

**Wechselwirkungen und Phosphorylierung des  
Adapterproteins Ste50 während der MAPK-vermittelten  
Signaltransduktion in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae***

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

vorgelegt von  
Claudia Karin Hopp  
aus Viersen

Düsseldorf, April 2005

---

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

Referent: Priv.-Doz. Dr. M. Ramezani Rad

Koreferent: Prof. Dr. G. Büldt

Tag der mündlichen Prüfung: 7.6.2005

---

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>G-Proteine und Signaltransduktion</b>	<b>1</b>
1.1.1	Der Pheromonantwortweg	5
1.1.2	Der Hochosmolare Antwortweg	8
1.1.3	Pseudohyphenbildung und der cAMP-Signalweg	9
<b>1.2</b>	<b>Ste50 fungiert als regulatorisches Adapterprotein</b>	<b>11</b>
1.2.1	Struktur und Funktion des Proteins Ste50	11
1.2.2	Struktur und Funktion der SAM-Domäne	13
1.2.3	Struktur und Funktion der RA-Domäne	16
1.2.4	Serin/Threonin reiche Region von Ste50	18
<b>1.3</b>	<b>Zielsetzung</b>	<b>18</b>
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>20</b>
<b>2.1</b>	<b>Materialien</b>	<b>20</b>
2.1.1	Hefestämme und Medien	20
2.1.1.1	Hefestämme	20
2.1.1.2	Medien	22
2.1.2	<i>Escherichia coli</i> Stämme und Medien	22
2.1.2.1	<i>E. coli</i> Stämme	22
2.1.2.2	Medien	23
2.1.3	Plasmide und Oligonukleotide	23
2.1.3.1	Plasmide	23
2.1.3.2	Oligonukleotide (Primer)	26
2.1.4	Chemikalien und Antikörper	27
2.1.4.1	Chemikalien	27
2.1.4.2	Antikörper	28
<b>2.2</b>	<b>Methoden</b>	<b>29</b>
2.2.1	PCR (Polymerase Chain Reaktion)	29
2.2.2	PCR von Zellen	29
2.2.2.1	Gen-Deletion in <i>S. cerevisiae</i>	30
2.2.2.2	Eliminierung der KanMX-Kassette	31
2.2.3	Transformation	31
2.2.3.1	Transformation in <i>S. cerevisiae</i>	31
2.2.3.1.1	Schnelltransformation in Mikrotiterplatten	31
2.2.3.1.2	High efficiency Transformation von Hefe nach der Lithiumacetatmethode	31
2.2.3.2	Transformation in <i>E. coli</i>	32
2.2.4	Präparation von Nukleinsäuren	32
2.2.4.1	Präparation von Plasmid- DNA aus <i>E. coli</i>	32
2.2.4.2	Präparation von Plasmid-DNA aus <i>S.cerevisiae</i>	32
2.2.5	Elektrophoretische Auftrennung von DNA	33
2.2.6	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	33
2.2.7	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	33
2.2.8	Enzymatische Modifikation von DNA	33
2.2.8.1	DNA-Restriktion	33
2.2.8.2	Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten	33
2.2.8.3	Ligation	33
2.2.9	Herstellung von Proteinrohextrakten	34
2.2.10	Nachweis der <i>lacZ</i> -Reportergenaktivität	34
2.2.10.1	Quantitative Bestimmung der $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität mit ONPG	34
2.2.10.2	Semiquantitative Bestimmung (X-Gal-Overlay)	35
2.2.11	Proteinbestimmung nach Bradford	35

2.2.12	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	35
2.2.13	Immunologischer Nachweis von Proteinen (Immunoblot)	36
2.2.13.1	Detektion durch Alkalische Phosphatase	36
2.2.13.2	Detektion mit Peroxidase-gekoppeltem Antikörper (LumiLight)	36
2.2.14	Differentielle Zellfraktionierung	36
2.2.15	Zellfraktionierung in einem Sukrose-Dichtegradienten	37
2.2.16	<i>in vitro</i> Bindungstest	37
2.2.17	Immunpräzipitation	38
2.2.18	Proteindephosphorylierung mit alkalischer Phosphatase	38
2.2.19	Nachweis der Hog1 – Phosphorylierung	39
2.2.20	Two-Hybrid-Interaktionsnachweis	39
2.2.21	Immunofluoreszenz	40
2.2.22	Induktion des Paarungspheromon-Antwortweges mit $\alpha$ -Faktor	41
2.2.23	Quantitative Paarungsanalyse	41
2.2.24	Sensitivitätstest gegenüber Hyperosmolarität	41
2.2.25	Induktion des pseudohyphalen Antwortweges	41
2.2.26	Induktion des Signalweges zur Bildung von Pseudohyphen in Flüssigmedium	41
2.2.27	Behandlung von <i>S. cerevisiae</i> mit cAMP	42
2.2.28	Bioinformatik	42

### **3 Ergebnisse 43**

#### **3.1 Wechselwirkungen zwischen dem cAMP/Ras-Signalweg und verschiedenen MAPK- vermittelten Signalwegen 43**

3.1.1	Auswirkung einer Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels auf die Transkription des Reportergens <i>FG(TyA)-lacZ</i>	43
3.1.2	Auswirkung einer Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels auf die Pheromonantwort	46
3.1.2.1	Transkription des Reportergens <i>FUS1-lacZ</i>	46
3.1.2.2	Quantitativer Paarungstest	48
3.1.2.3	Die Eigenschaften der Ste50-SAM-Mutanten bei einer Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels	49
3.1.3	Auswirkung einer Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels auf den hochosmolaren Antwortweg	50
3.1.3.1	Expression von <i>STRE-lacZ</i>	50
3.1.3.2	cAMP beeinflusst negativ das Wachstum auf hochosmolarem Medium	52
3.1.3.3	Eine Deletion von <i>STE50</i> verstärkt den cAMP-abhängigen Wachstumsdefekt auf hochosmolarem Medium	54
3.1.3.4	Galaktose beeinflusst die Osmosensitivität	54
3.1.3.5	Hog1-Phosphorylierung	56

#### **3.2 Untersuchungen zur RA-Domäne- (RAD) abhängigen Interaktion von Ste50 58**

3.2.1	Identifizierung von RAD-Interaktionspartnern im twohybrid-assay	58
3.2.1.1	Analyse der Interaktion von Ste50 mit den G-Proteinen Cdc42, Gic1, Ras1 und Ras2	58
3.2.1.2	Analyse der Interaktion von Ste50-RAD-Mutanten mit den G-Proteinen	60
3.2.2	Identifizierung von RAD-Interaktionspartnern im Pulldown-Assay	62
3.2.2.1	Analyse der Interaktion von Ste50 mit den G-Proteinen Cdc42, Ras1 und Ras2	62
3.2.2.2	Analyse der Interaktion von Ste50-RAD-Region mit den G-Proteinen	64
3.2.2.2.1	Analyse der Interaktion der Ste50-RAD-Region in pheromonbehandelten Zellen	64
3.2.2.2.2	Auswirkung einer Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels auf Ste50-RAD-Interaktionen in pheromonbehandelten Zellen	65
3.2.2.2.3	Analyse der Interaktion von Ste50-RAD unter Stickstoffmangelbedingungen	67

#### **3.3 Untersuchung der Verteilung von Ste50 während der Signaltransduktion 69**

3.3.1	Verteilung von GFP-Ste50 unter Überexpressionsbedingungen	69
3.3.2	Verteilung von GFP-Ste11 unter Überexpressionsbedingungen	71
3.3.3	Verteilung von Ste50 nach Überexpression der G-Proteine Ras2 <sup>val19</sup> bzw. Cdc42 <sup>val12</sup>	72
3.3.4	Verteilung von Ste50 unter Kontrolle des Eigenpromotors	75
3.3.4.1	Verteilung von Myc-Ste50 mittels Zellfraktionierung im Sukrosedichte-gradienten	75
3.3.4.2	Verteilung von Myc-Ste50 mittels differentieller Zellfraktionierung	77

---

<b>3.4</b>	<b>Untersuchungen zur Phosphorylierung von Ste50</b>	<b>79</b>
3.4.1	Signal- abhängige Phosphorylierung von Myc-Ste50	80
3.4.2	Die <i>in vivo</i> Phosphorylierung von Ste50 ist von der Ste11-Kinaseaktivität abhängig	82
3.4.2.1	Phosphorylierung von Ste50 in Kinase-Deletionsmutanten	83
3.4.2.2	Epistase- Untersuchung zur Phosphorylierung von Ste50	84
3.4.2.3	Phosphorylierung von Ste50 in Ste11-Kinase-Mutanten	86
3.4.2.4	Auswirkungen der Modifizierung von Ste50 auf die Stabilität	87
3.4.2.4.1	Stabilitätstest von Ste50 im hochosmolaren Antwortweg	88
3.4.2.4.2	Stabilitätstest von Ste50 im Pheromonantwortweg	89
3.4.2.4.3	Ubiquitinierungstest von Ste50	90
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>92</b>
<b>4.1</b>	<b>Wechselwirkungen von Ste50 in Abhängigkeit von verschiedenen Reizen</b>	<b>92</b>
4.1.1	cAMP-Spiegel und Signalintegration	93
4.1.2	Ste50 interagiert mittels der RA- Domäne mit den Proteinen Ras1 und Ras2	95
<b>4.2</b>	<b>Regulation von Ste50</b>	<b>99</b>
4.2.1	Verteilung von Ste50 während der Signaltransduktion	99
4.2.2	Pheromonabhängige Phosphorylierung von Ste50	101
4.2.3	Ste50 wird nach Einleitung des Pheromonweges in Abhängigkeit der Ste11- Kinase phosphoryliert	101
4.2.4	Die pheromonabhängige Phosphorylierung von Ste50 hat Einfluss auf die Stabilität	103
4.2.5	Model-Ste50 als regulierendes Adapterprotein	104
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>106</b>
<b>6</b>	<b>Literatur</b>	<b>107</b>
<b>7</b>	<b>Anhang</b>	<b>118</b>
<b>8</b>	<b>Abkürzungen</b>	<b>133</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 G-Proteine und Signaltransduktion

Für alle Zellen ist es essentiell, sich ändernden Umweltbedingungen anpassen zu können, um ihr Überleben zu sichern. Temperaturveränderungen, osmotische Schwankungen der Umgebung, sowie Änderungen des Nahrungsangebots, sind Stressbedingungen, auf die die Zelle reagieren muss. Aber auch Hormone und Pheromone dienen der Kommunikation zwischen den Zellen. Diese extrazellulären Signale werden durch Rezeptoren an der Plasmamembranoberfläche erkannt und über eine Signaltransduktionskaskade weitergeleitet, um geeignete Antworten zu produzieren.

GTP-bindende Proteine (G-Proteine) stellen in beinahe allen Eukaryonten die wichtigsten Vermittler der Signalantwort dar. Signalweiterleitende G-Proteine werden in zwei Gruppen klassifiziert, den heterotrimeren G-Proteinen mit einem hohen Molekulargewicht und den kleinen monomeren G-Proteinen mit niedrigem Molekulargewicht (Hadley, 1988). Kleine monomere G-Proteine besitzen eine Größe von 20-40 kDa. Inzwischen sind innerhalb der Eukaryonten von der Hefe bis zum Menschen mehr als 100 kleine G-Proteine identifiziert worden, die eine Superfamilie darstellen (Bourne *et al.*, 1990; Hall, 1990; Hall, 1998; Takai *et al.*, 1992). Die Mitglieder dieser Superfamilie können strukturell in mindestens fünf Familien klassifiziert werden, zu denen die Ras-, Rho-, Rab-, Sar1/Arf- und Ran-Familien gehören (Takai *et al.*, 2001). Die Funktionen einer Vielzahl kleiner G-Proteine konnten in den letzten Jahren aufgezeigt werden: die Ras-Subfamilie reguliert hauptsächlich die Genexpression, wohingegen Mitglieder der Rho/Rac/Cdc42-Subfamilie in die Regulation der cytoskeletalen Reorganization und Genexpression involviert sind. Die Rab-Subfamilie sowie die Sar1/Arf-Subfamilie spielen eine Rolle für die Regulation des intrazellulären Vesikeltransportes, während die Ran-Subfamilie in den nukleocytoplasmatischen Transport innerhalb der G1- und G2-Phase des Zellzyklus und der Mikrotubuli Organization während der M-Phase involviert ist (Takai *et al.*, 2001).

Strukturell zeichnen sich kleine G-Proteine dadurch aus, dass sie Konsensussequenzen enthalten, die für die spezifische Interaktion mit GDP und GTP sowie für die GTPase-Aktivität notwendig sind (Takai *et al.*, 1992). Weiterhin enthalten sie eine Region, die für die Interaktion mit ihren Effektoren benötigt wird (Effektorbinderegion). Zusätzlich besitzen kleine G-Proteine der Ras, Rho/Rac/Cdc42-Familien Sequenzen in ihrer carboxyterminalen Region, die posttranslationalen Modifikationen mit Lipiden unterzogen werden, wie Farnesylierungen, Geranylgeranylierungen sowie Palmitoylierungen (Casey & Seabra, 1996).

Kleine monomere G-Proteine fungieren als molekulare Schalter. Sie bestehen aus zwei ineinander konvertierbare Formen: einen inaktiven, GDP-gebundenen Zustand, sowie einen aktiven, GTP-gebundenen Zustand. Ein ankommendes Signal stimuliert den Austausch von GDP gegen GTP. Diese Reaktion wird durch GDP-GTP-Austauschfaktoren (GEF) katalysiert und führt zu konformellen Änderungen in der Effektorbinderegion, so dass diese Region mit abwärts gelegenen Effektoren interagieren kann. Die Abschaltung des Signals erfolgt, indem die GTP-gebundene Form durch eine

intrinsische GTPase-Aktivität sowie unter Zuhilfenahme GTPase aktivierender Proteine (GAP), in die GDP-gebundene Form überführt wird. Die gebundenen Effektoren können wieder freigegeben werden. Somit fungieren kleine GTP-bindende Proteine als molekulare Schalter, welche ein ankommendes Signal an abwärts gelegene Effektoren weiterleiten.

In der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* wurden die Funktionen einer Vielzahl von kleinen monomeren G-Proteinen und ihrer Effektoren untersucht. Anhand von Sequenzanalysen konnten in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* 4 Mitglieder der Ras-Familie, 6 Mitglieder der Rho-Familie, 11 Mitglieder der Rab-Familie, 7 Mitglieder der Sar1/Arf-Familie, sowie 2 Mitglieder der Ran-Familie identifiziert werden (Takai *et al.*, 2001). Beispielsweise sind die kleinen G-Proteine Ras1 und Ras2 der Ras-Familie und Cdc42 der Rho-Familie zuzuordnen (Takai *et al.*, 2001).

Die Ras-Proteine Ras1 und Ras2 kodieren für Proteine, welche strukturelle sowie funktionelle Homologien zu dem humanen Ras-Protein aufweisen (Broach & Deschenes, 1990; Gibbs & Marschall, 1989). Ras-Proteine nehmen eine wichtige Rolle in dem cAMP-Signalweg ein, der in die Kontrolle des Stoffwechsels, der Stressresistenz und der Zellproliferation involviert ist (Broach & Deschenes, 1990). Die Regulation der Proteine Ras1 und Ras2 erfolgt über die GDP-GTP-Austauschfaktoren (GEF) Cdc25 und Sdc25 (Broek *et al.*, 1987; Camonis *et al.*, 1986) sowie über die Ras-spezifischen GTPasen Ira1 und Ira2 (Tanaka *et al.*, 1989; Tanaka *et al.*, 1990). Ras-Proteine werden einer Reihe von posttranslationalen Modifikationen an einer carboxyterminalen Sequenz, dem CAAX-Motif (C: aliphatische Aminosäure, X: beliebige Aminosäure), unterzogen. Diese Modifikationen bestehen aus einer Farnesylierung, einem Schnittereignis, einer Methylveresterung sowie einer Palmitoylierung (Casey, 1994; Magee & Marshall, 1999). Die posttranslationale Modifikation der Ras-Proteine, insbesondere die Farnesylierung ist erforderlich für die Verankerung der Proteine an der Plasmamembran (Hancock *et al.*, 1990) und für die effiziente Aktivierung ihres Effektors, der Adenylatzyklase Cyr1 (Kuroda *et al.*, 1993). Cyr1 ist ein integrales Membranprotein, welches ATP in cAMP umwandelt. Die Adenylatzyklase Cyr1 enthält eine RA-Domäne (Ras-Associating), welche für die Bindung und Regulierung von Cyr1 durch Ras notwendig ist (Kido *et al.*, 2002).

Ein weiteres monomeres G-Protein in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* stellt das Protein Cdc42 dar. Cdc42 ist in die Regulation einer Vielzahl morphogenetischer Prozesse während des Zellzykluses, speziell in die Entwicklung der Zellpolarität involviert (Adams *et al.*, 1990; Johnson & Pringle, 1990). Am carboxyterminalen Ende trägt Cdc42 eine Geranylgeranyl-Modifizierung (Maltese & Sheridan, 1990; Finegold *et al.*, 1991; Yamane *et al.*, 1991). Mittels dieser Modifizierung ist Cdc42 an der Zellmembran verankert (Maltese & Sheridan, 1990). Cdc42 ist nicht nur an der Plasmamembran, an Stellen polarisierten Wachstums (Knospe, Knospenansatzstelle, Knospenring, Shmoospitze), sondern ebenfalls im Cytoplasma lokalisiert (Ziman *et al.*, 1993). Die Regulation von Cdc42 erfolgt durch den Guaninnukleotidaustauschfaktor Cdc24 (Sloat *et al.*, 1981; Zheng *et al.*, 1994) und den GTPase aktivierenden Enzymen Bem3 und Rga1 (Stevenson *et al.*, 1995; Zheng *et al.*, 1994). Eine Vielzahl von Cdc42-Effektoren ist bekannt, die mit der aktivierten GTP-gebundenen Form von Cdc42 interagieren

und in der Zelle eine Fülle von Antworten vermitteln. In der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* werden den Cdc42-Effektoren u.a. die zu der p21-aktivierten Proteinkinasefamilie (PAK) gehörenden Proteinkinasen Ste20, Cla4 und Skm1 (Cvrckova *et al.*, 1995; Leberer *et al.*, 1997; Martin *et al.*, 1997) und die in die Zellpolarisierung involvierten Proteine Gic1 und Gic2 (Brown *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 1997) zugeordnet.

Neben monomeren G-Proteinen existieren heterotrimere G-Proteine, die eine wichtige Rolle in der G-Protein-rezeptorvermittelten (GPCR) Signaltransduktion einnehmen. Heterotrimere G-Proteine leiten die Ligandenbindung an den Rezeptoren in geeignete intrazelluläre Antworten weiter, die meistens in einer Proteinkinasekaskade konvergieren. Ein heterotrimeres G-Protein setzt sich aus einer  $G_{\alpha}$ -, einer  $G_{\beta}$ - und einer  $G_{\gamma}$ -Untereinheit zusammen (Gilman, 1987; Hepler & Gilman, 1992). Die Klassifizierung der heterotrimeren G-Proteine erfolgt anhand der DNA-Sequenzhomologien der  $G_{\alpha}$ -Untereinheiten (Strathmann & Simon, 1991; Wilkie *et al.*, 1992). Heterotrimere G-Proteine liegen inaktiv in einem GDP-gebundenen heterotrimeren Zustand vor und sind mit einem Siebentransmembran-Rezeptor (STMR) assoziiert. Nach der Ligandenbindung an den Rezeptor kommt es infolge einer Konformationsänderung des Rezeptors und des assoziierten G-Proteins an der  $G_{\alpha}$ -Untereinheit zum Austausch von GDP gegen GTP. Die GTP-Bindung führt zu einer Dissoziation der  $G_{\alpha}$ -GTP-Untereinheit von den  $G_{\beta\gamma}$ -Untereinheiten und schließlich zu der Aktivierung von abwärts gelegenen Effektoren. Die Aktivierung der Effektoren kann sowohl durch  $G_{\alpha}$ -GTP als auch durch die  $G_{\beta\gamma}$ -Untereinheiten erfolgen.  $G_{\alpha}$  und  $G_{\beta\gamma}$  können divergente Signale erzeugen, durch Aktivierung verschiedener Effektoren und konvergente Signale durch Aktivierung eines Effektors. Sie können in der Signaltransduktion sowohl aktivierend als auch inhibierend wirken (Linder & Gilman, 1992; Clapham & Neer, 1993). Die Signaldauer ist abhängig von der GTPase-Aktivität der  $G_{\alpha}$ -Untereinheit, die durch verschiedene Effektoren wie RGS (regulators of G protein signalling) beschleunigt werden kann (Kim *et al.*, 1989; Ito *et al.*, 1992). Das aktivierte G-Protein leitet das Signal über eine Vielzahl von Effektorenzymen weiter, welches typischerweise in der Aktivierung einer Proteinkinasekaskade resultiert.

Mitogen-aktivierte Protein Kinase (MAPK) Kaskaden gehören zu den bekanntesten Signalkaskaden, die unterhalb der Ebene der G-Proteine anzufinden sind. Sie sind an einer Vielzahl von zellulären Programmen, wie Zelldifferenzierung, Zellbewegung, Zellteilung und Zelltod beteiligt. MAPK-Kaskaden sind in allen Eukaryonten hoch konserviert und nehmen eine Schlüsselrolle in der Regulation der Genexpression ein. Sie bestehen aus drei Hauptkomponenten, der MAP-Kinase (MAPK), dem MAPK-Aktivator (MAPKK oder MEK), und dem MAPKK-Aktivator (MAPKKK oder MEKK). MAPKKK besitzen eine aminoterminal, regulatorische Domäne und eine carboxyterminale Proteinkinasedomäne. Wenn die Kaskade ausgelöst wird, aktiviert die MAPKKK die MAPKK durch Phosphorylierung eines Serin- und Threoninrestes in einem konservierten aminoterminalen Bereich der MAPKK. Die aktivierte MAPKK phosphoryliert nun ihrerseits die MAPK an einem Threonin- und einem Tyrosinrest in dem Aktivierungsloop der konservierten Kinasedomäne, wobei deren



Kinaseaktivität angeregt wird (Johnson *et al.*, 1996). Es kommt nun zu einer Translokation der MAPK aus dem Cytosol in den Zellkern, wo sie Zielgene, wie Transkriptionsfaktoren aktiviert. Die Mechanismen, die die Spezifität und Dauer der Signalweiterleitung bestimmen, sind bisher noch wenig bekannt.

Die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* bietet sich als Modellorganismus an, um die Signalvermittlung zwischen dem G-Protein-Rezeptorkomplex an der Plasmamembran und den verschiedenen MAPK-Modulen aufzuklären. In der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* existieren fünf verschiedene MAPK-Module, welche die Paarung, das filamentöse Wachstum in haploiden sowie diploiden Zellen, die Antwort auf hohe Osmolarität (*HOG*-Weg), den Zellwandaufbau (*PKC1*-Weg) und die Sporulation (*SMK1*-Weg) regulieren (Herskowitz, 1995; Gustin *et al.*, 1998). Ein weiterer sechster Weg wurde postuliert, der die Zellwandintegrität in vegetativen Zellen reguliert (*SVG*-Weg, Cullen *et al.*, 2000; Elion, 2001).

Es zeigt sich, dass diese Kaskade-Module in makromolekulare Komplexe mit Gerüstproteinen sowie Adapterproteinen eingebettet sind, die trotz gleicher beteiligter Proteine bei unterschiedlichen Eingangssignalen erst die eigentliche Signalidentität bewirken und unterschiedliche Ausgangssignale liefern (Gustin *et al.*, 1998; Park *et al.*, 2003). Beispielsweise teilen sich die drei MAPK-vermittelten Signalwege der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* zur Induktion der Paarung, des invasiven Wachstums bzw. der Osmotoleranz vier gemeinsame Komponenten und stehen in einer dynamischen Wechselwirkung miteinander (Abb. 1.1, Ramezani Rad, 2003). Dies deutet auf ein Netzwerk von Wechselwirkungen zwischen diesen Wegen hin. Die Flexibilität der Verbindungen der Signalwege kann zum einen Vorteile für das Überleben in einer komplexen und sich ändernden Umwelt darstellen. Zum anderen muss die Zelle Mechanismen entwickelt haben, um unerwünschte Wechselwirkungen zu supprimieren und somit die Signalidentität zu gewährleisten. In der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* sind die verschiedenen Signalwege zur Induktion der Paarung, des invasiven Wachstums und der Osmotoleranz trotz gemeinsamer Signalkomponenten in der Lage, unabhängig voneinander das Signal vom G-Protein-Rezeptorkomplex an die jeweilige MAPK-Kaskade spezifisch weiterzuleiten. Hierbei könnte eine dynamische subzelluläre Lokalisation der Signalkomponenten dazu beitragen, dass unterschiedliche Interaktionspartner dem jeweiligen Modul zur Verfügung stehen und somit das Signal spezifisch weitergeleitet werden kann. Weiterhin tragen Gerüstproteine dazu bei, die Wege voneinander zu isolieren und schließlich als Adapterprotein das MAPK-Modul mit den G-Protein-Rezeptorkomponenten an der Plasmamembran zu verbinden. Weitere Adapterproteine, wie das Protein Ste50 könnten hierbei ebenfalls eine wichtige Rolle spielen. Um genaueren Aufschluss über das Netzwerk und die Mechanismen der Signalvermittlung zwischen dem G-Protein-Rezeptorkomplex und dem MAPK-Modul zu erhalten, ist es von Interesse, die Signalwege der Paarung, der Osmotoleranz und der Pseudohyphenbildung, die miteinander in Wechselwirkung stehen, genauer zu studieren.

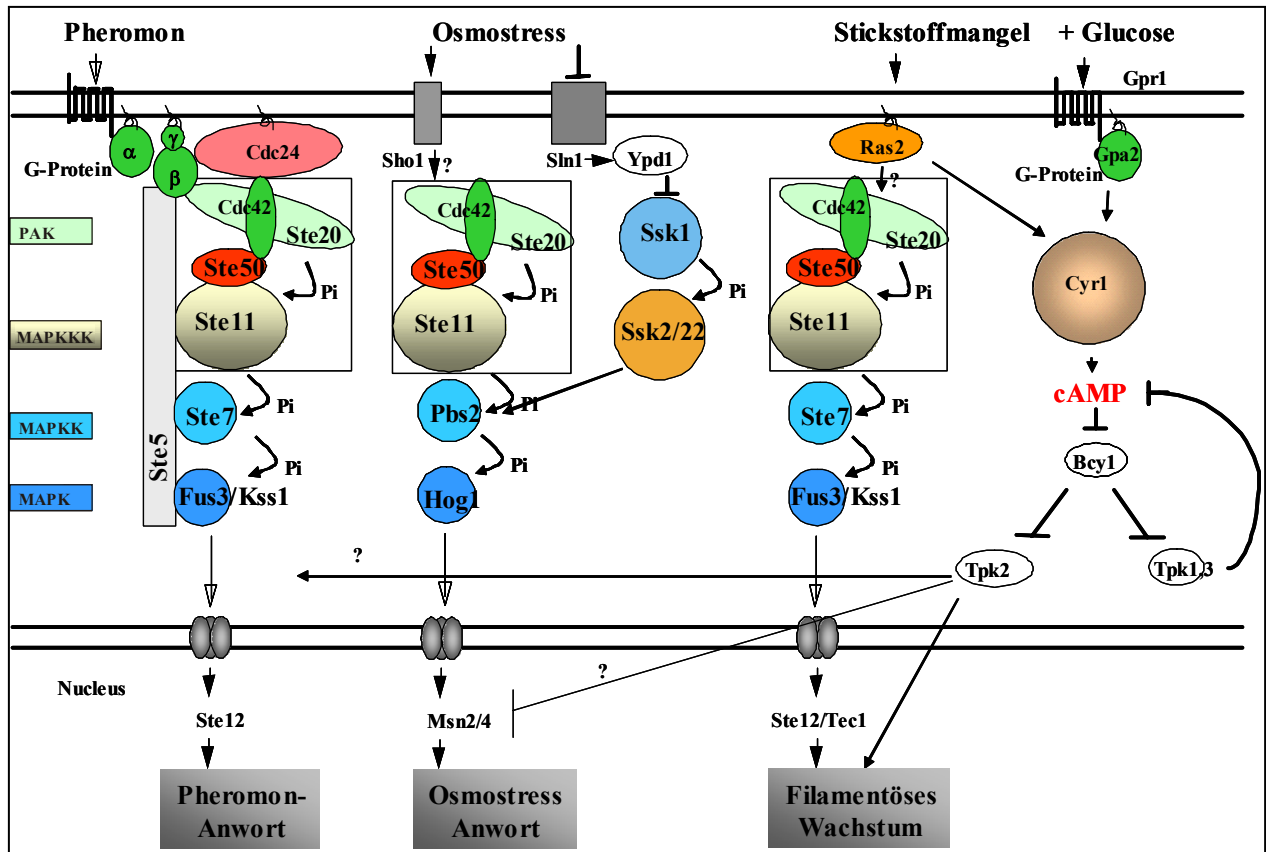


Abbildung 1.1 Schematische Darstellung der Signalwege für die Induktion der Paarung, des invasiven Wachstums oder der Pseudohyphenbildung und dem Signalweg zur Anpassung an hyperosmolare Stressbedingungen. Weitere Einzelheiten siehe Text.

### 1.1.1 Der Pheromonantwortweg

Der Paarungspheromonweg ist der am besten verstandene Signalweg aller eukaryotischen MAPK-Wege. Haploide Zellen unterschiedlichen Paarungstyps *MATa* bzw. *MATα* sind in der Lage zu paaren. Hierfür sezernieren die Zellen kleine Peptide, die Paarungspheromone  $\alpha$ -Faktor bzw.  $\alpha$ -Faktor. *MATa* -Zellen reagieren auf  $\alpha$ -Faktor und *MATα* auf a-Faktor, indem sie in der G1-Phase des Zellzykluses arretieren und sich einer Formveränderung unterziehen (Shmoobildung). Diese erlaubt den Zellen sich einander zu nähern und sich auf die Zell- und Kernfusion vorzubereiten. Die Zellen sind nun in der Lage, mit dem Paarungspartner über Agglutinine zu aggregieren und nach der Zellfusionierung (Plasmogamie) und Kernfusionierung (Karyogamie) eine Zygote zu bilden. Die aus diesem Vorgang resultierenden diploiden Zellen stellen den bevorzugten Zustand einer Hefepopulation dar. Diploide Zellen sind unter bestimmten Bedingungen in der Lage sich dem Vorgang einer Meiose zu unterziehen und wieder in den Zellzyklus einzutreten oder sogenannte Pseudohyphen zu bilden (Abb. 1.2).

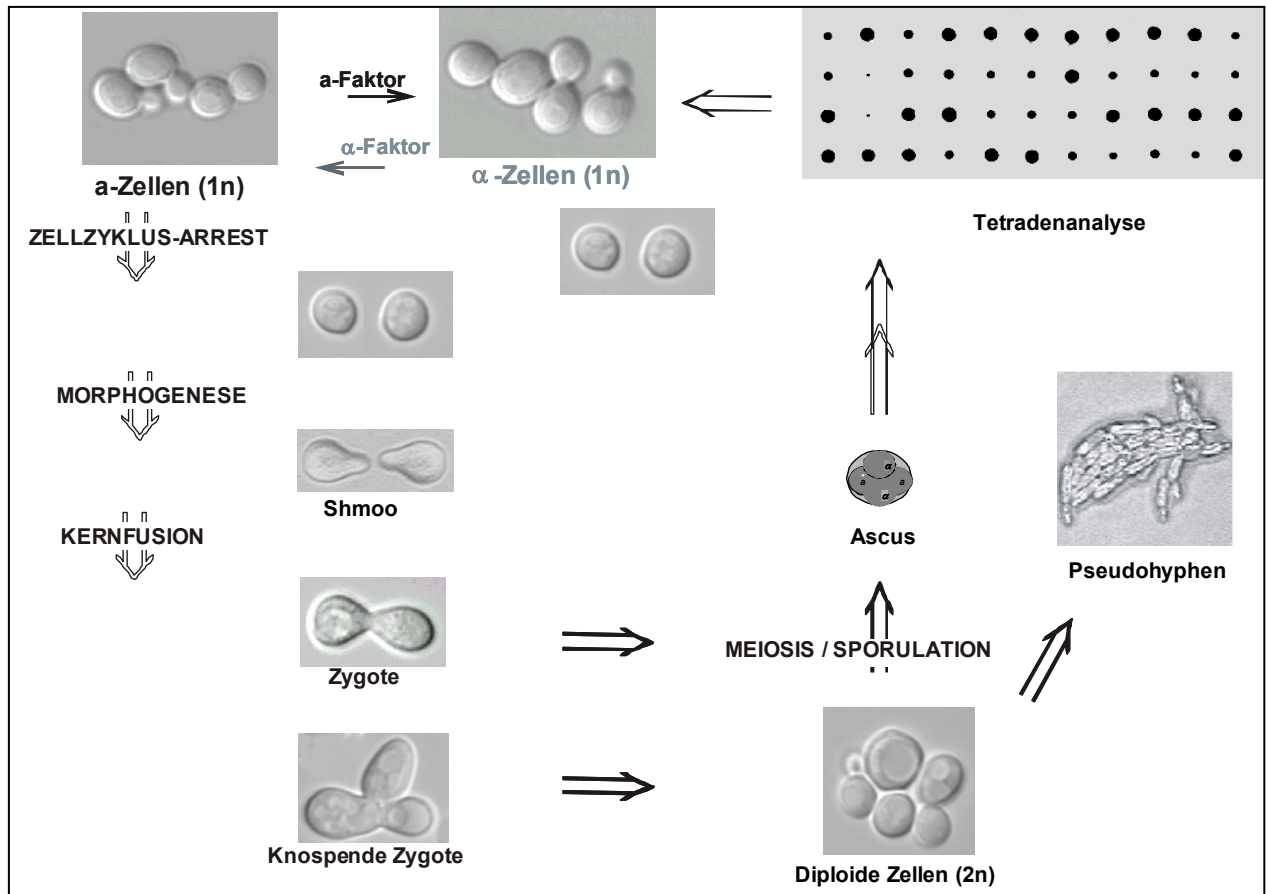


Abbildung 1.2 Schematische Darstellung des Paarungsprozesses in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*

Der Weg des Pheromonsignals vom Pheromonrezeptor an der Zelloberfläche über das heterotrimere G-Protein, eine Mitogen-aktivierte-Protein (MAP)-Kinasekaskade bis hin zum Transkriptionsfaktor für pheromoninduzierte Gene im Kern, ist im wesentlichen bekannt.

Die Einleitung der Signaltransduktionskaskade erfolgt, indem das zelltypspezifische Pheromon an den jeweiligen Sieben-Trans-Membran-Rezeptor (STMR) Ste2 in *MATa*-Zellen (Jeness & Spatrick, 1986) bzw. Ste3 in *MATα*-Zellen (Nakayama *et al.*, 1985) bindet und hierdurch ein heterotrimeres G-Protein, welches aus den Untereinheiten  $G_{\alpha}$  (Gpa1),  $G_{\beta}$  (Ste4) und  $G_{\gamma}$  (Ste18) zusammengesetzt ist, aktiviert. Dies führt zu einem GDP-GTP-Austausch des  $G_{\alpha}$ -Proteins und einer anschließenden Dissoziation der  $G_{\beta\gamma}$ -Untereinheit, die dadurch in der Lage ist, an  $G_{\beta\gamma}$ -Effektoren zu binden (Leberer *et al.*, 1997). Das Signal wird daraufhin von dem  $G_{\beta\gamma}$ -Heterodimer an die MAPKKK Ste11 weitergeleitet, über einen Weg, der die Proteine Cdc42, Ste20, Ste50 und Ste5 involviert (Wu *et al.*, 1995; Zhao *et al.*, 1995; Xu *et al.*, 1996; Elion, 2001; Lamson *et al.*, 2002). Bei der  $G_{\beta\gamma}$ -vermittelten Aktivierung der MAPK-Kaskade sind die Proteine Ste5 und Ste20 beteiligt (Leberer *et al.*, 1992; Ramer & Davis, 1993; Leberer *et al.*, 1993; Mukai *et al.*, 1993). Zum einen bindet die  $G_{\beta\gamma}$ -Untereinheit an die RING-H2-Domäne des Proteins Ste5, das ein Gerüstprotein darstellt, welches die MAPKKK Ste11, die MAPKK Ste7 und die MAPK Fus3 in einem hochmolekularen Komplex zusammenhält (Choi *et al.*, 1994; Inoye *et al.*, 1997).

Durch Bindung von Ste5 an die  $G_{\beta\gamma}$ -Untereinheit wird der Signalisierungskomplex an die Plasmamembran rekrutiert. Neben Ste5 bindet die  $G_{\beta\gamma}$ -Untereinheit an eine hoch konservierte carboxyterminale Domäne des Proteins Ste20 (Leeuw *et al.*, 1998). Bei Ste20 handelt es sich um ein Mitglied der PAK (p21 activated kinase)-Familie (Fanger *et al.*, 1997), welches im aminoterminalen Bereich eine Bindestelle für das kleine G-Protein Cdc42 besitzt. GTP-Cdc42 interagiert mit Ste20 und ist für die Lokalisierung von Ste20 zu Regionen polarisierten Wachstums verantwortlich (Simon *et al.*, 1995; Peter *et al.*, 1996; Leberer *et al.*, 1997; Pryciak & Huntress, 1998; Wu *et al.*, 1999; Moskow *et al.*, 2000). Die Bindung von Ste20 an das kleine G-Protein Cdc42 scheint weiterhin die Kinaseaktivität sowie die Signalweiterleitung von Ste20 zu stimulieren. Dieser Schritt ist erforderlich für die  $G_{\beta\gamma}$ -vermittelte Signalweiterleitung, wird aber nicht durch  $G_{\beta\gamma}$  selbst reguliert (Lamson *et al.*, 2002). Aktiviertes Ste20 ist nun in der Lage, Ste11 direkt zu phosphorylieren und hierdurch zu aktivieren (Wu *et al.*, 1995; Drogen *et al.*, 2000; Drees *et al.*, 2000). Die Phosphorylierung von Ste11 erfolgt innerhalb einer aminoterminalen Region und ist essentiell für die Funktion von Ste11 (Drogen *et al.*, 2000). Hierdurch wird die Interaktion der inhibitorischen aminoterminalen regulatorischen Domäne mit der distalen katalytischen Domäne von Ste11 aufgehoben und somit deren Autoinhibition (Drogen *et al.*, 2000). Eine weitere wichtige Rolle in der Regulation der Aktivität von Ste11 spielt das Protein Ste50, welches stabil mit Ste11 interagiert und eine wichtige Komponente zur Aufrechterhaltung der Pheromon induzierten Signaltransduktion darstellt (Xu *et al.*, 1996). Die aktivierte MAPKKK Ste11 phosphoryliert nun die MAPKK Ste7, welche die MAPK Fus3 und Kss1 ebenfalls durch Phosphorylierung aktiviert. Ein gemeinsames Substrat beider MAPK stellt der Transkriptionsfaktor Ste12 dar (Oehlen & Cross, 1994; Elion *et al.*, 1993). *STE12* kodiert für einen Transkriptionsaktivator, der an bestimmte Regionen der DNA, die „Pheromone Responsive Elements“ (PRE), bindet und dadurch die Transkription der nachgeschalteten, paarungsspezifischen Gene induziert (Yuan & Fields, 1991). Weiterhin reguliert Fus3 die Degradation des Transkriptionsaktivators Tec1 während der Paarung und bestimmt damit die Signalisierungsspezifität in der Hefe (Chou *et al.*, 2004; Bao *et al.*, 2004). Der Transkriptionsfaktor Ste12 wird unter anderem für die Regulation der Transkription der Gene *FUS1* und *FAR1* benötigt. Das Protein Fus1 spielt während der Paarung eine wichtige Rolle für die Fusion der Zellen und ist an der Spitze der Zellprojektion (Shmoo) lokalisiert (Trueheart & Fink, 1989). Far1 stellt ein Substrat von Fus3 dar, das die G1-Phase des Zellzyklusarrestes fördert, indem es G1-cyklinabhängige Kinasen inhibiert (O'Shea & Herskowitz, 2000). Das Protein Far1 spielt weiterhin eine wichtige Rolle bei der Etablierung von Stellen polarisierten Wachstums. Es fungiert hierbei als Gerüstprotein. In Anwesenheit von Pheromon bindet Far1, ähnlich wie Ste5, mittels einer RING-H2-Domäne an die  $G_{\beta\gamma}$ -Untereinheit und verbindet somit die Komponenten des Polarisierungsweges Cdc24, Cdc42 und Bem1 mit dem Heterodimer  $G_{\beta\gamma}$  an der Plasmamembran (Butty *et al.*, 1998; Nern & Arkowitz, 2000). Lokal aktiviertes Cdc42-GTP bindet daraufhin Effektoren, wie Ste20, Bni1, Gic1 und Gic2, um die Polarisierung des Aktinzytoskelettes zu regulieren (Chant, 1999).

Für die Zelle ist es nicht nur wichtig, ein Signal effizient weiterleiten zu können, sondern ebenfalls sich an Signale anpassen zu können. Somit ist die Zelle in der Lage schnell und geeignet auf sich ändernde Umweltbedingungen reagieren zu können. In *S. cerevisiae* findet dieser Prozess gegenüber dem Pheromonsignal, auch als Adaptation (Desensibilisierung) bezeichnet, an mehreren Stellen des G-Protein-vermittelten Signaltransduktionssystems statt. Zu den Adaptations-Mechanismen gehören u.a. die Degradation von Peptidliganden, die Hydrolyse von GTP durch  $G_{\alpha}$ , welche durch Erhöhung der GTPase-Aktivität von  $G_{\alpha}$  durch das RGS Sst2 beschleunigt wird, sowie die Dephosphorylierung von Zielproteinen, wie Fus3 (Dohlman & Thorner, 2001). Ein weiterer Mechanismus der Desensibilisierung stellt die Feedback-Regulation dar, welche die Phosphorylierung, die Internalisierung und Degradation von Zelloberflächenrezeptoren, sowie die Degradation der Proteine Ste7 und Ste11 beinhaltet (Hicke & Riezman, 1996; Hicke *et al.*, 1998; Roth *et al.*, 1998; Wang & Dohlman, 2002; Wang & Elion, 2003; Esch & Errede, 2002). Eine weitere Feedback-Regulation findet statt, indem das Protein  $G_{\alpha}$  mit der MAPK Fus3 interagiert und hierdurch das Paarungssignal moduliert (Metodiev *et al.*, 2002).

### 1.1.2 Der Hochosmolare Antwortweg

Unter erhöhten osmotischen Bedingungen akkumulieren Hefezellen hohe Konzentrationen an Glycerol, um den osmotischen Unterschieden zwischen dem Zellinneren und der externen Umgebung entgegenzuwirken (Blomberg & Adler, 1992). Hohe Osmolarität führt zur Aktivierung des *HOG* (high osmolarity glycerol) MAP-Kinase-Moduls und schließlich zur Aktivierung der MAPK Hog1 (Brewster *et al.*, 1993). Dies hat eine erhöhte Synthese von Glycerol in der Zelle zur Folge, indem die Transkription von Genen aktiviert wird, die für die Glycerolsynthese erforderlich sind (Larsson *et al.*, 1993; Albertyn *et al.*, 1994). Die MAP Kinase Kaskade zur Vermittlung der Osmosensitivität besteht aus fünf Proteinkinasen. Es existieren drei MAPKKK Ssk2, Ssk22 und Ste11, die eine einzelne MAPKK Pbs2 aktivieren, diese wiederum aktiviert die MAPK Hog1. Die Hyperosmolarität wird von der Zelle über zwei voneinander unabhängigen Transmembransensoren wahrgenommen: Sho1 und Sln1. Neben Sho1 ist das mucinähnliche Protein Msb2 in die Signalweiterleitung involviert (O'Rourke & Herskowitz, 2002). Die Osmosensoren geben das Signal über zwei konvergierende Wege an die MAPKK Pbs2 weiter.

Der eine Weg erfolgt über ein Phosphoübertragungs-System, bestehend aus den drei Komponenten Sln1, Ypd1 und Ssk1. Der Sln1 Osmosensor zeigt Homologien zu den prokaryotischen Zwei-Komponenten-Systemen. Dieses Protein ist ein Transmembranprotein, welches drei Domänen besitzt: eine aminoterminal Sensor-domäne und carboxyterminal eine cytoplasmatische Histidinkinase-Domäne sowie eine Receiverdomäne mit einem konservierten Aspartatrest (Ota & Varshavsky, 1993; Maeda *et al.*, 1994). Unter normalen Bedingungen vermittelt der Osmosensor Sln1 den Phosphotransfer eines Phosphatrestes von ATP auf einen Histidinrest in der Histidinkinasedomäne von Sln1, weiter auf einen Aspartatrest der Receiverdomäne von Sln1, danach auf einen Histidinrest von Ypd1 und von dort auf einen konservierten Aspartatrest der Receiverdomäne von Ssk1 (Maeda *et al.*, 1994; Posas *et al.*,

1996). Unter hochosmolaren Bedingungen wird die Histidinkinase-Aktivität von Sln1 supprimiert und es liegt unphosphoryliertes Ssk1 vor. Die unphosphorylierte Form von Ssk1 aktiviert die MAPKKK Ssk22 und Ssk2, indem es mittels der Receiverdomäne an die N-terminale inhibitorische Domäne von Ssk2 bindet und somit dessen Autophosphorylierung einleitet (Posas & Saito, 1998). Die aktivierten MAPKKK Ssk2 und Ssk22 aktivieren die MAPKK Pbs2.

Der zweite Weg wird über das mucinähnliche Protein Msb2 sowie dem Sho1 Osmosensor vermittelt (O'Rourke & Herskowitz, 2002). Sho1 enthält vier Transmembransegmente und eine C-terminale Region, die eine SH3-Domäne (SRC Homolog 3: Pawson & Gish, 1992) enthält. Diese bindet an eine N-terminale, prolinreiche Region von Pbs2. Diese Interaktion ist essentiell für die Aktivierung von Pbs2 durch Sho1 (Maeda *et al.*, 1995). Sho1 aktiviert weiterhin Cdc42. Aktiviertes GTP-gebundenes Cdc42 rekrutiert daraufhin Ste20 an die Plasmamembran, welches Ste11 daraufhin aktiviert (Raitt *et al.*, 2000). Ste11 wird durch eine direkte Assoziierung mit der C-terminalen Region von Sho1 an die Plasmamembran rekrutiert (Zarrinpar *et al.*, 2004). Weiterhin bindet Pbs2 die Proteine Sho1, Ste11 sowie Hog1 und verhindert möglicherweise hierdurch einen Informationsaustausch mit anderen Signalwegen (Posas & Saito, 1997). Somit fungieren Pbs2 und Sho1 gemeinsam als Gerüstproteine des hochosmolaren Antwortwegs, welche die Komponenten des HOG-Weges in einem Komplex zusammenhalten (Zarrinpar *et al.*, 2004). Die Aktivierung von Pbs2 erfolgt über die MAPKKK Ste11 und deren assoziiertem Protein Ste50 (Posas & Saito, 1997; Posas *et al.*, 1998; Jansen *et al.*, 2001). Aktiviertes Pbs2 aktiviert die MAPK Hog1, die daraufhin in den Zellkern transloziert wird (Ferrigno *et al.*, 1998). Im Nukleus erfolgt die Hog1-vermittelte Aktivierung der Transkriptionsfaktoren Sko1, Msn2, Msn4, Hot1 sowie Msn1. Msn2 und Msn4 binden an *STRE*-Sequenzen (stress responsible elements) in Promotoren verschiedener Zielgene, wie u.a. *CTT1* (Katalase; Schüller *et al.*, 1994). Des Weiteren wird die Transkription verschiedener Gene wie *GPDI*, einer Glycerol-3-Phosphat-Dehydrogenase, sowie *HOR2*, einer Glycerol-3-Phosphatase, die für die Glycerolsynthese in der Zelle benötigt werden, veranlasst (Norbeck *et al.*, 1996; Hirayama *et al.*, 1995).

Nachdem die initiale Antwort und die Signalweiterleitung stattgefunden und die Zellen sich an die veränderten Bedingungen angepasst haben, wird die Signalweiterleitungsmechanik wieder abgeschaltet. Dies wird dadurch erreicht, dass Hog1 dephosphoryliert und aus dem Zellkern transportiert wird (Ferrigno *et al.*, 1998). Eine Vielzahl von Phosphatasen wie die Phospho-Tyr-spezifischen Phosphatasen Ptp2 und Ptp3 und einige Phospho-Thr-spezifischen Phosphatasen (Ptc1, Ptc2 und Ptc3) regulieren die Aktivität von Hog1 wieder herunter. Zusätzlich wird der Aktivator Ssk1 während des Adaptationsprozesses in einer Ubiquitin- und Proteasom-abhängigen Weise degradiert (Sato *et al.*, 2003).

### 1.1.3 Pseudohyphenbildung und der cAMP-Signalweg

Die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* zeigt einen Pseudohyphendimorphismus, der durch das Nährstoffangebot im Medium reguliert wird. Unter Stickstoffmangelbedingungen und gleichzeitigem Angebot einer fermentierbaren Kohlenstoffquelle zeigen diploide *Saccharomyces cerevisiae* Zellen die

Induktion vom pseudohyphalen Wachstum (Gimeno *et al.*, 1992). Stickstoffmangelbedingungen werden von der Zelle mittels der hochaffinen Ammoniumpermease Mep2 wahrgenommen (Lorenz & Heitman, 1998a). Die niederaffine Ammoniumpermease Mep1 kann die Funktionen von Mep2 übernehmen (Lorenz & Heitman, 1998b). Während des filamentösen Wachstums ändern die Zellen ihr Wachstum von einzelnen ovalen Zellen bis hin zu Ketten von elongierten Zellen, den Pseudohyphen (Gimeno *et al.*, 1992). Pseudohyphale Zellen sind deutlich verlängert und wechseln zu einem unipolaren Knospungsmuster, wobei Mutter- und Tochterzellen physikalisch verbunden bleiben. Die Zellen sind in der Lage in den Agar hineinzuwachsen (Gimeno *et al.*, 1992; Kron *et al.*, 1994). Ein verwandtes Phänomen, das invasive Wachstum, ist bei haploiden Zellen zu beobachten (Roberts & Fink, 1994).

Eine Reihe molekulargenetischer Untersuchungen hat gezeigt, dass der Pseudohyphen-Dimorphismus in diploiden Zellen der Hefe *S. cerevisiae* unter der Kontrolle eines komplexen regulatorischen Netzwerks steht. Im Zentrum dieses Netzwerks stehen zwei parallel wirkende Signalwege, die sich gegenseitig beeinflussen können (Rupp *et al.*, 1999). Beide Signalwege werden durch Ras2 vermittelt. Der eine Signalweg involviert Komponenten des MAP-Kinase-Weges, der für die Paarung benötigt wird, wie Ste20, Cdc42, Ste11, Ste50, Ste7 und Kss1 (Liu *et al.*, 1993). Cdc42 agiert in diesem Weg unterhalb von Ras2 und wird wahrscheinlich von diesem Protein aktiviert (Mösch *et al.*, 1999). In seiner aktiven GTP-gebundenen Form aktiviert Cdc42 daraufhin die Effektoren Gic1, Gic2, sowie Ste20 (Leberer *et al.*, 1997; Peter *et al.*, 1996). Aktiviertes Ste20 wird für die Weiterleitung des Signals an Ste11 und dessen assoziiertem Protein Ste50 benötigt (Liu *et al.*, 1993). Das Signal wird über eine MAPK-Kaskade bestehend aus der MAPKKK Ste11, der MAPKK Ste7 sowie der MAPK Kss1 weitergeleitet (Bardwell *et al.*, 1998; Cook *et al.*, 1997). Des Weiteren ist der Transkriptionsfaktor Ste12 an der Ausbildung von Pseudohyphen beteiligt (Liu *et al.*, 1993). Ste12 bindet zusammen mit dem Transkriptionsfaktor Tec1 kooperativ an sogenannte *FRE*-Sequenzen (*f*ilamentous and *i*nvasion *r*esponsive *e*lements) in Promotoren von Genen, die für die Pseudohyphenbildung benötigt werden (Madhani *et al.*, 1997). Hierdurch wird die Expression von Tec1 sowie von zusätzlichen Zielgenen wie beispielsweise dem Retrotransposon Ty1 (Morillon *et al.*, 2000) oder dem Flocculin *FLO11* reguliert (Cook *et al.*, 1997; Bardwell *et al.*, 1998; Lo & Dranginis, 1996).

Der Pseudohyphen-Dimorphismus wird nicht nur durch den MAPK-vermittelten Signalweg reguliert, sondern ebenfalls durch einen cAMP/PKA-vermittelten Signalweg. Dieser zweite Signalweg involviert den G-Protein gekoppelten Rezeptor (GPCR) Gpr1, die G-Protein  $\alpha$ -Untereinheit Gpa2, die Adenylatzyklase Cyr1, die cAMP-abhängige Proteinkinase (PKA), die Transkriptionsfaktoren Flo8 und Sfl1, sowie das Zelloberflächenflocculin Flo11 (Lorenz & Heitman, 1997; Kübler *et al.*, 1997; Lorenz *et al.*, 2000; Robertson & Fink, 1998). Der cAMP/PKA-Signalweg kann zweifach aktiviert werden. Zum einen erfolgt die Aktivierung der Adenylatzyklase über ein G-Protein gekoppeltes Rezeptorsystem (GPCR), bestehend aus dem Rezeptor Gpr1, einem Sensor für Glucose sowie Sukrose (Kraakman *et al.*, 1999; Lemaire *et al.*, 2004) und dem  $G_\alpha$ -Protein Gpa2. Weiterhin stimulieren die G-Proteine Ras1 und Ras2 die Adenylatzyklase Cyr1, welches zu einer Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels führt.

Der cAMP-Spiegel in der Zelle hängt nicht nur von der Synthese, sondern ebenfalls von der Degradation ab. Eine Herunterregulierung des cAMP-Spiegels in der Zelle erfolgt durch die niederaffine Phosphodiesterase Pde1 sowie die hochaffine Phosphodiesterase Pde2, welche in der Lage sind, cAMP zu hydrolysieren (Thevelein & de Winde, 1999).

Liegt ein erhöhter cAMP-Spiegel in der Zelle vor, führt dies zur Aktivierung der cAMP-abhängigen Proteinkinase A (PKA). Es konnten verschiedene Zielproteine der PKA identifiziert werden, wie die Proteine Msn2 und Msn4. Diese Proteine vermitteln die PKA abhängige Regulation der Expression von *STRE* kontrollierten Genen im Stressantwortweg (Martinez-Pastor *et al.* 1996; Smith *et al.* 1998). Weitere Zielproteine der PKA stellen die Rim15 Proteinkinase sowie die Phosphodiesterase Pde1 dar. Pde1 ist in der Herunterregulierung der agonist-induzierten cAMP-Signalweiterleitung einbezogen (Ma *et al.*, 1999). Die PKA ist aus den drei katalytischen Untereinheiten Tpk1-3 und einer regulatorischen Untereinheit Bcy1 aufgebaut. Die Bindung von cAMP an die regulatorische Untereinheit der PKA (Bcy1) führt dazu, dass die drei katalytischen Untereinheiten Tpk1, Tpk2 und Tpk3 aktiviert werden. Tpk2 ist für die Einleitung von filamentösem Wachstum erforderlich, indem es den Transkriptionsfaktor Flo8 aktiviert, welcher die Expression der Flocculine Flo1, Flo9 sowie Flo11 reguliert. Diese Regulation erfolgt unabhängig vom Transkriptionsfaktor Ste12. Tpk1 und Tpk3 nehmen hingegen eine negative Rolle ein (Robertson & Fink, 1998; Robertson *et al.*, 2000).

Am Ende des cAMP-Wegs und des MAPK-Moduls stehen somit mehrere Transkriptionsfaktoren, die ihrerseits die Expression von Zielgenen stimulieren, die für das Umschalten von der Hefe- zur Pseudohyphenform nötig sind.

## 1.2 Ste50 fungiert als regulatorisches Adapterprotein

### 1.2.1 Struktur und Funktion des Proteins Ste50

In den drei Signalwegen zur Induktion der Paarung, des invasiven Wachstums bzw. der Osmotoleranz sind die vier gemeinsame Komponenten Cdc42, Ste20, Ste11 und Ste50 involviert (Abb. 1.1). Zwischen den einzelnen Komponenten dieser Wege bestehen verschiedene Wechselwirkungen (Abb. 1.3). In allen Signalwegen erfolgt die Interaktion von Ste50 mit Ste11 über die aminoterminalen SAM (sterile α motif)-Domänen beider Proteine, welches essentiell für die Aktivität von Ste11 ist (Ponting, 1995; Xu *et al.*, 1996; Wu *et al.*, 1999; Jansen *et al.*, 2001). Die Funktion der Proteinkinase Ste20 kann in den verschiedenen Signalwegen oberhalb des Ste50-Ste11-Komplexes angeordnet werden. Diese Kinase wird für die Phosphorylierung und Aktivierung von Ste11 in den verschiedenen Signalwegen benötigt und ist essentiell für die Funktion von Ste11 (Wu *et al.*, 1995; Pryciak & Huntress, 1998; O'Rourke & Herskowitz, 1998; Ramezani Rad *et al.*, 1998). Bei dem Protein Ste20 handelt es sich um eine Serin-/Threonin-Kinase, welche ein Mitglied der PAK (p21 activated kinase)-Familie darstellt (Leberer *et al.*, 1997). Ste20 trägt N-terminal eine Bindestelle für das aktivierte G-Protein Cdc42 (Cdc42-GTP), die sogenannte CRIB (Cdc42/Rac interaction binding)-Domäne (Leberer *et al.*, 1997). Bei der CRIB-



Domäne von Ste20 handelt es sich um eine autoinhibitorische Domäne. Dieser negative Effekt wird durch die Bindung von Cdc42 aufgehoben und stimuliert hierdurch die Ste20-Kinaseaktivität und somit die Signalweiterleitung (Lamson *et al.*, 2002). Andere Studien deuten an, dass die Interaktion von Cdc42 mit Ste20 für die genaue Lokalisation von Ste20 sowie dessen Funktion benötigt wird (Leberer *et al.*, 1997). Die Interaktion von Cdc42 und Ste20 konnte in den Signalwegen der Paarung, des filamentösen Wachstums und der Osmotoleranz *in vivo* und *in vitro* nachgewiesen werden (Peter *et al.*, 1996; Leberer *et al.*, 1997; Johnson, 1999; Raitt *et al.*, 2000). Ein weiterer Interaktionspartner von Cdc42 in der Signaltransduktion stellt das Protein Ste50 dar. Die Interaktion von Cdc42 und Ste50 konnte über Twohybrid-Studien nachgewiesen werden (Spode, 2004). Ste50 könnte somit als Adapterprotein fungieren, welches Verbindungen zwischen dem G-Protein assoziierten Cdc42-Ste20-Komplex an der Plasmamembran und der Effektor kinase Ste11 des MAPK-Moduls herstellt (Abb. 1.3).

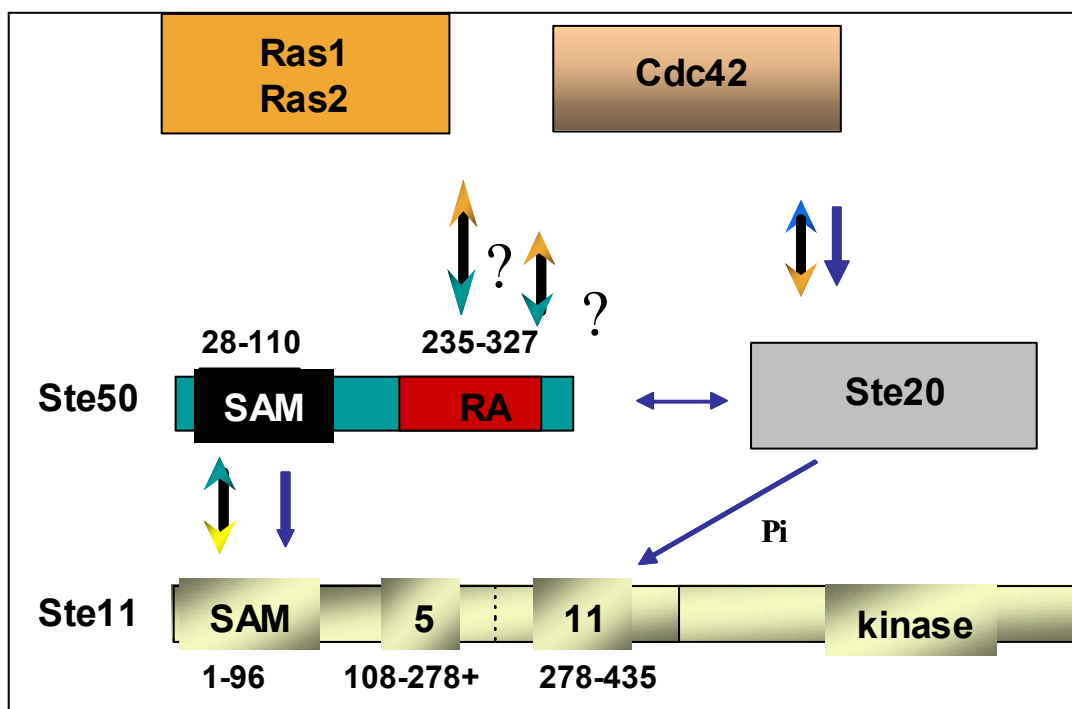


Abbildung 1.3 Schematische Darstellung der Interaktionen von Ste50 und Ste11, Cdc42, Ras1, Ras2 und Cdc42

Ste50 und Ste11 interagieren über ihre N-terminale SAM-Domänen. Es wird postuliert, dass die RA-Domäne von Ste50 mit den kleinen G-Proteinen Cdc42, Ras1 und Ras2 interagiert. Cdc42 interagiert mit der Proteinkinase Ste20, die die MAPKKK Ste11 durch Phosphorylierung aktiviert. Weitere Einzelheiten siehe Text.

Mit Hilfe von quantitativen Paarungsanalysen mit Deletionsmutanten konnte *STE50* im Rahmen eines Genomsequenzierungsprojektes identifiziert werden (Ramezani Rad *et al.*, 1991). Das Gen *STE50* kodiert für ein Protein, das 346 Aminosäuren enthält. Die Transkription von *STE50* erfolgt nicht zellzyklusspezifisch und ist unabhängig vom Paarungstyp. Ste50 sowie Ste11 besitzen aminoterminal, eine postulierte SAM-Domäne (sterile α motif). Die SAM-Domänen beider Proteine vermitteln die Ste50-Ste11-Interaktion, die essentiell für die Signaltransduktion ist. Ste50 besitzt weiterhin eine interne

Serin-/Threonin- reiche (S/T)-Region, mit putativen Phosphorylierungsstellen. Ferner enthält Ste50 carboxyterminal eine sogenannte RA-Domäne (RAS- associated domain; RAD), welche wahrscheinlich die Interaktion zu kleinen G-Proteinen vermittelt.

Ste50 stellt eine Komponente der Signalwege der Paarung, der Pseudohyphenbildung und der Osmotoleranz dar und reguliert die Aktivität der MAPKKK Ste11 in diesen Signalwegen (Ramezani Rad *et al.*, 1991; Xu *et al.*, 1996; Ramezani Rad *et al.*, 1998).

Im Paarungsweg nimmt Ste50 eine wichtige Rolle zur Aufrechterhaltung der Signaltransduktion ein. Die Überexpression von *STE50* bewirkt eine erhöhte Sensitivität gegenüber  $\alpha$ -Faktor, sowie eine Steigerung der *FUSI-lacZ* Expression in *MATa*-Zellen (Ramezani Rad *et al.*, 1991; Xu *et al.*, 1996). *STE50*-Deletionsmutanten werden hingegen durch  $\alpha$ -Faktor nur kurzfristig in der G1-Phase arretiert und zeigen eine stark reduzierte Paarungseffizienz (Ramezani Rad *et al.*, 1992; Xu *et al.*, 1996). Eine Überexpression von *STE11*, sowie der konstitutiv aktiven Mutante *STE11-1*, ist in der Lage den Paarungsdefekt von  $\Delta$ *ste50*-Mutanten partiell zu supprimieren (Ramezani Rad *et al.*, 1998). Somit ist der Signalweg in  $\Delta$ *ste50*- Zellen prinzipiell intakt. Die Signalstärke zur Einleitung der Paarung ist jedoch erniedrigt und reicht nicht zur Durchführung einer effizienten Paarung aus. Ste50 hat einen unterstützenden Einfluss auf die Dauer und Stärke des Paarungssignals und hat einen maßgeblichen Anteil an der Aktivierbarkeit von Ste11. Aufgrund von Überexpressionsanalysen ist der Wirkort von *STE50* im Pheromonantwortweg auf der Ebene des G-Proteins, unterhalb des Pheromonrezeptors *STE2* und oberhalb von *STE5*, *STE11* und *STE7* anzuordnen (Jansen *et al.*, 2001).

