

**Untersuchungen zur Zellwandbiogenese
der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae***

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
der Naturwissenschaftlichen Fakultät III
Biologie und Vorklinische Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von

Ilja Hagen

2002

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am 06.02.2002

Die Arbeit wurde angeleitet von Herrn Prof. Dr. Widmar Tanner

Prüfungsausschuß: Vorsitzender: Prof. Dr. G. Hauska

1. Prüfer: Prof. Dr. W. Tanner

2. Prüfer: Prof. Dr. R. Schmitt

3. Prüfer: Prof. Dr. P. Hegemann

1	Einleitung	1
1.1	<i>Aufbau der Zellwand</i>	2
1.1.1	Glukan	2
1.1.2	Chitin	3
1.1.3	Die Proteine der Zellwand	4
1.2	<i>Regulation der Zellwandbiogenese</i>	8
1.2.1	Zellzyklusregulation	9
1.2.2	MAP-Kinase Signaltransduktionswege	10
1.2.2.1	Der PKC-Signaltransduktionsweg	11
1.2.2.2	Der HOG-Signaltransduktionsweg	14
1.2.3	Kompensationsmechanismen bei Zellwandschäden	16
1.3	<i>Modifikationen der Zellwandproteine</i>	17
1.3.1	Protein N-Glykosylierung	17
1.3.2	Protein O-Glykosylierung	18
1.4	<i>Zielsetzung der Arbeit</i>	20
2	Material und Methoden	22
2.1	<i>Material</i>	22
2.1.1	Organismen	22
2.1.2	Plasmide und Genbanken	23
2.1.2.1	Plasmide für <i>E. coli</i>	23
2.1.2.2	Plasmide für <i>S. cerevisiae</i>	23
2.1.2.3	Genbank	23
2.1.3	Sonden für Northern Analysen	24
2.1.4	Oligonukleotide	24
2.1.5	Medien, Puffer und Lösungen	25
2.1.6	Enzyme, Chemikalien und Verbrauchsmaterial	27
2.1.7	Internetdienste	28
2.1.8	Software	28
2.2	<i>Methoden</i>	29
2.2.1	Anzucht der Organismen und Anlegen von Dauerkulturen	29
2.2.2	Allgemeine genetische Methoden	29
2.2.2.1	Elution von DNA aus Agarosegelen	29
2.2.2.2	Transformation von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	29
2.2.2.3	Isolierung von Plasmid-DNA aus Hefe	30

2.2.2.4	Isolierung von genomischer DNA aus Hefe.....	30
2.2.2.5	DNA-Sequenzanalyse	30
2.2.2.6	Isolierung von Gesamt-RNA aus Hefe mit saurem Phenol.....	30
2.2.2.7	Auftrennung und Nachweis von RNA	31
2.2.3	Methoden zur Expressions-Analyse mit DNA-Filtern	31
2.2.3.1	Isolierung von Gesamt-RNA aus Hefe für cDNA Synthesen	31
2.2.3.2	Einzelstrang-cDNA Synthese.....	32
2.2.3.3	Präzipitation von Nucleinsäuren mit TCA	32
2.2.3.4	Alkaline Gelelektrophorese.....	32
2.2.3.5	Hybridisierung und Regeneration von DNA-Filtern.....	33
2.2.4	Allgemeine proteinbiochemische Methoden	33
2.2.4.1	Proteinbestimmung.....	33
2.2.4.2	Auftrennung und Nachweis von Proteinen	33
2.2.4.3	Präparation von Zellwänden und Membranen für SDS-PAGE.....	34
2.2.4.4	Präparation von Zellwänden zur Zellwandanalyse	34
2.2.4.5	HF-Spaltung glykosylierter Proteine.....	35
2.2.5	Extraktion von Zellwandproteinen	35
2.2.5.1	Aga2p	35
2.2.5.2	Cts1p	35
2.2.5.3	Pir2p (Hsp150).....	36
2.2.5.4	Kre1p.....	36
2.2.6	Test auf Zellwandstabilität	36
2.2.7	Agglutinationstest.....	36
2.2.8	Komplementation von OSS-Mutanten	36
2.2.9	Synthese und Reinigung von Peptiden	37
2.2.9.1	Synthese unmodifizierter Peptide.....	37
2.2.9.2	Synthese mannosylierter Peptide	38
2.2.9.3	Kaisertest.....	38
2.2.9.4	Reinigung von Peptiden über HPLC.....	38
2.2.10	Kopplung eines Haptens an ein Träger-Protein.....	39
2.2.11	Gewinnung polyklonaler Antikörper.....	39
3	Ergebnisse.....	40
3.1	<i>Stabilität und Lokalisation von Zellwandproteinen in pmt-Mutanten.....</i>	<i>40</i>
3.1.1	Charakterisierung von Cts1p	40
3.1.1.1	Vergleich der Cts1p-Menge in Zellwand und Kulturmedium.....	41
3.1.1.2	<i>CTS1</i> -Expression.....	42

