



**"Charakterisierung der p21-aktivierten Kinasen (PAKs)  
in *Saccharomyces cerevisiae*"**

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

**Meng Lin**

**Kiel, Januar 2010**

**Referent/in: Prof. Dr. rer. nat. Stefan Rose-John**

**Korreferent/in: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Roeder**

**Tag der mündlichen Prüfung: 10.02.2010**

**Zum Druck genehmigt: Kiel, 10.02.2010**

**Prof. Dr. rer. nat. Lutz Kipp, Dekan**

## **Erklärung**

Hiermit erkläre ich, Meng Lin, 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, Januar 2010

Meng Lin

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom 01.09.2006 bis zum 22.01.2010 am Institut für Biochemie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Ursula Just angefertigt. Teile dieser Arbeit wurden in folgenden Artikeln veröffentlicht:

**Lin, M.**, Uden, H., Jacquier, N., Schneiter, R., Just, U. and Höfken, T. (2009) The Cdc42 effectors Ste20, Cla4 and Skm1 down-regulate the expression of genes involved in sterol uptake by a MAPK-independent pathway. **Mol. Biol. Cell** 20, 4826-4837.

**Lin, M.**, Grillitsch, K., Daum, G., Just, U. and Höfken, T. (2009) Modulation of sterol homeostasis by the Cdc42p effectors Cla4p and Ste20p in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **FEBS J.** 276, 7253-7264.

<b>1. Zusammenfassung</b>	<b>7</b>
<b>1. Abstract</b>	<b>9</b>
<b>2. Einleitung</b>	<b>10</b>
2.1 Cdc42 spielt eine zentrale Rolle bei der Zellpolarität	10
2.1.1 Regulation von Cdc42	10
2.1.2 Regulation des polaren Wachstums durch Cdc42	11
2.2 Die Effektoren von Cdc42	16
2.2.1 p21-aktivierte Kinasen (PAKs)	16
2.2.1.1 Die Lokalisation und wichtige Domänen von PAKs	16
2.2.1.2 Die Funktionen von PAKs	18
2.2.2 Andere Effektoren von Cdc42	20
2.3 Das Ergosterol und seine Homöostase	21
2.4 Die V-ATPase und ihre Untereinheiten	24
2.5 Aufgabenstellung	27
<b>3. Materialien und Methoden</b>	<b>28</b>
3.1 Materialien	28
3.1.1 Verbrauchsmaterialien	28
3.1.2 Geräte	28
3.1.3 Computerprogramme	29
3.1.4 Antikörper	29
3.1.4.1 Primäre Antikörper	29
3.1.4.2 Sekundäre Antikörper	30
3.1.5 Kits	30
3.1.6 Pufferlösungen	30
3.1.7 Chemikalien, Enzyme und Sonstiges	31
3.1.8 Primer	31
3.1.8.1 Genspezifische Primer	32
3.1.8.2 Sequenzierungsprimer	35
3.1.9 Plasmide	35
3.1.10 <i>S. cerevisiae</i> Stämme	38
3.1.11 <i>E. coli</i> Stämme	40
3.1.12 Nährmedien	40
3.1.12.1 Vollmedien	40
3.1.12.2 SC-Medien (synthetic complete)	41
3.2 Molekularbiologische Methoden	42
3.2.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)	42
3.2.2 Punktmutation oder Deletion eines Fragmentes von einem Gen	42
3.2.3 Reinigung von PCR-Produkten und DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel nach der Agarosegelelektrophorese	43
3.2.4 Restriktionsverdau	43
3.2.5 Agarosegelelektrophorese	44
3.2.6 Ligation	44
3.2.7 Chemische Transformation von <i>E. coli</i>	44
3.2.7.1 Herstellung von kompetenten Zellen	44
3.2.7.2 Transformation	45
3.2.8 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	45
3.3 Protein- und lipidbiochemische Methoden	45
3.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	45
3.3.2 Western-Blot	46
3.3.3 Stripping der Membran	47
3.3.4 Immunpräzipitation	47

3.3.5 Herstellung von immobilisierten GST-Fusionsproteinen	48
3.3.6 Herstellung von immobilisierten His <sub>6</sub> -Fusionsproteinen	48
3.3.7 Herstellung von immobilisierten MBP-Fusionsproteinen und seine Elution von der Matrix	49
3.3.8 Pulldown-Experiment	49
3.3.9 <i>In vitro</i> Kinase-Assay	49
3.3.10 Analyse des gesamten Sterols mittels Gaschromatographie (GLC) und Massenspektroskopie (MS)	50
3.3.11 Analyse des Ergosterolesters und des freien Ergosterols mittels Dünnschichtchromatographie (DC)	51
<b>3.4 Hefe-Methoden</b>	<b>52</b>
3.4.1 Herstellung kompetenter Hefezellen	52
3.4.2 Hefe-Transformation	52
3.4.3 Herstellung eines Zelllysats aus Hefezellen	53
3.4.4 TCA-Fällung von Hefeproteinen	53
3.4.5 Isolierung chromosomaler Hefe-DNA	54
3.4.6 Markierung und Deletion von Genen durch homologe Rekombinationen	54
3.4.6.1 Deletion	55
3.4.6.2 C-terminale Markierung	56
3.4.6.3 N-terminale Markierung mit dem <i>GALI</i> -Promotor	57
3.4.7 Integration eines Plasmides in das Hefegenom	58
3.4.8 Herstellung von Verdünnungsreihen	60
3.4.9 Fluoreszenz-Mikroskopie von Hefezellen	60
3.4.10 Analyse des filamentösen Wachstums von haploiden Hefezellen	61
3.4.11 Split-Ubiquitin-Technik	61
<b>4. Ergebnisse</b>	<b>64</b>
4.1 Regulation der Sterolsynthese und Sterolestersynthese durch Ste20 und Cla4	64
4.1.1 Analyse von Gesamtsterolen mit GLC/MS	64
4.1.1.1 Die Sterolmenge erhöhte sich in <i>ste20Δ</i> - oder <i>cla4Δ</i> -Mutanten	64
4.1.1.2 Erniedrigte Sterolmengen nach <i>STE20</i> Überexpression	65
4.1.1.3 Sterolmengen änderten sich nicht durch Behandlung mit $\alpha$ -Faktor	66
4.1.2 <i>are1Δ</i> -, <i>are2Δ</i> - und <i>are1Δare2Δ</i> -Stämme haben Zellpolaritätsdefekte	67
4.1.2.1 Herstellung und Bestätigung von <i>are1Δ</i> -, <i>are2Δ</i> - und <i>are1Δ are2Δ</i> -Stämmen	67
4.1.2.2 Analyse des apikalen Wachstums in <i>are1Δ</i> -, <i>are2Δ</i> - und <i>are1Δare2Δ</i> -Stämmen	68
4.1.3 Analyse der Interaktion zwischen Ste20 und den Sterolestersynthasen Are1 und Are2	70
4.1.3.1 Herstellung von immobilisiertem GST-Protein und GST-Ste20-Fusionsprotein	70
4.1.3.2 C-terminale Markierung von Are1 durch 9myc	71
4.1.3.3 5'-terminale Modifizierung von <i>ARE1</i> und <i>ARE2</i> durch einen induzierbaren <i>GALI</i> -Promotor	72
4.1.3.4 Pulldown-Experiment mit Ste20 und Are1 bzw. Are2	73
4.1.4 Analyse der Interaktion zwischen Ste20 und Are2 <sup>1-215</sup>	74
4.1.4.1 Klonierung des <i>ARE2</i> <sup>1-215</sup> -Fragmentes in den pMal-c2x-Vektor	75
4.1.4.2 Aufreinigung von MBP und MBP-Are2 <sup>1-215</sup>	76
4.1.4.3 Pulldown-Experiment mit rekombinantem GST-Ste20 und MBP-Are2 <sup>1-215</sup>	77
4.1.4.4 Analyse der <i>in vitro</i> Phosphorylierung von Are2 <sup>1-215</sup> durch Ste20	78
4.1.5 Regulation der Ergosterolester-Synthese durch Ste20 und Cla4	79
4.1.5.1 Ergosterolester und freies Ergosterol in <i>ste20Δ</i> - oder <i>cla4Δ</i> -Mutanten	80

4.1.5.2 Ergosterolester in Zellen mit überexprimiertem <i>STE20</i> oder <i>CLA4</i>	81
4.2 Die Regulation der Sterolaufnahme durch PAKs	82
4.2.1 Analyse der Interaktionen zwischen Sut1 und Cla4 und Skm1	82
4.2.2 Analyse der Kernlokalisierung von PAKs	84
4.2.2.1 Analyse der Kernlokalisierung von Ste20	84
4.2.2.2 Analyse der Kernlokalisierung von Skm1	88
4.2.2.3 Analyse der Kernlokalisierung von Cla4	90
4.2.3 Analyse der Funktion der Kernlokalisierung von Ste20	91
4.2.3.1 Analyse der Funktion der Kernlokalisierung von Ste20 beim filamentösen Wachstum und bei der Paarung	92
4.2.3.2 Analyse der Funktion der Kernlokalisierung von Ste20 in der letalen Doppelmutante <i>ste20Δ cla4Δ</i>	93
4.3 Ste20 und Vma13	94
4.3.1 Analyse des Polaritätsdefektes in den Deletionsstämmen <i>vma2Δ</i> , <i>vma3Δ</i> und <i>vma13Δ</i>	94
4.3.2 Analyse der genetischen Interaktion zwischen <i>STE20</i> und <i>VMA13</i>	96
4.3.3 Analyse der Signalwege des durch <i>VMA13</i> -Deletion induzierten hyperinvasiven Wachstums	97
4.3.4 Analyse des Wachstums der <i>tpk2Δ vma13Δ</i> -Mutante	98
4.3.5 Analyse des Wachstums von Mutanten auf Platten mit hoher $Ca^{2+}$ -Konzentration und hohem pH-Wert	99
4.3.6 Analyse der Interaktion zwischen Vma13 und Cla4 sowie Skm1 mit der Split-Ubiquitin-Technik	100
4.3.6.1 Herstellung des Cla4-Cub-Konstruktes und des Skm1-Cub-Konstruktes	100
4.3.6.2 Analyse der Interaktion zwischen Vma13 und Cla4 bzw. Skm1	101
4.3.7 Analyse der genetischen Interaktionen zwischen <i>VMA13</i> und <i>CLA4</i> bzw. <i>SKM1</i>	103
<b>5. Diskussion</b>	<b>104</b>
5.1 Regulation der Sterolsynthese und Sterolveresterung durch Ste20 und Cla4	104
5.2 Regulation der Sterolaufnahme durch die PAK-Kinasen Ste20, Cla4 und Skm1	108
5.2.1 Ste20, Cla4 und Skm1 interagieren mit Sut1	108
5.2.2 Ste20, Cla4 und Skm1 lokalisieren im Zellkern	108
5.2.3 PAKs regulieren sowohl die Expression von Genen, die eine Rolle bei der Sterolaufnahme spielen, als auch die Sterolaufnahme	110
5.2.4 Die Regulation der Expression von Genen für die Sterolaufnahme durch Ste20 hängt nicht von dem MAPK-Signalweg ab	111
5.3 PAKs regulieren die Zellpolarität auch durch die Regulation der Sterolhomöostase	113
5.4 Ste20 reguliert die Aktivität der V-ATPase	114
5.4.1 Ste20 interagiert mit Vma13	114
5.4.2 Hyperinvasives Wachstum von <i>vma13Δ</i> -Mutanten	114
5.4.3 Das hyperinvasive Wachstum der <i>vma13Δ</i> -Mutante hängt sowohl von dem MAPK-Signalweg mit Ste20 als auch von dem cAMP-PKA-Signalweg mit Tpk2 ab	116
5.4.4 Regulation der Aktivität der V-ATPase durch Ste20	117
5.4.5 Regulation der V-ATPase durch Tpk2, Skm1 und Cla4	120
5.4.6 Lokalisation von Ste20 an Vakuolen?	121
5.5 Neue Funktionen von PAKs	121
<b>6. Literaturverzeichnis</b>	<b>123</b>
<b>7. Anhang</b>	<b>135</b>
7.1 Abkürzungsverzeichnis	135
7.2 Danksagung	137

## 1. Zusammenfassung

Die p21-aktivierten Kinasen (PAKs) spielen eine wichtige Rolle bei der Polarisierung von Zellen. Die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* exprimiert drei PAKs: Ste20, Cla4 und Skm1. Das Ziel der Arbeit war die Charakterisierung neuer Funktionen dieser PAKs. In einem Screen wurden zuvor Erg4, Cbr1, Ncp1, Sut1 und Vma13 als Interaktoren von Ste20 identifiziert.

Erg4, Cbr1 und Ncp1 spielen wichtige Rollen bei der Sterolbiosynthese. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Ste20 und Cla4 einen negativen Einfluss auf die Sterolbiosynthese haben. Außerdem hemmt Cla4 die Bildung von Sterolestern, der Speicherform dieser Lipide. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass die beiden Sterolestersynthasen Are1 und Are2 eine Funktion beim polaren Wachstum von Knospen besitzen. Ste20 phosphoryliert Are2 und bindet sowohl an Are1 als auch an Are2. Ste20 und Cla4 spielen also eine wichtige Rolle im Bezug auf die Sterolsynthese und die Sterolveresterung.

Sut1 ist ein Transkriptionsfaktor, der an der Sterolaufnahme beteiligt ist und ausschließlich im Zellkern lokalisiert. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass auch Cla4 und Skm1 mit Sut1 einen Komplex bilden. Weiter wurde demonstriert, dass alle PAKs im Zellkern lokalisieren können. Für Ste20 und Skm1 wurden Kernimportsignale identifiziert. Die Mutation des Kernimportsignals von Ste20 ergab, dass die Kernlokalisierung von Ste20 für die Regulation von Sut1, aber nicht für die Aktivierung verschiedener Mitogen aktivierter Protein-Kinase (MAPK)-Signalwege durch Ste20 wichtig ist.

Vma13 ist eine Untereinheit und ein wichtiger Regulator der V-ATPase. Die V-ATPase ist für die Ansäuerung von Organellen, insbesondere der Vakuole, die den Lysosomen höherer Eukaryoten entspricht, wichtig. Die Deletion von *STE20* fördert den Wachstumsdefekt der *vma13Δ*-Mutante. Dies deutet auf gemeinsame Funktionen von Ste20 und Vma13 hin. Zellen mit defekter V-ATPase, wie z.B. in der *vma13Δ*-Mutante, weisen ein extrem starkes filamentöses Wachstum auf. Die Ursache hierfür ist wahrscheinlich die Unfähigkeit dieser Zellen, Nährstoffe effizient zu speichern und zu mobilisieren. Dieses verstärkte polare Wachstum hängt von Ste20 und Tpk2, einer der drei Protein Kinasen A (PKAs) in Hefe, ab. Wahrscheinlich reguliert Ste20 die Aktivität der V-ATPase über Vma13. Dies deutet darauf hin, dass Ste20 die Aktivität der V-ATPase durch die Interaktion mit Vma13 regulieren kann. Durch Ste20 könnten Nährstoffe demnach besser mobilisiert werden. Dies ist für polares Wachstum von großer Bedeutung.

Die Ergebnisse dieser Arbeit tragen dazu bei, die diversen Funktionen der PAKs besser verstehen zu können, und deuten auf bisher unbekannte Funktionen dieser hin.



## 1. Abstract

p21-activated kinases (PAKs) play an important role in polarized cell growth. The yeast *Saccharomyces cerevisiae* expresses only three PAKs: Ste20, Cla4 and Skm1. The aim of this work is the characterization of new functions of these PAKs. A previous screen has identified Erg4, Cbr1, Ncp1, Sut1 and Vma13 as interactors of Ste20.

Erg4, Cbr1 and Ncp1 play important roles in sterol biosynthesis. In this work it was shown, that Ste20 and Cla4 function as negative modulators of sterol biosynthesis. Moreover, Cla4 has a negative effect on the formation of sterolesters, the storage form of sterols. In addition, the yeast sterolester synthases Are1 and Are2 were shown to have a function in apical bud growth. Ste20 phosphorylates Are2 and binds both Are1 and Are2. Thus Ste20 and Cla4 play an important role in the biosynthesis of sterol and sterolester.

Sut1 is a transcriptional regulator that promotes sterol uptake and localizes only to the cell nucleus. In this work it was demonstrated, that Cla4 and Skm1 also form a complex with Sut1. Furthermore, all three PAKs can localize to the cell nucleus. Nuclear localization signals were identified in Ste20 and Skm1. The mutation of the nuclear localization signal of Ste20 showed, that the regulation of Sut1 but not the regulation of Ste20-dependent mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathways depends on the nuclear localization of Ste20.

Vma13 is a subunit and important regulator of the vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase (V-ATPase). The V-ATPase is important for the acidification of organelles, in particular of vacuoles, which are equivalent to lysosomes of higher eukaryotes. Deletion of *STE20* enhances the growth defect of *vma13Δ* cells, suggesting that both genes may be involved in the same process. Cells with defect V-ATPases, such as in *vma13Δ* mutants, exhibit increased filamentous growth, possibly because these cells fail to store and mobilize nutrients efficiently in the vacuole in the absence of V-ATPase activity. This increased polarized growth depends not only on Ste20 but also on Tpk2, one of the three protein kinases A (PKAs) in yeast. Ste20 possibly regulates the activity of the V-ATPase through Vma13. Nutrients can thus be better mobilized through Ste20, which is important for polarized growth.

The results of this work contribute to a better understanding of the diverse functions of the PAKs and indicate their new functions.

## 2. Einleitung

### 2.1 Cdc42 spielt eine zentrale Rolle bei der Zellpolarität

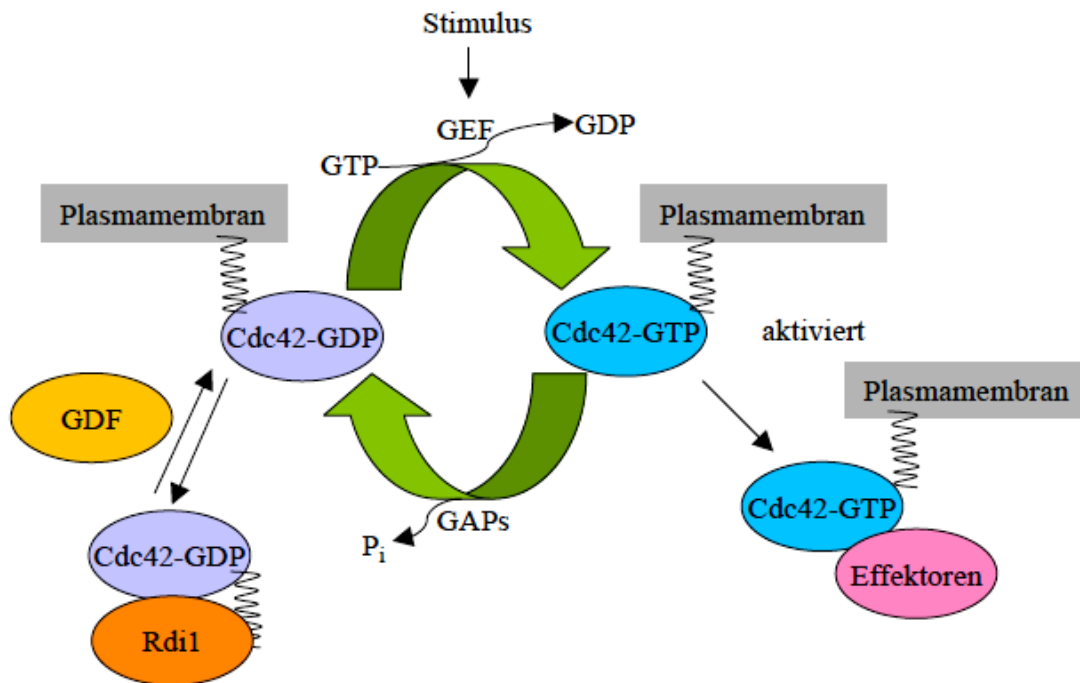
Polares Wachstum und Zellpolarität sind bei fast allen Eukaryoten zu beobachten und sind beispielsweise wichtig für die Differenzierung und die Morphogenese. Aus Untersuchungen verschiedener Organismen und Zelltypen wird immer klarer, dass die molekularen Mechanismen der Zellpolarisierung von Hefezellen bis zum Menschen konserviert sind. Kleine Rho-GTPasen spielen dabei eine besonders wichtige Rolle (Etienne-Manneville, 2004; Jaffe und Hall, 2005). Diese gehören zu der Unterfamilie der Ras-GTPasen. Im Säuger genom wurden bis jetzt 22 Rho-GTPasen beschrieben (Aspenstrom et al., 2004) und in Hefezellen gibt es lediglich 6 Rho-GTPasen: Rho1, Rho2, Rho3, Rho4, Rho5 und Cdc42 (Park und Bi, 2007). Cdc42 spielt eine sehr wichtige Rolle bei der Etablierung und Aufrechterhaltung von Zellpolarität (Etienne-Manneville, 2004). Nach der Entdeckung von Cdc42 in Hefe wurden Cdc42-Homologe auch in vielen anderen Organismen identifiziert. Nicht nur die Sequenz, sondern auch Funktionen von Cdc42 sind von Hefezellen bis zum Menschen stark konserviert (Adams et al., 1990; Johnson, 1999).

Obwohl es viele Varianten von polarem Wachstum gibt, folgt es einem gemeinsamen Schema. Zuerst markiert ein Signalmolekül die Stelle des polaren Wachstums. Weitere Signalmoleküle versammeln sich dort und leiten die räumliche Information an andere Komponenten des polaren Wachstums weiter. Das Zytoskelett wird dann polar organisiert, was für die gezielte Sekretion von Molekülen in Richtung des polaren Wachstums und für die Verstärkung des weiteren polaren Wachstums sehr wichtig ist (Park und Bi, 2007).

#### 2.1.1 Regulation von Cdc42

Wie andere regulatorische GTPasen liegt Cdc42 mit GTP in einem aktiven Zustand vor und ist inaktiv, wenn Cdc42 an GDP bindet (Jaffe und Hall, 2005). Die Aktivierung von Cdc42 wird durch Cdc24 katalysiert, den einzigen bekannten Guaninnukleotid-Austausch-Faktor (GEF) für Cdc42 in der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* (Zheng et al., 1994). Dagegen wird Cdc42 durch Bem3, Rga1, Rga2 und vielleicht auch Bem2 inaktiviert, die zu den GTPase-aktivierenden Proteinen (GAP) gehören (Zheng et al., 1994; Stevenson et al., 2005; Gladfelder et al., 2002; Smith et al., 2002). Rdi1, der einzige bekannte Rho-GDP-

Dissoziationsinhibitor in *S. cerevisiae*, inhibiert die Dissoziation des GDPs von Cdc42 (Masuda, et al., 1994; Park und Bi, 2007). Es konnte aber auch gezeigt werden, dass Rdi1 das GTP-bindende Cdc42 von der Plasmamembran besser als das GDP-bindende Cdc42 extrahieren kann (Tiedje, et al., 2008). Die Regulation der Aktivität von Cdc42 ist in Abbildung 2.1 zusammengefasst.



**Abbildung 2.1:** Regulation von Cdc42. Cdc42 besteht aus 191 Aminosäuren. Eine C-terminale polybasische Sequenz ( $^{183}\text{KKSKK}^{187}$ ) und ein durch einen hydrophoben Geranylgeranylrest modifiziertes Cystein ( $^{188}\text{CAIL}^{191}$ ) ermöglichen nicht nur die Membranlokalisation von Cdc42, sondern auch die Bindung von Cdc42 an Rdi1, das Cdc42-GDP von der Membran ins Zytosol bringt (Ziman et al., 1993). Ein GDF (GDI-Dissoziationsfaktor) für Cdc42-Rdi1 ist bis jetzt noch nicht identifiziert worden. Die Abbildung basiert auf einer Darstellung aus Jaffe und Hall (2005).

### 2.1.2 Regulation des polaren Wachstums durch Cdc42

Die Bäckerhefe *S. cerevisiae*, die beim normalen Wachstum Knospen bildet und deswegen auch als Knospungs-Hefe bezeichnet wird, dient als ein besonders attraktiver Modellorganismus bei der Untersuchung des polaren Wachstums. Einerseits zeigen die Hefezellen *S. cerevisiae* ein ausgeprägtes polares Wachstum, andererseits ist die genetische Manipulation von *S. cerevisiae* relativ einfach. *S. cerevisiae* hat drei Typen von Zellen: haploide  $a$ - und  $\alpha$ -Zellen und diploide  $a/\alpha$ -Zellen (Herskowitz, 1988). Außerdem sind drei

Typen von polarem Wachstum zu beobachten: die Knospung während des normalen Zellzyklus, die Bildung von Paarungsprojektionen bei der Paarung und das filamentöse Wachstum induziert durch Nährstoffmangel.

Sowohl haploide Zellen als auch diploide Zellen können knospen, wenn sie eine bestimmte Größe in der späten G<sub>1</sub>-Phase erreicht haben. Zuerst muss eine Stelle festgelegt werden, an der die Knospung stattfindet. Haploide Zellen und diploide Zellen haben unterschiedliche Knospungsmuster. Haploide Zellen bilden Knospen direkt neben der Stelle, wo die letzte Knospung stattgefunden hat und eine Knospungsnarbe hinterlassen hat (Abbildung 2.2). Dieses axiale Knospungsmuster gilt sowohl für die Mutterzelle als auch für die Tochterzelle. Dagegen haben diploide Hefezellen ein bipolares Knospungsmuster. Ihre Tochterzellen knospen fast ausschließlich an der entgegengesetzten Stelle der letzten Knospungsnarbe während ihre Mutterzellen direkt neben der letzten Knospungsnarbe oder an der entgegengesetzten Stelle der letzten Knospungsnarbe eine neue Zelle bilden können (Park und Bi, 2007).

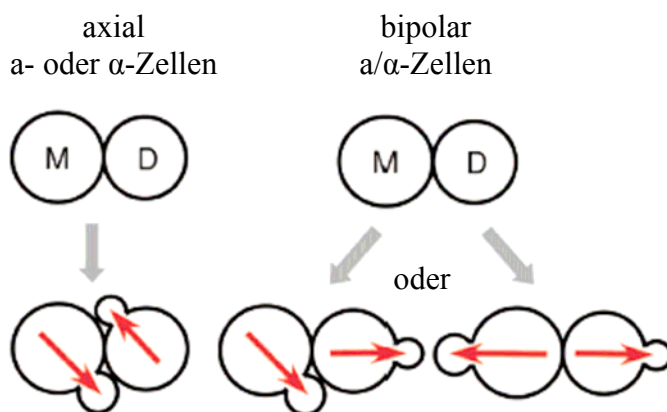
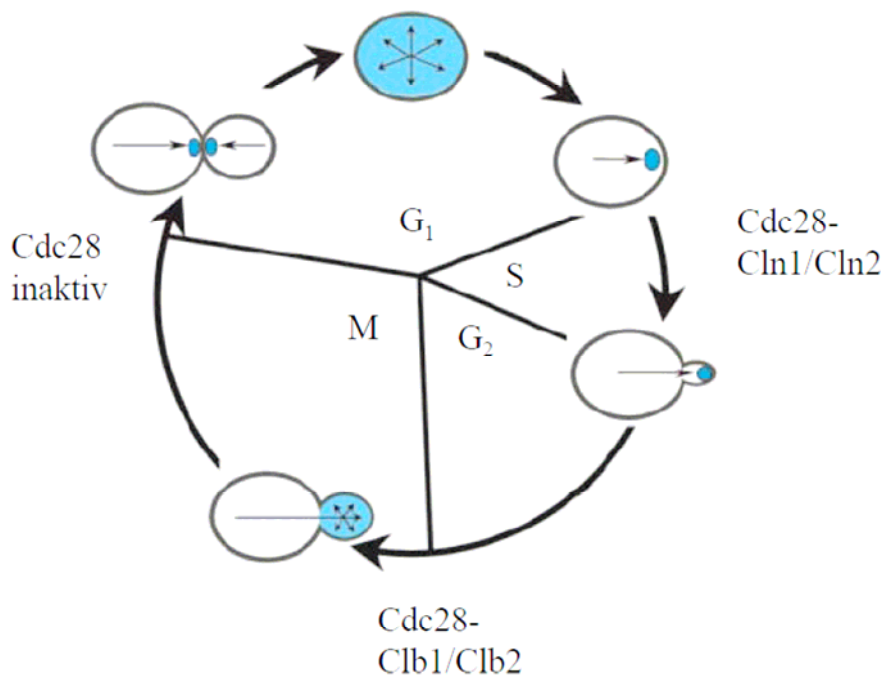


Abbildung 2.2: Haploide und diploide Zellen von *S. cerevisiae* haben unterschiedliche Knospungsmuster. Haploide Zellen weisen ein axiales Knospungsmuster auf und diploide Zellen knospen bipolar. Die Achsen des polaren Wachstums sind durch rote Pfeile gekennzeichnet. M bezeichnet Mutterzellen und D bezeichnet Tochterzellen. Die Abbildung stammt aus Park und Bi (2007).

Nach der Festlegung der Knospungsstelle wird diese durch Rsr1 markiert, eine GTPase der Ras-Familie. Anschließend werden Proteine wie Cdc42 an dieser Stelle aktiviert und/oder angereichert, so dass diese die Polarisierungssignale weiter leiten können. Daraus resultiert eine polarisierte Organisation des Aktinzytoskeletts, Sekretion in Richtung des polaren Wachstums und die Biosynthese der Zellwand. (Park und Bi, 2007). Die neu entstandene Knospe wächst zuerst apikal und dann isotrop. Dementsprechend lokalisieren aktivierte

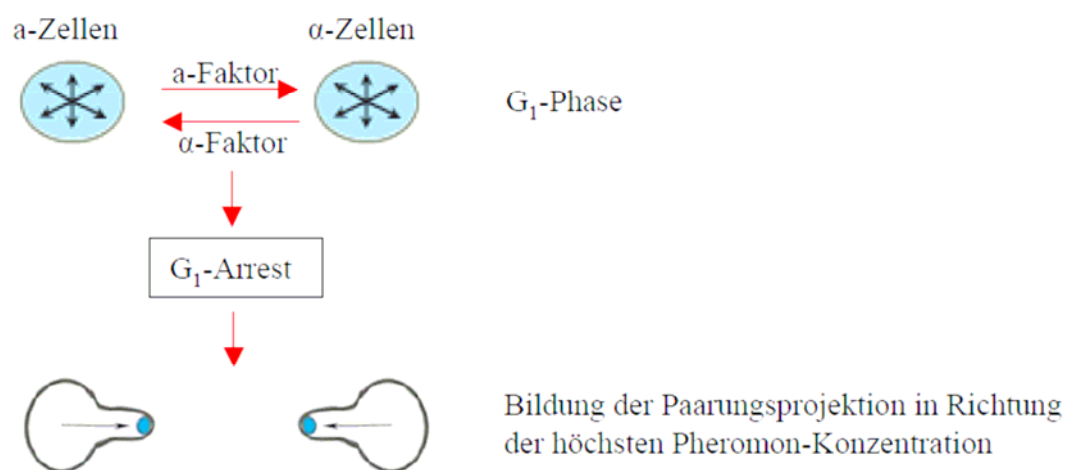
Cdc42-Moleküle zuerst an der Stelle der Knospung und sind später an der ganzen Membran der Knospe verteilt. Die Änderung der Lokalisation von aktivierten Cdc42-Molekülen wird durch Cdc28 reguliert, eine wichtige Cyclin-abhängige Kinase in *S. cerevisiae*. (Pruyne und Bretscher, 2000). Während der G<sub>1</sub>-S-Phase fördert die Bindung von Cdc28 mit den G<sub>1</sub>-Cyclinen Cln1 und Cln2 die Polarisierung des Zytoskeletts und die Entstehung von Knospen, die zunächst apikal wachsen. In der G<sub>2</sub>-M-Phase treten B-Cycline Clb1 und Clb2 auf, die Cln1 und Cln2 entgegenwirken. Daraus resultiert die Depolarisation von Aktin und damit isotropes Wachstum. Am Ende des Zellzyklus wird Cdc28 durch den Abbau von Cyclinen inaktiviert und Cdc42 und das Aktinzytoskelett polarisieren vorübergehend an der Stelle der Zytokinese (Abbildung 2.3).



**Abbildung 2.3:** Cdc28 reguliert die Lokalisation von Cdc42 während des Zellzyklus. Die Lokalisation von aktiviertem Cdc42 beeinflusst das polare Wachstum von *S. cerevisiae*. Die Verteilung von Cdc42 ist mit blauer Farbe markiert. Die Abbildung stammt aus Pruyne und Bretscher (2000).

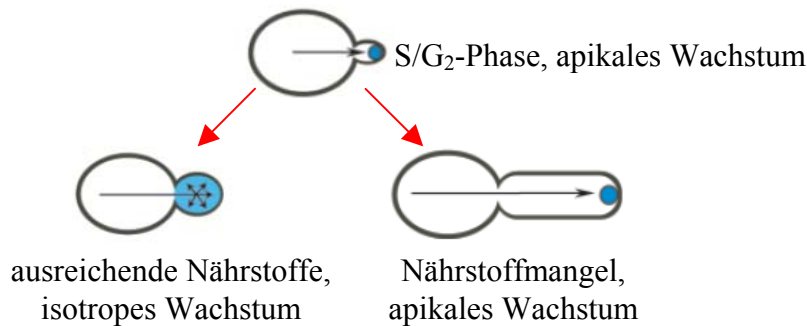
Die zweite Form polaren Wachstums in *S. cerevisiae* ist die Paarung, die durch externe Signale induziert wird. Die Paarung findet nur zwischen unterschiedlichen Paarungstypen von haploiden Hefezellen statt. Die haploiden a-Zellen produzieren den a-Faktor und die haploiden  $\alpha$ -Zellen produzieren den  $\alpha$ -Faktor. Der a-Faktor kann von dem a-Faktor-Rezeptor Ste3 der  $\alpha$ -Zellen gebunden werden während der  $\alpha$ -Faktor von dem  $\alpha$ -Faktor-Rezeptor Ste2 der

a-Zellen gebunden werden kann. Beide Bindungen lösen eine Aktivierung eines G-Protein-Heterotrimers aus, das an den Rezeptor bindet. Dadurch wird die  $G_{\beta\gamma}$ -Untereinheit des G-Protein-Heterotrimers freigesetzt und es führt weiter zur Membranlokalisierung von Far1, einer Polaritätsdeterminante (Butty et al., 1998). Aus der Zusammenlagerung der  $G_{\beta\gamma}$ -Untereinheit und Far1 resultiert die Assemblierung von Bem1, Cdc42, Cdc24 und Ste20. Die Aktivierung von Ste20 löst dann viele zelluläre Prozesse aus, wie z.B. transkriptionelle Induktion von Genen für die Paarung,  $G_1$ -Arrest und die Entstehung von Paarungsprojektionen (Johnson, 1999; Pryne und Bretscher, 2000). Im Gegensatz zu der vorgegebenen Stelle der Knospung während der Mitose wird der Ort einer entstehenden Paarungsprojektion durch den Konzentrationsgradient von Pheromon bestimmt (Pruyne und Bretscher, 2000). Die Bildung der Paarungsprojektionen in Richtung des anderen Paarungstypen ermöglicht den Kontakt und die Fusion der Paarungspartner (Abbildung 2.4).



**Abbildung 2.4:** Polarisierung von Cdc42 durch einen Pheromongradienten. Ein Pheromon des anderen Paarungstypen induziert die polare Verteilung von Cdc42. Die Verteilung von Cdc42 ist mit blauer Farbe wiedergegeben. Die Richtung des Wachstums (mit schwarzen Pfeilen gekennzeichnet) hängt von der Verteilung von Cdc42 ab. Abbildung verändert nach Pruyne und Bretscher (2000) und Park und Bi (2007).

Nährstoffmangel führt sowohl in haploiden als auch in diploiden Zellen von *S. cerevisiae* zu filamentösem Wachstum (Abbildung 2.5), das durch die Bildung von verlängerten Zellen, zunehmende Adhäsion der Zellen und das Wachstum von Zellen in die Agar-Palatte gekennzeichnet ist (Gimeno et al., 1992; Roberts und Fink, 1994).



**Abbildung 2.5:** Verlängertes apikales Wachstum durch Nährstoffmangel. Aus der polaren Verteilung von Cdc42 resultiert die Bildung von langen Zellen. Die Verteilung von Cdc42 ist durch blaue Farbe wiedergegeben. Die Richtung des Wachstums (mit schwarzen Pfeilen gekennzeichnet) hängt von der Verteilung von Cdc42 ab. Abbildung verändert nach Pruyne und Bretscher (2000).

Das filamentöse Wachstum von haploiden Zellen wird auch invasives Wachstum genannt, da Zellen unter bestimmten Bedingungen in Agar-Platten hineinwachsen können. Es konnte gezeigt werden, dass nach Glukose-Entzug das invasive Wachstum haploider Zellen induziert werden kann (Cullen und Sprague, 2000). Stickstoffmangel führt in diploiden Zellen zu filamentösem Wachstum und wird auch als Pseudohyphen-Wachstum bezeichnet (Gimeno et al., 1992). Einige Plasmamembranproteine wie z.B. Sho1, Msb2, Mep2 und Gpr1 fungieren als Sensoren für Nährstoffe (Lorenz und Heitman, 1998; Lorenz et al., 2000; Tamaki et al., 2000; Cullen et al., 2004). Auf einer bis jetzt noch unbekanntem Weise übertragen die Sensor-Proteine Signale auf zumindest zwei Signalwege: ein durch Ste20 aktivierter MAPK-Signalweg und ein cAMP-abhängiger PKA (Proteinkinase A)-Signalweg. Möglicherweise übertragen die Sensor-Proteine Signale auf Ras, welches eine Signalkaskade aus Cdc42, Ste20, der MAPK Kinase Kinase Ste11, der MAPK Kinase Ste7 und der MAPK Kss1 aktiviert (Roberts und Fink, 1994; Mösch et al. 1996). Ras2 aktiviert außerdem die Adenylatcyclase Cyr1, welche die Produktion von cAMP stimuliert (Toda et al., 1985). Die Bindung von cAMP an Bcy1, die inhibitorische Untereinheit von PKA, setzt die katalytischen PKA-Untereinheiten Tpk1, Tpk2 und Tpk3 frei (Toda et al., 1987a; Toda et al., 1987b). Tpk2 ist ein wichtiger Aktivator des filamentösen Wachstums während Tpk1 und Tpk3 als Inhibitoren funktionieren (Robertson und Fink, 1998; Pan und Heitman, 1999). Es wurde zusätzlich berichtet, dass die Aktivierung des MAPK-Signalweges und des cAMP-abhängigen PKA-Signalweges durch Sensor-Proteine unabhängig von Ras2 erfolgen kann. (Xue et al., 1998; Lu und Hirsch, 2005; Peeters et al., 2006). Die Stimulation des MAPK-Signalweges für filamentöses Wachstum durch den Sho1-Msb2-Komplex hängt beispielsweise nicht von Ras2 ab (Cullen et al., 2004). Zwei weitere Signalwege spielen ebenfalls eine Rolle beim filamentösen Wachstum. Der TOR-Signalweg reguliert die Expression von Genen, deren

Transkriptionen durch Nährstoffmangel induziert werden (Beck und Hall, 1999; Rep et al., 2000; Rep et al., 1999). Die 5'-AMP-abhängige Kinase Snf1 des Glukose-Repressionssignalweges spielt ebenfalls eine Rolle beim filamentösen Wachstum (Cullen und Sprague, 2000; Kuchin et al., 2002).

## **2.2 Die Effektoren von Cdc42**

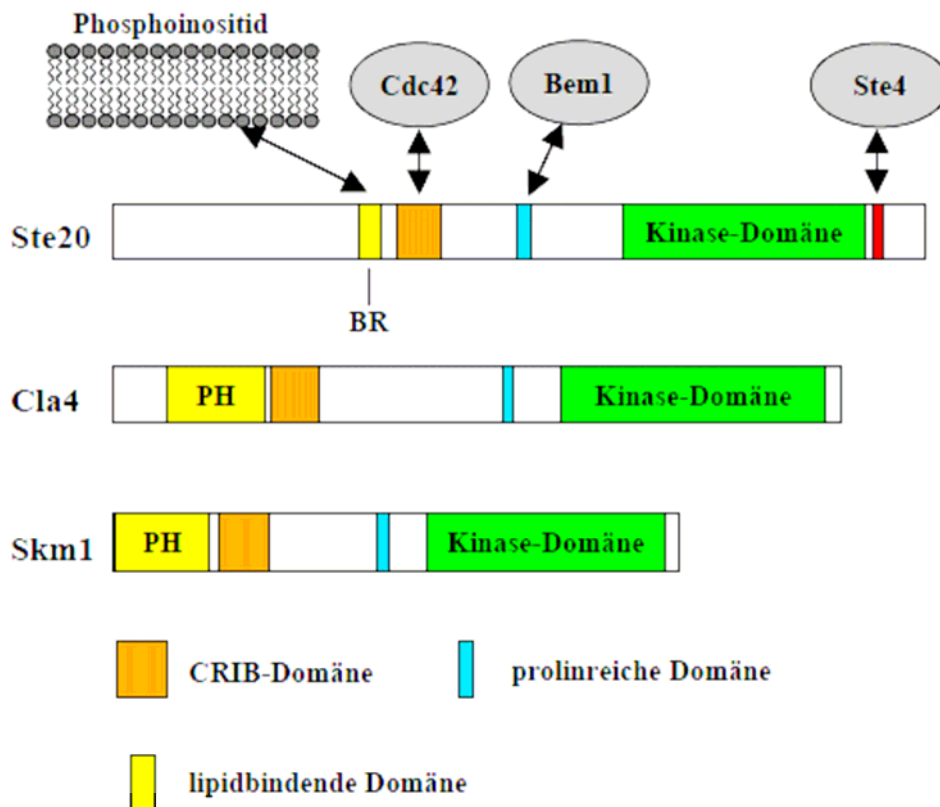
Cdc42 hat viele Funktionen wie z.B. die Regulation des Aktinzytoskeletts, der Genexpression, des Zellzyklus, der Zellmorphogenese. Es ist deswegen vorstellbar, dass Cdc42 seine vielen Funktionen durch zahlreiche Effektoren ausübt (Jaffe und Hall, 2005). Es muss aber erwähnt werden, dass die Mechanismen der Signaltransduktion durch Interaktionen zwischen Cdc42 und seinen Effektoren noch nicht vollständig verstanden sind (Johnson, 1999).

### **2.2.1 p21-aktivierte Kinasen (PAKs)**

#### **2.2.1.1 Die Lokalisation und wichtige Domänen von PAKs**

Es gibt in Hefezellen drei verschiedene PAKs: Ste20, Cla4 und Skm1. Cdc42 rekrutiert Ste20 und Cla4 vom Zytosol und aktiviert sie an der Stelle polaren Wachstums. Deswegen lokalisieren Ste20 und Cla4 an der Spitze von Knospen und Paarungsprojektionen. (Peter et al., 1996; Leberer et al., 1997; Holly und Blumer, 1999). Der Mechanismus der Aktivierung von Ste20 durch Cdc42 wurde am besten charakterisiert. Da alle drei PAKs strukturell ähnlich sind (Abbildung 2.6), werden Cla4 und Skm1 wahrscheinlich über einen vergleichbaren Mechanismus durch Cdc42 reguliert. Alle drei Cdc42-Effektoren enthalten eine Cdc42/Rac-Interaktion/Bindung-Domäne (CRIB-Domäne) (Abbildung 2.6), welche ein minimaler Bereich für die Bindung mit Cdc42 ist. Durch Punktmutationen in der CRIB-Domäne, welche die Interaktion zwischen Ste20 und Cdc42 stören, konnte gezeigt werden, dass diese Interaktion für das filamentöse Wachstum, die Regulation der Osmolarität und die polare Lokalisation von Ste20 wichtig ist (Lamson et al., 2002; Ash et al., 2003). Die CRIB-Domäne von Ste20 bindet an die eigene Kinase-Domäne und hemmt dadurch die Aktivität der Kinase. Diese sogenannte Autoinhibition kann durch die Interaktion zwischen Cdc42 und der CRIB-Domäne von Ste20 aufgehoben werden. Dadurch wird Ste20 in seine aktive Form überführt (Lamson et al., 2002).





**Abbildung 2.6:** Wichtige Domänen von Ste20, Cla4 und Skm1. Alle drei Kinasen besitzen eine Cdc42/Rac-Interaktion/Bindungs-Domäne (CRIB-Domäne), eine C-terminale Kinase-Domäne und eine prolinreiche Domäne (PR-Domäne), die für die Bindung mit Bem1 zuständig ist. Sowohl die basische Domäne (BR-Domäne) von Ste20 als auch die PH-Domäne (pleckstrin homology domain) von Cla4 sind für die polare Lokalisation der Proteine wichtig. Ste20 enthält außerdem am C-Terminus eine Domäne, welche für die Interaktion mit Ste4, der  $G_{\beta}$ -Untereinheit des G-Proteins, benötigt wird.

Eine prolinreiche Domäne von Ste20, die ebenfalls in Cla4 und Skm1 zu finden ist, bindet eine SH3-Domäne von Bem1 (Winters and Pryciak, 2005). Bem1 ist ein Gerüstprotein („scaffold protein“), welches Cdc42, den GEF Cdc24 und entweder Ste20 oder Cla4 binden und in räumliche Nähe zueinander bringen kann (Leeuw et al., 1995; Gulli et al., 2000; Bose et al., 2001; Winters and Pryciak, 2005; Yamaguchi et al., 2007). Dieser Komplex ermöglicht nicht nur eine effiziente Aktivierung von PAKs, sondern auch eine positive Rückkopplung, welche eine wichtige Rolle bei der Zellpolarisation spielt (Butty et al., 2002, Irazoqui et al., 2003; Wedlich-Söldner et al., 2004).

Die Membranlokalisation von Ste20 und Cla4 wird nicht nur durch Interaktionen zwischen Proteinen verwirklicht, sondern auch durch Interaktionen zwischen Proteinen und Lipiden. Cla4 enthält eine PH-Domäne (pleckstrin homology domain), die auch in Skm1 zu finden ist und an Phosphoinositide bindet (Wild et al., 2004; Martin et al., 1997). Cla4 lokalisiert im

Zytosol, wenn diese PH-Domäne oder die CRIB-Domäne deletiert wird. (Wild et al., 2004). Die Lokalisation von Skm1 wurde nicht beschrieben. Da Skm1 wie Cla4 ebenfalls eine PH-Domäne, eine CRIB-Domäne und eine prolinreiche Domäne enthält, ist es vorstellbar, dass seine Membranlokalisation ähnlich reguliert wird (Martin et al., 1997; Winters and Pryciak, 2005). Ste20 enthält statt einer PH-Domäne eine basische Domäne (BR-Domäne), die für seine polare Lokalisation und Funktion durch Interaktion mit Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (PI[4,5]P<sub>2</sub>) sehr wichtig ist (Takahashi und Pryciak, 2007). Dementsprechend ist PI[4,5]P<sub>2</sub> an der Spitze von Paarungsprojektionen angereichert (Jin et al., 2008).

### 2.2.1.2 Die Funktionen von PAKs

Nach der Aktivierung durch Cdc42 können PAKs eine Reihe von Reaktionen auslösen (Park und Bi, 2007). Während über die Funktionen von Ste20 und Cla4 viel bekannt ist, wurde nur sehr wenig über Skm1 berichtet (Pruyne und Bretscher, 2000).

Ste20, das Gründungsmitglied der PAK-Familie, ist gut charakterisiert. Ste20 spielt eine Rolle bei der bipolaren Knospung von diploiden Zellen und dem apikalen Wachstum von Knospen. Die Knospung in *ste20Δ/ste20Δ*-Mutanten ist unipolar (Sheu et al., 2000; Ni and Snyder, 2001). Wenn das G<sub>1</sub>-Cyclin Cln1 überexprimiert wird, bilden Hefezellen stark verlängerte Knospen wegen des verstärkten apikalen Wachstums (Lew und Reed, 1993). In *ste20Δ*-Mutanten wurden nur sehr wenige Zellen mit solchen verlängerten Knospen beobachtet (Sheu et al., 2000). Sowohl Ste20 als auch Cla4 phosphorylieren das Typ I Myosin Myo3 und die Phosphorylierung ist wichtig für dessen Funktion (Wu et al., 1997). Myo3 ist an der Endozytose und der Polarisierung des Aktins beteiligt, welche für polares Wachstum wichtig sind. Durch ein *in vitro* Aktin-Assemblierung-Experiment konnte gezeigt werden, dass Ste20 und Cla4 bei der Polarisierung von Aktin eine Rolle spielen (Eby et al., 1998).

Ste20 reguliert drei der fünf in Hefen beschriebenen MAPK-Signalwege: die Paarung, das filamentöse Wachstum und den HOG (high osmolarity/glycerol)-Signalweg (Leberer et al., 1992; Liu et al., 1993; Ramer und Davis, 1993; Roberts und Fink, 1994; O'Rourke und Herskowitz, 1998). Der HOG-Signalweg wird durch eine externe hohe Osmolarität induziert. Zellen produzieren mehr Glycerol, um dem hohen osmotischen Stress entgegenzuwirken. In allen drei Signalwegen phosphoryliert und aktiviert Ste20 die MAPK Kinase Kinase Ste11 (Wu et al., 1995; van Drogen et al., 2000). Ste11 stimuliert die MAPK Kinasen Ste7 und Pbs2, die wiederum die MAPKs Fus3, Kss1 und Hog1 entsprechend aktivieren (Abbildung 2.7).

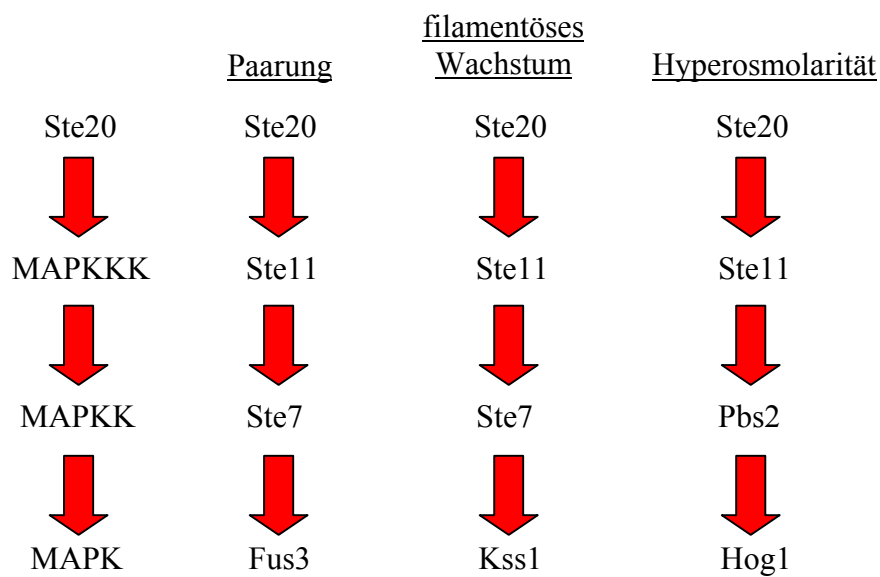


Abbildung 2.7: Bestandteile der drei MAPK-Singalwege in Hefezellen. Ste20 phosphoryliert die MAPK Kinase Kinase Ste11. Ste11 aktiviert Ste7 bei der Paarung und beim filamentösen Wachstum. Als Antwort auf Hyperosmolarität wird Pbs2 durch Ste11 aktiviert. Ste7 aktiviert wiederum Fus3 bei der Paarung und Kss1 beim filamentösen Wachstum. Pbs2 aktiviert Hog1 bei der Hyperosmolarität.