Des Weiteren ist Ste50 an dem Signalweg zur Induktion von invasiven Wachstum und der Pseudohyphenbildung beteiligt. Deletionsmutanten von *STE50* sind nicht mehr in der Lage, invasiv zu wachsen oder Pseudohyphen zu bilden (Ramezani Rad *et al.*, 1998). Dieser Defekt kann durch Überexpression von Wildtyp *STE11*, sowie hyperaktiven *STE11-1*, supprimiert werden. Anhand von Komplementationsexperimenten kann Ste50 in diesem Signalweg unterhalb von Ras2 auf der Ebene von Ste11 eingeordnet werden (Ramezani Rad *et al.*, 1998).

Hingegen stellt Ste50 eine essentielle Komponente des hochosmolaren Antwortweges dar. Trippeldeletionsmutanten  $\Delta$ *ssk2*  $\Delta$ *ssk22*  $\Delta$ *ste11* bzw.  $\Delta$ *ssk2*  $\Delta$ *ssk22*  $\Delta$ *ste50*, bei denen beide sensorischen Signalwege ausgeschaltet sind, sind unter hyperosmolaren Bedingungen nicht überlebensfähig (Posas & Saito, 1997). Interessanterweise kann im Gegensatz zum Pheromonantwortweg, sowie zum invasiven Antwortweg, nur eine Überexpression des hyperaktiven Allels *STE11-1* und nicht eine Überexpression von Wildtyp-*STE11* den Phänotyp eines  $\Delta$ *ssk2*  $\Delta$ *ssk22*  $\Delta$ *ste50*- Hefestammes supprimieren (Posas *et al.*, 1998). Dies bestätigt die essentielle Funktion von Ste50 für den hochosmolaren Weg.

### 1.2.2 Struktur und Funktion der SAM-Domäne

Ste50 interagiert mit dem Protein Ste11 innerhalb der Wege zur Induktion der Paarung, des invasiven Wachstums und der Osmotoleranz und reguliert dessen Aktivität. Die Interaktion erfolgt über eine

aminoternale Domäne, die von Ponting (1995) als SAM-Domäne identifiziert wurde. Die SAM-Domäne ist ein putatives Protein-Interaktionsmotiv, bestehend aus 65-70 Aminosäuren in über 300 Proteinen, die in die Signaltransduktion oder der transkriptionellen Aktivierung bzw. Reprimierung involviert sind (Ponting, 1995). SAM-Domänen existieren in einer Vielzahl von eukaryotischen Organismen, wie in den Hefen *Saccharomyces cerevisiae* und *Schizosaccharomyces pombe* sowie in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* (Ph-Domäne). Weiterhin tragen die humanen Proteinen p63 und p73, die Homologe des Tumorsuppressors p53 darstellen, dieses Protein-Motiv (Ponting, 1995; Barr *et al.*, 1996; Thanos & Bowie, 1999). SAM-Domänen sind in der Lage Homodimerisierung sowie Heterodimerisierung zu vermitteln (Kyba & Brock, 1998). In der Sekundärstruktur weisen diese Motive eine Vielzahl von  $\alpha$ -Helices auf, welche die Protein-Protein-Interaktion erleichtern könnten (Ponting, 1995).

Das Protein Ste50 besitzt aminoterminal eine postulierte SAM-Domäne, im Bereich der Aminosäuren 28-110. Ste11 besitzt ebenfalls eine SAM-Domäne im Bereich der Aminosäuren 1-96. Fragmentanalysen der Proteine Ste50 sowie Ste11 konnten zeigen, dass diese Domänen die Ste50-Ste11-Interaktion vermitteln, welches essentiell für die Signaltransduktion ist (Jansen *et al.*, 2001).

Die Struktur der SAM-Domänen von Ste50 sowie von Ste11 konnte 2004 aufgeklärt werden.

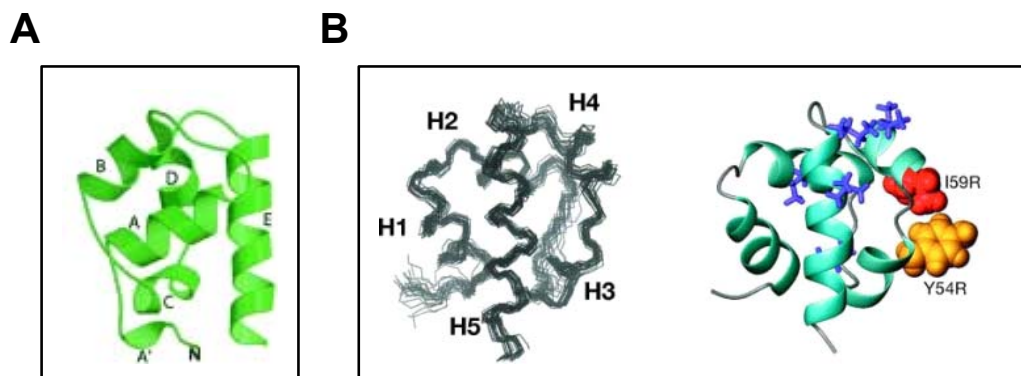


Abbildung 1.4 SAM-Domänen von Ste50 und Ste11

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

Mittels NMR-Studien konnte gezeigt werden, dass Ste50-SAM als Monomer existiert. Es besteht aus 6 Helices, die eine kompakte globale Faltung aufweisen (Grimshaw *et al.*, 2004; Abb. 1.4A). Die Helices setzen sich zusammen aus der Helix A' (23-34), den zwei kurzen  $\alpha$ -Helices Helix A (37-46) und Helix B (55-62), der Helix C (67-72), der Helix D (75-81) sowie der langen C-terminalen Helix E (86-101) (Grimshaw *et al.*, 2004; Abb. 1.4A). Die SAM-Domäne von Ste11 besteht aus den fünf Helices H1 (24-30), H2 (36-44), H3 (49-54), H4 (57-63) sowie H5 (68-80) (Kwan *et al.*, 2004). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die SAM-Domäne von Ste11 in geringen Konzentrationen als Monomer und in höheren Konzentrationen als Dimer sowie Oligomer vorkommt. Die SAM-Domäne von Ste11 ist somit in der Lage, Homodimere zu bilden. Die Mutationen Y54R sowie speziell die I59R-Mutation stören die

Selbstassoziation der Ste11-SAM-Domäne. Beide Mutationen befinden sich in der ML-Domäne von Ste11-SAM. EH (end-helix) /ML (middle-helix)-Interaktionen können somit als Modell für die Selbstassoziation der Ste11-SAM-Domäne postuliert werden. Ähnliches wird für die Ste50-SAM Ste11-SAM-Interaktion vorgeschlagen (Kwan *et al.*, 2004). Neueste Untersuchungen bestätigten die dimere Form der Ste11-SAM-Domäne (Bhattacharjya *et al.*, 2004). Diese Arbeitsgruppe favorisiert für die Interaktion von Ste11 mit Ste50 einen trimeren Komplex, bestehend aus einem Ste11-SAM-Dimer sowie einem Ste50-SAM-Monomer (Bhattacharjya *et al.*, 2004).

Biophysikalische Analysen zeigten eine andere Bindungsart für die SAM-Domänen des Ste50-Homolog Ste4 bzw. des Ste11-Homolog Byr2 in *Schizosaccharomyces pombe* (Ramachander & Bowie, 2004). Die SAM-Domänen der Proteine Ste4 bzw. Byr2 bilden einen schwachen 1:1 Komplex. Die SAM-Domäne von Ste4 befindet sich in unmittelbarer Nähe einer Leucin-Zipperdomäne (LZ). Verwendet man beide Domänen (Ste4-LZ-SAM), binden diese monomeres Byr2-SAM mit hoher Affinität in einem 3:1-Komplex (Ramachander & Bowie, 2004). Das Protein Ste50 in *S. cerevisiae* weist kein ähnliches Leucin-Zipper-Motif auf. Dies deutet auf verschiedene Signalisierungsmechanismen zwischen der knospenden Hefe sowie der Spalthefe hin.

Die heterotypische Interaktion der Ste50-SAM und der Ste11-SAM konnte im 2-Hybrid-System sowie auch biochemisch nachgewiesen werden (Ramezani Rad *et al.*, 1998; Wu *et al.*, 1999; Jansen *et al.*, 2001). Diese Interaktion erfolgt stabil, unabhängig von den Signalwegen der Paarung als auch des hochosmolaren Wachstums (Ramezani Rad *et al.*, 1998; Wu *et al.*, 1999). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die aminoternale regulatorische Domäne von Ste11 einen negativen Einfluss ausübt. Der Verlust dieser Domäne führt zu einer konstitutiv aktiven Kinase (Wu *et al.*, 1999; Cairns *et al.*, 1992; Posas & Saito, 1997). Dieser Einfluss ist vermutlich auf eine fehlende Interaktion sowie Regulation durch Ste50 zurückzuführen. Verschiedene Arbeitsgruppen zeigten, dass diese Regulation der Aktivität von Ste11 durch Ste50 in den Signalwegen der Paarung, des invasiven Wachstums und der Osmotoleranz unterschiedlich erfolgt (Wu *et al.*, 1999; Jansen *et al.*, 2001).

Die SAM-Domänen von Ste50 sowie Ste11 werden für die effiziente Signalweiterleitung während der Signalwege der Paarung und des invasiven Wachstums benötigt (Jansen *et al.*, 2001). Deletionsstämme der *STE50-SAM*- bzw. *STE11-SAM*-Domäne zeigen Defekte im Paarungsweg. Der Defekt eines  $\Delta ste11$ -Deletionsstammes kann durch Überexpression von *STE11* $\Delta$ SAM wiederhergestellt werden, obwohl diese Komponente nicht in der Lage ist, mit Ste50 zu interagieren. Somit ist das Protein Ste50 wichtig, um das Paarungssignal aufrecht zu erhalten, aber nicht für die Transduktion des Paarungssignals per se (Jansen *et al.*, 2001). Deletionsstämme der *STE50-SAM*- bzw. *STE11-SAM*-Domäne zeigen ebenfalls Defekte in der Pseudohyphenbildung sowie in der Expression von *FLO11-lacZ*. Somit sind die SAM-Domänen von Ste50 und Ste11 wichtig für die effiziente Signalweiterleitung während der Paarung und des invasiven Wachstums.

Hingegen sind die SAM-Domänen von Ste50 und Ste11 unentbehrlich für die Adaptation an Hyperosmolarität. Plasmide, die Ste50 $\Delta$ SAM bzw. Ste11 $\Delta$ SAM enthalten, sind nicht in der Lage, das Wachstum der Stämme  $\Delta$ ssk2  $\Delta$ ssk22  $\Delta$ ste50 bzw.  $\Delta$ ssk2  $\Delta$ ssk22  $\Delta$ ste11 auf Salzmedium wieder herzustellen. Die Überexpression einer STE11 $\Delta$ SAM-Mutante ist ebenfalls nicht in der Lage, das Salzwachstum eines  $\Delta$ ssk2  $\Delta$ ssk22  $\Delta$ ste11-Stammes wieder zu komplementieren (Jansen *et al.*, 2001). Somit ist die Modulatorfunktion von Ste50 unbedingt notwendig für die Signalweiterleitung während der hochosmolaren Antwort. Hingegen lässt sich die Funktion von Ste50 im Pheromonantwortweg bzw. invasiven Antwortweg partiell durch Überexpression von Ste11 ersetzen (Jansen *et al.*, 2001). Dies deutet darauf hin, dass die Aktivierung von Ste11 während der drei Signalwege unterschiedlich reguliert wird. Eine differentielle Modulation der Aktivität von Ste11 konnte unter Zuhilfenahme verschiedener Mutanten von Ste50 bestätigt werden. Es konnten SAM-Mutanten von Ste50 hergestellt werden, die in der Lage waren, zu homodimerisieren, aber eine geschwächte Interaktion zu Ste11 zeigten (Jansen *et al.*, 2001). Diese Mutanten Ste50-4 und Ste50-7 wiesen eine differentielle Regulation der Signalwege der Paarung, des invasiven Wachstums sowie der Osmotoleranz auf. Sie zeigten eine verstärkte Paarungsantwort sowie invasive Wachstumsantwort und ein reduziertes Wachstum auf hochosmolaren Medium. Unter hochosmolaren Bedingungen konnte weiterhin eine Aktivierung des Pheromonweges und des invasiven Wachstumsweges beobachtet werden (Jansen *et al.*, 2001). Somit könnte die Ste50-Ste11-Interaktion differentiell den Informationsfluss der verschiedenen MAPK-vermittelten Wege modulieren.

### 1.2.3 Struktur und Funktion der RA-Domäne

Für die effiziente Signalweiterleitung während der Paarung, des invasiven Wachstumsweges und des hochosmolaren Antwortweges ist nicht nur die aminoterminal SAM-Domäne von Ste50, die die Interaktion zu Ste11 vermittelt, sondern ebenfalls die carboxyterminale Region von Ste50 notwendig (Ramezani Rad *et al.*, 1992; Xu *et al.*, 1996; Wu *et al.*, 1999). In der carboxyterminalen Region von Ste50 konnte über Sequenzvergleiche mit RalGDS, einem GDP/GTP-Austauschfaktor, im Bereich der Aminosäuren 235-327 eine sogenannte RA-Domäne (RAS-associated domain; RAD) postuliert werden (Ponting & Benjamin, 1996). RA-Domänen wurden als Regionen identifiziert, bestehend aus über 100 Aminosäuren, deren Primärstruktur in einer Vielzahl von Ras/Rap1-Effektoren konserviert ist. Effektoren für Ras/Rap1-Proteine stellen beispielsweise die aus Säugetieren stammenden Proteine RalGDS und seine homologen Proteine Rlf und Rgl sowie Afadin/AF-6 dar (Geyer *et al.*, 1997; Steiner *et al.*, 2000; Linnemann *et al.*, 1999). Weitere Effektoren sind die *Drosophila melanogaster* homologen Proteine Canoe und Rin1 sowie die *S. cerevisiae* Proteine Ste50 und Cyr1. Die Sequenzen der RA-Domänen sind extrem divergent und erfordern sensitive Detektionsmethoden. Die geringe Sequenzhomologie innerhalb der RA-Domänen könnte die Diversität ihrer Bindepartner widerspiegeln. In der Tat zeigten biochemische Studien, dass die RAD der Ras/Rap1-Effektoren mit verschiedenen Bindungsaffinitäten an die Mitglieder der Ras-Subfamilie binden (Herrmann *et al.*, 1996;

Linnemann *et al.*, 1999). Beispielsweise bindet die RAD von RalGDS mit einer höheren Affinität an Rap-Proteine, als an Ras-Proteine, wohingegen die Ras-Bindedomäne von Raf1 eine höhere Bindeaffinität gegenüber Ras-Proteinen, verglichen mit Rap-Proteinen aufweist (Wittinghofer & Nassar, 1996).

Die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* enthält zwei Proteine mit einer RA-Domäne – die Adenylatzyklase Cyr1, sowie das Protein Ste50. Die Adenylatzyklase Cyr1 ist ein großes Protein mit 2026 Aminosäureresten. Cyr1 enthält vier Domänen: eine aminotermine, eine mittlere repetitive, eine katalytische sowie eine carboxyterminale Domäne (Kataoka *et al.*, 1985; Yamawaki-Kataoka *et al.*, 1989). Die mittlere repetitive Domäne (Aminosäuren 674-1300) zeigt eine Wiederholung eines aus 23 Aminosäuren bestehenden amphipatischen Leucin reichen Motifs (LRR). Im N-terminalen Bereich der LRR-Domäne konnte eine Ras-assoziierte Domäne (RA-Domäne, Aminosäuren 676-756) identifiziert werden, die die Interaktion zu den Ras-Proteinen vermittelt (Kido *et al.*, 2002). Cyr1 bildet weiterhin einen Komplex mit einem 60 kDA Adenylatzyklase assoziiertem Protein (CAP, Field *et al.*, 1990). Die Assoziation von Cyr1 mit dem CAP-Protein ist essentiell für die Aktivierung von Cyr1 durch das farnesylierte Ras-Protein. Es sind mindestens zwei Arten von Interaktionen von Ras mit der Adenylatzyklase für deren Aktivierung erforderlich. Zum einen erfolgt eine GTP-abhängige Interaktion zwischen den Ras-Proteinen und der RA-Domäne der Adenylatzyklase. Zum anderen erfolgt eine GTP-unabhängige schwache Interaktion zwischen farnesyliertem Ras und dem Cyr1-CAP-Komplex (Crechet *et al.*, 2000).

Des Weiteren enthält das Protein Ste50 eine carboxyterminale RA-Domäne. Über die Funktion dieser Domäne ist bisher noch nicht viel bekannt. Aufgrund der Variabilität der Domäne ist die Funktion nicht nur auf Ras beschränkt. Es können auch andere kleine G-Proteine als Bindungspartner dienen. Beispielsweise zeigten Twohybridanalysen, dass diese Domäne die Interaktion mit den Proteinen Cdc42 und Gic1 vermittelt (Spode, 2004).

Verschiedene Arbeitsgruppen konnten nachweisen, dass die carboxyterminale Region von Ste50, welche die RA-Domäne beinhaltet, essentiell für die Signaltransduktion während der Paarung, des invasiven Wachstumsweges und des hochosmolaren Antwortweges ist (Ramezani Rad *et al.*, 1992; Xu *et al.*, 1996; Wu *et al.*, 1999). Mutanten von *STE50* mit einer carboxyterminalen Deletion *ste50-2* ( $\Delta 242-346AS$ ) können nur mit einer Effizienz von 0,1%-0,2% mit einer Wildtypzelle paaren und weisen eine stark erniedrigte Sensitivität gegenüber Pheromon auf (Ramezani Rad *et al.*, 1992; Xu *et al.*, 1996). Eine andere Arbeitsgruppe konnte ebenfalls zeigen, dass der C-Terminus von Ste50 für dessen Aktivität essentiell ist, da eine Deletion von nur 24 Aminosäuren zu einem Funktionsverlust von Ste50 im Pheromonweg, sowie im hochosmolaren Antwortweg führt (Wu *et al.*, 1999). Sie konnten weiterhin nachweisen, dass eine carboxyterminal verkürzte Mutante von Ste50 einen dominant inhibitorischen Phänotyp aufweist. Im Pheromonweg zeigt diese Mutante (*STE50*<sup>1-218</sup>) einen stärker ausgeprägten Phänotyp verglichen mit einer Nullmutante von Ste50 (Wu *et al.*, 1999). Dies spiegelt sich in einer höheren Resistenz gegenüber durch Pheromon hervorgerufenen morphologischen

Veränderungen, sowie einer höheren Resistenz gegenüber dem Zellzyklusarrest, wieder. Im hochosmolaren Antwortweg hat die Expression von *STE50*<sup>1-218</sup> eine Osmosensitivität von normalerweise resistenten Hefestämmen zur Folge (Wu *et al.*, 1999). Somit ist die carboxyterminale Region von Ste50, welche die RA-Domäne beinhaltet, ebenfalls essentiell für die Funktion von Ste50.

#### 1.2.4 Serin/Threonin reiche Region von Ste50

Ste50 fungiert mit seinen Bindemöglichkeiten als regulatorisches Adapterprotein zwischen dem membrangebundenen G-Proteinkomplex und der MAPK-Kaskade. Darüber wie Ste50 selbst reguliert wird, ist bisher wenig bekannt. Ste50 enthält eine interne Serin/Threonin-reiche Region mit zahlreichen, putativen Phosphorylierungsstellen. Phosphorylierung von Proteinen stellt eine gute Möglichkeit dar, die Signaltransduktion zu regulieren. Phosphorylierungen beeinflussen beispielsweise die Aktivität von Enzymen (Gabrielli *et al.*, 1997; Davis, 2000), die Stabilität von Proteinen (Szilak *et al.*, 1997; Nosworthy *et al.*, 1998; Brondello *et al.*, 1999), sowie die Wechselwirkungen mit anderen Proteinen (Di Paolo *et al.*, 1997; Kann *et al.*, 1999) oder die Translokation zwischen verschiedenen Kompartimenten (Jans, 1995). Die Phosphorylierung stellt häufig eine Voraussetzung für eine nachfolgende Ubiquitinierung und schließlich den Abbau des Proteins dar. Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass die im Paarungsweg involvierten Proteine Ste7 sowie Ste11 über Phosphorylierung reguliert werden und anschließend einem Turnover unterzogen werden (Wang & Dohlman, 2002; Wang & Elion, 2003; Esch & Errede, 2002). Verschiedene Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass Ste50 ebenfalls über Phosphorylierung reguliert wird (Wu *et al.*, 1999; Wu *et al.*, 2003; Spode, 2004). Ste50 stellt somit ein Phosphoprotein dar, welches an zahlreichen Serin/Threoninresten *in vivo* phosphoryliert wird. Beispielsweise ist die Phosphorylierung des Threoninrestes T42 von Ste50 erforderlich für die effiziente Signalweiterleitung während der Paarung (Wu *et al.*, 2003). Die Phosphorylierung dieses Threoninrestes ist von der Kaseinkinase I Yck1 abhängig (Wu *et al.*, 2003). Eine weitere Phosphorylierungsmutante von Ste50 (Ste50-3A) zeigt hingegen Defekte im hochosmolaren Antwortweg (Spode, 2004). Eine unterschiedliche Phosphorylierung könnte die Aktivität von Ste50 in den verschiedenen Signalwegen somit unterschiedlich beeinflussen und zur Wechselwirkung mit unterschiedlichen Interaktionspartnern beitragen.

### 1.3 Zielsetzung

Das hier zu untersuchende Signalmolekül Ste50 gehört zu den Hilfsproteinen, die mit MAPK-Modulen wechselwirken. Das *S. cerevisiae* Protein Ste50 ist an drei Signalwegen beteiligt, welche die Paarungsreaktion, die Filamentation und die Osmotoleranz einleiten. Ste50 hat alle Kennzeichen eines regulatorischen Adapterproteins mit einer N-terminalen sterilen Alpha-Motif (SAM)-Domäne, einer Ser/Thr-reichen Region und einer C-terminalen Ras Association (RA)-Domäne. Wie oben erwähnt, dürfte Ste50 strukturell in der Lage sein, Verbindungen zwischen unterschiedlichen Rezeptor-bindenden G-Protein-Komplexen und Ste11 herzustellen. Die RA-Domäne von Ste50 könnte bei Querverbindungen zwischen den drei oben genannten Signalketten eine entscheidende Rolle spielen. Im

Rahmen der vorliegenden Arbeit sollen Wechselwirkungen, dynamisches Verhalten und Phosphorylierung von Ste50 in Abhängigkeit von verschiedenen Reizen (Pheromon, Nahrungsmangel und osmotischen Stress) untersucht werden. Im ersten Teil dieser Arbeit soll durch die Erhöhung der Konzentration von zyklischen AMP die Wechselwirkungen zwischen dem Ras/cAMP-Signalweg und den MAPK-vermittelten Signalwegen untersucht werden. Es soll untersucht werden, ob unterschiedliche G-Proteine über die RA-Domäne von Ste50 mit Ste11 verknüpft werden. Im Vorfeld dieser Arbeit wurde mit dem Two-Hybrid-System die Interaktion zwischen Ste50 und dem G-Protein Cdc42 und Gic1 überprüft. Mit Hilfe von Bindungsstudien sollen diese und weitere Signalmoleküle wie Ras1 und Ras2 als Interaktionspartner der RA-Domäne von Ste50 analysiert werden.

In den nächsten Abschnitten soll die Regulation von Ste50 charakterisiert werden. Hierfür waren die dynamische Verteilung und Phosphorylierung von Ste50 während der Signaltransduktion zu überprüfen. Zunächst soll die Lokalisation von Ste50 in der Zelle beobachtet werden. Eine unterschiedliche Lokalisation von Ste50 nach Einleitung der Signalwege, würde es unterschiedlichen anderen Proteinen zugänglich machen. Es soll getestet werden, ob die Überexpression der potentiellen Interaktionspartner Ras2 sowie Cdc42 einen Einfluss auf die Lokalisation von Ste50 ausübt.

Ste50 ist ein Phosphoprotein, das an multiplen Serin/Threoninresten phosphoryliert wird. Im letzten Abschnitt der Arbeit soll die Modifikation von Myc-Ste50 nach Einleitung des Pheromonwegs näher charakterisiert werden. Es soll gezeigt werden, welche Kinasen verantwortlich für die pheromonabhängige Phosphorylierung von Ste50 sind und welche Auswirkung die Modifizierung auf die Stabilität von Myc-Ste50 in der Zelle hat.



## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Hefestämme und Medien

##### 2.1.1.1 Hefestämme

**Tabelle 2:** Liste der verwendeten Stämme von *S. cerevisiae*

Stammname	Genotyp	Quelle/Referenz
HF91	<i>MATa</i> W303-1A <i>leu2-3,112 ura3-1 trp1 his3-11 ade2 can1-100</i>	Labor Rothstein Columbia University, New York
HF92	<i>MATα</i> W303-1A <i>leu2-3,112 ura3-1 trp1 his3-11 ade2 can1-100</i>	Labor Rothstein Columbia University, New York
HF93	<i>MATa</i> WAM4, W303-1A $\Delta$ <i>ste50::ura3</i> nach 5FOA-Selektion	Xu <i>et al.</i> , 1996
HF95	<i>MATa</i> W303-1A <i>Δste11::ADE2</i>	Laborsammlung
HLS275	<i>MATa</i> W303-1A <i>Δste4::ADE2</i>	Laborsammlung
HLS82	<i>MATa</i> W303-1A <i>Δste5::LEU2</i>	Laborsammlung
YEL206	<i>MATa</i> W303-1A <i>Δste20::TRP1</i>	E. Leberer, McGill university Montreal (HLS84)
HF894	<i>MATa</i> W303-1A <i>Δhog1::TRP1; ura3 his3 leu2</i>	Laborsammlung
HLS81	<i>MATa</i> W303-1A <i>Δste50::HIS3 Δste11::ADE2</i>	Laborsammlung
HLS85	<i>MATa</i> W303-1A <i>Δste50::ura3 Δste20::TRP1</i>	Laborsammlung
HLS354	<i>MATa</i> W303-1A <i>Δste2::LEU2</i>	Laborsammlung
HF898	<i>MATa</i> MC84 <i>Δste7::ura3</i> nach FOA-Selektion	Laborsammlung
HLS864	<i>MATa</i> W303-1A <i>Δubc4::HIS3 Δubc5::LEU2 his3Δ200 leu2-3,112 lys2-801 trp1-1(am) ura3-52</i>	W. Seufert, Universität Stuttgart
HLS746	<i>MATa</i> BY4741 <i>his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	Laborsammlung
HLS750	<i>MATa</i> BY4741 <i>his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 (Δubp3)</i>	Laborsammlung
HLS872	<i>MATa</i> BY471 <i>his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 YOR153w::kanMX4 (Δpr5)</i>	Laborsammlung
HLS1055	<i>MATa</i> BY4741 <i>his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 YHR135c::kanMX4 (Δyck1)</i>	Laborsammlung
HLS1058	<i>MATa</i> BY4741 <i>his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 YNL154c::kanMX4 (Δyck2)</i>	Laborsammlung
HLS1061	<i>MATa</i> BY4741 <i>his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 YER123w::kanMX4 (Δyck3)</i>	Laborsammlung
HLS1065	<i>MATa</i> BY4741 <i>his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 YDR507c::kanMX4 (Δgin4)</i>	Laborsammlung
HLS1066	<i>MATa</i> BY4741 <i>his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 YMR139w::kanMX4 (Δrim11)</i>	Laborsammlung
MY321	<i>MATa</i> BY4741 <i>ura3Δ0 his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 Δrpn11::KanMX [pM145= Rpn11D122A]</i>	Maytal-Kivity <i>et al.</i> , 2002 (HLS902)
DY62	<i>MATa</i> SUB62 <i>his3Δ200 lys2-801 leu2-3,112 trp1-1 ura3-52 Δrpt2::HIS3 [Dp42= Rpt2RF]</i>	Fu <i>et al.</i> , 2001 (HLS903)

HLS330	<i>MATa</i> C2Ca $\Delta$ ssk2::LEU2 $\Delta$ ssk22::LEU2 <i>trp1 ura3 his4</i>	Laborsammlung
HLS421	<i>MATa</i> C2Ca $\Delta$ ssk2::LEU2 $\Delta$ ssk22::LEU2 $\Delta$ ste50::ura3 nach FOA-Selektion <i>trp1 his4</i>	Laborsammlung
HLS430	<i>MATa</i> C2Ca $\Delta$ ssk2::LEU2 $\Delta$ ssk22::LEU2 $\Delta$ ste11::ADE2 <i>trp1 his4 ura3</i>	Laborsammlung
HLS5	<i>MATa</i> W303-1A $\Delta$ pde2::TRP1	Laborsammlung
HF899	<i>MATa</i> W303-1A $\Delta$ ste50::ura3 , nach 5'FOA-Selektion $\Delta$ pde2::TRP1	Laborsammlung
HF833	<i>MATa</i> C2C $\Delta$ ssk2::LEU2 $\Delta$ ssk22::LEU2 <i>ura3 trp1 his4</i> $\Delta$ pde2::TRP1	Laborsammlung
HF829	<i>MATa</i> C2C $\Delta$ ssk2::LEU2 $\Delta$ ssk22::LEU2 <i>ura3 trp1 his4</i> $\Delta$ pde2::TRP1 $\Delta$ ste50::ura3 nach FOA-Selektion	Laborsammlung
MR12	<i>MATa</i> /α <i>leu2::hisG/leu2::hisG; ura3-52/ura3-52; leu2::FLO11lacZ-LEU2::leu2</i>	S. Rupp, Fraunhofer-Institut, Stuttgart (HF739)
PJ187	Twohybrid-Reporterstamm, <i>MATa</i> /α , <i>GAL</i> <sub>(UAS)</sub> <i>LacZ</i> <sub>3</sub> , <i>GAL</i> <sub>(UAS)</sub> <i>ADE2</i> , <i>GAL</i> <sub>(UAS)</sub> <i>HIS3</i> , (Laborsammlung, Kreuzung aus Y187 + PJ69 4A) <i>leu2 trp1</i>	Laborsammlung (HLS196)

**Tabelle 3:** Liste der im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Stämme von *S. cerevisiae*

Stamname	Genotyp	Quelle/Referenz
HCH35	<i>MATa</i> WAM4 Myc- <i>STE50::URA3</i>	diese Arbeit/ Anhang 15
HCH497	<i>MATa</i> W303-1A $\Delta$ fus3::loxP-KAN MX-loxP	diese Arbeit/ Anhang 8
HCH92	<i>MATa</i> W303-1A $\Delta$ ssk1::loxP-KAN MX-loxP	diese Arbeit/ Anhang 1
HCH100	<i>MATa</i> W303-1A $\Delta$ ste50::ura3 nach 5FOA-Selektion; $\Delta$ ssk1::loxP-KAN MX-loxP	diese Arbeit/ Anhang 2
HCH129	<i>MATa</i> W303-1A $\Delta$ ste50::ura3 nach 5FOA-Selektion; $\Delta$ ssk1::loxP-kan MX-loxP (Cre-Rekombinase)	diese Arbeit
HCH631	<i>MATa</i> W303-1A $\Delta$ ste50::ura3 nach 5FOA-Selektion; $\Delta$ ssk1::loxP-kan MX-loxP $\Delta$ fus3::loxP-KAN MX-loxP	diese Arbeit/ Anhang 14
HCH108	<i>MATa</i> W303-1A $\Delta$ ste11::ura3 nach 5FOA-Selektion; $\Delta$ ssk1::loxP-KAN MX-loxP	diese Arbeit/ Anhang 3
HCH113	<i>MATa</i> W303-1A $\Delta$ pde2::loxP-KAN MX-loxP	diese Arbeit/ Anhang 5
HCH581	<i>MATa</i> W303-1A $\Delta$ pde2::loxP-kan MX-loxP $\Delta$ fus3::loxP-KAN MX-loxP	diese Arbeit/ Anhang 9
HCH119	<i>MATa</i> W303-1A $\Delta$ ste50::ura3, $\Delta$ pde2::loxP-KAN MX-loxP	diese Arbeit/ Anhang 6
HCH583	<i>MATa</i> W303-1A $\Delta$ ste50::ura3, $\Delta$ pde2::loxP-kan MX-loxP $\Delta$ fus3::loxP-KAN MX-loxP	diese Arbeit/ Anhang 10
HCH175	<i>MATa</i> W303-1A $\Delta$ ste11::ADE2 $\Delta$ pde2::loxP-KAN MX-loxP	diese Arbeit/ Anhang 7
HCH257	<i>MATa</i> W303-1A $\Delta$ ssk1::kanMX-loxP $\Delta$ pde2::loxP-KAN MX-loxP	diese Arbeit/ Anhang 4
HCH138	<i>MATa</i> W303-1A $\Delta$ pde1::loxP-KAN MX-loxP	diese Arbeit/ Anhang 11
HCH143	<i>MATa</i> W303-1A $\Delta$ ste50::ura3, $\Delta$ pde1::loxP-KAN MX-loxP	diese Arbeit/ Anhang 12
HCH152	<i>MATa</i> W303-1A $\Delta$ ste11::ADE2, $\Delta$ pde1::loxP-KAN MX-loxP	diese Arbeit/ Anhang 13

### 2.1.1.2 Medien

synthetisches Minimalmedium (SM):	0,67% Yeast Nitrogen Base w/o amino acids, 2% Glukose oder 1% Galaktose, 3% Raffinose, 100ml Aminosäuren-Drop-out-Mix
Aminosäuren- Drop-out-Mix:	Drop-out-Mix:  Adenin, Alanin, Arginin, Asparagin, Asparaginsäure, Cystein, Glutamin, Glutaminsäure, Glycin, Inositol, Isoleucin: 4 g  Para-Aminobenzoessäure: 0,4 g  Die gesamte Einwaage des Mix wird in 5 l aq. bidest. gelöst, autoklaviert und bei 4°C gelagert.
YEPD (Vollmedium):	1% Yeast Extract 2% Bacto-Pepton 2% Glucose
YEPD-G418:	1% Yeast Extract 2% Bacto-Pepton 2% Glucose 400 µg/ml Genitcin zur Selektion resistenter Kolonien 200 µg/ml Genitcin zur Anzucht resistenter Kolonien
Pseudohypheninduktionsmedium (SLAD bzw. SLAG):	1,5g Yeast nitrogen base w/o amino acids und Ammoniumsulfat/ l 40g Glucose bzw. Galactose/ l  1 M Ammoniumsulfat steril filtrieren, zwischen 50 und 200 µM hinzugeben

Sowohl für Hefe als auch *E. coli* wurde festen Nährböden 2 % Agar zugegeben.

## 2.1.2 *Escherichia coli* Stämme und Medien

### 2.1.2.1 *E. coli* Stämme

DH5 αF'	<i>F' end A1 hsdR17<sub>r<sub>k</sub></sub>-m<sub>k</sub>+supE44 thi-1 recA1 gyrA relAΔ(lacZYA-argF)</i> U169 (φ 80Δ( <i>lacZ</i> )M15) (Gibco BRL, Gaithersburg MD, USA)
XL1 Blue	<i>F' proAB lacI<sup>q</sup>ZΔM15Tn10 (Tet<sup>r</sup>) recA endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> (Stratagene, La Jolla, USA)

### 2.1.2.2 Medien

Vollmedium (LB):

1% Trypton

0,5% Hefeextrakt

0,5% NaCl

Zur Selektion plasmidhaltiger Zellen wurde dem Medium nach dem Autoklavieren 50 µg/ml Ampicillin zugesetzt (LB-Amp).

Feste Nährmedien enthielten zusätzlich 2% Agar.

Die Anzucht erfolgte bei 37°C.

### 2.1.3 Plasmide und Oligonukleotide

#### 2.1.3.1 Plasmide

**Tabelle 4:** Zur Verfügung gestellte Plasmide

Name	Genotyp und Merkmale			Quelle/Referenz
	Beschreibung	Marker	CEN/2µ	
pUG6	<i>TEF2</i> -Promotor, <i>TEF2</i> -Terminator <i>loxP-KAN MX-loxP</i> -Disruptionscassette	<i>URA3</i> <i>Amp<sup>R</sup></i> <i>KanMX<sup>R</sup></i>	CEN	Gueldener <i>et al.</i> , (1996) (ECH61)
pSH47	<i>GALI</i> -Promotor, Cre-Rekombinase	<i>URA3</i>	CEN	Gueldener <i>et al.</i> , (1996) (EWK1)
pMG10	YEP13 <i>FUS1</i> -Promotor, Reporterplasmid	<i>Amp<sup>R</sup></i> <i>lacZ</i> <i>LEU2</i>	2µ	Laborsammlung (EFB13)
EF309	pFG( <i>TyA</i> )- <i>LacZ</i> , Reporterplasmid	<i>URA3</i>	2µ	Mösch <i>et al.</i> , (1996)
pLG669-Z	<i>Pcyc-lacZ</i>	<i>URA3</i>	2µ	Guarente & Ptashne, (1981) Laborsammlung (EF325)
pLGi-Dss-178	pLG669-Z ( <i>XhoI</i> ), Klenow fill in - ( <i>SmaI</i> ) (-1,5 kB Fragment), Religation	<i>URA3</i>	2µ	Laborsammlung
pRS315- <i>STE11-1</i>	pRS315- <i>STE11-1 CYCI</i> -Terminator	<i>LEU2</i>	CEN	Laborsammlung (EGX399)
pRS413- <i>GALp</i>	pRS413 <i>GALI</i> -Promotor, <i>CYCI</i> -Terminator	<i>HIS3</i>	CEN	Laborsammlung (ELS22)
pRS416- <i>GALp</i>	pRS416 <i>GALI</i> -Promotor, <i>CYCI</i> -Terminator	<i>URA3</i>	CEN	Laborsammlung (ELS25)
pRS416- <i>GALp</i> -GST	pRS416 <i>GALI</i> -Promotor, GST, <i>CYCI</i> -Terminator	<i>URA3</i>	CEN	Laborsammlung (ELS202)
pRS416- <i>GALp</i> -GST- <i>STE11</i>	pRS416 <i>GALI</i> -Promotor, GST, <i>STE11</i> , <i>CYCI</i> -Terminator	<i>URA3</i>	CEN	Laborsammlung (ELS256)

pRS416- <i>GALp-GST-CDC42<sup>val12</sup></i>	pRS416 <i>GAL1</i> -Promotor, GST, <i>CDC42<sup>val12</sup></i> , <i>CYCI</i> -Terminator	<i>URA3</i>	CEN	Laborsammlung (ELS372)
pRS416- <i>GALp-Myc-RA</i>	pRS416 <i>GAL1</i> -Promotor, Myc, <i>RA</i> (215-346), <i>CYCI</i> -Terminator	<i>URA3</i>	CEN	Laborsammlung (ELS500)
pRS416- <i>GALp-Myc-STE50</i>	pRS416 <i>GAL1</i> -Promotor Myc, <i>STE50</i> , <i>CYCI</i> -Terminator	<i>URA3</i>	CEN	Laborsammlung (ELS164)
p416-50p-Myc- <i>STE50</i>	pRS416 50-Promotor Myc, <i>STE50</i> , <i>CYCI</i> -Terminator	<i>URA3</i>	CEN	Laborsammlung (EFB268)
p416-50p-GST- <i>STE50-4</i>	pRS416 50-Promotor GST, <i>STE50-4</i> , <i>CYCI</i> -Terminator	<i>URA3</i>	CEN	Laborsammlung (EFB306)
p415-50p-Myc- <i>STE50-4</i>	pRS415 50-Promotor, Myc, <i>STE50-4</i> , <i>CYCI</i> -Terminator	<i>LEU2</i>	CEN	Laborsammlung (EFB317)
p415-50p-Myc- <i>STE50-7</i>	pRS415 50-Promotor, Myc, <i>STE50-7</i> , <i>CYCI</i> -Terminator	<i>LEU2</i>	CEN	Laborsammlung (EFB319)
pGREG546	pRS416-Derivat <i>GAL1</i> -Promotor, GST, <i>CYCI</i> -Terminator	<i>URA3</i>	CEN	Jansen <i>et al.</i> , (2005) (EWK83)
pGREG546- <i>RAS1</i>	pRS416 <i>GAL1</i> -Promotor, GST, <i>RAS1</i> , <i>CYCI</i> -Terminator	<i>URA3</i>	CEN	Laborsammlung (ESK21)
pGREG525- <i>STE50P318L</i>	pRS415 <i>GAL1</i> -Promotor, Myc, <i>STE50P318L</i> , <i>CYCI</i> -Terminator	<i>LEU2</i>	CEN	Laborsammlung (ENB15)
pGREG525- <i>STE50L322S</i>	pRS415 <i>GAL1</i> -Promotor, Myc, <i>STE50L322S</i> , <i>CYCI</i> -Terminator	<i>LEU2</i>	CEN	Laborsammlung (ENB21)
pRS424- <i>METp-GFP-STE50</i>	pRS424 <i>MET</i> -Promotor, GFP, <i>STE50</i> , <i>CYCI</i> -Terminator	<i>TRP1</i>	2 $\mu$	Laborsammlung (ELS156)
pRS42411p-GFP- <i>STE11</i>	pRS424 <i>Ste11</i> -Promotor, GFP, <i>STE11</i> , <i>CYCI</i> -Terminator	<i>TRP1</i>	2 $\mu$	Laborsammlung (ELS261)
pSL2478	<i>pADHI GAL4 (1-147) STE11K444R</i>	<i>HIS3</i>	2 $\mu$	Laborsammlung (ELS67)
pSL2479	<i>pADHI GAL4 (1-147) STE11P279SK444R</i>	<i>HIS3</i>	2 $\mu$	Laborsammlung (ELS69)
pMBD	Twohybrid <i>GAL4</i> -DNA-Bindedomäne	<i>TRP1</i>	CEN	Laborsammlung (EWK67)
pMBD- <i>HIS3</i>	Twohybrid <i>GAL4</i> -DNA-Bindedomäne, <i>HIS3</i>	<i>TRP1</i>	CEN	Laborsammlung (ELS553)
pAD2	Twohybrid <i>GAL4</i> -Aktivierungsdomäne	<i>LEU2</i>	CEN	Laborsammlung (EWK66)
pAD2- <i>HIS3</i>	Twohybrid <i>GAL4</i> -Aktivierungsdomäne, <i>HIS3</i>	<i>LEU2</i>	CEN	Laborsammlung (ELS552)
pMBD- <i>STE50</i>	<i>MET</i> -Promotor -BD- <i>STE50</i>	<i>TRP1</i>	CEN	Laborsammlung (EGX303)

pMBD- <i>STE50R296GN301S</i>	<i>MET</i> -Promotor BD- <i>STE50R296GN301S</i>	<i>TRP1</i>	CEN	Laborsammlung (ELS563)
pMBD- <i>CDC42<sup>val12</sup></i>	<i>MET</i> -Promotor -BD- <i>CDC42<sup>val12</sup></i>	<i>TRP1</i>	CEN	Laborsammlung (ELS279)
pMBD- <i>RAS2<sup>val19</sup></i>	<i>MET</i> -Promotor -BD- <i>RAS2<sup>val19</sup></i>	<i>TRP1</i>	CEN	Laborsammlung (ELS263)
pAD- <i>RAS2<sup>val19</sup></i>	<i>ADH</i> - Promotor –AD <i>RAS2<sup>val19</sup></i>	<i>LEU2</i>	CEN	Laborsammlung (ELS269)
pKB- <i>STE11</i>	<i>MET</i> -Promotor –BD- <i>STE11</i>	<i>TRP1</i>	CEN	Laborsammlung (ELS342)
pAD- <i>STE11</i>	<i>ADH</i> - Promotor -AD- <i>STE11</i>	<i>LEU2</i>	CEN	Laborsammlung (ELS243)
pRL39	<i>ADH</i> - Promotor -AD- <i>CDC42</i>	<i>LEU2</i>	CEN	Laborsammlung (EFB68)
pRL58	<i>ADH</i> - Promotor -AD- <i>CDC42<sup>val12</sup></i>	<i>LEU2</i>	CEN	Laborsammlung (EFB67)
pAD- <i>GIC1</i>	<i>ADH</i> - Promotor -AD- <i>GIC1</i>	<i>LEU2</i>	CEN	Laborsammlung (ELS589)

**Tabelle 5:** Liste der im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Plasmide

Name	Genotyp und Merkmale			Konstruktion
	Beschreibung	Marker	CEN/2 $\mu$	
ECH121	pGREG546- <i>RAS2</i>	<i>URA3</i>	CEN	Durch homologe Rekombination von Ras2-PCR-Produkt (chromosomale DNA + Primer A88Rec1-Ras2, A89Rec2-Ras2) mit pGREG546 entstanden
ECH163	pAD- <i>RAS1F</i> (ohne C-terminale CAAX-Box)	<i>LEU2</i>	CEN	Durch homologe Rekombination von Ras1F-PCR-Produkt (chromosomale DNA + Primer A86Rec1-Ras1, A179rec2fras1) mit pAD- <i>HIS3</i> entstanden
ECH167	pAD- <i>RAS2F</i> (ohne C-terminale CAAX-Box)	<i>LEU2</i>	CEN	Durch homologe Rekombination von Ras2F-PCR-Produkt (chromosomale DNA + Primer A88Rec1-Ras2, A181rec2fras2) mit pAD- <i>HIS3</i> entstanden
ECH157	pAD- <i>RAS2<sup>val19</sup>F</i> (ohne C-terminale CAAX-Box)	<i>LEU2</i>	CEN	Durch homologe Rekombination von Ras2 <sup>val19</sup> F-PCR-Produkt (pMBD- <i>RAS2<sup>val19</sup></i> + Primer A88Rec1-Ras2, A181rec2fras2) mit pAD- <i>HIS3</i> entstanden
ECH191	pMBD- <i>STE50P318L</i>	<i>TRP1</i>	CEN	Durch homologe Rekombination von <i>STE50P318L</i> -PCR-Produkt (pGREG525- <i>STE50P318L</i> mit Primer A72Rec1-ste50, A73Rec2-ste50) mit pMBD- <i>HIS3</i> entstanden

ECH192	pMBD- <i>STE50L322S</i>	<i>TRP1</i>	CEN	Durch homologe Rekombination von <i>STE50L322S</i> -PCR-Produkt (pGREG525- <i>STE50L322S</i> + Primer A72Rec1-ste50, A73Rec2-ste50) mit pMBD- <i>HIS3</i> entstanden
ECH48	pLG669- <i>STRE-lacZ</i>	<i>URA3</i>	2 $\mu$	Klonierung von <i>STRE</i> -Oligonukleotide A12CTT1-20a + A13CTT1-20-b in pLGi-Dss-178 ( <i>XhoI</i> )

### 2.1.3.2 Oligonukleotide (Primer)

Name	Sequenz (5' → 3')	Verwendung
3KAN	CGC ACC TGA TTG CCG ACA TTA TCG	Nachweis Disruption
4KAN	CGG TTT GGT TGA TGC GAG TGA TTT T	Nachweis Disruption
A72rec1-ste50	GAA TTC GAT ATC AAG CTT ATC GAT ACC GTC GAC AAT GGA GGA CGG TAA ACA GGC CA	Homologe Rekombination Ste50, Nachweis Integration Ste50
A73rec2-ste50	GCG TGA CAT AAC TAA TTA CAT GAC TCG AGG TCG ACT TAG AGT CTT CCA CCG GGG GT	Homologe Rekombination Ste50, Nachweis Integration Ste50
A86rec1-ras1	GAA TTC GAT ATC AAG CTT ATC GAT ACC GTC GAC AAT GCA GGG AAA TAA ATC AAC TAT AA	Homologe Rekombination Ras1
A179rec2fras1	GCG TGA CAT AAC TAA TTA CAT GAC TCG AGG TCG ACT CAA CAA ATT ATA CAA CAA CCA CC	Homologe Rekombination Ras1F
A88rec1-ras2	GAA TTC GAT ATC AAG CTT ATC GAT ACC GTC GAC AAT GCC TTT GAA CAA GTC GAA C	Homologe Rekombination Ras2
A89rec2-ras2	GCG TGA CAT AAC TAA TTA CAT GAC TCG AGG TCG ACT TAA CTT ATA ATA CAA CAG CC	Homologe Rekombination Ras2
A181rec2fras2	GCG TGA CAT AAC TAA TTA CAT GAC TCG AGG TCG ACT TAA CTT ATA ATA CAA CAG CCA CC	Homologe Rekombination Ras2F
A112FUS3-3D	GTA TAC ATT GTT CTT CGG GTT GAT ATT TTA ATG ATA ATG ATG GCT AGC ATA GGC CAC TAG TGG ATC	Disruption Fus3
A111FUS3-5D	CGT TTG AAC TAC AAG GAA ATA AGG CAG AGA AAA AGA AAG GAA AAT AAT CAG CTG AAG CTT CGT ACG C	Disruption Fus3
A116FUS3-800P	CCC GAG CTC GGA AAA AGA GTA CGG TAG TTG	Nachweis Disruption Fus3
A210Fus3Term	CGC GTC CTC AGC GGC TAA TAC GTA	Nachweis

Chk		Disruption Fus3
A35pde2-3D	ATA TGT TTA TAC AAT GAA TGG TAC AAG AAA TTT TGA TAT TCT TGC TAG CAT AGG CCA CTA GTG GAT C	Disruption Pde2
A34pde2-5D	TTT GAG ATC ACT ACT ACT TAA TTG AAG AAA ACA TAA CCT ATT GAT CAG CTG AAG CTT CGT ACG C	Disruption Pde2
A25PDE2-800P	CCC GAG CTC GGG AAT GGT CTG CCC AAT TCG AAG AG	Nachweis Disruption Pde2
A45PDE2-3+400	CCC GGT ACC CCA ACA CAG GGA ACA T	Nachweis Disruption Pde2
A39pde1-3D	TCC GCT TTT CAT CTA CGT AGT ATT ATG TTA TTG ACG TTG TGT ACA TTA GCA TAG GCC ACT AGT GGA TC	Disruption Pde1
A38pde1-5D	AAC GAG GTT CTT CTT CTT CAT CCC CTT TTT TAC CAA TAT TCC TTT TTC AGC TGA AGC TTC GTA CGC	Disruption Pde1
A48PDE1-5-800	CCC GAG CTC AAG CGG TAA ACG ATC TTT	Nachweis Disruption Pde1
A49PDE1-3+400	CCC GGT ACC TCC CTC ACG TTA TGC TCC AG	Nachweis Disruption Pde1
A41ssk1-3D	TCG TTA CAT TCT ATC ATA ATG TCC TCT ACA CGG TAC AAC CAA ACT CAG CAT AGG CCA CTA GTG GAT C	Disruption Ssk1
A40ssk1-5D	AGG CTG CTG TAA ATC AAA AAC GAA TCG ATT TTG GGG AGA CAA GTA AAA CAG CTG AAG CTT CGT ACG C	Disruption Ssk1
A46SSK1-5-600	CCC GAG CTC CAT GGC AAA TGC CTC TTG C	Nachweis Disruption Ssk1
A47SSK1-3+300	CCC GGT ACC GAA ATA GTT TTT GAT GGA	Nachweis Disruption Ssk1
A12CTT1-20a	TCG ATT CAA GGG GAT CAC CGG TAA GGG GCC AAG	Konstruktion pLG669- <i>STRE-lacZ</i>
A13CTT1-20b	TCG ACT TGG CCC CTT ACC GGT GAT CCC CTT GAA	Konstruktion pLG669- <i>STRE-lacZ</i>

## 2.1.4 Chemikalien und Antikörper

### 2.1.4.1 Chemikalien

---

Acros Organics	Galaktose, Lysin
Bio-Rad	Bio-Rad Protein Assay
Braun-Melsungen	Glasperlen 0,45 mm Ø
Caesar & Loretz	Glukose
Difco	Bacto Agar, Hefe-Extrakt, Pepton, Trypton, Yeast nitrogen Base
Fermentas	PAGE-Ruler™ Prestained Protein Ladder
Fluka	Histidin
GibcoBRL	Agarose, Restriktionsendonucleasen
Janssen Chimica	DMF, DMSO



J.T. Baker	KAc, MgCl <sub>2</sub> , NaCl, NaOH, , RbCl <sub>2</sub>
Merck	APS, Adenin, EDTA, Leucin, Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , MgSO <sub>4</sub> , TEMED
MWG Biotech	Synthetische Oligonukleotide
New England Biolabs	Restriktionsendonucleasen, BSA
Pharmacia	dNTP-Mix, Glutathion-Sepharose, ProteinA-Sepharose
Qiagen	Plasmid Mini Kit, Plasmid Midi Kit, Qiaex II Gel Extraction Kit
Riedel-deHaën	Essigsäure, Ethanol, NaN <sub>3</sub> , Methanol
Roche	BCIP, Expand High Fidelity PCR System, Lumi-Light Western-Blotting-Substrat, Protease-Inhibitoren: Antipain, Leupeptin, Pepstatin, Aprotinin, Restriktionsendonucleasen
Roth	DTT, Gel30 Acrylamid, Glycin, Isopropanol, KCl, PEG4000 und 3350, Tryptophan
Schleicher & Schuell	Nitrocellulose-Membran
Serva	BSA, Glyzerin, Raffinose, SDS, Tween20
Sigma	Amp, EtBr, HMW, LiAc, NBT, ONPG, PMSF, Tris, $\alpha$ -Faktor, Uracil
Whatman	3 MM Papier

#### 2.1.4.2 Antikörper

Antikörper	Beschreibung	Quelle/Referenz
@GST	Polyklonal, aus Kaninchen, gegen Glutathion-S-Transferase Verdünnung 1:1000	Santa Cruz
@myc	Polyklonal, aus Maus, gegen Myc-9E10 Verdünnung 1:1000	Calbiochem
@ <i>Thr180Tyr182</i>	Polyklonal, aus Kaninchen, phospho-p38 Gegen MAP-Kinase ( <i>Thr180Tyr182</i> ) Verdünnung 1:1000	Cell Signalling, #9211
@HOG1-C	Polyklonal, aus Ziege, gegen HOG1-C Verdünnung 1:1000	Calbiochem
@Ubiquitin	Monoklonal, aus Maus gegen Ubiquitin Verdünnung 1:200	Covance
@Kaninchen	Polyklonal aus Ziege gegen Kaninchen IgG (H+L), gekoppelt mit alkaliner Phosphatase Verdünnung 1:5.000	Dianova
@Kaninchen	Polyklonal aus Ziege gegen Kaninchen IgG (H+L), gekoppelt Peroxidase Verdünnung 1:50.000	Dianova
@Maus	Polyklonal aus Ziege gegen Maus IgG (H+L), gekoppelt mit alkaliner Phosphatase Verdünnung 1:5.000	Dianova
@Maus	Polyklonal aus Ziege gegen Maus IgG (H+L), gekoppelt mit Peroxidase Verdünnung 1:50.000	Dianova
@Ziege	Polyklonal aus Kaninchen gegen Ziege IgG (H+L), gekoppelt mit alkaliner Phosphatase Verdünnung 1:5.000	Dianova
@Ziege	Polyklonal aus Esel gegen Ziege IgG (H+L), gekoppelt mit mit Peroxidase Verdünnung 1:50.000	Dianova

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 PCR (Polymerase Chain Reaktion)

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

**Tabelle 8:** PCR-Programm zur Amplifizierung von Plasmid-DNA

	Anzahl der Zyklen	Temperatur	Dauer	Funktion
1.	1x	95°C	10 min	Denaturierung der DNA
2.	20x	95°C	1min	Denaturierung der DNA
		52°C	1min	Bindung der Primer an die DNA
		68°C	1 min pro kb des zu amplifizierenden Fragmentes	DNA-Synthese
3.	1x	68°C	10 min	abschließende DNA-Synthese

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

### 2.2.2 PCR von Zellen

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) für den Nachweis der korrekten Disruption wurde unter Verwendung der Taq-Polymerase durchgeführt. Frisch ausgestrichene Zellen wurden in 40 µl 0,02 M NaOH resuspendiert und für 90 sec in der Mikrowelle erhitzt. Die Zellsuspension wurde bei -20°C für mindestens eine Stunde gelagert. Von diesem Ansatz wurden 2 µl für die PCR eingesetzt. Der PCR-Ansatz enthielt weiterhin einen Puffer, H<sub>2</sub>O, 0,1 nmol der entsprechenden Oligonukleotidprimer und 200 µM dNTP-Mix. Die Reaktion erfolgte in einem programmierbaren Thermo-Cycler (Techne). Zur Amplifikation der DNA wurde folgender Reaktionszyklus verwendet:

**Tabelle 9:** PCR-Programm zur Amplifizierung von genomischer DNA

	Anzahl der Zyklen	Temperatur	Dauer	Funktion
1.	1x	95°C	10 min	Denaturierung der DNA
2.	35x	95°C	1min	Denaturierung der DNA
		52°C	1min	Bindung der Primer an die DNA
		68°C	1 min pro kb des zu amplifizierenden Fragmentes	DNA-Synthese
3.	1x	68°C	10 min	abschließende DNA-Synthese

Nach abgeschlossener Reaktion wurden 15 µl des gesamten PCR-Ansatzes durch Agarosegelelektrophorese analysiert.

### 2.2.2.1 Gen-Deletion in *S. cerevisiae*

Gen-Deletionen in *S. cerevisiae* wurden durch homologe Rekombination von Markern in die chromosomale DNA bei gleichzeitiger Deletion des gewünschten Gens erzielt. Dazu wurden Disruptionsplasmide verwendet, die eine Amplifikation der Disruptionskassette in *E. coli* erlaubten. Die Gendisruption in *S. cerevisiae* wurde nach der von Gueldener *et al.* (1996) beschriebenen, auf PCR basierenden Methode der Gendeletion durchgeführt. Hierbei wurden 60mere Oligonukleotide verwendet, deren 20 3'-ständigen Basen die Amplifikation eines Selektionsmarkers erlauben, der auf einem Plasmid vorliegt. Die 40 5'-ständigen Basen sind genspezifisch und erlauben die homologe Rekombination. Mittels PCR wurde die LoxP-kanMX-LoxP-Kassette aus dem Plasmid pUG6 amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden durch Zugabe des 2,5 fachen Volumens 96%igen Ethanol und 1/10 Volumen 3 M Na-Acetat gefällt. Hierfür wurde der Ansatz für 30 min bei 13.000 rpm zentrifugiert (Eppendorf, 5417R) und das Pellet wurde mit 70%igen Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde anschließend in 10 µl Wasser aufgenommen. Das aufkonzentrierte PCR-Produkt wurde in Hefezellen mittels der High-efficiency LiAc-Methode transformiert.

Der Erfolg der Gendeletion wurde mittels PCR mit Oligonukleotiden durchgeführt, die außerhalb der zur Deletion verwendeten Deletionskassette im Genom binden. Somit wird nur bei korrekter Insertion bei der PCR ein Produkt mit bestimmter Größe erzeugt.

### 2.2.2.2 Eliminierung der KanMX-Kassette

Zur Eliminierung der KanMX-Kassette wurde ein Cre-loxP-Rekombinationssystem verwendet (Gueldener *et al.*, 1996). Hierbei vermittelt die Cre-Rekombinase die homologe Rekombination zwischen den die KanMX-Kassette flankierenden loxP-Erkennungssequenzen und das dazwischen liegende, die KanMX-Kassette tragende Fragment wird entfernt.

Hierfür wurde der Cre-Expressionsvektor pSH47 in den Hefestamm transformiert, dessen Gen mit der *loxP-kanMX-loxP*-Kassette disruptiert wurde und auf Uracil-Mangelmedium selektioniert. Je zwei Transformanden wurden verwendet und in 2 ml YPG Medium resuspendiert. Die Kulturen wurden für 2 h bei 30°C inkubiert. Ungefähr 200 Zellen wurden daraufhin auf eine YPD-Platte ausplattiert. Nachdem die Platte 2 Tage bei 30°C inkubiert wurde, wurden die Kolonien auf eine YPD-Platte replikaplattiert, die 400 mg/l G418 enthielt. Ungefähr 80 bis 90% der Kolonien hatten den Kan<sup>R</sup>-Marker verloren. Diese Kolonien, die nicht mehr in der Lage waren auf YPD-G418-Platten zu wachsen wurden mittels PCR-Analyse auf Verlust des Kan<sup>R</sup>-Markers hin kontrolliert. Der Cre-Expressionsvektor wurde entfernt, indem der Stamm auf Platten ausgestrichen wurde, die 5-Fluoro-Orotic acid enthielten, um auf den Verlust des Plasmids hin zu selektionieren.

### 2.2.3 Transformation

#### 2.2.3.1 Transformation in *S. cerevisiae*

##### 2.2.3.1.1 Schnelltransformation in Mikrotiterplatten

Es wurden frische Hefezellen in 200 µl PEG-Mix (40% PEG4000 in 0,1 M Lithiumacetat/ TE: 10 mM Tris/HCl pH 8,0; 1 mM EDTA) resuspendiert. Anschließend wurde ca. 1 µg Plasmid-DNA, 10 µl denaturierter Heringssperma-DNA (10 mg/ml) und 10 µl 1 M DTT hinzugegeben. Danach wurde der Ansatz für 6-8 Stunden bei 30°C bzw. über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Es erfolgte ein Hitzeschock für 10 Minuten bei 42°C. Die Zellen wurden auf den jeweiligen Selektivplatten ausplattiert und für 2-3 Tage bei 30°C inkubiert.

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

Die Transformation von Hefe wurde nach der Lithiumacetat-Methode durchgeführt. Es wurden 100 ml einer Kultur der OD<sub>600</sub> 0,6 bis 1 abzentrifugiert, die Zellen einmal in 0,1 M LiOAc gewaschen, in 1 ml 0,1 M LiOAc resuspendiert und in 100 µl Aliquots aufgeteilt. Zu den Ansätzen wurde 1 µg Plasmid-DNA, 10 µl Carrier-DNA und 700 µl PEG-Mix hinzugegeben. Der Ansatz wurde anschließend für 30 min bei 30°C inkubiert. Nun folgte ein Hitzeschock über 20 min bei 42°C. Die Zellen wurden schließlich abzentrifugiert, in 200 µl Wasser aufgenommen und auf Selektivmedium ausplattiert. Danach erfolgte die Inkubation der Platten bei 30°C.

### 2.2.3.2 Transformation in *E. coli*

Elektroporation:

400 ml LB-Medium wurden 1:100 mit einer Übernachtskultur angeimpft und bei 37°C inkubiert. Die logarithmisch gewachsenen Zellen ( $OD_{600}$  0,6 bis 1) wurden für 15-30 min auf Eis inkubiert. Die Kultur wurde daraufhin 15 min bei 3000 rpm und 4°C abzentrifugiert. Die Zellen wurden einmal mit einem Volumen  $H_2O$ , einmal mit zwei Volumen  $H_2O$  und einmal mit 1/50 Volumen 10% Glycerin gewaschen. Das Pellet wurde in 2 ml 10% Glycerin aufgenommen und auf 40  $\mu$ l Aliquots verteilt, die bei -70°C gelagert wurden.

40  $\mu$ l der kompetenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut, mit 50  $\mu$ l 1:10 verdünnter DNA versetzt und in eine Elektroporationsküvette (Spaltbreite 1 mm) gegeben. Die Elektroporation erfolgte mit dem Gene-Pulser<sup>TM</sup>/Pulse Controller (Biorad, München) [1,6 kV; 25  $\mu$ F; 200 Ohm]. Die Zellen wurden in 1 ml LB-Medium aufgenommen und für 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden sie 2 min bei 7000 rpm abzentrifugiert, das Zellpellet wurde im restlichen Überstand resuspendiert und auf LB<sub>amp</sub>-Platten ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert.

RbCl<sub>2</sub>-Methode:

Die Herstellung kompetenter Zellen und die Transformation von *E. coli* erfolgten nach dem Protokoll von Hanahan (1985).

## 2.2.4 Präparation von Nukleinsäuren

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

Die Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte nach der von Sambrook *et al.* (1989) beschriebenen Methode der alkalischen Lyse. Hierfür wurden 5 ml Übernachtskultur abzentrifugiert und in 300  $\mu$ l P1 (150 mM Tris/HCl, pH 8,0, 10 mM EDTA) resuspendiert. Die Lyse erfolgte durch Zugabe von 300  $\mu$ l P2 (0,2 M NaOH, 1% SDS). Anschließend erfolgte zur Neutralisierung die Zugabe von 300  $\mu$ l P3 (3 M KOAc, pH 5,5). Aus dem nach zehnmütiger Zentrifugation erhaltenen Überstand wurde die Plasmid-DNA durch eine Isopropanolfällung und einem anschließenden Waschschrift mit 70% Ethanol gewonnen.