3.1.1.3	Intrazelluläre Cts1p Konzentration	42
3.1.1.4	Einfluß vakuolärer Proteasen auf die Cts1p Stabilität	43
3.1.1.5	Nachweis von Cts1p in Sekretionsmutanten	44
3.1.2	Aga2p – a-Agglutinin	47
3.1.3	Pir2p / Hsp150	50
3.1.3.1	Pir2p im Kulturmedium von <i>pmt</i> -Mutanten	51
3.1.3.2	Nachweis von Pir2p in Sekretionsmutanten	52
3.1.4	Northern Analyse von KAR2 und PRC1 in <i>pmt</i> -Mutanten	58
3.2	<i>Gewinnung eines polyklonalen Antiserums gegen ein mannosyliertes Peptid</i>	60
3.2.1	Synthese mannosylierter Peptide und Kopplung an ein Trägerprotein	60
3.2.2	Gewinnung polyklonaler Antiseren	61
3.3	<i>Screen nach neuen Zellwandproteinen</i>	63
3.3.1	Durchführung des Screenings	63
3.3.2	Charakterisierung der OSS-Mutanten	65
3.3.2.1	Mikroskopischer Phänotyp	65
3.3.2.2	Überlebensrate der OSS-Mutanten in H ₂ O	66
3.3.2.3	Analyse der Zellwand von OSS-Mutanten	67
3.3.3	Komplementation der OSS-Mutanten	68
3.3.3.1	Komplementation der Mutante OSS20	69
3.3.3.2	Komplementation der Mutante OSS41	71
3.3.3.3	Komplementation der Mutante OSS55	74
3.3.3.4	Komplementation der Mutante OSS78	77
3.3.3.5	Komplementationsversuche weiterer OSS-Mutanten	79
3.3.3.6	Identifizierung einer Punktmutation in <i>CHS4</i> aus OSP345	79
3.4	<i>Genom-weite Expressionsanalyse multipler Zellwandmutanten</i>	80
3.4.1	Die Ausgangsmutanten Δ PIR und Δ GPI	81
3.4.2	Durchführung der DNA-Filter-Analysen	82
3.4.3	Auswertung der Expressionsdaten	84
3.4.3.1	Differentielle Expression bekannter Zellwandprotein-kodierender Gene in der Δ GPI-Mutante	88
3.4.3.2	Differentielle Expression unbekannter offener Leserahmen in der Δ GPI-Mutante	89
3.4.4	Überprüfung einzelner Daten mittels Northern-Analyse	90
4	Diskussion	92
4.1	<i>Stabilität und Lokalisation von Zellwandproteinen in <i>pmt</i>-Mutanten</i>	92

4.1.1	Pir2p	92
4.1.2	Cts1p.....	93
4.2	<i>Screen nach synthetisch osmolabilen Zellwandmutanten</i>	96
4.3	<i>Genom-weite Expressionsanalyse in Zellwandmutanten</i>	101
4.3.1	Das transkriptionelle Profil der Δ PIR-Mutante	101
4.3.2	Das transkriptionelle Profil der Δ GPI-Mutante	102
4.3.3	Differentiell exprimierte Gene bekannter bzw. potentieller Zellwandproteine in der Δ GPI-Mutante.....	103
4.3.3.1	Differentielle Regulation bekannter offener Leserahmen	103
4.3.3.2	Differentielle Regulation unbekannter offener Leserahmen	105
5	Zusammenfassung	108
6	Literaturverzeichnis	110