Cla4 könnte auch an der Paarung beteiligt sein. Die *cla4Δ*-Mutante hat eine reduzierte Empfindlichkeit gegenüber Pheromon, welches den Paarungssignalweg auslöst (Chasse et al., 2006). Allerdings wurde Cla4 auch als negativer Regulator des Paarungssignalweges beschrieben, da die Resistenz einer *cdc42*-Mutante gegenüber Pheromon durch Deletion von *CLA4* unterdrückt wird und die Überexpression von *CLA4* die Empfindlichkeit dieser *cdc42*-Mutante gegenüber Pheromon reduziert (Heinrich et al., 2007). Außerdem könnte Cla4 auch an dem HOG-Signalweg beteiligt sein. Cla4 phosphoryliert Ste11 (Keniry und Sprague, 2003). Die Deletion von *STE20* oder *CLA4* reduziert die Induktion des Reporters ( $8\times CRE-lacZ$ ) des HOG-Signalweges. In Mutanten ohne *STE20* und *CLA4* wurde keine Expression von  $8\times CRE-lacZ$  beobachtet (Tatebayashi et al., 2006). Die Regulation von Ste11 durch Ste20 und Cla4 scheint also unabhängig voneinander zu sein.

Cla4 phosphoryliert die mitotischen Septine Cdc3, Cdc10 und Cdc11 (Versele und Thorner, 2004), die zusammen mit zwei anderen mitotischen Septinen Cdc12 und Shs1 viele Funktionen besitzen, wie z.B. bei der Zytokinese und Zellkompartimentierung. Septine einer konditional letalen *ste20Δ cla4Δ*-Mutante mislokalisieren überwiegend an der Spitze der extrem langen Knospen dieser Zellen (Cvrckova et al., 1995; Weiss et al., 2000).

Die Tatsache, dass die *ste20Δ cla4Δ*-Mutante nicht lebensfähig ist, deutet darauf hin, dass beide Proteine überlappende Funktionen besitzen (Cvrckova et al., 1995). Bis jetzt wurde

Skm1 kaum charakterisiert. Die Überexpression von Skm1 führt zur Bildung von Zellen mit vielen Knospen. Dies deutet darauf hin, dass Skm1 eine Rolle bei der Morphologie spielt (Martin et al., 1997).

Ste20 spielt eine wichtige Rolle bei der Zellpolarität und wurde in unserer Arbeitsgruppe intensiv untersucht. Um neue molekulare Mechanismen und neue Funktionen von Ste20 zu identifizieren, wurde in der Arbeitsgruppe ein Screen durchgeführt, um die Interaktoren von Ste20 zu identifizieren. In diesem Screen wurden die Proteine Erg4, Ncp1 und Cbr1 entdeckt, die an der Sterolbiosynthese beteiligt sind. Außerdem wurde der Transkriptionsfaktor Sut1 identifiziert, der die Sterolaufnahme reguliert. Vma13, eine Untereinheit der V-ATPase, wurde ebenfalls in diesem Screen isoliert. Sterolhomöostase und V-ATPase werden deshalb weiter unten im Text beschrieben.

### **2.2.2 Andere Effektoren von Cdc42**

Wie die PAKs enthalten Gic1 und Gic2, zwei weitere Effektoren von Cdc42, ebenfalls eine CRIB-Domäne (Chen et al., 1997; Brown et al., 1997). Beide Proteine binden durch ihre CRIB-Domäne an Cdc42 und sind während des Zellzyklus und der Bildung einer Paarungsprojektion polar verteilt. Sie sind wichtig für viele Prozesse der Polarisierung, wie z.B. Selektion der Knospungsstelle, Entstehung von Knospen und Paarungsprojektionen, Polarisierung des Zytoskeletts (Chen et al., 1997; Brown et al., 1997). Außerdem steht Gic2 unter Zellzyklus-abhängiger Kontrolle (Jaquenoud et al., 1998). Eine polybasische Region in der Nähe zur CRIB-Domäne von Gic2 interagiert mit Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat der Plasmamembran (Orlando et al., 2007). Diese Interaktion, zusammen mit der Interaktion zwischen Cdc42 und Gic2, ist wahrscheinlich für die Funktion und polare Lokalisation von Gic2 verantwortlich. Gic1 und Gic2 können außerdem den Austritt der Zelle aus der Mitose vorantreiben (Höfken und Schiebel, 2004).

Hefezellen exprimieren zwei Formine: Bni1 und Bnr1. Sie spielen eine wichtige Rolle für die Entstehung von Aktinkabeln (Pruyne et al., 2002; Pruyne, et al., 2004; Moseley und Goode, 2006). Bni1 und Bnr1 enthalten jeweils eine GTP-bindende-Domäne (GBD), welche für ihre Interaktion mit Rho-GTPasen wie z.B. Cdc42 wichtig ist (Park und Bi, 2007). Es konnte in Säugern gezeigt werden, dass Formine durch Auto-Inhibition inaktiviert werden. Inhibierte Formine können durch Interaktion mit Rho-GTPasen aktiviert werden (Wallar und Alberts, 2003). Es gibt bis jetzt zwar keinen Beweis dafür, dass Bni1 und Bnr1 ebenfalls durch Auto-Inhibition inaktiviert werden, allerdings konnte gezeigt werden, dass Cdc42 die Aktivität der

Formine in der Anfangsphase der Knospung reguliert. Auch andere Rho-GTPasen, wie Rho1, Rho3 und Rho4, können die Aktivität der Formine regulieren (Dong et al., 2003). Die Mechanismen dieser Regulationen müssen allerdings noch untersucht werden.

### 2.3 Das Ergosterol und seine Homöostase

Da Hefezellen eine ähnliche subzelluläre Struktur wie die Zellen höherer Eukaryoten besitzen und sehr viel über die Biochemie und Molekularbiologie der Lipide von Hefen bekannt ist, werden Hefezellen als ein gutes Modellorganismus für die Analyse der Synthese und des intrazellulären Transportes von Lipiden eingesetzt (Daum et al., 1998).

Die Hauptlipide der Membran von eukaryotischen Zellen sind Phospholipide, Sterole, Sphingolipide und Glycoglycerolipide (Daum et al., 1998). Sterole sind essentielle Bestandteile der eukaryotischen Zellmembran und sind wichtig für die Permeabilität und Fluidität der Membran. Sterol-Mutanten wurden für die Analyse der Wirkung von Sterolen hinsichtlich Permeabilität und Fluidität der Membran eingesetzt (Kleinhans, et al., 1979; Lees et al., 1979). Das Hauptsterol der Hefezellen ist das Ergosterol, das Endprodukt der Sterolbiosynthese in Hefen. Das Ergosterol unterscheidet sich vom Cholesterol der höheren Eukaryoten an drei Stellen. Es gibt eine C-C-Doppelbindung zwischen C-7, 8 und zwischen C-22,23 und eine Methyl-Gruppe am C-24 (Abbildung 2.8).

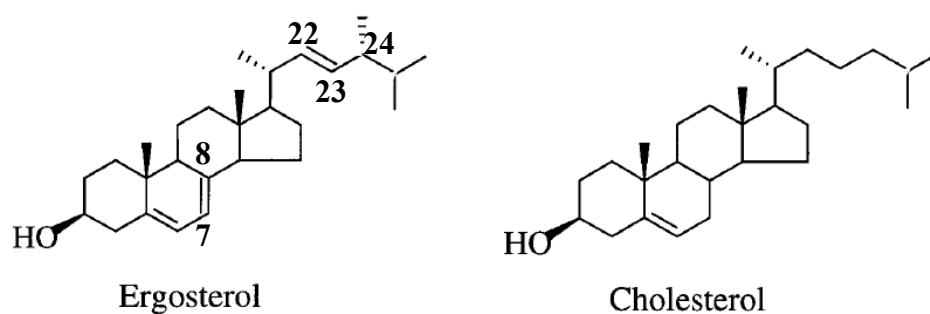


Abbildung 2.8: Ein Vergleich der Strukturen von Ergosterol und Cholesterol. Das Ergosterol hat 28 Kohlenstoffatome im Vergleich zum Cholesterol mit 27 Kohlenstoffatomen. Die Abbildung basiert auf Daum et al. (1998).

Die biochemische Synthese des Ergosterols ist ein sehr komplizierter Prozess mit über 20 Reaktionen, ist aber auf der molekularen Ebene gut charakterisiert (Daum et al., 1998; Lees et al., 1999). Die Synthese läuft grundsätzlich am ER ab, obwohl einige Enzyme der

Ergosterolbiosynthese auch in Lipidpartikeln (siehe Unten) detektiert wurden (Henneberry und Sturley, 2005). Die Synthese des Ergosterols kann in zwei Phasen eingeteilt werden. Die erste Phase wird als der Mevalonat- oder Isoprenoid-Syntheseweg bezeichnet und fängt mit dem Acetyl-CoA an (Daum et al., 1998). Das Endprodukt der ersten Phase ist das Farnesylpyrophosphat, ein wichtiges Produkt, welches als das Ausgangsprodukt für einige wichtige Synthesewege, wie z.B. Chinone und Dolichol, dient (Daum et al., 1998; Weinstein et al., 1986). Die zweite Phase beginnt mit dem Farnesylpyrophosphat und endet mit dem Ergosterol (Abbildung 5.1 in der Diskussion). Die Synthese von Ergosterol wird auf mehreren Ebenen reguliert, sowohl transkriptionell als auch posttranskriptionell (Henneberry und Sturley, 2005). Unter aeroben Bedingungen ist die Sterolbiosynthese die einzige Möglichkeit, Sterole zu erhalten. Obwohl die Sterolbiosynthese ein komplizierter und viel Energie verbrauchender Prozess ist, werden unter aeroben Bedingungen keine Sterole importiert (Lewis et al., 1985). Es wurde früher in der Arbeitsgruppe gezeigt, dass Ste20 mit Erg4, Cbr1 und Ncp1, drei Enzymen der zweiten Phase der Ergosterolbiosynthese interagieren (Tiedje et al., 2007). Erg4 katalysiert den letzten Schritt der Ergosterolbiosynthese. Cbr1 und Ncp1 sind Elektronentransporter und regulieren verschiedene Schritte der zweiten Phase der Ergosterolbiosynthese (Abbildung 5.1 in der Diskussion). *CLA4*, eine weitere PAK-Kinase, interagiert genetisch mit *ERG4* und *NCPI*. Außerdem führt die Deletion von *ERG4* oder *NCPI* zu verschiedenen Polaritätsdefekten. Die konditional letale Mutante *cbr1Δ ncp1-td* bildet bei der restriktiven Temperatur abnormal geformte Knospen. Diese Arbeit deutet auf eine mögliche Regulation der Sterolbiosynthese durch Ste20 und Cla4 hin.

Unter anaeroben Bedingungen müssen Hefezellen aus ihrer Umgebung Sterole aufnehmen, um überleben zu können. Da anaerobe Bedingungen schwer herzustellen sind, werden Analysen der Sterolanfnahme häufig in Mutanten durchgeführt, die Defekte bei der Häm-Synthese haben. Häm ist ein Sensor für Sauerstoff. In der *hem1Δ*-Mutante wird kein Häm gebildet und somit werden dadurch anaerobe Bedingungen imitiert. Deshalb nimmt die *hem1Δ*-Mutante Sterole auch unter aeroben Bedingungen auf (Gollub et al., 1977). Die molekularen Mechanismen der Sterolaufnahme wurden nur sehr schlecht charakterisiert. Es gibt aber Hinweise, dass die durch Rezeptoren vermittelte Sterolaufnahme höherer Eukaryonten keine Rolle bei der Sterolaufnahme in Hefen spielt, da keine orthologen Gene der Säuger in Hefen gefunden wurden (Henneberry und Sturley, 2005). Die Sterolaufnahme in Hefe wird durch die transkriptionellen Regulatoren Sut1, Upc2 und Ecm22, welche zu der Zn(II)2Cys6-Familie der DNA-bindenden Proteine gehören, kontrolliert (Schjerling und Holmberg, 1996). Unter anaeroben Bedingungen induzieren Upc2 und Sut1 die Expression

der ATP-bindenden Kasette-(ABC)-Transporter *AUS1* und *PDR11* und des Zellwand-Mannoproteins *DANI* (Regnacq et al., 2001; Wilcox et al., 2002; Alimardani et al., 2004). Diese Proteine und wahrscheinlich auch andere Faktoren vermitteln die Sterolaufnahme.

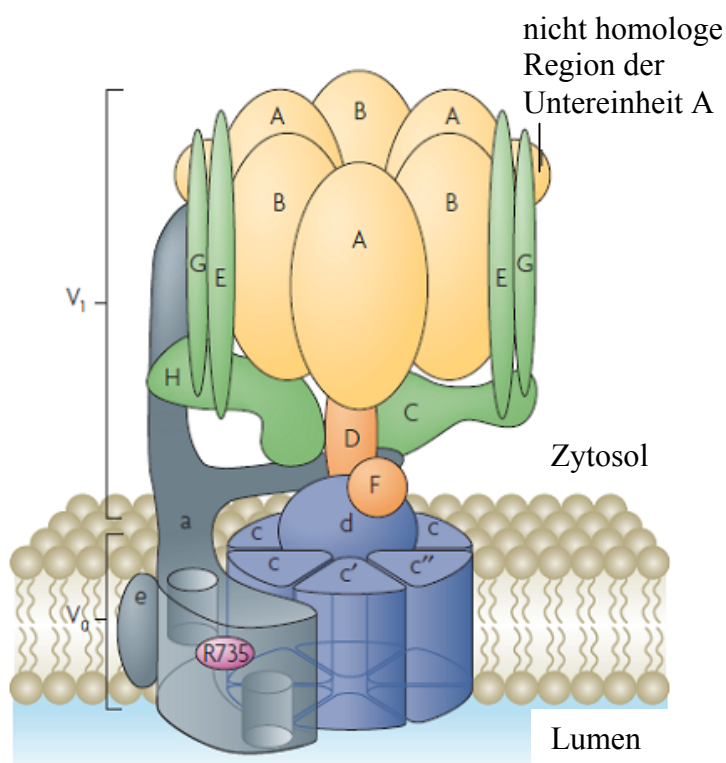
Obwohl Sterole im endoplasmatischen Retikulum (ER) hergestellt werden, befinden sich freie Sterole hauptsächlich in der Plasmamembran (Schneiter et al., 1999). Der Transport von Sterolen vom ER zur Plasmamembran ist schnell, effizient und verbraucht Energie (Kaplan und Simoni, 1985). Allerdings sind die Mechanismen dieses Transportes schlecht charakterisiert (Schulz und Prinz, 2007). Sowohl ein vesikulärer als auch ein nicht vesikulärer Transport könnten beim Steroltransport vom ER zur Plasmamembran eine Rolle spielen (Baumann et al., 2005; Schnabl et al., 2005; Jüschke et al., 2005).

Sterole können verestert werden und als Neutrallipide in Lipidpartikeln gespeichert werden (Zweytick, 2000a). Lipidpartikel befinden sich im Zytoplasma und bestehen aus einem Kern und einer Monoschicht aus Phospholipiden als umhüllende Membran. Der Kern enthält außer dem Sterolester noch das Triacylglycerol, welches mit den Sterolestern in äquivalenten Mengen vorkommt. Die Monoschicht aus Phospholipiden enthält außerdem periphere und integrale Membranproteine (Athenstaedt und Daum, 2006). In Hefezellen wird die Veresterung von Sterolen durch zwei homologe Enzyme katalysiert: Are1 und Are2 (Yang et al., 1996; Yu et al., 1996). Beide Enzyme befinden sich im ER, aber unterscheiden sich in ihrer Regulation und Substratspezifität. Are2 ist die Hauptsynthase von Sterolestern unter aeroben Bedingungen und verestert fast ausschließlich Ergosterol (Yu et al., 1996; Zweytick et al., 2000). Dagegen nimmt die Aktivität von Are1 unter anaeroben Bedingungen zu und Are1 verestert die Zwischenprodukte der Ergosterolsynthese (Yu et al., 1996; Zweytick et al., 2000). Durch Hydrolyse von Sterolestern können Sterole mobilisiert werden. Die erste charakterisierte Hydrolase Yeh2 befindet sich in der Plasmamembran, während die beiden anderen Hydrolasen Yeh1 und Tgl1 in Lipidpartikeln lokalisiert sind (Müller et al., 2005; Köffel et al., 2005; Jandrositz et al., 2005). Da sich die Lipase Yeh2 in der Plasmamembran befindet, können Sterolester auch dort hydrolysiert und Sterole freigesetzt werden. Deswegen spielen Lipidpartikel nicht nur eine Rolle bei der Speicherung sondern auch beim Transport von Sterolen (Schulz und Prinz, 2007).

## 2.4 Die V-ATPase und ihre Untereinheiten

Die Vakuolen der Hefen entsprechen den Lysosomen der Säugetierzellen und den Vakuolen der Pflanzenzellen (Klionsky et al., 1990). Sie sind die sauersten Organellen in Hefezellen und haben einen definierten Satz von Lipiden und Proteinen, die ihre Funktionen z.B. beim Abbau von Proteinen, bei der Speicherung von Metaboliten und bei der Entgiftung unterstützen können (Li und Kane, 2009; Klionsky et al., 1990). Die V-ATPase (vacuolar proton-translocating ATPase) spielt bei der Ansäuerung von Organellen in allen Eukaryoten eine zentrale Rolle (Kane, 2006).

Die V-ATPase der Hefezellen ist ein an der Membran gebundener Proteinkomplex, der aus zwei Domänen besteht (Kane, 2006; Forgac, 2007) (Abbildung 2.9).



**Abbildung 2.9:** Struktur der V-ATPase. Die V-ATPase besteht aus zwei Domänen. Die  $V_1$ -Domäne hydrolysiert ATP und die freigesetzte Energie wird für den Import von Protonen durch die  $V_0$ -Domäne benutzt. Die Aminosäure R735 der Untereinheit a ist wichtig für den Import von Protonen und Mutationen der nicht homologen Region der Untereinheit A können die Kopplung der ATP-Hydrolyse mit dem Import von Protonen ändern (Shao und Forgac, 2004). Die Abbildung stammt aus Forgac (2007).

Die  $V_1$ -Domäne ist auf der zytosolischen Seite der Membran von Vakuolen und besteht aus 8 unterschiedlichen Untereinheiten (A, B, C, D, E, F, G und H). Davon kommen die



Untereinheiten A und B jeweils als 3 Kopien, die Untereinheiten E und G jeweils als 2 Kopien und die restlichen Untereinheiten jeweils als eine Kopie vor (Forgac, 2007; Flannery und Stevens, 2008). Die  $V_0$ -Domäne ist eine Transmembrandomäne und besteht aus 6 unterschiedlichen Untereinheiten (a, c, c', c'', d und e). Die Untereinheit c kommt in 4 oder 5 Kopien vor und die anderen Untereinheiten kommen jeweils als eine Kopie vor (Forgac, 2007; Powell et al., 2000). Die  $V_1$ -Domäne hydrolysiert ATP und die freigesetzte Energie wird für die Rotation eines zentralen Stängels benutzt. Dies führt zur Mitrotation eines Rings aus den Untereinheiten c, c', c'' und d. Dadurch werden Protonen vom Zytosol ins Lumen der Vakuolen transportiert (Forgac, 2007).

Die Regulation der Aktivität der V-ATPase ist ein sehr komplexer Prozess. Eine wichtige Regulationsmöglichkeit ist die reversible Assemblierung der V-ATPase. In Hefezellen führt der Entzug von Glukose zu einer schnellen Disassemblierung der V-ATPase in eine zytosolische  $V_1$ -Domäne und eine membrangebundene  $V_0$ -Domäne. Nach der Zugabe von Glukose lagern sich die beiden Domänen schnell wieder an der Membran zusammen (Kane, 1995). Die Regulation der Aktivität der V-ATPase durch die reversible Assemblierung wurde auch in dem Schmetterling *Manduca sexta* und Säugertierzellen beobachtet (Summer et al., 2005; Sautin et al., 2005; Trombetta et al., 2003). Dieser Prozess wird durch den Ras/cAMP/PKA-Signalweg reguliert (Bond und Forgac, 2008). Der heterotrimere Komplex RAVE (regulator of  $H^+$ -ATPase of vacuolar and endosomal membranes) reguliert die Reassemblierung der V-ATPase (Seol et al., 2001; Smardon et al., 2002). Anderen Proteinen, darunter glykolytische Enzyme wie z.B. die Aldolase, wurden Funktionen bei der Dissoziation der V-ATPase zugeordnet (Lu et al., 2004). Nach der Dissoziation sind sowohl die  $V_1$ -Domäne als auch die  $V_0$ -Domäne inaktiv (Zhang et al., 1992; Parra et al., 2000). Die Inaktivierung der  $V_1$ -Domäne im Zytosol ist wichtig, da sonst die ATP-Reserven im Zytosol schnell verbraucht wären. Vma13, die Untereinheit H der  $V_1$ -Domäne, spielt eine wichtige Rolle bei der Inaktivierung der freien  $V_1$ -Domäne im Zytosol. Isolierte freie zytosolische  $V_1$ -Domänen aus dem Wildtyp sind inaktiv, während die entsprechenden  $V_1$ -Sektoren aus der *vma13Δ*-Mutante eine erhebliche Aktivität der ATP-Hydrolyse besitzen. Nach der Zugabe von rekombinantem Vma13 aus Bakterien konnte die  $V_1$ -Domäne aus der *vma13Δ*-Mutante inaktiviert werden (Parra et al., 2000, Diab et al., 2009). Vma13 ist auch die einzige Untereinheit, welche bei dem Zusammenbau der  $V_1$ -Domäne und der  $V_0$ -Domäne nicht notwendig ist. In der *vma13Δ*-Mutante wurden assemblierte V-ATPasen in der Membran detektiert, die allerdings weder die Hydrolyse von ATP noch den Import von  $H^+$ -Ionen durchführen können (Ho et al., 1993). Vma13 scheint also ein Inaktivator der zytosolischen

$V_1$ -Domäne und gleichzeitig ein Aktivator der assemblierten V-ATPase in der Membran zu sein. Das Vma13-Protein hat eine längliche Struktur und besteht aus zwei Domänen (Sagermann et al., 2001; Liu et al., 2005) (Abbildung 2.10). Die N-terminale Domäne (Aminosäure 1 bis 348) ist durch 4 Aminosäuren mit der C-terminalen Domäne (Aminosäure 352 bis 478) verbunden.

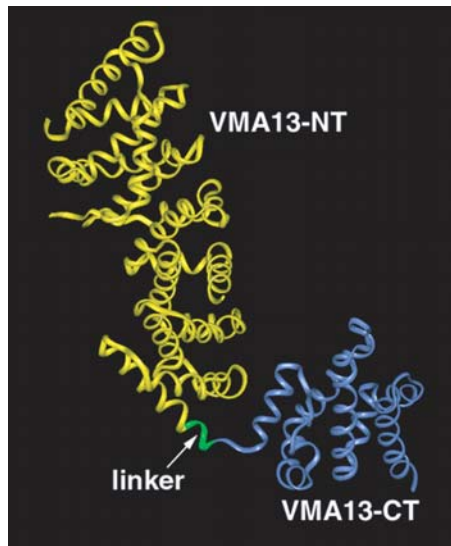


Abbildung 2.10: Das Ribbon-Diagramm von Vma13. Die N-terminale Domäne ist in gelber Farbe dargestellt und die C-terminale Domäne in blauer Farbe. Die beiden Domänen werden durch einen Linker verbunden, der in grüner Farbe dargestellt ist. Die Abbildung stammt aus Liu et al. (2005).

Es konnte gezeigt werden, dass die N-terminale Domäne von Vma13 ausreichend für die Aktivierung der  $V_1$ -Domäne ist und die C-terminale Domäne von Vma13 eine Rolle bei der Kommunikation zwischen  $V_1$ -Domäne und  $V_0$ -Domäne spielt (Liu et al., 2005). Die N-terminale Domäne von Vma13 kann die  $V_1$ -Domäne aus der *vma13* $\Delta$ -Mutante zwar aktivieren, der Import von  $H^+$ -Ionen kann allerdings nicht wiederhergestellt werden. Es konnte weiter gezeigt werden, dass die Interaktion zwischen Vma13 und Vma7 wichtig für die Inaktivierung der zytosolischen  $V_1$ -Untereinheit ist (Jefferies und Forgac, 2007). Es ist aber noch nicht bekannt, wie Vma13 die V-ATPase aktiviert und wie die Aktivierung durch Vma13 reguliert wird.

## 2.5 Aufgabenstellung

Die Cdc42-Effektoren Ste20, Cla4 und Skm1 gehören zur Familie der p21-aktivierten Kinasen (PAKs) in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. Sie spielen eine zentrale Rolle bei Zellpolarität und Signaltransduktion. Um mehr über die molekularen Mechanismen von Ste20 zu erfahren, wurde in der Arbeitsgruppe nach Proteinen gescreent, die an Ste20 binden. In diesem Screen wurden Erg4, Cbr1, Ncp1, Sut1 und Vma13 identifiziert. Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, in welchem Zusammenhang Ste20, aber auch die anderen PAKs, mit diesen Proteinen stehen.

Erg4, Cbr1 und Ncp1 sind an der Sterolbiosynthese beteiligt. Um festzustellen, ob Ste20 und Cla4 die Sterolbiosynthese beeinflussen können, sollte die Sterolkonzentration in *STE20*- und *CLA4*-Deletionsmutanten gemessen werden. Außerdem sollte die Sterolkonzentration nach der Überexpression von *STE20* bzw. *CLA4* analysiert werden. Die Sterolanalyse sollte mittels Gaschromatographie gekoppelt an Massenspektrometrie und parallel durch Dünnschichtchromatographie erfolgen. Außerdem sollten Sterole während der Bildung einer Paarungsprojektion, ein einfaches Modell der Zellpolarisierung, analysiert werden. Da Sterole als Sterolester gespeichert werden, sollte untersucht werden, ob Ste20 und Cla4 die Sterolveresterung beeinflussen können. Darüber hinaus wurde eine mögliche Beteiligung von Sterolestersynthasen an Zellpolarität untersucht.

Ste20 bildet einen Komplex mit Sut1, einem Transkriptionsfaktor, welcher den Sterolimport reguliert. Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob Cla4 und Skm1 ebenfalls an Sut1 binden. Da Sut1 ausschließlich im Zellkern vorliegt, wurde außerdem geprüft, ob PAKs auch in den Kern translozieren können. Falls dies der Fall wäre, könnten Kernimportsignale identifiziert werden. Durch Mutation dieser Kernimportsignale, wäre es möglich festzustellen, für welche Funktionen die Kernlokalisierung der PAKs wichtig ist.

Vma13 ist eine Untereinheit der V-ATPase, die eine wichtige Rolle bei der pH-Homöostase spielt. Es sollte untersucht werden, ob die *vma13*Δ-Mutante Polaritätsdefekte aufweist. Außerdem sollten genetische Interaktionen zwischen *PAKs* und *VMA13* getestet werden, da diese Hinweise auf molekulare Mechanismen liefern können.

Diese Arbeit sollte einen Beitrag zum besseren Verständnis molekularer Grundlagen der Regulation von Zellpolarität durch PAKs leisten und auf neue Funktionen von PAKs hinweisen.

### 3. Materialien und Methoden

#### 3.1 Materialien

##### 3.1.1 Verbrauchsmaterialien

Die Plastikverbrauchsartikel wurden von der Firma Sarstedt gekauft und die Glaswaren wurden von den Firmen Isolab, Fisherbrand und Schott bezogen.

##### 3.1.2 Geräte

Geräte	Hersteller
Agarosegeldokumentation Gel Jet Imager	INTAS
Agarosegelkammern 40-0708 und 40-1214	Peqlab
Automatic TLC Sampler 4	CAMAG
Chemolumineszenzdetektion LAS-3000 Mini	FujiFilm
DC-Kieselgel 60 Alufolien 20 x 20 cm	Merck
DC-Scanner CS930	Shimadzu
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
Gaschromatograp HP 5890 Serie II Plus	Hewlett Packard
HP 5972 Series Mass Selective Detector	Hewlett Packard
HP 6890 Series Injector	Hewlett Packard
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
Vortex Reax Top	Heidolph
Zentrifuge CR4i mit Kühlung	Jouan

### 3.1.3 Computerprogramme

Computerprogramme	Hersteller
Axiovision	Zeiss
Clone Manager Suite 7	Sci ED Central
ImageReader LAS-3000 Version 2.2	FujiFilm
MSD ChemStation, D.03.00.552	Agilent
Multi Gauge Version 3.0	Science Lab
Office 2000	Microsoft
Photoshop Comfort Suite 7	Adobe

### 3.1.4 Antikörper

#### 3.1.4.1 Primäre Antikörper

Antikörpername	Spezies	verwendete Verdünnung	Hersteller
anti-Cdc11	Ziege	1 :1000	Santa Cruz
anti-GAPDH	Ziege	1 :500	Santa Cruz
anti-GFP	Kaninchen	1 :3000	Fitzgerald Industries
anti-HA (12CA5)	Maus	1 :1000	Roche
anti-MBP	Maus	1 :10.000	New England Biolabs
anti-myc (9E10)	Maus	1 :500	Santa Cruz

### 3.1.4.2 Sekundäre Antikörper

Antikörpername	Spezies	verwendete Verdünnung	Hersteller
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)

### 3.1.5 Kits

Kitname	Hersteller
ECL advanced (Chemilumineszenzdetektion)	GE Healthcare
NucleoSpin Plasmid	Macherey + Nagel
NucleoSpin Extract II (PCR-Reinigung und Gel-Extraktion)	Macherey + Nagel

### 3.1.6 Pufferlösungen

#### 50 x TAE

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

#### 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>

#### 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

#### 10 ml 2 x SDS-Ladepuffer

4 ml 10% (w/v) SDS  
2,5 ml 1,5 M Tris, pH8,8  
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

#### 5 x SDS-Ladepuffer

15% (v/v) β-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

### 3.1.7 Chemikalien, Enzyme und Sonstiges

Produkt	Hersteller
Acrylamid/Bis-Acrylamid Lösung (37, 5:1)	Carl Roth
Agarose	VWR
Amylose Resin	New England Biolab
Bacto Peptone	Becton + Dickinson
Bacto Yeast Nitrogen Base	Becton + Dickinson
Bacto Yeast Extract	Becton + Dickinson
Bradfordlösung Roti Quant	Roth
CIAP (10 U/μl)	Fermentas
<i>Deep Vent</i> -DNA-Polymerase (2 U/μl)	New England Biolabs
γ- <sup>32</sup> P-ATP (3,7 MBq = 100 μCi)	Hartmann Analytic
Glutation Sepharose 4B	GE Healthcare
Klenow Fragment (10 U/μl)	Fermentas
Lachssperma DNA (10 mg/ml)	Invitrogen
Mowiol	Serva
Myelin basic protein (MBP)	Sigma-Aldrich
Ni-NTA Agarose	Qiagen
Nitrocellulose Protran (Porengröße 0,45 μm)	Whatman
Proteaseinhibitortabletten complete, EDTA frei	Roche
Protein G Sepharose 4G Fast Flow	GE Healthcare
Restriktionsenzyme	Fermentas
Rhodamine Phalloidine	Molecular Probes, Invitrogen
T4 Ligase (1 Weiss U/μl)	Fermentas
T4 PNK (10 U/μl)	Fermentas
<i>Taq</i> -Polymerase (5 U/μl)	Fermentas
Zymolyase T20	Seikagaku Corporation

Alle weiteren Standardchemikalien wurden von den Firmen Roth, Sigma-Aldrich, Serva, Fluka, Merk oder VWR bezogen.

### 3.1.8 Primer

Primer wurden von den Firmen Biomers und MWG synthetisiert.

## 3.1.8.1 Genspezifische Primer

Primer	Nukleotidsequenz des Primers in 5' → 3' Richtung
Are1-1	ATCACACTATGTATGTGC
Are1-2	TGTCGTCACAACACCTAT
Are1-F4	TG TTCAGCACGGCTTGCAGCAAGAGCGCCAAAACAGATTGCA AGAGAATTCGAGCTCGTTTAAAC
Are1-R2	GATCTTAAGAACTCTTCGTCTTGCAACAAATCCTTAGTCTCC GTCATTTTGAGATCCGGGTTTT
Are1-S1	TCAGCACGGCTTGCAGCAAGAGCGCCAAAACAGATTGCAAG AATGCGTACGCTGCAGGTCGAC
Are1-S2	CTATCAAGGGCTTGCAGGGACACACGTGGTATGGTGGCAGT TCAATCGATGAATTCGAGCTCG
Are1-S3	GTCTGTTCAGGGCCCAGTATCATTATGACGTTGTACCTGACCT TACGTACGCTGCAGGTCGAC
Are2-5	TGCAGTTACACGTGAATG
Are2-6	AGTTGCTTCGCCGATACG
Are2-7	CGCGGATCCATGGACAAGAAGAAGGAT
Are2-8	CCCAAGCTTTCAGAAATTGGATGAAATTAT
Are2-F4	AACAGACACATTACGTTAGCAAAAAGCAACAATAACAAACAC AACCGAATTCGAGCTCGTTTAAAC
Are2-R2	GATGCGGAGAAATTGTTTCGTTCTCCAGTAGATCCTTCTTCTTG TCCATTTTGAGATCCGGGTTTT
Are2-S1	AGACACATTACGTTAGCAAAAAGCAACAATAACAAACACAAC CATGCGTACGCTGCAGGTCGAC
Are2-S2	CTATAAAGATTTAATAGCTCCACAGAACAGTTGCAGGATGCC TTAATCGATGAATTCGAGCTCG
Cla4-7	TGTAATAAATCGAACAGTGAAACT
Cla4-8	AAGATTGTAGTATGTATGATATGC
Cla4-15	GCGGAATTCATGTCTCTTTCAGCTGCAGCG
Cla4-23	CCCAAGCTTTCATTCCCTTCCACTCCAA
Cla4-24	CCATCGATATGTCTCTTTCAGCTGCA
Cla4-27	TCCCCGGGTTCCCTTCCACTCCAACAG
Cla4-30	CCCAAGCTTTCAGGATGGAGATGGAGATGG
Cla4-31	CCCAAGCTTTCACTCGATCACTTTAAAGCA



Cla4-32	CCGGAATTCTTAAGTGGTGTATCTTCT
Cla4-33	CCGGAATTCCCATCTCCGTCTCCATTA
Cla4-35	CCGGAATTCTTTCAACCTCAAAGAACA
Cla4-S1	ATCGAACAGTGAAACTGAAACATAAAAGAAATAGTGCAAAA TATGCGTACGCTGCAGGTCGAC
Cla4-S2	ATTGTAGTATGTATGATATGCTTATAGAAATAGTTGTGTGCTT CAATCGATGAATTCGAGCTCG
Cyc8-S2	CGTTGATTATAAATTAGTAGATTAATTTTTTTGAATGCAAACCTT TTTAGATCGATGAATTCGAGCTCG
Cyc8-S3	GAAAATGTAGTAAGGCAAGTGGAAGAAGATGAAAACCTACGA CGACCGTACGCTGCAGGTCGAC
His/Kan-1	TGGGCCTCCATGTCGCTGG
Skm1-1	AAGTTCTGTGGGGAGGTCCCCAGT
Skm1-2	ACGCGAAGCAAACGTATCATTGTT
Skm1-21	GGAATCTGTGTTTATAATATACCTTGT
Skm1-22	ATTATAAACACAGATTCCATTTTACCC
Skm1-23	TGCCAGCTGATGAAGGGCGTAAAAAAG
Skm1-25	GCGGGCCCATACGCTTGATTTTCGTCA
Skm1-26	GCTCTAGAACAAAATACTATCCTAAC
Skm1-30	CCGCTCGAGAAATGCCACTTTAAGGATAC
Skm1-34	CCGCTCGAGTTTGCCTTTTCGGAGCGT
Skm1-35	GGAATTAGTAGCAGCGTTTATAATATACCTTGT
Skm1-36	ATTATAAACGCTGCTACTAATTCCATCAAGAGA
Skm1-37	GGAATCTGTGCGCGCCCGCCGCGAGCGTAGCACTTACTGATCT CTTGAT
Skm1-38	TCAGTAAGTGCTACGCTCGCGGGCGGCGACAGATTCCATT TTACCC
Skm1-F4	AGCTATACTCGAGGACAATCAGACAAAACGAAAGAATATCT TTCGGAATTCGAGCTCGTTTAAAC
Skm1-R3	TCCATCAACTTTATAAGATATCCATCCTTCCTTTTTTACGCCC TTGCACTGAGC AGCGTAATCTG
Skm1-R5	TCCATCAACTTTATAAGATATCCATCCTTCCTTTTTTACGCCC TTTTTGTATAGTTCATCCATGC
Skm1-S1	TATACTCGAGGACAATCAGACAAAACGAAAGAATATCTTTCG ATGCGTACGCTGCAGGTCGAC

Skm1-S2	ATATATATATATTGTTTCTCCTAAATAAAAAAAGCTAAATTT CAATCGATGAATTCGAGCTCG
Ste20-7	TGGCCCGAAACACGGCCAAGAGAG
Ste20-8	CTCCTTCGTTACATAGAACGCAGA
Ste20-19	GTGGATACAAATCCATGGATCCTGCGAAGA
Ste20-20	TGTGCGAATCACTTGTCGACGGAGGAAAT
Ste20-21	TTAAAAAACTCCTCTCCACCTAGCGGTTCAAATAGTGGTACA
Ste20-22	TGTACCACTATTTGAACCGCTAGGTGGAGAGGAGTTTTTTAA
Ste20-25	TCGTATTATTCTTCTCCTCTTCGAATTCTCAGGATGATAAAAGG
Ste20-26	CCTTTTATCATCCTGAGAATTCGAAGAGGAAGAATAATACGA
Ste20-27	CAATGCATTCTGCAGATGAGCAATGATCCATCT
Ste20-30	CCGCTCGAGTTACTTTTGTTTATCATC
Ste20-31	CAATGCATTCTGCAGAAAAAGCAAACAGAAAA
Ste20-35	CCGCTCGAGTTAGTTTGTTCCTGACATC
Ste20-41	GAAAAAGCAAACAGAAAAATCGTATTATTCTTCTCCTCTTCGAA AAAAAGGAAAC
Ste20-42	TCGAGTTTCTTTTTTTTCGAAGAGGAAGAATAATACGATTTTT CTGTTTGCTTTTTCTGCA
Ste20-43	CAATGCATTCTGCAGAAAAAAGGAAAAGCGGT
STe20-49	TGAACCGCTTTTCCTTTTTTTTAGGTGGAGAGGAGTTTTTTAA
Ste20-50	TTAAAAAACTCCTCTCCACCTAAAAAAGGAAAAGCGGTTCA
Ste20-53	GAAAAAGCAAACAGAAAAATCGTATTATTCTTCTCCTCTTCGAA AAAAAGGAAATCCGGAGCAGGTGCTGGTGCTGGTGCTGGAG CAATTCTGTAAC
Ste20-54	TCGAGTTACAGAATTGCTCCAGCACCAGCACCAGCACCTGCT CCGGATTTCTTTTTTTTCGAAGAGGAAGAATAATACGATTTTT CTGTTTGCTTTTTCTGCA
Ste20-S1A	GTACAATTAGAGCGAGGTAGCAAGCAACCCAAACTTCTTCCC TTCCGTACGCTGCAGGTCGAC
Ste20-S2A	TTAATGAAGTTGTGAATTAGAGTGGGATGTGTTATAAAATGT CCAATCGATGAATTCGAGCTCG
Tpk2-3	CAAATATACAGCCGGCAC
Tpk2-4	AAAGAGAAAGGAAAAGGA

Tpk2-S1	GCTTCACTCAGGTTAACTCACATACTGTTGAAAATTGTCGGT ATGCGTACGCTGCAGGTCGAC
Tpk2-S2	AAGTACTTGAAAATTGTTTTGTGTTTTTTGGTTCATGGA TAATCGATGAATTCGAGCTCG
Vma13-4	AGAGGCTGCGACAGTCGA
Vma13-7	CCGCTCGAGGAATCGATCTCGGATTTG
Vma13-12	CGCGGATCCAGAGGCTGCGACAGTCGA
Vma13-S1	AAAGACAAGAGATATAAAAGTGCCTGGCGATTCAGGAAC AATGCGTACGCTGCAGGTCGAC
Vma13-S2	TTAGGCTTCAAACCCACTACTTTACGGTCTTCTATATCTT TAATCGATGAATTCGAGCTCG
Vma2-1	TAGCAGCCAGTGTAATAA
Vma2-2	GATGTGTTCCCTTGATCTT
Vma2-S1	TAAGAGTAGACAGTACATCAAGCGAAAATAAATATTGCAGG AATGCGTACGCTGCAGGTCGAC
Vma2-S2	CGGACAAAATAAAAAAGCCTTTTTCTTCAGCAACCGTCCTC TTAATCGATGAATTCGAGCTCG
Vma3-1	CAAATTCACCCAGCAATT
Vma3-2	TAACAATAGAAGTTGATA
Vma3-S1A	CCCTTGATAGTTTTGTACAATTATACTCGTTCTGATTA ACCGTACGCTGCAGGTCGAC
Vma3-S2A	GCTTGAATGAGGTAGTTTGGATATGAAGTAAGAATAGGGG CTATATCGATGAATTCGAGCTCG

### 3.1.8.2 Sequenzierungsprimer

Primer	Nukleotidsequenz des Primers in 5' → 3' Richtung
M1	GGATGTGCTGCAAGGCG
Ste20-20	TGTGCGAATCACTTGTCGACGGAGGAAAT
Skm1-28	ACGTACGACGATTGGAAC

### 3.1.9 Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Quelle
pAK6	<i>VMA13</i> in pADNX	Thomas Höfken

pADNX	2 $\mu$ m, <i>LEU2</i> , <i>ADH-NUBI-3HA</i>	Tiedje et al. (2007)
pCT15	<i>STE20</i> in pEG(KT)	Thomas Höfken
pCT16	<i>STE20</i> <sup>K649A</sup> in pEG(KT)	Thomas Höfken
pCT18	<i>SUTI</i> in pET28c	Lin et al. (2009a)
pCT55	<i>SEC6</i> <sup>427-806</sup> in pET28	Thomas Höfken
pEG(KT)	2 $\mu$ m, <i>URA3</i> , <i>GALI-GST</i>	Mitchell et al. (1993)
pET28c	N-terminaler His <sub>6</sub> -Fusionsmarker	Novagen, Merck
pFA6a-His3MX6	Kassetten PCR-template	Longtine et al. (1998)
pFA6a-His3MX6- <i>PGAL1</i>	Kassetten PCR-template	Longtine et al. (1998)
pFA6a-His3MX6- <i>PGAL1-GFP</i>	Kassetten PCR-template	Longtine et al. (1998)
pFA6a-His3MX6- <i>PGAL1-3HA</i>	Kassetten PCR-template	Longtine et al. (1998)
pFA6a-KanMX6	Kassetten PCR-template	Longtine et al. (1998)
pFA6a-KanMX6- <i>PGAL1</i>	Kassetten PCR-template	Longtine et al. (1998)
pFA6a-TRP1	Kassetten PCR-template	Longtine et al. (1998)
pGEX-5X-1	N-terminaler GST-Fusionsmarker	GE Healthcare
pGST-Ste20	pDEST15 carrying <i>STE20</i>	Tiedje et al. (2007)
pMal-c2X	N-terminaler MBP-Fusionsmarker	New England Biolabs
pML6	<i>ARE1</i> <sup>1-215</sup> in pMal-c2X	Diese Arbeit
pML22	<i>STE20</i> <sup><math>\Delta</math>272-288</sup> in pRS303	Diese Arbeit
pML23	<i>STE20</i> in pRS303	Diese Arbeit
pML32	<i>STE20</i> <sup><math>\Delta</math>272-288</sup> in pRS313	Diese Arbeit
pML33	<i>STE20</i> in pRS313	Diese Arbeit
pML34	<i>STE20</i> <sup>272-400</sup> in pPP1843	Diese Arbeit
pML40	<i>STE20</i> <sup>272-288**</sup> in pPP1843	Diese Arbeit
pML41	<i>STE20</i> <sup>285-400</sup> in pPP1843	Diese Arbeit
pML42	<i>STE20</i> in pPP2022	Diese Arbeit

pML49	<i>STE20</i> <sup>272-288*</sup> in pPP1843	Diese Arbeit
pML51	<i>STE20</i> <sup>Δ272-284</sup> in pRS313	Diese Arbeit
pML55	<i>STE20</i> <sup>Δ272-284</sup> in pPP2022	Diese Arbeit
pML56	<i>STE20</i> <sup>Δ272-288</sup> in pPP2022	Diese Arbeit
pML65	<i>SKM1</i> in pRS305	Diese Arbeit
pML66	<i>SKM1</i> <sup>Δ213-230</sup> in pRS305	Diese Arbeit
pML68	<i>pMET25-Skm1-CUBiquitin-RURA3</i> in pRS313	Diese Arbeit
pML70	<i>pMET25-CLA4-CUBiquitin-RURA3</i> in pRS313	Diese Arbeit
pML72	<i>VMA13</i> in pRS316	Diese Arbeit
pML78	<i>CLA4</i> in in pPP1843	Diese Arbeit
pML88	<i>CLA4</i> <sup>181-400</sup> in pPP1843	Diese Arbeit
pML89	<i>CLA4</i> <sup>181-550</sup> in pPP1843	Diese Arbeit
pML90	<i>CLA4</i> <sup>400-550</sup> in pPP1843	Diese Arbeit
pML93	<i>CLA4</i> <sup>450-550</sup> in pPP1843	Diese Arbeit
pML94	<i>SKM1</i> <sup>201-230</sup> in pPP1843	Diese Arbeit
pML100	<i>SKM1</i> <sup>K213A, R214A</sup> in pRS305	Diese Arbeit
pML101	<i>SKM1</i> <sup>R224A, R227A, K228A, K230A</sup> in pRS305	Diese Arbeit
pMT485	<i>pGALI-CLNI-3HA</i> in YCp50	Lin et al. (2009b)
pPP1843	<i>pGALI-GST-GFP</i> in pRS426	Lin et al. (2009a)
pPP2022	<i>pGALI-GST-GFP</i> in pRS316	Lin et al. (2009a)
pRS303	<i>HIS3</i>	Sikorski und Hieter (1989)
pRS305	<i>LEU2</i>	Sikorski und Hieter (1989)
pRS313	<i>CEN6, HIS3</i>	Sikorski und Hieter (1989)
pRS316	<i>CEN6, URA3</i>	Sikorski and Hieter (1989)
pRS425	2μm, <i>LEU2</i>	Sikorski and Hieter (1989)
pRS426	2 μm, <i>URA3</i>	Sikorski and Hieter (1989)
pTH163	<i>CLA4</i> in pRS425	Lin et al. (2009b)
pTH197	<i>pMET25-STE20-CUBiquitin-RURA3</i> in pRS313	Tiedje et al. (2007)
pTH263	<i>STE20</i> in pRS425	Lin et al. (2009b)

pTH374	pMET25-STE14-CUbiquitin-RURA3 in pRS313	Thomas Höfken
pYM6	9myc-klTRP1, C-terminales tagging	Knop et al. (1999)
pYM19	9myc-His3MX6, C-terminales tagging	Knop et al. (1999)

### 3.1.10 *S. cerevisiae* Stämme

Stamm	Genotyp	Quelle
HUY50	<i>MATa ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1Δ63 his3Δ200 leu2Δ1 His3MX6-GAL1-3HA-CLA4</i>	Lin et al. (2009a)
MCY5	<i>MATa his3::hisG leu2::hisG trp1::hisG ura3-52 skm1Δ::klTRP1</i>	Thomas Höfken
MCY6	<i>MATa his3::hisG leu2::hisG trp1::hisG ura3-52 cla4Δ::klTRP1</i>	Thomas Höfken
MKY1	<i>MATa ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1Δ63 his3Δ200 leu2Δ1 ARE2-9myc-klTRP1</i>	Tomas Höfken
MLY2	<i>MATa ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1Δ63 his3Δ200 leu2Δ1 are1Δ::klTRP1</i>	Diese Arbeit
MLY3	<i>MATa ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1Δ63 his3Δ200 leu2Δ1 are2Δ::klTRP1</i>	Diese Arbeit
MLY4	<i>MATa ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1Δ63 his3Δ200 leu2Δ1 are1Δ::HIS3MX6</i>	Diese Arbeit
MLY6	<i>MATa ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1Δ63 his3Δ200 leu2Δ1 are1Δ::klTRP1 are2Δ::HIS3MX6</i>	Diese Arbeit
MLY20	<i>MATa ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1Δ63 his3Δ200 leu2Δ1 HIS3MX6-pGAL1-ARE2-9myc-klTRP1</i>	Diese Arbeit
MLY21	<i>MATa ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1Δ63 his3Δ200 leu2Δ1 are1Δ::HIS3MX6 ste20Δ::klTRP1</i>	Diese Arbeit
MLY27	<i>MATa ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1Δ63 his3Δ200 leu2Δ1 ARE1-9myc-klTRP1</i>	Diese Arbeit
MLY28	<i>MATa ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1Δ63 his3Δ200 leu2Δ1 HIS3MX6-pGAL1-ARE1-9myc-klTRP1</i>	Diese Arbeit
MLY48	<i>MATa his3::hisG leu2::hisG trp1::hisG ura3-52 ste20Δ::KanMX6 HIS3-STE20<sup>Δ272-288</sup></i>	Diese Arbeit
MLY49	<i>MATa his3::hisG leu2::hisG trp1::hisG ura3-52 ste20Δ::KanMX6 HIS3-STE20</i>	Diese Arbeit
MLY65	<i>MATa his3::hisG leu2::hisG trp1::hisG ura3-52 vma13Δ::HIS3MX6</i>	Diese Arbeit
MLY84	<i>MATa ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1Δ63 his3Δ200 leu2Δ1 are1Δ::HIS3MX6 cla4Δ::kanMX6</i>	Diese Arbeit

MLY107	<i>MATa ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1Δ63 his3Δ200 leu2Δ1 His3MX6-GAL1-3HA-SKM1</i>	Diese Arbeit
MLY110	<i>MATa ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1Δ63 his3Δ200 leu2Δ1 skm1Δ::klTRP1</i>	Diese Arbeit
MLY111	<i>MATa ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1Δ63 his3Δ200 leu2Δ1 skm1Δ::klTRP1 SKM1-LEU2</i>	Diese Arbeit
MLY112	<i>MATa ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1Δ63 his3Δ200 leu2Δ1 skm1Δ::klTRP1 SKM1<sup>Δ213-230</sup>-LEU2</i>	Diese Arbeit
MLY113	<i>MATa ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1Δ63 his3Δ200 leu2Δ1 skm1Δ::klTRP1 His3MX6-GAL1-GFP-SKM1-LEU2</i>	Diese Arbeit
MLY114	<i>MATa ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1Δ63 his3Δ200 leu2Δ1 skm1Δ::klTRP1 His3MX6-GAL1-GFP-SKM1<sup>Δ213-230</sup>-LEU2</i>	Diese Arbeit
MLY115	<i>MATa ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1Δ63 his3Δ200 leu2Δ1 CYC8-9myc-His3MX6</i>	Diese Arbeit
MLY125	<i>MATa his3::hisG leu2::hisG trp1::hisG ura3-52 vma2Δ::HIS3MX6</i>	Diese Arbeit
MLY126	<i>MATa his3::hisG leu2::hisG trp1::hisG ura3-52 vma3Δ::HIS3MX6</i>	Diese Arbeit
MLY138	<i>MATa his3::hisG leu2::hisG trp1::hisG ura3-52 cla4Δ::klTRP1 vma13Δ::His3MX6</i>	Diese Arbeit
MLY140	<i>MATa his3::hisG leu2::hisG trp1::hisG ura3-52 skm1Δ::klTRP1 vma13Δ::His3MX6</i>	Diese Arbeit
MLY159	<i>MATa his3::hisG leu2::hisG trp1::hisG ura3-52 tpk2Δ::His3MX6</i>	Diese Arbeit
MLY161	<i>MATa his3::hisG leu2::hisG trp1::hisG ura3-52 ste20Δ::hphNT1 tpk2Δ::His3MX6</i>	Diese Arbeit
MLY166	<i>MATa his3::hisG leu2::hisG trp1::hisG ura3-52 tpk2Δ::klTRP1 vma13Δ::His3MX6</i>	Diese Arbeit
MLY167	<i>MATa his3::hisG leu2::hisG trp1::hisG ura3-52 ste20Δ::hphNT1 tpk2Δ::klTRP1 vma13Δ::His3MX6</i>	Diese Arbeit
MLY168	<i>MATa his3::hisG leu2::hisG trp1::hisG ura3-52 ste7Δ::klTRP1 vma13Δ::His3MX6</i>	Diese Arbeit
MLY170	<i>MATa his3::hisG leu2::hisG trp1::hisG ura3-52 ste20Δ::hphNT1 vma13Δ::His3MX6</i>	Diese Arbeit
MLY177	<i>MATa his3::hisG leu2::hisG trp1::hisG ura3-52 ste11Δ::klTRP1 vma13Δ::His3MX6</i>	Diese Arbeit
MLY192	<i>MATa ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1Δ63 his3Δ200 leu2Δ1 skm1Δ::klTRP1 SKM1<sup>K213A, R214A</sup>-LEU2</i>	Diese Arbeit
MLY193	<i>MATa ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1Δ63 his3Δ200 leu2Δ1 skm1Δ::klTRP1 SKM1<sup>R224A, R227A, K228A, K230A</sup>-LEU2</i>	Diese Arbeit
MLY197	<i>MATa ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1Δ63 his3Δ200 leu2Δ1 skm1Δ::klTRP1 His3MX6-GAL1-GFP-SKM1<sup>K213A, R214A</sup>-LEU2</i>	Diese Arbeit

MLY198	<i>MATa ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1Δ63 his3Δ200 leu2Δ1 skm1Δ::klTRP1 His3MX6-GAL1-GFP-SKMI<sup>R224A, R227A, K228A, K230A</sup>-LEU2</i>	Diese Arbeit
PPY966	<i>MATa his3::hisG leu2::hisG trp1::hisG ura3-52</i>	Lin et al. (2009a)
SHY26	<i>MATa his3::hisG leu2::hisG trp1::hisG ura3-52 ste11Δ::His3MX6</i>	Thomas Höfken
SHY45	<i>MATa his3::hisG leu2::hisG trp1::hisG ura3-52 ste7Δ::His3MX6</i>	Thomas Höfken
THY310	<i>MATa ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1Δ63 his3Δ200 leu2Δ1 ste20Δ::klTRP1</i>	Lin et al. (2009a)
THY582	<i>MATa ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1Δ63 his3Δ200 leu2Δ1 ste20Δ::klTRP1 cla4Δ::KanMX6 + STE20 in pRS316</i>	Thomas Höfken
THY609	<i>MATa ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1Δ63 his3Δ200 leu2Δ1 cla4Δ::kanMX6</i>	Lin et al. (2009b)
THY665	<i>MATa ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1Δ63 his3Δ200 leu2Δ1 swe1Δ::HIS3MX6</i>	Lin et al. (2009b)
THY685	<i>MATa ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1Δ63 his3Δ200 leu2Δ1 swe1Δ::HIS3MX6 cla4Δ::kanMX6</i>	Lin et al. (2009b)
THY696	<i>MATa his3::hisG leu2::hisG trp1::hisG ura3-52 ste20Δ::KanMX6</i>	Lin et al. (2009a)
THY697	<i>MATa his3::hisG leu2::hisG trp1::hisG ura3-52 ste20Δ::hphNT1</i>	Tiedje et al. (2008)
YPH499	<i>MATa ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1Δ63 his3Δ200 leu2Δ1</i>	Sikorski und Hieter (1989)

### 3.1.11 *E. coli* Stämme

Stamname	Genotyp	Quelle
DH5α	F <sup>-</sup> endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ80dlacZΔM15 Δ( <i>lacZYA-argF</i> )U169, hsdR17(r <sub>K</sub> <sup>-</sup> m <sub>K</sub> <sup>+</sup> ), λ-	Studier und Moffat (1986)
BL21(DE3)	F <sup>-</sup> ompT gal dcm lon hsdS <sub>B</sub> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])	Hanahan (1983)
Rosetta(DE3)pLysS	F <sup>-</sup> ompT hsdS <sub>B</sub> (R <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) gal dcm λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5]) pLysSRARE (Cam <sup>R</sup> )	Novagen, Merck

### 3.1.12 Nährmedien

#### 3.1.12.1 Vollmedien

##### LB (für *E. coli*)

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

##### YPD ( Hefe)

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



Für die Herstellung von Platten wurden den Medien außerdem jeweils 1,5% Agar zugesetzt. Alle Medien wurden autoklaviert.