### 2.2.4.2 Präparation von Plasmid-DNA aus *S.cerevisiae*

Hefezellen aus einer 10 ml Übernachtskultur wurden geerntet und mit deionisiertem Wasser gewaschen. Das Pellet wurde anschließend in 1 ml P1 mit RNase resuspendiert und nach Zugabe von 1 ml P2 gemischt. Der Zellaufschluss erfolgte durch die Zugabe von 2/3 Volumen Glasperlen auf einem IKA-Vibrax VXR (Janke und Kunkel) unter Schütteln bei 4°C. Der Überstand wurde mit 0,5 ml P3 versetzt, 15 min auf Eis inkubiert und für 15 min bei 10.000 rpm zentrifugiert (Eppendorf, 5417R). Aus dem Überstand wurde die Plasmid-DNA mit Isopropanol gefällt und anschließend mit 70%

Ethanol gewaschen. Das getrocknete Pellet wurde in 20 µl deionisiertem Wasser aufgenommen und die DNA wurde im Anschluss für die Transformation in *E. coli* eingesetzt.

### **2.2.5 Elektrophoretische Auftrennung von DNA**

Die Analyse der DNA erfolgte über die Auftrennung in neutralen Agarosegelen (Agarose in 1 × TAE mit Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 0,5 µg/ml zur Anfärbung der Nukleinsäuren). Als Laufpuffer wurde 1 × TAE (40 mM Tris/HCl, 20 mM Natriumacetat, 2 mM EDTA, pH 7,8) verwendet. Die DNA-Proben wurden vor dem Auftragen mit 1/10 Volumen Blaumarker (0,2% Bromphenolblau in 25% Glycerol) versetzt. Die Auftrennung erfolgte bei analytischen Gelen bei maximal 120 V, bei präparativen Gelen bis 80 V. Als Längen- und Konzentrationsstandard diente 1 µg *EcoRI/HindIII* geschnittene Lambda-DNA.

### **2.2.6 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren**

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

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

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

### **2.2.8 Enzymatische Modifikation von DNA**

#### **2.2.8.1 DNA-Restriktion**

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

#### **2.2.8.2 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten**

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

#### **2.2.8.3 Ligation**

Die Ligation von DNA-Fragmenten erfolgte mit 100 ng dephosphorylierter Vektor-DNA und der fünffachen molaren Menge Insert-DNA in einem Gesamtvolumen von 20 µl. Die Ligation erfolgte bei

Verwendung des Ligasepuffers der Firma Gibco BRL in Gegenwart von 1 U T4-Ligase (Gibco BRL) über Nacht bei 16°C.

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

## 2.2.9 Herstellung von Proteinrohextrakten

Logarithmisch wachsende Kulturen (4 OD<sub>600 nm</sub> Zellen) wurden abzentrifugiert (5 min 3000 x g) und mit Wasser sowie Aufschlußpuffer (25 mM Tris/HCl pH 7,4; 5 mM EDTA; 0,1% TritonX-100; 10% Glycerin; 150 mM NaCl) gewaschen. Das Zellpellet wurde in 150 µl Aufschlußpuffer mit Protease-Inhibitoren (Aprotinin 1 µg/ml, Leupeptin 5 µg/ml, Pepstatin 1 µg/ml, Antipain 5 µg/ml, Sojabohnen Trypsininhibitor 100 µg/ml, 1 mM PMSF, 1 mM DTT) resuspendiert und mit 400 mg Glasperlen (Jansen Ø 0,45 cm) versetzt. Der Zellaufschluß erfolgte für 6 x 30 Sekunden auf einem IKA-Vibrax VXR (Janke und Kunkel) bei 4°C und maximaler Intensität. Nach Aufschluß der Zellen wurden wiederum 150 µl Aufschlußpuffer mit Protease-Inhibitoren zugegeben und die Flüssigkeit abgenommen. Nach einem Zentrifugationsschritt (10 min bei 13.000 rpm, Eppendorf 5417R) wurde der Proteinrohextrakt in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und verwendet. Zur Vorbereitung für die Auftrennung von Proteinen (2.2.12) wurde der Rohextrakt mit 2 x Probenpuffer (4% SDS, 20% Glycerin, 125 mM Tris/HCL, pH 6,8; 0,2% Bromphenolblau; 20 mM DTT) versetzt. Die Solubilisierung erfolgte für 5 min bei 95°C. Die Proben wurden bei -20°C gelagert und vor dem Auftragen auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel nochmals für 30-60 min bei 50°C solubilisiert. Aufgetragen wurden jeweils 25 µl frisch-denaturierter Extrakt, dies entspricht einer Menge von 0,2 OD<sub>600</sub>- Einheiten Zellen.

## 2.2.10 Nachweis der *lacZ*-Reportergenaktivität

### 2.2.10.1 Quantitative Bestimmung der β-Galaktosidase-Aktivität mit ONPG

Für ONPG-Messungen (2-Nitrophenyl-β-D-Galaktopyranosid) wurden 5 ml Kulturen bei einer optischen Dichte (OD<sub>600</sub>) von 0,8 bis 1,0 geerntet, mit 1 ml LacZ-Puffer (0,1 M Natrium-Phosphat, pH 7,0; 20 mM KCl; 1 mM MgSO<sub>4</sub>) gewaschen, anschließend in 300 µl LacZ-Puffer resuspendiert und mit Glasperlen (Volumen 100 µl, Ø 0,45mm) durch dreiminütige Inkubation in einem Vibrax-Schüttler (Firma Janke & Kunkel) aufgeschlossen. Der Überstand wurde 10 Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert (Eppendorf, 5417R) und das Pellet wurde verworfen. Der Rohextrakt wurde direkt für Aktivitätsmessungen und Proteinbestimmungen eingesetzt. Die gesamte Bearbeitung erfolgte bei 4°C. 950 µl ONPG-Lösung (1 mg/ml Z-Puffer) wurde mit 50 µl Rohextrakt versetzt. Über einen Zeitraum von bis zu 2 h wurden die Proben bei 30°C inkubiert und nach schwacher Gelbfärbung mit 0,5 ml 1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung abgestoppt. Es wurde photometrisch die Extinktion bei 480<sub>nm</sub> bestimmt und die Zeit des Abstoppens notiert. Die Berechnung der spezifischen Aktivitäten erfolgte mit folgender Formel:

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

$V$  = Küvettenvolumen ( $\mu\text{l}$ );  $v$  = Probenvolumen ( $\mu\text{l}$ );  $d$  = Schichtdicke des Küvetteninhalts;  $\epsilon$  = molarer Extinktionskoeffizient bei 420 nm ( $\epsilon_{420} = 4,5 \text{ ml}/\mu\text{mol}\cdot\text{cm}$ )

Die endgültige Angabe der Enzymaktivität erfolgte bezogen auf mg Gesamtprotein.

### **2.2.10.2 Semiquantitative Bestimmung (X-Gal-Overlay)**

Die semiquantitative Messung der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität von Hefestämmen 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  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität. Hierfür wurden Hefezellen auf Selektivplatten ausgestrichen und 2 Tage bei 30°C inkubiert. Die Zellen wurden auf entsprechende Selektivplatten replikaplatziert und wiederum 2-3 Tage bei 30°C inkubiert. Für den X-Gal-Overlay-Test wurden pro Überschichtung 10 mg/ml Agarose in 5 ml Wasser aufgekocht und mit 4,8 ml eines 1,0 M Natriumphosphatpuffers (pH 7,0) versetzt. Die Lösung wurde bei 60°C im Wasserbad inkubiert. 200  $\mu\text{l}$  X-Gal-Lösung (10 mg 5-Brom-4-chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-Galaktopyransid/ml Dimethylformamid) und 50  $\mu\text{l}$  einer 10%igen SDS-Lösung wurden hinzugegeben. Die Platten wurden nun vorsichtig mit der Lösung überschichtet und bis zum Erstarren der Agarose bei Raumtemperatur aufbewahrt. Die Platten wurden daraufhin bei 30°C bis zum Eintreten der Farbreaktion (1 h- 24 h) inkubiert.

### **2.2.11 Proteinbestimmung nach Bradford**

790  $\mu\text{l}$  Wasser wurden mit 10  $\mu\text{l}$  Rohextrakt (ONPG: 10  $\mu\text{l}$  Rohextrakt 1:10 verdünnt) und 200  $\mu\text{l}$  Bradford-Reagenz (Biorad) vermischt, 5 min bei RT inkubiert und anschließend bei einer Wellenlänge von 595 nm die Absorption im Photometer (Beckmann DU 7400) gemessen. Die Proteinmenge im Rohextrakt wurde anschließend anhand einer BSA-Eichreihe mit definierten Proteinkonzentrationen (0 bis 25  $\mu\text{g}$  BSA in 2  $\mu\text{g}$ -Schritten) aus den Absorptionswerten berechnet. Es erfolgte eine Dreifachbestimmung.

### **2.2.12 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Die gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht in SDS-Polyacrylamidgelen (SDS-PAGE) beruht auf der Methode von Laemmli (1970), bei der es durch Bildung von Ionenfronten zu einer vorgeschalteten Aufkonzentrierung der SDS-Proteinkomplexe kommt. Zur Auftrennung der Proteine wurden ein 3%iges Sammelgel (7 ml  $\text{H}_2\text{O}$ , 1,25 ml Tris (0,4% SDS, 0,5 M Tris HCl pH 6,8), 1,7 ml 30% Acrylamid/ 0,8% Bisacrylamid, 25  $\mu\text{l}$  10% APS, 20  $\mu\text{l}$  TEMED) und ein 10%iges Trenngel (10 ml  $\text{H}_2\text{O}$ , 5 ml Tris (0,4% SDS, 1,5 M Tris/ HCl, pH 8,8), 5 ml 30% Acrylamid/ 0,8% Bisacrylamid, 50  $\mu\text{l}$  10% APS, 40  $\mu\text{l}$  TEMED) verwendet (Maniatis, 1982). Der Laufpuffer enthielt 25 mM Tris, 0,192 M Glycin und 0,1% SDS. Die Proteinproben wurden mit



einem Volumenanteil 2 x Probenpuffer (4% SDS, 50 mM Tris/ HCl pH 6,8, 20% Glycerin, Bromphenolblau, 20 mM DTT) für 5 Minuten bei 95° C gekocht und anschließend 30 Minuten bei 50°C solubilisiert, bevor sie aufgetragen wurden. Die Auftrennung der Proteine und des Molekulargewichtsstandards (Fermentas, Prestained Protein Ladder: 170 kDa; 130 kDa; 100 kDa; 72 kDa; 55 kDa; 40 kDa; 33 kDa; 24 kDa; 17 kDa; 11 kDa) erfolgte bei 50 V über Nacht oder für 3-4 h bei 35 mA über Tag.

### **2.2.13 Immunologischer Nachweis von Proteinen (Immunoblot)**

Nach erfolgter Protein-Auftrennung (SDS-PAGE) wurden die Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Die Übertragung erfolgte in Blot-Puffer (25 mM Tris; 0,192 M Glyzin; 20% Methanol) für 6 Stunden bei 30 V (250 mA) im Kühlraum. Zum Blockieren unspezifischer Bindungsstellen wurde der Filter 2 Stunden in PBSTB inkubiert (10 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,2; 150 mM NaCl; 0,1% Tween 20; 5% BSA). Die Reaktion mit dem Primärantikörper (1:1000 in PBSTB) erfolgte für 3 Stunden bei RT. Nach dreimaligem Waschen für jeweils 10 Minuten mit PBST (PBSTB ohne BSA) erfolgte die Inkubation mit sekundärem Antikörper (1:5.000 (Phosphatase) oder 1:50.000 (Peroxidase)) für 4 Stunden oder über Nacht. Auf die folgenden 3 Waschschritte mit PBST folgte die Detektion des Sekundären Antikörpers.

#### **2.2.13.1 Detektion durch Alkalische Phosphatase**

Für den Nachweis von mit alkalischer Phosphatase gekoppeltem sekundären Antikörper wurde die Membran zunächst zweimalig für 5 Minuten in Substratpuffer (0,1 M Tris/HCl pH 8,8; 0,1 M NaCl; 2 mM MgCl<sub>2</sub>) äquilibriert. Anschließend erfolgt die Farbreaktion nach Zugabe von 25 ml Substratpuffer mit 0,1 mg/ml BCIP und 1 mg/ml NBT.

#### **2.2.13.2 Detektion mit Peroxidase-gekoppeltem Antikörper (LumiLight)**

Zur Detektion von Peroxidase-gekoppeltem Antikörper mit dem Lumi Light Chemiluminescent Substrate (Roche) wurde ein Fujifilm LAS-1000 in Kombination mit dem Image Reader LAS-1000 V1 verwendet. Die Einstellungen waren: Image, Dark-Frame-Substraction (File), Exposure; Linse: URF 20L, Iris 1,4.

### **2.2.14 Differentielle Zellfraktionierung**

Für die differentielle Zellfraktionierung wurden 10 OD Hefezellen einer logarithmisch wachsenden Übernachtskultur einer OD<sub>600nm</sub> von 0,5 geerntet. Die Zellen wurden mit Wasser gewaschen und in 250 µl Lysispuffer (0,3 M Sorbitol, 50 mM HEPES, pH 7,5, 10 mM Na<sub>3</sub>N) mit Proteaseinhibitoren (Aprotinin 1 µg/ml, Leupeptin 5 µg/ml, Pepstatin 1 µg/ml, Antipain 5 µg/ml, Sojabohnen Trypsininhibitor 100 µg/ml, 1 mM PMSF) resuspendiert. Es wurden Glasperlen bis zur Oberkante der Flüssigkeit gegeben und die Zellen wurden auf einem IKA-Vibrax VXR (Janke und Kunkel) 6 x 30 sec bei 4°C aufgeschlossen. Zwischen den einzelnen Aufschlußschritten wurden die Zellen für 30 sec

bei 4°C aufbewahrt. Die Glasperlen wurden mit 300 µl Lysispuffer (0,3 M Sorbitol, 50 mM HEPES pH 7,5, 10 mM NaN<sub>3</sub>) mit Proteaseinhibitoren gewaschen. Intakte Zellen und grobe Zelltrümmer wurden durch eine Zentrifugation über 5 min bei 500 x g aufgetrennt und 100 µl Homogenat wurde gesammelt. 300 µl Zellextrakt wurde für 10 min bei 13.000 x g zentrifugiert, zum Pelletieren der P13-Fraktion. Die Überstände wurden erneut für 1 h bei 4°C bei 100.000 x g zentrifugiert, wodurch die P100-Fraktion (Pellet) und die S100-Fraktion (Überstand) erhalten wurden.

Die Fraktionen wurden in Probenpuffer aufgenommen und äquivalente Mengen (0,2 OD) wurden mittels SDS-PAGE und Immunoblot analysiert.

### **2.2.15 Zellfraktionierung in einem Sukrose-Dichtegradienten**

Für die Auftrennung der Proteine nach dem Prinzip der Gradientenzentrifugation in einem Sukrosegradienten wurde nach der Methode von Kölling und Hollenberg (1994) verfahren. Als Protease-Inhibitoren wurden 1 mM PMSF, Pepstatin (1 µg/ml), Aprotinin (10 µg/ml) und Benzamidine (1 µg/ml) zugegeben. Es wurden Hefezellen von 100 ml Kulturen einer OD<sub>600nm</sub> von 0,8 geerntet, in STED10-Puffer (10% Sukrose, 10 mM Tris/HCl pH 7,6, 10 mM EDTA, 1 mM DTT) gewaschen und anschließend unter Anwesenheit der oben angeführten Protease-Inhibitoren in 500 µl STED10 aufgenommen. Der Zellextrakt wurde daraufhin mit Glasperlen für 3 min bei 4°C auf einem IKA-Vibrax VXR (Janke und Kunkel) aufgeschlossen. Die Glasperlen wurden zweimal mit je 500 µl STED10-Puffer gewaschen. Die gesammelten Überstände wurden zur Entfernung unvollständig aufgebrochener Zellen sowie der Zellkerne 5 min bei 500 x g abzentrifugiert. Der erhaltene Überstand wurde auf einem Sukrose-Dichtegradienten geschichtet. Der Sukrose-Dichtegradient wurde folgendermaßen hergestellt: in einem Zentrifugengefäß SW40 von Beckmann wurden 4 ml STED50 (wie STED10 mit 53% Sukrose), 4 ml STED34 (wie STED10 mit 35% Sukrose) und 4 ml STED20 (wie STED10 mit 20% Sukrose) übereinander geschichtet, mit Parafilm verschlossen und für 3 h bei 4°C in horizontaler Position gelagert. Der durch Diffusion nun annähernd kontinuierliche Gradient wurde aufgerichtet, mit dem Zellextrakt überschichtet und für 14 h in einem Beckmann SW40-Rotor bei 114.000 x g zentrifugiert. Die Portionierung des Gradienten nach der Zentrifugation erfolgte durch Abnahme von 700 µl Fraktionen von oben. Aliquots wurden mit dem gleichen Volumen 2 x Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95°C inkubiert. Hiervon wurden jeweils 50 µl elektrophoretisch aufgetrennt. Der spezifische Nachweis von Proteinen erfolgte durch Western-Analyse.

### **2.2.16 *in vitro* Bindungstest**

Für den Bindungstest wurden 4 OD<sub>600</sub>-Einheiten einer logarithmischen Hefekultur bei 4000 rpm (Eppendorf, 5417R) abzentrifugiert und in 1 ml E-Puffer (25 mM Tris/HCL pH 7,4; 15 mM EGTA, 1 mM DTT, 0,1% Triton X-100, 10% Glycerin, 125 mM NaCl ) mit Proteinaseinhibitoren (1 µg/ml Aprotinin, Antipain und Pepstatin, 5 µg/ml Leupeptin, 100 µg/ml Trypsininhibitor sowie 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid) gewaschen und in 150 µl E-Puffer aufgenommen. Der Zellaufschluß erfolgte bei 4°C durch dreiminütiges vibraxen. Der Überstand wurde bei 13.000 rpm (Eppendorf,

5417R) für 3 min zentrifugiert, um Zelltrümmer zu entfernen. Der Überstand wurde dann für den Bindungstest verwendet. Für den Rohextrakt wurden je 10 µl des 1. Extraktes und des 2. Extraktes abgenommen.

Die GST-Sepharose wurde nach Angaben des Herstellers vorbereitet und mit den GST-Fusionsprotein-enthaltenden Extrakten für 1 h bei Raumtemperatur auf einem Kippmischer inkubiert. Anschließend wurde die Sepharose mit dem gebundenen Protein 5 malig mit E-Puffer gewaschen. Es folgte die Inkubation der Sepharose bei 4°C über 2 h auf dem Kippmischer mit dem myc-Fusionsprotein-enthaltenden Zweitextrakt. Nach 5 maligem Waschen in E-Puffer erfolgte die Zugabe von 40 µl Volumen an Probenpuffer. Den Rohextrakten wurde 20 µl 2x Probenpuffer zugegeben. Die Solubilisierung der Proteine erfolgte durch eine 5 minütige Inkubation bei 95°C. Die Proben wurden daraufhin elektrophoretisch aufgetrennt. Der spezifische Nachweis von Proteinen erfolgte durch eine Immunoblot-Analyse.

### **2.2.17 Immunpräzipitation**

4 OD logarithmische Zellen wurden in 100 µl TN (50 mM Tris/HCl pH 7,4; 150 mM NaCl, Protease-Inhibitoren (Aprotinin 1 µg/ml, Leupeptin 5 µg/ml, Pepstatin 1 µg/ml, Antipain 5 µg/ml, Sojabohnen Trypsininhibitor 100 µg/ml, 1 mM PMSF)) resuspendiert und für 3 Minuten auf einem IKA-Vibrax VXR (Janke und Kunkel) mit Glasperlen aufgeschlossen. Anschließend wurden die Proben 3-4 Minuten mit 1% (w/v) SDS Endkonzentration gekocht und mit 4 Volumen Verdünnungspuffer versetzt (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 Zelltrümmern wurde 2 Minuten bei 13.000 rpm (Eppendorf, 5417R) zentrifugiert und der Überstand mit 40 µl 50% Protein A-Sepharose versetzt, es folgte eine 15 minütige Inkubation bei 4°C auf dem Kippschüttler. Die Proben wurden kurz abzentrifugiert. Daraufhin wurde dem Überstand 7,5 µl 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 µl 50% Protein A -Sepharose über Nacht auf einem Kippschüttler inkubiert (4°C). Nach einer einminütigen Zentrifugation bei 5.000 rpm (Eppendorf, 5417R) wurde das Pellet 4 malig für jeweils 10 Minuten mit je 1 ml 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; 1 mM PMSF; 1 µg/ml Aprotinin) und 1 malig mit 500 µl Waschpuffer 2 (150 mM NaCl; 50 mM Tris/HCl pH 7,4; 5mM EDTA; 1mM PMSF; 1µg/ml Aprotinin) gewaschen. Die Protein A-Sepharose wurde mit 40 µl SDS-Probenpuffer versetzt und nach 3-5 Minuten bei 95°C wurden die Proben auf einem SDS-PAGE aufgetragen.

### **2.2.18 Proteindephosphorylierung mit alkalischer Phosphatase**

Zur Dephosphorylierung von Proteinen in Rohextrakten wurden 4 OD<sub>600</sub>-Einheiten einer logarithmischen Hefekultur bei 4.000 rpm (Eppendorf, 5417R) abzentrifugiert und mit Aufschlußpuffer (25 mM Tris/HCl pH 7,4; 5 mM EDTA; 0,1% TritonX-100; 10% Glycerin; 150 mM NaCl) gewaschen. Das Zellpellet wurde in 100 µl Aufschlußpuffer mit Protease-Inhibitoren (Aprotinin

1 µg/ml, Leupeptin 5 µg/ml, Pepstatin 1 µg/ml, Antipain 5 µg/ml, Sojabohnen Trypsininhibitor 100 µg/ml, 1 mM PMSF, 1 mM DTT) resuspendiert und mit Glasperlen (Jansen Ø0,45 cm) versetzt. Der Zellaufschluß erfolgte wie unter 2.2.9 beschrieben. Nach dem Aufschluß wurden wiederum 50 µl Aufschlußpuffer mit Protease-Inhibitoren zugegeben und die Flüssigkeit mit der Pipette abgenommen. Nach Zentrifugation (3 min bei 13.000 rpm, Eppendorf 5417R) wurde der Proteinrohextrakt in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und verwendet. Der Rohextrakt wurde mit 2 x Probenpuffer (4% SDS, 20% Glycerin, 125 mM Tris/HCL, pH 6,8; 0,2 % Bromphenolblau; 100 mM DTT) versetzt und für 5 min bei 95°C solubilisiert. Die Proben wurden in 7,5 µl Aliquots (0,2 OD) aufgeteilt und bei -70°C gelagert. Für den Phosphatase-Test wurden die Aliquots mit dem vierfachen Volumen (37,5 µl) einer 60 mM Tris/HCl -Lösung pH 6,8 verdünnt, 5 U Alkaline Phosphatase wurden zugegeben und es erfolgte eine Inkubation bei 37°C über 4 h. Es wurden 9 µl 10%ige SDS-Lösung und 10,8 µl 50%ige Glycerinlösung hinzugegeben und der Ansatz nochmals 5 min bei 95°C solubilisiert. Der gesamte Ansatz wurde auf das SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen.

### 2.2.19 Nachweis der Hog1 – Phosphorylierung

Zum Nachweis der Phosphorylierung des Proteins Hog1 bei Hyperosmolarität wurden 1 OD<sub>600</sub>-Einheiten einer logarithmischen Hefekultur für 5 min bei 4000 rpm (Eppendorf 5417R) abzentrifugiert, 5 min in Vollmedium mit 0,7 M NaCl bei 30°C inkubiert und anschließend 2 min bei 10.000 rpm (Eppendorf, 5417R) abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 100 µl Aufschlußpuffer mit Protease-Inhibitoren (Aprotinin 1 µg/ml, Leupeptin 5 µg/ml, Pepstatin 1 µg/ml, Antipain 5 µg/ml, Sojabohnen Trypsininhibitor 100 µg/ml, 1 mM PMSF, 1 mM DTT) resuspendiert und mit Glasperlen (Jansen Ø0,45 cm) versetzt. Der Zellaufschluß erfolgte wie unter 2.2.9 beschrieben. Nach dem Aufschluß wurden wiederum 50 µl Aufschlußpuffer mit Protease-Inhibitoren zugegeben und die Flüssigkeit mit der Pipette abgenommen. Nach Zentrifugation (3 min bei 13.000 rpm, Eppendorf 5417R) wurde der Proteinrohextrakt in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und verwendet. Der Rohextrakt wurde mit 2x Probenpuffer (4% SDS, 20% Glycerin, 125 mM Tris/HCL, pH 6,8; 0,2 % Bromphenolblau; 100 mM DTT) versetzt und für 5 min bei 95°C solubilisiert. Je 0,15 OD<sub>600nm</sub>-Einheiten wurden auf einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und einer Western-Analyse unterzogen wurden. Der anti-Phospho-p38 MAP Kinase (Thr180/Tyr182) – Antikörper diente zum Nachweis der spezifischen Hog1-Phosphorylierung.

### 2.2.20 Two-Hybrid-Interaktionsnachweis

Das Two-Hybrid-System ist ein genetisches System zur Detektion von Protein-Protein-Interaktionen mittels eines Reportergenes (Fields & Song, 1989; Phizicky & Fields, 1995). Es beruht auf dem modularen Charakter vieler eukaryontischer Transkriptionsfaktoren wie z.B. *GAL4* (Giniger *et al.*, 1985) oder *GCN4* (Hinnebusch & Natarajan, 2002). Die Bindedomäne bringt den Transkriptionsfaktor an den Wirkort, d.h. in den Kern und bindet mit Hilfe der DNA-Bindedomäne an spezifische Bindestellen der Promotoren der Gene, welche durch den Faktor reguliert werden. Die

Aktivierungsdomäne bindet mit anderen für die Transkriptions-Initiation benötigten Faktoren an den Promotor und aktiviert die Transkription des stromabwärts liegenden Gens (Johnston, 1987). Man fusioniert einen der Interaktionspartner an eine DNA-Bindedomäne und den anderen an eine Aktivierungsdomäne. Durch Expression dieser Fusionsproteine in einem Stamm mit *GAL*-Promotorsequenzen vor Reportergenen kann die Wechselwirkung dieser beiden Proteine zur Transkriptionsaktivierung eines gut messbaren Reportergens (z.B. *lacZ*) führen. Die Menge des gebildeten Reportergenprodukts kann als direktes Maß für die Stärke der Interaktion verwendet werden. Es wurden die Domänen des Transkriptionsaktivators Gal4 verwendet Als Hefestamm wurde der Stamm PJ187, eine Kreuzung aus PJ-69-4A (James *et al.*, 1996) und Y187 (Durfee *et al.*, 1993) des Genotyps *MATa/α*, *GAL<sub>(UAS)</sub> LacZ<sub>3</sub>*, *GAL<sub>(UAS)</sub> ADE2*, *GAL<sub>(UAS)</sub> HIS3* verwendet. Weiterhin sind die relevanten *GAL*-Gene deletiert. In diesem Stamm kann neben der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität auch das Wachstum auf Minimalmedium ohne Histidin oder Adenin als Maß für die Interaktionsstärke dienen. Histidin zeigt allerdings einen relativ hohen Hintergrund, es werden viele falsch-positive Interaktionen durch Wachstum angezeigt, dafür werden auch schwache Interaktionen wahrgenommen. Das Hintergrundwachstum auf SD *leu- trp- his-* -Platten kann durch Zugabe von 6 mM 3'Aminotriazol minimiert werden. Die Adenin-Mutation hat stärkere Auswirkungen, hier können nur die Zellen wachsen, die eine sehr starke Interaktion der Fusionsproteine aufweisen.

### 2.2.21 Immunofluoreszenz

Es wurden 5 ml einer exponentiell wachsenden Kultur ( $OD_{600nm}$ : 0,5 – 0,8) 4 h mit 5% Formaldehyd bei 30°C fixiert. Die Zellen wurden abzentrifugiert und einmal mit 5 ml S-Puffer (50 mM HEPES, 1,2 M Sorbitol, pH 7,5) gewaschen, in 1 ml S-Puffer resuspendiert und über Nacht bei 4°C aufbewahrt. Zum Sphäroblastieren der Zellen wurde 10 mM DTT und 40  $\mu$ l Zymolyase (2,5 mg/ml) hinzugegeben und für 30 min bei 37°C inkubiert. Die Sphäroblastierung wurde mikroskopisch getestet Bei erfolgter Sphäroblastierung erscheinen die Zellen dunkel und der Knospenhals tritt deutlich hervor. Die Zellen wurden nun 1 min bei 5.000 rpm (Eppendorf, 5417R) abzentrifugiert und in 1 ml S-Puffer resuspendiert. Daraufhin wurden die Zellen für 5 min nach Zugabe von 0,1% Triton X-100 auf einem Kippmischer inkubiert. Die Zellen wurden wiederum abzentrifugiert und in 1 ml S-Puffer resuspendiert. Die Multitest-Objektträger wurden mit 10  $\mu$ l 0,1% Polylysin pro Well für 10 sec behandelt. Es erfolgten drei Waschschrte mit H<sub>2</sub>O. Nun wurden 20  $\mu$ l Zellsuspension auf die Wells für 1 min gegeben und 4x mit PBS gewaschen. Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde 1 Tropfen PBS/BSA (1 mg/ml BSA, IgG frei in PBS) auf die Wells gegeben. Daraufhin wurden die fixierten Zellen mit 20  $\mu$ l des Primär-Antikörpers (Myc 1:200 in PBS/BSA) für 90 min in H<sub>2</sub>O gesättigter Atmosphäre bei Raumtemperatur inkubiert. Nach vier Waschschrten mit PBS erfolgte die Inkubation mit 20  $\mu$ l des Sekundär-Antikörpers (anti-mouse-IgG-FITC) im Dunkeln. Nach weiteren vier Waschschrten mit PBS erfolgte die Färbung mit 20  $\mu$ l DAPI (4'6, Diamidino-2-Phenylindol 1 mg/ml, 1:1000 verdünnt in PBS) für 5 min nach dem Protokoll von Williamson und Fennell (1975).

Nach vier Waschschritten mit PBS wurden die Objektträger getrocknet. Es erfolgte nun die Zugabe von Mounting-Medium (50 mg p-Phenylendiamin in 5 ml PBS, pH 9 + 45 ml Glycerin, im Dunkeln lagern, -70°C) nach dem Protokoll von Johnson und Araujo (1981). Ein Deckglas wurde dann mit Hilfe von Nagellack auf dem Objektträger fixiert.

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

Zellen wurden bei OD 0,6-0,8 mit 5  $\mu$ M  $\alpha$ -Faktor (Endkonzentration) induziert. Außerdem wurde zur pH-Wert Einstellung 20 mM Natriumcitrat, pH 4,5 zugegeben, da dies die Sensitivität erhöht. Soweit nicht anders angegeben, erfolgte eine Probennahme nach 90 min Induktion.

### **2.2.23 Quantitative Paarungsanalyse**

Nach Bestimmung der Zelldichte logarithmisch wachsender Hefekulturen wurden jeweils ca.  $3 \times 10^6$  *MATa*- und *MAT $\alpha$* -Zellen in einem Eppendorfgesäß vermischt, abzentrifugiert und auf einem Nitrocellulose-Filter auf einer Vollmediumplatte platziert. Danach erfolgte eine Inkubation über 4 h bei 30°C. Anschließend wurden die Zellen auf dem Filter in 1 ml sterilem Wasser resuspendiert. Es wurden nun geeignete Verdünnungen auf Selektivmedium für haploide und diploide Zellen ausplattiert. Die Angabe der Paarungshäufigkeit erfolgte in Prozent der diploiden Zellen zur Gesamtzellzahl auf Minimalmedium.

### **2.2.24 Sensitivitätstest gegenüber Hyperosmolarität**

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

### **2.2.25 Induktion des pseudohyphalen Antwortweges**

Die Induktion von Pseudohyphen erfolgte auf einem Stickstoffmangelmedium (SLAD = Synthetic Low Ammonia Dextrose) mit 50  $\mu$ M Ammoniumsulfat wie von Gimeno *et al.* (1992) beschrieben. Logarithmisch wachsende Zellen wurden 1: 1000 in Wasser verdünnt, auf SLAD-Plattchen ausplattiert, für 1 -3 Tage bei 30°C inkubiert und zu gewünschten Zeitpunkten auf pseudohyphales Wachstum hin mikroskopisch untersucht.

### **2.2.26 Induktion des Signalweges zur Bildung von Pseudohyphen in Flüssigmedium**

Zur Induktion des Signalweges zur Bildung von Pseudohyphen wurden Zellen einer logarithmischen Hefekultur bei 4000 rpm abzentrifugiert. Anschließend wurden sie in flüssiges SLAD-Medium überführt. Nach 6 - 12 h Induktion wurden Proben entnommen.

### 2.2.27 Behandlung von *S. cerevisiae* mit cAMP

Um die Auswirkung von hohen cAMP-Konzentrationen im Medium untersuchen zu können, wurde zu Zellen einer logarithmischen Hefekultur 2 mM cAMP gegeben. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen.

### 2.2.28 Bioinformatik

Die Bearbeitung von Plasmidkarten/-Sequenzen und die Möglichkeit zur Konstruktion von Plasmiden erfolgte mit Hilfe von Clone Manager (Version 7.0). Der Sequenzvergleich konnte anhand von ClustalW ([www.ch.embnet.org/software/ClustalW.html](http://www.ch.embnet.org/software/ClustalW.html); Thompson *et al.*, 1994) erfolgen. Die Sekundärstruktur wurde mit Hilfe des Programms PHD ([http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=/NPSA/npsa\\_phd.html](http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_phd.html); Rost, 1996) ermittelt.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Wechselwirkungen zwischen dem cAMP/Ras-Signalweg und verschiedenen MAPK- vermittelten Signalwegen

Der Ras/cAMP Signalweg ist in eine Vielzahl von Prozessen involviert, wie die Kontrolle des Stoffwechsels, der Zellproliferation und der Stressresistenz und koordiniert diese Antworten mit der Nährstoffverfügbarkeit. Für den Ras/cAMP-Signalweg nehmen die Proteine Ras1 und Ras2 eine wichtige Rolle ein. Das aktivierte Ras-Protein (Ras-GTP-Protein) in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* wird hierbei an die Adenylatzyklase gebunden und kontrolliert den cAMP-Spiegel in der Zelle. Die Wirkungskraft des Ras/cAMP-Weges ist durch den cAMP-Spiegel bestimmt. Der cAMP-Spiegel in der Zelle wird zum einen auf der Syntheseebene (Ras-Adenylatzyklase-Modul) und zum anderen auf der Degradationsebene (cAMP-Phosphodiesterasen, kodiert von *PDE1* und *PDE2*) reguliert. Ein erhöhter cAMP-Spiegel in der Zelle bewirkt eine Aktivierung der cAMP-abhängigen Proteinkinase A (PKA) und die Einleitung einer Vielzahl von Prozessen. Es stellt sich nun die Frage, welche Verbindungen es zwischen dem Ras/cAMP-Signalweg und den MAPK-vermittelten Signalwegen in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* gibt. Es ist bekannt, dass der Weg zur Induktion von invasivem Wachstum und Pseudohyphenbildung nicht nur durch den MAPK-Signalweg, sondern ebenfalls durch den Ras/cAMP-Signalweg reguliert wird (Mösch *et al.*, 1999). Weiterhin nimmt der Ras/cAMP-Signalweg Einfluss auf die Stressresistenz in der Zelle. Die Transkriptionsfaktoren des hochosmolaren MAPK-Antwortweges, Msn2 und Msn4, stellen hierbei Zielgene der in den Ras/cAMP involvierten Proteinkinase A dar und vermitteln die PKA-abhängige Regulation von *STRE* (stress response element) kontrollierten Genen (Martinez-Pastor *et al.*, 1996). Ob es eine Wechselwirkung zwischen dem durch Pheromon vermittelten Signalweg und dem Ras/cAMP-Signalweg gibt, ist bisher nicht bekannt. Ziel dieses Teils der Arbeit ist es nun, den Einfluss des cAMP-Spiegels auf die verschiedenen MAPK-Wege zu untersuchen. Es soll weiterhin festgestellt werden, welche Rolle das Protein Ste50, welches an verschiedenen MAPK-vermittelten Signalwegen beteiligt ist, hierbei einnimmt.

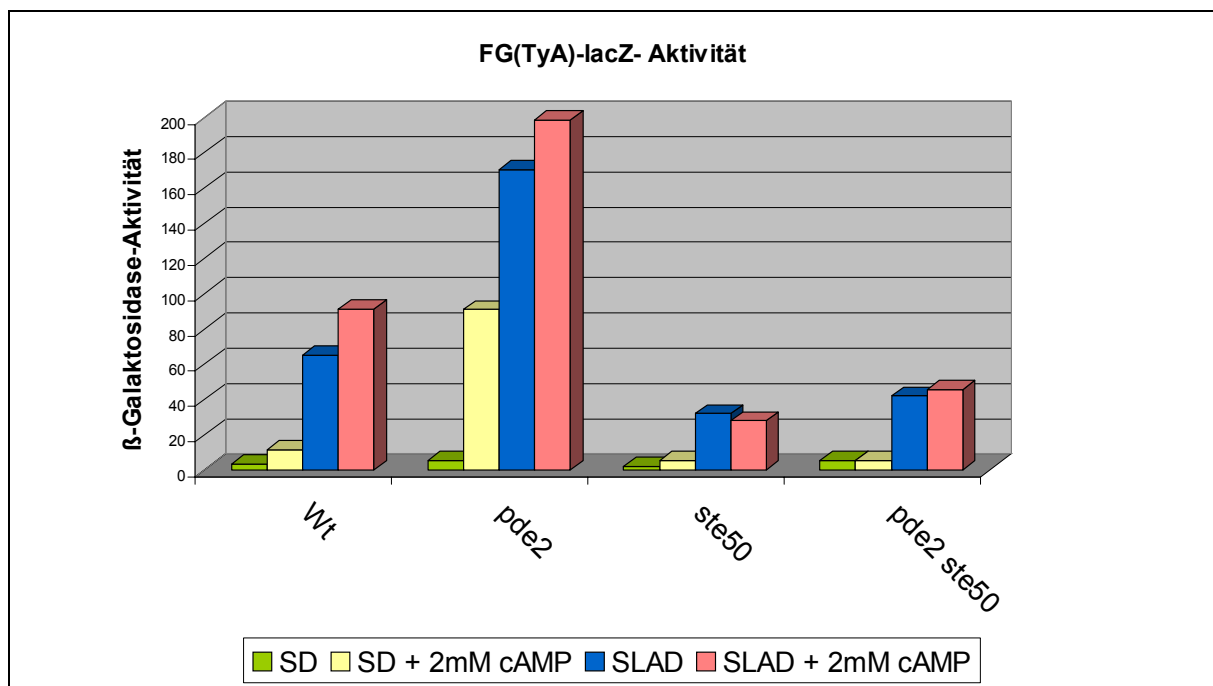
##### 3.1.1 Auswirkung einer Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels auf die Transkription des Reportergens *FG(TyA)-lacZ*

Der Weg zur Induktion vom invasiven Wachstum wird nicht nur durch den MAPK-Signalweg, sondern auch durch den Ras/cAMP-Signalweg reguliert (Mösch *et al.*, 1999). Zwischen dem MAPK-vermittelten Signalweg und dem Ras/cAMP-Signalweg bestehen verschiedene Wechselwirkungen. Es wurde vermutet, dass diese Kaskaden an einem Schritt unterhalb von dem Protein Ste20, welches in der MAPK-Kaskade involviert ist, wechselwirken (Mösch *et al.*, 1999). Es sollte nun untersucht werden, ob das Protein Ste50, welches unterhalb von Ste20 in die MAPK-Kaskade involviert ist, an der Vermittlung der Wechselwirkungen beteiligt ist. Hierfür wurde zunächst der Einfluss einer



Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels auf die Ste50-MAPK-vermittelte Expression des Reportergens *FG(TyA)-lacZ* untersucht. Es handelt sich bei *FG(TyA)-lacZ* um eine Fusion des Ty1-Transposons mit der  $\beta$ -Galaktosidase. Seine Expression hängt von dem Transkriptionsfaktor Ste12 des MAPK-Signalwegs ab (Laloux *et al.*, 1994) und korreliert mit dem pseudohyphalen Wachstum, welches durch Stickstoffverhungern (SLAD-Medium) induziert wird. Die Expression von *FG(TyA)-lacZ* reflektiert somit hauptsächlich die Aktivität der Ste50-MAPK-Kaskade, die in den filamentösen Prozess involviert ist (Lorenz & Heitman, 1997; Mösch *et al.*, 1996; Liu *et al.*, 1993; Roberts and Fink, 1994) und eignet sich daher für nachfolgende Untersuchungen.

Verschiedene Stammhintergründe, die mit dem Reportergen *FG(TyA)-lacZ* transformiert wurden, wurden in Standardmedium (SD) bzw. zur Induktion des invasiven Antwortweges in SLAD-Medium ohne und mit Zugabe von 2 mM cAMP für 12 h inkubiert. Die Zellen wurden geerntet, Rohextrakte hergestellt und hinsichtlich ihrer Expression des Reportergens *FG(TyA)-lacZ* mittels eines Enzymtests untersucht (Abb. 3.1).



**Abbildung 3.1** Auswirkung einer Erhöhung der cAMP-Konzentration auf die *FG(TyA)-lacZ*-Expression

Reportergenanalyse der Expression von *FG(TyA)-lacZ*. Verschiedene Stammhintergründe wurden mit dem Reportergenkonstrukt p*FG(TyA)-lacZ* transformiert. Die Zellen wurden in SD- bzw. SLAD-Medium ohne oder mit 2 mM cAMP angezogen. Die Proben wurden geerntet, Rohextrakte hergestellt und mit ONPG die spezifische  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität in mU/mg Gesamtprotein ermittelt. Es handelt sich um die Mittelwerte einer Doppelbestimmung. Die Abweichung beträgt +/- 15%.

Stämme: W303-1A (Wildtyp, HF91), W303-1A  $\Delta$ *pde2* (HCH113), W303-1A  $\Delta$ *ste50* (HF93) und W303-1A  $\Delta$ *pde2 ste50* (HCH119); Plasmid: p*FG(TyA)-lacZ* (EF309).

Hierbei zeigt sich, dass die Expression des Reportergens *FG(TyA)-lacZ* durch Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels gesteigert werden kann. Der Einfluss der cAMP-Konzentration auf die Induktion des pseudohyphalen Antwortwegs erfolgt in Abhängigkeit von Ste50 (Abb. 3.1).

Die Expression des Reportergens *FG(TyA)-lacZ* nach Inkubation der Zellen in Standardmedium spiegelt die Basalaktivität wieder (Abb. 3.1). Im Wildtypstamm W303-1A lässt sich die Basalaktivität durch Zugabe von cAMP leicht erhöhen. Eine Inkubation in SLAD-Medium führt zur Einleitung des invasiven Wachstumswegs, welches an einer Induktion der Expression von *FG(TyA)-lacZ* im Wildtypstamm erkennbar ist. Interessanterweise lässt sich die Expression von *FG(TyA)-lacZ* durch Zugabe von cAMP um den Faktor 1,4 steigern (Abb.3.1).

Um zu testen, welchen Einfluss die Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels auf die Expression des Reportergens *FG(TyA)-lacZ* ausübt, wurde mittels einer PCR-basierten Methode eine Deletion der hochaffinen Phosphodiesterase 2 (*PDE2*) hergestellt und die Expression des Reportergens *FG(TyA)-lacZ* analysiert. In einem  $\Delta pde2$ -Stamm liegt ein erhöhter intrazellulärer cAMP-Spiegel vor, da cAMP nicht mehr von der Phosphodiesterase 2 hydrolysiert werden kann. In diesem Stammhintergrund lässt sich schon die Basalaktivität des Reportergens *FG(TyA)-lacZ* durch Zugabe von cAMP drastisch erhöhen (Abb. 3.1). Nach Induktion des Signalweges steigt die *FG(TyA)-lacZ*-Expression um den Faktor 2,6 verglichen mit dem Wildtypstamm. Die Zugabe von cAMP führt zu einer weiteren Erhöhung der Expression um den Faktor 2,2 verglichen mit dem Wildtypstamm. Somit hat die Erhöhung des cAMP-Spiegels, hervorgerufen durch Zugabe von 2 mM cAMP, bzw. durch Deletion der hochaffinen Phosphodiesterase *PDE2* eine verstärkte Expression des Reportergens *FG(TyA)-lacZ* zur Folge (Abb. 3.1).

Um zu testen, ob der Einfluss der Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels direkt auf der Ebene der MAPK-Kaskade erfolgt, wurde ein Deletionsstamm des Gens *STE50*, einer Komponente der MAPK-Kaskade, verwendet und die Expression des Reportergens *FG(TyA)-lacZ* analysiert. Das Protein Ste50 spielt eine wichtige Rolle für den pseudohyphalen Antwortweg. Ein *STE50*-Deletionsstamm weist deutliche Defekte in der Induktion des pseudohyphalen Wachstums auf (Jansen *et al.*, 2001). Dies spiegelt sich ebenfalls in diesem Experiment wieder. In einem  $\Delta ste50$ -Stamm hat die Induktion des pseudohyphalen Signalweges durch Inkubation in SLAD-Medium eine um den Faktor 2 reduzierte Expression des Reportergens *FG(TyA)-lacZ* verglichen mit der Expression im Wildtypstamm zur Folge (Abb.3.1). Eine Erhöhung des cAMP-Spiegels, hervorgerufen durch Zugabe von 2 mM cAMP bzw. durch eine zusätzliche Deletion von *PDE2*, bewirkt nur eine leichte Steigerung der *FG(TyA)-lacZ*-Expression. Somit hat eine Erhöhung des cAMP-Spiegels kaum Auswirkung auf die Induktion der *FG(TyA)-lacZ*-Expression in einem  $\Delta ste50$ -Stamm.

Zusammenfassend hat die Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels einen positiven Einfluss auf die *FG(TyA)*-Expression. Dieser Einfluss von cAMP erfolgt in Abhängigkeit des Ste50-MAPK-Weges. Diese Ergebnisse stimmen mit den Daten von Mösch *et al.* (1999) überein und deuten an, dass

die *FRE* (filamentous and invasion responsive elements)-abhängige *FG(TyA)-lacZ*-Genexpression, die durch einen erhöhten cAMP-Spiegel in der Zelle und der MAPK-Kaskade vermittelt wird, auf der Höhe oder unterhalb von Ste50 zusammengeschaltet werden kann.

### 3.1.2 Auswirkung einer Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels auf die Pheromonantwort

#### 3.1.2.1 Transkription des Reportergens *FUS1-lacZ*

In vorherigen Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels einen positiven Einfluss auf die Induktion der Transkription im pseudohyphalen Antwortweg ausübt. Ob es eine Wechselwirkung zwischen dem durch Pheromon vermittelten Signalweg und dem Ras/cAMP-Signalweg gibt, ist bisher nicht bekannt. Daher ist es von Interesse den Einfluss einer Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels auf den Ste50-MAPK-vermittelten Pheromonantwortweg zu untersuchen. Hierfür stellt sich die Analyse der Expression des Reportergenkonstruktes *FUS1-lacZ*, einer Fusion des Gens *FUS1* an die  $\beta$ -Galaktosidase, als geeignet dar. *FUS1* ist ein Zielgen der Pheromon vermittelten MAPK-Kaskade, welches für die Fusion der Zellen während der Paarung benötigt wird (Trueheart & Fink, 1989).

Verschiedene Stammhintergründe, die mit dem Reportergen *FUS1-lacZ* transformiert wurden, wurden in Normalmedium ohne und mit Zugabe von 2 mM cAMP bzw.  $\alpha$ -Faktor für 90 min inkubiert. Die Zellen wurden geerntet, Rohextrakte wurden hergestellt und hinsichtlich ihrer Expression des Reportergens *FUS1-lacZ* mittels eines Enzymtests analysiert (Abb. 3.2).

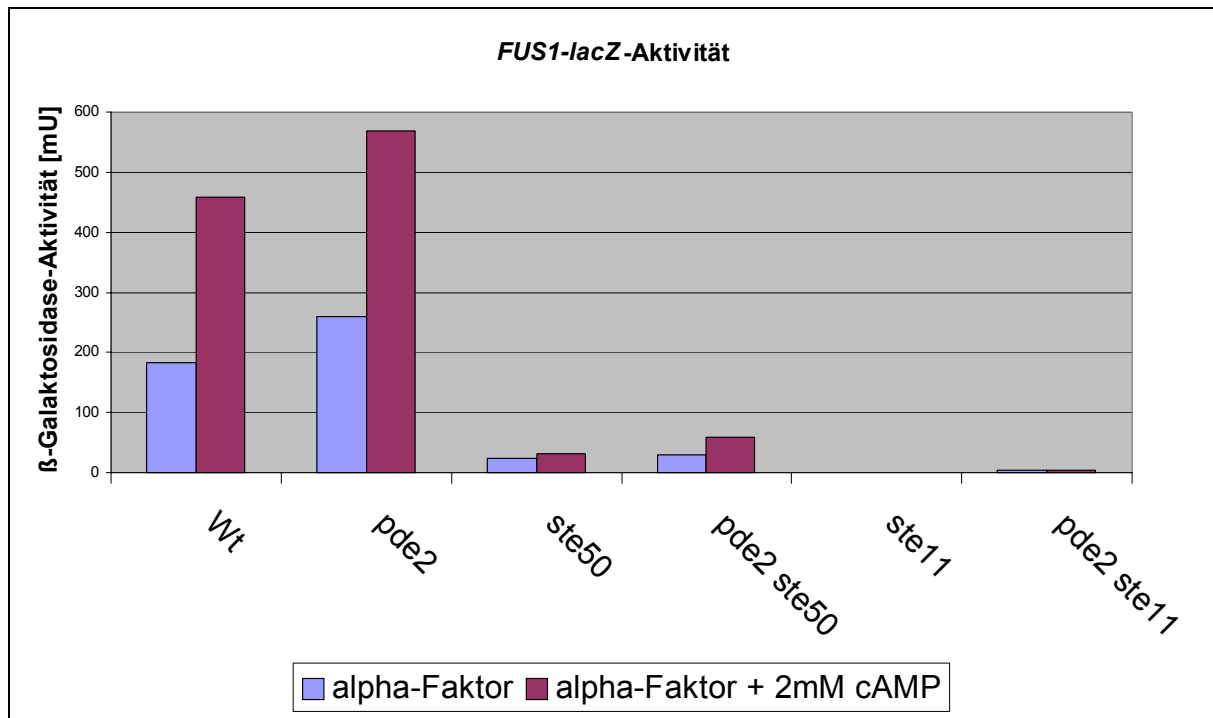
Hierbei zeigt sich, dass die Expression des Reportergens *FUS1-lacZ* durch Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels gesteigert werden kann. Der Einfluss der cAMP-Konzentration auf die Induktion des Pheromonantwortwegs erfolgt in Abhängigkeit von Ste50 (Abb. 3.2).

Die Einleitung des Pheromonantwortwegs führt im Wildtypstamm zu einer Induktion der Expression des Reportergens *FUS1-lacZ*, welche sich durch cAMP-Zugabe um den Faktor 2,5 steigern lässt (Abb.3.2). Durch Deletion von *PDE2* wird ein erhöhter cAMP-Spiegel in der Zelle hervorgerufen. Dies bewirkt eine weitere Steigerung der *FUS1-lacZ*-Expression um den Faktor 1,4 verglichen mit dem Wildtypstamm. Die Zugabe von 2 mM cAMP führt zu einer weiteren Erhöhung der Expression von *FUS1-lacZ* um den Faktor 1,2 verglichen mit dem Wildtypstamm (Abb.3.2). Dies deutet an, dass eine Erhöhung des cAMP-Spiegels einen positiven Einfluss auf die Induktion des Reportergens *FUS1-lacZ* ausübt.

Um zu testen, ob der Einfluss einer Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels auf der Ebene von Ste50 erfolgt, wurde ein Deletionsstamm von *STE50* verwendet und die Expression von *FUS1-lacZ* analysiert. Das Protein Ste50 spielt eine wichtige Rolle zur Aufrechterhaltung der Signaltransduktion während der Paarung. Deletionsstämme von *STE50* zeigen eine reduzierte Induktion der *FUS1-lacZ*-Expression (Ramezani Rad *et al.*, 1992; Xu *et al.*, 1996). Dies spiegelt sich ebenfalls in diesem

Experiment wieder. Ein  $\Delta ste50$ -Stamm weist nach Induktion des Pheromonantwortweges durch  $\alpha$ -Faktor eine um den Faktor 7–8 reduzierte Expression des Reportergens *FUS1-lacZ* verglichen mit der Expression im Wildtypstamm auf. Eine Erhöhung des cAMP-Spiegels, hervorgerufen durch Zugabe von 2 mM cAMP bzw. durch eine zusätzliche Deletion von *PDE2* bewirkt nur eine leichte Steigerung der *FUS1-lacZ*-Expression. Somit hat eine Erhöhung des cAMP-Spiegels kaum Auswirkung auf die Induktion der *FUS1-lacZ*-Expression in einem  $\Delta ste50$ -Stamm.

Die Hefestämme W303-1A  $\Delta ste11$  bzw. W303-1A  $\Delta pde2 \Delta ste11$  dienen als Negativkontrolle. Sie zeigen eine sehr niedrige *FUS1-lacZ*-Expression (Abb. 3.2).



**Abbildung 3.2** Auswirkung einer Erhöhung der cAMP-Konzentration auf die *FUS1-lacZ*- Expression

Reportergenanalyse der Expression von *FUS1-lacZ*. Verschiedene Stammhintergründe wurden mit dem Reportergenkonstrukt *FUS1-lacZ* transformiert. Die Hefen wurden in Selektivmedium ohne oder mit 2 mM cAMP angezogen. Die Proben wurden nach Induktion (5  $\mu$ M  $\alpha$ -Faktor für 90 min) geeerntet, Rohextrakte hergestellt und mit ONPG die spezifische  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität in mU/mg Gesamtprotein ermittelt. Es handelt sich um die Mittelwerte einer Doppelbestimmung. Die Abweichung beträgt  $\pm$  10%.

Stämme: W303-1A (Wt, HF91), W303-1A  $\Delta pde2$  (HCH113), W303-1A  $\Delta ste50$  (HF93) und W303-1A  $\Delta pde2 \Delta ste50$  (HCH119), Plasmid: pMG10 *FUS1-lacZ* (EFB13).

Zusammenfassend liefern diese Ergebnisse den ersten Hinweis darauf, dass eine Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels einen positiven Einfluss auf den Pheromonantwortweg ausübt. Dieser Effekt ist wiederum von dem Ste50-MAPK-Weg abhängig. Diese Daten weisen somit darauf hin, dass die *PRE*-abhängige *FUS1-lacZ*-Genexpression, die durch einen erhöhten cAMP-Spiegel in der Zelle und der MAPK-Kaskade hervorgerufen wird, auf der Höhe oder unterhalb von Ste50 zusammengeschaltet werden kann.

### 3.1.2.2 Quantitativer Paarungstest

Um den Einfluss von cAMP auf die Paarungspheromonantwort, im speziellen auf die Paarungseffizienz zu testen, wurde eine quantitative Paarungsanalyse durchgeführt. Hierfür wurden verschiedene Deletionsstämme des Paarungstyps *MATa* gegen den Wildtypstamm W303-1B des Paarungstyps *MAT $\alpha$*  gekreuzt. Die relative Paarungseffizienz wurde als Verhältnis der Diploidenzahl zur Zahl der Gesamtzellen ermittelt. In Tabelle 3.1 sind die Ergebnisse der Paarungsanalyse dargestellt.

<i>MATa</i>	X	<i>MAT<math>\alpha</math></i>	
		YEPD	YEPD + 2mM cAMP
Wildtyp		18.70	40.00
<i>pde2</i>		37.00	45.90
<i>pde1</i>		25.70	37.90
<i>ste50</i>		0.13	0.31
<i>pde2 ste50</i>		0.48	0.59
<i>pde1ste50</i>		0.06	0.31
<i>ste11</i>		0.00	0.00
<i>pde2 ste11</i>		0.00	0.00
<i>pde1 ste11</i>		0.00	0.00

**Tabelle 3.1 Auswirkung einer Erhöhung der cAMP-Konzentration auf die Paarung in der Hefe**

Dargestellt sind die Ergebnisse einer quantitativen Paarungsanalyse verschiedener Hefestämme. Hefezellen verschiedener Stammhintergründe (Wildtyp bzw. Deletionsstämme) wurden mit den angegebenen Plasmiden transformiert. Die Zellen wurden in Medium ohne oder mit 2 mM cAMP angezogen.  $1 \times 10^6$  Zellen des Paarungstypes *MATa* bzw. *MAT $\alpha$*  wurden für 5 Stunden bei 30°C inkubiert. Verschiedene Verdünnungen wurden auf den entsprechenden Selektivplatten zur Bestimmung der Zellzahl und der Diploidenzahl ausplattiert. Die relative Paarungseffizienz wurde als Verhältnis der Diploidenzahl relativ zur Zellzahl ermittelt. Angegeben sind die Mittelwerte zweier unabhängiger Experimente (Abweichung +/-10%).

Stämme: Wildtyp (W303-1A (HF91), W303-1B (HF92)), W303-1A  $\Delta pde2$  (HCH113), W303-1A  $\Delta pde1$  (HCH138), W303-1A  $\Delta ste50$  (HF93), W303-1A  $\Delta pde2 \Delta ste50$  (HCH119), W303-1A  $\Delta pde1 \Delta ste50$  (HCH143), W303-1A  $\Delta ste11$  (HF95), W303-1A  $\Delta pde2 \Delta ste11$  (HCH175), W303-1A  $\Delta pde1 \Delta ste11$  (HCH152); Plasmide: pRS413-*GALp* (ELS22), pRS416-*GALp* (ELS25).

Hierbei zeigt sich, dass die Paarungseffizienz durch eine Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels gesteigert werden kann. Der Einfluss der erhöhten cAMP-Konzentration auf die Paarung erfolgt in Abhängigkeit des Ste50-MAPK-Weges (Tab. 3.1).

Die Paarungseffizienz der Wildtypstämme lässt sich durch Zugabe von 2 mM cAMP um den Faktor 2,1 steigern (Tab. 3.1). Interessanterweise zeigt sich, dass eine Deletion der hochaffinen Phosphodiesterase *PDE2* einen größeren Einfluss auf die Paarungseffizienz ausübt verglichen mit der Deletion der niederaffinen Phosphodiesterase *PDE1*. In einem  $\Delta pde2$ -Hefestamm kann eine um den Faktor 2 (ohne cAMP-Zugabe) bzw. um den Faktor 2,5 (nach cAMP-Zugabe) erhöhte

Paarungseffizienz gegenüber der Wildtypkreuzung detektiert werden. In einem  $\Delta pde1$ -Stamm zeigt sich lediglich eine Erhöhung der Paarungseffizienz gegenüber der Wildtypkreuzung um den Faktor 1,4 (ohne cAMP-Zugabe) bzw. um den Faktor 2 (nach cAMP-Zugabe). Hingegen kann in einem  $\Delta ste50$ -Hefestamm die niedrige Paarungseffizienz weder durch cAMP-Zugabe, noch durch Deletion der Phosphodiesterase *PDE1* bzw. *PDE2* gesteigert werden. Die Kreuzungen der Stämme W303-1A  $\Delta ste11$ , W303-1A  $\Delta pde2 \Delta ste11$  bzw. W303-1A  $\Delta pde1 \Delta ste11$  dienen als Negativkontrolle. Sie sind nicht in der Lage zu paaren.

Somit konnte der positive Einfluss einer Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels auf den Pheromonweg bestätigt werden. Die Zugabe von cAMP führt zu einer Erhöhung der relativen Paarungseffizienz. Dieser Effekt kann durch Deletion von *PDE2* gesteigert werden. Ferner zeigt sich, dass der Einfluss einer *PDE1*-Deletion auf die Paarungseffizienz nicht so signifikant ist, wie für die *PDE2*-Deletion beobachtet. Weiterhin zeigen die Ergebnisse, dass die Einflussnahme des cAMP-Spiegels auf die Paarungseffizienz wiederum in Abhängigkeit des Ste50-MAPK-Wegs erfolgt.

### 3.1.2.3 Die Eigenschaften der Ste50-SAM-Mutanten bei einer Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels

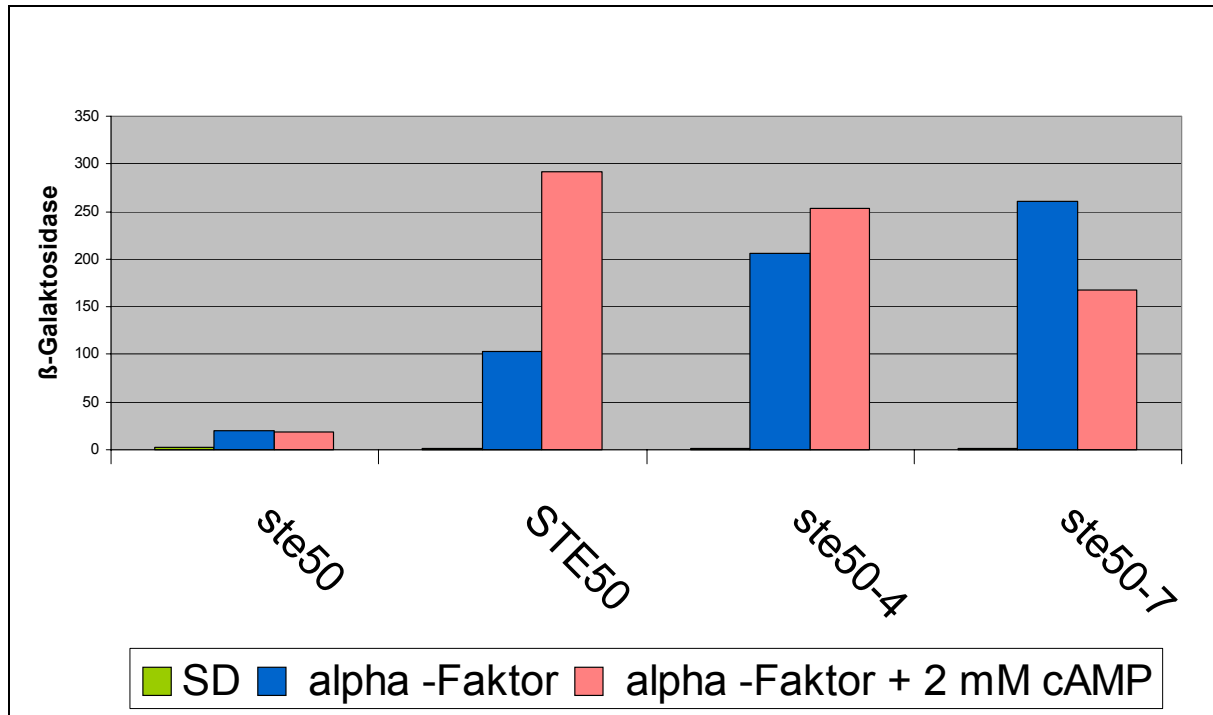
In den ersten Versuchsteilen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Einflussnahme von cAMP auf die MAPK-Wege zur Induktion der Pseudohyphenbildung bzw. der Paarung in Abhängigkeit von Ste50 erfolgt. In diesem Versuchsteil soll nun untersucht werden, welchen Einfluss die Erhöhung des cAMP-Spiegels auf Mutanten von Ste50 ausübt. In unserer Arbeitsgruppe konnten Mutanten der SAM-Domäne von Ste50 hergestellt werden, die eine verminderte Interaktion mit Ste11 aufwiesen und die Signale der Wege differenziert weiterleiten (Jansen *et al.*, 2001). Diese Mutanten Ste50-4 und Ste50-7 zeigten eine verstärkte Induktion des Pheromonweges und des invasiven Wachstumsweges und Wachstumsdefekte auf salzhaltigen Medium (Jansen *et al.*, 2001). Im folgenden Experiment soll der Einfluss von cAMP auf die *FUS1-lacZ*-Expression dieser Mutanten untersucht werden.

Hierfür wurden die Plasmide pRS416-50p-Myc-*STE50*, pRS416-50p-Myc-*STE50-4*, pRS416-50p-Myc-*STE50-7* sowie das Reportergenkonstrukt *FUS1-lacZ* in den Hefestamm W303-1A  $\Delta ste50$  transformiert. Die Zellen wurden logarithmisch angezogen, für 90 min mit 5  $\mu$ M  $\alpha$ -Faktor inkubiert und geerntet. Rohextrakte wurden hergestellt und einer Reportergenanalyse unterzogen (Abb. 3.3).

