



**„Charakterisierung des Rho GDI Rdi1  
in *Saccharomyces cerevisiae*“**

**Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität  
zu Kiel  
vorgelegt von**

**Christopher Tiedje**

**Kiel, September 2008**

**Referent/in:** .....

**Korreferent:** .....

**Tag der mündlichen Prüfung:** .....

**Zum Druck genehmigt: Kiel,** .....

**Der Dekan**

## **Erklärung**

Hiermit erkläre ich, Christopher Tiedje, die vorliegende Arbeit selbständig unter Anleitung meiner akademischen Lehrer angefertigt und verfasst zu haben. Es wurden keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet. Die Arbeit wurde bisher an keiner anderen Fakultät zur Begutachtung vorgelegt.

Ich erkläre hiermit zusätzlich, kein anderes Promotionsverfahren ohne Erfolg beendet zu haben und dass keine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades vorliegt.

Kiel, September 2008

Christopher Tiedje

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom 1.07.2005 bis zum 24.09.2008 am Institut für Biochemie der Christian-Albrechts-Universität Kiel in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Ursula Just angefertigt. Teile dieser Arbeit wurden in folgenden Artikeln veröffentlicht:

**Christopher Tiedje**, Daniel G. Holland, Ursula Just and Thomas Höfken. (2007). Proteins involved in sterol synthesis interact with Ste20 and regulate cell polarity. *Journal of Cell Science* 120, p 3613-3624.

**Christopher Tiedje**, Imme Sakwa, Ursula Just and Thomas Höfken. (2008). The Rho GDI Rdi1 regulates Rho GTPases by distinct mechanisms. *Molecular Biology of the Cell* 19, p 2885-2896.

**Inhaltsverzeichnis**

	<b>Seite</b>
<b>1. Zusammenfassung</b>	<b>8</b>
<b>1. Abstract</b>	<b>9</b>
<b>2. Einleitung</b>	<b>10</b>
2.1 Mechanismen der Zellpolarität in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	10
2.2 Zellpolarität und die Rolle von Rho GTPasen	10
2.3 Regulation und Aufbau von Rho GTPasen	12
2.4 Die Rho GTPase Cdc42 und seine Effektoren	15
2.4.1 Die p21-aktivierten Kinasen Ste20, Cla4 und Skm1	16
2.4.2 Gic1 und Gic2	18
2.4.3 Formine und weitere Effektoren	19
2.5 Der Einfluss von Rho1 auf Zellpolaritätsprozesse in <i>S. cerevisiae</i>	20
2.6 Funktionen der anderen Rho GTPasen in <i>S. cerevisiae</i>	22
2.7 Eigenschaften von Rho GDIs in <i>S. cerevisiae</i> und höheren Eukaryoten	22
2.7.1 Die Interaktion von Rdi1 mit Cdc42 und Rho1 in <i>S. cerevisiae</i>	23
2.7.2 Regulationsmechanismen von Rho GDI-Rho GTPase Interaktionen	25
2.8 Aufgabenstellung	27
<b>3. Materialien und Methoden</b>	<b>28</b>
3.1 Materialien	28
3.1.1 Verbrauchsmaterialien	28
3.1.2 Geräte und Hilfsmittel	28
3.1.3 Antikörper	29
3.1.3.1 Primäre Antikörper	29
3.1.3.2 Sekundäre Antikörper	30
3.1.4 Kits	30
3.1.5 Häufig verwendete Pufferlösungen	30
3.1.6 Chemikalien, Enzyme und Sonstiges	31
3.1.7 Oligonukleotide (Primer)	32
3.1.7.1 Genspezifische Primer	32
3.1.7.2 Sequenzierungsprimer	36
3.1.8 Plasmide	36
3.1.9 <i>E. coli</i> Stämme	38
3.1.10 <i>S. cerevisiae</i> Stämme	38
3.1.11 Nährmedien	42
3.2 Molekularbiologische Methoden	44
3.2.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)	44
3.2.2 Rekombinante Fusions-PCR	45
3.2.3 Aufreinigung von DNA aus PCR-Ansätzen	46
3.2.4 Restriktionsverdau	46
3.2.5 Agarosegelelektrophorese	47
3.2.6 Agarosegel-DNA-Extraktion	47
3.2.7 Ligation	48
3.2.8 Transformation von <i>E. coli</i>	48
3.2.8.1 Chemische Transformation	49
3.2.8.2 Elektroporation	49
3.2.8.3 Blau-Weiß-Selektion	50
3.2.9 Isolierung von DNA aus <i>E. coli</i>	51
3.3 Proteinbiochemische Methoden	51
3.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	51

	<b>Seite</b>
3.3.2 Western-Blot	51
3.3.3 Stripping von Western-Blot Membranen	53
3.3.4 Bradford Proteinbestimmung	53
3.3.5 Immunpräzipitation	53
3.3.6 Auftrennung von Cytosol und Membranen durch Ultrazentrifugation	54
3.3.7 Dephosphorylierung von Proteinen	55
3.3.8 Expression und Aufreinigung rekombinanter Proteine	56
3.3.8.1 Expressionsüberprüfung rekombinanter Proteine in <i>E. coli</i>	57
3.3.8.2 His <sub>6</sub> -Aufreinigung rekombinanter Proteine	57
3.3.8.3 GST-Aufreinigung	59
3.3.9 <i>In vitro</i> Bindung rekombinanter Proteine	60
3.3.10 Kinase-Assay	60
3.4 Hefe-Methoden	61
3.4.1 Herstellung kompetenter Hefezellen	61
3.4.2 Hefe-Transformation	62
3.4.3 Split-Ubiquitin-Technik und Transformation großer Zellzahlen mit Gen-Bibliotheken	63
3.4.4 Herstellung von Proteinrohextrakten aus <i>S. cerevisiae</i>	65
3.4.4.1 TCA-Fällung von Hefeproteinen	66
3.4.4.2 Lysatherstellung mittels Glasperlen-Aufschluss	66
3.4.5 Isolierung chromosomaler Hefe-DNA	68
3.4.6 Isolierung von Hefe-Plasmid DNA	69
3.4.7 Genmarkierung und Gendelektionen durch gezielte homologe Rekombination	70
3.4.7.1 Deletion und Markierung von Proteinen durch Rekombination mit PCR-Kassetten	70
3.4.7.2 Markieren von Genen durch Integration von Plasmiden in das Hefegenom	74
3.4.8 Herstellung von Verdünnungsreihen	75
3.4.9 Fluoreszenzmikroskopie von Hefezellen	75
3.4.10 Färbung des Aktincytoskeletts mit Rhodamin-Phalloidin	76
3.4.11 Analyse des filamentösen Wachstums von haploiden Hefezellen	77
3.4.12 Bgl2-Sekretionsassay	78
3.4.13 Zellzyklussynchronisation mittels Metaphasearrest	79
<b>4. Ergebnisse</b>	<b>80</b>
4.1 Die Interaktion von Rdi1 mit Rho GTPasen	80
4.1.1 Die Spezifität von Rdi1 gegenüber den sechs Rho GTPasen	80
4.1.1.1 Markierung der sechs Rho GTPasen mit integrativen Plasmiden	80
4.1.1.2 Verteilung der Rho GTPasen	83
4.1.1.3 Bestimmung der Spezifität von Rdi1 mit Co-Immunpräzipitationen	85
4.1.1.4 Bestimmung der Spezifität von Rdi1 bei Überexpression der Rho GTPasen	87
4.1.1.5 Membranextraktion der Rho GTPasen durch <i>RDII</i> -Überexpression	88
4.1.1.6 Bestätigung der Rdi1-Rho4 Interaktion durch Mikroskopieexperimente	90
4.1.1.7 Abhängigkeit der Membranextraktion vom Aktivitätsstatus der Rho GTPasen	92
4.1.2 Funktionen von Rdi1	94
4.1.2.1 Analyse des haploiden invasiven Wachstums	94
4.1.2.2 Lokalisation von Rdi1	96

	<b>Seite</b>
4.1.2.3 Letalität durch starke <i>RDII</i> -Überexpression	97
4.2 Regulation der Rdi1-Cdc42/Rho1 Interaktion durch die p21-aktivierte Kinase Cla4	100
4.2.1 Bindung von Rdi1 an Cdc42 und Rho1 nach der Überexpression der p21-aktivierten Kinasen Cla4, Ste20 und Skm1	100
4.2.2 Der Einfluss von Cla4 auf die Verteilung von Rho1, Rho4 und Cdc42	101
4.2.2.1 Analyse nach der Überexpression von <i>CLA4</i>	101
4.2.2.2 Analyse im <i>CLA4</i> -Deletionsstamm	104
4.2.2.3 Analyse während gleichzeitiger Überexpression von <i>RDII</i> und <i>CLA4</i>	105
4.2.3 Phosphorylierung von Rdi1 durch Cla4 im Kinase-Assay	106
4.3 Rdi1-Rho4: ein neuer Mechanismus steuert die Regulation von Rho4	109
4.3.1 Die Überexpression von Rdi1 führt zum Abbau von Rho4	109
4.3.1.1 Starke Reduktion der Rho4 Proteinmengen durch <i>RDII</i> -Überexpression	109
4.3.1.2 Die Deletion von <i>RDII</i> führt zu erhöhten Rho4 Proteinmengen	109
4.3.1.3 Stabilität von Rho4	110
4.3.2 Der Abbau von Rho4 durch Ygk3	111
4.3.2.1 Analyse der Proteinmengen nach <i>YGK3</i> -Überexpression	111
4.3.2.2 Einfluss von Ygk3 auf Cdc42 und Rho1	113
4.3.2.3 Identifizierung einer potentiellen PEST-Domäne in Rho4	114
4.3.2.4 Phosphorylierung von Rho4 durch Ygk3 im Kinase-Assay	115
4.3.3 Inhibition des Rdi1-induzierten Rho4 Abbaus	117
4.3.3.1 Inhibition des proteasomalen Abbauweges mit MG-132	117
4.3.3.2 Abhängigkeit des Rdi1-induzierten Rho4-Abbaus von der E3-Ubiquitin-Ligase Rsp5	118
4.3.3.3 Inhibition des vakuolären Abbauweges	119
4.3.4 Die Expression von Rho4 während des vegetativen Zellzyklus	120
4.4 Identifizierung neuer Rdi1 Interaktoren	121
4.4.1 Suppressoren der Rdi1-induzierten Letalität aus einem Multicopy-Screen	121
4.4.2 Split-Ubiquitin-Screen mit Rdi1 als Köderprotein	124
4.4.2.1 Überprüfung der Expression des Rdi1-Cub-Konstruktes	124
4.4.2.2 Split-Ubiquitin-Screen mit Rdi1 als Köderprotein	125
4.4.3 Analyse der Interaktion von Rdi1 mit Sec6	128
4.4.3.1 Die Interaktion von Rdi1 mit Sec6 im Split-Ubiquitin-System	128
4.4.3.2 Wechselwirkungen von Rdi1 mit anderen Komponenten des Exocystkomplexes	129
4.4.3.3 Bindung von Rdi1 an Sec6 im <i>in vitro</i> Bindungsexperiment	131
4.4.3.4 Funktionelle Analyse der Rdi1-Sec6 Interaktion	132
4.4.3.5 Analyse der Sekretion während <i>RDII</i> -Überexpression und im <i>RDII</i> -Deletionsstamm	134
4.5 Die Interaktion von Ste20 mit Komponenten des Ergosterolsynthesewegs	136
4.5.1 Die Interaktion von Ste20 mit Cbr1 und Ncp1	136
4.5.2 Die Interaktion von Ste20 mit Erg4	137
4.5.3 Phosphorylierung von Cbr1, Ncp1 und Erg4 durch Ste20 im Kinase-Assay	138
<b>5. Diskussion</b>	<b>141</b>
5.1 Die Interaktion von Rdi1 mit Rho GTPasen	141
5.1.1 Die Spezifität von Rdi1 gegenüber den sechs Rho GTPasen	141
5.1.2 Funktionen von Rdi1	144
5.2 Regulation der Interaktion von Rdi1 mit Rho1 und Cdc42 durch Cla4	146

	<b>Seite</b>
5.2.1 Die Bindung von Rdi1 an Cdc42 und Rho1 unter dem Einfluss der p21-aktivierten Kinasen Cla4, Ste20 und Skm1	146
5.2.2 Phosphorylierung von Rdi1 durch Cla4	147
5.3 Analyse der Rho4-Rdi1 Interaktion	149
5.3.1 Abbaumechanismen von Rho4	149
5.3.2 Eigenschaften von Rho4	152
5.4 Screening nach neuen Rdi1-Interaktoren	153
5.4.1 Suppressoren der Rdi1-induzierten Letalität	153
5.4.2 Split-Ubiquitin-Screen mit Rdi1 als Köderprotein	154
5.4.3 Analyse der Interaktion von Rdi1 mit Sec6	154
5.5 Die Interaktion von Ste20 mit Proteinen der Ergosterolsynthese	156
5.5.1 Die Bindung von Ste20 mit Cbr1, Ncp1 und Erg4 in Pulldown-Assays	156
5.5.2 Phosphorylierung von Cbr1, Ncp1 und Erg4 durch Ste20 im Kinase-Assay	157
<b>6. Literaturverzeichnis</b>	<b>159</b>
<b>7. Anhang</b>	<b>169</b>
7.1 Abkürzungsverzeichnis	169
7.2 Tabellarischer Lebenslauf	171
7.3 Danksagung	172

## 1. Zusammenfassung

Rho GTPasen besitzen in allen Organismen eine herausragende Rolle bei der Etablierung und Aufrechterhaltung von Zellpolarität. Sie werden u.a. von Rho GDIs (Rho Guaninnukleotid-Dissoziationsinhibitor) reguliert, welche die Fähigkeit besitzen, den hydrophoben Membrananker von Rho GTPasen zu binden. Dadurch können sie Rho Proteine von Membranen extrahieren. In der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* wird mit Rdi1 ein einziger, für Rho GTPasen spezifischer GDI exprimiert. Das Ziel der Arbeit war die umfassende Charakterisierung von Rdi1 und die Analyse neuer Regulationsmechanismen an denen Rdi1 beteiligt ist.

Es zeigte sich zunächst, dass Rdi1 spezifisch an Cdc42, Rho1 und Rho4 binden konnte und diese Rho GTPasen von Membranen extrahierte. Die anderen drei Rho GTPasen Rho2, Rho3 und Rho5 interagierten nicht mit Rdi1. Es wurde deutlich, dass die Bindung von Rdi1 an Cdc42 und Rho1 von der PAK (p21-aktivierten Kinase) Cla4 abhängig war. Da Cla4 ein direktes Effektormolekül von Cdc42 ist, handelte es sich wahrscheinlich um einen positiven Rückkopplungsprozess, der die Rdi1-Cdc42/Rho1 Komplexe reguliert. Für die Regulation von Rho4 konnte ein neuer Mechanismus identifiziert werden. Die Extraktion von Rho4 durch Rdi1 führte hierbei zum selektiven Abbau des Rho Proteins durch das Proteasom und die Vakuole. Der Abbauprozess hing zusätzlich von der GSK-3 $\beta$  Glykogen-Synthase-Kinase Ygk3 ab. Durch Fluoreszenzmikroskopieexperimente wurde deutlich, dass Rho4, wie Cdc42 und Rho1, an Orten polarisierten Wachstums lokalisierte. Dies beinhaltete beispielsweise die Knospenhalsregion und den Ort des zukünftigen Knospenwachstums. Ausgenommen war jedoch die Spitze der Paarungsprojektion. In weiteren Studien wurde unter Zuhilfenahme von verschiedenen Screening-Techniken das Hefegenom hinsichtlich neuer Interaktoren von Rdi1 analysiert. In einem Split-Ubiquitin-Screen konnte, neben verschiedenen anderen putativen Interaktoren, die Exocystkomponente Sec6 als ein mutmaßlicher Interaktor von Rdi1 identifiziert werden. Die Interaktion von Rdi1 mit Sec6 konnte in einem *in vitro* Bindungsexperiment bestätigt werden. Unabhängig von der Charakterisierung des Rho GDI Rdi1, sollten die in einem Split-Ubiquitin-Screen identifizierten potentiellen Interaktionen der PAK Ste20 mit Proteinen, die eine Rolle bei der Ergosterolsynthese in *S. cerevisiae* spielen, in *in vitro* Bindungsexperimenten bestätigt werden. Dabei konnten die Interaktionen von rekombinantem Ste20 mit Erg4 und Cbr1 dargestellt werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit tragen zu einem besseren Verständnis der molekularen Grundlagen der Regulation von Rho GTPasen und allgemeinen Zellpolaritätsprozessen bei.

## 1. Abstract

Rho GTPases play a pivotal role in the establishment and maintenance of cell polarity in all eukaryotic organisms. They are regulated by Rho GDIs (Rho guaninnucleotide dissociation inhibitors), which have the ability to bind the prenylated anchor of Rho GTPases and are therefore capable to extract them from membranes. Rdi1 is the only GDI specific for Rho proteins that is expressed in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. It was the aim of this work to further characterize Rdi1 and to identify novel regulatory mechanisms in which Rdi1 is involved.

The analyzes revealed that Rdi1 specifically binds to Cdc42, Rho1 and Rho4 and is able to extract these proteins from membranes. The other three Rho GTPases Rho2, Rho3 and Rho5 did not interact with Rdi1. It became clear that the binding of Rdi1 to Cdc42 and Rho1 depends on the PAK (p21-activated kinase) Cla4. As Cla4 is a direct effector of Cdc42, it seems likely that a positive-feedback loop regulates the Rdi1-Cdc42/Rho1 complexes. A new regulation was identified for the regulation of Rho4. Extraction of Rho4 by Rdi1 led to the subsequent degradation of the Rho protein by the proteasome and by vacuolar processes. This degradation process did also depend on the GSK-3 $\beta$  glycogen-synthase-kinase Ygk3. Using fluorescence microscopy analysis, it was possible to show that Rho4 localizes to sites of polarized growth, like the presumptive bud site and the tip of the bud, similar to Cdc42 and Rho1. In contrast, Rho4 did not accumulate at the tip of the mating projection like other cell polarity proteins. In further studies the yeast genome was screened for novel Rdi1 interactors. By using the split-ubiquitin technique, different putative interactors of Rdi1 were identified. Sec6, as a component of the exocyst complex, was the most promising potential interactor. The binding of Sec6 to Rdi1 was confirmed by an *in vitro* pull-down experiment. In another project it was the aim to confirm possible interactions of the PAK Ste20 with proteins that were identified in a split-ubiquitin-screen and are involved in the ergosterol synthesis of *S. cerevisiae*. *In vitro* binding experiments revealed the interactions of recombinant Ste20 with Erg4 and Cbr1.

The results of this work contribute to a better understanding of the molecular mechanisms of Rho GTPase regulation and of general cell polarity processes.

## 2. Einleitung

### 2.1 Mechanismen der Zellpolarität in *Saccharomyces cerevisiae*

Zellpolarität spielt eine essentielle Rolle in Entwicklungs- und Wachstumsprozessen nahezu aller Eukaryoten. Sie ist wichtig für Prozesse wie Nährstofftransport, Neuritenwachstum, Zellmotilität, dem intrazellulären Transport von Organellen in polarisierten Epithelzellen und bei der asymmetrischen Zellteilung (Johnson, 1999; Etienne-Manneville und Hall, 2002; Jaffe und Hall, 2005; Park und Bi, 2007). Der Vorgang der Zellpolarisation folgt dabei einem generellen Mechanismus, der nach einem festgelegten Muster abläuft. Nach der räumlichen Festlegung des Ortes des polarisierten Wachstums geben Signalmoleküle diese räumliche Information an „downstream“ Komponenten weiter, die für eine asymmetrische Verteilung des Cytoskeletts verantwortlich sind. Diese so etablierte Polarität wird anschließend durch gerichtete Sekretion von Molekülen, die für das weitere Wachstum an der zuvor ausgewählten Stelle benötigt werden, verstärkt (Drubin und Nelson, 1996; Park und Bi, 2007). Aus einer Reihe von Studien, die mit verschiedensten Modellorganismen durchgeführt wurden, ist deutlich geworden, dass bei diesen Prozessen die kleinen Rho GTPasen eine zentrale Rolle spielen (Jaffe und Hall, 2005; Park und Bi, 2007).

Diese Prozesse sind bislang in der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*, die auch als Knospungs-Hefe bezeichnet wird, sehr gut verstanden worden. Hierdurch und aufgrund der Tatsache, dass Hefezellen sehr einfach genetisch modifiziert werden können, lassen sich diese Prozesse besonders gut und einfach untersuchen (Pruyne und Bretscher, 2000; Etienne-Manneville, 2004).

### 2.2 Zellpolarität und die Rolle von Rho GTPasen

Die Grundlagen für die Analyse von Prozessen der Zellpolarität in *S. cerevisiae* bilden die drei Arten polarisierten Wachstum, die Hefezellen, je nach Stimulus, eingehen können (Abbildung 2.2.1). Ausgehend von haploiden Zellen beobachtet man im vegetativen Lebenszyklus die Verdoppelung der Zellen durch Knospung, wenn die isotrop wachsenden Zellen eine kritische Größe überschreiten (Etienne-Manneville, 2004). Außerdem können Zellen unter Nährstoffmangel in ein filamentöses Wachstum übergehen (Pruyne und

Bretscher, 2000; Park und Bi, 2007). In diploiden Zellen wird dieses Wachstum als Pseudohyphenwachstum und in haploiden Zellen als invasives Wachstum bezeichnet (Palecek et al., 2002). Als dritte Form des polaren Wachstums bezeichnet man die Ausbildung einer Paarungsprojektion haploider Zellen durch Stimulation mit einem Paarungspheromon. Dabei lassen sich die Zellen, welche entweder als a- oder  $\alpha$ -Zelltypen vorliegen, mit dem Paarungshormon des entgegengesetzten Typs stimulieren. Die Zellen unterschiedlicher Typen können unter diesen Bedingungen zu einer diploiden Zelle fusionieren (Park und Bi, 2007).

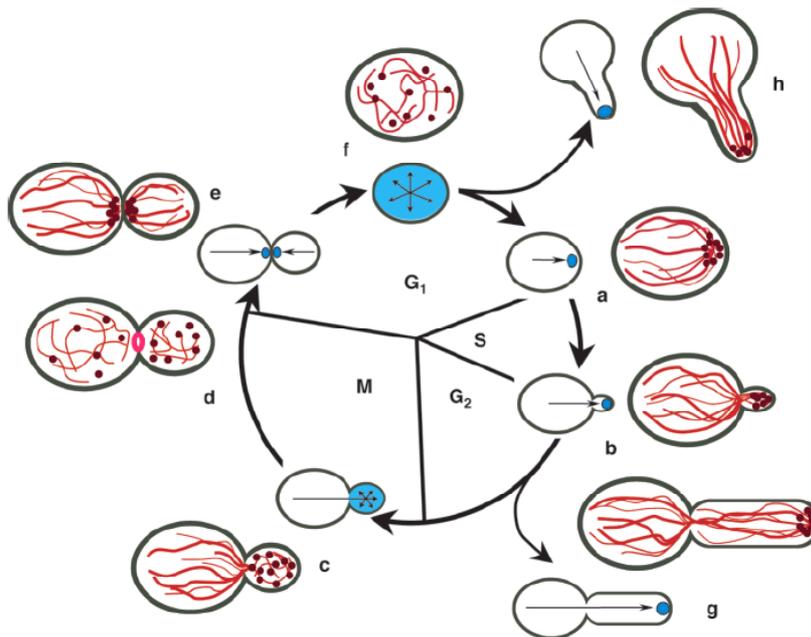


Abbildung 2.2.1: Etablierung von Zellpolarität durch die Rekrutierung der kleinen Rho GTPase Cdc42 (blau). Effektoren von Cdc42 organisieren die Orientierung des Aktincytoskeletts, welches aus Aktinkabeln (rot) und Aktinpatches (braun) besteht. Das Aktincytoskelett führt sekretorische Vesikel, die das polarisierte Wachstum verstärken, zu Orten des polarisierten Wachstums wo sie dann akkumulieren (blau). Zu Beginn eines neuen Zellzyklus ( $G_1$ -Phase) wird eine Knospungsstelle ausgewählt (a), an der Cdc42 akkumuliert. Dies führt zum frühen Knospnwachstum (S- bis  $G_2$ -Phase) in Richtung der Knospenspitze (b). Die gleichmäßige Verteilung von Cdc42 auf der Knospensoberfläche führt zum isotropen Wachstum der Knospe beim Übergang von der  $G_2$ - zur M-Phase (c). Nach dem Abschluss des Knospnwachstums verteilen sich die Aktinpatches und die Aktinkabel. Daraufhin formt sich ein cytotkinetischer Ring. Dieser Ring löst sich nach der Mitose wieder auf (d). (e) Cdc42 sorgt für eine Reorganisation des Aktins, so dass neue Zellwand zwischen Mutter- und Tochterzelle synthetisiert werden kann. Die Mutterzelle beginnt nach der Abspaltung der Tochterzelle mit erneuter Knospung. Die Tochterzelle wächst nach der Trennung von der Mutterzelle für einen längeren Zeitraum isotrop in alle Richtungen (f). Unter Nährstoffmangel können Hefezellen in ein filamentöses Wachstum übergehen, welches sich dadurch auszeichnet, dass die Zellen beim  $G_2$ -M-Phase Übergang stark in Richtung der Knospe elongieren (g). Durch Zugabe von Paarungspheromonen arretieren haploide Hefezellen in der  $G_1$ -Phase. Cdc42 wird dabei an der Spitze der sich ausbildenden Paarungsprojektion polarisiert (h). Die Abbildung stammt aus Pruyne und Bretscher (2000).

In *S. cerevisiae* werden sechs verschiedene Rho GTPasen exprimiert (Rho1, 2, 3, 4, 5 und Cdc42). Von diesen ist Cdc42 am besten charakterisiert. Bei polaren Wachstumsprozessen sind Cdc42 und als Folge daraus das Aktincytoskelett polar, also asymmetrisch verteilt (Pryune und Bretscher, 2000; Park und Bi, 2007). Ausgehend vom Start eines neuen Zellzyklus einer Zelle, die isotrop wächst, wird zum Ende der G<sub>1</sub>-Phase der Ort des Knospenswachstums festgelegt. Dort wird zunächst lokal Cdc42 polarisiert. Im Zuge dessen wird das Aktincytoskelett umorganisiert, so dass die Aktinkabel und die Aktinpatches zu der gleichen Stelle hin polarisieren, wo Cdc42 polarisiert vorliegt. Später sind die Aktinkabel der Mutterzelle immer noch polarisiert, während die Aktinkabel und die Aktinpatches der Knospe wenig organisiert vorliegen. Von der G<sub>1</sub>- bis zur G<sub>2</sub>-Phase wächst die Knospe apikal in eine Richtung. Erst beim anschließenden Übergang von der G<sub>2</sub>- zur M-Phase wächst die Knospe durch die Verteilung von Cdc42 isotrop, also gleichmäßig in alle Richtungen. Die Knospe gewinnt nun deutlich an Größe. Am Ende der M-Phase bildet sich zwischen Mutter- und Tochterzelle ein kontraktiler F-Aktin-Ring aus. Nach der Kontraktion polarisiert sich in Mutter- und Tochterzelle das Aktincytoskelett in Richtung der ehemaligen Knospenhalsregion, so dass die Zellwandsynthese an dieser Stelle vorangebracht werden kann (Pruyne und Bretscher, 2000).

Alternativ kann eine haploide Zelle durch Zugabe eines Paarungspheromons und dem daraus resultierenden Eingehen eines polaren Prozesses in der G<sub>1</sub>-Phase arretieren. Dabei wird in Richtung der höchsten Pheromonkonzentration eine Paarungsprojektion ausgebildet (Kron und Gow, 1995). In diese Richtung werden auch das Aktincytoskelett, Cdc42 und andere Zellpolaritätsproteine polarisiert. Zudem können haploide Zellen in der G<sub>2</sub>-Phase durch Nährstoffmangel das apikale Wachstum verlängern und demnach sehr lang gezogene Tochterzellen ausbilden und in diesem Zustand arretieren (Madhani und Fink, 1998).

### 2.3 Regulation und Aufbau von Rho GTPasen

Rho GTPasen besitzen die fundamentale Eigenschaft entweder in einem inaktiven Zustand (GDP-gebunden) oder aktiven Zustand vorzuliegen (GTP-gebunden), der es ihnen erlaubt ihre Effektorproteine zu beeinflussen (Etienne-Manneville und Hall, 2002; Jaffe und Hall, 2005; Park und Bi, 2007). Die Rho GTPasen gehören zur Superfamilie der Ras-Proteine. Sie sind dabei von der Hefe bis zum Menschen bezüglich Sequenz und Funktion sehr konserviert und haben in den meisten Fällen ein Molekulargewicht von etwa 25 kDa (Johnson, 1999).

Rho GTPasen werden durch ein Set von Proteinen reguliert, die eine genaue räumliche und zeitliche Regulation dieser molekularen Schalter möglich machen. Der Wechsel zwischen dem GDP- und GTP-gebundenen Zustand wird dabei von GEFs (Guaninnukleotid-Austausch-Faktoren) reguliert. Dem gegenüber stehen die GAPs (GTPase-aktivierende Proteine), welche die geringe intrinsische GTPase Aktivität der Rho GTPasen derart erhöhen, dass die Proteine wieder in den GDP-gebundenen, also inaktiven Zustand, übergehen. Inaktive Rho GTPasen können mit einem Rho GDI (Guaninnukleotid-Dissoziationsinhibitor) einen cytosolischen Komplex ausbilden, der durch die Wirkung eines GDFs (GDI-Dissoziationsfaktors) aufgelöst werden kann (Etienne-Manneville, 2004; Jaffe und Hall, 2005; Park und Bi, 2007). Die Regulation von Rho GTPasen ist in Abbildung 2.3.1 zusammengefasst.

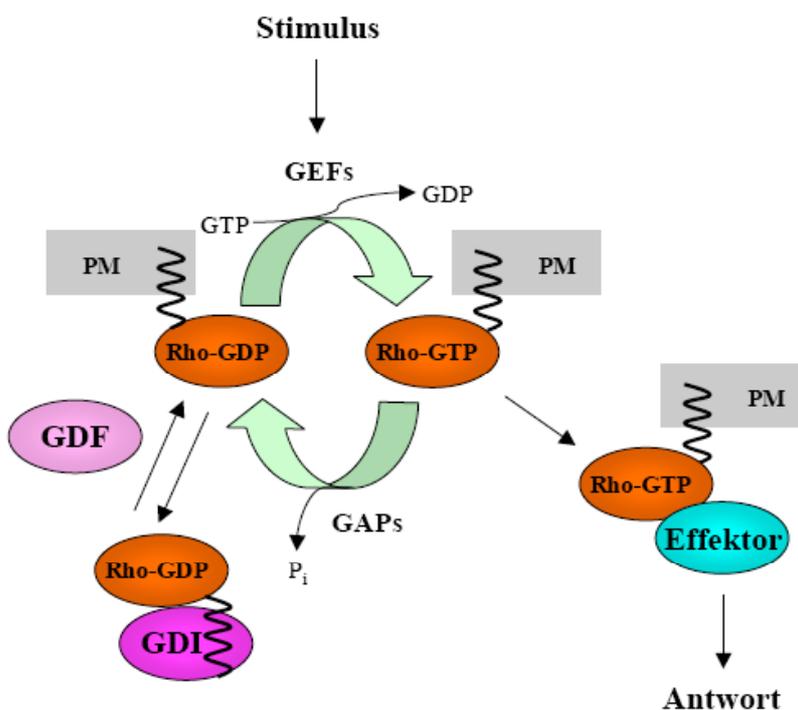


Abbildung 2.3.1: Regulation von Rho GTPasen. Rho GTPasen können durch Rho GDIs von Membranen extrahiert werden. Inaktive Rho GTPasen, die in einem cytosolischen Komplex mit ihrem Rho GDI vorliegen, können nach der Dissoziation des GDI wieder in die Membran inserieren. Die Dissoziation des GDI kann dabei durch einen GDI Displacement-Faktor (GDF) erfolgen. Nach Stimulation durch z.B. extrazelluläre Signale wird die GDP-gebundene Rho GTPase von einem GEF (Guaninnukleotid-Austausch-Faktor), aktiviert. Effektormoleküle können binden und eine zelluläre Antwort auf den Stimulus vermitteln. GAPs (GTPase-aktivierende Proteine), welche die intrinsische GTPase Aktivität der Rho GTPasen erhöhen, sorgen für die Inaktivierung des Rho Proteins. Die Abbildung basiert auf einer Darstellung aus Jaffe und Hall (2005).

Der Aufbau sämtlicher Rho GTPasen lässt sich vereinfachen und in unterschiedliche Domänen aufteilen. In Abbildung 2.3.2 ist diese Aufteilung für Cdc42 aus *S. cerevisiae* schematisch dargestellt. Die Switch I und II Domänen in der Nähe des N-Terminus enthalten eine potentielle Ras-ähnliche Effektor-domäne. Diese ermöglicht Interaktionen mit den p21-aktivierten Kinasen (PAKs) und anderen Effektoren. Die Rho GTPasen liegen dabei bevorzugt im GTP-gebundenen Zustand vor (Sells und Chernoff, 1997). Weiter in Richtung des C-Terminus von Cdc42 liegt die Rho-Insert Domäne, deren Funktion in *S. cerevisiae* bislang noch nicht komplett entschlüsselt werden konnte. Man geht allerdings zumindest für humanes Cdc42 davon aus, dass der etwa 13 Aminosäuren lange Abschnitt für die Interaktion mit dem Rho GDI und /oder IQGAPs, Effektoren von Cdc42 in Eukaryoten verantwortlich ist (McCallum et al., 1996; Wu et al., 1997). Als zentrales Element liegt kurz vor dem C-terminalen Ende von Cdc42 eine polybasische Region (Aminosäuren <sup>183</sup>KKSKK<sup>187</sup>), die zum einen für die Bindung an den Rho GDI und zum anderen für Membranassoziation notwendig ist. In direkter Nachbarschaft dazu liegt terminal die CAAX Box (Aminosäuren <sup>188</sup>CAIL<sup>191</sup>, A: ist dabei eine aliphatische und X ist eine beliebige Aminosäure), deren Cysteinrest durch die Anheftung eines hydrophoben Geranylgeranylrestes, vermittelt von der Geranylgeranyltransferase Cdc43, modifiziert wird und somit die Insertion in Membranen und die Bindung an den Rho GDI ermöglicht (Ziman et al., 1993). Besonders durch die Auflösung der Kristallstruktur eines Komplexes aus humanen Cdc42 und bovinen Rho GDI wurde deutlich, dass diese C-terminale Modifikation der Rho GTPase essentiell für die Wechselwirkung mit dem Rho GDI ist. Allerdings wurde auch klar, dass die Bindung von Wechselwirkungen mit den Switch I und II Domänen abhängt (Hoffman et al., 2000).

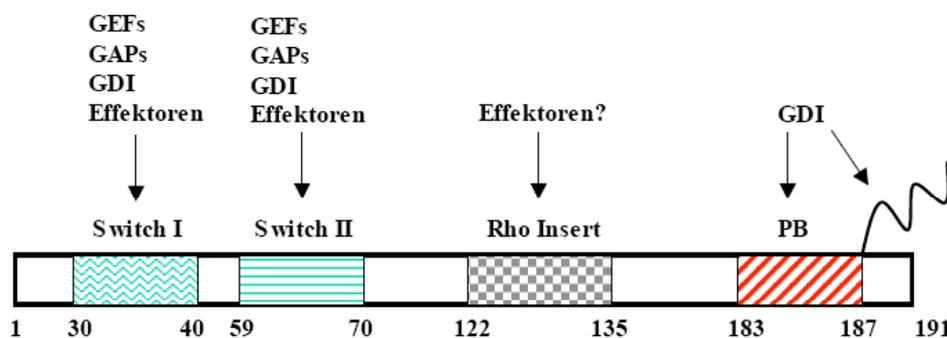


Abbildung 2.3.2: Interaktionsdomänen der Rho GTPasen aus *S. cerevisiae*. Exemplarisch sind die verschiedenen Domänen von Cdc42 und ihre potentiellen Interaktionspartner schematisch dargestellt. Auf die polybasische Region (PB) folgt die CAAX Box, deren Cysteinrest mit einem hydrophoben Geranylgeranylrest modifiziert wird, um eine Membranassoziation der Rho GTPase zu ermöglichen. Die Abbildung wurde nach Park und Bi (2007) erstellt.

## 2.4 Die Rho GTPase Cdc42 und seine Effektoren

Aus der Abbildung 2.2.1 wird die besondere Stellung der Rho GTPase Cdc42 deutlich, da sie an sämtlichen polaren Wachstumsarten und deren Etablierung bzw. Aufrechterhaltung direkt beteiligt ist, indem es Vorgänge wie die Aktincytoskelett-Organisation und Exocytose reguliert. Dies wird auch dadurch unterstützt, dass Zellen, denen temporär Cdc42 fehlte, nicht mehr polarisierten und als große runde Zellen vorlagen (Adams et al., 1990) und eine dauerhafte Deletion von Cdc42 nicht möglich ist (Inoue et al., 1999).

Die wichtigsten Faktoren, die den Wechsel zwischen GDP- und GTP-gebundenem Zustand von Cdc42 aus *S. cerevisiae* vermitteln, sind der GEF Cdc24, sowie die GAPs Rga1, Rga2, Bem3 und vermutlich auch Bem2. Als einziger Rho GDI in *S. cerevisiae* konnte Rdi1 identifiziert werden. Ein Protein mit GDF Aktivität, die sich gegen Cdc42-Rdi1 Komplexe richtet, wurde bisher nicht entdeckt (Johnson, 1999; Gulli und Peter, 2001; Park und Bi, 2007). Cdc42 ist in *S. cerevisiae* an der Plasmamembran und an inneren Membranen lokalisiert. Dort liegt es an Orten polarisierten Wachstums wie der Knospenspitze, der Knospenhalsregion oder der Spitze von Paarungsprojektionen vor (Ziman et al., 1993; Richman et al., 2002). Für die Anreicherung von Cdc42 an Orten polaren Wachstums sind die Membranassoziationssignale wie PB Domäne und Geranylgeranyl-Modifikation nicht ausreichend. Vielmehr muss die Rho GTPase in einem GTP-gebundenen Zustand vorliegen und eine Interaktion mit anderen Cdc42 Domänen möglich sein (Richman et al., 2002; Richman et al., 2004). Es wurde zusätzlich ein cytoplasmatischer Pool von Cdc42 bestimmt (Ziman et al., 1993). Cdc42 kann durch Rdi1 von der Plasmamembran und von Vakuolenmembranen extrahiert werden und einen cytosolischen Komplex bilden (Koch et al., 1997; Eitzen et al., 2001; Tcheperegine et al., 2005). Es zeigte sich, dass bei der Interaktion von humanem Rho GDI mit humanem Cdc42 die Rho GTPase sowohl im GDP- als auch im GTP-gebundenem Zustand sein kann (Nomanbhoy und Cerione, 1996).

Cdc42 vermittelt zahlreiche zelluläre Funktionen und hat dementsprechend eine große Anzahl an Effektorproteinen, die diese Funktionen auslösen. Diese Effektoren binden bevorzugt an Cdc42-GTP (Johnson, 1999). Wie die große Anzahl an zellulären Funktionen durch Bindung der Effektoren genau vermittelt wird oder welche exakten Mechanismen zugrunde liegen, ist nicht geklärt. Anhand einer neuen Studie wurde jedoch deutlich, dass die Bindungen von Effektormolekülen an Cdc42-GTP unterschiedlich große Änderungen der Komplex-Konformation ermöglichen und so je nach gebundenem Effektor unterschiedliche Antworten

vermittelt werden könnten (Phillips et al., 2008). Im Folgenden werden die wichtigsten Effektoren von Cdc42 samt ihrer regulatorischen Effekte vorgestellt.

#### 2.4.1 Die p21-aktivierten Kinasen Ste20, Cla4 und Skm1

Interessante Effektormoleküle von Cdc42 aus *S. cerevisiae* stellen die PAKs (p21-aktivierten Serin-/Threonin-Kinasen) Ste20, Cla4 und Skm1 dar. Ste20 und Cla4 sind ausführlich charakterisiert worden (Hofmann et al., 2004). Die Bindung der PAKs an Cdc42 erfolgt mit einer so genannten CRIB-Domäne (Cdc42/Rac interactive binding) (Leberer et al., 1997). Zusammen regulieren sie dabei vor allem das Cytoskelett während des vegetativen Zellzyklus und beim Knospnwachstum in der späten G<sub>1</sub>-Phase. Hinzu kommt das polarisierte Wachstum in der G<sub>2</sub>- und M-Phase (Hofmann et al., 2004). Ste20 wurde zunächst als Aktivator der MAPK-Kaskade entdeckt, welche bei der Ausbildung der Paarungsprojektion die Gentranskription und Cytoskelettstruktur beeinflusst (Johnson, 1999; Hofmann et al., 2004). Ste20 wird dabei direkt von der  $\beta$ -Untereinheit Ste4 des heterotrimeren G-Proteins, welches mit dem Pheromonrezeptors Ste2/Ste3 assoziiert, gebunden und aktiviert (Leeuw et al., 1998). Die Auswirkungen der Aktivierung der MAPK-Kaskade sind in Abbildung 2.2.1 (h) zu erkennen. Neben der polaren Ausrichtung von Cdc42 werden auch Aktinkabel und Aktinpatches sowie andere Polaritätsproteine polar organisiert. Konsistent mit diesen Ergebnissen ist die Tatsache, dass Zellen in denen *STE20* deletiert wurde, keine Paarungsprojektion ausbilden können (Cvrcková et al., 1995). Weitere MAPK-Kaskaden können von Ste20 beeinflusst werden. Über die MAPK Kinase Kinase Ste11 übt Ste20 Einflüsse auf Vorgänge der Osmotoleranz (de Nadal et al., 2002) und des filamentösen Wachstums (Mösch et al., 1996) aus. Hinzu kommt die Fähigkeit zur Einflussnahme auf die Aktinpolarisierung über die Regulation der Typ I Myosine Myo3 und Myo5 sowie das Formin Bni1 (Wu et al., 1996; Goehring et al., 2003). Hinzu kommen Funktionen von Ste20 bei der Wasserstoffperoxid-induzierten Apoptose und eine bisher undefinierte Rolle beim Austritt der Zellen aus der Mitose (Ahn et al., 2005; Höfken und Schiebel, 2002). Der Austritt der Zellen aus der Mitose wird bei den Effektoren Cla4 und Gic1/2 näher erläutert (Abschnitt 2.4.2).

Möglicherweise spielt Ste20 auch eine Rolle bei der Regulation der Ergosterolsynthese (Tiedje et al., 2007). Der direkte Einfluss von Lipiden auf Zellpolaritätsprozesse wurde von Bagnat und Simons (2002) demonstriert. Mit Hilfe des für Sterole spezifischen Farbstoffs

Filipin konnte gezeigt werden, dass Ergosterol, das in *S. cerevisiae* am häufigsten vorkommende Sterol, an der Spitze der Paarungsprojektion stark angereichert vorliegt und möglicherweise die Verankerung von Polaritätsproteinen begünstigt. An der Paarung beteiligte Proteine konnten aus Lipid-Rafts isoliert werden. Dies sind Mikrodomänen, in welchen Sterole und Sphingolipide angereichert vorliegen und so zu einer Kompartimentierung der Membran beitragen. Dies könnte demnach Zellpolaritätsprozesse beeinflussen (Rajendran und Simons, 2005). Störungen der Ergosterol- und der Sphingolipidbiosynthese führten demnach bei der Paarung zu einer verringerten Paarungseffizienz und zu Mislokalisationen von Membranproteinen.

In der hiesigen Arbeitsgruppe wurde vor Beginn dieser Arbeit ein Split-Ubiquitin-Screen durchgeführt (Johnsson und Varshavsky, 1994), der potentielle Interaktoren von Ste20 identifizieren sollte (persönliche Mitteilung T. Höfken). Dabei wurden mit Cbr1, Ncp1 und Erg4 Proteine identifiziert, die eine Rolle bei der Sterolsynthese (Daum et al., 1998) und mit Scs7 auch bei der Sphingolipidsynthese haben (Haak et al., 1997). In einer globalen Phosphorylierungsanalyse konnte zudem festgestellt werden, dass Ste20 mit Are2 ein Protein phosphoryliert (Ptacek et al., 2005), welches an der Sterolveresterung und Speicherung beteiligt ist (Yang et al., 1996). Da Ste20 ein direktes Effektormolekül von Cdc42 während der Paarung ist, lässt sich vermuten, dass Ste20 in diesem polaren Wachstumsprozess die Ergosterolsynthese regulieren könnte und so die Zusammensetzung der Plasmamembran beeinflusst.

Cla4 besitzt neben der CRIB-Domäne, eine PH (pleckstrin homolog) Domäne, welche die Bindung an Membranlipide ermöglicht (Hofman et al., 2004). Die Doppeldeletion von *CLA4* und *STE20* wirkt sich letal auf die Zellen aus (Cvrcková et al., 1995). Die einfache Deletion oder Überexpression von *CLA4* führt zur Ausbildung von elongierten Knospen (Cvrcková et al., 1995). Cla4 ist genau wie Ste20 in der Lage die Aktinpolarisierung über die Typ I Myosine Myo3 und Myo5 zu regulieren (Wu et al., 1997). Cla4 ist außerdem Teil negativen Rückkopplungssystems. Bis zum Wachstum der neuen Tochterknospe bleibt der GEF Cdc24 im Komplex mit Far1 im Nukleus. Im Zuge des Knospenwachstums wird die CDK Cdc28 aktiviert und phosphoryliert Far1, welches darauf abgebaut wird und die Translokation von Cdc24 zur Knospungsstelle zur Folge hat. Dort wird Cdc42 aktiviert und im Zuge dessen auch Cla4, welches dann Cdc24 phosphorylieren kann und dessen Aktivität so eindämmt (Gulli et al., 2000). Eine zentrale Eigenschaft von Cla4 stellt die Fähigkeit zur Interaktionen mit Septinen dar (Weirich et al., 2008). Dabei hat Cla4 die Fähigkeit diese GTPasen (Cdc10 und Cdc12) zu phosphorylieren (Versele und Thorner). Während der Cytokinese formen

Septine einen filamentösen Ring um den Knospenhals der Mutterzelle. Ist *CLA4* deletiert, so kann sich dieser Ring nicht korrekt ausbilden und lokalisieren (Cvrcková et al., 1995). Hinzu kommt die Tatsache, dass auch Cla4 eine wichtige Rolle beim Ausgang aus der Mitose besitzt, in dem es für die Phosphorylierung von Lte1 verantwortlich ist (Abbildung 2.4.1; Höfken und Schiebel, 2002; Seshan et al., 2002). Lte1 ist ein Aktivator der GTPase Tem1. Tem1 vermittelt durch Aktivierung einer Signaltransduktionskaskade den Austritt der Zelle aus der Mitose (Bosl und Li, 2005). Darüber hinaus kann Cla4 durch Phosphorylierung des Zellzyklus-Inhibitors Swe1 den Eintritt in die Mitose vorantreiben (Sakchaisri et al., 2004).

Die dritte PAK Skm1 ist im Vergleich zu Ste20 und Cla4 wenig charakterisiert (Martin et al., 1997). Wie Cla4 besitzt Skm1 eine PH-Domäne. Die Deletion von *SKM1* hat keine Auswirkungen auf das Zellwachstum und es konnte auch keine synthetische Letalität zusammen mit einer *STE20*- oder *CLA4*-Deletion detektiert werden. Die Überexpression von *SKM1* führt zur Ausbildung großer runder Zellen. Teilweise besitzen die Zellen multiple Knospen, was eine Rolle von Skm1 in der Morphogenese indiziert (Martin et al., 1997).

#### 2.4.2 Gic1 und Gic2

Zwei weitere wichtige Effektoren von Cdc42 sind Gic1 und Gic2 (Chen et al., 1997; Brown et al., 1997). Beide Proteine besitzen eine CRIB-Domäne, über die sie mit Cdc42 wechselwirken können. Die Effektoren sind polar verteilt und stehen unter Zellzyklus-abhängiger Kontrolle (Jaquenoud et al., 1998). Die Deletion eines der beiden Gene hat keine Auswirkungen auf das Zellwachstum. Dem gegenüber steht die Doppeldeletion, welche sich bei 37°C letal auswirkt und bei 33°C große Zellen ohne Knospe mit einer gestörten Aktinorganisation hervorbringt (Chen et al., 1997; Brown et al., 1997). Zusätzlich konnte eine polybasische Region in Gic1 identifiziert werden, die eine Assoziation mit bestimmten Lipiden ermöglicht (Orlando et al., 2008). Genau wie Ste20 und Cla4 kann Gic1 den Austritt der Zellen aus der Mitose vorantreiben (Höfken und Schiebel, 2004). Dabei unterbricht Gic1 die Wechselwirkung der GTPase Tem1 mit seinem Bub2-Bfa1 GAP-Komplex durch Interaktion mit Bub2. Die GTPase Tem1 wird dadurch aktiviert (Bosl und Li, 2005). Die Einflüsse der Cdc42-Effektoren Ste20, Cla4 und Gic1 auf den Ausgang der Zellen aus der Mitose sind in Abbildung 2.4.1 zusammengefasst.

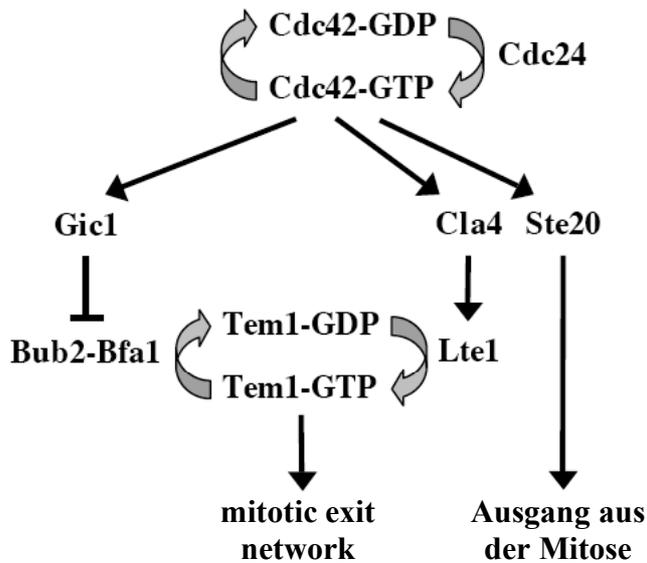


Abbildung 2.4.1: Der Ausgang aus der Mitose wird durch drei Effektoren von Cdc42 unabhängig voneinander ausgelöst. Cla4 fördert den Austritt aus der Mitose über die Aktivierung von Lte1, einem Aktivator der GTPase Tem1. Gic1 inhibiert den GAP-Komplex Bub2-Bfa1 von Tem1 und Ste20 fördert den Ausgang der Mitose durch einen unbekanntem Mechanismus. Die Abbildung wurde nach Höfken und Schiebel (2004) entworfen.

#### 2.4.3 Formine und weitere Effektoren

Die Formine Bni1 und Bnr1 sind in *S. cerevisiae* Effektorproteine von Cdc42 und auch von Rho1 (siehe Abschnitt 2.4). Formine vermitteln die lineare Elongation von Aktinfilamenten (Jaffe und Hall, 2005). Die Formine Bni1 und Bnr1 sind demnach für Bildung von Aktinkabeln während des polarisierten Wachstums, wie Knospenwachstum und Cytokinese, von essentieller Bedeutung (Park und Bi, 2007). Bni1 interagiert dabei direkt mit Cdc42 und, wie auch Bnr1, mit dem Profilin Pfy1 (Evangelista et al., 1997). Deletionen im *BNII* Gen verursachen Störungen im filamentösen Wachstum, welches unter bestimmten Bedingungen erfolgen kann (Johnson, 1999). Interessanterweise ist Bni1 auch eine Komponente des Polarisoms (Johnson, 1999). Das Polarisom ist ein multimerer Proteinkomplex, dessen Funktion noch nicht entschlüsselt werden konnte. Gesichert ist jedoch, dass der Komplex polar verteilt ist und polares Wachstum beeinflussen kann (Tcheperegine et al., 2005).

Das Gerüstprotein Igq1 ist ebenfalls ein Effektorprotein von Cdc42 (Johnson, 1999; Hofmann et al., 2004). Es vermittelt dabei die Assemblierung und Polarisierung von Aktin. Mit Bee1 lokalisiert ein weiteres Protein an Aktinpatches. Bee1 ist ein homologes Protein zu den WASP-Proteinen aus höheren Eukaryoten (Li, 1997). WASP-Proteine aktivieren dort

zusammen mit Cdc42 den Arp2/3 Komplex, welcher die Verzweigung von Aktinfilamenten vermittelt (Jaffe und Hall, 2005). Interessanterweise interagiert in Hefe Cdc42 nicht wie in höheren Eukaryoten direkt mit dem WASP-Protein Bee1 (Li, 1997).

Zuletzt wurde immer deutlicher, dass Cdc42 eine wichtige Rolle in Prozessen der Exocytose spielt. Im Zuge dessen konnte aufgedeckt werden, dass Cdc42-GTP direkt mit Sec3 interagiert (Zhang et al., 2001). Sec3 ist ein Bestandteil eines oktameren Proteinkomplexes, der auch als Exocystkomplex bekannt ist. Dieser Komplex ist für die Anheftung sekretorischer Vesikel an die Plasmamembran verantwortlich und somit wichtig für polare Sekretion während polaren Wachstums (Brennwald und Rossi, 2007).

## 2.5 Der Einfluss von Rho1 auf Zellpolaritätsprozesse in *S. cerevisiae*

Neben Cdc42 als vermutlich wichtigste Rho GTPase, spielt die Rho GTPase Rho1 ebenfalls eine übergeordnete Rolle in Zellpolaritätsprozessen. Wie Cdc42 interagiert Rho1 mit Rdi1 (Koch et al., 1997) und ist an Orten polaren Wachstums lokalisiert (Yamochi et al., 1994). Die Extraktion von Rho1 durch Interaktion mit Rdi1 aus der Vakuolenmembran konnte ebenfalls dargestellt werden (Eitzen et al., 2001). Im Gegensatz zu Cdc42, zeigte sich in einer anderen Studie und unter Verwendung eines anderen Versuchsansatzes, dass Rho1 im inaktiven GDP-gebundenen Zustand bei der Interaktion mit Rdi1 vorliegt (Koch et al., 1997). Genau wie Cdc42 ist Rho1 ein für die Zelle essentielles Protein (Inoue et al., 1999). Bislang konnten für Rho1 drei GEFs (Rom1, Rom2 und Tus1) und vier GAPs (Bem2, Lrg1, Sac7 und Bag7) identifiziert werden. Der Einfluss von Rho1 auf Zellpolaritätsprozesse lässt sich besonders an den Vorgängen der Zellwandsynthese, der Stress-Antwort, Aktinorganisation und an der Exocytose festmachen. An Stellen polarisierten Wachstums müssen die Zellwand und die Plasmamembran expandieren. Die Zellwand besteht zu ca. 50 bis 60 % (Trockengewicht) aus 1,3- $\beta$ -Glucanen und zu ca. 1 bis 2 % aus Chitin. Die anderen Bestandteile sind glykosolierte Mannoproteine und 1,6- $\beta$ -Glucane. *FKS1* und *FKS2* codieren für je eine Untereinheit der 1,3- $\beta$ -Glucan-Synthase, welche die Zellwandbestandteile synthetisiert. Unter normalen Wachstumsbedingungen wird hauptsächlich Fks1 exprimiert, während Fks2 unter Stressbedingungen oder während der Paarung exprimiert wird. Die Synthese von 1,3- $\beta$ -Glucanen wird dabei durch zwei voneinander unabhängigen Signaltransduktionswegen von Rho1 reguliert (Park und Bi, 2007). Aktiviertes Rho1 kann zum

einen unter normalen Bedingungen direkt mit Fks1 interagieren und dessen enzymatische Aktivität stimulieren (Drgonová et al., 1996). Beide Proteine colokalisieren dabei an Orten polaren Wachstums. Auf der anderen Seite kann Rho1 nach der Aktivierung mit der Protein Kinase C Pkc1 interagieren und eine MAPK Kaskade aktivieren, die in der Expression von Zellwand aufbauenden Genen wie *FKS1*, *FKS2* und *CHS3* mündet (Levin, 2005). Dieser Signaltransduktionsweg wird auch als cell wall integrity Signalweg bezeichnet. Über das Formin Bni1, welches für die Verknüpfung von Aktinmonomeren und Profilin zu Aktinkabeln verantwortlich ist und für die Cytokinese benötigt wird, kann Rho1, wie auch Cdc42, das Aktin organisieren (Evangelista et al., 1997). Dies kann ebenfalls direkt oder über den CWI Signalweg geschehen. Die Tatsache, dass Rho1 Aktin organisieren kann und somit gerichtete Exocytose zu Orten polaren Wachstums ermöglicht, wird durch die direkte Interaktion von Rho1 mit Sec3 verstärkt (Guo et al., 2001). Sec3 ist dabei eine Komponente des oktameren Exocystkomplexes, welcher für die Anheftung sekretorischer Vesikel an die Plasmamembran verantwortlich ist (Brennwald und Rossi, 2007; Park und Bi, 2007). Die Funktionen von Rho1 sind in Abbildung 2.5.1 zusammengefasst.

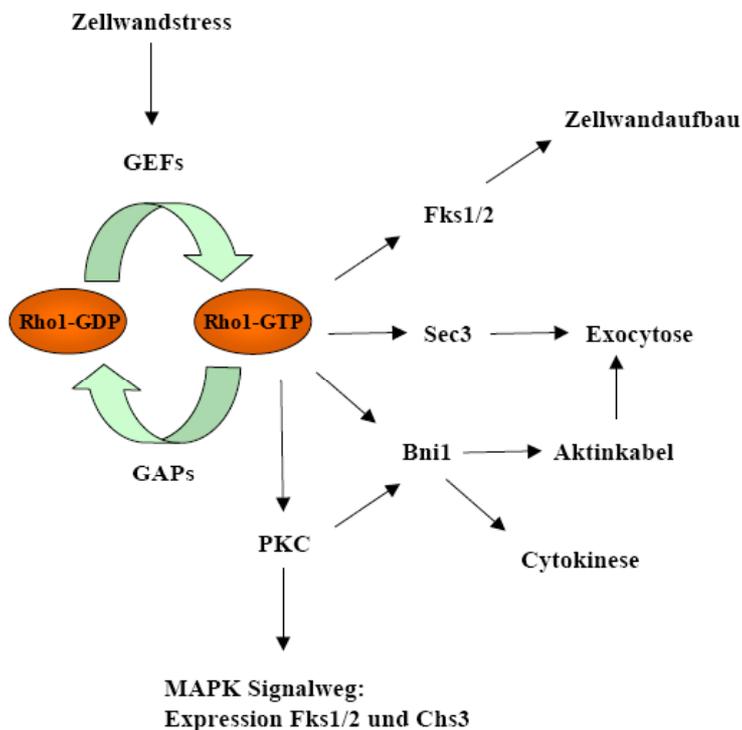


Abbildung 2.5.1: Die Rolle von Rho1 in Zellpolaritätsprozessen. Rho1 kann durch direkte Interaktion mit Fks1 oder über einen indirekten Signalweg (cell wall integrity Weg) den Aufbau einer neuen Zellwand vorantreiben. Durch Interaktion mit dem Formin Bni1 kann Aktin organisiert werden und somit Cytokinese und gerichtete Exocytose ermöglicht werden. Die Interaktion von Rho1 mit Sec3, einer Komponente des Exocystkomplexes, ist für das Andocken von Vesikeln an der Plasmamembran notwendig.

## 2.6 Funktionen der anderen Rho GTPasen in *S. cerevisiae*

In *S. cerevisiae* gibt es insgesamt sechs verschiedene Rho GTPasen (Cdc42, Rho1-5). Cdc42 und Rho1 stellen die Rho GTPasen dar, die am besten charakterisiert sind. Die anderen sind im Gegensatz zu Rho1 und Cdc42 nicht essentiell (Park und Bi, 2007). Nachfolgend sind alle bisher bekannten Funktionen von Rho2, Rho3 und Rho5 aufgeführt.

Die Rho GTPasen Rho2 und Rho3 sind im Gegensatz zu den anderen Rho GTPasen nicht nur geranyl-geranyliert, sondern zusätzlich am N-Terminus palmitoyliert (Roth et al., 2006). Über die Funktionen von Rho2 ist sehr wenig bekannt. Anhand von genetischen Interaktionen wird vermutet, dass Rho2 einige Funktionen mit Rho1 teilt und in der Lage ist das Aktincytoskelett durch bislang noch nicht identifizierte Mechanismen zu regulieren (Madaule et al., 1987).

Von Rho3 und Rho4 konnten mehrere funktionale Eigenschaften identifiziert werden, die mit Zellpolaritätsprozessen zu tun haben. Für beide Rho GTPasen konnte mit Rgd1 bislang ein GAP identifiziert werden (Doignon et al., 1999). Proteine, die eine GEF-Aktivität gegenüber Rho3 und Rho4 zeigen, wurden bisher nicht gefunden. Die Deletion von Rho4 hat keine Auswirkungen auf das Zellwachstum. Wird jedoch Rho3 deletiert, so verlangsamt sich das Wachstum dramatisch. Die Doppeldeletion ist letal, wobei große Runde Zellen mit kleinen Knospen entstehen und Aktin depolarisiert vorliegt. Diese Ergebnisse ließen den Schluss zu, dass die Proteine überlappende Funktionen besitzen (Matsui und Toh-e, 1992). Interessant sind die Interaktionen von Rho4 mit dem Formin Bnr1 (Imamura et al., 1997) und von Rho3 mit dem Typ V Myosin Myo2 und Exo70, einer Komponente des Exocystkomplexes (Robinson et al., 1999). Dies lässt vermuten, dass Rho3 und Rho4 eine Funktion im Vesikeltransport und beim Anheften der Vesikel an die Plasmamembran haben.

Rho5 besitzt eine ähnliche Effektor-domäne wie Cdc42. Rho5 kann bei hohen Temperaturen (37°C) die Aktindepolarisierung regulieren (Roumanie et al., 2001). Zudem besitzt Rho5 die Fähigkeit den Pkc1-abhängigen cell wall integrity Signalweg herunter zu regulieren (Schmitz et al., 2002). Rho5 spielt zudem eine Rolle beim Wasserstoffperoxid induzierten oxidativen Stress (Singh et al., 2008).

## 2.7 Eigenschaften von Rho GDIs in *S. cerevisiae* und höheren Eukaryoten

Wie bereits bei der Beschreibung der Regulationsmöglichkeiten der Rho GTPasen Cdc42 und Rho1 angeklungen (2.3 und 2.5), besteht die Möglichkeit, dass die membranassoziierten

inaktiven Rho GTPasen mit einem GDI komplexieren und so in das Cytosol gelangen. Rho GDIs werden allgemein drei unterschiedliche biochemische Aktivitäten zugeschrieben. Ein Rho GDI inhibiert die Dissoziation des GDP an der Rho GTPase, belässt diese somit im inaktiven Zustand und schützt sie vor einer Aktivierung durch GEFs. Ein Rho GDI kann GDP- und GTP-gebundene Rho GTPasen von Membranen extrahieren und sie in das Cytosol translozieren oder zu anderen Membranen rekrutieren. So kann zusätzlich ein ständiger Austausch zwischen verschiedenen Membranen gewährleistet werden. Als dritte Aktivität wird Rho GDIs die Fähigkeit zur Inhibition der intrinsischen und der GAP-vermittelten extrinsischen GTPase-Aktivität zugeschrieben. Dazu muss ein Rho GDI mit der GTP-gebundenen Form der Rho GTPase assoziieren. Dies schützt sie vor der Wechselwirkung mit Effektormolekülen (DerMardirossian und Bokoch, 2005; Dransart et al., 2005). In der Hefe *S. cerevisiae* konnte bislang lediglich ein GDI identifiziert werden, der spezifisch mit Rho GTPasen assoziiert (Masuda et al., 1994; Koch et al., 1997). Im menschlichen Genom konnten mit Rho GDI 1, 2 und 3 drei GDIs identifiziert werden (DerMardirossian und Bokoch, 2005). Das Protein in der Hefe trägt den Namen Rdi1 und hat ein Molekulargewicht von etwa 23 kDa (Masuda et al., 1994). Rdi1 ist im Cytosol, aber auch an Orten polaren Wachstums, wie der Knospenspitze und der Knospenhalsregion zu finden (Koch et al., 1997; Richman et al., 2004; Cole et al., 2007). Die Deletion von *RDII* offenbarte bisher keinen offensichtlichen Phänotypen. Interessanterweise blieben in einem *RDII*-Deletionsstamm die cytosolischen und membranassoziierten Cdc42 und Rho1 Proteinmengen unverändert (Masuda et al., 1994; Koch et al., 1997). Nach *RDII*-Überexpression wurden unterschiedliche Phänotypen erhalten. Zum einen wirkte sich die Überexpression von einem Multicopy-Plasmid, welches zusätzlich den induzierbaren *GALI*-Promotor enthielt, letal auf die Zellen aus (Masuda et al., 1994). Auf der anderen Seite resultierte die Überexpression von *RDII* durch den genomisch integrierten *GALI*-Promotor in einer runderen Zellmorphologie (Tcheperegine et al., 2005). Im für Menschen opportunistischen Pilz *Candida albicans* führte die Deletion von *RDII* zu einem reduzierten polarisierten Pseudohyphenwachstum der diploiden Zellen (Court und Sudbery, 2007).