Für die Herstellung von 1 Liter LB-Medium mit Antibiotika wurde jeweils 1 ml folgender Stammlösungen zugesetzt.

Ampicillin : 100 mg/ml	Kanamycin : 30 mg/ml	Chloramphenicol : 20 mg/ml
------------------------	----------------------	----------------------------

Für die Herstellung von 1 Liter YPD-Medium mit G418 Selektion wurden 10 ml 20 mg/ml G418 zugesetzt.

### 3.1.12.2 SC-Medien (synthetic complete)

Den SC-Medien fehlen die Aminosäuren Histidin, Tryptophan, Leucin oder Uracil, welche von Zellen mittels der erworbenen Plasmide oder von entsprechenden Mutanten wieder synthetisiert werden können.

#### SC-Medium

0,67% (w/v) Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acids  
0,2% (w/v) Drop-out Mix  
2% (w/v) Glukose oder 3% (w/v) Raffinose mit 2% (w/v) Galaktose

#### Drop-out Mix

18,3g 10 x SC-His-Trp-Leu-Ura Drop-out Mix  
1 g Histidin  
2 g Leucin  
1 g Tryptophan  
1 g Uracil

Dem Drop-out Mix für SC-Ura, z.B., wurde 1 g Uracil nicht zugesetzt.

10 x SC-His-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

Sowohl der Drop-out Mix als auch der 10 x SC-His-Trp-Leu-Ura Drop-out Mix werden über mehrere Stunden auf dem Rollenmischer gemischt.

### 3.2 Molekularbiologische Methoden

#### 3.2.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR-Technik wird für eine schnelle und effektive Vermehrung von DNA-Fragmenten verwendet. Dabei werden eine Matrizen-DNA, Desoxynukleotidtriphosphate (dNTPs), passende Primer-Paare (Oligonukleotide) und DNA-Polymerase zusammen mit einer Puffer-Lösung verwendet. Die DNA-Polymerase ist hitzestabil. Zur Amplifikation von DNA für eine Klonierung wird das folgende Programm und der folgende Ansatz verwendet:

##### PCR-Programm

Schritt	Temperatur	Dauer und Zweck
1	95°C	5 min Polymerase-Aktivierung
2	95°C	1 min DNA-Denaturierung
3	53°C	30 s Primer-Hybridisierung
4	72°C	Elongation: 1 Kb/min
5	4°C	∞ Ende der Elongation

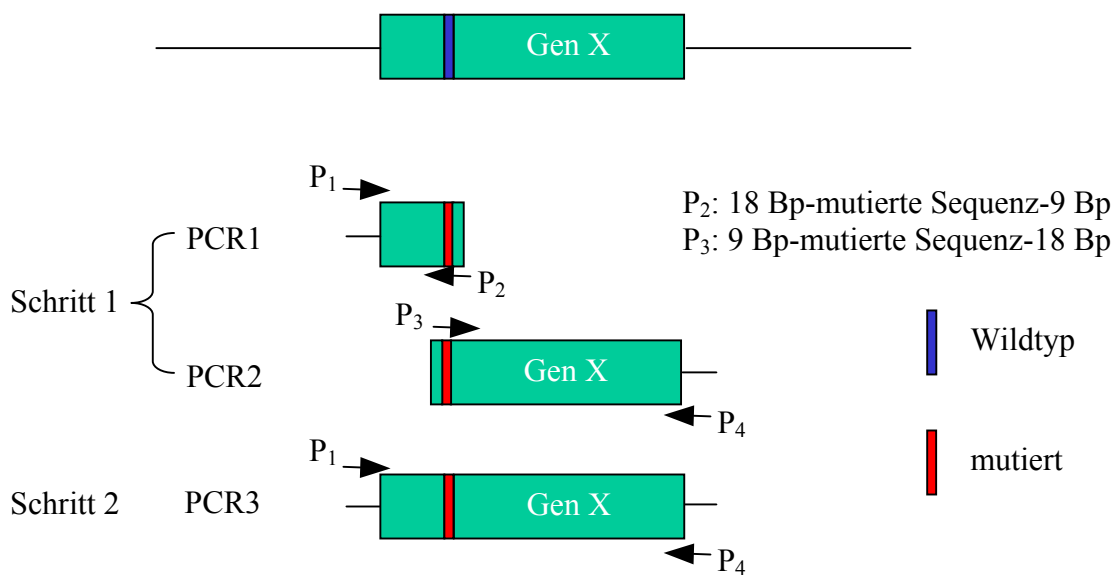
Die Schritte von 2 bis 4 wurden 30-mal wiederholt.

##### Ansatz (100 µl)

10 µl dNTPs (2 mM)
10 µl 10 x Puffer
10 µl MgCl <sub>2</sub> (25 mM)
0,4 µl Taq-Polymerase (2 U)
0,2 µl Vent-Polymerase (0,4 U)
0,5 µl je Primer
1 µl chromosomale DNA (1 µg)
67,4 µl H <sub>2</sub> O

#### 3.2.2 Punktmutation oder Deletion eines Fragmentes von einem Gen

Hierfür wird eine 2-Schritt-PCR durchgeführt (Abbildung 3.1).



**Abbildung 3.1:** 2-Schritt-PCR. Durch eine 2-Schritt-PCR können Mutationen in einem Gen erzeugt werden. Die gewünschte mutierte Sequenz wurde durch entsprechend synthetisierte Primer erzeugt.

Durch den Schritt 1 (PCR-Programm und Ansatz wie von 3.2.1) können sowohl ein 5'-terminales Fragment mit der mutierten Sequenz als auch ein 3'-terminales Fragment mit der mutierten Sequenz hergestellt werden, wobei die chromosomale DNA des Wildtyps als Matrizen-DNA dient. Nach der Reinigung der beiden PCR-Produkte durch ein Agarose-Gel werden sie als Matrizen-DNA bei der zweiten PCR eingesetzt (PCR-Programm wie von 3.2.1, Ansatz siehe unten).

**Ansatz (100 µl)**

10 µl dNTPs (2 mM)

10 µl 10 x Puffer

10 µl MgCl<sub>2</sub> (25 mM)

0,4 µl Taq-Polymerase (2 U)

0,2 µl Vent-Polymerase (0,4 U)

0,5 µl je Primer

5 µl des gereinigten Produktes von PCR1

5 µl des gereinigten Produktes von PCR2

58,4 µl H<sub>2</sub>O**3.2.3 Reinigung von PCR-Produkten und DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel nach der Agarosegelelektrophorese**

Die Reinigung erfolgt durch die Verwendung des NucleoSpin Extract II Kits der Firma Macherey und Nagel. Mittels eines Agarosegels kann ein DNA-Fragment einer bestimmten Größe von anderen aufgetrennt werden. Nach dem Ausschneiden kann dieses DNA-Fragment gereinigt werden.

**3.2.4 Restriktionsverdau**

Der Restriktionsverdau verwendet die Eigenschaften von Restriktionsenzymen, welche Endonukleasen sind und die Phosphodiesterbindungen beider Stränge eines sequenzspezifischen DNA-Doppelstranges hydrolytisch spalten können. Die entstandenen Sequenzen besitzen stumpfe oder überhängende Enden. Bei einem Restriktionsverdau vom PCR-Produkt wird die DNA beim letzten Schritt der Reinigung in 51 µl Elutionspuffer aufgenommen und der Restriktionsverdau wird über Nacht bei der entsprechenden Temperatur durchgeführt. Der Restriktionsverdau von Plasmiden wird stets für ungefähr zwei Stunden durchgeführt.

**PCR-Produkte**

51 µl gereinigte PCR-Produkte  
1,5 µl Enzym A  
1,5 µl Enzym B  
6 µl Puffer

**Plasmide**

10 µl Plasmide aus Mini-Präparation  
1,5 µl Enzym A  
1,5 µl Enzym B  
5 µl Puffer und 32 µl H<sub>2</sub>O

**3.2.5 Agarosegelelektrophorese**

Die Agarosegelelektrophorese dient zur Analyse von Nukleinsäuren. Prinzipiell sollen die analysierten Nukleinsäuren linearisiert sein, dadurch ist die Laufstrecke der Nukleinsäuren proportional zu ihren Massen. Durch die Zugabe von Ethidiumbromid im Agarosegel können die getrennten DNA-Banden unter UV-Licht sichtbar gemacht werden. Ein DNA-Längenstandard hilft bei der Abschätzung der Größe der DNA-Banden. In dieser Arbeit wurde ausschließlich die TAE-Pufferlösung für die Herstellung des Agarose-Gels und als Laufpufferlösung eingesetzt. Vor dem Auftragen der Proben werden sie mit 5 x Probenpuffer versetzt. Die Agarosegelelektrophorese wird für 60 Minuten bei 90 V durchgeführt.

**3.2.6 Ligation**

Unter Ligation versteht man das Verknüpfen von DNA-Fragmenten durch Ligasen. Nach der Ligation können zwei DNA-Fragmente kovalent verknüpft werden. Diese Reaktion läuft zwischen der 3'-OH-Gruppe und dem 5'-Phosphatrest unter Verbrauch von ATP ab. Ein DNA-Fragment, welches in einen Vektor inkloniert wird, muss entweder wie der Vektor ein stumpfes Ende oder ein zum Vektor kompatibles überhängendes Ende besitzen. Die Mengen des eingesetzten DNA-Fragmentes und des eingesetzten Vektors soll durch die Agarosegelelektrophorese abgeschätzt werden. Prinzipiell soll die Menge des eingesetzten DNA-Fragmentes einen 10-fachen Überschuss im Vergleich zu der des Vektors haben. Der Ligationsansatz wird bei Raumtemperatur für 60 Minuten inkubiert.

**3.2.7 Chemische Transformation von *E. coli*****3.2.7.1 Herstellung von kompetenten Zellen**

Aus einer Übernachtskultur werden 100 ml Hauptkultur auf eine OD<sub>600</sub> (optische Dichte bei 600 nm) von 0,1 angeimpft und bei 37°C bis zu einer OD<sub>600</sub> zwischen 0,4 und 0,6 inkubiert.

Nach einer Inkubation auf Eis für 15 Minuten werden die Zellen für 15 Minuten bei 4500 rpm abzentrifugiert. Zellen werden dann in 20 ml Puffer RF1 resuspendiert und 15 Minuten auf Eis inkubiert. Danach werden die Zellen abzentrifugiert und in 4 ml Puffer RF2 resuspendiert. Nach einer Inkubation für 15 Minuten auf Eis sind die Zellen bereit für die Transformation. Die Zellen können dann entweder für die Lagerung je 100 µl aliquotiert und eingefroren oder für die Transformation eingesetzt werden.

**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.

**3.2.7.2 Transformation**

Kompetenten Zellen werden Plasmide oder Ligationsansätze zugesetzt. Nach einer Inkubation für 45 Minuten auf Eis werden die Ansätze bei 42°C für eine Minute inkubiert. Die Zellen werden dann sofort wieder auf Eis gebracht und für eine Minute inkubiert. Dann werden die Zellen auf entsprechenden antibiotikumhaltigen Platten ausplattiert und die Platten werden bei 37°C über Nacht inkubiert.

**3.2.8 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli***

Die Isolierung erfolgt durch die Verwendung von NucleoSpin Kits der Firma Machery-Nagel.

**3.3 Protein- und lipidbiochemische Methoden****3.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ermöglicht die Trennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht. Die Bestimmung des Molekulargewichtes erfolgt anhand eines Molekulargewichtstandards, welcher wie die anderen Proben ebenfalls aufgetragen und getrennt wird. Die Färbung von Polyacrylamid-Gelen kann durch die Zugabe

von Coomassie Brilliant Blue erfolgen. Dazu färbt man zunächst das Gel für 15 Minuten mit der Coomassie-Färbelösung (siehe unten). Dann wird das blaue Gel mit Hilfe einer Entfärbelösung (siehe unten) entfärbt, bis nur die Proteine im Gel als blaue Banden erscheinen.

Ein Polyacrylamid-Gel besteht aus zwei Teilen: einem Trenngel (siehe unten) und einem direkt darauf liegenden Sammelgel (siehe unten). Durch das großporige Sammelgel werden die Proben zuerst auf der Grenze der beiden Gele konzentriert. Im kleinporigen Trenngel werden Proteine ihrer Größe nach aufgetrennt. Vor dem Auftragen auf das Gel werden die Proben mit 2 x SDS-Ladepuffer versetzt und für 5 Minuten bei 95°C erhitzt. Die Elektrophorese wurde bei 120 V durchgeführt.

<b>Trenngel</b>	<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**

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 kann ein Protein auch in kleinen Mengen spezifisch detektiert werden. Dazu werden Proteine, die zuvor mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt wurden, von dem SDS-Gel auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Dies geschieht für eine Stunde bei 350 mA in Blotting-Puffer. Ein erfolgreicher Transfer lässt sich anschließend schnell mit der Ponceau-Färbung überprüfen. Nach der Blockierung der Membran mit 5% (w/v) Milchpulver in PBS für eine Stunde wurde die Membran bei Raumtemperatur mit dem Primärantikörper in 5% (w/v) Milchpulver in PBS für eine weitere Stunde inkubiert. Anschließend wurde die Membran 3 x mit PBS/T für jeweils 5 Minuten gewaschen und darauf mit dem Sekundärantikörper für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem erneuten

dreimaligen Waschen, konnte die Membran mit den Lösungen des ECL advanced Kits entwickelt werden. Die Detektion erfolgte am LAS-3000 Imager.

### 3.3.3 Stripping der Membran

Die Membran des Western-Blots kann nach der Entwicklung von den gebundenen Antikörpern befreit werden, damit sie für eine weitere Detektion mit anderen Antikörpern benutzt werden kann. 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 wie nach dem Western-Blot weiter behandelt werden (siehe 3.3.2).

#### **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 Immunpräzipitation

Mit der Immunpräzipitation kann ein Protein in einem Zelllysat mithilfe eines Antikörpers und einer geringen Menge von Protein G Sepharose präzipitiert werden. Das durch diesen Antikörper an die Matrix gebundene Protein und mögliche Interaktoren (Co-Immunpräzipitate) dieses Proteins können anschließend im Western-Blot selektiv detektiert werden.

Das Hefelysat wird mit dem entsprechend Antikörper bei 4°C für eine Stunde gemischt nachdem es im IP-Puffer (siehe unten; siehe 3.4.3) hergestellt wurde. Dann wird eine kleine Menge der Protein G Sepharose zugegeben, die vorher mit IP-Puffer zweimal gewaschen wurde. Anschließend wird der Ansatz für eine weitere Stunde bei 4°C zusammengemischt und das immobilisierte Protein wird dreimal mit IP-Puffer mit 0,1% Triton X-100 gewaschen.

#### **IP-Puffer**

20 mM Tris  
100 mM NaCl  
10 mM EDTA  
1 mM EGTA  
5% (v/v) Glycerin  
pH 7,4

### 3.3.5 Herstellung von immobilisierten GST-Fusionsproteinen

Mithilfe des Plasmides pGEX-5X-1 kann ein GST-Fusionsprotein in BL21(DE3) Bakterienzellen produziert werden. Bei der Benutzung von Rosetta(DE3)plysS als das Proteinexpressionssystem wird außer 100 µg/ml Ampicillin noch 20 µg/ml Chloramphenicol zugegeben. Die Produktion des GST-Fusionsproteins wird durch die Zugabe von 1 mM IPTG in 300 ml Zellkultur bei einer  $OD_{600}=0,4$  und für 3 Stunden bei 30°C induziert. Die Zellen werden dann durch fünfzehnminütiges Abzentrifugieren bei 4500 rpm geerntet. Nach dem Waschen der Zellen mit H<sub>2</sub>O wird das Pellet in 30 ml PBS (pH 7,3) mit Protease-Inhibitoren resuspendiert (siehe unten). Anschließend werden die Zellen sechsmal für je eine Minute mit dem Sonoplus HD 2070 sonifiziert. Nach jeder Sonifikation muss der Ansatz für eine Minute auf Eis inkubiert werden. Dem Überstand werden nach fünfzehnminütigem Abzentrifugieren bei 4500 rpm 300 µl Glutation-Sepharose 4B zugegeben. Nach einer Inkubation auf einem Rollenmischer bei 4°C für 90 Minuten wird die Sepharose zweimal mit PBS gewaschen, welches 0,5% (v/v) Triton X-100 enthält. Für eine langzeitige Lagerung bei 4°C soll noch 1 mM DTT, 0,03% (w/v) Natriumazid und 20 µl der Stammlösung der Protease-Inhibitoren pro 1 ml Sepharose zugesetzt werden.

#### **Protease-Inhibitoren**

Stammlösung der Protease-Inhibitoren: eine Tablette in 1 ml H<sub>2</sub>O;  
20 µl der Stammlösung pro 1 ml Zellysat

### 3.3.6 Herstellung von immobilisierten His<sub>6</sub>-Fusionsproteinen

Die Herstellung von immobilisierten His<sub>6</sub>-Fusionsproteinen wird in einer ähnlichen Weise wie die von immobilisierten GST-Fusionsproteinen durchgeführt. Die Ni-NTA-Agarose wird zur Immobilisierung des His<sub>6</sub>-Fusionsproteins verwendet. Statt des PBS-Puffers wird hier der Sonifikationspuffer verwendet. Für das Waschen des immobilisierten His<sub>6</sub>-Fusionsproteins an der Ni-NTA-Agarose wird ein spezieller Wasch-Puffer verwendet.

#### **Sonifizierungs-Puffer (500 ml)**

50 mM NaP, pH 7,6  
(aus 21,2 ml 1 M Na<sub>2</sub>HPO<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



### 3.3.7 Herstellung von immobilisierten MBP-Fusionsproteinen und seine Elution von der Matrix

Die Herstellung von immobilisierten MBP-Fusionsproteinen wird ebenfalls in einer ähnlichen Weise wie die von immobilisierten GST-Fusionsproteinen durchgeführt. Dem Medium muss aber 0,2% (w/v) Glukose zugesetzt werden. Für die Sonifikation der Zellen wird statt des PBS-Puffers der Lysispuffer (siehe unten) benutzt. Die Elution des MBP-Fusionsproteins erfolgt durch die Inkubation des immobilisierten MBP-Fusionsproteins mit 10 mM Maltose.

#### Lysepuffer

200 mM Tris-HCl  
200 mM NaCl  
1 mM EDTA  
pH 7,4

### 3.3.8 Pulldown-Experiment

Das Pulldown-Experiment dient zum Test der direkten physikalischen Interaktion zwischen Proteinen *in vitro*. Beide Interaktionspartner sollen als rekombinante Proteine aus *E. coli* hergestellt und gereinigt werden. Während ein Interaktionspartner immobilisierter Form vorliegt, wird ein anderer Interaktionspartner von seiner Matrix eluiert und seinem möglichen Interaktionspartner zugesetzt. Nach einer Inkubation für 90 Minuten bei 4°C auf einem Rollenmischer wird das immobilisierte Protein bis zu sechs Mal mit dem Lysepuffer, der 0,1% Triton X-100 enthält, gewaschen. Zum Schluss wird der Interaktionspartner des immobilisierten Proteins mithilfe eines Western-Blotes detektiert.

### 3.3.9 *In vitro* Kinase-Assay

Der *in vitro* Kinase-Assay überprüft, ob ein Substrat von einer Kinase phosphoryliert werden kann. Dabei wird die Fähigkeit von Kinasen genutzt, Phosphate auf Proteine zu übertragen. In dieser Arbeit wurden die Substrate rekombinant hergestellt während die Kinasen aus Zelllysaten nach Überexpression immunpräzipitiert wurden. Die Verwendung des radioaktiv markierten ATP ( $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP) ermöglicht die Detektion einer Phosphorylierung. Die immobilisierte Kinase wurde dreimal mit dem Kinase-Assay-Puffer gewaschen und anschließend in 30  $\mu$ l Kinase-Assay-Puffer für jeden Ansatz resuspendiert. 1  $\mu$ l Substrat und dann 3  $\mu$ Ci radioaktives  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP wurden jedem Ansatz zugegeben. Die Ansätze wurden vorsichtig auf- und abpipettiert und dann für 30 Minuten im 30°C Wasserbad inkubiert. Nach

der Zugabe von 6  $\mu$ l 5 x SDS-Ladepuffer wurden die Ansätze für 5 Minuten bei 95°C gekocht. Dann wurden die Proben per SDS-Gelelektrophorese getrennt. Das Gel wurde anschließend auf zwei Whatmann-Papiere gelegt und bei 80°C auf einem Gelrockner getrocknet. Die Detektion des radioaktiven Signales erfolgte durch eine Phosphoimagerplatte und ein Phosphoimager.

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

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

#### **3.3.10 Analyse des gesamten Sterols mittels Gaschromatographie (GLC) und Massenspektroskopie (MS)**

Sterole liegen in Hefezellen sowohl in freier Form als auch in veresterter Form vor. Um die quantitative Analyse des gesamten Sterols zu erzielen, müssen alle Sterole als freie Form vorliegen und aus Hefezellen extrahiert werden.

Aus einer 48 Stunden Kultur wird eine 20 ml Hauptkultur auf eine OD<sub>600</sub>=0,1 angeimpft. Nach 25 Stunden werden 10 OD<sub>600</sub>-Einheiten von Zellen (Eine OD<sub>600</sub>-Einheit entspricht 1 ml Zellen der OD<sub>600</sub>=1) für die Proteinbestimmung benutzt. 20 OD<sub>600</sub>-Einheiten von Zellen wurden in ein Pyrex-Röhrchen gefüllt und abzentrifugiert. Das Pellet wird einmal mit Wasser gewaschen. Dem Pellet wird die Mischung 1 (siehe unten) zugegeben und im Sandbad bei 90°C für 2 Stunden gekocht. Dann werden die Lipide dreimal mit 1 ml n-Heptan extrahiert und jedes Mal wird die obere Phase in ein neues Pyrex-Röhrchen überführt. Die gesammelten oberen Phasen werden mit N<sub>2</sub>-Gas getrocknet und die Lipide werden dann in 10  $\mu$ l Pyridin aufgenommen. Nach der Zugabe von 10  $\mu$ l N'O'-bis(trimethylsilyl)-trifluoracetamid (Sigma) und einer anschließenden Inkubation für 10 Minuten werden 100  $\mu$ l Ethylacetat zugegeben und der gesamte Ansatz wurde in ein verschließbares kleines Röhrchen überführt, das später bei der GLC/MS direkt eingesetzt werden kann. Die Analyse der gesamten Sterole mit der GLC/MS wurde von dem Institut für Lebensmittelchemie und -technologie in Graz durchgeführt. Die Menge von einzelnen Sterolen wird mithilfe des Programms MSD ChemStation berechnet.

**Mischung 1**

0,6 ml Methanol  
0,4 ml 0,5% (w/v) Pyrogallol in Methanol  
0,4 ml 60% (w/v) KOH  
5 µl 2 mg/ml Cholesterol in Ethanol als Standard

**3.3.11 Analyse des Ergosterolesters und des freien Ergosterols mittels Dünnschichtchromatographie (DC)**

Die gleichen Mengen Zellen wie bei der GLC/MS-Analyse werden hier bei der DC-Analyse präpariert. Zuerst werden die Zellen mit 1 ml Glasperlen und in 3 ml  $\text{CHCl}_3$ : MeOH (2:1) bei Raumtemperatur für eine Stunde durch Vortexen aufgeschlossen. Die Ansätze werden dann gewaschen, um Proteine zu entfernen. Zuerst wird die Mischung 2 (siehe unten) den Ansätzen zugegeben und die Ansätze werden nach einem dreiminütigen Vortexen für 3 Minuten bei 3000 rpm abzentrifugiert. Die obere wässrige Phase und die entstehende Proteinschicht zwischen den beiden Phasen werden vorsichtig entfernt. Dieser Waschvorgang wird wiederholt bis keine Proteinschicht entsteht. Anschließend wird die gesamte organische Phase in ein neues Pyrex-Röhrchen überführt und das Lösungsmittel wird mit  $\text{N}_2$ -Gas getrocknet. Die Lipide werden dann mit 100 µl  $\text{CHCl}_3$ : MeOH (2:1) aufgenommen und in ein verschließbares kleines Röhrchen überführt, das später bei der DC direkt eingesetzt werden kann. Mithilfe eines Auftragsgerätes (Automatic TLC Sampler IV, Murrenz, Schweiz) werden alle Proben und der Standard (siehe unten) auf eine DC-Platte aufgetragen. Die Platte wird dann zuerst in dem Laufmittel 1 (siehe unten) eingetaucht, welches nur bis zweidrittel der Platte laufen darf. Nachdem die Platte trocken ist, wird sie wieder in das Laufmittel 2 (siehe unten) eingetaucht. Nachdem das Laufmittel 2 das Ende der Platte erreicht, wird die Platte herausgenommen, kurz getrocknet, 15 Sekunden in einer  $\text{MnCl}_2$ -Lösung (siehe unten) gehalten und dann bei 100°C für 20 Minuten gebacken. Danach sind die Lipide als Bande sichtbar. Die Quantifizierung der Bande erfolgt durch einen Scanner bei einer Wellenlänge von 400 nm (Shimadzu chromatoscanner CS-930)

**Mischung 2**

0,6 ml 0,034%  $\text{MgCl}_2$   
1 ml 2N KCl:MeOH (4:1; v/v)  
3 ml künstliche obere Phase  
( $\text{CHCl}_3$ :MeOH:H<sub>2</sub>O=3:48:47)

**Laufmittel 1**

Petroether:Diethylether:Eisessigsäure  
(70:30:2)

**Laufmittel 2**

Petroether:Diethylether (98:2)

<b>Standard</b>	<b>MnCl<sub>2</sub>-Lösung</b>
2,5 mg/ml Ergosterol und 5 mg/ml Cholesterolester in CHCl <sub>3</sub> :MeOH (2:1)	0,63 g MnCl <sub>2</sub> 60 ml H <sub>2</sub> O 60 ml Methanol 4 ml 98% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>

### 3.4 Hefe-Methoden

#### 3.4.1 Herstellung kompetenter Hefezellen

Um eine effiziente Transformation von Hefezellen zu ermöglichen, müssen diese kompetent gemacht werden. Dafür wird die Zellwand durch Behandlung mit Lithiumacetat und Sorbitol permeabler gemacht.

Aus einer Übernachtskultur werden 50 ml Hauptkultur auf eine OD<sub>600</sub>=0,3 angeimpft. Die Zellen werden dann bei 30°C und 230 rpm inkubiert bis die OD<sub>600</sub> zwischen 0,6 und 0,8 liegt. Nach Abzentrifugieren der Zellen wird das Pellet einmal mit 50 ml H<sub>2</sub>O gewaschen, einmal mit 10 ml LiSorb gewaschen und zum Schluss in 300 µl LiSorb resuspendiert. Nach der Zugabe von 30 µl denaturierter Träger-DNA (Lachssperma-DNA, welche 10 Minuten bei 95°C denaturiert wurde) wurde der Ansatz durch Auf- und Abpipettieren gut gemischt. Die Zellen werden in 50 µl aliquotiert und entweder eingefroren oder für die Transformation von Fremd-DNA eingesetzt.

<b>LiSorb</b>	<b>LiPEG</b>
100 mM Lithiumacetat 10 mM Tris 1 mM EDTA 1 M Sorbitol pH mit HCL auf 8,0 einstellen, dann sterilfiltrieren	100 mM Lithiumacetat 10 mM Tris 1 mM EDTA 40% (w/v) PEG3350 pH mit HCL auf 8,0 einstellen, dann sterilfiltrieren und bei + 4°C aufbewahren.

#### 3.4.2 Hefe-Transformation

50 µl kompetente Hefezellen werden mit 1 µl (etwa 0,2 µg) Plasmid-DNA oder 5 µl eines PCR-Produktes gemischt. Nach der Zugabe von 300 µl LiPEG wird der Ansatz kurz und kräftig vorgetext und bei Raumtemperatur für 20 Minuten inkubiert. 35 µl DMSO werden zugegeben und der gesamte Ansatz wird noch mal kurz und kräftig vorgetext. Nach einer Inkubation bei 42°C für 15 Minuten werden die Zellen 1 Minute bei 3200 rpm abzentrifugiert.

Das Pellet wird dann in 75  $\mu$ l H<sub>2</sub>O resuspendiert und auf einer Selektionsplatte ausplattiert. Werden die Zellen mit einem G418-Marker transformiert, müssen sie vor dem Ausplattieren für 4 Stunden bei 30°C in 1 ml YPD (Vollmedium) inkubiert werden. Nach dem Ausplattieren werden die Zellen bei 30°C inkubiert.

### 3.4.3 Herstellung eines Zelllysats aus Hefezellen

Die Herstellung eines Zelllysats aus Hefezellen kann mechanisch durch Vortexen mit Glasperlen erzielt werden. Dabei werden aus einer Übernachtskultur 50 ml Hauptkultur auf eine OD<sub>600</sub>=0,3 angeimpft. Die Zellen werden dann bei 30°C und 230 rpm inkubiert bis die OD<sub>600</sub> zwischen 0,8 und 1 liegt. Nach Abzentrifugieren der Zellen wird das Pellet einmal mit 50 ml H<sub>2</sub>O gewaschen und in 750  $\mu$ l IP-Puffer mit Protease-Inhibitoren resuspendiert. Nach der Zugabe von Glasperlen ( $\varnothing$  425 bis 600  $\mu$ m) wird der Ansatz sechsmal je 1 Minute vorgetext. Nach jedem Vortexen wird der Ansatz auf Eis für 1 Minute inkubiert. Anschließend wird die wässrige Phase in eine 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt. Die Glasperlen werden dann einmal durch 500  $\mu$ l IP-Puffer mit Protease-Inhibitoren gewaschen und die wässrige Phase wird ebenfalls in die 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt. Das Zelllysats ist dann der Überstand nach Abzentrifugieren der wässrigen Phase bei 4°C und 13000rpm für 1 Minute. Das Zelllysats kann für weitere Experimente benutzt werden.

### 3.4.4 TCA-Fällung von Hefeproteinen

Die TCA-Fällung stellt eine Methode zur schnellen Gewinnung von Proteinen aus Hefezellen dar. Zellen einer OD<sub>600</sub>-Einheit werden in 1 ml H<sub>2</sub>O resuspendiert. Nach der Zugabe von 150  $\mu$ l 1,85 M NaOH wird der Ansatz auf Eis für exakt 10 Minuten inkubiert. Danach werden 150  $\mu$ l 55% (w/v) TCA zugegeben und der Ansatz weiter für mindestens 10 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wird der Ansatz bei 4°C und 16400 rpm für 20 Minuten abzentrifugiert. Das Pellet wird dann in 50  $\mu$ l 2 x SDS-Ladepuffer aufgenommen und bei 95°C für 5 Minuten gekocht.

### 3.4.5 Isolierung chromosomaler Hefe-DNA

Nach der Isolierung chromosomaler Hefe-DNA kann sie als Matrizen-DNA für eine PCR benutzt werden. Dadurch kann ein bestimmtes Fragment des Hefe-Genoms vermehrt werden oder die Deletion eines Gens überprüft werden.

Eine OD-Einheit Zellen werden in 400 µl Puffer 1 resuspendiert und bei 37°C für 30 Minuten inkubiert. Der Puffer 1 enthält Zymolyase, welche die β-1,3-Glucane, den Hauptbestandteil der Hefezellwand, spalten kann. Zellen werden dann bei 14000 rpm für 30 Sekunden abzentrifugiert und anschließend in 400 µl TE-Puffer (pH 8,0) resuspendiert. Nach der Zugabe von 90 µl EDTA/Tris/SDS-Mix (50 µl 0,5 M EDTA, 20 µl 2 M Tris, pH 8,0 und 20 µl 10% (w/v) SDS) wird der Ansatz für 30 Minuten bei 65°C inkubiert. Danach wird der Ansatz auf Eis abgekühlt und 80 µl 5 M Kaliumacetat werden zugegeben. Nach einer Inkubation auf Eis wird der Ansatz für 5 Minuten bei 14000 rpm und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wird in ein neues Eppendorfgefäß überführt und 1 ml 100% Ethanol wird zugegeben. Der Ansatz wird vorsichtig gemischt und für 5 Minuten bei 14000 rpm und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wird entfernt und 1 ml 70% Ethanol wird zugegeben. Nach Abzentrifugieren für eine Minute bei 4°C und 14000 rpm wird der Überstand möglichst komplett entfernt und das fast unsichtbare Pellet wird nach dem Trocknen in 50 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen.

#### **Puffer 1**

0,9 M Sorbitol  
100 mM EDTA  
pH 7,5  
frische Zugabe von 4 µl β-Mercaptoethanol und  
0,1 mg Zymolyase T20 je 400 µl Puffer 1

### 3.4.6 Markierung und Deletion von Genen durch homologe Rekombinationen

Die homologe Rekombination ermöglicht die gezielte Markierung und Deletion von Genen. Mittels PCR werden DNA-Fragmente mit überhängenden Enden generiert, welche komplementär zu flankierenden Sequenzen der zu verändernden Gene sind. Aufgrund der hohen Rekombinationsrate in Hefezellen und der geringen Anzahl an Introns im Hefegenom ist eine Rekombination dieser DNA-Fragmente mit genomischer DNA ein relativ wahrscheinlicher Prozess. Diese DNA-Fragmente werden mit bestimmten Kombinationen von Oligonukleotiden und bestimmten Plasmiden amplifiziert und können neben dem

Selektionsmarker, auch einen Proteinmarker, sowie einen induzierbaren Galaktosepromotor codieren.

### 3.4.6.1 Deletion

Die Amplifikation von Deletions-Kassetten erfolgt mit den S1- und S2-Primern des zu deletierenden Gens und mit den pFA6a-Plasmiden als Matrizen-DNA (Longtine et al., 1998). Die Abbildung 3.2 zeigt das Prinzip.

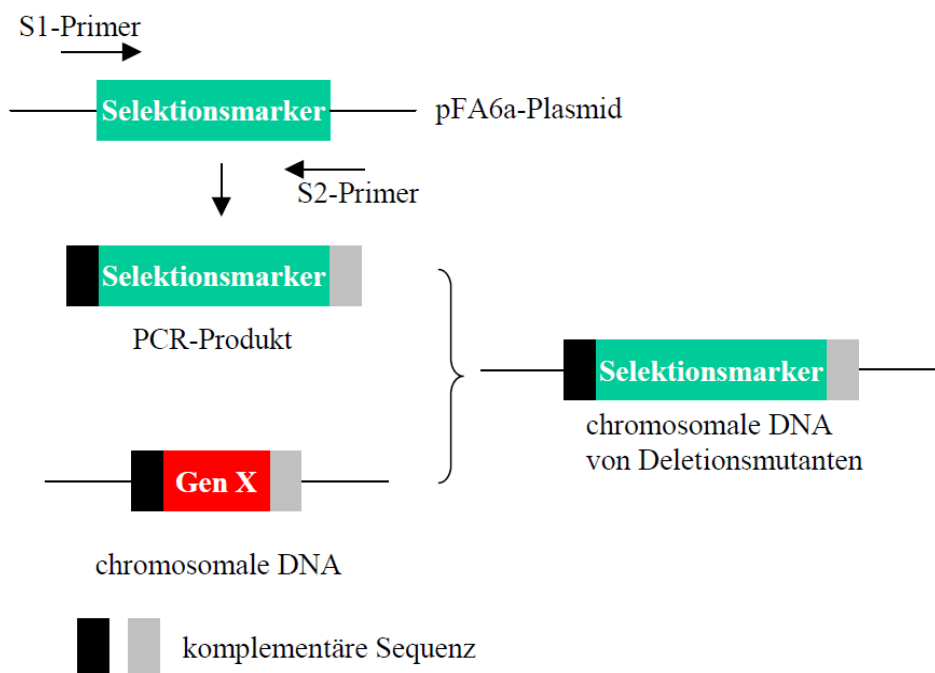


Abbildung 3.2: Prinzip der Deletion eines Gens mithilfe einer Deletionskassette. Die Deletionskassette enthält einen Selektionsmarker, welcher die Aminosäuren Histidin oder Tryptophan oder das Antibiotikum G418 exprimieren kann.

#### S1-Primer

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

#### S2-Primer

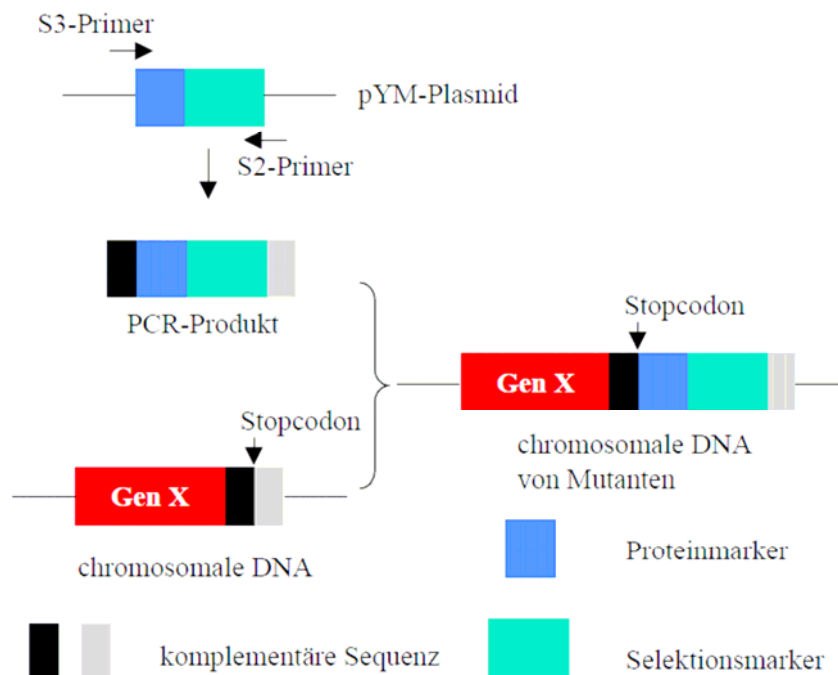
rückwärts komplementär, 45 Bp in 3' Richtung des Stopcodons, das Stopcodon mit eingeschlossen, dazu die Sequenz ATCGATGAATTCGAGCTCG am 3' Ende

Da die Größe der Deletionskassette und des deletierten Gens unterschiedlich ist, kann eine Deletion durch PCR bestätigt werden. Dafür wird die chromosomale DNA des Wildtyps und der möglichen Mutanten isoliert (3.4.5) und als Matrizen-DNA benutzt. Zur Bestätigung der Deletion wird das PCR-Programm der Klonierung (3.2.1) benutzt und der folgende Ansatz wird verwendet.

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.

### 3.4.6.2 C-terminale Markierung

Die Amplifikation von Kassetten für die C-terminale Markierung erfolgt mit den S2- und S3-Primern des zu markierenden Gens und mit den pYM-Plasmiden als Matrizen-DNA (Knop et al., 1999; Janke et al., 2004). Die Abbildung 3.3 zeigt das Prinzip. Zur Bestätigung der C-terminalen Markierung wird der Western-Blot verwendet.



**Abbildung 3.3:** Prinzip der C-terminalen Markierung eines Gens. Die PCR-Kassette enthält einen Selektionsmarker und einen Proteinmarker, der 3HA, 3myc oder GFP exprimieren kann.



**S2-Primer**

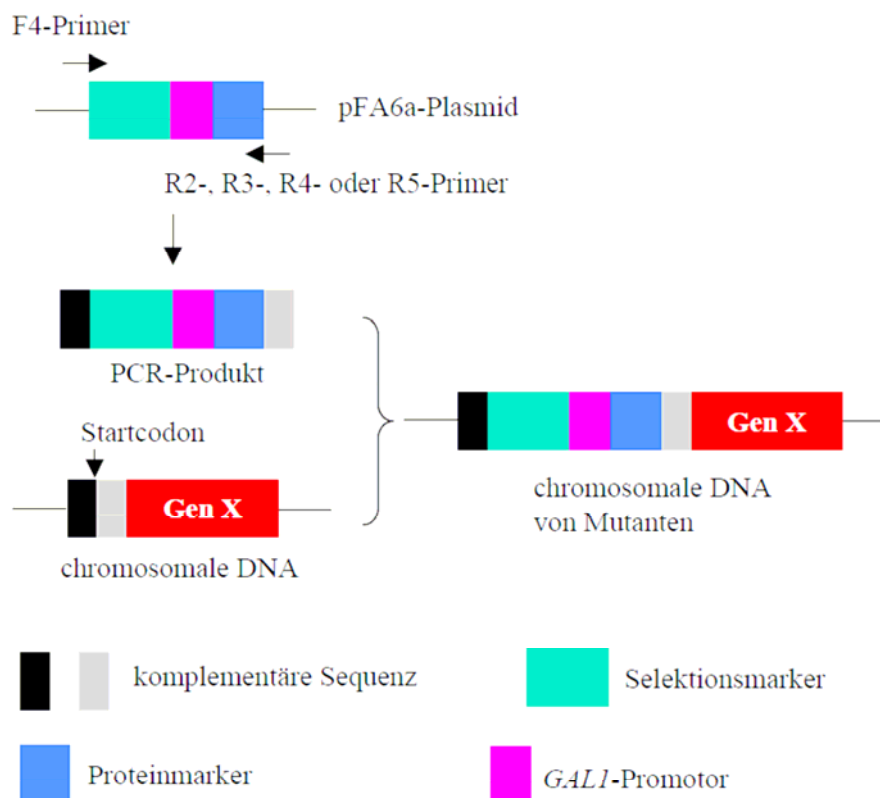
rückwärts komplementär, 45 Bp in 3' Richtung des Stopcodons, das Stopcodon mit eingeschlossen, dazu die Sequenz ATCGATGAATTCGAGCTCG am 3' Ende

**S3-Primer**

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

**3.4.6.3 N-terminale Markierung mit dem *GALI*-Promotor**

Für die N-terminale Markierung von Proteinen mit dem stark induzierbaren *GALI*-Promotor und unterschiedlichen Proteinmarkern können DNA-Kassetten mit den folgenden Primern (Abbildung 3.4) von den pFA6a-Plasmiden (Longtine et al., 1998) amplifiziert werden. Zur Bestätigung der N-terminalen Markierung wird der Western-Blot verwendet.



**Abbildung 3.4:** Prinzip der N-terminalen Markierung eines Gens. Die PCR-Kassette enthält einen Selektionsmarker und einen *GALI*-Promotor und kann auch einen Proteinmarker enthalten, der für 3HA, GST oder GFP codieren kann.

**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.

Bei der Herstellung von PCR-Kassetten für die Deletion, die C-terminale Modifizierung und die N-terminale Modifizierung wird der gleiche Ansatz und das folgende spezielle PCR-Programm verwendet werden.

**Der Ansatz für PCR-Kassetten****Das PCR-Programm für PCR-Kassetten**

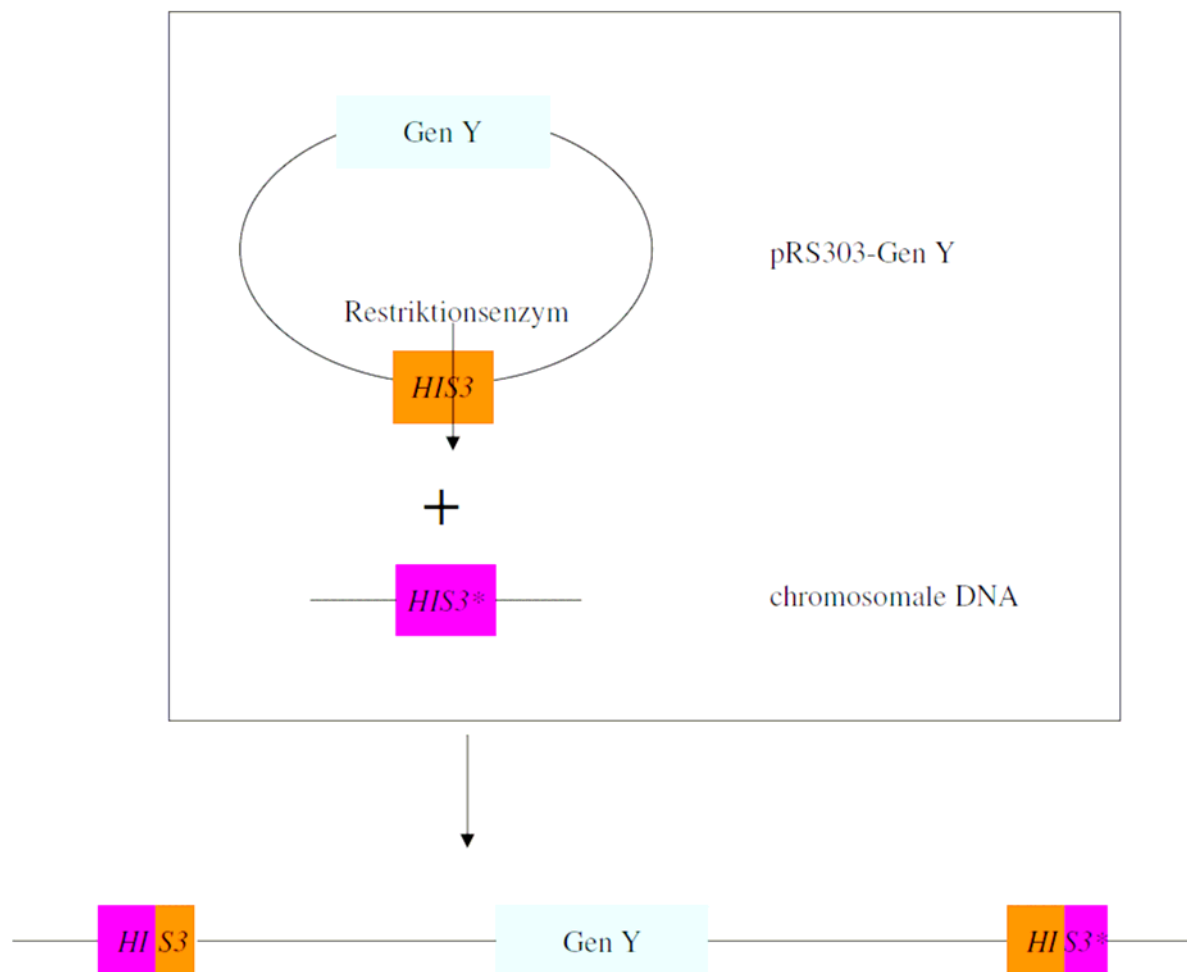
10 µl dNTP-Mix (2mM)  
 10 µl 10 x Buffer (-MgCl<sub>2</sub>)  
 10 µl MgCl<sub>2</sub> (25 mM)  
 0,4 µl *Taq* DNA-Polymerase  
 0,2 µl *Vent* DNA-Polymerase  
 0,5 µl je Primer (100 µM)  
 0,2 µl Template DNA  
 auf 100 µl mit Wasser auffüllen

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 s  
 8. 4°C ∞

**3.4.7 Integration eines Plasmides in das Hefegenom**

pRS30X-Vektoren (Sikorski und Hieter, 1989) ermöglichen eine indirekte Modifikation eines Gens im Hefegenom. Nach der Modifizierung des Gens (3.2.2) wird es in einen pRS30X-Vektor kloniert. X steht für unterschiedliche Selektionsmarker. X ist 3, 5 oder 6 wenn der

Selektionsmarker *HIS3*, *LEU2* oder *URA3* ist. In der chromosomalen DNA des Wildtyps sind die Gene *HIS3*, *LEU2* und *URA3* mutiert. Durch eine homologe Rekombination kann z.B. das Plasmid pRS303-Gen Y (modifiziert) sich in das Hefegenom integrieren und richtige Mutanten können dann mit Platten ohne Histidin selektiert werden, da ein nicht mutiertes funktionales *HIS3* Gen entsteht. Das modifizierte Gen Y wird dadurch ins Hefegenom gebracht (Abbildung 3.5).