Hierbei zeigt sich, dass die *STE50*-SAM-Mutanten Ste50-4 und Ste50-7 den Pheromonweg verstärkt einleiten. Interessanterweise führt die Zugabe von cAMP bei diesen Mutanten zu keiner weiteren Steigerung der *FUS1-lacZ*-Induktion (Abb. 3.3).

In einem  $\Delta ste50$ -Hefestamm ist die Expression von *FUS1-lacZ* nach Einleitung des Pheromonweges sehr niedrig. Sie kann durch Zugabe von cAMP nicht gesteigert werden (Abb. 3.3). Komplementiert man diesen Stamm mit dem Plasmid pRS416-50p-Myc-*STE50*, ist nach Pheromonzugabe eine

Induktion der Expression von *FUS1-lacZ* detektierbar. Die Zugabe von 2 mM cAMP führt zu einer Erhöhung der Expression von *FUS1-lacZ* um den Faktor 2-3. Betrachtet man die Expression von *FUS1-lacZ* nach Transformation des Stammes W303-1A  $\Delta ste50$  mit den Plasmiden pRS416-50p-Myc-*STE50-4* bzw. pRS416-50p-Myc-*STE50-7*, ist nach Pheromonzugabe eine deutliche, um den Faktor 2-3 erhöhte *FUS1-lacZ*-Expression im Vergleich zum Wildtyp detektierbar. Interessanterweise lässt sich diese Expression durch Zugabe von cAMP kaum steigern (Abb. 3.3).



**Abbildung 3.3 Die Wirkung von Ste50-SAM-Mutanten auf die *FUS1-lacZ*- Expression**

Der Hefestamm W303-1A  $\Delta ste50$  wurde mit den Plasmiden pRS416-50p-Myc-*STE50*, pRS416-50p-Myc-*STE50-4*, pRS41650p-Myc-*STE50-7* sowie mit dem Reportergerkonstrukt pMG10 *FUS1-lacZ* transformiert. Die Hefen wurden in Selektivmedium ohne oder mit 2 mM cAMP angezogen. Die Proben wurden nach Induktion (5  $\mu$ M  $\alpha$ -Faktor für 90 min) geerntet, Rohextrakte hergestellt und mit ONPG die spezifische  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität in mU/mg Gesamtprotein ermittelt. Die Angaben sind Mittelwerte und basieren auf einer Doppelbestimmung (Abweichung +/-15%).

Stamm: W303-1A  $\Delta ste50$  (HF93); Plasmide: pRS416-50p-Myc-*STE50* (EFB268), pRS416-50p-Myc-*STE50-4* (EFB317), pRS416-50p-Myc-*STE50-7* (EFB319), pMG10 *FUS1-lacZ* (EFB13).

Es konnte somit bestätigt werden, dass die *STE50*-SAM-Mutanten Ste50-4 und Ste50-7 den Pheromonweg verstärkt einleiten, sichtbar an einer erhöhten *FUS1-lacZ*-Expression. Diese Expression lässt sich durch Zugabe von cAMP nicht weiter steigern.

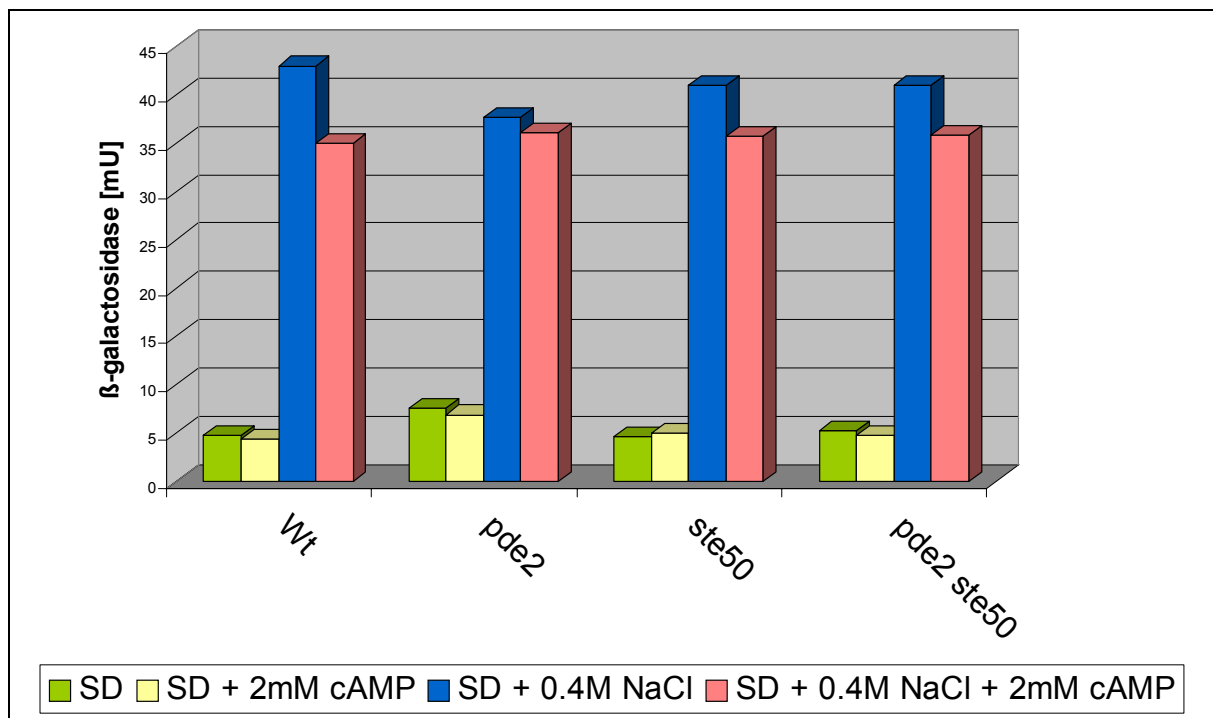
### 3.1.3 Auswirkung einer Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels auf den hochosmolaren Antwortweg

#### 3.1.3.1 Expression von *STRE-lacZ*

Daraufhin sollten die Auswirkungen einer Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels auf den hochosmolaren Antwortweg untersucht werden. Es ist bekannt, dass der Ras/cAMP-Signalweg Einfluss auf die Stressresistenz in der Zelle nimmt. Die Transkriptionsfaktoren des hochosmolaren

MAPK-Antwortweges, Msn2 und Msn4, stellen hierbei Zielgene der in dem Ras/cAMP-Signalweg involvierten Proteinkinase A dar und werden negativ von ihr reguliert. Diese Transkriptionsfaktoren binden an sogenannte *STRE*-Elemente (*s*tress *r*esponsive *e*lements) in den Promotorregionen verschiedener Zielgene. Ein solches Zielgen stellt beispielsweise die Katalase *CTTI* dar. Daher bietet sich die Verwendung des Reportergens *STRE-lacZ* an, welches eine Fusion von *CTTI*-Sequenzen an die  $\beta$ -Galaktosidase enthält, um die transkriptionelle Induktion des hochosmolaren Antwortwegs zu analysieren.

In diesem Versuchsteil soll nun der Einfluss einer Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels auf die Induktion der *STRE*-abhängigen Ste50-MAPK-vermittelten Expression untersucht werden. Verschiedene Stammhintergründe wurden hierfür mit dem Reportergen *STRE-lacZ* transformiert, in Medium mit oder ohne 0,7 M NaCl bzw. 2 mM cAMP inkubiert, Zellen geerntet, Rohextrakte hergestellt und hinsichtlich ihrer *STRE-lacZ*-Expression analysiert (Abb. 3.4).



**Abbildung 3.4** Auswirkung einer Erhöhung der cAMP-Konzentration auf die *STRE-lacZ*- Expression

Verschiedene Hefestämme wurden mit dem Reportergenkonstrukt *STRE-lacZ* transformiert. Die Hefen wurden in Selektivmedium ohne oder mit 2 mM cAMP angezogen. Die Proben wurden nach Induktion (0,7 M NaCl für 5 min) geerntet, Rohextrakte hergestellt und mit ONPG die spezifische  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität in mU/mg Gesamtprotein ermittelt.

Stämme: W303-1A (HF91, Wildtyp), W303-1A  $\Delta pde2$  (HCH113), W303-1A  $\Delta ste50$  (HF93) und W303-1A  $\Delta pde2 \Delta ste50$  (HCH119), Plasmid: pLG669-*STRE-lacZ* (ECH48).

Hierbei zeigt sich, dass eine Erhöhung des cAMP-Spiegels in der Zelle einen leicht negativen Einfluss auf die Expression des Reportergenkonstruktes *STRE-lacZ* ausübt (Abb. 3.4).

Die Expression des Reportergens *STRE-lacZ* nach Inkubation der Zellen in Standardmedium (SD) spiegelt die Basalaktivität wieder (Abb. 3.4). Im Wildtypstamm W303-1A wird die Basalaktivität durch die Zugabe von 2 mM cAMP kaum beeinflusst. Der hochosmolare Antwortweg wird durch



Inkubation der Zellen in salzhaltigem Medium angeschaltet, welches zu einer Induktion der Expression von *STRE-lacZ* im Wildtypstamm führt. Diese Expression lässt sich durch Zugabe von cAMP leicht erniedrigen (Abb.3.4).

Erhöht man den intrazellulären cAMP-Spiegel in der Zelle, durch Deletion von *PDE2*, ändert sich die Basalaktivität verglichen mit dem Wildtypstamm kaum. Die Zugabe von cAMP hat ebenfalls kaum Einfluss auf die Basalaktivität dieses Stammes. Hingegen zeigt dieser Stamm nach Induktion des hochosmolaren Antwortwegs eine leichte Reduzierung der *STRE-lacZ*-Expression, verglichen mit dem Wildtypstamm (Abb.3.4). Eine Erhöhung des cAMP-Spiegels in der Zelle übt somit einen leicht negativen Einfluss auf die Expression des Reportergenkonstruktes *STRE-lacZ* aus.

Um zu überprüfen, ob dieser Einfluss in Abhängigkeit von *STE50* erfolgt, wurde die Expression von *STRE-lacZ* in einem  $\Delta ste50$ -Stamm untersucht. Dieser Stammhintergrund zeigt eine Expression der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität in dem Bereich des Wildtypstammes, da das Signal noch über den Sln1-abhängigen Zweig des hochosmolaren Antwortweges weitergeleitet werden kann. Die Zugabe von 2 mM cAMP hat eine mit dem Wildtypstamm vergleichbare Verminderung der *STRE-lacZ*-Expression zur Folge. Hingegen wird die Expression von *STRE-lacZ* durch eine zusätzliche Deletion von *PDE2* nicht beeinflusst (Abb. 3.4).

Zusammenfassend deuten diese Ergebnisse an, dass eine Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels einen leicht negativen Einfluss auf die Stress-induzierte Transkription des Reportergens *STRE-lacZ* ausübt.

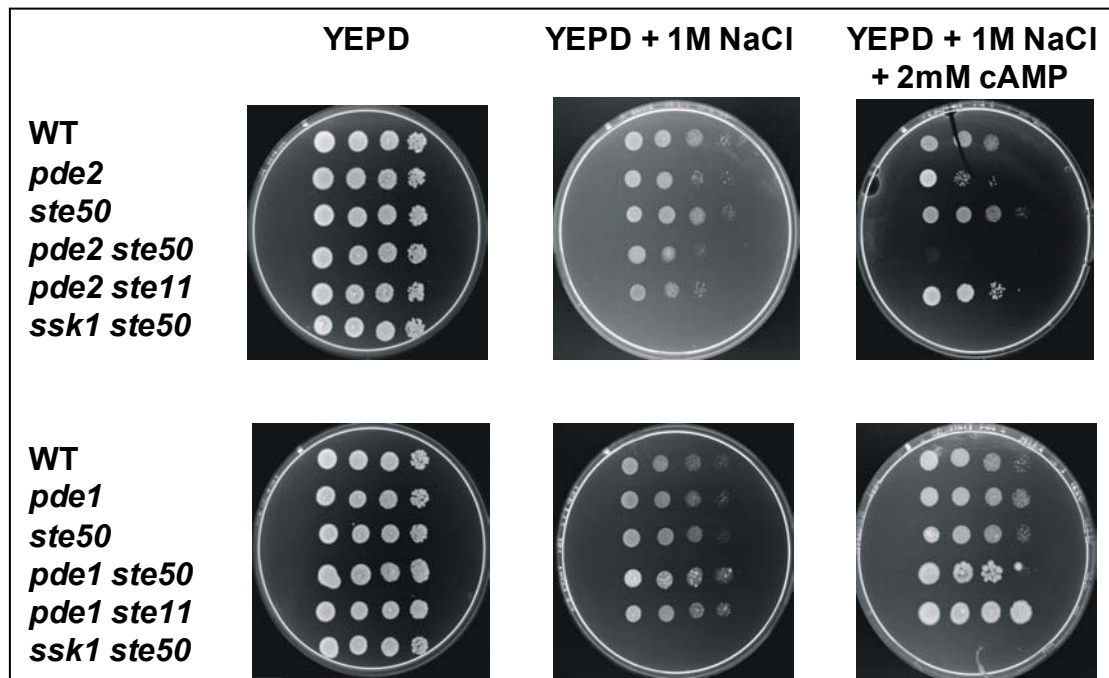
### 3.1.3.2 cAMP beeinflusst negativ das Wachstum auf hochosmolaren Medium

Die Flüssigmessungen der *STRE-lacZ*-Expression zeigten einen leicht negativen Einfluss einer Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels auf die transkriptionelle Induktion des hochosmolaren Antwortwegs, hervorgerufen durch einen kurzen Salzstress. Um zu testen, wie sich eine Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels auf das langfristige Wachstum von Zellen auf Medium mit hohen Salzkonzentrationen auswirkt, wurden Wachstumsanalysen auf verschiedenen Salzmedien durchgeführt. Hierfür wurden verschiedene Stammhintergründe verwendet, die unter anderem Deletionen der Phosphodiesterasen *PDE2* bzw. *PDE1* enthielten.

Es zeigt sich, dass die Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels in der Zelle, hervorgerufen durch eine Deletion der hochaffinen Phosphodiesterase *PDE2*, sowie einer Zugabe von 2 mM cAMP, das Wachstum der Zellen auf Medium mit hohen Salzkonzentrationen negativ beeinflusst (Abb. 3.5).

Alle Hefestämme zeigen normales Wachstum auf Vollmedium (Abb. 3.5). Der Wildtypstamm W303-1A (Positivkontrolle) ist ebenfalls in der Lage, auf Medium mit hohen Salzkonzentrationen zu wachsen. Auch die Zugabe von cAMP beeinflusst das Wachstum des Wildtypstammes auf salzhaltigen Medium nicht (Abb. 3.5, oberer Teil). Als Negativkontrolle wurde der Hefestamm W303-

1A  $\Delta ssk1 \Delta ste50$  verwendet, welcher nicht mehr in der Lage ist, auf Medium mit hohen Salzkonzentrationen zu wachsen (Abb. 3.5). Um zu überprüfen, ob die Phosphodiesterasen *PDE2* und *PDE1* unterschiedliche regulatorische Rollen für den Ras/cAMP-Signalweg unter hohen Salzstressbedingungen einnehmen, wurde das Wachstum verschiedener Deletionsstämmen der Phosphodiesterasen auf Medium mit hohen Salzkonzentrationen getestet. Hierbei zeigt sich, dass die Deletion der niederaffinen Phosphodiesterase *PDE1* keine sichtbaren Auswirkungen auf das Wachstum auf salzhaltigem Medium bzw. auf salzhaltigem Medium und Zusatz von 2 mM cAMP hat. Das Wachstum eines  $\Delta pde1$ -Stammes ist mit dem des Wildtyps vergleichbar (Abb.3.5, unterer Teil). Hingegen führt die Deletion der hochaffinen Phosphodiesterase *PDE2* zu leichten Wachstumsdefekten auf Medium mit hohen Salzkonzentrationen verglichen mit dem Wildtypstamm. Diese Wachstumsdefekte können durch Zugabe von 2 mM cAMP noch leicht verstärkt werden (Abb. 3.5, oberer Teil).



**Abbildung 3.5** Auswirkung einer Erhöhung der cAMP-Konzentration auf die Osmotoleranz

Dargestellt ist die Wachstumsanalyse verschiedener Hefestämme auf verschiedenen Medien. Logarithmisch wachsende Hefezellen verschiedener Stammhintergründe wurden geerntet. Daraufhin wurden verschiedene 1:10 Verdünnungen hergestellt. Entsprechende Verdünnungen (unverdünnt, 1:10, 1:100, 1:1000) wurden auf YEPD-Platten, YEPD-Platten mit 1 M NaCl und YEPD-Platten mit 1 M NaCl und 2 mM cAMP aufgetropft. Die Platten wurden 3 Tage bei 30°C inkubiert und das Wachstum der Zellen dokumentiert.

Stämme: W303-1A (HF91, Wildtyp), W303-1A  $\Delta pde2$  (HCH113), W303-1A  $\Delta ste50$  (HF93), W303-1A  $\Delta pde2 \Delta ste50$  (HCH119), W303-1A  $\Delta pde2 \Delta ste11$  (HCH175), W303-1A  $\Delta ssk1 \Delta ste50$  (HCH100), W303-1A  $\Delta pde1$  (HCH138), W303-1A  $\Delta pde1 \Delta ste50$  (HCH143) und W303-1A  $\Delta pde1 \Delta ste11$  (HCH152).

Somit beeinflusst eine Erhöhung des cAMP-Spiegels, hervorgerufen durch eine Deletion der hochaffinen Phosphodiesterase *PDE2* das Wachstum der Zellen auf Medium mit hohen Salzkonzentrationen. Hingegen hat die Deletion der niederaffinen Phosphodiesterase *PDE1* keinen Einfluss auf das Wachstum der Zellen auf salzhaltigen Platten.

### 3.1.3.3 Eine Deletion von *STE50* verstärkt den cAMP-abhängigen Wachstumsdefekt auf hochosmolarem Medium

Des Weiteren sollte untersucht werden, welchen Einfluss eine Erhöhung des cAMP-Spiegels auf das Wachstumsverhalten von Hefestämmen ausübt, die Deletionen von Komponenten des Sho1-abhängigen Zweiges des hochosmolaren Antwortwegs enthalten. Es wurden hierfür verschiedene Deletionsstämme der Gene *STE11* bzw. *STE50* verwendet und einer Wachstumsanalyse auf salzhaltigem Medium unterzogen (Abb.3.5).

Die Hefestämme W303-1A  $\Delta ste11$  sowie W303-1A  $\Delta ste50$  sind in der Lage auf Salzmedium zu wachsen, unabhängig von der cAMP-Zugabe (Abb. 3.5). Der Stamm W303-1A  $\Delta pde2 \Delta ste11$  verhält sich wie der Einfachdeletionsstamm W303-1A  $\Delta pde2$ . Es sind leichte Wachstumsdefekte detektierbar (Abb. 3.5). Betrachtet man hingegen das Wachstum des Stammes W303-1A  $\Delta pde2 \Delta ste50$  auf Medium mit hohen Salzkonzentrationen, so stellt man deutliche Wachstumsdefekte fest, die sich gegenüber dem Stamm W303-1A  $\Delta pde2$  noch verstärken (Abb. 3.5). Auf Medium mit Salz und 2 mM cAMP zeigt der Stamm W303-1A  $\Delta pde2 \Delta ste50$  kein Wachstum mehr. In diesem Stamm ist der Sho1-abhängige Zweig des hochosmolaren Antwortweges unterbrochen. Dieser Stamm müsste daher noch in der Lage sein, das Signal über den Sln1-abhängigen Zweig dieses Weges weiterzuleiten und auf Salzmedium zu wachsen (siehe Einleitung). Wodurch der starke Wachstumsdefekt des  $\Delta ste50 \Delta pde2$ -Stammes genau hervorgerufen wird, muss in weiteren Versuchen geklärt werden.

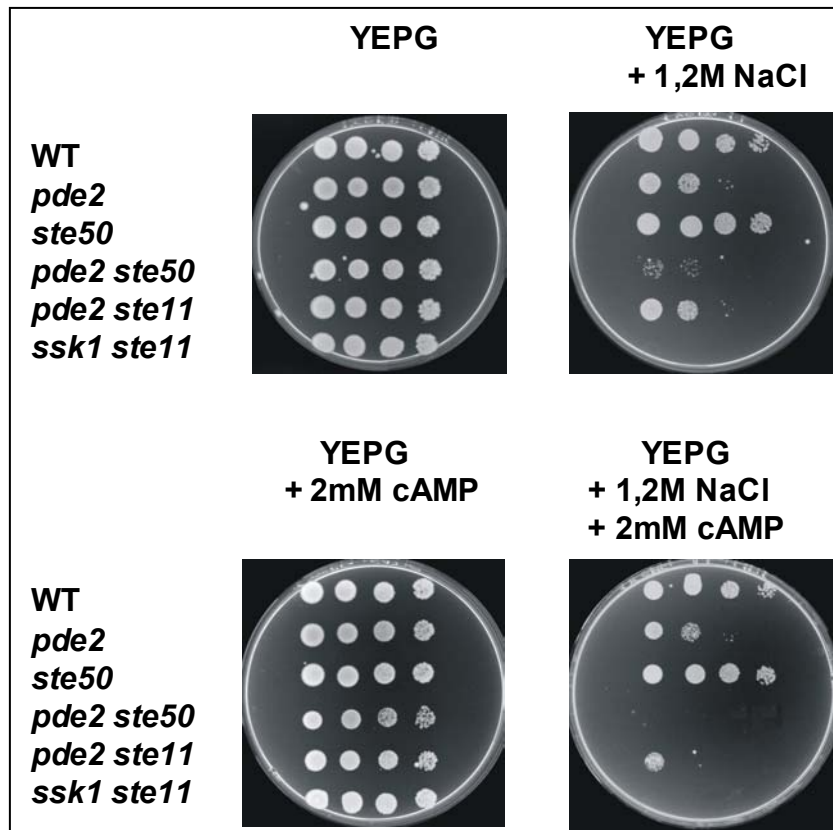
Zusammenfassend führt eine Deletion von *STE50* zu einer Verstärkung des Wachstumsdefektes eines  $\Delta pde2$ -Stammes auf Medium mit hohen Salzkonzentrationen.

### 3.1.3.4 Galaktose beeinflusst die Osmosensitivität

Es ist bekannt, dass die Adenylatzyklase *CYR1*, die für die cAMP-Synthese in der Zelle verantwortlich ist, sowohl durch die Ras-Proteine als auch durch ein Glukose-stimuliertes G-Protein gekoppeltes Rezeptorsystem (GPCR) aktiviert wird. Somit kann eine andere Kohlenstoffquelle einen Einfluss auf die cAMP-Herstellung in der Zelle haben, die hauptsächlich durch die Ras-Aktivität beeinflusst wird. Es soll nun untersucht werden, welchen Einfluss eine andere Kohlenstoffquelle auf das Wachstum verschiedener *PDE2*-Deletionsstämme ausübt. Hierfür wurde Galaktose verwendet, die von der Zelle erst zu Glukose umgewandelt werden muss. Es wurden Wachstumsanalysen verschiedener Hefestämme auf galaktosehaltigem Medium mit hohen Salzkonzentrationen durchgeführt.

Es zeigt sich, dass die Kohlenstoffquelle Galaktose die Osmosensitivität beeinflusst (Abb. 3.6).

Die Wachstumsdefekte der Zellen werden durch Verwendung von Galaktose als Kohlenstoffquelle, besonders für den Stamm W303-1A  $\Delta pde2 \Delta ste50$ , leicht verstärkt. Der Galaktoseeffekt könnte durch die Kombination einer schlechteren Kohlenstoffquelle und des erhöhten osmotischen Druckes verursacht sein. Diese Ergebnisse deuten an, dass Galaktose die Osmosensitivität beeinflusst.



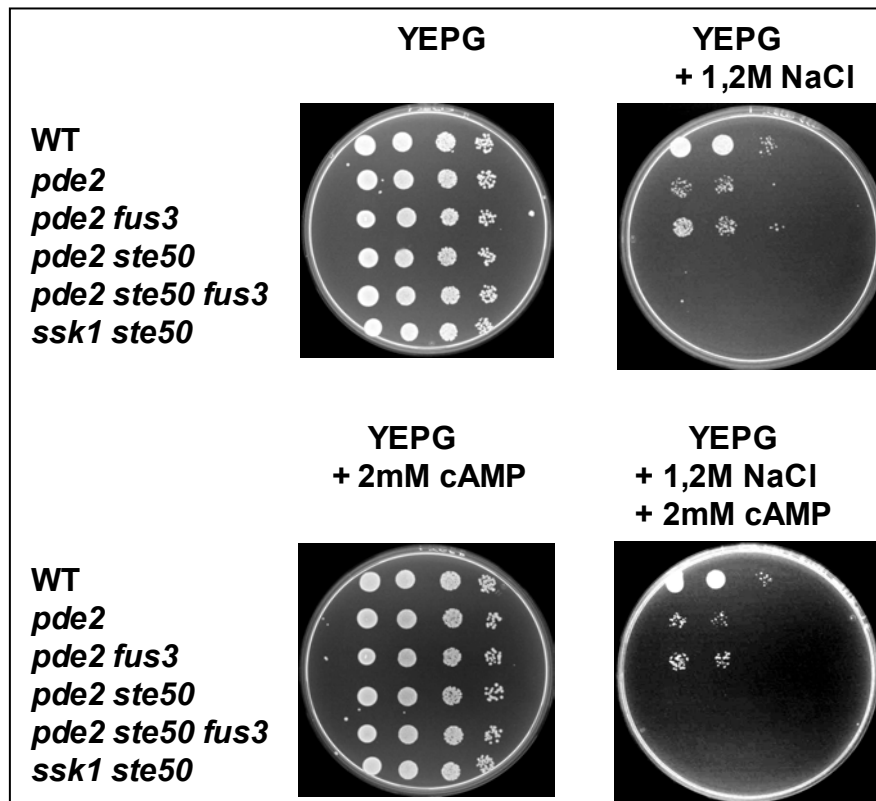
**Abbildung 3.6 Galaktose beeinflusst die Osmosensitivität**

Dargestellt ist die Wachstumsanalyse verschiedener Hefestämme auf verschiedenen Medien. Logarithmisch wachsende Hefezellen verschiedener Stammhintergründe wurden geerntet. Es wurden verschiedene 1:10 Verdünnungen hergestellt. Entsprechende Verdünnungen (unverdünnt, 1:10, 1:100, 1:1000) wurden auf Vollmediumplatten mit 2% Galaktose (YEPG), YEPG-Platten mit 1,2 M NaCl und YEPG-Platten mit 1,2 M NaCl und 2 mM cAMP aufgetropft. Die Platten wurden 3 Tage bei 30°C inkubiert und das Wachstum der Zellen dokumentiert.

Stämme: W303-1A (HF91, Wildtyp), W303-1A  $\Delta pde2$  (HCH113), W303-1A  $\Delta ste50$  (HF93), W303-1A  $\Delta pde2 \Delta ste50$  (HCH119), W303-1A  $\Delta pde2 \Delta ste11$  (HCH175), W303-1A  $\Delta ssk1 \Delta ste50$  (HCH100).

In den Wachstumsanalysen auf Salzmedium konnte somit gezeigt werden, dass eine Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels einen negativen Einfluss auf den hochosmolaren Antwortweg ausübt. Weiterhin konnte in vorherigen Versuchen gezeigt werden, dass cAMP einen positiven Einfluss auf den Pheromonweg hat. Da die Wachstumsdefekte auf Salzmedium zusätzlich auf eine Pheromon-abhängige Signalweiterleitung zurückzuführen sein könnten, sollte nun untersucht werden, ob ein cAMP vermittelter Crosstalk zwischen dem hochosmolaren und dem Pheromonantwortweg stattfindet. Um dies zu untersuchen, wurde in verschiedenen Stämmen zusätzlich die MAPK *FUS3* deletiert. *FUS3* stellt ein Zielgen des Pheromonwegs dar. Wenn es deletiert ist, kann kein Pheromonweg abhängiger G1-Arrest mehr erfolgen. Es wurden Wachstumsanalysen auf Medium mit hohen Salzkonzentrationen durchgeführt.

Der Hefestamm W303-1A  $\Delta pde2$  zeigt auf Medium mit 1,2 M Salz mit oder ohne cAMP leichte Wachstumsdefekte (Abb. 3.7). Wird zusätzlich *FUS3* deletiert, wird der Wachstumsdefekt leicht verbessert. Betrachtet man hingegen das Wachstum der Stämme W303-1A  $\Delta pde2 \Delta ste50$  sowie W303-1A  $\Delta pde2 \Delta ste50 \Delta fus3$ , so stellt man fest, dass diese Stämme nicht mehr in der Lage sind auf salzhaltigen Medium zu wachsen, unabhängig von der cAMP-Zugabe. Somit ist der Wachstumsdefekt dieses Stammes nicht auf einen Pheromon-vermittelten Wachstumsarrest zurückzuführen.



**Abbildung 3.7 Wachstumstest auf hochosmolarem Medium**

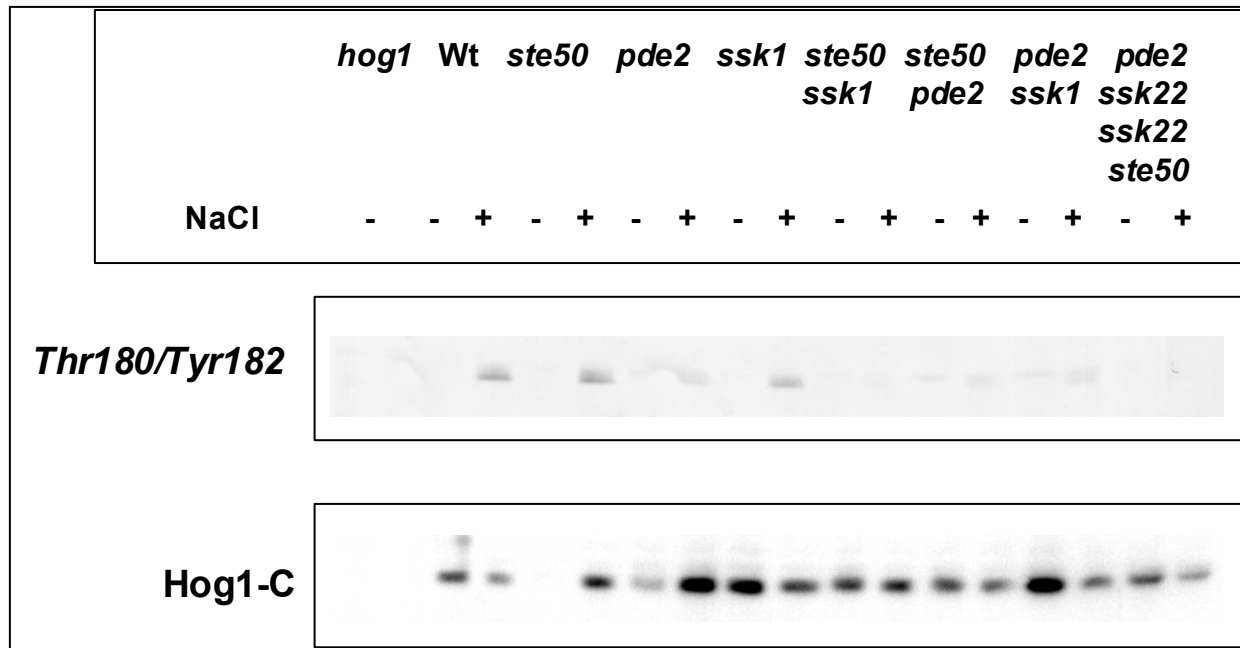
Logarithmisch wachsende Hefezellen verschiedener Stammhintergründe wurden geerntet. Es wurden verschiedene 1:10 Verdünnungen hergestellt. Entsprechende Verdünnungen (unverdünnt, 1:10, 1:100, 1:1000) wurden auf Vollmediumplatten mit 2% Galaktose, YEPG-Platten mit 1,2 M NaCl und YEPG-Platten mit 1,2 M NaCl und 2 mM cAMP aufgetropft. Die Platten wurden 3 Tage bei 30°C inkubiert und das Wachstum der Zellen dokumentiert.

Stämme: W303-1A (HF91, Wildtyp), W303-1A  $\Delta pde2$  (HCH113), W303-1A  $\Delta pde2 \Delta fus3$  (HCH581), W303-1A  $\Delta pde2 \Delta ste50$  (HCH119), W303-1A  $\Delta pde2 \Delta ste50 \Delta fus3$  ((HCH583) bzw. W303-1A  $\Delta ssk1 \Delta ste50$  (HCH100).

### 3.1.3.5 Hog1-Phosphorylierung

Der Hefestamm W303-1A  $\Delta pde2 \Delta ste50$  weist einen starken Wachstumsdefekt auf hochosmolarem Medium auf. Es stellte sich nun die Frage, ob das Signal in diesem Stammhintergrund richtig weitergeleitet wird. Hierfür wurde die Aktivierung des hochosmolaren Signalwegs mit Hilfe der Hog1-Phosphorylierung in verschiedenen Stammhintergründen untersucht. Es wurde ein Antikörper verwendet, der spezifisch die durch Salzzugabe hervorgerufene Thr180- und Tyr182-Phosphorylierung von Hog1 nachweisen kann. Die Ergebnisse der Westernblot-Analyse sind in Abbildung 3.8 dargestellt.

Als Positivkontrolle wurde der Wildtypstamm W303-1A verwendet. In diesem Stammhintergrund können beide Zweige des hochosmolaren Antwortwegs das Signal weiterleiten und das Protein Hog1 wird daher nach Salzzugabe phosphoryliert (Abb. 3.8). Als Negativkontrolle wurde der Stamm W303-1A  $\Delta hog1$  benutzt, in welchem wie erwartet keine Bande detektierbar ist (Abb. 3.8). Weiterhin wurden Stämme untersucht, die das Signal nur noch über einen Zweig des Weges weiterleiten können. Diese Stämme W303-1A  $\Delta ssk1$ , bei dem der Sln1-abhängige Weg unterbrochen ist, sowie W303-1A  $\Delta ste50$ , der nicht mehr in der Lage ist, das Sho1-abhängige Signal weiterzuleiten, zeigen eine Phosphorylierung von Hog1 (Abb. 3.8). Sind hingegen beide Zweige des Weges unterbrochen, wie es bei den Stämmen W303-1A  $\Delta ssk1 \Delta ste50$  und W303-1A  $\Delta pde2 \Delta ssk2 \Delta ssk22 \Delta ste50$  der Fall ist, ist keine Hog1-Phosphorylierung mehr detektierbar (Abb. 3.8).



**Abbildung 3.8 Immunoblotanalyse zum Nachweis der Hog1-Phosphorylierung**

Hefezellen verschiedener Stammhintergründe wurden in YEPD-Medium angezogen. Je 1 OD Hefezellen wurden geerntet und je ein Aliquot der Zellen wurde mit 0,7 M NaCl für 5 min inkubiert. Zellextrakte wurden hergestellt, auf einem SDS-PAGE aufgetrennt und einer Westenblot-Analyse unterzogen. Phosphoryliertes Hog1 wurde mit einem anti-*Thr180/Tyr182*-Antikörper nachgewiesen.

Stämme: W303-1A  $\Delta$ *hog1* (HFB894), W303-1A (HF91, Wildtyp), W303-1A  $\Delta$ *ste50* (HF93), W303-1A  $\Delta$ *pde2* (HCH113), W303-1A  $\Delta$ *ssk1* (HCH92), W303-1A  $\Delta$ *ste50*  $\Delta$ *ssk1* (HCH100), W303-1A  $\Delta$ *ste50*  $\Delta$ *pde2* (HCH119), W303-1A  $\Delta$ *pde2*  $\Delta$ *ssk1* (HCH257), C2C  $\Delta$ *pde2*  $\Delta$ *ste50* (HFB833).

Die Hefestämme W303-1A  $\Delta$ *pde2* sowie W303-1A  $\Delta$ *pde2*  $\Delta$ *ste50* wiesen leichte bzw. starke Wachstumsdefekte auf Salzmedium auf. Es sollte nun untersucht werden, ob diese Defekte auf eine verminderte Signalweiterleitung und somit Hog1-Phosphorylierung zurückzuführen seien. Hierbei zeigte sich, dass sowohl im Stamm W303-1A  $\Delta$ *pde2* als auch im Hefestamm W303-1A  $\Delta$ *pde2*  $\Delta$ *ste50* eine Phosphorylierung von Hog1 detektierbar ist (Abb.3.8).

Somit scheint der Wachstumsdefekt dieser Stämme unabhängig von der Aktivierung der Hog1 MAPK zu sein.

Zusammenfassend lässt sich aussagen, dass Wechselwirkungen zwischen dem Ras/cAMP-Weg, an dem die kleinen G-Proteine Ras1 und Ras2 beteiligt sind, und den verschiedenen Ste50-MAPK-vermittelten Signalwegen bestehen. Der Ras/cAMP-Weg übt in Abhängigkeit von Ste50 einen positiven Einfluss auf die Signalweiterleitung des Pheromonwegs sowie des invasiven Wachstumsweges aus. Hingegen sind negative Einflüsse des Ras/cAMP-Signalwegs auf den hochosmolaren Antwortweg zu beobachten. Diese Wechselwirkungen des Ras/cAMP-Signalwegs und den verschiedenen MAPK-Signalwege erfolgen in Abhängigkeit von Ste50 und deuten somit auf eine mögliche Interaktion von Ste50 mit Komponenten des Ras/cAMP-Weges, wie den Proteinen Ras1 und Ras2, hin.

### **3.2 Untersuchungen zur RA-Domäne- (RAD) abhängigen Interaktion von Ste50**

Ste50 besitzt zwei funktionelle Domänen, welche die Interaktion mit anderen Proteinen vermitteln können. Die SAM-Domäne ist für die Interaktion mit der MAPKKK Ste11 notwendig. Ste50 ist fest mit Ste11 assoziiert und reguliert die Aktivität von Ste11 innerhalb der Signalwege der Paarung, des invasiven Wachstums und der Osmotoleranz. Aktiviertes Ste11 phosphoryliert dann die jeweiligen MAPKK durch Phosphorylierung. Es wird vermutet, dass die zweite Interaktionsdomäne von Ste50, die sogenannte Ras-Assoziierungs-Domäne (RAD), für die Interaktion mit kleinen G-Proteinen wichtig sein könnte. Ste50 und Ste11 sind an allen drei Signalwegen zur Induktion der Paarung, des invasiven Wachstums und der Osmotoleranz beteiligt. Es stellt sich nun die Frage, auf welche Weise die Signalintegration und Signalweiterleitung gewährleistet wird. Da Ste50 fest mit Ste11 assoziiert ist, könnte eine transiente Interaktion zwischen Ste50 und den verschiedenen G-Proteinen innerhalb der Signalwege eine Adapterrolle von Ste50 darstellen. Ste50 könnte somit als regulierendes Adapterprotein zwischen dem MAPK-Komplex und der Region der Zelle, wo die upstream Aktivatoren des Signalübertragungskomplexes lokalisiert sind, fungieren.

Es stellt sich nun die Frage, mit welchen kleinen G-Proteinen Ste50 interagieren könnte. In einer Twohybrid-Analyse konnte gezeigt werden, dass Ste50 mit dem kleinen G-Protein Cdc42 interagiert (Spode, 2004). Cdc42 ist in der Regulation einer Vielzahl morphogenetischer Prozesse während des Zellzyklus, speziell in der Entwicklung der Zellpolarität involviert (Adams *et al.*, 1990). Weiterhin ist es an den drei MAPK-Signalwegen der Paarung, des invasiven Wachstums und der Osmotoleranz beteiligt (Reiser *et al.*, 2000). Die Proteine Gic1 und Gic2 stellen Effektorproteine von Cdc42 dar. Es konnte nachgewiesen werden, dass Ste50 ebenfalls mit dem Protein Gic1 interagiert (Drees *et al.*, 2001). Im ersten Teil der Arbeit wurde gezeigt, dass Wechselwirkungen zwischen dem cAMP-Weg, an dem die kleinen G-Proteine Ras1 und Ras2 beteiligt sind und den verschiedenen MAPK-vermittelten Signalwegen bestehen. Diese Wechselwirkungen erfolgen in Abhängigkeit von Ste50 und deuten auf eine mögliche Interaktion von Ste50 mit Komponenten des Ras/cAMP-Weges hin. Die kleinen G-Proteine Ras1 und Ras2 könnten daher weitere Interaktionspartner von Ste50 darstellen.

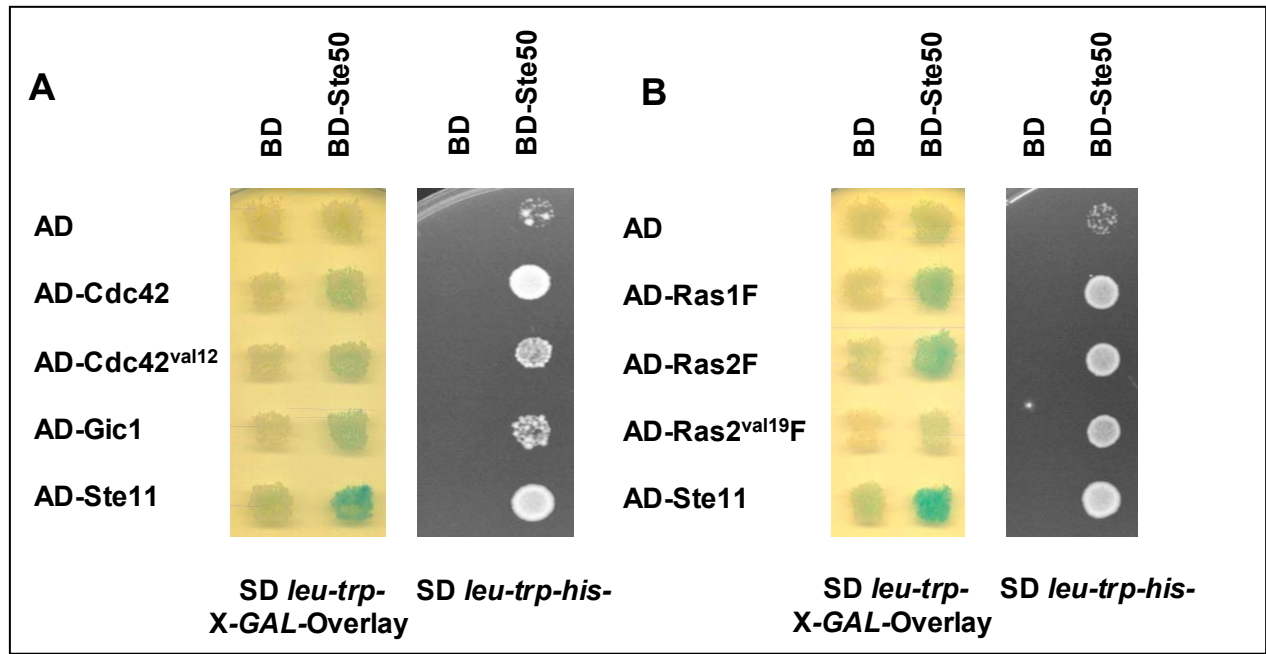
Im folgendem Versuchsteil sollen Interaktionspartner von Ste50 mittels eines Twohybrid-Testes identifiziert werden, die möglicherweise den Ste50-Ste11-Komplex mit Hilfe der RA-Domäne transient an die upstream Aktivatoren des Signalübertragungskomplexes binden. Weiterhin sollen die Interaktionen in einer Affinitäts-Aufreinigung-Studie biochemisch nachgewiesen werden.

#### **3.2.1 Identifizierung von RAD-Interaktionspartnern im twohybrid-assay**

##### **3.2.1.1 Analyse der Interaktion von Ste50 mit den G-Proteinen Cdc42, Gic1, Ras1 und Ras2**

Bevor die Art der Interaktionen näher charakterisiert werden kann, soll untersucht werden, ob eine physikalische Interaktion stattfindet. Hierfür kann das Twohybrid-System genutzt werden. Beim Twohybrid-System handelt es sich um ein genetisches System zum *in vivo* Nachweis von Protein-

Protein-Wechselwirkungen (Fields & Song, 1989). Die Intensität der Transkriptionsaktivierung dient hierbei als Maß für die Stärke der Interaktion. Dieses System ist besonders geeignet, um schwache oder vorübergehende Wechselwirkungen nachzuweisen (Guarente, 1993). Das Twohybridsystem wurde nun verwendet, um zu testen, ob Ste50 mit den kleinen G-Proteinen Cdc42, Ras1, Ras2 sowie interagiert (Abb. 3.9).



**Abbildung 3.9** Untersuchung der Interaktion von Ste50 mit Cdc42, Gic1, Ras1, Ras2 und Ste11 mittels Twohybrid-Analyse

Der Hefestamm PJ187 wurde mit den angegebenen Plasmiden transformiert. Für den X-Gal-Overlay-Test wurden die Transformanten über Nacht auf SD *leu- trp-* Medium ausgestrichen. Die Platten wurden auf den entsprechenden Selektivplatten replikaplattiert und einer Overlay-Analyse unterzogen. Für die Dokumentation des Wachstums auf SD *leu- trp- his-* Platten wurden die Transformanten über Nacht in 5 ml SD *leu- trp-* Medium logarithmisch angezogen und je 0,4 OD<sub>600nm</sub> Zellen wurden geerntet. Die Zellen wurden in 500 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen und je 5 µl Zellen wurden auf SD *leu- trp- his-* Platten mit 6 mM 3' Aminotriazol aufgetropft. Nach Inkubation der Platten für 2 Tage bei 30°C wurde das Wachstum auf SD *leu- trp- his-* Platten dokumentiert. Als Negativkontrolle dienten die Transformationen mit den Plasmiden pAD2 bzw. pMBD. Als Positivkontrolle wurde der Nachweis der Interaktion zwischen Ste50 und Ste11 verwendet. Stamm: PJ187 (HLS196), Plasmide: pAD2 (EWK66), pAD-*CDC42* (EFB68), pAD-*CDC42*<sup>val12</sup> (EFB67), pAD-*GIC1* (ELS589), pAD-*RAS1F* (ECH163), pAD-*RAS2F* (ECH167), pAD-*RAS2*<sup>val19</sup> (ECH157), pAD-*STE11* (ELS243), pMBD (EWK67), pMBD-*STE50* (EGX303).

Für den Twohybrid-Test wurden in dem Stamm PJ187 ein an die Gal4-Aktivierungsdomäne fusioniertes Protein und ein an die Gal4-Bindedomäne fusioniertes Protein koexprimiert. Der Hefestamm PJ187 enthält die Reportergene *lacZ*, *HIS3* und *ADE2*. Bei einer Interaktion der Proteine im Kern werden diese Reportergene induziert. Die Stärke der β-Galaktosidase-Bildung und das Wachstum auf Histidin- bzw. Adenin- freiem Medium wurden als Maß für die Stärke der Interaktion verwendet. Auf Adenin freiem Medium lassen sich nur starke Interaktionen nachweisen, wohingegen sich auf Histidin freiem Medium auch schwache Interaktionen identifizieren lassen. Das auf Histidin freiem Medium auftretende Hintergrundwachstum wurde durch Zugabe von 6 mM 3' Aminotriazol reprimiert.



Als Negativkontrolle wurde die Interaktion zwischen dem Aktivierungsdomänen-Leerplasmid (AD) mit dem jeweiligen Bindedomänen-Fusionsplasmid, bzw. den Aktivierungsdomänen-Fusionsplasmiden mit dem Bindedomänen-Leerplasmid verwendet (Abb. 3.9). Diese Negativkontrollen zeigen wie erwartet weder eine Blaufärbung im Überschichtungstest, noch Wachstum auf Histidin bzw. Adenin freiem Medium (Daten nicht gezeigt). Als Positivkontrolle dient die Interaktion zwischen Ste50 und Ste11, bei der eine starke Blaufärbung und Wachstum auf Histidin und Adenin freiem Medium auftritt (Abb. 3.9). Weiterhin wurde untersucht, ob Ste50 mit den Proteinen, Cdc42, Gic1, Ras1 sowie Ras2 interagiert. Hierbei zeigt sich, dass eine schwache Interaktion zwischen Ste50 und Cdc42 bzw. Cdc42<sup>val12</sup> detektierbar ist, betrachtet man die schwache Blaufärbung und das leichte Wachstum auf Histidin freiem Medium. Die Zellen sind hingegen nicht in der Lage auf Adenin freiem Medium zu wachsen (Daten nicht gezeigt). Vergleicht man die Interaktion von Ste50 mit Cdc42 oder mit dem konstitutiv aktiven Protein Cdc42<sup>val12</sup> (Cdc42-GTP-Form), so erkennt man keine Unterschiede. Des Weiteren ist zwischen Gic1 und Ste50 eine schwache Interaktion detektierbar, an einer hellen Blaufärbung und Wachstum auf Histidin freien Medium erkennbar (Abb. 3.9).

Ras1 und Ras2 sind durch die Farnesylierung ihrer C-terminalen CAAX-Box an der Zellmembran verankert (Dong *et al.*, 2003). Um dennoch eine Twohybrid-Analyse durchführen zu können, wurde die CAAX-Box verändert. Bei Ras1 wurde das Cystein an Position 308 zu einem Lysin verändert und bei Ras2 das Cystein an Position 319 zu einem Serin verändert. Somit wird die Farnesylierung der Proteine verhindert und diese können nicht mehr an der Membran verankert werden (Dong *et al.*, 2003). Es zeigt sich, dass Ste50 eine schwache Interaktion mit den Proteinen Ras1F (Ras1 ohne Farnesylierung) und Ras2F (Ras2 ohne Farnesylierung, Abb. 3.9) aufweist. Man beobachtet eine schwache Blaufärbung und schwaches Wachstum auf Medium ohne Histidin. Interessanterweise zeigt die konstitutiv aktive (Ras2-GTP) Form von Ras2, Ras2<sup>val19F</sup> eine schwächere Interaktion mit Ste50, verglichen mit dem Ras2-Wildtyp. Man beobachtet fast keine Blaufärbung und ein schwaches Wachstum auf Medium ohne Histidin (Abb. 3.9).

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse der Twohybridanalyse darauf hin, dass Ste50 mit den für die Zellpolarisation benötigten Proteinen Cdc42 und Gic1 sowie den Proteinen Ras1 und Ras2, welche eine wichtige Rolle für den cAMP- Signalweg spielen, interagiert.

### 3.2.1.2 Analyse der Interaktion von Ste50-RAD-Mutanten mit den G-Proteinen

Es wird vermutet, dass die RA-Domäne von Ste50 die Interaktion mit den G-Proteinen vermittelt. Mittels PCR-Random-Mutagenese konnten Mutanten in der RA-Domäne hergestellt werden, die nicht mehr in der Lage waren, auf Salzmedium zu wachsen (Sussmann, Spode und Ramezani-Rad, nicht veröffentlichte Daten). Um zu testen, ob diese RA-Mutanten Ste50-P318L, Ste50-R296G N301S und Ste50-L322S mit den G-Proteinen Cdc42<sup>val12</sup>, Ras1F und Ras2<sup>val19F</sup> sowie dem Protein Gic1 interagieren, wurde eine Twohybridanalyse durchgeführt (Abb. 3.10).



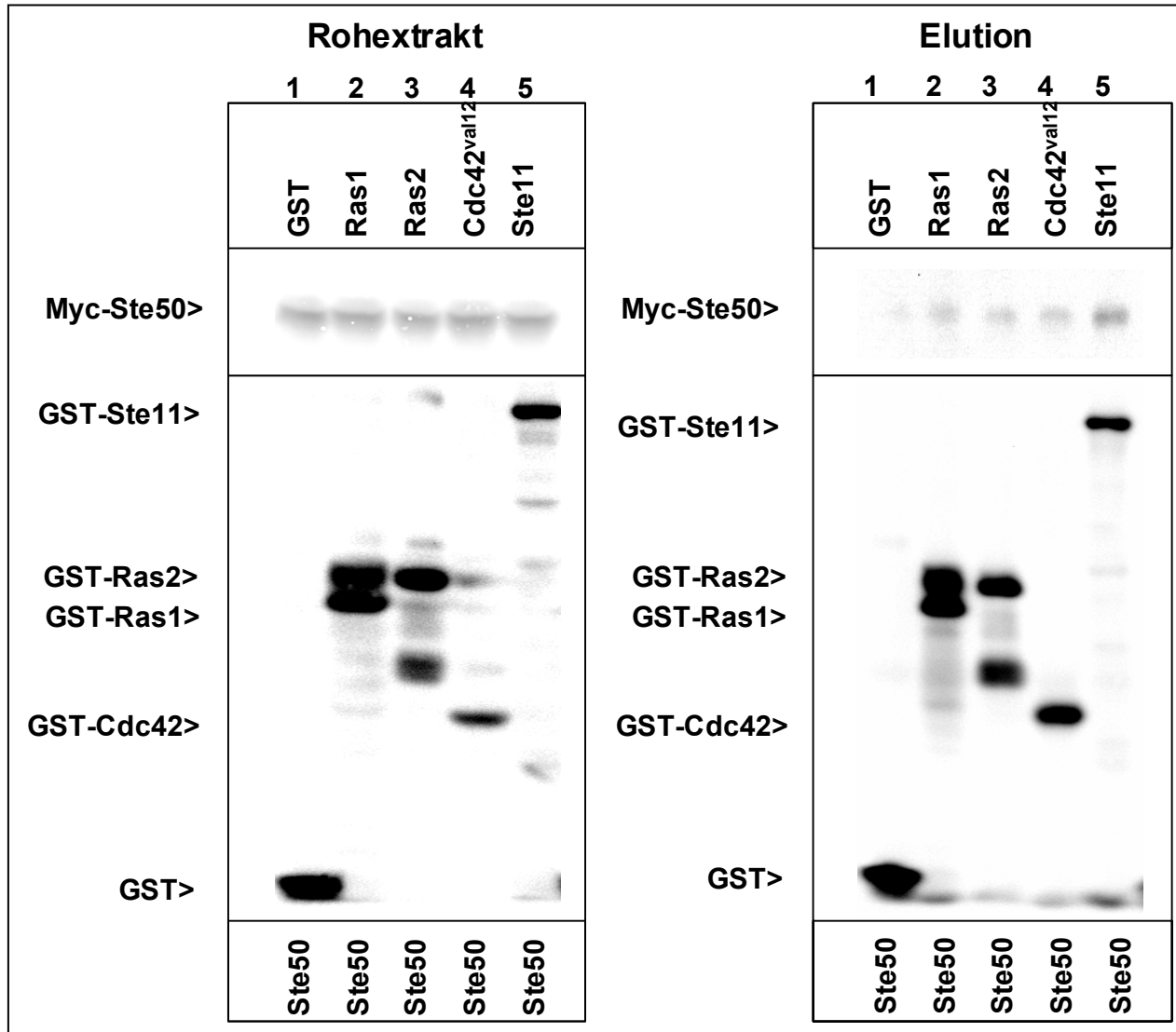
Zusammenfassend lässt sich aussagen, dass die G-Proteine Gic1, Ras1, Ras2 und Cdc42 eine schwache Interaktion mit Ste50 im Twohybrid-Test zeigen. Mutanten in der RA-Domäne von Ste50 zeigen hingegen keine Interaktion mit Gic1, Ras1F und Ras2<sup>val19</sup>F. Die Ste50-R296G N301S-Mutante sowie die Ste50-L322S-Mutante zeigen eine leichte Interaktion mit Cdc42<sup>val12</sup>, welches mittels des lacZ-Reportergens detektierbar ist. Da Ras-Proteine keine Interaktion zu den RA-Mutanten zeigten, ist zu vermuten, dass es sich bei der RA-Domäne um die Domäne handelt, die die Interaktion zwischen Ste50 und den G-Proteinen vermittelt.

### **3.2.2 Identifizierung von RAD-Interaktionspartnern im Pulldown-Assay**

Die RA-Domäne von Ste50 ist essentiell für dessen Funktion in allen drei MAPK-vermittelten Signalwegen (Ramezani Rad, 2003) und könnte die Interaktion zu kleinen G-Proteinen vermitteln. Mittels der Twohybrid-Analyse konnte gezeigt werden, dass Ste50 schwach mit den kleinen G-Proteinen Ras1, Ras2, Gic1 und Cdc42 interagiert. Es ist wahrscheinlich, dass Ste50 zur Formierung eines Komplexes mit den Rezeptor-bindenden G-Proteinen induziert wird und sich an die G-Proteine transient bindet. Deshalb ist es nicht leicht, diese Interaktion zu detektieren. Um diese Bindungsstudien unter verschiedenen Bedingungen zu ermöglichen, wurde ein Aufreinigungstest (Pulldown-Analyse) optimiert. Im folgenden Teil der Arbeit sollten mit Hilfe dieser Pulldown-Analyse die Interaktionen von Ste50 mit den G-Proteinen Ras1, Ras2 und Cdc42<sup>val12</sup> biochemisch detektiert werden. Es sollte hierbei nachgewiesen werden, dass es sich bei der RA-Domäne um die Region handelt, die die Interaktionen mit den G-Proteinen vermittelt. Weiterhin sollte der Einfluss der Einleitung der Signalwege auf Ste50-Interaktionen untersucht werden.

#### **3.2.2.1 Analyse der Interaktion von Ste50 mit den G-Proteinen Cdc42, Ras1 und Ras2**

Um die Interaktionen von Ste50 mit den G-Proteinen Ras1, Ras2 und Cdc42 biochemisch zu bestätigen, wurde eine Pulldown-Analyse durchgeführt. Hierfür wurde der Hefestamm W303-1A verwendet, der mit verschiedenen GST- bzw. Myc-Fusionsproteinen unter Kontrolle des *GAL*-Promotors transformiert wurde. Die Transformanden wurden angezogen und Zellextrakte wurden hergestellt. Zunächst wurden die GST-Fusionsproteine an die Glutathion-Sepharose gebunden. Der zweite Zellextrakt, der Myc-Fusionsproteine enthielt, wurde hinzugegeben. Nach verschiedenen Waschschritten wurden die spezifisch-gebundenen Proteine aus der Sepharose eluiert und einer Westernblotanalyse unterzogen. In der Elutionsfraktion sollten nur die Myc-Fusionsproteine detektierbar sein, die spezifisch an die GST-Fusionsproteine binden konnten (Abb. 3.11).



**Abbildung 3.11** Interaktion von Myc-Ste50 mit Ras1, Ras2 und Cdc42<sup>val12</sup>. Coaufreinigung (Pull-down) von Myc-Ste50 mit den GST-Fusionsproteinen Ras1, Ras2 und Cdc42<sup>val12</sup> (rechts).

Immunoblotanalyse von affinitätsaufgereinigten GST-Fusionsproteinen (unten) und assoziiertem Myc-Fusionsprotein (oben).

Hefezellen des Hefestammes W303-1A (HF91) mit Plasmiden unter Kontrolle des *GAL*-Promotors wurden in Medium mit 3% Raffinose und 1% Galaktose induziert. Die Gesamtzellextrakte wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und durch Westernblotexperimente analysiert. Es wurden anti-Myc-Antikörper (oben) bzw. anti-GST-Antikörper (unten) zur Detektion der Proteinexpression verwendet.

Stamm: W303-1A (HF91); Plasmide: pRS416-*GALp*-GST (ELS202), pGREG546-*RAS1* (ESK21), pGREG546-*RAS2* (ECH121), pRS416-*GALp*-GST-*CDC42*<sup>val12</sup> (ELS372), pRS416-*GALp*-GST-*STE11* (ELS256), pRS416-*GALp*-Myc-*STE50* (ELS164).

Die Detektion der Expression der Rohextrakte zeigt, dass gleiche Proteinmengen eingesetzt wurden (Abb. 3.11, linke Seite). Die GST-Fusionsproteine konnten erfolgreich an die Glutathion-Sepharose gebunden werden, nachgewiesen mit einem Antikörper, der spezifisch gegen GST gerichtet ist (Abb. 3.11, rechte Seite, unten). Die Elution wurde weiterhin mit einem anti-Myc-Antikörper entwickelt, um die getesteten Interaktionen detektieren zu können. Als Negativkontrolle wurde, wie auch in allen nachfolgenden Studien, die Interaktion zwischen dem GST-Protein und Myc-Ste50 verwendet. Man kann sehen, dass bei der Negativkontrolle wie erwartet keine Interaktion zu erkennen ist (Abb. 3.11). Als Positivkontrolle wurde die bekannte Interaktion zwischen Ste50 und Ste11 verwendet. Man kann

eine deutliche Interaktion dieser Proteine erkennen. Weiterhin ist eine schwache Interaktion zwischen Ste50 und den G-Proteinen Ras1, Ras2 und Cdc42<sup>val12</sup> detektierbar (Abb. 3.11).

Die Interaktion zwischen Ste50 und den kleinen G-Proteinen Ras1, Ras2 sowie Cdc42 lässt sich somit auch biochemisch bestätigen.

### **3.2.2.2 Analyse der Interaktion von Ste50-RAD-Region mit den G-Proteinen**

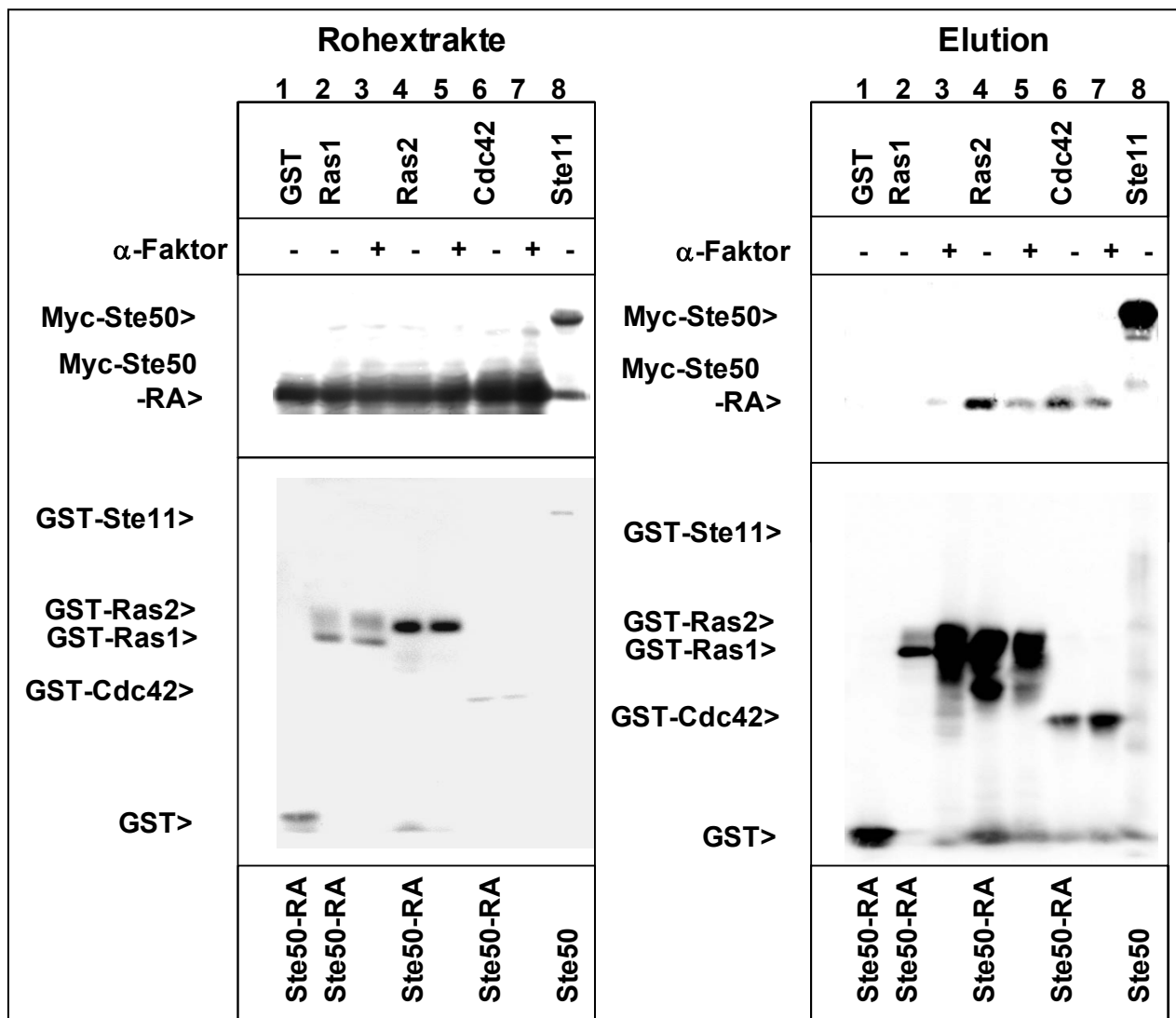
In der Twohybrid-Analyse zeigten Mutanten in der RA-Domäne von Ste50 eine veränderte Interaktion mit den G-Proteinen. Es soll nun biochemisch nachgewiesen werden, dass es sich bei der RA-Domäne um die Region handelt, die die Interaktionen mit den G-Proteinen vermittelt. Weiterhin soll der Einfluss der Einleitung der Signalwege auf Ste50-Interaktionen untersucht werden. Frühere Ergebnisse deuteten darauf hin, dass Ras1 eine wichtige Rolle für den Pheromonweg spielt (Kluge und Ramezani Rad, nicht veröffentlichte Daten). Die Proteine Ras2 sowie Ras1 sind weiterhin für die Einleitung des invasiven Wachstumswegs bedeutend (Mösch *et al.*, 1999). Für Cdc42 konnte gezeigt werden, dass es sowohl im Pheromonweg, im invasiven Wachstumsweg als auch im hochosmolaren Antwortweg involviert ist (Simon *et al.*, 1995; Reiser *et al.*, 2000). Es stellte sich nun die Frage, ob Ste50 als Adapterprotein mit den verschiedenen G-Proteinen innerhalb der verschiedenen Signalwege interagiert und ob diese Interaktion nach Induktion durch verschiedene Stimulatoren ( $\alpha$ -Faktor, cAMP, SLAG-Medium) beeinflusst werden kann.