1 Einleitung

Eine 100-200nm dicke Zellwand gewährleistet die strukturelle Integrität der Hefezelle *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*). Die mehrschichtige Struktur aus Kohlenhydratpolymeren und Proteinen macht bis zu 30% des Zell-Trockengewichts aus (Valentin, *et al.*, 1987; Fleet, 1991) und vermag einem Innendruck von 15 bar und mehr standzuhalten (Eamus und Jennings, 1986). Trotz dieser hohen mechanischen Stabilität ist die Zellwand keine starre Struktur konstanter Zusammensetzung. Sie verändert sich nicht nur während des Zellwachstums und verschiedener Differenzierungsprozesse, wie beispielsweise Sporulation oder Paarung, sondern auch in Anpassung an sich stetig verändernde Umweltbedingungen, wie z.B. der Osmolarität des umgebenden Mediums. Während die molekularen Komponenten, aus welchen die Zellwand aufgebaut ist, seit längerer Zeit bekannt und auch auf biochemischer Ebene gut untersucht sind, konnten erst in jüngster Zeit Erkenntnisse über die dynamische Biogenese der Zellwand und deren Regulation gewonnen werden. Unter pharmazeutischen Gesichtspunkten ist die Zellwand pathogener Hefen von besonderer Bedeutung, da sie sich in ihrem Aufbau wesentlich von der extrazellulären Matrix von Säugerzellen unterscheidet und somit ein ideales Ziel für die Entwicklung neuer Fungizide darstellt. Analog zu antibiotischen Wirkstoffen, welche den Aufbau der bakteriellen Zellwand inhibieren, könnten effektivere Therapeutika gegen pilzliche Krankheitserreger, wie z.B. *Candida albicans* (*C. albicans*), entwickelt werden. Derartige Mykosen haben in den letzten Jahren, nicht zuletzt als eine der häufigsten Koinfektionen bei Trägern des humanen Immundefizienz-Virus (HIV), stark zugenommen.

Die Bäckerhefe *S. cerevisiae* ist als Modellorganismus ideal, da sie nicht nur genetisch leichter zugänglich ist als ihre pathogenen Verwandten, sondern auch die genomischen Sequenzdaten seit 1996 vollständig verfügbar sind (Goffeau *et al.*, 1996). Eine Übertragung gewonnener Erkenntnisse von *S. cerevisiae* auf andere *Ascomyceten*, wie z.B. *C. albicans*, ist aufgrund gleicher bzw. ähnlicher Zusammensetzung der Zellwände wahrscheinlich. In beiden Fällen besteht diese aus Glukan, Chitin und Mannoproteinen. Ferner konnten für eine Vielzahl aus *S. cerevisiae* bekannter, an der Zellwandbiogenese beteiligter Proteine, Homologe in *C. albicans* identifiziert werden.

1.1 Aufbau der Zellwand

1.1.1 Glukan

Der Hauptbestandteil der Zellwand von *S. cerevisiae* ist mit ca. 60% Glukan. Bezüglich des Verknüpfungstyps der Glukose-Untereinheiten unterscheidet man zwischen β -1,3 und β -1,6 Glukan. Die aus durchschnittlich 1500 Glukosemolekülen bestehenden β -1,3 Glukanpolymere (Manners *et al.*, 1973) bilden ein dicht gepacktes, fibrilläres Netzwerk, welches zusammen mit eingelagerten Chitinfibrillen vor allem für die mechanische Stabilität der Zellwand verantwortlich ist (Zlotnik *et al.*, 1984, Cid *et al.*, 1995). Unter der Verwendung von UDP-Glukose als Zuckerdonor (Shematek *et al.*, 1980) wird die wachsende Glukankette durch die Membran ins Periplasma transloziert (Cabib *et al.*, 1982). Zwei Transmembranproteine, Fks1p und Fks2p, welche zu 88% identisch sind, wurden als katalytische Untereinheiten der β -1,3 Glukansynthase identifiziert, wobei Fks1p für den Großteil des synthetisierten β -1,3-Glukans verantwortlich ist. Während in einer entsprechenden *fks1*-Mutante der Glukangehalt um bis zu 75% reduziert ist (Mazur *et al.*, 1995; Ram *et al.*, 1998), ändert sich dieser in einer *fks2*-Mutante kaum. Für die Aktivität der β -1,3 Glukansynthase wird zudem das kleine G-Protein Rho1p in seiner GTP-gebundenen Form benötigt (Mazur *et al.*, 1996), welches zusammen mit Fks1p kolokalisiert nachgewiesen werden konnte (Qadota *et al.*, 1996). Eine ähnliche Interaktion wird ebenfalls für Fks2p postuliert.