**Abbildung 3.5:** Integration eines Plasmides in das Hefegenom. Da ein funktionierendes *HIS*-Gen entsteht, können richtige Mutanten durch Platten ohne Histidin selektiert werden. Mithilfe dieses Integrationsplasmides kann ein Gen in das Hefegenom gebracht werden. Das Gen kann vorher mit genetischer Manipulation modifiziert werden.

Das Plasmid pRS303-Gen Y muss zuvor mit einem Restriktionsenzym in dem *HIS3*-Gen geschnitten werden. Eine erfolgreiche homologe Rekombination kann durch eine PCR bestätigt werden. Dabei wird zuerst die chromosomale DNA der Mutante isoliert. Das Programm und der Ansatz zur Bestätigung einer Deletion werden verwendet. Falls vorher das

Wildtypgen deletiert wird, erhält man bei einem richtigen Klon zwei Banden. Eine Bande entspricht der Größe der Deletionskassette des Gens und eine andere entspricht der Größe des Gens.

#### **3.4.8 Herstellung von Verdünnungsreihen**

Das Wachstum genetisch veränderter Mutanten kann mit dem des Wildtyps durch Verdünnungsreihen verglichen werden. Dabei wird der OD<sub>600</sub>-Wert von Übernachtskulturen gemessen. Anschließend werden 1000 durch den OD<sub>600</sub>-Wert geteilt. Dies entspricht dem Volumen in µl, welches dann mit Wasser auf 1000 µl aufgefüllt wird. Von dieser Ausgangsverdünnung werden im Anschluss eine 1:10, 1:100 und eine 1:1000 Verdünnung hergestellt. Jeweils 4 µl dieser Verdünnungen werden dann auf die Wachstumsplatte(n) getropft und bei der gewünschten Temperatur inkubiert.

#### **3.4.9 Fluoreszenz-Mikroskopie von Hefezellen**

Die Expression eines mit dem GFP markierten Proteins in Hefezellen kann auch mittels Fluoreszenz-Mikroskopie analysiert werden. Dadurch kann man Informationen über die Verteilung dieses Proteins in Hefezellen erhalten. Wenn die Expression des GFP-Fusionsproteins unter dem eigenem Promotor sehr schwach und unter einem Fluoreszenz-Mikroskop nicht zu sehen ist, kann das GFP-Fusionsprotein durch einen induzierbaren *GALI*-Promotor überexprimiert werden. Um die Ergebnisse der Fluoreszenz-Mikroskopie zu verbessern, wird dem Medium, in dem die Zellen angezogen werden, Adenin (10mg/ml Adeninhemisulfat, 1:100 verdünnt) zugesetzt.

Um Photos von den Zellen zu machen, müssen sie zuerst fixiert und auf einem Objektträger immobilisiert werden. Die Fixierung von 1 ml Zellen erfolgt durch eine zehnmütige Inkubation der Zellen mit 3,7% Paraformaldehyd bei Raumtemperatur. Danach werden die Zellen zweimal mit 1 ml H<sub>2</sub>O gewaschen und zum Schluss in 50 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen. Nach der Sonifikation der Zellen in einem Sonifizierwasserbad (Sonorex Super RK106, Bandelin) für 30 Sekunden, werden 2 µl Zellen mit 1 µl Mowiol auf einem Objektträger vermischt. Das Deckgläschen wird aufgelegt und der Objektträger wird bis zum Aushärten des Mowioms bei Raumtemperatur im Dunkeln aufbewahrt. Die Zellen werden so immobilisiert. Die Analyse der Zellen unter einem Fluoreszenz-Mikroskop erfolgt mit einem 100-fachen Immersionsobjektiv.

**Mowiol (25 ml)**

12 ml 0,2 M Tris pH 8,5

4,2 g Mowiol-Pulver

Mischung auf 50°C unter Rühren erhitzen

Zugabe von 6 g Glycerin, Ansatz bei 50°C rühren  
und 5 Minuten bei 1000 rpm abzentrifugieren.

**3.4.10 Analyse des filamentösen Wachstums von haploiden Hefezellen**

Der Hefestamm  $\Sigma 1278b$  (PPY966) besitzt die Fähigkeit, in das Agarmedium einzuwachsen. Diese Fähigkeit wird als invasives Wachstum bezeichnet und gehört zum polaren Wachstum von Hefezellen. Die Deletion oder die Überexpression eines Gens kann zu einem veränderten invasiven Wachstum führen.

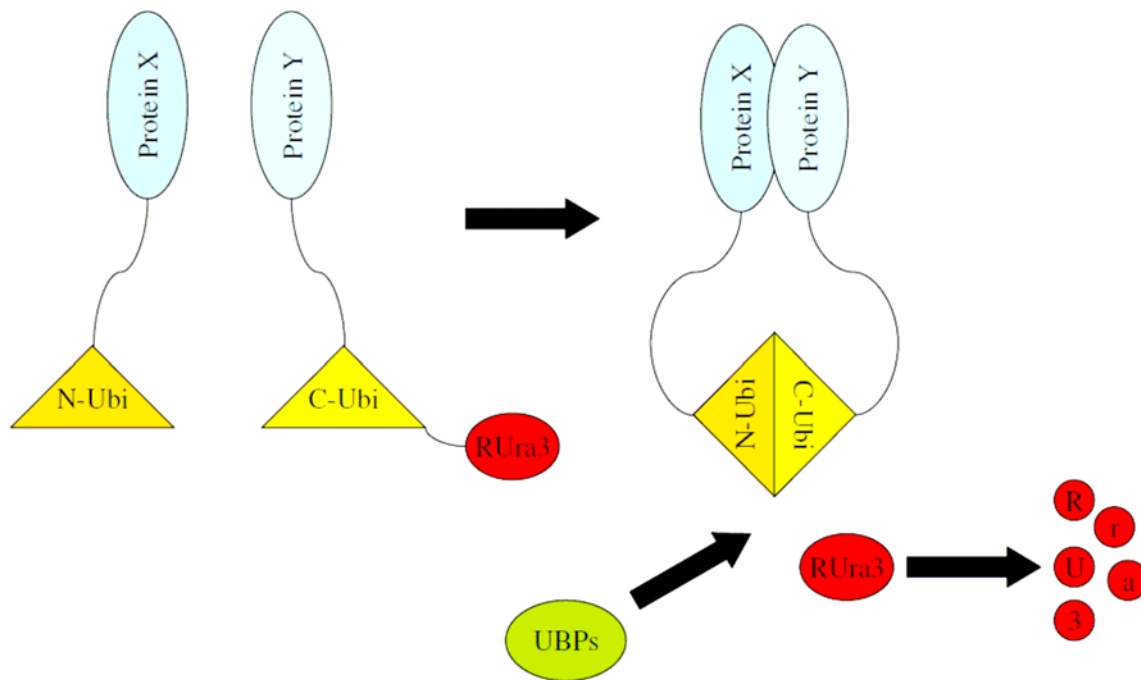
Die  $OD_{600}$ -Werte von Übernachtskulturen werden gemessen. Anschließend werden 1000 durch jeden dieser Werte geteilt. Jedes Ergebnis entspricht dem Volumen in  $\mu\text{l}$ , welches dann mit Wasser auf 1000  $\mu\text{l}$  aufgefüllt wird. Jeweils 4  $\mu\text{l}$  dieser Proben werden auf eine entsprechende Agarplatte getropft. Die Agarplatte wird dann bei der entsprechenden Temperatur für 48 bis 72 Stunden inkubiert. Nach der Protokollierung des normalen Wachstums der Stämme durch einen Scanner, werden die auf der Oberfläche der Agarplatte wachsenden Zellen abgespült. Zellen, die das invasive Wachstum machen, können nicht abgespült werden. Zellen besitzen defektes invasives Wachstum, wenn sie weniger als der Wildtyp in die Agarplatte einwachsen. Ein hyperinvasives Wachstum wird als solches bezeichnet, wenn die Zellen mehr als der Wildtyp in die Agarplatte einwachsen.

**3.4.11 Split-Ubiquitin-Technik**

Zur Analyse einer (direkten) Interaktion zwischen Proteinen *in vivo* kann die Split-Ubiquitin-Technik (Johnsson und Varshavsky, 1994) verwendet werden. Diese Technik ist eine Variante der klassischen Hefe-2-Hybrid-Technik und gilt als eine besonders zuverlässige Methode.

Die entsprechenden Gene der beiden Proteine müssen zuerst in zwei unterschiedliche Vektoren kloniert werden. Ein Vektor wird als RUra3-Cub bezeichnet und enthält die C-terminale Hälfte von Ubiquitin. An dem C-Terminus der C-terminalen Hälfte des Ubiquitins ist eine veränderte Form des Ura3-Enzyms als Reporter gekoppelt. Dieses als RUra3 bezeichnete Enzym besitzt an seinem extremen N-Terminus ein zusätzliches Arginin, das bei einer Interaktion zwischen beiden Interaktionspartnern und der daraus folgenden Abspaltung

des Reporters einen schnellen Abbau des Reporters ermöglicht. Ein anderer Vektor wird als Nub bezeichnet und enthält die N-terminale Hälfte von Ubiquitin. Bei einer Interaktion zwischen den beiden Proteinen werden die beiden Hälften von Ubiquitin zueinander gebracht und ein vollständiges Ubiquitin entsteht. Das an dem Ubiquitin gebundene RUra3 wird durch Ubiquitin-spezifische Proteasen (UBPs) von der C-terminalen Hälfte des Ubiquitins abgespalten und schnell abgebaut (Abbildung 3.6).



**Abbildung 3.6:** Das Prinzip der Split-Ubiquitin-Technik. Die Interaktion der beiden Proteine führt zum schnellen Abbau von RUra3. Auf einer Platte ohne Uracil können die Zellen dann nicht mehr wachsen.

Zuerst werden die Cub- und Nub-Plasmide in die Hefezellen transformiert. Da das Nub-Plasmid ein *LEU2* und das Cub-Plasmid ein *HIS3* enthält, können die beiden Plasmide von den Hefezellen behalten werden, die auf Platten ohne die Aminosäuren Leucin und Histidin wachsen. Der OD<sub>600</sub>-Wert der Übernachtskultur von den Hefezellen mit den beiden Plasmiden wird gemessen und eine Verdünnungsreihe (3.4.8) wird sowohl auf eine Platte ohne Histidin und Leucin als Kontrolle als auch auf eine Platte ohne Histidin, Leucin, Uracil, Methionin und Cystein getropft. Die Expression des Proteins von dem Cub-Plasmid ist nur möglich wenn kein Methionin und Cystein vorhanden ist, da diese unter der Kontrolle des *MET25*-Promotors ist. Als negative Kontrolle werden Plasmide benutzt, deren exprimierte Proteine

keine Interaktion miteinander zeigen. Dagegen interagieren die Produkte der Plasmide von der positiven Kontrolle miteinander.

Die Split-Ubiquitin-Technik kann auch für einen Screen eingesetzt werden, um die Interaktoren eines Köderproteins zu identifizieren. Dabei wird das Gen des Köderproteins in den RUr3-Cub-Vektor kloniert und das Plasmid in Hefezellen transformiert. Die zu durchsuchende Gen-Bibliothek besteht aus zufällig geschnittenen chromosomalen DNA-Abschnitten, die sich im Nub-Vektor befinden. Die Nub-Plasmide werden dann in die Hefezellen mit dem RUr3-Cub-Plasmid transformiert. Da Interaktionen zwischen den Interaktionspartnern zum Sterben von Hefezellen führen, wird beim Screen den Platten Uracil und 5-FOA zugegeben. Uracil unterstützt das Wachstum von Hefezellen wenn Interaktionen auftreten. 5-FOA wird durch das exprimierte Produkt von *RUR3* zu einer für die Zellen toxischen Substanz umgewandelt. Dies verursacht das Absterben von Hefezellen, in denen keine Interaktion zwischen den Interaktionspartnern stattfindet und ermöglicht die Selektion nach positiven Interaktoren.

<b>SC-Met/Cys-His-Leu-Ura-Platte</b>	<b>SC-Met/Cys-His-Leu + 5-FOA-Platte</b>
6,7 g Bacto yeast nitrogen base w/o amino acids 20 g Glucose 20 mg Adenin 20 mg Tryptophan 30 mg Lysin 400 ml H <sub>2</sub> O Mischung lösen und sterilfiltrieren.  Agar separat autoklavieren 15 g Agar 600 ml H <sub>2</sub> O	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 15 g Agar 600 ml H <sub>2</sub> O

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Regulation der Sterolsynthese und Sterolestersynthese durch Ste20 und Cla4

#### 4.1.1 Analyse von Gesamtsterolen mit GLC/MS

Die Sterolbiosynthese spielt eine wichtige Rolle beim polaren Zellwachstum (Tiedje et al., 2007; Bagnat und Simons, 2002; Jin et al., 2007; Kozminski et al., 2006). Es wurde gezeigt, dass Ste20 mit den Sterolsyntheseproteinen Erg4, Cbr1 und Ncp1 interagiert. Die drei Proteine sind wichtig für Zellpolarität. *CLA4* interagiert genetisch mit den Sterolsynthesegenen *ERG4* und *NCPI* (Tiedje et al., 2007). Da Ste20 und Cla4 zwei wichtige Polaritätsproteine sind, wurde untersucht, ob ihre Deletion oder Überexpression die Sterolmenge in Hefen beeinflusst. Hierfür wurden Lipide aus Hefen extrahiert und mit GLC/MS ("gas liquid chromatography/mass spectrometry") analysiert.

##### 4.1.1.1 Die Sterolmenge erhöhte sich in *ste20Δ*- oder *cla4Δ*-Mutanten

Sterole aus Wildtypzellen, *ste20Δ*-Mutanten und *cla4Δ*-Mutanten wurden extrahiert und mit GLC/MS analysiert. Die häufigsten Sterole, d. h. Ergosterol, Zymosterol, Fecosterol und Lanosterol wurden quantifiziert. Die Menge des gesamten Sterols entspricht der Summe der vier Sterole. Es zeigte sich, dass sowohl das Gesamtsterol als auch alle einzelnen Sterole in beiden Mutanten erhöht waren (Tabelle 4.1.1).

	µg Sterol/mg Protein				
	Wildtyp	<i>ste20Δ</i>	<i>cla4Δ</i>	<i>swe1Δ</i>	<i>cla4Δ swe1Δ</i>
Ergosterol	15,21 ± 0,66	20,1 ± 1,67	19,58 ± 0,57	15,15 ± 0,98	18,18 ± 1,11
Zymosterol	0,62 ± 0,14	0,84 ± 0,06	0,76 ± 0,11	0,73 ± 0,06	1,14 ± 0,31
Fecosterol	0,48 ± 0,16	0,64 ± 0,04	0,65 ± 0,07	0,45 ± 0,04	0,89 ± 0,30
Lanosterol	0,28 ± 0,09	0,45 ± 0,15	0,38 ± 0,06	0,26 ± 0,08	0,35 ± 0,07
gesamtes Sterol	16,59 ± 0,59	22,03 ± 1,65	21,37 ± 0,78	16,49 ± 1,09	20,56 ± 1,52

Tabelle 4.1.1: Sterolanalyse von Deletionsmutanten.

Die Daten sind Mittelwerte mit ihren Standardabweichungen von mindestens zwei unabhängigen Experimenten.



Eine *cla4Δ*-Mutante hat eine stark veränderte Morphologie mit verlängerten Knospen (Abbildung 4.1.1) (Cvrckova et al., 1995). Der Grund dafür ist, dass Cla4 an dem Abbau von Swe1 beteiligt ist, das bei dem Übergang vom apikalen Wachstum zum isotropen Wachstum eine wichtige Rolle spielt. In der *cla4Δ*-Mutante wird Swe1 akkumuliert und das apikale Wachstum wird dadurch ausgeweitet (Sakchaisri et al., 2004). Gibt es einen Zusammenhang zwischen der Erhöhung der Sterole und der Morphologie der *cla4Δ*-Mutante? Um diese Frage zu beantworten, wurde sowohl die *cla4Δ swe1Δ*-Mutante, die wieder eine normale Morphologie besitzt, als auch die *swe1Δ*-Mutante, die als Kontrolle diente, für eine Sterolanalyse eingesetzt (Abbildung 4.1.1). Es zeigt sich, dass die *cla4Δ swe1Δ*-Mutante eine vergleichbare Sterolmenge wie die *cla4Δ*-Mutante besitzt, während die *swe1Δ*-Mutante eine vergleichbare Sterolmenge wie der Wildtyp aufzeigt. Die erhöhte Sterolmenge in der *cla4Δ*-Mutante hat daher keinen Zusammenhang mit ihrer Morphologie.

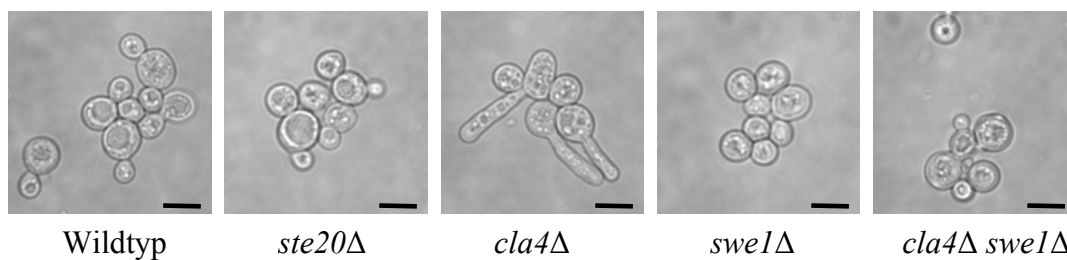


Abbildung 4.1.1: Die Morphologie von Wildtyp und Mutanten.

Die Zellen wurden wie für Sterolanalyse vorbereitet und nach Fixierung mit Formaldehyd mikroskopisch analysiert. Der Balken entspricht 5 µm.

#### 4.1.1.2 Erniedrigte Sterolmengen nach *STE20* Überexpression

Die Überexpression von *STE20* und *CLA4* wurde durch das Multi-Copy-Plamid pRS425 erreicht. Wildtypzellen wurden mit pRS425 (Leerplasmid), pRS425-*STE20* oder pRS425-*CLA4* transformiert und ebenfalls für die Sterolanalyse mittels GLC/MS eingesetzt. Es zeigte sich, dass Zellen mit pRS425-*STE20* eine erniedrigte Sterolmenge besitzen, während eine Überexpression von *CLA4* keinen Einfluss auf die Sterolmenge hatte (Tabelle 4.1.2). Zusammen mit dem Ergebnis, dass *ste20Δ*-Mutanten eine erhöhte Sterolmenge besaßen, kann spekuliert werden, dass Ste20 ein negativer Regulator der Sterolmenge in Hefezellen ist. Alle Zellen in diesem Versuch besaßen eine normale Morphologie (Abbildung 4.1.2). Für eine Sterolanalyse mit GLC/MS wurden Wildtypzellen sowie Deletionsmutanten in YPD gezüchtet, während Wildtypzellen mit Multi-Copy-Plasmiden im Selektionsmedium

gezüchtet wurden. Dieser Unterschied führte zu unterschiedlichen Lipidmengen von Wildtypzellen in YPD und Wildtypzellen mit pRS425 im Selektionsmedium (Tabelle 4.1.1 und Tabelle 4.1.2).

µg Sterol/mg Protein			
	pRS425	pRS425- <i>STE20</i>	pRS425- <i>CLA4</i>
Ergosterol	26,67 ± 2,12	21,32 ± 0,86	27,44 ± 0,90
Zymosterol	2,36 ± 0,11	1,99 ± 0,16	2,53 ± 0,22
Fecosterol	0,92 ± 0,05	0,91 ± 0,09	1,20 ± 0,08
Lanosterol	0,60 ± 0,27	0,31 ± 0,10	0,68 ± 0,10
gesamtes Sterol	30,55 ± 2,10	24,53 ± 1,01	31,85 ± 1,11

Tabelle 4.1.2: Überexpression von *STE20* führte zur verringerten Sterolmengen in Hefezellen. Die Mittelwerte und Standardabweichungen basieren auf mindestens zwei voneinander unabhängigen Experimenten.

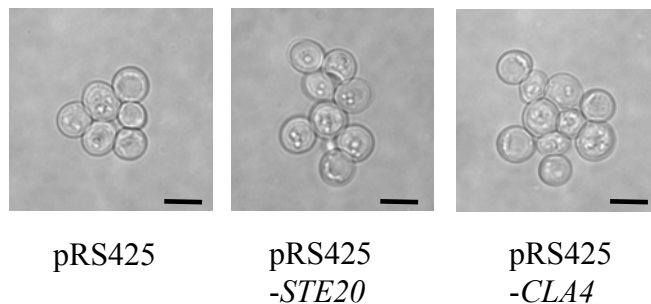


Abbildung 4.1.2: Morphologie von Wildtypzellen mit pRS425 (Leerplasmid), pRS425-*STE20* oder pRS425-*CLA4*.

Die Zellen wurden wie für die Sterolanalyse vorbereitet und nach Fixierung mit Formaldehyd mikroskopisch analysiert. Alle drei Stämme besaßen eine ähnliche Morphologie. Der Balken entspricht 5 µm.

#### 4.1.1.3 Sterolmengen änderten sich nicht durch Behandlung mit $\alpha$ -Faktor

Sterole spielen eine wichtige Rolle beim polaren Wachstum, besonders während der Paarung (Tiedje et al., 2007; Bagnat und Simons, 2002; Jin et al., 2008). Es wurde spekuliert, dass die Sterolmenge während der Bildung einer Paarungsprojektion zunimmt (Bagnat und Simons, 2002). Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden Wildtypzellen mit  $\alpha$ -Faktor in DMSO behandelt und ihre Sterolmenge mit GLC/MS analysiert. Als Kontrolle dienten Zellen, die mit DMSO unter gleichen Bedingungen behandelt wurden. Es zeigte sich, dass sich die Sterolmenge während der Paarung nicht ändert (Tabelle 4.1.3).

µg Sterol/mg Protein		
	DMSO	α-Faktor
Ergosterol	21,89 ± 2,00	20,84 ± 1,61
Zymosterol	1,20 ± 0,14	1,24 ± 0,20
Fecosterol	0,48 ± 0,15	0,49 ± 0,15
Lanosterol	0,61 ± 0,32	0,55 ± 0,29
gesamtes Sterol	24,18 ± 1,94	23,12 ± 1,71

Tabelle 4.1.3: Die Menge der Sterole ändert sich nicht während der Paarung.

Die Ausbildung der Paarungsprojektionen wurde mikroskopisch kontrolliert. Jeweils über 95% der Zellen bildeten diese aus. Mittelwerte und Standardabweichungen aus fünf unabhängigen Experimenten sind hier gezeigt.

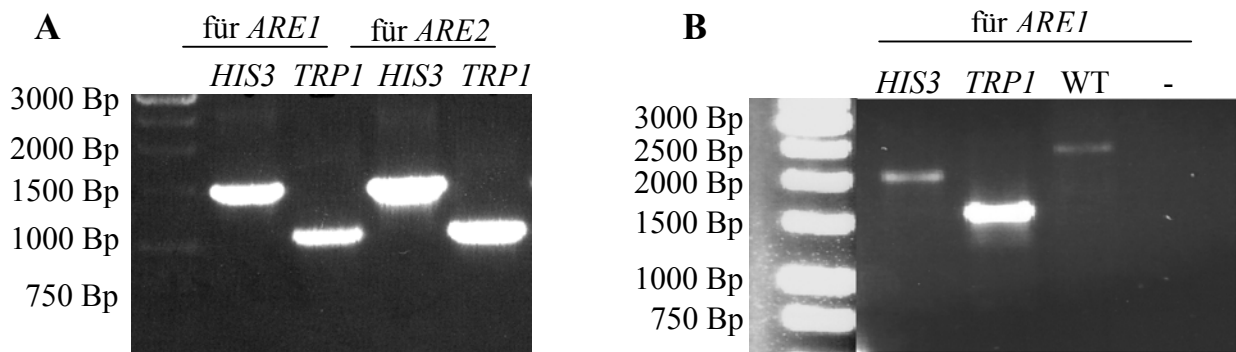
#### 4.1.2 *are1Δ*-, *are2Δ*- und *are1Δare2Δ*-Stämme haben Zellpolaritätsdefekte

Wie gezeigt, regulieren Ste20 und Cla4 die Sterolsynthese. In einem Screen wurde entdeckt, dass Ste20 die Sterolestersynthase Are2 phosphoryliert (Ptacek et al., 2005). Als wichtigste Sterolestersynthase in Hefe, spielt Are2 eine wichtige Rolle für die Speicherung und Homöostase von Sterolen in Hefe. Es sollte daher untersucht werden, ob Are2 und auch Are1, ein redundantes Protein von Are2, Funktionen bei Zellpolaritätsprozessen haben. Dazu sollte geklärt werden, ob Ste20 und Cla4 die Ergosterolsynthese regulieren.

##### 4.1.2.1 Herstellung und Bestätigung von *are1Δ*-, *are2Δ*- und *are1Δ are2Δ*-Stämmen

Um Phänotypen von *are1Δ*-, *are2Δ*- und *are1Δ are2Δ*-Stämmen zu analysieren, wurden die Stämme zuerst hergestellt. Dabei wurden PCR-Fragmente hergestellt, welche die Selektionsmarker *HIS3* oder *TRP1* trugen und nach homologer Rekombination gegen die Zielgene *ARE1* oder *ARE2* im Wildtyp rekombinieren konnten (Abbildung 4.1.3 A). Es zeigte sich, dass die benötigten PCR-Fragmente richtig hergestellt wurden. Nach der Transformation wurden Zellen auf entsprechende Selektionsplatten ausplattiert. Da die Gene *HIS3* und *TRP1* im Wildtyp mutiert waren, konnten nur Zellen auf den entsprechenden Selektionsplatten wachsen, die das *HIS3*- oder *TRP1*-Gen durch homologe Rekombination erworben haben. Zur Bestätigung einer erfolgreichen Deletion wurde ebenfalls die PCR-Technik benutzt. Als ein Beispiel wird hier die Bestätigung der Deletion von *ARE1* gezeigt (Abbildung 4.1.3 B). Zuerst wurde die chromosomale DNA aus Zellen präpariert, die als Template diente. Die beiden Primer Are1-1 und Are1-2 binden entsprechend 300 Bp 5' vor dem Startcodon und 300 Bp 3'

hinter dem Stopcodon des *ARE1*-Gens. Da das *ARE1*-Gen (1883 Bp), das *HIS3*-Gen (1403 Bp) und das *TRP1*-Gen (1036 Bp) unterschiedlich groß sind, konnten durch PCR richtige Klone bestätigt werden. Es zeigte sich, dass je zwei Klone mit den Selektionsmarkern *HIS3* und *TRP1* positiv waren. Die zweifache Mutante wurde nach Deletion von *ARE2* in der *are1Δ*-Mutante hergestellt.



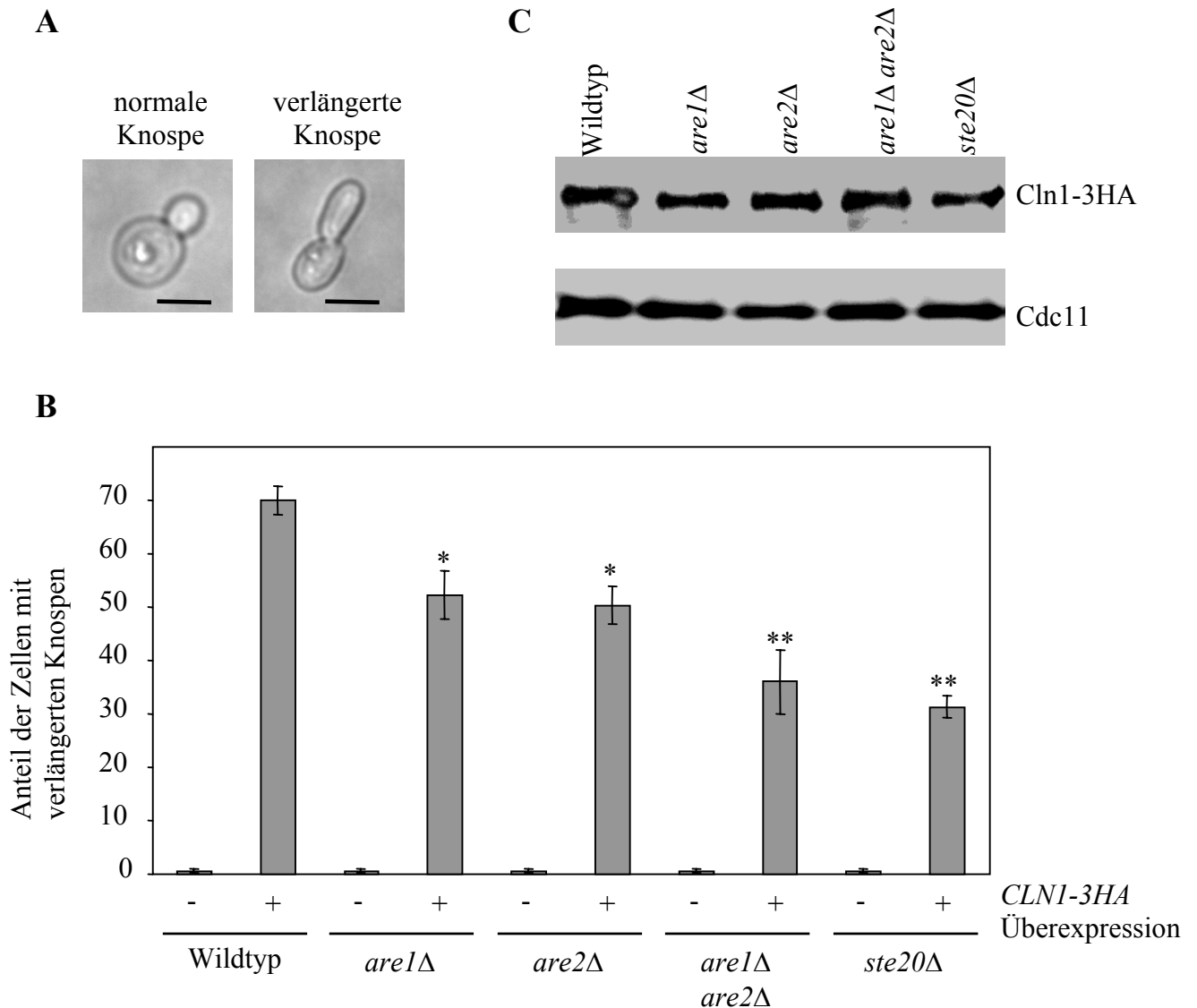
**Abbildung 4.1.3:** PCR für Deletionskassetten und Bestätigung der Deletion.

(A) Die Deletionskassetten wurden durch PCR hergestellt. Es wurden PCR-Fragmente, welche die Selektionsmarker *HIS3* oder *TRP1* enthielten, für *ARE1*- und *ARE2*-Deletionen hergestellt. Die erwartete Größe von 1036 Bp für *TRP1* und 1403 Bp für *HIS3* stimmt mit der Größe der PCR-Fragmente überein. (B) Bestätigung der Deletion durch PCR. Gezeigt sind zwei Klone mit dem deletierten *ARE1*. In einem Klon wurde *ARE1* durch *HIS3* ersetzt und in einem anderen wurde *ARE1* durch *TRP1* ersetzt. Die Größe der PCR-Produkte stimmten mit den erwarteten Größen, 2000 Bp für *HIS3* und 1600 Bp für *TRP1* überein. Die beiden Klone waren somit positiv.

#### 4.1.2.2 Analyse des apikalen Wachstums in *are1Δ*-, *are2Δ*- und *are1Δare2Δ*-Stämmen

Die *are1Δ*-, *are2Δ*- und *are1Δare2Δ*-Stämme zeigten keinen Unterschied zum Wildtyp im Bezug auf die Morphologie, die Paarung und das filamentöse Wachstum (Daten nicht gezeigt). Sie wurden dann mit einem Plasmid transformiert, das ein unter dem *GAL*-Promotor kontrolliertes *CLNI*-Gen enthält. Die Cyclin-abhängige-Kinase Cdc28 reguliert das apikale Wachstum von Knospen in Hefezellen nach ihrer Aktivierung durch die G1-Cycline Cln1 und Cln2. Das Auftreten der Mitose-Cycline Clb1 und Clb2 wirkt den G1-Cyclinen entgegen und führt in den Knospen dann zum isotropen Wachstum. Wenn *CLNI* überexprimiert wird, verlängert sich das apikale Wachstum und elongierte Knospen werden gebildet (Ni und Snyder, 2001). Nach induzierter Überexpression von *CLNI* durch 2% Galaktose für 4 Stunden wurden die Zellen fixiert und ihre Morphologie unter dem Lichtmikroskop quantitativ analysiert. Als Kontrollen wurden der Wildtyp und ebenfalls ein *ste20Δ*-Stamm analysiert. Der *ste20Δ*-Stamm war bekannt für seinen Defekt beim apikalen Wachstum und diente hier als positive Kontrolle (Tiedje et al., 2007; Ni et al., 2001). Es zeigte sich, dass die

beiden Einfachmutanten *are1* $\Delta$  und *are2* $\Delta$  weniger verlängerte Knospen als der Wildtyp bilden konnten, während die Doppelmutante noch weniger verlängerte Knospen bilden konnte (Abbildung 4.1.4 A und B). Durch Western-Blot wurde gezeigt, dass vergleichbare Mengen von Cln1-3HA in allen Mutanten exprimiert wurden (Abbildung 4.1.4 C).



**Abbildung 4.1.4:** Analyse des apikalen Wachstums von *are1* $\Delta$ -, *are2* $\Delta$ - und *are1* $\Delta$  *are2* $\Delta$ -Stämmen. (A) Morphologie von Zellen mit einer normalen Knospe und einer verlängerten Knospe. Der Balken entspricht 5  $\mu$ m.

(B) Are1 und Are2 sind am apikalen Wachstum beteiligt. Der Anteil der Zellen mit verlängerten Knospen wurde in drei unabhängigen Experimenten quantitativ analysiert. In jedem Experiment wurden 100 Zellen gezählt. \*,  $P < 0,05$  im Vergleich zum Wildtyp. \*\*,  $P < 0,01$  im Vergleich zum Wildtyp.

(C) Cln1-3HA wurde in allen Stämmen in einer vergleichbaren Menge überexprimiert. Cdc11 diente als Ladekontrolle.

### 4.1.3 Analyse der Interaktion zwischen Ste20 und den Sterolestersynthasen Are1 und Are2

Da Ste20 einem Bericht nach die Sterolestersynthase Are2 phosphoryliert (Ptacek et al., 2005), wurde zuerst untersucht, ob Ste20 eine physikalische Interaktion mit Are2 und mit dem ihm verwandten Enzym Are1 zeigt. Während die Split-Ubiquitin-Technik und Co-Immunpräzipitations-Experimente keine Interaktion zwischen Ste20 und Are2 *in vivo* beweisen konnten (Daten nicht gezeigt), war ein reines *in vitro* Bindungsexperiment wegen des hohen hydrophoben Charakters der Sterolestersynthase (*Saccharomyces* Genome Database) auch nicht möglich, da sie nicht als rekombinantes Protein hergestellt werden konnte. In einem reinen *in vitro* Bindungsexperiment sollten die beiden Bindungspartner als rekombinante Proteine hergestellt werden. Hier wurde ein Pulldown-Experiment durchgeführt, in dem Ste20 aus *E. coli* als GST-Ste20 und Are2 aus Hefezellen hergestellt wurden. Die Interaktion zwischen Ste20 und Are1 wurde ebenfalls mit dem Pulldown-Experiment getestet.

#### 4.1.3.1 Herstellung von immobilisiertem GST-Protein und GST-Ste20-Fusionsprotein

Für die Analyse der Interaktion zwischen Ste20 und Are1 bzw. Are2 wurde zuerst Ste20 als GST-Fusionsprotein hergestellt und aufgereinigt. Das rekombinante Protein wurde aufgereinigt und reichte für folgende Experimente aus (Abbildung 4.1.5).

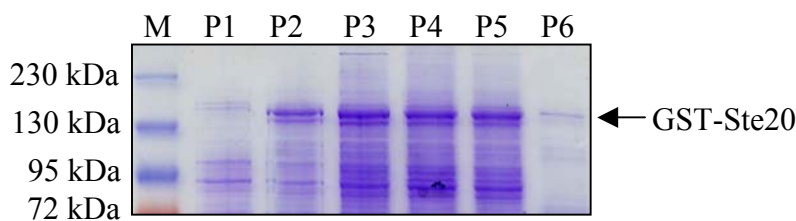
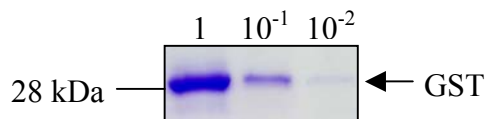


Abbildung 4.1.5: Herstellung und Reinigung von GST-Ste20.

GST-Ste20 konnte aufgereinigt werden. P1 stellt Zellen ohne Induktion dar. P2 zeigt die Zellen nach der Induktion. P3 zeigt die Zellen nach dem Zellaufschluss und P4 den Überstand nach 15-minütiger Zentrifugation. P5 ist der Überstand nach der Inkubation mit Glutathion-Sepharose und Zentrifugation. P6 ist die GST-Ste20-Glutathion-Sepharose.

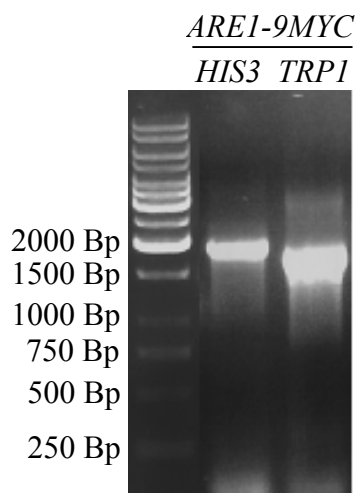
Das GST-Protein ohne den Fusionsanteil wurde ebenfalls hergestellt und aufgereinigt und als Kontrolle eingesetzt (Daten nicht gezeigt). GST-Protein ohne den Fusionsanteil wurde in einer Verdünnungsreihe aufgetragen und mit Coomassie-Blau-Färbung analysiert (Abbildung 4.1.6).



**Abbildung 4.1.6:** Verdünnungsreihe vom aufgereinigten GST-Protein ohne den Fusionsanteil. Aufgereinigtes GST-Protein wurde nach der SDS-Gelelektrophorese mit Coomassie-Blau-Färbung analysiert.

#### 4.1.3.2 C-terminale Markierung von Are1 durch 9myc

Da kein spezifischer Antikörper gegen Are1 oder Are2 zur Verfügung stand, wurden Are1 und Are2 mit einem Epitop markiert, damit sie im Zuge des Western-Blot Verfahrens detektiert werden konnten. Hierbei wurden zuerst PCR-Kassetten hergestellt, die sowohl einen 9myc-Marker als auch einen Selektionsmarker enthalten. Es zeigte sich, dass PCR-Fragmente mit entweder einem *HIS3*-Marker oder einem *TRP1*-Marker richtig hergestellt wurden (Abbildung (4.1.7)).



**Abbildung 4.1.7:** C-terminale Markierung von Are1 mit 9myc. PCR-Fragmente für die C-terminale Markierung von Are1 mit 9myc. Es wurden zwei Fragmente hergestellt, die außerdem das *HIS3*- oder *TRP1*-Gen enthielten. Die erwartete Größe der PCR Fragmente, 1830 Bp für *HIS3* und 1480 Bp für *TRP1* stimmte mit der Größe der PCR-Fragmente überein.

Dann wurde der Wildtyp mit den PCR-Kassetten transformiert und auf Selektionsplatten selektiert. Positive Klone wurden dann weiter mittels Western-Blot bestätigt (Abbildung 4.1.8). Da Mutanten mit dem 9myc markierten Are2 schon in der Arbeitsgruppe generiert wurden, konnten sie für weitere Arbeiten verwendet werden.

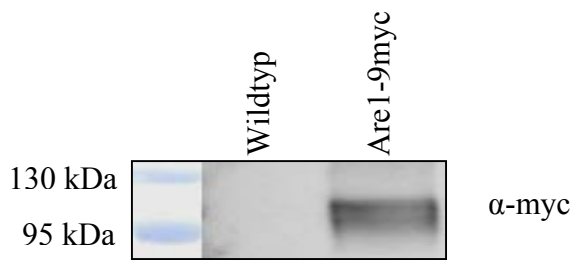


Abbildung 4.1.8: Die Bestätigung von Are1-9myc durch einen Western-Blot.

Von dem Wildtyp und einem Klon wurde eine TCA-Extraktion durchgeführt. Nach dem Western-Blot wurde das Protein mit  $\alpha$ -myc-Antikörpern detektiert. Die erwartete Größe von Are1-9myc beträgt 80 kDa. Bei dem Klon wurde eine Bande bei etwa 100 kDa detektiert, die nicht im Wildtyp detektiert wurde. Dieser Klon war positiv. Die hohe Hydrophobizität von Are1 (Saccharomyces Genome Database) könnte eine Erklärung für die hohe apparente Masse von Are1-9myc sein.

#### 4.1.3.3 5'-terminale Modifizierung von *ARE1* und *ARE2* durch einen induzierbaren *GALI*-Promotor

Für das folgende Pulldown-Experiment musste Protein in großen Mengen eingesetzt werden. Weil *ARE1* und *ARE2* in Hefezellen unter Kontrolle ihres eigenen Promotors nur schwach exprimiert werden, wurde das 5'-Ende von *ARE1-9MYC* und *ARE2-9MYC* durch einen induzierbaren *GALI*-Promotor, der auch als PCR-Kassette hergestellt wurde (Abbildung 4.1.9 A und B), nach homologer Rekombination weiter modifiziert. Es zeigte sich, dass die gewünschten PCR-Fragmente richtig hergestellt wurden.

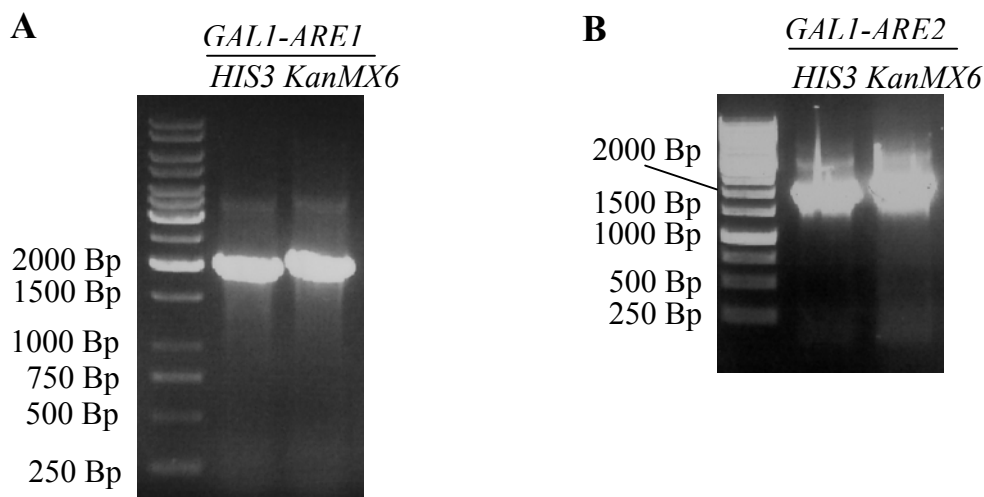


Abbildung 4.1.9: Die Modifizierung des 5'-Endes von *ARE1* und *ARE2* mit dem *GALI*-Promotor.

(A) PCR-Fragmente für die Modifizierung des 5'-Endes von *ARE1* durch den *GALI*-Promotor. Die Fragmente enthielten noch einen *HIS3*-Marker oder einen *KanMX6*-Marker. Die erwarteten Größen der Fragmente sind 1925 Bp und 2081 Bp.

(B) Wie in (A), aber für *ARE2*. Die erwarteten Größen der Fragmente sind 1925 Bp für die *HIS3* Kassette und 2081 Bp für die *KanMX6* Kassette.



Da die PCR-Kassetten des *GALI*-Promotors auch Selektionsmarker enthalten, konnten mutierte Zellen auf Selektionsplatten selektiert werden. Die induzierte Expression von Are1-9myc und Are2-9myc wurde dann im Western-Blot bestätigt (Abbildung 4.1.10 A und B). Sowohl Are1-9myc als auch Are2-9myc konnten nach Induktion überexprimiert werden.

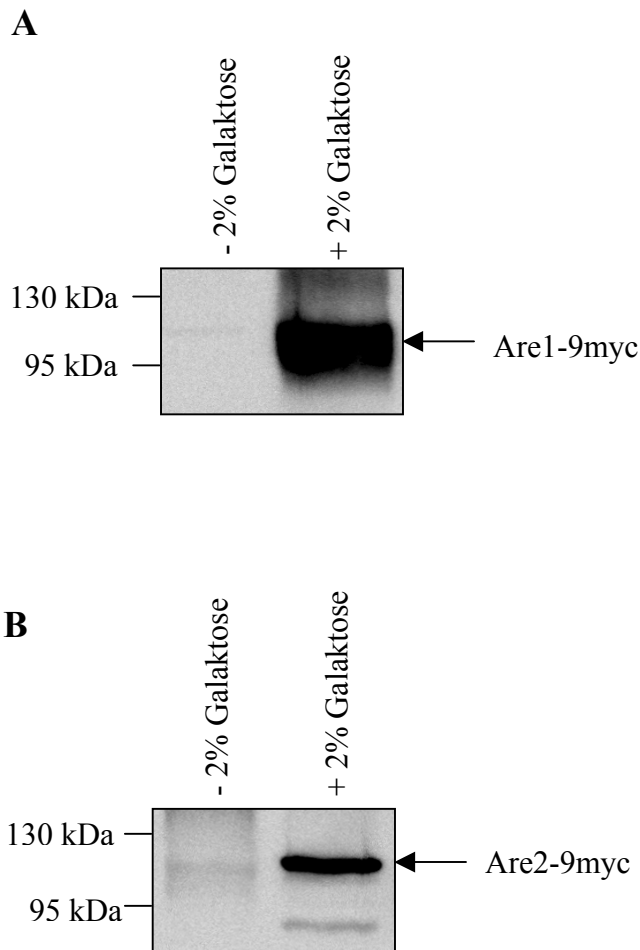


Abbildung 4.1.10: Überprüfung der induzierten Expression von Proteinen.

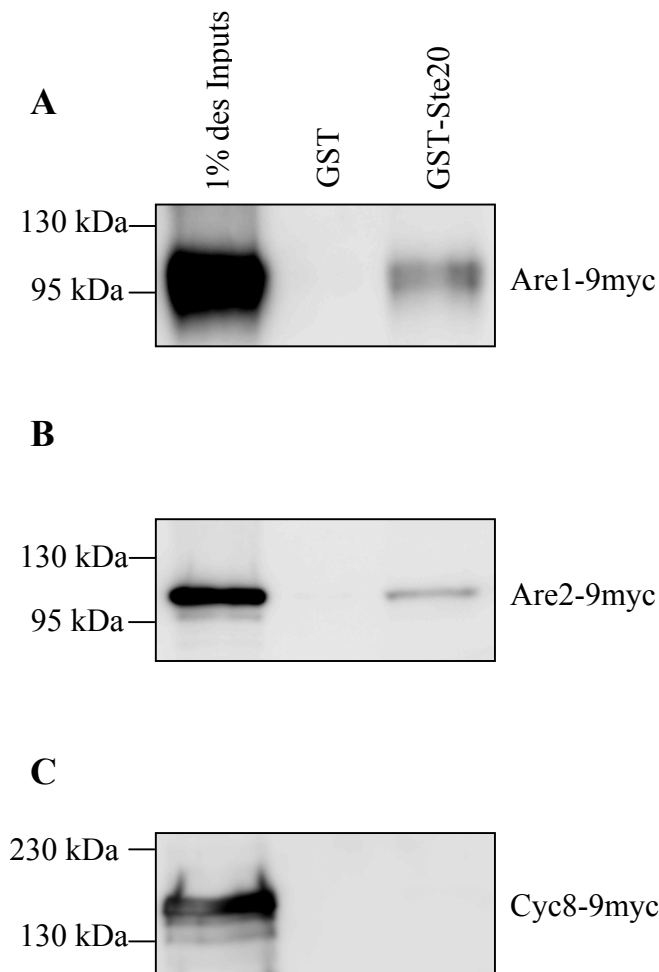
(A) Bestätigung der induzierten Expression von Are1-9myc durch Western-Blot. Nicht induzierte Zellen dienten als negative Kontrolle. Die erwartete Größe von Are1-9myc beträgt 80 kDa.

(B) Wie in (A), aber für Are2-9myc. Die erwartete Größe von Are2-9myc beträgt 84 kDa. Sowohl Are1-9myc als auch Are2-9myc liefen möglicherweise wegen ihrer hohen Hydrophobizität bei einem größeren Molekulargewicht als erwartet.

#### 4.1.3.4 Pulldown-Experiment mit Ste20 und Are1 bzw. Are2

Beim Pulldown-Experiment wurden vergleichbare Mengen von immobilisierten GST und GST-Ste20 eingesetzt. GST und GST-Ste20 wurde mit einem Lysat inkubiert, das Are1-9myc, Are2-9myc oder Cyc8-9myc enthielt. Cyc9-9myc diente hier als negative Kontrolle.

Während die Interaktionen zwischen GST-Ste20 und Are1-9myc bzw. Are2-9myc bestätigt werden konnten, wurde keine Interaktion zwischen GST und Are1-9myc bzw. Are2-9myc identifiziert (Abbildung 4.1.11 A und B). Da GST-Ste20 auch nicht mit Cyc8-9myc interagiert (Abbildung 4.1.11 C), konnte somit festgestellt werden, dass Ste20 mit Are1 bzw. Are2 in diesem Pulldown-Experiment spezifisch miteinander interagiert.



**Abbildung 4.1.11:** Analyse der Interaktion zwischen Ste20 und Are1 bzw. Are2.

(A) Are1-9myc interagiert mit GST-Ste20. Vergleichbare Mengen von GST und GST-Ste20 wurden mit dem Are1-9myc-Lysat inkubiert. Nach dem Abwaschen von unspezifisch gebundenem Are1-9myc, wurden die Proben im Western-Blot mit  $\alpha$ -myc-Antikörpern analysiert.