#### **3.2.2.2.1 Analyse der Interaktion der Ste50-RAD-Region in pheromonbehandelten Zellen**

Zunächst sollte untersucht werden, ob die Interaktion zwischen Ste50 und den G-Proteinen Ras1, Ras2 und Cdc42 über die RA-Domäne erfolgt. Hierfür wurde zunächst die Interaktion von Ste50-RAD mit den G-Proteinen Ras1, Ras2 und Cdc42 in pheromonbehandelten Zellen analysiert. Zur Einleitung des Pheromonantwortweges wurden die Zellen für 90 min mit 5  $\mu$ M  $\alpha$ -Faktor induziert. Unbehandelte und mit Pheromon behandelte Proben wurden einer Pulldown-Analyse unterzogen.

Hierbei zeigt sich, dass die G-Proteine Ras1, Ras2 und Cdc42<sup>val12</sup> mit der RA-Domäne von Ste50 interagieren (Abb. 3.12). Ras1 zeigt unter Normalbedingungen nur eine sehr schwache Wechselwirkung mit Ste50-RAD. Nach Zugabe von Pheromon kann diese Interaktion verstärkt werden. Hingegen zeigen Ras2 und Cdc42<sup>val12</sup> eine Interaktion mit Ste50-RAD, welche unabhängig vom Pheromon ist. Nach Pheromonzugabe wird die Interaktion sogar leicht abgeschwächt (Abb. 3.12).

Es konnte also gezeigt werden, dass die Interaktion von Ste50 mit den G-Proteinen Ras1, Ras2 und Cdc42 über die RA-Domäne erfolgt. Bei Ras1 kann erst durch die Behandlung der Zellen mit Pheromon eine detektierbare Interaktion mit der RA-Domäne von Ste50 beobachtet werden.



**Abbildung 3.12** Interaktion von Myc-Ste50-RAD mit Ras1, Ras2 und Cdc42<sup>val12</sup>. Coaufreinigung (Pull-down) von Myc-Ste50-RAD mit den GST-Fusionsproteinen Ras1, Ras2 und Cdc42<sup>val12</sup> in  $\alpha$ -Faktor behandelten Zellen (rechts).

Immunoblotanalyse von affinitätsaufgereinigten GST- Fusionsproteinen (unten) und assoziiertem Myc-Fusionsprotein (oben).

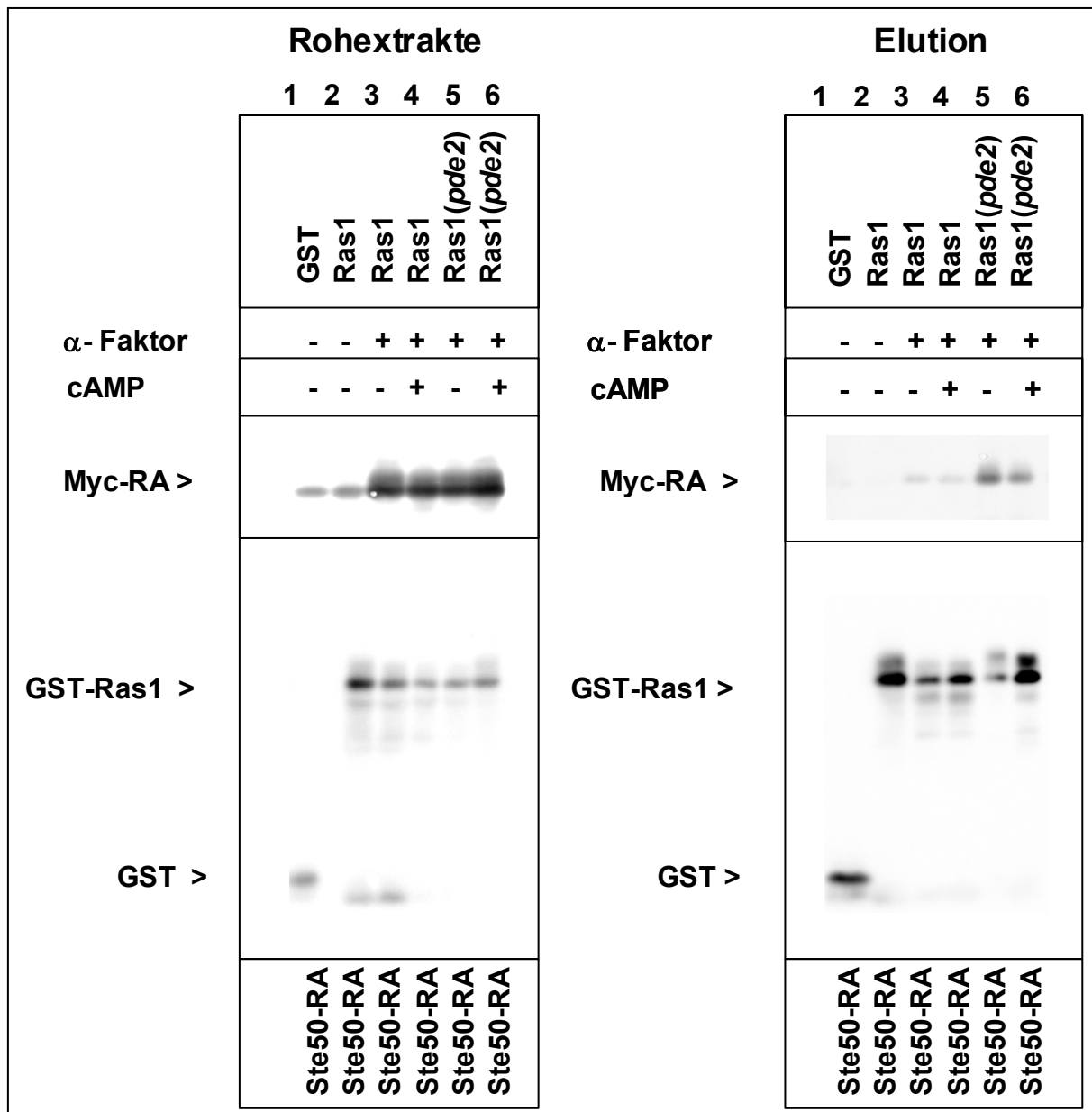
Hefezellen des Hefestammes W303-1A mit Plasmiden unter Kontrolle des *GAL*-Promotors wurden in Medium mit 3% Raffinose und 1% Galaktose induziert. Es wurden unbehandelte Zellen und Zellen, die 90min mit 5  $\mu$ M  $\alpha$ -Faktor induziert wurden, geerntet. Die Gesamtzellextrakte wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und einer Westernblotanalyse unterzogen. Es wurden anti-Myc-Antikörper (oben) bzw. anti-GST-Antikörper (unten) zur Detektion der Proteinexpression verwendet.

Stamm: W303-1A (HF91); Plasmide: pRS416-*GALp*-GST (ELS202), pGREG546-*RAS1* (ESK21), pGREG546-*RAS2* (ECH121), pRS416-*GALp*-GST-*CDC42*<sup>val12</sup> (ELS372), pRS416-*GALp*-GST-*STE11* (ELS256), pRS416-*GALp*-Myc-*STE50* (ELS164), pRS416-*GALp*-Myc-*STE50-RA* (ELS500).

### 3.2.2.2.2 Auswirkung einer Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels auf Ste50-RAD-Interaktionen in pheromonbehandelten Zellen

Die Proteine Ras1 und Ras2 nehmen eine wichtige Rolle in dem cAMP-Weg ein, indem sie in ihrer aktivierten Form (Ras-GTP) an die Adenylatzyklase Cyr1 binden und somit die cAMP-Synthese kontrollieren. Daher ist es von Interesse zu untersuchen, ob eine Erhöhung des intrazellulären cAMP-

Spiegels einen Einfluss auf die Interaktion von Ste50-RAD mit den G-Proteinen Ras1 bzw. Ras2 ausübt. Hier wird im speziellen der Einfluss einer Erhöhung des cAMP-Spiegels auf die Interaktion von Ste50-RAD mit Ras1 in pheromonbehandelten Zellen untersucht (Abb. 3.13).



**Abbildung 3.13 Interaktion von Myc-Ste50-RAD mit Ras1. Coaufreinigung von Myc-Ste50-RAD mit GST-Ras1 von cAMP behandelten Zellen (rechts).**

Immunoblotanalyse von affinitätsaufgereinigten GST-Fusionsproteinen (unten) und assoziiertem Myc-Fusionsprotein (oben).

Hefezellen mit Plasmiden unter Kontrolle des *GAL*-Promotors wurden in Medium mit 3% Raffinose und 1% Galaktose induziert. Als Stammhintergründe wurde der Wildtypstamm W303-1A (HF91) bzw. der Stamm HCH 113 ( $\Delta pde2$ ) verwendet. Es wurden unbehandelte Zellen und Zellen, die 90min mit 5  $\mu$ M  $\alpha$ -Faktor bzw. mit 2 mM cAMP behandelt wurden, geerntet. Die Gesamtzellextrakte wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und einer Westernblotanalyse unterzogen. Es wurden anti-Myc-Antikörper (oben) bzw. anti-GST-Antikörper (unten) zur Detektion der Proteinexpression verwendet.

Stämme: W303-1A (HF91), W303-1A  $\Delta pde2$  (HCH 113); Plasmide: pRS416-*GALp*GST (ELS202), pGREG546-*RAS1* (ESK21), pRS416-*GALp*-Myc-*STE50-RA* (ELS500).

Der cAMP-Spiegel in der Zelle lässt sich zum einen durch Zugabe von 2 mM cAMP erhöhen. Zum anderen kann man die Phosphodiesterase *PDE2* deletieren, die für die Hydrolyse von cAMP in der Zelle verantwortlich sind. Für das nachfolgende Experiment wurde der Wildtypstamm W303-1A, sowie der Stamm HCH113, der eine *PDE2*-Deletion trägt, verwendet. Es wurden unbehandelte Proben und Proben, die mit  $\alpha$ -Faktor oder mit  $\alpha$ -Faktor und 2mM cAMP behandelt wurden, geerntet und einer Pulldown-Analyse unterzogen (Abb. 3.13).

In pheromonbehandelten Zellen des Wildtypstamms interagiert Ste50-RAD mit Ras1 nur schwach (Abb. 3.12 und 3.13). Diese Interaktion lässt sich durch Zusatz von 2 mM cAMP nicht weiter verstärken. Betrachtet man hingegen die Interaktion von Ste50-RAD mit Ras1 in pheromonbehandelten Zellen eines  $\Delta pde2$ -Hefestammes, ist eine stärkere Interaktion der Proteine zu detektieren. Eine zusätzliche Zugabe von 2 mM cAMP führt zu keiner weiteren Verstärkung der Interaktion (Abb. 3.13).

Diese Daten weisen darauf hin, dass eine Deletion der Phosphodiesterase *PDE2* zu einer verstärkten Interaktion von Ste50-RAD mit Ras1 in pheromonbehandelten Zellen führt.

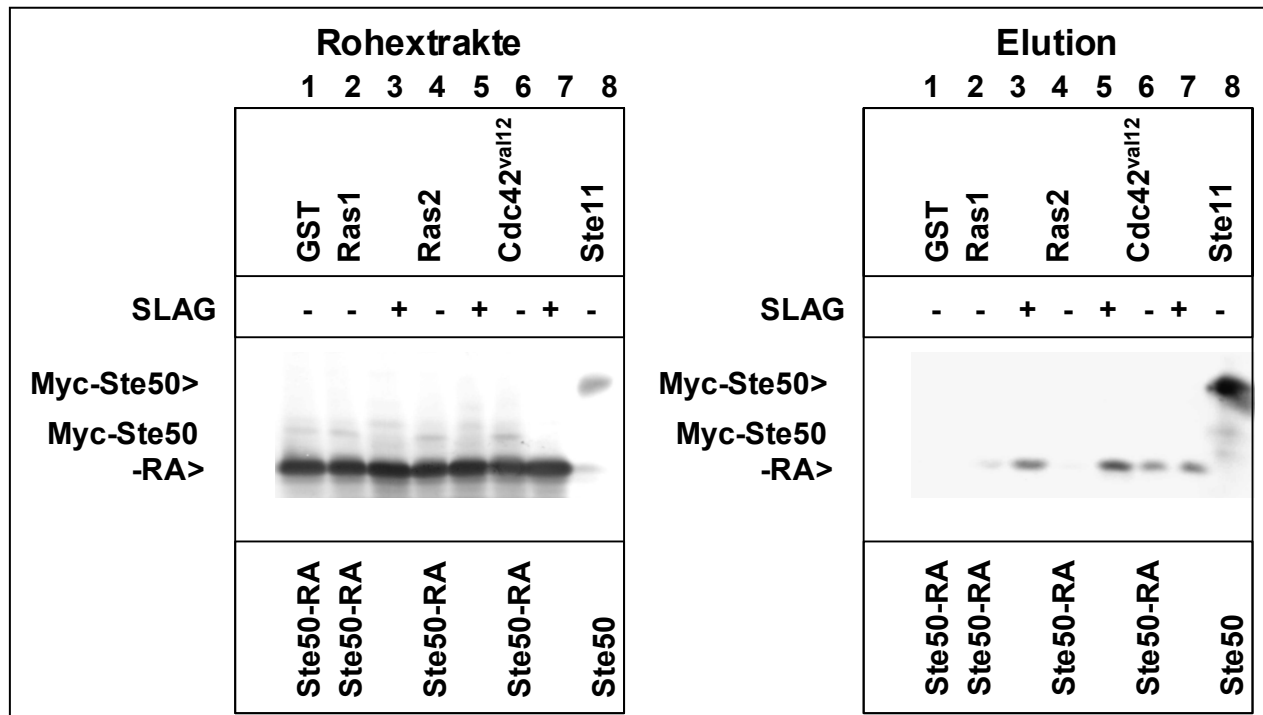
### 3.2.2.2.3 Analyse der Interaktion von Ste50-RAD unter Stickstoffmangelbedingungen

Der Ras/cAMP- Signalweg, an dem die Proteine Ras1 sowie Ras2 beteiligt sind, nimmt eine zentrale Rolle für das invasive Wachstum ein. Daher sollen nun die Interaktionen von Ste50-RAD mit den G-Proteinen Ras1, Ras2 und Cdc42 nach Induktion des invasiven Wachstumswegs, hervorgerufen durch Inkubation der Zellen in Stickstoffmangelmedium (SLAG), analysiert werden. Hierfür wurden die Zellen in Normalmedium bzw. 12 h in SLAG-Medium angezogen. Unbehandelte Proben und behandelte Proben wurden für die Pulldown-Analyse eingesetzt (Abb. 3.14).

Hierbei zeigt sich, dass Ras1 sowie Ras2 verstärkt mit Ste50-RAD nach Einleitung des invasiven Wachstumsweges interagieren (Abb. 3.14). Dies entspricht auch den Erwartungen, da beide Proteine eine zentrale Rolle in dem invasiven Weg einnehmen. Sie beeinflussen die Signaltransduktion sowohl über den MAPK-vermittelten Weg, als auch über den cAMP-vermittelten, Proteinkinase A (PKA) abhängigen Signalweg. Cdc42<sup>val12</sup> zeigt hingegen eine gleich bleibende Interaktion mit Ste50-RAD, unabhängig vom invasiven Weg.

Die Ergebnisse zeigen, dass sich die Interaktion von Ste50-RAD mit Ras1 und Ras2 durch Induktion des invasiven Signalweges verstärken lässt.





**Abbildung 3.14 Interaktionsstudie von Myc-Ste50-RAD mit Ras1, Ras2 und Cdc42<sup>val12</sup>. Coaufreinigung von Myc-Ste50-RAD mit den GST-Fusionsproteinen Ras1, Ras2 und Cdc42<sup>val12</sup> in SLAG-behandelten Zellen (rechts).**

Immunoblotanalyse von affinitätsaufgereinigten GST-Fusionsproteinen und assoziiertem Myc-Fusionsprotein. Hefezellen des Hefestammes W303-1A (HF91) mit Plasmiden unter Kontrolle des Gal-Promotors wurden in Medium mit 3% Raffinose und 1% Galaktose induziert. Es wurden unbehandelte Zellen und Zellen, die 12 h in SLAG-Medium inkubiert wurden, geerntet. Die Gesamtzellextrakte wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und einer Westernblotanalyse unterzogen. Es wurden anti-Myc-Antikörper zur Detektion der Proteinexpression verwendet.

Stamm: W303-1A (HF91); Plasmide: pRS416-GALp-GST (ELS202), pGREG546-RAS1 (ESK21), pGREG546-RAS2 (ECH121), pRS416-GALp-GST-CDC42<sup>val12</sup> (ELS372), pRS416-GALp-GST-STE11 (ELS256), pRS416-GALp-Myc-STE50 (ELS164), pRS416-GALp-Myc-STE50-RA (ELS500).

Zusammenfassend kann ausgesagt werden, dass die G-Proteine Ras1 und Ras2 über die RA-Region mit Ste50 interagieren. Diese Interaktion ist verglichen mit der stabilen Interaktion der Ste50-SAM-Domäne mit der MAPKKK Ste11 sehr schwach. Die Ergebnisse liefern den ersten Hinweis darauf, dass Ste50 mit den G-Proteinen Ras1 und Ras2 interagiert und diese Interaktionen durch Einleitung der verschiedenen Signalwege verändert werden kann. In pheromonbehandelten Zellen zeigt Ste50-RAD die stärkste Wechselwirkung mit Ras1. Diese Wechselwirkung kann durch Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels verstärkt werden. Im invasiven Weg wird die Interaktion von Ste50-RAD mit Ras1 sowie Ras2 verstärkt. Weiterhin zeigen die Daten, dass eine schwache Interaktion der Ste50-RAD mit Cdc42<sup>val12</sup> (Cdc42-GTP) stattfindet, welche nach der Stimulierung der Signalwege für die Paarung und der Pseudohyphenbildung unverändert bleibt.

### 3.3 Untersuchung der Verteilung von Ste50 während der Signaltransduktion

Ste50 und Ste11 sind in den Signaltransduktionswegen für die Paarung, für das filamentöse Wachstum und für die Osmotoleranz involviert. Ste50 besitzt hierbei regulierende Adapterfunktionen. Es interagiert mit der MAPKKK Ste11 stabil über die N-terminale SAM-Domäne und reguliert somit deren Aktivität. Im vorherigen Ergebnisteilen konnte gezeigt werden, dass Ste50 ebenfalls an die kleinen G-Proteine Ras1, Ras2 und Cdc42 mittels der C-terminalen RA-Domäne bindet und somit ein regulierendes Adapterprotein darstellt, das Ste11 mit dem G-Protein-Signalübertragungskomplex an der Plasmamembran verbindet. Eine induzierte und transiente Interaktion mit den G-Proteinen in den verschiedenen Signalwegen, die nicht leicht zu beobachten ist, könnte auf eine differenzierte Verteilung bzw. Lokalisation hinweisen und somit die Signalintegration und Signalweiterleitung gewährleisten. Daher soll in diesem Versuchsteil die Verteilung von Ste50 während der Signaltransduktion untersucht werden.

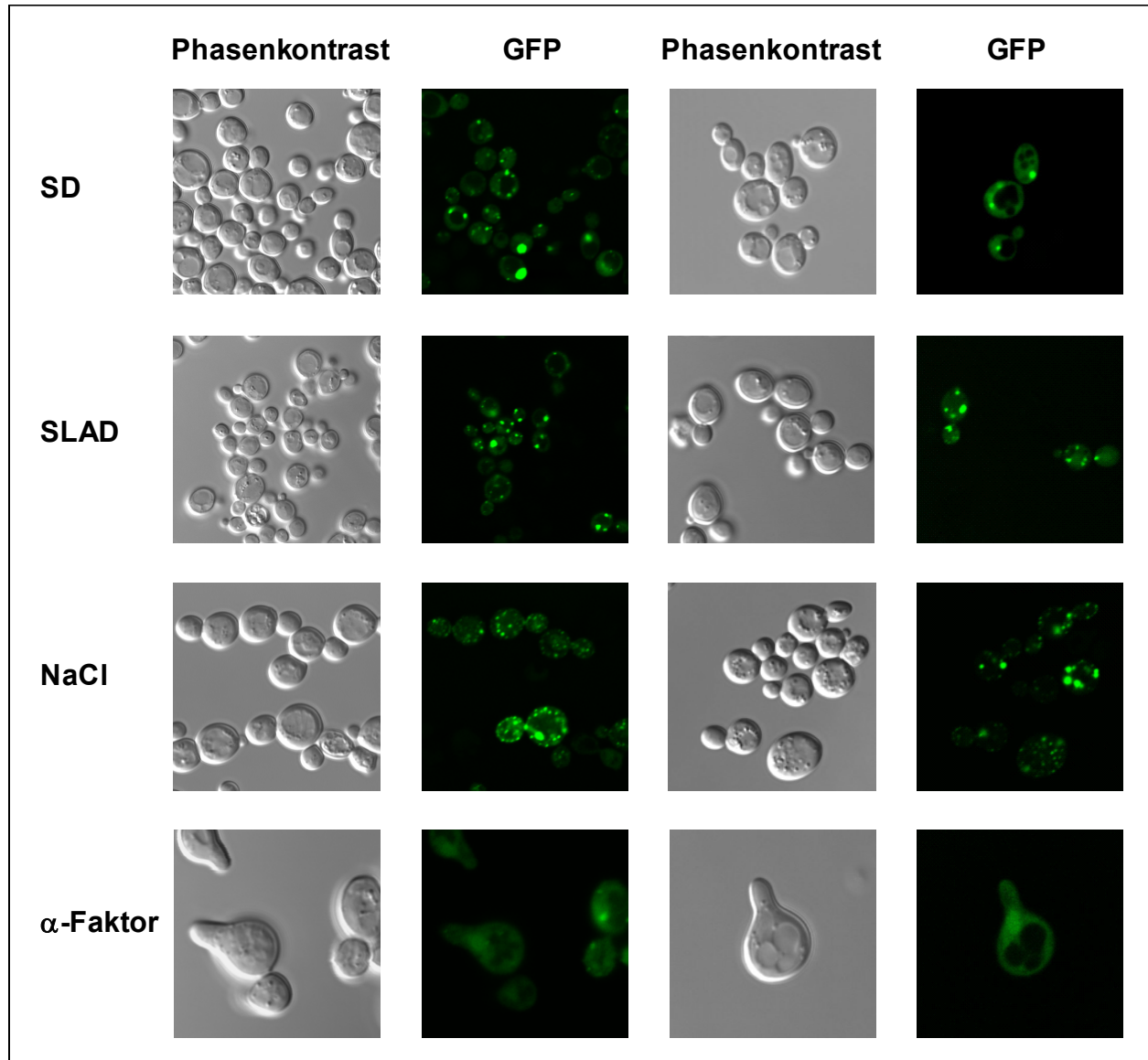
#### 3.3.1 Verteilung von GFP-Ste50 unter Überexpressionsbedingungen

Um Aufschluss über die Lokalisation von Ste50 und Ste11 in der Zelle zu erhalten, sollte zunächst die *in vivo* Lokalisation von Ste50 und Ste11 untersucht werden. Hierfür eignet sich die Verwendung von Fusionsplasmiden von Ste50 bzw. Ste11 mit dem grünen fluoreszierenden Protein GFP (Chalfie *et al.*, 1994). GFP zeigt bei einer Bestrahlung mit Licht von einer Wellenlänge von 395 nm eine Eigenfluoreszenz im grünen Bereich, die mikroskopisch detektiert werden kann. Der Vorteil der Verwendung von GFP besteht darin, dass Zellen, die dieses Protein exprimieren, im Lebendzustand, ohne vorherige Fixierung, beobachtet werden können.

Zunächst wurde die Verteilung von GFP-Ste50 mittels direkter Immunofluoreszenz ermittelt. Da die Expression von GFP-Ste50 unter Kontrolle des Eigenpromotors zu niedrig war, um eine *in vivo* Lokalisation zu beobachten, wurde die Lokalisation des Proteins unter Überexpressionsbedingungen ermittelt. Der Hefestamm W303-1A wurde mit dem Plasmid pRS424-METp-GFP-Ste50 transformiert, welches unter der Kontrolle des schwachen, regulierbaren MET25-Promotors steht. Der Hefestamm wurden logarithmisch angezogen und zur Induktion der Signalwege der Paarung, des invasiven Wachstums, bzw. der Osmotoleranz, für 90 min mit 5  $\mu$ M  $\alpha$ -Faktor, 12 h in SLAD-Medium, bzw. 5 min mit 0,7 M NaCl inkubiert (Abb. 3.15).

Hierbei zeigt sich, dass sich die Verteilung von GFP-Ste50 während der Signalinduktion verändert (Abb. 3.15). Unter Standardbedingungen (SD) ist GFP-Ste50 in cytosolischen, granulären Strukturen angereichert (Abb. 3.15). Die Inkubation der Zellen in SLAD-Medium zur Induktion des invasiven Wachstumsweges führt zu einer Akkumulation der granulären Strukturen (Abb. 3.15). Nach Induktion des hochosmolaren Antwortweges durch Salzzugabe, verstärken sich die granulären Strukturen und die Anzahl dieser Strukturen erhöht sich (Abb. 3.15). Diese Ergebnisse werden durch Beobachtungen von anderen Arbeitsgruppen unterstützt (Posas *et al.*, 1998). Nach Pheromonzugabe kann man

erkennen, dass die punktuieren Strukturen, die unter Standardbedingungen beobachtet werden konnten, verschwinden (Abb. 3.15). Stattdessen ist eine diffuse cytoplasmatische Färbung zu beobachten. Weiterhin ist eine Akkumulation von GFP-Ste50 in Richtung der sich ausbildenden Paarungsprojektionen (Shmoo) zu detektieren. Je größer die Paarungsprojektionen ausgebildet sind, d.h. je weiter die Signalweiterleitung des Pheromonantwortwegs fortgeschritten ist, desto verstärkter tritt dieses Phänomen auf (Abb. 3.15).



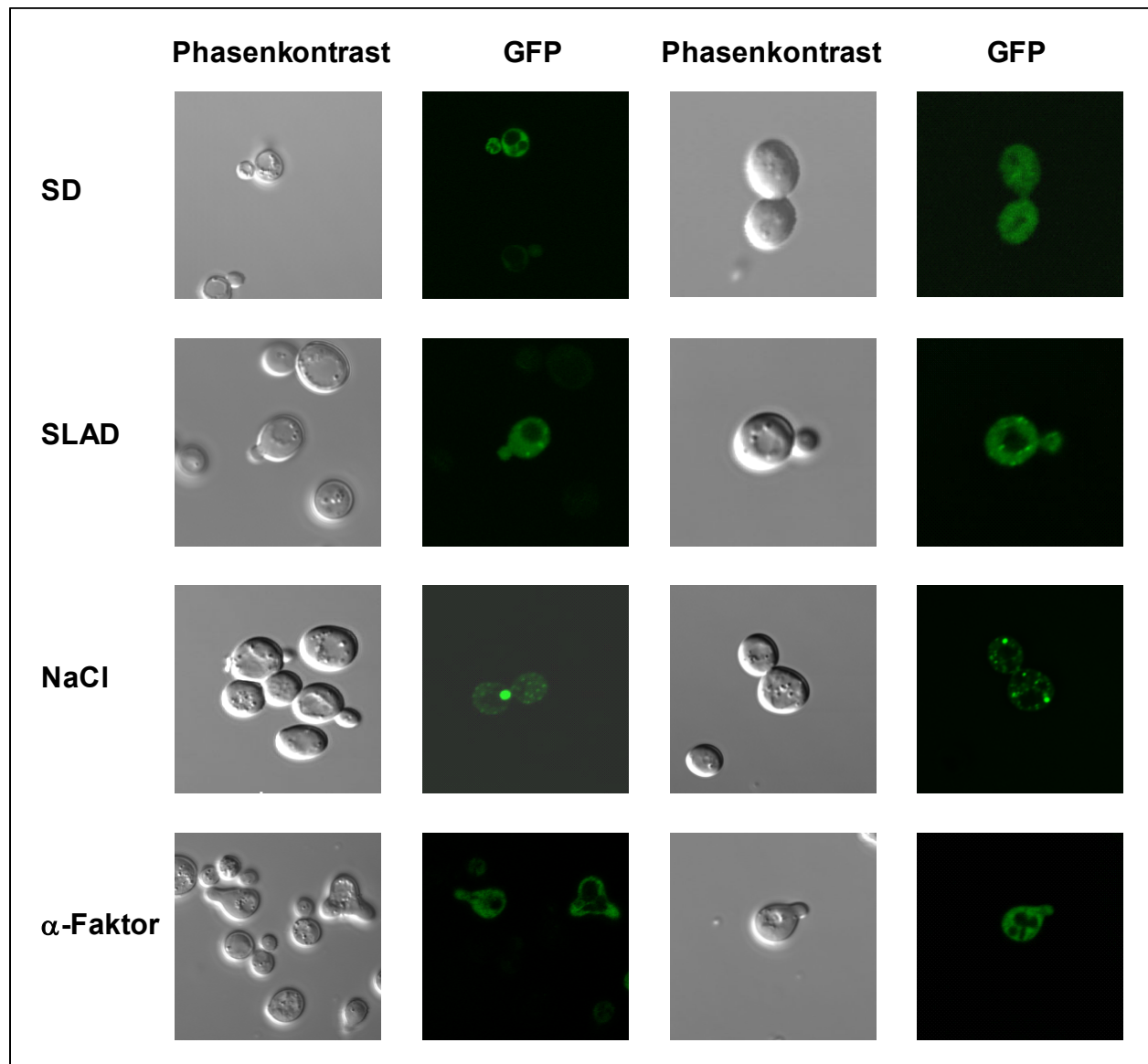
**Abbildung 3.15** Verteilung von GFP-Ste50 nach der Signalinduktion

Wildtypzellen des Hefestammes W303-1A wurden mit dem Plasmid pRS424-METp-GFP-STE50 transformiert. Die Lokalisation von GFP-Ste50 wurde unter Standardbedingungen (Vollmedium) und nach Einleitung der Signalwege beobachtet. Hierfür wurden die Zellen 12 h in SLAD-Medium inkubiert (pseudohyphaler Antwortweg), 5 min mit 0,7 M NaCl behandelt (hochosmolarer Antwortweg), bzw. 90 min mit 5  $\mu$ M  $\alpha$ -Faktor induziert (Pheromonantwortweg) und mittels Fluoreszenz- und Phasenkontrast-Mikroskopie analysiert. Stamm: W303-1A (HF91); Plasmid: pRS424-METp-GFP-STE50 (ELS156).

Somit verändert GFP-Ste50 seine Lokalisation nach Induktion der Signalwege des invasiven Wachstums, der Osmotoleranz sowie der Paarung.

### 3.3.2 Verteilung von GFP-Ste11 unter Überexpressionsbedingungen

Es stellte sich nun die Frage, in welchem Teil der Zelle die MAPKKK Ste11 lokalisiert ist, die stabil mit Ste50 interagiert. Strukturanalysen von Ste50 und Ste11 zeigten, dass zwei Moleküle von Ste11 mit einem Molekül Ste50 einen Ste11-Ste50-Komplex bilden (Grimshaw *et al.*, 2004). Dies macht sich auch bemerkbar, wenn man die *in vivo* Lokalisation von GFP-Ste11 unter Kontrolle des Eigenpromotors in einem 2  $\mu$  Plasmid beobachtet. Im Gegensatz zu GFP-Ste50 ist GFP-Ste11 unter Kontrolle des Eigenpromotors detektierbar (Abb. 3.16).



**Abbildung 3.16** Verteilung von GFP-Ste11 nach der Signalinduktion

Wildtypzellen des Hefestammes W303-1A (HF91) wurden mit dem 2  $\mu$ -Plasmid pRS424-11p-GFP-*STE11* transformiert. Die Lokalisation von GFP-Ste11 wurde unter Standardbedingungen (Vollmedium) und nach Einleitung der Signalwege beobachtet. Hierfür wurden die Zellen 12 h in SLAD-Medium inkubiert (pseudohyphaler Antwortweg), 5 min mit 0,7 M NaCl behandelt (hochosmolarer Antwortweg), bzw. 90min mit 5  $\mu$ M  $\alpha$ -Faktor induziert (Pheromonantwortweg) und mittels Fluoreszenz- und Phasenkontrast-Mikroskopie analysiert. Stamm: W303-1A (HF91); Plasmid: pRS424-11p-GFP-*STE11* (ELS261).

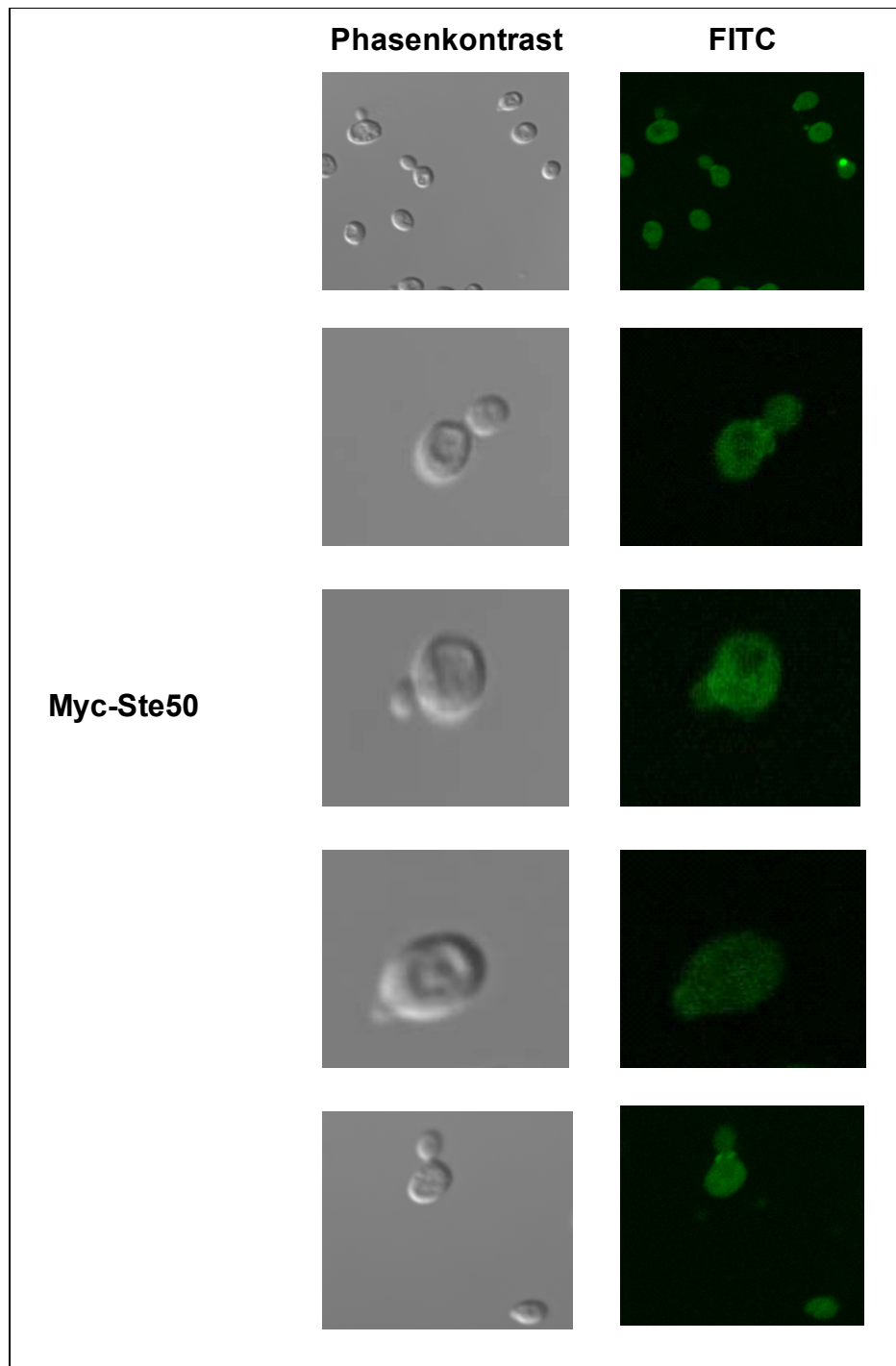
Hierbei zeigt sich, dass sich die Verteilung von GFP-Ste11 während der Signalinduktion verändert (Abb. 3.16). Unter Standardbedingungen (SD) ist GFP-Ste11 in granulären Strukturen angereichert. Diese granulären Strukturen verstärken sich nach Induktion des Salzweges und des invasiven Wachstumsweges (Abb. 3.16). Nach Pheromonzugabe nehmen die granulären Strukturen ab. Stattdessen ist eine diffuse cytoplasmatische Färbung und eine Akkumulation von GFP-Ste11 in Richtung des sich ausbildenden Shmoos zu beobachten (Abb. 3.16).

Zusammenfassend lässt sich aussagen, dass GFP-Ste11 seine Lokalisation nach Induktion der verschiedenen Signalwege ändert. Zudem zeigen diese Ergebnisse, dass die MAPKKK Ste11 und das Modulatorprotein Ste50 in ähnlichen Strukturen innerhalb der drei Signalwege lokalisiert sind.

### **3.3.3 Verteilung von Ste50 nach Überexpression der G-Proteine Ras2<sup>val19</sup> bzw. Cdc42<sup>val12</sup>**

Die Proteine Ste50 und Ste11, welche miteinander interagieren, sind in ähnlichen Strukturen innerhalb der Signalwege lokalisiert. Im vorherigen Teilen der Arbeit konnte gezeigt werden, dass Ste50 nicht nur mit Ste11, sondern mittels der C-terminalen RA-Domäne ebenfalls mit den Proteinen Cdc42, Ras1, Ras2 und Gic1 interagiert. Die Proteine Gic1 sowie Cdc42 sind in der Zelle an Stellen polarisierten Wachstums, wie zum Beispiel der Knospenspitze oder der Knospenansatzstelle lokalisiert (Ziman *et al.*, 1993), während die Proteine Ras1 sowie Ras2 in der Zelle an der Zellmembran lokalisiert sind (Hancock *et al.*, 1990). Es stellte sich nun die Frage, ob sich lokale Konzentrationen von Ste50 ändern, wenn man die Interaktionspartner Cdc42 oder Ras2 überexprimiert.

Hierfür wurde der Hefestamm HCH35 verwendet, der im Genom integriertes Myc-Ste50 trägt. Dieser Stamm wurde mit dem Plasmid pKB-METp-CDC42<sup>val12</sup> transformiert und indirekte Immunofluoreszenzstudien wurden durchgeführt.

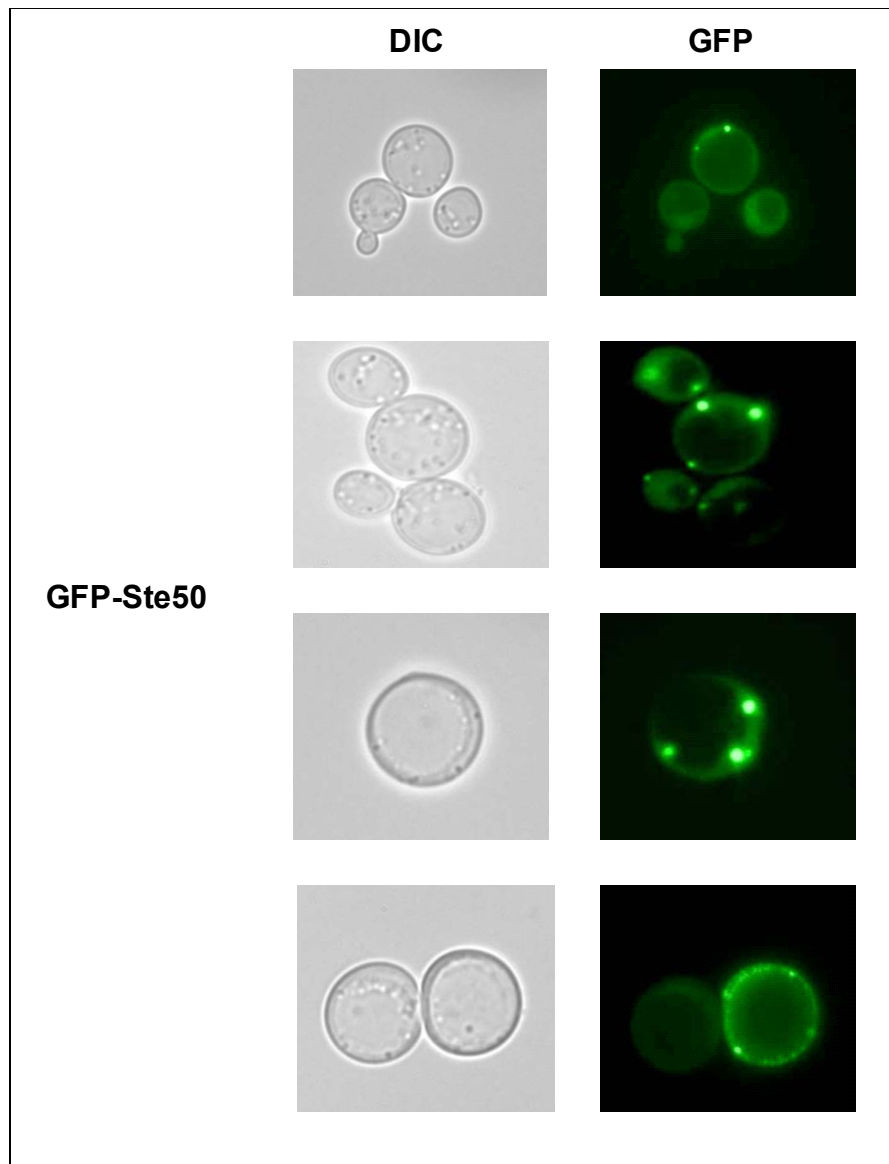


**Abbildung 3.17** Verteilung von Myc-Ste50 nach Überexpression von Cdc42<sup>val12</sup>

Der Hefestamm HCH35 mit integriertem Myc-Ste50::*URA3* wurde mit dem Plasmid pMBD-*CDC42*<sup>val12</sup> (ELS279) transformiert. Es wurden Immunfluoreszenzexperimente durchgeführt. Dargestellt ist die Immunfluoreszenz mit dem Primärantikörper anti-cMyc und dem Sekundärantikörper anti-Maus IgG-FITC. Die Lokalisation von Myc-Ste50 wurde mittels Fluoreszenz- und Phasenkontrast-Mikroskopie analysiert.

Cdc42 ist in der Zelle an Stellen polarisierten Wachstums, wie zum Beispiel der Knospenspitze oder der Knospenansatzstelle lokalisiert (Ziman *et al.*, 1993). Man kann erkennen, dass Konzentrationen von Myc-Ste50 ebenfalls an der Knospenansatzstelle (Knospenring) akkumulieren (Abb.3.17).

Um den Einfluss einer Überexpression von Ras2 auf die Verteilung von GFP-Ste50 zu beobachten, wurde der Hefestamm W303-1A mit den Plasmiden pRS424-*METp-GFP-STE50* und dem Plasmid pAD-*RAS2*<sup>val19</sup> transformiert. Daraufhin wurden direkte Fluoreszenzstudien durchgeführt (Abb. 3.18).



**Abbildung 3.18** Verteilung von GFP-Ste50 nach Überexpression von Ras2<sup>val19</sup>

Wildtypzellen des Hefestammes W303-1A wurden mit dem Plasmid pRS424-METp-GFP-STE50 und dem Plasmid pAD-RAS2<sup>val19</sup> transformiert. Die Lokalisation von GFP-Ste50 wurde mittels Fluoreszenz- und Differential-Interference-Contrast (DIC)-Mikroskopie analysiert. Stamm: W303-1A (HF93), Plasmide: pRS424-METp-GFP-STE50 (ELS156), pAD-RAS2<sup>val19</sup> (ELS269).

Ras2 ist in der Zelle an der Zellmembran lokalisiert (Hancock *et al.*, 1990). Man kann deutlich sehen, das GFP-Ste50 nach Überexpression von Ras2<sup>val19</sup> ebenfalls an Bereichen der Zellmembran akkumuliert (Abb. 3.18).

Somit verändert sich die Verteilung von Ste50 in der Zelle nach Überexpression der G-Proteine Cdc42 und Ras2. Ste50 ist nun an den Stellen in der Zelle anzutreffen, die der Lokalisation der jeweiligen überexprimierten Proteine entsprechen. Diese Ergebnisse unterstützen die beobachtete Interaktion von Ste50 mit diesen Proteinen.

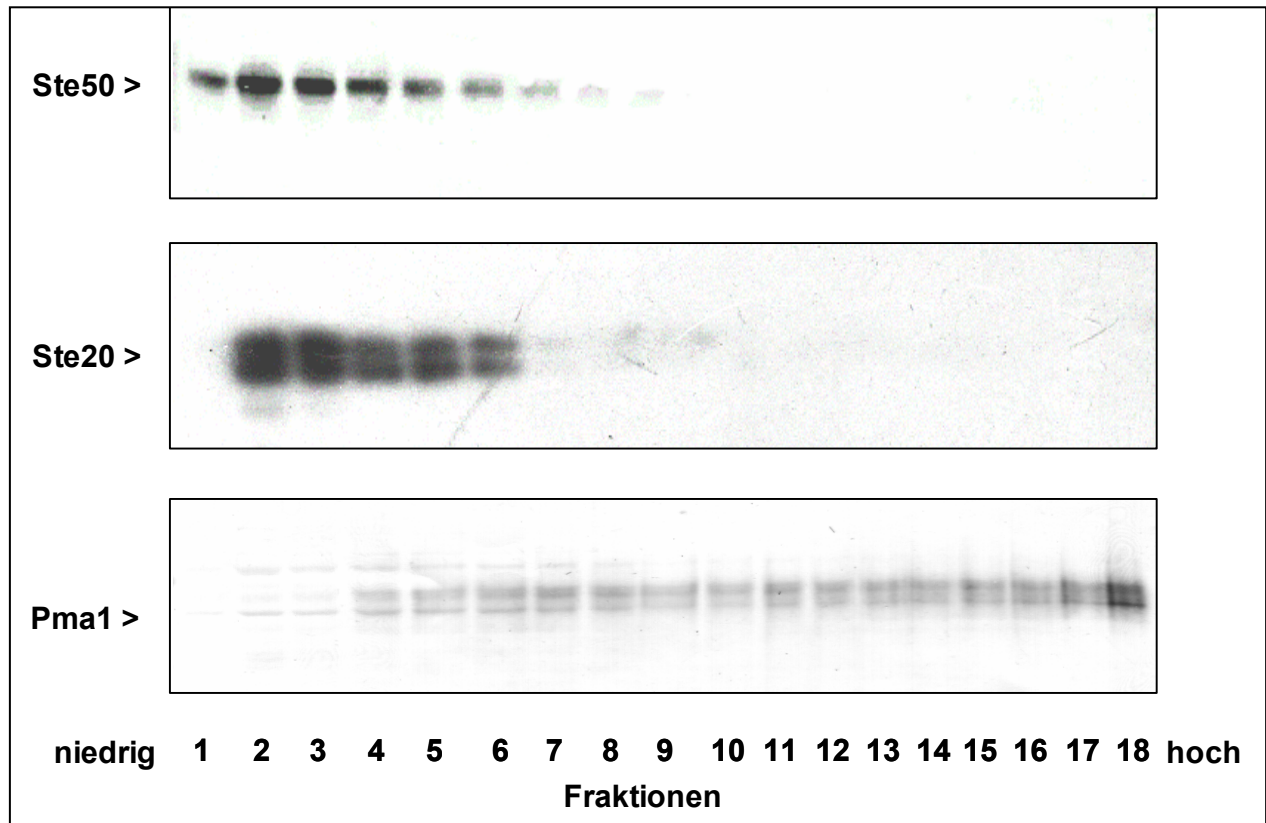
### 3.3.4 Verteilung von Ste50 unter Kontrolle des Eigenpromotors

#### 3.3.4.1 Verteilung von Myc-Ste50 mittels Zellfraktionierung im Sukrosedichtegradienten

Um mehr Informationen über die Verteilung von Ste50 während der Signalwege des invasiven Wachstums, der Osmotoleranz und der Paarung zu erhalten, wurden Zellfraktionierungsexperimente in einem Sukrose-Dichtegradienten durchgeführt. Mit Hilfe von Sukrose-Dichtegradienten können aufgrund physikalischer Parameter einzelne Zellorganellen während einer isopyknischen Zentrifugation voneinander getrennt werden. Zunächst soll die Verteilung von Myc-Ste50 unter Kontrolle des Eigenpromotors untersucht werden. Der Hefestamm HCH35 (W303-1A  $\Delta ste50$  Myc-*STE50::URA3*) wurde logarithmisch angezogen. Zellextrakte wurden hergestellt und nach einer 10 minütigen Zentrifugation bei 13.000 x g wurde der Überstand auf einen 20-50%igen Sukrosegradienten geschichtet und für 14 h bei 114.000 x g zentrifugiert. Die Fraktionen wurden geerntet, auf einem SDS-Gel aufgetragen und mittels einer Westenblot-Analyse untersucht (Abb. 3.19).

Nach einer Zentrifugation im Sukrosedichtegradienten sind lösliche, cytoplasmatische Proteine im Bereich der Fraktionen mit geringerer Sukrosekonzentration anzutreffen. Unter Standardbedingungen (YEPD) akkumuliert Myc-Ste50 in diesen ersten cytoplasmatischen Fraktionen (Abb. 3.19, Fraktionen 1-8). Als Referenzproteine wurden die Proteine Ste20 und die Plasmamembran-ATPase (PmaI) verwendet. Das Protein Ste20 ist ebenfalls in den Signalwegen der Paarung, des invasiven Wachstums und der Osmotoleranz anzufinden und mit Ste50 in der Aktivierung der MAPKKK Ste11 involviert. Es akkumuliert ebenfalls in den Fraktionen 1-8. Das Protein PmaI ist hingegen in den Fraktionen hoher Dichte (6-18) zu finden, die folglich die Plasmamembranfraktionen repräsentieren. Somit reichert sich Ste50 unter Standardbedingungen in den Fraktionen an, die das Cytoplasma repräsentieren (Abb. 3.19).



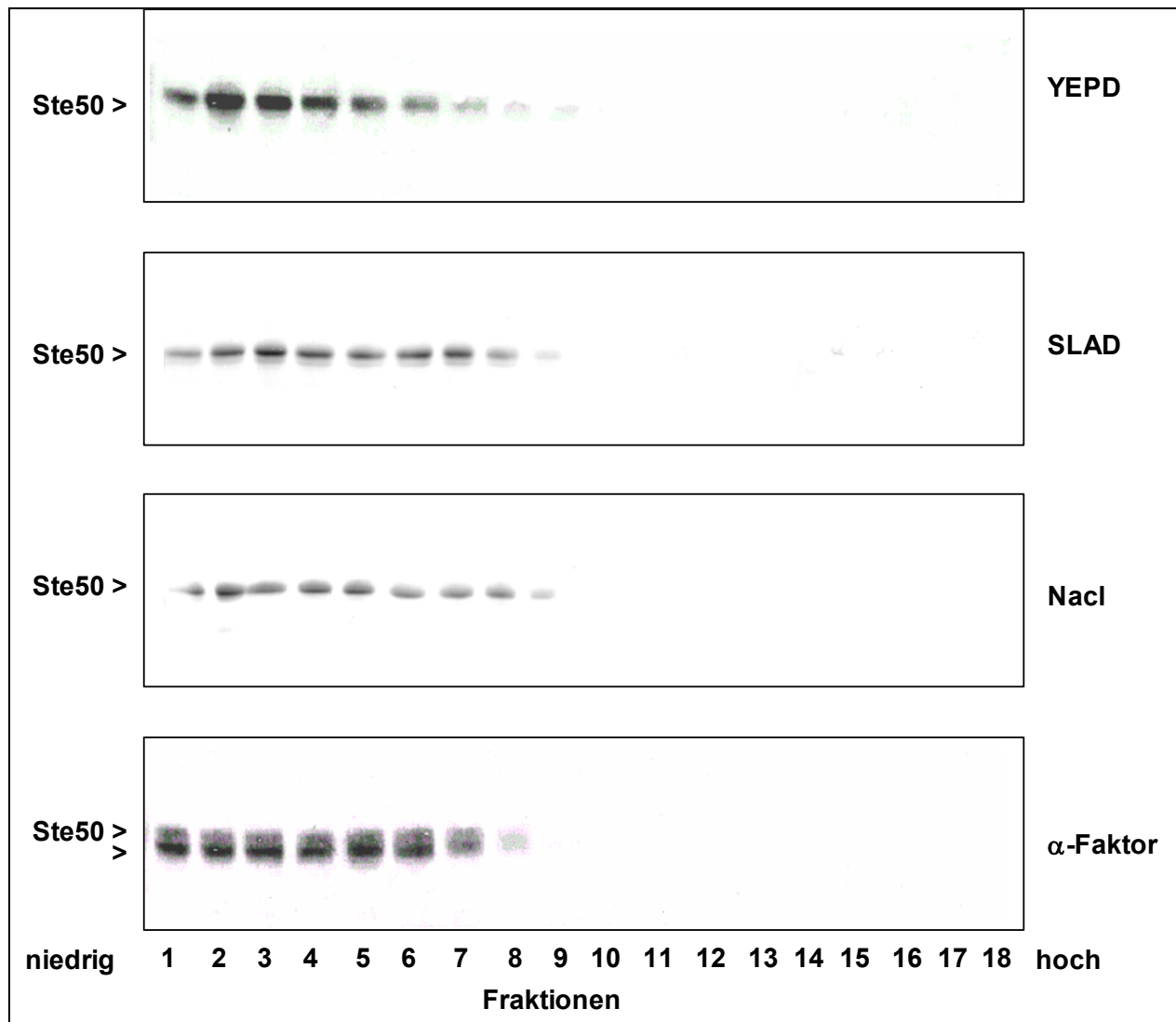


**Abbildung 3.19** Verteilung von Myc-Ste50 im Sucrose-Dichtegradienten

Zellextrakte des Stammes HCH35 mit integriertem Myc-*STE50::URA3* wurden für 10 min bei 13.000 x g zentrifugiert und der Überstand über einen Sucrose-Dichtegradienten (20-50% Sucrose w/w, geringste Dichte in Fraktion 1) fraktioniert. Aliquots der Fraktionen wurden über SDS-PAGE und Westernblot analysiert. Myc-Ste50 wurde mit anti-Myc, Ste20 und Pma1 mit spezifischen, gegen diese Proteine gerichteten Antikörpern, nachgewiesen.

Daraufhin sollte untersucht werden, ob sich die Verteilung von Myc-Ste50 nach Induktion der Signalwege des invasiven Wachstums, der Osmotoleranz sowie der Paarung ändert. Hierfür wurde der Hefestamm HCH35 (W303-1A  $\Delta ste50$  Myc-*STE50::URA3*) logarithmisch angezogen und zur Induktion der Signalwege der Paarung, des invasiven Wachstums, bzw. der Osmotoleranz, für 90 min mit  $\alpha$ -Faktor, 12 h in SLAD-Medium, bzw. 5 min mit 0,7 M NaCl inkubiert. Zellextrakte wurden hergestellt und nach einer 10 minütigen Zentrifugation bei 13.000 x g wurde der Überstand auf einen 20-50%igen Sukrosegradienten geschichtet und für 14 h bei 114.000 x g zentrifugiert. Die Fraktionen wurden auf einem SDS-Gel aufgetragen und mittels einer Westenblot-Analyse untersucht (Abb. 3.20).

Hierbei zeigt sich, dass Myc-Ste50 seine Verteilung im Sukrosegradienten nach Induktion der Signalwege des invasiven Wachstums, der Osmotoleranz und der Paarung nicht verändert (Abb. 3.20). Nach Induktion des invasiven Wachstumsweges, des hochosmolaren Antwortweges, bzw. des Pheromonantwortweges reichert sich Myc-Ste50 ebenfalls in den Fraktionen niedriger Dichte (Fraktionen 1-8) an. Interessanterweise ist nach Induktion des Pheromonweges eine zusätzliche, modifizierte Form von Ste50 detektierbar (Abb. 3.20).



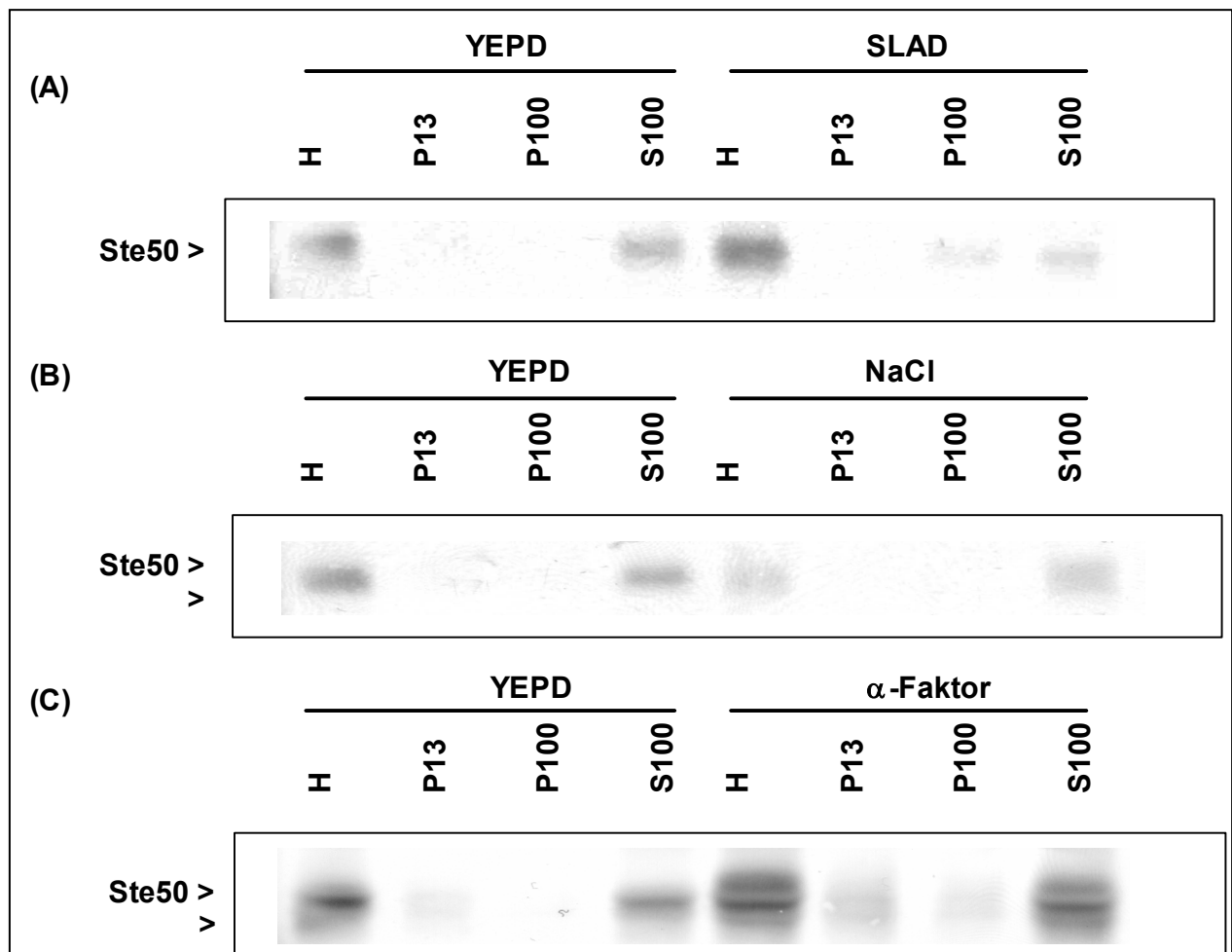
**Abbildung 3.20** Verteilung von Myc-Ste50 im Sucrosegradienten nach der Stimulierung unterschiedlicher Wege der Signaltransduktion (Pseudohyphenweg, HOG-Weg und Pheromonantwort; Wachstum in Stickstoffmangelmedium, Osmostress und  $\alpha$ -Faktor-Behandlung)

Es wurden Zellen logarithmisch wachsender Hefekulturen des Stammes HCH35 geerntet. Zur Induktion der Wege wurden die Zellen für 12 h in SLAD-Medium angezogen, für 5 min mit 0,7 M NaCl behandelt, bzw. für 90 min mit 5  $\mu$ M  $\alpha$ -Faktor induziert. Zellextrakte wurden wie in Abb. 3.19 über Sucrosegradienten (20-50%, niedrigste Dichte in Fraktion 1) fraktioniert. Aliquots der Fraktionen wurden über SDS-PAGE und Westernblot analysiert. Myc-Ste50 wurde mit einem anti-Myc-Antikörper detektiert.

### 3.3.4.2 Verteilung von Myc-Ste50 mittels differentieller Zellfraktionierung

Um weiteren Aufschluss über die Verteilung von Myc-Ste50 während der Signalinduktion zu erhalten, wurde eine differentielle Zentrifugation durchgeführt. Mit Hilfe dieser Methode lassen sich Zellbestandteile aufgrund ihrer unterschiedlichen Sedimentationsgeschwindigkeit voneinander trennen. Logarithmisch wachsende Hefekulturen des Hefestammes HCH35 (W303-1A  $\Delta$ ste50 Myc-STE50::URA3) wurden zur Induktion der Signalwege mit Pheromon, SLAD-Medium, bzw. Salz inkubiert. Die Zellen wurden geerntet, Zellextrakte wurden hergestellt und diese unterschiedlichen Zentrifugationsschritten unterzogen. Zunächst wurden die Zellextrakte für 5 min bei 500 x g

zentrifugiert. Der Überstand (Homogenat) wurde für 10 min bei 13.000 x g zentrifugiert, so dass man das Pellet P13 und den Überstand S13 erhielt. Der Überstand S13 wurde wiederum für 1 h bei 100.000 x g zentrifugiert. Aus dieser Zentrifugation gingen das Pellet P100 und der Überstand S100 hervor. Die erhaltenen Fraktionen weisen Anreicherungen unterschiedlicher Proteine auf. Das Pellet P13 enthält Anreicherungen von der Plasmamembran, Mitochondrien und dem Zellkern. Das Pellet P100 weist Anreicherungen von Mikrosomen auf, wohingegen der Überstand S100 lösliche Zellbestandteile enthält. Auf einem SDS-Gel wurden gleiche Anteile der Fraktionen aufgetragen und einer Westernblot-Analyse unterzogen. Die Ergebnisse der differentiellen Zentrifugation sind in Abbildung 3.21 dargestellt.



**Abbildung 3.21** Verteilung von Myc-Ste50 nach der Zellfraktionierung mittels differentieller Zentrifugation.

Zur Induktion der Signalwege wurden die Zellen des Hefestammes HCH35 mit integriertem Myc-Ste50::UR43 für 12 Stunden in SLAD-Medium inkubiert (pseudohyphaler Antwortweg (A)), für 5 min mit 0,7 M NaCl induziert (hochosmolarer Antwortweg (B)), bzw. für 90 min mit 5  $\mu$ M  $\alpha$ -Faktor behandelt (Pheromonweg (C)). Jeweils 10 OD Zellen logarithmisch wachsender Hefekulturen wurden geerntet und Zellextrakte hergestellt. Die Zellextrakte wurden verschiedenen Zentrifugationsschritten unterzogen. Die Zellextrakte wurden zunächst für 5 min bei 500 x g zentrifugiert, um die Zelltrümmer zu entfernen. Ein Teil des Homogenates (H) wurde für 10 min bei 13.000 x g abzentrifugiert. Man erhielt das Pellet (P13) und den Überstand S13. Der Überstand S13 wurde dann für 1 h bei 100.000 x g zentrifugiert. Aus dieser Zentrifugation erhielt man das Pellet P100 und den Überstand S100. Die Fraktionen wurden in gleichen Volumina Lysis- sowie Probenpuffer aufgenommen. Je 0,2 OD jeder Fraktion wurde auf einem 10%igen SDS-Gel aufgetragen und einer Westernblot-Analyse unterzogen. Myc-Ste50 wurde mit einem anti-Myc-Antikörper detektiert.