### 2.7.1 Die Interaktion von Rdi1 mit Cdc42 und Rho1 in *S. cerevisiae*

Die Bindung von Rdi1 an Cdc42 und Rho1 ist bereits seit einiger Zeit bekannt (Masuda et al., 1994; Koch et al., 1997). In einem Ansatz konnte gezeigt werden, dass die Assoziation von

Rdi1 mit Rho1 nur gelten könnte, wenn Rho1 im GDP-gebundenen Zustand vorliegt (Koch et al., 1997). Zusätzlich konnte demonstriert werden, dass Rdi1 Cdc42 von der Plasmamembran und von vakuolären Membranen extrahieren kann (Koch et al., 1997; Eitzen et al., 2001; Richman et al., 2004). Dem gegenüber steht die Beobachtung der Extraktion von Rho1 lediglich von Vakuolenmembranen (Eitzen et al., 2001). In einem *in vitro* Fluoreszenzspektroskopie-Experiment konnte zusätzlich gezeigt werden, dass humanes Cdc42, unerheblich ob GDP- oder GTP-gebunden, an seinen Rho GDI binden kann (Nomanbhoy und Cerione, 1996).

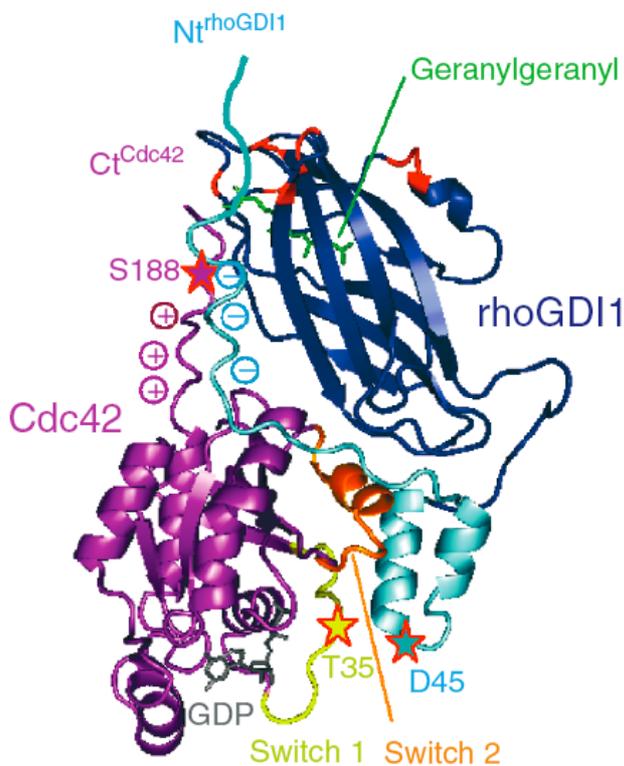


Abbildung 2.7.1: Kristallstruktur von humanem Cdc42-GDP (violett) im Komplex mit bovinem Rho GDI1 (blau). Am C-Terminus von Rho GDI1 befindet sich eine an der Innenseite hydrophobe immunglobulinähnliche  $\beta$ -Faltblattstruktur (dunkelblau), die den Geranylgeranyl-Anker (grün) bindet. Der N-terminale regulatorische Arm von Rho GDI1 bildet nach der Bindung des Prenylankers geordnete Strukturen aus, welche an die Switch I und II Domänen (gelb und orange) von Cdc42 binden. Die stark konservierten Aminosäuren beider Proteine sind durch Sternchen gekennzeichnet. Die Abbildung stammt aus Dransart et al. (2005).

In Kristallisationsstudien mit humanem Cdc42-GDP und bovinem Rho GDI1 konnten die unterschiedlichen Interaktionsdomänen von Cdc42 (siehe Abbildung 2.3.2), die durch diverse

Experimente bestimmt wurden, auch einer räumlichen Struktur zugeordnet werden (Hoffman et al., 2000; Abbildung 2.7.1). Dabei wurde deutlich, dass Rho GDI1 den Geranygeranyl-Anker (grün) von Cdc42 (violett, GDP in grau) mit einer im Inneren hydrophoben Tasche bindet, die sich durch eine immunoglobulinähnliche  $\beta$ -Faltblattstruktur in der C-terminalen Proteinregion ausbildet (blau). Der N-terminale regulatorische Arm (hellblau) von Rho GDI1 bindet dazu an die Switch I und II Domänen (gelb und orange) von Cdc42. Der regulatorische Arm bildet hierfür eine „extended loop“ und „helix-loop-helix“ Struktur aus (Dransart et al., 2005). Diese Strukturen bilden sich jedoch erst aus, wenn der Prenylanker in der hydrophoben Bindungstasche gebunden ist (Golovanov et al., 2001).

### 2.7.2 Regulationsmechanismen von Rho GDI-Rho GTPase Interaktionen

Für die Regulation der Assoziation und Dissoziation von Rho GDI-Rho GTPase Komplexen bieten sich eine Reihe von Möglichkeiten an. Während in *S. cerevisiae* bislang keine Mechanismen beobachtet werden konnten, die den Komplex regulieren, konnten in höheren Eukaryoten eine Reihe von Regulationsmechanismen identifiziert werden. Als ein offensichtlicher Mechanismus fällt die Regulation durch Kinase-vermittelte Phosphorylierung ins Auge. Dazu wurden Vorgänge identifiziert, die zum einen die Phosphorylierung des Rho GDI und zum anderen die Phosphorylierung der Rho GTPasen zur Folge hatten (DerMardirossian und Bokoch, 2005).

In ruhenden Neutrophilen konnte zunächst gezeigt werden, dass die Phosphorylierung von Rho GDI die Wechselwirkung mit RhoA verstärkt (Bourmeyster und Vignais, 1996). Zusätzlich demonstrierte eine andere Arbeitsgruppe, dass die spezifische Phosphorylierung von Rho GDI an Serin 101 und Serin 174 durch die p21-aktivierte Kinase Pak1, einem Rac1-Effektor, *in vitro* und *in vivo* zur Auflösung von Rac1-Rho GDI Komplexen, nicht jedoch von RhoA-Rho GDI Komplexen führte. Die Phosphorylierung resultiert dabei in strukturellen Veränderungen des Komplexes. Nach der Auflösung des Komplexes kann Rac1 durch GEFs aktiviert werden (DerMardirossian et al., 2004; DerMardirossian und Bokoch, 2005). Des Weiteren konnte ein ähnlicher Effekt beobachtet werden, der von PKC $\alpha$  vermittelt wird. PKC $\alpha$  phosphoryliert Rho GDI und aktiviert so RhoA (Mehta et al., 2001). Auf der anderen Seite zeigte sich, dass die Phosphorylierung von RhoA durch PKA $\alpha$  in cytotoxischen T-Lymphocyten den Komplex von RhoA mit Rho GDI verstärken konnte und eine verstärkte Extraktion der Rho GTPase RhoA von Membranen verursachen konnte (Lang et al., 1996).

PKA scheint auch einen Komplex aus Cdc42 und Rho GDI durch Phosphorylierung von Cdc42 an Serin 188 verstärken zu können (Forget et al., 2002). Die Behandlung von Zellen mit EGF führt zu einer Phosphorylierung von Cdc42, vermutlich von der Src Tyrosin Kinase vermittelt, an Tyrosin 64, welches in der Switch II Domäne liegt. Die Phosphorylierung stimuliert dann die Bindung von Cdc42 an RhoGDI (Tu et al., 2003).

Als weitere interessante Regulatoren erscheinen GDFs, welche die Fähigkeit besitzen, Rho GDI-Rho GTPase Komplexe durch bisher noch unbekannte Mechanismen selektiv auflösen zu können (siehe Abbildung 2.3.1). In *S. cerevisiae* konnten bisher keine Proteine mit solchen Eigenschaften identifiziert werden. In höheren Eukaryoten wurden jedoch einige wenige Beschreibungen hierzu publiziert. So konnten mit Proteinen der ERM („ezrin/radixin/moesin“) Familie, der Etk1 Tyrosinkinase und dem Neutrophinrezeptor p75 Faktoren bestimmt werden, welche die Auflösung von Rho GDI-RhoA Komplex vermitteln (Takahashi et al., 1997; Kim et al., 2002; Yamashita und Tohyama, 2003). Strukturelle und mechanistische Daten sind hierfür bisher noch nicht bekannt (Collins, 2003; DerMardirossian und Bokoch, 2005). In einer weiteren Arbeit konnte gezeigt werden, dass Integrine Rho GDI binden können und dadurch die Auflösung von Rho GDI-Rac1 Komplexen vermittelt (Lakhe-Reddy et al., 2006). Auch Lipiden wurden GDF-Eigenschaften zugeschrieben. Es wurde demonstriert, dass der GDP- zu GTP-Austausch durch bestimmte Lipide im RhoA-RhoGDI Komplex verstärkt werden konnte (Faure et al., 1999) und dass die Affinität des Rho GDIs gegenüber den Rho GTPasen beeinflusst werden konnte (Chuang et al., 1993; Ugolev et al., 2006).

## 2.8 Aufgabenstellung

Rdi1 ist in der Hefe *S. cerevisiae* der einzige bekannte GDI für Rho GTPasen. Bislang ist wenig über die Regulation der Interaktion von Rdi1 mit den Rho GTPasen in *S. cerevisiae* bekannt. Ausgehend von zwei unterschiedlichen Ansätzen sollte die Arbeit zur Klärung dieser Regulation beitragen.

Zunächst sollte die Spezifität von Rdi1 gegenüber allen sechs in *S. cerevisiae* exprimierten Rho GTPasen mit *in vivo* Co-Immünpräzipitations- und Membranextraktionsexperimenten systematisch analysiert werden. Ausgehend von diesen Experimenten sollten einzelne Rho GTPasen näher charakterisiert werden. Hierzu sollten Eigenschaften wie Expressionsmuster während des Zellzyklusverlaufs, Lokalisation und Phosphorylierungsmuster analysiert werden.

Außerdem sollte versucht werden mehr Informationen über die Regulation der Rdi1-Rho GTPase Interaktion zu erlangen und der Einfluss von bekannten Polaritätsproteinen analysiert werden. Außerdem sollte die Identifizierung eines solchen Rdi1-Regulators mit Hilfe von einem Suppressor- und Split-Ubiquitin-Screen vorangetrieben werden.

In einem zweiten unabhängigen Projekt sollten potentielle Interaktoren des Cdc42-Effektors Ste20, die eine Rolle bei der Sterolsynthese spielen, weiterführend analysiert werden. Die Interaktoren wurden zuvor in der Arbeitsgruppe im Zuge eines Split-Ubiquitin-Screens identifiziert. Die Analyse sollte neben der Bestätigung der Bindung durch Co-Immünpräzipitations- und Pull-down-Experimente klären, ob die potentiellen Interaktoren Kinasesubstrate von Ste20 sind. Hierfür waren Kinase-Assay Experimente eingeplant.

Die Arbeit sollte einen Beitrag zum besseren Verständnis molekularer Grundlagen des Einflusses von Rdi1 auf Zellpolaritätsprozessen leisten und zusätzlich eine mögliche neue Rolle von Ste20 bei der Etablierung von Zellpolarität aufzeigen.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Materialien

##### 3.1.1 Verbrauchsmaterialien

Sämtliche Plastikverbrauchsartikel wurden von der Firma Sarstedt bezogen sowie Glaswaren, von den Firmen Isolab, Fisherbrand und Schott.

##### 3.1.2 Geräte und Hilfsmittel

<b>Gerät/Hilfsmittel</b>	<b>Hersteller</b>
Agarosegeldokumentation Gel Jet Imager	INTAS
Agarosegelkammern 40-0708 und 40-1214	Peqlab
Computerprogramme:	
– Axiovision	Zeiss
– Clone Manager Suite 7	Sci ED Central
– ImageReader LAS-3000 Version 2.2	FujiFilm
– Multi Gauge Version 3.0	Science Lab
– Photoshop Comfort Suite 7	Adobe
Chemolumineszenzdetektion LAS-3000 Mini	FujiFilm
Flachbettscanner Canon Scan 3000	Canon
Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200M	Zeiss
Gel-Trockner Model 583	Bio-Rad
Gel und Western-Blot System Mini-Protean III, Trans-Blot Cell	Bio-Rad
Heizblock Thermomixer kompakt	Eppendorf
Inkubatoren	Heraeus
Lichtmikroskop	Zeiss
Magnetrührer RCT	IKamag
Pipette Eppendorf research (0,1-2,5 µl)	Eppendorf
Pipetten Finpette (1-10, 10-100 und 100-1000 µl)	Thermo Electron Corp.
Phosphoimager Fuji BAS 5100	FujiFilm
Phosphoimagerplatte BAS-MP 2025 P	FujiFilm

Photometer Bio Photometer	Eppendorf
Pipettierhilfe Accu jet	Brand
Rollenmischer Roller Mixer SRT1	Stuart Scientific
Rotator SB3	Stuart Scientific
PCR-Maschine T3 Thermocycler	Biometra
Schüttler Unimax 2010	Heidolph
Schüttelinkubator Multitron II	Infors
Stromquelle PowerPac HC Power	Bio-Rad
Tischzentrifuge 5415D	Eppendorf
Tischzentrifuge 5417 mit Kühlung	Eppendorf
Ultraschallbecken Sonorex Super RK106	Bandelin
Ultraschallanlage Sonoplus HD 2070	Bandelin
Ultrazentrifuge Optima LE-80K	Beckmann
Ultrazentrifugenrotor Ti70.1	Beckmann
Ultrazentrifugenröhrchen für Rotor Ti70.1	Beckmann
Vortex Reax Top	Heidolph
Zellhomogenisator Precellys 24	Bertin Technologies
Zentrifuge CR4i mit Kühlung	Jouan

### 3.1.3 Antikörper

#### 3.1.3.1 Primäre Antikörper

<b>Antikörpername</b>	<b>Spezies</b>	<b>Verdünnung im Blot</b>	<b>Hersteller</b>
anti-Cdc11	Ziege	1:1000	Santa Cruz
anti-Cdc42	Kannichen	1:250	Santa Cruz
anti-GAPDH	Ziege	1:500	Santa Cruz
anti-GFP	Kannichen	1:3000	Fitzgerald Industries
anti-GST	Ziege	1:500	GE Healthcare
anti-HA (12CA5)	Maus	1:1000	Roche
anti-His (27E8)	Maus	1:500	Cell Signaling, NEB
anti-Myc (9E10)	Maus	1:500	Santa Cruz

## 3.1.3.2 Sekundäre Antikörper

<b>Antikörpername</b>	<b>Spezies</b>	<b>Verdünnung im Blot</b>	<b>Hersteller</b>
anti-Kaninchen-HRP	Ziege	1:5000	Jackson Laboratories
anti-Maus-HRP	Ziege	1:5000	Pierce
anti-Ziege-HRP	Esel	1:5000	Pierce

HRP: Meerrettichperoxidase (horseradish peroxidase)

## 3.1.4 Kits

<b>Kitname</b>	<b>Hersteller</b>
ECL advanced (Chemilumineszenzdetektion)	GE Healthcare
NucleoSpin Plasmid (Mini-DNA Isolierung)	Macherey + Nagel
QIAquick PCR-Purification Kit	Qiagen
QIAquick Gel-Extraction Kit	Qiagen

## 3.1.5 Häufig verwendete Pufferlösungen

**50 x TAE**

2 M Tris/HCl  
1 M Natriumacetat  
62,5 mM EDTA  
pH 7,7

**TE**

10 mM Tris/HCl  
1 mM EDTA

**10 x SDS Laufpuffer**

250 mM Tris  
1,92 M Glycin  
1 % SDS (w/v)  
pH 8,3

**20 x PBS**

3 M NaCl  
0,6 M KCl  
0,12 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O  
0,03 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

**2 x SDS-Ladepuffer**

4 ml 10 % (w/v) SDS  
2,5 ml 1,5 M Tris, pH 8,8  
2 ml Glycerin  
1 ml β-Mercaptoethanol  
0,5 ml H<sub>2</sub>O  
etwas Bromphenolblau

**Blotting-Puffer**

10 % (v/v) 10 x SDS-Laufpuffer  
20 % (v/v) Methanol

**6 x DNA-Ladepuffer**

0,09 % (w/v) Bromphenolblau  
 0,09 % (w/v) Xylencyanol  
 60 % (v/v) Glycerin  
 60 mM EDTA

**PBS/T**

1 x PBS  
 0,1 % (v/v) Tween20<sup>®</sup>

**5 x SDS-Ladepuffer**

15 % (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol  
 15 % (w/v) SDS  
 1,5 % (w/v) Bromphenolblau  
 50 % (v/v) Glycerin

**Ponceau-Färbelösung**

0,02 % (w/v) Ponceau S  
 3 % (w/v) TCA

## 3.1.6 Chemikalien, Enzyme und Sonstiges

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>
Acrylamid/Bis-Acrylamid Lösung (37,5:1)	Carl Roth
Agarose	VWR
Bacto Peptone	Becton + Dickinson
Bacto Yeast Nitrogen Base	Becton + Dickinson
Bacto Yeast Extract	Becton + Dickinson
Bradfordlösung Roti Quant	Roth
CIAP (1U/ $\mu$ l)	Fermentas
Cycloheximid	Riedel de Hæn
<i>Deep Vent</i> -Polymerase (2U/ $\mu$ l)	New England Biolabs (NEB)
$\gamma$ - <sup>32</sup> P-ATP (3,7 MBq = 100 $\mu$ Ci)	Hartmann Analytic
Glutathion Sepharose 4B	GE Healthcare
Lambda-Phosphatase (400U/ $\mu$ l)	New England Biolabs (NEB)
Lachssperma DNA (10 mg/ml)	Invitrogen
MG-132 (Proteasominhibitor)	Biomol
Mowiol	Serva
Myelin basic protein (MBP)	Sigma-Aldrich
Ni-NTA Agarose	Qiagen
Nitrocellulose Protran (Porengröße 0,45 $\mu$ m)	Whatman
Proteaseinhibitortabletten complete, EDTA frei	Roche
Protein G Sepharose 4G Fast Flow	GE Healthcare
Restriktionsenzyme	Fermentas
Rhodamine Phalloidine	Molecula Probes, Invitrogen
T4-Ligase (1 Weiss U/ $\mu$ l)	Fermentas

*Taq*-Polymerase (5U/ $\mu$ l)

Fermentas

ZymoYlase T20

Seikagaku Corporation

Alle weiteren Standardchemikalien, die zur Herstellung von Medien und Pufferlösungen benötigt werden, wurden, wenn nicht anders angegeben, von den Firmen Roth, Sigma-Aldrich, Serva, Fluka, Merck oder VWR bezogen.

### 3.1.7 Oligonukleotide (Primer)

Sämtliche Primer wurden von den Firmen Biomers und MWG synthetisiert.

#### 3.1.7.1 Genspezifische Primer

<b>Primer</b>	<b>Nukleotidsequenz des Primers in 5' → 3' Richtung</b>
Bgl2-S2	AAGGAAAAGCCATTCTTGTTTAAAGAGTATTTTAAAGCGTTCAA TCGATGAATTCGAGCTCG
Bgl2-S3	ACTTCAAGTGACAATTTGAAATACTCCTTGGACTGTGACTTTTCA CGTACGCTGCAGGTCGAC
Cdc20-F4	CATTCATTTAGTGCAGAAATATCAAAAGACAAGTATTACAAAGAA GACTAGAATTCGAGCTCGTTTAAAC
Cdc20-R2	GTTACCGCTAATTGCTGCATTTCCCTTATCTCTAGAGCTTTCTGGCA TTTTGAGATCCGGGTTTT
Cdc42-1	CGCGGATCCAAGATGTCTTCCACCGTC
Cdc42-4	CCGCTCGAGTTCATATGCATACCGTGT
Cdc42-5	CGCGGATCCATGCAAACGCTAAAGTGT
Cdc42-6	CCGCTCGAGGATTGCTAGCCTGAATGT
Cdc42-29	AAACGCGTCGACAAGATGTCTTCCACCGTC
Cdc42-30	CACAAAATGGGCGGCCGCAAACGCTAAAGTGTGTT
Cdc42-31	TAGCGTTTGGCGGCCGCCATTTTGTGGAAGAGCTA
Cdc42-33	GTCGGTGATGTTGCTGTTGGGAAAACGTGC
Cdc42-34	CCCAACAGCAACATCACCGACAACAACACA
Cdc42-35	ACGCAGATTGCTCTAAGGGATGACAAGGTA
Cdc42-36	ATCCCTTAGAGCAATCTGCGTACCGACGAC
Cla4-F4	TAAATCGAACAGTGAAACTGAAACATAAAAGAAATAGTGCAAAA TGAATTCGAGCTCGTTTAAAC
Cla4-R3	TTGGAAATCGTTGTCAGATATCTTATTCGCTGCAGCTGAAAGAGA GCCTAGAGCGTAATCTG
Cla4-20	GGAAGATCTATGTCTCTTTCAGCTGCA
Cla4-21	CCCAAGCTTTATCTCATAAAATGGATG
Erg4-F4	AGGCAGATACGGATATTTACGTAGTGTACATAGATTAGCATCGCT GAATTCGAGCTCGTTTAAAC
Erg4-R2	TTTCTCCTCTCCCTGCACCTGCAGCTTCTCACTATTATCCTTTGCCA TTTTGAGATCCGGGTTTT

Erg4-R3	TTTCTCCTCTCCCTGCACCTGCAGCTTCTCACTATTATCCTTTGCGC ACTGAGCAGCGTAATCTG
Erg4-S2	ACTGTAAAATAAGTTAATGAAGTGGATAGAAAAAGAAAATAACT AATCGATGAATTCGAGCTCG
Erg4-S3	GAGTATTGTAAACATTGCCCTTACGTCTTTATTTCCTTATGTTTTCC GTACGCTGCAGGTCGAC
Exo70-1	AAACGCGTCGACATGCCCGCTGAAATTGACAT
Exo70-2	ATAAGAATGCGGCCGCTTTTCTCCACTTTTGGGAAG
Exo84-1	CCGCTCGAGATGGTTGAGTTTTCTTTGAA
Exo84-2	ATAAGAATGCGGCCGCTTCGCAATAGACCACTGTAA
Nce2-S2	CTTAATTGAAAGTGGCGTAAAATTTAAGTTGGTGCCTTCAATTA ATCGATGAATTCGAGCTCG
Nce2-S3	AGAAGAAGAAGTGGCCAAGTCGGTGTCCAACCATTTCCCAAGTC CGTACGCTGCAGGTCGAC
Ncp1-F4	TAGACAACGACCGCGGTTTTCAAGTGATCTACTGTCGCACATATC GAATTCGAGCTCGTTTAAAC
Ncp1-R3	TAGCCCCGCCAGGACAGTGAAGTCGGTGTGTCTATTCCAAACGG GCACTGAGCAGCGTAATCTG
Pdr5-S1	TTAAGTTTTCGTATCCGCTCGTTCGAAAGACTTTAGACAAAAATG CGTACGCTGCAGGTCGAC
Pdr5-S2	CATCTTGGTAAGTTTCTTTTCTTAACCAAATTCAAATTTCTATTAA TCGATGAATTCGAGCTCG
Pdr5-1	TCCAAAAGAAAAAAGTCACG
Pdr5-2	AATAATGTTTTCACACTAAA
Pep4-S1	GTATTTAATCCAAATAAAATTCAAACAAAAACCAAACCTAACATG CGTACGCTGCAGGTCGAC
Pep4-S2	ATGGCAGAAAAGGATAGGGCGGAGAAGTAAGAAAAGTTTAGCTC AATCGATGAATTCGAGCTCG
Pep4-1	AGCCTAGTGACCTAGTAT
Pep4-2	TAGAGCGCAGCCTGTGAA
Rdi1-S1	TAACTCGAGTATTGAGCTTTTTTATTAGAGAAAACTGAATA ATGCGTACGCTGCAGGTCGAC
Rdi1-S2	GTTTATACAGGCCATATCTACATTGTGCATTTCAAGAACTTA TTAATCGATGAATTCGA CT G
Rdi1-S3	ACTAACCCTTGACTTTAAATTGGGGGGTCGAAATTGTCAAAAAA CGTACGCTGCAGGTCGAC
Rdi1-1	TTATTCTTCAGATATATCAATCAA
Rdi1-2	AACACCAAACGGCAATTTATTTA
Rdi1-F4	GAATAACTCGAGTATTGAGCTTTTTTATTAGAGAAAACTGA ATAGAATT GAGCTCGTTTAAAC
Rdi1-R3	GTTTCTCCTCTTCGAATTGACTAAAGTCGGTACTTTCTTCGG GCACTGAGCAGCGTAATCTG
Rdi1-R5	GTTTCTCCTCTTCGAATTGACTAAAGTCGGTACTTTCTTCGG TTTGTATAGTTCATCCATGC
Rdi1-9	CCATCGATATGGCCGAAGAAAGTACC
Rdi1-10	AAACGCGTCGACGGTTTTTTGACAATTCGAC
Rdi1-11	ATCCATACTTCTAGAACTAGT
Rdi1-I	TGGATGCTGAAGACGAATCCT
Rdi1-II	AGGTGCTTCACTTTCCGGTAG

Rho1-8	ATGCGAGCTCTGTATTGGGTTACTACATG
Rho1-11	CCGCTCGAGTGAGATCTACGCAGATCA
Rho1-12	GTTGGTGATGTTGCCTGTGGTAAGACATGT
Rho1-13	ACCACAGGCAACATCACCAACGATTACCAG
Rho1-14	TGTAAAGTGGCTTTGAGAAACGACCCACAA
Rho1-15	GTTTCTCAAAGCCACTTTACAACCAACAAG
Rho3-S1	TTCATTAATAATCCATAGTAGCACAAGGTAAAGGGAAACAAACAT GCGTACGCTGCAGGTCGAC
Rho3-S2	TTGGGTTCTATTCTTTTGTGTGTGCGTCCGTGTCTTATTATATTAAT CGATGAATTCGAGCTCG
Rho3-9	ATGCGAGCTCCGTCATAGATATACTGGT
Rho3-11	ATGCGAGCTCTACCGCACCTACGCGAGA
Rho4-4	CCGCTCGAG TCAAAGTTCGTACATA
Rho4-5	ATGCGAGCTCTATACCCGTTACAGTAGC
Rho4-8	TTTAAGCGAAATCTTCCCAGATTGCCT
Rho4-9	GGGAAGATTTGCTTAAATAATAGTGT
Rho4-S1	AAGTCAAATAGGTCCAAAAATCTCCAATAGTAACGCTTTTTTCATG CGTACGCTGCAGGTCGAC
Rho4-S2	GTGCGTACAGAATGGGCAACAGAATAATCTTCATCATTATTCTTA ATCGATGAATTCGAGCTCG
Rho4-F4	CTTAAGTCAAATAGGTCCAAAAATCTCCAATAGTAACGCTTTTTTC GAATTCGAGCTCGTTAAAC
Rho4-R3	TTCGTTCCACAATTGCCACCTTTTCGCTTAAATAATAGTGTATTG CACTGAGCAGCGTAATCTG
Rho4-R5	TTCGTTCCACAATTGCCACCTTTTCGCTTAAATAATAGTGTATTT TTGTATAGTTCATCCATGC
Rho4-10	CGCGGATCC GA ATG AAAGGTGGCAATTGTGGG
Rho4-11	CCGCTCGAG CC CTTTTCATCTAAAGTGCC
Rho4-13	ATTGTTGTTGTGGGAGATGTGCGCTGTAGGGAAGACGTGC
Rho4-14	GCACGTCTTCCCTACAGCGACATCTCCACAACAACAAT
Rho4-28	AACCTTTCAGCTCTGGTGGAAACCAAGTTCA
Rho4-29	TTCCACCAGAGCTGAAAGGTTATCAGCTTC
Sec3-1	AAACGCGTCGACATGAGGTCCTCGAAGTCTCC
Sec3-2	ATAAGAATGCGGCCGCATGAATATCGGTAATGAAAA
Sec5-1	CCGCTCGAGATGGATAGGTTTCAAATTGG
Sec5-2	ATAAGAATGCGGCCGCGCACTAAAGCAAATTATAAC
Sec5-3	CCGCTCGAG GATAGGTTTCAAATTGGCGA
Sec5-4	ATAAGAATGCGGCCGCCATAATGATGAATTCCAAG
Sec6-S1	TGGGCCGAGAGCAGAGATATTATCAAGTATCTAGTTACTAAGATG CGTACGCTGCAGGTCGAC
Sec6-S2	TATGTTATATGTAATCAGTGAACCTTTTTTTTTTTCTTGTATATCGAT CGATGAATTCGAGCTCG
Sec6-S3	GAACCTACTTTGATGAGGCGGTTTGTATTAGAATTCGAAAAGCAA CGTACGCTGCAGGTCGAC
Sec6-F4	AATTGGGCCGAGAGCAGAGATATTATCAAGTATCTAGTTACTAAG GAATTCGAGCTCGTTAAAC
Sec6-R3	ATCTCCCTTTATTAATCACAACTTGCTGCAAGGGATCTGAAGA GCACTGAGCAGCGTAATCTG
Sec6-R5	ATCTCCCTTTATTAATCACAACTTGCTGCAAGGGATCTGAAGA TTTGTATAGTTCATCCATGC

Sec6-1	AAACGCGTCGACATGTCTTCAGATCCCTTGCA
Sec6-2	ATAAGAATGCGGCCGCAACAAAAGGATCAGGCTGCC
Sec6-4	AAACGCGTCGACTCTTGATGCCTCTAACGGGA
Sec6-7	AAACGCGTCGACGTTAAAATGACCGAGTGGA
Sec6-8	GCGGACACACCAGATGAATATCTTTTGGAT
Sec6-9	ATATTCATCTGGTGTGTCCGCAATTTGCTG
Sec6-10	AAACGCGTCGACAATGTCTTCAGATCCCTTG
Sec6-11	ATAAGAATGCGGCCGCAATTATTGCTTTTCGAATTC
Sec6-12	AAACGCGTCGACAAATGTCTTCAGATCCCTTG
Sec6-13	AAACGCGTCGACAGTTAAAATGACCGAGTGGA
Sec6-14	AAACGCGTCGACAAGTTAAAATGACCGAGTGGA
Sec6-15	CCCAAGCTT AACAAAAGGATCAGGCTGCC
Sec8-1	AAACGCGTCGACATGGATTACCTAAAACCAGC
Sec8-2	ATAAGAATGCGGCCGCTACTTCCTTTCTCATTTCCT
Sec10-1	CCGCTCGAG ATGAACTCATTATATGAACT
Sec10-2	ATAAGAATGCGGCCGCGTAACACAATGGTCTAACCT
Sec15-1	AAACGCGTCGACATGGACCAAGAAGGCCAGCC
Sec15-2	ATAAGAATGCGGCCGCCTTCTAGAACATGTGGCATA
Skml-F4	AGCTATACTCGAGGACAATCAGACAAAACGAAAGAATATCTTTCG GAATTCGAGCTCGTTTAAAC
Skml-R3	TCCATCAACTTTATAAGATATCCATCCTTCCTTTTTTACGCCCTTGC ACTGAGC AGCGTAATCTG
Ste20-F4	CACCCCATCCTAAATATCCCACAAGATCCTCGACTAATACAA GAAGAATTCGAGCTCGTTTAAAC
Ste20-R3	ACTGTCCTTGTCTGGTAGTTCCGATACAGCAGATGGATCATT GCTGCACTGAGCAGCGTAATCTG
Ygk3-S1	GAAAATACTACATACATTTTGCTTTTAGCACTAACATACCTAATGC GTACGCTGCAGGTCGAC
Ygk3-S2	ATAAGATGACGGCAAATGCAAAAATGAGGTAAGAATCAGCAACT AATCGATGAATTCGAGCTCG
Ygk3-S3	AGGGCTCTTGGAGAGTATTACAACCTGATTGTGCCATCTCTGGAT CGTACGCTGCAGGTCGAC
Ygk3-F4	AAAGAAAATACTACATACATTTTGCTTTTAGCACTAACATACCTA GAATTCGAGCTCGTTTAAAC
Ygk3-R5	TGTCATTCTATTGGGGTTGCTCCCGAAAACGTTATTCACTTTAAGT TTGTATAGTTCATCCATGC
Ygk3-1	TTAGACTGATTAGTA
Ygk3-2	GCATATTATTGAGTT
Ygk3-3	CGCGGATCCATGCTTAAAGTGAATAAC
Ygk3-4	AAACGCGTCGACTCGAGGCCAATTAAGGCG
Ygk3-5	ACAAGAATATGTAATGATAA
Ygk3-6	TACAATACCTATCCAACCTT
Ygk3-7	TATGCCATAGCAAGAGTAGTGAAATCTCCC
Ygk3-8	GGGAGATTCACACTCTTGCTATGGCATA

## 3.1.7.2 Sequenzierungsprimer

Primer	Nukleotidsequenz des Primers in 5' → 3' Richtung
pADNX-NubI-Seq1	CTCCAGGTAACCTCGACCTACC
YEp13-1	TTCTCGGAGCACTGTCC
YEp13-2	GTGATGTCGGCGATATAG

## 3.1.8 Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Quelle
pADNX	2µm, <i>LEU2</i> , <i>ADH-NUBI-3HA</i>	Tiedje et al. (2007)
pCT2	<i>RDII</i> in pMET25- <i>CUBI-RURA3</i>	Diese Arbeit
pCT9	<i>CDC42</i> in pGEX-5X-1	Diese Arbeit
pCT10	<i>CDC42</i> in pET28c	Diese Arbeit
pCT14	<i>STE20</i> in pEG(KT)	Diese Arbeit
pCT16	<i>STE20</i> <sup>K649A</sup> in pEG(KT)	Diese Arbeit
pCT19	<i>CLA4</i> in pEG(KT)	Diese Arbeit
pCT21	<i>3HA-CDC42</i> in pRS305	Diese Arbeit
pCT22	<i>YGK3</i> in pEG(KT)	Diese Arbeit
pCT23	<i>3HA-RHO4ΔN9-40</i> in pRS305	Diese Arbeit
pCT24	<i>RHO4</i> in pET28c	Diese Arbeit
pCT26	<i>RHO3</i> in pRS316	Diese Arbeit
pCT27	<i>RHO4-PEST</i> in pET28c	Diese Arbeit
pCT29	<i>YGK3</i> <sup>K75A</sup> in pEG(KT)	Diese Arbeit
pCT33	<i>3HA-CDC42</i> <sup>G12V</sup> in pRS305	Diese Arbeit
pCT34	<i>3HA-CDC42</i> <sup>D118A</sup> in pRS305	Diese Arbeit
pCT35	<i>3HA-RHO1</i> <sup>G19V</sup> in pRS305	Diese Arbeit
pCT36	<i>3HA-RHO1</i> <sup>D125A</sup> in pRS305	Diese Arbeit
pCT37	<i>3HA-RHO4</i> <sup>G81V</sup> in pRS305	Diese Arbeit
pCT38	<i>3HA-RHO4</i> <sup>D197A</sup> in pRS305	Diese Arbeit
pCT39	<i>SEC6</i> in pRS304	Diese Arbeit
pCT40	<i>SEC6</i> in pRS305	Diese Arbeit
pCT41	<i>SEC6</i> in pADNX	Diese Arbeit
pCT42	<i>SEC6</i> <sup>427-806</sup> in pADNX	Diese Arbeit
pCT44	<i>EXO70</i> in pADNX	Diese Arbeit
pCT45	<i>SEC15</i> in pADNX	Diese Arbeit
pCT46	<i>EXO84</i> in pADNX	Diese Arbeit
pCT47	<i>SEC3</i> in pADNX	Diese Arbeit
pCT48	<i>SEC5</i> in pADNX	Diese Arbeit
pCT49	<i>SEC8</i> in pADNX	Diese Arbeit
pCT50	<i>SEC10</i> in pADNX	Diese Arbeit
pCT51	<i>sec6-4 ts</i> in pRS304	Diese Arbeit
pCT52	<i>sec6-4 ts</i> in pRS305	Diese Arbeit
pCT54	<i>SEC6</i> in pET28c	Diese Arbeit
pCT55	<i>SEC6</i> <sup>427-806</sup> in pET28c	Diese Arbeit

pCT56	<i>SEC6</i> in pGEX-5X-1	Diese Arbeit
pCT57	<i>SEC6</i> <sup>427-806</sup> in pGEX-5X-1	Diese Arbeit
pCT58	<i>SEC6</i> in pEG(KT)	Diese Arbeit
pCT64	<i>3HA-CDC42</i> in pRS303	Diese Arbeit
pCT66	<i>3HA-RHO1</i> in pRS303	Diese Arbeit
pET28c	N-terminaler His <sub>6</sub> -Fusionsmarker	Novagen, Merck
pEG(KT)	2µm, <i>URA3</i> , <i>GALI-GST</i>	Mitchell et al. (1993)
pFA6a-His3MX6- <i>PGALI-GFP</i>	Kassetten PCR-template	Longtine et al. (1998)
pFA6a-His3MX6- <i>PGALI-3HA</i>	Kassetten PCR-template	Longtine et al. (1998)
pFA6a-KanMX6- <i>PGALI-3HA</i>	Kassetten PCR-template	Longtine et al. (1998)
pFA6a- <i>TRP1</i>	Kassetten PCR-template	Longtine et al. (1998)
pFA6a-His3MX6	Kassetten PCR-template	Longtine et al. (1998)
pFA6a-KanMX6	Kassetten PCR-template	Longtine et al. (1998)
pGEX-5X-1	N-terminaler GST-Fusionsmarker	GE Healthcare
pGST-Ste20	<i>STE20</i> in pDEST15	C. David Allis, New York
pGTEPI	<i>3HA</i> in pBlueskript II	Elmar Schiebel, Heidelberg
pMB5	<i>RHO1</i> in pEG(KT)	Tiedje et al. (2008)
pMB6	<i>RHO2</i> in pEG(KT)	Tiedje et al. (2008)
pMB7	<i>RHO3</i> in pEG(KT)	Tiedje et al. (2008)
pMB8	<i>RHO4</i> in pEG(KT)	Tiedje et al. (2008)
pMB9	<i>RHO5</i> in pEG(KT)	Tiedje et al. (2008)
pMB10	<i>CDC42</i> in pEG(KT)	Tiedje et al. (2008)
pMB40	<i>3HA-RHO1</i> in pRS305	Diese Arbeit
pMB41	<i>3HA-RHO2</i> in pRS305	Diese Arbeit
pMB42	<i>3HA-RHO3</i> in pRS305	Diese Arbeit
pMB43	<i>3HA-RHO4</i> in pRS305	Diese Arbeit
pMB44	<i>3HA-RHO5</i> in pRS305	Diese Arbeit
pMET25-CUBI-RURA3	<i>CEN</i> , <i>HIS3</i> , MET25- <i>CUbiquitin-RURA3</i>	Johnsson und Varhavsky (1994)
pMK21	CBR1 in pGEX-5X-1	Diese Arbeit
pML2	SKM1 in pEG(KT)	Tiedje et al. (2008)
pMVB112	<i>CEN</i> , <i>URA3</i> , <i>GALI-myc-CLA4</i>	Versele und Thorner (2004)
pMVB113	<i>CEN</i> , <i>URA3</i> , <i>GALI-myc-CLA4(K594A)</i>	Versele und Thorner (2004)
pKT10-Rdi1	2µm, <i>URA3</i> , <i>GALI-Rdi1</i>	Masuda et al. (1994)
pRS303	<i>HIS3</i>	Sikorski und Hieter (1989)
pRS305	<i>LEU2</i>	Sikorski und Hieter (1989)
pRS306	<i>URA3</i>	Sikorski und Hieter (1989)
pRS313	<i>CEN6</i> , <i>HIS3</i>	Sikorski und Hieter (1989)
pRS316	<i>CEN6</i> , <i>URA3</i>	Sikorski und Hieter (1989)
pRS425	2µm, <i>LEU2</i>	Christianson et al. (1992)
pTH64	<i>CDC42</i> in pGEX-5X-1	Diese Arbeit
pTH114	<i>CDC42</i> in pRS425	Diese Arbeit
pTH123	<i>GIC1</i> in pRS425	Diese Arbeit
pTH124	<i>GIC2</i> in pRS425	Diese Arbeit
pTH163	<i>CLA4</i> in pRS425	Diese Arbeit

pTH197	<i>STE20</i> in pMET25- <i>CUBI-RURA3</i>	Tiedje et al. (2007)
pTH242	<i>RDII</i> in pGEX-5X-1	Diese Arbeit
pTH243	<i>RDII</i> in pET28c	Diese Arbeit
pTH263	<i>STE20</i> in pRS425	Diese Arbeit
pTH300	<i>NCP1</i> in pGEX-5X-1	Diese Arbeit
pTH344	<i>BEM1</i> in pADNX	Tiedje et al. (2007)
pTH345	<i>UBC6</i> in pADNX	Tiedje et al. (2007)
pYM1	<i>3HA-KanMX6</i> , C-terminales tagging	Knop et al. (1999)
pYM2	<i>3HA-His3MX6</i> , C-terminales tagging	Knop et al. (1999)
pYM3	<i>6HA-klTRP1</i> , C-terminales tagging	Knop et al. (1999)
pYM4	3myc- <i>KanMX6</i> , C-terminales tagging	Knop et al. (1999)
pYM5	3myc- <i>His3MX6</i> , C-terminales tagging	Knop et al. (1999)
pYM6	9myc- <i>klTRP1</i> , C-terminales tagging	Knop et al. (1999)
pYM12	EGFP- <i>KanMX4</i> , C-terminales tagging	Knop et al. (1999)
pYM22	<i>3HA-klTRP1</i> , C-terminales tagging	Janke et al. (2004)
pYM23	3myc- <i>klTRP1</i> , C-terminales tagging	Janke et al. (2004)
p177	pRS315- <i>PGAL1-CDC42<sup>G12V</sup></i>	Ziman et al. (1991)
Ste14-Cub	<i>STE14</i> in pMET25- <i>CUBI-RURA3</i>	Nils Johnsson, Ulm

3.1.9 *E. coli* Stämme

Stammname	Genotyp	Quelle
DH5 $\alpha$	F <sup>-</sup> endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG $\Phi$ 80dlacZ $\Delta$ M15 $\Delta$ ( <i>lacZYA-argF</i> )U169, hsdR17( <i>r<sub>K</sub><sup>-</sup> m<sub>K</sub><sup>+</sup></i> ), $\lambda$ -	Studier und Moffat (1986)
BL21(DE3)	F <sup>-</sup> ompT gal dcm lon hsdS <sub>B</sub> ( <i>r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup></i> ) $\lambda$ (DE3 [ <i>lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5</i> ])	Hanahan (1983)
Rosetta(DE3)pLysS	F <sup>-</sup> ompT hsdS <sub>B</sub> ( <i>R<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup></i> ) gal dcm $\lambda$ (DE3 [ <i>lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5</i> ]) pLysSRARE ( <i>Cam<sup>R</sup></i> )	Novagen, Merck

3.1.10 *S. cerevisiae* Stämme

Stamm	Genotyp	Quelle
CTY4	<i>MATa ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1<math>\Delta</math>63 his3<math>\Delta</math>200 leu2<math>\Delta</math>1 NCE2-9Myc-His3MX6 KanMX6-GAL1-3HA-RDII</i>	Diese Arbeit
CTY5	<i>MATa ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1<math>\Delta</math>63 his3<math>\Delta</math>200 leu2<math>\Delta</math>1 RDII-3HA-klTRP1</i>	Diese Arbeit
CTY10	<i>MATa ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1<math>\Delta</math>63 his3<math>\Delta</math>200 leu2<math>\Delta</math>1 RDII-9Myc-His3MX6 <math>\Delta</math>cla4::klTRP1</i>	Diese Arbeit
CTY30	<i>MATa ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1<math>\Delta</math>63 his3<math>\Delta</math>200 leu2<math>\Delta</math>1 KanMX6-GAL1-3HA-NCP1</i>	Diese Arbeit
CTY31	<i>MATa ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1<math>\Delta</math>63 his3<math>\Delta</math>200 leu2<math>\Delta</math>1 TAP-RDII-KanMX6</i>	Diese Arbeit

CTY33	<i>MATa ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1Δ63 his3Δ200 leu2Δ1 KanMX6-GAL1-ERG4-9myc-klTRP1</i>	Tiedje et al. (2007)
CTY34	<i>MATa ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1Δ63 his3Δ200 leu2Δ1 His3MX6-GAL1-3HA-YCK1</i>	Diese Arbeit
CTY35	<i>MATa ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1Δ63 his3Δ200 leu2Δ1 RDII-3myc-His3MX6 LEU2-3HA-RHO1</i>	Diese Arbeit
CTY36	<i>MATa ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1Δ63 his3Δ200 leu2Δ1 RDII-3myc-His3MX6 LEU2-3HA-RHO4</i>	Diese Arbeit
CTY37	<i>MATa ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1Δ63 his3Δ200 leu2Δ1 LEU2-3HA-RHO1 His3MX6-GAL1-3HA-RDII</i>	Diese Arbeit
CTY38	<i>MATa ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1Δ63 his3Δ200 leu2Δ1 LEU2-3HA-RHO4 Δrdi1::klTRP1</i>	Diese Arbeit
CTY40	<i>MATa ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1Δ63 his3Δ200 leu2Δ1 LEU2-3HA-RHO4 His3MX6-GAL1-CDC20</i>	Diese Arbeit
CTY42	<i>MATa ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1Δ63 his3Δ200 leu2Δ1 LEU2-3HA-RHO4 Δerg6::klTRP1</i>	Diese Arbeit
CTY43	<i>MATa ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1Δ63 his3Δ200 leu2Δ1 LEU2-3HA-CDC42</i>	Diese Arbeit
CTY44	<i>MATa ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1Δ63 his3Δ200 leu2Δ1 RDII-3myc-His3MX6 LEU2-3HA-CDC42</i>	Diese Arbeit
CTY45	<i>MATa ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1Δ63 his3Δ200 leu2Δ1 LEU2-3HA-CDC42 His3MX6-GAL1-3HA-RDII</i>	Diese Arbeit
CTY46	<i>MATa ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1Δ63 his3Δ200 leu2Δ1 LEU2-3HA-RHO4 Δydk3::His3MX6</i>	Diese Arbeit
CTY48	<i>MATa ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1Δ63 his3Δ200 leu2Δ1 LEU2-3HA-ΔN(9-40)RHO4</i>	Diese Arbeit
CTY49	<i>MATa ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1Δ63 his3Δ200 leu2Δ1 LEU2-3HA-ΔN(9-40)RHO4 RDII-3myc-klTRP1</i>	Diese Arbeit
CTY52	<i>MATa ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1Δ63 his3Δ200 leu2Δ1 Δrho4::His3MX6</i>	Diese Arbeit
CTY53	<i>MATa ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1Δ63 his3Δ200 leu2Δ1 Δrho4:klTRP1</i>	Diese Arbeit
CTY54	<i>MATa ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1Δ63 his3Δ200 leu2Δ1 RDII-3myc-His3MX6 LEU2-3HA-RHO2</i>	Diese Arbeit
CTY55	<i>MATa ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1Δ63 his3Δ200 leu2Δ1 RDII-3myc-His3MX6 LEU2-3HA-RHO3</i>	Diese Arbeit
CTY56	<i>MATa ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1Δ63 his3Δ200 leu2Δ1 RDII-3myc-His3MX6 LEU2-3HA-RHO5</i>	Diese Arbeit
CTY59	<i>MATa ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1Δ63 his3Δ200 leu2Δ1 LEU2-3HA-CDC42 Δrdi1::klTRP1</i>	Diese Arbeit
CTY60	<i>MATa ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1Δ63 his3Δ200 leu2Δ1 LEU2-3HA-RHO1 Δrdi1::klTRP1</i>	Diese Arbeit
CTY61	<i>MATa ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1Δ63 his3Δ200 leu2Δ1 Δrho3::klTRP1</i>	Diese Arbeit
CTY63	<i>MATa ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1Δ63 his3Δ200 leu2Δ1 Δrho3::klTRP1 Δrho4::His3MX6 pCT26</i>	Diese Arbeit
CTY64	<i>MATa his3::hisG leu2::hisG trp1::hisG ura3-52 Δrdi1::KanMX6</i>	Diese Arbeit
CTY65	<i>MATa ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1Δ63 his3Δ200 leu2Δ1 LEU2-3HA-RHO4 Δpep4::KanMX6</i>	Diese Arbeit

CTY66	<i>MATa ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1Δ63 his3Δ200 leu2Δ1 LEU2-3HA-RHO4 Δpep4::His3MX6</i>	Diese Arbeit
CTY67	<i>MATa ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1Δ63 his3Δ200 leu2Δ1 His3MX6-GAL1-GFP-RHO4</i>	Diese Arbeit
CTY68	<i>MATa ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1Δ63 his3Δ200 leu2Δ1 LEU2-3HA-CDC42 Δrdi1::His3MX6</i>	Diese Arbeit
CTY69	<i>MATa ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1Δ63 his3Δ200 leu2Δ1 LEU2-3HA-RHO1 Δrdi1::His3MX6</i>	Diese Arbeit
CTY71	<i>MATa ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1Δ63 his3Δ200 leu2Δ1 LEU2-3HA-RHO4 rsp5-1</i>	Diese Arbeit
CTY74	<i>MATa ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1Δ63 his3Δ200 leu2Δ1 LEU2-3HA-RHO4 Δcla4::His3MX6</i>	Diese Arbeit
CTY75	<i>MATa ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1Δ63 his3Δ200 leu2Δ1 KanMX6-GAL1-3HA-RHO4 Δrdi1::klTRP1</i>	Diese Arbeit
CTY76	<i>MATa ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1Δ63 his3Δ200 leu2Δ1 His3MX6-GAL1-GFP-RHO4 Δrdi1::klTRP1</i>	Diese Arbeit
CTY84	<i>MATa ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1Δ63 his3Δ200 leu2Δ1 LEU2-3HA-RHO4 Δpdr5::His3MX6 Δerg6::klTRP1</i>	Diese Arbeit
CTY85	<i>MATa ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1Δ63 his3Δ200 leu2Δ1 LEU2-3HA-RHO4 Δdoa4::klTRP1</i>	Diese Arbeit
CTY86	<i>MATa ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1Δ63 his3Δ200 leu2Δ1 LEU2-3HA-CDC42 Δrdi1::klTRP1 Δcla4::His3MX6</i>	Diese Arbeit
CTY87	<i>MATa ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1Δ63 his3Δ200 leu2Δ1 LEU2-3HA-RHO1 Δrdi1::klTRP1 Δcla4::His3MX6</i>	Diese Arbeit
CTY88	<i>MATa ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1Δ63 his3Δ200 leu2Δ1 LEU2-3HA-CDC42<sup>G12V</sup></i>	Diese Arbeit
CTY89	<i>MATa ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1Δ63 his3Δ200 leu2Δ1 LEU2-3HA-CDC42<sup>D118A</sup></i>	Diese Arbeit
CTY90	<i>MATa ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1Δ63 his3Δ200 leu2Δ1 LEU2-3HA-RHO1<sup>G19V</sup></i>	Diese Arbeit
CTY91	<i>MATa ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1Δ63 his3Δ200 leu2Δ1 LEU2-3HA-RHO1<sup>D125A</sup></i>	Diese Arbeit
CTY95	<i>MATa ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1Δ63 his3Δ200 leu2Δ1 Δpep4::His3MX6 LEU2-3HA-RHO4<sup>G81V</sup></i>	Diese Arbeit
CTY96	<i>MATa ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1Δ63 his3Δ200 leu2Δ1 Δpep4::His3MX6 LEU2-3HA-RHO4<sup>D197A</sup></i>	Diese Arbeit
CTY99	<i>MATa ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1Δ63 his3Δ200 leu2Δ1 LEU2-3HA-CDC42 Δcla4::His3MX6</i>	Diese Arbeit
CTY100	<i>MATa ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1Δ63 his3Δ200 leu2Δ1 LEU2-3HA-RHO1 Δcla4::His3MX6</i>	Diese Arbeit
CTY101	<i>MATa ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1Δ63 his3Δ200 leu2Δ1 SEC6-GFP-KanMX6</i>	Diese Arbeit
CTY105	<i>MATa ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1Δ63 his3Δ200 leu2Δ1 LEU2-SEC6 His3MX6-GAL1-3HA-SEC6</i>	Diese Arbeit
CTY106	<i>MATa ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1Δ63 his3Δ200 leu2Δ1 LEU2-SEC6 KanMX6-GAL1-3HA-SEC6</i>	Diese Arbeit

CTY107	<i>MATa ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1Δ63 his3Δ200 leu2Δ1 LEU2-SEC6 KanMX6-GAL1-GFP-SEC6</i>	Diese Arbeit
CTY111	<i>MATa ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1Δ63 his3Δ200 leu2Δ1 TRP1-SEC6 His3MX6-GAL1-3HA-SEC6 LEU2-3HA-CDC42</i>	Diese Arbeit
CTY113	<i>MATa ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1Δ63 his3Δ200 leu2Δ1 TRP1-SEC6 His3MX6-GAL1-3HA-SEC6 LEU2-3HA-RHO1</i>	Diese Arbeit
CTY115	<i>MATa ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1Δ63 his3Δ200 leu2Δ1 CDC19-9myc-klTRP1 BGL2-3HA-His3MX6</i>	Diese Arbeit
CTY116	<i>MATa ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1Δ63 his3Δ200 leu2Δ1 CDC19-9myc-klTRP1 BGL2-3HA-KanMX6</i>	Diese Arbeit
CTY124	<i>MATa ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1Δ63 his3Δ200 leu2Δ1 CDC19-9myc-klTRP1 BGL2-3HA-KanMX6 Δrho3::His3MX6</i>	Diese Arbeit
CTY125	<i>MATa ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1Δ63 his3Δ200 leu2Δ1 CDC19-9myc-klTRP1 BGL2-3HA-His3MX6 Δrdi1::KanMX6</i>	Diese Arbeit
CTY126	<i>MATa ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1Δ63 his3Δ200 leu2Δ1 CDC19-9myc-klTRP1 BGL2-3HA-His3MX6 Δrho4::KanMX6</i>	Diese Arbeit
CTY128	<i>MATa ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1Δ63 his3Δ200 leu2Δ1 LEU2-sec6-4 ts Δsec6::klTRP1</i>	Diese Arbeit
CTY129	<i>MATa ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1Δ63 his3Δ200 leu2Δ1 LEU2-sec6-4 ts Δsec6::His3MX6</i>	Diese Arbeit
CTY130	<i>MATa ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1Δ63 his3Δ200 leu2Δ1 CDC19-9myc-klTRP1 BGL2-3HA-KanMX6 LEU2-sec6-4 ts Δsec6::His3MX6</i>	Diese Arbeit
CTY131	<i>MATa ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1Δ63 his3Δ200 leu2Δ1 LEU2-sec6-4 ts Δsec6::His3MX6 Δrdi1::klTRP1</i>	Diese Arbeit
CTY132	<i>MATa ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1Δ63 his3Δ200 leu2Δ1 His3MX6-GAL1-GFP-RDII</i>	Diese Arbeit
CTY134	<i>MATa ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1Δ63 his3Δ200 leu2Δ1 Δsec6::klTRP1 LEU2-SEC6-4 ts His3MX6-GAL1-GFP-RDII</i>	Diese Arbeit
CTY135	<i>MATa ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1Δ63 his3Δ200 leu2Δ1 LEU2-SEC6-4 ts Δsec6::klTRP1 HIS3-3HA-CDC42</i>	Diese Arbeit
CTY136	<i>MATa ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1Δ63 his3Δ200 leu2Δ1 LEU2-SEC6-4 ts Δsec6::klTRP1 HIS3-3HA-RHO1</i>	Diese Arbeit
MBY37	<i>MATa ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1Δ63 his3Δ200 leu2Δ1 LEU2-3HA-RHO1</i>	Tiedje et al. (2008)
MBY38	<i>MATa ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1Δ63 his3Δ200 leu2Δ1 LEU2-3HA-RHO2</i>	Tiedje et al. (2008)
MBY39	<i>MATa ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1Δ63 his3Δ200 leu2Δ1 LEU2-3HA-RHO3</i>	Tiedje et al. (2008)
MBY40	<i>MATa ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1Δ63 his3Δ200 leu2Δ1 LEU2-3HA-RHO4</i>	Tiedje et al. (2008)
MBY41	<i>MATa ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1Δ63 his3Δ200 leu2Δ1 LEU2-3HA-RHO5</i>	Tiedje et al. (2008)
MKY15	<i>MATa ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1Δ63 his3Δ200 leu2Δ1 KanMX6-GAL1-3HA-CBR1</i>	Diese Arbeit
PPY966	<i>MATa his3::hisG leu2::hisG trp1::hisG ura3-52</i>	Tiedje et al. (2007)

THY497	<i>MATa ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1Δ63 his3Δ200 leu2Δ1 His3MX6-GAL1-3HA-RDII</i>	Tiedje et al. (2008)
THY521	<i>MATa ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1Δ63 his3Δ200 leu2Δ1 Δrdi1::klTRP1</i>	Tiedje et al. (2008)
THY529	<i>MATa ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1Δ63 his3Δ200 leu2Δ1 RDII-9myc-klTRP1</i>	Tiedje et al. (2008)
THY567	<i>MATa ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1Δ63 his3Δ200 leu2Δ1 RDII-9myc-klTRP1 KanMX6-GAL1-3HA-STE20</i>	Tiedje et al. (2008)
THY568	<i>MATa ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1Δ63 his3Δ200 leu2Δ1 RDII-9myc-klTRP1 KanMX6-GAL1-3HA-CLA4</i>	Tiedje et al. (2008)
THY608	<i>MATa ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1Δ63 his3Δ200 leu2Δ1 Δcld4::klTRP1</i>	Diese Arbeit
THY651	<i>MATa ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1Δ63 his3Δ200 leu2Δ1 RDII-3myc-His3MX6</i>	Tiedje et al. (2008)
THY697	<i>MATa his3::hisG leu2::hisG trp1::hisG ura3-52 Δste20::hphNT1</i>	Tiedje et al. (2008)
YPH499	<i>MATa ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1Δ63 his3Δ200 leu2Δ1</i>	Sikorski und Hieter (1989)

YPH499 ist der in dieser Arbeit verwendete Wildtypstamm.

### 3.1.11 Nährmedien

Das LB-Medium für die Anzucht von *E. coli* setzte sich folgendermaßen zusammen:

#### **LB-Flüssigmedium**

0,5 % (w/v) Hefe-Extrakt  
 1 % (w/v) Trypton  
 0,5 % (w/v) NaCl

Für die Agarplatten wurden dem Medium 1,5 % (w/v) Agar zugesetzt und die Mischung autoklaviert. Bei Ampicillin-Selektion wurde dem Medium nach dem Abkühlen 1 ml einer 100 mg/ml Ampicillin-Stammlösung zugesetzt. Bei Kanamycin- oder Chloramphenicolselektion wurden je 1 ml einer 30 mg/ml bzw. 20 mg/ml Stammlösung zugesetzt.

Das Hefe-Vollmedium YPD hatte folgende Zusammensetzung:

#### **YPD**

1 % (w/v) Hefe-Extrakt  
 2 % (w/v) Pepton  
 2 % (w/v) Glucose  
 1,5 % (w/v) Agar

Das Medium wurde autoklaviert. Für die G418 Selektion (KanMX6-Marker) wurden dem Medium nach dem Abkühlen 10 ml 20 mg/ml G418 zugesetzt.

Der in dieser Arbeit verwendete Hefe-Wildtyp trägt Mutationen in den Genen zur Tryptophan-,

Histidin-, Leucin- und Uracil-Synthese. Da er diese essentiellen Aminosäuren und die Base Uracil nicht bilden kann, besitzt er dementsprechend nicht die Fähigkeit auf einem Medium zu wachsen, dem eine dieser Aminosäuren oder Uracil fehlt. Wird der Stamm mit einem Plasmid oder einer Transformationskassette transformiert, die eine der Aminosäuren als Selektionsmarker enthält, kann er die Fähigkeit erlangen auf einem Selektionsmedium zu wachsen. Hierzu wurden SC-Medien (synthetic complete) verwendet.

### **SC-Platten (1L)**

Mischung 1:

0,67 % (w/v) Yeast Nitrogen Base w/o Amino acids

0,2 % (w/v) Drop-out Mix

2 % (w/v) Glucose

auf 400 ml H<sub>2</sub>O

Mischung 2:

1,5 % (w/v) Agar

auf 600 ml H<sub>2</sub>O

Die beiden Mischungen wurden getrennt voneinander autoklaviert und vor dem Gießen der Platten vermischt. Für Stämme, die auf Raffinose-Medium wuchsen, wurde anstatt der Glucose 3 % (w/v) Raffinose und 2 % (w/v) Galaktose zugesetzt. Mischung 1 wurde in diesem Fall sterilfiltriert und mit der autoklavierten Mischung 2 vor dem Gießen der Agarplatten gemischt.

Um die Herstellung von SC-Medien zu erleichtern, wurde ein Drop-out Mix hergestellt. In diesem Mix fehlen die Aminosäuren Histidin, Leucin und Tryptophan sowie die Base Uracil. Dies sind genau die Substanzen, die der Hefewildtypstamm nicht synthetisieren kann. Um ein SC-X-Medium (X steht für His, Leu, Trp oder Ura) herzustellen, wurden der Mischung die restlichen fehlenden Substanzen außer X zugesetzt. Somit sind diverse Selektionskombinationen möglich.

### **10 x SC-Trp-Leu-Ura Drop-out Mix**

5 g Adenin	20 g Alanin
20 g Arginin	20 g Asparagin
20 g Asparaginsäure	20 g Cystein
20 g Glutamin	20 g Glutaminsäure
20 g Glycin	20 g Inositol
20 g Isoleucin	20 g Lysin
20 g Methionin	2 g para-Aminobenzoesäure
20 g Phenylalanin	20 g Prolin
20 g Serin	20 g Threonin
20 g Tyrosin	20 g Valin

Dieser Ansatz wurde 12 Stunden gemischt und im Anschluss bei 4°C gelagert. Von dieser Mischung wurden z.B. für ein SC-Ura-Medium 18,3 g entnommen und mit 1 g Histidin, 2 g Leucin und 1 g Tryptophan versetzt. Uracil wurde der Mischung nicht zugegeben. Bei einem anderen Selektionsmarker, z.B. bei einer Leucin-Selektion, würde dementsprechend Uracil (1 g) und nicht Leucin zugegeben werden.

### 3.2 Molekularbiologische Methoden

#### 3.2.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die „polymerase chain reaction“ (PCR) stellt eine der wichtigsten Techniken der Molekularbiologie dar. Sie ist die einfachste Methode zur schnellen und effektiven Vermehrung von DNA-Fragmenten. Man nutzt dabei vor allem die Eigenschaften von hitzestabilen Polymerasen aus, die es erlauben, auch bei für Enzyme sehr hohen Temperaturen zu arbeiten. Man benötigt eine Matrizen-DNA, die amplifiziert werden soll und Desoxynukleotidtriphosphate (dNTPs), sowie passende Primer-Paare (Oligonukleotide). Die Reaktion findet in einem wässrigen Puffersystem statt, welches  $MgCl_2$  enthält. Die Primer, die auf die zu amplifizierende DNA passen, binden bei einer für sie spezifischen Temperatur an die DNA. Die Primer sind sequenzspezifisch und können nur an einzelsträngige DNA binden. Daher wird die als Doppelstrang vorliegende DNA zunächst in Einzelstränge aufgeschmolzen. Zur Amplifikation von DNA für eine Klonierung wurde stets folgender Ansatz und folgendes PCR-Programm verwendet:

#### PCR-Ansatz (Gesamtvolumen 100 $\mu$ l)

10  $\mu$ l dNTPs (2 mM)  
 10  $\mu$ l 10 x Puffer  
 10  $\mu$ l  $MgCl_2$  (25 mM)  
 0,4  $\mu$ l *Taq*-Polymerase (entspricht 2 U)  
 0,2  $\mu$ l *Vent*-Polymerase (entspricht 0,4 U)  
 0,5  $\mu$ l je Primer (vorwärts und rückwärts)  
 1  $\mu$ l chromosomale DNA aus *S. cerevisiae* (entspricht ca. 1  $\mu$ g)  
 67,4  $\mu$ l  $H_2O$

#### PCR-Programm zur cDNA Amplifikation von chromosomaler *S. cerevisiae* DNA

Schritt	Temperatur	Dauer
1.	95°C	5 Minuten zur Hitzeaktivierung der Polymerase
2.	95°C	1 Minute zwecks Denaturierung doppelsträngiger DNA
3.	53°C	30 Sekunden (Temperatur ist variabel, da abhängig vom Primer)
4.	72°C	Die Elongationszeit ist abhängig von der Größe des Amplifikates. Die <i>Taq</i> -Polymerase ist in der Lage mindestens 1000 bp/Minute zu verknüpfen.
5.	4°C	$\infty$ Abschluss der Elongation

Ein Zyklus beginnt nach der Hitzeaktivierung der Polymerase bei Schritt 2 und geht bis Schritt 4. Danach heizt der Thermocycler wieder auf 95°C, ein neuer Zyklus beginnt. In allen PCRs dieser Arbeit, die der Amplifikation von cDNA dienen, wurden 30 Zyklen durchlaufen.