(B) Are2-9myc interagiert mit GST-Ste20. Wie in (A), aber mit Are2-9myc.

(C) Es gab keine Interaktion zwischen GST-Ste20 und Cyc8-9myc. Wie in (A), aber mit Cyc8-9myc.

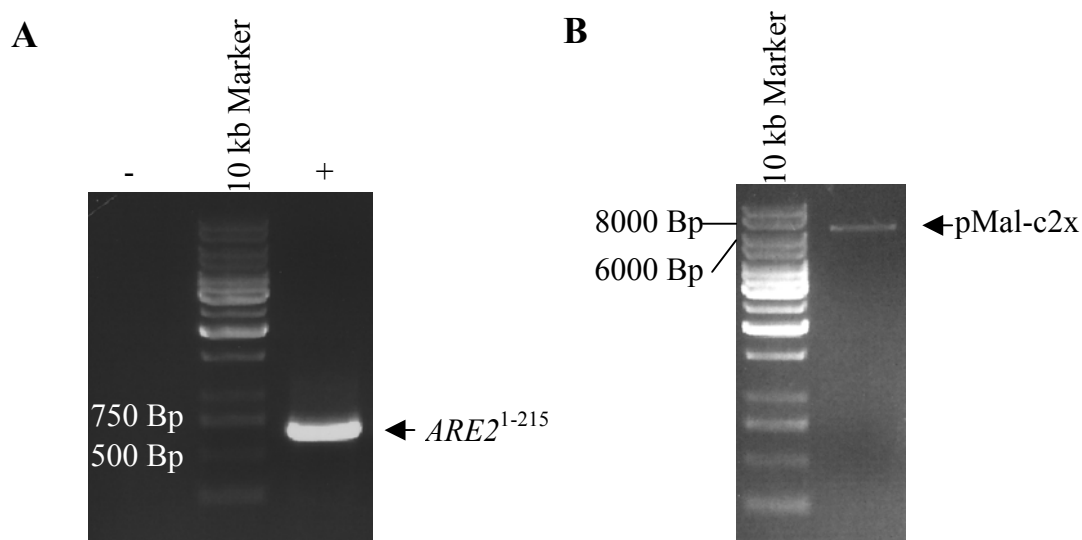
#### 4.1.4 Analyse der Interaktion zwischen Ste20 und Are2<sup>1-215</sup>

Die Interaktion zwischen der PAK-Kinase Ste20 und Are1 bzw. Are2 weist auf eine Phosphorylierung beider Sterolestersynthasen durch Ste20 hin. Da Are1 eine

vernachlässigbare Enzymaktivität unter aeroben Bedingungen im Vergleich zu Are2 besitzt (Zweytick et al., 2000), wurde eine mögliche Phosphorylierung durch Ste20 nur für Are2 untersucht. Wie zuvor erwähnt wurde, ist Are2 sehr hydrophob und kann nicht als rekombinantes Protein hergestellt werden. Das Fragment von 1 bis 215 ist hydrophil und enthält keine Transmembrandomäne. Der übrige Teil des Proteins enthält neun Transmembrandomänen (Saccharomyces Genome Database). Das Fragment von 1 bis 215 wurde als rekombinantes Protein hergestellt und für Pulldown-Experimente und *in vitro* Phosphorylierungen eingesetzt.

#### 4.1.4.1 Klonierung des *ARE2*<sup>1-215</sup>-Fragmentes in den pMal-c2x-Vektor

Das *ARE2*<sup>1-215</sup>-Fragment wurde mit den Primern Are2-7 und Are2-8 von der chromosomalen DNA des Wildtyps amplifiziert (Abbildung 4.1.12 A). Dieses Fragment wurde nach Restriktionsverdau mit BamHI und HindIII in den pMal-c2x-Vektor kloniert, der ebenfalls mit BamHI und HindIII geschnitten wurde (Abbildung 4.1.12 B).



**Abbildung 4.1.12:** Klonierung des *ARE2*<sup>1-215</sup>-Fragmentes in den pMal-c2x-Vektor.

(A) Das mit PCR hergestellte *ARE2*<sup>1-215</sup>-Fragment. Ohne chromosomale DNA als Template wurde kein PCR-Produkt erhalten (linke Spur 10 Kb Marker). Die erwartete Größe des *ARE2*<sup>1-215</sup>-Fragmentes beträgt 645 Bp. Das hergestellte *ARE2*<sup>1-215</sup>-Fragment wurde nach der Aufreinigung des PCR-Ansatzes mit BamHI und HindIII über Nacht verdaut. Danach wurde es für die Klonierung über ein 1% Agarose-Gel aufgereinigt.

(B) Das Plasmid pMal-c2x wurde ebenfalls mit BamHI und HindIII verdaut und über ein 1% Agarose-Gel gereinigt. Die Größe des Plasmides beträgt 6646 Bp.

Plasmide wurden aus sechs ausgewählten Klonen durch Mini-Präparation isoliert. Die Richtigkeit der Plasmide wurde durch Restriktionsverdau mit BamHI und HindIII getestet. Alle Klone waren positiv (Abbildung 4.1.13).

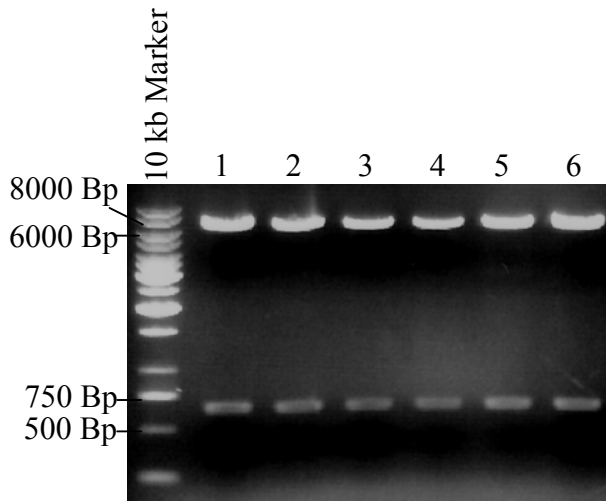
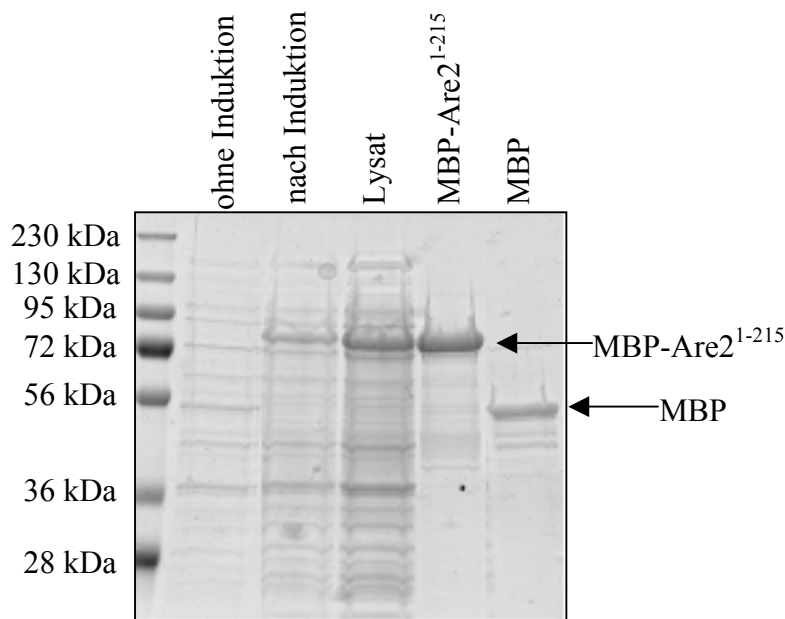


Abbildung 4.1.13: Überprüfung der Richtigkeit der erhaltenen Plasmide durch Restriktionsverdau. Nach Mini-Präparationen wurde die Richtigkeit der Plasmide durch Restriktionsverdau mit den Enzymen BamHI und HindIII geprüft. Zwei Banden auf der Höhe von 645 Bp und 6646 Bp wurden erwartet. Bei jedem Plasmid wurden zwei Banden erhalten, die mit der erwarteten Größe der Banden übereinstimmten.

#### 4.1.4.2 Aufreinigung von MBP und MBP-Are2<sup>1-215</sup>

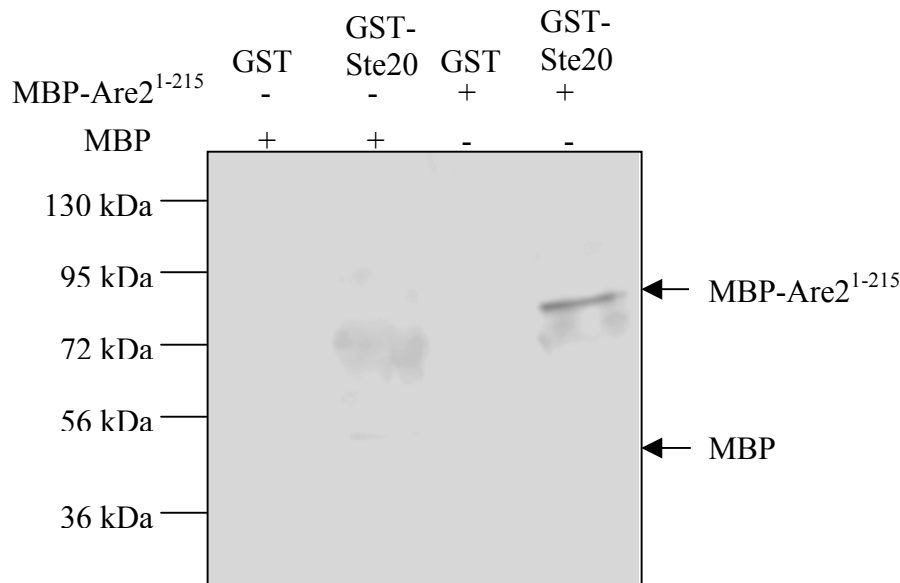
Da das Fusionsprotein MBP-Are2<sup>1-215</sup> das MBP (maltose-binding protein) enthält, das an eine Amylose-Matrix binden kann, konnte es darüber aufgereinigt werden. Es zeigte sich, dass sich das Fusionsprotein gut exprimieren und aufreinigen ließ (Abbildung 4.1.14). Als negative Kontrolle für das folgende Pulldown-Experiment wurde eine MBP-Matrix ohne den Fusionsanteil hergestellt (Abbildung 4.1.14, Für MBP wurde nur das immobilisierte MBP gezeigt). Nach Zugabe von 10 mM Maltose konnten sowohl MBP-Are2<sup>1-215</sup> als auch MBP eluiert werden (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 4.1.14:** Herstellung des Fusionsproteins und des MBPs mit der Amylose-Matrix. MBP und MBP-Are2<sup>1-215</sup> wurden in BL21 *E. coli* nach Induktion überexprimiert. Beide Proteine wurden mit der Amylose-Matrix aufgereinigt. Sowohl das Fusionsprotein als auch das MBP wurden mit Erfolg aufgereinigt.

#### 4.1.4.3 Pulldown-Experiment mit rekombinantem GST-Ste20 und MBP-Are2<sup>1-215</sup>

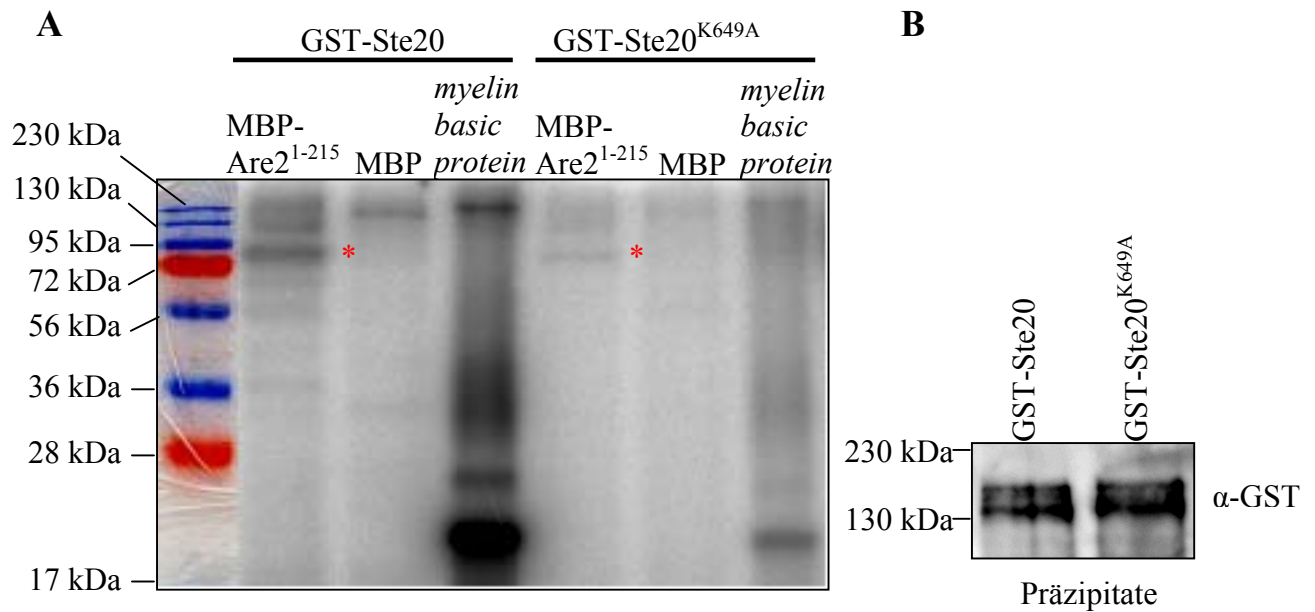
Vergleichbare Proteinmengen der eluierten Proteine MBP und MBP-Are2<sup>1-215</sup> wurden für das Pulldown-Experiment eingesetzt, in dem sie mit vergleichbaren Proteinmengen von immobilisiertem GST oder GST-Ste20 (Abbildung 4.1.5 und Abbildung 4.1.6) inkubiert wurden. Während GST-Ste20 das Fragment Are2<sup>1-215</sup> band (Abbildung 4.1.15, letzte Spur), wurde keine Interaktion zwischen GST und MBP bzw. MBP-Are2<sup>1-215</sup> detektiert. Da MBP mit GST-Ste20 schwach interagiert, konnte die Interaktion zwischen GST-Ste20 und MBP-Are2<sup>1-215</sup> als spezifisch betrachtet werden.



**Abbildung 4.1.15:** Analyse der physikalischen Interaktion zwischen Ste20 und Are2<sup>1-215</sup>. Vergleichbare Proteinmengen von GST und GST-Ste20 als Matrix wurden mit vergleichbaren Proteinmengen von MBP oder MBP-Are2<sup>1-215</sup> inkubiert. Nach Abwaschen unspezifisch gebundener Proteine von der Matrix, wurden die noch an die Matrix gebundenen Proteine im 2x SDS-Puffer gelöst. Die Analyse der Proben wurde nach Western-Blot mit  $\alpha$ -MBP-Antikörpern durchgeführt

#### 4.1.4.4 Analyse der *in vitro* Phosphorylierung von Are2<sup>1-215</sup> durch Ste20

Da Ste20 eine Kinase ist, ließ die Interaktion zwischen Ste20 und Are2<sup>1-215</sup> eine Phosphorylierung von Are2<sup>1-215</sup> durch Ste20 vermuten. Um diese mögliche Phosphorylierung zu überprüfen, wurde die Kinase als GST-Ste20 aus dem Hefelysät mit Glutathion-Sepharose gereinigt. Die Kinase-inaktive Form von Ste20, Ste20<sup>K649A</sup>, wurde ebenfalls als GST-Fusionsprotein hergestellt und als negative Kontrolle bei der folgenden *in vitro* Phosphorylierung eingesetzt (Abbildung 4.1.16 B). Während MBP als negative Kontrolle diente, wurde das *myelin basic protein* als positive Kontrolle eingesetzt, das von Ste20 phosphoryliert werden soll. Unterhalb von GST-Ste20 wurde in der Spur von MBP-Are2<sup>1-215</sup> eine Bande zwischen 72 kDa und 95 kDa beobachtet, die weder bei MBP noch beim *myelin basic protein* zu sehen war. Dies deutete auf eine Phosphorylierung von Are2<sup>1-215</sup> durch Ste20 hin. Die Phosphorylierung von Are2<sup>1-215</sup> und *myelin basic protein* durch Ste20<sup>K649A</sup> war sehr schwach im Vergleich zu ihrer Phosphorylierung durch Ste20 (Abbildung 4.1.16 A). Eine Erklärung dafür ist, dass die Kinase-inaktive Form von Ste20 noch eine schwache Kinase-Aktivität besaß. Es konnte aber nicht ausgeschlossen werden, dass andere präzipitierte Kinasen diese Phosphorylierung verursachten.



**Abbildung 4.1.16:** *In vitro* Phosphorylierung von Are2<sup>1-215</sup> durch Ste20.

(A) Are2<sup>1-215</sup> wurde durch Ste20 phosphoryliert. Das eluierte Fusionsprotein MBP-Are2<sup>1-215</sup>, das eluierte MBP und das *myelin basic protein* wurde mit präzipitiertem GST-Ste20 oder GST-Ste20<sup>K649A</sup> und radioaktivem  $\gamma$ -<sup>32</sup>P ATP inkubiert. Die Detektion von phosphorylierten Proteinen wurde nach SDS-Gelelektrophorese durch eine Phosphoimagerplatte ermöglicht. Phosphoryliertes Are2<sup>1-215</sup> wird durch ein \* rechts von der Bande gekennzeichnet.

(B) Präzipitiertes GST-Ste20 und GST-Ste20<sup>K649A</sup>. GST-Ste20 und GST-Ste20<sup>K649A</sup> wurden nach induzierter Überexpression aus einem Hefelysate mit Glutathion-Sepharose gereinigt. Die Detektion präzipitierter Proteine erfolgte nach Western-Blot durch  $\alpha$ -GST-Antikörper.

#### 4.1.5 Regulation der Ergosterolester-Synthese durch Ste20 und Cla4

Da Zellen mit deletierten Sterolestersynthasen Polaritätsdefekt im Bezug auf das apikale Wachstum haben, Ste20 mit Are1, Are2 und Are2<sup>1-215</sup> Komplexe bildet, Ste20 das Fragment Are2<sup>1-215</sup> phosphoryliert und Zellen mit veränderten Mengen von Ste20 oder Cla4 veränderte Menge vom gesamten Sterol haben, sollte untersucht werden, ob Ste20 bzw. Cla4 die Sterolestersynthese regulieren. Mittels Dünnschichtchromatographie (DC) können Sterole und Sterolester voneinander getrennt werden (Abbildung 4.1.17). Von Sterolen und Sterolestern liegen nur Ergosterol und Ergosterolester in Zellen ausreichend für quantitative Analysen mit Dünnschichtchromatographie vor. Es wurde hier untersucht, wie sich die Menge von Ergosterolester in *STE20*- oder *CLA4*-Deletionsmutanten oder in Zellen mit überexprimiertem *STE20* oder *CLA4* ändert. Da Are1 eine vernachlässigbare Estersynthase-Aktivität im Vergleich zu Are2 besitzt, wurde *ARE1* in allen getesteten Stämmen deletiert. Dadurch wurde die Bildung der Ergosterolester allein durch Are2 katalysiert. Lipide wurden dann aus aufgeschlossenen Zellen extrahiert und auf eine DC-Platte aufgetragen. Nach der

Probentrennung mit Laufmitteln wurden Lipide zum Visualisieren zuerst mit  $\text{MnCl}_2$  behandelt und dann gebacken. Die Menge des entsprechenden Ergosterols oder Ergosterolesters wurde über einen Scanner gemessen.

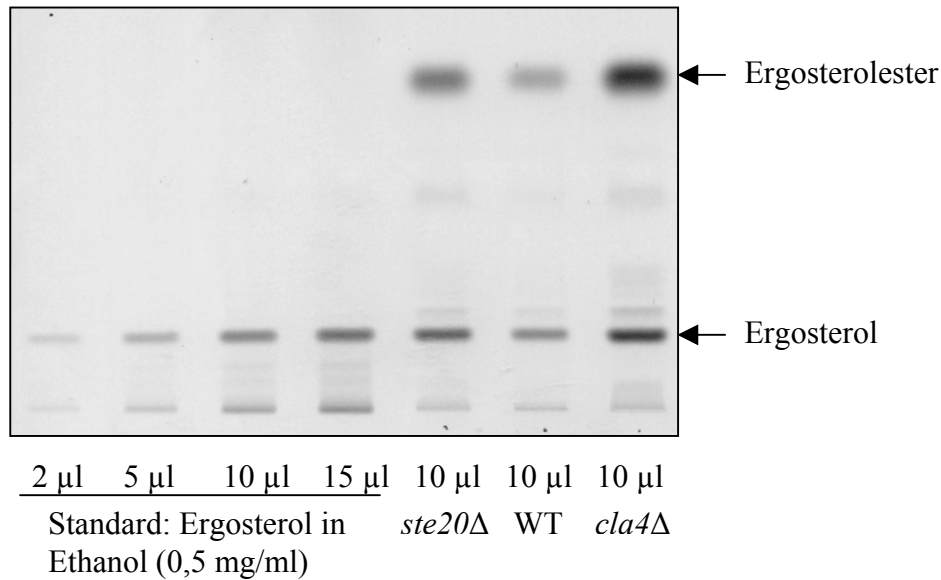


Abbildung 4.1.17: Eine zur Lipidbestimmung bearbeitete DC-Platte als Beispiel.

Der Standard diente zur Berechnung der entsprechenden Lipidmenge. Hier wurde 0,5 mg/ml Ergosterol als Standard zur Berechnung des Ergosterols benutzt. Für die Bestimmung der Ergosterolestermengen wurde Cholesterolester als Standard benutzt (hier nicht verwendet).

#### 4.1.5.1 Ergosterolester und freies Ergosterol in *ste20Δ*- oder *cla4Δ*-Mutanten

Für Lipidextraktionen wurden 20 OD-Einheiten Zellen von jedem Stamm benutzt, damit Ergebnisse miteinander verglichen werden konnten. Die gleiche Menge von Zellen wurde gleichzeitig zur Herstellung vom Lysat und anschließenden Proteinbestimmung benutzt. Die Lipidkonzentration wurde auf die entsprechende Proteinmenge bezogen. Zum Schluss wurden die Lipidkonzentrationen anderer Stämme auf die Lipidkonzentration vom Wildtyp bezogen. Während *ste20Δ*-Mutanten keinen Unterschied zum Wildtyp im Bezug auf die Ergosterolestermenge zeigten, enthielten *cla4Δ*-Mutanten eine höhere Ergosterolestermenge als Wildtypzellen (Abbildung 4.1.17 und 4.1.18 A). Eine mögliche Erklärung ist, dass Cla4 die Are2-Aktivität herunterreguliert. Mit der DC-Platte konnte auch die Menge von freiem Ergosterol bestimmt werden, das vor allem in der Plasmamembran vorliegt. Diese Menge unterscheidet sich jedoch von der Ergosterolmenge, die mit der GLC/MS-Methode bestimmt wurde. Mit der GLC/MS-Methode wurde auch Ergosterol gemessen, das Ergosterolester bildet. Wie das gesamte Ergosterol lag mehr freies Ergosterol sowohl in *ste20Δ*-Mutanten als



auch in *cla4Δ*-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp vor (Abbildung 4.1.18 B). Dies deutet auf eine negative Regulation der Menge an freiem Ergosterol durch die beiden Kinasen hin.

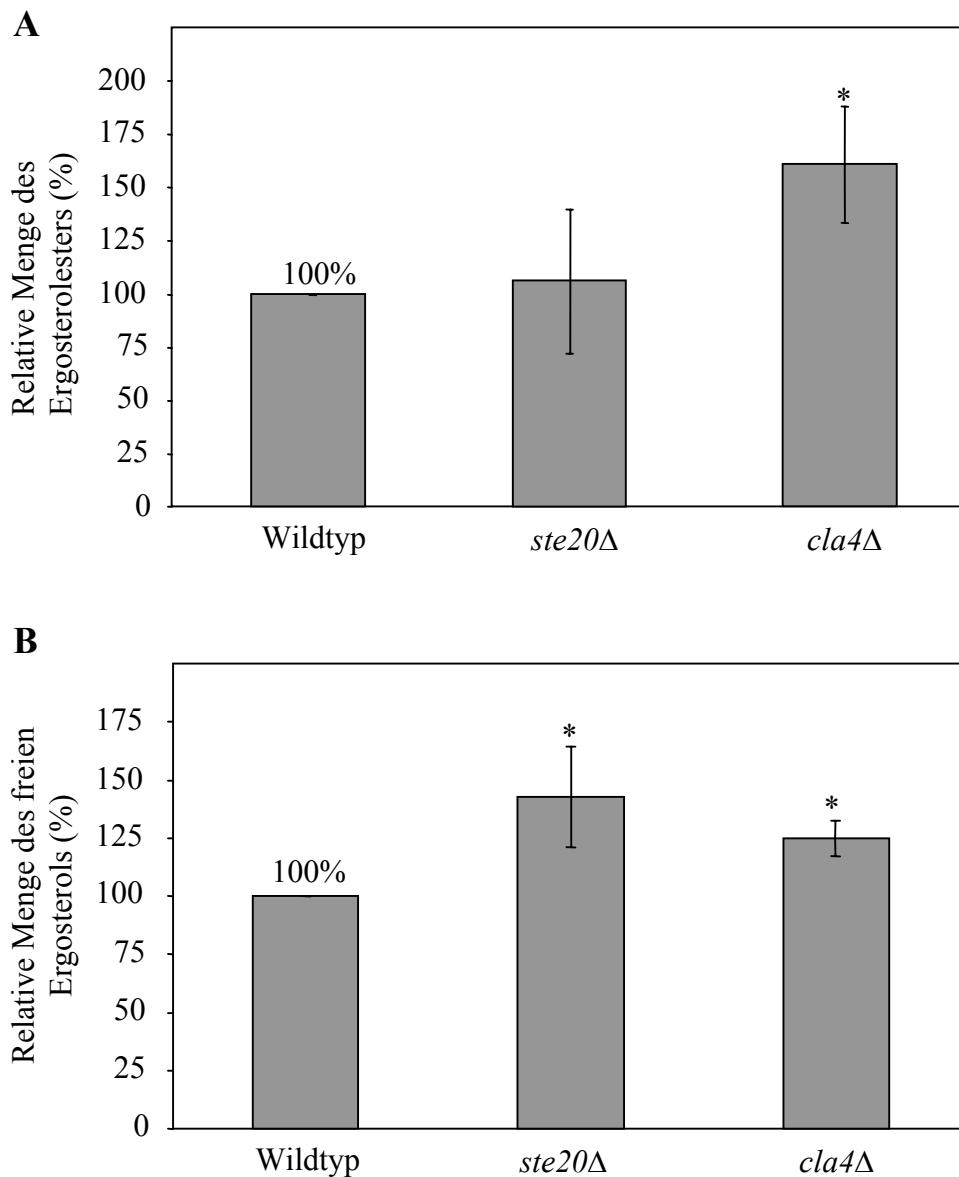


Abbildung 4.1.18: Analyse von Ergosterolester und freiem Ergosterol in *ste20Δ*- und *cla4Δ*-Zellen mittels Dünnschichtchromatographie.

(A) Die Ergosterolestermenge erhöhte sich in *cla4Δ*-Zellen. Die Ergebnisse beziehen sich auf zwei unabhängige Experimente. \*,  $P < 0,05$  im Vergleich zum Wildtyp.

(B) Die Ergosterolmenge erhöhte sich sowohl in *ste20Δ*-Zellen als auch in *cla4Δ*-Zellen. Die Ergebnisse beziehen sich auf zwei unabhängige Experimente. \*,  $P < 0,05$  im Vergleich zum Wildtyp.

#### 4.1.5.2 Ergosterolester in Zellen mit überexprimiertem *STE20* oder *CLA4*

Eine Überexpression von *STE20* oder *CLA4* wurde durch Transformation eines entsprechenden Multi-Copy-Plasmides ermöglicht. In einem Selektionsmedium konnten die Multi-Copy-Plasmide pRS425-*STE20* und pRS425-*CLA4* von Zellen behalten werden und die

Ergosterolester-Analyse wurde dann wie bei den Deletionsmutanten durchgeführt. Es zeigte sich, dass die Überexpression von *STE20* oder *CLA4* keinen Einfluss auf die Ergosterolestermenge in Hefezellen hatte (Abbildung 4.1.19).

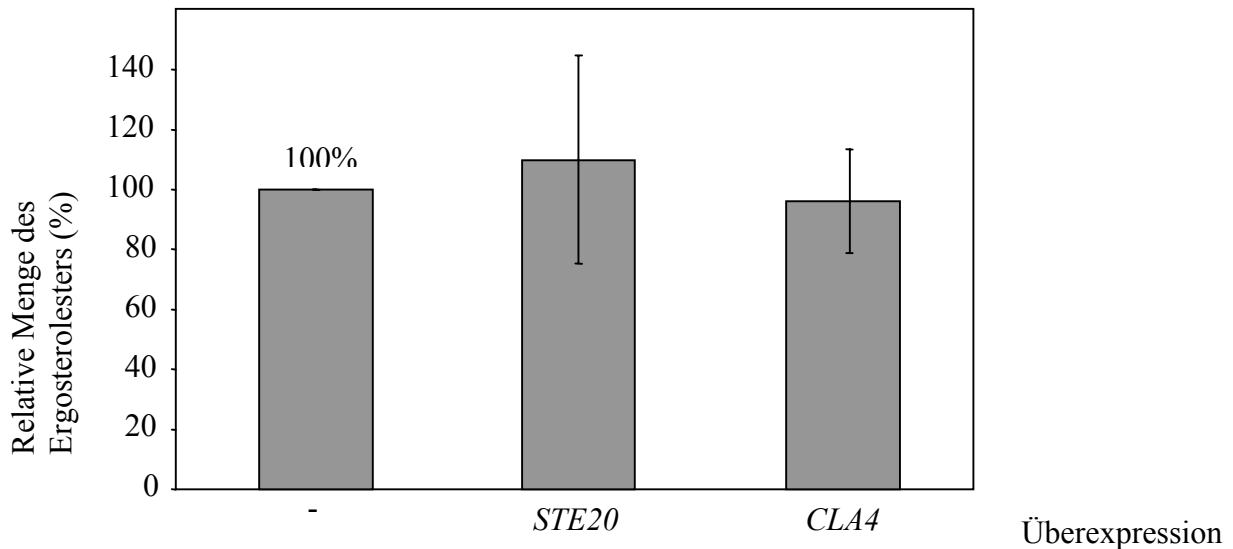


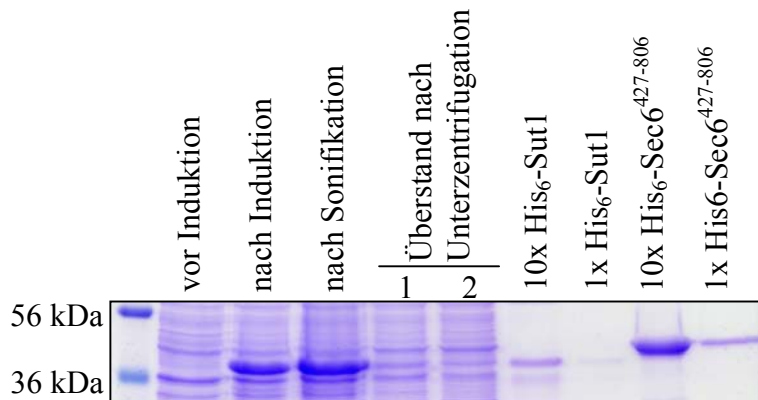
Abbildung 4.1.19: Die Überexpression von *STE20* oder *CLA4* hatte keinen Einfluss auf die Ergosterolestermenge.

Wildtypzellen mit pRS425 (Leervektor), pRS425-*STE20* oder pRS425-*CLA4* wurden für eine Ergosterolesteranalyse durch DC eingesetzt. Die Ergebnisse beziehen sich auf drei unabhängige Experimente.

## 4.2 Die Regulation der Sterolaufnahme durch PAKs

### 4.2.1 Analyse der Interaktionen zwischen Sut1 und Cla4 und Skm1

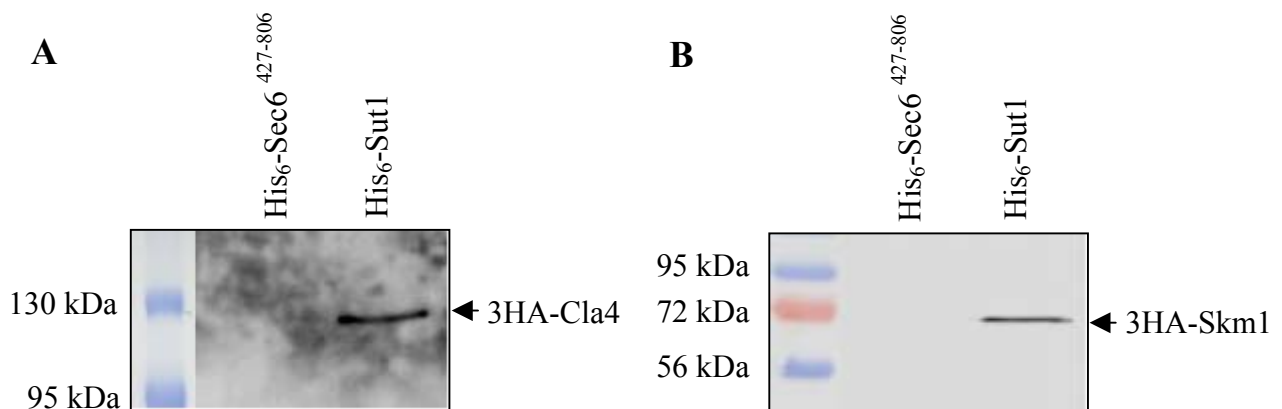
Eine Interaktion zwischen dem Transkriptionsfaktor Sut1 und Ste20 wurde in der Arbeitsgruppe sowohl durch ein Split-Ubiquitin-Experiment als auch durch ein Pulldown-Experiment bestätigt. Da Cla4 und Skm1 auch wie Ste20 zu den PAK-Kinasen der Hefe gehören, wurde untersucht, ob sie auch mit Sut1 interagieren. Während ein Split-Ubiquitin-Experiment keine Interaktion zwischen Sut1 und Cla4 bzw. Skm1 ergab (Daten nicht gezeigt), wurden die Interaktionen weiter mit einem Pulldown-Experiment untersucht. Hierbei wurde Sut1 zuerst als rekombinantes His<sub>6</sub>-Fusionsprotein nach induzierter Überexpression in *E.coli* hergestellt und danach mit Ni-NTA-Agarose aufgereinigt. Als negative Kontrolle wurde ein Fragment von Sec6 (Sec6<sup>427-806</sup>), das als ein Interaktor von Rdi1 durch einen Screen der Arbeitsgruppe identifiziert wurde (Dissertation Christopher Tiedje, 2008), ebenfalls als His<sub>6</sub>-Fusionsprotein hergestellt und gereinigt (Abbildung 4.2.1).



**Abbildung 4.2.1:** Herstellung von His<sub>6</sub>-Sut1. Die Proben wurden im SDS-Gel mit anschließender Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung analysiert.

Es zeigte sich, dass His<sub>6</sub>-Sut1 über die Ni-NTA-Matrix aufgereinigt werden konnte. Die Proteinmenge von His<sub>6</sub>-Sut1 entsprach der von 1x His<sub>6</sub>-Sec6<sup>427-806</sup>. Der Überstand nach Zentrifugation wurde zweimal aufgetragen.

*CLA4* und *SKM1* wurden im Hefegenom an ihrem N-Terminus mit *GALI-3HA* modifiziert. Dadurch wurden die beiden Proteine mit 3HA markiert und gleichzeitig konnten sie durch den induzierbaren *GALI*-Promotor überexprimiert werden (Daten nicht gezeigt). 3HA-Cla4 und 3HA-Skm1 wurden als Lysat nach Überexpression aus Hefezellen gewonnen. Es zeigte sich, dass sowohl Cla4 als auch Skm1 mit Sut1 interagierten (Abbildung 4.2.2 A und B).



**Abbildung 4.2.2:** Analyse der Interaktionen von Sut1 mit Cla4 und Sut1 mit Skm1 in einem Pulldown-Experiment.

(A) 3HA-Cla4 band spezifisch an His<sub>6</sub>-Sut1. Vergleichbare Proteinmengen von His<sub>6</sub>-Sut1 und His<sub>6</sub>-Sec6<sup>427-806</sup> wurden für das Pulldown-Experiment benutzt. 50 µl des Lysates aus 50 ml Hefezellen, die für 3 Stunden induziert worden waren, wurden für die Inkubation mit der Matrix eingesetzt. An der Matrix gebundene Proteine wurden nach Western-Blot durch α-HA-Antikörper analysiert. Während Sut1 nicht an His<sub>6</sub>-Sec6<sup>427-806</sup>-Matrix band, wurde eine Interaktion zwischen Sut1 und Cla4 detektiert. Dies wies auf eine spezifische Interaktion zwischen Sut1 und Cla4 hin.

(B) 3HA-Skm1 band spezifisch an His<sub>6</sub>-Sut1. Das Experiment wurde wie in (A) beschrieben durchgeführt. Statt 3HA-Cla4 wurde hier 3HA-Skm1 eingesetzt.

## 4.2.2 Analyse der Kernlokalisierung von PAKs

### 4.2.2.1 Analyse der Kernlokalisierung von Ste20

Ste20 lokalisiert im Zytosol und auch an der Plasmamembran der Knospenspitze (Peter et al., 1996; Leberer et al., 1997), wo das polare Wachstum stattfindet. Da Sut1 als ein Transkriptionsfaktor nur im Kern lokalisiert (Ness et al., 2001), wurde vermutet, dass Ste20 auch im Zellkern zu finden ist. Durch eine Analyse der Aminosäuresequenz von Ste20 wurde die Sequenz von Aminosäure 272 bis 288 als ein mögliches zweiteiliges Kernlokalisierungssignal (NLS, nuclear localization signal) identifiziert (Abbildung 4.2.3). Die Sequenz überlappt teilweise mit der BR-Domäne (Takahashi und Pryciak, 2007), welche für die Membranlokalisierung von Ste20 wichtig ist.

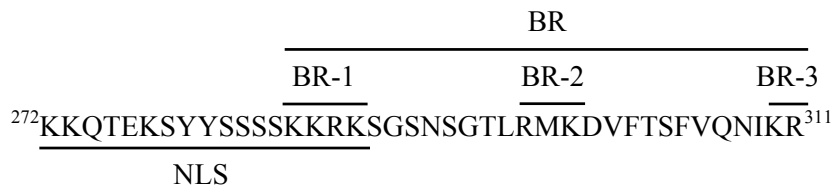


Abbildung 4.2.3: Die Aminosäuresequenz des möglichen Kernlokalisierungssignals und der BR-Domäne.

Die BR-Domäne enthält drei basenreiche Cluster, BR-1, BR-2 und BR-3, die für die Membranlokalisierung von Ste20 wichtig sind. Das NLS überlappt mit der BR-Domäne. Der Überlappungsbereich entspricht dem BR1-Cluster.

Um die Funktion dieser Sequenz zu untersuchen, wurde sie in einen Vektor kloniert, damit sie als ein GST-GFP-Fusionsprotein nach induzierter Überexpression in Hefezellen analysiert werden konnte. Die GST-Sequenz kann das Signal des GFP-Fusionsproteins verstärken (Winters et al., 2005). Dieses Fusionsprotein lokalisierte gleichmäßig im Zytosol (Daten nicht gezeigt). Eine mögliche Erklärung ist eine sterische Hinderung, welche die Erkennung des Kernlokalisierungssignals durch die Kernimportmaschinerie unmöglich macht. Deswegen wurde eine kurze Aminosäuresequenz (SGAGAGAGAGAIL) an den C-Terminus des Kernlokalisierungssignals eingefügt. Diese Sequenz wird häufig als Linker zwischen GFP und dessen Fusionsprotein benutzt (Miller und Lindow, 1997). Es zeigte sich, dass das Fusionsprotein mit dem Linker (bezeichnet als Ste20<sup>272-288\*</sup>) vollständig im Zellkern vorlag (Abbildung 4.2.4). Um eine mögliche Kernlokalisationsfunktion des Linkers auszuschließen, wurde *STE20*<sup>272-288</sup> ohne ein Stop-Codon in den Vektor inkloniert. Dadurch wurde auch ein

Teil der MCS (multiple cloning site) translatiert (LGYFLFFEGGPGTQFAL). Dieses Fusionsprotein,  $Ste20^{272-288^{**}}$  genannt, war auch nur im Zellkern zu finden (Abbildung 4.2.4).

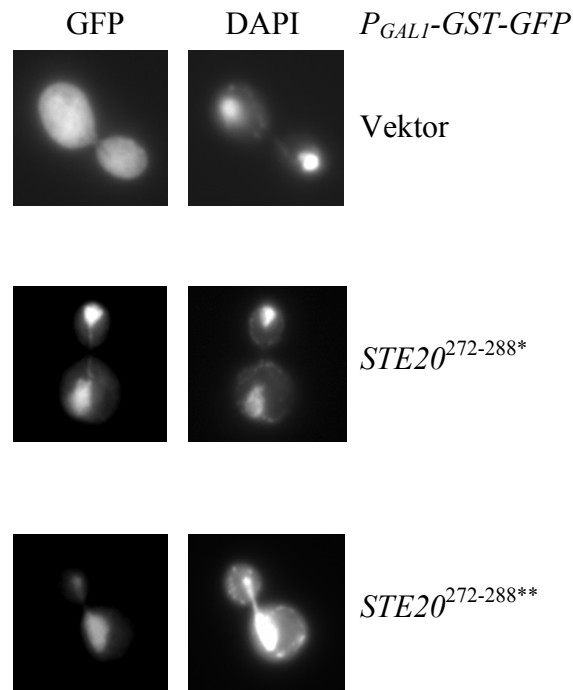


Abbildung 4.2.4: Analyse der entdeckten NLS-Sequenz im Bezug auf seine Funktion bei der Kernlokalisierung.

Das Fragment von der Aminosäure 272 bis 288 ist eine funktionierende NLS-Sequenz. Wildtyp-Zellen wurden mit den entsprechenden Plasmiden transformiert. Die Expression der Proteine wurde mit 2% Galaktose für 45 Minuten induziert. Die Zellen wurden dann mit 3,7% Formaldehyd fixiert, mit DAPI gefärbt und mittels Fluoreszenz-Mikroskopie analysiert. Sowohl  $Ste20^{272-288^*}$  als auch  $Ste20^{272-288^{**}}$  befanden sich im Zellkern.

Wie oben erwähnt, entsprechen die letzten vier Aminosäuren der NLS-Sequenz den ersten vier Aminosäuren der BR-Domäne. Um festzustellen, ob die Kernlokalisierung des Fusionsproteins allein durch die BR-Domäne verursacht worden war, wurden zwei Fragmente  $STE20^{272-400}$  und  $STE20^{285-400}$  in den  $P_{GALI-GST-GFP}$ -Vektor kloniert und die Lokalisation der exprimierten Proteine wurde analysiert. Das  $Ste20^{272-400}$ -Fragment enthielt die komplette NLS-Sequenz, die BR-Domäne und 88 weitere C-terminale Aminosäuren. Das  $Ste20^{285-400}$ -Fragment enthielt die komplette BR-Domäne und 88 weitere C-terminale Aminosäuren, d. h. es enthielt nur den zweiten basenreichen Cluster der NLS-Sequenz. Während sich  $Ste20^{272-400}$  hauptsächlich im Kern und teilweise im Zytosol und an der Membran befand, lag  $Ste20^{285-400}$

hauptsächlich im Zytosol und in der Knospe vor und zeigte eine sehr schwache Anreicherung im Zellkern (Abbildung 4.2.5). Das gesamte NLS ist also notwendig für Kernlokalisierung des Fusionsproteins.

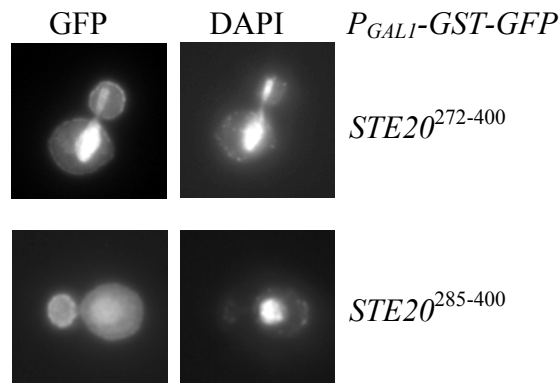
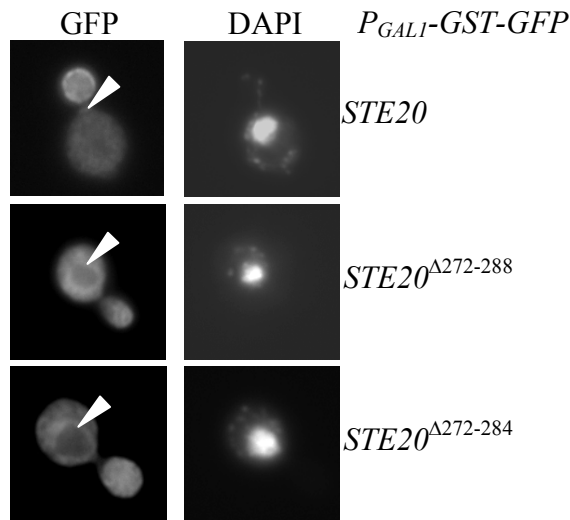
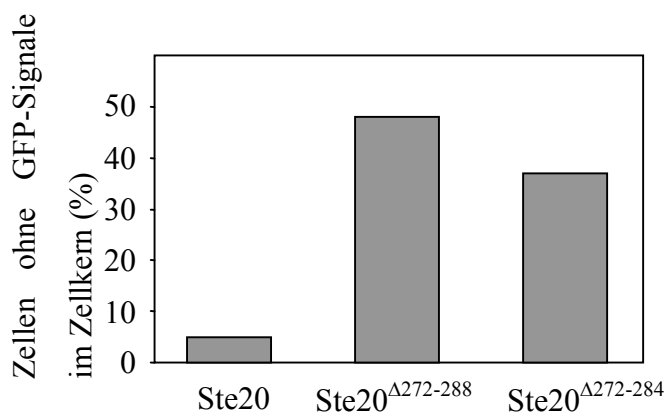
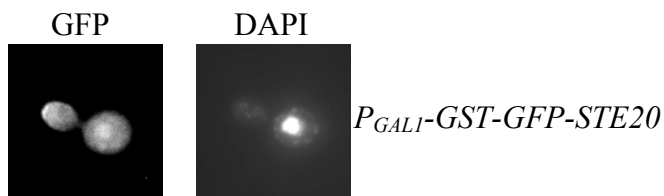


Abbildung 4.2.5: Das komplette NLS ist wichtig für die Kernlokalisierung.

Experimente wurden wie in der Abbildung 4.2.4 beschrieben durchgeführt.  $Ste20^{272-400}$  mit dem kompletten NLS (272-288) bis zur Aminosäure 400 war im Kern angereichert.  $Ste20^{284-400}$  nur mit dem zweiten Teil des NLS (285-288) bis zur Aminosäure 400 war sehr schwach im Kern angereichert.

Um die Funktion der NLS-Sequenz weiter zu testen, wurden drei weitere Konstrukte hergestellt. Das gesamte  $STE20$ ,  $STE20^{\Delta 272-288}$  und  $STE20^{\Delta 272-284}$  wurden in  $P_{GAL1}-GST-GFP$  kloniert. Die resultierenden Konstrukte wurden in den Wildtyp transformiert und die Lokalisation der induzierten Expression der Fusionsproteine wurde analysiert. In dem  $STE20^{\Delta 272-288}$ -Konstrukt wurde die komplette NLS-Sequenz deletiert während in dem  $STE20^{\Delta 272-284}$ -Konstrukt nur der erste basenreiche Cluster deletiert wurde. Während sich das Ste20-Fusionsprotein im Knospenkortex konzentrierte und in der Mutterzelle gleichmäßig verteilte, wurde in vielen Zellen eine Aussparung beobachtet, in dem kein GFP-Signal von  $Ste20^{\Delta 272-288}$ -Fusionsprotein und  $Ste20^{\Delta 272-284}$ -Fusionsprotein zu sehen war. Die Position der Aussparung entsprach der Position des Zellkerns (Abbildung 4.2.6 A). Die Zahl der Zellen, in welchen es kein GFP-Signal von  $GST-GFP-Ste20^{\Delta 272-288}$  im Zellkern gab, war leicht höher als die Zahl der Zellen, in welchen das  $GST-GFP-Ste20^{\Delta 272-284}$  überexprimiert wurde (Abbildung 4.2.6 B). Diese Tatsache bestätigt auch die Kernlokalisationsfunktion der beiden basenreichen Cluster. In der Tat wurde das gesamte Ste20 auch im Zellkern von einigen Zellen angereichert beobachtet (Abbildung 4.2.6 C).

**A****B****C**

**Abbildung 4.2.6:** Lokalisation des in seiner NLS-Sequenz modifizierten Ste20.

(A) Ste20 ohne NLS lag nicht im Zellkern (Pfeilspitze) vor. GST-GFP-Ste20<sup>Δ272-288</sup> und GST-GFP-Ste20<sup>Δ272-284</sup> wurden nicht im Zellkern beobachtet.

(B) Quantitative Analyse von (A). Von jedem Stamm wurden 100 Zellen analysiert.

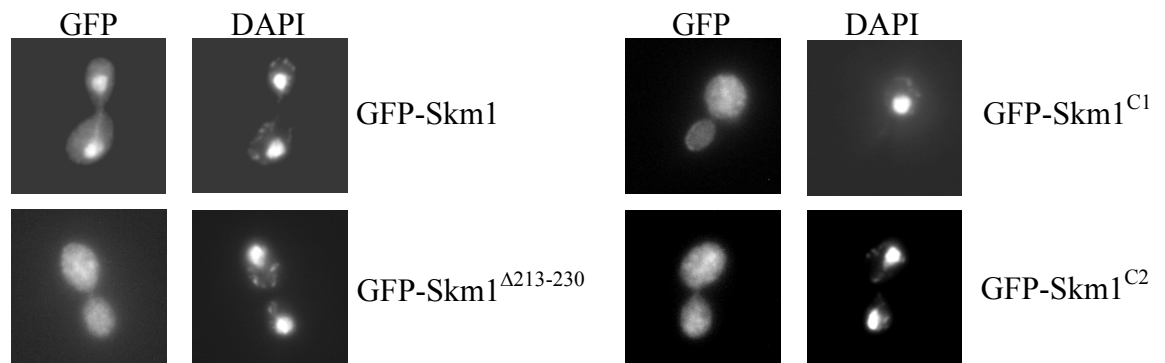
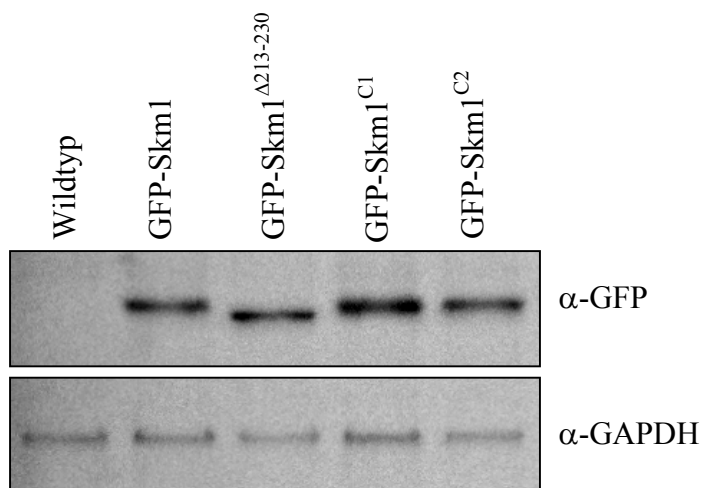
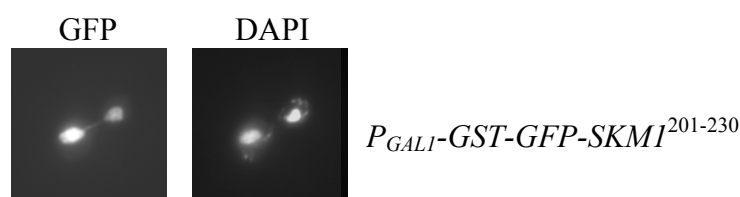
(C) Das Ste20-Wildtyp-Protein konnte in einigen Zellen auch im Zellkern angereichert beobachtet werden.