Das in geringeren Mengen vorhandene β -1,6 Glukan (10% des Glukans) besteht aus durchschnittlich 140 hochgradig verzweigten Glukoseeinheiten, wobei bis zu 20% auch β -1,3 gebunden sein können (Manners *et al.*, 1973). Die Synthese dieses komplexen Polymers ist bislang im Detail nicht vollständig aufgeklärt, obwohl bereits zahlreiche daran beteiligte Gene und Proteine bekannt sind. Die Entdeckung, daß β -1,6 Glukan einen wichtigen Teil des Zelloberflächenrezeptors für das K1 Killertoxin darstellt (Hutchins und Bussey, 1983), war die Voraussetzung für die Identifizierung zahlreicher Gene und Genprodukte, die potentiell an der β -1,6 Glukansynthese beteiligt sind. Ferner konnten weitere Gene über einen *Screen* nach *Calcofluor White*-hypersensitiven Mutanten gefunden werden (zusammengefaßt in Shahinian und Bussey, 2000). Obwohl einige der Genprodukte analog zur β -1,3 Glukansynthese an der Zelloberfläche lokalisiert wurden (Kre1p, Kre9p, Knh1p) geht man dennoch davon aus, daß die β -1,6 Glukansynthese bereits im sekretorischen Weg initiiert wird, da ebenso eine Vielzahl von

Proteinen im ER (Cne1p, Cwh41p, Kre5p, Rot2p) oder Golgi (Kre6p, Skn1p) gefunden wurden. Es wird daher eine mehrstufige, protein-, und membrangebundene Synthese postuliert, welche im ER über Primer-Strukturen initiiert, im Golgi verlängert und letztlich an der Zelloberfläche beendet wird (zusammengefaßt in Orlean, 1997; Shahinian und Bussey, 2000). Vergebliche Versuche β -1,6 Glukan in späten sekretorischen Vesikeln nachzuweisen stellen diese Theorie in Frage und machen eine β -1,6 Glukansynthese an der Zelloberfläche, eventuell auch unter Beteiligung der β -1,3 Glukansynthase (Fks1p) wahrscheinlicher (Montijn *et al.*, 1999; Ohya, persönliche Mitteilung).

Kollar *et al.* (1997) konnten zeigen, daß das β -1,6 Glukanpolymer ein zentrales Verbindungselement der verschiedenen Zellwandkomponenten darstellt. Demzufolge ist β -1,6 Glukan zum einen durch eine noch ungeklärte Bindung an die terminale Glukose einer β -1,3 Glukankette, zum anderen auch direkt an Chitin gebunden. Desweiteren ist eine Gruppe der Mannoproteine über einen Glykosyl-Phosphatidyl (GPI)-Ankerrest mit β -1,6 Glukan verknüpft (Kollar *et al.*, 1997; siehe 1.1.3).

Das β -1,6 Glukan ist für *S. cerevisiae* zwar nicht essentiell, dennoch weisen z.B. *kre5*-Mutanten, die kein nachweisbares β -1,6 Glukan besitzen, schwere Wachstums- und Zellwanddefekte auf, welche abhängig vom Stammhintergrund auch zur Letalität führen können (Maeden *et al.*, 1990; Shahinian *et al.*, 1998). In *kre5*-Mutanten konnte von Simons *et al.* (1998) elektronenmikroskopisch das Fehlen der äußeren Mannoproteinschicht der Zellwand gezeigt werden.