Unter Standardbedingungen ist Myc-Ste50 im Homogenat und in der S100-Fraktion angereichert (Abb. 3.21). Nach Induktion des invasiven Wachstumsweges ist eine zusätzliche Anreicherung in der P100-Fraktion erkennbar (Abb. 3.21 (A)). Die Induktion des hochosmolaren Antwortweges führt zu einer Anreicherung von Myc-Ste50 im Homogenat sowie der S100-Fraktion, welches der Verteilung von Myc-Ste50 unter Standardbedingungen entspricht (Abb. 3.21 (B)). Wird der Pheromonantwortweg induziert, zeigt sich eine zusätzliche Akkumulation in der P13-Fraktion (Abb. 3.21 (C)). Interessanterweise ist nach Induktion mit  $\alpha$ -Faktor eine zusätzliche langsamer wandernde Form von Myc-Ste50 erkennbar (Abb. 3.21 (C)).

Zusammenfassend lässt sich anhand der differentiellen Zentrifugation aussagen, dass Myc-Ste50 während der Signalwege der Pseudohyphenbildung und der Paarung leichte Änderungen in seiner Verteilung zeigt. Unter Standardbedingungen sowie unter hochosmolaren Bedingungen ist Myc-Ste50 in der cytoplasmatischen Fraktion anzufinden. Nach Induktion des invasiven Wachstumsweges findet man zusätzliche Anreicherungen von Myc-Ste50 in der P100-Fraktion, welche die Anreicherungen von Mikrosomen repräsentiert. Nach Induktion des Pheromonantwortweges sind Anreicherungen von Myc-Ste50 in der P13-Fraktion (Plasmamembran-, Mitochondrien- bzw. Zellkernfraktion) erkennbar. Weiterhin ist eine zusätzliche, langsamer wandernde, modifizierte Form von Ste50 sichtbar. Die hier gewonnenen Zellfraktionierungsdaten zeigen, dass die Verteilung von Ste50 nach der Signalinduktion nicht mit ihrer Verteilung in Zellen ohne Stimulierung der Signalwege übereinstimmt. Dies deutet darauf hin, dass Ste50 die lokale Konzentration der Kinase Ste11 folglich auch erhöhen kann, welches zu einer Verstärkung der Signaltransduktion führt. Weiterhin deuten die Verteilungsstudien von Myc-Ste50 nach Einleitung des Signalweges der Paarung an, dass Myc-Ste50 *in vivo* modifiziert wird. In folgenden Versuchen wird geklärt, um welche Art der Modifizierung es sich handelt.

### 3.4 Untersuchungen zur Phosphorylierung von Ste50

Das Protein Ste50 ist ein Regulatorprotein von der MAPKKK Ste11. Es reguliert die Aktivität des Proteins Ste11 in dem MAPK-vermittelten Signalweg zur Einleitung der Paarung, des invasiven Wachstums und der Osmotoleranz. Darüber wie Ste50 selbst reguliert wird, ist noch nicht viel bekannt. Die Verteilung von Ste50 nach Einleitung der Signalwege der Paarung und des hochosmolaren Weges deuteten an, dass Ste50 *in vivo* modifiziert wird. Anhand der folgenden Daten liegt die Vermutung nahe, dass es sich bei dieser Modifizierung von Ste50 um eine Phosphorylierung handelt.

Wu *et al.* (1999) haben gezeigt, dass gereinigtes GST-Ste50 durch Ste11 *in vitro* phosphoryliert wird. Weiterhin konnte diese Arbeitsgruppe zeigen, dass GAL-GST-Ste50 an mehreren Serin- und Threoninresten phosphoryliert wird. Sie identifizierten einen Threoninrest (T42), dessen Phosphorylierung für die Signalweiterleitung des Paarungsweges wichtig zu sein scheint und deuteten

an, dass die Kaseinkinasen I Yck1 sowie Yck2 für die Phosphorylierung dieses Threoninrests benötigt werden sollten (Wu *et al.*, 2003).

In unserer Arbeitsgruppe konnte mittels massenspektroskopischer Untersuchungen, einer Phosphoprotein-Anfärbung im Gel, sowie eines Phosphoserinantikörpers nachgewiesen werden, dass *GAL*-GST-Ste50 phosphoryliert wird (Spode, 2004). Eine Phosphorylierungsmutante Ste50-3A (Ste50-S196A S198A S202A) zeigte Defekte in der Signalweiterleitung des Pheromonwegs und des hochosmolaren Antwortweges. Diese Mutante verstärkte die Einleitung des Pheromonwegs und zeigte schlechteres Wachstum auf hochosmolaren Medium (Spode, 2004).

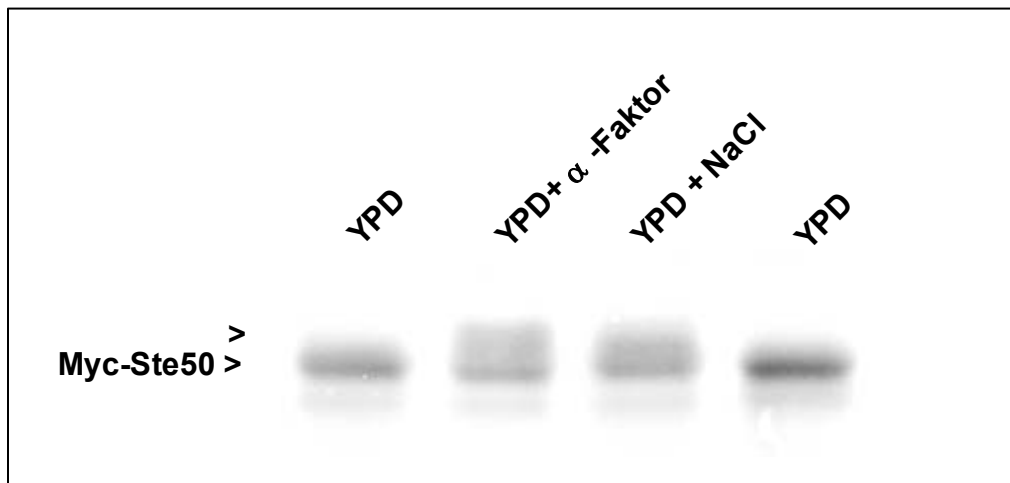
Ziel dieses Teils der Arbeit ist es, die Phosphorylierung von Ste50 *in vivo* insbesondere nach Einleitung des Pheromonweges zu untersuchen. Hierbei wurden im Genom-intergrierte Myc-Ste50-Konstrukte unter Kontrolle des endogenen Promoters verwendet, um möglichst natürliche Bedingungen vorliegen zu haben. Vorherige Experimente wurden unter Verwendung von GST-Ste50 unter der Kontrolle des induzierbaren *GAL*-Promoters durchgeführt (Wu *et al.*, 2003; Spode, 2004). Der Nachteil von GST-Fusionsproteinen besteht darin, dass diese Dimere bilden können. Daher wurde in folgenden Experimenten Myc-Ste50 verwendet. Es sollte untersucht werden, ob es sich bei der Modifizierung von Ste50 um eine Phosphorylierung handelt. Weiterhin sollte untersucht werden, welche Proteinkinase für die *in vivo* Phosphorylierung im Pheromonweg verantwortlich ist. Daraufhin sollte der Einfluss der Phosphorylierung auf die Stabilität von Ste50 untersucht werden.

### 3.4.1 Signal- abhängige Phosphorylierung von Myc-Ste50

Die Verteilungsstudien von Myc-Ste50 deuteten an, dass Myc-Ste50 nach Einleitung des Pheromonweges und zum Teil nach Einleitung des hochosmolaren Antwortweges modifiziert wird (Abb. 3.20, Abb. 3.21). Diese Modifizierungen sind als langsamer wandernde Formen von Ste50 detektierbar. Um die Modifizierung von Myc-Ste50 nach Einleitung der beiden Wege besser vergleichen zu können, wurden Hefezellen nach Induktion der Signalwege der Paarung und des hochosmolaren Wachstums geerntet, Proteinrohextrakte hergestellt, diese auf einem SDS-Gel aufgetrennt und einer Westernblotanalyse unterzogen (Abb. 3.22).

Unter Normalbedingungen ist Myc-Ste50 als scharfe einfache Bande detektierbar. Nach Induktion des Pheromonweges für 90 min mit  $\alpha$ -Faktor ist zusätzlich zur normalen Form von Myc-Ste50 eine diffuse, langsamer wandernde Form von Ste50 zu sehen (Abb. 3.22). Die Menge der normalen Form von Myc-Ste50 vermindert sich hierbei. Nach Induktion des hochosmolaren Weges durch Salzzugabe entdeckt man wiederum zusätzlich eine langsamer wandernde Form von Ste50. Die langsamer wandernde Isoform von Myc-Ste50 von salzbehandelten Zellen zeigt ein anderes Laufverhalten im SDS-Gel verglichen mit Myc-Ste50, welches von pheromonbehandelten Zellen exprimiert wurde. Die modifizierte Form von Myc-Ste50, welches von salzbehandelten Zellen exprimiert wurde, ist als

relativ kompakte Form detektierbar, wohingegen Myc-Ste50 von pheromonbehandelten Zellen ein stärker verzögertes Laufverhalten aufweist (Abb. 3.22). Dies deutet darauf hin, dass Myc-Ste50 nach Einleitung des Pheromonweges und des hochosmolaren Antwortweges differenziert modifiziert wird.



**Abbildung 3.22 Modifizierung von Myc-Ste50**

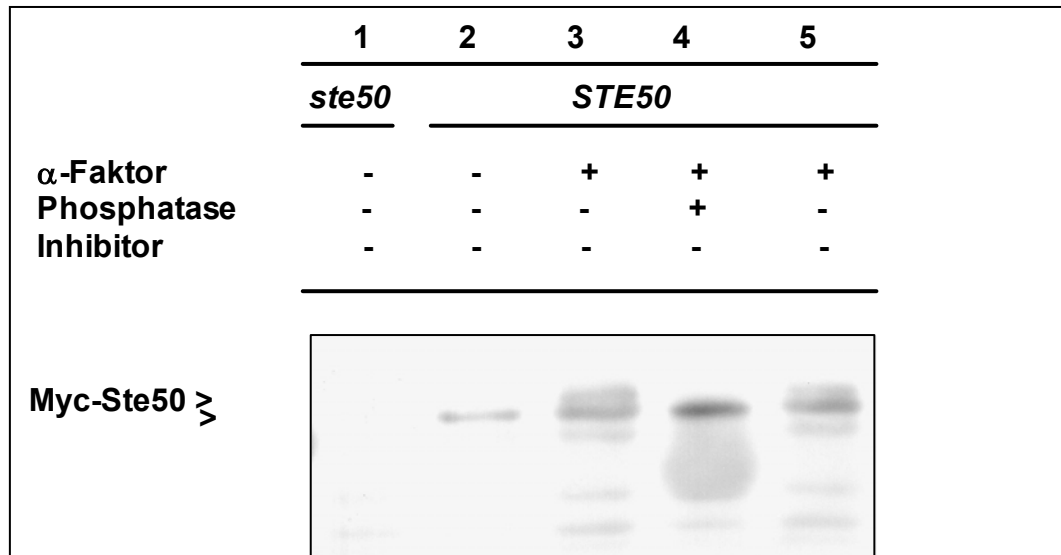
Dargestellt ist die Immunoblotanalyse von Myc-Ste50. Zellen von logarithmisch wachsenden Hefekulturen des Stammes HCH35 mit integriertem Myc-*STE50::URA3* wurden geerntet. Zur Induktion der Wege wurden die Zellen 5 min mit 0,7 M NaCl behandelt, bzw. für 90 min mit 5  $\mu$ M  $\alpha$ -Faktor induziert. Zellextrakte wurden hergestellt und über SDS-PAGE und Westernblot analysiert. Myc-Ste50 wurde mit dem anti-Myc-Antikörper detektiert.

Es sollte nun untersucht werden, ob Ste50 *in vivo* nach Einleitung des Pheromonweges phosphoryliert wird und welche Auswirkungen diese Phosphorylierung hat. Zunächst wurde überprüft, ob es sich bei der langsamer wandernde modifizierte Form von Myc-Ste50 um eine Phosphatase-sensitive Spezies handelt. Hierfür wurden Hefezellen geerntet, die unter verschiedenen Bedingungen inkubiert wurden, Zellextrakte hergestellt und einer Phosphatase-Behandlung unterzogen (Abb. 3.23).

Der Hefestamm HCH35 (W303-1A  $\Delta$ *ste50* Myc-*STE50::URA3*) wurde ohne Pheromon inkubiert beziehungsweise mit Pheromon behandelt. Es wurden Proteinrohextrakte hergestellt, die in mehrere Aliquots aufgeteilt wurden. Ein Aliquot der pheromonbehandelten Probe wurde mit fünf Units Calf Intestine Phosphatase für vier Stunden bei 37°C inkubiert. Um eine mögliche Degradation des Proteins auszuschließen, wurde ein zweites Aliquot ohne Zugabe von Phosphatase für 4 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Proben wurden auf einem SDS-Gel aufgetrennt und einer Immunoblotanalyse unterzogen (Abb. 3.23).

Als Negativkontrolle wurde der Hefestamm W303-1A  $\Delta$ *ste50* verwendet, in welchem wie erwartet kein Myc-Ste50 detektierbar ist (Abb. 3.23, Spur 1). In dem Stammhintergrund HCH35 mit integriertem Myc-Ste50::*URA3* wandert Myc-Ste50 nach Inkubation in Normalmedium als kompakte einfache Bande (Abb. 3.23, Spur 2). Nach Pheromonbehandlung der Zellen ist zusätzlich zur einfachen Bande eine zweite diffuse, langsamer wandernde Bande von Myc-Ste50 detektierbar (Abb. 3.23, Spur 3). Behandelt man diese Probe hingegen mit alkaliner Phosphatase, ist diese Bande niedrigerer Mobilität nicht mehr nachweisbar (Abb. 3.23, Spur 4). Der Verlust dieser Bande ist

spezifisch, da sich zeigt, dass die phosphatase-sensitive Bande nach reiner Inkubation für 4 Stunden bei 37°C ohne alkaline Phosphatase noch auftritt (Abb. 3.23, Spur 5). Dies weist darauf hin, dass die Reduzierung der langsamer wandernden Bande durch die Behandlung mit Alkaliner Phosphatase hervorgerufen wird und nicht durch zum Beispiel unspezifische Degradation durch Proteasen.



**Abbildung 3.23 Test auf Phosphorylierung von Myc-Ste50**

Dargestellt ist die Immunoblotanalyse von Myc-Ste50. Es wurden Zellen logarithmisch wachsender Hefekulturen des Stammes HCH35 (Myc-*STE50::URA3*) geerntet. Zur Induktion des Pheromonweges wurden die Zellen für 90 min mit 5 µM α-Faktor induziert. Zellextrakte wurden hergestellt und zur Phosphatasebehandlung für 4 Stunden bei 37°C mit 5 U alkaliner Phosphatase inkubiert. Als Kontrolle wurde der Zellextrakt ebenfalls für 4 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Zellextrakte wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und einer Westernblotanalyse unterzogen. Myc-Ste50 wurde mit dem anti-Myc-Antikörper detektiert.

Somit ist das veränderte Laufverhalten von Myc-Ste50 nach Einleitung des Pheromonweges auf Phosphorylierung zurückzuführen. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit publizierten Daten, dass Ste50 ein Phosphoprotein ist (Wu *et al.*, 2003). Welche Proteinkinasen für diese *in vivo* Phosphorylierung notwendig sind, wurde in weiteren Versuchen geklärt.

### 3.4.2 Die *in vivo* Phosphorylierung von Ste50 ist von der Ste11-Kinaseaktivität abhängig

Das Protein Ste50 interagiert mit der MAPKKK Ste11 und reguliert deren Aktivität. Wu *et al.* (1999) konnten mittels *in vitro* Kinasetests zeigen, dass Ste50 ein *in vitro* Substrat der Ste11-Kinase darstellt. Weiterhin konnten Wu *et al.* (2003) eine Phosphorylierungsstelle (T42) von Ste50 identifizieren, deren Phosphorylierung für die Signalweiterleitung des Paarungsweges von Bedeutung sein soll. Sie haben in einem *in vitro* Kinase assay gezeigt, dass für die Phosphorylierung dieses Threoninrestes vermutlich die Kaseinkinase des Types I Yck1 verantwortlich ist. Weitere Kinasen, die eine *in vitro* Phosphorylierung von Ste50 zeigten, sind die Kinasen Yck2, Gin4 und Rim11 (Wu *et al.*, 2003). Es stellte sich nun die Frage, ob die durch Pheromonbehandlung hervorgerufene *in vivo* Phosphorylierung von Myc-Ste50 von Ste11 abhängig ist oder von einer der oben genannten Kinasen vermittelt wird.

Hierfür wurde die *in vivo* Phosphorylierung von Ste50, die nach Pheromonzugabe auftritt, in verschiedenen Deletionsstämmen der Kinasen analysiert.

### 3.4.2.1 Phosphorylierung von Ste50 in Kinase-Deletionsmutanten

Um zu testen, ob die pheromonabhängige Phosphorylierung von einer der Kinasen Yck1, Yck2, Yck3, Gin4 bzw. Rim11 oder von der MAPKKK Ste11 vermittelt wird, wurde die Phosphorylierung von Myc-Ste50 in pheromonbehandelten Zellen der entsprechenden Deletionsstämme der Kinasen untersucht. Die Deletionsstämme, die mit dem Plasmid pRS416-50p-Myc-STE50 transformiert wurden, wurden logarithmisch wachsen gelassen. Die Zellen wurden vor bzw. nach Pheromonbehandlung geerntet, Proteinextrakte hergestellt und diese einer Westernblotanalyse unterzogen (Abb. 3.24).



**Abbildung 3.24 Phosphorylierung von Myc-Ste50 in verschiedenen Kinase-Mutanten. Die  $\alpha$ -Faktor-abhängige Phosphorylierung von Ste50 ist von Ste11 abhängig.**

Dargestellt ist eine Immunoblotanalyse von Myc-Ste50. Verschiedene Deletionsstämme wurden mit dem Plasmid p41650pMycSTE50 transformiert. Es wurden Zellen logarithmisch wachsender Hefekulturen geerntet. Zur Induktion des Pheromonweges wurden die Zellen für 90 min mit 5  $\mu$ M  $\alpha$ -Faktor induziert. Zellextrakte wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und einer Westernblotanalyse unterzogen. Myc-Ste50 wurde mit dem anti-Myc-Antikörper detektiert.

Stämme: W303-1A  $\Delta$ *ste50* (HF93), W303-1A  $\Delta$ *ste11* (HF95), W303-1A  $\Delta$ *yck1* (HLS1055), W303-1A  $\Delta$ *yck2* (HLS1058), W303-1A  $\Delta$ *yck3* (HLS1061), W303-1A  $\Delta$ *gin4* (HLS1065) und W303-1A  $\Delta$ *rim11* (HLS1066); Plasmid: p416-50p-Myc-STE50 (EFB268).

Der Proteinextrakt des Hefestamms W303-1A  $\Delta$ *ste50* stellt die Negativkontrolle dar und man kann daher kein Myc-Ste50 detektieren (Abb. 3.24, Spur 1). Der Hefestamm W303-1A  $\Delta$ *ste11* [pRS416-50p-Myc-STE50] zeigt ohne sowie nach Pheromonbehandlung Myc-Ste50 als scharfe kompakte Bande (Abb. 3.24, Spur 2 und Spur 3). Myc-Ste50 kann in diesem Stammhintergrund somit nicht mehr phosphoryliert werden. Die pheromonabhängige Phosphorylierung von Myc-Ste50 scheint daher von Ste11 abhängig zu sein. Betrachtet man hingegen das Laufverhalten von Myc-Ste50 in dem Wildtypstamm, so ist nach Pheromonbehandlung die typische diffuse, langsamer wandernde phosphorylierte Form von Myc-Ste50 detektierbar (Abb. 3.24, Spur 4 und Spur 5). In den Deletionsstämmen der Kinasen *YCK1*, *YCK2*, *YCK3*, *GIN4*, sowie *RIM11* ist ebenfalls die



pheromonabhängige Phosphorylierungsbande von Myc-Ste50 zu sehen (Abb. 3.24, Spur 6-15). Die Kinasen Yck1, Yck2, Yck3, Gin4 sowie Rim11 scheinen somit nicht für die pheromonabhängige *in vivo* Phosphorylierung von Myc-Ste50 erforderlich zu sein.

Zusammenfassend deuten diese Ergebnisse an, dass die pheromonabhängige Phosphorylierung von Myc-Ste50 von der Kinase Ste11 und nicht von den Proteinkinasen Yck1, Yck2, Yck3, Gin4 bzw. Rim11 abhängig ist.

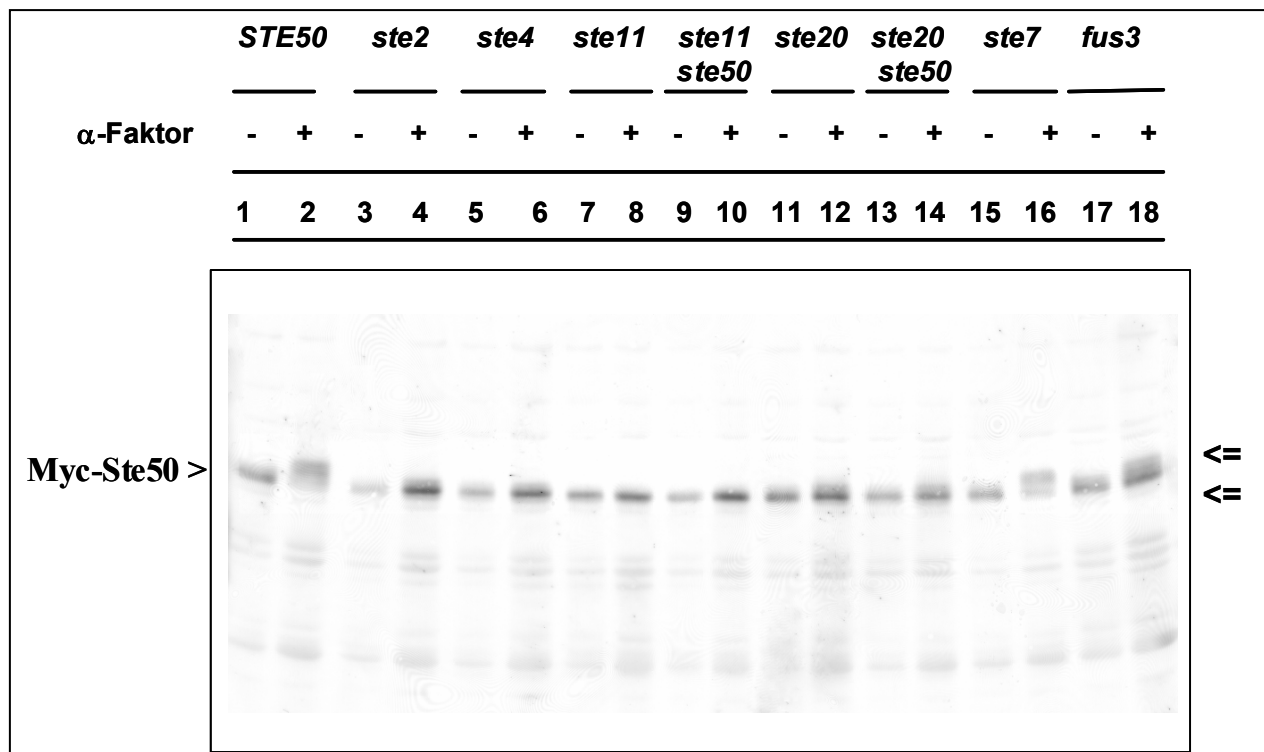
### 3.4.2.2 Epistase- Untersuchung zur Phosphorylierung von Ste50

Um genaueren Aufschluss über die pheromonabhängige Phosphorylierung von Myc-Ste50 zu erlangen, wurde diese in verschiedenen Mutanten des Pheromonweges überprüft. Es sollte ermittelt werden, ob die Phosphorylierung des Proteins Myc-Ste50 von Ste11 selber oder von Komponenten des Pheromonweges, die ober- bzw. unterhalb von Ste50 in der Signalkaskade involviert sind, abhängig ist. Es wurden hierfür Deletionsmutanten des Pheromonrezeptors *STE2*, der  $G_{\beta}$ -Untereinheit des heterotrimeren G-Proteins *STE4*, der MAPKKK *STE11* bzw. der PAK-Proteinkinase *STE20* eingesetzt. Um eine mögliche Feedback- sowie von der Signalweiterleitung abhängigen Phosphorylierung auszuschließen, wurden Mutanten des Pheromonweges, die in der Signalkaskade unterhalb von Ste50 liegen, verwendet. Bei diesen Mutanten handelt es sich um Deletionen der MAPKK *STE7* bzw. der MAPK *FUS3*. Die verschiedenen Hefestämme wurden mit dem Plasmid pRS416-50p-Myc-*STE50* transformiert. Zellen logarithmisch wachsender Hefestämme wurden vor bzw. nach Pheromonbehandlung geerntet, Rohextrakte hergestellt und einer Westernblotanalyse unterzogen (Abb. 3.25).

Das Ergebnis der epistatischen Analyse zeigt, dass die pheromonabhängige Phosphorylierung von Myc-Ste50 auf der Ebene von Ste11 erfolgt (Abb. 3.25).

Im Wildtypstamm W303-1A ist Myc-Ste50 unter Normalbedingungen als kompakte Bande detektierbar (Abb. 3.25, Spur 1). Nach Inkubation mit  $\alpha$ -Faktor, ist eine zusätzliche phosphorylierte Bande zu erkennen. Der Anteil von unphosphoryliertem Myc-Ste50 reduziert sich hierbei (Abb. 3.25, Spur 2). Die Deletion des Pheromonrezeptors *STE2* führt dazu, dass Ste50 nach Inkubation mit Pheromon nicht mehr phosphoryliert werden kann (Abb. 3.25, Spur 3 und Spur 4). Eine Deletion der  $G_{\beta}$ -Untereinheit *STE4* zeigt ebenfalls Defekte in der Phosphorylierung von Myc-Ste50 (Abb. 3.25, Spur 5 und Spur 6). Wird hingegen die MAPKKK *STE11* deletiert, führt dies zu einem vollständigen Verlust der pheromonabhängigen Phosphorylierung von Myc-Ste50 (Abb. 3.25, Spur 7 und Spur 8). Man erkennt keine Unterschiede im Laufverhalten von Myc-Ste50 vor bzw. nach Einleitung des Pheromonweges. Wird zusätzlich zu *STE11* noch *STE50* deletiert, um den eventuellen Einfluss zusätzlicher Kopien von Ste50 auszuschließen, ist das gleiche Ergebnis wie für die Einfachdeletion von *STE11* beobachtbar (Abb. 3.25, Spur 9 und Spur 10). Myc-Ste50 wird in diesem

Stammhintergrund nach Pheromonzugabe nicht mehr phosphoryliert. Des Weiteren zeigt die Deletion der Proteinkinase *STE20* eine reduzierte pheromonabhängige Phosphorylierung von Myc-Ste50 (Abb. 3.25, Spur 11-14). *Ste20* ist für die Phosphorylierung und Aktivierung von *Ste11* notwendig. Somit wird *Ste50* abhängig von *Ste11* phosphoryliert. *Ste11* muss hierfür vorher von *Ste20* aktiviert werden. Um zu untersuchen, ob die Phosphorylierung von Myc-Ste50 einem Feedback- sowie Signalweiterleitungs-Mechanismus unterliegt, wurde die Phosphorylierung in *STE7*- bzw. *FUS3*-Deletionsstämmen untersucht. Hierbei zeigt sich, dass Myc-Ste50 in einem *STE7*-Deletionsstamm nach Pheromonzugabe phosphoryliert wird (Abb. 3.25, Spur 15 und Spur 16). Auch in einem Deletionsstamm von *FUS3* ist die pheromonabhängige Phosphorylierung detektierbar (Abb. 3.25, Spur 17 und Spur 18). Somit wird die Phosphorylierung von Myc-Ste50 nicht durch einen über *Ste7*- bzw. *Fus3*- vermittelten Mechanismus reguliert. Diese Ergebnisse zeigen weiterhin, dass die durch den Pheromonweg hervorgerufene Phosphorylierung von Myc-Ste50 über die MAPKKK *Ste11* vermittelt wird.



**Abbildung 3.25 Epistatische Analyse der Phosphorylierung von Myc-Ste50 in Deletionsmutanten des Pheromonantwortweges**

Dargestellt ist eine Immunoblotanalyse von Myc-Ste50. Verschiedene Hefestämme wurden mit dem angegebenen Plasmid transformiert. Es wurden Zellen logarithmisch wachsender Hefekulturen geerntet. Zur Induktion des Pheromonweges wurden die Zellen für 90 min mit 5  $\mu$ M  $\alpha$ -Faktor induziert. Zellextrakte wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und einer Westernblotanalyse unterzogen. Myc-Ste50 wurde mit dem anti-Myc-Antikörper detektiert.

Stämme: W303-1A  $\Delta$ *ste50* (HF93), W303-1A  $\Delta$ *ste2* (HLS354), W303-1A  $\Delta$ *ste4* (HLS275), W303-1A  $\Delta$ *ste11* (HF95), W303-1A  $\Delta$ *ste11*  $\Delta$ *ste50* (HLS81), W303-1A  $\Delta$ *ste20* (HLS84), W303-1A  $\Delta$ *ste20*  $\Delta$ *ste50* (HLS85), W303-1A  $\Delta$ *ste7* (HF898) und W303-1A  $\Delta$ *fus3* (HCH497), Plasmid: pRS416-50p-Myc-*STE50* (EFB268).

### 3.4.2.3 Phosphorylierung von Ste50 in Ste11-Kinase-Mutanten

Um zu testen, ob für die Phosphorylierung von Myc-Ste50 nach Einleitung des Pheromonweges die Kinaseaktivität von Ste11 notwendig ist, wurde die Phosphorylierung von Myc-Ste50 in verschiedenen Kinase-Mutanten von Ste11 untersucht. Zum einen wurde die Mutante Ste11-K444R verwendet. Bei dieser Mutante handelt es sich um eine Kinase-inaktive Form von Ste11. Diese Mutante ist nicht mehr in der Lage andere Proteine zu phosphorylieren. Weiterhin wurde die hyperaktive Mutante Ste11-1 (Ste11-P279S) verwendet. Der Aminosäureaustausch P279S in der aminoterminalen Domäne von Ste11 führt zu einer konstitutiven Aktivierung des Pheromonwegs (Stevenson *et al.*, 1992). Eine weitere Mutante von Ste11 - Ste11-K444R P279S enthält beide Aminosäureaustausche und stellt somit eine konstitutiv aktive Mutante von Ste11 dar, die nicht mehr in der Lage ist, andere Proteine zu phosphorylieren. Verschiedene Stammhintergründe, der Wildtypstamm, ein  $\Delta ste11$ -Hefestamm, sowie  $\Delta ste11$ -Hefestämme, die die Plasmide pADH-STE11K444R, pADH-STE11P279K444R, pKB-STE11 bzw. pRS315-STE11-1 enthielten, wurden zusätzlich mit dem Plasmid pRS416-50p-Myc-STE50 transformiert. Die Stämme wurden unter Normalbedingungen und Pheromonbedingungen angezogen. Die Zellen wurden geerntet, Rohextrakte hergestellt und einer Westernblotanalyse unterzogen (Abb. 3.26).



Abbildung 3.26 Phosphorylierung von Myc-Ste50 in Ste11-Kinasemutanten

Dargestellt ist eine Immunoblotanalyse von Myc-Ste50. Verschiedene Hefestämme wurden mit den angegebenen Plasmiden transformiert. Es wurden Zellen logarithmisch wachsender Hefekulturen geerntet. Zur Induktion des Pheromonweges wurden die Zellen für 90 min mit 5  $\mu$ M  $\alpha$ -Faktor induziert. Zellextrakte wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und einer Westernblotanalyse unterzogen. Myc-Ste50 wurde mit dem anti-Myc-Antikörper detektiert.

Stämme: W303-1A  $\Delta ste50$  (HF93), W303-1A  $\Delta ste11$  (HF95), Plasmide: p416-50p-Myc-STE50 (EFB268), pSL2478 (pADH-STE11K444R), pSL2479 (pADH-STE11P279SK444R), ELS342 (pKB-STE11) bzw. EGX399 (pRS315-STE11-1).

Der Hefestamm W303-1A  $\Delta ste50$  dient als Negativkontrolle, da in diesem Stamm kein Myc-Ste50 detektiert werden kann (Abb. 3.26, Spur 1). Im Wildtypstamm ist Myc-Ste50 unter nicht-induzierenden Bedingungen als kompakte Bande detektierbar (Abb. 3.26, Spur 2). Nach Einleitung des Pheromonweges wird Myc-Ste50 phosphoryliert, welches als zusätzliche verzögert laufende Bande sichtbar wird (Abb. 3.26, Spur 3). Hingegen tritt in dem Stammhintergrund W303-1A  $\Delta ste11$  keine pheromonabhängige Phosphorylierung von Myc-Ste50 auf (Abb. 3.26, Spur 4 und Spur 5). Enthält dieser Stamm zusätzlich eine Kinase inaktive Mutante von Ste11 mit dem Aminosäureaustausch K444R, ist wiederum kein Unterschied im Laufverhalten von Myc-Ste50 detektierbar (Abb. 3.26, Spur 6 und Spur 7). Auch in diesem Fall kann Ste50 nicht mehr phosphoryliert werden. Eine Zweifachmutante von Ste11 mit einem zusätzlichen Aminosäureaustausch von P279S, der zu einer konstitutiv aktiven Mutanten von Ste11 führt, hat ebenfalls keine Wiederherstellung der Phosphorylierung von Myc-Ste50 zur Folge (Abb. 3.26, Spur 8 und Spur 9). Dieses Ergebnis deutet an, dass für die pheromonabhängige Phosphorylierung von Myc-Ste50 die Kinasefunktion von Ste11 benötigt wird und somit Ste11 direkt für die Phosphorylierung von Myc-Ste50 verantwortlich ist. Weiterhin zeigt sich, dass die Expression von Wildtyp Ste11 in einem  $\Delta ste11$ -Hefestamm zur Wiederherstellung des Wildtypphänotyps führt (Abb. 3.26, Spur 10 und Spur 11). Myc-Ste50 wird nach Einleitung des Pheromonweges in diesem Stammhintergrund wieder phosphoryliert. Interessanterweise führt die Expression der Mutante Ste11-P279R, die den Pheromonweg konstitutiv einleitet, schon ohne Pheromonzugabe zu einer leichten Phosphorylierung von Myc-Ste50 (Abb. 3.26, Spur 12 und Spur 13). Diese Phosphorylierung ist mit der nach Pheromonzugabe vergleichbar.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass die Phosphorylierung von Myc-Ste50 nach Pheromonzugabe von der Kinaseaktivität der MAPKKK Ste11 abhängig ist. Kinase-Mutanten von Ste11, die nicht mehr in der Lage sind andere Proteine zu phosphorylieren, zeigen auch keine Myc-Ste50-Phosphorylierung. Hingegen zeigen Mutanten von Ste11, die den Pheromonweg konstitutiv aktivieren, phosphoryliertes Myc-Ste50 unabhängig von der Einleitung des Pheromonweges. Diese Daten weisen darauf hin, dass Ste50 nicht nur die Aktivität des assoziierten Proteins Ste11 reguliert, sondern selbst mittels Phosphorylierung von diesem Protein reguliert wird.

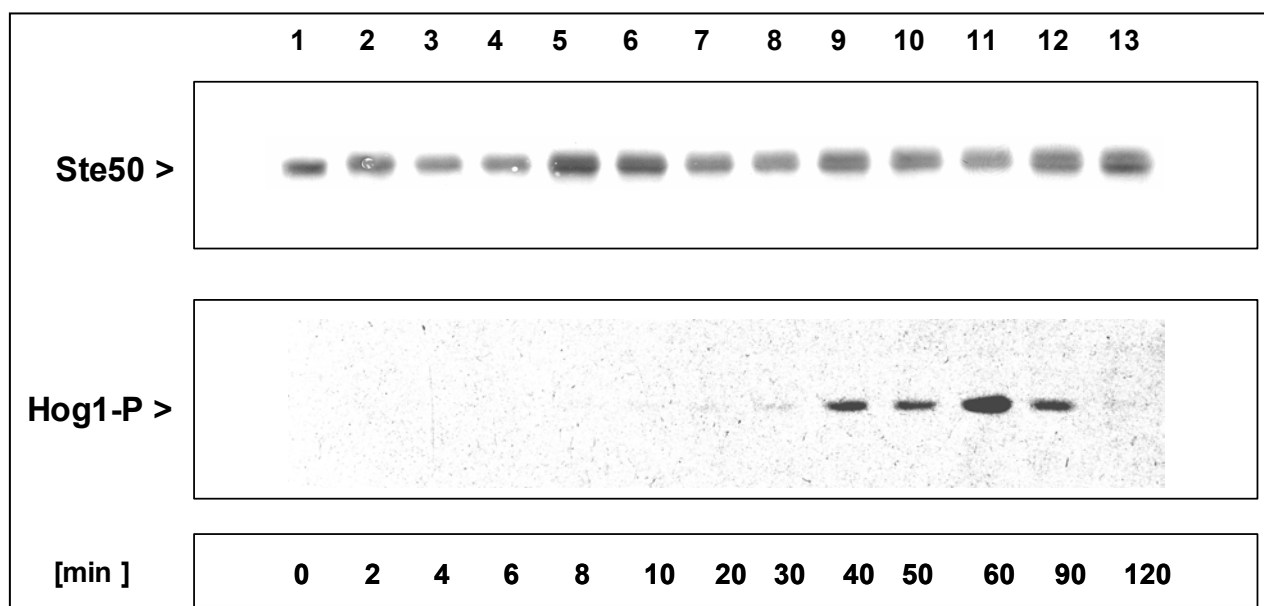
#### **3.4.2.4 Auswirkungen der Modifizierung von Ste50 auf die Stabilität**

Die Funktion vieler in der Signaltransduktion involvierter Komponenten wird durch Phosphorylierung reguliert. Für Ste50 konnte ebenfalls gezeigt werden, dass es nach Einleitung des Pheromonweges phosphoryliert wird. Welche Rolle dieser Phosphorylierung zukommt, ist bis jetzt noch unklar. Phosphorylierung von Proteinen ist vielfach eine Voraussetzung für eine nachfolgende Ubiquitinierung und schließlich für den Abbau des Proteins. Die bisherigen Ergebnisse deuteten an, dass Myc-Ste50 nach Einleitung des Pheromonwegs und des hochosmolaren Antwortwegs

unterschiedlich modifiziert wird. Um zu überprüfen, ob die unterschiedliche Modifizierung einen Einfluss auf die Stabilität von Myc-Ste50 hat, sollte die Stabilität des modifizierten Myc-Ste50 nach Pheromonzugabe bzw. nach Salzzugabe miteinander verglichen werden. Weiterhin soll getestet werden, ob Ste50 nach Pheromonzugabe ubiquitiniert wird.

#### 3.4.2.4.1 Stabilitätstest von Ste50 im hochosmolaren Antwortweg

Zunächst soll die Stabilität von Myc-Ste50 nach Einleitung des hochosmolaren Antwortwegs untersucht werden. Hierfür wurde der Hefestamm HCH35 (W303-1A  $\Delta ste50$  Myc-STE50::*URA3*) logarithmisch angezogen. Die Einleitung des hochosmolaren Antwortwegs erfolgte durch Zugabe von 0,7 M NaCl und einer Inkubation der Kultur bei Raumtemperatur (25°C). Die Proben wurden zu den angegebenen Zeiten geerntet, Proteinextrakte hergestellt und einer Western blot- Analyse unterzogen. Myc-Ste50 wurde mittels eines anti-Myc-Antikörpers detektiert. Zur Kontrolle der Einleitung des Wegs wurde die Membran mit einem Antikörper gegen die Phosphorylierungsstellen Thr180 und Tyr182 von Hog1 entwickelt (Abb. 3.27).



**Abbildung 3.27 Stabilität von Myc-Ste50 nach Salzinduktion**

Es wurden Zellen logarithmisch wachsender Hefekulturen des Stammes HCH35 (Myc-STE50::*URA3*) geerntet. Zur Induktion des hochosmolaren Antwortweges wurden die Zellen mit 0,7 M NaCl induziert. Die Zellen wurden zu den angegebenen Zeiten geerntet. Zellextrakte wurden hergestellt, über ein SDS-PAGE aufgetrennt und einer Westernblotanalyse unterzogen. Myc-Ste50 wurde mit dem anti-Myc-Antikörper detektiert. Hog1-P wurde mit einem p38-Thr180Tyr182-Antikörper detektiert.

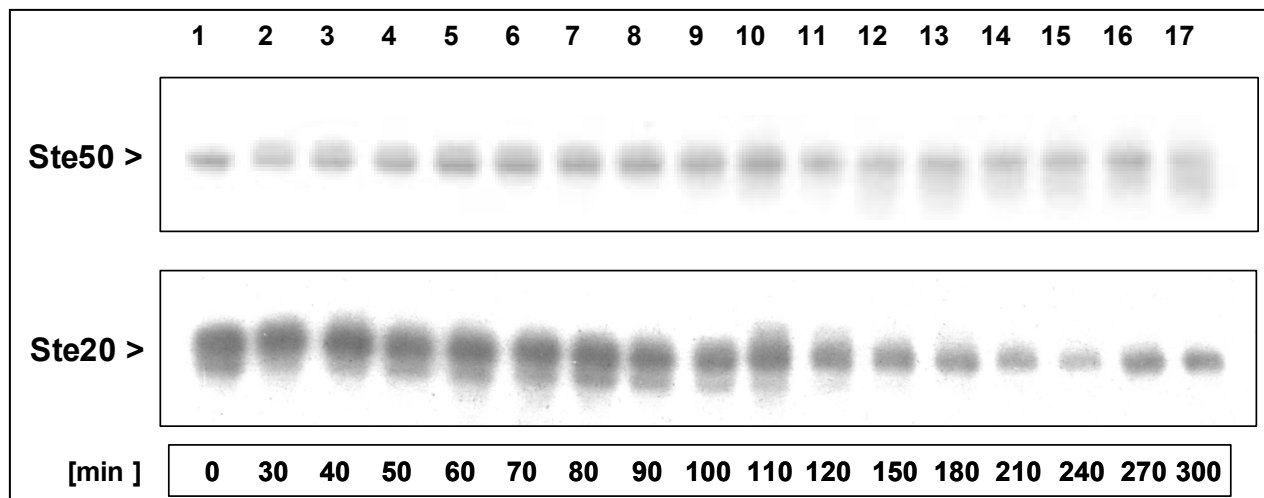
Die Detektion mit dem anti-Myc-Antikörper zeigt, dass Ste50 nach ungefähr 8 min modifiziert wird (Abb. 3.27). Die modifizierte Bande zeigt ein weniger retardiertes Laufverhalten verglichen mit der Phosphorylierung von Myc-Ste50 nach Einleitung des Pheromonwegs (siehe auch Abb. 3.22). Die modifizierte Bande sowie unphosphoryliertes Myc-Ste50 bleiben über einen Zeitraum von zwei Stunden stabil. Als Referenz für die Einleitung des hochosmolaren Antwortwegs wurde die Membran

mit dem Antikörper Thr180/Tyr182 gegen die Phosphorylierungsstellen von Hog1 entwickelt. Nach ungefähr 8 min zeigt sich, dass der Signalweg eingeleitet wird, da Hog1 phosphoryliert wird. Dies ist auch der Zeitpunkt, an dem Myc-Ste50 modifiziert vorliegt. Die Phosphorylierung von Hog1 verstärkt sich bis zu 60 min, nimmt danach ab, bis sie nach 120 min nicht mehr vorliegt. Myc-Ste50 liegt hingegen nach 120 min noch modifiziert vor.

Somit zeigt sich, dass Myc-Ste50 im hochosmolaren Signalweg unter steady state Bedingungen stabil ist. Auch nach der Osmoadaptation bzw. Dephosphorylierung von Hog1 sind verschiedene Isoformen von Myc-Ste50 noch detektierbar.

#### 3.4.2.4.2 Stabilitätstest von Ste50 im Pheromonantwortweg

Um zu überprüfen, wie stabil die pheromonabhängige Phosphorylierung nach Einleitung des Pheromonwegs und während des Desensibilisierungsprozesses nach anhaltender Einwirkung von Pheromon ist, wurden Hefezellen des Stammes HCH35 (W303-1A *ste50* Myc-*STE50::URA3*) für fünf Stunden mit  $\alpha$ -Faktor inkubiert. Die Proben wurden zu den angegebenen Zeiten geerntet, Proteinextrakte hergestellt und einer Westernblot-Analyse unterzogen. Myc-Ste50 wurde mit einem anti-Myc-Antikörper detektiert. Als weiteres Protein wurde endogenes Ste20 detektiert (Abb. 3.28).



**Abbildung 3.28 Stabilität von Myc-Ste50 nach Pheromoninduktion**

Es wurden Zellen logarithmisch wachsender Hefekulturen des Stammes HCH35 (Myc-*STE50::URA3*) geerntet. Zur Induktion des Pheromonweges wurden die Zellen mit 5  $\mu$ M  $\alpha$ -Faktor induziert. Die Zellen wurden zu den angegebenen Zeiten geerntet. Zellextrakte wurden hergestellt, über ein SDS-PAGE aufgetrennt und einer Westernblotanalyse unterzogen. Myc-Ste50 wurde mit dem anti-Myc-Antikörper und Ste20 mit einem spezifischen, gegen dieses Protein gerichteten Antikörper detektiert.

Es ist bekannt, dass Ste20 zellzyklusabhängig modifiziert wird (Wu *et al.*, 1998). Während der Pheromonantwort ist Ste20 als schneller wandernde Bande detektierbar, wohingegen Ste20 nach Einleitung des Zellzyklus phosphoryliert wird und ein retardiertes Laufverhalten zeigt (Wu *et al.*, 1998). Die Entwicklung mit dem Antikörper gegen Ste20 dient somit als Nachweis dafür, zu welchem

Zeitpunkt die Zellen nach Einleitung der Pheromonantwort wieder in den Zellzyklus eintreten. Hierbei zeigt sich, dass nach Einleitung der Pheromonantwort Ste20 als schnell wandernde Bande detektierbar ist. Nach ungefähr 120 min erkennt man, dass die untere, schnell wandernde Bande abnimmt. Stattdessen ist phosphoryliertes, verzögert laufendes Ste20-Protein detektierbar (Abb. 3.28, untere Reihe). Dies ist somit der Zeitpunkt, an dem die Zellen wieder in den Zellzyklus eintreten.

Des Weiteren wurde Myc-Ste50 mit einem anti-Myc-Antikörper detektiert. Zu dem Zeitpunkt 0 läuft Myc-Ste50 als schnell wandernde, kompakte Bande (Abb. 3.28, Spur 1). Nach Inkubation mit Pheromon erkennt man schon nach 30 min, dass Myc-Ste50 zusätzlich phosphoryliert wird. Die phosphorylierte Bande ist relativ stabil bis zu dem Zeitpunkt von 120 min. Dies ist auch der Zeitpunkt, an dem die Zellen wieder in den Zellzyklus eintreten. Nach 120 min ist nur noch unphosphoryliertes Myc-Ste50 detektierbar. Man erkennt weiterhin Degradationsprodukte von Myc-Ste50 unterhalb der unphosphorylierten Bande (Abb. 3.28, Spur 2-7).

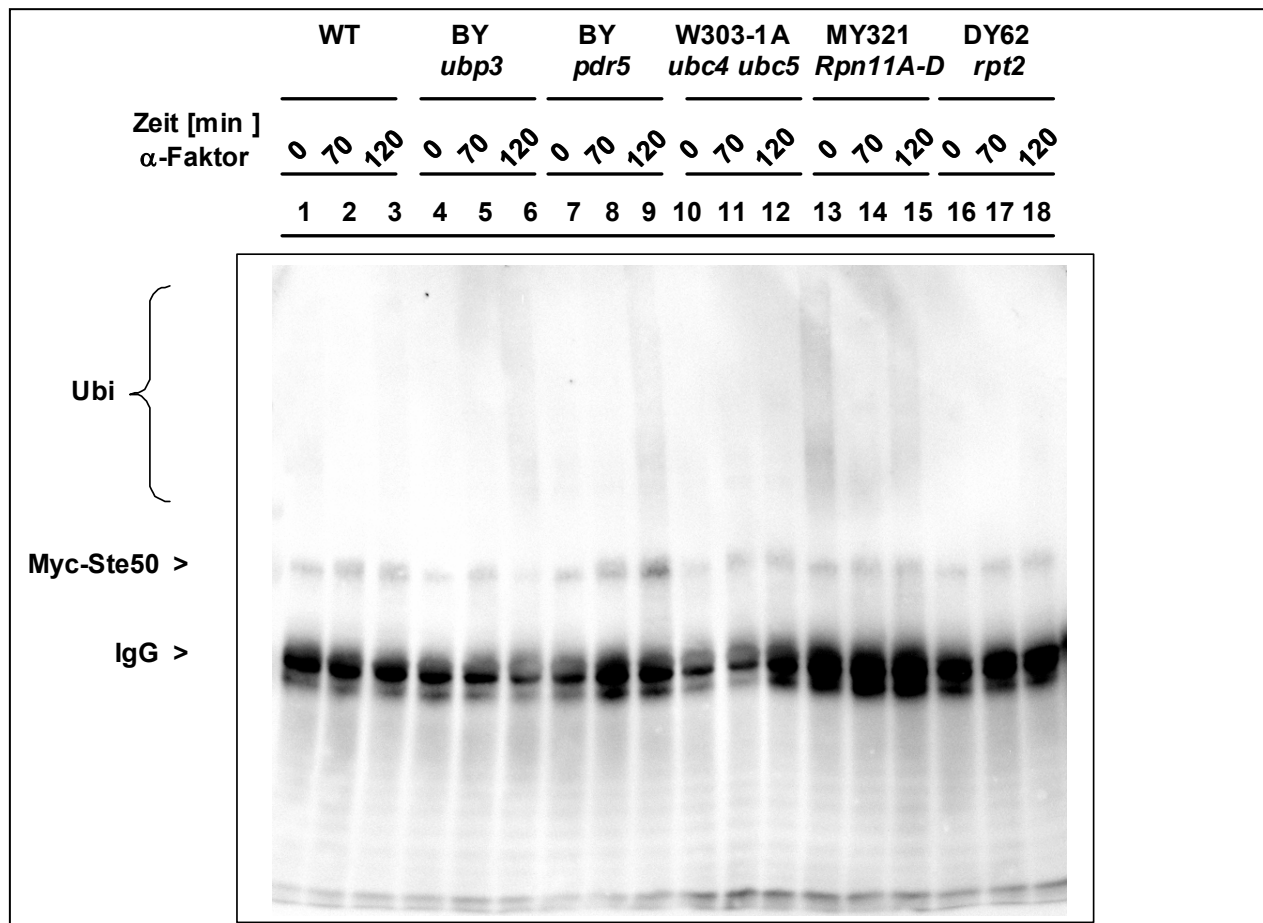
Zusammenfassend lässt sich aussagen, dass phosphoryliertes Myc-Ste50 während der Pheromonantwort stabil ist. Nach Eintritt in den Zellzyklus scheint es abgebaut zu werden. Die Stabilität des Protein Myc-Ste50 unterscheidet sich also nach Einleitung des hochosmolaren Wegs bzw. des Pheromonantwortwegs.

#### **3.4.2.4.3 Ubiquitinierungstest von Ste50**

Eine Vielzahl von Proteinen, die in der Signaltransduktion involviert sind, wird über Phosphorylierung reguliert. Phosphorylierung ist häufig eine Voraussetzung für eine anschließende Ubiquitinierung und schließlich der Degradation des Proteins. Der Abbau des Proteins kann nach erfolgter Ubiquitinierung über das Proteasom erfolgen. In vorangegangenen Experimenten konnte beobachtet werden, dass Myc-Ste50 nach Pheromonbehandlung phosphoryliert wird und nach Eintritt in den Zellzyklus abgebaut wird. Um zu testen, ob phosphoryliertes Ste50 über das Ubiquitinierungs-Proteasom-System degradiert wird, wurden Immunopräzipitationsexperimente in verschiedenen Stammhintergründen durchgeführt. Es wurden der Wildtypstamm, Deletionsstämme des ubiquitin- konjugierenden Enzyms E2 *UBP3*, weiterer Mitglieder der E2-Familie *UBC4* und *UBC5*, des Multidrug-Transporters *PDR5* sowie die Mutanten  $\Delta$ *rpn11D122A* bzw.  $\Delta$ *rpt2RF*, die Defekte im Proteasoms aufweisen, verwendet. Falls Myc-Ste50 über den Ubiquitinierungs- bzw. Proteasom- Apparat abgebaut wird, sollte es in diesen Mutanten eine Ubiquitinierung aufweisen. Die Kulturen wurden zu den angegebenen Zeiten mit Pheromon inkubiert, Zellextrakte wurden hergestellt und mit Hilfe des Myc-Antikörpers und ProteinA- Sepharose wurde Myc-Ste50 aufgereinigt. Nach der Immunopräzipitation wurde Ubiquitin mit einem spezifisch gegen dieses Protein gerichteten Antikörper nachgewiesen. Myc-Ste50 wurde mit dem anti-Myc-Antikörper detektiert (Abb. 3.29).

Im Wildtypstamm BY4741 liegt Myc-Ste50 nach Pheromonbehandlung phosphoryliert vor (Abb. 3.29, Spur 1-3). Die Detektion mit dem anti-Ubiquitin-Antikörper zeigt, dass eine Ubiquitinierung von Myc-Ste50 in diesem Stammhintergrund nicht leicht detektierbar ist, bzw. dass die Ubiquitinierung

nicht stabil ist (Abb. 3.29, Spur 1-3). Der Deletionstamm von *UBP3* zeigt hingegen ein deutlicheres Ubiquitinierungsmuster nach 120 min Induktion (Abb. 3.29, Spur 4-6). In diesem Stammhintergrund kann ubiquitiniertes Myc-Ste50 stabilisiert werden und ist daher leichter zu detektieren, da Ubiquitin zwar angelagert wird, aber nicht mehr abgespalten werden kann. Ubiquitiniertes Myc-Ste50 ist ebenso in einem Deletionsstamm des Multidrugtransporters *PDR5* nach 120 min zu detektieren (Abb. 3.29, Spur 7-9). Die deutlichste Ubiquitinierung von Myc-Ste50 ist in einer Mutante des Proteasoms  $\Delta rpn11D122A$  zu detektieren (Abb. 3.29, Spur 13-15). Ubiquitinierte Proteine können in dieser Mutante nicht mehr über das Proteasom abgebaut werden. Die Deletionsstämme von *UBC4* und *UBC5*, bzw. von *RPT2RF* zeigen hingegen kein ubiquitiniertes Myc-Ste50 (Abb. 3.29, Spur 10-12, Spur 16-18).



**Abbildung 3.29 Ubiquitinierungstest von Myc-Ste50**

Verschiedene Hefestämme wurden mit dem angegebenen Plasmid transformiert. Zellen logarithmisch wachsender Hefekulturen wurden mit 5  $\mu$ M  $\alpha$ -Faktor induziert und zu den angegebenen Zeiten geerntet. Zellextrakte wurden hergestellt, mit ProteinA-Sepharose und dem anti-Myc-Antikörper immunopräzipitiert, solubilisiert und auf einem SDS-Gel aufgetrennt. Myc-Ste50 wurde mit einem anti-Myc-Antikörper und aufgereinigtes Ubiquitin mit einem anti-Ubiquitin-Antikörper detektiert.

Stämme: BY4741 (Wildtyp, HLS610), BY  $\Delta ubp3$  (HLS750), BY  $\Delta pdr5$  (HLS872), W303-1A  $\Delta ubc4 \Delta ubc5$  (HLS864), MY321  $\Delta rpn11D122A$  (HLS902) und DY62  $\Delta rpt2RF$  (HLS903), Plasmid: pRS416-50p-Myc-STE50 (EFB268).

Zusammenfassend liefern diese Ergebnisse den ersten Hinweis, dass möglicherweise phosphoryliertes Myc-Ste50 ubiquitiniert wird und wahrscheinlich über das Proteasom abgebaut wird.



## 4 Diskussion

### 4.1 Wechselwirkungen von Ste50 in Abhängigkeit von verschiedenen Reizen

Das Protein Ste50 stellt eine essentielle Komponente der Signalwege zur Induktion der Paarung, des invasiven Wachstums, sowie der Osmotoleranz dar. Diese Signalwege teilen sich eine Vielzahl von Komponenten, was auf ein Netzwerk von Verbindungen zwischen den Signalwegen hindeutet. Das hier untersuchte Hilfsprotein Ste50 könnte aufgrund seiner Struktur zur Verknüpfung von Rezeptor-assoziierten G-Protein-Effektoren mit mitogen-aktivierten Protein-Kinase (MAPK)-Modulen beitragen. Ste50 besitzt eine tripartite Struktur, bestehend aus einer aminoterminalen SAM- (steril alpha motif) Domäne, einer zentralen S/T-reichen Region und einer carboxyterminalen Ras-assoziierten Domäne (RAD). Die N-terminale SAM- Domäne vermittelt stabil die Interaktion zu der MAPKKK Ste11 und reguliert hierdurch deren Funktion. Die Struktur und Funktion der SAM-Domänen von Ste50 sowie Ste11 konnten in den letzten Jahren weitreichend aufgeklärt werden (Grimshaw *et al.*, 2004, Kwan *et al.*, 2004; Bhattacharjya *et al.*, 2004; Jansen *et al.*, 2001). Mittels Twohybrid-Analysen sowie biochemischer Analysen konnte nachgewiesen werden, dass die SAM-Domäne die Interaktion zwischen Ste50 und Ste11 vermittelt (Jansen *et al.*, 2001). Mutationsanalysen der SAM-Domäne von Ste50 zeigten weiterhin, dass die Interaktion zwischen Ste50 und Ste11 für die genaue Signalweiterleitung der Antwort auf Paarungspheromone, Stickstoffmangelbedingungen und hypertonen Stress benötigt wird (Jansen *et al.*, 2001).

Die carboxyterminale Region von Ste50, welche die RA-Domäne beinhaltet, ist ebenfalls essentiell für die Signalweiterleitung im Pheromonweg, im hochosmolaren Antwortweg sowie im invasiven Wachstumsweg (Ramezani Rad *et al.*, 1992; Xu *et al.*, 1996; Wu *et al.*, 1999). Die RA-Domäne wurde durch eine Analyse auf Computerbasis von Ponting und Benjamin (1996) identifiziert. Sie ist vermutlich an der Vermittlung von Interaktionen mit kleinen G-Proteinen beteiligt. Da die Wechselwirkungen, die mit Hilfe der SAM-Domäne von Ste50 übertragen werden, weitreichend bekannt sind, war es von Interesse, die Wechselwirkungen, die über die RA-Domäne von Ste50 vermittelt werden, näher zu untersuchen. Die kleinen G-Proteine Ras1 und Ras2, welche in den Ras/cAMP-Signalweg involviert sind, könnten Interaktionspartner von Ste50 darstellen. Es stellte sich nun die Frage, welche Verbindungen es zwischen dem Ras/cAMP-Signalweg und den MAPK-vermittelten Signalwegen in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* gibt. Das Protein Ste50 könnte durch seine Bindemöglichkeiten an die MAPKKK Ste11 der MAPK-Module und an kleine G-Proteine an der Vermittlung dieser Wechselwirkungen beteiligt sein. Des Weiteren sollten Interaktionsstudien aufzeigen, ob Ste50 mit den Proteinen Ras1 und Ras2 in Abhängigkeit von verschiedenen Reizen wechselwirkt.

#### 4.1.1 cAMP-Spiegel und Signalintegration

Bisher waren Wechselwirkungen des Ras/cAMP-Signalweges mit den MAPK-vermittelten Signalwegen zur Induktion des invasiven Wachstums und der Osmotoleranz bekannt. Ob es Verbindungen zwischen dem Ras/cAMP-Signalweg und dem Pheromonweg gibt, war bisher noch nicht bekannt. Die Wechselwirkungen des Ras/cAMP-Signalweges mit den verschiedenen MAPK-Modulen können nun auf verschiedenen Ebenen der MAPK-Module erfolgen. Eine Arbeitsgruppe konnte beispielsweise zeigen, dass der Ras/cAMP-Signalweg und der MAPK-Weg zur Induktion von invasiven Wachstum auf einer Ebene unterhalb der PAK-ähnlichen Proteinkinase Ste20 zusammenschaltet sind (Mösch *et al.*, 1999). Die Wechselwirkungen des Ras/cAMP-Signalweges mit dem hochosmolaren Antwortweg erfolgen auf der Ebene der Transkriptionsfaktoren des hochosmolaren Antwortweges, Msn2 bzw. Msn4 (Görner *et al.*, 1998). Diese Transkriptionsfaktoren stellen Zielgene der im Ras/cAMP-involvierten Proteinkinase A dar und werden negativ von ihr reguliert (Görner *et al.*, 1998).

Ob weitere Wechselwirkungen zwischen dem Ras/cAMP-Signalweg und den MAPK-vermittelten Signalwegen bestehen, die durch eine Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels vermittelt werden, wurde in diesem Teil der Arbeit untersucht. Der cAMP-Spiegel in der Zelle wurde zum einen durch Zugabe von externen cAMP und zum anderen durch Deletion der niederaffinen Phosphodiesterase *PDE1* bzw. der hochaffinen Phosphodiesterase *PDE2* erhöht. Es konnte hierbei gezeigt werden, dass eine Erhöhung des cAMP-Spiegels in Abhängigkeit von Ste50 die Signalisierung von Pheromon, Stickstoffmangelbedingungen sowie Osmostress unterschiedlich beeinflusst. Ein positiver Einfluss auf die Signalweiterleitung des Pheromonwegs sowie des invasiven Wachstumsweges konnte aufgezeigt werden. Hingegen waren negative Auswirkungen des Ras/cAMP-Signalwegs auf den hochosmolaren Antwortweg zu beobachten.

Eine Erhöhung des cAMP-Spiegels hatte eine erhöhte transkriptionelle Induktion der Reportergene des invasiven Wachstumsweges *FG-TyA-lacZ* sowie des Reportergens *Fus1-lacZ* des Pheromonantwortweges zur Folge. Diese Einflüsse fanden in Abhängigkeit von Ste50 statt. Daher ist zu vermuten, dass die Einflussnahme des cAMP-Spiegels auf diese Wege u.a. auf der Ebene von Ste50 bzw. unterhalb von Ste50 erfolgt. Dies deutet darauf hin, dass Ste50 möglicherweise mit Komponenten des Ras/cAMP-Signalwegs interagiert.

Der cAMP-Spiegel kann entweder direkt auf die MAPK-vermittelten Signalwege Einfluss nehmen oder mittels des cAMP-Signalweges, indem er die Proteinkinase A aktiviert. Untersuchungen zur Auswirkung einer Erhöhung des cAMP-Spiegels auf den Pheromonweg deuteten an, dass der cAMP-Spiegel in der Zelle diesen Signalweg zumindest partiell direkt beeinflusst. Beispielsweise zeigten Untersuchungen zur Paarungseffizienz der Zellen, dass eine Deletion der Phosphodiesterase *PDE2* einen größeren Einfluss auf die Paarungseffizienz ausübte, verglichen mit einem  $\Delta pde1$ -Stamm. Da eine *PDE2*-Deletion sich auf den basalen cAMP-Spiegel auswirkt, wohingegen eine *PDE1*-Deletion

Einfluss auf die cAMP-Signalweiterleitung nimmt (Ma *et al.*, 1999), sprechen diese Ergebnisse für einen direkten Einfluss des cAMP-Spiegels auf den Pheromonweg.