#### 4.2.2.2 Analyse der Kernlokalisierung von Skm1

Die Lokalisation von Skm1, die am wenigsten charakterisierte PAK-Kinase in Hefezellen, wurde untersucht. Zuerst wurde Skm1 mit einem C-terminalen GFP markiert. Da die Expression des Fusionsproteins unter dem eigenen Promotor sehr schwach und kein GFP-Signal unter dem Mikroskop zu sehen war (Daten nicht gezeigt), wurde eine PCR-Kassette hergestellt, die einen *GALI*-Promotor und einen *GFP*-Marker enthielt, und nach homologer Rekombination vor dem *SKM1*-Gen in Wildtyp-Zellen eingesetzt. Durch den *GALI*-Promotor konnte das Fusionsprotein GFP-Skm1 überexprimiert werden. Nach induzierter Überexpression von GFP-Skm1 wurde überraschenderweise beobachtet, dass sich GFP-Skm1 hauptsächlich im Zellkern befand (Abbildung 4.2.7 A). Durch eine Untersuchung der Aminosäuresequenz von Skm1 wurde eine putative zweiteilige NLS-Sequenz von Aminosäure 213 bis 230 entdeckt (KRTNSIKRSVSRTLRKGGK; positiv geladene Aminosäuren der beiden basischen Gruppen sind unterstrichen). Nach Deletion des putativen NLS befand sich das verkürzte Protein hauptsächlich im Zytosol (Abbildung 4.2.7 A). Punktmutationen wurden bei den positiv geladenen Aminosäuren hergestellt, entweder von der ersten basischen Gruppe oder von der zweiten basischen Gruppe. Das Protein, in dem Lys213 und Arg214 der ersten basischen Gruppe zu Ala mutiert wurden, wurde als Skm1<sup>C1</sup> bezeichnet. Es verteilte sich gleichmäßig im Zytosol (Abbildung 4.2.7 A). Ein anderes Protein, in dem Arg227, Lys228 und Lys230 der zweiten basischen Gruppe zu Ala mutiert wurden, wurde als Skm1<sup>C2</sup> bezeichnet. Es konzentrierte sich sehr schwach im Zellkern (Abbildung 4.2.7 A). Sowohl die erste basische Gruppe als auch die zweite basische Gruppe der NLS-Sequenz sind also für die Kernlokalisierung von Skm1 wichtig. Durch Western-Blot wurde bestätigt, dass die Mengen der überexprimierten GFP-Fusionsproteine von Wildtyp-Skm1 und Mutanten-Skm1 miteinander vergleichbar waren (Abbildung 4.2.7 B).

Um die Funktion dieser NLS-Sequenz zu testen wurde sie in den *P<sub>GALI</sub>-GST-GFP*-Vektor kloniert. Nach induzierter Überexpression des GFP-Fusionsproteins wurde es nicht im Zellkern beobachtet (Daten nicht gezeigt). Ein GFP-Fusionsprotein mit verlängerter NLS-Sequenz von Aminosäure 201 bis 230 lag aber vollständig im Zellkern vor (Abbildung 4.2.7 C). Dieses Ergebnis bestätigte die Funktion der NLS-Sequenz von Skm1. Die NLS-Sequenz von Skm1 benötigt wie Ste20 eine Verlängerung, damit sie von der Kernlokalisationsmaschinerie erkannt wird.



**A****B****C**

**Abbildung 4.2.7:** Analyse der Kernlokalisierung von Skm1.

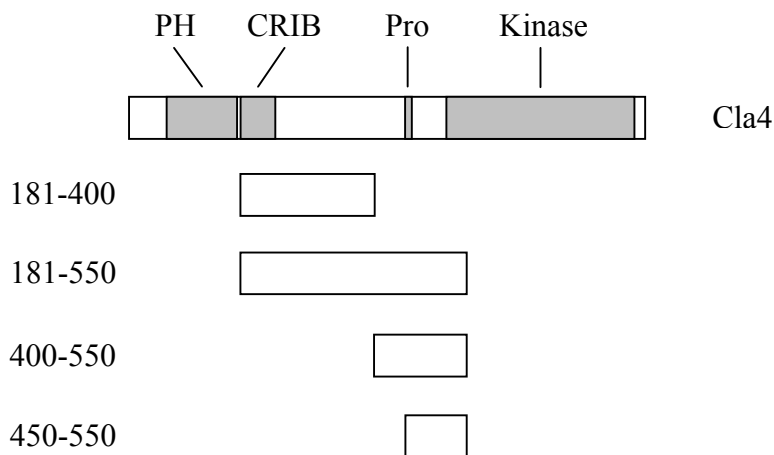
(A) Kernlokalisierung des GFP-Skm1-Fusionsproteins. Zellen mit den entsprechenden Plasmiden wurden mit 2% Galaktose für 60 Minuten induziert. Die Zellen wurden nach Fixierung mit 3,7% Formaldehyd zum Nachweis der Zellkerne mit DAPI gefärbt. Während das GFP-Signal von GFP-Skm1 im Kern angereichert war, verteilten sich die GFP-Signale von GFP-Skm1<sup>Δ213-230</sup>, GFP-Skm1<sup>C1</sup> und GFP-Skm1<sup>C2</sup> gleichmäßig in den Zellen.

(B) Alle GFP-Fusionsproteine wurden in vergleichbaren Mengen exprimiert. Gleiche Mengen von Zellen wurden nach der Induktion aufgeschlossen und nach Gelelektrophorese und Western-Blot durch  $\alpha$ -GFP- und  $\alpha$ -GAPDH-Antikörpern analysiert. GAPDH diente als Ladekontrolle.

(C) Das Fusionsprotein GST-GFP-Skm1<sup>201-230</sup> reichte sich im Zellkern an. Das Experiment wurde wie in Abbildung (B) beschrieben durchgeführt.

### 4.2.2.3 Analyse der Kernlokalisierung von Cla4

Es wurde berichtet, dass Cla4, wie Ste20, an Stellen polaren Wachstums lokalisiert, d.h. an der Plasmamembran von Knospen und Paarungsprojektionen (Holly und Blumer, 1999). Durch Untersuchung der Cla4-Sequenz wurde kein NLS entdeckt. Um zu überprüfen, ob Cla4 auch in den Zellkern transportiert werden kann, wurden verschiedene Fragmente von *CLA4* in den *GALI-GST-GFP*-Vektor kloniert (Abbildung 4.2.8).



**Abbildung 4.2.8:** Benutzte Fragmente von Cla4 sowie ihre Positionen in der Cla4-Sequenz. Positionen der Kinasedomäne und wichtiger Domänen für Membranlokalisierung wurden zum Vergleich gekennzeichnet. Die CRIB-Domäne ist das minimale Bindungsmotiv für Cdc42 (Cvrckova et al., 1995). Die Pro-Domäne bindet an das "Scaffoldprotein" Bem1 (Winters and Pryciak, 2005). Die PH-Domäne interagiert mit Phosphoinositiden der Membran (Wild et al., 2004).

Wildtyp-Cla4 befand sich an der Plasmamembran von Knospen (Abbildung 4.2.9) und entsprach damit den Beschreibungen aus der Literatur (Holly und Blumer, 1999). Während das Fragment von Aminosäure 181 bis 400 sich gleichmäßig in Zellen verteilte, befand sich das Fragment von Aminosäure 181 bis 550 nur im Zellkern. Dies deutet möglicherweise darauf hin, dass sich zwischen Aminosäure 400 und 550 ein NLS befindet. In der Tat befand sich nicht nur das Fragment von Aminosäure 400 bis 550 ausschließlich im Zellkern, sondern ein weiter verkürztes Fragment von Aminosäure 450 bis 550 (Abbildung 4.2.9). Das noch um weitere 50 Aminosäuren verkürzte Fragment lag nicht mehr ausschließlich im Zellkern vor (Daten nicht gezeigt). Deswegen wurde die Signalsequenz für die Kernlokalisierung von Aminosäure 450 bis 550 festgelegt.

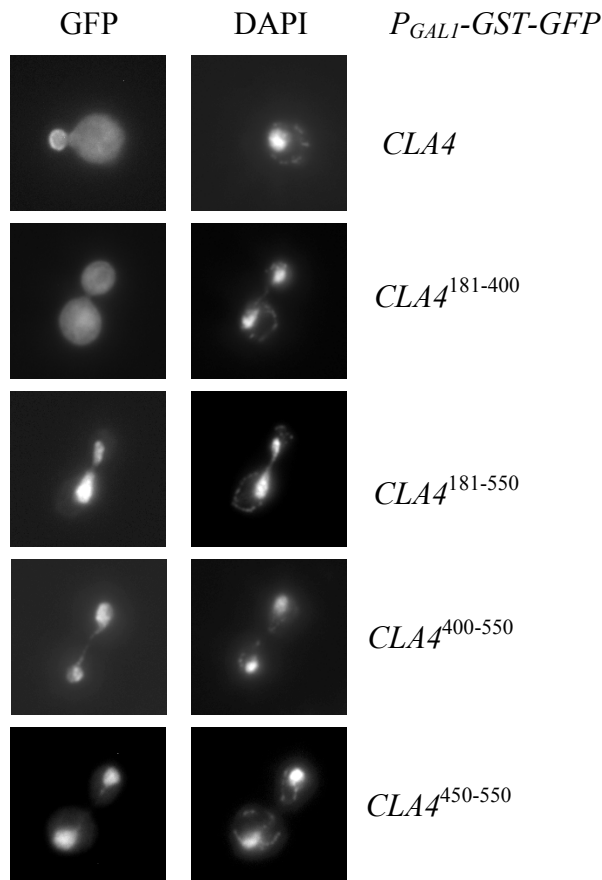


Abbildung 4.2.9: Lokalisation der GST-GFP-Fusionsfragmente von Cla4 in Zellen nach induzierter Expression. Zellen mit den entsprechenden Plasmiden wurden durch 2% Galaktose für 45 Minuten induziert und dann mit Formaldehyd fixiert. Es zeigte sich, dass das Fragment von Aminosäure 450 bis 550 nur im Zellkern vorlag.

### 4.2.3 Analyse der Funktion der Kernlokalisierung von Ste20

Ste20, die am besten charakterisierte PAK-Kinase in Hefezellen, besitzt viele Funktionen. Besonders gut charakterisiert ist ihre Funktion als MAPKKKK beim filamentösen Wachstum und bei der Paarung (Roberts und Fink, 1994). Außerdem ist bekannt, dass *STE20* mit *CLA4* genetisch interagiert. Gleichzeitige Deletion von *STE20* und *CLA4* führt zum Tod der Zellen (Cvrckova et al., 1995). Es ist daher interessant zu wissen, ob Ste20 ohne seine NLS-Sequenz immer noch die MAPKKK-Funktion im Bezug auf das filamentöse Wachstum und auf die Bildung der Paarungsprojektionen ausführen kann und die synthetische Letalität von *ste20Δ* und *cla4Δ* aufheben kann.

#### 4.2.3.1 Analyse der Funktion der Kernlokalisierung von Ste20 beim filamentösen Wachstum und bei der Paarung

Für die Untersuchung des filamentösen Wachstums wurde der Stamm  $\Sigma 1278b$  als Wildtyp benutzt. Um die Funktion der Kernlokalisierung von Ste20 zu testen, wurde das mutierte *STE20*, nämlich das *STE20<sup>ANLS</sup>*, in den Vektor pRS303 kloniert. Das resultierende Plasmid konnte dann stabil in einen *ste20Δ*-Stamm integriert werden. Als Kontrolle wurde das Wildtyp-*STE20* auch in das integrative Plasmid kloniert und zurück in den *ste20Δ*-Stamm gebracht. Es zeigte sich, dass *STE20<sup>ANLS</sup>* genau wie *STE20* den Defekt der *ste20Δ*-Mutante beim filamentösen Wachstum aufhob (Abbildung 4.2.10). Die Kernlokalisierung von Ste20 ist also nicht entscheidend für seine Funktion als MAPKKKK beim filamentösen Wachstum.

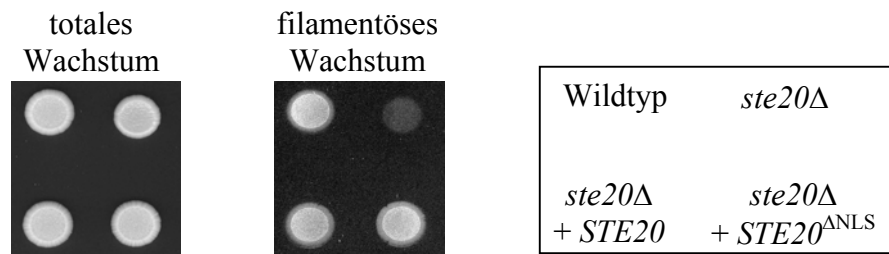
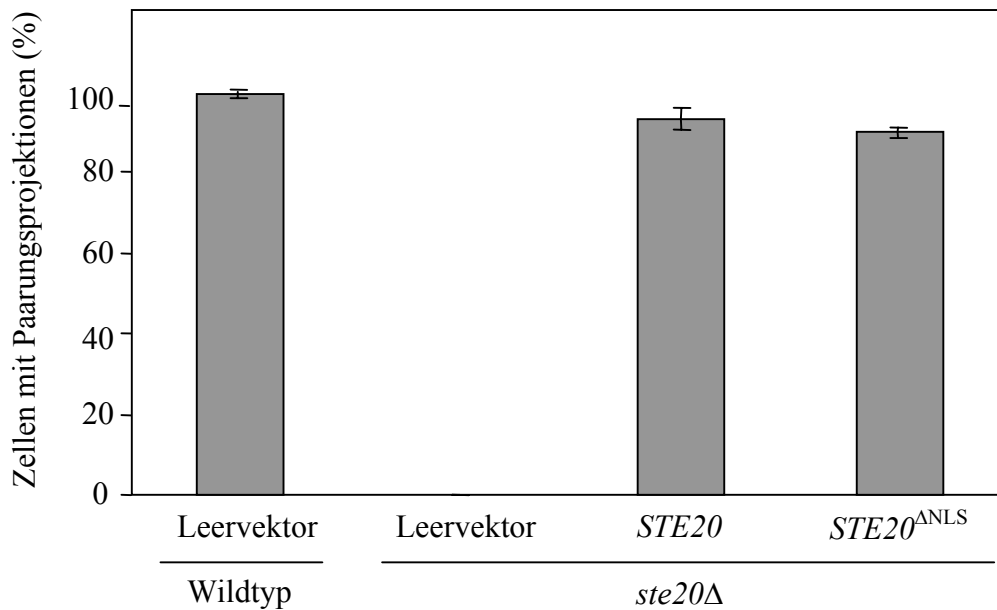


Abbildung 4.2.10: Analyse des invasiven Wachstums des *ste20Δ*-Stammes mit dem integrierten *STE20<sup>ANLS</sup>*.

$10^5$  Zellen von jedem Stamm wurden auf eine YPD-Platte pipettiert. Das totale Wachstum zeigte Zellen auf der Oberfläche nach Inkubation bei 30°C für zwei Tage. Danach wurden die Zellen von der Oberfläche weggespült. Das filamentöse Wachstum zeigte dann Zellen, die in die Agarplatte hineinwuchsen und nicht mehr von der Oberfläche weggespült werden konnten.

Bei der Untersuchung der Funktion der Kernlokalisierung von Ste20 im Bezug auf die Paarung wurde YAS8 als Wildtyp benutzt. Nach der Behandlung mit  $\alpha$ -Faktor bildeten Wildtyp-Zellen Paarungsprojektionen aus, während die Bildung der Paarungsprojektionen in *ste20Δ*-Zellen komplett ausbleibt. Hier wurden *STE20* und *STE20<sup>ANLS</sup>* unter ihren eigenen Promotor in Vektoren kloniert. Die resultierenden Plasmide wurden dann in den *ste20Δ*-Stamm transformiert. Der Leervektor wurde auch in den *ste20Δ*-Stamm transformiert und diente als negative Kontrolle. Es zeigte sich, dass die Bildung der Paarungsprojektionen in *ste20Δ*-Zellen durch *STE20<sup>ANLS</sup>* fast genauso gut wie durch *STE20* normalisiert wurde (Abbildung 4.2.11). Die Kernlokalisierung von Ste20 ist also nicht entscheidend für seine Funktion als MAPKKKK bei Paarung.



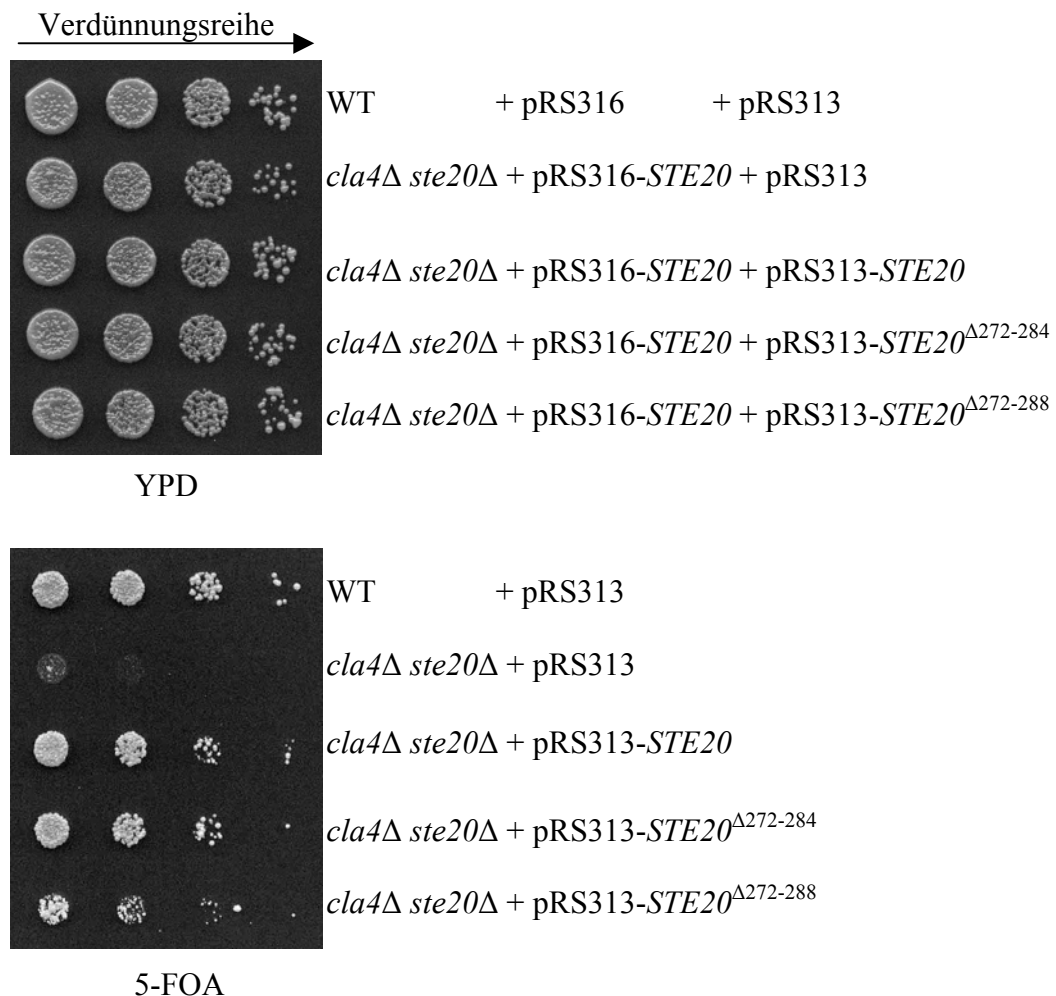
**Abbildung 4.2.11:** Analyse der Funktion von  $STE20^{ANLS}$  bei der Paarung.  $\alpha$ -Faktor mit einer Endkonzentration von 1  $\mu\text{g/ml}$  wurde Zellen zugegeben als ihre  $OD_{600}$  bei 0,25 lag. Nach Inkubation bei 30°C für 150 min wurden die Zellen mit 3,7% Formaldehyd fixiert. Zellen mit Paarungsprojektionen wurden quantitativ analysiert. Es wurden 3 unabhängige Experimente durchgeführt und 100 Zellen bei jeder Analyse quantifiziert.

#### 4.2.3.2 Analyse der Funktion der Kernlokalisierung von Ste20 in der letalen Doppelmutante $ste20\Delta cla4\Delta$

Die gleichzeitige Deletion von  $STE20$  und  $CLA4$  führt zum Tod von Hefezellen (Cvrckova et al., 1995). Dies deutet auf eine oder mehrere gemeinsame Funktionen der beiden Kinasen hin. Da beide Kinasen in den Zellkern translozieren können, ist es interessant zu wissen, ob die Kernlokalisierung der beiden Kinasen gemeinsame lebenswichtige Funktionen hat. Zu diesem Zweck wurde ein Stamm verwendet, dem beide Kinasen fehlen und in welchen das Plasmid pRS316- $STE20$  transformiert wurde. Dieses unter seinem eigenen Promotor exprimierte Ste20 ermöglicht das Überleben des  $ste20\Delta cla4\Delta$ -Stammes.

Das Plasmid pRS313- $STE20^{\Delta 272-288}$  wurde in diesen Stamm transformiert. Da die letzten vier Aminosäuren der NLS-Sequenz mit der BR-Domäne überlappen, welche für die Funktion von Ste20 an der Plasmamembran wichtig ist, wurde das Plasmid pRS313- $STE20^{\Delta 272-284}$  hergestellt und auch in diesen Stamm transformiert. Als negative bzw. positive Kontrolle wurde der Leervektor pRS313 oder das Plasmid pRS313- $STE20$  in diesen Stamm transformiert. Da auf einer 5-FOA-Platte Zellen selektiert werden, die keine pRS316-Plasmide enthalten, besaßen sie nur pRS313-Plasmide. Es zeigte sich, dass Zellen mit pRS313- $STE20^{\Delta 272-284}$  genauso gut auf der 5-FOA-Platte gewachsen waren wie Zellen mit

pRS313-*STE20*, während Zellen mit pRS313-*STE20*<sup>Δ272-288</sup> ein wenig langsamer gewachsen waren (Abbildung 4.2.12). Ste20 und Cla4 üben keine überlappende lebenswichtige Funktion im Zellkern aus.



**Abbildung 4.2.12:** Analyse der Funktion der Kernlokalisierung von Ste20 in der letalen Doppelmutante *ste20Δ cla4Δ*

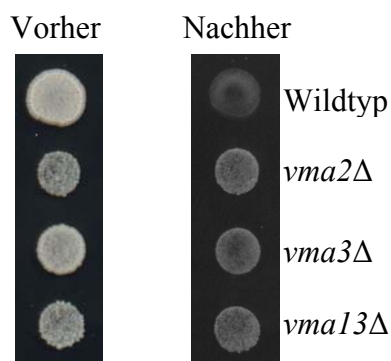
Zellen der angegebenen Stämme wurden in einer Verdünnungsreihe (1:10) auf eine YPD-Platte und auf eine 5-FOA-Platte pipettiert. Die erste Verdünnungsstufe enthielt  $10^5$  Zellen. Die beiden Platten wurden bei 30°C für zwei Tage inkubiert.

### 4.3 Ste20 und Vma13

#### 4.3.1 Analyse des Polaritätsdefektes in den Deletionsstämmen *vma2Δ*, *vma3Δ* und *vma13Δ*

Da Vma13, eine Untereinheit der V<sub>1</sub>-Domäne der V-ATPase, ein Interaktor des Polaritätsproteins Ste20 ist, wurde untersucht, ob Zellen ohne *VMA13* einen Polaritätsdefekt

besitzen. Die Deletion von *VMA13* führte zwar zu verlangsamtem Wachstum von Zellen, ihre Morphologie und Fähigkeit zur Bildung von Paarungsprojektionen waren jedoch normal. Es wurde aber beobachtet, dass Zellen mit deletiertem *VMA13* hyperinvasives Wachstum aufweisen (Abbildung 4.3.1). Um festzustellen, ob das hyperinvasive Wachstum für *vma13Δ*-Mutanten spezifisch war, wurden zwei weitere Mutanten hergestellt. In der ersten Mutante wurde *VMA2* deletiert, eine andere Untereinheit der  $V_1$ -Domäne. In der zweiten Mutante wurde *VMA3* deletiert, eine Untereinheit der  $V_0$ -Domäne. Sowohl die *vma2Δ*-Mutante als auch die *vma3Δ*-Mutante wiesen hyperinvasives Wachstum auf (Abbildung 4.3.1). Da die Deletion verschiedener V-ATPase-Gene jeweils zur Inaktivierung der V-ATPase führt (Yamashiro et al., 1990), wurde vermutet, dass Zellen ohne V-ATPase-Aktivität weniger Nährstoffe zur Verfügung standen. Dies ist vermutlich eine Folge der Unfähigkeit, Nährstoffe wegen fehlender V-ATPase-Aktivität zu speichern und zu mobilisieren.

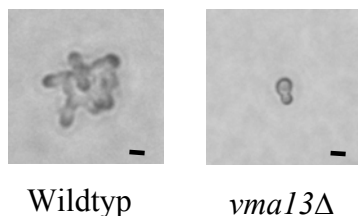


**Abbildung 4.3.1:** Analyse des invasiven Wachstums der Mutanten mit den deletierten Genen *VMA2*, *VMA3* oder *VMA13*.

Es zeigte sich, dass alle Mutanten hyperinvasives Wachstum aufwiesen.  $10^5$  Zellen von jedem Stamm wurden auf eine YPD-Platte pipettiert und die Platte wurde bei  $30^\circ\text{C}$  für zwei Tage inkubiert. Das linke Bild zeigt das Wachstum der Zellen, die sich vor dem Abwaschen auf der Oberfläche der Platte befanden. Das rechte Bild zeigt das invasive Wachstum der Zellen, die in die Platte hineingewachsen sind und nicht abgewaschen werden konnten.

Zellen, die hyperinvasives Wachstum zeigen, besaßen in einem Mikrokolonie-Experiment längere Zellen als Wildtypzellen (Cullen und Sprague, 2000). In diesem Experiment wurden stark verdünnte Zellen auf Minimalmedium-Platten ohne Glukose ausplattiert. Die von einer Zelle ausgebildete Kolonie wurde nach Inkubation für 18 Stunden unter dem Lichtmikroskop analysiert. Da *vma13Δ*-Mutanten hyperinvasives Wachstum zeigten, wurde in einem Mikrokolonie-Experiment untersucht, ob sie auch längere Zellen als Wildtypzellen bilden konnten. Wildtypzellen bildeten wie erwartet normale Mikrokolonien (Abbildung 4.3.2). Überraschenderweise wurde bei *vma13Δ*-Mutanten auch nach 48 Stunden keine Zellteilung beobachtet (Abbildung 4.3.2). Dies war wahrscheinlich die Folge der Unfähigkeit der

*vma13Δ*-Mutante wegen der inaktivierten V-ATPase, Nährstoffe zu speichern und zu mobilisieren.

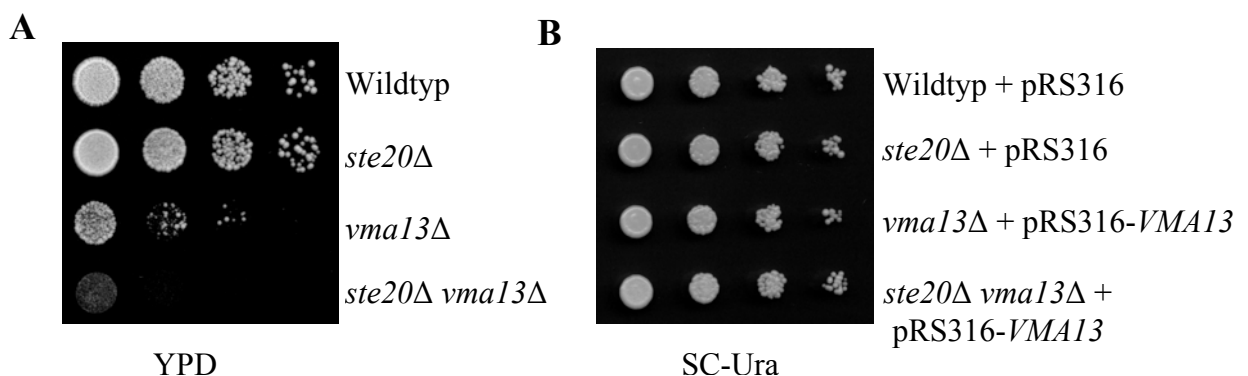


**Abbildung 4.3.2:** Invasives Wachstum einer einzelnen Zelle.

Zellen aus einer Flüssig-Kultur wurden nach dem Waschen auf Minimalmedium ohne Glukose ausplattiert. Nach Inkubation für 18 Stunden bei 30°C wurden die Zellen unter dem Lichtmikroskop analysiert. Der Balken entspricht 5 µm.

### 4.3.2 Analyse der genetischen Interaktion zwischen *STE20* und *VMA13*

Um eine genetische Interaktion zwischen *STE20* und *VMA13* zu testen, wurde das *VMA13*-Gen in einem *ste20Δ*-Stamm deletiert. Verdünnungsreihen zeigten, dass die *ste20Δ vma13Δ*-Mutante langsamer als die *ste20Δ*-Mutante und die *vma13Δ*-Mutante wuchs (Abbildung 4.3.3 A). Um unerwünschte Mutationen auszuschließen, die das verlangsamte Wachstum der *ste20Δ vma13Δ*-Mutante verursachen könnten, wurde das *VMA13*-Gen unter dem eigenen Promotor in das pRS316-Plasmid kloniert und zurück in den Stamm transformiert. Verdünnungsreihen zeigten, dass die *ste20Δ vma13Δ*-Mutante mit dem pRS316-*VMA13*-Plasmid genauso schnell wie der Wildtyp wuchs (Abbildung 4.3.3 B). *STE20* interagiert also genetisch mit *VMA13*. Dies wies darauf hin, dass *STE20* und *VMA13* in demselben oder parallelen Signalweg(en) eine Funktion besitzen.



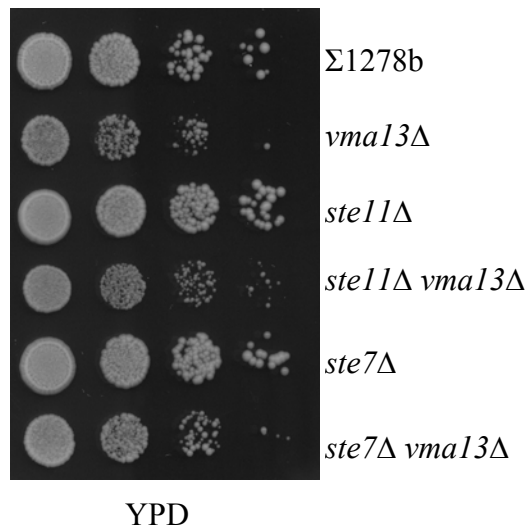
**Abbildung 4.3.3:** Analyse der genetischen Interaktion zwischen *STE20* und *VMA13*.

(A) Alle Stämme wurden in einer Verdünnungsreihe (1:10) auf eine YPD-Platte pipettiert. Die erste Verdünnungsstufe enthielt  $10^5$  Zellen. Es zeigte sich, dass die *ste20Δ vma13Δ*-Mutante langsamer als die *ste20Δ*-Mutante und die *vma13Δ*-Mutante wuchs.

(B) Mit dem pRS316-*VMA13*-Plasmid wuchsen sowohl die *vma13Δ*-Mutante als auch die *ste20Δ vma13Δ*-Mutante genau so schnell wie der Wildtyp. Das verlangsamte Wachstum der *vma13Δ*-Mutante und der *ste20Δ vma13Δ*-Mutante wurde also nicht durch zusätzliche Mutationen verursacht.



Im Gegensatz dazu, zeigten zwei andere Gene des *STE20*-MAPK-Signalweges, *STE11* (eine MAPKKK) und *STE7* (eine MAPKK), keine genetische Interaktion mit *VMA13* (Abbildung 4.3.4). Die Mutanten *ste11Δ vma13Δ* und *ste7Δ vma13Δ* wuchsen genauso schnell wie *vma13Δ*-Mutanten. Die genetische Interaktion zwischen *STE20* und *VMA13* war also spezifisch.

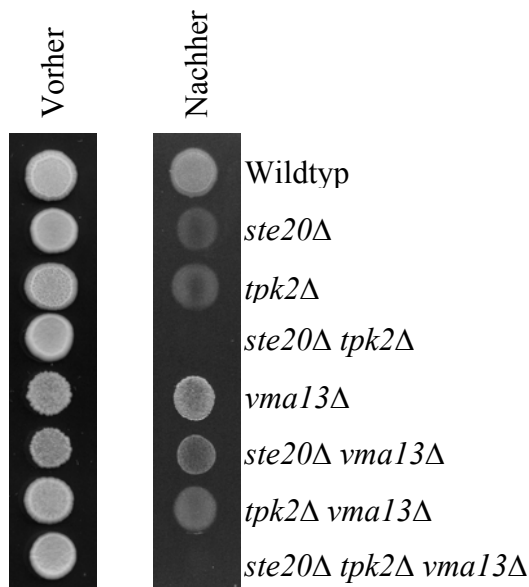


**Abbildung 4.3.4:** Analyse der genetischen Interaktion zwischen *VMA13* und *STE11* bzw. *STE7*. Verdünnungsreihen der angegebenen Stämme wurden auf eine YPD-Platte pipettiert. Zwischen Einfachmutanten und Doppelmutanten wurde kein Wachstumsunterschied beobachtet.

### 4.3.3 Analyse der Signalwege des durch *VMA13*-Deletion induzierten hyperinvasiven Wachstums

Hefezellen besitzen zwei wichtige Signalwege, mit denen sie invasives Wachstum durchführen können. Diese sind der MAPK-Signalweg mit der Kinase Ste20 und der PKA-cAMP-Signalweg mit der katalytischen PKA-Untereinheit Tpk2. Während die Deletion einer Kinase zum geschwächten invasiven Wachstum führte, wurde das invasive Wachstum bei gleichzeitiger Deletion beider Kinasen ganz aufgehoben (Abbildung 4.3.5). Dies deutet darauf hin, dass der MAPK-Signalweg und der PKA-cAMP-Signalweg die Hauptsignalwege beim filamentösen Wachstum sind. Um zu testen, ob das hyperinvasive Wachstum des *vma13Δ*-Stammes von den beiden Signalwegen abhängt, wurden die Stämme *ste20Δ vma13Δ*, *tpk2Δ vma13Δ* und *ste20Δ tpk2Δ vma13Δ* hergestellt. Während der *ste20Δ vma13Δ*-Stamm und der *tpk2Δ vma13Δ*-Stamm stärkeres invasives Wachstum als die entsprechenden Stämme *ste20Δ* und *tpk2Δ* aufzeigten, konnte der *ste20Δ tpk2Δ vma13Δ*-Stamm wie der *ste20Δ tpk2Δ*-Stamm nicht invasiv wachsen (Abbildung 4.3.5). Dies weist darauf hin, dass die *vma13Δ*-Mutante

sowohl durch den MAPK-Signalweg als auch durch den PKA-cAMP-Signalweg ihr invasives Wachstum verstärken konnte.



**Abbildung 4.3.5:** Analyse der Signalwege, welche die *vma13Δ*-Mutante für ihr hyperinvasives Wachstum benötigt.

$10^5$  Zellen wurden auf eine YPD-Platte pipettiert und die Platte wurde bei 30°C inkubiert. Die linke Abbildung zeigt die Kolonien nach zwei Tagen. Danach wurde die Platte mit Wasser gespült, um Zellen von der Oberfläche abzuwaschen. Die rechte Abbildung zeigt das Aussehen der Kolonien, die in den Agar hinein gewachsen sind und nicht mehr von der Platte abgespült werden konnten.

#### 4.3.4 Analyse des Wachstums der *tpk2Δ vma13Δ*-Mutante

Es konnte in Abbildung 4.3.5 gezeigt werden, dass die *tpk2Δ vma13Δ*-Mutante schneller wächst als die *vma13Δ*-Mutante. Um dies genauer zu prüfen, wurden Verdünnungsreihen hergestellt (Abbildung 4.3.6). Dadurch konnte bestätigt werden, dass die *tpk2Δ vma13Δ*-Mutante tatsächlich schneller als die *vma13Δ*-Mutante wachsen konnte. Diese genetische Interaktion deutet darauf hin, dass *TPK2*, genau wie *STE20*, überlappende Funktionen mit *VMA13* hat.

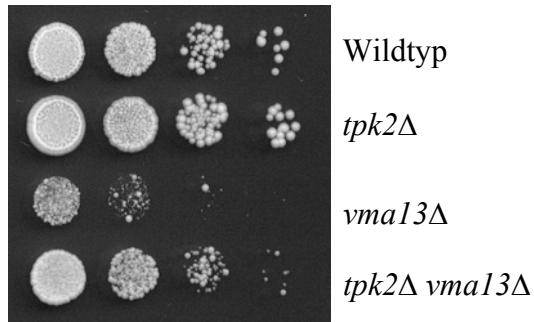
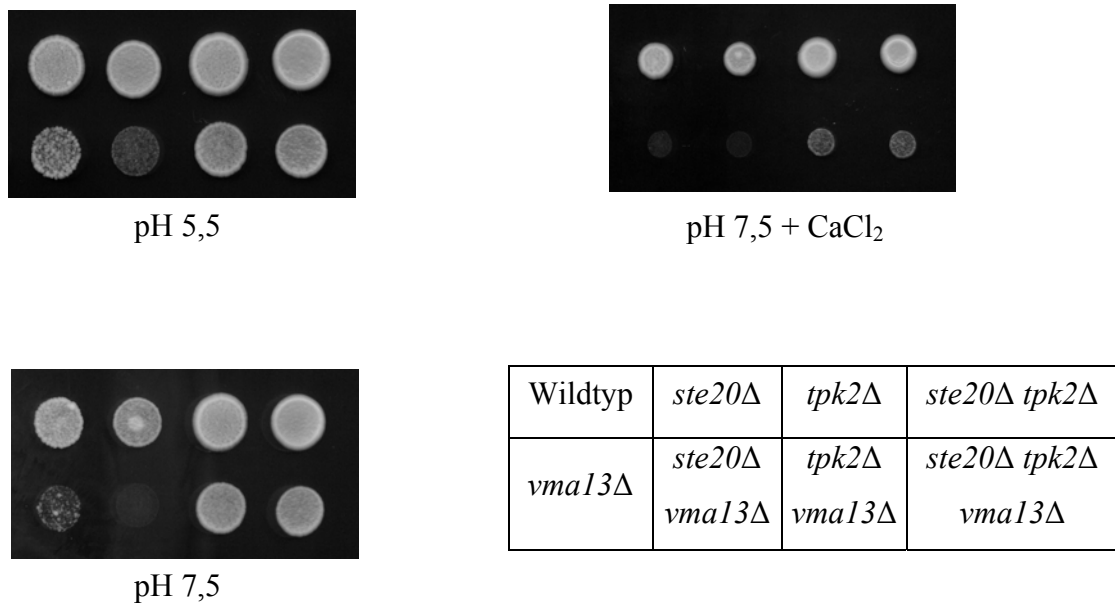


Abbildung 4.3.6: Analyse des Wachstums der *tpk2Δ vma13Δ*-Mutante.

Alle Stämme wurden in einer Verdünnungsreihe (1:10) auf eine YPD-Platte pipettiert. Die erste Verdünnungsstufe enthielt  $10^5$  Zellen. Es zeigte sich, dass die *tpk2Δ vma13Δ*-Mutante schneller als die *vma13Δ*-Mutante wuchs.

#### 4.3.5 Analyse des Wachstums von Mutanten auf Platten mit hoher $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration und hohem pH-Wert

Die Deletion einer Untereinheit (mit Ausnahme der homologen Untereinheiten *VPH1* und *STV1*) der V-ATPase führt zu einer erhöhten Sensitivität der Zellen gegenüber einem hohen pH-Wert und einer hohen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration, eine allgemeine Eigenschaft des *VMA*<sup>-</sup>-Phänotyps (Manolson et al., 1994). Da die *tpk2Δ vma13Δ*-Mutante und die *ste20Δ tpk2Δ vma13Δ*-Mutante auf einer normalen YPD-Platte (pH 5,5) schneller als die *vma13Δ*-Mutante wuchs (Abbildung 4.3.5), wurde getestet, wie sich die Doppel- und Dreifachmutanten bei hohem pH-Wert und hoher  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration verhielten. Gleichzeitig wurde auch die *ste20Δ vma13Δ*-Mutante getestet, die auf einer normalen YPD-Platte (pH 5,5) noch langsamer als die *vma13Δ*-Mutante wuchs (Abbildung 4.3.5). Während die *vma13Δ*-Mutante auf einer YPD-Platte mit pH 7,5 noch ein wenig wuchs, blieb ihr Wachstum auf einer YPD-Platte mit pH 7,5 und 60 mM  $\text{CaCl}_2$  komplett aus. Die *ste20Δ vma13Δ*-Mutante wuchs weder auf der YPD-Platte mit pH 7,5 noch auf der Platte mit pH 7,5 und 60 mM  $\text{CaCl}_2$ . Dagegen wurde das Wachstum der *tpk2Δ vma13Δ*-Mutante und der *ste20Δ tpk2Δ vma13Δ*-Mutante nicht durch den erhöhten pH-Wert beeinträchtigt. Auf der YPD-Platte mit pH 7,5 und 60 mM  $\text{CaCl}_2$  zeigten die beiden Mutanten immer noch Wachstum (Abbildung 4.3.7). Dies deutet darauf hin, dass die Deletion von *STE20* die Empfindlichkeit des *VMA*<sup>-</sup>-Phänotyps erhöht. Deletion von *TPK2* konnte sowohl die Empfindlichkeit der *vma13Δ*-Mutante als auch die Empfindlichkeit der *vma13Δste20Δ*-Mutante gegenüber einem hohen pH-Wert und  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration erniedrigen.



**Abbildung 4.3.7:** Analyse des Wachstums von Mutanten bei verschiedenen pH-Werten und Calcium-Konzentrationen.

10<sup>5</sup> Zellen von jedem Stamm wurden nach dem in der Tabelle gezeigten Muster auf eine normale YPD-Platte mit pH 5,5, eine YPD-Platte mit pH 7,5 und eine YPD-Platte mit pH 7,5 und 60 mM CaCl<sub>2</sub> pipettiert. Die Platten wurden dann bei 30°C für zwei Tage inkubiert.

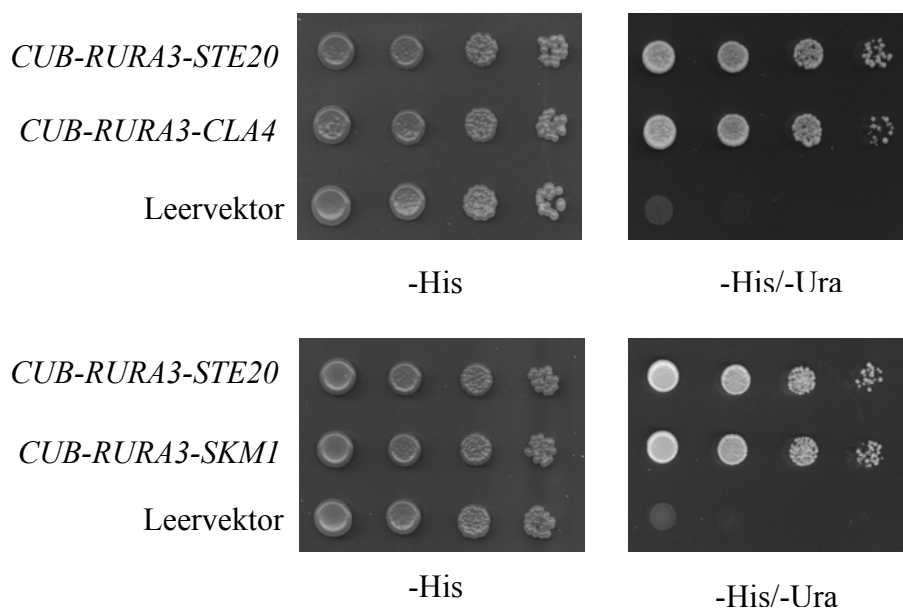
#### 4.3.6 Analyse der Interaktion zwischen Vma13 und Cla4 sowie Skm1 mit der Split-Ubiquitin-Technik

Mit der Split-Ubiquitin-Technik wurde in der Arbeitsgruppe Vma13 als ein Interaktor von Ste20 identifiziert. Da die drei PAK-Kinasen in Hefezellen strukturelle Ähnlichkeiten besitzen und auch überlappende Funktionen ausüben, ist es interessant zu wissen, ob Vma13 auch mit den anderen zwei PAK-Kinasen Cla4 und Skm1 interagiert.

##### 4.3.6.1 Herstellung des Cla4-Cub-Konstruktes und des Skm1-Cub-Konstruktes

PCR-Produkte mit den Primern Cla4-24 und Cla4-27 oder den Primern Skm1-23 und Skm1-30 wurden in das Plasmid *STE14-CUB-RURA3-Met313* kloniert. Die beiden Konstrukte mit der C-terminalen Hälfte von Ubiquitin (*CUB*) und dem *RURA3*-Marker, die *CUB-RURA3-CLA4* und *CUB-RURA3-SKMI* genannt werden, wurden vor der Benutzung für das Split-Ubiquitin-Experiment funktionell getestet. Dazu wurden Zellen mit *CUB-RURA3-CLA4*, *CUB-RURA3-SKMI*, *CUB-RURA3-STE20*, oder dem Leervektor transformiert. Das Konstrukt *CUB-RURA3-STE20* wurde früher funktionell getestet und diente als positive Kontrolle. Der Leervektor wurde als negative Kontrolle eingesetzt. Da alle Plasmide einen *HIS3*-Marker

besaßen, wurde eine Kontrollplatte ohne Histidin benutzt, um sicher zu sein, dass gleiche Mengen von Zellen jeder Stämme auf Platten pipettiert wurden. Da dieses Split-Ubiquitin-System Ura3 als Reporter benutzte, wurde die Expression des *CUB-RURA3-CLA4*-Konstruktes und des *CUB-RURA3-SKMI*-Konstruktes mit Platten ohne Uracil getestet. Richtig exprimierte *CUB*-Konstrukte ermöglichen das Wachstum von Zellen auf Platten ohne Uracil. Es zeigte sich, dass sowohl Zellen mit dem *CUB-RURA3-CLA4*-Konstrukt als auch mit dem *CUB-RURA3-SKMI*-Konstrukt genauso schnell wie Zellen mit dem *CUB-RURA3-STE20*-Konstrukt (Abbildung 4.3.8) wuchsen. Die beiden Konstrukte exprimierten somit das codierte Fusionsprotein.



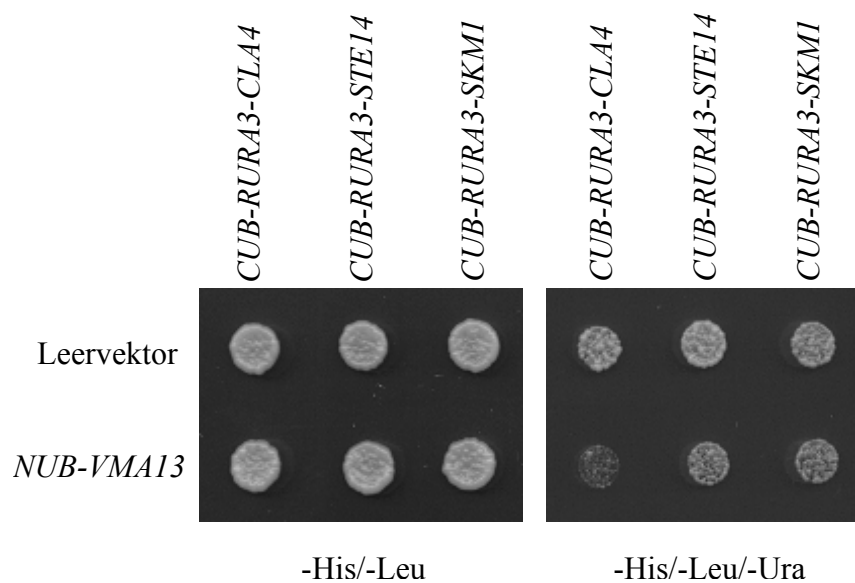
**Abbildung 4.3.8:** Funktionstest des *CUB-RURA3-CLA4*-Konstruktes und des *CUB-RURA3-SKMI*-Konstruktes. Zellen mit dem gezeigten Plasmid wurden auf -His und -His/-Ura Platten in Verdünnungsreihen (1:10) pipettiert. Die erste Stufe enthielt  $10^5$  Zellen. Sowohl Zellen mit dem *CUB-RURA3-CLA4*-Plasmid als auch mit dem *CUB-RURA3-SKMI*-Plasmid wuchsen genauso schnell wie Zellen mit dem *CUB-RURA3-STE20*-Plasmid. Dies deutet auf funktionierendes *CUB-RURA3-CLA4*-Konstrukt und *CUB-RURA3-SKMI*-Konstrukt hin.

#### 4.3.6.2 Analyse der Interaktion zwischen Vma13 und Cla4 bzw. Skm1

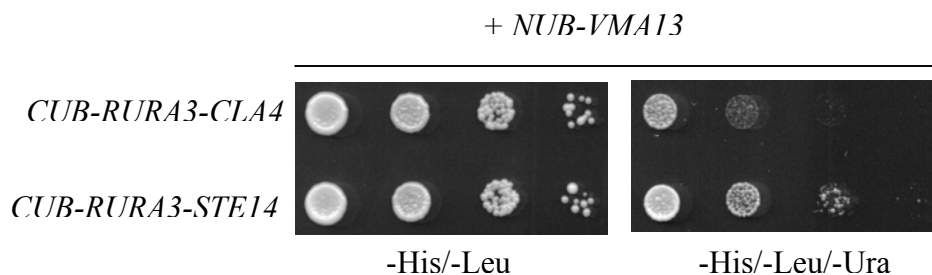
Um die Interaktion zwischen Vma13 und Cla4 bzw. Skm1 mittels der Split-Ubiquitin-Technik testen zu können, wurde die gesamte codierende Sequenz von Vma13 in einen Vektor kloniert. Der Vektor codiert für die N-terminale Hälfte von Ubiquitin (*NUB*) und einen daran angeschlossenen *3HA*-Marker. Der konstitutiv aktive Promotor der Alkoholdehydrogenase ermöglicht die Expression des Fusionsproteins, die durch Western-Blot mit  $\alpha$ -HA-Antikörpern kontrolliert werden konnte (Daten nicht gezeigt). Wildtyp-Zellen

wurden zuerst mit einem *NUB-VMA13*-Konstrukt oder dem Leervektor pRS315 transformiert. Danach wurden sie weiter mit dem *CUB-RURA3-CLA4*-Konstrukt, dem *CUB-RURA3-SKM1*-Konstrukt oder einem *CUB-RURA3-STE14*-Konstrukt transformiert, welches als negative Kontrolle diente. Zellen mit pRS315 dienten auch als negative Kontrolle. Interaktionen zwischen *CUB*- und *NUB*-Konstrukt führen zum Abbau des Produktes des *URA3*-Gens, das für die Synthese des Uracil zuständig ist. Somit können Zellen nicht mehr auf Platten ohne Uracil wachsen. Es zeigte sich, dass Cla4 mit Vma13 interagiert (Abbildung 4.3.9 A). Diese Interaktion wurde dann in einer Verdünnungsreihe bestätigt (Abbildung 4.3.9 B).