1.1.2 Chitin

Chitin, das dritte und nur in geringen Mengen vorhandene Kohlenhydratpolymer (1-2%) der Zellwand, besteht aus β -1,4-glykosidisch gebundenen N-Acetyl-D-Glukosamin-einheiten. Es wird vor allem während der Knospung bei der Bildung des Septums und des Knospungsrings in die Zellwand eingelagert (Shaw *et al.*, 1991) und ist, trotz seiner vergleichsweise geringen Menge, ein für die Integrität der Zellwand essentieller Bestandteil (Bulawa, 1993). Das Chitin bildet zusammen mit Glukan die innere Zellwandschicht, welche sich im Elektronenmikroskop gut von der äußeren, vornehmlich aus Mannoproteinen bestehenden Schicht unterscheiden läßt (Cid *et al.*, 1995).

Drei integrale Membranproteine, Chs1p, Chs2p und Chs3p sind zusammen mit weiteren regulatorischen Proteinen für die Chitinsynthese von *S. cerevisiae* verantwortlich, wobei Chs3p ca. 95% des Zellwandchitins synthetisiert (Bulawa *et al.*, 1986; Silverman *et al.*, 1988; Roncero *et al.*, 1988). Dazu zählen der Chitinring zu Beginn der Knospung und das Chitin der lateralen Zellwand ebenso wie die Chitinsynthese während der Paarung und der Sporulation (Shaw *et al.*, 1991; Bulawa, 1992).

Die Chitinsynthase Chs2p ist ausschließlich verantwortlich für die Bildung des primären Septums bei der Knospung (Bulawa, 1992). Eine Reparaturfunktion wird für Chs1p postuliert, wodurch hydrolysiertes Chitin während der Zytokinese wieder erneuert wird (Cabib *et al.*, 1992).

1.1.3 Die Proteine der Zellwand

Die Mannoproteinschicht ist, anders als Glukan und Chitin nicht direkt an der Aufrechterhaltung der strukturellen Integrität beteiligt. Es konnte gezeigt werden, daß die Hefezelle ihre Form auch nach proteolytischem Verdau der äußeren Zellwandschicht aufrechterhalten kann (Koch und Rademacher, 1980; Zlotnik, *et al.*, 1984). Vielmehr scheint die Mannoproteinschicht für die Permeabilität der Zellwand limitierend zu sein (De Nobel *et al.*, 1990; Van der Vaart *et al.*, 1995). Obwohl die Mannoproteine mit ca. 40% des Zellwandtrockengewichts einen Hauptbestandteil darstellen, entsprechen davon nur 25% dem Proteinanteil. Der überwiegende Teil der Masse kommt durch zahlreiche N- und O-glykosyidisch gebundene Zucker zustande (Orlean, 1997; siehe 1.3).

Je nach Verankerung in der Zellwand lassen sich drei verschiedene Gruppen von Zellwandproteinen unterscheiden.

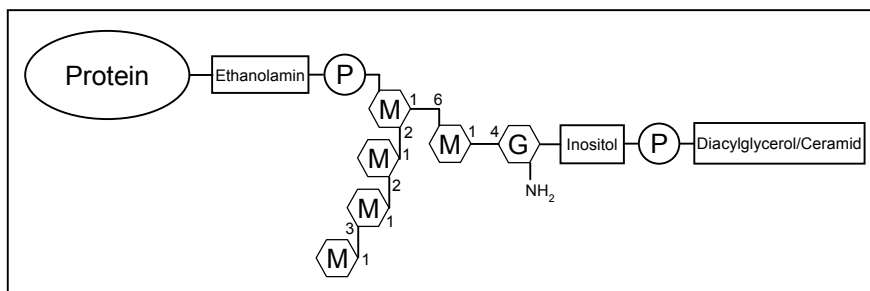


Abb. 1-1: Struktur des GPI-Ankers (Nach Orlean, 1997)