### 3.2.2 Rekombinante Fusions-PCR: Einführung von Punktmutationen und Deletionen

Die Einführung von Punktmutationen oder die gezielte Deletion von Basenpaaren in einem codierenden DNA-Insert ist mittels einer 3-Schritt-PCR möglich. Dabei werden zunächst in zwei PCR-Schritten mit Hilfe veränderter Primer, die beispielsweise eine Punktmutation im Vergleich zur normalen DNA-Sequenz tragen, zwei einzelne DNA-Fragmente amplifiziert. Es ist auch möglich Primer zu verwenden, die an zwei weit auseinander liegende Bereiche am DNA-Strang binden (der Bereich zwischen den Bindungsbereichen bildet idealerweise eine Schleife aus), und die dazwischen liegende Sequenz nicht zu amplifizieren somit ein verkürztes DNA-Fragment zu erhalten (Deletion des Bereichs). Im dritten Schritt werden die PCR-Produkte der ersten beiden PCRs miteinander im Verhältnis 1:1 gemischt und eine PCR mit dem Vorwärtsprimer aus PCR 1 und dem Rückwärtsprimer aus PCR 2 durchgeführt. Dabei wird das ganze Gen mitsamt der eingeführten Punktmutation oder Deletion amplifiziert. Das veränderte DNA-Fragment kann dann in ein Plasmid ligiert werden. Die Primer für die Einführung von Punktmutationen sind immer gleich aufgebaut. Die Mutation sollte in 5'-3'Richtung von 9 und 18 bp flankiert sein (Abbildung 3.2.1). Bei Einführung einer Deletion ist zwischen diesen Basenpaaren keine weitere Sequenz eingeführt.

Die Ansätze für die rekombinante Fusions-PCR gleichen den Ansätzen aus 3.2.1. Auch die PCR-Programme sind gleich. Lediglich die Elongationszeit muss wie bei allen PCRs der Größe des zu amplifizierenden DNA-Fragments angepasst werden. Das endgültige PCR-Produkt muss anschließend zur Überprüfung der Punktmutation oder Deletion sequenziert werden.

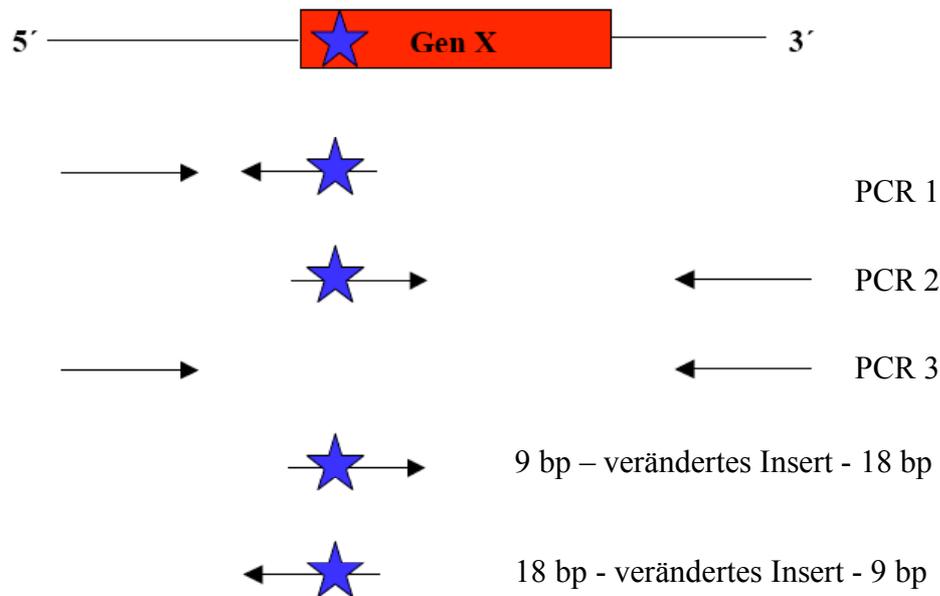


Abbildung 3.2.1: Prinzip der Einführung von Punktmutationen mittels rekombinanter Fusions-PCR. Bei PCR 1 und PCR 2 werden mit Hilfe von Primern, welche die Punktmutation enthalten und durch den Stern gekennzeichnet sind, zwei PCR-Produkte amplifiziert, die für die 3. PCR im Verhältnis 1:1 gemischt werden. In der PCR 3 kommen der Vorwärtsprimer aus PCR 1 und der Rückwärtsprimer aus PCR 2 zum Einsatz, um das komplette Gen samt Punktmutation zu amplifizieren.

### 3.2.3 Aufreinigung von DNA aus PCR-Ansätzen

Um beispielsweise PCR- oder Restriktionsansätze von störenden Enzymen wie Polymerasen, Restriktionsenzyme und Salzen wie  $MgCl_2$  zu befreien, bietet sich die Möglichkeit den Ansatz mit einem Säulensystem der Firma Qiagen („QIAquick PCR purification kit“) aufzureinigen und in einem kleinen Volumen zu eluieren. Dabei wurde nach den Angaben des Herstellers vorgegangen.

### 3.2.4 Restriktionsverdau

Restriktionsenzyme sind Endonukleasen. Sie spalten die Phosphodiesterbindungen beider Stränge eines DNA-Doppelstranges hydrolytisch und unterscheiden sich bezüglich ihrer Erkennungssequenz und ihrer Spaltstelle. Restriktionsenzyme spalten innerhalb oder nahe

ihrer exakt definierten Erkennungssequenz, die etwa 4-8 Basenpaare umfasst und meist palindromisch aufgebaut ist. So entstehen DNA-Fragmente mit definierter Länge, die entweder stumpfe oder überhängende bzw. klebrige Enden aufweisen.

Jedes Restriktionsenzym benötigt ein spezielles Puffersystem, damit eine optimale Prozessivität erreicht wird. In der Regel werden die Enzyme in einem Ansatz von 10  $\mu\text{l}$  eingesetzt. Normalerweise liegen die Aktivitäten der Enzyme im Bereich von 1 bis 10 U/ $\mu\text{l}$ . Das Volumen des Enzyms sollte dabei einen Anteil von 10 % am Gesamtvolumen des Ansatzes nicht übersteigen. Es wurde nach den Angaben des Herstellers vorgegangen.

### 3.2.5 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese stellt die Standardmethode zur Analyse von Nukleinsäuren dar. Die Auftrennung erfolgt dabei in einem elektrischen Feld. Mit Hilfe eines DNA-Längenstandards, der ebenfalls der Elektrophorese unterzogen wird, kann die Größe abgeschätzt werden. Die effektive Größe der Nukleinsäuremoleküle hängt dabei nicht nur von ihrer absoluten Masse, sondern auch von ihrer Form ab. Da DNA-Banden transparent erscheinen und somit im Gel nicht sichtbar wären, werden die DNA-Fragmente angefärbt. Als Färbereagenz wurde Ethidiumbromid benutzt, welches in doppelsträngiger DNA interkaliert und dem Gel vor dem Aushärten zugesetzt wurde. Unter UV-Licht können die Banden dann sichtbar gemacht werden. Die Agarose wurde immer in 1 x TAE-Puffer aufgelöst und in einer Konzentration von 1 % (w/v) zugesetzt. Für die Dauer der Elektrophorese eines kleinen Agarosegels mit zehn Taschen wurden in dieser Arbeit normalerweise 45 Minuten bei konstant 90 V veranschlagt.

### 3.2.6 Agarosegel-DNA-Extraktion

Es besteht die Möglichkeit DNA-Fragmente aus Agarosegelen auszuschneiden und mit dem „QIAquick Gel extraction kit“ der Firma Qiagen aufzureinigen. Dafür werden die aufzureinigenden Banden auf einem UV-Tisch vorsichtig mit einem Skalpell ausgeschnitten. Um eine effektive Aufreinigung der DNA aus dem Agarosestück zu erreichen, wurde nach den Angaben des Herstellers vorgegangen.

### 3.2.7 Ligation

Bei der Ligation handelt es sich um den Vorgang der Verknüpfung von DNA-Fragmenten. Auf molekularer Ebene ist dieser Vorgang die Knüpfung von Phosphodiesterbindungen zwischen zwei DNA-Stücken. Der 5'-Phosphorsäureester wird dafür mit der 3'-Hydroxylgruppe verestert. Die Enzyme, die solche Reaktionen katalysieren, heißen Ligasen. Sie sind in der Lage, Einzelstrangbrüche zu reparieren. Die Ligasen von Eukaryoten sind ATP-abhängig, so dass bei der Reaktion Diphosphat ( $PP_i$ ) freigesetzt wird. Bei der Ligation im Labor wird normalerweise die rekombinant hergestellte T4-Ligase aus dem T4-Phagen verwendet. Die T4-Ligase bietet sich hierbei besonders an, da sie sowohl überhängende/klebrige Enden als auch glatte Enden zusammenfügen kann.

Dem Ligationsansatz wird ATP-haltiger 10-fach T4-Ligasepuffer zugesetzt und die T4-Ligase (Aktivität 1 Weiss U/ $\mu$ l) wird normalerweise so eingesetzt, dass sie, wie auch die Restriktionsenzyme, nicht mehr als 10 % des Gesamtvolumens des Ansatzes ausmacht.

### 3.2.8 Transformation von *E. coli*

Bei der Transformation von Bakterien soll fremde Plasmid-DNA in die Zelle eingebracht werden, um diese DNA danach zu vervielfachen und zu isolieren oder das durch die neu eingebrachte DNA codierte Protein in großen Mengen zu exprimieren. Dabei werden für die jeweilige Anwendung unterschiedliche Bakterienstämme verwendet. Für die Vervielfältigung von DNA wird im Normalfall der DH5 $\alpha$  Stamm benutzt, während für die Expression von Proteinen von Plasmiden spezielle Expressionsstämme wie Rosetta(DE3)plysS oder BL21(DE3) verwendet werden (Spezifikationen der Stämme siehe 3.1.9). Um die Effizienz einer Transformation zu erhöhen, werden die Bakterien zuvor mit unphysiologisch hohen  $Ca^{2+}$ -Konzentrationen behandelt. Dadurch wird die Zellwand destabilisiert und die Bakterien für die Aufnahme von Fremd-DNA vorbereitet. Eine weitere Erhöhung der Transformationseffizienz kann durch einen kurzen Hitze- oder Elektroschock erreicht werden. Für alle in dieser Arbeit benutzten Bakterienstämme konnten folgende Transformationsmethoden angewendet werden.

## 3.2.8.1 Chemische Transformation

1. Aus einer 10 ml Übernachtskultur des entsprechenden Bakteriums werden 100 ml LB-Medium auf eine  $OD_{600}$  von 0,1 angeimpft. Wachstum bei 37°C bis die  $OD_{600}$  ungefähr zwischen 0,4 und 0,6 liegt.
2. Inkubation der Zellen für 15 Minuten auf Eis.
3. Zentrifugation für 15 Minuten bei 4500 rpm.
4. Resuspendieren der Zellen in 20 ml Puffer RF1 (siehe 3.1.5) mit anschließender Inkubation auf Eis für 15 Minuten.
5. Zentrifugation für 15 Minuten bei 4500 rpm.
6. Zellen in 4 ml Puffer RF2 resuspendieren und 15 Minuten auf Eis inkubieren.
7. Aliquots von 100 µl auf Trockeneis einfrieren oder mit der Transformation fortfahren.
8. Zugabe der zu transformierenden DNA (eingefrorene Zellen werden zuvor auf Eis aufgetaut) und Inkubation auf Eis für 45 Minuten.
9. Hitzeschock für eine Minute bei 42°C im Wasserbad.
10. Abkühlen des Transformationsansatzes auf Eis für eine Minute. Dann die Zellen ausplattieren. Die Inkubation der Platte erfolgt dann über Nacht bei 37°C, so dass sich Einzelkolonien bilden können.

**RF1**

100 mM Rubidiumchlorid  
50 mM Manganchlorid  
30 mM Kaliumacetat  
10 mM Calciumchlorid  
15 % (v/v) Glycerin  
pH 5,8 und bei 4°C lagern.

**RF2**

10 mM Rubidiumchlorid  
10 mM MOPS  
75 mM Calciumchlorid  
15 % (v/v) Glycerin  
pH 6,8 und bei 4°C lagern.

## 3.2.8.2 Elektroporation

1. Aus einer 10 ml Übernachtskultur des entsprechenden Bakteriums werden 100 ml LB-Medium auf eine  $OD_{600}$  von 0,1 angeimpft. Wachstum bei 37°C bis die  $OD_{600}$  ungefähr zwischen 0,5 und 0,6 liegt.
2. Inkubation der Zellen für 20 Minuten auf Eis.
3. Zentrifugation der Zellen für fünf Minuten bei 4500 rpm. Zellen dann in 100 ml eiskaltem Wasser resuspendieren.

4. Zentrifugation der Zellen für fünf Minuten bei 4500 rpm. Zellen dann in 100 ml eiskaltem Wasser resuspendieren.
5. Zentrifugation der Zellen für fünf Minuten bei 4500 rpm. Zellen dann in ca. 4 ml eiskaltem Wasser resuspendieren.
6. 50 bis 100  $\mu$ l dieser Zellen werden pro Elektroporation eingesetzt und dazu in eine Elektroporationsküvette (Bio-Rad, 0,1 cm) zusammen mit der zu transformierenden DNA gegeben.
7. Am Elektroporationsgerät werden folgende Einstellungen justiert.  
Spannung: 1800 V  
Capacitance extender: 250  $\mu$ FD  
Widerstand: 200  $\Omega$   
Capacitance output: 25  $\mu$ FD  
Die Küvette wird in die Vorrichtung gestellt und der Auslöser so lange gedrückt bis ein Piepton zu hören ist.
8. Die Zellen werden dann umgehend in 1 ml LB-Medium gelöst, bei 37°C für eine Stunde inkubiert und dann ausplattiert. Die Inkubation der Platte erfolgt dann über Nacht bei 37°C, so dass sich Einzelkolonien bilden können.

Es ist zudem möglich elektrokompetente Zellen über einen längeren Zeitraum bei -80°C zu lagern. Dazu werden die Zellen in einer entsprechenden Menge kaltem 10 %igen Glycerin resuspendiert und auf Trockeneis eingefroren.

### 3.2.8.3 Blau-Weiß-Selektion

Mit der Blau-Weiß-Selektion kann auf einfache Weise die Ligation (3.2.5) eines Inserts in eine Plasmid-DNA nach der Transformation des Ligationsansatzes sichtbar gemacht werden. Viele Plasmide, wie z.B. die pRS Vektoren (Sikorski und Hieter, 1989) tragen ein Gen, welches für das  $\alpha$ -Peptid codiert. Das  $\alpha$ -Peptid bildet mit dem von *E. coli* synthetisierten *lacZ*-Protein durch  $\alpha$ -Komplementation ein aktives Enzym. Dieses kann farbloses X-Gal in einen blauen Indigo-Farbstoff umwandeln. X-Gal (40  $\mu$ l einer 2%igen Dimethylformamidlösung) und das zur Induktion von *lacZ* benötigte IPTG (40  $\mu$ l, 100 mM) werden vor dem Ausplattieren der Bakterien auf den Agarplatten gleichmäßig verteilt und getrocknet. Ein erfolgreich eingebrachtes Insert stoppt die Expression des  $\alpha$ -Peptids und

somit wachsen diese Kolonien weiß. Im Falle einer Religation des Plasmids kommt es zur Expression des  $\alpha$ -Peptides und demnach zur Bildung des blauen Farbstoffes in der entsprechenden Kolonie. Die Blau-Weiß-Selektion war nicht mit allen in dieser Arbeit verwendeten Plasmiden möglich.

### 3.2.9 Isolierung von DNA aus *E. coli* (Mini-DNA-Präparation)

Mithilfe des „NucleoSpin® Kits“ der Firma Machery-Nagel kann Plasmid-DNA bequem aus *E. coli* Kulturen aufgereinigt werden. Das Bindungsvermögen der Silica-Membran liegt bei ca. 60  $\mu$ g DNA. Es wurde nach den Angaben des Herstellers vorgegangen, um die Plasmid DNA zu isolieren.

## 3.3 Proteinbiochemische Methoden

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

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) stellt das Standardverfahren zur Trennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht dar. Durch die Bindung des SDS an die Proteine wird das Molekül derartig mit negativen Ladungen besetzt, dass die ursprüngliche Ladung des Proteins vernachlässigbar wird. Das Verhältnis von Masse zu Ladung ist somit fast identisch. Angesichts dieser Tatsachen erfolgt die Trennung der Proteine bei der Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgrund der molaren Masse der Proteine. Die Bestimmung des Molekulargewichtes erfolgt anhand eines Molekulargewichtstandards, welcher ebenfalls der Elektrophorese unterzogen wird. Die Färbung von Polyacrylamid-Gelen kann durch die Zugabe eines Farbstoffs wie Coomassie Brilliant Blue erfolgen. Dazu färbt man zunächst das Gel für 15 Minuten mit der Coomassie-Färbelösung, umanschließend mit Hilfe einer Entfärbelösung das Gel so weit zu entfärben, dass lediglich die Proteine im Gel als blaue Banden erscheinen.

Die Polyacrylamid-Gele bestehen aus einem Trenngel, welchem ein Sammelgel vorgeschaltet ist. Das Sammelgel ist großporig, so dass die Proben lediglich konzentriert und nicht getrennt werden. Im Trenngel erfolgt der Siebeffekt durch kleinere Poren. Auf diese Weise werden die Proteine ihrer Größe nach aufgetrennt. Vor dem Auftragen auf das Gel werden die Proben mit 2 x SDS-Ladepuffer versetzt und für fünf Minuten bei 95°C erhitzt. Die Elektrophorese erfolgte stets bei konstant 120 V. Im Folgenden sind die Zusammensetzungen unterschiedlicher Trenngele aufgeführt.

**Trenngel (für zwei Minigele):**

	<b>8%</b>	<b>10%</b>	<b>12%</b>	<b>15%</b>
Rotiphorese 30 (Acrylamid)	2,7 ml	3,35 ml	4 ml	5 ml
H <sub>2</sub> O	4,7 ml	4 ml	3,4 ml	2,35 ml
1,5 M Tris, pH 8,8	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
10 % (w/v) SDS	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
10 % (w/v) APS	75 µl	75 µl	75 µl	75 µl
TEMED	7,5 µl	7,5 µl	7,5 µl	7,5 µl

**Sammelgel (für zwei Minigele):**

650 µl Rotiphorese 30 (Acrylamid)  
 3,1 ml H<sub>2</sub>O  
 1,25 ml 0,5 M Tris, pH 6,8  
 50 µl 10 % (w/v) SDS  
 30 µl 10 % (w/v) APS  
 6 µl TEMED

**Coomassie-Färbelösung**

7 % (v/v) Essigsäure  
 50 % (v/v) Methanol  
 0,25 % (w/v) Coomassie R250

**Coomassie-Entfärbelösung**

7 % (v/v) Essigsäure  
 50 % (v/v) Methanol

## 3.3.2 Western-Blot

Mit der Western-Blot-Analyse ist es möglich auf sensitive Weise geringe Mengen Protein zu detektieren. Dazu werden Proteine, die zuvor mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt wurden, auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Dies geschieht für eine Stunde bei konstant 350 mA in Blotting-Puffer. Ein erfolgreicher Transfer lässt sich anschließend schnell mit der Ponceau-Färbung überprüfen. Der rote Ponceau-Farbstoff bindet reversibel an die Proteine auf der Membran und lässt sich mit Wasser wieder abspülen. Bevor der Blot entwickelt werden kann, muss die Membran für ca. eine Stunde mit 5 % (w/v) Milchpulver in PBS blockiert werden. Das Blockieren der nicht mit Protein beladenen Stellen auf der Membran verhindert unspezifische Bindungsreaktionen der Primärantikörper, die zur spezifischen Detektion der Proteine eingesetzt werden. Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte stets für 1 h bei Raumtemperatur in 5 % (w/v) Milchpulver in PBS. Anschließend wurde die Membran 3 x mit PBS/T gewaschen und darauf mit dem Sekundärantikörper für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen, konnte der Blot mit den Lösungen des ECL advanced Kits entwickelt werden. Die Detektion erfolgte am LAS-3000 Imager.

### 3.3.3 Stripping von Western-Blot Membranen

Teilweise ist es notwendig einen Western-Blot nicht nur gegen einen Antikörper zu entwickeln, sondern gegen zwei oder gar mehrere. Damit es keine störenden Nebenreaktionen des neuen Primärantikörpers mit dem Primärantikörper der ersten Reaktion gibt, wird der Blot von allen gebundenen Antikörpern befreit. Dafür wird die Membran für 40 Minuten bei 50°C im unten angeführten Puffer inkubiert und anschließend drei Mal für 10 Minuten mit PBS/T gewaschen. Danach kann die Membran erneut blockiert und entwickelt werden.

#### **Stripping Puffer (10 ml)**

6,75 ml H<sub>2</sub>O

1,25 ml 0,5M Tris pH 6,8

2 ml 10 % (w/v) SDS

35 µl β-Mercaptoethanol

### 3.3.4 Bradford-Proteinbestimmung

Um die Konzentration einer Proteinlösung bestimmen zu können, führt man die Proteinbestimmung nach Bradford durch. Der Nachweis beruht auf der Entstehung eines Farbkomplexes, der bei einer Wellenlänge von 595 nm photometrisch quantifiziert werden kann. Von der Bradford-Stammlösung musste zunächst eine 1:5 Verdünnung hergestellt werden. Jeweils 1 ml dieser Verdünnung wurde mit 10 µl einer Proteinlösung (zumeist 1:10 verdünnt) vermischt und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und dann gegen den Leerwert bei 595 nm gemessen. Zwecks Bestimmung der absoluten Proteinkonzentration einer Lösung wurden aus einer 1 mg/ml BSA-Stammlösung Verdünnungen hergestellt und eine Eichgerade erstellt anhand derer man die Konzentration berechnen konnte.

### 3.3.5 Immunpräzipitation

Die Immunpräzipitation stellt eine Methode zur *in vivo* Präzipitation von Proteinen dar. Dabei wird ein Protein in einem Zelllysate von einem Antikörper gebunden und anschließend mit einer geringen Menge Protein G Sepharose präzipitiert. Die Sepharose kann ein breites Spektrum von Immunglobulinen selektiv binden. Nach einer Inkubation kann die Sepharose abzentrifugiert und durch mehrmaliges Waschen gereinigt werden. Die gebundenen Proteine

werden mit Hilfe von 2 x SDS-Ladepuffer von der Matrix eluiert. Die an die Matrix gebundenen Proteine und mögliche Interaktoren (Co-Immünpräzipitate) dieser Proteine können anschließend im Western-Blot selektiv detektiert werden. Durchführung:

1. Herstellung eines Hefelysats (siehe 3.4.3) in IP-Puffer, welcher Proteaseinhibitoren enthält.

**IP-Puffer**

20 mM Tris

100 mM NaCl

10 mM EDTA

1 mM EGTA

5 % (v/v) Glycerin

2. Mischung des Lysats mit beispielsweise 15 µl des anti-Myc (9E10) Antikörpers, was etwa 3 µg des Antikörpers entspricht. Die Menge des zugesetzten Antikörpers variiert stark und wird meist vom Hersteller vorgeschlagen. Rotation der Mischung für eine Stunde bei 4°C auf einem Rollenmischer.
3. Zugabe von etwa 30 µl mit IP-Puffer äquilibrierter Protein G Sepharose. Anschließend Rotation für eine Stunde bei 4°C auf einem Rollenmischer.
4. Dreimaliges Waschen der Sepharose mit IP-Puffer. Zentrifugation bei 2000 rpm und 4°C.
5. Elution der Proteine durch Zugabe von 35 µl 2 x SDS-Ladepuffer und Erhitzen der Proben für fünf Minuten bei 95°C.
6. Separation der flüssigen Phase von den Sepharose „Beads“ durch Zentrifugation für eine Minute bei 13200 rpm. Abnahme des Überstands. Analyse im Western-Blot.

### 3.3.6 Auftrennung von Cytosol und Membranen durch Ultrazentrifugation

Zur Analyse von Proteinen in unterschiedlichen Zellkompartimenten bietet sich die Auftrennung des Zelllysats mittels Ultrazentrifugation an. Im Vakuum der Ultrazentrifuge können Kräfte von 200000 x g erzeugt werden. In dieser Arbeit wurde häufig die Verteilung von Proteinen im Cytosol und an den Membranen analysiert.

Um ein Zelllysats in Cytosol und Membranfraktion aufzutrennen, genügt die Zentrifugation des Lysats für eine Stunde bei 100.000 x g. Die Zentrifugation erfolgte ausschließlich mit dem Ti70.1 Rotor und den dazugehörigen Schraubdeckeltzentrifugenröhrchen von Beckmann. 100.000 x g entsprechen bei diesem Rotor etwa 38200 rpm. Wichtig hierbei ist, dass zur

Herstellung des Lysats kein Triton X-100 oder ähnliche nichtionische Detergenzien eingesetzt werden, die unpolare integrale Membranproteine oder membranassoziierte Proteine solubilisieren können. Membranproteine würden so in die cytosolische Fraktion gelangen, welche nach der Ultrazentrifugation den Überstand im Zentrifugenröhrchen darstellt. Das Pellet, demnach die Membranfraktion, wird danach in Lysispuffer resuspendiert. Um eine gleichmäßige Beladung der Proben in der Western-Blot-Analyse zu gewährleisten, werden zunächst die Proteinkonzentrationen der Fraktionen mit Hilfe der Bradford-Analyse bestimmt, bevor die Proben mittels SDS-Gelelektrophorese und Western-Blot analysiert werden können.

### 3.3.7 Dephosphorylierung von Proteinen

Phosphorylierte Proteine zeichnen sich häufig durch dicht übereinander gelagerte Banden oder einen Schmier im Western-Blot aus. Um den Phosphorylierungsstatus von Proteinen zu analysieren, werden präzipitierte Proteinproben mit der Phosphatase des  $\lambda$ -Phagen behandelt. Die Phosphatase besitzt eine große *in vitro* Aktivität gegenüber phosphorylierten Serinen, Tyrosinen und Threoninen. Die  $\lambda$ -Phosphatase ist ein  $Mn^{2+}$  abhängiges Enzym, das vom Hersteller NEB mit einer Aktivität von 400 U/ $\mu$ l hergestellt wird. Um den Einfluss der Phosphatase auf das Proteinmuster genau zu bestimmen, erfolgt eine Auftrennung des Präzipitats in drei Proben. Ein Teil wird mit der Phosphatase behandelt, ein zweiter Teil mit hitzeinaktivierter Phosphatase und der dritte Teil wird unbehandelt analysiert. Somit ist es möglich das Verschwinden von Banden einzig der Phosphatase und demnach der Dephosphorylierung des Proteins zuzuschreiben. Es wurde wie folgt vorgegangen.

Dephosphorylierung von präzipitierten Proteinen aus einem 100 ml Lysat

1. Nach der Immunpräzipitation werden die „Beads“ (ca. 65  $\mu$ l) drei Mal mit Phosphatase Puffer gewaschen (20 mM Tris pH7,4, 10mM NaCl, 5 % (v/v) Glycerin).
2. Die Beads werden resuspendiert und je ca. 20  $\mu$ l in drei Reaktionsgefäße transferiert.
3. Probe A: Zugabe von nichts  
Probe B: 100 U  $\lambda$ -Phosphatase (400 U/ $\mu$ l), + je 4  $\mu$ l 10 x Puffer und 10 x  $MnCl_2$   
Probe C: 100 U inaktivierte  $\lambda$ -Phosphatase (20  $\mu$ l Mix)

**Mix besteht aus:**

0,5 µl λ-Phosphatase  
4 µl 10 x λ-Phosphatase-Puffer  
4 µl 10 x MnCl<sub>2</sub> (mM)  
4 µl 0,5 M EDTA  
28 µl Phosphatase-Puffer (s. oben)  
Σ 40µl

Inaktivierung des Mixes für 30 Minuten bei 95°C im Heizblock.

6. Nach Zugabe der Phosphatase Inkubation für 30 Minuten bei 30°C.
7. Zugabe von 25 µl 2 x SDS-Ladepuffer. Proben für fünf Minuten bei 95°C erhitzen und anschließend für eine Minute bei 13200 rpm abzentrifugieren.

### 3.3.8 Expression und Aufreinigung rekombinanter Proteine

Die Expression und Aufreinigung rekombinanter Proteine in dem Bakterium *E. coli* stellt eine zentrale Methode in der Biochemie dar. Dabei kommen für die Proteinexpression andere Bakterienstämme zum Einsatz als bei der Vermehrung von DNA (DH5α Stamm, siehe 3.2.7 und 3.2.7). In Proteinexpressionsstämmen, wie BL21(DE3) und Rosetta(DE3)plysS (siehe 3.1.9), sind bestimmte Proteasen, die eine erhöhte Proteinexpression behindern können, deletiert. Der Stamm Rosetta(DE3)plysS enthält zudem zusätzliche Plasmide mit Chloramphenicolresistenzen, die für seltene tRNAs codieren und die Expression von Proteinen noch weiter verbessern soll. Die Expression wird in der Regel nicht bei 37°C, sondern bei 30°C oder 23°C durchgeführt. Um die Eigenschaften des Expressionsstammes zu bewahren, muss demnach zusätzlich zur Selektion des Expressionsplasmides, welches das Protein codiert, mit Chloramphenicol (20 µg/ml) selektiert werden. Mit Hilfe der zuvor genannten stark induzierbaren Expressionsplasmide können Proteine sowohl im kleinen als auch großen Maßstab exprimiert und anschließend aufgereinigt werden. In den meisten Fällen werden die Proteine als Fusionsproteine mit einem Affinitätsmarker („tag“) exprimiert. Diese Affinitätsmarker sind beispielsweise das Glutathion-S-Transferase (GST) Protein oder ein 6-Histidin-Marker, bei dem entweder am N-Terminus oder am C-Terminus sechs hintereinander gelegene Histidine an das Protein fusioniert werden. Mit Hilfe von Bindungsmatrices können die markierten Proteine auch ohne ein Säulensystem relativ sauber aufgereinigt werden. Für den GST-Marker wurde in dieser Arbeit Glutathion Sepharose verwendet. Das Glutathion fungiert als selektive Bindungsstelle für das GST-Fusionsprotein. Für den His<sub>6</sub>-Marker wurde Ni-NTA-Agarose verwendet. Dabei wurde die komplexierende Wirkung zweier Histidinreste

genutzt. Zusammen mit der Nitrilotriessigsäure, welche in wässriger Lösung  $\text{Ni}^{2+}$  komplexiert (Metallchelatchromatographie), kann das markierte Protein das  $\text{Ni}^{2+}$  komplexieren und liegt dann im gebundenen Zustand vor.

#### 3.3.8.1 Expressionsüberprüfung rekombinanter Proteine in *E. coli*

Um die Expression von rekombinanten Proteinen in Bakterien zu überprüfen, wird die Expression mit 1 mM IPTG induziert. Anschließend werden Proben der Zellen zu bestimmten Zeitpunkten nach Induktionsbeginn genommen (1, 2 und 3 Stunden nach Induktion). Dazu vergleicht man die Proben mit einem Proteinlysate uninduzierter Zellen (Zeitpunkt 0 Stunden). Es wurde wie folgt vorgegangen.

1. Ausgehend von einer Übernachtskultur des Bakterienstammes (BL21(DE3) oder Rosetta(DE3)plysS), der ein Expressionsplasmid enthält, werden 5 ml Selektionsmedium auf eine  $\text{OD}_{600} = 0,4$  angeimpft und zunächst für eine Stunde bei  $30^\circ\text{C}$  wachsen gelassen (230 rpm).
2. Vor der Induktion mit 1 mM IPTG (Endkonzentration) werden 1 ml Zellen abgenommen und folgendermaßen aufgearbeitet: Die Zellen eine Minute bei 13200 rpm abzentrifugieren und in 50  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  resuspendieren. Zugabe eines äquivalenten Volumens 2 x SDS-Ladepuffer mit anschließender kurzer Sonifizierung. Die Proben 5 Minuten bei  $95^\circ\text{C}$  erhitzen und dann 30 Sekunden bei 13200 rpm abzentrifugieren.
3. Proben nach 1, 2 und 3 Stunden Induktion werden genau so aufgearbeitet, jedoch zunächst in 100, 200 und 300  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  resuspendiert.
4. Die Proben und somit die Expression der Proteine können nun miteinander mittels SDS-Gelelektrophorese (siehe 3.3.1) und anschließender Coomassie-Färbung verglichen werden.

#### 3.3.8.2 His<sub>6</sub>-Aufreinigung rekombinanter Proteine

Es wurden zumeist 200 ml oder weniger Zellen wie folgt aufgearbeitet.

1. Mit den Zellen einer 10 ml Übernachtskultur werden 200 ml Selektionsmedium angeimpft und für eine Stunde bei  $30^\circ\text{C}$  und 230 rpm wachsen gelassen.

2. Induktion mit 1 mM IPTG (Endkonzentration) für drei Stunden bei 30°C und 230 rpm.
3. Abzentrifugieren der Zellen für 15 Minuten bei 4500 rpm und 4°C. Waschen der Zellen mit kaltem Wasser und erneute Zentrifugation.
4. Resuspendieren der Zellen in 20 ml Sonifizierungs-Puffer, der 1 Protease Inhibitor Tablette enthält.
5. Sechsmaliges Sonifizieren der Zellen für eine Minute mit dem Sonopuls HD 2070. Zwischen den Sonifizierungszyklen jeweils eine Minute Zellen auf Eis stellen.
6. Zugabe von 0,1 bis 1 % (v/v) Triton X-100 mit anschließender Inkubation auf Eis für 10 Minuten.
7. Abzentrifugieren der Zellen bei 4500 rpm für 15 Minuten bei 4°C. Abnahme des Überstands in ein 50 ml Plastikröhrchen.
8. Zugabe von 350 µl Ni-NTA-Agarose, welche zuvor zweimal mit Sonication-Puffer gewaschen wurde. Inkubation auf einem Rollenmischer bei 4°C für ca. 90 Minuten.
9. Abzentrifugieren der Agarose für zwei Minuten bei 2000 rpm und anschließendes zweimaliges Waschen mit Wasch-Puffer.
10. Die Beads in 2 ml Wasch-Puffer resuspendieren und Proteaseinhibitoren dazugeben (50 µl einer 5 ml Lösung, in der eine Inhibitortablette gelöst wurde). Lagerung bei 4°C. Bei längerer Lagerung sollte noch 1 mM DTT und 0,03 % (w/v) Natriumazid zugesetzt werden.
11. Analyse der Fraktionen (Lysat nach Zellaufschluss, Überstände beim Waschen) mittels SDS-Gelelektrophorese und Coomassie-Färbung (siehe 3.3.1).

**Sonifizierungs-Puffer (500 ml)**

50 mM NaP, pH 7,6  
(aus 21,2 ml 1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
plus 3,9 ml 1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)  
300 mM NaCl  
0,1 mM MgCl<sub>2</sub>  
10 mM Imidazol

**Wasch-Puffer (1 L)**

50 mM NaP, pH 7,6  
(aus 42,25 ml 1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
plus 7,75 ml 1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)  
500 mM NaCl  
30 mM Imidazol

Das Imidazol in Sonifizierungs- und Wasch-Puffer verhindert unspezifische Bindungen von Proteinen an die Agarose. Mit einer 0,5 M Imidazol-Lösung (in Wasch-Puffer) lassen sich die Proteine problemlos von der Agarosematrix eluieren. Dabei wird die Mischung für ca. 30 Minuten bei Raumtemperatur oder bei 4°C mit Hilfe eines Rotators gedreht. Im Überstand sind dann die eluierten Proteine zu finden.

## 3.3.8.3 GST-Aufreinigung

In Bakterien exprimierte Proteine, die einen GST-Affinitätsmarker tragen, wurden wie folgt aufgereinigt. Zumeist wurden 200 ml oder weniger Zellen aufgearbeitet.

1. Mit den Zellen einer 10 ml Übernachtskultur werden 200 ml Selektionsmedium angeimpft und für eine Stunde bei 30°C und 230 rpm wachsen gelassen.
2. Induktion mit 1 mM IPTG (Endkonzentration) für drei Stunden bei 30°C und 230 rpm.
3. Abzentrifugieren der Zellen für 15 Minuten bei 4500 rpm und 4°C. Waschen der Zellen mit kaltem Wasser und erneute Zentrifugation.
4. Resuspendieren der Zellen in 20 ml 1 x PBS (pH 7,3), das 1 Protease Inhibitor Tablette enthält.
5. Sechsmaliges Sonifizieren der Zellen für eine Minute mit dem Sonoplus HD 2070. Zwischen den Sonifizierungszyklen jeweils eine Minute Zellen auf Eis stellen.
6. Zugabe von 0,1 bis 1 % (v/v) Triton X-100 mit anschließender Inkubation auf Eis für 10 Minuten.
7. Abzentrifugieren der Zellen bei 4500 rpm für 15 Minuten bei 4°C. Abnahme des Überstands in ein 50 ml Plastikröhrchen.
8. Zugabe von 350 µl Glutathion-Sepharose 4B, die zuvor zweimal mit 1 x PBS gewaschen wurde. Inkubation auf einem Rollenmischer bei 4°C für ca. 90 Minuten.
9. Abzentrifugieren der Sepharose für zwei Minuten bei 2000 rpm und anschließendes zweimaliges Waschen mit 1 x PBS, welches 0,5 % (v/v) Triton X-100 enthält.
10. Die Beads in 2 ml 1 x PBS resuspendieren und Proteaseinhibitoren dazugeben (50 µl einer 5 ml Lösung, in der eine Inhibitortablette gelöst wurde). Lagerung bei 4°C. Bei längerer Lagerung sollte noch 1 mM DTT und 0,03 % (w/v) Natriumazid zugesetzt werden.
11. Analyse der Fraktionen (Lysat nach Zellaufschluss, Überstände beim Waschen) mittels SDS-Gelelektrophorese und Coomassie-Färbung (siehe 3.3.1).

Auch Proteine, die an die Glutathion-Sepharose gebunden sind, lassen sich einfach in den Überstand eluieren. Die Elution erfolgt durch reduziertes Glutathion (30 mM), das dem Elutions-Puffer zugesetzt wird und das gebundene GST-Fusionsprotein von der Sepharose verdrängt. Die Elution erfolgt in Elutions-Puffer unter Rotation bei 4°C für ca. 30 bis 60 min.

### 3.3.9 *In vitro* Bindung rekombinanter Proteine

Während die Co-Immunpräzipitation zur Bestätigung von *in vivo* Wechselwirkungen von Proteinen dient, können durch die Bindung von Proteinen in einem *in vitro* System Rückschlüsse auf die direkte Bindung der Proteine aneinander gezogen werden. Für ein *in vitro* Bindungsexperiment setzt man nur rekombinant hergestellte Proteine ein. Ein Bindungspartner wird dem anderen, welcher an eine Matrix gebunden ist, in eluierter Form zugesetzt. Der Ansatz wird dann für ca. 90 Minuten unter Rotation bei 4°C inkubiert. Anschließend wird der Ansatz mindestens fünf Mal mit Puffer, der 0,5 % (v/v) Triton X-100 enthält, gewaschen. Als Bindungs- und Waschpuffer wird in der Regel der Puffer genutzt, mit dem die an die Matrix gebundenen Proteine hergestellt wurden. Um unspezifische Bindungsreaktionen zu vermeiden, kann die Matrix mit einer BSA-Lösung (0,2 mg/ml) präinkubiert werden. Dies erfolgt durch Resuspension der gebundenen Proteine in 1 ml Bindungspuffer, der das BSA enthält und rotiert für etwa 90 Minuten bei 4°C.

### 3.3.10 Kinase-Assay

Der *in vitro* Kinase-Assay dient der Nachahmung von Phosphorylierungsreaktionen, die von Kinasen ausgeführt werden. Dabei wird die Fähigkeit von Kinasen genutzt, Phosphate auf Proteine zu übertragen. Zur Detektion dieser Reaktion wird radioaktiv markiertes ATP ( $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP) verwendet. Die Substrate werden meist rekombinant hergestellt. Die Kinasen können beispielsweise aus einem Zelllysate nach Überexpression immunpräzipitiert oder rekombinant hergestellt werden. Es wurde wie folgt vorgegangen.

1. Dreimaliges Waschen der präzipitierten Kinase in Kinase-Assay-Puffer. Resuspendieren der Kinase in etwa 30  $\mu$ l Kinase-Assay-Puffer.
2. Zugabe von 0,5 bis 3  $\mu$ g Substrat.
3. Zugabe von 3  $\mu$ Ci radioaktivem  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP (100  $\mu$ Ci/10  $\mu$ l). Vorsichtig auf- und abpipettieren. Inkubation für 30 Minuten im 30°C Wasserbad.
4. Abstoppen der Reaktion mit 10  $\mu$ l 4 x SDS-Ladepuffer. 5 Minuten bei 95°C erhitzen.
5. 15 % SDS-Gelelektrophorese. Die Lauffront nicht aus dem Gel laufen lassen, da diese sehr radioaktiv ist. Gel anschließend auf zwei Whatmann-Papiere legen.
6. Trocknung des Gels für zwei Stunden bei 80°C auf einem Gel Trockner.

7. Das getrocknete Gel zunächst über Nacht gegen eine gelöschte Phosphoimagerplatte in einer Röntgenfilmkassette exponieren. Entwicklung am Phosphoimager.
8. Bei sehr schwachen Signalen kann die Expositionsdauer verlängert werden.

#### **Kinase-Assay-Puffer**

1 mM EGTA  
2 mM MgCl<sub>2</sub>  
1 mM DTT  
0,5 M Natrium-o-Vanadat  
10 mM β-Glycerophosphat  
50 mM Tris, pH 8,0

### **3.4 Hefe-Methoden**

#### 3.4.1 Herstellung kompetenter Hefezellen

Hefezellen können wie auch Bakterien oder Säugerzellen Plasmid-DNA aufnehmen. Für die erfolgreiche Aufnahme von Fremd-DNA müssen die Zellen durch chemische Behandlung vorbereitet werden. Dafür wird die Zellwand durch Behandlung mit Lithiumacetat und Sorbitol permeabler gemacht wird. Es wurde wie folgt vorgegangen.

1. Aus einer Übernachtskultur im entsprechenden Selektionsmedium werden 50 ml Selektionsmedium auf eine OD<sub>600</sub> = 0,3 angeimpft.
2. Wachstum bei 30°C und 230 rpm bis die OD<sub>600</sub> zwischen 0,6 und 0,8 liegt. Bei optimalen Bedingungen teilt sich dabei eine haploide Hefezelle etwa alle 90 Minuten.
3. Abzentrifugieren der Zellen für 2 Minuten bei 3200 rpm und 4°C. Waschen der Zellen mit H<sub>2</sub>O. Erneutes Abzentrifugieren.
4. Resuspendieren der Zellen in 10 ml LiSorb (siehe 3.1.5). Abzentrifugieren der Zellen für 2 Minuten bei 3200 rpm und 4°C.
5. Resuspendieren der Zellen in 300 µl LiSorb und Zugabe von 30 µl denaturierter Träger-DNA (Lachssperma-DNA, welche 10 Minuten bei 95°C denaturiert wurde). Mischen der Zellen mit der Träger-DNA durch auf- und abpipettieren.
6. Einfrieren der Zellen in 50 µl Aliquots auf Trockeneis oder sofort mit Transformation von Fremd-DNA (siehe 3.4.2) fortfahren.

**LiSorb**

100 mM Lithiumacetat  
10 mM Tris  
1 mM EDTA  
1 M Sorbitol  
pH mit HCl auf 8,0 einstellen,  
dann sterilfiltrieren

**LiPEG**

100 mM Lithiumacetat  
10 mM Tris  
1 mM EDTA  
40 % (w/v) PEG 3350  
pH mit HCl auf 8,0 einstellen,  
dann sterilfiltrieren und bei + 4°C aufbewahren.

## 3.4.2 Hefe-Transformation

Nach der Vorbereitung der Hefezellen kann Fremd-DNA in die Zellen eingebracht werden. Die Fremd-DNA wird mit Hilfe einer zähflüssigen Lithiumacetat-Polyethylenglykol-Lösung (LiPEG) in die Zellen aufgenommen. Nach der Transformation müssen die Zellen für etwa 48 Stunden auf einer Selektionsplatte bei normalerweise 30°C wachsen, bis erste kreisförmige Kolonien mit einem Durchmesser von ca. 0,5 mm zu erkennen sind. Bei der Hefe-Transformation wurde wie folgt vorgegangen.

1. Mischen von 50 µl Zellen aus 3.4.1 mit 1 µl Plasmid-DNA, also etwa 0.2 µg. Im Falle der Transformation mit einem PCR-Produkt werden 5 µl des PCR-Produktes transformiert.
2. Zugabe von 300 µl LiPEG. Ansatz kräftig vortexen und bei Raumtemperatur für 20 Minuten inkubieren.
3. Zugabe von 35 µl DMSO, das die Transformationseffizienz erhöht. Ansatz kräftig vortexen und dann für 15 Minuten im Wasserbad bei 42°C inkubieren.
4. Zellen 1 Minute bei 3200 rpm abzentrifugieren. Das Zellpellet in 75 µl H<sub>2</sub>O resuspendieren und auf einer Selektionsplatte ausplattieren.
5. Werden die Zellen mit einem G418-marker transformiert, müssen die Zellen aufgrund der Toxizität des Antibiotikums vor dem Ausplattieren für 4 Stunden bei 30°C in 1 ml Vollmedium (YPD) inkubiert werden.

Nach dem Ausplattieren werden die Zellen bei 30°C inkubiert.

## 3.4.3 Split-Ubiquitin-Technik und Transformation großer Zellzahlen mit Gen-Bibliotheken

Die Analyse von Protein-Protein-Interaktionen ist in der Hefe *S. cerevisiae* besonders gut möglich. Hinzu kommt, dass im Hefesystem durch das gezielte Durchsuchen (Screen) von Gen-Bibliotheken die Bestimmung von völlig neuen Interaktionen möglich ist. Dies gilt sowohl für hefeeigene als auch fremde Proteine und Gen-Bibliotheken. Hierbei hat sich in den letzten Jahren neben der klassischen Hefe-2-Hybrid Technik eine Variante als besonders erfolgreich, reproduzierbar und störungsunanfällig gezeigt. Diese Technik wird als Split-Ubiquitin Technik (Johnsson und Varshavsky, 1994) bezeichnet und basiert auf der Fusion des Köderproteins mit der C-terminalen Hälfte des Ubiquitins. An dem C-Terminus des C-terminalen Fragments des Ubiquitins ist zudem eine veränderte Form des Ura3 Enzyms als Reporter gekoppelt, das am extremen N-Terminus ein zusätzliches Arginin besitzt (RUra3).

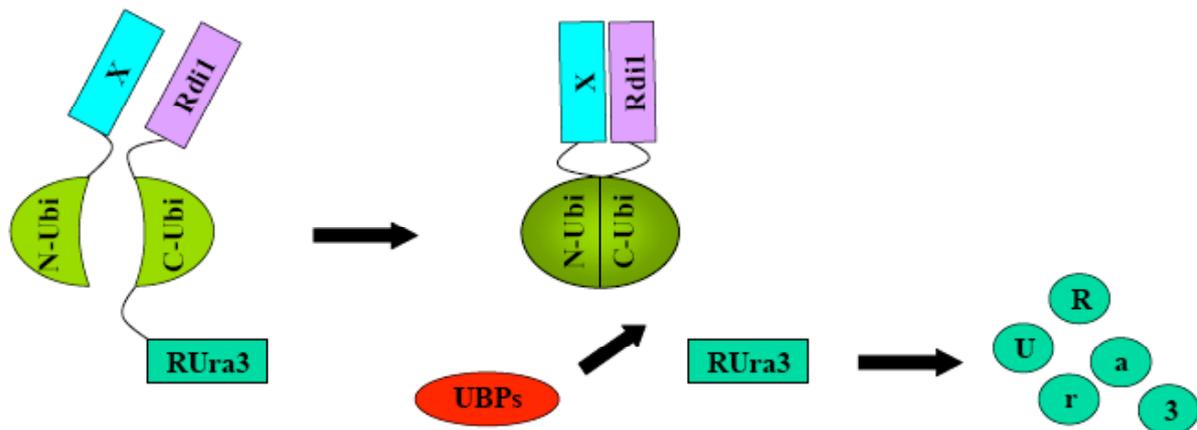


Abbildung 3.4.1: Schematische Darstellung der Split-Ubiquitin Technik am Beispiel der Interaktion von dem Protein Rdi1 mit einem Protein X. Nach der Assemblierung der beiden Ubiquitin-Untereinheiten im Falle einer Interaktion von Rdi1 mit einem Protein X, spalten Ubiquitin-spezifische Proteasen (UBPs) den RUra3 Reporter von der C-terminalen Ubiquitinuntereinheit ab. Der RUra3 Reporter wird darauf schnell abgebaut, so dass das in den Wachstumsplatten enthaltene 5-FOA nicht in eine toxische Substanz umgewandelt werden kann. Zellen in denen es keine Interaktion gibt, wachsen nicht auf diesen Platten.

Die zu durchsuchende Gen-Bibliothek besteht aus zufällig geschnittenen chromosomalen DNA-Abschnitten, die mit der N-terminalen Hälfte von Ubiquitin fusioniert sind. Kommt es zur Interaktion der beiden Fusionsproteine, so wird das Ubiquitin als physiologisches Protein rekonstituiert. In jeder Zelle vorhandene Ubiquitin-spezifische Proteasen (UBPs) spalten dann den Reporter vom Ubiquitin ab, der anschließend schnell durch den Abbauweg nach der N-Ende-Regel abgebaut wird. Das Enzym Ura3 kann die Verbindung 5-FOA in eine für die

Zellen toxische Verbindung umwandeln. Demnach können Zellen, in denen es zu einer Proteininteraktion kommt und der R<sub>Ura3</sub>-Reporter abgebaut wird, auf Platten, die 5-FOA enthalten, wachsen. Andersherum können diese Zellen auf Platten, denen Uracil fehlt, nicht wachsen. Es ist folglich eine doppelte Selektion möglich. Das Köderplasmid trägt zusätzlich den *HIS3*-Marker und das Bibliotheksplasmid den *LEU2*-Marker.

Um möglichst viel Bibliothek-DNA in Zellen zu transformieren, die bereits das Köderplasmid in sich tragen, wird eine sehr große Zellzahl transformiert. Ziel ist es möglichst viele Doppeltransformatanden zu erhalten, um das gesamte Genom durchsuchen zu können und somit möglichst viele Interaktoren des Köderproteins zu identifizieren. Bei der Transformation im großen Maßstab wird wie folgt vorgegangen:

1. Es wird eine 50 ml Übernachtskultur mit den Zellen, die das Köderplasmid enthalten in SC-His Medium angeimpft. Wachstum bei 30°C und 230 rpm.
2. Zellen für 5 Minuten bei 3200 rpm abzentrifugieren und in 150 ml YPD Medium auf eine OD<sub>600</sub> von 0,3 animpfen. Wachstum bis OD<sub>600</sub> 1,0 ist ( $2 \times 10^7$  Zellen).
3. Zellen 5 Minuten bei 3200 rpm abzentrifugieren und mit 100 ml Wasser waschen.
4. Resuspendieren der Zellen in 3 ml 100 mM Lithiumacetat. Inkubation bei 30°C für 15 Minuten.
5. Zellen 5 Minuten bei 3200 rpm abzentrifugieren und Zellen vorsichtig in 5,4 ml Transformations-Mix resuspendieren. 1/20 (270 µl) des Volumens separat aufbewahren und nicht mit Bibliotheks-DNA transformieren, ansonsten gleich weiterbehandeln (Negativkontrolle).

#### **Transformations-Mix**

3,6 ml 50 % (w/v) PEG 3,350

540 µl 1 M Lithiumacetat

1,5 mg Träger-DNA (150 µl einer 10mg/ml Stammlösung; Inkubation der Lachs-sperma-DNA für 5 bis 10 Minuten bei 95°C, Abkühlen auf Eis)

1,1 ml H<sub>2</sub>O

Lösung kräftig vortexen!

6. Zugabe von 15 µg Bibliotheks-DNA zur Transformations-Mix Zell-Suspension. Mindestens für 20 Sekunden kräftig vortexen. Inkubation für 30 Minuten bei 30°C.
7. Zugabe von 500 µl DMSO. Inkubation für 40 Minuten im 42°C Wasserbad.
8. Zellen 5 Minuten bei 3200 rpm abzentrifugieren und in 5,5 ml Wasser resuspendieren. 10 µl dieser Lösung und eine 1:10 Verdünnung davon, werden auf SC-His/Leu Platten ausplattiert, um die Transformationseffizienz (Anzahl der Doppeltransformatanden)

durch Auszählen bestimmen zu können. Die restlichen Zellen werden zu je 275 µl auf den großen Screen-Platten ausplattiert.

9. Inkubation der Platten bei 30°C. Nach zwei Tagen sollte die Zahl der Doppeltransformatanten bestimmt werden. Am darauf folgenden Tag sollten im Idealfall erste Klone auf den 5-FOA Platten zu erkennen sein (positive Klone/positive Interaktoren), die in den darauf folgenden Tagen immer größer werden. Nach 5 Tagen des Wachstums zeigt sich im Normalfall so viel Hintergrundwachstum, dass keine neuen potentiellen positiven Klone mehr isoliert werden können. Positive Klone werden auf separate Platten, welche die gleiche Zusammensetzung haben wie die Screen-Platten, ausgestrichen und dann weiter aufgearbeitet (siehe Ergebnisteil).

Die Minimalmedium-Platten für einen Split-Ubiquitin-Screen besitzen folgende Zusammensetzung:

#### **Platten für Split-Ubiquitin-Screen (1 L)**

6,7 g Bacto yeast nitrogen base w/o amino acids

20 g Glucose

50 mg Uracil

20 mg Adenin

20 mg Tryptophan

30 mg Lysin

0.5 g 5-FOA

400 ml H<sub>2</sub>O

Mischung lösen und sterilfiltrieren.

Agar separat autoklavieren

20 g Agar

600 ml H<sub>2</sub>O

Mischen der beiden Lösungen. 2 Liter sind für mindestens 20 Platten mit 15 cm Durchmesser ausreichend. Zur Versuchsdurchführung werden 20 Platten für die Analyse der Interaktoren und eine Platte als Negativkontrolle benötigt.

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

Da Hefezellen über eine äußerst stabile Zellwand verfügen, reicht es nicht die Zellen in einem detergenzhaltigen Puffer zu inkubieren, um ein Gesamtzelllysate zu erhalten. Der Aufschluss von Hefezellen kann entweder mechanisch durch vortexen mit Glasperlen oder chemisch mit stark alkalischer Lösung und anschließender saurer Fällung der Proteine erfolgen. Im

Unterschied zum Aufschluss mit Glasperlen, liegen die Proteine nach der TCA-Fällung im denaturierten Zustand vor.

#### 3.4.4.1 TCA-Fällung von Hefeproteinen

Um mittels einer TCA-Extraktion Proteine zu gewinnen, können entweder die Zellen aus einer Flüssigkultur oder direkt von der Agarplatte genommen werden. Bei Verwendung einer Flüssigkultur wird 1 ml Zellsuspension für 1 Minute bei 3.200 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das zurückbleibende Pellet wird in 1 ml H<sub>2</sub>O resuspendiert. Bei Verwendung von Zellen, die auf einer Agarplatte wachsen, wird etwas Zellmaterial in 1 ml H<sub>2</sub>O mit einem Zahnstocher resuspendiert. Die TCA-Fällung wurde wie folgt durchgeführt.

1. Zugabe von 150 µl 1,85 M NaOH zu der 1 ml Zellsuspension. Inkubation auf Eis für exakt 10 Minuten.
2. Zugabe von 150 µl 55 % (w/v) TCA. Inkubation auf Eis für mindestens 10 Minuten.
3. Zentrifugation bei 16400 rpm/25000 x g bei 4°C.
4. Verwerfen des Überstands und resuspendieren des Pellets in 50 bis 100 µl 2 x SDS-Ladepuffer. Das Volumen ist dabei von dem des Präzipitats abhängig. Erhitzen der Proben für fünf Minuten bei 95°C.
5. Zentrifugation für 1 Minute bei 13200 rpm/16100 x g.

#### 3.4.4.2 Lysatherstellung mittels Glasperlen-Aufschluss

Eine schonende Methode zur Herstellung von Hefezelllysaten stellt der Aufschluss mit dem Einsatz von Glasperlen dar. Dabei können mit dem Lysat, in dem die Proteine im physiologischen Zustand vorliegen, neben der einfachen Expressionsanalyse auch eine Vielzahl an biochemischen Experimenten durchgeführt werden.

Die Zellsuspension wird mit Glasperlen versetzt und anschließend gevortext. Die Scherkräfte sorgen für die Zerstörung der massiven Zellwand der Hefezellen und zur Anreicherung der zellulären Proteine im Zellüberstand. Die Zellyse mittels Glasperlen-Aufschluss wurde wie folgt durchgeführt.

1. Ausgehend von einer Übernachtskultur der Zellen, die aufgeschlossen werden sollen, werden 50 ml Selektionsmedium auf eine OD<sub>600</sub> = 0,3 angeimpft. Wachstum der Zellen bei 30°C und 230 rpm bis die OD<sub>600</sub> zwischen 0,8 und 1,0 liegt.

2. Abzentrifugieren der Zellen bei 3200 rpm und 4°C für 2 Minuten. Waschen der Zellen in H<sub>2</sub>O. Erneutes Abzentrifugieren.
3. Resuspendieren der Zellen in 750 µl IP-Puffer, der Proteaseinhibitoren enthält (20 µl einer Stammlösung, in der eine Inhibitortablette in 5 ml H<sub>2</sub>O gelöst wurde).
4. Zugabe von soviel Glasperlen (Ø 425 bis 600 µm), dass der Flüssigkeitsmeniskus wenige Millimeter über den Glasperlen liegt.
5. 6 x 1 Minute auf der höchsten Stufe vortexen. Dazwischen die Zellen immer mindestens für 1 Minute auf Eis stellen.
6. Zellen 2 Minuten bei 3200 rpm abzentrifugieren, um die Schaumbildung rückgängig zu machen.
7. Resuspendieren der nicht aufgeschlossenen Zellen mit dem Überstand der Lösung. Anschließend Zugabe von 500 µl IP-Puffer (+ Proteaseinhibitoren) und waschen der Glasperlen. Transfer der Überstände in ein sauberes 1,5 ml Reaktionsgefäß.
8. Zugabe von Triton X-100 (Endkonzentration 1 % (v/v), erhöht die Löslichkeit der Proteinlösung). Inkubation auf Eis für 10 Minuten.
9. Zentrifugation für 2 Minuten bei 4°C und 3200 rpm. Transferieren des Überstands in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß.
10. Zentrifugation für 5 Minuten bei 4°C und 5200 rpm. Der Überstand stellt das aufgeklärte Hefezellysate dar.

Alternativ zum Aufschluss durch manuelles vortexen, kann der Aufschluss mit einem Zellhomogenisator (Precellys 24, Bertin) durchgeführt werden. Besonders bei geringeren Volumina der Flüssigkulturen bietet sich diese Methode an. Die Zellen werden in einem entsprechend geringeren Volumen IP-Puffer plus Proteaseinhibitoren resuspendiert und in ein 1,5 ml Plastikeinfrierröhrchen transferiert. Den Zellen werden nun ca. 0,25 ml Glasperlen zugesetzt. In zwei Zyklen von jeweils 20 Sekunden wird die Zellwand bei 6200 rpm im Homogenisator zerstört. Nicht aufgeschlossene Zellen werden wie im normalen Aufschlussverfahren mit dem Überstand resuspendiert und in ein sauberes 1,5 ml Reaktionsgefäß transferiert. Im Folgenden wird wie oben angegeben vorgegangen.

### 3.4.5 Isolierung chromosomaler Hefe-DNA

Die Isolierung von chromosomaler Hefe-DNA wird immer dann notwendig, wenn ein Gen davon per PCR amplifiziert werden soll, um dieses Fragment im Anschluss beispielsweise für eine Ligation in ein Plasmid zu verwenden. Außerdem können auch Veränderungen im Genom detektiert werden, in dem man die PCR-Produkte des Wildtyps mit dem PCR-Produkt des veränderten Stammes miteinander vergleicht.

Durch Zugabe von Zymolyase wird die Zellwand der Hefezellen zunächst partiell verdaut. Zymolyase kann die  $\beta$ -1,3-Glucane, den Hauptbestandteil der Hefezellwand, spalten. Die Zellen liegen dann als Sphäroblasten vor und sind leicht lysierbar. Durch Zugabe von SDS und Kaliumacetat werden die Zellen endgültig lysiert und die zellulären Proteine danach aus der Lösung gefällt. Im Anschluss daran wird die chromosomale DNA mit Ethanol präzipitiert. Die Isolierung chromosomaler Hefe-DNA wurde wie folgt durchgeführt.

1. Zellmaterial mit einem Zahnstocher von der Platte kratzen und in 400  $\mu$ l Puffer 1A resuspendieren. Inkubation für 30 Minuten bei 37°C.

**Puffer 1A**

0,9 M Sorbitol

100 mM EDTA

Zugabe von 4  $\mu$ l  $\beta$ -Mercaptoethanol und 0,1 mg Zymolyase T20.

2. Zellen für 30 Sekunden bei 14000 rpm abzentrifugieren und anschließend in 400  $\mu$ l TE-Puffer lösen. Zugabe von 90  $\mu$ l EDTA/Tris/SDS-Mix (50  $\mu$ l 0,5 M EDTA, 20  $\mu$ l 2 M Tris, pH 8,0 und 20  $\mu$ l 10 % (w/v) SDS). Inkubation für 30 Minuten bei 65°C.
3. Abkühlen der Proben auf Eis, dann Zugabe von 80  $\mu$ l 5 M Kaliumacetat. Inkubation auf Eis für mindestens 60 Minuten.
4. Abzentrifugieren des weißen Niederschlags für 5 Minuten bei 14000 rpm und 4°C.
5. Überführen des Überstandes in ein sauberes 1,5 ml Reaktionsgefäß. Zugabe von 1 ml absoluten Ethanols. Mischen der Probe.
6. Zentrifugation für 5 Minuten bei 14000 rpm und 4°C.
7. Überstand verwerfen und Präzipitat mit 1 ml 70 % (v/v) Ethanol waschen. Zentrifugation für 1 Minute bei 14000 rpm und 4°C.
8. Verwerfen des Überstands. Präzipitierte DNA bei 37°C trocknen und anschließend in 50  $\mu$ l H<sub>2</sub>O lösen. Aufbewahrung bei 4°C oder -20°C.

### 3.4.6 Isolierung von Hefe-Plasmid DNA

Auch in Hefezellen transformierte Plasmid-DNA kann in einem ähnlichen Verfahren, wie chromosomale DNA, isoliert werden. Dabei ist die Präzipitation von chromosomaler DNA im Zuge der Präparation nicht komplett zu verhindern. Die Isolierung von Plasmid-DNA aus Hefezellen wurde folgendermaßen durchgeführt.

1. Zellmaterial (Die Zellen sollten nicht älter als 4 Tage sein!) mit einem Zahnstocher von der Platte kratzen und in 500 µl Puffer 1B resuspendieren. Inkubation für 30 Minuten bei 37°C. Gelegentlich Ansatz vermischen.

**Puffer 1B**

0,9 M Sorbitol

0,1 M EDTA

Zugabe von 0,125 mg Zymolyase T20.

2. Zellen für 40 Sekunden bei 3000 rpm abzentrifugieren. Vorsichtiges Resuspendieren der Zellen in 500 µl Puffer 2B. Zugabe von 50 µl 10 % (w/v) SDS. Inkubation bei 65°C für 30 Minuten.

**Puffer 2B**

50 mM Tris

20 mM EDTA

pH 7,4

3. Zugabe von 200 µl 3 M Kaliumacetat. Mischen der Probe, dann Inkubation auf Eis für 30 Minuten.
4. Zentrifugation für 5 Minuten bei 14000 rpm. Überstand in ein neues sauberes 1,5 ml Reaktionsgefäß überführen und erneut 5 Minuten bei 14000 rpm zentrifugieren.
5. Überstand mit 700 µl Isopropanol vorsichtig mischen und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.
6. Zentrifugation bei Raumtemperatur für 10 Minuten bei 1400 rpm.
7. Überstand verwerfen und präzipitierte DNA mit 500 µl 70 % (v/v) Ethanol waschen. Inkubation bei Raumtemperatur für 10 Minuten.
8. Zentrifugation für 5 Minuten bei 14000 rpm. Verwerfen des Überstands. Präzipitierte DNA bei 37°C trocknen.
9. DNA in 20 µl sterilem H<sub>2</sub>O resuspendieren.