**A**



**B**



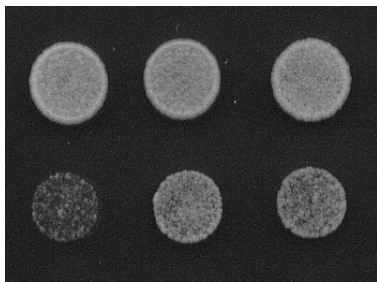
**Abbildung 4.3.9:** Analyse der Interaktion von Vma13 mit Cla4 bzw. Skm1.

(A)  $10^5$  Zellen, die mit den entsprechenden Plasmiden transformiert geworden sind, wurden auf eine -His/-Leu-Platte und eine -His/-Leu/-Ura-Platte pipettiert. Die Platten wurden bei 30°C für zwei Tage inkubiert.

(B) Bestätigung der Interaktion zwischen Cla4 und Vma13. Die Interaktion zwischen Cla4 und Vma13 wurde mit einer Verdünnungsreihe (1:10) genauer analysiert. Die erste Verdünnungsstufe enthielt  $10^5$  Zellen. Es zeigte sich, dass Cla4 mit Vma13 interagiert.

#### 4.3.7 Analyse der genetischen Interaktionen zwischen *VMA13* und *CLA4* bzw. *SKM1*

Da eine genetische Interaktion zwischen *STE20* und *VMA13* gezeigt werden konnte, wurde getestet, ob *CLA4* bzw. *SKM1* auch genetische Interaktion mit *VMA13* zeigten. *VMA13* wurde in einer *skm1Δ*-Mutante oder einer *cla4Δ*-Mutante deletiert. Das Wachstum aller Zellen wurde dann auf einer YPD-Platte analysiert. Es zeigte sich, dass die Doppelmutanten *skm1Δ vma13Δ* und *cla4Δ vma13Δ* schneller als die entsprechenden Einfachmutanten wuchsen (Abbildung 4.3.10). *CLA4* und *SKM1* haben also möglicherweise überlappende Funktionen mit *VMA13*.



Σ1278b	<i>skm1Δ</i>	<i>cla4Δ</i>
<i>vma13Δ</i>	<i>skm1Δ vma13Δ</i>	<i>cla4Δ vma13Δ</i>

Abbildung 4.3.10: Analyse des Wachstums von Mutanten *skm1Δ vma13Δ* und *cla4Δ vma13Δ*.  $10^5$  Zellen der einzelnen Stämme wurden nach der in der Tabelle angegebenen Position auf eine YPD-Platte aufgetragen. Die Platte wurde bei 30°C für 2 Tage inkubiert.

## 5. Diskussion

### 5.1 Regulation der Sterolsynthese und Sterolveresterung durch Ste20 und Cla4

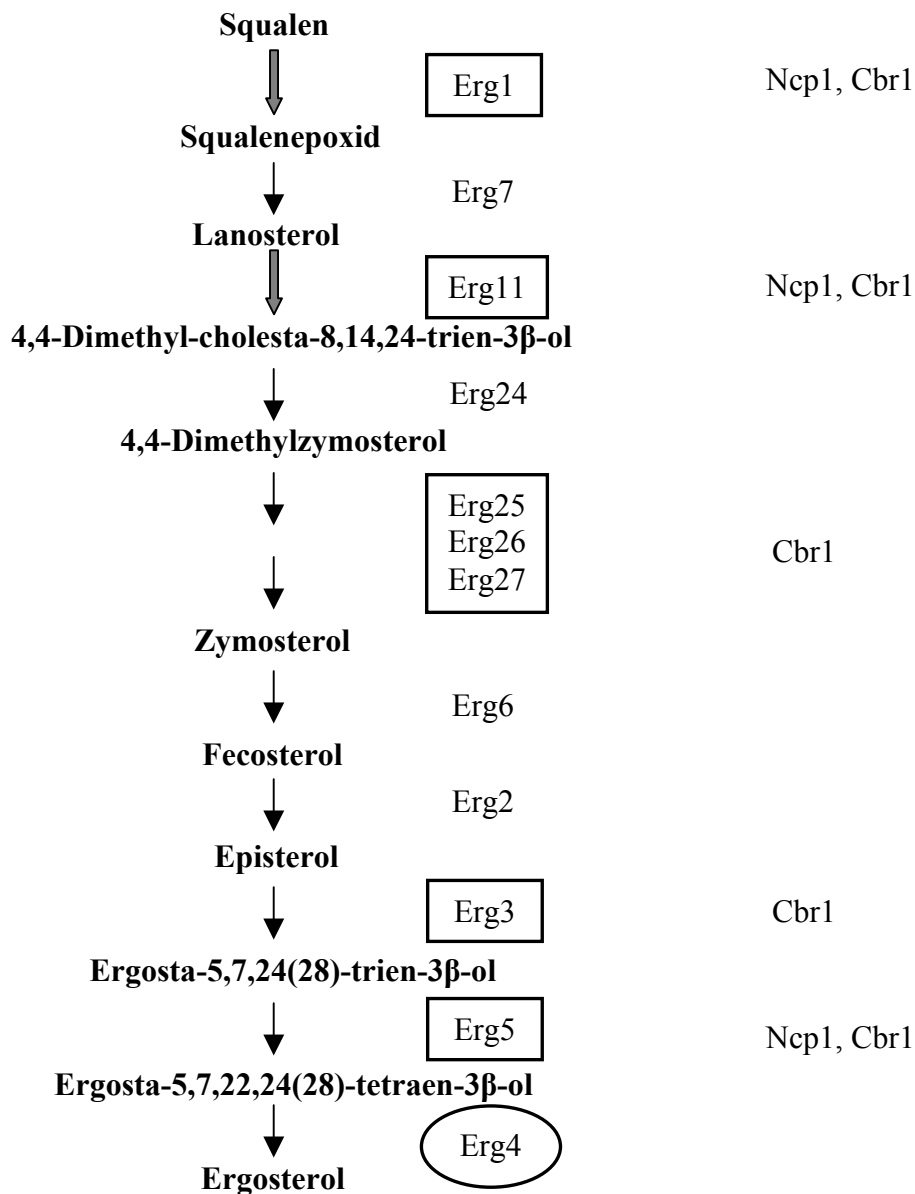
Sterole spielen eine wichtige, aber schlecht definierte Rolle beim polaren Wachstum von Hefen (Tiedje et al., 2007; Bagnat und Simons, 2002; Jin et al., 2007; Kozminski et al., 2006). Zuvor wurde spekuliert, dass die Sterolbiosynthese während des polaren Wachstums zunimmt (Tiedje et al., 2007; Bagnat und Simons, 2002).

Es wurde gezeigt, dass physikalische Interaktionen und genetische Interaktionen zwischen Proteinen, die bei der Sterolbiosynthese eine Rolle spielen, und zwei wichtigen Polaritätsproteinen, nämlich den PAK-Kinasen Ste20 und Cla4, existieren (Tiedje et al., 2007). Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob Ste20 und Cla4 die Sterolbiosynthese beeinflussen können. Die Sterolkonzentration in der *ste20Δ*-Mutante, der *cla4Δ*-Mutante und Zellen, in denen *STE20* oder *CLA4* durch ein Multi-Copy-Plasimid überexprimiert wurden, wurde mittels Gaschromatographie (GLC) und Dünnschichtchromatographie (DC) analysiert. Für die GLC werden Sterolester hydrolysiert und die Ergebnisse repräsentieren die gesamte Sterolmenge. Bei der DC werden freie Sterole von Sterolestern getrennt und separat gemessen. Hierbei kann jedoch nur Ergosterol nachgewiesen werden. Die Konzentration anderer Sterole ist zu gering, um durch die DC detektiert werden zu können. GLC-Analysen zeigten, dass die gesamten Sterolmengen in der *ste20Δ*-Mutante und der *cla4Δ*-Mutante erhöht sind. Ste20 und Cla4 haben also einen negativen Einfluss auf die Sterolbiosynthese. Außerdem sind die Sterolmengen in Zellen nach Überexpression von *STE20* erniedrigt. Dieses Ergebnis spricht auch dafür, dass Ste20 einen negativen Einfluss auf die Sterolbiosynthese hat. Durch die DC konnte gezeigt werden, dass die Mengen des freien Ergosterols, das sich hauptsächlich in der Plasmamembran befindet, in der *ste20Δ*-Mutante und der *cla4Δ*-Mutante ebenfalls erhöht waren. Das Ergebnis der DC bestätigt die hemmende Wirkung von Ste20 und Cla4 auf die Sterolsynthese.

Ste20 interagiert physikalisch mit Erg4, Ncp1 und Cbr1 (Tiedje et al., 2007). Erg4 katalysiert den letzten Schritt der Ergosterolbiosynthese (Lai et al., 1994). Ncp1 und Cbr1 übertragen Elektronen von NADPH bzw. NADH auf viele Enzyme der Ergosterolbiosynthese wie z.B. Erg1, Erg3, Erg5, Erg11 und den Erg25/Erg26/Erg27-Komplex (Reddy et al., 1977; Aoyama et al., 1981; Yoshida 1988; Aoyama et al., 1989; Kelly et al., 1995; Lamb et al., 1999) (Abbildung 5.1).



**Beteiligte Enzyme für den  
Transport von Elektronen**



**Abbildung 5.1:** Der Syntheseweg des Ergosterols. Nur der Teil, der für die Ergosterolbiosynthese spezifisch ist, ist hier gezeigt. Dicke Pfeile kennzeichnen die geschwindigkeitsbestimmenden Schritte. Enzyme, welche Ncp1 und/oder Cbr1 benötigen, sind mit Rechtecken gekennzeichnet. Die Abbildung stammt aus Tiedje et al. (2007).

Da sehr viele Schritte der Ergosterolbiosynthese von Ncp1 und Cbr1 abhängen, sind die beiden Proteine plausible Regulationspunkte des Ergosterolbiosyntheseweges. Ste20 könnte also durch Interaktionen mit Erg4, Ncp1 und Cbr1 als ein negativer Regulator der Ergosterolbiosynthese funktionieren.

Die Tatsache, dass *CLA4* genetische Interaktionen mit *ERG4* und *NCPI* aufweist (Tiedje et al., 2007), deutet darauf hin, dass *CLA4* und die beiden Gene an denselben Prozessen beteiligt

sind. Es ist nicht überraschend, dass sich Sterolmengen in der *cla4Δ*-Mutante vom Wildtyp unterscheiden. Da die Sterolkonzentration in der *cla4Δ*-Mutante erniedrigt ist, könnte Cla4 genau wie Ste20 ein negativer Regulator der Sterolbiosynthese sein. Die Frage, wie Cla4 die Sterolbiosynthese reguliert, ist unklar. Cla4 hat keine physikalischen Interaktionen mit Erg4, Cbr1 und Ncp1 (Lin et al., 2009b).

Da die Polaritätsproteine Ste20 und Cla4 die Ergosterolbiosynthese regulieren, wurde gefragt, welche physiologische Rolle diese Regulation bei der Polarisierung spielt. Die induzierte Ausbildung von Paarungsprojektionen stellt ein einfaches Modell für Zellpolarisierung dar. Nach der induzierten Paarungsreaktion durch Zugabe von  $\alpha$ -Faktor wurde eine Anreicherung von Sterolen in Paarungsprojektionen beobachtet, die durch Filipin-Färbung visualisiert werden konnte (Bagnat und Simons, 2002). Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob diese Anreicherung durch vermehrte Sterolsynthese zustande kommt. In Zellen, die mit  $\alpha$ -Faktor behandelt wurden, wurde keine Zunahme der Sterolmengen beobachtet. Ste20 ist wichtig für den G<sub>1</sub>-Phase-Arrest und die Bildung von Paarungsprojektionen nach Induktion durch Pheromon (Leberer et al., 1992; Ramer und Davis, 1993). Es scheint, dass Cla4 ebenfalls eine Rolle beim Pheromon-induzierten Signalweg spielt (Chasse et al., 2006; Heinrich et al., 2007). Weder Ste20 noch Cla4 scheinen die Sterolbiosynthese während der Paarung zu beeinflussen. Sterole sind allerdings wichtig für die Paarung, da Mutanten mit defekter Sterolbiosynthese mit geringerer Effizienz paaren (Tiedje et al., 2007; Bagnat und Simons, 2002; Jin et al., 2007). Andererseits sind die Sterolpolarisierung und polar lokalisierte Sterole als Anker für polar verteilte Proteine sehr umstritten (Bagnat und Simons, 2002; Jin et al., 2007; Valdez-Taubas und Pelham, 2003; Proszynski et al., 2006). Da Sterolmengen in Zellen nach Zugabe von  $\alpha$ -Faktor keine Zunahme zeigten, wurde die Zunahme von Sterolen durch neue Synthese ausgeschlossen. Eine schnelle Relokalisation oder Polarisierung von bereits synthetisierten Sterolen ist bei der Anreicherung von Sterolen in Paarungsprojektionen während der Paarung denkbar.

Da die Sterolveresterung ebenfalls für die Sterolhomöostase wichtig ist, wurde in dieser Arbeit untersucht, ob Ste20 und Cla4 die Mengen vom Ergosterolester beeinflussen. Die Mengen an Ergosterolester sind in der *cla4Δ*-Mutante höher als im Wildtyp. Die Zunahme der Ergosterolesterkonzentration könnte zwei Ursachen haben. Eine Ursache könnten die erhöhten Mengen von Sterolen, die in der *cla4Δ*-Mutante detektiert wurden, sein. Überschüssige Sterole sind giftig und werden verestert. Eine zweite Ursache könnte die erhöhte Aktivität von Enzymen, welche die Sterolveresterung katalysieren, sein. Tatsächlich ist die Aktivität von Are2, dem Hauptenzym der Sterolveresterung, nach *CLA4*-

Überexpression durch ein Multi-Copy-Plasmid um 50% reduziert (Lin et al., 2009b). Cla4 übt also einen negativen Einfluss auf die Sterolbiosynthese und die Sterolveresterung aus. Möglicherweise liegt Are2 in Zellen im Bezug auf seine Substrate im Überschuss vor. Dadurch würden die Mengen an Ergosterolestern eventuell nicht durch eine erniedrigte Are2-Aktivität in Zellen, die *CLA4* überexprimieren, beeinflusst. Bei der Messung der Ergosterolestermengen wurden Zellen der stationären Phase benutzt. In diesem Fall ist ein Gleichgewicht von freiem Sterol zu Ergosterolestern erreicht. Eventuell könnte man in Zellen der exponentiellen Phase eine Erniedrigung der Ergosterolester beobachten. Außerdem werden Ergosterolesterkonzentrationen auch durch Hydrolasen beeinflusst, deren Aktivität durch die *CLA4*-Überexpression verändert werden könnte. Im Gegensatz zu *CLA4* waren die Mengen an Ergosterolester weder durch die Deletion noch durch Überexpression von *STE20* verändert. Auch die Are2-Aktivität war unverändert.

Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Ste20 mit Are2 und auch mit Are1 in einem Pulldown-Experiment interagiert. Da Are1 und Are2 sehr hydrophob sind und nicht als rekombinante Proteine hergestellt werden können, wurden sie in diesem Pulldown-Experiment in Hefe überexprimiert und als Hefelysate eingesetzt. Es konnte gezeigt werden, dass Serin 175 von Are2 phosphoryliert werden kann (Chi et al., 2007). Das Are2-Fragment von Aminosäure 1 bis 215 enthält keine Transmembrandomäne (Saccharomyces Genome Database) und konnte als ein rekombinantes Protein hergestellt werden. Ein *in vitro* Bindungsexperiment zeigte, dass Ste20 auch mit Are2<sup>1-215</sup> interagiert. Außerdem phosphoryliert Ste20 *in vitro* das Fragment Are2<sup>1-215</sup>. Die Funktion dieser Interaktion und Phosphorylierung ist allerdings unklar.

Weiter konnte gezeigt werden, dass Are1 und Are2 eine Rolle beim apikalen Wachstum von Knospen spielen. Dieses Ergebnis deutet auf Funktionen der Veresterung bei der Zellpolarität hin. Ste20 und Cla4 könnten Zellpolarität durch Modulation der Sterolveresterung regulieren. Da Ste20 und Cla4 die Sterolbiosynthese regulieren und die Sterolbiosynthese für das polare Wachstum von Hefe sehr wichtig ist (Tiedje et al., 2007; Bagnat und Simons, 2002), könnten Ste20 und Cla4 die Zellpolarität auch durch Modulation der Sterolbiosynthese regulieren. Da Sterolbiosynthese und Sterolveresterung wichtig für die Sterolhomöostase sind, kann spekuliert werden, dass die Polaritätsproteine Ste20 und Cla4 das polare Wachstum von Hefezellen auch zumindest teilweise durch Modulation der Sterolhomöostase regulieren können. Es wurde neulich berichtet, dass Tgl4, die Hauptlipase für Triacylglycerole, durch die Cyclin-abhängige Kinase Cdc28 reguliert wird (Kurat et al., 2009). Tgl4 lokalisiert in Lipidpartikeln und mobilisiert dort gespeicherte Lipide je nach Notwendigkeit für die Zelle.

Lipolyse durch die Cdc28-abhängige Regulation hängt somit mit dem Verlauf des Zellzyklus zusammen, wie z.B. dem Wachstum von Knospen. Möglicherweise wird die Konzentration von Sterolen während der Knospung und des Zellwachstums in einer ähnlichen Weise durch Ste20 und Cla4 reguliert.

## **5.2 Regulation der Sterolaufnahme durch die PAK-Kinasen Ste20, Cla4 und Skm1**

### **5.2.1 Ste20, Cla4 und Skm1 interagieren mit Sut1**

Hefe besitzt drei PAK-Kinasen: Ste20, Cla4 und Skm1. Sie spielen wichtige Rollen beim polaren Zellwachstum (Hofmann et al., 2004). In einem Screen der Arbeitsgruppe wurde der Transkriptionsfaktor Sut1 als ein Interaktor von Ste20 identifiziert. Sut1 ist ein Zink-Cluster-Protein der Zn[II]<sub>2</sub>-Cys<sub>6</sub>-Familie und reguliert die Sterolaufnahme (Ness et al., 2001). Diese Interaktion wurde durch Pulldown-Experimente bestätigt (Lin et al., 2009a). In dieser Arbeit wurde Sut1 als rekombinantes His<sub>6</sub>-Fusionsprotein hergestellt, das in einem Pulldown-Experiment sowohl an 3HA-Cla4 als auch an 3HA-Skm1 bindet. Weder 3HA-Cla4 noch 3HA-Skm1 binden an das Fusionsprotein His<sub>6</sub>-Sec6<sup>427-806</sup> (Lin et al., 2009a), das als Negativkontrolle diente. Cla4 und Skm1 interagieren also genau wie Ste20 spezifisch mit Sut1.

### **5.2.2 Ste20, Cla4 und Skm1 lokalisieren im Zellkern**

Der Transkriptionsfaktor Sut1 lokalisiert nur im Zellkern (Ness et al., 2001). Bis zum Zeitpunkt dieser Arbeit wurde nur von einer Lokalisation von Ste20 und Cla4 an der Plasmamembran an Stellen polaren Wachstums und im Cytoplasma berichtet, während die Lokalisation von Skm1 unbekannt ist (Peter et al., 1996; Leberer et al., 1997; Holly und Blumer, 1999; Martin et al., 1997). Da Sut1 nur im Zellkern vorkommt, stellt sich die Frage, ob PAK-Kinasen auch im Zellkern lokalisieren können. Eine Co-Lokalisation von zwei Proteinen ermöglicht ihre direkte Interaktion. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Skm1 im Zellkern sehr stark angereichert ist. Da die Expression von Skm1 unter dem eigenen Promotor mikroskopisch nicht sichtbar war, wurde hier GFP-Skm1 unter Kontrolle des induzierbaren *Gall*-Promotors exprimiert. In dieser Arbeit wurde eine putative zweiteilige NLS-Sequenz von Skm1 identifiziert: <sup>213</sup>KRTNSIKRSVSRTLRKGK<sup>230</sup>. Eine solche zweiteilige NLS-

Sequenz wird definiert als zwei benachbarte basische Aminosäuren (K oder R), gefolgt von 10 beliebigen Aminosäuren als "Spacer" und darauf folgend mindestens 3 basische Aminosäuren an den ersten 5 Stellen hinter diesem "Spacer" (Robbins und Dingwall, 1991). Bei Skm1 ist der "Spacer" 11 statt 10 Aminosäuren lang. Diese NLS-Sequenz entspricht also nicht exakt der Consensus-Sequenz, ist aber sehr ähnlich. Die putative NLS-Sequenz von Skm1 wurde funktionell getestet. Durch Deletion oder Mutation dieser NLS-Sequenz ist Skm1 wenig oder nicht mehr im Zellkern angereichert. Außerdem lokalisiert das Fragment Skm1<sup>200-230</sup>, welches die NLS-Sequenz von der Aminosäure 213 bis 230 enthält, ausschließlich im Zellkern. Die NLS-Sequenz ist also funktionsfähig und unentbehrlich für die Kernlokalisierung von Skm1.

In dieser Arbeit wurde auch eine putative zweiteilige NLS-Sequenz von Ste20 entdeckt: <sup>272</sup>KKQTEKSYSSSSKKKRK<sup>288</sup>. In diesem Fall besteht der "Spacer" aus 10 Aminosäuren. Das NLS-GFP-Fusionsprotein liegt nur im Zellkern vor. GFP-Ste20 ohne NLS wurde nicht mehr im Zellkern gefunden. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass zumindest ein gewisser Anteil vom Wildtyp-Ste20 im Zellkern vorkommt. Tatsächlich wurden einige Zellen mit schwacher Anreicherung von GFP-Ste20 im Zellkern beobachtet. Eine eindeutige NLS-Sequenz wurde für Cla4 nicht identifiziert. Es wurden deshalb verschiedene GFP-Fusionsproteine aus Cla4-Fragmenten ohne die PH-Domäne hergestellt und ihre Lokalisation analysiert. Die PH-Domäne spielt eine wichtige Rolle für die Membranassoziation von Proteinen durch ihre Interaktion mit Phosphoinositiden. Es konnte gezeigt werden, dass einige dieser Fragmente im Kern lokalisieren. Das Fragment Cla4<sup>450-550</sup> ist das kleinste Fragment, welches noch vollständig im Zellkern vorkommt. Diese Sequenz enthält zwar keine putative NLS-Sequenz, ist aber anscheinend trotzdem wichtig für die Kernlokalisierung von Cla4. Wie gelangt Cla4 in den Zellkern? Eine Möglichkeit ist durch den indirekten Transport. Mit der Hilfe eines anderen Proteins, das in den Kern transportiert wird, könnte Cla4 in den Kern mittransportiert werden. Eine andere Möglichkeit ist, dass Cla4 eine NLS-Sequenz enthält, die noch nicht gut charakterisiert ist. Außer der klassischen einteiligen und zweiteiligen NLS-Sequenz gibt es z.B. das M9-NLS, das virale NLS und das ribosomale NLS, welche ebenfalls als Kernlokalisierungssignale fungieren können (Macara, 2001). Da alle drei PAKs im Zellkern vorliegen, können sie dort mit Sut1 interagieren, welches als Transkriptionsfaktor nur im Kern lokalisiert.

### 5.2.3 PAKs regulieren sowohl die Expression von Genen, die eine Rolle bei der Sterolaufnahme spielen, als auch die Sterolaufnahme

Die Expression von Genen wie z.B. *AUS1*, *DANI* und *PDR11*, die für die Sterolaufnahme verantwortlich sind, wird unter aeroben Bedingungen unterdrückt. Deswegen findet eine Sterolaufnahme normalerweise nur unter anaeroben Bedingungen statt. Unter anaeroben Bedingungen ermöglichen Transkriptionsfaktoren wie z.B. Sut1 und Upc2 die Expression von Genen, welche für die Sterolaufnahme wichtig sind (Regnacq et al., 2001; Wilcox et al., 2002; Alimardani et al., 2004). PAKs interagieren mit Sut1 und dementsprechend regulieren sie die Expression von Genen für die Sterolaufnahme (Lin et al., 2009a). Interessant ist, dass PAKs unterschiedliche Spezifitäten bei der Regulation zeigen. Während Ste20 die Expression von *AUS1* und *DANI* reguliert, kontrolliert Skm1 die Expression von *AUS1* und *PDR11* und Cla4 die Expression von *AUS1*, *DANI* und *PDR11* herunter (Lin et al., 2009a). Es ist allerdings nicht klar, warum PAKs diese Spezifität zeigen. Es konnte beispielhaft gezeigt werden, dass die Regulation der Expression von *AUS1* durch Ste20 und der Expression von *PDR11* durch Skm1 von der Kernlokalisierung der entsprechenden PAKs abhängig ist. Sowohl Ste20<sup>ΔNLS</sup> als auch Skm1<sup>ΔNLS</sup> sind nicht mehr in der Lage, die Expression der entsprechenden Gene zu regulieren (Lin et al., 2009a). Dies spricht auch dafür, dass PAKs im Zellkern mit Sut1 interagieren und dadurch die Expression von Genen, bei der Sut1 eine Rolle spielt, umgehend regulieren. Da PAKs die Expression von *AUS1* in der *sut1Δ*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp nur noch geringfügig beeinflussen können (Lin et al., 2009a), kann daraus geschlossen werden, dass PAKs die Expression von *AUS1* und eventuell anderer Gene, die an der Sterolaufnahme beteiligt sind, hauptsächlich durch Sut1 beeinflussen können. PAKs könnten auch über andere Transkriptionsfaktoren wie z.B. Upc2 und Ecm22 (Shianna et al., 2001) die Expression von *AUS1* in der *sut1Δ*-Mutante beeinflussen. In der Tat regulieren Cla4 und Skm1 die Expression von *PDR11* (Lin et al., 2009a), welches das Zielgen des Transkriptionsfaktors Upc2 ist.

Es konnte weiter gezeigt werden, dass die Sterolaufnahme in den *ste20Δ*-, *cla4Δ*- und *skm1Δ*-Mutanten zunimmt (Lin et al., 2009a). Außerdem nehmen Zellen nach PAK-Überexpression weniger Sterol auf (Lin et al., 2009a). Diese Ergebnisse stimmen mit der Regulation der Expression von Genen durch PAKs überein.

Bisher ist nur sehr wenig über die Mechanismen der Sterolaufnahme bekannt. Es scheint möglich, dass die Transkriptionsfaktoren überlappende Funktionen im Bezug auf die Sterolaufnahme besitzen. Aber man weiß nicht, wie Sut1 die Expression von *AUS1* und *DANI* hochreguliert. Noch weniger ist über Ecm22 bekannt. Deswegen ist es schwierig,

Mechanismen der Inhibition von Sut1 und anderen Transkriptionsfaktoren durch PAKs zu verstehen. Es konnte gezeigt werden, dass die Regulation der *AUS1*-Expression von der Ste20-Kinaseaktivität abhängig ist (Lin et al., 2009a). Eine Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors Sut1 durch PAKs konnte weder *in vivo* noch *in vitro* bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Da alle PAKs mit Sut1 interagieren, alle PAKs die Expression von Sut1-Zielgenen regulieren und keine der PAKs Sut1 phosphorylieren, könnte es sein, dass PAKs Sut1 indirekt regulieren. Es ist durchaus vorstellbar, dass PAKs zuerst ein Protein phosphorylieren und aktivieren. Dieses hypothetische Protein könnte dann den Transkriptionsfaktor Sut1 regulieren (Abbildung 5.2).

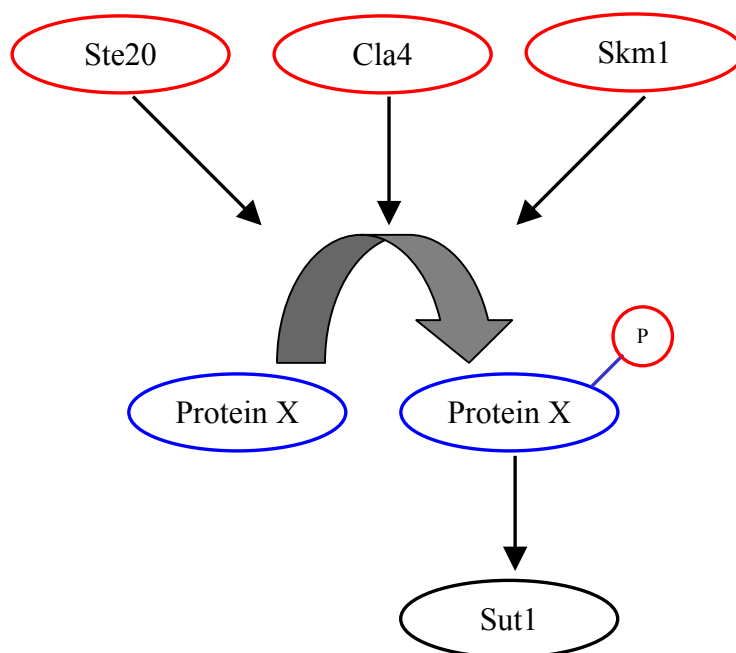
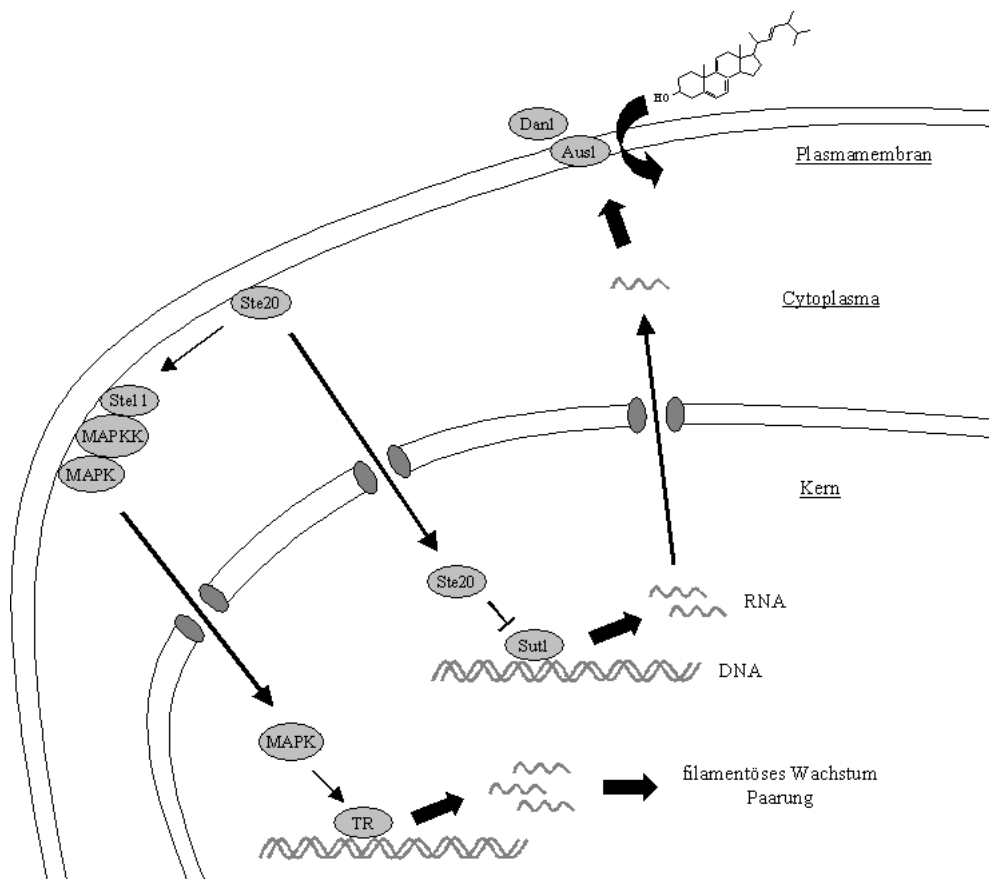


Abbildung 5.2: Ein möglicher Mechanismus der Regulation von Sut1 durch PAKs. PAKs könnten ein Protein phosphorylieren, das Sut1 regulieren könnte.

#### 5.2.4 Die Regulation der Expression von Genen für die Sterolaufnahme durch Ste20 hängt nicht von dem MAPK-Signalweg ab

Als MAPKKKK phosphoryliert Ste20 die MAPKKK Ste11 während der Paarung und des filamentösen Wachstums und auch als Antwort auf erhöhten osmotischen Druck. Diese Phosphorylierung führt letztendlich zur Expression einer Reihe von Genen (Roberts and Fink, 1994; Wu et al., 1995; O'Rourke and Herskowitz, 1998; Raitt et al., 2000). Die durch Ste20 regulierte Expression von Genen für Sterolaufnahme hängt nicht von dieser Phosphorylierung ab, da die durch Überexpression von *STE20* regulierte Expression von *AUS1* in der *ste11Δ*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp keinen Unterschied zeigt (Lin et al., 2009a). Auf der

anderen Seite sind MAPK-Signalwege zumindest für die Paarung und das filamentöse Wachstum nicht von der Kernlokalisierung von Ste20 abhängig, da Ste20<sup>ΔNLS</sup> eine vergleichbare Funktion wie Ste20 bei der Paarung und dem filamentösen Wachstum besitzt. Es kann daraus geschlossen werden, dass die Regulation der Expression von Genen für die Sterolaufnahme durch Ste20 und die Regulation von MAPK-Signalwegen durch Ste20 zwei unabhängige Signalwege sind (Abbildung 5.3).



**Abbildung 5.3:** Regulation der Genexpression durch Ste20. Der MAPK-Signalweg ist nicht von der Kernlokalisierung von Ste20 abhängig. Die Expression von Genen für die Sterolaufnahme wird durch die Interaktion zwischen Ste20 und Sut1 im Kern reguliert.

Im Fall der MAPK-Signalwege wird Ste20 an der Plasmamembran aktiviert. Ste20 phosphoryliert und aktiviert Ste11, die wiederum eine MAPKK stimuliert, die weiter eine MAPK aktivieren kann. Die MAPK kann in den Zellkern transportiert werden und dort die Expression von Genen einschalten, die für das polare Wachstum wichtig sind. In einem anderen Fall kann Ste20 nach einer unbekanntem Modifikation selbst in den Zellkern transportiert werden. Dort kann Ste20 mit dem Transkriptionsfaktor Sut1 interagieren und dieser wiederum die Expression einer Reihe von Genen für die Sterolaufnahme regulieren.

Mutanten mit gleichzeitiger Deletion von *STE20* und *CLA4* sind nicht lebensfähig. Wird *STE20* unter Kontrolle des eigenen Promotors in die *ste20Δ cla4Δ*-Mutante eingebracht,



wachsen diese Zellen wie der Wildtyp. Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass *STE20<sup>ANLS</sup>* ähnlich wie *STE20* den Defekt der *ste20Δ cla4Δ*-Mutante komplementiert. Allerdings wurde dieses Experiment unter aeroben Bedingungen durchgeführt. Es könnte sein, dass unter anaeroben Bedingungen *STE20<sup>ANLS</sup>* das Wachstum von *ste20Δ cla4Δ*-Mutanten nicht wiederherstellen kann.

Es wurde berichtet, dass Ste20 eine Rolle bei Wasserstoffperoxid-induzierter Apoptose spielt. Dabei lokalisiert Ste20 nach Behandlung mit Wasserstoffperoxid im Zellkern und phosphoryliert das Histon H2B. Diese Phosphorylierung verursacht dann Apoptose (Ahn et al., 2005). Es wurde aber nicht untersucht, ob Ste20 auch die Genexpression reguliert. Es muss noch herausgefunden werden, wie die Zellen unterschiedliche Funktionen von Ste20 in Zellkernen regulieren können.

### **5.3 PAKs regulieren die Zellpolarität auch durch die Regulation der Sterolhomöostase**

Sterolhomöostase ist wichtig für Zellen und wird durch viele Prozesse reguliert. Dies sind die Sterolsynthese unter aeroben Bedingungen, der intrazelluläre Steroltransport, die Sterolspeicherung als Sterolester, die Hydrolyse von Sterolestern und die Sterolaufnahme unter anaeroben Bedingungen (Sturley, 2000).

Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass PAKs die Sterolhomöostase auf mehreren Ebenen regulieren. Ste20 und Cla4 modulieren die Sterolsynthese und Cla4 reguliert die Sterolveresterung. Außerdem kontrollieren Ste20, Cla4 und Skm1 die Sterolaufnahme. Es kann somit spekuliert werden, dass PAKs eine wichtige Rolle bei der Regulation der Sterolhomöostase spielen.

Sterole spielen eine wichtige Rolle bei der Zellpolarität. Hefezellen haben Defekte bei der Bildung einer Paarungsprojektion und haben weniger effektive Paarung, wenn Defekte der Sterolbiosynthese vorliegen (Tiedje et al, 2007; Bagnat und Simons, 2002; Jin et al., 2007). Es wurde vorgeschlagen, dass die Plasmamembran aus unterschiedlichen Mikrodomänen besteht. Manche Mikrodomänen enthalten angereicherte Sterole und Sphingolipide und werden als "Lipid Rafts" bezeichnet (Rajendran und Simons, 2005). Viele Proteine der Zellpolarität interagieren mit Lipiden der Plasmamembran. Lipid Rafts sind daher besonders geeignet für diese Interaktion und könnten als Anker für Proteine dienen. Bei der Bildung einer Paarungsprojektion werden Lipide an der Spitze dieser Projektionen angereichert (Bagnat und Simons, 2002). Da sich Proteine für die Polarisierung in diesem Fall ebenfalls in den

Paarungsprojektionen konzentrieren, wurde spekuliert, dass Lipid Rafts für diese Anreicherung von Proteinen verantwortlich sind und eine wichtige Rolle bei der Zellpolarität spielen. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass PAKs die Sterolhomöostase beeinflussen können. Die Sterolhomöostase ist wahrscheinlich wichtig für die Bildung von Lipid Rafts. Deswegen könnten PAKs Zellpolarität durch die Regulation der Sterolhomöostase beeinflussen.

Es wurde auch gezeigt, dass Endocytose wichtig für die polare Lokalisation von Proteinen ist. In Endocytose-Mutanten können sich eigentlich polar verteilte Proteine nicht mehr in den Paarungsprojektionen konzentrieren (Valdez-Taubas und Pelham, 2003). Sterole spielen eine wichtige Rolle bei der Endocytose (Pichler und Riezman, 2004). PAKs könnten also indirekt über die Sterolhomöostase und die Endocytose die Zellpolarisierung beeinflussen. Wahrscheinlich ist die polare Lokalisation von Proteinen ein sehr komplexer Prozess, an dem zumindest sowohl Lipid Rafts als auch Endocytose beteiligt sind.

## **5.4 Ste20 reguliert die Aktivität der V-ATPase**

### **5.4.1 Ste20 interagiert mit Vma13**

Mit Hilfe eines Split-Ubiquitin-Screens wurde in der Arbeitsgruppe Vma13 als ein Interaktor von Ste20 identifiziert. Mit einem Pulldown-Experiment konnte weiter bestätigt werden, dass Ste20 mit Vma13 interagiert (P. Kane, persönliche Mitteilung).

Es wurde berichtet, dass das Wachstum von *vma13Δ*-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp verlangsamt ist (Ho et al., 1993). Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die zusätzliche Deletion von *STE20* in *vma13Δ*-Mutanten das Wachstum weiter verlangsamt. Diese genetische Interaktion zwischen *STE20* und *VMA13* deutet darauf hin, dass Ste20 und Vma13 an gleichen Signalwegen beteiligt sein könnten. Interessant ist, dass *VMA13* keine genetischen Interaktionen mit *STE11* und *STE7* zeigte. Ste11 ist eine MAPK Kinase und Ste7 ist eine MAPK des MAPK-Signalwegs, der von Ste20 aktiviert wird. Die genetische Interaktion zwischen *STE20* und *VMA13* ist deswegen spezifisch.

### **5.4.2 Hyperinvasives Wachstum von *vma13Δ*-Mutanten**

Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass *vma13Δ*-Mutanten ein verstärkt invasives Wachstum im Vergleich zum Wildtyp aufweisen. In der Tat wurde dieser Phänotyp nicht nur

bei der *vma13Δ*-Mutante, sondern auch bei der *vma2Δ*-Mutante und der *vma3Δ*-Mutante beobachtet. Vma2 und Vma3 gehören jeweils zur  $V_1$ -Domäne und  $V_0$ -Domäne der V-ATPase. Da die Deletion einer beliebigen Untereinheit der V-ATPase eine funktionsunfähige V-ATPase verursacht (Kane, 2006), kann spekuliert werden, dass dieses hyperinvasive Wachstum durch eine defekte V-ATPase verursacht wurde. In Vakuolen werden Nährstoffe aufgenommen, gespeichert und bei Bedarf wieder mobilisiert. Der pH-Gradient der Vakuole ist wichtig für sowohl die Aufnahme als auch die Mobilisierung (Li und Kane, 2009; Ruzznak et al., 2001). Bei einer funktionsunfähigen V-ATPase resultiert daraus wahrscheinlich eine Störung der Speicherung und Mobilisierung von Nährstoffen in Vakuolen (Shimazu et al., 2005). Die Mutanten könnten dieses Signal wahrnehmen und versuchen durch das hyperinvasive Wachstum mehr Nährstoffe aufzunehmen. Tatsächlich ist diese Speicherung und Mobilisierung von Nährstoffen notwendig für hyperinvasives Wachstum, wenn die *vma13Δ*-Mutante auf Platten ohne Glukose wachsen. Hier fehlt den Mutanten die notwendige Energie, die weder durch Aufnahme noch durch Mobilisierung von eigenen Nährstoffen zur Verfügung steht. Dementsprechend wachsen *vma13Δ*-Mutanten auf Platten ohne Glukose nicht.

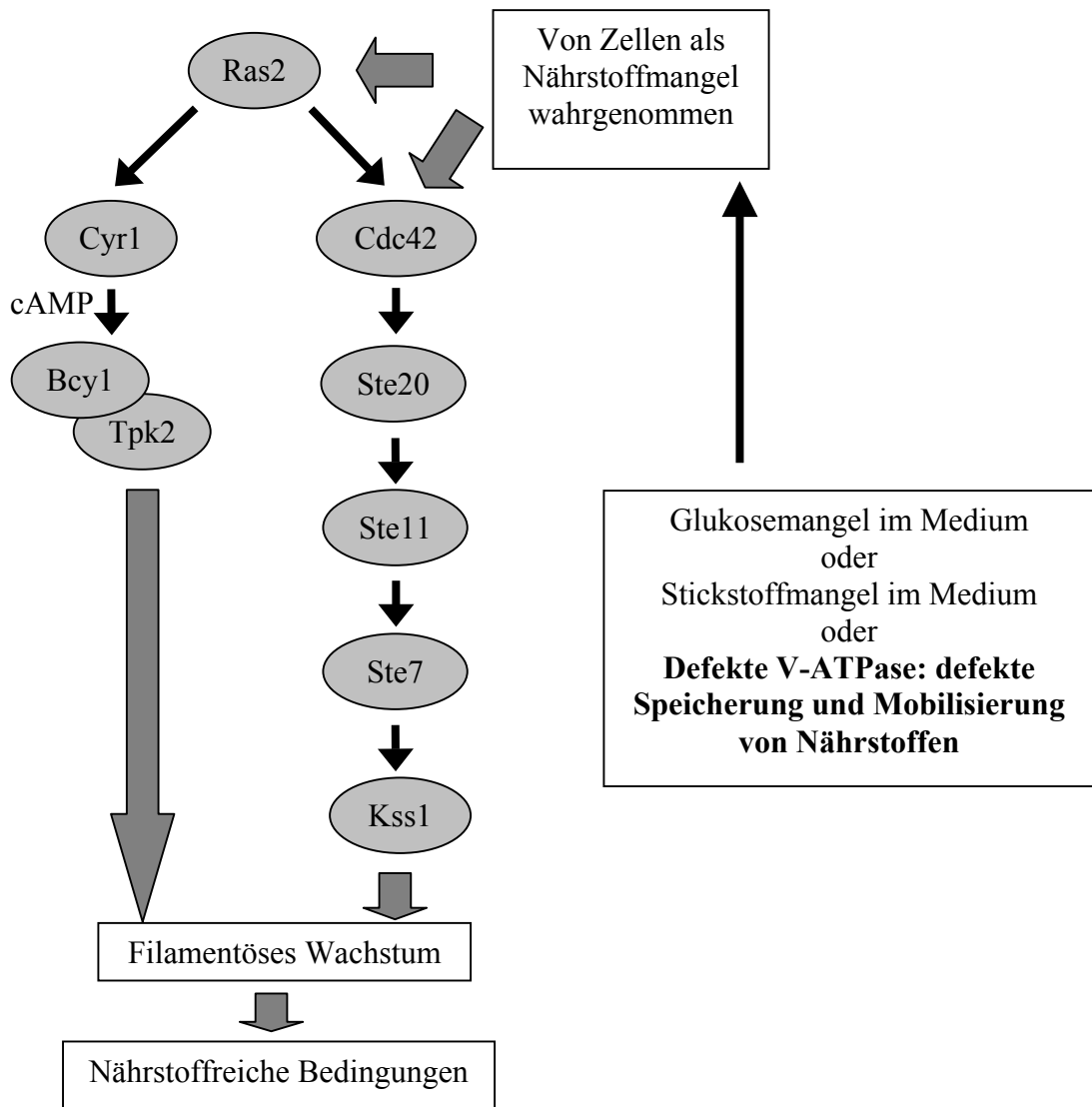
Kürzlich wurde berichtet, dass das humane XMEA („X-linked myopathy with excessive autophagy“) Syndrom aufgrund einer defekten V-ATPase entsteht (Ramachandran et al., 2009). Diese defekte V-ATPase verursacht erhöhte pH-Werte in Lysosomen, was wiederum zum reduzierten Abbau von Proteinen führt. Da Zellen freie Aminosäure nicht durch den Abbau von Proteinen generieren können, befinden sich diese Zellen somit in einem Zustand mit Aminosäuremangel. Zellen müssen dann verstärkt extrazelluläre Aminosäuren aufnehmen. Der mTOR-Signalweg wird stimuliert und dies führt zur Entstehung von großen und ineffektiven Autolysosomen. In einer ähnlichen Weise induziert eine reduzierte lysosomale Proteolyse durch Leupeptin auch die Vakuolenbildung durch Autophagie (Ramachandran et al., 2009). Es zeigt sich, dass Zellen durch verstärkte Aufnahme von Nährstoffen versuchen, den Nährstoffmangel, welcher durch reduzierte oder fehlende V-ATPase hervorgerufen werden, zu beseitigen. Diese Strategie scheint also eine allgemeine Eigenschaft von eukaryotischen Zellen zu sein.

Es ist allerdings unklar, wie das Signal der defekten Speicherung und Mobilisierung von Mutanten wahrgenommen wird. Eine direkte Konsequenz der defekten V-ATPase ist eine Veränderung der pH-Werte sowohl in Vakuolen als auch im Cytosol (Martinez-Munoz und Kane, 2008). Es sind möglicherweise intrazelluläre Proteine, welche die Veränderung der pH-

Werte wahrnehmen und das Signal weiter auf Signalwege des invasiven Wachstums übertragen.

### 5.4.3 Das hyperinvasive Wachstum der *vma13Δ*-Mutante hängt sowohl von dem MAPK-Signalweg mit Ste20 als auch von dem cAMP-PKA-Signalweg mit Tpk2 ab

Hefezellen zeigen invasives Wachstum durch zumindest zwei wichtige Signalwege: der Ste20 induzierte MAPK-Signalweg und der cAMP-PKA-Signalweg, wobei Tpk2 eine wichtige Rolle spielt. (Abbildung 5.4).



**Abbildung 5.4:** Das hyperinvasive Wachstum ausgelöst durch eine defekte V-ATPase. Das verstärkte invasive Wachstum von Mutanten mit der defekten V-ATPase ist mit der eigenen Unfähigkeit, Nährstoffe zu speichern und zu mobilisieren erklärbar. Diese Unfähigkeit wird als Nährstoffmangel von den Mutanten wahrgenommen. Das verstärkte invasive Wachstum wird durch den cAMP-PKA-Signalweg und den MAPK-Signalweg ausgelöst.

Zellen mit deletiertem *STE20* oder *TPK2* zeigen viel weniger invasives Wachstum als der Wildtyp (Roberts and Fink, 1994; Mösch et al. 1996; Pan und Heitman, 1999). Da die *ste20Δ vma13Δ*-Mutante und die *tpk2Δ vma13Δ*-Mutante stärkeres invasives Wachstum als die entsprechenden Einfachmutanten (*ste20Δ* und *tpk2Δ*) zeigen, kann spekuliert werden, dass die Doppelmutanten jeweils durch den cAMP-PKA-Signalweg und den MAPK-Signalweg ihr invasives Wachstum verstärken. Die Tatsache, dass das invasive Wachstum bei *ste20Δ tpk2Δ vma13Δ*-Mutanten ausgeblieben ist, bestätigt diese Spekulation. Allerdings ist unklar, wie diese Wege aktiviert werden.

#### 5.4.4 Regulation der Aktivität der V-ATPase durch Ste20

Die Phosphorylierung der MAPK Kinase Kinase Ste11 ist die einzige bisher beschriebene Funktion von Ste20 beim filamentösen Wachstum. Ste11 phosphoryliert wiederum Ste7, eine MAPK Kinase (Liu et al., 1993; Roberts und Fink, 1994; Wu et al., 1995). Es konnte gezeigt werden, dass die *ste20Δ*-Mutante viel weniger invasives Wachstum als die *ste11Δ*-Mutante oder die *ste7Δ*-Mutante zeigt (T. Höfken, persönliche Mitteilung). Ste20, Ste11 und Ste7 sind auch an der Paarung beteiligt (Dohlman und Thorner, 2001). Im Gegensatz zum filamentösen Wachstum sind für die Paarung alle drei Gene notwendig (T. Höfken, persönliche Mitteilung). Während kein paralleler Signalweg zum Ste20-Ste11-Ste7-Signalweg bei der Paarung besteht, kann spekuliert werden, dass Ste20 beim invasiven Wachstum noch andere Signalwege parallel zum Ste20-Ste11-Ste7-Signalweg regulieren kann.