M = Mannose; G = Glucose; P = Phosphatgruppe

Kovalent mit dem Glukan der Zellwand verbunden sind die PIR-Proteine und Proteine mit Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-Ankerrest. Das Hefegenom kodiert für insgesamt 58 Proteine, die neben einem Signalpeptid für die Sekretion, eine hydrophobe Sequenz (ω -Motiv) für die Übertragung eines GPI-Ankers aufweisen (Caro *et al.*, 1997; Orlean, 1997). Durch diese C-terminale Modifikation (Abb. 1-1), die in allen höheren Eukaryonten zu finden ist, werden sekretorische Proteine zunächst in der Plasmamembran verankert. In *S. cerevisiae* wurden GPI-Anker zum ersten Mal durch eine *in vivo* Markierung von Proteinen mit [³H]Insositol nachgewiesen, welches kovalent als Teil des GPI-Ankers an diese gebunden war (Conzelmann *et al.*, 1988). Mit dem α -Agglutinin Ag α 1p wurde das erste entsprechend modifizierte Protein mit Hilfe von Glukanasen aus der Zellwand extrahiert (Hauser und Tanner, 1989; Roy *et al.*, 1991). Eine Aufklärung, auf welche Weise die Proteine dabei am Glukan der Zellwand gebunden sind, erfolgte 1997 von Kollar *et al.*, die zeigen konnten, daß eine kovalente Bindung an das nicht reduzierende Ende von β -1,6 Glukan über einen Teil des GPI-Ankers erfolgt. Die an der Übertragungsreaktion beteiligten Enzyme sind bislang jedoch ebenso unbekannt, wie der Mechanismus selbst. Strittig ist ferner, ob der GPI-Anker ein generelles Motiv für eine Zellwandverankerung und damit die membrangebundene Form nur ein Übergangsstadium darstellt (De Sampaio *et al.*, 1999). Verschiedene Arbeitsgruppen gehen davon aus, daß nur 38 Proteine, welche kein dibasisches Sequenzmotiv unmittelbar vor dem GPI-Signal selbst besitzen, durch eine Spaltung des GPI-Ankers auf die Zellwand übertragen werden (Caro *et al.*, 1997; Vossen *et al.*, 1997; Hamada *et al.*, 1998; 1999). Dafür spricht, daß allen bisher aus der Zellwand extrahierten GPI-Proteinen dieses dibasische Motiv fehlte. Andererseits verblieb ein genetisch entsprechend verändertes Zellwandprotein (Cwp2p) weiterhin in der Zellwand lokalisiert (Caro *et al.*, 1997).

Bisher konnten mit verschiedenen Methoden 13 GPI-Proteine direkt in der Zellwand von *S. cerevisiae* identifiziert werden (Hauser und Tanner, 1989; Roy *et al.*, 1991; Van der Vaart *et al.*, 1995; Bony *et al.*, 1997; Kitagaki *et al.*, 1997; Moukadiri *et al.*, 1997; Shimoï *et al.*, 1998; Mrsa *et al.*, 1999; Rodríguez-Peña *et al.*, 2000). Einen indirekten Hinweis auf weitere GPI-Proteine lieferte ein Screen in welchem die 40 C-terminalen Aminosäuren von 38, potentiell in der Zellwand verankerten, Proteine an ein Reporterkonstrukt aus Signalpeptid, α -Galaktosidase und Hemagglutinin fusioniert wurden (Hamada *et al.*, 1998). Auf diese Weise konnte für die Genprodukte von 14

neuen offenen Leserahmen eine putative Zellwandlokalisierung durch einen GPI-Ankerrest gezeigt werden.