### 3.4.7 Genmarkierung und Gendeletionen durch gezielte homologe Rekombination

In der Hefe *S. cerevisiae* ist es möglich durch gezielte homologe Rekombination Gene direkt im Genom zu markieren oder gar zu deletieren. Mittels PCR werden DNA-Fragmente generiert, die überhängende Enden besitzen und komplementär zu flankierenden Sequenzen der zu verändernden Gene sind. Aufgrund der hohen Rekombinationsrate in Hefezellen und der äußerst geringen Anzahl an Introns im Hefegenom ist eine Rekombination dieser DNA-Fragmente mit genomischer DNA ein relativ wahrscheinlicher Prozess. Die DNA-Fragmente werden mit bestimmten Oligonukleotiden-Kombinationen von Plasmiden amplifiziert (Longtine et al., 1998; Knop et al., 1999; Janke et al., 2004), die neben dem Selektionsmarker, auch einen Proteinmarker, sowie einen induzierbaren Galaktosepromotor codieren können. Für die Amplifikation von diversen DNA-Fragmenten, die unterschiedlichste C-terminale Proteinmarker und Selektionsmarker codieren und für die Deletion des Proteins benötigt werden, sind lediglich drei unterschiedliche Primer nötig. Für die N-terminale Markierung von Proteinen mit einem neuen Promotor und unterschiedlichen Proteinmarkern sind ebenfalls nur ein Set von drei Primern notwendig.

#### 3.4.7.1 Deletion und Markierung von Proteinen durch Rekombination mit PCR-Kassetten

##### 1. Deletion

Die Amplifikation von Deletions-Kassetten erfolgt mit den S1 und S2 Primern des zu deletierenden Gens. Amplifiziert wird dabei von den pFA6a Plasmiden (Longtine et al., 1998, siehe Plasmide 3.1.9). Die Primer werden wie folgt zusammengesetzt.



Abbildung 3.4.2: Prinzip des Primerdesigns für die genspezifischen S1 und S2 Primer. 45 bp binden die Region kurz vor dem Start- bzw. Stopcodon inklusive der Start- und Stopcodons. Die 45 bp ermöglichen später die Rekombination der DNA-Fragmente in das Hefegenom. Die Überhänge in 3' Richtung sind komplementär mit Sequenzen in den pFA6a Plasmiden. Von diesen Plasmiden wird mit der PCR der Selektionsmarker amplifiziert.

**S1 Primer**

vorwärts, 45 bp in 5' Richtung vom Startcodon, das Startcodon mit eingeschlossen, dazu die Sequenz CGTACGCTGCAGGTCGAC am 3' Ende

**S2 Primer**

rückwärts komplementär, 45 bp in 3' Richtung des Stopcodons, das Stopcodon mit eingeschlossen, dazu die Sequenz ATCGATGAATTCGAGCTCG am 3' Ende

**2. C-terminale Markierung**

Für die C-terminale Markierung von Proteinen können mit den folgenden Primern DNA-Kassetten von den pYM-Plasmiden (Knop et al., 1999; Janke et al., 2004) amplifiziert werden.



Abbildung 3.4.3: Prinzip des Primerdesigns für die genspezifischen S2 und S3 Primer. Der S2 Primer wird bereits in Abbildung 3.4.2 beschrieben (siehe oben). Auch hier sind die 45 bp genspezifisch und später für die Rekombination des C-Terminus verantwortlich. Mit dem 3' Überhang werden die Proteinmarker samt Selektionsmarker von den pYM-Plasmiden amplifiziert.

**S2 Primer**

Rückwärts komplementär, 45 bp in 3' Richtung des Stopcodons, das Stopcodon mit eingeschlossen, dazu die Sequenz ATCGATGAATTCGAGCTCG am 3' Ende

**S3 Primer**

vorwärts, 45 bp in 5' in Richtung vom Stopcodon, das Stopcodon nicht eingeschlossen, dazu die Sequenz CGTACGCTGCAGGTCGAC am 3' Ende.

**3. N-terminale Markierung mit dem *GALI*-Promotor**

Für die N-terminale Markierung von Proteinen mit dem stark induzierbaren *GALI*-Promotor und unterschiedlichen Proteinmarkern können mit den folgenden Primern DNA-Kassetten von den pFA6a-Plasmiden (Longtine et al., 1998) amplifiziert werden. Die Proteine können nach der Markierung nur noch durch Induktion mit Galaktose exprimiert werden. Ist der *GALI*-Promotor, wie im Glucose-Medium, nicht angeschaltet, so entspricht die N-terminale Markierung einer Deletion. Allerdings ist der *GALI*-Promotor nicht zu 100 % ausgeschaltet.

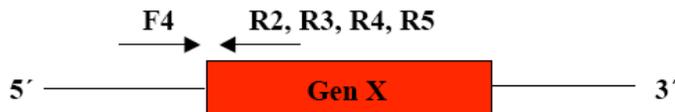


Abbildung 3.4.4: Prinzip des Primerdesigns für die genspezifischen F4 und unterschiedlichen R Primer. Abhängig von der Wahl des R Primers entscheidet sich welcher N-terminale Proteinmarker zusammen mit dem *GALI*-Promotor und dem Selektionsmarker vor das Protein integriert wird. Mit dem R2 Primer ist es möglich das Gen nur unter Kontrolle des *GALI*-Promotors zu markieren und keinen Proteinmarker davor zu setzen.

F4 Primer:

vorwärts, 45 bp in 5' Richtung von Startcodon, das Startcodon nicht eingeschlossen, dazu die Sequenz GAATTCGAGCTCGTTTAAAC am 3' Ende.

R2 Primer (kein Proteinmarker, nur *GALI*-Promotor):

rückwärts komplementär, 45 bp in 3' Richtung vom Startcodon, das Startcodon nicht eingeschlossen, dazu CATTTTGAGATCCGGGTTTT am 3' Ende.

R3 Primer (3HA-Proteinmarker):

rückwärts komplementär, 45 bp in 3' Richtung vom Startcodon, das Startcodon nicht eingeschlossen, dazu GCACTGAGCAGCGTAATCTG am 3' Ende.

R4 Primer (GST-Proteinmarker):

rückwärts komplementär, 45 bp in 3' Richtung vom Startcodon, das Startcodon nicht eingeschlossen, dazu ACGCGGAACCAGATCCGATT am 3' Ende.

R5 Primer (GFP-Proteinmarker):

rückwärts komplementär, 45 bp in 3' Richtung vom Startcodon, das Startcodon nicht eingeschlossen, dazu TTTGTATAGTTCATCCATGC am 3' Ende.

Für alle Amplifikationen kann der gleiche Ansatz und das folgende spezielle PCR-Programm verwendet werden.

### **Ansatz für die Amplifikation von DNA-Kassetten**

Gesamtvolumen 100 µl

10 µl dNTP-Mix (2mM)

10 µl 10 x Buffer (-MgCl<sub>2</sub>)

10 µl MgCl<sub>2</sub> (25 mM)

0,4 µl *Taq* DNA-Polymerase

0,2 µl *Vent* DNA-Polymerase

0,5 µl je Primer (100 µM)

0,2 µl Template DNA

auf 100 µl mit Wasser auffüllen.

**PCR-Programm für die Amplifikation von PCR-Kassetten**

1. 94°C 2 Minuten
2. 94°C 20 Sekunden
3. 50°C 30 Sekunden
4. 68°C 2 Minuten

Zurück zu Schritt 2, insgesamt 10 Zyklen

5. 94°C 30 Sekunden
6. 54°C 30 Sekunden
7. 68°C 2 Minuten

Zurück zu Schritt 5, insgesamt 20 Zyklen, nach jedem Zyklus verlängert sich die Elongationszeit bei 68°C um 20 Sekunden.

8. 4°C  $\infty$

Für eine Transformation werden 5  $\mu$ l des jeweiligen unaufgereinigten PCR-Produkts direkt transformiert. Die Zellen werden dafür nach 3.4.1 und 3.4.2 behandelt. Nach etwa 48 Stunden Inkubation bei 30°C sind erste kleine Kolonien zu erkennen. In manchen Fällen ist es notwendig die Klone auf eine Platte mit einem anderen Selektionsmarker zu transferieren. Dies wird mit Hilfe eines Stempels und Samtlappen erreicht. Die Kolonien der Ausgangsplatte werden zunächst auf den Samtlappen gedrückt. Anschließend wird die neue Platte auf den Samtlappen gepresst. Der Samtlappen ist dabei auf einem massiven Plastikstempel gespannt.

Um sicher zu gehen, dass die Kolonie aus einem einzelnen Klon resultiert und keine Mischkolonie ist, werden die Klone vereinzelt. Die Vereinzlung erfolgt mit einem Zahnstocher durch fraktioniertes Ausstreichen von etwas Kolonienmaterial auf einer neuen Selektionsplatte. Nach spätestens 48 Stunden Wachstum sind Einzelkolonien zu erkennen. Eine Einzelkolonie pro Ausgangsklon wird dann großflächig auf einer neuen Selektionsplatte ausgestrichen. Die Klone können anschließend auf eine korrekte Rekombination getestet werden. Markierte Proteine werden nach Aufschluss der Zellen im Western-Blot analysiert. Das Einfügen von Deletionen kann mittels PCR überprüft werden. Dabei wird die genomische DNA aus den Klonen isoliert und eine PCR durchgeführt bei der diese DNA als Matrize dient. Mit Primern, die in den flankierenden Bereichen um das deletierte Gen herum binden, lassen sich Klone mit Deletion von Wildtypzellen unterscheiden, da die durch Rekombination integrierten Selektionsmarker eine andere Größe als das Wildtypgen besitzen. Daher erhält man PCR-Fragmente mit unterschiedlichen, aber bestimmten Größen. Der Ansatz für die PCR und das PCR-Programm gleichen dem Standard-PCR-Programm (siehe 3.2.1). Der Ansatz wird allerdings normalerweise auf ein kleineres Volumen reduziert.

**PCR-Ansatz zur Bestätigung einer Deletion im Hefegenom (25 µl Gesamtvolumen)**

2,5 µl dNTP-Mix (2mM)  
2,5 µl 10 x Buffer (-MgCl<sub>2</sub>)  
2,5 µl MgCl<sub>2</sub> (25 mM)  
0,0625 µl *Taq* DNA-Polymerase  
0,1 µl je Primer (100 µM)  
2 µl chromosomale DNA  
auf 25 µl mit Wasser auffüllen.

**3.4.7.2 Markieren von Genen durch Integration von Plasmiden in das Hefegenom**

pRS30X-Vektoren (Sikorski und Hieter, 1989) können nach Linearisierung mit einem Restriktionsenzym direkt in das Genom von Hefezellen integriert werden. Dies geschieht nach der Transformation des geschnittenen Plasmides durch homologe Rekombination. Dabei kann entweder der Selektionsmarker geschnitten werden (siehe Abbildung 3.4.5) oder das zu integrierende Gen. Da in den Wildtyp Hefezellen die Gene *URA3*, *LEU2*, *HIS3* und *TRP1* in der chromosomalen DNA mutiert vorliegen, bietet sich eine Rekombination mit diesen Genen an. Mittels Integration von Plasmiden lassen sich Proteine unter der Kontrolle ihres eigenen Promotors markieren. Die Markierung kann dabei sowohl N- als C-terminal erfolgen. Folglich können auch Proteine markiert werden, die normalerweise C-terminal modifiziert sind. Dies ist beispielsweise bei den kleinen RhoGTPasen der Fall. Diese sind an ihrem C-Terminus prenyliert und lassen sich daher unter Kontrolle ihres eigenen Promotors nicht auf klassische Art und Weise markieren, da sie ihre Funktion verlieren würden. Im Falle des essentiellen *CDC42* wäre eine C-terminale Markierung letal für die Zellen. Auch das Einfügen von Punktmutationen ist auf diesem Wege einfach zu bewerkstelligen. Mittels Fusions-PCR kann das Insert des integrativen Plasmids verändert und dann direkt in das Hefegenom integriert werden.

**Ein typischer Linearisierungsansatz sah in dieser Arbeit wie folgt aus:**

1 µg (in der Regel 5 µl Mini-DNA) Plasmid-DNA  
2 µl 10 x Enzypuffer  
1 µl Restriktionsenzym  
12 µl H<sub>2</sub>O  
Σ = 20 µl  
Inkubation für 90 Minuten bei 37°C. 5 µl des Restriktionsansatzes wurden direkt in die Hefezellen transformiert (siehe 3.4.2).

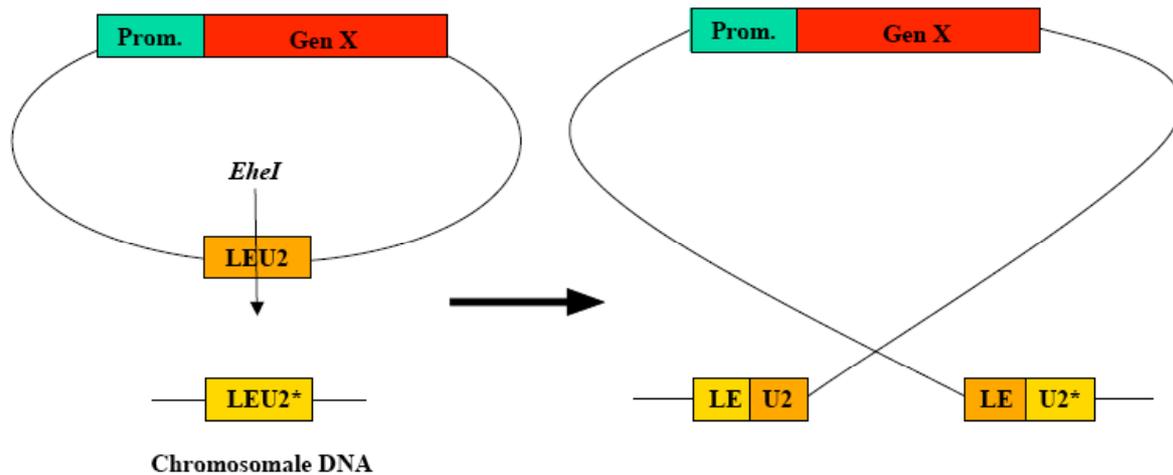


Abbildung 3.4.5: Ein GenX unter Kontrolle seines natürlichen Promotors ist einem integrativen Vektor, der den *LEU2* Marker trägt, kloniert worden. Schneidet man mit dem Restriktionsenzym *EheI* im *LEU2*-Locus, an der einzigen Schnittstelle des Enzyms im gesamten Plasmid, so kann das geschnittene Wildtyp *LEU2*-Gen mit dem mutierten *LEU2\** Gen im Genom der Hefezellen rekombinieren. Es entsteht ein neues Wildtyp *LEU2* Gen, auf das selektieren kann.

### 3.4.8 Herstellung von Verdünnungsreihen

Um das Wachstum von genetisch veränderten Hefezellen mit den Wildtypzellen bei unterschiedlichen Temperaturen miteinander zu vergleichen, werden Verdünnungsreihen hergestellt. Bei der Herstellung von einer solchen Reihe geht man von einer 2 ml Übernachtkultur aus. Von dieser Kultur wird die  $OD_{600}$  bestimmt. Eine  $OD_{600}$  von 1,0 entspricht etwa einer Zellzahl von  $2 \times 10^7$  Zellen. Anschließend werden 1000 durch den Wert der  $OD_{600}$  geteilt. Dies entspricht dem Volumen in  $\mu\text{l}$ , welches dann mit Wasser auf 1000  $\mu\text{l}$  aufgefüllt wird. Von dieser Ausgangsverdünnung werden im Anschluss eine 1:10, 1:100 und eine 1:1000 Verdünnung hergestellt. Jeweils 4  $\mu\text{l}$  dieser Verdünnungen werden dann auf die Wachstumsplatte(n) getropft und bei der gewünschten Temperatur inkubiert. Bei der Durchführung sollte stets darauf geachtet werden, dass die Zellsuspensionen gut gemischt werden, da Hefezellen aufgrund ihrer Größe schnell sedimentieren.

### 3.4.9 Fluoreszenzmikroskopie von Hefezellen

Hefezellen können, wenn sie die mit Fluorophoren markierten Proteine in sich tragen, ohne größere Probleme im Fluoreszenzmikroskop analysiert werden. Grundvoraussetzung ist eine

Fixierung der Zellen mit Paraformaldehyd und eine Immobilisierung der etwa 5 bis 10  $\mu\text{m}$  kleinen Zellen durch das Einbetten der Zellen mit dem zähflüssigen und bei Raumtemperatur sich aushärtenden Mowiol auf dem Objektträger. Um die Ergebnisse der Fluoreszenzmikroskopie zu verbessern, wird dem Medium, in dem die Zellen angezogen werden, Adenin (10 mg/ml Adeninhemisulfat, 1:100 verdünnt) zugesetzt. Die Fixierung und Einbettung von Hefezellen für die Fluoreszenzmikroskopie wurde wie folgt durchgeführt.

1. Ausgehend von einer 5 ml Übernachtskultur werden 5 ml Selektionsmedium auf eine  $\text{OD}_{600}$  von etwa 0,3 bis 0,4 angeimpft. Danach erfolgt ein Wachstum der Zellen bei in der Regel  $30^\circ\text{C}$  bis zu einer maximalen  $\text{OD}_{600}$  von 1,0.
2. 900 ml Zellsuspension werden mit 100  $\mu\text{l}$  einer 37%igen Paraformaldehydlösung vermischt und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.
3. Zweimaliges Waschen der Zellen mit je 1 ml  $\text{H}_2\text{O}$ . Zentrifugation bei 3200 rpm und Raumtemperatur.
4. Resuspendieren der Zellen in 100  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$ . Zellen vortexen und im Sonifizierwasserbad (Sonorex Super RK106, Bandelin) für 30 Sekunden sonifizieren.
5. Auf einem Objektträger dann 2  $\mu\text{l}$  Zellen mit 1  $\mu\text{l}$  Mowiol vermischen und das Deckgläschen auflegen. Aushärten des Mowiol bei Raumtemperatur für mindestens 30 Minuten. Das Aushärten sollte im Dunkeln erfolgen. Die Analyse der Zellen im Fluoreszenzmikroskop erfolgt mit einem 100-fach Immersionsobjektiv.

#### **Mowiol (25 ml)**

12 ml 0,2 M Tris pH 8,5

6 ml (v/v)

4,2 g Mowiol-Pulver

Mischung auf  $50^\circ\text{C}$  unter rühren erhitzen.

Zugabe von 6 g Glycerin, Ansatz bei  $50^\circ\text{C}$  rühren und 5 min bei 1000 rpm abzentrifugieren.

#### 3.4.10 Färbung des Aktincytoskeletts mit Rhodamin-Phalloidin

Das Aktincytoskelett der Hefezellen lässt sich mit dem Phallotoxin aus dem Pilz *Amanita phalloides* anfärben. Phallotoxine binden an die Aktinfilamente (F-Aktin), die für die Motilität, Stabilität, Transport und Integrität der Zelle als Strukturproteine eine essentielle Bedeutung besitzen. Das Phallotoxin ist mit dem Fluorophor Tetramethylrhodamin (TRITC)

gekoppelt und insgesamt mit einer Größe von nur 1,3 kDa recht klein. Ein Molekül Rhodamin-Phalloidin kann an ein Aktin-Monomer binden. Aufgrund der geringen Größe der Verbindung können andere Aktin-bindene Proteinen wie die Myosine zusätzlich an Aktin binden. Die Emission erfolgt bei einer Wellenlänge von 565 nm. Bei der Färbung des Aktins mit Rhodamin-Phalloidin wurde wie folgt vorgegangen.

1. 5 ml Medium werden mit einer Übernachtskultur auf eine  $OD_{600}$  von 0,4 angeimpft. Wachstum bis die  $OD_{600}$  1,0 ist.
2. 1,5 ml Zellen 1 Minute bei 3200 rpm abzentrifugiert und 0,9 ml 1 x PBS/T resuspendieren. Zugabe von 100  $\mu$ l 37 % Paraformaldehyd. Inkubation bei Raumtemperatur für 30 Minuten.
3. Zellen 1 Minuten bei 3200 rpm abzentrifugieren und mit 1 x PBS waschen. Anschließend in 0,9 ml PBS resuspendieren. Zugabe von 100  $\mu$ l 37 % Paraformaldehyd. Inkubation bei 30°C für 2 Stunden.
4. Zellen zwei Mal mit PBS waschen und in 90  $\mu$ l PBS resuspendieren.
5. Zugabe von 15  $\mu$ l Rhodamin-Phalloidin (0,2 U/ $\mu$ l, in Methanol gelöst). Inkubation im Dunkeln für 2 Stunden.
6. Zellen drei Mal mit PBS waschen und dann in 100  $\mu$ l PBS resuspendieren.
7. Fixieren der Zellen nach 3.4.9 mit 37 % Paraformaldehyd.
8. Analyse am Floureszenzmikroskop bei 100-facher Vergrößerung mit einem Öl-Immersionsobjektiv.

#### 3.4.11 Analyse des filamentösen Wachstums von haploiden Hefezellen

Um Polaritätsdefekte von haploiden Hefezellen bezüglich des invasiven Wachstums zu analysieren, wird die Fähigkeit zum Einwachsen der Zellen in Agarmedium untersucht. Dabei werden  $10^5$  Zellen aus einer Übernachtskultur auf eine Agarplatte getropft und bei 30°C für 48 bis 72 Stunden wachsen gelassen. Dann wird ein Foto vor dem Abspülen der Zellen mit einem schwachen Wasserstrahl und nach dem Abspülen angefertigt. Die Wildtypzellen sind nach dem Abspülen noch auf der Platte zu erkennen, da sie die Fähigkeit besitzen in den Agar einzuwachsen. Haben Veränderungen im Hefegenom, wie z.B. Gendelektionen, Auswirkungen auf das invasive Wachstum der Zellen, so können die Zellen die Fähigkeit zum Einwachsen in

den Agar verlieren oder ein gesteigertes Wachstum in den Agar aufzeigen. Dieser Effekt wird auch als hyperinvasives Wachstum bezeichnet.

Haploides invasives Wachstum wird im  $\Sigma 1278b$  Stammhintergrund (PPY966) analysiert. Dieser Stamm lässt sich wie der in dieser Arbeit für alle anderen Experimente verwendete Wildtypstamm (YPH499) verändern. Die Besonderheit des Stamms liegt in der Fähigkeit unter lokalem Nährstoffmangel, der durch die hohe Zelldichte zu Stande kommt und in einem lokalen Glucosemangel mündet, in den Agar einzuwachsen zu können.

#### 3.4.12 Bgl2-Sekretionsassay

Die Analyse von Sekretionsdefekten ist in der Hefe *S. cerevisiae* ebenfalls einfach durchzuführen. Bgl2 ist eine endo- $\beta$ -1,3-Glucanase, die einen Hauptbestandteil der Zellwand von Hefezellen darstellt und eine wichtige Funktion bei der Aufrechterhaltung und Organisation eben dieser besitzt. Bgl2 gelangt über Vesikeltransport aus dem Zellinneren in die Zellwand. Dabei wird das Protein im Zuge der Proteinbiosynthese in das endoplasmatische Reticulum (ER) transloziert und gelangt dann durch das trans-Golgi Netzwerk (dem ER abgewandt) in einem sekretorischen Vesikel zur Plasmamembran, wo es zur Verschmelzung des Vesikels und zur Freilassung von Bgl2 in die Zellmembran kommt. Der Vorgang der Verschmelzung wird auch als Exocytose bezeichnet.

Hat die Hefezelle, z.B. durch Gendeletion, einen Sekretionseffekt, so können durch Vergleich der inneren und äußeren Bgl2-Proteinmengen Rückschlüsse auf einen Defekt gezogen werden. Eine Auftrennung der Zellwandproteine und intrazellulären Proteine erfolgt durch Sphäroblastierung der Zellen mit dem Zellwand-verdauenden Enzym Zymolyase (Abbau der  $\beta$ -1,3-Glucane). Der Bgl2-Sekretionsassay nach Adamo et al. (1999) wurde folgendermaßen durchgeführt.

1. Ausgehend von einer Übernachtskultur in Selektionsmedium werden 5 ml Medium auf eine  $OD_{600}$  von 0,4 angeimpft. Wachstum bis die  $OD_{600}$  1,0 ist.
2. 0,5 ml der Zellsuspension mit 0,5 ml 2-fach Sphäroblast-Mix mischen. Inkubation für 45 Minuten bei 37°C.

**2-fach Sphäroblast-Mix**

2,8 M Sorbitol

0,1 M Tris

10 mM Natriumazid

40 µl je 10 ml Puffer β-Mercaptoethanol

5 mg je 10 ml Zymolyase T20

3. Zentrifugation für 5 Minuten bei 3200 rpm. Überstand (externe Fraktion) in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführen und mit 250 µl 5 x SDS-Ladepuffer 5 Minuten bei 95°C erhitzen.
4. Pellet (interne/cytosolische Fraktion) 0,5 ml 0,5 % (v/v) Triton X-100 resuspendieren und mit 500 µl 2 x SDS-Ladepuffer 5 Minuten bei 95°C inkubieren. Die Analyse der Fraktionen erfolgt danach im Western-Blot.

**3.4.13 Zellzyklussynchronisation mittels Metaphasearrest**

Eine elegante Methode zur Synchronisation von Hefezellen zwecks Analyse der Expression von Proteinen während des Durchschreitens des vegetativen Zellzyklusses bietet der Metaphasearrest (z.B. Höfken und Schiebel, 2002). Dabei wird das *CDC20* Gen N-terminal unter der Kontrolle des mit Galaktose stark induzierbaren *GALI*-Promotors markiert. *CDC20* codiert ein Protein, das ein Aktivator des APC (anaphase-promoting-complex) ist. Es ist für den Abbau von Anaphase-Inhibitoren, die den Übergang von der Metaphase zur Anaphase vermitteln, verantwortlich. Durch ständige Zugabe von Galaktose, bei Raffinose als Kohlenhydratquelle, ist der Promotor vor dem *CDC20* angeschaltet und die Zellen können den Zellzyklus normal durchlaufen. Wird dem Medium die Galaktose entzogen, verbleiben die Zellen im Übergang von der Metaphase zur Anaphase. Charakteristisch sind in diesem Stadium die ähnliche Größe der noch nicht abgeschnürten Tochterzelle und der Mutterzelle. Die Zellen sind nun synchronisiert. Durch Zugabe von Galaktose kann der Zellzyklus synchron in allen Zellen gestartet werden. In Abständen von 10 bis 15 Minuten werden dann den Zellen Proben entnommen, die zum einen für eine Proteinanalyse im Western-Blot und zum anderen zur Analyse des Knospungsindex („budding index“) verwendet werden. Unter optimalen Bedingungen durchläuft eine Hefezelle den vegetativen Zellzyklus in etwa 90 Minuten. Daher sollten die Proben mindestens 120 bis 150 Minuten lang entnommen werden, um sicher zu gehen, dass der Zellzyklus mindestens einmal komplett durchlaufen wurde.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Die Interaktion von Rdi1 mit Rho GTPasen

#### 4.1.1 Die Spezifität von Rdi1 gegenüber den sechs Rho GTPasen

##### 4.1.1.1 Markierung der sechs Rho GTPasen mit integrativen Plasmiden

Um die Spezifität der sechs Rho GTPasen mit dem Rho GDI Rdi1 in *S. cerevisiae* näher zu charakterisieren, wurden integrative Plasmide hergestellt. Diese Plasmide erlauben eine stabile Integration in das Hefegenom. Sie trugen die codierende Sequenz der sechs Rho GTPasen und zusätzlich eine N-terminale 3HA-Markierung, da lediglich für die GTPase Cdc42 ein Antikörper zur Verfügung stand und die Herstellung von spezifischen Antikörpern, die gegen Rho1-5 gerichtet sind, sehr aufwendig gewesen wäre. Eine einfache C-terminale Markierung mit Hilfe von PCR-Kassetten (siehe 3.4.7) war bei den Rho GTPasen ebenfalls nicht möglich, da sie am C-Terminus durch Anheftung hydrophober Gruppen, die eine Membranverankerung ermöglichen, modifiziert werden. Bei einer C-terminalen Markierung wäre diese Modifikation nicht mehr möglich gewesen und die Proteine hätten ihre physiologische Funktion nicht mehr ausüben können. Zusätzlich zur codierenden Sequenz wurden in die Plasmide 400 bp stromaufwärts vom Startcodon und stromabwärts vom Stopcodon der Sequenz hinzugefügt. Dies sollte sicherstellen, dass sowohl die Promotor- als auch die Terminatorregionen der *RHO* Gene im Plasmid enthalten sind und somit die Expression der Proteine unter Kontrolle des eigenen physiologischen Promotors und Terminators geschehen konnte. Im Folgenden wird die Prozedur der N-terminalen Markierung am Beispiel von Cdc42 gezeigt.

Zur Markierung mit dem 3HA wurde zunächst mittels rekombinanter 3 Schritt-PCR nach dem Startcodon eine *NotI*-Schnittstelle inseriert (siehe 3.2.2, Abbildung 3.2.1). Dazu wurden zwei PCR-Fragmente mit den Primer-Paaren Cdc42-32 und Cdc42-31, sowie Cdc42-30 und Cdc42-4 von ca. 450 und 1000 bp Größe amplifiziert (Abbildung 4.1.1 A). Diese Primer enthielten veränderte Sequenzen, die nicht auf der Matrizen-DNA (genomische Wildtyp DNA) enthalten waren und für eine *NotI*-Schnittstelle codierten. Danach wurde eine dritte PCR mit dem Primer-Paar Cdc42-32/-4 und der Produkt-Mischung aus PCR 1 und 2 als Matrize durchlaufen. Das erhaltene Produkt hatte eine Größe von ca. 1350 bp, was der Größe von Cdc42 (576 bp) plus je ca. 400 bp stromaufwärts vom Startcodon und stromabwärts vom

Stopcodon entsprach (Abbildung 4.1.1 B). Das PCR-Produkt wurde aufgereinigt und mittels der in den Primern Cdc42-32 und Cdc42-4 enthaltenen *SacI*- bzw. *XhoI*-Schnittstellen in den Vektor pRS315 ligiert. Anschließend wurden positive Klone, in denen die Insert-DNA richtig integriert wurde, ausgewählt (Daten nicht gezeigt). Positive DNA wurde darauf mit *NotI* geschnitten. In diese Schnittstelle wurde nun ein 3HA-DNA-Fragment (ca. 100 bp), welches aus dem Vektor pGTEPI generiert wurde, ligiert. Die korrekte Ligation wurde wiederum mittels einer *NotI*-Restriktion überprüft (Daten nicht gezeigt).

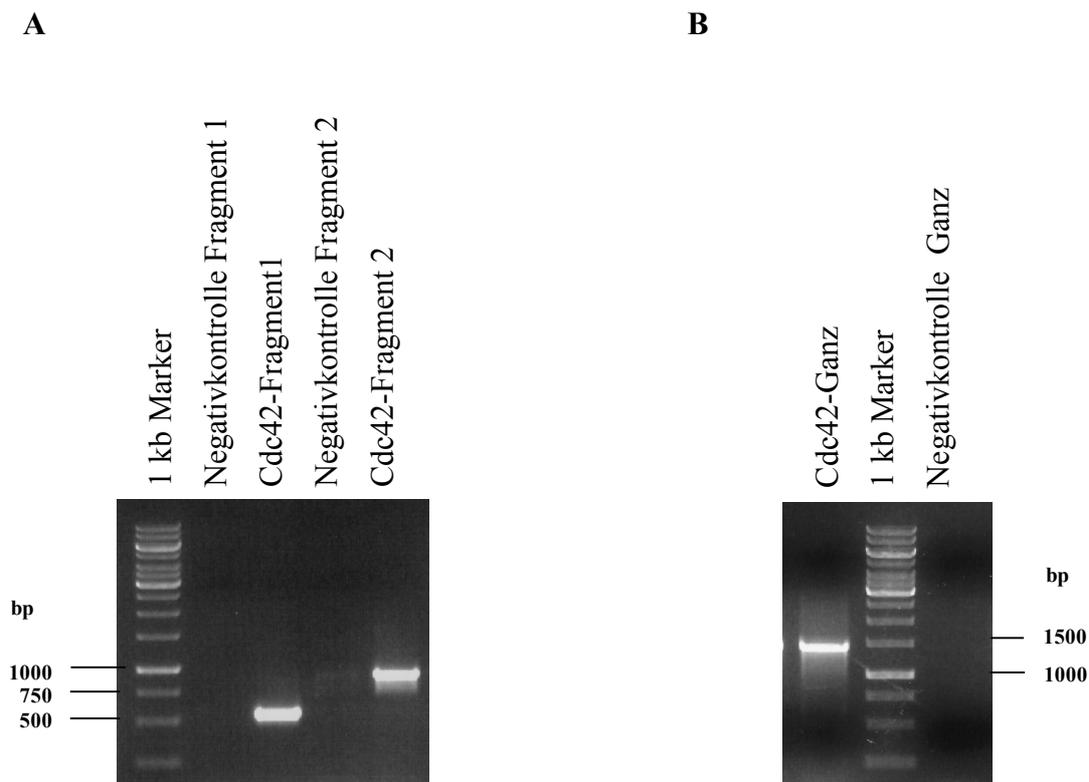


Abbildung 4.1.1: Einführung einer *NotI*-Schnittstelle nach dem Startcodon von Cdc42 mittels rekombinanter Fusions-PCR. (A) Mit den Primer-Paaren Cdc42-32 und Cdc42-31 sowie Cdc42-30 und Cdc42-4 wurden zunächst zwei PCR-Fragmente generiert, die eine *NotI*-Schnittstelle vor das Startcodon einfügen. (B) Durch eine dritte PCR wurde das ganze Cdc42-Gen (576 bp) samt neuer *NotI*-Schnittstelle, Promotor- und Terminatorregion (+ je 400 bp) mit dem Primer-Paar Cdc42-32 und Cdc42-4 amplifiziert.

Um zu prüfen, ob das 3HA-Fragment in der richtigen Orientierung, also in codierender Richtung, in die Schnittstelle inserierte, wurde die positive DNA in Wildtyp Hefezellen transformiert und die Expression des Fusionsproteins nach TCA-Fällung des Hefezelllysats im Western-Blot analysiert. In Abbildung 4.1.2 kann man das Expressionsmuster von zwei

getesteten Klonen erkennen. Es war zu erkennen, dass Klon 2 das 3HA-Cdc42 Fusionsprotein von etwa 26 kDa Größe exprimiert.

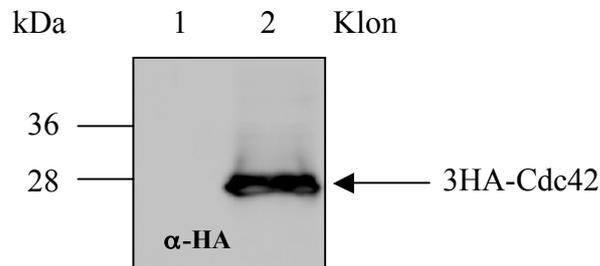


Abbildung 4.1.2: N-terminale Markierung von Cdc42 in pRS315. Bei Klon 2 wurde das 3HA-Insert in der korrekten Orientierung in die neu geschaffene *NotI*-Schnittstelle ligiert, so dass ein N-terminales Fusionsprotein von ca. 26 kDa Größe exprimiert wurde. Bei Klon 1, der zwar positiv in der Restriktionskontrolle war, schien die Orientierung falsch herum gewesen zu sein.

Nach der Expressionskontrolle des 3HA-markierten Cdc42 zwecks Überprüfung der richtigen Orientierung der Insert-DNA wurde diese wiederum mit den Restriktionsenzymen *SacI* und *XhoI* aus dem Vektor pRS315 herausgeschnitten. Nach der Aufreinigung der ausgeschnittenen Insert-DNA wurde diese in einen ebenfalls *SacI* und *XhoI* geschnittenen pRS305 Vektor ligiert. Dieser Vektor (Sikorski und Hieter, 1989) ist ein integratives Plasmid, das sich nach einer Linearisierung in das Hefegenom durch Rekombination mit dem geschnittenen Selektionsmarker integriert (Abschnitt 3.4.7.2, Abbildung 3.4.5). Das 3HA-markierte Cdc42 in dem Vektor pRS305 wurde mit dem Enzym *EheI* im *LEU2*-Marker geschnitten. Da dies die einzige Schnittstelle war, wurde das Plasmid somit linearisiert und anschließend, wie im Methodenteil unter 3.4.7.2 beschrieben, zur Transformation eingesetzt. Klone wurden vereinzelt und anschließend im Western-Blot auf eine positive Integration getestet.

In Abbildung 4.1.3 ist das Prinzip der Konstruktion des integrativen Plasmids noch einmal dargestellt. Mit Hilfe solcher integrativer Plasmide konnte jede Rho GTPase problemlos im Western-Blot detektiert werden und somit eine Vielzahl biochemischer Experimente durchgeführt werden.

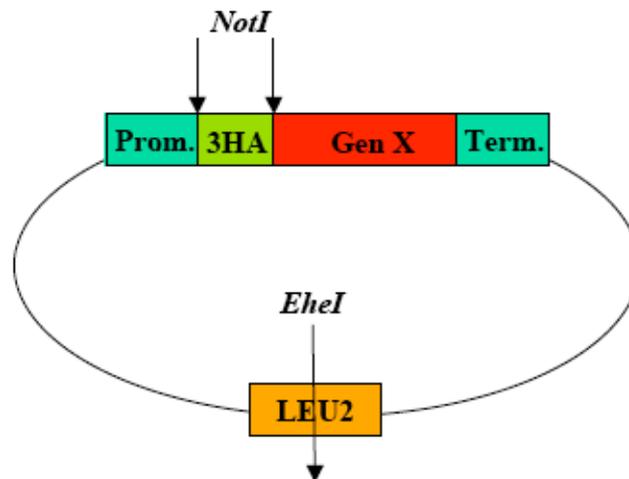


Abbildung 4.1.3: Prinzip der N-terminalen Markierung von Cdc42. Nach Einführung einer neuen *NotI*-Schnittstelle nach dem Startcodon der Rho GTPase mittels rekombinanter 3 Schritt-PCR, wurde dort ein 3HA-Fragment eingeführt. Dabei wurde die gesamte codierende Sequenz der Rho GTPasen mit zusätzlichen 400 bp stromaufwärts vom Startcodon (Prom.) und stromabwärts von Stopcodon (Term.) amplifiziert. Durch Linearisierung des Selektionsmarkers *LEU2*, der mit dem mutierten *LEU2\** Gen des Wildtyps rekombinieren kann, erfolgte die Integration der markierten Rho GTPasen in das Hefegenom. Die korrekte Orientierung des gesamten Inserts wurde zunächst in den Vektor pRS315 getestet. Richtig orientierte DNA wurde dann in den integrativen Vektor pRS305 umklont. Diese Konstruktionsweise gilt auch für die anderen 5 Rho Proteine.

#### 4.1.1.2 Verteilung der Rho GTPasen

Durch die C-terminale Modifikation mit hydrophoben Gruppen sollten Rho GTPasen eigentlich in Membranen inseriert sein. Zumindest im Falle von Cdc42 und Rho1 war zuvor bekannt, dass sie zumindest durch die Rdi1-vermittelte Extraktion von Membranen in das cytosolische Kompartiment der Zellen gelangen können (Koch et al., 1997; Eitzen et al., 2001). Um Aufschlüsse über die Verteilung der Rho GTPasen in Cytosol und an den Membranen zu erhalten, wurden Zellysate, die 3HA-markierte Rho GTPasen enthielten, durch Ultrazentrifugation bei 100.000 x g in cytosolischen Überstand und Membran-Pellet aufgetrennt. Um diesen experimentellen Ansatz auf eine gute Trennung zu überprüfen, wurden zunächst das bekannte cytosolische Protein GAPDH und das Transmembranprotein Nce2 bezüglich ihrer Verteilung analysiert. Bei der Analyse der Fraktionen zeigte sich die erwartete Verteilung der Proteine (Abbildung 4.1.4). Nce2-9myc konnte fast ausschließlich in der Membranfraktion und GAPDH lediglich in der cytosolischen Fraktion detektiert werden. Dies ließ den Schluss zu, dass die Auftrennung der Fraktionen durch Ultrazentrifugation gut

möglich war. Da der Versuch mit zwei unterschiedlichen Lysaten und in zwei unabhängigen Experimenten durchgeführt wurde, ließ sich ein hohes Maß an Reproduzierbarkeit vermuten.

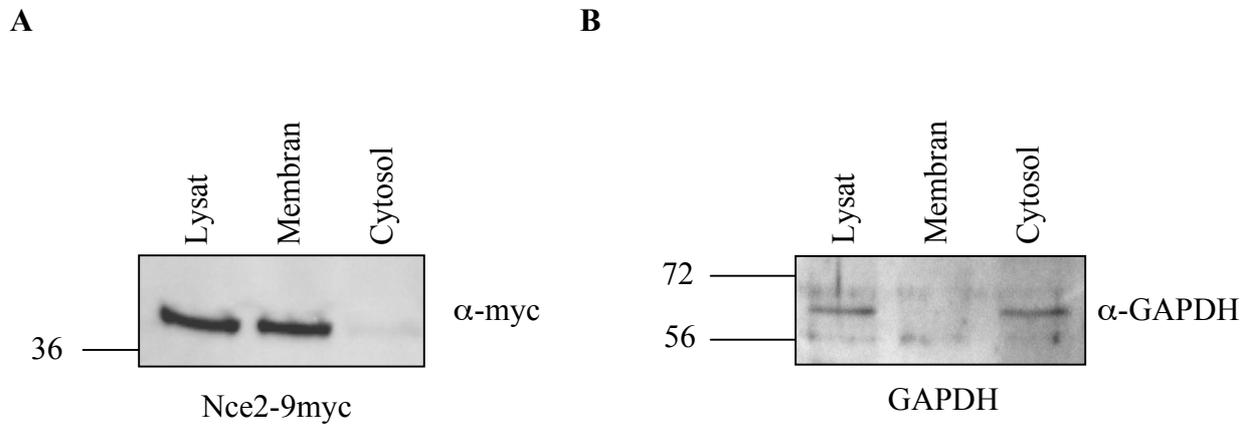


Abbildung 4.1.4: Nachweis der Auftrennung von Cytosol und Membranen mittels Ultrazentrifugation. (A) Das Membranprotein Nce2, welches 9myc markiert wurde, konnte nach der Auftrennung der Kompartimente fast ausschließlich in der Membranfraktion detektiert werden. (B) Das cytosolische Protein GAPDH befand sich ausschließlich im cytosolischen Überstand.

Zur Bestimmung der Verteilungen der Rho GTPasen wurde wie mit den zuvor aufgeführten Kontrollen vorgegangen. Nach der Detektion im Western-Blot wurden die Proteinbanden mit Hilfe einer Software quantifiziert, um Verteilungskoeffizienten zu ermitteln (Abbildung 4.1.5). Die Intensität der Cytosol-Bande wurde dabei als 1 angenommen. Es zeigte sich, dass Cdc42, Rho1, Rho2 und Rho5 hauptsächlich an der Membran gebunden waren, während Rho3 und Rho4 fast gleich verteilt in Cytosol und Membran vorlagen.

Interessanterweise konnten alle Rho GTPasen auch im Cytosol detektiert werden. Dies implizierte eine eventuelle Extraktion aller Rho GTPasen von Membranen. Außerdem konnte es möglich sein, dass die Proteine im Cytosol neu synthetisierte Proteine darstellen, die noch nicht die C-terminalen Modifikationen besitzen und somit auch noch nicht in die Membran inseriert werden konnten. Um zu klären, ob Rdi1, außer mit Cdc42 und Rho1, einen cytosolischen Komplex mit anderen Rho GTPasen bilden kann, wurden weitere Experimente durchgeführt.

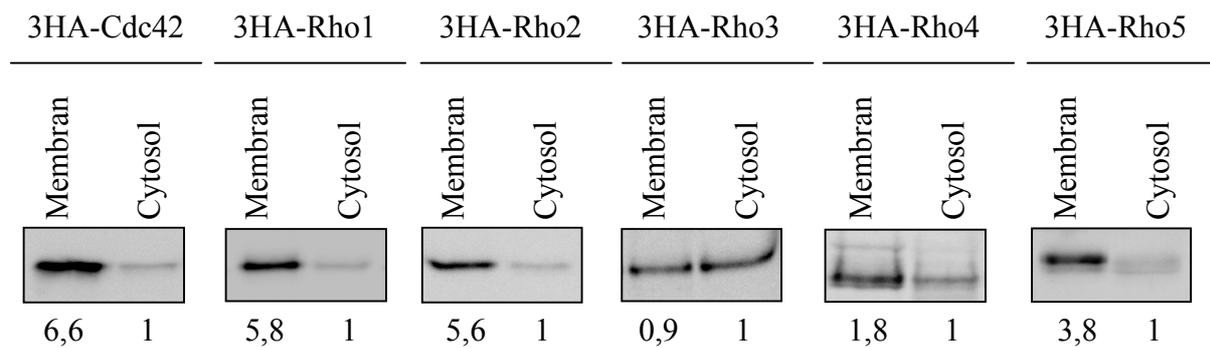


Abbildung 4.1.5: Verteilungskoeffizienten der sechs Rho GTPasen. Nach der Auftrennung der Lysate in Membran-Pellet und cytosolischen Überstand mittels Ultrazentrifugation, wurde das Pellet in dem gleichen Volumen Lysis-Puffer resuspendiert, das dem Cytosol entsprach. Gleiche Probenvolumina wurden zum Vergleich der Proteinmengen im  $\alpha$ -HA Western-Blot zuvor auf das SDS-Gel aufgetragen. Mit Hilfe einer Quantifizierungssoftware wurden die Verteilungskoeffizienten bestimmt. Die Quantifizierung wurde für jede Rho GTPase jeweils zwei Mal durchgeführt und war äußerst reproduzierbar.

#### 4.1.1.3 Bestimmung der Spezifität von Rdi1 mit Co-Immunpräzipitationen

Zunächst wurde die Spezifität von Rdi1 gegenüber den 3HA-markierten Rho GTPasen in Co-Immunpräzipitationsexperimenten überprüft. Dazu wurden Stämme hergestellt, die neben den markierten GTPasen zusätzlich ein 3myc markiertes Rdi1 trugen, welches unter Expressionskontrolle des eigenen Promotors stand. Aus Zelllysaten wurden mit Hilfe von  $\alpha$ -HA Antikörpern die Rho GTPasen präzipitiert. Rdi1-3myc als potentieller Bindungspartner aller Rho GTPasen konnte nach der Auftrennung der Proben in einem  $\alpha$ -myc Blot detektiert werden. Es zeigte sich dabei eine spezifische Interaktion von 3HA-Rho1 und 3HA-Rho4 mit Rdi1-3myc (Abbildung 4.1.6 A und B). Die anderen Rho GTPasen Rho2, 3 und 5 zeigten keine Wechselwirkung mit Rdi1-3myc. Die Protein-Protein-Wechselwirkung von Cdc42 mit Rdi1 konnte auch durch die Präzipitation von Rdi1-9myc dargestellt werden. Mit einem Antikörper, der gegen Cdc42 gerichtet war, konnte diese Rho GTPase als spezifischer Interaktor von Rdi1-9myc identifiziert werden (Abbildung 4.1.6 C). Die Co-Immunpräzipitationsexperimente spiegelten die *in vivo* Situation wider, da alle analysierten Proteine unter Kontrolle ihres eigenen physiologischen Promotors exprimiert wurden. Rdi1 interagierte dabei spezifisch mit Cdc42, Rho1 und Rho4. Die Interaktion von Rdi1-3myc mit 3HA-Rho4 war neu. Um auszuschließen, dass die Interaktionen von Rdi1 mit Rho2, 3 und 5

nur nicht zustande kamen, da zu wenig Material präzipitierte, wurde die Spezifität auch nach Überexpression der Rho GTPasen bestimmt.

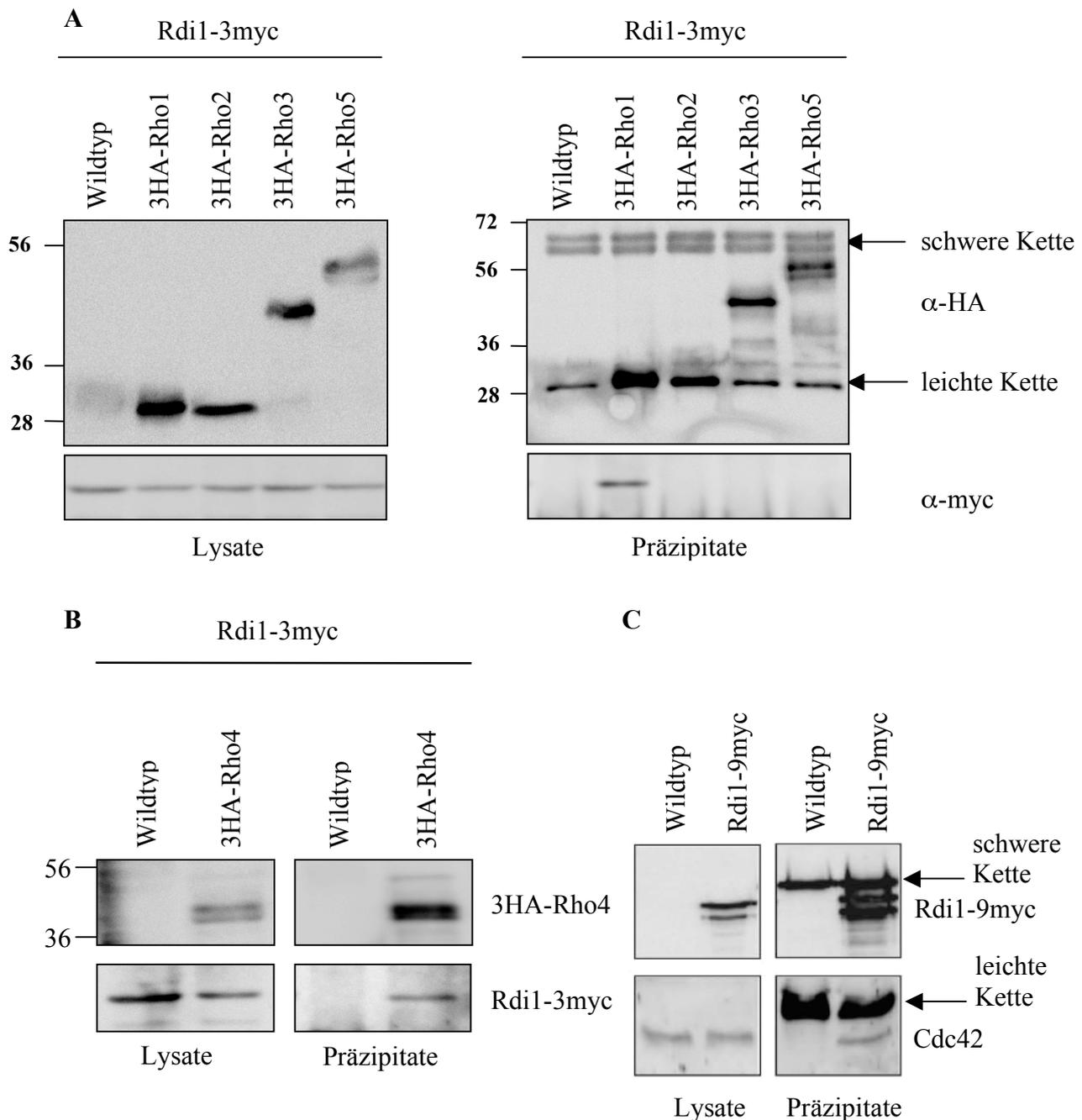


Abbildung 4.1.6: Co-Immünpräzipitationen zur Bestimmung der Spezifität von Rdi1 gegenüber den sechs Rho GTPasen. (A) und (B) Die 3HA-markierten Rho GTPasen wurden mit einem  $\alpha$ -HA Antikörper präzipitiert und die Präzipitate anschließend auf Rdi1-3myc als Interaktor getestet. Rho1 und Rho4 interagierten dabei im Gegensatz zu Rho2, 3 und 5 spezifisch mit Rdi1-3myc. (C) Rdi1-9myc wurde mit einem  $\alpha$ -myc Antikörper präzipitiert und das Präzipitat mit einem Cdc42-spezifischen Antikörper auf eine Interaktion mit Cdc42 hin getestet. Rdi1-9myc interagiert dabei spezifisch mit Cdc42. Die leichten und die schweren Antikörperketten sind durch einen Pfeil gekennzeichnet.

## 4.1.1.4 Bestimmung der Spezifität von Rdi1 bei Überexpression der RhoGTPasen

Zur starken Überexpression der Rho GTPasen wurden Plasmide hergestellt, die eine Expression der Proteine als GST-Fusionsprotein ermöglichten. Die GST-Markierung erfolgte am N-Terminus. Durch Zugabe von Galaktose konnten die Rho-Proteine stark überexprimiert werden. Zusätzlich war in den Zellen, die das Überexpressionsplasmid trugen, ein am C-Terminus 3HA- markiertes Rdi1 enthalten. Unter Verwendung von Glutathion-Sepharose wurden die überexprimierten Rho GTPasen präzipitiert. Die Analyse im Western-Blot bestätigte die Ergebnisse aus den Co-Immunpräzipitationsexperimenten. Rdi1 copräzipitierte mit GST-Cdc42, GST-Rho1 und GST-Rho4. Für GST-Rho2, 3 und 5 konnte keine Wechselwirkung mit Rdi1 detektiert werden (Abbildung 4.1.7). Die Rho GTPasen wurden alle im etwa gleichen Maße exprimiert und ließen sich problemlos präzipitieren.

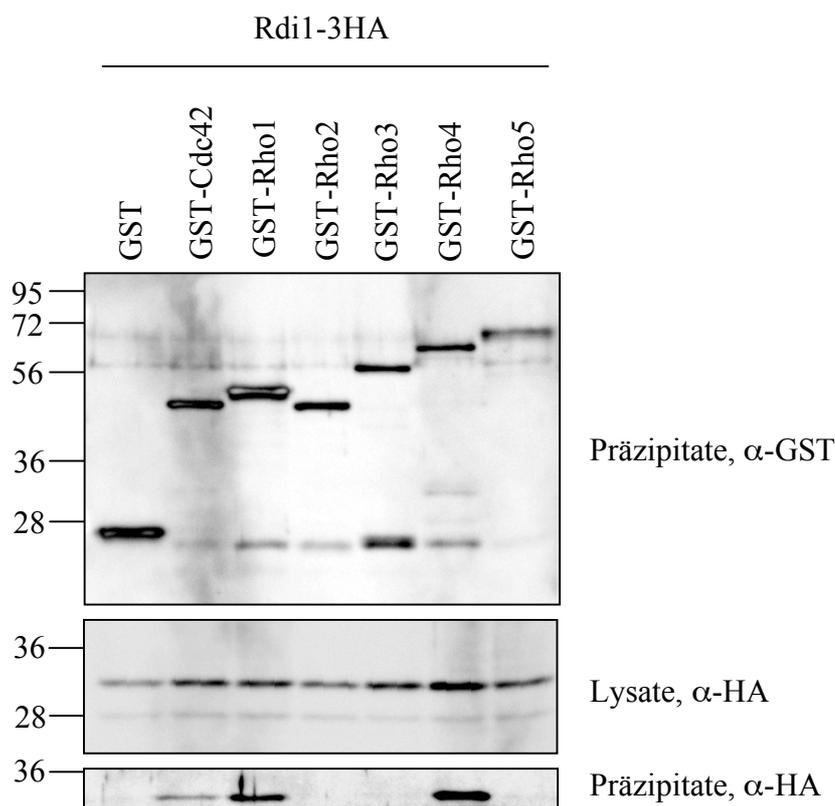


Abbildung 4.1.7: Bestimmung der Spezifität von Rdi1 gegenüber den sechs Rho GTPasen während der Überexpression dieser Proteine. Nach der Überexpression der Rho GTPasen durch Galaktoseinduktion wurden die GST-Fusionsproteine mit einer Glutathion-Bindungsmatrix präzipitiert. Für Cdc42, Rho1 und Rho4 wurde Rdi1 als spezifischer Bindungspartner identifiziert.

Durch die Übereinstimmung der Bindungsergebnisse aus den Co-Immunpräzipitationsexperimenten und den Experimenten bei Überexpression der Rho GTPasen, konnte ausgeschlossen werden, dass die nicht vorhandenen Interaktionen von Rho2, 3 und 5 mit Rdi1 auf zu wenig präzipitiertes Protein basierten. Rho2, 3 und 5 interagierten demnach mit großer Wahrscheinlichkeit nicht mit Rdi1. In weiteren Experimenten sollte die Spezifität von Rdi1 in Verknüpfung mit der Fähigkeit zur Extraktion der Rho GTPasen von Membranen demonstriert werden. Dazu wurden Membranextraktionsexperimente sowie fluoreszenzmikroskopische Analysen durchgeführt

#### 4.1.1.5 Membranextraktion der Rho GTPasen durch *RDII*-Überexpression

Die Assoziation von Rdi1 an die Rho GTPasen Cdc42, Rho1 und Rho4 konnte im Bindungsexperiment bestimmt werden. Welche Auswirkungen die Wechselwirkungen auf die Lokalisation der Rho GTPasen bzw. auf Proteinebene hatte, sollte in einem Extraktionsversuch gezeigt werden. Dabei wurden die Lysate von Zellen, die 3HA-markierte Rho GTPasen enthielten, in einem Ultrazentrifugationsschritt bei 100.000 x g in Cytosol und Membran aufgetrennt. Die Zellen enthielten ein Plasmid, welches die starke Überexpression von *RDII* durch Galaktoseinduktion erlaubte. Die Induktion erfolgte dabei für drei Stunden. Für sämtliche Fraktionen wurde eine Bradford-Proteinbestimmung (siehe 3.3.4) durchgeführt, um bei der Beladung des Proteingels gleiche Proteinmengen auftragen zu können.

Bei der Analyse der Fraktionen im  $\alpha$ -HA Western-Blot konnte man erkennen, dass die Rho GTPasen, die mit Rdi1 interagieren, im Zuge der *RDII*-Überexpression, von den Membranen in das Cytosol extrahiert wurden (Abbildung 4.1.8). Im Fall von Cdc42, Rho1 und Rho4 konnte man demnach deutlich erniedrigte Proteinmengen in der Membranfraktion und deutlich erhöhte Proteinmengen in der cytosolischen Fraktion detektieren. Die Proteinmengen der anderen Rho GTPasen Rho2, 3 und 5 blieben in allen Fraktionen gleich, was mit der fehlenden Bindung an Rdi1 einherging und konsistent mit den Ergebnissen aus den Bindungsexperimenten war. Interessanterweise konnte für Rho2 fast gar kein Protein in der cytosolischen Fraktion detektiert werden.

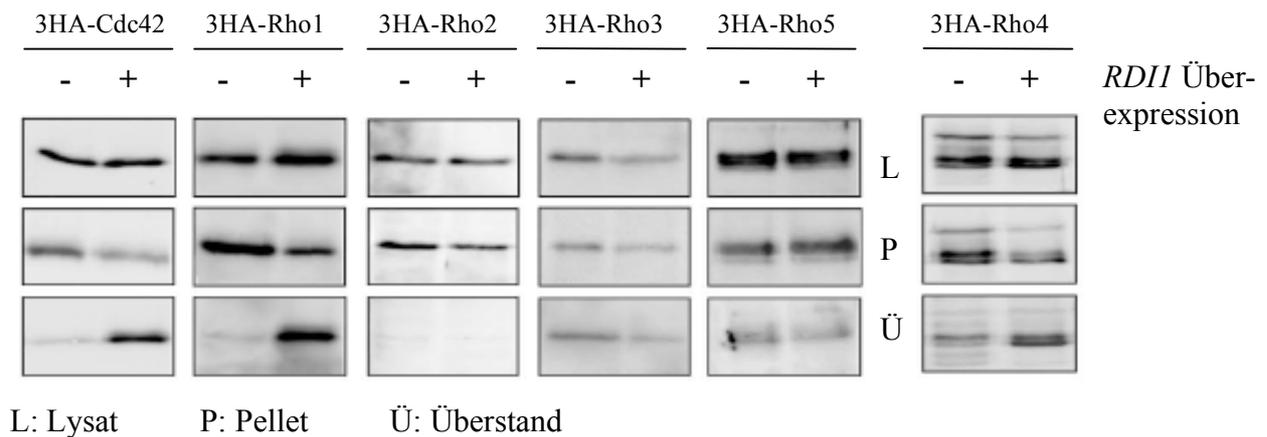


Abbildung 4.1.8: Extraktion von Cdc42, Rho1 und Rho4 von Membranen durch *RDII*-Überexpression. In allen Fällen lagen die Proteinmengen, in der  $\alpha$ -HA Western-Blot-Analyse, im cytosolischen Überstand erhöht und im Membran-Pellet nach der Ultrazentrifugation erniedrigt vor. Im Falle von Rho4 wurde das Experiment in  $\Delta pep4$  Zellen durchgeführt, um den Abbau von Rho4 zu verhindern (siehe Abschnitt 4.3.4.3).

In einem Fluoreszenzmikroskopieexperiment konnte die Extraktion von Cdc42 ebenfalls dargestellt werden. In Abbildung 4.1.9 wurden Wildtyp Zellen mit einem Plasmid transformiert, das eine GFP-Markierung von Cdc42 möglich macht. Es zeigte sich, dass GFP-Cdc42 an Orten polaren Wachstums, wie der Knospenhalsregion und dem Ort des zukünftigen Knospenwachstums lokalisiert war. Wird in diesen Zellen *RDII* stark überexprimiert, so konnte man erkennen, dass dies zu einer Translokation von Cdc42 in das Cytsol führte. In  $\Delta rdi1$  Zellen wurden keine Abweichungen zum Wildtyp detektiert.

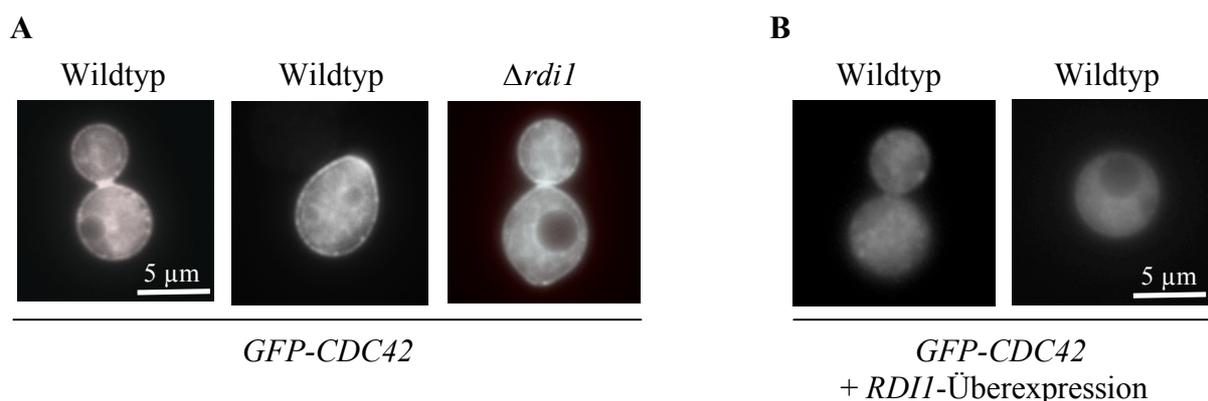


Abbildung 4.1.9: Lokalisation von GFP-Cdc42 während des vegetativen Wachstums. (A) Cdc42 war im Wildtyp und in  $\Delta rdi1$  Zellen an der Plasmamembran, der Knospenhalsregion und an der Stelle des kommenden Knospenwachstums lokalisiert. (B) Wurde *RDII* überexprimiert, so konnte nach kurzer Zeit (etwa 90 Minuten) kaum noch membrangebundenes Cdc42 detektiert werden. Die Expression von *GFP-CDC42* wurde von einem Plasmid mit dem *MET*-Promotor induziert.

## 4.1.1.6 Bestätigung der Rdi1-Rho4 Interaktion durch Mikroskopieexperimente

Rho4 interagiert spezifisch mit Rdi1. Zunächst wurde bestimmt, wo Rho4 in Wildtyp und  $\Delta rdi1$  Zellen lokalisiert. Dazu wurde versucht, Rho4 mit Hilfe eines integrativen Plasmids N-terminal mit GFP zu markieren. Das integrative 3HA-Rho4 Plasmid konnte als Ausgangsmaterial genutzt werden. In die *NotI* Schnittstelle wurde anstatt des 3HA-Inserts die codierende Sequenz für GFP eingefügt. Nach der Integration in das Genom von Wildtypzellen konnte zwar ein Fusionsprotein im Western-Blot detektiert werden, aber in der Fluoreszenzmikroskopie stellte sich das Signal als sehr schwach heraus. Daher wurde ein Stamm hergestellt, der GFP-Rho4 unter Kontrolle des induzierbaren Galaktosepromotors exprimieren konnte. Die Lokalisation von GFP-Rho4 wurde nach etwa zweistündiger Induktion via Fluoreszenzmikroskopie bestimmt. Es wurde dabei deutlich, dass in Wildtyp Zellen GFP-Rho4 an Orten polarisierten Wachstums lokalisiert war (Abbildung 4.1.10 A). Dazu zählten der Knospenhals, die Spitze der kleinen Tochterknospe und der Ort des zukünftigen Knospenwachstums. Hinzu kam die Lokalisation von Rho4 an der Plasmembran sowie an inneren Membranen. Hierbei handelte es sich um Vakuolenmembranen, was durch Kolokalisation nach FM4-64<sup>®</sup>-Vakuolenfärbung gezeigt werden konnte (Daten nicht gezeigt.) Die Lokalisation von GFP-Rho4 in  $\Delta rdi1$  Zellen zeigte keine Unterschiede zu der Lokalisation im Wildtyp (Abbildung 4.1.10 B). Exemplarisch hierfür waren Zellen, die ein starkes Rho4-Signal an der Stelle des zukünftigen Knospenwachstums zeigten.