Es konnte *in vitro* gezeigt werden, dass sich die Aktivität der V-ATPase in *ste20Δ*-Mutanten erniedrigt (P. Kane, persönliche Mitteilung). Außerdem erhöht sich die Aktivität der V-ATPase nach Überexpression von *STE20* durch ein Multi-Copy-Plasmid. Es konnte *in vivo* weiter gezeigt werden, dass der pH-Wert der Vakuolen in Zellen mit deletiertem *STE20* nicht mehr gehalten werden kann (P. Kane, persönliche Mitteilung). Da der pH-Wert in den Vakuolen hauptsächlich durch die V-ATPase reguliert wird (Kane, 2006), kann spekuliert werden, dass Ste20 ein positiver Regulator der V-ATPase ist. Ste20 könnte dann durch die Regulation der Aktivität der V-ATPase den pH-Wert der Vakuolen regulieren, was wiederum für die Mobilisierung von Nährstoffen aus Vakuolen wichtig ist. Beim Nährstoffmangel hat Ste20 dann zwei Möglichkeiten, um ausreichend Nährstoffe zu erhalten. Eine Möglichkeit ist die Aktivierung des Ste11-Ste7-Kss1-Signalwegs und die andere ist die Mobilisierung von Nährstoffen aus Vakuolen (Abbildung 5.5).

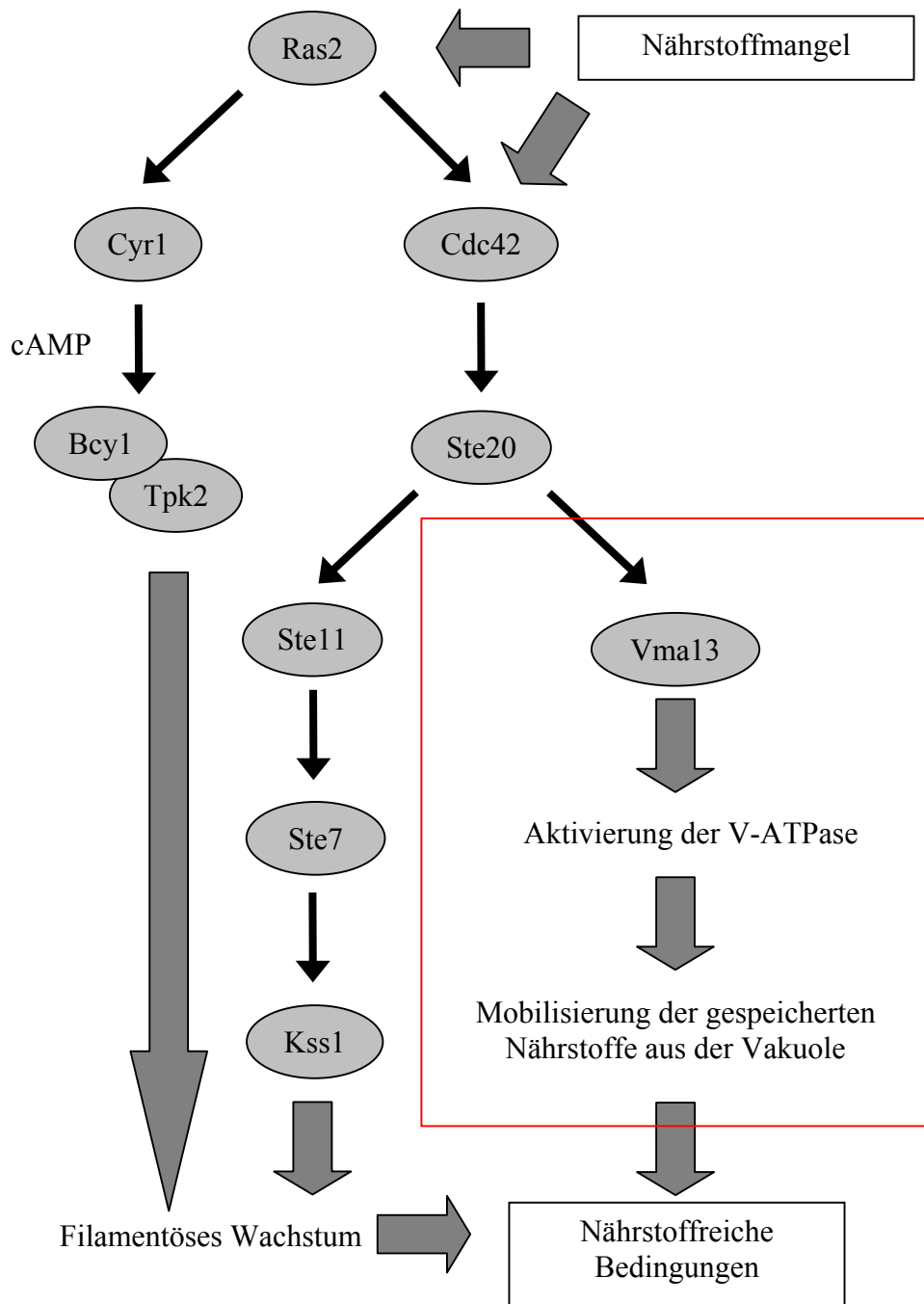


Abbildung 5.5: Verstärkte Mobilisierung von Nährstoffen aus Vakuolen durch Ste20. Um nährstoffreiche Bedingungen zu erreichen, kann Ste20 nicht nur das filamentöse Wachstum aktivieren, sondern auch die Mobilisierung von Nährstoffen aus Vakuolen durch die V-ATPase verstärken. Vma13 ist ein möglicher Regulationspunkt von Ste20. Die neue Funktion von Ste20 ist durch ein rotes Rechteck gekennzeichnet.

In der Tat ist die V-ATPase im Wildtyp nicht optimal gekoppelt. Mutationen einiger Untereinheiten der V-ATPase resultieren sogar in einer erhöhten V-ATPase-Aktivität (Shao et al., 2003; Owegi, et al., 2006). Deswegen ist es denkbar, dass Ste20 die Aktivität der V-ATPase durch Vma13 reguliert. Eine erhöhte Aktivität der V-ATPase resultiert vermutlich in einer besseren Mobilisierung von Nährstoffen.

Es wurde berichtet, dass haploide Hefezellen auf Platten ohne Glukose ihr invasives Wachstum verstärken (Cullen und Sprague, 2000). Unter dieser Bedingung wird erwartet, dass die V-ATPase aktiviert wird und dadurch die Mobilisierung von Nährstoffen aus Vakuolen verstärkt wird. Es ist aber auch bekannt, dass die V-ATPase nach Entzug von Glukose sofort in  $V_1$ - und  $V_0$ -Untereinheit zerfällt (Kane, 1995). Es muss aber erwähnt werden, dass der Zerfall von V-ATPase nach Entzug von Glukose im flüssigen Medium beobachtet wurde. Wahrscheinlich ist die Aktivierung oder Inaktivierung der V-ATPase für die entsprechende Bedingung vorteilhaft. Zellen auf Platten ohne Glukose zeigen noch invasives Wachstum durch die Unterstützung eigener mobilisierter Nährstoffe, da sie die Möglichkeit haben, weitere Nährstoffe zu finden. Im flüssigen Medium ohne Glukose ist der Zerfall der V-ATPase vorteilhaft, um Energie zu sparen. In beiden Fällen werden wahrscheinlich unterschiedliche Signalwege ausgelöst. Das Verhalten von Hefezellen hängt also nicht nur von Nährstoffen, sondern sehr wahrscheinlich auch von der Konsistenz des Mediums ab.

Vma13 ist ein wichtiger Aktivator der V-ATPase. In *vma13* $\Delta$ -Mutanten sind andere Untereinheiten der V-ATPase assembliert in der Membran der Vakuolen zu detektieren. Allerdings sind diese V-ATPasen inaktiv (Ho et al., 1993). Dies deutet auf eine Funktion von Vma13 als Aktivator der V-ATPase hin. Ste20 könnte die Aktivität der V-ATPase durch die Interaktion mit Vma13 regulieren. Es ist jedoch unklar, wie Ste20 die Aktivität der V-ATPase durch Vma13 reguliert. Sicher ist, dass Ste20 die Aktivität der V-ATPase nicht durch die Regulation der Assemblierung der V-ATPasen in der Membran der Vakuole beeinflussen kann (P. Kane, persönliche Mitteilung). Ste20 ist eine Kinase, aber eine Phosphorylierung von Vma13 durch Ste20 wurde weder *in vitro* noch *in vivo* beobachtet (Daten nicht gezeigt). Die V-ATPase ist ein großer Multiprotein-Komplex. Es kann daher sein, dass Vma13 lediglich eine Bindungsstelle für Ste20 ist und Ste20 andere Einheiten der V-ATPase phosphoryliert. Es könnte auch sein, dass Ste20 Vma13 durch ein anderes Protein indirekt reguliert.

#### 5.4.5 Regulation der V-ATPase durch Tpk2, Skm1 und Cla4

Es wurde bereits erwähnt, dass der cAMP-PKA-Signalweg in der *vma13Δ*-Mutante zusätzlich zum MAPK-Signalweg aktiviert wird. Es ist interessant, dass der cAMP-PKA-Signalweg außer seiner Funktion beim filamentösen Wachstum noch an der Regulation des Zusammenbaus der V-ATPase beteiligt ist. Es wurde berichtet, dass aktiviertes Ras2 oder PKA die Dissoziation der V-ATPase nach Entzug von Glukose verhindert. Dies führt vermutlich zur erhöhten Aktivität der V-ATPase (Bond und Forgac, 2008). In Insektenzellen wurde beobachtet, dass die Untereinheit C der V-ATPase (Vma5 in Hefe) durch PKA phosphoryliert wird. Diese Untereinheit C spielt eine wichtige Rolle beim Aufbau der V-ATPase (Voss et al., 2007). Es kann daher spekuliert werden, dass Ste20 und der PKA-Signalweg sowohl filamentöses Wachstum als auch die Aktivität der V-ATPase regulieren können.

Die *tpk2Δ vma13Δ*-Mutante wächst besser als die *vma13Δ*-Mutante. Während die *vma13Δ*-Mutante kein Wachstum auf Platten mit pH 7,5 und 60 mM CaCl<sub>2</sub> zeigte, wurde Wachstum der *vma13Δ tpk2Δ*-Mutante unter diesen Bedingungen beobachtet. Die Deletion von *CLA4* oder *SKM1*, die wie *STE20* zu den PAKs gehören, in der *vma13Δ*-Mutante führte zum verbesserten Wachstum. In der *vma13Δ*-Mutante verliert die V-ATPase ihre Funktion. Eine Ansäuerung von Vakuolen durch die V-ATPase ist dann unmöglich. Da die zusätzliche Deletion von *TPK2*, *CLA4* oder *SKM1* das Wachstum der *vma13Δ*-Mutante wieder verbessert, könnte es sein, dass Vakuolen wieder stärker angesäuert sind. Es ist allerdings schwer vorstellbar, dass die Aktivität der V-ATPase in diesen Zellen normal ist, da der durch die *VMA13*-Deletion bedingte Defekt äußerst schwerwiegend ist. Wahrscheinlich gibt es noch andere Proteine, welche den pH-Wert von Vakuolen regulieren könnten und deren Aktivität und Lokalisation durch Tpk2, Cla4 und Skm1 beeinflusst werden könnte. Es wurde gezeigt, dass Pma1, eine Protonen-Pumpe der Plasmamembran, zur Membran der Vakuolen gelangen und dort den pH-Wert der Vakuole regulieren kann (Martinez-Munoz und Kane, 2008). Da *TPK2*, *CLA4* und *SKM1* genetisch mit *VMA13* interagieren und Cla4 mit Vma13 auch in einem Split-Ubiquitin-Experiment interagiert, wäre es interessant zu testen, ob die Aktivität der V-ATPase durch sie reguliert wird.

Die Regulation der Homöostase des pH-Wertes in Vakuolen ist wahrscheinlich ein komplizierter aber wichtiger Prozess. Der PKA-Signalweg und die PAKs sind mögliche Kandidaten, die diesen Prozess über die V-ATPase und vielleicht auch über andere Proteine regulieren könnten.



#### **5.4.6 Lokalisation von Ste20 an Vakuolen?**

Über eine andere Funktion von Ste20 an Vakuolen wurde kürzlich berichtet. Zusammen mit Cla4 reguliert Ste20 die Vererbung von Vakuolen während der Zellteilung (Bartholomew und Hardy, 2009). Beide Proteine sind bei diesem Prozess an der Auflösung der so genannten Segregationsstruktur beteiligt, einer vesikulären und tubulären Struktur, die aus Vakuolen der Mutterzelle entsteht und in die Tochterzelle transportiert wird. Ste20 und Cla4 regulieren den Abbau von Vac18, welches eine Funktion beim Transport der Segregationsstruktur in die Tochterzelle hat. Cla4 lokalisiert zusammen mit Cdc42 und Bem1 an Vakuolen. Bem1 ist ein Gerüstprotein, das Cdc42, seinen Aktivator Cdc24 und entweder Ste20 oder Cla4 in unmittelbare Nähe zueinander bringt und Interaktionen ermöglicht (Eitzen et al., 2001; Müller et al., 2001; Eitzen et al., 2002; Richman et al. 2002; Xu und Wickner, 2006; Bartholomew und Hardy, 2009). Da Cdc42, Cdc24 und Bem1 an Vakuolen lokalisieren, wäre es nicht überraschend, wenn auch Ste20 an Vakuolen lokalisiert.

#### **5.5 Neue Funktionen von PAKs**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden neue Funktionen von PAKs charakterisiert. In einer frühen Arbeit der Arbeitsgruppe wurde ein Zusammenhang zwischen Sterolsynthese und Zellpolarität beschrieben (Tiedje et al., 2007). Ste20 und Cla4, zwei wichtige Proteine für die Zellpolarität der PAK-Familie, interagieren mit einigen wichtigen Enzymen der Sterolsynthese. Es wurde deshalb spekuliert, dass Ste20 und Cla4 Zellpolarität durch Regulation der Sterolsynthese kontrollieren könnten. Es wurde deswegen in dieser Arbeit weiter untersucht, ob Ste20 und Cla4 tatsächlich die Sterolsynthese regulieren. Es konnte hierbei gezeigt werden, dass Ste20 und Cla4 die gesamte Sterolmenge, die aus freien Sterolen und veresterten Sterolen besteht, negativ modulieren. Außerdem reguliert Cla4 die Veresterung von Sterolen negativ. Es konnte in dieser Arbeit weiter gezeigt werden, dass PAKs mit Sut1 interagieren, einem Transkriptionsfaktor für Gene der Sterolaufnahme. Dadurch kann die Expression dieser Gene negativ kontrolliert werden und diese Regulation hängt von der Kernlokalisation der PAKs ab. Dementsprechend wird die Sterolaufnahme durch PAKs inhibiert. Zusammengefasst sind PAKs negative Regulatoren der Sterolhomöostase in Hefezellen.

Außerdem wurde die Regulation der V-ATPase durch PAKs untersucht. Da Vma13, eine Untereinheit und auch ein Aktivator der V-ATPase, mit Ste20 sowohl physikalisch als auch

genetisch interagieren kann und Ste20 die Aktivität der V-ATPase positiv reguliert, wurde spekuliert, dass Ste20 durch Vma13 die Aktivität der V-ATPase kontrolliert. Die anderen zwei PAKs Cla4 und Skm1 und die PKA-Untereinheit Tpk2 spielen bei der Regulation der V-ATPase-Aktivität möglicherweise ebenfalls eine Rolle.

Leider ist momentan nicht bekannt, wie Sut1 Transkription reguliert und wie Vma13 die Aktivität der V-ATPase beeinflusst. Erst wenn diese Mechanismen beschrieben sind, kann untersucht werden, wie PAKs über Sut1 Transkription regulieren bzw. über Vma13 die Aktivität der V-ATPase kontrollieren.

## 6. Literaturverzeichnis

Adams, A. E. M., Johnson, D. I., Longnecker, R. M., Sloat, B. F. and Pringle, J. R. (1990) CDC42 and CDC43, two additional genes involved in budding and the establishment of cell polarity in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* 111, 131-142.

Ahn, S. H., Cheung, W. L., Hsu, J. Y., Diaz, R. L., Smith, M. M. and Allis, C. D. (2005) Sterile 20 kinase phosphorylates histone H2B at serine 10 during hydrogen peroxide-induced apoptosis in *S. cerevisiae*. *Cell* 120, 25-36.

Aoyama, Y., Yoshida, Y., Sato, R., Susani, M. and Ruis, H. (1981) Involvement of cytochrome b5 and a cyanide-sensitive monooxygenase in the 4-demethylation of 4,4-dimethylzymosterol by yeast microsomes. *Biochim. Biophys. Acta* 663, 194-202.

Aoyama, Y., Yoshida, Y., Sonoda, Y. and Sato, Y. (1989) Deformylation of 32-oxo-24,25-dihydrolanosterol by the purified cytochrome P-450<sub>14DM</sub> (lanosterol 14 alpha-demethylase) from yeast evidence confirming the intermediate step of lanosterol 14 alpha-demethylation. *J. Biol. Chem.* 264, 18502-18505.

Ash, J., Wu, C., Larocque, R., Jamal, M., Stevens, W., Osborne, M., Thomas, D. Y. and Whiteway, M. (2003) Genetic analysis of the interface between Cdc42p and the CRIB domain of Ste20p in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 163, 9-20.

Athenstaedt, K. and Daum, G. (2006) The life cycle of neutral lipids: synthesis, storage and degradation. *Cell Mol. Life Sci.* 63, 1355–1369.

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

Baumann, N. A., Sullivan, D. P., Ohvo-Rekila, H., Simonot, C., Pottekat, A., Klaassen, Z., Beh, C. T. and Menon, A. K. (2005) Transport of newly synthesized sterol to the sterol-enriched plasma membrane occurs via nonvesicular equilibration. *Biochemistry* 44, 5816–5826.

Beck, T. and Hall, M. N. (1999) The TOR signalling pathway controls nuclear localization of nutrient-regulated transcription factors. *Nature* 402, 689-692

Bond, S. and Forgac, M. (2008) The Ras/cAMP/protein kinase A pathway regulates glucose-dependent assembly of the vacuolar (H<sup>+</sup>)-ATPase in yeast. *J. Biol. Chem.* 283, 36513-36521.

Bose, I., Irazoqui, J. E., Moskow, J. J., Bardes, E. S., Zyla, T. R. and Lew, D. J. (2001) Assembly of scaffold-mediated complexes containing Cdc42p, the exchange factor Cdc24p, and the effector Cla4p required for cell cycle-regulated phosphorylation of Cdc24p. *J. Biol. Chem.* 276, 7176-7186.

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

- Butty, A. C., Perrinjaquet, N., Petit, A., Jaquenoud, M., Segall, J. E., Hofmann, K., Zwahlen, C. and Peter, M. (2002) A positive feedback loop stabilizes the guanine-nucleotide exchange factor Cdc24 at sites of polarization. *EMBO J.* 21, 1565-1576.
- Butty, A. C., Pryciak, P., Huang, L., Herskowitz, I. and Peter, M. (1998) The role of Far1p in linking the heterotrimeric G protein to polarity establishment proteins during yeast mating. *Science* 282, 1511-1516.
- Chasse, S. A., Flanary, P., Parnell, S. C., Hao, N., Cha, J. Y., Siderovski, D. P. and Dohlman, H. G. (2006) Genome-scale analysis reveals Sst2 as the principal regulator of mating pheromone signaling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot. Cell* 5, 330-346.
- Chen, G. C., Kim, Y. J. and Chan, C. S. M. (1997) The Cdc42 GTPase-associated proteins Gic1 and Gic2 are required for polarized cell growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* 11, 2958-2971.
- Chi, A., Huttenhower, C., Geer, L. Y., Coon, J. J., Syka, J. E. P., Bai, D. L., Shabanowitz, J., Burke, D. J., Troyanskaya O. D. and Hunt, D. F. (2007) Analysis of phosphorylation sites on proteins from *Saccharomyces cerevisiae* by electron transfer dissociation (ETD) mass spectrometry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 2193-2198.
- Cullen, P. J. and Sprague, G. F. J. (2000) Glucose depletion causes haploid invasive growth in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 13619-13624.
- Cullen, P. J. and Sprague, G. F. J. (2002) The Roles of Bud-Site-Selection Proteins during Haploid Invasive Growth in Yeast. *Mol. Biol. Cell* 13, 2990-3004.
- Cullen, P. J., Sabbagh, W. J., Graham, E., Irick, M. M., van Olden, E. K., Neal, C., Delrow, J., Bardwell, L. and Sprague G. F. J. (2004) A signaling mucin at the head of the Cdc42- and MAPK-dependent filamentous growth pathway in yeast. *Genes Dev.* 18, 1695-1708.
- Cvrckova, F., De Virgilio, C., Manser, E., Pringle, J. R. and Nasmyth, K. (1995) Ste20-like protein kinases are required for normal localization of cell growth and for cytokinesis in budding yeast. *Genes Dev.* 9, 1817-1830.
- Diab, H., Ohira, M., Liu, M., Cobb, E. and Kane, P. M. (2009) Subunit interactions and requirements for inhibition of the yeast V1-ATPase. *J. Biol. Chem.* 284, 13316-13325.
- Dohlman, H. G. and Thorner, J. W. (2001) Regulation of G protein-initiated signal transduction in yeast: paradigms and principles. *Annu. Rev. Biochem.* 70, 703-754.
- Dong, Y., Pruyne, D. and Bretscher, A. (2003) Formin-dependent actin assembly is regulated by distinct modes of Rho signaling in yeast. *J. Cell Biol.* 161, 1081-1092.
- Drohen, F., O'Rourke S. M., Stucke, V. M., Jaquenoud, M., Neiman, A. M. and Peter, M. (2000) Phosphorylation of the MEKK Ste11p by the PAK-like kinase Ste20p is required for MAP kinase signaling in vivo. *Curr. Biol.* 10, 630-639.
- Eby, J. J., Holly, S. P., van Drogen, F., Grishin, A. V., Peter, M., Drubin, D. G. and Blumer, K. J. (1998) Actin cytoskeleton organization regulated by the PAK family of protein kinases. *Curr. Biol.* 8, 967-970.

- Etienne-Manneville, S. (2004) Cdc42-the centre of polarity. *J. Cell Sci.* 117, 1291-1300.
- Flannery, A. R. and Stevens, T. H. (2008) Functional Characterization of the N-terminal Domain of Subunit H (Vma13p) of the Yeast Vacuolar ATPase. *J. Biol. Chem.* 283, 29099-29108.
- Forgac, M. (2007) Vacuolar ATPases: rotary proton pumps in physiology and pathophysiology. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 917-929.
- Gladfelter, A. S., Bose, I., Zyla, T. R., Bardes, E. S. G. and Lew, D. J. (2002) Septin ring assembly involves cycles of GTP loading and hydrolysis by Cdc42p. *J. Cell Biol.* 156, 315-326.
- Gollub, E. G., Liu, K. P., Dayan, J., Adlersberg, M. and Sprinson, D. B. (1977) Yeast mutants deficient in heme biosynthesis and a heme mutant additionally blocked in cyclization of 2,3-oxidosqualene. *J. Biol. Chem.* 252, 2846-2854.
- Gulli, M. P., Jaquenoud, M., Shimada, Y., Niederhäuser, 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, 1155-1167.
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166, 557-580
- Heinrich, M., Köhler, T. and Mösch, H. U. (2007) Role of Cdc42-Cla4 interaction in the pheromone response of *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot. Cell* 6, 317-327.
- Henneberry, A. L. and Sturley, S. L. (2005) Sterol homeostasis in the budding yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Semin. Cell Dev. Biol.* 16,155-161.
- Herskowitz, I. (1988) Life cycle of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.* 52, 536-553
- Ho, M. N., Hirata, R., Umemoto, N., Ohya, Y., Takatsuki, A., Stevens, T. H. and Anraku, Y. (1993) VMA13 encodes a 54-kDa vacuolar H(+)-ATPase subunit required for activity but not assembly of the enzyme complex in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 268, 18286-18292.
- Höfken, T. and Schiebel, E. (2004) Novel regulation of mitotic exit by the Cdc42 effectors Gic1 and Gic2. *J. Cell Biol.* 164, 219-231.
- Hofmann, C., Shepelev, M. and Chernoff, J. (2004) The genetics of Pak. *J. Cell Sci.* 117, 4343-4354.
- Holly, S. P. and Blumer, K. J. (1999) PAK-family kinases regulate cell and actin polarization throughout the cell cycle of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* 147, 845-856.
- Irazoqui, J. E., Gladfelter, A. S. and Lew, D. J. (2003) Scaffold-mediated symmetry breaking by Cdc42p. *Nat. Cell Biol.* 5, 1062-1070.

Jaffe, A. B. and Hall, A. (2005) Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 21, 247-269.

Jandrositz, A., Petschnigg, J., Zimmermann, R., Natter, K., Scholze, H., Hermetter, A., Kohlwein, S. D. and Leber, R. (2005) The lipid droplet enzyme Tgl1p hydrolyzes both steryl esters and triglycerides in the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* 1735, 50–58.

Jin, H., McCaffery, J. M. and Grote, E. (2008) Ergosterol promotes pheromone signaling and plasma membrane fusion in mating yeast. *J. Cell Biol.* 180, 813-826.

Johnson, D. I. (1999) Cdc42: An essential Rho-type GTPase controlling eukaryotic cell polarity. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63, 54-105.

Jüschke, C., Wachter, A., Schwappach, B. and Seedorf, M. (2005) SEC18/NSF-independent, protein-sorting pathway from the yeast cortical ER to the plasma membrane. *J. Cell Biol.* 169, 613–622.

Kane, P. M. (1995) Disassembly and reassembly of the yeast vacuolar H<sup>(+)</sup>-ATPase in vivo. *J. Biol. Chem.* 270, 17025-17032.

Kane, P. M. (2006) The where, when, and how of organelle acidification by the yeast vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70, 177-191.

Kaplan, M. R., Simoni, R. D. (1985) Transport of cholesterol from the endoplasmic reticulum to the plasma membrane. *J. Cell Biol.* 101, 446-453.

Kelly, S. L., Lamb, D. C., Corran, A. J., Baldwin, B. C., Parks, L. W. and Kelly, D. E. (1995) Purification and reconstitution of activity of *Saccharomyces cerevisiae* P450 61, a sterol delta 22-desaturase. *FEBS Lett.* 377, 217-220.

Keniry, M. E., Kemp, H. A., Rivers, D. M. and Sprague, G. F. J. (2004) The identification of Pcl1-interacting proteins that genetically interact with Cla4 may indicate a link between G1 progression and mitotic exit. *Genetics* 166, 1177-1186.

Kleinhans, F. W., Lees, N. D., Bard, M., Haak, R. A. and Woods, R. A. (1979) ESR determination of membrane permeability in a yeast sterol mutant. *Chem. Phys. Lipids* 23, 143-154

Klionsky, D. J., Herman, P. K., Emr, S. D. (1990) The fungal vacuole: composition, function, and biogenesis. *Microbiol. Rev.* 54, 266-292

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, 963-972.

Köffel, R., Tiwari, R., Falquet, L. and Schneiter, R. (2005) The *Saccharomyces cerevisiae* YLL012/YEH1, YLR020/YEH2, and TGL1 genes encode a novel family of membrane-anchored lipases that are required for steryl ester hydrolysis. *Mol. Cell. Biol.* 25, 1655–1668.

- Kuchin, S., Vyas, V. K. and Carlson, M. (2002) Snf1 protein kinase and the repressors Nrg1 and Nrg2 regulate FLO11, haploid invasive growth, and diploid pseudohyphal differentiation. *Mol. Cell. Biol.* 22, 3994-4000.
- Kurat, C. F., Wolinski, H., Petschnigg, J., Kaluarachchi, S., Andrews, B., Natter, K. and Kohlwein, S. D. (2009) Cdk1/Cdc28-dependent activation of the major triacylglycerol lipase Tgl4 in yeast links lipolysis to cell-cycle progression. *Mol. Cell* 33, 53-63.
- Lai, M. H., Bard, M., Pierson, C. A., Alexander, J. F., Goebel, M., Carter, G. T. and Kirsch, D. R. (1994) The identification of a gene family in the *Saccharomyces cerevisiae* ergosterol biosynthesis pathway. *Gene* 140, 41-49.
- Lamb, D. C., Kelly, D. E., Manning, N. J., Kaderbhai, M. A. and Kelly, S. L. (1999) Biodiversity of the P450 catalytic cycle: yeast cytochrome b5/NADH cytochrome b5 reductase complex efficiently drives the entire sterol 14-demethylation (CYP51) reaction. *FEBS Lett.* 462, 283-288.
- Lamson, R. E., Winters, M. J. and Pryciak, P. M. (2002) Cdc42 regulation of kinase activity and signalling by the yeast p21-activated kinase Ste20. *Mol. Cell. Biol.* 22, 2939-2951.
- Leberer, E., Dignard, D., Harcus, D., Thomas, D. Y. and Whiteway, M. (1992) The protein kinase homologue Ste20p is required to link the yeast pheromone response G-protein beta gamma subunits to downstream signalling components. *EMBO J.* 11, 4815-4824.
- Leberer, E., Wu, C., Leeuw, T., Fourest-Lieuvin, A., Segall, J. E. and Thomas, D. Y. (1997) Functional characterization of the Cdc42p binding domain of yeast Ste20p protein kinase. *EMBO J.* 16, 83-97.
- Lees, N. D., Bard, M., Kemple, M. D., Haak, R. A. and Kleinhans, F. W. (1979) ESR determination of membrane order parameter in yeast sterol mutants. *Biochim. Biophys. Acta* 553, 469-475.
- Lees, N. D., Bard, M., Kirsch, D. R. (1999) Biochemistry and molecular biology of sterol synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 34, 33-47.
- Leeuw, T., Fourest-Lieuvin, A., Wu, C., Chenevert, J., Clark, K., Whiteway, M., Thomas, D. Y. and Leberer, E. (1995) Pheromone response in yeast: association of Bem1p with proteins of the MAP kinase cascade and actin. *Science* 270, 1210-1213.
- Lew, D. J. and Reed, S. I. (1993) Morphogenesis in the yeast cell cycle: regulation by Cdc28 and cyclins. *J. Cell Biol.* 120, 1305-1320.
- Lewis, T. A., Taylor, F. R. and Parks, L. W. (1985) Involvement of heme biosynthesis in control of sterol uptake by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 163, 199-207.
- Li, S. C. and Kane, P. M. (2009) The yeast lysosome-like vacuole: endpoint and crossroads. *Biochim. Biophys. Acta* 1793, 650-663.
- Lin, M., Unden, H., Jacquier, N., Schneiter, R., Just, U. and Höfken, T. (2009a) The Cdc42 effectors Ste20, Cla4 and Skm1 down-regulate the expression of genes involved in sterol uptake by a MAPK-independent pathway. *Mol. Biol. Cell* 20, 4826-4837

- Lin, M., Grillitsch, K., Daum, G., Just, U. and Höfken, T. (2009b) Modulation of sterol homeostasis by the Cdc42p effectors Cla4p and Ste20p in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS J.* 276, 7253-7264.
- Liu, H., Styles, C. A. and Fink, G. R. (1993) Elements of the yeast pheromone response pathway required for filamentous growth of diploids. *Science* 262, 1741-1744.
- Longtine, M. S., McKenzie, A., Demarini, D. J., Shah, N. G., Wach, A., Brachat, A., Philippsen, P. and Pringle, J. R. (1998) Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 14, 953-961.
- Lorenz, M. C. and Heitman, J. (1998) The MEP2 ammonium permease regulates pseudohyphal differentiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 17, 1236-1247.
- Lorenz, M. C., Pan, X., Harashima, T., Cardenas, M. E., Xue, Y., Hirsch, J. P. and Heitman, J. (2000) The G protein-coupled receptor *gpr1* is a nutrient sensor that regulates pseudohyphal differentiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 154, 609-22.
- Lu, M., Sautin, Y. Y., Holliday, L. S. and Gluck, S. L. (2004) The glycolytic enzyme aldolase mediates assembly, expression, and activity of vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase. *J. Biol. Chem.* 279, 8732-8739.
- Lu, A. and Hirsch, J. P. (2005) Cyclic AMP-independent regulation of protein kinase A substrate phosphorylation by Kelch repeat proteins. *Eukaryot. Cell* 4, 1794-1800.
- Macara, I. G. (2001) Transport into and out of the Nucleus. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 65, 570-594.
- Manolson, M. F., Wu, B., Proteau, D., Taillon, B. E., Roberts, B. T., Hoyt, M. A. and Jones, E. W. (1994) STV1 gene encodes functional homologue of 95-kDa yeast vacuolar H(+) -ATPase subunit Vph1p. *J. Biol. Chem.* 269, 14064-14074.
- Marie, C., Leyde, S. and White, T. C. (2008) Cytoplasmic localization of sterol transcription factors Upc2p and Ecm22p in *S. cerevisiae*. *Fungal Genet. Biol.* 45, 1430-1438.
- Martin, H., Mendoza, A., Rodriguez-Pachon, J. M., Molina, M. and Nombela, C. (1997) Characterization of SKM1, a *Saccharomyces cerevisiae* gene encoding a novel Ste20/PAK like protein kinase. *Mol. Microbiol.* 23, 431-444.
- Martinez-Munoz, G. A. and Kane, P. (2008) Vacuolar and plasma membrane proton pumps collaborate to achieve cytosolic pH homeostasis in yeast. *J. Biol. Chem.* 283, 20309-20319.
- 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, 19713-19718.
- Miller, W. G. and Lindow, S. E. (1997) An improved GFP cloning cassette designed for prokaryotic transcriptional fusions. *Gene* 191, 149-153.
- Mitchell, D. A., Marshall, T. K. and Deschenes, A. R. (1993) Vectors for the inducible overexpression of glutathione S-transferase fusion proteins in yeast. *Yeast* 9, 715-722.



- Mösch, H. U., Roberts, R. L. and Fink, G. R. (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, 5352-5356.
- Moseley, J. B. and Goode, B. L. (2006) The yeast actin cytoskeleton: from cellular function to biochemical mechanism. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70, 605-645
- Müllner, H., Deutsch, G., Leitner, E., Ingolic, E. and Daum, G. (2005) YEH2/YLR020c encodes a novel steryl ester hydrolase of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 280, 13321-13328.
- Ness, F., Bourot, S., Régnacq, M., Spagnoli, R., Bergès, T. and Karst, F. (2001) SUT1 is a putative Zn[II]2Cys6-transcription factor whose upregulation enhances both sterol uptake and synthesis in aerobically growing *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Eur. J. Biochem.* 268, 1585-1595.
- Ni, L. And Snyder, M. (2001) A genomic study of the bipolar bud site selection pattern in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* 12, 2147-2170.
- O'Rourke, S. M. and Herskowitz, I. (1998) The Hog1 MAPK prevents cross talk between the HOG and pheromone response MAPK pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* 12, 2874-2886.
- Owegi, M. A., Pappas, D. L., Finch, M. W. J., Bilbo, S. A., Resendiz, C. A., Jacquemin, L. J., Warriar, A., Trombley, J. D., McCulloch K. M., Margalef, K. L., Mertz, M. J., Storms, J. M., Damin, C. A. and Parra, K. J. (2006) Identification of a domain in the V<sub>0</sub> subunit d that is critical for coupling of the yeast vacuolar proton-translocating ATPase. *J. Biol. Chem.* 281, 30001-30014.
- Pan, X. and Heitman, J. (1999) Cyclic AMP-dependent protein kinase regulates pseudohyphal differentiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 19, 4874-4887.
- Park, H.O. and Bi, E. (2007) Central roles of small GTPases in the development of cell polarity in yeast and beyond. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 71, 48-96.
- Peeters, T., Louwet, W., Geladé, R., Nauwelaers, D., Thevelein, J. M. and Versele, M. (2006) Kelch-repeat proteins interacting with the Galpha protein Gpa2 bypass adenylate cyclase for direct regulation of protein kinase A in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 13034-13039.
- Peter, M., Neiman, A. M., Park, H. O., van Lohuizen, M. and Herskowitz, I. (1996) Functional analysis of the interaction between the small GTP binding protein Cdc42 and the Ste20 protein kinase in yeast. *EMBO J.* 15, 7046-7059.
- Pichler, H. and Riezman, H. (2004) Where sterols are required for endocytosis. *Biochim. Biophys. Acta* 1666, 51-61.
- Powell, B., Graham, L. A. and Stevens, T. H. (2000) Molecular characterization of the yeast vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase proton pore. *J. Biol. Chem.* 275, 23654-23660.
- Proszynski, T. J., Klemm, R., Bagnat, M., Gaus, K. and Simons, K. (2006) Plasma membrane polarization during mating in yeast cells. *J. Cell Biol.* 173, 861-866.

- Pruyne, D. and Bretscher, A. (2000) Polarization of cell growth in yeast. I. Establishment and maintenance of polarity states. *J. Cell Sci.* 113, 365-375.
- Pruyne, D., Evangelista, M., Yang, C., Bi, E., Zigmond, S., Bretscher, A. and Boone, C. (2002) Role of formins in actin assembly: nucleation and barbed end association. *Science* 297, 612-615.
- Pruyne, D., Gao, L., Bi, E. and Bretscher, A. (2004) Stable and dynamic axes of polarity utilize distinct formin isoforms in budding yeast. *Mol. Biol. Cell* 15, 4971-4989.
- Ptacek, J., Devgan, G., Michaud, G., Zhu, H., Zhu, X., Fasolo, J., Guo, H., Jona, G., Breitzkreutz, A., Sopko, R., McCartney, R. R., Schmidt, M. C., Rachidi, N., Lee, S. J., Mah, A. S., Meng, L., Stark, M. J., Stern, D. F., De Virgilio, C., Tyers, M., Andrews, B., Gerstein, M., Schweitzer, B., Predki, P. F. and Snyder, M. (2005) Global analysis of protein phosphorylation in yeast. *Nature* 438, 679-684.
- Raitt, D. C., Posas, F. and Saito, H. (2000) Yeast Cdc42 GTPase and Ste20 PAK-like kinase regulate Sho1-dependent activation of the Hog1 MAPK pathway. *EMBO J.* 19, 4623-4631.
- Ramachandran, N., Munteanu, I., Wang, P., Aubourg, P., Rilstone, J. J., Israelian, N., Naranian, T., Paroutis, P., Guo, R., Ren, Z. P. et al. (2009) VMA21 deficiency causes an autophagic myopathy by compromising V-ATPase activity and lysosomal acidification. *Cell* 137, 235-246.
- Ramer, S. W. and Davis, R. W. (1993) A dominant truncation allele identifies a gene, STE20, that encodes a putative protein kinase necessary for mating in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 452-456.
- Reddy, V. V., Kupfer, D. and Caspi, E. (1977) Mechanism of C-5 double bond introduction in the biosynthesis of cholesterol by rat liver microsomes. *J. Biol. Chem.* 252, 2797-2801.
- Rep, M., Krantz, M., Thevelein, J. M. and Hohmann, S. (2000) The transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to osmotic shock. Hot1p and Msn2p/Msn4p are required for the induction of subsets of high osmolarity glycerol pathway-dependent genes. *J. Biol. Chem.* 275, 8290-8300.
- Rep, M., Reiser, V., Gartner, U., Thevelein, J. M., Hohmann, S., Ammerer, G. and Ruis, H. (1999) Osmotic stress-induced gene expression in *Saccharomyces cerevisiae* requires Msn1p and the novel nuclear factor Hot1p. *Mol. Cell. Biol.* 19, 5474-5485.
- Robbins, J., Dilworth, S. M., Laskey, R. A. and Dingwall, C. (2001) Two interdependent basic domains in nucleoplasmin nuclear targeting sequence: identification of a class of bipartite nuclear targeting sequence. *Cell* 64, 615-623.
- Roberts, R. L. and Fink, G. R. (1994) Elements of a single MAP kinase cascade in *Saccharomyces cerevisiae* mediate two developmental programs in the same cell type: mating and invasive growth. *Genes Dev.* 8, 2974-2985.
- Robertson, L. S. and Fink, G. R. (1998) The three yeast A kinases have specific signaling functions in pseudohyphal growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 13783-13787.

- Russnak, R., Konczal, D. and McIntire, S. L. (2001) A family of yeast proteins mediating bidirectional vacuolar amino acid transport. *J. Biol. Chem.* 276, 23849-23857.
- Sagermann, M., Stevens, T. H. and Matthews, B. W. (2001) Crystal structure of the regulatory subunit H of the V-type ATPase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 7134-7139.
- Sakchaisri, K., Asano, S., Yu, L. R., Shulewitz, M. J., Park, C. J., Park, J. E., Cho, Y. W., Veenstra, T. D., Thorner, J. And Lee, K. S. (2004) Coupling morphogenesis to mitotic entry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 4124-4129.
- Sautin, Y. Y., Lu, M., Gaugler, A., Zhang, L. and Gluck, S. L. (2005) Phosphatidylinositol 3-kinase-mediated effects of glucose on vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase assembly, translocation, and acidification of intracellular compartments in renal epithelial cells. *Mol. Cell Biol.* 5, 575–589.
- Schjerling, P. and Holmberg, S. (1996) Comparative amino acid sequence analysis of the C6 zinc cluster family of transcriptional regulators. *Nucleic Acids Res.* 24, 4599-4607.
- Schnabl, M., Daum, G. and Pichler, H. (2005) Multiple lipid transport pathways to the plasma membrane in yeast. *Biochim. Biophys. Acta* 1687,130–140.
- Seol, J. H., Shevchenko, A., Shevchenko, A. and Deshaies, R.J. (2001) Skp1 forms multiple protein complexes, including RAVE, a regulator of V-ATPase assembly. *Nat. Cell Biol.* 3, 384-391.
- Shao, E. and Forgac, M. (2004) Involvement of the nonhomologous region of subunit A of the yeast V-ATPase in coupling and in vivo dissociation. *J. Biol. Chem.* 279, 48663–48670.
- Shao, E., Nishi, T., Kawasaki-Nishi, S. and Forgac, M. (2003) Mutational analysis of the non-homologous region of subunit A of the yeast V-ATPase. *J. Biol. Chem.* 278, 12985–12991.
- Sheu, Y. J., Barral, Y. and Snyder, M. (2000) Polarized growth controls cell shape and bipolar bud site selection in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* 20, 5235-5247.
- Shimazu, M., Sekito, T., Akiyama, K., Ohsumi, Y. and Kakinuma, Y. (2005) A family of basic amino acid transporters of the vacuolar membrane from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 280, 4850-4857
- Shianna, K. V., Dotson, W. D., Tove, S. and Parks, L. W. (2001) Identification of a UPC2 homolog in *Saccharomyces cerevisiae* and its involvement in aerobic sterol uptake. *J. Bacteriol.* 183, 830-834.
- 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, 19-27.
- Smardon, A. M., Tarsio, M. and Kane, P. M. (2002) The RAVE complex is essential for stable assembly of the yeast V-ATPase. *J. Biol. Chem.* 277, 13831-13839.

- Smith, G. R., Givan, S. A., Cullen, P. and Sprague, G. F. J. (2002) GTPase-activating proteins for Cdc42. *Eukaryot. Cell* 1, 469–480.
- Stevenson, B. J., Ferguson, B., De Virgilio, C., Bi, E., Pringle, J. R., Ammerer, G. and Sprague, G. F. J. (1995) Mutation of RGA1, which encodes a putative GTPase-activating protein for the polarity-establishment protein Cdc42p, activates the pheromone-response pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* 9, 2949–2963.
- Studier, F. W. and Moffatt, B. A. (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* 189, 113-130.
- Sturley, S. L. (2000) Conservation of eukaryotic sterol homeostasis: new insights from studies in budding yeast. *Biochim. Biophys. Acta* 1529, 155-163.
- Sumner, J. P., Dow, J. A., Earley, F. G., Klein, U., Jager, D. and Wieczorek, H. (1995) Regulation of plasma membrane V-ATPase activity by dissociation of peripheral subunits. *J. Biol. Chem.* 270,5649–5653.
- Takahashi, S. and Pryciak, P. M. (2007) Identification of Novel Membrane-binding Domains in Multiple Yeast Cdc42 Effectors. *Mol. Biol. Cell* 18, 4945-4956.
- Tamaki, H., Miwa, T., Shinozaki, M., Saito, M., Yun, C. W., Yamamoto, K. and Kumagai, H. (2000) GPR1 regulates filamentous growth through FLO11 in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 267, 164-168.
- Tatebayashi, K., Yamamoto, K., Tanaka, K., Tomida, T., Maruoka, T., Kasukawa, E. and Saito, H. (2006) Adaptor functions of Cdc42, Ste50, and Sho1 in the yeast osmoregulatory HOG MAPK pathway. *EMBO J.* 25, 3033-3044.
- 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, 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, 2885-2896.
- Toda, T., Uno, I., Ishikawa, T., Powers, S., Kataoka, T., Broek, D., Cameron, S., Broach, J., Matsumoto, K. and Wigler, M. (1985) In yeast, RAS proteins are controlling elements of adenylate cyclase. *Cell* 40, 27-36.
- Toda, T., Cameron, S., Sass, P., Zoller, M., Scott, J. D., McMullen, B., Hurwitz, M., Krebs, E. G. and Wigler, M. (1987a) Cloning and characterization of BCY1, a locus encoding a regulatory subunit of the cyclic AMP-dependent protein kinase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 7, 1371-1377.
- Toda, T., Cameron, S., Sass, P., Zoller, M. and Wigler, M. (1987b) Three different genes in *S. cerevisiae* encode the catalytic subunits of the cAMP-dependent protein kinase. *Cell* 50, 277-287.
- Valdez-Taubas, J. and Pelham, H. R. (2003) Slow diffusion of proteins in the yeast plasma membrane allows polarity to be maintained by endocytic cycling. *Curr. Biol.* 13, 1636-1640.

- 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, 701-715
- Wallar, B. J. and Alberts, A. (2003) The formins: active scaffolds that remodel the cytoskeleton. *Trends Cell Biol.* 13, 435-446.
- Wedlich-Söldner, R., Wai, S. C., Schmidt, T. and Li, R. (2004) Robust cell polarity is a dynamic state established by coupling transport and GTPase signalling. *J. Cell Biol.* 166, 889-900.
- Weinstein, J. D., Branchaud, R., Beale, S. I., Mement, W. J. and Sinclair, P. R. (1986) Biosynthesis of the farnesyl moiety of heme  $\alpha$  from exogenous mevalonic acid by cultured chick liver cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 245, 44-50
- Weiss, E. L., Bishop, A. C., Shokat, K. M. and Drubin, D. G. (2000) Chemical genetic analysis of the budding-yeast p21-activated kinase Cla4p. *Nat. Cell Biol.* 2, 677-685.
- Wild, A. C., Yu, J. W., Lemmon, M. A. and Blumer, K. J. (2004) The p21-activated protein kinase-related kinase Cla4 is a coincidence detector of signaling by Cdc42 and phosphatidylinositol 4-phosphate. *J. Biol. Chem.* 279, 17101-17110.
- Winters, M. J., Lamson, R. E., Nakanishi, H., Neiman, A. M. and Pryciak, P. M. (2005) A membrane binding domain in the Ste5 scaffold synergizes with Gbetagamma binding to control localization and signaling in pheromone response. *Mol. Cell* 20, 21-32.
- Winters, M. J. and Pryciak, P. M. (2005) Interaction with the SH3 domain protein Bem1 regulates signaling by the *Saccharomyces cerevisiae* p21-activated kinase Ste20. *Mol. Cell Biol.* 25, 2177-2190.
- Wu, C., Lytvyn, V., Thomas, D. Y. 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, 30623-30626.
- Wu, C., Whiteway, M., Thomas, D.Y. 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, 15984-15992.
- Xue, Y., Battle, M. and Hirsch, J. P. (1998) GPR1 encodes a putative G protein-coupled receptor that associates with the Gpa2p Galpha subunit and functions in a Ras-independent pathway. *EMBO J.* 17, 1996-2007.
- Yamaguchi, Y., Ota, K. and Ito, T. (2007) A novel Cdc42-interacting domain of the yeast polarity establishment protein Bem1. Implications for modulation of mating pheromone signaling. *J. Biol. Chem.* 282, 29-38.
- Yamashiro, C. T., Kane, P. M., Wolczyk, D. F., Preston, R. A. and Stevens, T. H. (1990) Role of vacuolar acidification in protein sorting and zymogen activation: a genetic analysis of the yeast vacuolar proton-translocating ATPase. *Mol. Cell Biol.* 10, 3737-3749.

Yang, H., Bard, M., Bruner, D. A., Gleeson, A., Deckelbaum, R. J., Aljinovic, G., Pohl, T. M., Rothstein, R. and Sturley S. L. (1996) Sterol esterification in yeast: a two-gene process. *Science* 272, 1353-1356.

Yoshida, Y. (1988) Cytochrome P-450 of fungi: primary target for azole antifungal agents. In *Current Topics in Medical Mycology* (McGinnis MR ed), Vol. 2, pp. 388-418. Springer, New York

Yu, C., Kennedy, N. J., Chang, C. C. and Rothblatt, J. A. (1996) Molecular cloning and characterization of two isoforms of *Saccharomyces cerevisiae* acyl-CoA:sterol acyltransferase. *J Biol Chem* 271, 24157-24163.

Zheng, Y., Cerione, R. and Bender, A. (1994) Control of the yeast bud-site assembly GTPase Cdc42: catalysis of guanine nucleotide exchange by Cdc24 and stimulation of GTPase activity by Bem3. *J. Biol. Chem.* 269, 2369–2372.

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

Zweytick, D., Athenstaedt, K. and Daum, G. (2000a) Intracellular lipid particles of eukaryotic cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1469, 101–120.

Zweytick, D., Leitner, E., Kohlwein, S. D., Yu, C., Rothblatt, J. and Daum, G. (2000b) Contribution of Are1p and Are2p to sterol ester synthesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* 267, 1075-1082.

## 7. Anhang

### 7.1 Abkürzungsverzeichnis

APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
ATPasen	Adenosintriphosphatase
BR	basic rich
Bp	Basenpaare
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
C-terminal	carboxyterminal
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
ECL	Enhanced Chemiluminescence
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycoltetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
g	Gramm
GAPDH	Glycerin-Aldehydphosphat-Dehydrogenase
GDP	Guanosindiphosphat
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GST	Glutation-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
GTPase	Guanosintriphosphatase
HA	Hämagglutinin
IP	immunoprecipitation
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
kDa	Kilodalton
LiPEG	Lithiumacetat-Polyethylenglykol
LiSorb	Lithiumacetat-Sorbitol

MAPK	mitogen-activated protein kinase
MBP	maltose binding protein
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mM	Millimolar
$\mu$ Ci	Microcurie
$\mu$ l	Microliter
$\mu$ M	Micromolar
N-terminal	Aminoterminal
Ni-NTA	nickel-nitrilotriacetic acid
OD	optische Dicht
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PBS/T	Phosphatgepufferte Salzlösung mit Tween
PCR	Polymerasekettenreaktion
Ras	<i>Rat sarcoma</i>
rpm	rotations per minute
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris-EDTA
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	Ultraviolett
V	Volt
w/v	weight/volume
YPD	yeast peptone dextrose
z.B.	zum Beispiel
5-FOA	5-Fluororotsäure



## 7.2 Danksagung

Ich danke Frau Prof. U. Just, für die Möglichkeit diese Arbeit in ihrer Arbeitsgruppe durchführen zu können. Ich danke Herrn Dr. T. Höfken für die exzellente Betreuung, hilfreiche Diskussionen und für die Übertragung der Begeisterung der Forschung mit *S. cerevisiae* an mich.

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

Ich bedanke mich bei meinen Kollegen der Arbeitsgruppe, mit denen ich die letzten drei Jahren verbracht habe. Ein besonderes Dankschön geht an meinen ehemaligen Kollege Dr. C. Tiedje, der sehr vorbildlich war.

Kiel, im Januar 2010

Meng Lin