Während sich eine Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels positiv auf die Signalweiterleitung des invasiven Wachstumsweges sowie des Pheromonantwortweges auswirkte, waren negative Einflüsse auf den hochosmolaren Antwortweg zu beobachten. Eine Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels hatte eine leicht erniedrigte transkriptionelle Induktion des Reportergens *STRE-lacZ* nach einem kurzen Salzschock der Zellen zur Folge. Dies kann dadurch zu erklären sein, dass die Transkriptionsfaktoren des hochosmolaren MAPK-Antwortweges, Msn2 und Msn4, welche die Transkription von Genen regulieren, die *STRE*-Sequenzen in ihrer Promotorregion enthalten, Zielgene der Proteinkinase A (PKA) sind. Eine Aktivierung der PKA führt zu einer Inaktivierung von Msn2 und Msn4. Die Transkriptionsfaktoren werden nicht mehr in den Nukleus transportiert, wo sie normalerweise an *STRE*-Elemente in den Promotorregionen verschiedener Zielgene binden und die Transkription dieser Gene induzieren (Görner *et al.*, 1998). Diese Ergebnisse deuteten auf einen leicht negativen Einfluss des Ras/cAMP-Signalweges auf die transkriptionelle Induktion unter niedrigen Salzstressbedingungen hin. Ein deutlicherer Einfluss einer Erhöhung des cAMP-Spiegels war während des langfristigen Wachstums von Zellen unter hohen Salzbedingungen zu beobachten. Verwendete man Galaktose als Kohlenstoffquelle, verstärkte sich dieser Effekt. Der Galaktoseeffekt könnte durch die Verwendung einer schlechteren Kohlenstoffquelle kombiniert mit erhöhtem osmotischem Stress zu erklären sein. Die Wachstumsanalysen unter Osmostressbedingungen deuteten weiterhin an, dass der erhöhte cAMP-Spiegel in der Zelle nicht nur zur Inhibierung der Transkriptionsfaktoren Msn2 und Msn4 durch die Proteinkinase A führt, sondern ebenfalls direkt den Signalweg beeinflusst. Dies wurde durch den Vergleich des Wachstumsverhaltens eines  $\Delta pde2$ -Stammes mit dem eines  $\Delta pde1$ -Stammes auf hochosmolarem Medium deutlich. Hierbei zeigte sich, dass ein  $\Delta pde1$ -Stamm keinen Wachstumsdefekt aufwies, wohingegen ein  $\Delta pde2$ -Stamm Wachstumsdefekte zeigte. Da eine *PDE2*-Deletion sich auf den basalen cAMP-Spiegel auswirkt, wohingegen eine *PDE1*-Deletion Einfluss auf die cAMP-Signalweiterleitung nimmt (Ma *et al.*, 1999), sprechen diese Ergebnisse für einen zusätzlichen direkten Einfluss des cAMP-Spiegels auf den hochosmolaren Antwortweg. Andere Arbeitsgruppen konnten ebenfalls zeigen, dass ein  $\Delta pde2$ -Hefestamm größere Auswirkungen auf die Stresstoleranz von Zellen hat, verglichen mit einem  $\Delta pde1$ -Hefestamm (Park *et al.*, 2005). Sie konnten nachweisen, dass ein  $\Delta pde2$ -Stamm sensitiv gegenüber oxidativen Stress sowie Osmostress war. Eine Deletion der Phosphodiesterase *PDE1* hatte hingegen keinen Einfluss auf die zelluläre Stressresistenz (Park *et al.*, 2005). Diese Arbeitsgruppe beobachtete weiterhin, dass eine Deletion von *PDE2* zu einer drastischen Erhöhung des basalen cAMP-Spiegels in stationären Zellen führt (Park *et al.*, 2005). Die stärkere Auswirkung einer *PDE2*-Deletion auf das langfristige Wachstum von Zellen auf Medium mit hohen Salzkonzentration (stationäre Bedingungen), verglichen mit der *STRE-lacZ*-Expression von Zellen nach kurzem Salzschock (exponentielle Bedingungen) könnte hierdurch zu erklären sein.

In diesem Teil der Arbeit konnte weiterhin gezeigt werden, dass sich der Wachstumsdefekt eines *Δpde2*-Stammes durch eine zusätzliche Deletion von *STE50* deutlich verstärken ließ. Untersuchungen zur Aktivierung des hochosmolaren Signalwegs mit Hilfe der Hog1-Phosphorylierung deuteten an, dass der Signalweg zur Induktion von Osmosensitivität in einem *Δpde2 Δste50*-Hefestamm noch stimuliert wird. Der Wachstumsdefekt dieses Stammes war somit nicht auf eine schwache Einleitung des HOG-Signalwegs zurückzuführen. Eine Verstärkung des Wachstumsdefektes eines *Δpde2*-Stammes auf Medien mit hohen Salzkonzentrationen durch eine zusätzliche Deletion von *STE50* deutete darauf hin, dass Ste50 bei der Regulation des hochosmolaren Wegs durch den cAMP-Spiegel eine Rolle einnehmen könnte und dies möglicherweise über eine Interaktion mit Komponenten des Ras/cAMP-Signalwegs vermitteln könnte. Eine weitere Erklärung könnte sein, dass möglicherweise Ste50 und Pde2 synergistisch über Parallelwege diesen Wachstumsdefekt hervorrufen.

Anhand der Untersuchungen der Auswirkungen einer Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels auf die Induktion verschiedener MAPK-vermittelter Signalwege lässt sich aussagen, dass der cAMP-Spiegel in der Zelle die Signalweiterleitung der Wege unterschiedlich beeinflusst. Ein erhöhter cAMP-Spiegel in der Zelle übt in Abhängigkeit von Ste50 einen positiven Einfluss auf die Signalweiterleitung des Pheromonwegs sowie des invasiven Wachstumsweges aus. Hingegen sind negative Auswirkungen des erhöhten cAMP-Spiegels auf den hochosmolaren Antwortweg zu beobachten. Ein erhöhter cAMP-Spiegel in der Zelle hat somit unterschiedliche Einflüsse auf die Signalweiterleitung der MAPK-Wege zur Induktion des invasiven Wachstums, der Paarung sowie der Osmotoleranz. Der cAMP-Spiegel in der Zelle könnte somit als Indikator der Balance der Aktivierung der verschiedenen MAPK-Module dienen und zur Signalintegration der Wege beitragen.

#### **4.1.2 Ste50 interagiert mittels der RA- Domäne mit den Proteinen Ras1 und Ras2**

Die beobachteten Wechselwirkungen des Ras/cAMP-Signalwegs und der verschiedenen MAPK-Signalwege erfolgten auch auf der Ebene von Ste50 und deuteten auf eine mögliche Interaktion von Ste50 mit Komponenten des Ras/cAMP-Weges, wie den Proteinen Ras1 und Ras2, hin. Betrachtet man die Struktur von Ste50, so stellt man fest, dass Ste50 eine carboxyterminale Interaktionsdomäne, die RA-Domäne, enthält, welche die Interaktion mit kleinen G-Proteinen vermitteln könnte (Ponting & Benjamin, 1996). Der carboxyterminale Bereich von Ste50, welcher die RA-Domäne beinhaltet, ist essentiell für die Signalweiterleitung im Pheromonweg, im hochosmolaren Antwortweg sowie im invasiven Wachstumsweg (Ramezani Rad *et al.*, 1992; Xu *et al.*, 1996; Wu *et al.*, 1999). Beispielsweise können Mutanten von *STE50* mit einer carboxyterminalen Deletion *ste50-2* ( $\Delta 242-346AS$ ) nur mit einer Effizienz von 0,1%-0,2% mit einer Wildtypzelle paaren und weisen eine stark erniedrigte Sensitivität gegenüber Pheromon auf (Ramezani Rad *et al.*, 1992; Xu *et al.*, 1996). Eine andere Arbeitsgruppe konnte ebenfalls zeigen, dass der C-Terminus von Ste50 für die Aktivität von Ste50 essentiell ist, da eine Deletion von nur 24 Aminosäuren zu einem Funktionsverlust von Ste50 im Pheromonweg sowie im hochosmolaren Antwortweg führte (Wu *et al.*, 1999). Wie die RA-Domäne

von Ste50 die Funktionen vermittelt, war bisher noch nicht genau bekannt. Es wurde vermutet, dass Ste50 über die RA-Domäne mit kleinen G-Proteinen interagiert. In der Tat konnte in dieser Arbeit mittels Twohybrid-Analysen gezeigt werden, dass Ste50 mit den kleinen G-Proteinen Ras1 und Ras2, sowie mit Cdc42 und Gic1, die für die Zellpolarisation benötigt werden, interagiert. Für den Ras/cAMP-Signalweg nehmen die Proteine Ras1 und Ras2 eine wichtige Rolle ein. Das aktivierte Ras-Protein (Ras-GTP-Protein) in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* wird hierbei an die Adenylatzyklase gebunden und kontrolliert den cAMP-Spiegel in der Zelle. Ras2 interagiert hierbei bevorzugt in seiner aktivierten Ras-GTP-Form mit der Adenylatzyklase Cyr1 (Kido *et al.*, 2002). Die Twohybridstudie deutete hingegen an, dass Ste50 verstärkt mit der GDP-gebundenen Form von Ras2 interagiert. Mit Ras2<sup>val19</sup> (Ras-GTP) war eine schwächere Interaktion detektierbar. Dies deutet darauf hin, dass die Interaktion zwischen den Ras-Proteinen und Ste50 bzw. der Adenylatzyklase Cyr1 unterschiedlich reguliert wird. Dies spiegelt sich auch im Strukturvergleich der RA-Domänen der Proteine Ste50 sowie Cyr1 wieder (Abb. 4.1A). In der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* sind nur diese beiden Proteine bekannt, welche eine RA-Domäne enthalten. Die postulierten RA-Domänen der Proteine Ste50 sowie Cyr1 wurden mittels eines Homologie-Alignments unter Verwendung des Programms ClustalW ([www.ch.embnet.org/software/ClustalW.html](http://www.ch.embnet.org/software/ClustalW.html)) miteinander verglichen (Abb. 4.1A). Die Sekundärstrukturen wurden mittels des Computerprogramms PHD ([http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=NPSA/npsa\\_phd.html](http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=NPSA/npsa_phd.html)) vorhergesagt und zu den Sequenzen hinzugefügt (Abb. 4.1A).

Die von Ponting und Benjamin (1996) vorhergesagten RA-Domänen verschiedener Organismen zeigten eine starke Divergenz in ihrer Sequenz. Vergleicht man die RA-Sequenzen der Proteine Ste50 sowie Cyr1, so kann man erkennen, dass zwischen ihnen ebenfalls nur geringe Sequenzhomologien bestehen (Abb. 4.2A). Auch die Sekundärstrukturen der Proteine sind unterschiedlich. Sie weisen eine andere Anordnung der  $\beta$ -Faltblätter sowie  $\alpha$ -Helices auf (Abb. 4.1 B). Dies deutet darauf hin, dass die Interaktionen zwischen der RA-Domäne von Ste50 bzw. Cyr1 und den Effektoren Ras sowie Ras2 auf eine unterschiedliche Art und Weise vermittelt werden können. Um genauere Aussagen über die Interaktionen der RA-Domänen von Cyr1 bzw. Ste50 treffen zu können, müsste man Informationen über ihre Tertiärstruktur haben.

Die Analyse von Mutanten in der RA-Domäne der Proteine Cyr1 sowie Ste50 könnte weiterhin Aufschluss über die Vermittlung der Interaktionen geben. Beispielsweise zeigten Mutanten der RA-Domäne von Cyr1 keine Interaktion mehr zu Ras-Proteinen (Kido *et al.*, 2002). Ein ähnliches Bild zeigte sich für Mutanten der RA-Domäne von Ste50. In einer Twohybrid-Analyse zeigten die RA-Mutanten Ste50-P318L, Ste50-R296G N301S sowie Ste50-L322S keine Interaktion mit den G-Proteinen Ras1 sowie Ras2. Die Mutationsstellen der Mutanten wurden ebenfalls in das Homologie-Alignment eingetragen (Abb. 4.1A). Ein Teil der Mutationen betrifft Austausch von polaren Aminosäuren gegen neutrale Aminosäuren (R296G). Für die Interaktionen von RA-Domänen verschiedener Proteine, wie z.B. RalGDS konnte gezeigt werden, dass polare Aminosäuren die



Protein Ste50 verantwortlich ist. Diese Interaktion erfolgte schwach im Vergleich zur stabilen Interaktion zwischen Ste50 und Ste11 und war nicht einfach zu detektieren. Sie ließ sich durch verschiedene Stimulatoren wie Pheromon, cAMP sowie Stickstoffmangelbedingungen leicht verändern. Beispielsweise war in pheromonbehandelten Zellen eine leicht geschwächte Interaktion zwischen Ras2 und Ste50 sowie eine verstärkte Interaktion zwischen Ras1 und Ste50-RAD zu detektieren. Die Interaktion von Ras1 mit Ste50-RAD in pheromonbehandelten Zellen ließ sich durch Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels, hervorgerufen durch eine Deletion von *PDE2*, noch verstärken. Dies bestätigt den im vorherigen Teil der Arbeit aufgezeigten positiven Einfluss einer Erhöhung des cAMP-Spiegel auf den Pheromonantwortweg, der vermutlich partiell auf eine Interaktion von Ste50 mit Ras1 zurückzuführen sein könnte.

Nach Einleitung des invasiven Antwortweges war eine verstärkte Interaktion zwischen Ste50 und Ras1 sowie Ras2 zu beobachten. Auch im ersten Teil dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass ein erhöhter cAMP-Spiegel in der Zelle in Abhängigkeit von Ste50 die Signalweiterleitung des invasiven Wachstumswegs positiv beeinflusst. Dieser Einfluss könnte somit teilweise über die Interaktion der Proteine Ras1 sowie Ras2 mit Ste50 erfolgen. Wenn Ste50 deletiert ist, kann eine Erhöhung der cAMP-Konzentration keinen Einfluss mehr auf die Signalübertragung ausüben.

Weiterhin war im ersten Teil der Arbeit durch Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels ein negativer Einfluss auf den hochosmolaren Antwortweg zu beobachten. Ein  $\Delta pde2 \Delta ste50$ -Hefestammes wies starke Wachstumsdefekte auf Medium mit hohen Salzkonzentrationen auf. Zieht man die Untersuchungen der Interaktionsanalyse zu Rate, könnte dieser Effekt wahrscheinlich dadurch zu erklären sein, dass das Protein Ste50 als Interaktionspartner der Ras-Proteine nicht mehr vorliegt. Die Ras-Proteine wären dadurch wahrscheinlich in der Lage, verstärkt mit der Adenylatzyklase Cyr1 zu interagieren, wobei die cAMP-Synthese stimuliert werden könnte (Abb. 4.1B). Somit würde der cAMP-Spiegel in der Zelle weiterhin erhöht, welches zu einem stärkeren Wachstumsdefekt der Zellen auf hochosmolaren Medium führen könnte.

Anhand der Ergebnisse lässt sich folgendes Modell der durch eine Erhöhung des cAMP-Spiegels ausgelösten Auswirkung auf Ste50-Wechselwirkungen postulieren (Abb. 4.1 B). Die Proteine Ras1 sowie Ras2 interagieren nicht nur mit der RA-Domäne von Ste50, sondern sind ebenfalls in der Lage, mit der RA-Domäne der Adenylatzyklase Cyr1 zu interagieren (Abb. 4.1B). Die letztere Interaktion führt zu einer Aktivierung der Adenylatzyklase, welches eine Erhöhung des cAMP-Spiegels in der Zelle zur Folge hat. Wenn nun der cAMP-Spiegel in der Zelle erhöht vorliegt, welches beispielsweise durch eine Deletion von *PDE2* hervorgerufen wird, ist möglicherweise eine Aktivierung von Cyr1 sowie eine Interaktion mit den Ras-Proteinen nicht mehr notwendig. Die Ras-Proteine könnten somit verstärkt der Interaktion mit Ste50-RAD zur Verfügung stehen. Diese Ergebnisse liefern den ersten Hinweis darauf, dass die beiden Proteine Ste50 und Cyr1, welche RA-Domänen enthalten, um die Interaktion mit den Ras-Proteinen Ras1 und Ras2 konkurrieren könnten und der cAMP-Spiegel Einfluss auf die Vermittlung dieser Interaktionen ausüben könnte (Abb. 4.1B).

Ein erhöhter cAMP-Spiegel in der Zelle kann nun auf unterschiedlicher Weise die Signalweiterleitung der MAPK-Wege zur Induktion des invasiven Wachstums, der Paarung sowie der Osmotoleranz beeinflussen. Dieser Einfluss erfolgt auf der Ebene von Ste50. Interaktionsstudien deuteten an, dass dieser Einfluss durch eine Interaktion der G-Proteine Ras1 und Ras2 mit der RA-Domäne von Ste50 vermittelt wird. Somit würde Ste50 eine transiente Brücke zwischen dem aktivierten G-Proteinkomplex an der Plasmamembran und dem MAP-Kinasekomplex darstellen und damit zur Verstärkung der Signalwege beitragen. Der cAMP-Spiegel in der Zelle könnte einen entscheidenden Beitrag für die Vermittlung der Interaktionen leisten und mit Hilfe von Ste50 zur Signalintegration beitragen.

## 4.2 Regulation von Ste50

Im ersten Teil der Arbeit konnten die Wechselwirkungen von Ste50 in Abhängigkeit von verschiedenen Reizen aufgezeigt werden. Es konnte gezeigt werden, dass über die RA-Domäne von Ste50 die Interaktion zu den Ras-Proteinen stattfindet. Dies weist auf eine mögliche Signalintegration durch den cAMP-Spiegel in der Zelle hin. Wie Ste50 selbst während der verschiedenen Signalwege reguliert wird, war hingegen noch nicht genau bekannt. Die Verteilung von Proteinen in der Zelle zu beobachten, ist eine Möglichkeit die Regulation von Proteinen zu untersuchen. Es stellte sich somit zunächst die Frage, in welchen Bereichen der Zelle Ste50 sowie Ste11 während der Signaltransduktion lokalisiert sind. Eine weitere Möglichkeit der Regulation von Proteinen könnten posttranslationale Modifikationen darstellen. Eine unterschiedliche Modifikation von Ste50 während der Signalwege könnte zur Signalidentität beitragen.

### 4.2.1 Verteilung von Ste50 während der Signaltransduktion

Im ersten Teilabschnitt der Arbeit wurde untersucht, welche Interaktionen die RA-Domäne von Ste50 vermittelt. Eine unterschiedliche subzelluläre Lokalisation könnte dazu beitragen, dass unterschiedliche Interaktionspartner dem jeweiligen Modul zur Verfügung stehen. Somit könnte gewährleistet werden, dass das Signal spezifisch weitergeleitet werden kann. Zunächst wurde die Lokalisation von GFP-Ste50 und GFP-Ste11 in der Zelle nach Einleitung der Signalwege der Paarung, des invasiven Wachstums und der Osmotoleranz untersucht. Posas *et al.* (1998) beobachteten, dass die Proteine Ste50 und Ste11, die miteinander interagieren, auch in ähnlichen Kompartimenten in der Zelle anzufinden sind. Unter Normalbedingungen wurden GFP-Ste50 sowie GFP-Ste11 unter Kontrolle des Eigenpromotors im Cytoplasma detektiert. Nach Einleitung des hochosmolaren Antwortweges konnten sie eine punktierte Färbung beobachten (Posas *et al.*, 1998). Diese Beobachtungen konnten in dieser Arbeit bestätigt werden. Unter Normalbedingungen waren GFP-Ste50 sowie GFP-Ste11 im Cytoplasma anzufinden. Nach Einleitung des hochosmolaren Antwortweges sowie auch des invasiven Wachstumsweges änderte sich die Verteilung von einer diffusen cytoplasmatischen Färbung hin zu punktierten, granulären Strukturen. Es könnte postuliert werden, dass es sich bei diesen granulären Strukturen um Strukturen handelt, die Ste50 zu



Interaktionspartnern an der Plasmamembran transportiert. Des Weiteren wurde die Verteilung von GFP-Ste50 sowie GFP-Ste11 nach Einleitung des Pheromonwegs untersucht. Drogen *et al.* (2000) konnten zeigen, dass das Gerüstprotein Ste5 Komponenten des Pheromonweges, wie Fus3 und Ste7, nach Einleitung des Pheromonwegs an die Plasmamembran hin zur sich ausbildenden Paarungsprojektion rekrutiert. Im Gegensatz dazu waren sie nicht in der Lage GFP-Ste11 an der Plasmamembran zu detektieren, obwohl dieses an Ste5 bindet. Sie beobachteten, dass aktiviertes Ste11 instabil ist und wahrscheinlich mittels eines Ubiquitin-abhängigen Mechanismus abgebaut wird (Drogen *et al.*, 2000; Esch & Errede, 2002). Ähnliches konnte im Rahmen dieser Arbeit beobachtet werden. Nach Einleitung des Pheromonwegs sind GFP-Ste11 sowie GFP-Ste50 interessanterweise diffus in einer Struktur in Richtung der sich ausbildenden Paarungsprojektion lokalisiert. Zellen mit kleineren Paarungsprojektionen weisen zunächst noch eine granuläre Lokalisation auf, wohingegen Zellen mit größeren Paarungsprojektionen eine diffuse Verteilung der Proteine zeigen. Dies könnte dadurch zu erklären sein, dass das Protein Ste50 an dem Adaptationsprozess gegenüber Pheromonbedingungen beteiligt ist. Eine *STE50*-Deletion führt zu einer reduzierten Paarungseffizienz sowie einer kurzfristigen Arretierung in der G1-Phase des Zellzyklus und einer schnellen Adaptation gegenüber Paarungspheromonen. (Ramezani Rad *et al.*, 1992; Xu *et al.*, 1996). Die diffuse Färbung nach Einleitung des Paarungsweges, die umso ausgeprägter ist, je weiter der Paarungsweg fortgeschritten ist, könnte, ähnlich wie für Ste11 postuliert, auf eine Degradation des Proteins Ste50 zurückzuführen sein (Esch & Errede, 2002). Dies könnte eine Möglichkeit darstellen, sich an die Pheromonbedingungen zu adaptieren und somit den Pheromonweg wieder abzuschalten.

Ste50 ist nun in ähnlichen Bereichen der Zelle anzufinden, wie das Protein Ste11, mit dem es stabil über die SAM- Domäne interagiert. Im ersten Teil der Arbeit konnte gezeigt werden, dass Ste50 ebenfalls mit den im Ras/cAMP-Signalwege involvierten Proteinen Ras1, Ras2 sowie mit den an der Etablierung der Zellpolarität beteiligten Proteinen Cdc42 sowie Gic1 interagiert. Es stellte sich nun die Frage, ob sich lokale Konzentrationen von Ste50 ändern, wenn man die Interaktionspartner Cdc42 oder Ras2 überexprimiert. Cdc42 ist ein Protein, das an Polarisierungsprozessen beteiligt ist. Es ist sowohl im Cytoplasma als auch an der Plasmamembran anzufinden. Cdc42 ist an Stellen polarisierten Wachstums, wie Knospen, Knospenansatzstellen und Paarungsprojektionen detektierbar (Ziman *et al.*, 1993). In Immunofluoreszenzexperimenten konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von Cdc42<sup>val12</sup> zu einer Veränderung der Lokalisation von Myc-Ste50 hin zu Knospenansatzstellen bzw. den Knospenring führt. Konzentrationen von Ste50 sind somit in denselben Bereichen der Zelle lokalisiert, an denen der Interaktionspartner Cdc42 ebenfalls akkumuliert. Diese Ergebnisse liefern weiterhin den Hinweis darauf, dass Ste50 eine Rolle bei der Etablierung der Zellpolarität einnehmen könnte. Diese Vermutung wird durch Studien einer anderen Arbeitsgruppe unterstützt, welche eine Interaktion von Ste50 mit dem Protein Cbk1 beobachteten (Geyer *et al.*, 1999). Bei Cbk1 handelt es sich um eine Kinase für die Zellwandbiosynthese, welche für die Produktion von

tochterzellspezifischen Genen, wie die Chitinase Cts1, mittels des Transkriptionsfaktors Ace2 erforderlich ist (Racki *et al.*, 2000; Colman-Lerner *et al.*, 2001).

Ras2 ist ein Protein, das an der Plasmamembran verankert ist (Dong *et al.*, 2003). Die Überexpression von Ras2<sup>val19</sup> führte dazu, dass GFP-Ste50 ebenfalls teilweise an der Plasmamembran anzufinden ist. Ste50 lässt sich somit durch Überexpression seiner Interaktionspartner Cdc42 bzw. Ras2 an Stellen lokalisieren, wo diese ebenfalls anzufinden sind.

Daraufhin wurde die Verteilung von Myc-Ste50 unter Kontrolle des Eigenpromotors untersucht. Mittels differentieller Zentrifugation sowie Dichtegradienten konnte gezeigt werden, dass Myc-Ste50 unter Normalbedingungen in cytoplasmatischen Fraktionen anzufinden ist. Dies entspricht auch den Beobachtungen der mikroskopischen Untersuchungen. Nach Induktion der Wege ist eine leichte Änderung der Verteilung mittels differentieller Zentrifugation erkennbar. Nach Induktion des invasiven Wachstumsweges findet man zusätzliche Anreicherungen von Myc-Ste50 in der Fraktion, in der Mikrosomen angereichert sind. Nach Induktion des Pheromonweges sind Anreicherungen von Myc-Ste50 in der Fraktion, in der die Plasmamembran, Mitochondrien bzw. der Zellkern akkumulieren, erkennbar. Weiterhin ist eine zusätzliche langsamer wandernde, modifizierte Form von Ste50 sichtbar. Es stellte sich nun die Frage, um welche Art von Modifizierung es sich handeln könnte.

#### **4.2.2 Pheromonabhängige Phosphorylierung von Ste50**

Bisher war wenig darüber bekannt, wie Ste50 selbst reguliert wird. Die Verteilungsstudien von Myc-Ste50 zeigten, dass nach Einleitung des Pheromonweges sowie des hochosmolaren Antwortweges langsamer wandernde, modifizierte Formen von Myc-Ste50 auftreten. Diese Modifikationen zeigten im SDS-Gel unterschiedliche Laufverhalten. Dies deutete darauf hin, dass Myc-Ste50 nach Einleitung der Signalwege der Paarung und der Osmotoleranz differentiell modifiziert wird. Posttranslationale Modifikationen stellen eine gute Möglichkeit dar, die Signaltransduktion zu regulieren.

#### **4.2.3 Ste50 wird nach Einleitung des Pheromonweges in Abhängigkeit der Ste11-Kinase phosphoryliert**

Bei Ste50 handelt es sich um ein Protein, das an multiplen Serin- und Threoninresten phosphoryliert werden kann (Wu *et al.*, 2003, Spode, 2004). Unter Kontrolle des *GAL*- Promotors wird GST-Ste50 schon im Grundzustand phosphoryliert (Wu *et al.*, 2003, Spode, 2004). Allerdings besteht bei der Verwendung von GST-Fusionsproteinen der Nachteil, dass diese in der Lage sind Dimere zu bilden. Wang und Elion (2003) konnten zeigen, dass eine GST-Fusion von Ste5 dazu führt, dass dieses Komplexe bildet und die Funktion verändert. Dimerbildung sowie Überexpression der Proteine könnten für die Phosphorylierung von Ste50 im Grundzustand verantwortlich sein. Um möglichst natürliche Bedingungen vorliegen zu haben, wurden daher für die folgenden Studien daher Myc-Ste50-Konstrukte verwendet, die unter der Kontrolle des eigenen Promotors standen. Nach Induktion des Pheromonweges sowie des hochosmolaren Antwortweges konnten langsamer wandernde,

modifizierte Banden von Myc-Ste50 detektiert werden. Es konnte mittels Behandlung mit alkaliner Phosphatase weiterhin gezeigt werden, dass der pheromonabhängige Mobilitätsshift auf eine Phosphorylierung zurückzuführen ist. Es stellte sich nun die Frage, welche Kinase für die pheromonabhängige Phosphorylierung von Myc-Ste50 verantwortlich sei. Wu *et al.* konnten 2003 die Kaseinkinasen I Yck1 sowie Yck2 als Kinasen identifizieren, die für die Phosphorylierung des Aminosäurestes T42 verantwortlich sind. Weitere Kinasen, die eine *in vitro* Phosphorylierung von Ste50 zeigten, sind die Kinasen Yck2, Gin4 und Rim11 (Wu *et al.*, 2003). Die Kinasen Yck1, Yck2, Yck3, Gin4 sowie Rim11 konnten jedoch als Kinasen für die pheromonabhängige Phosphorylierung von Myc-Ste50 ausgeschlossen werden, da in Deletionsstämmen derselben noch eine Phosphorylierung von Myc-Ste50 zu detektieren war. Hierbei muss jedoch beachtet werden, dass Einzeldelentionsstämmen verwendet wurden. Die Funktion der jeweiligen Kaseinkinase hätte von der jeweils redundanten Kinase übernommen werden können.

Eine epistatische Analyse der Phosphorylierung von Myc-Ste50 in Deletionsmutanten des Pheromonwegs deutete darauf hin, dass vielmehr die Kinase Ste11 für die pheromonabhängige Phosphorylierung verantwortlich ist. Ste11 muss hierfür von Ste20 aktiviert werden, um diese Funktion ausüben zu können. Die Phosphorylierung von Myc-Ste50 ist nicht auf einen Feedback- sowie Signalweiterleitungs-Mechanismus zurückzuführen, da in einem  $\Delta fus3$ - bzw.  $\Delta ste7$ -Stamm weiterhin eine Phosphorylierung von Myc-Ste50 zu detektieren war. Anhand dieser Ergebnisse konnte noch nicht ausgesagt werden, ob die fehlende Phosphorylierung von Myc-Ste50 in diesen Stammhintergründen auf einen direkten Effekt durch die Ste11-Kinase oder auf indirekte Einflüsse zurückzuführen war. Daher wurde die Phosphorylierung von Myc-Ste50 in verschiedenen Ste11-Kinase-mutanten untersucht. Hierbei konnte keine Phosphorylierung von Myc-Ste50 in der Kinase-inaktiven Mutante Ste11-K444R sowie der Doppelmutante Ste11-K444R P279S detektiert werden. In der hyperaktiven Mutante *STE11-1*, deren Aminosäureaustausch P279S in der aminoterminalen Domäne zu einer konstitutiven Aktivierung des Pheromonwegs führt (Stevenson *et al.*, 1992), konnte eine Phosphorylierung von Myc-Ste50 schon ohne Einleitung des Pheromonwegs detektiert werden. Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass für die pheromonabhängige Phosphorylierung von Myc-Ste50 die Kinasefunktion von Ste11 benötigt wird. Ste50 wäre somit ein Modulatorprotein von Ste11, dass dessen Aktivität reguliert und selber von Ste11 reguliert wird.

Eine konstitutive Phosphorylierung von Ste50 (Wu *et al.*, 2003), lässt sich vielleicht auf deren Verwendung von GAL-GST-Ste50 zurückführen. Wie bereits erwähnt, können GST-Proteine Dimere bilden. In einer Auflösung der Kristallstruktur der SAM-Domäne Ste11 konnte gezeigt werden, dass die Ste11-SAM-Domäne hauptsächlich als Dimer vorkommt (Grimshaw *et al.*, 2004). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass es sich bei dem Komplex der Ste11-SAM- sowie der Ste50-SAM-Domänen um einen trimeren Komplex handelt, bestehend aus einem Ste11-SAM-Dimer und einem Ste50-SAM-Monomer. Die Dimerbildung der Ste11-SAM-Domäne wird durch eine höhere Konzentration dieses Proteins begünstigt (Kwan *et al.*, 2004). Des Weiteren ist bekannt, dass nach

Einleitung des Pheromonweges die Dimerbildung des Gerüstproteins Ste5 und somit die Oligomerisierung mit den an Ste5 gebundenen Komponenten gefördert wird. Man könnte daher vermuten, dass nach der Einleitung des Signalweges durch Aktivierung von Ste11 durch Ste20 sowie Ste5 die Dimerbildung von Ste11 gefördert wird und dies die Konformation des Ste50-Ste11-Komplexes verändert. Dies hätte dann zur Folge, dass Ste50 durch Ste11 phosphoryliert werden kann. Wenn nun die Dimerbildung künstlich durch eine GST-Fusion bzw. durch Überexpression des Proteins begünstigt wird, könnte dies eine Konformationsänderung des Ste50-Ste11-Komplexes bewirken und somit eine Phosphorylierung von Ste50 im Grundzustand. Diese Vermutung müsste durch zusätzliche Experimente noch unterstützt werden.

Eine weitere Möglichkeit wäre, dass eine Grundphosphorylierung von Ste50 stattfindet, aufgrund des Überschusses an überexprimierten Ste50. Bei einer massenspektroskopischen Analyse von überexprimierten GST-Ste50 nach Pheromonbehandlung wurden zwei Massen-Spezies detektiert, die zu einem Peptid mit einer bzw. zwei Phosphorylierungsstellen gehören (Spode, 2004). Diese zwei Phosphopeptide (P1= 2292 kDa; P2= 2372 kDa) korrelieren negativ mit einem 2212 kDa-Fragment von Ste50 (Aminosäuren 189-207). Der Anteil des P2-Spaltpeptids erhöhte sich nach Pheromonbehandlung (Spode, 2004). Dies deutet darauf hin, dass GST-Ste50 im Grundzustand phosphoryliert vorliegt und nach Pheromonbehandlung stärker phosphoryliert wird.

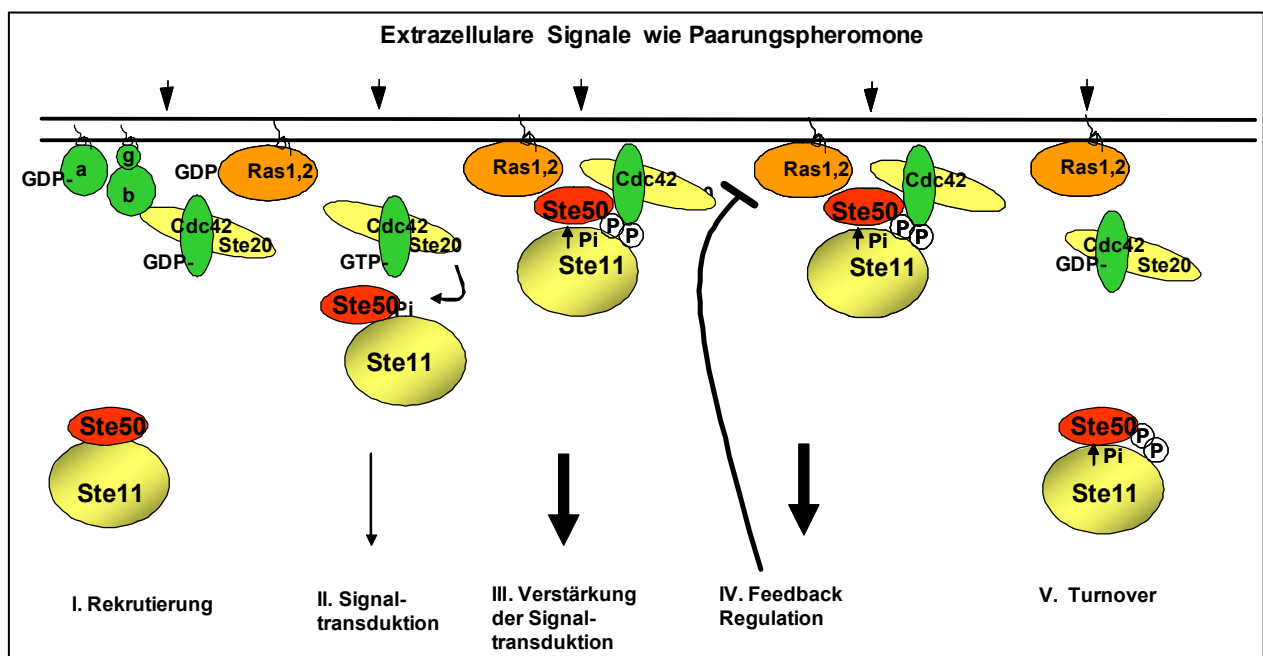
#### **4.2.4 Die pheromonabhängige Phosphorylierung von Ste50 hat Einfluss auf die Stabilität**

Die *in vivo* Lokalisation von GFP-Ste50 nach Einleitung des Pheromonwegs ließ vermuten, dass dieses massiven Veränderungen in der Verteilung und der Stabilität unterliegt. Diese Beobachtung wird unterstützt, wenn man die Stabilität von Myc-Ste50 während der Pheromonantwort und nach Eintritt der Zellen in den Zellklusarrest beobachtet. Während der Pheromonantwort ist phosphoryliertes sowie unphosphoryliertes Myc-Ste50 stabil. Nach Eintritt der Zellen in den Zellzyklus ist hingegen phosphoryliertes Myc-Ste50 nicht mehr detektierbar. Stattdessen waren Abbauprodukte zu sehen. Diese Ergebnisse unterstützten die Vermutung, dass Ste50 nach fortgeschrittenem Pheromonweg abgebaut werden könnte. Phosphorylierung ist vielfach eine Voraussetzung für eine folgende Ubiquitinierung sowie einem Abbau des Proteins über das Proteasom. In der Tat lieferten die Ergebnisse den ersten Hinweis darauf, dass Ste50 ubiquitiniert werden könnte. Bei Hefestämmen, die Mutationen im proteasomalen System aufweisen, in denen ubiquitinierte Proteine stabiler sind, konnte ubiquitiniertes Ste50 detektiert werden. Diese Ergebnisse müssen durch weitere Versuche unterstützt werden. Eine pheromonabhängige Degradation sowie Ubiquitinierung wurde ebenfalls für Ste11 vermutet. Es konnte gezeigt werden, dass Stimulation des Pheromonantwortweges den Turnover von Ste11 fördert und dieser Effekt von Komponenten des Ubiquitinierungsystems abhängig ist (Esch & Errede, 2002). Im hochosmolaren Antwortweg ist Ste11 jedoch stabil. Eine direkte Ubiquitinierung von Ste11 konnte allerdings nicht gezeigt werden (Esch & Errede, 2002). Für Ste7 konnte hingegen direkt nachgewiesen werden, dass es nach fortgeschrittener

Einleitung des Pheromonwegs ubiquitiniert wird (Wang & Dohlman, 2002; Wang & Elion, 2003). Die Ubiquitinierung von Ste7 erfordert eine vorangegangene Phosphorylierung, welche von der Ste11-Kinase vermittelt wird (Wang & Dohlman, 2002; Wang & Elion, 2003). Eine Phosphorylierung von Proteinen, die in Signaltransduktionswegen involviert sind, könnte somit dazu dienen, die Proteine zu aktivieren und schließlich die Proteine für die Ubiquitinierung und den Abbau zu markieren, damit die Zellen den Signalweg wieder abschalten können. Die Zellen können sich somit schnell ändernden Umweltbedingungen anpassen.

#### 4.2.5 Modell-Ste50 als regulierendes Adapterprotein

Anhand der Ergebnisse kann man die Funktion von Ste50 als regulierendes Adapterprotein innerhalb der MAPK-Wege, insbesondere des Pheromonwegs, im folgenden Modell zusammenfassen (Abb.4.2).



**Abbildung 4.2 Modell für die Ste50- abhängige Regulation der MAPKKK Ste11- Aktivierung**

Aktiviertes G-Protein rekrutiert das Gerüstprotein Ste5 (wegen der Vereinfachung nicht gezeigt) und assoziiertes Ste11 sowie Ste50 an die Plasmamembran. Ste20 wird durch Cdc42 an die Membran rekrutiert (Schritt I). Aktiviertes Cdc42 bindet und aktiviert Ste20. Daraufhin aktiviert Ste20 Ste11 durch Phosphorylierung und die Signaltransduktion kann eingeleitet werden (Schritt II). Durch Ste20 aktiviertes Ste11 aktiviert nun Ste50 durch Phosphorylierung. Dies führt wahrscheinlich zu einer konformellen Änderung des Ste11-Ste50-Komplexes, so dass die RAD von Ste50 der Interaktion mit den G-Proteinen Ras1, Ras2 und Cdc42 zugänglich ist. Dies hat eine Verstärkung der Signaltransduktion zur Folge (Schritt III). Eine verlängerte Aktivierung des Weges führt zu einer Feedback Regulation und schließlich zur Anpassung an Pheromonbedingungen (Schritt IV). Dies führt zu einer Aufhebung der transienten Brücke zwischen dem G-Protein- und dem MAPK-Komplex und zu einem Turnover der phosphorylierten Proteine Ste11 sowie Ste50 (Schritt V).

Unter Pheromonbedingungen erfolgt zunächst die Rekrutierung des MAPK-Komplexes an die Plasmamembran. Dieser Prozess wird durch Cdc42 vermittelt, welches an Ste20 bindet und es somit aktiviert (Lamson *et al.*, 2002). Weiterhin erfolgt die Rekrutierung mittels des aktivierten  $G_{\beta\gamma}$ -Proteins, das direkt mit Ste20 interagiert (Leeuw *et al.*, 1998).  $G_{\beta\gamma}$  bringt ebenfalls das Gerüstprotein Ste5, sowie die an dieses Protein gebundenen Komponenten des Pheromonwegs an die

Plasmamembran. Aktiviertes Ste20 wird phosphoryliert und aktiviert daraufhin die MAPKKK Ste11. Die Signaltransduktionskaskade kann somit eingeleitet werden (Schritt II, Abb. 4.2). Die Aktivierung von Ste11 durch Ste20 wird ebenfalls benötigt, damit Ste11 die Phosphorylierung von Ste50 bewirken kann. Die Vermutung liegt nahe, dass durch die Phosphorylierung von Ste50 strukturelle Änderungen in dem Ste11- Ste50-Proteinkomplex hervorgerufen werden, so dass dieser in der Lage ist, mittels der RA-Domäne von Ste50 an die Proteine Ras1 sowie Ras2 an der Plasmamembran zu binden. Dies könnte eine stabilere Plattform an der Zellperipherie bereitstellen, die für die genaue räumliche Regulation von Ste11 erforderlich ist. Dies führt schließlich zur Signalverstärkung (Schritt III). Somit würde Ste50 mittels seiner carboxyterminalen RA-Domäne sowie seiner aminoterminalen SAM-Domäne, eine transiente Brücke zwischen dem aktivierten G-Proteinkomplex und dem MAP-Kinasekomplex darstellen und damit zur Amplifikation des Signalwegs beitragen. Eine verstärkte Aktivierung des Signalwegs führt schließlich zu Desensitisation des Signalwegs (Schritt IV). Diese Adaptation an Pheromonbedingungen wird durch verschiedene Mechanismen vermittelt. Beispielsweise kommt der Feedback-Kontrolle hierbei eine bedeutende Funktion zu. Hierbei spielt ein Effektor des Pheromonwegs, Fus3, eine wichtige Rolle, welcher in der Lage ist, an die  $G_{\alpha}$ -Untereinheit Gpa1 zu binden und diese zu inaktivieren (Metodiev *et al.*, 2002). Dies führt wahrscheinlich zur Auflösung des G-Proteinkomplexes sowie des MAPK-Komplexes. Somit wird die transiente Brücke zwischen den Komplexen aufgelöst und der Turnover der phosphorylierten Proteine Ste50 und Ste11 beschleunigt (Schritt V).

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass Ste50 ein regulierendes Adapterprotein darstellt, das den G-Proteinkomplex mit der MAPK-Kaskade verbindet. Ste50 könnte ein Protein sein, das je nach Signalweg unterschiedlich reguliert, sowie phosphoryliert wird. Es könnte somit unterschiedlichen Interaktionspartnern zur Verfügung stehen und die Wege unterschiedlich beeinflussen könnte. Innerhalb des Pheromonwegs dient Ste50 zum einen der Signalverstärkung und wird zum anderen zur Anpassung an Pheromonbedingungen abgebaut. Man beobachtet daher eine instabile phosphorylierte Form von Myc-Ste50, je weiter der Signalweg fortgeschritten ist. Innerhalb des hochosmolaren Wegs stellt Ste50 hingegen eine stabile Komponente dar. Dies lässt sich dadurch erklären, dass Ste50 für diesen Weg essentiell ist. Die Zelle muss schließlich nach Abschalten des Wegs sehr schnell wieder in der Lage sein, auf hochosmolare Bedingungen zu reagieren. Eine dauerhafte Aktivierung des HOG-Wegs führt hingegen zur Lethalität (Wurgler-Murphy *et al.*, 1997). Die Zelle hat daher Mechanismen entwickelt, sich an hochosmolare Bedingungen adaptieren zu können, welches u.a. durch Dephosphorylierung von Hog1 erreicht werden kann.

Eine unterschiedliche Modifikation von Ste50 innerhalb der verschiedenen Signalwege, könnte somit zur Signalidentität der Wege beitragen und schließlich die Dauer und Stärke der Signalweiterleitung mitbestimmen.

## 5 Zusammenfassung

Wie externe Signale von der eukaryotischen Zelle verarbeitet werden, um eine angemessene Reaktion auszulösen, ist eine der zentralen Fragestellungen der Molekularbiologie. Die Verknüpfung von Rezeptor-assoziierten G-Protein-Effektoren mit mitogen-aktivierten Protein-Kinase (MAPK)-Modulen spielt bei der Signalübertragung eine große Rolle. Das hier zu untersuchende Signalmolekül Ste50 ist in die MAPK-Signalwege der Paarung, des invasiven Wachstums sowie der Osmotoleranz in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* involviert. Ste50 stellt hierbei ein regulatorisches Adapterprotein dar, das mittels seiner C-terminalen Ras-Assoziations- (RA) Domäne mit kleinen G-Proteinen sowie seiner N-terminalen sterilen Alpha-Motif- (SAM) Domäne mit Ste11, einer Schlüsselkomponente der MAPK-Wege, interagieren kann und somit als transiente Brücke zwischen dem G-Proteinkomplex und dem MAPK-Komplex fungieren kann. Im ersten Abschnitt der Arbeit wurden die Wechselwirkungen von Ste50 in Abhängigkeit von verschiedenen Signalen untersucht. Es wurde gezeigt, dass eine Erhöhung des cAMP-Spiegels einen positiven Einfluss auf die von Ste50 abhängige Signalweiterleitung des Pheromonwegs sowie des invasiven Wachstumsweges ausübt. Hingegen sind negative Einflüsse des Ras/cAMP-Signalwegs auf den hochosmolaren Antwortweg zu beobachten. Die G-Proteine Ras1 und Ras2 spielen eine wichtige Rolle innerhalb des Ras/cAMP-Signalwegs in der Hefe. Hier konnte gezeigt werden, dass Ste50 mittels der RA-Domäne mit den Ras-Proteinen interagiert. Dies weist auf eine mögliche Regulation der Signalintegration der MAPK-Wege durch den cAMP-Spiegel in der Zelle hin. Mutanten der RA-Domäne von Ste50, die Defekte in der Signalinduktion aufweisen, zeigten keine Interaktion mit den Proteinen Ras1 und Ras2. Aufreinigungsstudien konnten die Wechselwirkungen von Ste50 mit den G-Proteinen Ras1 und Ras2 auf die RA-Domäne von Ste50 (Aminosäuren 235-346) eingrenzen.

Es stellte sich die Frage, wie Ste50 selbst während der Signaltransduktion reguliert wird. Zunächst wurde die Verteilung von Ste50 in der Zelle beobachtet. GFP-Ste50 verändert seine Verteilung von cytosolischen, diffusen sowie punktförmigen Strukturen nach Einleitung des hochosmolaren sowie des invasiven Antwortwegs hin zu stark granulären Strukturen. Nach Einleitung des Pheromonantwortwegs wurde eine diffuse Färbung beobachtet. Durch Überexpression des Interaktionspartners Ras2 veränderte sich die Lokalisation von Ste50 hin zur Plasmamembran, an welcher dieses Protein ebenfalls zu finden ist. Nach Einleitung des Pheromonwegs konnte eine modifizierte Form von Myc-Ste50 beobachtet werden. Daher wurde im letzten Teil der Arbeit die Modifikation von Myc-Ste50 *in vivo* untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass Ste50 nach Einleitung des Pheromonwegs phosphoryliert wird. Ferner konnte gezeigt werden, dass Ste50 hierbei in Abhängigkeit von der Ste11-Kinase phosphoryliert wird. Ste50 wies eine verminderte Proteinstabilität nach Einleitung der Pheromonantwort auf (Desensibilisierung). Jedoch zeigte sich Ste50 während der Aktivierung des hochosmolaren Antwortwegs stabil. Eine unterschiedliche Modifikation von Ste50 innerhalb der verschiedenen Signalwege könnte zur Signalidentität der Wege beitragen und schließlich die Dauer und Stärke der Signalweiterleitung mitbestimmen.

## 6 Literatur

- Adams, A.E., Johnson, D.I., Longnecker, R.M., Sloat, B.F. and Pringle, J.R. (1990).** *CDC42* and *CDC43*, two additional genes involved in budding and the establishment of cell polarity in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* **111**:131–142.
- Albertyn, J., Hohmann, S., Thevelein, J. M. and Prior, B. A. (1994).** *GPD1*, which encodes glycerol-3-phosphate dehydrogenase, is essential 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.
- Bao, M.Z., Schwartz, M.A., Cantin, G.T., Yates III, J.R. and Madhani, H.D. (2004).** Pheromone-dependent destruction of the Tec1 transcription factor is required for MAP kinase signaling specificity in yeast. *Cell* **119**:991–1000.
- Bardwell, L.J., Cook, J.G., Voora, D., Baggott, D.M., Martinez, A.R. and Thorner, J. (1998).** Repression of yeast Ste12 transcription factor by direct binding of unphosphorylated Kss1 MAPK and its regulation by the Ste7 MEK. *Genes Dev.* **12**:2887–2898.
- Barr, M.M., Tu, H., v. Aelet, L. and Wigler, M. (1996).** Identification of Ste4 as a potential regulator of Byr2 in the sexual response pathway of *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol. Cell Biol.* **16**:5597–5603.
- Bhattacharjya, S., Chen, L., Broach, J.R. and 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.
- Bhattacharjya, S., Xu, P., Gingras, R., Shaykhtudinov, R., Wu, C., Whiteway, M. and Ni, F. (2004).** Solution structure of the dimeric SAM domain of the MAPKKK Ste11 and its interacting with the adaptor protein Ste50 from the budding yeast: implications for Ste11 activation and signal transmission through the Ste50-Ste11 complex. *J. Mol. Biol.* **344**:1071–1087.
- Blomberg, A. and Adler, C. (1992).** Physiology of osmotolerance in fungi. *Adv. Microb. Physiol.* **33**:145–212.
- Bourne, H.R., Sanders, D.A. and McCormick, F. (1990).** The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions. *Nature* **348**:125–132.
- Brewster, J.L., de Valoir, T., Dwyer, N.D., Winter, E. and Gustin, M.C. (1993).** An osmosensing signal transduction pathway in yeast. *Science* **259**:1760–1763.
- Broach, J.R. and Deschenes, R.J. (1990).** The function of *RAS* genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Adv. Cancer Res.* **54**:79–139.
- Broek, D., Toda, T., Michaeli, T., Levin, L., Birchmeier, C., Zoller, M., Powers, S. and Wigler, M. (1987).** The *S. cerevisiae* CDC25 gene product regulates the RAS/adenylate cyclase pathway. *Cell* **48**:789–799.
- Brondello, J., Pouyssegur, J. and McKenzie, F.R. (1999).** Reduced MAP kinase phosphatase-1 degradation after p42/p44MAPK-dependent phosphorylation. *Science* **286**:2514–2517.
- Brown, J. L., Jaquenoud, M. Gulli, M. P. Chant, J. and Peter, M. (1997).** Novel Cdc42-binding proteins Gic1 and Gic2 control cell polarity in yeast. *Genes Dev.* **11**:2972–2982.
- Butty, A.C., Pryciak, P.M., Huang, L.S., Herskowitz, I. and Peter, M. (1998).** The role of Far1 linking the heterotrimeric G-protein polarity establishment proteins during mating. *Science* **282**:1511–1516.
- Cairns, B.R., Ramer, S.W. and Kornberg, R.D. (1992).** Order of action of components in the yeast pheromone response pathway revealed with a dominant allele of the *STE11* kinase and the multiple phosphorylation of the *STE7* kinase. *Genes Dev.* **6**:1305–1318.
- Camonis, J.H., Kalekine, M., Gondre, B., Garreau, H., Boy-Marcotte, E. and Jacquet, M. (1986).** Characterization, cloning and sequence analysis of the CDC25 gene which controls the cyclic AMP level of *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* **5**:375–380.



- Casey, P. J. (1994).** Lipid modifications of G proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* **6**:219-225.
- Casey, P. J. and Seabra, M. C. (1996).** Protein prenyltransferases. *J. Biol. Chem.* **271**:5289–5292.
- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W.W. and Prashner, D.C. (1994).** Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* **263**:802-805.
- Chant, J. (1999).** Cell polarity in yeast. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* **15**:365-391.
- Chen, G. C., Kim, Y. J. and Chan, C. S. (1997).** The Cdc42 GTPase-associated proteins Gic1 and Gic2 are required for polarized cell growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* **11**:2958–2971.
- Choi, K.Y., Satterberg, B., Lyons, D.M. and Elion, E.A (1994).** Ste5 tethers multiple protein kinases in the MAP kinase cascade required for mating in *S. cerevisiae*. *Cell* **78**:499-512.
- Chou, S., Huang, L. and Liu, H. (2004).** Fus3-regulated Tec1 degradation through SCF<sup>Cdc4</sup> determines MAPK signaling specificity during mating in yeast. *Cell* **119**:981-990.
- Clapham, D.E. and Neer, E.J. (1993).** New roles for G-protein beta gamma-dimers in transmembrane signalling. *Nature* **365**:403-406.
- Colman-Lerner A, Chin, T.E and Brent, R. (2001).** Yeast Cbk1 and Mob2 activate daughter-specific genetic programs to induce asymmetric cell fates. *Cell* **107**:739–750.
- Cook, J. G., Bardwell, L., and Thorner, J. (1997).** Inhibitory and activating functions for MAPK Kss1 in the *S. cerevisiae* filamentous-growth signalling pathway. *Nature* **390**:85-88.
- Crechet, J. B., Jacquet, E., Bernardi, A., and Parmeggiani, A. (2000).** Analysis of the role of the hypervariable region of yeast Ras2p and its farnesylation in the interaction with exchange factors and adenylyl cyclase. *J. Biol. Chem.* **275**:17754-17761.
- Cullen, P.J., Schultz, J., Horecka, J., Stevenson, B.J., Jigami, Y. and Sparargue, G.F. (2000).** Defects in protein glycosylation cause *SHO1*-dependent activation of a *STE12* signaling pathway in yeast. *Genetics* **155**: 1005-1018.
- Cvrckova, F., De Virgilio, C. Manser, E. Pringle, J. R. and Nasmyth, K. (1995).** Ste20-like protein kinases are required for normal localization of cell growth and for cytokinesis in budding yeast. *Genes Dev.* **9**:1817–1830.
- Davis, R.J. (2000).** Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell* **103**:239-252.
- Di Paolo, G., Antonsson, B., Kassel, D., Riederer, B.M. and Grenningloh, G. (1997).** Phosphorylation regulates the microtubule-destabilizing activity of stathmin and its interaction with tubulin. *FEBS Lett.* **416**:149-152.
- Dohlman, H.G. and Thorner, J.W. (2001).** Regulation of G protein-initiated signal transduction in yeast: paradigms and principles. *Annu. Rev. Biochem.* **70**:703–754.
- Dong, X., Mitchell, D.A., Lobo, S., Zhao, L., Bartels, D.J. and Deschenes, R.J. (2003).** Palmitoylation and plasma membrane localization of Ras2p by a nonclassical trafficking pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* **23**:65574-65584.
- Drees, B.L., Sundin, B., Brazeau, E., Caviston, J.P., Chen, G-C., Guo, W., Kozminski, K.G., Lau, M.L., Moskow, J.J., Tong, A., Schenkman, L.R., McKenzie III, A., Brennwald, P., Longtime, M., Bi, E., Chan, C., Drogen, F., O'Rourke, S.M., Stucke, V.M., Jaquenoud, M., Neiman, A.M. and Peter, M. (2000).** Phosphorylation of the MEKK Ste11p by the PAK-like kinase Ste20p is required for MAP kinase signaling in vivo. *Curr. Biol.* **10**:630-639.
- Drogen, F., O'Rourke, S.M., Stucke, V.M., Jaquenoud, M., Neiman, A.M. and Peter, M. (2000).** Phosphorylation of the MEKK Ste11p by the PAK-like kinase Ste20p is required for MAP kinase signaling in vivo. *Curr Biol.* **10**: 630-639.

- Durfee, T., Becherer, K., Chen, P.L., Yeh, S.H., Yang, Y., Kilburn, A.E., Lee, W.H. and Elledge S.J. (1993).** The retinoblastoma protein associates with the protein phosphatase type 1 catalytic subunit. *Genes Dev.* **7**:555-569.
- Elion, E.A., Satterberg, B. and Kranz, J.E. (1993).** FUS3 phosphorylates multiple components of the mating signal transduction cascade: evidence for STE12 and FAR1. *Mol. Biol. Cell.* **4**:495-510.
- Elion, E.A. (2001).** The Ste5 scaffold. *J. Cell Sci.* **114**:3967-78.
- Esch, R.K. and Errede, B. (2002).** Pheromone induction promotes Ste11 degradation through a MAPK feedback and ubiquitin-dependent mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**:9160-9165.
- Fanger, G. R., Gerwins, P., Widmann, C., Jarpe, M.B. and Johnson, G.L. (1997).** MEKKs, GCKs, MLKs, PAKs, TAKs, and tpls: upstream regulators of the c-Jun amino-terminal kinases? *Curr. Opin. Genet. Dev.* **7**:67-74.
- Ferrigno, P., Posas, F., Koepp, D., Saito, H. and Silver, P.A (1998).** Regulated nucleo/cytoplasmic exchange of *HOG1* MAPK requires the importin  $\beta$  homologs *NMD5* and *XPO1*. *EMBO J.* **17**:5606-5614.
- Field, J., Xu, H.P., Michaeli, T., Ballester, R., Sass, P., Wigler, M. and Colliceli, J. (1990).** Cloning and characterization of CAP, the *S. cerevisiae* gene encoding the 70kD adenylyl cyclase-associated protein. *Cell* **61**: 319-327.
- Fields, S. and Song, O. (1989).** A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* **340**:245-246.
- Finegold, A. A., Johnson, D. I. Farnsworth, C. C. Gelb, M. H. Judd, S. R. Glomset, J. A. and Tamanoi, F. (1991).** Protein geranylgeranyltransferase of *Saccharomyces cerevisiae* is specific for Cys-Xaa-Xaa-Leu motif proteins and requires the *CDC43* gene product, but not the *DPR1* gene product. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 4448-4452.
- Fu, H., Reis, N., Lee, Y., Glickman, M.H. and Vierstra, R.D. (2001).** Subunit interaction maps for the regulatory particle of the 26S proteasome and the COP9 signalosome. *EMBO J.* **20**:7096-7107.
- Gabrielli, B.G., Clark, J.M., McCormack, A.K. and Ellem, K.A. (1997).** Hyperphosphorylation of the N-terminal domain of Cdc25 regulates activity towards cyclin B1/Cdc2 but not cyclin A/Cdk2. *J. Biol. Chem.* **272**:28607-28614.
- Geyer, M., Herrmann, C., Wohlgemuth, S., Wittinghofer, A. and Kalbitzer, H.R. (1997).** Structure of the Ras-binding domain of RalGEF and implications for Ras binding and signaling. *Nature Struct. Biol.* **4**:694-699.
- Geyer, C.R., Colman-Lerner, A. and Brent, R. (1999).** "Mutagenesis" by peptide aptamers identifies genetic network members and pathway connections. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**:8567-8572.
- Gibbs, J.B. and Marschall, M. (1989).** The ras oncogene- an important regulatory element in lower eukaryotic organisms. *Microbiol. Rev.* **53**:171-185.
- Gilman, A.G. (1987).** G-Proteins: transducers of receptor-generated signals. *Annu. Rev. Biochem* **56**:615-649.
- Gimeno, C.J., Ljungdahl, P.O., Styles, C.A. and Fink, G.R. (1992).** Unipolar cell divisions in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* lead to filamentous growth; regulation by starvation and *RAS*. *Cell* **68**:1077-1090.
- Giniger, E., Varnum, S.M. and Ptashne, M. (1985).** Specific DNA binding of GAL4, a positive regulatory protein of yeast. *Cell* **40**:767-774.
- Görner, W., Durchschlag, E., Martinez-Pastor, M., Estruch, P., Ammerer, G. and Hamilton, B. (1998).** Nuclear localization of the C2H2 zinc finger protein Msn2p is regulated by stress and protein kinase A activity. *Genes Dev.* **12**:586-597.
- Grimshaw, S.J., Mott, H.R., Stott, K.M., Nielsen, P.R., Evetts, K.A., Hopkins, L.J., Nietlispach, D. and Owen, D. (2004).** Structure of the sterile a motif (SAM) domain of the *Saccharomyces cerevisiae* mitogen-

activated protein kinase pathway-modulating protein Ste50 and analysis of its interaction with the Ste11 SAM. *J. Biol. Chem.* **279**:2192-2201.

**Guarente, L., and Ptashne, M. (1981).** Fusion of *Escherichia coli lacZ* to the cytochrome *c* gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**:2199-2203.

**Guarente, L. (1993).** Strategies for the identification of interacting proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**:1639-1641.

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

**Gustin, M.C., Albertyn, J., Alexander, M., and Davenport, K. (1998).** MAP kinase pathways in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb. Mol. Biol. Rev.* **62**:1264-1300.

**Hadley M.E. (1988).** *Endocrinology*. 2<sup>nd</sup> ed., Engelwood Cliffs, N.Y., Prentice Hall.

**Hall A. (1990).** The cellular functions of small GTP-binding proteins. *Science* **249**:635-640.

**Hall A. (1998).** Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* **279**:509-514.

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

**Hancock, J. F., Paterson, H. and Marshall, C. J. (1990).** A polybasic domain or palmitoylation is required in addition to the CAAX motif to localize p21ras to the plasma membrane. *Cell* **63**:133-139.

**Hepler, J.R. and Gilman, A.G. (1992).** G proteins. *Trends Biochem. Sci.* **17**:383-387.

**Herrmann, C., Horn, G., Spaargaren, M., Wittinghofer, A. (1996).** Differential interaction of the Ras family GTP-binding proteins H-Ras, Rap1A, and R-Ras with the putative effector molecules Raf kinase and Ral-guanine nucleotide exchange factor. *J. Biol.Chem.* **271**:6794-6800.

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

**Hicke, L., and Riezman, H. (1996).** Ubiquitination of a plasma membrane receptor signals its ligand stimulated endocytosis. *Cell* **84**:277-87.

**Hicke, L., Zanolari, B. and Riezman, H. (1998).** Cytoplasmic tail phosphorylation of the alpha factor receptor is required for its ubiquitination and internalization. *J. Cell Biol.* **141**:349-358.

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

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

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

**Ito, H., Tungm R.T., Suyimoto, T., Kobayashi, I., Takahashi, K., Katada, T., Ui, M. and Kurachi, Y. (1992).** On the mechanism of G-protein beta-gamma-subunit activation of the muscarinic K<sup>+</sup> channel in Guinea Pig atrial cell membrane. *J. Gen. Physiol.* **99**:961-83.

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

**Jans, D.A. (1995).** The regulation of protein transport to the nucleus by phosphorylation. *Biochem. J.* **311**:705-716.