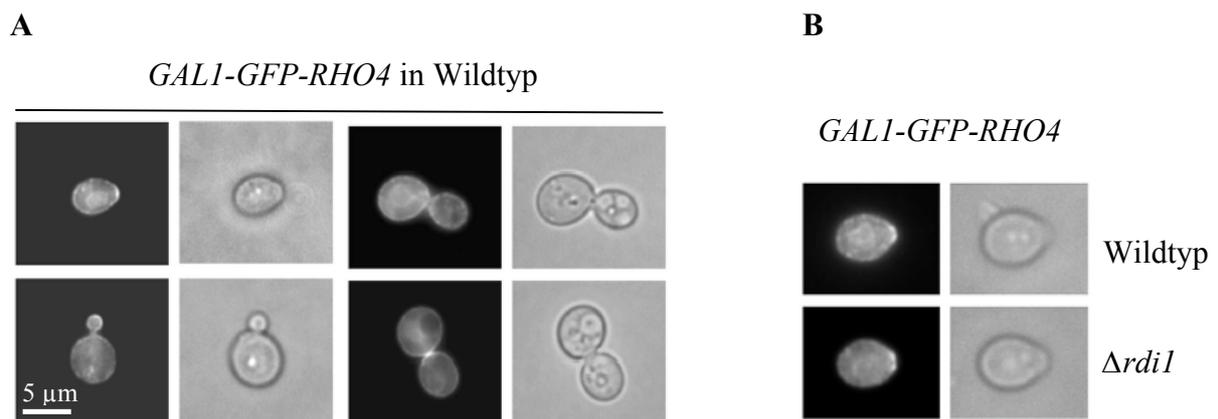


Abbildung 4.1.10: Lokalisation von *GFP-RHO4* nach dessen Überexpression für 2 Stunden. (A) In Wildtypzellen konnte *GFP-RHO4* an Orten polarisierten Wachstums lokalisiert werden. Dies beinhaltete die Knospenhalsregion, die Spitze der Tochterzelle und den Ort des zukünftigen Knospenwachstums. (B) In  $\Delta rdi1$  Zellen konnte keine veränderte Lokalisation von *GFP-RHO4* beobachtet werden. Auch in diesen Zellen war *GFP-RHO4* beispielsweise an dem Ort des zukünftigen Knospenwachstums und inneren Membranen lokalisiert.

Zusätzlich zur Lokalisation im vegetativen Zellzyklus, sollte der Einfluss der Paarung auf die Lokalisation von *GFP-RHO4* analysiert werden. Dazu wurden die Wildtyp Zellen 150 Minuten mit dem Paarungspheromon  $\alpha$ -Faktor unter normalen Wachstumsbedingungen inkubiert. Dies führte zur Ausbildung einer polaren Paarungsprojektion. Die Analyse erfolgte per Fluoreszenzmikroskopie. Es konnte beobachtet werden, dass die Zugabe  $\alpha$ -Faktors keine gravierenden Auswirkungen auf die Lokalisation von GFP-Rho4 hatte. Es wurde immer noch an der Plasmamembran und inneren Membranen vorgefunden (Abbildung 4.1.11). Die für andere Zellpolaritätsproteine übliche Anreicherung an der Spitze der Paarungsprojektion konnte für GFP-Rho4 jedoch nicht beobachtet werden.

*GALI-GFP-RHO4*

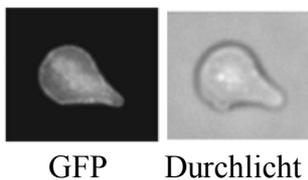


Abbildung 4.1.11: Lokalisation von *GFP-RHO4* nach der Zugabe des Paarungspheromons  $\alpha$ -Faktor. 150 Minuten nach der Zugabe des  $\alpha$ -Faktors und gleichzeitiger *GFP-RHO4* Induktion wurden die Zellen im Fluoreszenzmikroskop betrachtet. GFP-Rho4 war dabei nicht in der Spitze der Paarungsprojektion angereichert. Zusätzlich war GFP-Rho4 an Membranen lokalisiert.

Nach der Analyse der Rho4-Lokalisation, wurde versucht, die Extraktion von Rho4 von Membranen fluoreszenzmikroskopisch darzustellen. GFP-Rho4 lokalisierte nach ca. 2 ½ Stunden Überexpression wie zuvor (Abbildung 4.1.10). Wurde zur gleichen Zeit *RDII* überexprimiert, so konnte kaum noch polarisiertes GFP-Rho4 detektiert werden (Abbildung 4.1.12 A). Es konnte hauptsächlich ein cytosolisches Signal detektiert werden. Zusätzlich wurde diese Delokalisation quantifiziert (Abbildung 4.1.12 B). Im Vergleich zu den Kontrollzellen erniedrigte sich die Anzahl von Zellen mit membrangebundenen GFP-Rho4 von etwa 90 % auf ca. 20 % der Zellen. Zusammen mit den Ergebnissen aus der Fluoreszenzmikroskopie bestätigte diese Quantifizierung das Ergebnis für Rho4 aus dem Membranextraktionsexperiment (Abbildung 4.1.8). Rho4 wurde in beiden Fällen durch eine Wechselwirkung mit Rdi1 von Membranen extrahiert und lag dann vermehrt im Cytosol vor.

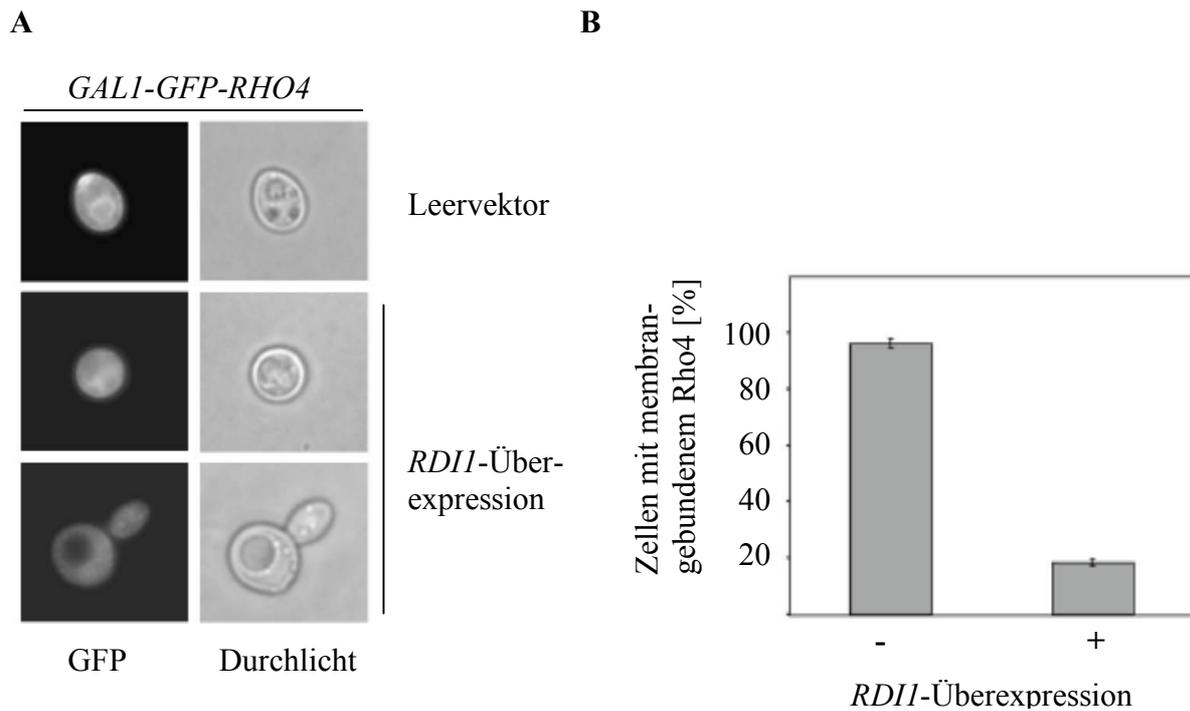


Abbildung 4.1.12: Lokalisation von GFP-Rho4 und Quantifizierung von Zellen mit membrangebundenem GFP-Rho4 nach *RDII*-Überexpression für 2,5 h. (A) Das polar lokalisierte GFP-Rho4 liegt nach *RDII*-Überexpression delokalisiert im Cytosol der Zellen vor. (B) Quantifizierte man die Zellen mit membrangebundenem GFP-Rho4 ohne und mit *RDII*-Überexpression, so erniedrigte sich der Anteil nach ca. 2 ½ Stunden Induktion von ca. 90 % auf unter 20 % der Zellen.

#### 4.1.1.7 Abhängigkeit der Membranextraktion vom Aktivitätsstatus der Rho GTPasen

Rho GTPasen können entweder in einer GTP-gebundenen oder GDP-gebundenen Form vorliegen. Man geht vereinfacht davon aus, dass der GTP-gebundene Zustand der aktive und der GDP-gebundene Zustand der inaktive ist (Park und Bi, 2007). In den zuvor durchgeführten Experimenten konnte eine Extraktion von 3HA-Cdc42, 3HA-Rho1 und 3HA-Rho4 durch Rdi1 von Membranen gezeigt werden. Diese Versuche wurden in Wildtypzellen durchgeführt und man konnte keine Aussage darüber treffen, ob Rdi1 spezifisch die aktiven und/oder inaktiven Formen der Rho GTPasen extrahierte. Um dies zu analysieren, wurden mittels rekombinanter PCR Mutanten der Rho GTPasen hergestellt, die ausschließlich in der GTP- oder GDP-gebundenen Form vorlagen. Die Mutationen, die dafür eingeführt werden mussten, waren für Cdc42 bereits bekannt (Ziman et al. 1991). Für die GTP-gebundene Form musste Aminosäure 12 von Glycin zu Valin getauscht werden. Für die GDP-gebundene Form wurde die Aminosäure 118 von Asparaginsäure in Alanin getauscht. Da Rho1 und Rho4 eine

hohe Sequenzhomologie mit Cdc42 aufwiesen und das GTP/GDP Bindungstaschenmotiv in allen Rho GTPasen konserviert vorlag, wurden für Rho1 die Aminosäuren 19 (G zu V) und 125 (D zu A) und für Rho4 die Aminosäuren 81 (G zu V) und 197 (D zu A) als zu verändernde Aminosäuren identifiziert. Die Mutanten wurden wiederum in integrative Plasmide eingefügt, um eine Integration in das Genom der Hefezellen zu ermöglichen. Zur Analyse der möglichen Spezifität von Rdi1 gegenüber einer bestimmten Mutante der Rho GTPasen, wurde der experimentelle Ansatz aus 4.1.1.5 übernommen. Zellen, die das Plasmid zur *RDII*-Überexpression oder ein Kontrollplasmid trugen, wurden aufgeschlossen und anschließend in Cytosol und Membranen mittels Ultrazentrifugation bei 100.000 x g aufgetrennt. Gleiche Proteinmengen wurden im SDS-Gel aufgetrennt und anschließend im  $\alpha$ -HA Western-Blot analysiert.

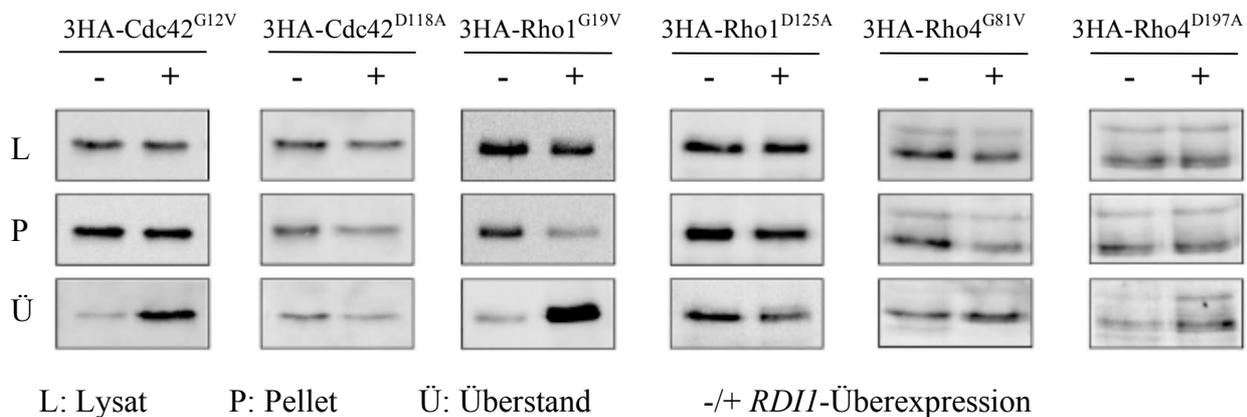


Abbildung 4.1.13: Membranextraktion von Cdc42-, Rho1- und Rho4-Mutanten, die entweder dauerhaft GTP (G zu V Substitution) oder GDP (D zu A Substitution) gebunden waren. Analyse der Fraktionen im Western-Blot ( $\alpha$ -HA). Es zeigte sich, dass bei Cdc42 und Rho1 lediglich die GTP-Mutante durch *RDII*-Überexpression extrahiert werden konnte. Bei Rho4 war das Ergebnis weniger eindeutig. Zwar wurde die GTP-Mutante extrahiert, doch auch in der cytosolischen Fraktion der GDP-Mutante wurde mehr Rho4 erhalten. Dies deutete auf eine Extraktion hin. Der Rho4 Extraktionsversuch wurde wiederum in dem  $\Delta pep4$  Deletionsstamm durchgeführt, um den Abbau von Rho4 zu inhibieren (Abschnitt 4.3.4.3). Alle Versuche wurden zwei Mal durchgeführt.

Es wurde sichtbar, dass Rdi1 zumindest bei der Extraktion von Cdc42 und Rho1 eine klare Präferenz gegenüber der GTP-gebundenen Mutante hatte. In beiden Fällen konnte eine deutliche Erhöhung der Proteinmengen im Cytosol und eine Reduktion der Mengen an den Membranen festgestellt werden (Abbildung 4.1.13). Bei den GDP-Mutanten dieser beiden Proteine konnten keine Veränderungen festgestellt werden. Die GTP-Mutante 3HA-Rho4<sup>G81V</sup> wurde ebenfalls durch *RDII*-Überexpression extrahiert und akkumulierte daher in der

cytosolischen Fraktion. Bei der GDP-Mutante 3HA-Rho4<sup>D197A</sup> war die Situation nicht eindeutig. Der leichte Anstieg der Proteinmengen in der cytosolischen Fraktion deutete zwar auf eine Extraktion hin, doch zeigte sich keine signifikante Verringerung, auch bei mehrmaliger Durchführung des Versuchs, der Rho4<sup>D197A</sup> Proteinmengen an den Membranen ab.

Rdi1 zeigte sich für alle drei Rho GTPasen zumindest gegenüber der dauerhaft GTP-gebundenen Form als spezifisch. Im Falle von Cdc42 und Rho1 konnte gezeigt werden, dass Rdi1 die GDP-gebundene Form nicht von Membranen extrahierte. Im Gegensatz dazu stand die GDP-gebundene Form von Rho4. Obwohl die Ergebnisse nicht ganz eindeutig waren, konnte man davon ausgehen, dass auch die inaktive Rho4<sup>D197A</sup> Form von Membranen extrahiert werden konnte.

#### 4.1.2 Funktionen von Rdi1

##### 4.1.2.1 Analyse des haploiden invasiven Wachstums im *RDII*-Deletionsstamm

Aufgrund der Tatsache, dass über den Rho GDI Rdi1 in *S. cerevisiae* bis zum Beginn dieser Arbeit keine Informationen über etwaige Phänotypen, welche Hinweise auf die Funktionen von Rdi1 geben könnten, existierten, wurde nach solchen systematisch gesucht.

Dafür sollte zuerst ein Stamm hergestellt werden, in dem das *RDII*-Gen deletiert wurde. Die Deletion wurde durch homologe Rekombination genomischer DNA mit Fragmenten eingeführt, die in einer Kassetten-PCR synthetisiert wurden. Es wurden drei Deletionskassetten amplifiziert, die den *HIS3*, *TRP1* und den *KanMX6* Marker trugen (Abbildung 4.1.14 A). Nach der direkten Transformation dieser PCR-Fragmente in Wildtyp Hefezellen konnten Klone vereinzelt werden, deren genomische DNA auf Rekombination geprüft wurde. Zu diesem Zweck wurde zunächst die genomische DNA von zwei Klonen, die zuvor mit der  $\Delta rdi1::KanMX6$  Kasette transformiert wurden, isoliert. Im Anschluss wurde eine PCR durchlaufen, bei der die Primer Rdi1-1 und Rdi1-2 zum Einsatz kamen. Diese Primer haben ca. 250 bp stromaufwärts vom *RDII* Startcodon und 250 bp stromabwärts vom Stopcodon gebunden, so dass sich für das Wildtypgen ein errechnetes PCR-Produkt von etwa 1100 bp Größe ergab und im Falle einer erfolgreichen Rekombination ein Produkt der Größe von etwa 2000 bp Größe. Bei der Analyse des Bandenmusters konnte man erkennen, dass in beiden Klonen das *RDII* Gen erfolgreich deletiert wurde (Abbildung 4.1.14 B).

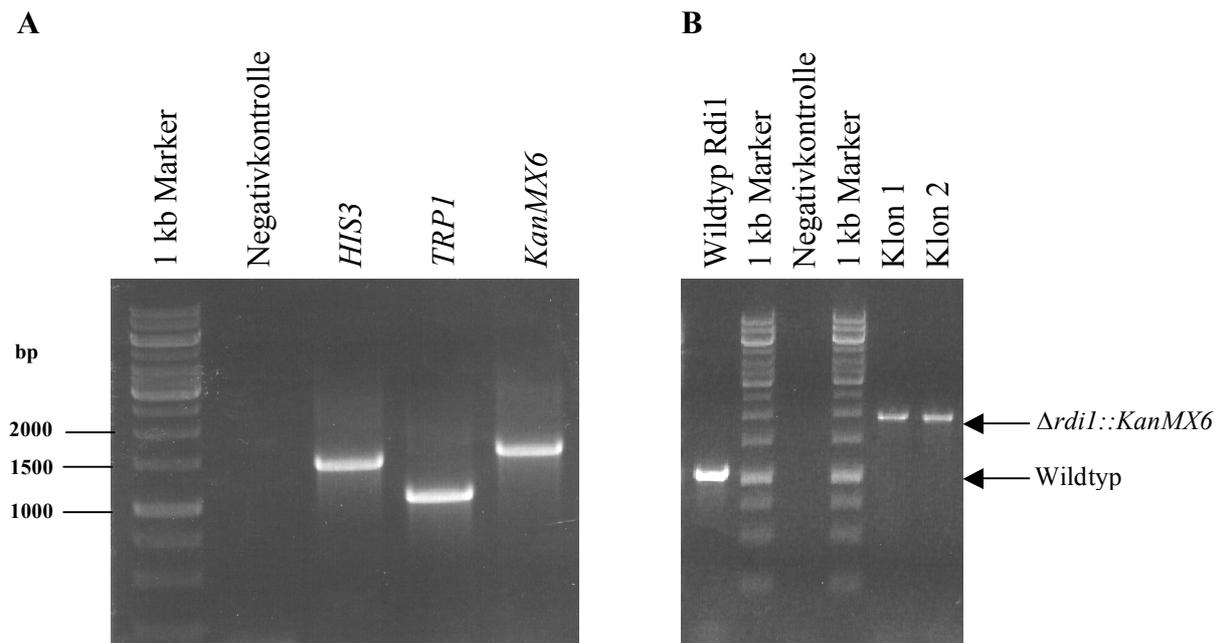


Abbildung 4.1.14: Herstellung von Deletionskassetten und Integration einer  $\Delta rdi1::kanMX6$  Deletion in genomische Wildtyp Hefe-DNA. (A) Zunächst wurden drei Deletionskassetten amplifiziert, die unterschiedliche Selektionsmarker trugen und unterschiedliche Größen besaßen. Die *HIS3*-Kassette sollte etwa eine Größe von 1400 bp, die *TRP1*-Kassette von etwa 1000 bp und die *KanMX6*-Kassette von ca. 1500 bp haben. (B) Bei der Untersuchung zweier Klone, die unter G418 Selektion wuchsen, zeigte, dass in ihnen das *RDI1* Wildtyp-Gen durch die *KanMX6*-Kassette ersetzt wurde. Eine PCR mit den Primern Rdi1-1 und Rdi1-2 ergab ein Produkt der Größe von etwa 1900 bp im Vergleich zur Wildtyp-Kontrolle, welche eine Größe von ca. 1000 bp ergab.

Erste Experimente mit dem  $\Delta rdi1$  Stamm zeigten keine Abweichungen im Vergleich zu Wildtyp-Zellen in Bezug auf Wachstumsgeschwindigkeit und die Fähigkeit zur Ausbildung einer Paarungsprojektion durch Zugabe des Paarungspheromons  $\alpha$ -Faktor (Daten nicht gezeigt). Auch die Analyse des invasiven Wachstums von  $\Delta rdi1$  Zellen zeigte keine Abweichung gegenüber den Wildtypzellen (Abbildung 4.1.15). Dazu wurde die *RDI1*-Deletion im Wildtypstamm  $\Sigma 1278b$  eingeführt. Dies stand im scharfen Kontrast zur Deletion des Polaritätsproteins Ste20, welches als Negativkontrolle diente.

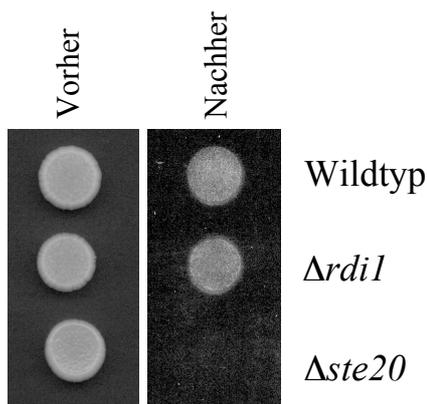


Abbildung 4.1.15: Analyse des invasiven Wachstums im *RDII*-Deletionsstamm. Es zeigte sich, dass die Deletion von *RDII* keinen Einfluss auf die Fähigkeit des  $\Sigma 1278b$  Stammes zum invasiven Wachstum hat. Als Negativkontrolle diente ein *STE20*-Deletionsstamm. Die Zellen wurden auf die Platten getropft und für 2 Tage inkubiert. Die Abbildung zeigt die Agarplatten vor und nach dem Abwaschen von oberflächlich wachsenden Zellen mit destilliertem Wasser. Invasive Zellen wuchsen in den Agar und konnten nicht abgewaschen werden.

#### 4.1.2.2 Lokalisation von Rdi1

Interessant für weitere Untersuchung war die Bestimmung der Lokalisation von Rdi1. Unter Kontrolle des eigenen Promotors konnte lediglich ein schwaches cytosolisches Signal detektiert werden. Daher wurde die Überexpression von *GFP-RDII* durch einen induzierbaren Galaktose-Promotor gewählt, um ein stärkeres Signal zu erhalten. Der Stamm enthielt ein mit GFP N-terminal markiertes *RDII*. Es zeigte sich, dass GFP-Rdi1 an der Knospenhalsregion und an inneren Membranen lokalisierte. Zudem erhielt man ein recht starkes cytosolisches Signal (Abbildung 4.1.16). Der GFP-Rdi1 Stamm wurde anschließend für weitere Experimente eingesetzt.

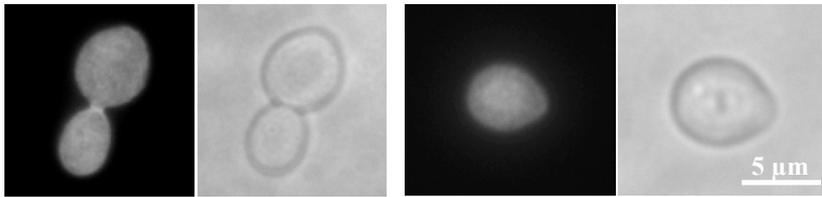
*GAL1-GFP-RDII*

Abbildung 4.1.16: Lokalisation von GFP-Rdi1 bei 100-facher Vergrößerung. Nach 90 Minuten Galaktoseinduktion wurde die Lokalisation von GFP-Rdi1 analysiert. Es zeigte sich, dass GFP-Rdi1 an Orten polaren Wachstums wie der Knospenhalsregion und an Membranen assoziiert war. Zudem erhielt man ein starkes cytosolisches Signal.

4.1.2.3 Letalität durch starke *RDII*-Überexpression

Um weitere Ansatzpunkte für *RDII*-abhängige Phänotypen zu erhalten, bot sich neben der Deletion des *RDII*-Gens die Überexpression von *RDII* an. Um eine starke Überexpression von *RDII* zu gewährleisten, wurden Zellen mit dem Plasmid pKT10-GAL-*RDII* (Masuda et al. 1994) transformiert. Das Plasmid ist ein Multicopy-Plasmid, welches zudem den induzierbaren Galaktose-Promotor vor dem *RDII* Insert besitzt.

Zellen, die das Plasmid tragen und auf Platten getropft wurden, die eine Galaktoseinduktion ermöglichen, wachsen nicht mehr. Die starke *RDII*-Überexpression war letal (Abbildung 4.1.17).

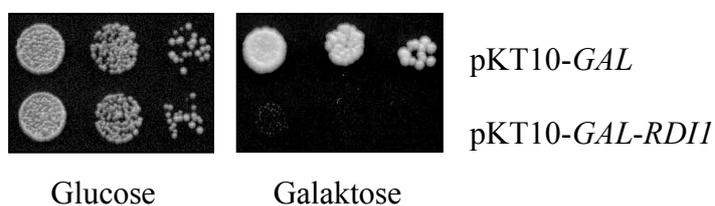
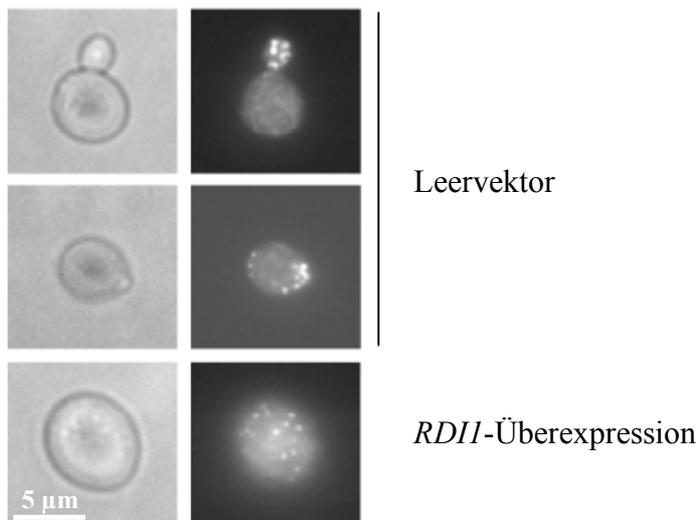


Abbildung 4.1.17: Letalität durch starke *RDII*-Überexpression. Zellen, die das Plasmid pKT10-GAL-*RDII* trugen und auf Galaktose-Platten getropft wurden, wuchsen im Gegensatz zu Zellen, die eine Vektorkontrolle pKT-GAL enthielten, nicht mehr.

Die Gründe für die Letalität durch *RDII*-Überexpression konnten vielfältig sein. Da zuvor bestätigt werden konnte, dass Rdi1 mit Cdc42, Rho1 und Rho4 interagiert, war es interessant

zu erfahren, ob die *RDII*-Überexpression Einfluss auf die für Polaritätsprozesse essentielle Organisation des Aktincytoskeletts und auf die Zellmorphologie hat. Dafür wurden Zellen, die das pKT10-*GAL-RDII* enthielten, für 5 Stunden mit Galaktose induziert und anschließend die Zellmorphologie sowie die Aktinorganisation durch Färbung mit Rhodamin-Phalloidin betrachtet.

**A**



**B**

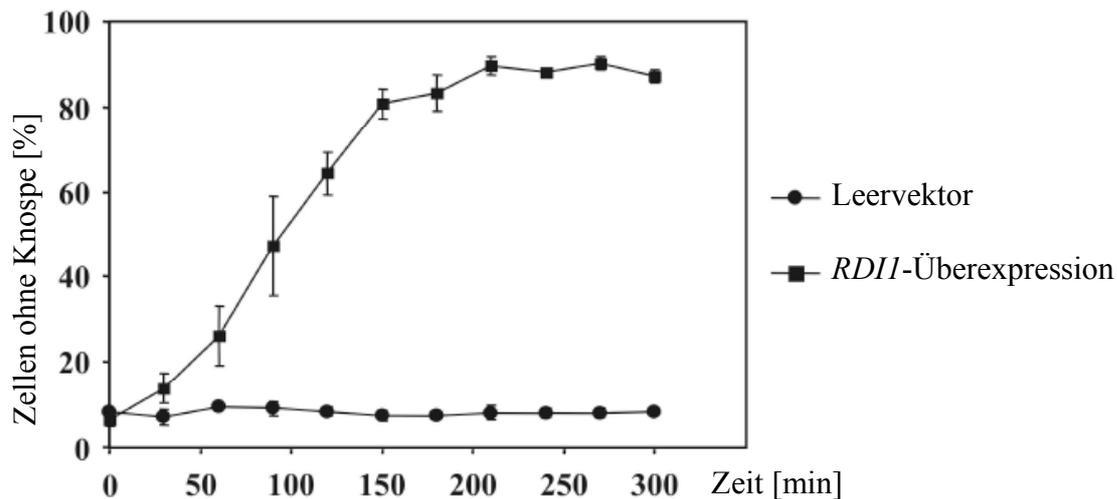


Abbildung 4.1.18: Auswirkungen der *RDII*-Überexpression auf die Zellmorphologie sowie das Aktincytoskelett. (A) Zellen, die *RDII* stark überexprimierten zeigten nach fünfständiger Induktion ein stark depolarisiertes Aktincytoskelett auf und waren zudem runder und etwas größer als Wildtypzellen. (B) Nach der Induktion mit 20 % Galaktose erhöhte sich die Anzahl von Zellen ohne Knospe dramatisch. Nach ca. 150 Minuten war bereits das Maximum mit über 90 % Zellen ohne Knospe erreicht. Fast alle Zellen waren zu diesem Zeitpunkt depolarisiert (siehe Abbildung 4.1.18 A).

Nach der Färbung der Zellen konnte man im Mikroskop erkennen, dass die Zellen keine Knospe mehr besaßen und neben ihrer runden Form zusätzlich einen etwas größeren Durchmesser besaßen (Abbildung 4.1.18 A). Mit Blick auf das Aktincytoskelett konnte man zudem eine starke Depolarisierung des Aktins erkennen. In den Kontrollzellen waren die Aktinpatches deutlich in kleinen Knospen und am Ort des kommenden Knospenwachstums polar lokalisiert. Im Zuge der starken *RDII*-Überexpression verschwand diese polare Verteilung der Patches komplett. Sie waren gleichmäßig in den runden, etwas größeren Zellen verteilt, also depolarisiert.

Im Zuge der Analyse des Aktins und der Zellmorphologie wurde in drei unabhängigen Experimenten der Anteil an Zellen ohne Knospe, demnach also depolarisierten Zellen, in den Kontrollzellen und den Zellen, in denen *RDII* stark überexprimiert wurde, quantifiziert (Abbildung 4.1.18 B). Es zeigte sich, dass bereits nach 150 Minuten starker *RDII*-Überexpression 80 % der Zellen eine runde Morphologie besaßen. Der Anteil dieser Zellen steigerte sich anschließend auf über 90 % und war damit um ein Vielfaches höher als in den Kontrollzellen, die etwa 5 % bis 10 % runde Zellen ohne Knospen aufzeigten.

*RDII*-Überexpression führte somit zur Letalität durch Depolarisierung der Zellen. Das Aktincytoskelett wurde depolarisiert, was in einem Verlust der üblichen Zellmorphologie resultierte. Man konnte davon ausgehen, dass die Depolarisierung aus der Extraktion der Rho GTPasen resultierte, da diese das Aktincytoskelett organisieren.

## 4.2 Regulation der Rdi1-Cdc42/Rho1 Interaktion durch die p21-aktivierte Kinase Cla4

### 4.2.1 Bindung von Rdi1 an Cdc42 und Rho1 nach der Überexpression der p21-aktivierten Kinasen Cla4, Ste20 und Skm1

Nachdem die Spezifität von Rdi1 gegenüber den Rho GTPasen geklärt werden konnte und wichtige Informationen über die Verteilung, Lokalisation der Rho GTPasen gesammelt werden konnten, stellte sich die Frage nach möglichen Regulationsmechanismen, die Rdi1-Rho GTPase Interaktionen steuern könnten. Daher wurde zunächst versucht, die Interaktionen unter Überexpression von Polaritätsproteinen wie den drei verschiedenen PAKs (p21-aktivierten Kinasen) *STE20*, *CLA4* und *SKM1* zu untersuchen.

Zur Analyse wurden zunächst Stämme hergestellt, die die Überexpression der PAKs ermöglichten. In einem Stamm war außerdem ein 9myc-markiertes Rdi1 enthalten, welches mit einem  $\alpha$ -myc Antikörper präzipitiert wurde. Cdc42 konnte dann direkt mit einem  $\alpha$ -Cdc42 Antikörper detektiert werden. In den anderen Stämmen war Rdi1 3myc-markiert, jedoch wurden hier die Rho GTPasen mit einem  $\alpha$ -HA Antikörper präzipitiert. In der Western-Blot-Analyse konnte man erkennen, dass die Überexpression von *CLA4* zur Auflösung der Rdi1-Cdc42 Bindung führte (Abbildung 4.2.1 A). Im Gegensatz dazu standen *STE20* und *SKM1*, deren Überexpression keinerlei Auswirkungen auf die Assoziation von Rdi1 mit Cdc42 hatten (Abbildung 4.2.1 A und B). Vergleichbare Co-Immunpräzipitationsexperimente wurden auch für Rho1 und Rho4 durchgeführt. Die Rho4-Rdi1 Wechselwirkung zeigte sich eindeutig unanfällig gegenüber der Überexpression aller PAKs (Daten nicht gezeigt). Im Fall von Rho1 konnte nicht eindeutig geklärt werden, ob die *CLA4*-Überexpression die Bindung von Rdi1 und Rho1 beeinflusst, da unterschiedliche Ergebnisse erhalten wurden (Daten nicht gezeigt). In zwei von drei Fällen konnte kein Einfluss beobachtet werden. In einem weiteren Experiment konnte jedoch nach *CLA4*-Überexpression keine Bindung von 3HA-Cdc42 an Rdi1-3myc festgestellt werden. Die Kinasen Ste20 und Skm1 hatten wie bei Cdc42 keinen Einfluss auf die Interaktion.

Da der Einfluss von Cla4 auf die Rdi1-Rho1 Interaktion in Co-Immunpräzipitationsexperimenten unklar blieb, wurden alternative Experimente durchgeführt. Hierfür boten sich Fraktionierungsexperimente an, die darauf abzielen sollten, die Verteilung im Cytosol und an den Membranen von Cdc42 und Rho1 unter bestimmten Bedingungen zu analysieren und den Einfluss von Cla4 näher zu charakterisieren.

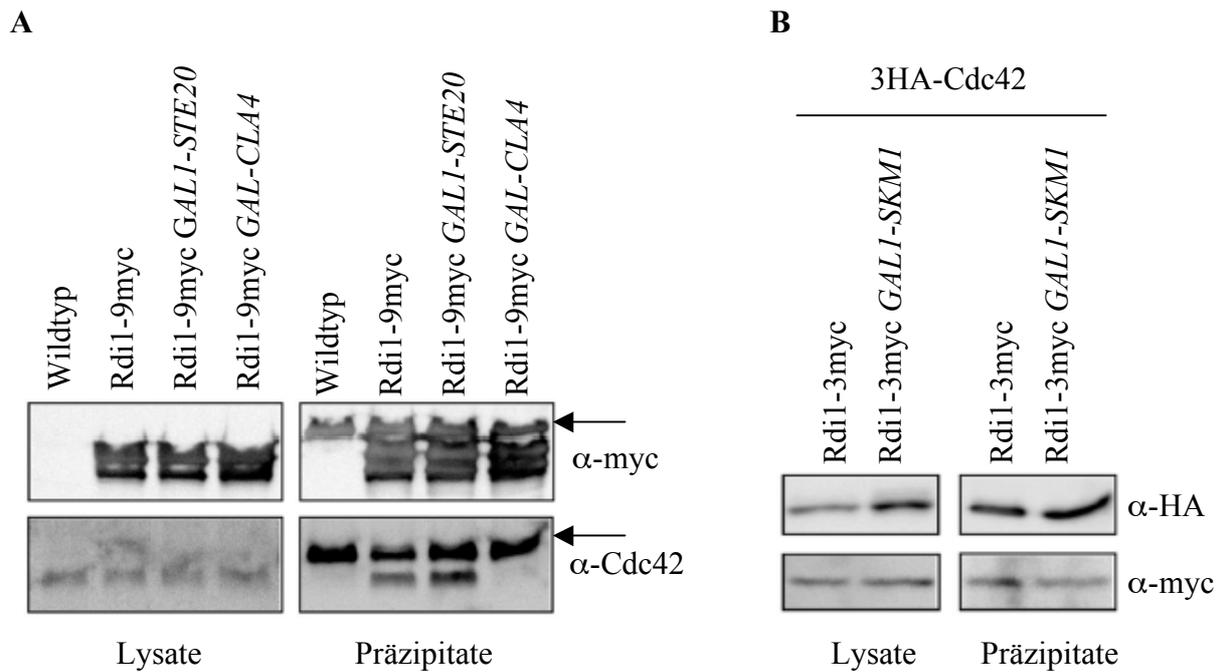


Abbildung 4.2.1: Abhängigkeit der Rdi1-Cdc42 Interaktion von den p21-aktivierten Kinasen Ste20, Cla4 und Skm1. (A) Nach der Präzipitation von Rdi1-9myc bei vorhergehender Überexpression der p21-aktivierten Kinasen *STE20* und *CLA4*, konnte Rdi1 nur noch im Falle der *STE20*-Überexpression mit Cdc42 assoziieren. *CLA4*-Überexpression führte zur Auflösung der Rdi1-Cdc42 Bindung. Die leichte und schwere Kette der Antikörper mit denen präzipitiert wurde, sind durch einen Pfeil gekennzeichnet. (B) Eine Überexpression der dritten p21-aktivierten Kinase *SKM1* beeinträchtigte wie die Überexpression von *STE20* die Bindung von Rdi1 an Cdc42 nicht. In diesem Fall wurde die 3HA-markierte Rho GTPase Cdc42 präzipitiert.

#### 4.2.2 Der Einfluss von Cla4 auf die Verteilung von Rho1, Rho4 und Cdc42

##### 4.2.2.1 Analyse nach der Überexpression von *CLA4*

Die Überexpression von *CLA4* führte zumindest im Fall von Cdc42 zur Auflösung der Bindung an Rdi1. Es stellte sich daher die Frage, ob die Überexpression von *CLA4* einen Effekt auf die cytosolischen und membrangebundenen Cdc42 und Rho1 Proteinmengen hatte. Dazu wurden Zellysate hergestellt, die die 3HA-markierten Rho GTPasen Cdc42, Rho1 und Rho4 enthielten und zuvor induziert wurden, damit *CLA4* stark überexprimiert wurde. Die Lysate wurden anschließend mittels Ultrazentrifugation in Cytosol und Membranen aufgetrennt. Die Analyse der Fraktionen erfolgte nach Bestimmung der Proteinkonzentrationen wie zuvor im  $\alpha$ -HA Western-Blot.

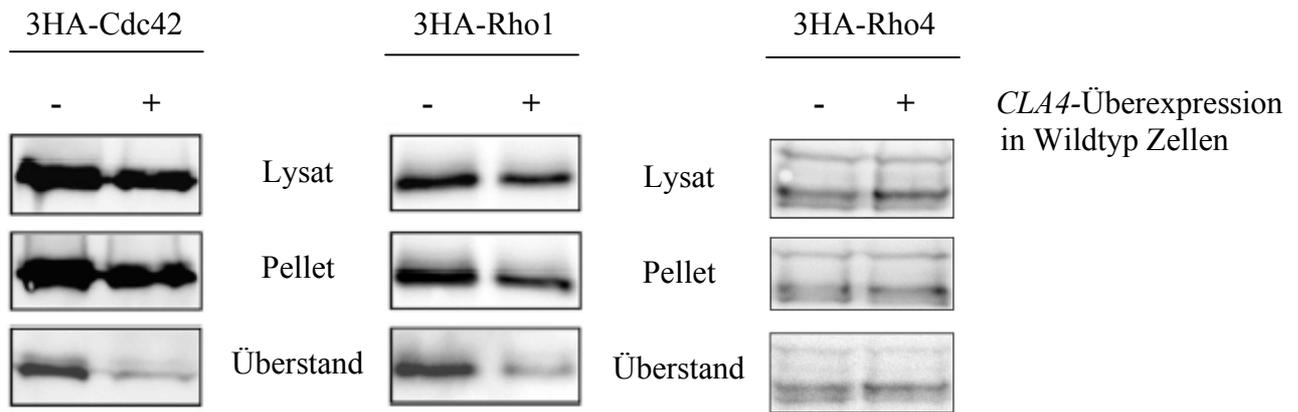


Abbildung 4.2.2: Analyse der einzelnen Fraktionen nach *CLA4*-Überexpression. Wurde *CLA4* überexprimiert und die Zelllysate mit den 3HA-markierten Rho GTPasen mittels Ultrazentrifugation aufgetrennt, so zeigte sich für 3HA-Cdc42 und 3HA-Rho1 eine deutliche Abnahme der Proteinmengen im Cytosol (Überstand). Eine Zunahme in der Membranfraktion konnte lediglich bei 3HA-Cdc42 beobachtet werden. Die 3HA-Rho4 Proteinmengen blieben in allen Fraktionen unverändert. Der Western-Blot wurde  $\alpha$ -HA entwickelt.

Nach der Überexpression von *CLA4* konnten für 3HA-Cdc42 und 3HA-Rho1 in den cytosolischen Fraktionen deutlich verringerte Proteinmengen detektiert werden (Abbildung 4.2.2). Im Fall von 3HA-Cdc42 konnte zudem eine geringe Zunahme der Mengen an den Membranen beobachtet werden. Dies war dem Effekt der *RDII*-Überexpression entgegengesetzt. Die Proteinmengen von 3HA-Rho4 blieben in allen Fraktionen unverändert. Diese Beobachtungen unterstützten die Ergebnisse aus 4.2.1. Eine Abnahme der Proteinmengen im Cytosol konnte damit verbunden sein, dass Rdi1-Cdc42/Rho1 Komplexe aufgelöst wurden und darauf folgend die Rho GTPasen in die Membranen inseriert werden konnten.

In einem nächsten Experiment wurde untersucht, ob der *CLA4*-Überexpressionseffekt tatsächlich mit Rdi1 zusammenhing. Dazu wurden Stämme hergestellt in denen *RDII* im Genom deletiert wurde und die 3HA-markierten Rho GTPasen Cdc42 und Rho1 enthalten waren. Außerdem konnte *CLA4* über ein Galaktose-induzierbares Plasmid überexprimiert werden. Es wurden wiederum Lysate hergestellt, die mittels Ultrazentrifugation in Cytosol und Membranen aufgetrennt wurden. Die Analyse erfolgte im Western-Blot ( $\alpha$ -HA).

Die Detektion im Western-Blot zeigte, dass sich im  $\Delta$ *rdi1* Stammhintergrund die Proteinmengen von 3HA-Cdc42 und 3HA-Rho1 nicht änderten und man somit davon ausgehen konnte, dass der *CLA4*-induzierte Überexpressionseffekt tatsächlich von Rdi1 abhing (Abbildung 4.2.3).

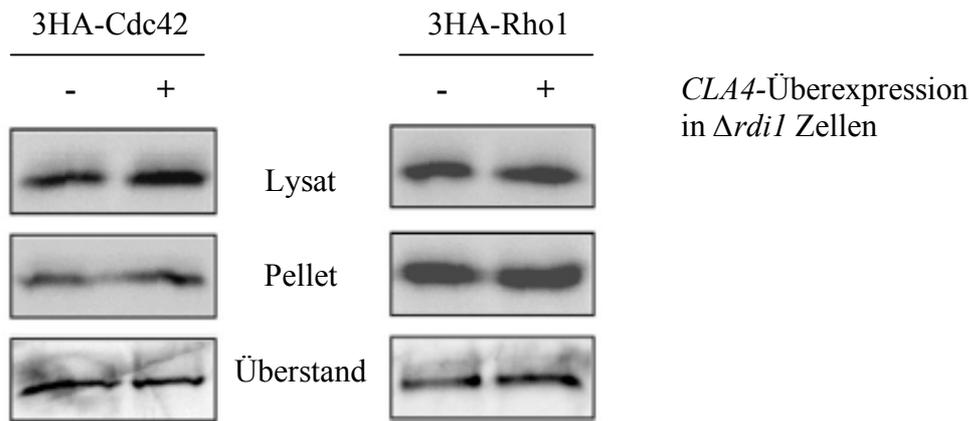


Abbildung 4.2.3: Abhängigkeit des *CLA4*-Überexpressionseffekts von Rdi1. Das Experiment aus Abbildung 4.2.2 wurde wiederholt, jedoch in  $\Delta rdi1$  Zellen durchgeführt. Nach der Überexpression von *CLA4* in  $\Delta rdi1$  Zellen änderten sich die Proteinmengen von 3HA-Cdc42 und 3HA-Rho1 in keiner der zuvor aufgetrennten Fraktionen. Der Western-Blot wurde  $\alpha$ -HA entwickelt.

In einem abschließenden Experiment sollte danach untersucht werden, ob der *CLA4*-Überexpressionseffekt auf die 3HA-Cdc42 und 3HA-Rho1 Proteinmengen, von der Kinaseaktivität der PAK Cla4 ausgeht. Cla4 ist mit fast 100 kDa ein relativ großes Protein, welches diverse Domänen enthält. Es war daher nicht auszuschließen, dass der Effekt aus der Überexpression einer anderen Domäne außer der Kinasedomäne resultierte. Da die Cla4- und Rdi1-Bindestellen an Cdc42 überlappen, könnte auch ein kompetitiver Effekt für die Reduktion der Proteinmengen verantwortlich sein.

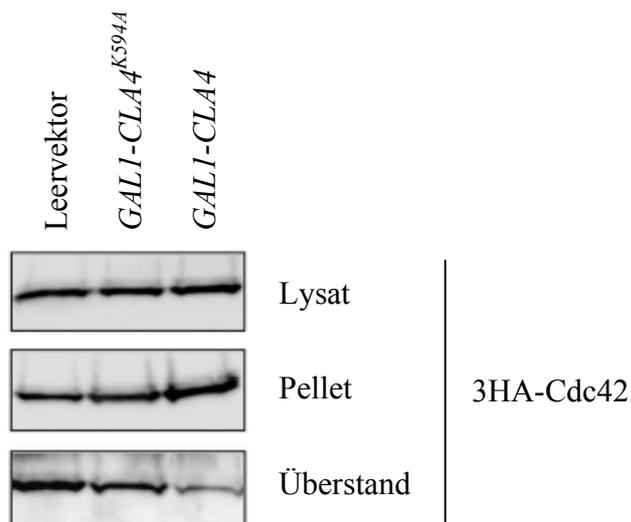


Abbildung 4.2.4: Kinaseabhängigkeit des *CLA4*-Überexpressionseffekts. Der Versuch aus Abbildung 4.2.2 wurde für 3HA-Cdc42 wiederholt. Zusätzlich wurde auch eine Kinaseinaktive Form *CLA4*<sup>K594A</sup> überexprimiert. Die Analyse im  $\alpha$ -HA Western-Blot zeigt eine Kinaseabhängigkeit des *CLA4*-induzierten Effekts auf die 3HA-Cdc42 Proteinmengen.

Im Zuge der Überexpression der Wildtyp *CLA4* Kinase änderten sich die Proteinmengen von 3HA-Cdc42 im Cytosol (Abnahme) und an den Membranen (Zunahme). Im Kontrast dazu standen die Mengen im Laufe der Überexpression der Kinase-inaktiven Form von *CLA4* (Abbildung 4.2.4). Hierbei änderten sich die Proteinmengen sowohl im Cytosol als auch an den Membranen nicht im gleichen Maße wie bei der Wildtyp Kinase. Es konnte daraus geschlossen werden, dass der *CLA4*-induzierte Überexpressionseffekt von der Kinaseaktivität der PAK abhängig war und nicht auf der Überexpression anderer Domänen oder auf einer Konkurrenz zwischen Cla4 und Rdi1 basierte.

#### 4.2.2.2 Analyse im *CLA4*-Deletionsstamm

Nachdem geklärt wurde, dass die Überexpression von *CLA4* zur Translokation von Cdc42 und Rho1 aus dem Cytosol an die Membranen führte, sollte untersucht werden, ob sich der Effekt durch Deletion von *CLA4* umkehren lässt. Dazu wurden die entsprechenden Deletionsstämme hergestellt. Die Deletion von *CLA4* führte sowohl bei 3HA-Cdc42 als auch bei 3HA-Rho1 zu leicht erhöhten Proteinmengen im Cytosol (Abbildung 4.2.5 A). An den Membranen konnte hingegen lediglich für 3HA-Cdc42 eine Abnahme der Proteinmengen beobachtet werden.

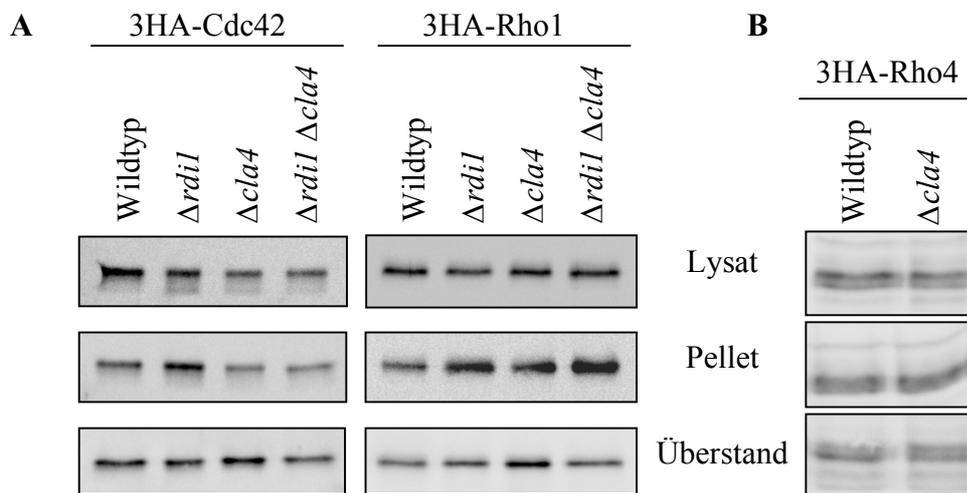


Abbildung 4.2.5: Einfluss von *RDII*- und *CLA4*-Deletionen auf die Verteilung der Rho GTPasen Cdc42, Rho1 und Rho4 im Cytosol und an den Membranen. Nach der Auftrennung der Fraktionen mittels Ultrazentrifugation wurden die Fraktionen im  $\alpha$ -HA Western-Blot detektiert. (A) Die Deletion von *RDII* hatte unerwarteterweise weder im Falle von Cdc42 noch im Falle von Rho1 Auswirkungen auf die Proteinmengen in den Fraktionen. Dafür sorgte die Deletion von *CLA4* für erhöhte Mengen im Cytosol. Bei gleichzeitiger *RDII*-Deletion wurde der Effekt aufgehoben. (B) Die Deletion von *CLA4* hatte keinerlei Auswirkungen auf die Proteinmengen von 3HA-Rho4 im Cytosol und den Membranen.

Da durch die Deletion von *CLA4* ein Effekt beobachtet werden konnte, wurde untersucht, ob die Veränderungen der cytosolischen und membrangebundenen Proteinmengen in Abhängigkeit von Rdi1 standen. Dazu wurde das Experiment zum einen mit Stämmen wiederholt in denen *RDII* deletiert wurde und zum anderen mit Zellen, in denen eine *CLA4 RDII*-Doppeldeletion eingefügt wurde.

Interessanterweise hatte zunächst die Deletion von *RDII*, wenn überhaupt, nur auf die Proteinmengen von 3HA-Cdc42 einen geringen Einfluss (Abbildung 4.2.5 A). Die Proteinmengen waren im Cytosol etwas erniedrigt und dementsprechend an den Membranen geringfügig erhöht. Da Rdi1 in *S. cerevisiae* der einzige Rho GDI ist, hätte man einen weitaus stärkeren Effekt durch die Deletion von *RDII* erwartet. Überprüft man den Effekt der *CLA4*-Deletion auf die Abhängigkeit von Rdi1, so erkannte man bei der Analyse der Fraktionen der Doppeldeletionsstämme, dass keine Auswirkungen zu beobachten waren. Die Proteinmengen blieben an den Membranen und im Cytosol konstant. Im Falle von 3HA-Rho4 blieben, wie bei der *CLA4*-Überexpression, auch bei der Deletion von *CLA4* die Proteinmengen gleich (Abbildung 4.2.2. und Abbildung 4.2.5 B).

Der Effekt der *CLA4*-Deletion hatte demnach den gegenteiligen Effekt zur *CLA4*-Überexpression und war auch von Rdi1 abhängig. Dies unterstützte die Vermutung, dass Cla4 und Rdi1 im gleichen Signalweg bei der Regulation der Rdi1-Cdc42/Rho1 Wechselwirkung beteiligt waren.

#### 4.2.2.3 Analyse während gleichzeitiger Überexpression von *RDII* und *CLA4*

Da eine *CLA4*-Überexpression die Proteinmengen von Cdc42 und Rho1 im Vergleich zu Rdi1 an den Membranen und im Cytosol in entgegengesetzter Weise beeinträchtigte, wurde analysiert, ob die Überexpression von *CLA4* den Effekt der *RDII*-induzierten Extraktion der Rho GTPasen aufheben konnte.

Zur Klärung dieser Frage wurden Stämme hergestellt, die eine gleichzeitige Überexpression von *RDII* und *CLA4* ermöglichten. Die Analyse erfolgte wie zuvor stets nach Auftrennung in die Fraktionen durch Ultrazentrifugation im Western-Blot.

Zunächst konnte die Rdi1-induzierte Extraktion von 3HA-Cdc42 und 3HA-Rho1 aus den Membranen beobachtet werden (siehe 4.1.2.4). Außerdem stellte sich heraus, dass die gleichzeitige Überexpression von *CLA4* einen Rückgang sowohl der cytosolischen als auch membrangebundenen Proteinmengen auf das Wildtyp-Niveau zur Folge hatte (Abbildung

4.2.6). Diese Ergebnisse unterstützten zusätzlich die Vermutung, dass Cla4 und Rdi1 im gleichen Signalweg wirken.

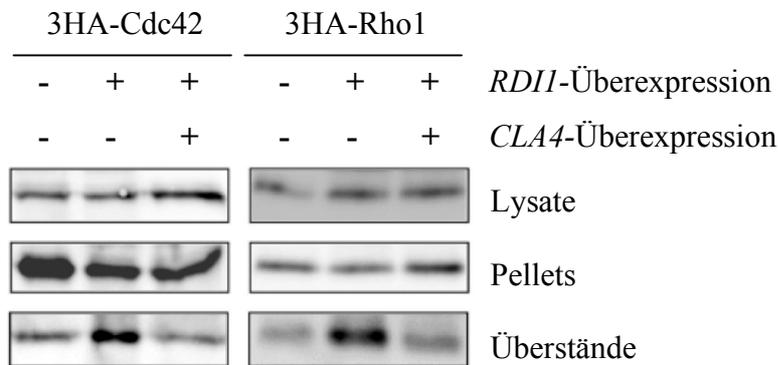


Abbildung 4.2.6: Die Überexpression von *CLA4* hebt den Extraktionseffekt von Rdi1 auf. Die Überexpression von *RDII* führte zur Extraktion von 3HA-Cdc42 und 3HA-Rho1 und somit zur Anreicherung der Proteine in den cytosolischen Fraktionen. Wurde simultan zu *RDII* auch *CLA4* überexprimiert, so wurde der Extraktionseffekt der *RDII*-Überexpression aufgehoben. Der Western-Blot wurde  $\alpha$ -HA entwickelt.

#### 4.2.3 Phosphorylierung von Rdi1 durch Cla4 im Kinase-Assay

Der Einfluss von Cla4 auf die Rdi1-Cdc42/Rho1 Interaktionen konnte zuvor in einer Reihe von Experimenten dargestellt werden. Es blieb jedoch zu klären, ob dabei die Kinase Cla4 einen der Interaktionspartner phosphoryliert.

Daher sollte versucht werden, eine Phosphorylierungsreaktion *in vitro* zu erzeugen. Dafür wurden Rdi1 und Cdc42 durch Expression in *E. coli* als His<sub>6</sub>-Fusionsprotein aufgereinigt und dienten in der Folge als Substrate für *in vitro* Kinase-Assays. Die Expression, Aufreinigung und Elution von His<sub>6</sub>-Rdi1 ist exemplarisch in Abbildung 4.2.7 A und B dargestellt. Als Expressionsstamm diente der Bakterienstamm BL21(DE3). Die Aufreinigung der Fusionsproteine gestaltete sich problemlos und man erhielt große Mengen an Protein. Das freie Protein konnte als Substrat für die *in vitro* Phosphorylierungsreaktionen verwendet werden. Pro Reaktion wurden etwa 2 bis 3  $\mu$ g Protein eingesetzt. Die Kinase, welche die Reaktion ausführen sollte, wurde aus *S. cerevisiae* präzipitiert und somit grob aufgereinigt. Dafür wurden Zellen, die ein Plasmid enthielten, welches erlaubte *CLA4*-Wildtyp-Protein und die Kinase-inaktive *CLA4*<sup>K594A</sup> Form über zu exprimieren, lysiert. Die Kinasen trugen eine myc-Markierung, welche eine effektive Präzipitation mit einem  $\alpha$ -myc Antikörper

ermöglichte (Abbildung 4.2.8 B). Nach Zugabe von radioaktivem  $\gamma$ - $^{32}\text{P}$  ATP wurden die Proben nach der Inkubation und der anschließenden Auftrennung im Gel gegen eine empfindliche Phosphoimagerplatte exponiert.

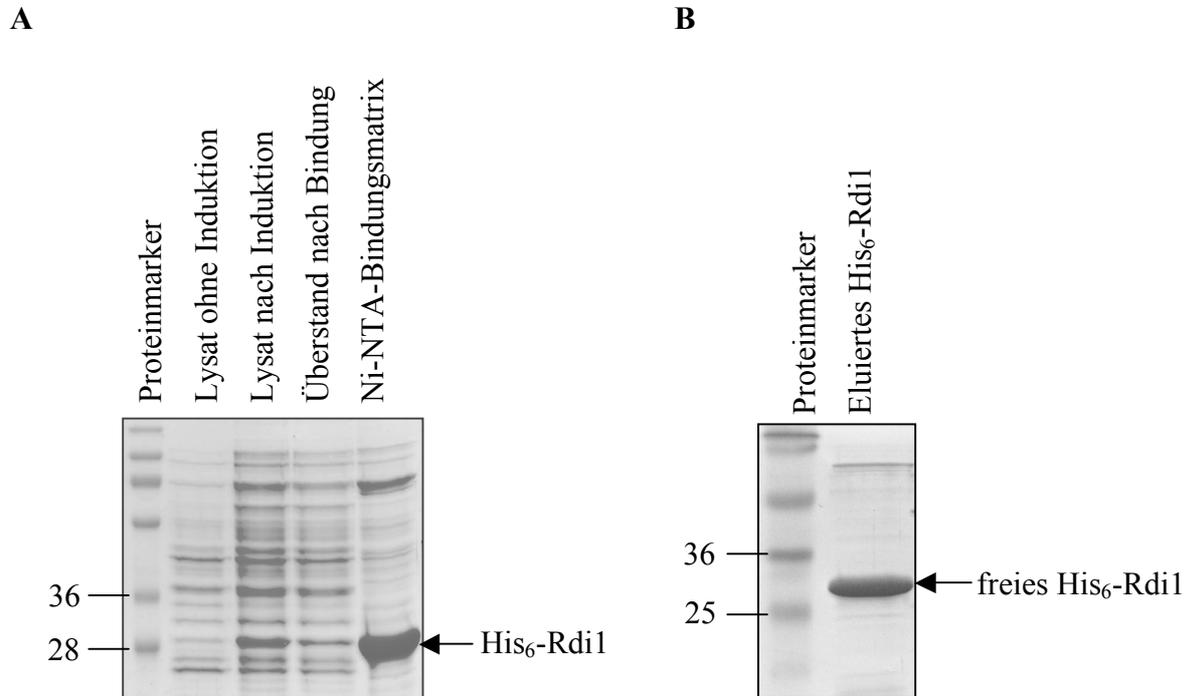


Abbildung 4.2.7: Aufreinigung von rekombinantem His<sub>6</sub>-Rdi1 in *E. coli* und Elution des aufgereinigten His<sub>6</sub>-Fusionsproteins. (A) Aufreinigung und Bindung von His<sub>6</sub>-Rdi1 aus einer 250 ml BL21(DE3) *E. coli* Kultur. Das His<sub>6</sub>-Rdi1 Fusionsprotein von etwa 28 kDa Größe wurde nach der IPTG-Induktion stark exprimiert und konnte zudem sehr stark an die Ni-NTA Bindungsmatrix binden. (B) Durch Inkubation mit einer Imidazol-Lösung wurde das His<sub>6</sub>-Rdi1 Fusionsprotein von der Ni-NTA-Bindungsmatrix in den Puffer freigesetzt. Das 12 % SDS-Gel wurde mit Coomassie gefärbt.

Es zeigte sich, dass Wildtyp Cla4 His<sub>6</sub>-Rdi1 *in vitro* phosphorylieren kann (Abbildung 4.2.8 A). Jedoch zeigte auch die Kinase-inaktive Mutante von Cla4 eine Aktivität gegenüber His<sub>6</sub>-Rdi1. Die Quantifizierung der Intensität der Banden aus dem Phosphoimage ergab eine um den Faktor 3 erhöhte Intensität der Bande für die Reaktion mit Wildtyp Cla4. Wurde dem Ansatz kein Substrat zugefügt, so konnte man eine Bande bei beiden Formen erkennen, die der Kinase selbst zuzuordnen war. Diese Autophosphorylierung ist durch die oberen Pfeile gekennzeichnet. Mischte man dem His<sub>6</sub>-Rdi1 noch His<sub>6</sub>-Cdc42 hinzu, so gab es auch hier keine Veränderungen im Vergleich zwischen Wildtyp und inaktiver Kinase. Auch wenn His<sub>6</sub>-Cdc42 alleiniges Substrat von Cla4 war, konnte keine Phosphorylierung durch Cla4 detektiert werden (Abbildung 4.2.8 C). Als Positivkontrolle für dieses Experiment diente MBP, welches

als ubiquitäres Kinasesubstrat eingesetzt werden kann (z.B. Benton et al., 1997 und Lamson et al., 2002). MBP wurde von Cla4 und der Kinase-inaktiven Form phosphoryliert werden (Abbildung 4.2.8 C; Daten nicht gezeigt). Die Daten aus den *in vitro* Phosphorylierungsstudien zeigten, dass Cla4 zwar das His<sub>6</sub>-Rdi1 Fusionsprotein phosphorylieren konnte, die Kontrolle mit der Kinase-inaktiven Mutante jedoch auch eine Phosphorylierungsaktivität gegenüber His<sub>6</sub>-Rdi1 zeigte. Es konnte daher angenommen werden, dass eventuell ein unbekanntes Protein, welches bei der Präzipitation von Cla4 copräzipitierte, die Phosphorylierung von His<sub>6</sub>-Rdi1 vermittelte.