Allen GPI-Proteinen gemein ist der sehr hohe Serin/Threonin Anteil von bis zu 50% der Gesamtaminoacids. Dies läßt auf eine extensive O-Glykosylierung (1.3.2) schließen und erklärt damit weshalb einige Vertreter dieser Gruppe trotz ihrer relativ kurzen Proteinsequenz auf SDS-Gelen ein großes apparentes Molekulargewicht aufweisen. Über phylogenetische Stammbäume wurden die potentiellen GPI-Proteine in Familien eingeteilt (Caro *et al.*, 1997), wobei für die meisten noch keine eindeutige Funktion nachgewiesen wurde. Zu den Ausnahmen gehören die Agglutinine (Aga1p, Aga1p) und einige Flokuline (Flo1p, Flo5p, Flo9p, Flo10p) für die eine Beteiligung an der Zell-Zell Adhäsion gezeigt werden konnte (Hauser und Tanner, 1988; Roy *et al.*, 1991; Teunissen *et al.*, 1995). Allgemein wird angenommen, daß die GPI-Proteine vor allem strukturelle Funktionen als Zellwandbausteine besitzen, da die meisten bisher untersuchten Deletionsmutanten eine geschwächte Zellwand aufweisen, das sich unter anderem in einer Hypersensitivität gegenüber Zellwand-destabilisierenden Agenzien wie *Calcoflour White* und Kongorot zeigt (Van der Vaart *et al.*, 1995, Mrsa *et al.*, 1999). Diesen Phänotyp besitzen auch *crh1*-, und *crh2*-mutante Stämme (congo red hypersensitiv). Die beiden Proteine gehören zu der Gruppe über GFP-Fusion nachgewiesener Zellwandproteine und weisen signifikante Homologien zu bakteriellen β -Glukanasen bzw. eukaryontischen Endotransglykosidasen auf. Colokalisiert mit Chitin könnten sie daher eine Rolle bei der Quervernetzung der verschiedenen Zellwandkomponenten spielen (Rodríguez-Peña *et al.*, 2000).

Von der zweiten Gruppe der kovalent am Glukan gebundenen Zellwandproteine konnten bislang vier Vertreter direkt, durch eine Behandlung präparierter Zellwände mit 30mM NaOH, extrahiert werden (Mrsa *et al.*, 1997). Die Proteine Ccw5p – Ccw8p (covalantly linked cell wall) werden auch als Pir1p – Pir4p (protein with internal repeat) bezeichnet, da sie eine oder mehrere hochkonservierte repetitive Sequenzen besitzen (Toh-e *et al.*, 1993; Mrsa *et al.*, 1997). Sie sind zueinander homolog, ebenfalls sehr Serin/Threonin reich und enthalten eine N-terminale Prozessierungsstelle für die Golgi-Protease Kex2p. Das Fehlen einer GPI-Ankersequenz läßt, neben der Alkali-Sensitivität bereits auf eine andere Art der Zellwand-Verankerung dieser Proteinfamilie schließen. Wie die GPI-Proteine können die PIR-Proteine zwar ebenfalls mit β -1,3 Glukanase aus der Zellwand gelöst werden, jedoch nicht mit β -1,6 Glukanase (Kapteyn *et al.*, 1999).

Es wurde daher eine direkte, β -1,6 Glukan unabhängige Bindung der PIR-Proteine an das β -1,3 Glukan der Zellwand postuliert. Die Beobachtung, daß β -1,3 Glukanase extrahiertes Pir1p und Pir2p zwar von β -1,3 Glukan-, nicht aber von β -1,6 Glukan-Antiserum erkannt wird, stützt diese Theorie. Die Art der Bindung und welche Enzyme an der Verknüpfungsreaktion beteiligt sind konnte bislang noch nicht geklärt werden.

Über die Funktion der PIR-Proteine in der Zellwand ist bislang wenig bekannt. Einzeldelationen PIR-Protein codierender Gene führen nur zu geringfügig erhöhter Sensitivität gegenüber *Calcofluor White* und Kongorot. Mehrfachdeletionen verstärken zwar diesen Phänotyp, die Mutanten sind aber lebensfähig (Mrsa und Tanner, 1999). Mit Pir2p wurde das erste PIR-Protein zunächst als ein ins Medium sezerniertes Hitzeschockprotein Hsp150 identifiziert, dessen Transkriptmenge bei 37°C im Vergleich zu 30°C um das 7fache ansteigt (Russo *et al.*, 1992). Das Verhältnis von sezerniertem zu Zellwand gebundenem Pir2p liegt dabei bei 4,4 : 1 (Kapteyn *et al.*, 1999). Ein vermuteter genereller Einfluß erhöhter Temperatur auf die Transkription und vor allem die Menge aller PIR-Proteine in der Zellwand konnte aber nicht bestätigt werden (Mrsa *et al.*, 1997). Ferner weisen lediglich *pir1pir2*-Doppelmutanten eine erhöhte Sensitivität gegenüber Hitzeschock auf (Toh-e *et al.*, 1993).