- Jansen G., Bühring, F., Hollenberg, C. P. and Ramezani Rad, M. (2001).** Mutations in the SAM domain of *STE50* differentially influence the MAPK-mediated pathways for mating, filamentous growth and osmotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* **265**:102-117.
- Jansen, G., Wu, C., Schade, B., Thomas, D. Y. and Whiteway, M. (2005).** Drag & Drop cloning in yeast. *Gene* **344**:43-51.
- Jeness, D.D. and Spatrick, P. (1986).** Down regulation of the alpha-factor pheromone receptor in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell* **46**:345-353.
- Johnson, D.I. and Pringle, J.R. (1990).** Molecular characterization of CDC42, a *Saccharomyces cerevisiae* gene involved in the development of cell polarity. *J. Cell Biol.* **111**:143-152.
- Johnson, D.I. (1999).** Cdc42: an essential Rho-Type GTPase controlling eukaryotic cell polarity. *Microb. Mol. Biol. Rev.* **63**:54-105.
- Johnson, G.D. and Araujo, N. (1981).** A simple method of reducing the fading of immunofluorescence microscopy. *J. Immunol. Meth.* **43**:349-350.
- Johnson, L.N., Noble, M.E. and Owen, D.J. (1996).** Active and inactive protein kinases: structural basis for regulation. *Cell* **85**:149-158.
- Johnston, M. (1987).** A model fungal gene regulatory mechanism: the GAL gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.* **51**:458-476.
- Kann, M., Sodeik, B., Vlachou, A., Gerlich, W.H. and Helenius, A. (1999).** Phosphorylation-dependent binding of hepatitis B virus core particles to the nuclear pore complex. *J. Cell Biol.* **145**:45-55.
- Kataoka, T., Broek, D. and Wigler, M. (1985).** DNA-sequence and characterization of the *S.cerevisiae* gene encoding adenylyl cyclase. *Cell* **43**:493-468.
- Kido, M., Shima, F., Satoh, T., Asato, T., Kariya Ki, K. and Kataoka, T. (2002).** Critical function of the Ras-associating domain as a primary Ras-binding site for regulation of *Saccharomyces cerevisiae* adenylyl cyclase. *J. Biol. Chem.* **277**:3117-3123.
- Kiel, C., Serrano, L. and Herrmann, C. (2004).** A detailed thermodynamic analysis of Ras/effector complex interfaces. *J. Mol. Biol.* **340**:1039-1058.
- Kim, D., Lewis, D.L., Grazeadei, L., Neer, E.J., Bar-Sagi, D. and Clapham, D.E. (1989).** G-protein-subunits activate the cardiac muscarinic K<sup>+</sup>-channel via phospholipase A2. *Nature* **337**:557-560.
- Kölling, R. and Hollenberg, C.P. (1994).** The ABC-transporter Ste6 accumulates in the plasma membrane in a ubiquitinated form in endocytosis mutants. *EMBO J.* **13**:3261-3271.
- Kraakman, L., Lemaire, K., Ma, P., Teunissen, A., Donaton, M., Dijck, P.V., Winderickx, J., de Winde, J.H. and Thevelein, J.M. (1999).** A *Saccharomyces cerevisiae* G-protein coupled receptor, Gpr1, is specifically required for glucose activation of the cAMP pathway during the transition to growth on glucose. *Mol Microbiol* **32**: 1002-1012.
- Kron, S.J., Styles, C.A. and Fink, G.R. (1994).** Symmetric cell division in pseudohyphae of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* **5**:1003-1022.
- Kübler, E., Mösch, H.U., Rupp, S. and Lisanti, M.P. (1997).** Gpa2p, a G-protein alpha-subunit, regulates growth and pseudohyphal development in *Saccharomyces cerevisiae* via a cAMP-dependent mechanism. *J. Biol. Chem.* **272**:20321-20323.
- Kuroda, Y., Suzuki, N. and Kataoka, T. (1993).** The effect of posttranslational modifications on the interaction of Ras2 with adenylyl cyclase. *Science* **259**:683-686.
- Kwan, J.J., Warner, N., Pawson, T. and Donaldson, L.W. (2004).** The solution structure of the *S. cerevisiae* Ste11 MAPKKK SAM domain and its partnership with Ste50. *J. Mol. Biol.* **342**:681-693.

- Kyba, M. and Brock, H.W. (1998).** The SAM domain of polyhomeotic, RAE28, and Scm mediates specific interactions through conserved residues. *Dev. Genet.* **22**:74-84.
- Laemmli, U.K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-705.
- Laloux, I., Jacobs, E. and Dubois, E. (1994).** Involvement of SRE element of Ty1 transposon in TEC1 dependent transcriptional activation. *Nucleic Acids Res.* **22**:999-1005.
- Lamson, R.E., Winters, M.J. and Pryciak, P.M. (2002).** Cdc42 regulation of kinase activity and signaling by the yeast p21-activated kinase Ste20. *Mol. Cell Biol.* **22**:2939-2951.
- Larsson, K., Eriksson, P., Ansell, R. and Adler L. (1993).** A gene encoding *sn*-glycerol 3-phosphate dehydrogenase (NAD-) complements an osmosensitive mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* **10**:1101-1111.
- Leberer, E., Dignard, D., Harcus, D. , Thomas, D. Y. and Whiteway M. (1992).** The protein kinase homologue Ste20p is required to link the yeast pheromone response G-protein bg subunits to downstream signalling components. *EMBO J.* **11**:4815-4824.
- Leberer, E., Dignard, D., Harcus, D., Hougan, L., Whiteway, M. and Thomas, D.Y. (1993).** Cloning of *Saccharomyces cerevisiae* *STE5* as a suppressor of a *STE20* protein kinase mutant: structural and functional similarity of *STE5* with *FAR1*. *Mol. Gen. Genet.* **241**:241-54.
- Leberer, E., Wu, C.L., Leeuw, T., Fourestlieuvin, A., Segall, J.E. and Thomas, D.Y. (1997).** Functional characterization of the Cdc42 binding domain of yeast Ste20 protein kinase. *EMBO J.* **6**:53-97.
- Leeuw, C., Leeuw, T., Leberer, C., Thomas, D.Y. and Whiteway, M. (1998).** Cell cycle- and Cln2p-Cdc28p-dependent phosphorylation of the yeast Ste20p protein kinase. *J. Biol. Chem.* **273**:28107-115.
- Lemaire, K., Van de Velde, S., Van Dijck, P. and Thevelein, J.M. (2004).** Glucose and sucrose act as agonist and mannose as antagonist ligands of the G-protein-coupled receptor Gpr1 in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell* **16**:293-299.
- Linder, M.E. and Gilman, A.G. (1992).** G proteins. *Sci. Am.* **267**:56-61, 64-65.
- Linnemann, T., Geyer, M., Jaitner, B.K., Block, C., Kalbitzer, H.R., Wittinghofer, A. and Herrmann, C. (1999).** Thermodynamic and kinetic characterization of the interaction between the Ras binding domain of AF6 and members of the Ras subfamily. *J. Biol.Chem.* **274**:13556-13562.
- Liu, H., Styles , C.A. and Gerald Fink (1993).** Element of the yeast pheromone response pathway required for filamentous growth of diploids. *Science* **262**:1741-1744.
- Lo, W.S. and Dranginis, A.M. (1996).** The cell surface flocculin Flo11 is required for pseudohyphal formation and invasion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* **9**:161-171.
- Lorenz., M.C., and Heitman, J. (1997).** Yeast pseudohyphal growth is regulated by *GPA2*, a G-protein alpha homolog. *EMBO J.* **16**:7008-7018.
- Lorenz, M.C. and Heitman, J. (1998a).** Regulators of pseudohyphal differentiation in *Saccharomyces cerevisiae* identified through multicopy suppressor analysis in ammonium permease mutant strains. *Genetics* **150**:1443-1457.
- Lorenz, M.C. and Heitman, J. (1998b).** The *MEP2* ammonium permease regulates pseudohyphal differentiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* **17**:1236-1247.
- Lorenz, M.C., Pan X., Harashima T., Cardenas, M.E., Xue, Y., Hirsch, J.P., and Heitmann, J. (2000).** The G-protein-coupled receptor Gpr1 is a nutrient sensor that regulates pseudohyphal differentiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **154**:609-622.

- Ma, P., Wera, S., van Dijck, P. and Thevelein, J.M. (1999).** The *PDE1* encoded low-affinity phosphodiesterase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* has a specific function in controlling agonist-induced cAMP signalling. *Mol. Biol. Cell* **10**:91-104.
- Madhani, H.D., Styles, C.A. and Fink, G.R. (1997).** MAP kinases with distinct inhibitory functions impart signaling specificity during yeast differentiation. *Cell* **91**:673-684.
- Maeda, T., S.M. Wurgler-Murphy and H. Saito (1994).** A two-component system that regulates an osmosensing MAP kinase cascade in yeast. *Nature* **369**:242-245.
- Maeda, T., M. Takekawa and H. Saito (1995).** Activation of yeast *PBS2* MAPKK by MAPKKs or by binding of an SH3-containing osmosensor. *Science* **269**:554-558.
- Magee, T. and Marshall, C. (1999).** New insights into the interaction of Ras with the plasma membrane. *Cell* **98**:9-12.
- Maltese, W. A. and Sheridan K. M. (1990).** Isoprenoid modification of G25K (Gp), a low molecular mass GTP-binding protein distinct from p21ras. *J. Biol. Chem.* **265**:17883-17890.
- Maniatis T., Fritsch E.G. and Sambrook J. (1982).** „Molecular Cloning: A Laboratory Manual“. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Martin, H., Mendazoa, A., Rodriguez-Padon, J.M., Molina, M. and Nombela, C. (1997).** Characterization of SKM1, a *Saccharomyces cerevisiae* gene encoding a novel Ste20/PAK like protein kinase. *Mol. Microbiol.* **23**:431-444.
- Martinez-Pastor, M.T., Marchler, G., Schuller, C., Marchler-Bauer, A., Ruis, H. and Estruch, F. (1996).** The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger proteins Msn2p and Msn4p are required for transcriptional induction through the stress response element (STRE). *EMBO J.* **15**:2227-2235.
- Maytal-Kivity, V., Reis, N., Hofmann, K. and Glickman, M.H. (2002).** MPN<sup>+</sup>, a putative catalytic motif found in a subset of MPN domain proteins from eukaryotes and prokaryotes, is critical für Rpn11 function. *BMC Biochem.* **20**:28.
- Metodiev, M.V., Matheos, D., Rose, M.D. and Stone, D.E. (2002).** Regulation of MAPK function by direct interaction with the mating-specific Galpha in yeast. *Science* **296**:1483-1486.
- Mösch, H.U., Roberts, R.L. and Fink, G.R. (1996).** Ras2 signals via the Cdc42/Ste20/mitogen-activated protein kinase moduls to induce filamentous growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**:5352-5356.
- Mösch, H.U., Kubler, E., Krappmann, S., Fink, G.R. and Braus, G.H. (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.
- Morillon, A., Springer, M. and Lesage, P. (2000).** Activation of the Kss1 invasive-Ælamentous growth pathway induces Ty1 transcription and retrotransposition in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* **20**:5766-5776.
- Moskow, J.J., Gladfelter, A.S., Lamson, R.E., Pryciak, P.M. and Lew, D.J. (2000).** Role of Cdc42p in pheromone-stimulated signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* **20**:7559-7571.
- Mukai, Y., Harashima, S. and Oshima, Y. (1993).** Function of the signal transduction pathway for mating pheromone sustains MAT alpha 1 transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* **13**:2050-2060.
- Nakayama, N., Miyajima, A. and Arai, K (1985).** Nucleotide sequences of *STE2* and *STE3*, cell type-specific sterile genes from *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* **4**:2643-2648.
- Nern, A. and Arkowitz, R.A. (2000).** Nucleocytoplasmic shuttling of the Cdc42 exchange factor Cdc24p. *J. Cell Biol.* **148**:1115-1123.

- Norbeck, J., Pahlmann, A.K., Akhtar, N., Blomberg, A. and Adler, L. (1996).** Purification and characterization of two isoenzymes of DL-glycerol-3-phosphatase from *Saccharomyces cerevisiae*. Identification of the corresponding *GPP1* and *GPP2* genes and evidence for osmotic regulation of Gpp2p expression by the osmosensing mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *J. Biol. Chem.* **271**:12875-13881.
- Nosworthy, N.J., Peterkofsky, A., Konig, S., Seok, Y.J., Szczepanowski, R.H. and Ginsburg, A. (1998).** Phosphorylation destabilizes the amino-terminal domain of enzyme I of the *Escherichia coli* phosphoenolpyruvate-sugar phosphotransferase system. *Biochemistry* **37**:6718-6726.
- Oehlen, L.J.W.M. and Cross F.R. (1994).** G1 cyclins *CLN1* and *CLN2* repress the mating factor response pathway at Start in the yeast cell cycle. *Genes Dev.* **8**:1058-1070.
- O'Rourke, S.M. and Herskowitz, I. (2002).** A third osmosensing branch in *Saccharomyces cerevisiae* requires the Msb2 protein and functions in parallel with the Sho1 branch. *Mol. Cell Biol.* **22**:4739-4749.
- O'Rourke, S.M. and Herskowitz, I. (1998).** The Hog1p MAPK prevents crosstalk between the HOG and pheromone response pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* **12**:2874-2886.
- O'Shea, E.K. and Herskowitz, I. (2000).** The ins and outs of cell-polarity decisions. *Nat. Cell Biol.* **2**:E39-E41.
- Ota, I.M. and Varshavsky, A. (1993).** A yeast protein similar to bacterial two-component regulators. *Science* **262**:566-569.
- Park, S.H., Zarrinpar, A. and Lim, W.A. (2003).** Rewiring MAP kinase pathway using alternative scaffold assembly mechanisms. *Science* **299**:1061-1064.
- Park, J.I., Grant, C.M. and Dawes, I.W. (2005).** The high-affinity cAMP phosphodiesterase of *Saccharomyces cerevisiae* is the major determinant of cAMP levels in stationary phase: involvement of different branches of the Ras-cyclic AMP pathway in stress responses. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **4**:311-319.
- Pawson, T. and Gish, G.D. (1992).** SH2 and SH3 domains: from structure to function *Cell* **71**:359-62.
- Peter, M., Neiman, A.M., Park, H.O., van Lohuizen, M. and Herskowitz, I. (1996).** Functional analysis of the interaction between the small GTP binding protein Cdc42 and the Ste20 protein kinase in yeast. *EMBO J.* **15**: 7046-7059.
- Phizicky, E.M. and Fields, S. (1995).** Protein-protein interactions: methods for detection and analysis. *Microbiol. Rev.* **59**:94-123.
- Ponting, C. P. (1995).** SAM: a novel motif in yeast sterile and *Drosophila* polyhomeotic proteins. *Protein Sci.* **4**: 1928-1930.
- Ponting, C.P. and Benjamin, D.R. (1996).** A novel family of Ras-binding domains. *Trends Biochem. Sci.* **21**: 422-425.
- Posas, F., M.S. Wurgler, T. Maeda, E.A. Witten, T.C. Thai and H. Saito (1996).** Yeast *HOG1* MAP kinase cascade is regulated by a multistep phosphorelay mechanism in the *SLN1-YPD1-SSK1* „two-component” osmosensor. *Cell* **86**:865-875.
- Posas, F. and H. Saito (1997).** Osmotic activation of the *HOG* MAPK pathway via Ste11p MAPKKK: scaffold role of Pbs2p MAPKK. *Science* **276**:1702-1705.
- Posas, F. and H. Saito (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, E.A. and Saito H. (1998).** Requirement of *STE50* for osmostress-induced activation of the *STE11* mitogen-activated protein kinase kinase kinase in the high-osmolarity glycerol response pathway. *Mol. Cell Biol.* **18**:5788-5796.
- Pryciak, P.M. and Huntress, F.A. (1998).** Membrane recruitment of the kinase cascade scaffold protein Ste5 by the G beta gamma complex underlies activation of the yeast pheromone response pathway. *Genes Dev.* **112**:2684-2697.

- Racki, W.J., Becam, A.M., Nasr, F. and Herbert, C.J. (2000).** Cbk1p, a protein similar to the human myotonic dystrophy kinase, is essential for normal morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* **19**:4524–4532.
- Raitt, D.C., F. Posas and Saito H. (2000).** Yeast Cdc42 GTPase and Ste20 PAK-like kinase regulate Sh01-dependent activation of the Hog1 MAPK pathway. *EMBO J.* **19**:4623-4631.
- Ramachander, R. and Bowie, J.U. (2004).** SAM domains can utilize similar surfaces for the formation of polymers and closed oligomers. *J. Mol. Biol.* **342**:1353-1358.
- Ramer, S.W. and Davis, R.W. (1993).** A dominant truncation allele identifies a gene, STE20, that encodes a putative protein kinase necessary for mating in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 452-456.
- Ramezani Rad, M., Luetzenkirchen, K., Xu, G., Kleinhans, U. and Hollenberg, C.P. (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., Xu, G. and Hollenberg, C.P. (1992).** *STE50*, a novel gene required for activation of conjugation at an early Step in mating in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* **236**:145-154.
- Ramezani Rad, M., Jansen, G., Bühring, F. and Hollenberg, C.P. (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. (2003).** The role of adaptor protein Ste50-dependent regulation of the MAPKKK Ste11 in multiple signalling pathways of yeast. *Curr. Genet.* **43**:161-70.
- Roberts, R.L. and Fink, G.R. (1994).** Elements of a single MAP kinase cascade in *Saccharomyces cerevisiae* mediate two developmental programs in the same cell type: mating and invasive growth. *Genes Dev.* **8**:2974-2985.
- Robertson, L.S. and Fink, G.S. (1998).** The three yeast A kinases have specific signaling functions in pseudohyphal growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**:13783-13787.
- Reiser, V., Salah, S.M. and Ammerer, G. (2000).** Polarized localization of yeast Pbs2 depends on osmotic stress, the membrane protein Sho1 and Cdc42. *Nat. Cell. Biol.* **2**:620–627
- Robertson, L.S., Causton, H.C., Young, R.A. and Fink, G.R. (2000).** The yeast A kinases differentially regulate iron uptake and respiratory function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**:5984-5988.
- Rost, B. (1996).** PHD: predicting one-dimensional protein structure by profile-based neural networks. *Methods Enzymol.* **266**:525-539.
- Roth, A.F., Sullivan, D.M. and Davis, N.G. (1998).** A large PEST-like sequence directs the ubiquitination, endocytosis, and vacuolar degradation of the yeast a-factor receptor. *J. Cell Biol.* **142**:949-961.
- Rupp, S., Summers, E., Lo, H-J., Madhani, H. and Fink, G. (1999).** MAP kinase and cAMP filamentation signaling pathways converge on the unusually large promoter of the yeast *FLO11* gene. *EMBO J.* **18**:1257-1269.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989).** *Molecular cloning: A laboratory manual*, Ed. 2 Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY.
- Sato, N., Kawahara, H., Toh-e, A. and Maeda, T. (2003).** Phosphorelay-regulated degradation of the yeast Ssk1p response regulator by the ubiquitin proteasome system. *Mol. Cell Biol.* **23**:6662-6672.
- Schüller, G., Brewster, J.L., Alexander, M.R., Gustin, M.C. and Ruis, H. (1994).** The HOG pathway controls osmotic regulation of transcription via the stress response element (STRE) of the *Saccharomyces cerevisiae* *CTT1* gene. *EMBO J.* **13**:4382–4389.
- Simon, M.N., de Virgilio, C., Souza, B., Pringle, J.R., Abo, A. and Reed, S.I. (1995).** Role for the Rho-family GTPase Cdc42 in yeast mating pheromone signal pathway. *Nature* **376**:702-705.



- Sloat, B. F., Adams, A. and Pringle J. R. (1981).** Roles of the *CDC24* gene product in cellular morphogenesis during the *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. *J. Cell Biol.* **89**:395–405.
- Smith, A., Ward, M.P. and Garretts, S. (1998).** Yeast PKA represses Msn2p/Msn4p-dependent gene expression to regulate growth, stress response and glycogen accumulation. *EMBO J.* **17**:3556-3564.
- Spode, I. (2004).** Untersuchungen zur Modifikation von Ste50p in der Bierhefe *Saccharomyces cerevisiae*. Dissertation, Universität Düsseldorf.
- Steiner, G., Kremer, W., Linnemann, T., Herrmann, C., Geyer, M. and Kalbitzer, H. R. (2000).** Sequence specific resonance assignment of the Ras-binding domain of AF6. *J. Biomol. NMR* **18**:73–74.
- Stevenson, B.J., Rhodes, N., Errede, B. and Sprague Jr., G.F. (1992).** Constitutive mutants of the protein kinase *STE11* activate the yeast pheromone response pathway in the absence of the G protein. *Genes Dev.* **6**: 1293-1304.
- Stevenson, B. J., Ferguson, B. De Virgilio, C. Bi, E. Pringle, J. R. Ammerer, G. and Sprague, Jr. G. F. (1995).** Mutation of *RGAI*, which encodes a putative GTPase-activating protein for the polarity-establishment protein Cdc42p, activates the pheromone-response pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* **9**:2949–2963.
- Strathmann, M. and Simon, M.I. (1991).** G alpha 12 and G alpha 13 subunits define a fourth class of G protein alpha subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 5582-5586.
- Suckow, M. and Hollenberg, C.P. (1998).** The activation specificities of wild-type and mutant Gcn4p in vivo can be different from the DNA binding specificity of the corresponding bZIP peptides in vitro. *J. Mol. Biol.* **276**:887-902.
- Szilak, L., Moitra, J., Krylov, D. and Vinson, C. (1997).** Phosphorylation destabilizes alpha-helices. *Nature Struct. Biol.* **4**:112-114.
- Takai, Y., Kaibuchi, K., Kikuchi, A. and Kawata, M. (1992).** Small GTP-bindingproteins. *Int. Rev. Cytol.* **133**:187–230.
- Takai, Y., Sasaki, T. and Matozaki, T. (2001).** Small GTP-binding proteins, *Physiol. Rev.* **81**:153-208.
- Tanaka, K., Matsumoto, K. and Toh-E, A. (1989).** IRA1, an inhibitory regulator of the RAS-cyclic AMP pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* **9**:757–768.
- Tanaka, K., Nakafuku, M., Satoh, T., Marshall, M.S., Gibbs, J.B., Matsumoto, K., Kaziro, Y. and Toh-e, A. (1990).** *S. cerevisiae* genes *IRA1* and *IRA2* encode proteins that may be functionally equivalent to mammalian Ras GTPase activating protein. *Cell* **60**:803-807.
- Thanos, C.D. and Bowie, J.U. (1999).** P53 family members p63 and p73 are SAM domain-containing proteins. *Protein Sci.* **8**:1708-1710.
- Thevelein, J.M., and de Winde, J.H. (1999).** Novel Sensing mechanisms and targets for the cAMP-protein kinase A pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* **33**:904-918.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J. (1994).** CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**:4673-4630.
- Trueheart, J. and Fink, G.R. (1989).** The yeast cell fusion protein *FUS1* is O-glycosylated and spans the plasma membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**:9916-20.
- Wang, Y. and Dohlman, H.G. (2002).** Pheromone-dependent ubiquitination of the mitogen-activated protein kinase kinase Ste7. *J. Biol. Chem.* **277**:15766-15772.

- Wang, Y. and Elion, E.A. (2003).** Nuclear export and plasma membrane recruitment of the Ste5 scaffold are coordinated with oligomerization and association with signal transduction components. *Mol. Biol. Cell* **14**:2543-2558.
- Wilkie, T.M., Gilbert, D.J., Olsen, A.S., Chen, X.N., Amatruda, T.T., Korenberg, J.R., Trask, B.J., de Jong, P., Reed, R.R. and Simon, M.I. (1992).** Evolution of the mammalian G protein alpha subunit multigene family. *Natl. Genet.* **1**:85-91.
- Williamson, D.H. and Fennell, D.J. (1975).** The use of fluorescence binding agent for detection and separation yeast mitochondrial DNA. *Meth. Cell. Biol.* **12**:335-351.
- Wittinghofer, A. and Nassar, N. (1996).** How Ras-related proteins talk to their effectors. *Trends Biochem. Sci.* **21**:488-491.
- Wu, C., M. Whiteway, D.Y. Thomas and E. Leberer (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, Leeuw, T., Leberer, E., Thomas, D.Y. and Whiteway, M. (1998).** Cell cycle- and Cln2p-Cdc28p-dependent phosphorylation of the yeast Ste20p protein kinase. *J. Biol. Chem.* **273**:28107-28115.
- Wu, C., Leberer, E., Thomas, D. and 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, D.Y., Meloche, S. and Whiteway, M. (2003).** Phosphorylation of the MAPKKK Regulator Ste50p in *Saccharomyces cerevisiae*: a casein kinase I phosphorylation site is required for proper mating function. *Euk. Cell.* **2**:949-961.
- Wurgler-Murphy, S.M., Maeda, T., Witten E.A., Saito, H. (1997).** Regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* HOG1 mitogen-activated protein kinase by the PTP2 and PTP3 protein tyrosine phosphatases. *Mol. Cell Biol.* **17**:1289-1297.
- Xu, G., Jansen, G., Thomas, D.Y., Hollenberg, C.P. and Ramezani Rad, M. (1996).** Ste50p sustains mating pheromone-induced signal transduction in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* **20**:773-783.
- Yamane, H.K., Farnsworth, C.C., Xie, H., Evans, T., Howald, W., Gelb, M.H., Glomset, J.A., Clarke, S. and B.K.-K. (1991).** The membrane binding domain of the small G-protein G25K contains an alltrans geranylgeranyl cysteinyl methyl ester at its carboxyl terminus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**:286-290.
- Yamawaki-Kataoka, Y., Tamaoki, T., Choe, H.-R., Tanaka, H. and Kataoka, T. (1989).** Adenylyl cyclase in yeast: a comparison of the gene from *Schizosaccharomyces pombe* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**:5693-5697.
- Yuan, Y.L. and Fields, S. (1991).** Properties of the DNA-binding domain of the *Saccharomyces cerevisiae* STE12 protein. *Mol. Cell Biol.* **11**:5910-5918.
- Zarrinpar, A., Bhattacharjya, R.P., Nittler M.P. and Lim, W.A. (2004).** Sho1 and Pbs2 act as coscaffolds linking components in the yeast high osmolarity MAP kinase pathway. *Mol. Cell.* **18**:825-832.
- Zhao, Z.S., Leung, T., Manser, E. and 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.
- Zheng, Y., Cerione, R. and Bender A. (1994).** Control of the yeast bud-site assembly GTPase Cdc42: catalysis of guanine nucleotide exchange by Cdc24 and stimulation of GTPase activity by Bem3. *J. Biol. Chem.* **269**:2369-2372.
- Ziman, M., Preuss, D., Mulholland, J., O'Brien, J.M., Botstein, D. and Johnson, D.I. (1993).** Subcellular localization of Cdc42p, a *Saccharomyces cerevisiae* GTP-binding protein involved in the control of cell polarity. *Mol. Biol. Cell* **4**:1307-1316.

## 7 Anhang

### DATA DOCUMENTATION SHEET 1

#### A. Identification of gene replacement strategy

##### Origin

#### A. Identification of gene

1) **Label:** HF91

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

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

##### Created one

1) **Label:** HCH92

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

3) **Genotype:** *MATa leu2-3,112 ura3-1 trp1 his3-11 ade2 can1-100*, YLR006C *ssk1::loxP-KAN MX-loxP*

4) **Systematic name of ORF:** YLR006C *SSK1* chromosome XII  
Chromosomal coordinates: 163892 - 161754 size of ORF: 2138 (bp)

#### Replacement Strategy:

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

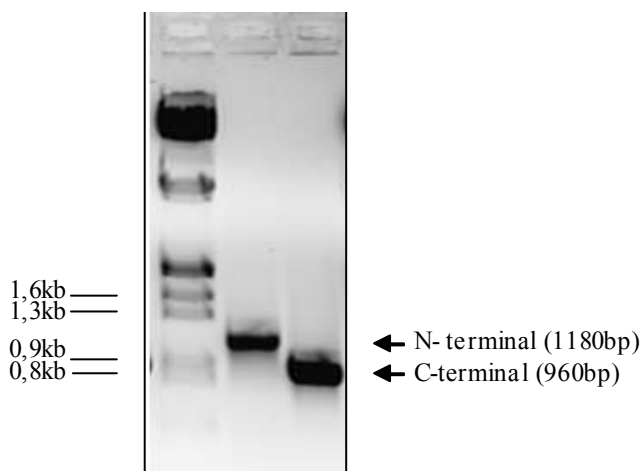
Replacement marker: loxP-KAN MX-loxP Position and number of bp replaced from ORF (A of ATG = 1). From 1 to 2138 replaced: 2138 (bp)

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

#### B. Verification of gene replacement

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

Primer	Primer-Sequence	Sizes of PCR-fragment
A1 (A46SSK1-5-600)	5'- CCC GAG CTC CAT GGC AAA TGC CTC TTG C -3'	
A2 (A47SSK1-3+300)	5'- CCC GGT ACC GAA ATA GTT TTT GAT GGA -3'	
K2 (3KAN)	5'- CGC ACC TGA TTG CCG ACA TTA TCG-3'	A1-K2: 1180bp
K3 (4KAN)	5'- CGG TTT GGT TGA TGC GAG TGA TTT T -3'	K3-A2: 960bp



## DATA DOCUMENTATION SHEET 2

## A. Identification of gene replacement strategy

**Origin****A. Identification of gene**1) **Label:** HF932) **Strain background:** W303-1A, WAM4, haploid3) **Genotype:** *MATa leu2-3,112 ura3-1 trp1 his3-11 ade2 can1-100 ste50::ura3* nach 5FOA-Selektion**Created one**1) **Label:** HCH1002) **Strain background:** W303-1A, haploid3) **Genotype:** *MATa leu2-3,112 ura3-1 trp1 his3-11 ade2 can1-100, ste50::ura3* nach 5FOA-Selektion, YLR006C *ssk1::loxP-KAN MX-loxP*4) **Systematic name of ORF:** YLR006C *SSK1* chromosome XII

Chromosomal coordinates: 163892 - 161754 size of ORF: 2138 (bp)

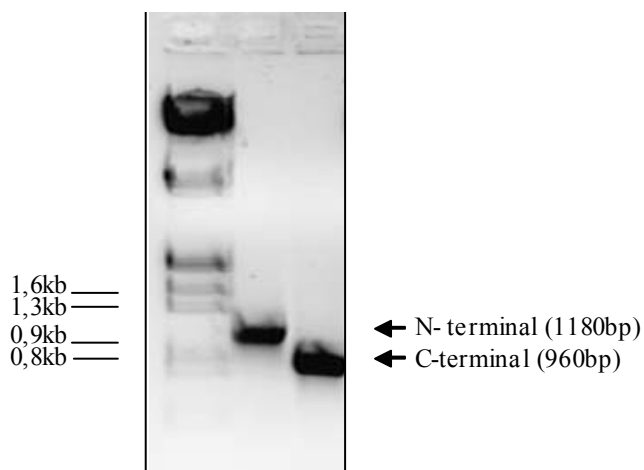
**Replacement Strategy:**() SFH-PCR () LFH-PCR () cloned replacement cassetteReplacement marker: *loxP-KAN MX-loxP* Position and number of bp replaced from ORF (A of ATG = 1). From 1 to 2138 replaced: 2138 (bp)

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

## B. Verification of gene replacement

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

Primer	Primer-Sequence	Sizes of PCR-fragment
A1 (A46SSK1-5-600)	5'- CCC GAG CTC CAT GGC AAA TGC CTC TTG C -3'	
A2 (A47SSK1-3+300)	5'- CCC GGT ACC GAA ATA GTT TTT GAT GGA -3'	
K2 (3KAN)	5'- CGC ACC TGA TTG CCG ACA TTA TCG-3'	A1-K2: 1180bp
K3 (4KAN)	5'- CGG TTT GGT TGA TGC GAG TGA TTT T -3'	K3-A2: 960bp



### DATA DOCUMENTATION SHEET 3

#### A. Identification of gene replacement strategy

##### Origin

##### A. Identification of gene

1) **Label:** HF95

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

3) **Genotype:** *MATa leu2-3,112 ura3-1 trp1 his3-11 ade2 can1-100 ste11::ADE2*

##### Created one

1) **Label:** HCH108

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

3) **Genotype:** *MATa leu2-3,112 ura3-1 trp1 his3-11 ade2 can1-100, ste11::ADE2, YLR006C ssk1::loxP- KAN MX-loxP*

4) **Systematic name of ORF:** YLR006C *SSK1* chromosome XII

Chromosomal coordinates: 163892 - 161754 size of ORF: 2138 (bp)

##### Replacement Strategy:

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

Replacement marker: loxP-KAN MX-loxP Position and number of bp replaced from ORF

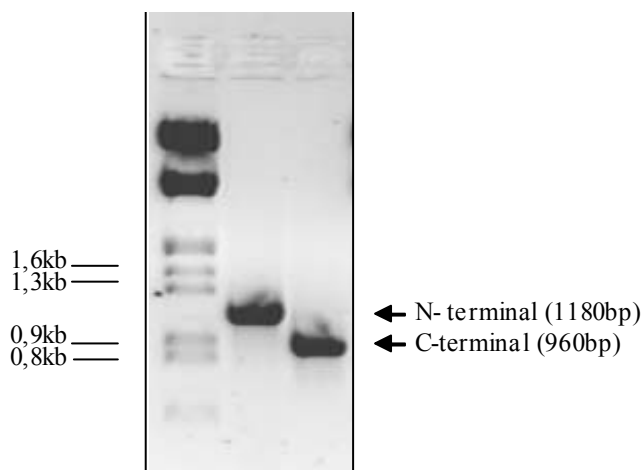
(A of ATG = 1). From 1 to 2138 replaced: 2138 (bp)

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

#### B. Verification of gene replacement

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

Primer	Primer-Sequence	Sizes of PCR-fragment
A1 (A46SSK1-5-600)	5'- CCC GAG CTC CAT GGC AAA TGC CTC TTG C -3'	
A2 (A47SSK1-3+300)	5'- CCC GGT ACC GAA ATA GTT TTT GAT GGA -3'	
K2 (3KAN)	5'- CGC ACC TGA TTG CCG ACA TTA TCG-3'	A1-K2: 1180bp
K3 (4KAN)	5'- CGG TTT GGT TGA TGC GAG TGA TTT T -3'	K3-A2: 960bp



## DATA DOCUMENTATION SHEET 4

## A. Identification of gene replacement strategy

**Origin****A. Identification of gene**1) **Label:** HCH922) **Strain background:** W303-1A, haploid3) **Genotype:** *MATa leu2-3,112 ura3-1 trp1 his3-11 ade2 can1-100, ssk1:: loxP- kanMX-loxP* (Cre-Rekombinase)**Created one**1) **Label:** HCH2572) **Strain background:** W303-1A, haploid3) **Genotype:** *MATa leu2-3,112 ura3-1 trp1 his3-11 ade2 can1-100, ssk1:: loxP- kanMX-loxP* (Cre-Rekombinase) *YOR360C pde2:: loxP- KAN MX-loxP*4) **Systematic name of ORF:** *YOR360C PDE2* chromosome XV

Chromosomal coordinates: 1014817 - 1013237 size of ORF: 1590 (bp)

**Replacement Strategy:**() SFH-PCR () LFH-PCR () cloned replacement cassette

Replacement marker: loxP-KAN MX-loxP Position and number of bp replaced from ORF

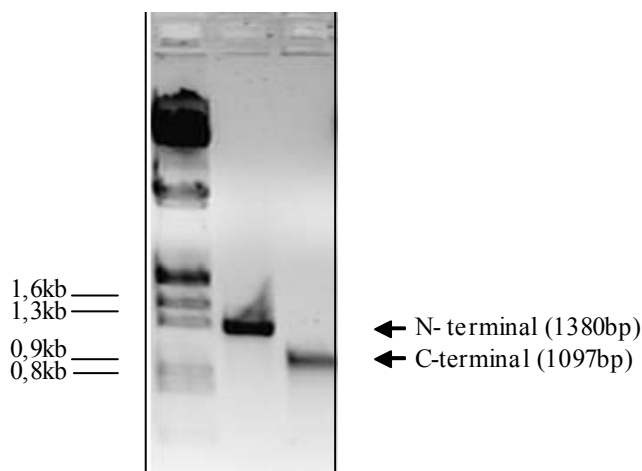
(A of ATG = 1). From 1 to 1590 replaced: 1590 (bp)

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

## B. Verification of gene replacement

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

Primer	Primer-Sequence	Sizes of PCR-fragment
A1 (A25PDE2-800P)	5'-CCC GAG CTC GGG AAT GGT CTG CCC AAT TCG AAG AG -3'	
A2 (A45PDE2-3+400)	5'- CCC GGT ACC CCA ACA CAG GGA ACA T -3'	
K2 (3KAN)	5'- CGC ACC TGA TTG CCG ACA TTA TCG-3'	A1-K2: 1380bp
K3 (4KAN)	5'- CGG TTT GGT TGA TGC GAG TGA TTT T -3'	K3-A2: 1097bp



## DATA DOCUMENTATION SHEET 5

### A. Identification of gene replacement strategy

#### Origin

#### A. Identification of gene

1) **Label:** HF91

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

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

#### Created one

1) **Label:** HCH113

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

3) **Genotype:** *MATa leu2-3,112 ura3-1 trp1 his3-11 ade2 can1-100, YOR360C pde2:: loxP- KAN MX-loxP*

4) **Systematic name of ORF:** YOR360C *PDE2* chromosome XV

Chromosomal coordinates: 1014817 - 1013237 size of ORF: 1590 (bp)

#### Replacement Strategy:

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

Replacement marker: loxP-KAN MX-loxP Position and number of bp replaced from ORF

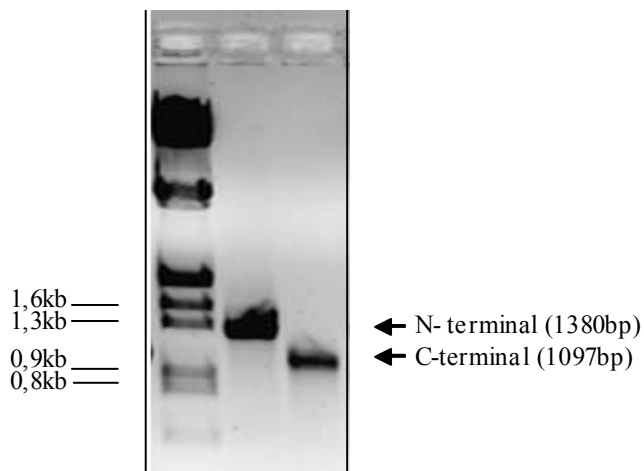
(A of ATG = 1). From 1 to 1590 replaced: 1590 (bp)

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

### B. Verification of gene replacement

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

Primer	Primer-Sequence	Sizes of PCR-fragment
A1 (A25PDE2-800P)	5'-CCC GAG CTC GGG AAT GGT CTG CCC AAT TCG AAG AG -3'	
A2 (A45PDE2-3+400)	5'- CCC GGT ACC CCA ACA CAG GGA ACA T -3'	
K2 (3KAN)	5'- CGC ACC TGA TTG CCG ACA TTA TCG-3'	A1-K2: 1380bp
K3 (4KAN)	5'- CGG TTT GGT TGA TGC GAG TGA TTT T -3'	K3-A2: 1097bp



## DATA DOCUMENTATION SHEET 6

### A. Identification of gene replacement strategy

#### Origin

#### A. Identification of gene

1) **Label:** HF93

2) **Strain background:** W303-1A, WAM4, haploid

3) **Genotype:** *MATa leu2-3,112 ura3-1 trp1 his3-11 ade2 can1-100 ste50::ura3* nach 5FOA-Selektion

#### Created one

1) **Label:** HCH119

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

3) **Genotype:** *MATa leu2-3,112 ura3-1 trp1 his3-11 ade2 can1-100, ste50::ura3* nach 5FOA-Selektion, YOR360C *pde2::loxP-KAN MX-loxP*

4) **Systematic name of ORF:** YOR360C *PDE2* chromosome XV

Chromosomal coordinates: 1014817 - 1013237 size of ORF: 1590 (bp)

#### Replacement Strategy:

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

Replacement marker: *loxP-KAN MX-loxP* Position and number of bp replaced from ORF

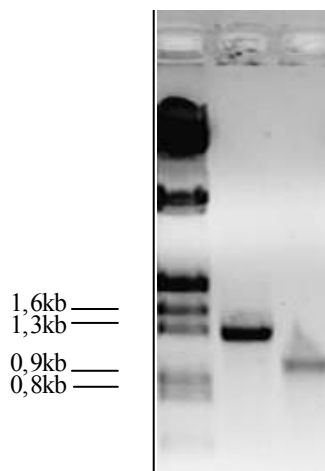
(A of ATG = 1). From 1 to 1590 replaced: 1590 (bp)

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

### B. Verification of gene replacement

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

Primer	Primer-Sequence	Sizes of PCR-fragment
A1 (A25PDE2-800P)	5'-CCC GAG CTC GGG AAT GGT CTG CCC AAT TCG AAG AG-3'	
A2 (A45PDE2-3+400)	5'- CCC GGT ACC CCA ACA CAG GGA ACA T -3'	
K2 (3KAN)	5'- CGC ACC TGA TTG CCG ACA TTA TCG-3'	A1-K2: 1380bp
K3 (4KAN)	5'- CGG TTT GGT TGA TGC GAG TGA TTT T -3'	K3-A2: 1097bp



← N-terminal (1380bp)  
 ← C-terminal (1097bp)



## DATA DOCUMENTATION SHEET 7

## A. Identification of gene replacement strategy

**Origin****A. Identification of gene**1) **Label:** HF952) **Strain background:** W303-1A, haploid3) **Genotype:** *MATa leu2-3,112 ura3-1 trp1 his3-11 ade2 can1-100 ste11::ADE2***Created one**1) **Label:** HCH1752) **Strain background:** W303-1A, haploid3) **Genotype:** *MATa leu2-3,112 ura3-1 trp1 his3-11 ade2 can1-100, ste11::ADE2, YOR360C pde2::loxP- KAN MX-loxP*4) **Systematic name of ORF:** YOR360C *PDE2* chromosome XV

Chromosomal coordinates: 1014817 - 1013237 size of ORF: 1590 (bp)

**Replacement Strategy:**() SFH-PCR () LFH-PCR () cloned replacement cassette

Replacement marker: loxP-KAN MX-loxP Position and number of bp replaced from ORF

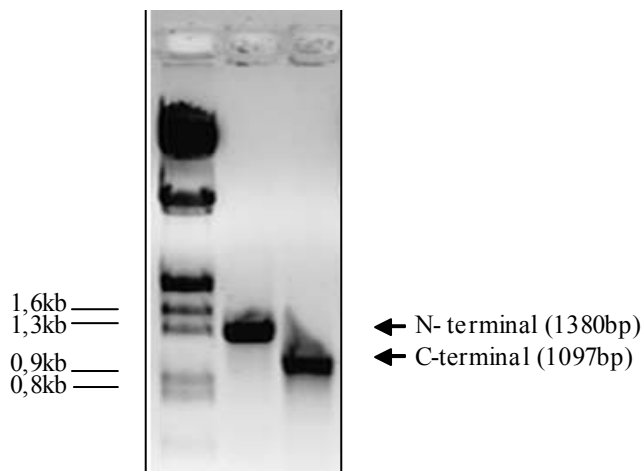
(A of ATG = 1). From 1 to 1590 replaced: 1590 (bp)

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

## B. Verification of gene replacement

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

Primer	Primer-Sequence	Sizes of PCR-fragment
A1 (A25PDE2-800P)	5'- CCC GAG CTC GGG AAT GGT CTG CCC AAT TCG AAG AG-3'	
A2 (A45PDE2-3+400)	5'- CCC GGT ACC CCA ACA CAG GGA ACA T -3'	
K2 (3KAN)	5'- CGC ACC TGA TTG CCG ACA TTA TCG-3'	A1-K2: 1380bp
K3 (4KAN)	5'- CGG TTT GGT TGA TGC GAG TGA TTT T -3'	K3-A2: 1097bp



## DATA DOCUMENTATION SHEET 8

### A. Identification of gene replacement strategy

#### Origin

#### A. Identification of gene

1) **Label:** HF91

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

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

#### Created one

1) **Label:** HCH497

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

3) **Genotype:** *MATa leu2-3,112 ura3-1 trp1 his3-11 ade2 can1-100*, YBL016W *fus3:: loxP-KAN MX-loxP*

4) **Systematic name of ORF:** YBL016W *FUS3* chromosome II

Chromosomal coordinates: 192454 - 193515 size of ORF: 1061 (bp)

#### Replacement Strategy:

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

Replacement marker: loxP-KAN MX-loxP Position and number of bp replaced from ORF

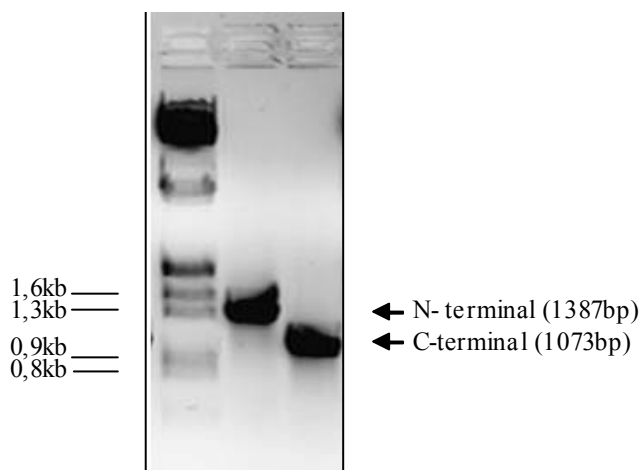
(A of ATG = 1). From 1 to 1061 replaced: 1061 (bp)

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

### B. Verification of gene replacement

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

Primer	Primer-Sequence	Sizes of PCR-fragment
A1 (A116FUS3-800P)	5'- CCC GAG CTC GGA AAA AGA GTA CGG TAG TTG - 3'	
A2 (A210FUS3-Term)	5'- CGC GTC CTC AGC GGC TAA TAC GTA -3'	
K2 (3KAN)	5'- CGC ACC TGA TTG CCG ACA TTA TCG-3'	A1-K2: 1365bp
K3 (4KAN)	5'- CGG TTT GGT TGA TGC GAG TGA TTT T -3'	K3-A2: 792bp



## DATA DOCUMENTATION SHEET 9

## A. Identification of gene replacement strategy

**Origin****A. Identification of gene**1) **Label:** HCH113 + Cre-Rekombinase2) **Strain background:** W303-1A, haploid3) **Genotype:** *MATa leu2-3,112 ura3-1 trp1 his3-11 ade2 can1-100 pde2:: loxP- kanMX-loxP* (Cre-Rekombinase)**Created one**1) **Label:** HCH5812) **Strain background:** W303-1A, haploid3) **Genotype:** *MATa leu2-3,112 ura3-1 trp1 his3-11 ade2 can1-100, pde2:: loxP- kanMX-loxP* (Cre-Rekombinase), YBL016W *fus3:: loxP- KAN MX-loxP*4) **Systematic name of ORF:** YBL016W *FUS3* chromosome II

Chromosomal coordinates: 192454 - 193515 size of ORF: 1061 (bp)

**Replacement Strategy:**() SFH-PCR () LFH-PCR () cloned replacement cassette

Replacement marker: loxP-KAN MX-loxP Position and number of bp replaced from ORF

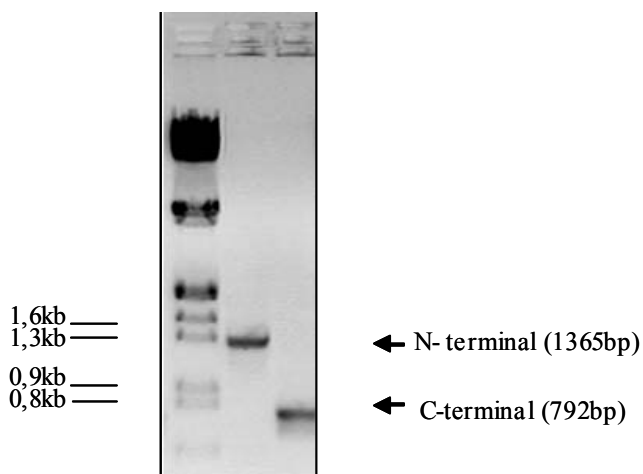
(A of ATG = 1). From 1 to 1061 replaced: 1061 (bp)

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

## B. Verification of gene replacement

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

Primer	Primer-Sequence	Sizes of PCR-fragment
A1 (A116FUS3-800P)	5'- CCC GAG CTC GGA AAA AGA GTA CGG TAG TTG - 3'	
A2 (A210FUS3-Term)	5'- CGC GTC CTC AGC GGC TAA TAC GTA -3'	
K2 (3KAN)	5'- CGC ACC TGA TTG CCG ACA TTA TCG-3'	A1-K2: 1365bp
K3 (4KAN)	5'- CGG TTT GGT TGA TGC GAG TGA TTT T -3'	K3-A2: 792 bp



## DATA DOCUMENTATION SHEET 10

## A. Identification of gene replacement strategy

**Origin****A. Identification of gene**1) **Label:** HCH119 + Cre-Rekombinase2) **Strain background:** W303-1A, haploid3) **Genotype:** *MATa leu2-3,112 ura3-1 trp1 his3-11 ade2 can1-100, ste50::ura3* nach 5FOA-Selektion, *pde2::loxP-kanMx-loxP* (Cre-Rekombinase)**Created one**1) **Label:** HCH5832) **Strain background:** W303-1A, haploid3) **Genotype:** *MATa leu2-3,112 ura3-1 trp1 his3-11 ade2 can1-100, ste50::ura3* nach 5FOA-Selektion, *pde2::loxP-kanMx-loxP* (Cre-Rekombinase) YBL016W *fus3::loxP-KAN MX-loxP*4) **Systematic name of ORF:** YBL016W *FUS3* chromosome II

Chromosomal coordinates: 192454 - 193515 size of ORF: 1061 (bp)

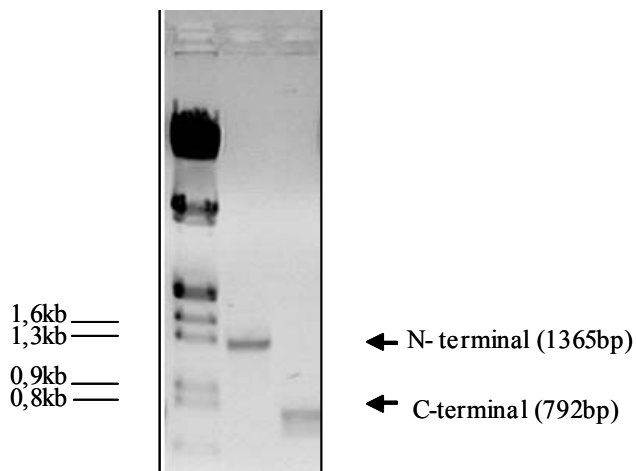
**Replacement Strategy:**() SFH-PCR () LFH-PCR () cloned replacement cassetteReplacement marker: *loxP-KAN MX-loxP* Position and number of bp replaced from ORF (A of ATG = 1). From 1 to 1061 replaced: 1061 (bp)

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

## B. Verification of gene replacement

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

Primer	Primer-Sequence	Sizes of PCR-fragment
A1 (A116FUS3-800P)	5'- CCC GAG CTC GGA AAA AGA GTA CGG TAG TTG - 3'	
A2 (A210FUS3-Term)	5'- CGC GTC CTC AGC GGC TAA TAC GTA -3'	
K2 (3KAN)	5'- CGC ACC TGA TTG CCG ACA TTA TCG-3'	A1-K2: 1365bp
K3 (4KAN)	5'- CGG TTT GGT TGA TGC GAG TGA TTT T -3'	K3-A2: 792bp



## DATA DOCUMENTATION SHEET 11

## A. Identification of gene replacement strategy

**Origin****A. Identification of gene**1) **Label:** HF912) **Strain background:** W303-1A, haploid3) **Genotype:** *MATa leu2-3,112 ura3-1 trp1 his3-11 ade2 can1-100***Created one**1) **Label:** HCH1382) **Strain background:** W303-1A, haploid3) **Genotype:** *MATa leu2-3,112 ura3-1 trp1 his3-11 ade2 can1-100, YGL360W pde1:: loxP-KAN MX-loxP*4) **Systematic name of ORF:** *YGL360W PDE1* chromosome VII

Chromosomal coordinates: 35653 - 36762 size of ORF: 1109 (bp)

**Replacement Strategy:**() SFH-PCR () LFH-PCR () cloned replacement cassette

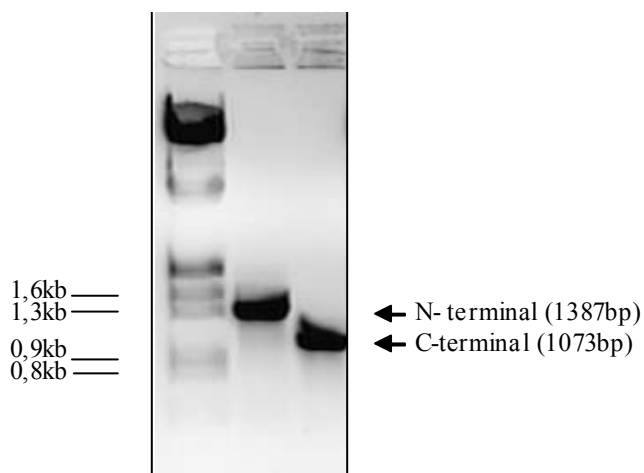
Replacement marker: loxP-KAN MX-loxP Position and number of bp replaced from ORF (A of ATG = 1). From 1 to 1109 replaced: 1109 (bp)

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

## B. Verification of gene replacement

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

Primer	Primer-Sequence	Sizes of PCR-fragment
A1 (A48PDE1-5-800)	5'- CCC GAG CTC AAG CGG TAA ACG ATC TTT -3'	
A2 (A49PDE1-3+400)	5'- CCC GGT ACC TCC CTC ACG TTA TGC TCC AG -3'	
K2 (3KAN)	5'- CGC ACC TGA TTG CCG ACA TTA TCG-3'	A1-K2: 1387bp
K3 (4KAN)	5'- CGG TTT GGT TGA TGC GAG TGA TTT T -3'	K3-A2: 1073bp



## DATA DOCUMENTATION SHEET 12

## A. Identification of gene replacement strategy

**Origin****A. Identification of gene**1) **Label:** HF932) **Strain background:** W303-1A, WAM4, haploid3) **Genotype:** *MATa leu2-3,112 ura3-1 trp1 his3-11 ade2 can1-100 ste50::ura3* nach 5FOA-Selektion**Created one**1) **Label:** HCH1432) **Strain background:** W303-1A, haploid3) **Genotype:** *MATa leu2-3,112 ura3-1 trp1 his3-11 ade2 can1-100, ste50::ura3* nach 5FOA-Selektion, YGL360W *pde1::loxP-KAN MX-loxP*4) **Systematic name of ORF:** YGL360W *PDE1* chromosome VII

Chromosomal coordinates: 35653 - 36762 size of ORF: 1109 (bp)

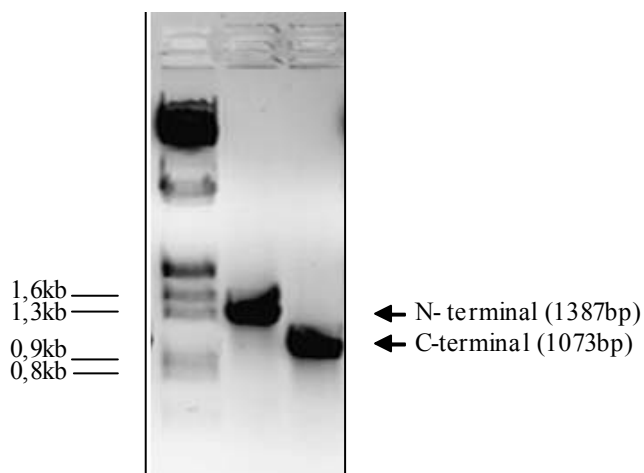
**Replacement Strategy:**() SFH-PCR () LFH-PCR () cloned replacement cassetteReplacement marker: *loxP-KAN MX-loxP* Position and number of bp replaced from ORF (A of ATG = 1). From 1 to 1109 replaced: 1109 (bp)

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

## B. Verification of gene replacement

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

Primer	Primer-Sequence	Sizes of PCR-fragment
A1 (A48PDE1-5-800)	5'- CCC GAG CTC AAG CGG TAA ACG ATC TTT -3'	
A2 (A49PDE1-3+400)	5'- CCC GGT ACC TCC CTC ACG TTA TGC TCC AG -3'	
K2 (3KAN)	5'- CGC ACC TGA TTG CCG ACA TTA TCG-3'	A1-K2: 1387bp
K3 (4KAN)	5'- CGG TTT GGT TGA TGC GAG TGA TTT T -3'	K3-A2: 1073bp



## DATA DOCUMENTATION SHEET 13

### A. Identification of gene replacement strategy

#### Origin

#### A. Identification of gene

1) **Label:** HF95

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

3) **Genotype:** *MATa leu2-3,112 ura3-1 trp1 his3-11 ade2 can1-100 ste11::ADE2*

#### Created one

1) **Label:** HCH152

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

3) **Genotype:** *MATa leu2-3,112 ura3-1 trp1 his3-11 ade2 can1-100, ste11::ADE2, YGL360W pde1::loxP- KAN MX-loxP*

4) **Systematic name of ORF:** *YGL360W PDE1* chromosome VII

Chromosomal coordinates: 35653 - 36762 size of ORF: 1109 (bp)

#### Replacement Strategy:

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

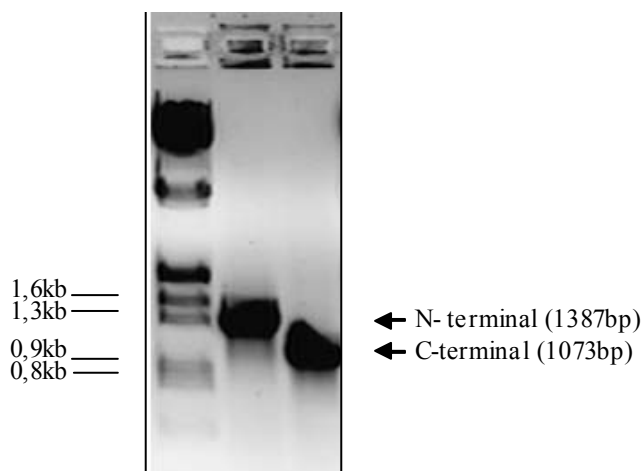
Replacement marker: loxP-KAN MX-loxP Position and number of bp replaced from ORF (A of ATG = 1). From 1 to 1109 replaced: 1109 (bp)

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

### B. Verification of gene replacement

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

Primer	Primer-Sequence	Sizes of PCR-fragment
A1 (A48PDE1-5-800)	5'- CCC GAG CTC AAG CGG TAA ACG ATC TTT -3'	
A2 (A49PDE1-3+400)	5'- CCC GGT ACC TCC CTC ACG TTA TGC TCC AG -3'	
K2 (3KAN)	5'- CGC ACC TGA TTG CCG ACA TTA TCG-3'	A1-K2: 1387bp
K3 (4KAN)	5'- CGG TTT GGT TGA TGC GAG TGA TTT T -3'	K3-A2: 1073bp



## DATA DOCUMENTATION SHEET 14

## A. Identification of gene replacement strategy

**Origin****A. Identification of gene**1) **Label:** HCH1292) **Strain background:** W303-1A, haploid3) **Genotype:** *MATa leu2-3,112 ura3-1 trp1 his3-11 ade2 can1-100, ste50::ura3* nach 5FOA-Selektion, *ssk1::loxP-kanMx-loxP* (Cre-Rekombinase)**Created one**1) **Label:** HCH6312) **Strain background:** W303-1A, haploid3) **Genotype:** *MATa leu2-3,112 ura3-1 trp1 his3-11 ade2 can1-100, ste50::ura3* nach 5FOA-Selektion, *ssk1::loxP-kanMx-loxP* (Cre-Rekombinase) *fus3::loxP-KAN MX-loxP*4) **Systematic name of ORF:** YBL016W *FUS3* chromosome II

Chromosomal coordinates: 192454 - 193515 size of ORF: 1061 (bp)

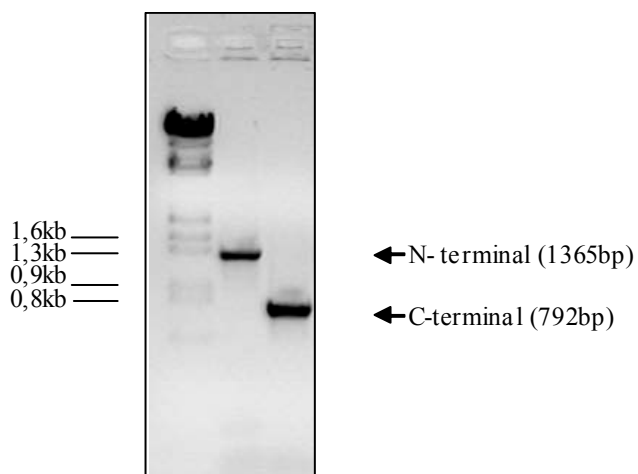
**Replacement Strategy:**() SFH-PCR () LFH-PCR () cloned replacement cassetteReplacement marker: *loxP-KAN MX-loxP* Position and number of bp replaced from ORF (A of ATG = 1). From 1 to 1061 replaced: 1061 (bp)

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

## B. Verification of gene replacement

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

Primer	Primer-Sequence	Sizes of PCR-fragment
A1 (A116FUS3-800P)	5'- CCC GAG CTC GGA AAA AGA GTA CGG TAG TTG - 3'	
A2 (A210FUS3-Term)	5'- CGC GTC CTC AGC GGC TAA TAC GTA -3'	
K2 (3KAN)	5'- CGC ACC TGA TTG CCG ACA TTA TCG-3'	A1-K2: 1365bp
K3 (4KAN)	5'- CGG TTT GGT TGA TGC GAG TGA TTT T -3'	K3-A2: 792bp

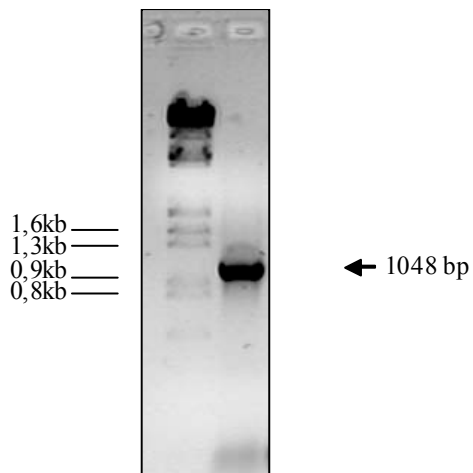




## DATA DOCUMENTATION SHEET 15

**Origin****A. Identification of gene**1) **Label:** HF932) **Strain background:** W303-1A, haploid3) **Genotype:** *MATa leu2-3,112 ura3-1 trp1 his3-11 ade2 can1-100, ste50::ura3* nach 5FOA-Selektion**Created one**1) **Label:** HCH352) **Strain background:** W303-1A, haploid3) **Genotype:** *MATa leu2-3,112 ura3-1 trp1 his3-11 ade2 can1-100, ste50::ura3* nach 5FOA-Selektion, Myc-*STE50::URA3***(x) Analytical PCR** (provide copy of gel and indicate size marker)

Primer	Primer-Sequence	Sizes of PCR-fragment
A1 (A72rec1-ste50)	5'- GAA TTC GAT ATC AAG CTT ATC GAT ACC GTC GAC AAT GGA GGA CGG TAA ACA GGC CA -3'	
K2 (A73-rec2-ste50)	5'- GCG TGA CAT AAC TAA TTA CAT GAC TCG AGG TCG ACT TAG AGT CTT CCA CCG GGG GT -3'	A1-K2: 1048bp



## 8 Abkürzungen

AD	Aktivierungsdomäne
ADE	Adenin
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
3-AT	3-Amino-1H-1,2,4-triazole
BCIP	Brom-Chlor-Indolylphosphat
bP	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
CEN	Centromer
CIP	Calf Intestine alkaline Phosphatase
cAMP	zyklisches Adenin- Monophosphat
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtBr	Ethidiumbromid
FRE	Filamentous response element
GAP	GTPase activating protein
GEF	Guanine nucleotide exchange factor
GST	Gluthation-S-Transferase
h	Stunde
HIS	Histidin
HMW	High-Molecular-Weight
HOG	High osmolarity glycerol
kb	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
LB	Luria-Bertani-Medium für <i>E. coli</i>
LEU	Leucin
M, mM, $\mu$ M	Molar, Millimolar, Mikromolar
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MgSO <sub>4</sub>	Magnesiumsulfat
min	Minute
ml, l, $\mu$ l	Milliliter, Liter, Mikroliter
NaCl	Natriumchlorid
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dinatriumhydrogenphosphat
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Natriumdihydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
NBT	Nitro-Blue-Tetrazoliumchlorid
OD	Optische Dichte
ONPG	2-Nitrophenyl- $\beta$ -D-Galaktopyranosid
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
pH	potentia Hydrogenii (Säurestärke)
PRE	pheromone response element
RAD	Ras association domain
RbCl <sub>2</sub>	Rubidiumchlorid
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
SC	Synthetic Complete
SD	Synthetisches Medium
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
STRE	stress response element
TEMED	N, N, N', N', Tetramethylethylendiamin

---

Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TRP	Tryptophan
URA	Uracil
Wt	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-Galaktopyranosid
YEPD	Hefe-Vollmedium
YNB	Yeast nitrogen base

---

## **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Massoud Ramezani-Rad für die Bereitstellung des Themas, die vielen anregenden Diskussionen und besonders für seinen Einsatz bei der Betreuung und Korrektur meiner Arbeit.

Herrn Prof. Dr. C. P. Hollenberg danke ich dafür, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat, in seinem Institut zu arbeiten.

Ich danke Herrn Prof. Dr. G. Büldt für die freundliche Übernahme des Ko-Referates.

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

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

Ganz besonders möchte ich den jetzigen und ehemaligen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Zheng Hu, Anja Saran, Nicolas Bernsmeier, Bernd Pothoff, Igo Spode, Waltraud Kuss, Ute Selan und Frauke Bühring für die freundschaftliche Aufnahme und die sehr gute Zusammenarbeit danken.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern sowie meiner Schwester Daniela, die mich stets unterstützt haben und auch in schwierigen Zeiten mit ihrer Geduld und ihrer moralischen Unterstützung eine große Hilfe waren.

---

## **Eidesstattliche Erklärung**

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, April 2005