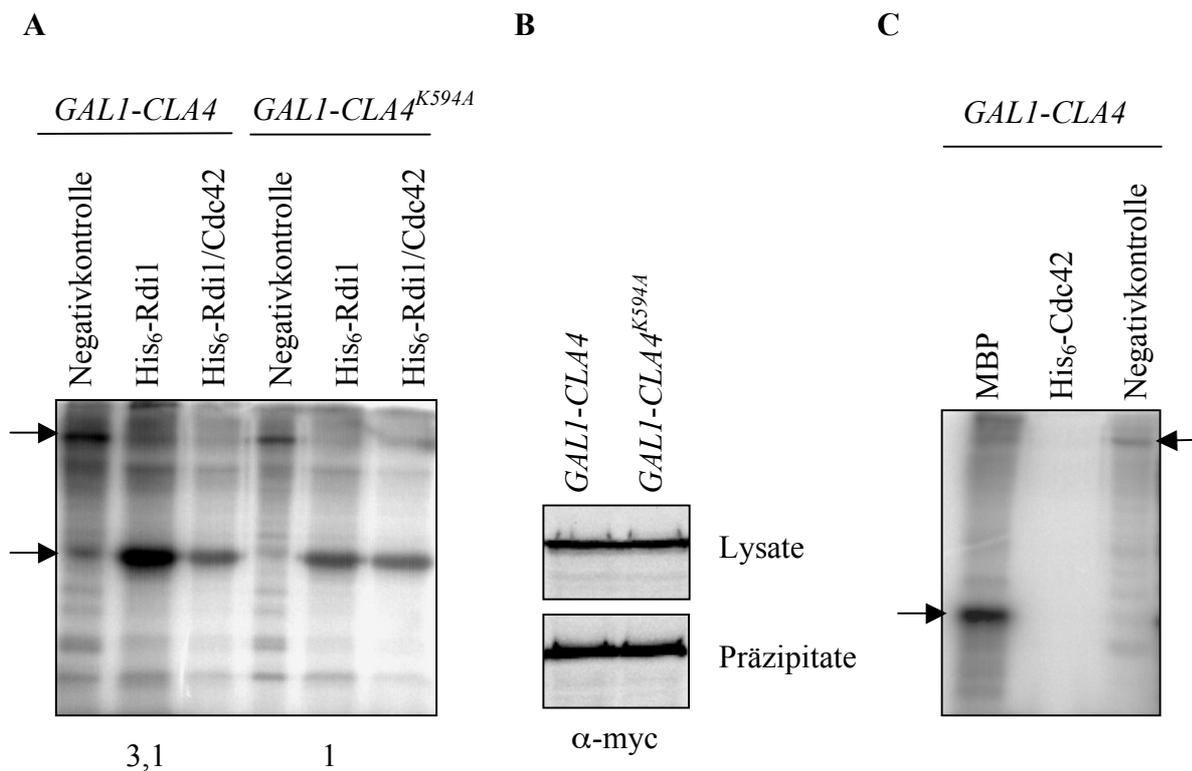


Abbildung 4.2.8: *In vitro* Kinase-Assay mit aufgereinigtem His<sub>6</sub>-Rdi1, His<sub>6</sub>-Cdc42 und präzipitierter Cla4-Kinase. (A) Kinase-Assay mit eluiertem His<sub>6</sub>-Rdi1 als Substrat. Die Kinase Cla4 (Wildtyp und Kinase-inaktiv) wurde zuvor aus einem Lysat mit einem α-myc Antikörper präzipitiert (B). Nach der Kinasereaktion wurden die Proben elektrophoretisch aufgetrennt. (C) Wie A, lediglich His<sub>6</sub>-Cdc42 als Substrat und zur Kontrolle das Kinase-Substrat MBP. Die Exposition der getrockneten Kinase-Assay-Gele erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur gegen eine Phosphoimagerplatte. Die Bestimmung der Intensität der Phosphobanden in A erfolgte mit der Multi Gauge Version 3.0 Software von Science Lab. A und C sind Phosphoimages. B ist ein α-myc Western-Blot.

### 4.3 Rdi1-Rho4: ein neuer Mechanismus steuert die Regulation von Rho4

#### 4.3.1 Die Überexpression von Rdi1 führt zum Abbau von Rho4

##### 4.3.1.1 Starke Reduktion der Rho4 Proteinmengen durch *RDII*-Überexpression

In vorhergehenden Versuchen konnte gezeigt werden, dass Rdi1 spezifisch mit 3HA-Rho4 interagiert und Rho4 durch *RDII*-Überexpression von Membranen extrahiert werden konnte (4.1.1.3, 4.1.1.4, 4.1.1.5 und 4.1.1.6).

Es zeigte sich, dass die 3HA-Rho4 Proteinmengen nach der *RDII*-Überexpression stark reduziert wurden. Die Ursache der Reduktion blieb zunächst unklar. In Zellen, die 3HA-markiertes Rho4 enthielten, wurde über das pKT10-*GALI-RDII* Plasmid die starke *RDII*-Überexpression für 2 Stunden induziert. Das Expressionsmuster wurde mit Zellen verglichen, die ein Kontrollplasmid enthielten (Abbildung 4.3.1). Bei gleicher Beladung der Spuren war in der Spur der *RDII*-Überexpression kaum noch Protein zu erkennen.

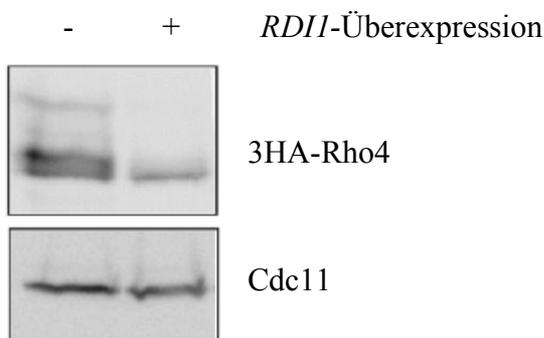


Abbildung 4.3.1: *RDII*-Überexpression führt zu verringerten 3HA-Rho4 Proteinmengen. Nach der Induktion der *RDII*-Überexpression für 2 Stunden verringerten sich die 3HA-Rho4 Proteinmengen. Cdc11 diente als Ladekontrolle.

##### 4.3.1.2 Die Deletion von *RDII* führt zu erhöhten Rho4 Proteinmengen

Um zu überprüfen, ob sich die Rho4 Proteinmengen konsequenterweise erhöhen, wenn *RDII* deletiert wird, wurde ein Stamm hergestellt, der eine Deletion im *RDII* Gen hatte und außerdem ein 3HA-markiertes Rho4 trug. Es wurde nun das Expressionsmuster von 3HA-Rho4 in den Wildtyp Zellen mit dem in den  $\Delta rdi1$  Zellen im  $\alpha$ -HA Western-Blot verglichen.

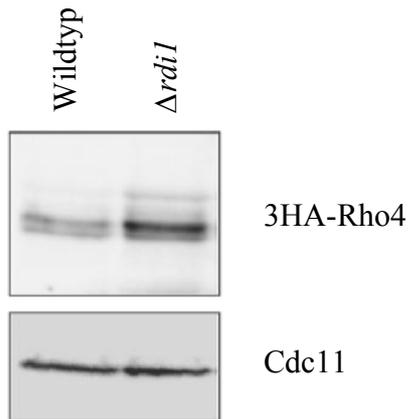


Abbildung 4.3.2: Nachweis zur Abhängigkeit der 3HA-Rho4 Proteinmengen von Rdi1. In  $\Delta rdi1$  Zellen waren die 3HA-Rho4 Proteinmengen erhöht. Der Western-Blot wurde  $\alpha$ -HA entwickelt. Cdc11 diente als Ladekontrolle.

In Zellen, denen das *RDII* Gen fehlte, konnten erhöhte 3HA-Rho4 Spiegel detektiert werden (Abbildung 4.3.2). Dies indizierte eine Abhängigkeit der 3HA-Rho4 Proteinmengen von Rdi1.

Die Reduktion der Rho4 Proteinmengen konnte auf zwei Mechanismen basieren. Zum einen konnte Rdi1 den proteolytischen Abbau von Rho4 induzieren. Auf der anderen Seite war es möglich, dass Rdi1 die *RHO4* Genexpression regulierte. Das zelluläre System müsste dafür schnell auf die Überexpression von *RDII* reagieren. Daher war eine transkriptionelle oder translatorische Regulation von Rho4 durch Rdi1 nur möglich, wenn Rho4 ein instabiles Protein mit geringer Halbwertszeit war.

#### 4.3.1.3 Stabilität von Rho4

Zur Klärung, ob Rho4 ein Protein mit großer oder kleiner Halbwertszeit war, wurde ein Versuch durchgeführt, bei dem die Translation in den Zellen mit dem Inhibitor Cycloheximid blockiert wurde. Während des vegetativen Wachstums wurde den Zellen, die ein 3HA-markiertes Rho4 trugen, Cycloheximid zugesetzt. Nach 0, 1 und 2 Stunden wurden Zellen entnommen, lysiert und dann die Expression von 3HA-Rho4 im  $\alpha$ -HA Western-Blot getestet (Abbildung 4.3.3).

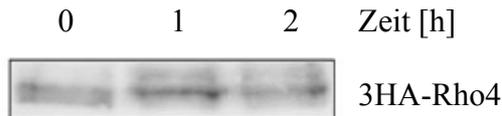


Abbildung 4.3.3: 3HA-Rho4 ist ein relativ stabiles Protein. Nach Zugabe des Translationshemmers Cycloheximid (50  $\mu\text{g/ml}$ ) wurde nach 0, 1 und 2 Stunden ein Zelllysate hergestellt und im  $\alpha$ -HA Western-Blot analysiert.

Durch die Inhibition der Translation konnte kein neues Protein synthetisiert werden. Noch 2 Stunden nach der Inhibition wurden kaum veränderte 3HA-Rho4 Mengen detektiert. Dies deutete auf eine recht hohe Halbwertszeit des Proteins hin und indizierte einen proteolytischen Abbau von Rho4, welcher von Rdi1 vermittelt wird. Unerwarteterweise konnte zusätzlich eine Veränderung des Bandenmusters beobachtet werden. Die Doppelbande wurde nach 1 Stunde zu einer im Vergleich zum Nullpunkt intensiveren Einzelbande.

#### 4.3.2 Der Abbau von Rho4 durch Ygk3

##### 4.3.2.1 Analyse der Proteinmengen nach YGK3-Überexpression

In einer globalen Phosphorylierungsstudie konnte gezeigt werden, dass Ygk3 Rho4 *in vitro* phosphorylierte (Ptacek et al., 2005). Es wurde zudem berichtet, dass der Abbau von Proteinen auf der Phosphorylierung durch Ygk3 basierte (Andoh et al., 2000). Ygk3 stellt eines von vier homologen Proteinen der in höheren Eukaryoten bekannten Glykogen-Synthase-Kinase GSK-3 $\beta$  dar (Kassir et al., 2006).

Es wurde daher zunächst untersucht, ob es sich bei Rho4 um ein Phosphoprotein handelt. In einigen zuvor durchgeführten Experimenten zeigte 3HA-Rho4 unter Wildtypbedingungen im Western-Blot ein multiples Bandenmuster auf (siehe 4.1.1.2, 4.1.1.3 und 4.3.1.1). Es konnten immer zwei intensive übereinanderliegende Banden detektiert werden und zusätzlich mehrere schwächere, die über den kräftigen Banden lagen. Ob dieses Bandenmuster auf phosphorylierte Isoformen von 3HA-Rho4 zurückzuführen war, wurde dann in einem Dephosphorylierungsexperiment analysiert. Dazu wurde 3HA-Rho4 immunpräzipitiert. Anschließend wurde das Präzipitat in drei gleiche Teile getrennt und mit aktiver  $\lambda$ -Phosphatase, hitzeinaktivierter  $\lambda$ -Phosphatase oder ohne Phosphatase für 30 Minuten bei

30°C inkubiert. Diese Behandlung sollte phosphorylierte Isoformen dephosphorylieren und von den anderen Proben unterscheidbar machen. Die Auftrennung erfolgte in der SDS-Gelelektrophorese mit anschließenden Western-Blot Transfer und  $\alpha$ -HA Entwicklung.

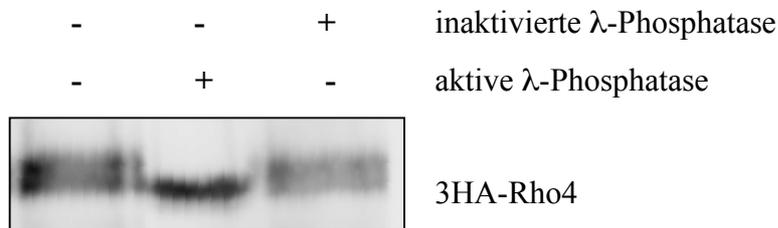


Abbildung 4.3.4: Dephosphorylierung von präzipitiertem 3HA-Rho4. Die Abbildung zeigt, dass 3HA-Rho4 nach der Präzipitation unter Zugabe von  $\lambda$ -Phosphatase dephosphoryliert wurde. Die beiden kräftigen dicht übereinanderliegenden Banden wurden auf eine Bande reduziert (mittlere Spur). Die Zugabe von hitzeinaktivierter  $\lambda$ -Phosphatase hatte keine Auswirkungen auf das Bandenmuster. Der Western-Blot wurde  $\alpha$ -HA entwickelt.

3HA-Rho4 wurde nach der Präzipitation effektiv von aktiver  $\lambda$ -Phosphatase dephosphoryliert. Dies zeigte, dass es sich bei 3HA-Rho4 um ein Phosphoprotein handelte (Abbildung 4.3.4). Im Vergleich zu den Präzipitaten, welche mit inaktivierter oder ohne Phosphatase behandelt wurden, konnte man lediglich eine Proteinbande erkennen, die 3HA-Rho4 zugeordnet werden konnte. In den beiden anderen Spuren hingegen waren die beiden kräftigen übereinanderliegenden Banden noch gut zu erkennen.

Durch den beschriebenen Zusammenhang der Ygk3-vermittelten Proteinphosphorylierung und dem Abbau von Proteinen, sowie der Tatsache, dass Rho4 ein Phosphoprotein ist, wurde untersucht, ob die Rho4 Proteinmengen auch von Ygk3 abhängig waren. Dazu wurde *YGK3* in Zellen überexprimiert, die ein 3HA-markiertes Rho4 trugen. Es wurde nach der Überexpression von *YGK3* durch die Induktion eines mit Galaktose induzierbaren Plasmides Lysate hergestellt und im  $\alpha$ -HA Western-Blot miteinander verglichen.

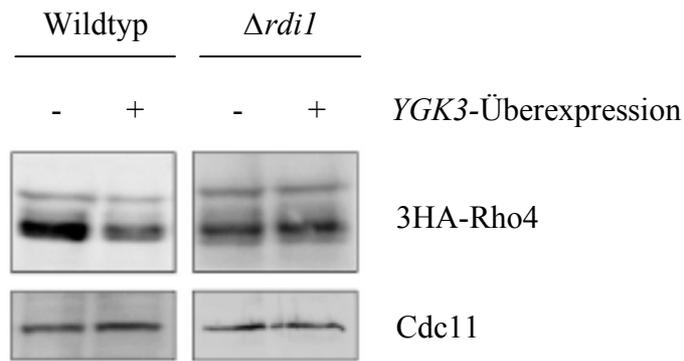


Abbildung 4.3.5: *YGK3*-Überexpression führt zu reduzierten 3HA-Rho4 Proteinmengen. Nach der Überexpression von *YGK3* konnten reduzierte 3HA-Rho4 Proteinmengen detektiert werden. Die Reduktion war von Rdi1 abhängig, da in  $\Delta rdi1$  Zellen kein Effekt nach *YGK3*-Überexpression zu beobachten war. Cdc11 diente als Ladekontrolle

Im Gegensatz zur Wildtypkontrolle konnten nach Überexpression von *YGK3* reduzierte Rho4 Mengen detektiert werden (Abbildung 4.3.5). Zudem zeigte sich eine Abhängigkeit des Prozesses von Rdi1. Deletierte man *RDII* und exprimierte dann *YGK3* über, so konnte man im Anschluss keine Reduktion von Rho4 detektieren.

Vorstellbar war die direkte Phosphorylierung von Rho4 durch Ygk3, die für den Abbau von Rho4 notwendig war. Dazu wurde *YGK3* deletiert und das Bandenmuster von 3HA-Rho4 analysiert. Es konnten keine Veränderungen im Phosphorylierungsmuster beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Auch die zusätzliche Deletion von einer der drei anderen homologen Ygk3 Proteine hatte keinen Einfluss auf das Muster (Daten nicht gezeigt). Die Herstellung von Dreifach- und Vierfach-Deletions-Mutanten gelang nicht (Sakwa, 2008).

#### 4.3.2.2 Einfluss von Ygk3 auf Cdc42 und Rho1

Ob Ygk3 auch die Proteinmengen von 3HA-Cdc42 und 3HA-Rho1 beeinflusst, wurde in einem weiteren Experiment überprüft, welches analog zum experimentellen Ansatz in 4.3.2.1 durchgeführt wurde.

Die Proteinmengen von 3HA-Cdc42 und 3HA-Rho1 waren dabei, trotz mehrstündiger Überexpression, nicht von Ygk3 abhängig (Abbildung 4.3.6).

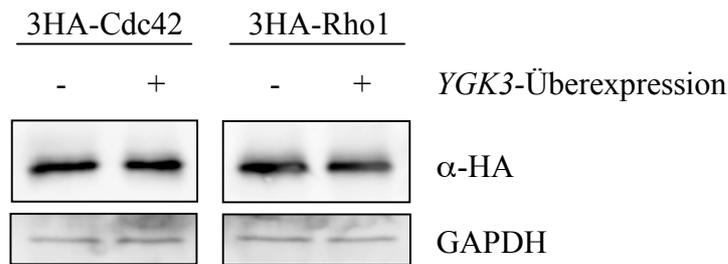


Abbildung 4.3.6: *Ygk3* beeinflusst die 3HA-Cdc42 und 3HA-Rho1 Proteinmengen nicht. Das Experiment aus 4.3.3.1 wurde für 3HA-Cdc42 und 3HA-Rho1 durchgeführt. Es wurde deutlich, dass die *YGK3*-Überexpression keinen Einfluss auf die Proteinmengen von 3HA-Cdc42 und 3HA-Rho1 hatte. Als Ladekontrolle diente GAPDH.

#### 4.3.2.3 Identifizierung einer potentiellen PEST-Domäne in Rho4

Proteinabbauprozesse sind häufig von Signalen abhängig, die im abzubauenen Protein enthalten sind. Die sogenannte PEST-Sequenz, welche reich an den Aminosäuren Prolin, Glutaminsäure, Serin und Threonin ist, wird dabei häufig als ein Hinweis für den schnellen Abbau eines Proteins angesehen (Rogers et al., 1986). Der Abbau erfolgt darauf zumeist durch das Proteasom mit vorheriger Assoziation von Ubiquitinen an das Protein.

Mit Hilfe des Computer-Programms „epestfind“ (<http://mobylye.pasteur.fr/cgi-bin/MobylyePortal/portal.py?form=epestfind>) lassen sich Vorhersagen über mögliche PEST-Sequenzen in einem Protein machen. Die Analyse basierte auf einem Algorithmus, der von Rogers et al. (1986) entwickelt wurde und den einzelnen Aminosäuren bestimmte Werte zuordnete und so Sequenzen ihrer Güte nach sortierte. Der Algorithmus wurde auf die Proteinsequenz von Rho4 angewendet. Dabei wurde im N-Terminus von Rho4 eine potentielle PEST-Sequenz zwischen den Aminosäuren 9 bis 40 identifiziert. Ihr PEST-Wert betrug 4,8. Ab einem Wert von mehr als 5 wird von einem signifikanten Wert gesprochen (Rogers et al., 1986). Die Sequenz wurde von dem Programm zumindest als potentielle PEST-Sequenz eingestuft. Daraufhin wurde eine verkürzte Version von 3HA-Rho4 hergestellt, bei der die Aminosäuren 9 bis 40 deletiert wurden. Dabei zeigte sich unter anderem, dass das verkürzte Rho4-Protein in geringeren Mengen vorlag, also nicht durch den verhinderten Abbau in der Zelle akkumulierte. Zudem konnten immer noch mindestens zwei gleich intensive Banden dem Rho4 zugeordnet werden (Daten nicht gezeigt).

#### 4.3.2.4 Phosphorylierung von Rho4 durch Ygk3 im Kinase-Assay

Zur Klärung der Frage, ob Ygk3 die Rho GTPase Rho4 tatsächlich phosphorylieren kann, wurden Kinase-Assays durchgeführt. Zunächst wurde dafür Rho4 als His<sub>6</sub>-Fusionsprotein rekombinant in *E. coli* (Rosetta) exprimiert und aufgereinigt (Abbildung 4.3.7). Die Aufreinigung erzielte eine hohe Ausbeute. Das His<sub>6</sub>-Rho4 Fusionsprotein von etwa 36 kDa Größe konnte dabei sehr gut an die Ni-NTA-Bindungsmatrix binden. Auch die Elution des Fusionsproteins von der Bindungsmatrix mit einer 0,5 M Imidazol-Lösung erfolgte problemlos. Zusätzlich wurde der N-terminale Abschnitt von Rho4 exprimiert und aufgereinigt, der die unter 4.3.2.3 entdeckte PEST-Domäne enthielt (Daten nicht gezeigt). Das Fragment wurde wie Rho4 ebenfalls als His<sub>6</sub>-Fusionsprotein exprimiert. Von der Kinase Ygk3 wurde ein Hefe-Expressionsplasmid hergestellt, das es ermöglichte, das Protein als GST-Fusionsprotein stark zu exprimieren. Zusätzlich wurde ein Plasmid gleicher Art hergestellt, das die Kinase-inaktive Form Ygk3<sup>K75A</sup> enthielt. Beide GST-Fusionsproteine wurden mittels Glutathionsepharose präzipitiert und mit ihren potentiellen Substraten und radioaktiven ATP inkubiert. Der Auftrennung der Proben im Gel folgten die Trocknung und Exposition des Gels gegen eine Phosphoimagerplatte. Es konnte eine Aktivität von Ygk3 gegenüber His<sub>6</sub>-Rho4 und dem Kinasesubstrat MBP detektiert werden (Abbildung 4.3.7 B). Gegenüber dem His<sub>6</sub>-PEST Fragment von Rho4 konnte keine Aktivität beobachtet werden. Allerdings auch die Kinase-inaktive Form Ygk3<sup>K75A</sup> phosphorylierte His<sub>6</sub>-Rho4 und das ubiquitäre Kinasesubstrat MBP. Es stellte sich die Frage, ob die Phosphorylierung der Substrate von einem anderen Protein, welches bei der Präzipitation von GST-Ygk3 copräzipitierte, ausging. Die Präzipitation der Kinasen erfolgte dabei gleichmäßig und konnte als mögliche Fehlerquelle ausgeschlossen werden (Abbildung 4.3.7 C).

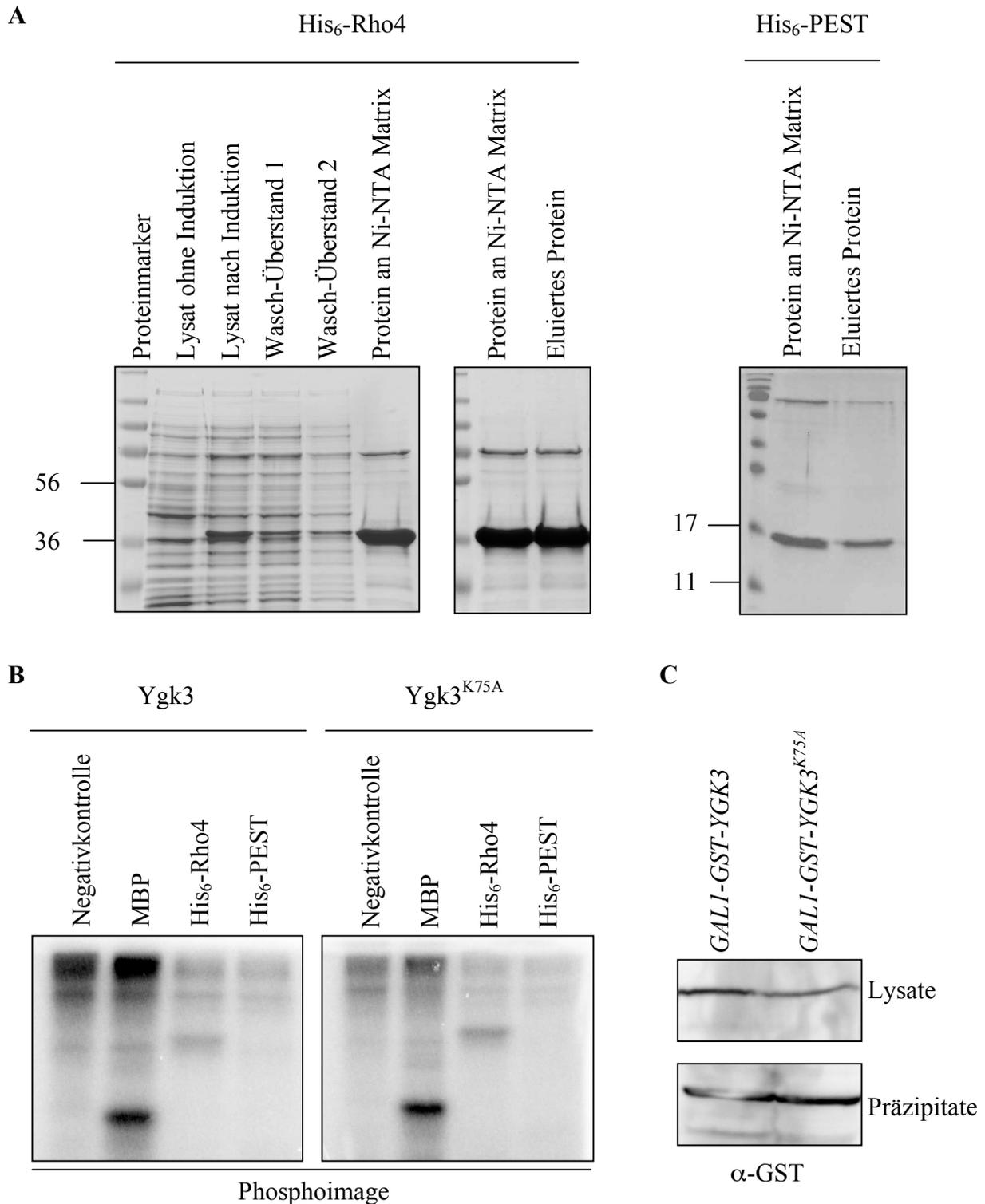


Abbildung 4.3.7: Aufreinigung und Elution von His<sub>6</sub>-Rho4 aus *E. coli* und dessen Einsatz als Substrat für einen Kinase-Assay mit präzipitiertem GST-Ygk3. (A) Aufreinigung und Elution von His<sub>6</sub>-Rho4 aus einer Rosetta *E. coli* Kultur. Es konnte ein etwa 36 kDa großes His<sub>6</sub>-Fusionsprotein aufgereinigt und anschließend mit einer 0,5 M Imidazol-Lösung eluiert werden. Zusätzlich sind die Überstände der Beads nach dem Waschen dargestellt. Die Gele wurden mit Coomassie gefärbt. (B) Kinase-Assay mit His<sub>6</sub>-Rho4, His<sub>6</sub>-PEST und MBP als Substrate. Sowohl das präzipitierte Wildtyp, als auch das Kinase-inaktive Ygk3 zeigten eine Aktivität gegenüber His<sub>6</sub>-Rho4 und MBP. (C) Die GST-Fusionsproteine GST-Ygk3 und GST-Ygk3<sup>K75A</sup> ließen sich problemlos präzipitieren.

### 4.3.3 Inhibition des Rdi1-induzierten Rho4 Abbaus

#### 4.3.3.1 Inhibition des proteasomalen Abbauprozesses mit MG-132

Anhand des Cycloheximidexperiments wurde deutlich, dass mit proteasomalen und vakuolären Abbauprozessen zwei Möglichkeiten in Frage kamen, die den Abbau von Rho4 nach *RDII*-Überexpression beeinflussen konnten (4.3.1.3). Zunächst sollte überprüft werden, ob der Rdi1-induzierte Abbau von dem Proteasom abhing. Dafür wurde zunächst ein Stamm hergestellt, der eine Deletion im *ERG6* Gen trug, da sich dieser Stamm besonders für die Behandlung mit dem proteasomalen Inhibitor MG-132 eignete (Lee und Goldberg, 1996). Dabei waren durch die *ERG6* Deletion die Zellen, aufgrund der erhöhten Permeabilität der Plasmamembran, besonders aufnahmefähig bezüglich organischer Verbindungen aus dem Medium.

Wurde den Zellen bei gleichzeitiger *RDII*-Überexpression MG-132 in das Medium zugegeben, so konnte man in der Western-Blot-Analyse erkennen, dass sich der Abbau von 3HA-Rho4 deutlich reduzierte (Abbildung 4.3.8). Der Abbau reduzierte sich dabei im Vergleich zu den Zellen, die nur mit DMSO, dem Lösungsmittel des Inhibitors, behandelt wurden, deutlich. Somit konnte gefolgert werden, dass Rdi1-induzierte Rho4 Abbau von proteasomalen Abbauprozessen abhing.

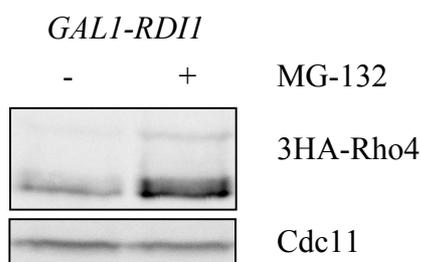


Abbildung 4.3.8: Inhibition des Rdi1-induzierten Abbaus von 3HA-Rho4 durch spezifische Blockierung des Proteasoms mit dem Inhibitor MG-132 (50  $\mu$ M). In Zellen, die im *ERG6* Gen deletiert waren, wurde *RDII* für 2 Stunden überexprimiert und zeitgleich das Proteasom mit MG-132 blockiert. Der Western-Blot wurde  $\alpha$ -HA und zur Ladekontrolle  $\alpha$ -Cdc11 entwickelt.

Wurden Wildtypzellen mit MG-132 behandelt, so steigerten sich auch hier die Rho4 Proteinmengen im Vergleich zu den Zellen ohne MG-132 leicht (Daten nicht gezeigt). Dies war durchaus zu erwarten gewesen, da der Abbau von Rho4 somit auch unter physiologischen Bedingungen vom Proteasom abhängig war.

## 4.3.3.2 Abhängigkeit des Rdi1-induzierten Rho4-Abbaus von der E3-Ubiquitin-Ligase Rsp5

Anhand des Versuchs mit dem proteasomalen Inhibitor wurde eine Abhängigkeit des Rdi1-induzierten Abbaus von Rho4 bestätigt. Der proteasomale Abbau beinhaltet zumeist die Verknüpfung von Ubiquitinen an das abzubauenende Protein. Die Assoziation wird von E3-Ubiquitin-Ligasen vermittelt. In Hefe konnte gezeigt werden, dass Ygk3 im Zusammenspiel mit der E3-Ubiquitin-Ligase Rsp5 den Abbau von Proteinen induzieren kann. In höheren Eukaryoten wurde bereits der Abbau der Rho GTPasen RhoA und Rap1B beschrieben. Dieser hängt von den E3-Ubiquitin-Ligasen Smurf1 und Smurf2 ab (Wang et al., 2003; Schwamborn et al., 2007). Die Smurf Proteine besitzen beide eine HECT-Domäne. In Hefe wird mit Rsp5 lediglich eine einzige Ubiquitin-Ligase exprimiert, die eine solche Domäne besitzt (Rotin et al., 2000). Mit Hilfe eines Stammes, der eine temperatursensitive Variante von Rsp5 trug (*rsp5-1*, Stamenova et al., 2004), sollte der Abbau von Rho4 näher analysiert werden. Dabei wurde der Abbau bei der permissiven Temperatur von 23°C und der restriktiven Temperatur von 37°C, bei der Rsp5 inaktiv ist, unter *RDII*-Überexpression betrachtet (Abbildung 4.3.9).

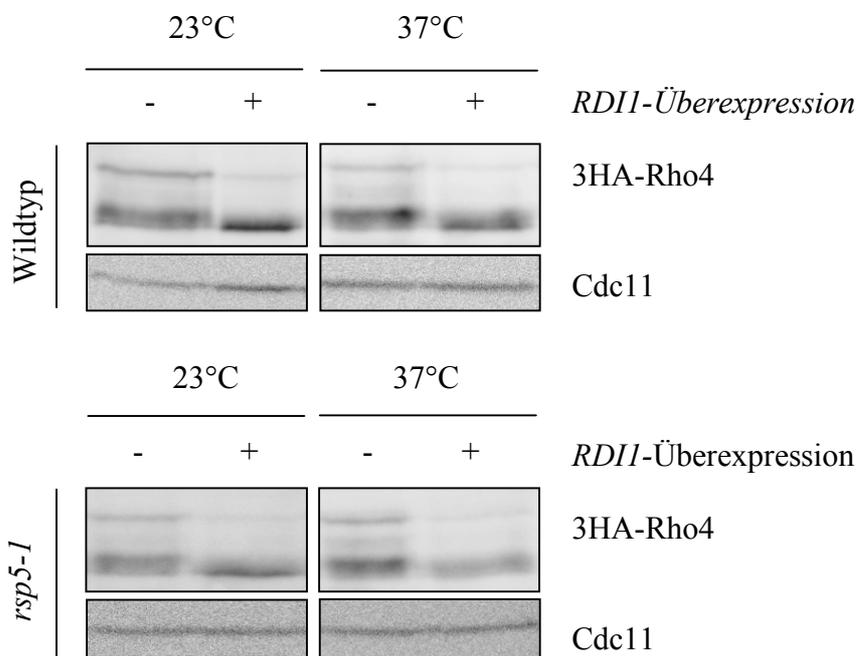


Abbildung 4.3.9: Der Abbau von 3HA-Rho4 ist nicht abhängig von der E3-Ubiquitin-Ligase Rsp5. In Zellen, welche die temperatursensitive Mutante *rsp5-1* der E3-Ubiquitin-Ligase Rsp5 enthielten, wurde der Abbau von 3HA-Rho4 durch *RDII*-Überexpression bei der permissiven und restriktiven Temperatur von 23°C bzw. 37°C induziert. Nach der Analyse im  $\alpha$ -HA Western-Blot konnte keine Abhängigkeit des Rho4-Abbaus von Rsp5 beobachtet werden. Cdc11 diente als Ladekontrolle.

Bei der Analyse des Abbaus in Abhängigkeit der Ubiquitin-Ligase Rsp5 konnte kein Effekt gefunden werden (Abbildung 4.3.9). Der Abbau von Rho4 war bei der restriktiven Temperatur von 37°C genauso stark wie unter den permissiven Bedingungen, bei denen *rsp5-1* noch aktiv war. Es konnte vermutet werden, dass andere Ubiquitin-Ligasen den Abbau beeinflussen könnten oder der proteasomale Abbau Ubiquitin-unabhängig erfolgte.

#### 4.3.3.3 Inhibition des vakuolären Abbauweges

Als zweiter möglicher Mechanismus, von dem der Rdi-induzierte Abbau von Rho4 abhängig sein konnte, kam der Abbau in den Vakuolen, welche den Lysosomen in höheren Eukaryoten entsprechen, in Frage. Um den Einfluss vakuolärer Abbauprozesse zu analysieren, wurde der Abbau von Rho4 in  $\Delta pep4$  Zellen verfolgt. Pep4 ist normalerweise für die Reifung vakuolärer Proteinasen verantwortlich, die den Abbau der in die Vakuolen translozierten Proteine vermitteln (Ammerer et al., 1986). Unter *RDII*-Überexpression wurden die 3HA-Rho4 Proteinmengen nach der Lyse der Zellen im  $\alpha$ -HA Western-Blot analysiert.

Es wurde deutlich, dass die Deletion von *PEP4* große Auswirkungen auf die Proteinmengen von 3HA-Rho4 hatte (Abbildung 4.3.10). Die Blockierung der Reifung vakuolärer Proteinasen hatte zur Folge, dass der Rdi1-induzierte Abbau von Rho4 im Vergleich zur Wildtypsituation effektiv gehemmt werden konnte.

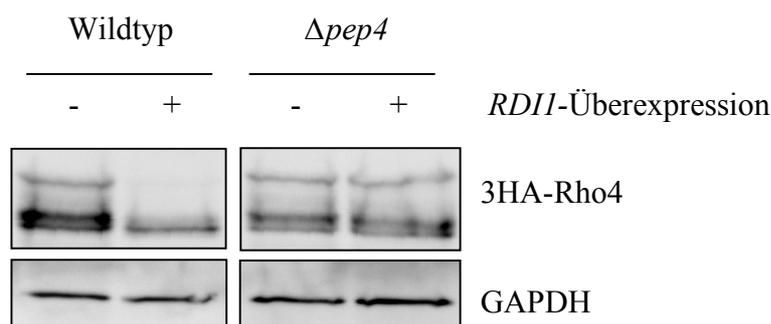


Abbildung 4.3.10: Inhibition des Rdi1-induzierten Abbaus von 3HA-Rho4 durch Blockierung der vakuolären Abbauwege. Die *RDII*-Überexpression wurde in Wildtypzellen und in  $\Delta pep4$  Zellen für 2<sup>1</sup>/<sub>2</sub> Stunden induziert. Aus den Zellen wurden dann Lysate hergestellt, die im  $\alpha$ -HA Western-Blot analysiert wurden. GAPDH diente als Ladekontrolle.

Dies bedeutet, dass Rho4 nach der Extraktion von Membranen in die Vakuolen transloziert wurde, um dort abgebaut zu werden. Zuvor zeigte sich bereits, dass Rho4 auch an inneren Membranen wie der Vakuolenmembran lokalisiert sind (4.1.1.6).

#### 4.3.4 Die Expression von Rho4 während des vegetativen Zellzyklus

Auf der Suche nach physiologischen Gründen für den Rdi1-induzierten Abbau von Rho4 in der Vakuole und durch das Proteasom wurde die Expression von 3HA-Rho4 während des vegetativen Zellzyklus analysiert. Dazu wurde ein Stamm hergestellt, der es ermöglichte, *CDC20* unter Kontrolle des induzierbaren *GALI*-Promotors stark zu exprimieren (siehe 3.4.13)..

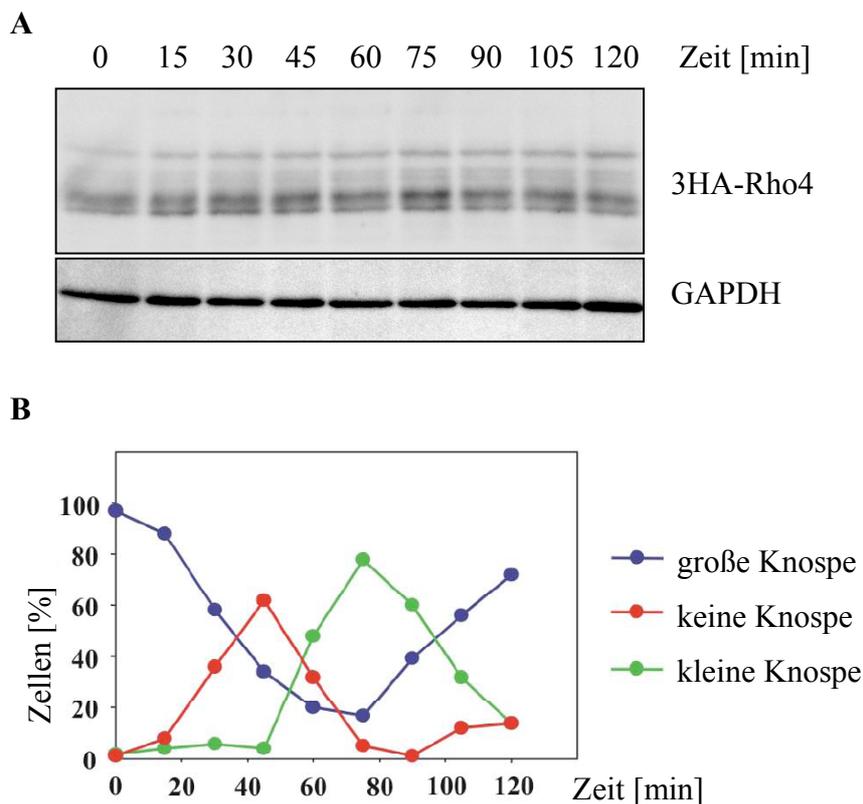


Abbildung 4.3.11: Expression von 3HA-Rho4 während des synchronisierten Durchlaufens des vegetativen Zellzyklus. (A) Nach der Probenentnahme wurden Lysate hergestellt, die im  $\alpha$ -HA Western-Blot betrachtet wurden. GAPDH diente als Ladekontrolle. (B) Zur Bestimmung des Knospungsindex wurden von den Proben je insgesamt 100 Zellen gezählt und der Anteil von Zellen ohne, mit kleiner und großer Knospe bestimmt.

*CDC20* ist dabei essentiell für den Übergang der Zellen von der Metaphase zur Anaphase. Das gezielte Abschalten des Promotors durch Galaktoseentzug bewirkte ein synchrones Arretieren der Zellen bei diesem Übergang. Dies war daran zu erkennen, dass etwa gleich große Mutter- und Tochterzellen vorlagen. Ausgehend von diesem Punkt wurde das Durchlaufen des Zellzyklus durch Zugabe von Galaktose und somit der Expression von *CDC20* synchron gestartet. In Abständen von 15 Minuten wurden dann Proben gesammelt, die zum einen in der Western-Blot-Analyse detektiert wurden und zum anderen mikroskopisch zur Bestimmung des Knospungsindex betrachtet wurden.

Die Zellzyklusanalyse zeigte keine Veränderungen in dem Expressionsmuster von 3HA-Rho4 beim Durchlaufen des vegetativen Zellzyklus (Abbildung 4.3.11). Unter gleichzeitiger Betrachtung der Ladekontrolle, wofür der Blot gestrippt und mit einem  $\alpha$ -GAPDH Antikörper entwickelt wurde, konnte gezeigt werden, dass die Proteinmengen im Western-Blot unverändert blieben. Größere Mengen Rho4 wurden im Verlauf des Zellzyklus nicht abgebaut. Zusätzlich konnte durch die Bestimmung des Knospungsindex gezeigt werden, dass zur jeweiligen Probenentnahme ein anderes Stadium des Zellzyklus recht synchron durchschritten wurde. Zunächst verringerte sich der Anteil an Zellen der Mutter- und Tochterzellen mit großer Knospe durch Cytokinese deutlich, während die Zahl der Zellen ohne Knospe dementsprechend anstieg. Ein neuer Lebenszyklus begann. Nach ca. 60 Minuten fiel die Anzahl der Zellen ohne Knospe deutlich ab und wurde von der Zahl der Zellen mit einer kleinen Knospe überstiegen. Nach etwa 120 Minuten wurde die Anzahl der Zellen mit großer Knospe wieder fast so groß wie zu Beginn, was darauf hindeutet, dass der Zellzyklus einmal komplett durchschritten wurde.

## 4.4 Identifizierung neuer Rdi1 Interaktoren

### 4.4.1 Suppressoren der Rdi1-induzierten Letalität aus einem Multicopy-Screen

Auf der Suche nach neuen Interaktoren wurden zwei unterschiedliche Screens durchgeführt. Es war zuvor bekannt, dass die starke *RDII*-Überexpression letal für die Zellen ist (Masuda et al. 1994). Dabei wurde *RDII* auf einem Multicopy-Plasmid unter Kontrolle des *GALI*-Promotors überexprimiert. Auf Platten, auf denen die Galaktoseinduktion erfolgte, konnten die Zellen nicht wachsen. Basierend auf dieser Beobachtung wurde eine Genbibliothek

gescreent, welche die Genomfragmente auf Multicopy-Plasmiden enthält. Dabei wurde zunächst ein Stamm hergestellt, der das pKT10-Rdi1 Plasmid enthielt. Diese Zellen wurden anschließend mit der Genbibliothek transformiert. Die Zellen wurden dann auf Platten ausgestrichen, die eine Galaktoseinduktion und somit die starke Induktion von *RDII* ermöglichten. Die Zellen sollten unter diesen Bedingungen nur wachsen, wenn sie ein Bibliotheks-Plasmid enthielten, welches für ein Protein codierte, das die Rdi1-induzierte Letalität supprimieren konnte. Diese Klone waren potentielle Interaktoren von Rdi1, da sie die Wirkmechanismen von Rdi1 beeinflussen mussten.

In mehreren Versuchen wurden etwa durchschnittlich 800000 Doppeltransformanden pro Transformationsansatz erhalten. Man konnte damit davon ausgehen, dass der Screen gesättigt war. Trotzdem wurde nur eine geringe Anzahl an Klonen erhalten, die auf den Selektionsplatten wuchsen. Nach der Isolierung der Hefe-Plasmid DNA und erneuter Transformation dieser DNA in die Ausgangs-Hefezellen wurde das Wachstum analysiert. Im Zuge der Sequenzierungen der positiven Plasmide konnte zunächst *CDC42* als Suppressor identifiziert werden. Hinzu kamen weitere positive Klone, die Sequenzen von *GAL80* und *URA3* enthielten. *GAL80* ist ein Transkriptionsfaktor, der den Galaktosestoffwechsel reguliert und *URA3*, ist wichtig für die Uracil-Synthese. Die Klonierung dieser Gene in Multicopy-Plasmide führte zur Suppression der Rdi1-induzierten Letalität unter Induktionsbedingungen (Abbildung 4.4.1).

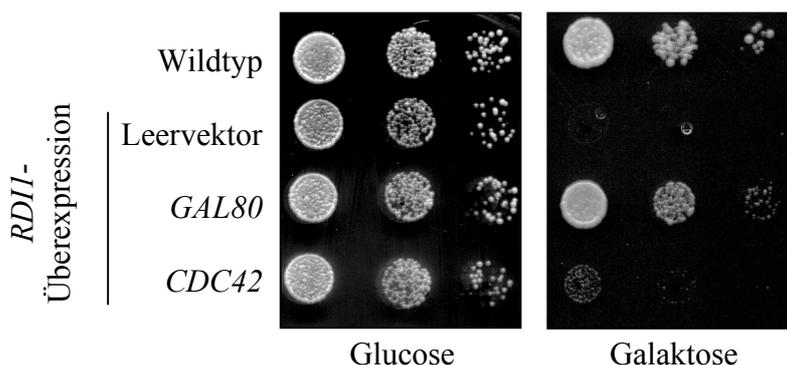


Abbildung 4.4.1: Suppressoren von Rdi1, die durch einen Screen identifiziert wurden. Die identifizierten Gene *GAL80* und *CDC42* wurden in Multicopy-Plasmide kloniert und in Zellen transformiert, die ein Plasmid zur starken *RDII*-Überexpression enthielten. Auf Galaktoseplatten erfolgte, im Gegensatz zum Wachstum auf den Glucoseplatten, die Induktion der *RDII*-Überexpression.

Die Protein-Protein-Interaktion von Cdc42 mit Rdi1 war bereits bekannt (Masuda et al., 1994; Koch et al., 1997). Die Suppression der Rdi1-induzierten Letalität durch Cdc42 signalisierte, dass der Screen funktionierte und sinnvolle Ergebnisse erhalten wurden. Die Suppression von Cdc42 war zudem recht schwach. Die anderen beiden Klone stellten sich als Artefakte dar, da sie im Falle von *GAL80* anscheinend den Galaktosestoffwechsel so umstellten, dass der Klon unanfällig für die Galaktoseinduktion war und im Falle von *URA3* einfach dafür sorgte, dass das pKT10-Rdi1 Plasmid, welches auf den *URA3*-Marker selektiert wurde, aus den Zellen entfernt werden konnte, um eine *RDII*-Überexpression zu vermeiden. Da diese drei Klone die einzigen Klone waren, blieb zu überlegen, ob die Screen-Bedingungen zu stringent gewählt waren oder die exprimierten Rdi1 Proteinmengen zu groß waren, um physiologisch sinnvolle Ergebnisse zu erhalten.

Außerdem wurde überprüft, wie sich die Überexpression von bekannten Cdc42-Effektoren auf die Rdi1-induzierte Letalität auswirken würden. Dazu wurden die codierenden Sequenzen von *CLA4*, *STE20*, *GIC1* und *GIC2* ebenfalls in ein Multicopy-Plasmid kloniert und in die Zellen transformiert, die das pKT10-Rdi1 Plasmid enthielten.

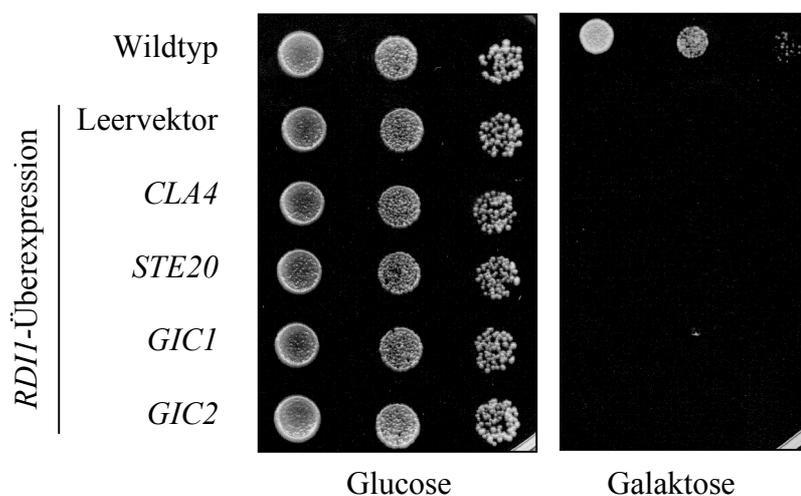


Abbildung 4.4.2: Die Überexpression verschiedener Cdc42-Effektoren konnte die Rdi1-induzierte Letalität nicht supprimieren. Die Effektoren wurden von einem Multicopy-Plasmid exprimiert.

Es zeigte sich, dass keiner der Cdc42-Effektoren in der Lage war, die Letalität zu unterdrücken (Abbildung 4.4.2). Besonders im Falle von *CLA4* war dies verwunderlich, da zuvor gezeigt werden konnte, dass die Überexpression von *CLA4* einen großen Einfluss auf die Interaktionen von Rdi1 hatte. Hierbei war *Cla4* in der Lage, Rdi1-Cdc42 Komplexe in Co-Immunpräzipitationsexperimenten aufzulösen und in Fraktionierungsexperimenten die

Verteilung von Cdc42 und Rho1 in Abhängigkeit von Rdi1 zu regulieren. Die Überexpression von *CLA4* konnte sogar den negativen Effekt von Rdi1 aufheben (Abschnitt 4.2.1 und 4.2.2).

#### 4.4.2 Split-Ubiquitin-Screen mit Rdi1 als Köderprotein

Als nächste Möglichkeit bot sich eine weitere Screen-Methode an. Die Split-Ubiquitin Technik (Abschnitt 3.4.3) wurde zuvor in der Arbeitsgruppe erfolgreich zur Identifikation von Ste20-Interaktoren verwendet (Tiedje et al., 2007) und sollte auch auf Rdi1 angewendet werden.

##### 4.4.2.1 Überprüfung der Expression des Rdi1-Cub-Konstruktes

Bevor der Split-Ubiquitin-Screen durchgeführt werden konnte, musste sichergestellt sein, dass Rdi1 als Köderprotein in Fusion mit der C-terminalen Hälfte von Ubiquitin und dem RUra3-Marker ausreichend stark exprimiert wurde. Dazu wurden Zellen, die entweder das Rdi1-Plasmid, ein leeres Kontrollplasmid oder ein Vergleichsplasmid enthielten, in einer Verdünnungsreihe bezüglich ihres Wachstums analysiert. Das Vergleichsplasmid enthielt Ste20 und wurde zuvor erfolgreich als Köderprotein bei der Identifizierung neuer Ste20-Interaktoren eingesetzt (Tiedje et al., 2007). Die Platten enthielten zum einen kein Histidin, um so die Plasmide auf das *HIS3* Gen zu selektieren und zum anderen sollte das Wachstum auf Platten, denen zusätzlich Uracil fehlte, beweisen, dass die Köderproteine in Fusion mit dem RUra3-Marker exprimiert wurden. Es zeigte sich, dass die Expression des Rdi1-Fusionsprotein ausreichend ist und mit der Expression des bereits etablierten Ste20-Fusionsprotein vergleichbar war (Abbildung 4.4.3). Während die Kontrollzellen, welche den Leervektor trugen und nur auf -His Platten wuchsen, auf der Doppelselektionsplatte kein Wachstum aufzeigten, konnte ein gleichmäßiges Wachstum der Rdi1- und Ste20-tragenden Stämme beobachtet werden. Aufgrund der Überprüfung der Expressionsstärke des Köderproteins konnte der eigentliche Screen begonnen werden.

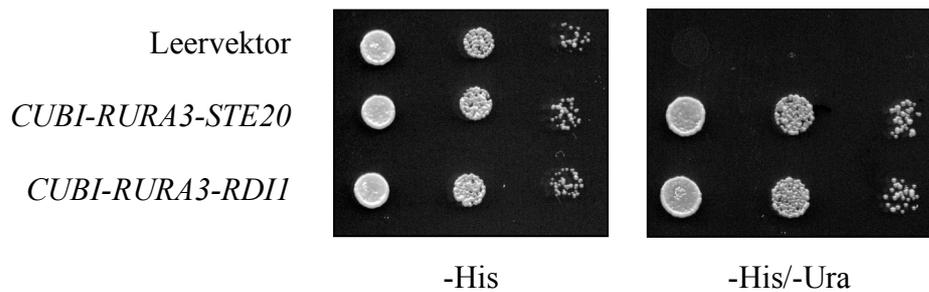


Abbildung 4.4.3: Überprüfung der Expression des Köderproteins Rdi1 in dem *CUBI-RURA3* Vektor, der für den Split-Ubiquitin-Screen eingesetzt wurde. *RDII* wurde in einem mit dem bereits etablierten Ste20-Konstrukt vergleichbaren Ausmaß als Fusionsprotein mit der C-terminalen Hälfte von Ubiquitin und dem Rura3-Marker exprimiert. Das Wachstum erfolgte für etwa 48 Stunden bei 30°C in  $\Delta rdi1$  Zellen, was die Interaktion von intrinsischem Rdi1 mit potentiellen Interaktoren verhindern sollte.

#### 4.4.2.2 Split-Ubiquitin-Screen mit Rdi1 als Köderprotein

Der Screen wurde wie unter 3.4.3 beschrieben durchgeführt. Es wurden etwa 1,2 Millionen Doppeltransformatanten erhalten, von denen insgesamt 136 als kleine Kolonien auf den Selektionsplatten wachsen konnten. Aus diesen Klonen wurde die Hefe-Plasmid DNA isoliert und erneut in Hefezellen retransformiert, die das Rdi1-Köderprotein exprimierten. Ein Wachstum dieser Doppeltransformatanten auf den Selektionsplatten bedeutete die Reproduzierbarkeit der identifizierten Interaktion. Von den 136 Klonen wuchsen 96 Klone so stark auf den Selektionsplatten, dass sie als positive Klone angenommen wurden. Die genomischen DNA-Fragmente dieser Klone, welche in den Bibliotheksplasmiden enthalten sind, wurden anschließend sequenziert und analysiert. Die Gene und ihre möglichen Funktionen sind in Tabelle 4.4.A dargestellt und wurden aus der *Saccharomyces* Genome Database generiert.

Klon	Gen	Beschreibung
1	<i>YIR003W</i>	unbekannte Funktion
3	-	
4	<i>MLC1</i>	leichte Kette von Myo1
6	<i>ADH1</i>	Alkoholdehydrogenase
8	<i>PTA1</i>	Untereinheit von holo-CPF
9	<i>PAI3</i>	cytoplasmatischer Pep4-Inhibitor
10	<i>RBA50</i>	beeinträchtigt die Transkription
11	<i>FLC2</i>	potentieller FAD-Transporter
12	<i>ADH1</i>	Alkoholdehydrogenase
13	<i>BI3</i>	mitochondriale mRNA-Maturase
14	<i>SEC27</i>	involviert im Golgi zu ER und ER zu Golgi Transport

Klon	Gen	Beschreibung
16	<i>CNS1</i>	Co-Chaperon
17	-	
18	<i>YCL045C</i>	unbekannte Funktion
19	<i>YDR239C</i>	unbekannte Funktion
20	<i>YDR239C</i>	unbekannte Funktion
22	-	
23	<i>COX1</i>	Untereinheit der Cytochrom-c-Oxidase
24	<i>RSC30</i>	Chromatin-Remodellierung
26	<i>PEP7</i>	multivalentes Adapterprotein
27	<i>SEN1</i>	Helikase
29	<i>SEC6</i>	Exocystkomponente
30	<i>SEC6</i>	Exocystkomponente
31	-	
32	<i>MHP1</i>	Microtubuli-assoziiertes Protein
33	<i>TFG2</i>	TFIIF Untereinheit
34	<i>DDR48</i>	exprimiert im Zuge von DNA-Schädigungen
35	-	
36	<i>RSC30</i>	Chromatin-Remodellierung
37	-	
40	<i>SEC6</i>	Exocystkomponente
43	-	
44	<i>CNS1</i>	Co-Chaperon
47	-	
48	<i>YPR115W</i>	unbekannte Funktion
49	-	
52	<i>SAN1</i>	Ubiquitin-Ligase
53	<i>YGR169C-A</i>	unbekannte Funktion
54	-	
55	<i>NOPI3</i>	unbekannte Funktion
57	<i>LSB6</i>	Phosphatidylinositol-4-Kinase
58	<i>TWF1</i>	Actin-organisierendes Protein
59	<i>SRP101</i>	unbekannte Funktion
60	<i>BUD22</i>	Auswahl des Knospungsortes
61	-	
62	<i>POP8</i>	RNase-Untereinheit
66	<i>ATP6</i>	mitochondriale ATP-F-Synthase
68	<i>MRPL39</i>	mitochondriales ribosomales Protein
70	<i>YML079W</i>	unbekannte Funktion
72	<i>TRR2</i>	mitochondriale Thioredoxin-Reduktase
73	<i>CTF4</i>	Chromatin-assoziiertes Protein
75	<i>PDII</i>	Protein-Disulfid-Isomerase
76	<i>YPR115W</i>	unbekannte Funktion
77	<i>MET3</i>	ATP-Sulfurylase
78	-	
79	<i>ACO1</i>	Aconitase
80	<i>ADH1</i>	Alkoholdehydrogenase
81	<i>SEC53</i>	Phosphomannomutase
82	<i>MES1</i>	Methionyl-tRNA-Synthase
83	<i>YIH1</i>	Inhibitor der Gcn2-Aktivierung
85	-	

Klon	Gen	Beschreibung
86	<i>CDC60</i>	F0-ATP-Synthase-Untereinheit 9
87	-	
88	<i>CHS5</i>	Komponente des Exomerkomplexes
89	<i>YCR083W</i>	mitochondriales Thioredoxin
90	<i>TEA1</i>	Ty1-Aktivator
91	-	
92	<i>ATG8</i>	Autophagie
93	<i>SRB5</i>	Untereinheit des RNAPolymerase II Komplexes
96	<i>RAD18</i>	Postreplikationsreparatur
97	-	
98	<i>SDO1</i>	involviert in 60S Ribosom Reifung
99	-	
100	<i>YAK1</i>	Serin-Threonin-Kinase
101	<i>BNA4</i>	Kynurenin-3-Monooxygenase
102	<i>RSC8</i>	Chromatin-Remodellierung
105	-	
108	-	
109	<i>CHS5</i>	Komponente des Exomerkomplexes
110	<i>WRS1</i>	cytoplasmatische t-RNA-Synthetase
111	-	
112	-	
113	-	
114	<i>TRK2</i>	Kalium-Transport-System
116	<i>YAT2</i>	Carnitin-Acetyltransferase
120	<i>CYC8</i>	allgemeiner Transkriptionsrepressor
123	<i>DDR48</i>	exprimiert im Zuge von DNA-Schädigungen
124	<i>APQ12</i>	nukleoplasmatischer mRNA-Transport
126	<i>HPC2</i>	basisches Protein
127	<i>MDM1</i>	mitochondriales Innermembranprotein
129	<i>DDR48</i>	exprimiert im Zuge von DNA-Schädigungen
131	<i>DDR48</i>	exprimiert im Zuge von DNA-Schädigungen
132	<i>DDR48</i>	exprimiert im Zuge von DNA-Schädigungen
136	<i>YGL049C</i>	Translationsinitiationsfaktor eIF4G

Tabelle 4.4.A: Liste der im Split-Ubiquitin-Screen identifizierten potentiellen Interaktoren von Rdi1. Neben Klonnummern und Namen der identifizierten Gene wurden anhand der Datenbankeinträge auf [www.yeastgenome.org](http://www.yeastgenome.org) Beschreibungen der Genfunktionen in die Liste eingefügt. Klone ohne Beschreibung hatte die falsche Orientierung und waren somit falsch-positiv.

Einige Gene, wie *DDR48* und *ADH1*, wurden mehrmals im Screen identifiziert. Die Gene, welche in Zellpolaritätsprozessen eine Rolle spielen, waren jedoch interessanter. Die Klone 29, 30 und 40 codierten jeweils für *SEC6*. Das Sec6 Protein ist Teil des Exocystkomplexes, welcher die Anheftung von sekretorischen Vesikeln an die Plasmamembran vermittelt (Brennwald und Rossi, 2007). Die beiden Exocystkomponenten Exo70 und Sec3 interagieren

interessanterweise direkt mit Rho1 und Cdc42 (Guo et al., 2001; Zhang et al., 2001). Auffällig ist, dass alle Klone nur für einen Bereich im C-terminalen Abschnitt der identifizierten Sequenz codierten (Aminosäuren 427 bis 806). Die Domäne von Sec6, welche mit Rdi1 interagiert, lässt sich somit eingrenzen.

#### 4.4.3 Analyse der Interaktion von Rdi1 mit Sec6

##### 4.4.3.1 Die Interaktion von Rdi1 mit Sec6 im Split-Ubiquitin-System

Es sollte untersucht werden, ob Rdi1 auch mit dem Sec6-Gesamtprotein interagiert. Dazu wurde die gesamte codierende Sequenz und das in dem Screen erhaltene *SEC6*-Fragment in einen Vektor ligiert, der auch für die Erstellung der Split-Ubiquitin Bibliothek verwendet wurde. Er codiert für die N-terminale Hälfte von Ubiquitin (Nub) und zusätzlich für einen 3HA-Marker, der dem Nub-Fragment angeschlossen war. Die Expression des Fusionsproteins stand unter der Kontrolle des konstitutiv aktiven Promotors der Alkoholdehydrogenase. Eine Überprüfung der korrekten Insertion der Sequenz und dessen Expression als Protein ließ sich somit einfach im  $\alpha$ -HA Western-Blot verfolgen. Zusätzlich zu den *SEC6* Konstrukten wurde die Expression des Kontrollproteins Ubc6 überprüft (Abbildung 4.4.4 A).

Es konnte die starke Expression aller drei Nub-3HA-Fusionsproteine im Western-Blot detektiert werden. Das Ubc6-Protein hatte eine Größe von etwa 36 kDa und die Sec6-Proteine von etwa 45 und 100 kDa. Das apparente Molekulargewicht der exprimierten Fusionsproteine stimmte in etwa mit den errechneten Werten überein. Zur Analyse der Interaktion von Rdi1 mit Sec6 und dem Sec6-Fragment wurden Zellen, die verschiedene Köderkonstrukte enthielten (Fusion von *RDII*, *STE20* und *STE14* mit *CUB-RURA3*), mit verschiedenen Nub-Konstrukten transformiert. Die Interaktion von Ste20 mit Bem1 sollte dabei als Positivkontrolle dienen. Die Negativkontrollen stellten die Zellen dar, die das Cub-Ste14 und Cub-Ste20 sowie das Nub-Ubc6 Konstrukt enthielten (Abbildung 4.4.4 B).

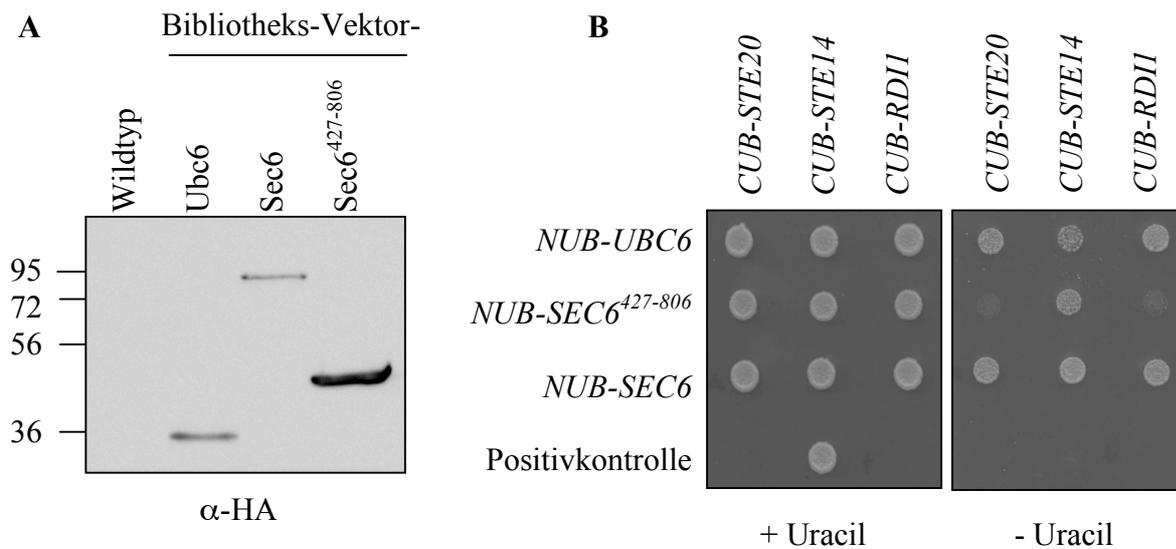


Abbildung 4.4.4: Expression von Nub-3HA-Fusionsproteinen und die Interaktion von Cub-Rdi1 mit Nub-3HA-Sec6-Fragment im Split-Ubiquitin-System. (A) Die Nub-3HA-Fusionsproteine wurden stark und mit dem erwarteten Molekulargewicht von etwa 36, 45 und 100 kDa exprimiert. (B) Die Analyse des Wachstums von Doppeltransformatanten, die unterschiedliche Kombination der Nub- und Cub-Plasmide enthielten zeigte, dass Rdi1 und unerwarteter Weise auch Ste20 ausschließlich mit dem Sec6-Fragment interagierten. Die Positivkontrolle stellte eine Interaktion von Ste20 mit Bem1 dar.

Das Wachstum der Zellen wurde auf Platten analysiert, die im Falle der Kontrolle Uracil und im Falle der Selektionsplatten kein Uracil enthielten. Bei einer positiven Interaktion wurde kein Wachstum erwartet, da unter diesen Umständen der Rura3-Reporter von Ubiquitin-spezifischen Proteasen, die das aus den beiden einzelnen Hälfte rekonstituierte Ubiquitin erkannten, abgespalten wurde. Es wurde deutlich, dass Rdi1 ausschließlich mit dem Sec6-Fragment im Split-Ubiquitin System interagiert (Abbildung 4.4.4 B). Auch die Positivkontrolle konnte aufgrund der Interaktion nicht wachsen. Interessanterweise interagiert in diesem Versuchsansatz Ste20 mit dem Sec6-Fragment. Der Grund für diese Wechselwirkung blieb unklar. Die nicht vorhandene Interaktion von Rdi1 mit dem kompletten Sec6 konnte auf sterische Probleme zurückgeführt werden.

#### 4.4.3.2 Wechselwirkungen von Rdi1 mit anderen Komponenten des Exocystkomplexes

In weiteren Split-Ubiquitin-Versuchen sollte geklärt werden, ob Rdi1 mit den anderen Komponenten des Exocystkomplexes Wechselwirkungen zeigte. Dafür wurden die

codierenden Sequenzen von *SEC3*, *SEC5*, *SEC8*, *SEC10*, *SEC15*, *EXO70* und *EXO84* in den Bibliotheks-Vektor ligiert. Nachdem die Expression der Nub-3HA-Fusionsproteine im  $\alpha$ -HA Western-Blot nach der TCA-Fällung überprüft wurde (Daten nicht gezeigt), wurde wie zuvor unter 4.4.3.1 vorgegangen.

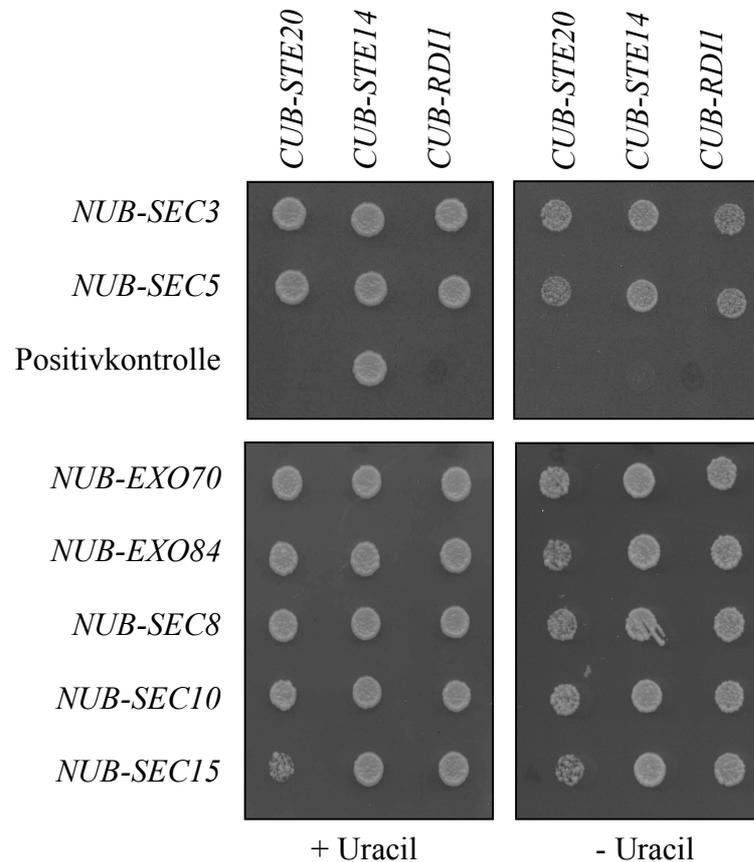


Abbildung 4.4.5: Überprüfung der Wechselwirkungen von Rdi1 mit den anderen Komponenten des Exocystkomplexes im Split-Ubiquitin-System. Im gleichen Versuchsansatz wie unter 4.4.4 B wurden die Fähigkeit der Interaktion von Rdi1 mit den anderen Komponenten des Exocystkomplexes getestet. Es konnte keine zusätzliche Interaktion identifiziert werden. Alle Klone, bis auf die Positivkontrolle, konnten auf den Selektionsplatten wachsen. Die Positivkontrolle stellte eine Interaktion von Ste20 mit Bem1 dar.

Es wurde deutlich, dass keine der anderen sieben Exocystkomponenten mit Rdi1 interagiert (Abbildung 4.4.5). Bis auf die Positivkontrolle (Ste20 mit Bem1) wuchs kein Doppeltransformant auf den Selektionsplatten. Das Sec6-Fragment zeigte somit als einzige Komponente eine Wechselwirkung mit Rdi1.

4.4.3.3 Bindung von Rdi1 an Sec6 im *in vitro* Bindungsexperiment

Die Interaktion von Rdi1 mit dem Sec6-Fragment sollte mit Hilfe eines *in vitro* Bindungsexperiments auf einem anderen Weg bestätigt werden.

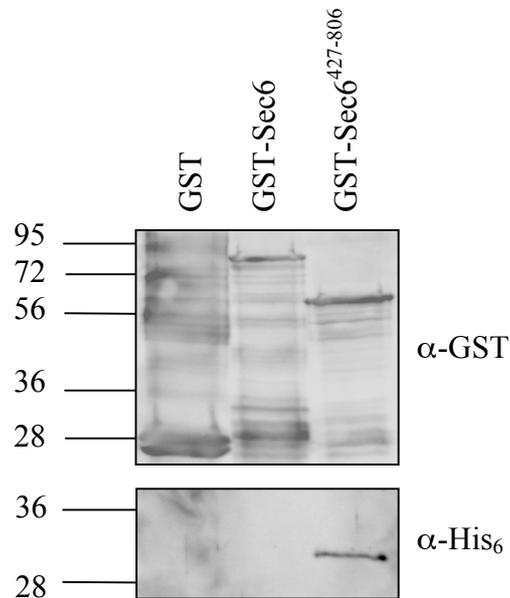


Abbildung 4.4.6: Bestätigung der Rdi1 Interaktion mit dem Sec6-Fragment durch ein *in vitro* Bindungsexperiment. Die angegebenen rekombinanten GST-Fusionsproteine wurden, gebunden an Glutathionsepharose, mit rekombinantem His<sub>6</sub>-Rdi1 inkubiert. Nach dem mehrmaligen Waschen der Sepharose und der Analyse der gebundenen Proteine im Western-Blot ( $\alpha$ -His<sub>6</sub> und  $\alpha$ -GST) zeigte sich, dass das GST-Sec6-Fragment *in vitro* mit His<sub>6</sub>-Rdi1 interagiert.

Zur Durchführung des Experimentes mussten zunächst eine Reihe von GST-Fusionsproteinen rekombinant in *E. coli* hergestellt werden. Neben GST allein wurden das Sec6-Fragment und das komplette Sec6 als Fusionsprotein exprimiert und durch Bindung an eine Glutathionbindungsmatrix isoliert (Daten nicht gezeigt). Der potentielle Interaktor Rdi1 wurde zuvor bereits als His<sub>6</sub>-Fusionsprotein aufgereinigt (siehe 4.2.3, Abbildung 4.2.7). Das eluierte His<sub>6</sub>-Rdi1 (etwa 1  $\mu$ g pro Ansatz) wurde dem Ansatz beigefügt. Die gebundenen Proteine wurden eluiert und anschließend im  $\alpha$ -His<sub>6</sub> und  $\alpha$ -GST Western-Blot analysiert.

Die Interaktion des Sec6-Fragments mit His<sub>6</sub>-Rdi1 konnte in diesem Versuch dargestellt werden (Abbildung 4.4.6). Wurde die Western-Blot Membran mit einem ( $\alpha$ -His<sub>6</sub> Antikörper entwickelt, so konnte eine starke His<sub>6</sub>-Rdi1 Bande in der Spur, die mit dem GST-Sec6-

Fusionsprotein beladen war, detektieren. Unerwarteterweise konnte für das komplette GST-Sec6 Protein keine Interaktion mit His<sub>6</sub>-Rdi1 festgestellt werden.

#### 4.4.3.4 Funktionelle Analyse der Rdi1-Sec6 Interaktion

Um die Interaktion von Rdi1 mit dem Sec6-Fragment mit einer physiologischen Funktion verknüpfen zu können, wurden einige funktionale Assays durchgeführt. Es galt zu klären, ob Sec6, wie etwa Cla4, einen Einfluss auf die cytosolischen und membrangebundenen Proteinmengen von Cdc42 und Rho1 hatte.

Dazu wurden zunächst Membranextraktionsexperimente durchgeführt, in denen die Proteinmengen von 3HA-Cdc42 und 3HA-Rho1 an den Membranen und im Cytosol nach *SEC6*-Überexpression analysiert wurden. Das Experiment erfolgte wie zuvor. Die Proteinmengen von 3HA-Cdc42 und 3HA-Rho1 blieben nach etwa dreistündiger Überexpression von *SEC6* in allen Fraktionen konstant (Abbildung 4.4.7).

In einem anderen Experiment wurde außerdem die Verteilung von Rho1 und Cdc42 analysiert, wenn Sec6 inaktiviert ist. Da eine Deletion von *SEC6* aufgrund des essentiellen Charakters nicht möglich war, wurde eine temperatursensitive Mutante hergestellt. Bei der restriktiven Temperatur von 37°C war Sec6 dann reversibel inaktiviert. Die Mutation von Leucin 633 zu Prolin wurde mit Hilfe einer rekombinanten Fusions-PCR und eines integrativen Plasmids in das Genom der Zellen eingeführt und wurde zuvor von Lamping et al., 2005 beschrieben (*sec6-4 ts*). Nach der Integration wurden die Zellen mit  $\Delta sec6$  Deletionskassetten transformiert und zunächst bei 23°C selektiert. Positive Klone mussten danach ein weiteres Mal selektiert werden, da nicht klar war, ob das Wildtyp *SEC6* Gen oder die *sec6-4* Mutante deletiert wurde. Dazu wurden die Zellen in einer Verdünnungsreihe auf Platten getropft, die bei 23, 30, 33 und 37°C inkubiert wurden. Die Zellen, die bei 33 und 37°C nicht wuchsen, enthielten die *sec6-4 ts* Mutante und besaßen eine Deletion im Wildtyp *SEC6*.

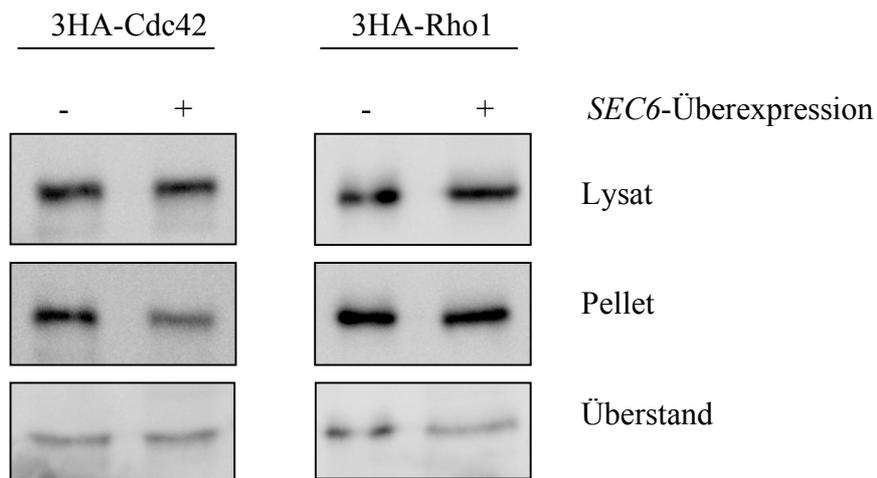


Abbildung 4.4.7: Einfluss der *SEC6*-Überexpression auf cytosolische und membrangebundene 3HA-Cdc42 und 3HA-Rho1 Proteinmengen. Die Überexpression von *SEC6* für etwa 3 Stunden hatten keinen Einfluss auf die cytosolischen und membrangebundenen 3HA-Cdc42 und 3HA-Rho1 Proteinmengen. Der Western-Blot wurde  $\alpha$ -HA entwickelt.

In dem Membranextraktionsexperiment mit der temperatursensitiven Mutante wurden die Zellen synchron zur Überexpression von *RDII* für zwei Stunden von der permissiven Temperatur von 23°C auf die restriktive Temperatur von 37°C versetzt, um so Sec6 zu inaktivieren.

Die Fähigkeit von Rdi1, Cdc42 und Rho1 von Membranen abzuziehen, änderte sich mit der Inaktivierung von *SEC6* nicht (Abbildung 4.4.8). Bei Induktion der Überexpression von *RDII* und gleichzeitiger temperaturbedingter Inaktivierung von *SEC6* änderten sich die Proteinmengen beider Rho GTPasen in Cytosol und an den Membranen im gleichen Maße wie in den Kontrollzellen. Es konnte kein Einfluss von Sec6 auf diesen Vorgang bestimmt werden. Auch die Lokalisation von GFP-Rdi1 (siehe 4.1.2.2) wurde trotz der Inaktivierung von *SEC6* nicht verändert (Daten nicht gezeigt). Die physiologische Rolle der Sec6-Rdi1 Interaktion blieb daher ungeklärt.

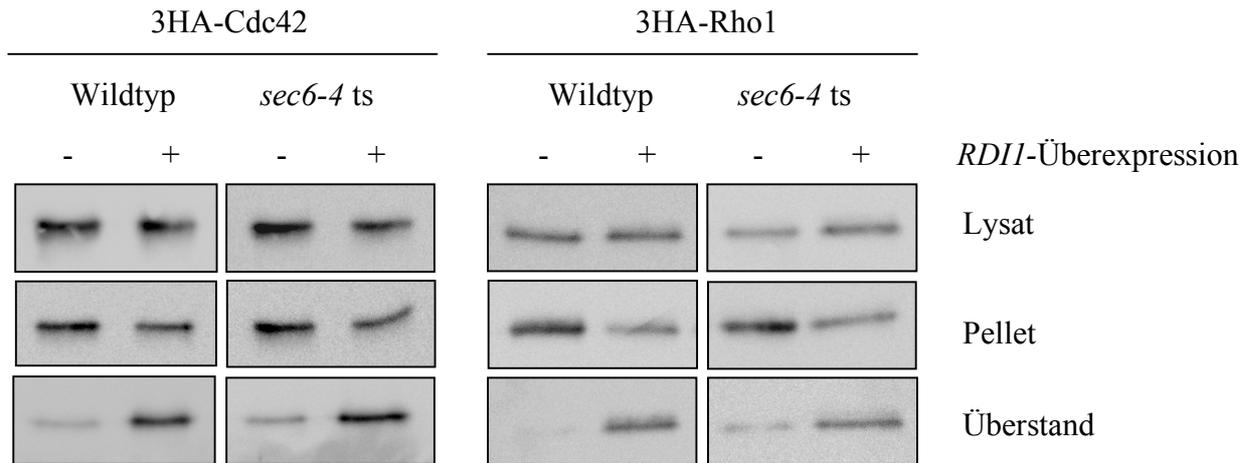


Abbildung 4.4.8: Einfluss der temperaturinduzierten *SEC6*-Inaktivierung auf die Rdi1-induzierte Extraktion von 3HA-Cdc42 und 3HA-Rho1 von Membranen. Die Zellen wurden bei der permissiven Temperatur von 23°C angezogen und synchron zu der zweistündigen *RDII*-Überexpression bei der restriktiven Temperatur von 37°C inkubiert. Es zeigte sich, dass die temperaturinduzierte Inaktivierung von *SEC6* keinen Einfluss auf die Fähigkeit von Rdi1 bezüglich der Extraktion von 3HA-Cdc42 und 3HA-Rho1 hatte.

#### 4.4.3.5 Analyse der Sekretion während *RDII*-Überexpression und im *RDII*-Deletionsstamm

Der Einfluss von *SEC6* auf Prozesse der Exocytose als Komponente des Exocystkomplexes wurde bereits vor längerer Zeit beschrieben (Potenza et al., 1992). Es stellte sich daher die Frage, ob Rdi1 aufgrund seiner Interaktion mit Sec6 einen Einfluss auf Vorgänge der Exocytose hatte. Dafür wurde ein experimentelles System etabliert, welches die Beobachtung der Akkumulation von sekretorischen Vesikeln ermöglichte (Adamo et al., 1999). Das periplasmatische Protein Bgl2, welches in sekretorischen Vesikeln zur Plasmamembran transportiert wird, wurde zunächst 3HA-markiert und konnte so nach der Auftrennung von periplasmatischen und cytosolischen Fraktionen detektiert werden. Eine Akkumulation von Bgl2-3HA in der inneren cytosolischen Fraktion indizierte einen sekretorischen Defekt, welcher auf eine Fehlfunktion des Exocystkomplexes zurückzuführen war. Der Exocystkomplex vermittelt in diesem Prozess die Anheftung sekretorischer Vesikel an die Plasmamembran (TerBush et al., 1996). Zunächst wurde die Situation im Wildtyp mit der Situation in Zellen, welche das temperatursensitive Allel *sec6-4* von *SEC6* trugen, miteinander verglichen. Es wurden die Bgl2-3HA Proteinmengen bei der permissiven Temperatur von 23°C und nach dem Shift der Zellen auf die restriktive Temperatur von 37°C für zwei Stunden betrachtet. Bei 37°C wurde *sec6-4* inaktiviert.

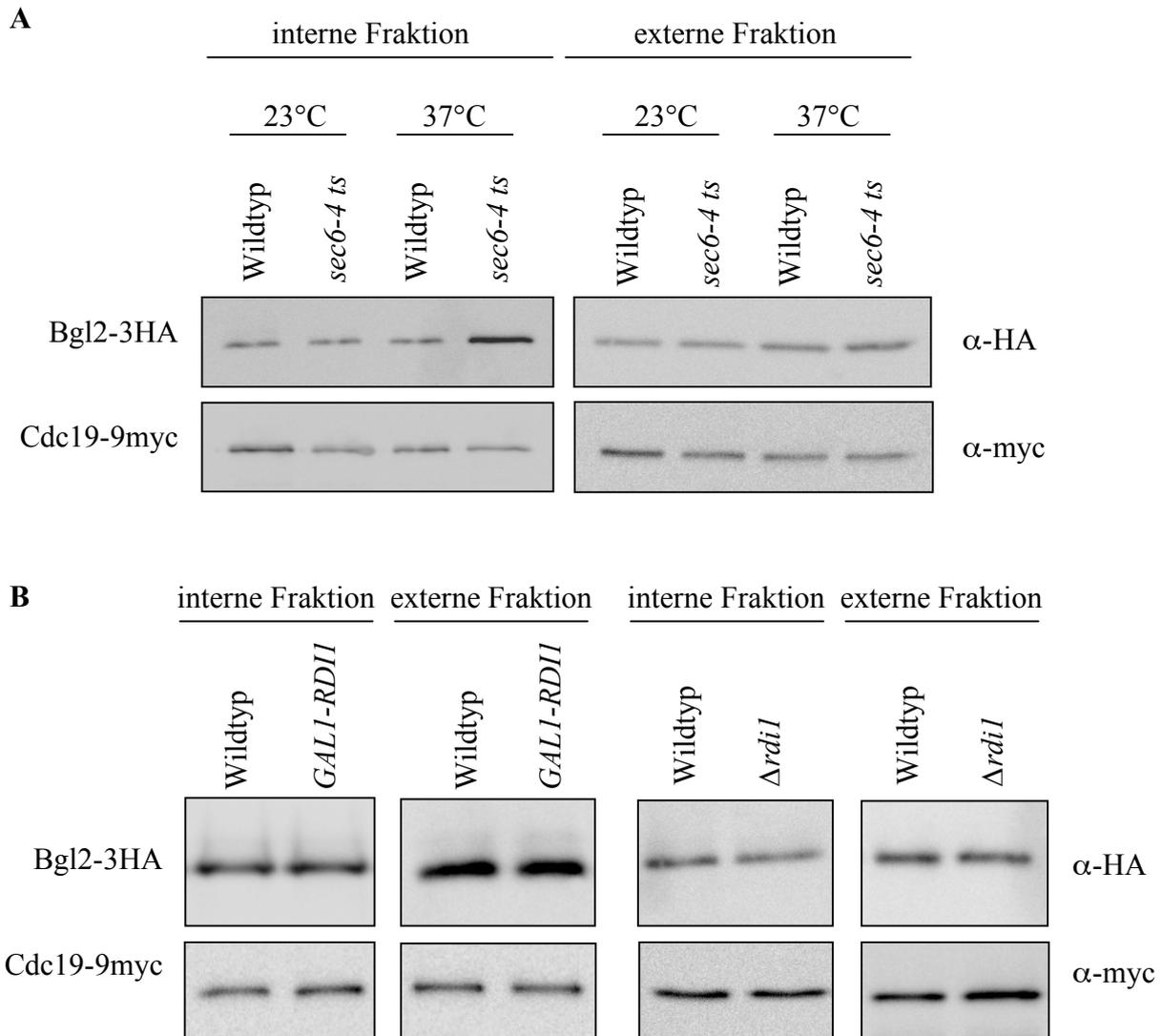


Abbildung 4.4.9: Analyse möglicher Sekretionsdefekte in Zellen, in denen entweder *RDII* überexprimiert oder deletiert wurde. (A) Im Wildtyp und in Zellen, welche die temperatursensitive *sec6-4* Variante enthielten, wurden die internen und externen Bgl2-3HA Proteinmengen bei 23°C und nach einem zweistündigen Shift der Zellen auf die restriktive Temperatur von 37°C betrachtet. In der *sec6-4* Mutante akkumulierte bei 37°C Bgl2-3HA in der inneren Fraktion. (B) Die Überexpression und Deletion von *RDII* hatte keinen Einfluss auf die Sekretion. Cdc19-9myc diente als interne Ladekontrolle.

Es stellte sich heraus, dass die Änderung der Temperatur auf 37°C in den *sec6-4* Zellen eine Akkumulation der Bgl2-3HA Proteinmengen in der cytosolischen Fraktion bewirkte (Abbildung 4.4.9 A). Anschließend sollte bestimmt werden, ob die Überexpression oder Deletion von *RDII* einen ähnlichen Effekt auf die Sekretion hatte. Die Analyse der Fraktionen ergab, dass sowohl die Überexpression als auch die Deletion von *RDII* in diesem System keinen Einfluss auf die Sekretion hatte (Abbildung 4.4.9 B). In allen Fraktionen konnten konstante Mengen Bgl2-3HA detektiert werden.

#### 4.5 Die Interaktion von Ste20 mit Komponenten des Ergosterolsynthesewegs

In der Arbeitsgruppe wurde vor Beginn der Arbeit ein Split-Ubiquitin-Screen mit dem Cdc42-Effektor Ste20 durchgeführt. Dabei wurde eine Vielzahl von neuen Interaktoren identifiziert. Am interessantesten erschienen eine Reihe von Proteinen, die allesamt an Prozessen der Ergosterolsynthese beteiligt waren, da der Zusammenhang von Zellpolarität und Sterolsynthese zuvor völlig unbekannt war. Ziel war es, die Interaktionen von Ste20 mit den drei Proteinen Cbr1, Ncp1 und Erg4 in *in vitro* oder *in vivo* Bindungsexperimenten zu bestätigen.

Zunächst wurde damit begonnen, Co-Immunpräzipitationsexperimente mit den getaggen Proteinen *in vivo* durchzuführen. Schnell wurde klar, dass ein solches Experiment für keinen der drei potentiellen Interaktoren von Ste20 möglich war, da diese Proteine sich dadurch auszeichneten, unspezifisch an die Antikörper, mit denen präzipitiert wurde, oder an die Sepharosematrix zu binden. Auch ein reines *in vitro* Bindungsexperiment war nicht einfach möglich, da die potentiellen Interaktoren einen sehr hydrophoben Charakter besaßen (Saccharomyces Genome Database) und sich daher nicht einfach rekombinant herstellen ließen.

##### 4.5.1 Die Interaktion von Ste20 mit Cbr1 und Ncp1

Wegen der oben aufgeführten Gründe wurde versucht, die Interaktionen in einem anderen Bindungsexperiment darzustellen. Die Kinase Ste20 wurde als GST-Fusionsprotein rekombinant hergestellt und aufgereinigt (Abbildung 4.5.1 A). Es zeigte sich, dass GST-Ste20 sich für ein Protein dieser Größe (insgesamt etwa 125 kDa) relativ gut aufreinigen ließ, aber auch schnell abgebaut wurde. Dies war vor allem der Fall als versucht wurde, das Protein von der Sepharose zu eluieren (Daten nicht gezeigt).

Danach wurde getestet, ob Cdc42 aus einem Hefelysat an das rekombinante GST-Ste20 binden kann, um Rückschlüsse über die Spezifität des rekombinanten Proteins ziehen zu können. Es zeigte sich, dass Cdc42 aus *S. cerevisiae* selektiv an GST-Ste20 binden konnte (Abbildung 4.5.1 B). Dies bedeutete, dass das aufgereinigte Protein für weitere Bindungsversuche eingesetzt werden konnte. In einem vergleichbaren Experiment wurde das GST-Fusionsprotein mit einem Lysat inkubiert, welches überexprimiertes 3HA-Cbr1 enthielt. Es konnte eine Bindung von 3HA-Cbr1 an GST-Ste20 detektiert werden (Abbildung 4.5.1 C).

Auch für 3HA-Ncp1 wurde dieses Experiment durchgeführt. Es konnte jedoch keine Wechselwirkung festgestellt werden.

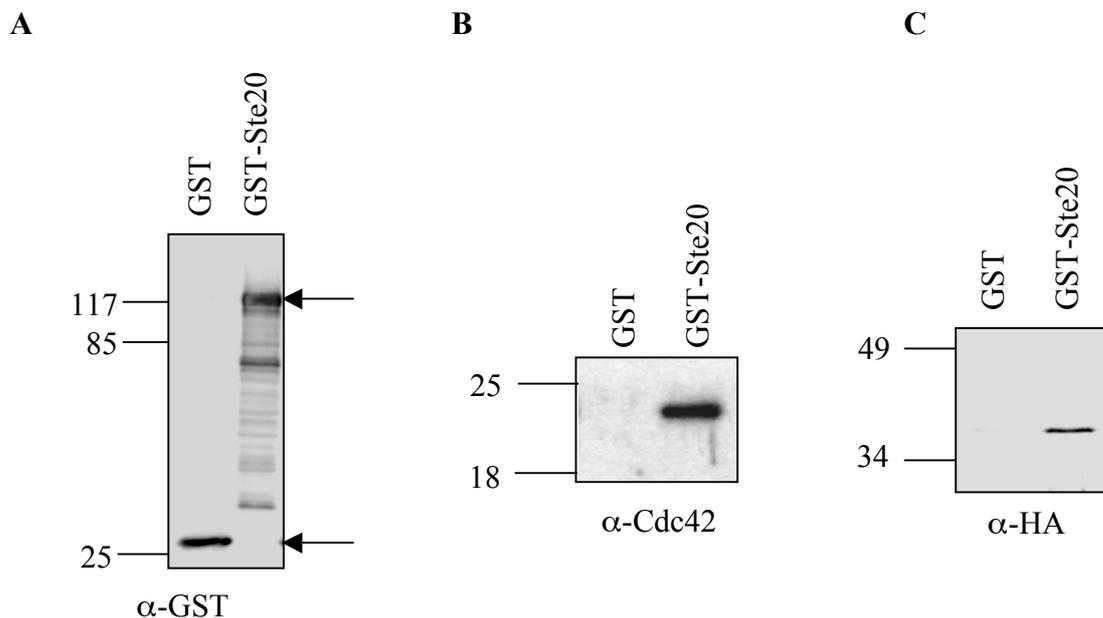


Abbildung 4.5.1: Bindung von Cdc42 und 3HA-Cbr1 aus *S. cerevisiae* an rekombinant hergestelltes GST-Ste20. (A) GST (etwa 25 kDa) und GST-Ste20 (etwa 120 kDa) wurden rekombinant in *E. coli* exprimiert und mit einer Glutathionsepharosematrix gebunden und aufgereinigt. Die Abbildung zeigt die Detektion beider Proteine, die durch einen Pfeil gekennzeichnet sind, in einem  $\alpha$ -GST Western-Blot. (B) GST-Ste20 konnte Cdc42 aus Hefe binden (Positivkontrolle). Die aufgereinigten Proteine aus (A) wurden in einem Bindungsexperiment mit einem Hefelysat inkubiert und die gebundenen Proteine im Anschluss im  $\alpha$ -Cdc42 Western-Blot detektiert. (C) GST-Ste20 bindet 3HA-Cbr1. Wie in (B) wurden die Proteine aus (A) mit einem Hefelysat inkubiert, in dem allerdings 3HA-Cbr1 überexprimiert vorlag. Der Western-Blot wurde  $\alpha$ -HA entwickelt.

#### 4.5.2 Die Interaktion von Ste20 mit Erg4

Das gleiche Experiment wie unter 4.5.1 sollte auch zur Bestimmung der Ste20-Erg4 Interaktion durchgeführt werden. Mit einem neu hergestellten Stamm ließen sich große Mengen Erg4 in Hefe exprimieren. Um eine eventuelle Bindung von Erg4-9myc an GST-Ste20 darzustellen, wurde wie unter 4.5.1 vorgegangen. Ein Hefelysat, das überexprimiertes Erg4-9myc enthielt, wurde zusammen mit GST und GST-Ste20, welche rekombinant hergestellt wurden und an die Sepharosematrix gebunden waren, inkubiert. Nach Waschen der Proben wurden die noch gebundenen Proteine eluiert und im  $\alpha$ -myc Western-Blot

analysiert. In diesem Bindungsexperiment konnte die Wechselwirkung von GST-Ste20 mit Erg4-9myc bestätigt werden (Abbildung 4.5.2).

Somit ließ sich zusammenfassen, dass das rekombinant hergestellte GST-Ste20 *in vitro* mit 3HA-Cbr und Erg4-9myc interagiert. Eine Wechselwirkung von GST-Ste20 mit 3HA-Ncp1 konnte nicht detektiert werden.

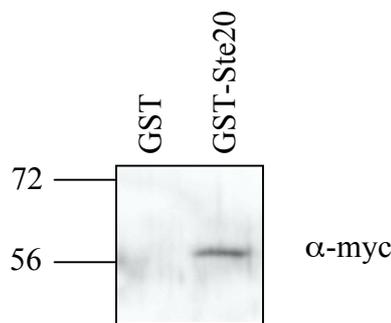


Abbildung 4.5.2: GST-Ste20 bindet Erg4-9myc. Das zuvor rekombinant hergestellte GST-Ste20 wurde mit einem Hefelysat inkubiert, welches überexprimiertes Erg4-9myc enthielt. Nach der Inkubation wurde die Bindungsmatrix gewaschen und die gebundenen Proteine im  $\alpha$ -myc Western-Blot detektiert.

#### 4.5.3 Phosphorylierung von Cbr1, Ncp1 und Erg4 durch Ste20 im Kinase-Assay

Die Interaktionsstudien, darunter die *in vitro* Bindungen und die Split-Ubiquitin-Wechselwirkungen, zeigten, dass Ste20 zumindest mit Cbr1 und Erg4 interagiert. Aufgrund der Tatsache, dass Ste20 eine Kinase war, stellte sich die Frage, ob die Interaktoren Substrate dieser Kinase waren und somit phosphoryliert werden konnten. Diese Hypothese wurde auch durch eine Arbeit unterstützt, die eine Kinaseaktivität von Ste20 gegenüber dem Are2 Protein beschrieb, welches an der Veresterung von Sterolen beteiligt ist (Ptacek et al., 2005).

Zur Durchführung wurden zunächst Plasmide hergestellt, die es erlaubten, Wildtyp Ste20 und das Kinase-inaktive Ste20<sup>K649A</sup> in Fusion mit einem GST-Marker in Hefe überzuexprimieren. Zusätzlich wurden die potentiellen Substrate Cbr1 und Ncp1 rekombinant in *E. coli* exprimiert und aufgereinigt. Beide Proteine wurden als GST-Fusionsproteine exprimiert. Die Aufreinigung der Proteine erfolgte relativ problemlos, so dass sich ausreichende Mengen der Proteine von der Bindungsmatrix eluieren ließen (Abbildung 4.5.3 A). Die Aufreinigung eines rekombinanten Erg4 Proteins ließ sich möglicherweise aufgrund der Hydrophobizität in *E. coli* nicht bewerkstelligen.

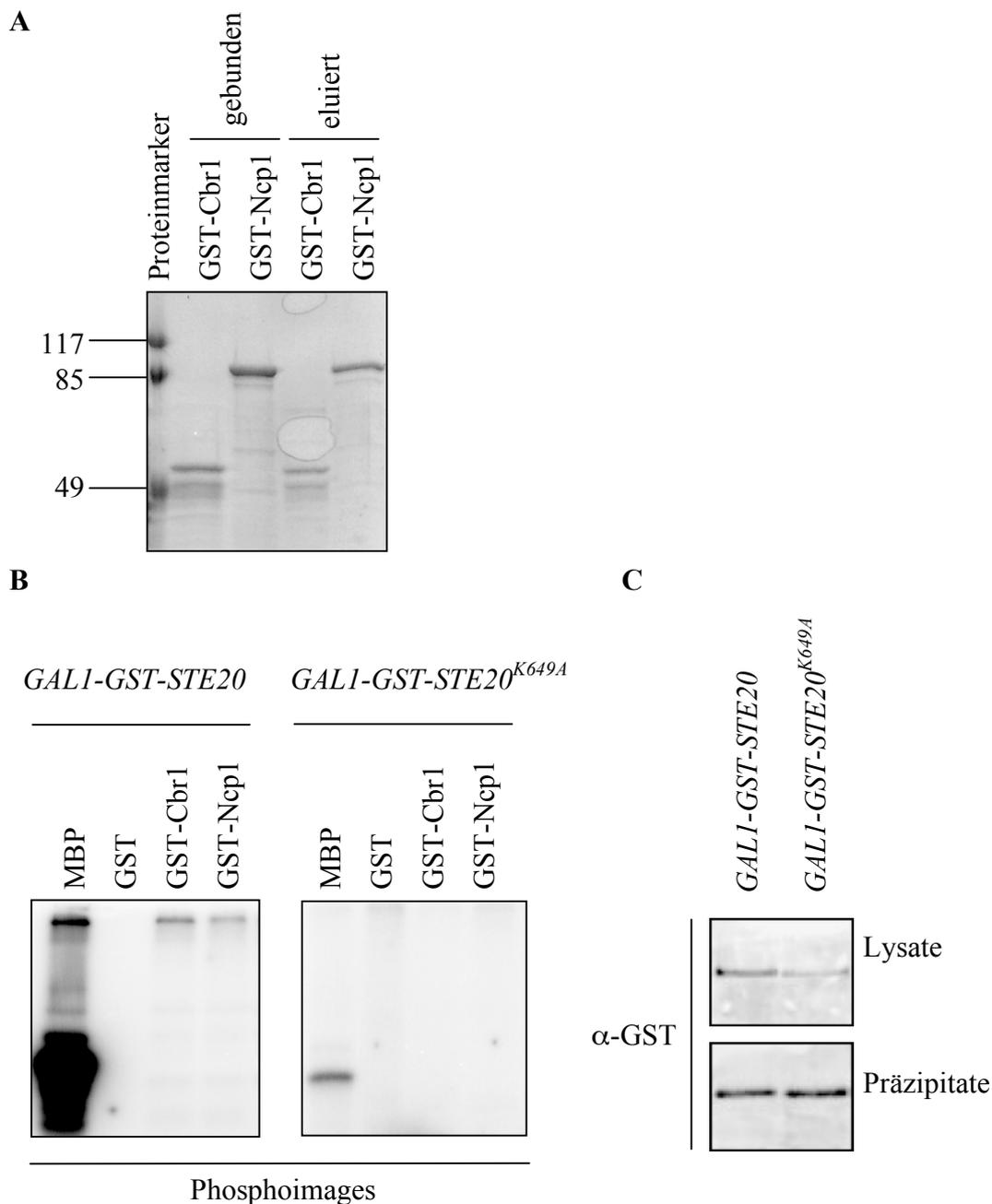


Abbildung 4.5.3: Ste20 Kinase-Assay mit GST-Cbr1 und GST-Ncp1 als Kinase-Substrate. (A) Die GST-Fusionsproteine GST-Cbr1 und GST-Ncp1 wurden in *E. coli* exprimiert und an eine Glutathionbindungsmatrix gebunden und aufgereinigt. Nach der Aufreinigung wurden die gebundenen Proteine mit Glutathion von der Matrix eluiert und als Substrate für Ste20 im Kinase-Assay eingesetzt. (B) Ste20 Kinase-Assay mit GST, GST-Cbr1, GST-Ncp1 und MBP als Substrate. (C) Präzipitation von GST-Ste20 und GST-Ste20<sup>K649A</sup> aus *S. cerevisiae*. Die Wildtyp-Kinase und die Kinase-inaktive Ste20<sup>K649A</sup> Form wurden in Hefe überexprimiert, an eine Glutathion-Sepharosematrix gebunden und aufgereinigt und konnten dann direkt im Kinase-Assay eingesetzt werden.

Die eluierten Proteine konnten somit für einen Ste20 Kinase-Assay als Substrat eingesetzt werden. Wildtyp Ste20 und die Kinase-inaktive Variante wurden aus Hefekulturen nach Überexpression isoliert, indem sie an Glutathionsepharose gebunden wurden (Abbildung 4.5.3 C). Beide Kinasen wurde gleichmäßig exprimiert und haben gut an die Sepharose gebunden. Neben den beiden potentiellen Substraten GST-Cbr1 und GST-Ncp1 wurden zur Kontrolle GST allein als Negativkontrolle und das ubiquitäre Kinase-Substrat MBP als Positivkontrolle eingesetzt. Die Durchführung des Kinase-Assays richtete sich nach dem Protokoll aus Abschnitt 3.3.10.

Die Analyse zeigte, dass Ste20 eine starke Aktivität gegenüber MBP besaß und bei allen Substraten, außer bei der Negativkontrolle, selbst phosphoryliert vorlag. Auch bei längerer Exposition der Platte wurden die potentiellen Substrate Cbr1 und Ncp1 nicht phosphoryliert (Abbildung 4.5.3 B). Die Analyse der Aktivität der Kinase-inaktiven Variante von Ste20 zeigte, dass man bei gleicher Expositionsdauer wie beim Wildtyp eine vernachlässigbare Aktivität gegenüber MBP detektieren konnte. Eine Selbstaktivierung fand bei keinem der Substrate statt. Dies indizierte eine tatsächliche Inaktivierung der Mutante durch den Aminosäureaustausch an Position 649. Ein Kinase-Assay, bei dem Erg4-9myc ebenfalls aus einem Hefelysat präzipitiert wurde, und dann mit dem aus Hefe präzipitierten Ste20 inkubiert wurde, brachte ebenfalls keine Phosphorylierung durch Ste20 hervor (Daten nicht gezeigt).

Es konnte somit zusammengefasst werden, dass Ste20 zwar mit Cbr1 und auch Erg4 interagiert, aber weder Cbr1 und Ncp1 noch Erg4 im *in vitro* Kinase-Assay von dieser Kinase phosphoryliert wurden.

## 5. Diskussion

### 5.1 Die Interaktion von Rdi1 mit Rho GTPasen

#### 5.1.1 Die Spezifität von Rdi1 gegenüber den sechs Rho GTPasen

Rho GTPasen besitzen in Eukaryoten eine herausragende Rolle bei der Etablierung und Aufrechterhaltung der Zellpolarität. Rho Proteine können von Rho GDIs reguliert werden. GDIs sind in der Lage den hydrophoben Membrananker der Rho GTPasen zu binden und können diese somit von Membranen extrahieren. So sind sie vor einer Aktivierung geschützt und können zu einer anderen Membrandomäne rekrutiert werden (Jaffe und Hall, 2005; Park und Bi, 2007). Im Rahmen dieser Arbeit sollte Rdi1, der einzige bekannte Rho GDI in *S. cerevisiae*, bezüglich seiner Interaktionen mit Rho GTPasen und der Regulation dieser Prozesse charakterisiert werden.

Zunächst wurden die Verteilungskoeffizienten der einzelnen Rho GTPasen bestimmt. Da keine Antikörper gegen die einzelnen Rho GTPasen existieren, wurden integrative Plasmide hergestellt, die es ermöglichten 3HA-markierte Rho GTPasen unter Kontrolle ihres eigenen Promotors in *S. cerevisiae* zu exprimieren. Dann wurden die Proteinmengen nach der Auftrennung der Lysate in Cytosol und Membranfraktion durch Ultrazentrifugation bei 100.000 x g bestimmt und miteinander verglichen. Alle sechs Rho GTPasen besaßen neben einem membrangebundenen Proteinanteil auch immer einen cytosolischen Anteil. Dies wurde bereits für Cdc42 beschrieben (Ziman et al., 1993). Die Koeffizienten von Membrananteil zu Cytosolanteil variierten vom Verhältnis 6:1 bis etwa 1:1 sehr stark. Der Grund hierfür ist unklar. Dass überhaupt cytosolische Anteile von Rho Proteinen zu detektieren sind, könnte mit einem noch nicht verknüpften Membrananker an die neu synthetisierten Rho GTPasen zusammenhängen. Rho2 und Rho3 werden nicht nur, wie die anderen vier Rho GTPasen mit einem Geranylgeranylanker versehen, sondern zusätzlich palmitoyliert (Roth et al., 2006). Außerdem ist das Vorhandensein von cytosolischen Cdc42 und Rho1 auf die Assoziation mit Rdi1 zurückzuführen, welche zu einer Membranextraktion führt (Koch et al., 1997; Tcheperegine et al., 2005).

Zu Beginn der Arbeit war bekannt, dass Rdi1 mit den Rho GTPasen Cdc42 und Rho1 assoziiert (Masuda et al., 1994; Koch et al., 1997; Eitzen et al. 2001). Um die Spezifität von Rdi1 näher zu charakterisieren, wurde zunächst systematisch die mögliche Assoziation mit den sechs Rho GTPasen Cdc42 und Rho1-5 überprüft. Durch Co-

Immunpräzipitationsexperimente konnte demonstriert werden, dass neben Cdc42 und Rho1 auch Rho4 mit Rdi1 assoziieren kann. Um ausschließen zu können, dass die nicht vorhandenen Interaktionen von Rho2, Rho3 und Rho5 darauf zurückzuführen ist, dass zu wenig präzipitierte Rho GTPase vorhanden war, wurde das Experiment mit Zellen wiederholt, in denen die Rho GTPasen überexprimiert wurden. Auch hier wurde das gleiche Ergebnis erhalten, so dass man unter physiologischen Bedingungen von einer Assoziation der Rho GTPasen Rho1, Rho4 und Cdc42 mit Rdi1 ausgehen kann.

Um die Spezifität der Rdi1-Bindung auf einem anderen Wege zu bestätigen, wurden Membranextraktionsexperimente durchgeführt. Dazu wurden die cytosolischen und membrangebundenen Proteinmengen der einzelnen Rho GTPasen nach *RDII*-Überexpression analysiert. Die Ergebnisse der *in vivo* Co-Immunpräzipitationsexperimente konnten bestätigt werden. Während die Proteinmengen von Rho2, Rho3 und Rho5 sich nicht veränderten, konnte eine deutliche Zunahme der Cdc42, Rho1 und Rho4 Proteinmengen im Cytosol detektiert werden. Gleichzeitig verringerten sich ihre Mengen an den Membranen. Dies beruhte auf der Extraktion durch Rdi1. Außerdem zeigte sich, dass die Gesamtproteinmenge von Rho4 nach der *RDII*-Überexpression abnahm. Wurden vakuoläre Abbauprozesse durch die Deletion von *PEP4* ausgeschlossen (Ammerer et al., 1986), so konnte die Reduktion verhindert und die Extraktion demonstriert werden. Die Extraktion von Rho4 und Cdc42 wurde zusätzlich mikroskopisch dargestellt und im Falle von Rho4 quantifiziert. Rho4 und Cdc42 lokalisierten zunächst an Orten polaren Wachstums. Diese waren die Knospenspitze, der Knospenhals und innere Membranen wie die der Vakuolen. Nach *RDII*-Überexpression konnte fast kein polar verteiltes Rho4 und Cdc42 mehr detektiert werden.

Zuvor wurde berichtet, dass bei der Extraktion von Rho1 aus *S. cerevisiae* die Rho GTPase im GDP-gebundenen Zustand vorliegt (Koch et al., 1997). Im Gegensatz dazu konnte in einem anderen experimentellen System humanes Cdc42 im GDP- und im GTP-gebundenen Zustand gleich gut mit Rho GDI assoziieren (Nomanhboy und Cerione, 1996). In dieser Arbeit konnte durch den Einsatz von konstitutiv aktiven und inaktiven Mutanten der Rho GTPasen beobachtet werden, dass Cdc42 und Rho1 im GTP-gebundenen Zustand von Membranen extrahiert werden. Im Fall von Rho4 wurden beide Formen extrahiert. Hierbei war der Effekt jedoch nicht so ausgeprägt wie bei Rho1 und Cdc42. Die Gründe für die Abweichungen zu den zuvor publizierten Ergebnissen könnten in dem anderen methodischen Ansatz der Experimente liegen. Durch Einführung von Punktmutationen können sich die Strukturen von Proteinen ändern. Als mögliche Konsequenz daraus könnte die Interaktion mit

Rdi1 beeinträchtigt werden. Die Ergebnisse aus den Assoziations- und Extraktionsexperimenten sind in Abbildung 5.1.1 zusammengefasst.

Wie bereits erwähnt, assoziieren Rho2, Rho3 und Rho5 nicht mit Rdi1 und werden daher nicht von Membranen extrahiert. Der Grund für die mangelnde Bindung von Rho2 und Rho3 an Rdi1 könnte in der zusätzlichen Palmitoylierung der Proteine zu finden sein (Roth et al., 2006). Eine Extraktion von palmitoylierten Proteinen ist bisher nicht bekannt. Außerdem ist die Palmitoylierung im Gegensatz zur Geranylgeranylierung reversibel. In Strukturanalysen zeigte sich außerdem, dass die Switch I und II Domänen von Cdc42 für die Assoziation mit Rdi1 essentiell waren (Hoffman et al., 2000). Es kann daher vermutet werden, dass die fehlende Interaktion mit diesen Domänen für die nicht vorhandene Bindung verantwortlich sein könnte. Dies gilt besonders für Rho5, welches nicht zusätzlich palmitoyliert wird.

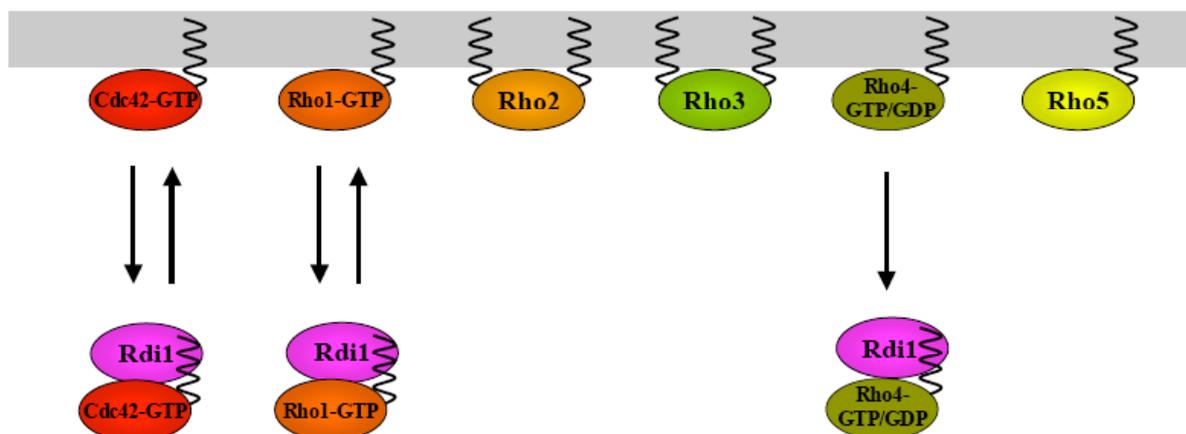


Abbildung 5.1.1: Die Spezifität von Rdi1 gegenüber den sechs Rho GTPasen in *S. cerevisiae*. Rdi1, der einzige Rho GDI in *S. cerevisiae*, ist spezifisch gegenüber den Rho GTPasen Cdc42, Rho1 und Rho4 und kann diese nicht nur binden, sondern auch von Membranen extrahieren. Cdc42 und Rho1 liegen dafür wahrscheinlich im aktiven GTP-gebundenen Zustand vor. Rho4, dessen Interaktion mit Rdi1 zuvor unbekannt war, kann vermutlich im GDP- und im GTP-gebundenen Zustand vorliegen. Die Interaktion von Rdi1 mit Rho4 scheint nicht, wie die von Rdi1 mit Cdc42 und Rho1, reversibel zu sein, sondern zum Abbau von Rho4 zu führen (siehe 5.3 und Abbildung 5.3.1). Die Rho GTPasen Rho2, Rho3 und Rho5 interagieren nicht mit Rdi1, was z.B. im Falle von Rho2 und Rho3 damit zusammenhängen könnte, dass diese Rho GTPasen zusätzlich palmitoyliert sind.

### 5.1.2 Funktionen von Rdi1

Neben der Spezifität von Rdi1 gegenüber den Rho GTPasen interessierten auch die Funktionen von Rdi1. Hinweise auf Funktionen von Proteinen geben häufig Phänotypen, die durch Deletion oder Überexpression des entsprechenden Gens auftreten.

Über die Überexpression von *RDII* wurden verschiedene Ergebnisse berichtet. Masuda et al. (1994) beschrieben, dass die starke Überexpression von *RDII* von einem Multicopy-Plasmid mit dem stark induzierbaren *GALI*-Promotor letal für die Zellen sei, während Tcheperegine et al. (2005) lediglich geringfügig rundere Zellen bei gleicher Wachstumsrate beschrieben. Dabei wurde *RDII* durch einen im Genom integrierten *GALI*-Promotor überexprimiert. In dieser Arbeit wuchsen die Zellen, die das Plasmid aus Masuda et al. (1994) trugen, nicht. Im Vergleich dazu wuchsen Zellen, die leicht erhöhte Rdi1 Proteinmengen enthielten, normal. Dabei wurde *RDII* zum einen von einem Multicopy-Plasmid unter Kontrolle des eigenen Promotors und zum anderen unter der Kontrolle des *GALI*-Promotors im Genom exprimiert (persönliche Mitteilung Dr. T. Höfken, Universität Kiel). Dies lässt den Schluss zu, dass die Rdi1-induzierte Letalität deutlich von den exprimierten Proteinmengen abhängig ist. In Masuda et al. (1994) wurden jedoch keine Angaben darüber gemacht welche Ursachen die Rdi1-induzierte Letalität hatte. In dieser Arbeit wurde deswegen die Aktinorganisation im Zuge der starken *RDII*-Überexpression analysiert. Diese zeigte eine außerordentliche Misorganisation auf, wenn *RDII* für mehrere Stunden überexprimiert wurde. Im direkten Zusammenhang gaben morphologische Defekte einen Hinweis darauf, dass die Zellen komplett depolarisierten. Die Zellen waren nach etwa fünfstündiger *RDII*-Überexpression ausschließlich rund und ein wenig größer. Als Ursache für die vollständige Depolarisierung der Zellen kommt die Extraktion von Rho GTPasen durch Rdi1 in Frage (siehe Abschnitt 5.2.1). Da Rho1 und Cdc42 essentiell für die Zellen sind, ist es leicht vorstellbar, dass wenn sie an den Membranen ihre physiologische Funktion nicht mehr ausüben können, die Zellen depolarisieren und dann sterben.

Für die Deletion von *RDII* in *S. cerevisiae* wurde vor dieser Arbeit kein Phänotyp beschrieben (Masuda et al., 1994; Koch et al., 1997). Bei der Analyse verschiedener polarer Prozesse, wie das haploiden invasive Wachstums und die Paarung, konnten auch hier keine Abweichungen zum Wildtyp detektiert werden. In diploiden Zellen des opportunistischen Pilzes *Candida albicans* konnte zuvor beobachtet werden, dass die  $\Delta rdi1/\Delta rdi1$  Deletion das Pseudohyphenwachstum, welches in diploiden Zellen dem invasiven Wachstum in haploiden Zellen entspricht (Palecek et al., 2002), reduziert. Zusätzlich konnte die *RDII*-Deletion die

Filamentationsdefekte aufheben, welche durch die Deletion von *CDC42* und der Cdc42 GAPs *BEM3* und *RGA2* zu Stande kamen (Court und Sudbery, 2007). In diploiden *S. cerevisiae* Zellen führte die *RDII*-Deletion ebenfalls zur Reduktion des Pseudohyphenwachstums (Tiedje et al., 2008). Eine gleichzeitige *CDC42*-Überexpression konnte diesen Effekt nicht aufheben, was darauf hindeutet, dass *RDII* die Akkumulation von Cdc42 an Orten polarisierten Wachstums lokal begrenzt und dementsprechend in  $\Delta rdi1/\Delta rdi1$  Zellen das polarisierte Wachstum verringert ist.

Ein weiterer Phänotyp für die *RDII*-Deletion konnte für den Austritt der Zellen aus der Mitose beobachtet werden. Zellen, in denen *LTE1* deletiert ist, verlassen bei 10°C nicht die Anaphase, welche für die Abschnürung der Tochterzelle notwendig ist. Die Zellen arretieren demnach mit einer großen Tochterzelle und zwei separaten Zellkernen (Bosl und Li, 2005). Die Deletion von *RDII* hob diesen Defekt auf (Tiedje et al., 2008). Dies war vergleichbar mit der Aufhebung des Effekts durch Überexpression der Cdc42-Effektoren *STE20*, *GIC1* und *GIC2*, die den Austritt aus der Mitose auf voneinander unabhängigen Wegen vorantreiben können (Höfken und Schiebel, 2002; Höfken und Schiebel, 2004). Als Resultat aus der Deletion von *RDII* ist eine leichte Aktivierung von Cdc42 vorstellbar, die dazu führt, dass Effektoren wie *Ste20* aktiviert werden und dann auf verschiedenen Wegen den Austritt der Zellen aus der Mitose vorantreiben.

Die Gründe dafür warum in  $\Delta rdi1$  Zellen nur wenige Phänotypen zu erkennen sind, können vielfältig sein. Interessanterweise bleiben die Proteinmengen von Cdc42 und Rho1 im Cytosol und an den Membranen in  $\Delta rdi1$  Zellen fast gleich (4.2.2.2; Koch et al., 1997). Dies spricht für die Anwesenheit eines unbekanntes Proteins, welches Rho GTPasen binden und regulieren kann. Die Existenz eines solchen Proteins wurde in der Vergangenheit bereits kontrovers diskutiert (Johnson, 1999). In höheren Eukaryoten wurde mit PDE $\delta$  ein Protein charakterisiert, welches ein breites Spektrum an Rho GTPasen binden kann, jedoch im Vergleich zu Rho GDIs keinen regulatorischen Arm besitzt, der mit der Switch I und II Domäne der Rho GTPasen interagieren kann. (Pechlivanis und Kuhlmann, 2006). Es könnte dennoch möglich sein, dass auch in *S. cerevisiae* ein solches Protein existiert.

## 5.2 Regulation der Interaktion von Rdi1 mit Rho1 und Cdc42 durch Cla4

### 5.2.1 Die Bindung von Rdi1 an Cdc42 und Rho1 unter dem Einfluss der p21-aktivierten Kinasen Cla4, Ste20 und Skm1

In Co-Immunpräzipitationsexperimenten konnte gezeigt werden, dass Rdi1 selektiv an Rho1, Rho4 und Cdc42 bindet. Wurde die PAK (p21-aktivierte Kinase) *CLA4*, welche ein Cdc42-Effektor ist, überexprimiert, so wurde die Assoziation von Rdi1 mit Cdc42 aufgelöst. Die Überexpression der beiden anderen PAKs *STE20* und *SKM1* hatte keinen Effekt. Für Rho1 wurden unterschiedliche Ergebnisse nach der *CLA4*-Überexpression erhalten, so dass in diesem Versuchsansatz nicht geklärt werden konnte, ob die Interaktion auch von Cla4 abhängig ist. Daher wurden Fraktionierungsexperimente durchgeführt, die zur Klärung dieser Frage dienen und die für Cdc42 erhaltenen Ergebnisse bestätigen sollten.

Es zeigte sich, dass die Überexpression von *CLA4* zu deutlich erniedrigten Cdc42 und Rho1 Proteinmengen im Cytsol führte. Dieser Prozess war von der Anwesenheit von Rdi1 abhängig. Dies bedeutet, dass Cla4 und Rdi1 im gleichen Signalweg beteiligt sind. Eine Zunahme der Mengen an den Membranen konnte nur für Cdc42 beobachtet werden. Es muss jedoch beachtet werden, dass die Analyse der Überstände einfacher erfolgen kann als die Analyse der Membranfraktionen, da die Proteinmengen im Cytosol geringer sind und daher Veränderungen in der Verteilung einfacher zu detektieren sind. Die Deletion des *CLA4* Gens hatte für Rho1 und Cdc42 den gegenteiligen Effekt. Konsistent dazu erhöhten sich die Proteinmengen beider Proteine im Cytosol geringfügig. Auch hier war der Prozess von Rdi1 abhängig. Die Effekte bei Deletionen fallen jedoch häufig weniger deutlich aus als die Überexpressionseffekte. Bei gleichzeitiger Überexpression von *CLA4* und *RDII* konnte eine Wiederherstellung der Wildtypsituation im Cytosol und an den Membranen beobachtet werden, in dem der Rdi1-induzierte Extraktionseffekt aufgehoben wird. Durch dieses Experiment wurde der Einfluss von Cla4 auf die Regulation der Rdi1-Rho GTPase Interaktion besonders deutlich. Für Rho4 konnten weder Effekte nach der Überexpression noch durch die Deletion von *CLA4* beobachtet werden. Dies bedeutet, dass diese Interaktion nicht von Cla4, sondern von anderen Faktoren reguliert wird.

Die Ergebnisse indizieren, dass die Komplexbildung von Rdi1 mit Cdc42 und Rho1 von der Kinase Cla4 abhängig ist. Dies wurde davon unterstützt, dass der Effekt durch die Überexpression von *CLA4* nicht durch eine Konkurrenz mit Rdi1 zu stande kam. Unklar war allerdings, ob die Komplexe von Rdi1 mit den Rho GTPasen aufgelöst wurden oder gar nicht

erst entstehen konnten. Die Kinase-Abhängigkeit von einigen Rho GDI-Rho GTPase-Wechselwirkungen konnten bereits in höheren Eukaryoten demonstriert werden (Bourmeyster und Vignais, 1996; Mehta et al., 2001; Forget et al., 2002; DerMardirossian et al., 2004). Es galt es nun zu klären, ob die Regulation durch die direkte Cla4-vermittelte Phosphorylierung der Rho GTPase oder von Rdi1 erfolgte oder durch ein drittes unbekanntes Protein vermittelt wird.

### 5.2.2 Phosphorylierung von Rdi1 durch Cla4

Um zu klären, ob Cla4 Rdi1 oder Cdc42/Rho1 phosphoryliert, wurden *in vitro* Kinase-Assays durchgeführt. Dafür wurden zunächst Rdi1 und Cdc42 als His<sub>6</sub>-Fusionsproteine erfolgreich exprimiert und aufgereinigt. Sie wurden dann als Substrate eingesetzt, wobei die Kinase Cla4 aus Hefe präzipitiert wurde.

Es zeigte sich, dass Rdi1 von der Wildtyp Cla4 Kinase phosphoryliert wurde. Allerdings zeigte die Kinase-inaktive Form auch eine Restaktivität gegenüber Rdi1. Die Aktivität der Wildtyp Kinase war jedoch etwa drei Mal höher als die der inaktiven Form, so dass man davon ausgehen konnte, dass Cla4 Rdi1 phosphoryliert. Wenn Cla4 kein Substrat zugegeben wurde, konnte man eine Autophosphorylierung erkennen, die der von Ste20 gleicht (Wu et al., 1995). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass Cla4 nicht in der Lage war Cdc42 *in vitro* zu phosphorylieren. Das ubiquitäre Kinasesubstrat MBP wurde hingegen stark von Cla4 phosphoryliert. Die direkte Phosphorylierungsaktivität von Cla4 gegenüber Rdi1 ging einher mit der Kinaseabhängigkeit der Cla4 Effekte auf die Rdi1-Rho GTPase Interaktionen, welche in den Bindungs- und Fraktionierungsexperimenten erhalten wurden. Dies wäre mit zuvor gemachten Beobachtungen für die p21-aktivierte Kinase Pak1 in höheren Eukaryoten vergleichbar (DerMardirossian et al., 2004). Pak1 vermittelt dort die Dissoziation von Rac1-Rho GDI Komplexen. Die von DerMardirossian et al. (2004) beschriebenen Serine 107 und 174 von Rho GDI, welche durch Pak1 phosphoryliert werden, sind in Rdi1 allerdings nicht konserviert. Es konnte aber gezeigt werden, dass Rdi1 *in vivo* an Threonin 27 phosphoryliert wird (Chi et al., 2007). Es kann daher spekuliert werden, dass Rdi1 von Cla4 an dieser Aminosäure, welche im N-terminalen regulatorischen Arm-Region nahe der Switch I Domäne liegt (Hoffman et al., 2000), phosphoryliert wird. Aufgrund der Restaktivität der Kinase-inaktiven Form von Cla4 gegenüber Rdi1 lässt sich außerdem vermuten, dass noch ein

weiteres unbekanntes Protein bei der Regulation der Rdi1-Rho GTPase Komplexe beteiligt sein könnte.

Betrachtet man die Etablierung von Polarität z.B. bei der Ausbildung der Knospe, so startet dieser Prozess mit der lokalen Aktivierung von Cdc42 an dem Ort des zukünftigen Knospenwachstums. Cla4 als Cdc42-Effektor wird im Zuge dessen von Cdc42 aktiviert und könnte dann dafür sorgen, dass bestehende Rdi1-Cdc42/Rho1 Komplexe aufgelöst werden. Dies würde wiederum dazu führen, dass Cdc42 und Rho1 zum Ort des polaren Wachstums gelangen könnten und dort aktiviert werden. Für die Regulation der Rdi1-Cdc42/Rho1 Komplexe kann man daher einen positiven Rückkopplungsprozess formulieren, da Cla4 ein Cdc42-Effektor ist. Durch einen noch nicht gänzlich entschlüsselten Mechanismus kann Cla4 die Assoziation von Rdi1 mit Cdc42 und Rho1 beeinflussen (Abbildung 5.2.1). Unklar bleibt, ob die Komplexbildung verhindert oder bestehende Komplexe aufgelöst werden. Für die negative Regulation des Cdc42 GEFs Cdc24 durch Cla4 beschrieben wurde bereits ein vergleichbarer Mechanismus beschrieben (Gulli et al., 2000). Auch die Rho1 Aktivität ist in diesem Modell indirekt von Cla4 abhängig. Ein ähnlicher Einfluss konnte für das Paxilin Pxl1 beobachtet werden, welches vermutlich auch die Aktivität von Rho1 und Cdc42 während des polarisierten Wachstums koordiniert (Gao et al., 2004; Mackin et al., 2004).

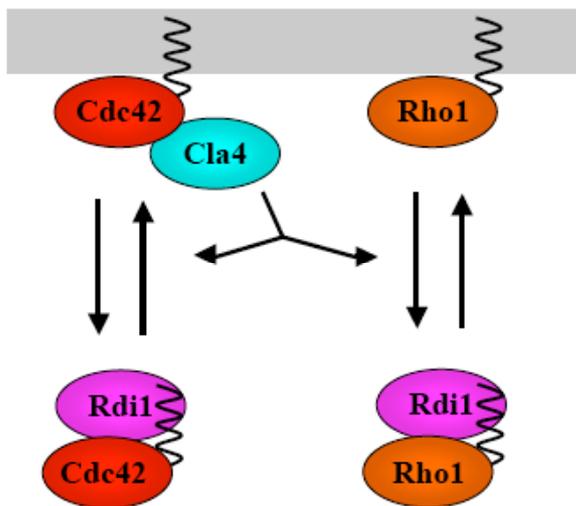


Abbildung 5.2.1: Modell zur Regulation von Cdc42 und Rho1. Anhand der Ergebnisse kann für die Wirkung von Cla4 auf die Interaktion von Rdi1 mit Rho1 und Cdc42 ein Modell postuliert werden, welches einen positiven Rückkopplungsprozess zulässt. Cla4 als direkter Effektor von Cdc42, aber nicht von Rho1, kann entweder die Rdi1-Rho1/Cdc42 Komplexe auflösen oder gar nicht erst entstehen lassen. Auf die Rdi1-Rho1 Interaktion hat Cla4 keinen Einfluss.

### 5.3 Analyse der Rho4-Rdi1 Interaktion

#### 5.3.1 Abbaumechanismen von Rho4

Durch die Überexpression von *RDII* wurden die Proteinmengen von Rho4 drastisch verringert. Konsequenterweise waren die Rho4 Proteinmengen in  $\Delta rdi1$  Zellen erhöht. Da Rho4 ein relativ stabiles Protein ist, konnte ausgeschlossen werden, dass die Reduktion durch eine geringere Expression von Rho4 zu Stande kam. Daher ließ sich vermuten, dass Rho4 im Zuge der *RDII*-Überexpression durch proteolytische Prozesse abgebaut wird. Für den proteolytischen Abbau kommen mit dem proteasomalen und vakuolären Prozess zwei Mechanismen in Frage.

Zunächst wurde die Möglichkeit des proteasomalen Abbaus von Rho4 analysiert. Hierfür wurde der Abbau in  $\Delta erg6$  Zellen unter Zugabe des proteasomspezifischen Inhibitors MG-132 betrachtet. Die Deletion von *ERG6* erhöht die Permeabilität der Zellmembran gegenüber pharmakologischen Substanzen (Lee und Goldberg, 1996). Der Abbau konnte im Vergleich zum Wildtyp deutlich reduziert werden und indizierte somit eine proteasomale Degradation. Um eine effektivere Inhibition mit dem Proteasominhibitor zu erreichen, wurde der Versuch in  $\Delta erg6 \Delta pdr5$  Zellen wiederholt. Die Deletion des Multidrug-Transporters *PDR5*, welcher normalerweise für den Export von pharmakologischen Substanzen verantwortlich ist, bei gleichzeitiger Deletion von *ERG6*, sorgte für einen additiven Effekt (Emter et al., 2002). Doch auch auf diesem Wege wurde keine effektivere Inhibition erreicht.

Die Regulation von Rho GTPasen durch Proteolyse ist ein sehr selten vorkommender Prozess und konnte zuvor nur in höheren Eukaryoten beobachtet werden. Hierbei konnte ein Ubiquitin-abhängiger Abbau von RhoA und Rap1B, vermittelt von den E3 Ubiquitin-Ligasen Smurf1 und Smurf2, beobachtet werden (Wang et al., 2003; Schwamborn et al., 2007). Der lokale Abbau von RhoA in Lamellipodien und Filopodien führt dabei zur Entstehung von Zellpolarität und Zellauswucherungen. Durch den Abbau von Rap1B wird die Verteilung dieses Rho Proteins in Neuriten von Neuronen lokal eingegrenzt. Dadurch kann eine Polarität etabliert werden kann, die in der Ausbildung von Axonen mündet. Die E3 Ubiquitin-Ligasen besitzen jeweils eine HECT-Domäne (Homologous to the E6-AP Carboxyl Terminus). In Hefe wird mit *Rsp5* lediglich eine Ubiquitin-Ligase mit einer solchen Domäne exprimiert (Rotin et al., 2000). Daher wurde der Abbau von Rho4 in einem Stamm induziert, welcher ein temperatursensitives *rsp5-1* Allel trug (Stamenova et al., 2004). Bei der restriktiven Temperatur, bei der *Rsp5* inaktiv ist, konnte keine Veränderung des Rho4 Abbaus beobachtet

werden. Daraus konnte geschlossen werden, dass der Prozess nicht von Rsp5 abhängig ist und auf einem anderen Mechanismus als bei RhoA und Rap1B basiert.

Anschließend wurde der Rho4 Abbau während der Inhibition vakuolärer Abbaumechanismen analysiert. Dies wurde in  $\Delta pep4$  Zellen durchgeführt. *PEP4* codiert ein Protein, das für die Reifung vakuolärer Proteinasen verantwortlich ist (Ammerer et al., 1986). In diesen  $\Delta pep4$  Zellen wurde der Rdi1-induzierte Abbau von Rho4 effektiv inhibiert. Rho4 lokalisierte zudem an Vakuolenmembranen, was den Zusammenhang mit dem vakuolären Abbau noch verstärken könnte. Für die Integrität der Vakuolen scheint Rho4 nicht verantwortlich zu sein, da in  $\Delta rho4$  Zellen die Vakuolen unverändert sind (Sakwa, 2008).

Zusätzlich wurde im N-Terminus der Rho4 Aminosäuresequenz eine potentielle PEST-Sequenz identifiziert. PEST-Sequenzen können einen Hinweis darauf geben, ob ein Protein schnell abgebaut wird (Rogers et al., 1986). Die Deletion dieser Aminosäuren führte allerdings unerwarteterweise nicht zur Akkumulation von Rho4, sondern zur starken Reduktion der Proteinmengen. Somit spielt diese Sequenz vermutlich keine Rolle bei dem Rdi1-induzierten Abbau von Rho4.

Es konnte hier demonstriert werden, dass das multiple Bandenmuster von 3HA-Rho4 aus einer Phosphorylierung des Proteins resultierte. Die Phosphorylierung von Proteinen wird von Kinasen vermittelt. In einer globalen Phosphorylierungsanalyse konnte die Phosphorylierung von Rho4 durch das GSK-3 $\beta$  homologe Protein Ygk3 gezeigt werden (Ptacek et al., 2005). Interessanterweise wurde berichtet, dass die Kinase Ygk3 zusammen mit der zuvor beschriebenen E3-Ubiquitin-Ligase Rsp5 in proteasomalen Proteinabbauprozessen involviert ist (Andoh et al., 2000). Hinzu kommt, dass GSK-3 $\beta$  auch in höheren Eukaryoten Zellpolaritätsprozesse beeinflussen kann und daher auch in Hefe solche Prozesse beeinflussen könnte. GSK-3 $\beta$  ist dabei für die Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren der Hedgehog und Wnt Signaltransduktionswege verantwortlich. Die Proteine werden daraufhin abgebaut (Kim und Kimmel, 2006). Daher schien es möglich, dass Ygk3 in Hefe einen solchen Einfluss auf Rho4 besitzen könnte. Es zeigte sich tatsächlich, dass die Proteinmengen von Rho4 auch verringert werden, wenn *YGK3* überexprimiert wird. Allerdings ist dieser Effekt etwas schwächer als der von Rdi1. Es wurde deutlich, dass der Einfluss von Ygk3 nur in Kooperation mit Rdi1 vermittelt werden kann. Die Proteinmengen von Cdc42 und Rho1 blieben unverändert, so dass der Einfluss von Ygk3 für Rho4 spezifisch war.

Wenn Ygk3 die Rho GTPase tatsächlich direkt phosphorylieren würde, so hätte man eine Veränderung des Rho4-Bandenmusters und der Proteinmengen erwarten können, wenn *YGK3* deletiert wird. Die Deletion ergab keine Veränderungen, was allerdings nicht unbedingt auf

den fehlenden Einfluss von Ygk3 zurückzuführen ist, sondern vielmehr auf das Vorhandensein von drei weiteren GSK-3 $\beta$  homologen Proteinen, die Funktionen von Ygk3 übernehmen könnten (Kassir et al., 2006). Die Herstellung einer Quadrupelmutante war bisher nicht möglich, könnte jedoch mit Hilfe einer konditional letalen Mutante erreicht werden.

Wurden die potentielle PEST-Sequenz deletiert, so verringert sich auch die Anzahl der detektierbaren Proteinbanden von Rho4. Daher wurde Rho4 und die PEST-Sequenz in einem *in vitro* Kinase-Assay als potentielle Substrate von Ygk3 eingesetzt. Wie bei den zuvor durchgeführten Kinase-Assays, zeigte auch hier die Kinase-inaktive Form eine Restaktivität gegenüber ihrem potentiellen Substrat. Das PEST-Fragment wurde nicht phosphoryliert. Die Phosphorylierung von Rho4 durch Ygk3 (Ptacek et al. 2005) konnte somit nicht bestätigt werden. Dennoch lässt sich festhalten, dass Ygk3 den Abbau von Rho4 beeinflusst.

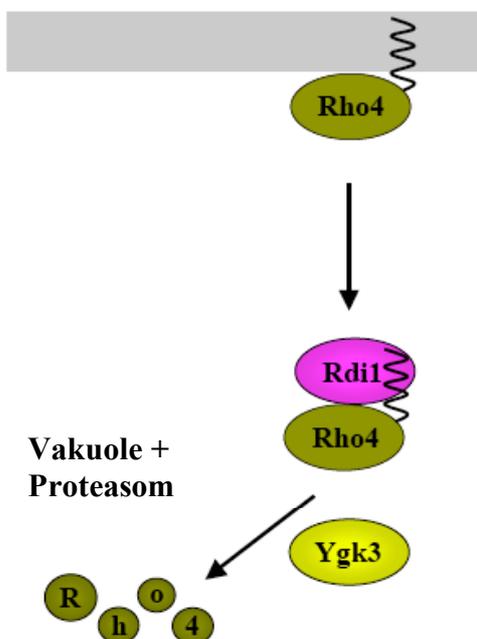


Abbildung 5.3.1: Prinzip des Rdi1-induzierten Abbaus von Rho4 unter Beteiligung des GSK-3 $\beta$  homologen Proteins Ygk3. Nach der Membranextraktion von Rho4 durch Rdi1 kann der proteasomale und vakuoläre Abbau der Rho GTPase beobachtet werden. Zusätzlich induziert die Überexpression von Ygk3 in Kooperation mit Rdi1 den Abbau von Rho4.

Es scheint als würde Rho4 ungewöhnlicherweise durch zwei unterschiedliche Mechanismen abgebaut werden können (Abbildung 5.3.1). In einer neuen Studie konnte gezeigt werden, dass der Ort des Proteinabbaus vom Ubiquitinierungsgrad und dem Aggregationszustand des Proteins abhängig ist. Lösliche ubiquitinierte Proteine werden dabei proteasomal und

Proteine, die terminal aggregiert vorliegen, vakuolär abgebaut (Kaganovich et al., 2008). Es ist daher möglich, dass die Art des Abbaus von Rho4 auch von solchen Faktoren abhängig ist. In einer weiteren Arbeit konnte der duale Proteinabbau einer mutierten Version der  $H^+$ -ATPase Pma1 durch das Proteasom und durch Autophagieprozesse gezeigt werden. Es wurde auf diese Weise demonstriert, dass auch hier der Abbau eines Proteins von zwei Mechanismen kontrolliert werden kann (Mazón et al., 2007).

### 5.3.2 Eigenschaften von Rho4

Rho4 lokalisierte im Wildtyp wie andere Rho GTPasen an Orten polarisierten Wachstum, wie der Knospenspitzen und der Stelle zukünftigen Knospenwachstums (Ziman et al., 1993; Yamochi et al., 1994; Cole et al., 2007). Hinzu kamen die Lokalisation an inneren Membranen, wie die Vakuolenmembran und die mangelnde Akkumulation in der Spitze der Paarungsprojektion. Rho4 wurde zudem von Membranen extrahiert (siehe Abschnitt 4.1).

Der Abbau von Rho4 nach der Extraktion von Membranen wurde durch diverse Experimente bestätigt. Unklar war, welche physiologisch relevante Rolle der Abbau von Rho4 haben könnte. Zur Analyse dessen wurde die Expression von Rho4 beim synchronisierten Durchschreiten der Zellen des vegetativen Zellzyklus betrachtet. Es wurde klar, dass sich die Rho4 Proteinmengen zu keiner Zeit signifikant änderten. Wenn wie bei Wang et al. (2003) und Schwamborn et al. (2007) die Aktivität der Rho GTPase und somit die Polarisierung durch Proteinabbau an bestimmten Membrandomänen hätte reguliert werden sollen, so wären auch hier größere Veränderungen der Rho4 Proteinmengen erwartet worden. Daher scheint es wahrscheinlicher, dass Rdi1 lediglich aktives Rho4 von Membranen abzieht, um die Aktivität zu beenden. Für andere Rho GTPasen in Hefe liegen keine vergleichbaren Daten vor, während z.B. Zellpolaritätsproteine wie der Cdc42-Effektor Gic1 Zellzyklus-abhängig reguliert werden (Jaquenoud et al., 1998). Dass Rho4 dennoch das Zellwachstum beeinflussen kann, zeigte sich bei der Analyse des Wachstums von Zellen, welche die konstitutiv aktive Form Rho4<sup>G81V</sup> überexprimieren. Diese Zellen wuchsen im Vergleich zum Wildtyp deutlich verlangsamt (Sakwa, 2008).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass Rho4 durch einen neuen Mechanismus reguliert wird. Zwar wurde die Regulation von Rho GTPasen durch Proteolyse bereits beschrieben, jedoch war diese nicht von der Extraktion durch den GDI abhängig. Zudem werden bei der Regulation von Rho4 nur geringe Mengen aktives Protein abgebaut.

## 5.4 Screening nach neuen Rdi1 Interaktoren

### 5.4.1 Suppressoren der Rdi1-induzierten Letalität

Auf der Suche nach neuen Rdi1 Interaktoren wurden verschiedene Gen-Bibliotheken gescreent. Die starke *RDII*-Überexpression war letal für die Zellen. Daher wurden zunächst versucht Proteine zu finden, die diese Letalität supprimieren können. Zum Einsatz kam dabei die YEp13 Gen-Bibliothek, welche die genomischen Fragmente in Multicopy-Vektoren enthält (Nasmyth und Reed, 1980). In verschiedenen Ansätzen wurden einige Klone erhalten, die unter den Selektionsbedingungen wuchsen. Die Sequenzierung der genomischen Fragmente ergab, dass auch *CDC42* die Letalität supprimieren konnte. Dies bedeutete, dass der Versuchsansatz physiologisch sinnvolle Ergebnisse lieferte. Die Analyse der anderen Sequenzen zeigte lediglich Gene auf (*URA3*, *GAL80*), welche die Zellen durch ihre Überexpression befähigten die restriktiven Selektionsbedingungen zu umgehen. Die Überexpression des Transkriptionsfaktors *GAL80* resultierte vermutlich in der Hochregulation des Galaktosestoffwechsels, was darin mündete, dass die Galaktose-induzierte Überexpression von *RDII* nicht stattfinden konnte. Die Überexpression von *URA3* führte wahrscheinlich dazu, dass die Zellen das pKT10-Rdi1 Plasmid, das die starke *RDII*-Überexpression ermöglichte und auch auf das *URA3* Gen selektiert wurde (Masuda et al., 1994), aus den Zellen ausschleusen konnten. Es lässt sich aufgrund dieser Tatsache vermuten, dass die Selektionsbedingungen des Screens zu restriktiv waren und deswegen fast alle Klone starben. Hinzu kommt die Tatsache, dass die Überexpression von *RDII* äußerst stark ist und große Rdi1 Proteinmengen entstehen, die dafür sorgen, dass die mit Rdi1 interagierenden Rho GTPasen Cdc42, Rho1 und Rho4 von Membranen extrahiert werden (siehe Abschnitt 4.1). Da die Funktionen von Cdc42 und Rho1 essentiell für die Zelle sind, verwundert es kaum, dass wenige Suppressoren identifiziert werden konnten. Dies wird auch dadurch unterstützt, dass die Überexpression von *CLA4* nicht ausreichend für eine Suppression ist, obwohl Cla4 sehr wohl einen regulatorischen Effekt auf Rdi1 und den Komplex aus Rdi1 und Cdc42/Rho1 ausüben kann (siehe Abschnitt 4.2 und 5.2). Zusätzlich ist der supprimierende Effekt des bekannten Rdi1 Interaktors Cdc42 äußerst schwach und gibt einen weiteren Hinweis auf die restriktiven Selektionsbedingungen des Screens.

#### 5.4.2 Split-Ubiquitin-Screen mit Rdi1 als Köderprotein

Bei dem Split-Ubiquitin-Screen mit Rdi1 als Köderprotein wurden insgesamt 136 Klone erhalten. Von 96 Klonen konnte das Wachstum nach der Isolierung der Plasmid-DNA und anschließender Retransformation auf den Screen-Selektionsplatten reproduziert werden. Von allen 96 Klonen wurde die im Plasmid enthaltene genomische DNA sequenziert. Es zeigte sich, dass eine Vielzahl von unterschiedlichsten Genen putative Interaktoren von Rdi1 darstellten. Am interessantesten erschien *SEC6*, das ein Protein des Exocystkomplexes codiert (TerBush et al. 1996) und drei Mal identifiziert wurde. Der Exocystkomplex vermittelt die Anheftung sekretorischer Vesikel an die Plasmamembran und ist wichtig für das polarisierte Wachstum (Brennwald und Rossi, 2007). Die Verbindung von Exocytose und Rho GTPasen besteht darin, dass Cdc42 und Rho1 direkt mit Sec3 und Exo70, die ebenfalls Komponenten des Exocystkomplexes sind, interagieren (Zhang et al., 2001; Guo et al., 2001). Auch die Rho GTPase Rho3 interagiert mit Exo70 (Robinson et al., 1999). Demensprechend wurde zunächst die Interaktion von Sec6 mit Rdi1 charakterisiert.

#### 5.4.3 Analyse der Interaktion von Rdi1 mit Sec6

Die im Screen entdeckte Interaktion von Rdi1 mit Sec6 sollte nun auf anderen Wegen bestätigt werden. Interessanterweise waren von dem *SEC6* ORF in allen drei positiven Klonen Abschnitte zwischen den Aminosäuren 427 bis 806 enthalten. Somit konnte die Domäne von Sec6, die potentiell mit Rdi1 interagiert, eingegrenzt werden. Zunächst wurden die gesamte codierende *SEC6* Sequenz und das C-terminale Fragment in den Vektor integriert, der auch zur Erstellung der Split-Ubiquitin-Bibliothek verwendet wurde. Es gelang die Interaktion von Rdi1 mit dem Sec6-Fragment in diesem Split-Ubiquitin-System zu zeigen. Unerwarteterweise zeigte das komplette Sec6-Protein keine Wechselwirkung mit Rdi1. Der Grund hierfür könnte in sterischen Problemen zu finden sein. Die anderen Komponenten des Exocystkomplexes konnten im Split-Ubiquitin-System keine Wechselwirkung mit Rdi1 eingehen.

Die Bindung von Sec6 an Rdi1 sollte anschließend in einem *in vitro* Bindungsexperiment dargestellt werden. Hierfür wurden Sec6 und das C-terminale Sec6-Fragment als GST-Fusionsproteine und Rdi1 als His<sub>6</sub>-Fusionsprotein in *E. coli* exprimiert und aufgereinigt. Es zeigte sich, dass Rdi1 an das Sec6-Fragment binden konnte, jedoch nicht an das gesamte Protein. Es wäre zu erwarten gewesen, dass nachdem Rdi1 im Split-Ubiquitin vermutlich aus

sterischen Gründen nur mit dem Sec6-Fragment wechselwirken konnte, zumindest im *in vitro* Bindungsexperiment an Sec6 hätte binden können. Da nur rekombinant hergestellte Proteine eingesetzt wurden, zeigte sich, dass das Sec6-Fragment direkt an Rdi1 binden konnte.

In weiteren Experimenten, wie z.B. durch Co-Immunpräzitationen, könnte versucht werden die Bindung des gesamten Sec6 an Rdi1 darzustellen.

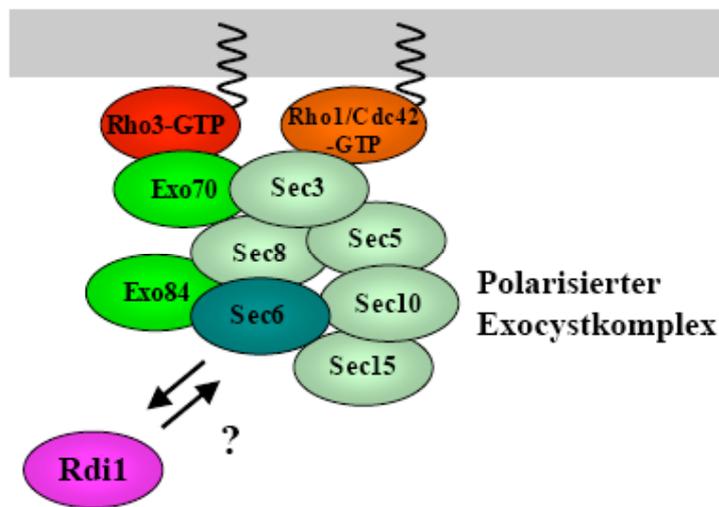


Abbildung 5.4.1: Modell zur Interaktion von Rdi1 mit der Exocystkomponente Sec6. Eine direkte Protein-Protein-Interaktion zwischen Rdi1 und einem C-terminalen Fragment der Exocystkomponente Sec6 konnte in einem *in vitro* Bindungsexperiment dargestellt werden. Funktionelle Analysen dieser Bindung waren bislang ergebnislos, so dass der physiologische Sinn dieser Wechselwirkung noch unklar ist.

Offensichtlich ist ein Zusammenhang zwischen polarisierter Exocytose und polarisiertem Wachstum gegeben. Bei beiden Prozessen spielen Rho GTPasen wie Cdc42 und Rho1 eine wichtige Rolle (Brennwald und Rossi, 2007; Park und Bi, 2007). Zudem interagieren diese Proteine auch mit Rdi1. Fraglich war nun, welche Rolle die Interaktion von Rdi1 mit der Exocystkomponente Sec6 bei diesen Prozessen haben könnte. Vorstellbar war zum einen, dass Rdi1 die Interaktion von Rho GTPasen mit Exocystkomponenten indirekt über Sec6 beeinflusst oder dass auf der anderen Seite Sec6 die Interaktion von Rdi1 mit den Rho GTPasen regulieren kann. Hierbei war eine GDF-Aktivität (DerMardisrossion und Bokoch, 2005) von Sec6 gegenüber Rdi1-Cdc42/Rho1 Komplexen vorstellbar, die zur Auflösung der Komplexe führen könnte.

Die funktionelle Analyse der Sec6-Rdi1 Interaktion lieferte keinen Hinweis. Sec6 führte weder eine GDF-Aktivität aus, noch war es wichtig für die Extraktion der Rho GTPasen von

Membranen. Da Sec6 einen unmittelbaren Einfluss auf Prozesse der Exocytose hat (TerBush et al., 1996), wurde überprüft, ob auch Rdi1 einen Einfluss auf diesen Vorgang hat, um so einen Hinweis auf die Physiologie der Interaktion erhalten werden könnte. Doch auch diese Experimente lieferten keine positiven Ergebnisse (Abbildung 5.4.1).

Ein weiterer Ansatz, um eventuell Anhaltspunkte zur Physiologie der Interaktion zu erhalten, könnte die Interaktion von Rho4 mit Rdi1 sein. Der Einfluss von Sec6 auf diese Wechselwirkung wurde bisher jedoch nicht untersucht.

## 5.5 Die Interaktion von Ste20 mit Proteinen der Ergosterolsynthese

Die PAK Ste20 ist ein Effektormolekül der Rho GTPase Cdc42 und somit wichtig für Zellpolaritätsprozesse (Park und Bi, 2007). Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Bindung potentieller Interaktoren an Ste20 bestätigt werden. Die putativen Wechselwirkungspartner *ERG4*, *CBR1* und *NCPI* wurden zuvor bei einem in der Arbeitsgruppe durchgeführten Split-Ubiquitin-Screen identifiziert. Diese Proteine spielen alle eine Rolle bei der Ergosterolsynthese in *S. cerevisiae* (Daum et al., 1998). Die Untersuchung der Interaktionen von Ste20 mit den Proteinen der Ergosterolsynthese wurde gewählt, da Sterole vermutlich wichtig für Zellpolaritätsprozesse sind (Bagnat und Simons, 2002).

### 5.5.1 Die Bindung von Ste20 mit Cbr1, Ncp1 und Erg4 in Pulldown-Assays

Zur Bestimmung der Bindung der potentiellen neuen Ste20-Interaktoren kamen *in vitro* Bindungsexperimente zum Einsatz. Ste20 wurde dafür erfolgreich als GST-Fusionsprotein in *E. coli* exprimiert und aufgereinigt. Die Funktionalität des GST-Ste20 wurde anhand der Bindung von Cdc42 aus Hefe an das GST-Fusionsprotein gezeigt.

Zunächst wurde die Bindung von Cbr1 und Ncp1 an Ste20 untersucht. Die beiden Proteine wurden dazu in *S. cerevisiae* überexprimiert und anschließend mit dem rekombinanten GST-Ste20 inkubiert. Als Negativkontrolle wurde rekombinant in *E. coli* exprimiertes GST eingesetzt. Im Bindungsexperiment zeigte sich, dass 3HA-Cbr1 selektiv an GST-Ste20 binden konnte. Eine Bindung von 3HA-Ncp1 an GST-Ste20 konnte nicht gezeigt werden.

Es wurde zusätzlich untersucht, ob auch Erg4 an GST-Ste20 binden kann. Da auch hier zur Bindung das rekombinante GST-Ste20 mit in Hefe überexprimiertem *ERG4* inkubiert werden

sollte, wurde zunächst ein Stamm hergestellt, mit dem sich *ERG4* unter Kontrolle des induzierbaren *GALI*-Promotors exprimieren ließ. Es konnte die Bindung von Erg4-9myc an GST-Ste20 detektiert werden.

### 5.5.2 Phosphorylierung von Cbr1, Ncp1 und Erg4 durch Ste20 im Kinase-Assay

Die PAKs gehören zur Familie der Serin-/Threonin-Kinasen (Hofmann et al., 2004). Daher war es möglich, dass Ste20 die potentiellen neuen Interaktoren, deren Wechselwirkungen zuvor durch die Bindungsexperimente bestätigt wurden, durch Phosphorylierung regulieren könnte. Im Kinase-Assay wurden *in vitro* Phosphorylierungsstudien mit Ste20 als Kinase und Cbr1 sowie Ncp1 als Substrate durchgeführt. Die Substrate wurden dafür als GST-Fusionsproteine in *E. coli* erfolgreich exprimiert und anschließend aufgereinigt. Die Kinase Ste20 wurde ebenfalls als GST-Fusionsprotein exprimiert. Wurde Ste20 unter physiologischeren Bedingungen in *S. cerevisiae* überexprimiert und aufgereinigt und dann im Kinase-Assay eingesetzt. Ste20 wurde einerseits als Wildtyp-Protein und andererseits zur Kontrolle als inaktive Kinase eingesetzt. Es zeigte sich, dass keine Phosphorylierung eines der beiden potentiellen Substrate detektiert werden konnte. Lediglich die starke Phosphorylierung von MBP, einem ubiquitären Kinasesubstrat (z.B. Wu et al., 1995; Benton et al., 1997; Lamson et al., 2002), durch Wildtyp Ste20 wurde detektiert und indizierte, dass das Experiment funktionierte. Die Kinase-inaktive Form von Ste20 zeigte eine vernachlässigbare Aktivität gegenüber diesem Substrat. Dem gegenüber stand die Autophosphorylierung von Ste20 in der Wildtypsituation. Zuvor war bereits bekannt, dass diese Autophosphorylierung von Ste20 die eigene Kinaseaktivität erhöhen kann. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Kinase-inkativierte Form Ste20<sup>K649A</sup> sich nicht selbst phosphoryliert und somit weniger aktiv als die Wildtyp Kinase ist (Wu et al., 1995).

Erg4 ließ sich möglicherweise aufgrund seines hydrophoben Charakters nicht ohne weiteres rekombinant in *E. coli* exprimieren und war in dieser Form als Substrat für Ste20 in einem Kinase-Assay unbrauchbar. Dementsprechend wurde Erg4-9myc aus *S. cerevisiae* präzipitiert und mit dem ebenfalls aus Hefe präzipitierten Ste20 im Kinase-Assay eingesetzt. Es konnte keine Aktivität von Ste20 gegenüber Erg4 beobachtet werden. Auch in diesem Versuchansatz lag Wildtyp Ste20 im Kontrast zur Kinase-inaktiven Form Ste20<sup>K649A</sup> autophosphoryliert vor.

Die Deletionen von *ERG4*, *CBR1* und *NCP1* führten zu einer Reihe von Polaritätsdefekten, welche mit denen der *STE20*-Deletion vergleichbar sind und indizierten, dass die Proteine im gleichen Signalweg agieren könnten (Tiedje et al., 2007). Da beobachtet wurde, dass Cbr1 und Ncp1 in bestimmten Schritten der Ergosterolsynthese Elektronen auf die gleichen Proteine übertragen können (Daum et al., 1998), war es möglich zu schließen, dass auch Ncp1 in der Lage sein könnte mit Ste20 eine Protein-Protein-Wechselwirkung einzugehen. Die möglichen Regulationsmechanismen, die Ste20 auf die Proteine des Ergosterolsyntheseweges ausübt, könnten in lipidbiochemischen Ansätzen besser charakterisiert werden.

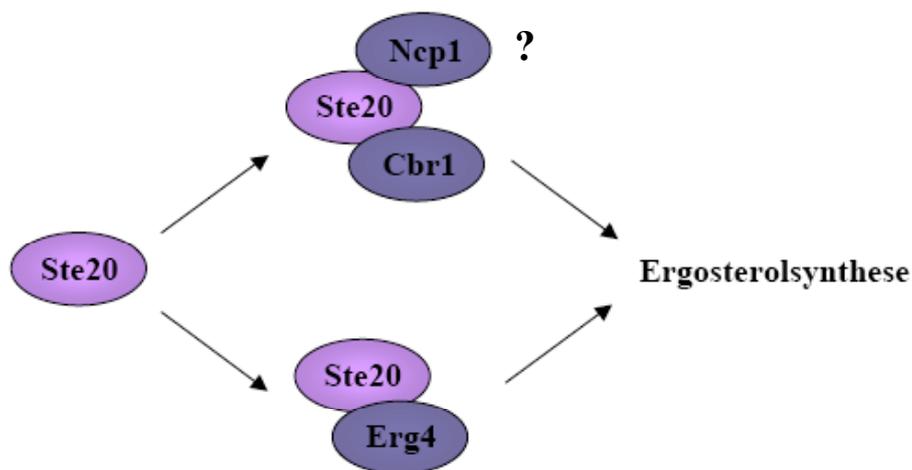


Abbildung 5.5.1: Interaktionspartner von Ste20, die in die Synthese von Ergosterol involviert sind. Eine Interaktion von Ste20 mit Cbr1 und Erg4 konnte in *in vitro* Bindungsexperimenten dargestellt werden. Da Cbr1 und Ncp1 redundante Funktionen besitzen, lässt sich spekulieren, dass auch Ncp1 mit Ste20 interagiert. In Kinase-Assay-Experimenten konnte keine Kinaseaktivität von Ste20 gegenüber den potentiellen Interaktoren beobachtet werden.

In der Abbildung 5.5.1 sind die beobachteten Protein-Protein-Interaktionen dargestellt. Unklar blieb, ob Ste20 die potentiellen Substrate durch Phosphorylierung reguliert. Im *in vitro* Kinase-Assay konnte keine Kinaseaktivität von Ste20 gegenüber Cbr1, Ncp1 und Erg4 detektiert werden. Dies schließt jedoch die Möglichkeit einer solchen Regulation nicht komplett aus.

## 6. Literaturverzeichnis

Adamo, JE., Rossi, G. and Brennwald, P. (1999). The Rho GTPase Rho3 has a direct role in exocytosis that is distinct from its role in actin polarity, *Mol. Biol. Cell* 10, p 4121-4133.

Adams, AE., Johnson, DI., Longnecker, RM, Sloat, BF. and Pringle, JR. (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, p 131-142.

Ahn, SH., Cheung, WL., Hsu, JY., Diaz, RL., Smith, MM. and Allis, CD. (2005). Sterile 20 kinase phosphorylates histone H2B at serine 10 during hydrogen peroxide-induced apoptosis in *S. cerevisiae*. *Cell* 120, p 25-36.

Ammerer, G., Hunter, CP., Rothman, JH., Saari, GC., Valls, LA. and Stevens, TH. (1986). PEP4 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes proteinase A, a vacuolar enzyme required for processing of vacuolar precursors. *Mol. Cell. Biol.* 6, p 2490-2499.

Amberg, DC., Burke, DJ. and Strathern, JN. (2005). Methods in yeast genetics. *Cold Spring Harbor Laboratories Press*.

Andoh, T., Hirata, Y. and Kikuchi, A. (2000). Yeast glycogen synthase kinase 3 is involved in protein degradation in cooperation with Bull1, Bul2, and Rsp5. *Mol. Cell. Biol.* 20, p 6712-6720.

Bagnat, M. and Simons, K. (2002). Cell surface polarization during yeast mating. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, p 14183-14188.

Benton, BK., Tinkelenberg, A., Gonzalez, I. and Cross, FR. (1997). Cla4p, a *Saccharomyces cerevisiae* Cdc42p-activated kinase involved in cytokinesis, is activated at mitosis, *Mol. Cell. Biol.* 17 p 5067-5076.

Bosl, WJ. and Li, R. (2005). Mitotic-exit control as an evolved complex system. *Cell* 121, p 325-333.

Bourmeyster, N., and Vignais, PV. (1996). Phosphorylation of Rho GDI stabilizes the Rho A-Rho GDI complex in neutrophil cytosol. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 218, p 54-60.

Brennwald, P. and Rossi, G. (2007). Spatial regulation of exocytosis and cell polarity: Yeast as a model for animal cells. *FEBS Lett.* 581, p 2119-2124.

Brown, JL., Jaquenoud, M., Gulli, MP., Chant, J. and Peter, M. (1997). Novel Cdc42-binding proteins Gic1 and Gic2 control cell polarity in yeast. *Genes Dev.* 11, p 2972-2982.

Chen, GC., Kim, YJ. and Chan, CSM. (1997). The Cdc42 GTPase-associated proteins Gic1 and Gic2 are required for polarized cell growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* 11, p 2958-2971.

Chi, A., Huttenhower, C., Geer, LY., Coon, JJ., Syka, JEP., Bai, DL., Shabanowitz, J., Burke, DJ., Troyanskaya OD. and Hunt, DF. (2007). Analysis of phosphorylation sites on proteins from *Saccharomyces cerevisiae* by electron transfer dissociation (ETD) mass spectrometry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, p 2193 - 2198.

- Christianson, TW., Sikorski, RS., Dante, M., Shero, JH. and Hieter, P. (1992). Multifunctional yeast high-copy-number shuttle vectors. *Gene* 110, p 119-122.
- Chuang, TH., Bohl, BP. and Bokoch, GM. (1993). Biologically active lipids are regulators of Rac.GDI complexation. *J. Biol. Chem.* 268, p 26206-26211.
- Cole, KC., McLaughlin, HW. and Johnson, DI. (2007). Use of bimolecular fluorescence complementation to study in vivo interactions between Cdc42p and Rdi1p of *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot. Cell* 6, p 378-387.
- Collins, RN. (2003). „Gettin it on“-GDI Displacement an Small GTPase Membrane Recruitment. *Mol. Cell* 12, p 1064-1066.
- Court, H. and Sudbery, P. (2007). Regulation of Cdc42 GTPase activity in the formation of hyphae in *Candida albicans*. *Mol. Biol. Cell* 18, p 265-281.
- Cvrcková, F., De Virgilio, C., Manser, E., Pringle, JR. 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.
- Daum, G., Lees, ND., Bard, M. and Dickson, R. (1998). Biochemistry, cell biology and molecular biology of lipids of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 14, 1471-1510.
- DerMardirossian, C., Schnelzer, A. and Bokoch, G.M. (2004). Phosphorylation of RhoGDI by Pak1 mediates dissociation of Rac GTPase. *Mol. Cell* 15, p 117-127.
- DerMardirossian, C. and Bokoch, GM. (2005). GDIs: central regulatory molecules in Rho GTPase activation. *Trends Cell Biol.* 15, p 356-363.
- Doignon, F., Weinachter, C., Roumanie, O. and M. Crouzet. (1999). The yeast Rgd1p is a GTPase activating protein of the Rho3 and Rho4 proteins. *FEBS Lett.* 459, p 458–462.
- Dransart, E., Olofsson, B. and Cherfils, J. (2005). RhoGDIs revisited: novel roles in Rho regulation. *Traffic* 6, p 957-966.
- Drgonová, J., Drgon, T. Tanaka, K., Kollár, R., Chen, GC., Ford, RA., Chan, CS., Takai, Y. and Cabib, E. (1996). Rho1p, a yeast protein at the interface between cell polarization and morphogenesis. *Science* 272, p 277-279.
- Drubin, DG. and Nelson, WJ. (1996). Origins of cell polarity. *Cell* 84, p 335-344.
- Eitzen, G., Thorngren, N. and Wickner, W. (2001). Rho1p and Cdc42p act after Ypt7p to regulate vacuole docking. *EMBO J.* 20, p 5650-5656.
- Emter, R., Heese-Peck, A. and Kralli, A. (2002). ERG6 and PDR5 regulate small lipophilic drug accumulation in yeast cells via distinct mechanisms. *FEBS Lett.* 521, p 57-61.
- Etienne-Manneville, S., and A. Hall. (2002). Rho GTPases in cell biology. *Nature* 420, p 629–635.
- Etienne-Manneville, S. (2004). Cdc42-the centre of polarity. *J. Cell Sci.* 117, p 1291-1300.

- Evangelista, M., Blundell, K., Longtine, MS., Chow, CJ., Adames, N., Pringle, JR., Peter, M. and Boone, C. (1997). Bni1p, a yeast formin linking Cdc42p and the actin cytoskeleton during polarized morphogenesis. *Science* 276, p 118–122.
- Faure, J., Vignais, PV. and Dagher, MC. (1999). Phosphoinositide-dependent activation of RhoA involves partial opening of the RhoA/Rho-GDI complex. *Eur. J. Biochem.* 262, p 879–889.
- Forget, MA., Desrosiers, RR., Gingras, D. and Beliveau, R. (2002). Phosphorylation states of Cdc42 and RhoA regulate their interactions with Rho GDP dissociation inhibitor and their extraction from biological membranes. *Biochem. J.* 361, p 243-254.
- Gao, X.D., Caviston, J.P., Tcheperegine, S.E. and Bi, E. (2004). Pxl1p, a paxillin-like protein in *Saccharomyces cerevisiae*, may coordinate Cdc42p and Rho1p functions during polarized growth. *Mol. Biol. Cell* 15, p 3977-3985.
- Goehring, AS., Mitchell, DA., Tong, AH., Keniry, ME., Boone, C. and Sprague Jr, GF. (2003). Synthetic Lethal Analysis Implicates Ste20p, a p21-activated Protein Kinase, in Polarisome Activation. *Mol. Biol. Cell* 4, p 1501-1516.
- Golovanov, AP., Chuang, TH., DerMardirossian, C., Barsukov, I., Hawkins, D., Badii, R., Bokoch, GM., Lian, LY. and Roberts, GC. (2001). Structure-activity relationships in flexible protein domains: regulation of rho GTPases by RhoGDI and D4 GDI. *J. Mol. Biol.* 305, p 121-135.
- Guo, W., Tamanoi, F. and Novick, P. (2001). Spatial regulation of the exocyst complex by Rho1 GTPase. *Nat. Cell Biol.* 3, p 353-360.
- Gulli, MP., Jaquenoud, M., Shimada, Y., Niederhauser, G., Wiget, P. and Peter, M. (2000). Phosphorylation of the Cdc42 exchange factor Cdc24 by the PAK-like kinase Cla4 may regulate polarized growth in yeast. *Mol. Cell* 6, p 1155-1167.
- Gulli, MP. And Peter, M. (2001). Temporal and spatial regulation of Rho-type guanine-nucleotide exchange factors: the yeast perspective. *Genes Dev.* 15, p 365-379.
- Haak D., Gable K., Beeler T. and Dunn T (1997). Hydroxylation of *Saccharomyces cerevisiae* ceramides requires Sur2p and Scs7p. *J. Biol. Chem.* 272, p 29704-29710.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166, p 557-80
- Hofmann, C., Shepelev, M. and Chernoff, J. (2004). The genetics of Pak. *J. Cell Sci.* 117, p 4342-4353.
- Hoffman, GR., Nassar, N. and Cerione, RA. (2000). Structure of the Rho family GTP-binding protein Cdc42 in complex with the multifunctional regulator RhoGDI. *Cell* 100, p 345- 356.
- Höfken, T. and Schiebel, E. (2002). A role for cell polarity proteins in mitotic exit. *EMBO J.* 21, p 4851-4862.

- Höfken, T. and Schiebel, E. (2004). Novel regulation of mitotic exit by the Cdc42 effectors Gic1 and Gic2. *J. Cell Biol.* 164, p 219-231.
- Holland, DG. (2006) Charakterisierung von Interaktoren der PAK-Kinase Ste20 in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. Diplomarbeit, Universität Kiel, Biochemisches Institut.
- Imamura, H., Tanaka, K., Hihara, T., Umikawa, M., Kamei, T., Takahashi, K., Sasaki, T. and Takai, Y. (1997). Bni1p and Bnr1p: downstream targets of the Rho family small G-proteins which interact with profilin and regulate actin cytoskeleton in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 16, p 2745-2755.
- Inoue, SB., Qadota, H., Arisawa, M., Watanabe, T., Oyha, Y. (1999). Prenylation of Rho1p Is Required for Activation of Yeast 1,3- $\beta$  Glucan Synthase. *J. Biol. Chem.* 274, p 38119-38124
- Jaffe, AB. and Hall, A. (2005). Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 21, p 247-269.
- Jaquenoud, M., Gulli, MP., Peter, K. and Peter, M. (1998). The Cdc42p effector Gic2p is targeted for ubiquitin-dependent degradation by the SCFGrr1 complex. *EMBO J.* 7, p 5360-5373.
- Janke, C., Magiera, MM., Rathfelder, N., Taxis, C., Reber, S., Maekawa, H., Moreno-Borchart, A., Doenges, G., Schwob, E., Schiebel, E. and Knop, M. (2004). A versatile toolbox for PCR-based tagging of yeast genes: new fluorescent proteins, more markers and promoter substitution cassettes. *Yeast* 21, p 947-629.
- Johnson, N. and Varshavsky, A. (1994). Split Ubiquitin as a Sensor of Protein Interactions in Vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, p 10340 - 10344.
- Johnson, DI. (1999). Cdc42: An Essential Rho-Type GTPasen Controlling Eukaryotic Cell Polarity. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63, p 54-105.
- Kaganovich, D., Kopito, R. and Frydman, J. (2008). Misfolded proteins partition between two distinct quality control compartments. *Nature* 454, p 1088-1095.
- Kim, O., Yang, J. and Qiu, Y. (2002). Selective Activation of Small GTPase RhoA by Tyrosine Kinase Etk through Its Pleckstrin Homology Domain. *J. Biol. Chem.* 277, p 30066-30071.
- Kassir, Y., Rubin-Bejerano, I. and Mandel-Gutfreund, Y. (2006). The *Saccharomyces cerevisiae* GSK-3 $\beta$  Homologs. *Curr. Drug Targets* 7, p 1455-1465.
- Kim, L. and Kimmel, AR. (2006). GSK3 at the edge: regulation of developmental specification and cell polarization. *Curr. Drug Targets* 7, p 1411-1419.
- Knop, M., Siegers, K., Pereira, G., Zachariae, W., Winsor, B., Nasmyth, K. and Schiebel, E. (1999). Epitope tagging of yeast genes using a PCR-based strategy: more tags and improved practical routines. *Yeast* 15, p 963-972.

- Koch, G., Tanaka, K., Masuda, T., Yamochi, W., Nonaka, H. and Takai, Y. (1997). Association of the Rho family small GTP-binding proteins with Rho GDP dissociation inhibitor (Rho GDI) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Oncogene* 15, p 417-422.
- Kron, SJ. and Gow, NA. (1995). Budding yeast morphogenesis: signalling, cytoskeleton and cell cycle. *Curr. Opin. Cell Biol.* 7, p 845-855.
- Lamping, E., Tanabe, K., Niimi, M., Uehara, Y., Monk, BC. and Cannon, RD. (2005). Characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* sec6-4 mutation and tools to create *S. cerevisiae* strains containing the sec6-4 allele. *Gene* 361, p 57-66.
- Lamson, RE., Winters, MJ. and Pryciak, PM. (2002). Cdc42 Regulation of Kinase Activity and Signaling by the Yeast p21-Activated Kinase Ste20, *Mol. Cell. Biol.* 22, p 2939-2951.
- Lang, P., Gesbert, F., Delespine-Carmagnat, M, Stancou, R., Pouchelet, M. and Bertoglio, J. (1996). et al., 1996, Protein kinase A phosphorylation of RhoA mediates the morphological and functional effects of cyclic AMP in cytotoxic lymphocytes. *EMBO J.* 15, p 510-519.
- Lakhe-Reddy, S., Khan, S., Konieczkowski, M., Jarad, G., Wu, KL., Reichardt, LF., Takai, Y., Bruggeman, LA., Wang, B., Sedor, JR. And Schelling, JR. (2006).  $\beta^8$  integrin binds Rho GDP dissociation inhibitor-1 and activates Rac1 to inhibit mesangial cell myofibroblast differentiation. *J. Biol. Chem.* 281, p 19688-16699.
- Leberer, E., Wu, C., Leeuw, T., Fourest-Lieuvin, A., Segall, JE. and Thomas, DY. (1997). Functional characterization of the Cdc42p binding domain of yeast Ste20p protein kinase. *EMBO J.* 16, p 83-97.
- Lee, DH. and Goldberg, AL. (1996). Selective Inhibitors of the Proteasome-dependent and Vacuolar Pathways of Protein Degradation in *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Biol. Chem.* 271, p 27280-27284.
- Leeuw, T., Fourest-Lieuvin, A., Wu, C., Chenevert, J., Clark, K., Whiteway, M., Thomas, DY. and Leberer, E. (1995). Pheromone response in yeast: association of Bem1p with proteins of the MAP kinase cascade and actin. *Science* 270, p 1210-1213.
- Leeuw, T., Wu, C., Schrag, JD., Whiteway, M., Thomas, DY. and Leberer, E. (1998). Interaction of a G-protein  $\gamma$ -subunit with a conserved sequence in Ste20/PAK family protein kinases. *Nature* 391, p 191-195.
- Levin, DE. (2005). Cell wall integrity signalling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 69, p 262-291.
- Li, R. (1997). Bee1, a yeast protein with homology to Wiscott-Aldrich syndrome protein, is critical for the assembly of cortical actin cytoskeleton. *J. Cell Biol.* 136, p 649-658.
- Longtine, MS., McKenzie, A., Demarini, DJ., Shah, NG., Wach, A., Brachat, A., Philippsen, P. and Pringle, JR. (1998). Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 14, p 953-961.

- Mackin, N.A., Sousou, T.J. and Erdman, S.E. (2004). The PXL1 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a paxillin-like protein functioning in polarized cell growth. *Mol. Biol. Cell* 15, p 1904-1917.
- Madaule, P., Axel, R. and Myers, AM. (1987). Characterization of two members of the rho gene family from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, p 779–783.
- Madhani, HD and Fink, GR. (1998). The control of filamentous differentiation and virulence in fungi. *Trends Cell Biol.* 8, p 348-853.
- Martin, H., Mendoza, A., Rodriguez-Pachon, JM., Molina, M. and C. Nombela. (1997). Characterization of *SKM1*, a *Saccharomyces cerevisiae* gene encoding a novel Ste20/PAK like protein kinase. *Mol. Microbiol.* 23, p 431–444.
- Masuda, T., Tanaka, K., Nonaka, H., Yamochi, W., Maeda, A. and Takai, Y. (1994). Molecular cloning and characterization of yeast rho GDP dissociation inhibitor. *J. Biol. Chem.* 269, p 19713-19718.
- Matsui, Y., and Toh-e, A. (1992). Isolation and characterization of two novel ras superfamily genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 114, p 43–49.
- Mazón, MJ., Eraso, P. and Portillo, F. (2007) Efficient degradation of misfolded mutant Pma1 by endoplasmic reticulum-associated degradation requires Atg19 and the Cvt/autophagy pathway. *Mol. Microbiol.* 63, p 1069-1077.
- McCallum, SJ., Wu, WJ. and Cerione, RA. (1996). Identification of a Putative Effector for Cdc42Hs with High Sequence Similarity to the RasGAP-related Protein IQGAP1 and a Cdc42Hs Binding Partner with Similarity to IQGAP2. *J. Biol. Chem.* 271, p 21732-21737.
- Mehta, D., Rahman, A. and Malik, AB: (2001). Protein Kinase C- $\alpha$  Signals Rho-Guanine Nucleotide Dissociation Inhibitor Phosphorylation and Rho Activation and Regulates the Endothelial Cell Barrier Function. *J. Biol. Chem.* 276, p 22614-22620.
- Mitchell, DA., Marshall, TK. and Deschenes, AR. (1993). Vectors for the inducible overexpression of glutathione S-transferase fusion proteins in yeast. *Yeast* 9, p 715-722.
- Mösch, HU., Roberts, RL. and Fink, GR. (1996). Ras2 signals via the Cdc42/Ste20/mitogen-activated protein kinase module to induce filamentous growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, p 5352-5356.
- de Nadal, E., Alepuz, PM. and Posas, F. (2002). Dealing with osmostress through MAP kinase activation. *EMBO Rep.* 3, p 735-740.
- Nasmyth, KA. and Reed, SI. (1980) Isolation of genes by complementation in yeast: molecular cloning of a cell cycle gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, p 2119-2123.
- Nomanbhoy, TK. and Cerione, R. (1996). Characterization of the interaction between RhoGDI and Cdc42Hs using fluorescence spectroscopy. *J. Biol. Chem.* 271, p 10004-10009.

- Oehlen, LJWM. and Cross, FR. (1998). Potential Regulation of Ste20 Function by the Cln1-Cdc28 and Cln2-Cdc28 Cyclin-dependent Protein Kinases. *J. Biol. Chem.* 273, p 25089-25097
- Orlando, K., Zhang, J., Zhang, X., Yue, P., Chiang, T., Bi, E. and Guo, W. (2008). Regulation of Gic2 Localization and Function by Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate during the Establishment of Cell Polarity in Budding Yeast. *J. Biol. Chem.* 283, p 14205-14212.
- Palecek, SP., Parikh, AS. and Kron, SJ. (2002). Sensing, signalling and integrating physical processes during *Saccharomyces cerevisiae* invasive and filamentous growth. *Microbiology* 148, p 893-907.
- Park, HO. and Bi, E. (2007). Central roles of small GTPases in the development of cell polarity in yeast and beyond. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 71, p 48-96.
- Pechlivanis, M. and Kuhlmann, J. (2006). Hydrophobic modifications of Ras proteins by isoprenoid groups and fatty acids--More than just membrane anchoring. *Biochim. Biophys. Acta* 1764, p 1914-1931.
- Phillips, MJ., Calero, G., Chan, B., Ramachandran, S. and Cerione, RA. (2008). Effector Proteins Exert an Important Influence on the Signaling-active State of the Small GTPase Cdc42. *J. Biol. Chem.* 283, p 14153-14164.
- Pingoud, A. und Urbanke, C. (1997). Arbeitsmethoden der Biochemie, *Walter de Gruyter Verlag*.
- Potenza M., Bowser R., Muller H. and Novick P. (1992). SEC6 encodes an 85 kDa soluble protein required for exocytosis in yeast. *Yeast* 8, p 549-58.
- Pruyne, D. and Bretscher, A. (2000). Polarization of cell growth in yeast. I. Establishment and maintenance of polarity states. *J. Cell Sci.* 113, p 365-375.
- Ptacek J., Devgan, G., Michaud, G., Zhu, H., Zhu, X., Fasolo, J., Guo, H., Jona, G., Breitkreutz, A., Sopko, R., McCartney, RR., Schmidt, MC., Rachidi, N., Lee, SJ., Mah, AS., Meng, L., Stark, MJ., Stern, DF., De Virgilio, C., Tyers, M., Andrews, B., Gerstein, M., Schweitzer, B., Predki, PF. and Snyder, M. (2005). Global analysis of protein phosphorylation in yeast. *Nature* 438, p 679-684.
- Rajendran, L. and Simons, K. (2005). Lipid rafts and membrane dynamics. *J. Cell Sci.* 18, p 1099-1102
- Richman, TJ., Sawyer, MM. and Johnson, DI. (2002). *Saccharomyces cerevisiae* Cdc42p localizes to cellular membranes and clusters at sites of polarized growth. *Eukaryot. Cell* 1, p 458-468.
- Richman, TJ., Toenjes, KA., Morales, SE., Cole, KC., Wasserman, BT., Taylor, CM., Koster, JA., Whelihan, MF. and Johnson, DI. (2004). Analysis of cell-cycle specific localization of the Rdi1p RhoGDI and the structural determinants required for Cdc42p membrane localization and clustering at sites of polarized growth. *Curr. Genet.* 45, p 339-349.

- Roberts, RL. and Fink, GR. (1994). Elements of a single MAP kinase cascade in *Saccharomyces cerevisiae* mediate two developmental programs in the same cell type: mating and invasive growth. *Genes Dev.* 8, p 2974-2985.
- Robinson, N. G., Guo, L., Imai, J., Toh, EA., Matsui, Y. and Tamanoi, F. (1999). Rho3 of *Saccharomyces cerevisiae*, which regulates the actin cytoskeleton and exocytosis, is a GTPase which interacts with Myo2 and Exo70. *Mol. Cell. Biol.* 19, p 3580–3587.
- Rogers, S., Wells, R. and Rechsteiner, (1986). Amino acid sequences common to rapidly degraded protein: the PEST hypothesis. *Science* 234, p 364 - 368.
- Roth, AF., Wan, J., Bailey, AO., Sun, B., Kuchar, JA., Green, WN., Phinney, BS., Yates 3rd, JR. and Davis, NG. (2006). Global analysis of protein palmitoylation in yeast. *Cell* 25, p 1003-1013.
- Rotin, D., Staub, O. and Haguenauer-Tsapis, R. (2000). Ubiquitination and endocytosis of plasma membrane proteins: role of Nedd4/Rsp5p family of ubiquitin-protein ligases. *J. Membr. Biol.* 176, p 1-17.
- Roumanie, O., Weinachter, C., Larrieu, I., Crouzet, M. and Doignon, F. (2001). Functional characterization of the Bag7, Lrg1 and Rgd2 RhoGAP proteins from *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 506, p 149–156.
- Sakchaisri, K., Asano, S., Yu, LR., Shulewitz, MJ., Park, CJ., Park, JE., Cho, YW., Veenstra, TD., Thorner, J. and Lee, KS. (2004). Coupling morphogenesis to mitotic entry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, p 4124-4129.
- Sakwa, I. (2008). Regulation der Aktivität von Rho GTPasen durch den RhoGDI Rdi1 in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. Diplomarbeit, Universität Kiel, Biochemisches Institut.
- Schmitz, HP., Huppert, S., Lorberg, A. and Heinisch, JJ. (2002). Rho5p downregulates the yeast cell integrity pathway. *J. Cell Sci.* 115, p 3139–3148.
- Schwamborn, JC., Muller, M., Becker, AH. and Puschel, AW. (2007). Ubiquitination of the GTPase Rap1B by the ubiquitin ligase Smurf2 is required for the establishment of neuronal polarity. *EMBO J.* 26, p 1410-1422.
- Sells, MA. and Chernoff, J. (1997). Emerging from the Pak: the p21-activated protein kinase family. *Trends Cell Biol.* 7, p 162-167.
- Seshan, A., Bardin, AJ. and Amon, A. (2002). Control of Lte1 localization by cell polarity determinants and Cdc14. *Curr. Biol.* 12, p 2098-2110.
- Singh, K., Kang, PJ. and Park, HO (2008). The Rho5 GTPase is necessary for oxidant-induced cell death in budding yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 5, p 1522-1527.
- Sikorski, R.S. and Hieter, P. (1989). A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 122, p 19-27.

- Stamenova, SD., Dunn, R., Adler, AS. And Hicke, L. (2004). The Rsp5 Ubiquitin Ligase Binds to and Ubiquitinates Members of the Yeast CIN85-Endophilin Complex, Sla1-Rvs167 *J. Biol. Chem.* 279, p 16017-16025.
- Studier, FW. and Moffatt, BA. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* 189, p 113-30.
- Takahashi, K., Sasaki, T., Mammoto, A., Takaishi, K., Kameyama, T., Tsukita, S. and Takai, Y. (1997). Direct interaction of the Rho GDP dissociation inhibitor with ezrin/radixin/moesin initiates the activation of the Rho small G protein. *J. Biol. Chem.* 272, p 23371-23375.
- Tcheperegine, SE., Gao, XD. and Bi, E. (2005). Regulation of cell polarity by interactions of Msb3 and Msb4 with Cdc42 and polarisome components. *Mol. Cell. Biol.* 25, p 8567-8580.
- TerBush DR., Maurice T., Roth D. and Novick P. (1996). The Exocyst is a multiprotein complex required for exocytosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 15, p 6483-6494.
- Tiedje, C., Holland, D.G., Just, U. and Höfken, T. (2007). Proteins involved in sterol synthesis interact with Ste20 and regulate cell polarity. *J. Cell Sci.* 120, p 3613-3624.
- Tiedje, C., Sakwa, I., Just, U. and Höfken, T. (2008). The Rho GDI Rdi1 regulates Rho GTPases by distinct mechanisms. *Mol. Biol. Cell* 19, p 2885-2896.
- Tu, S., Wu, WJ., Wang, J. and Cerione, RA. (2003). Epidermal Growth Factor-dependent Regulation of Cdc42 Is Mediated by the Src Tyrosine Kinase. *J. Biol. Chem.* 278, p 49293-49300.
- Ugolev, Y., Molshanski-Mor, S., Weinbaum, C. and Pick, E. (2006). Liposomes Comprising Anionic but Not Neutral Phospholipids Cause Dissociation of Rac(1 or 2)·RhoGDI Complexes and Support Amphiphile-independent NADPH Oxidase Activation by Such Complexes. *J. Biol. Chem.* 281, p 19204-19219.
- Versele, M. and Thorner, J. (2004). Septin collar formation in budding yeast requires GTP binding and direct phosphorylation by the PAK, Cla4. *J. Cell Biol.* 164, p 701-715.
- Vida, TA. and Emr, SD. (1995). A new vital stain for visualizing vacuolar membrane dynamics and endocytosis in yeast. *J. Cell Biol.* 128, p 779-792.
- Wang, HR., Zhang, Y., Ozdamar, B., Ogunjimi, AA., Alexandrova, E., Thomsen, GH. and Wrana, J.L. (2003). Regulation of cell polarity and protrusion formation by targeting RhoA for degradation. *Science* 302, p 1775-1779.
- Weirich, CS., Erzberger, JP. And Barral, Y. (2008). The septin family of GTPases: architecture and dynamics. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 9, p 478-489.
- Wu, C., Whiteway, M., Thomas, DY. and Leberer, E. (1995). Molecular Characterization of Ste20p, a Potential Mitogen-activated Protein or Extracellular Signal-regulated Kinase Kinase (MEK) Kinase Kinase from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 270, p 15984-15992.

Wu, C., Lee, SF., Furmaniak-Kazmierczak, E., Cote, GP., Thomas, DY. and Leberer, E. (1996). Activation of myosin-I by members of the Ste20p protein kinase family. *J. Biol. Chem.* 271, p 31787-31790.

Wu, C., Lytvyn, V., Thomas, DY. and Leberer, E. (1997). The phosphorylation site for Ste20p-like protein kinases is essential for the function of myosin-I in yeast. *J. Biol. Chem.* 272, p 30623–30626.

Yamashita, T. and Tohyama, M. (2003). The p75 receptor acts as a displacement factor that releases Rho from Rho-GDI. *Nat. Neurosci.* 6, p 461-467.

Yamochi, W., Tanaka, K., Nonaka, H., Maeda, A., Musha, T. and Takai, Y. (1994). Growth site localization of Rho1 small GTP-binding protein and its involvement in bud formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* 125, p 1077-1093.

Yang, H., Bard, M., Bruner, DA., Gleeson, A., Deckelbaum, RJ., Aljinovic, G., Pohl, TM., Rothstein, R. and Sturley, SL. (1996). Sterol Esterification in Yeast: A Two-Gene Process *Science* 272, p 1353-1356.

Zhang X., Bi E., Novick P., Du L., Kozminski KG., Lipschultz J. and Guo W. (2001). Cdc42 interacts with the exocyst and regulates polarized secretion. *J. Biol. Chem.* 276, p 46745-46750.

Ziman, M., O'Brien, JM., Ouellette, LA., Church, WR. and Johnson, DI. (1991). Mutational analysis of CDC42Sc, a *Saccharomyces cerevisiae* gene that encodes a putative GTP-binding protein involved in the control of cell polarity. *Mol. Cell. Biol.* 11, p 3537-3544.

Ziman, M., Preuss, D., Mulholland, J., O'Brien, JM., Botstein, D. and Johnson, DI. (1993). Subcellular localization of Cdc42p, a *Saccharomyces cerevisiae* GTP-binding protein involved in the control of cell polarity. *Mol. Biol. Cell* 4, p 1307-1316.

## 7. Anhang

### 7.1 Abkürzungsverzeichnis

APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
ca.	circa
cDNA	komplementäre DNA
CIAP	calf intestine alkaline phosphatase
C-Terminus	Carboxyterminus
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	epidermal growth factor
EGTA	Ethylenglykoltetraessigsäure
g	Gramm
GAP	GTPase activating protein
GAPDH	Glycerin-Aldehydphosphat-Dehydrogenase
GDF	GDI displacement factor
GDI	guanine nucleotide dissociation inhibitor
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	guanine nucleotide exchange factor
EGFP	enhanced (verstärkt) grün fluoreszierendes Protein
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HA	Hämagglutinin
His	Histidin
HRP	Horseradish peroxidase
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
L	Liter
LB	Luria Bertani

Leu	Leucin
mA	Milliampere
$\mu$ Ci	Microcurie
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
MOPS	Morpholinpropansulfonat
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
nm	Nanometer
N-Terminus	Aminoterminus
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
rpm	revolutions per minute
S	Svedberg
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Natrium-Dodecyl-Sulfat
TAE	Tris-Acetat-EDTA
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	Transport-Ribonukleinsäure
Trp	Tryptophan
Ura	Uracil
V	Volt
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyronosid
5-FOA	5-Fluororotsäure

## 7.2 Tabellarischer Lebenslauf

### Persönliche Daten

- Vorname: Christopher
- Name: Tiedje
- Geburtstag und Geburtsort: 27. Juni 1980 in Walsrode, Deutschland
- Nationalität: Deutsch

### Ausbildung und Abschlüsse

- 1999: Abitur am Gymnasium Walsrode, Deutschland
- 1999 bis 2005: Studium der Biochemie (Diplom) an der Leibniz Universität Hannover, Deutschland
- Juli 2004 bis März 2005: Anfertigung der Diplomarbeit am Institut für Biochemie/Physiologische Chemie der Medizinischen Hochschule Hannover in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Matthias Gaestel mit dem Thema „Erk3-MK5: Expressions- und Interaktionsstudien“.
- April 2005 bis Juni 2005: Assistent für das biochemische Praktikum am Institut für Biochemie/Physiologische Chemie der Medizinischen Hochschule Hannover.
- Juli 2005 bis September 2008: Anfertigung der Doktorarbeit im Biochemischen Institut der Christian-Albrecht-Universität Kiel in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Ursula Just mit dem Thema „Charakterisierung des Rho GDI Rdi1 in *Saccharomyces cerevisiae*“.

### Publikationen

- **Christopher Tiedje**, Daniel G. Holland, Ursula Just and Thomas Höfken. (2007). Proteins involved in sterol synthesis interact with Ste20 and regulate cell polarity. *Journal of Cell Science* 120, p 3613-3624.
- **Christopher Tiedje**, Imme Sakwa, Ursula Just and Thomas Höfken. (2008). The Rho GDI Rdi1 regulates Rho GTPases by distinct mechanisms. *Molecular Biology of the Cell* 19, p 2885-2896.

### 7.3 Danksagung

Ich danke Frau Prof. U. Just, für die Möglichkeit diese Arbeit in ihrer Arbeitsgruppe durchführen zu können. Dazu kommt auch ein besonderes Dankeschön Herrn Dr. T. Höfken zu Gute, der mein stets hilfsbereiter und motivierender Betreuer war und der seine Begeisterung für die Arbeit mit *S. cerevisiae* auf mich übertragen konnte.

Meinen Dank möchte ich auch Herrn Prof. S. Rose-John und Herrn Prof. T. Roeder für die Übernahme des Referates bzw. des Korreferates aussprechen.

Zu guter Letzt möchte ich mich noch bei meinen Kollegen in der Arbeitsgruppe bedanken, die immer für eine gute Atmosphäre im Labor gesorgt haben. Hierbei möchte ich besonders Meng Lin danken, mit dem ich viele interessante Gespräche führen durfte.

Kiel, im September 2008

Christopher Tiedje