Ein weiterer offener Leserahmen, YJL160c erfüllt in *S. cerevisiae* die Kriterien eines PIR-Proteins und ist ebenfalls sehr homolog zu den bekannten vier Vertretern, jedoch gelang es bisher nicht das entsprechende Protein in der Zellwand nachzuweisen (M. Ecker, persönliche Mitteilung).

Die dritte Gruppe der Zellwandproteine werden als Scwp (soluble cell wall protein) bezeichnet und lassen sich unter reduzierenden Bedingungen, beispielsweise mit geringen Konzentrationen DTT oder Laemmli-Puffer aus der Zellwand extrahieren (Valentin *et al.*, 1984; Montijn *et al.*, 1994; Cappellaro *et al.*, 1998). Man kann daher davon ausgehen, daß sie über Disulfidbrücken an andere Komponenten der Zellwand gebunden sind. Bei den sechs bislang identifizierten Vertretern dieser Gruppe handelt es sich um Enzyme mit bereits nachgewiesener glykolytischer bzw. hydrolytischer Aktivität oder Homolgen dazu. Darunter sind die Endochitinase Cts1p und die Exoglukanase Exg1p, welche zunächst als ins Medium sezernierte Proteine identifiziert wurden (Kuranda *et al.*, 1991; Vazquez *et al.*, 1991), desweiteren Bgl2p, für das bereits β -1,3 Endoglukanase- (Mrsa *et al.*, 1993) und Transglykosidaseaktivität (Goldman *et al.*, 1995) beschrieben wurde.

Für Scw4p, Scw10p und Scw3p konnte bisher noch keine hydrolytische oder glykolytische Funktion nachgewiesen werden. Scw4p und Scw10p sind zu 63% identisch zueinander und ca. 55% homolog zu Bgl2p (Cappellaro *et al.*, 1998). Eine gleichzeitige Disruption von *SCW4* und *SCW10* führt zu einer Beeinträchtigung der Zellwandstruktur. Dies zeigt sich, neben einer Hypersensitivität gegenüber *Calcofluor White*, vor allem durch eine im Vergleich zum WT stark erhöhte Proteinmenge, welche mit DTT aus der Zellwand extrahiert werden kann. Man kann daher von einer wesentlichen Funktion beider Proteine bei der Quervernetzung der Zellwandbestandteile ausgehen.

Aufgrund eines charakteristischen, 258 Aminosäuren langen, C-terminalen Sequenzmotivs wird Scw3p/Sun4p zur SUN (*SIM1*, *UTH1*, *NCA3*) Proteinfamilie gezählt (Mouassite *et al.*, 2000). Obwohl Scw3p das einzige in der Zellwand von *S. cerevisiae* nachgewiesene Protein dieser Familie ist, weisen alle Mitglieder Homologie zu einer β -Glukosidase aus *Candida wickerhamii* (*CwBglA*) auf. Ein funktionelles Scw3p scheint ferner wichtig für die Trennung von Mutter- und Tochter-Zelle zu sein. So verbleiben in *scw3*-Mutanten mehrere Zellen miteinander verbunden, wobei auch die einzelnen Septen zwischen Mutter- und Tochterzelle im Vergleich zum Wildtyp starke Verdickungen aufweisen. Dieser Phänotyp wird durch eine zusätzliche Deletion von Chitinase *CTS1* noch verstärkt (Mouassite *et al.*, 2000). Cts1p, das zum Teil über eine C-terminale Domäne nicht kovalent an das Chitin der Zellwand gedunden ist, hydrolysiert spezifisch die Chitinschicht des primären Septums (Kuranda und Robbins, 1991).

Obwohl keines der bisher identifizierten löslichen Zellwandproteine eine essentielle Funktion für die osmotische Stabilität der Zelle besitzt, scheint die Familie hydrolytischer und glykolytischer Enzyme einen wesentlichen Beitrag zur Flexibilität und Stabilität der Zellwand zu leisten.

1.2 Regulation der Zellwandbiogenese

Die verschiedenen Komponenten der Zellwand unterliegen vielfältigen Regulationsmechanismen, die eine Anpassung der Zelle und ihrer Wand während definierter entwicklungspezifischer Programme, wie z.B. Sporulation und Paarung und als Reaktion auf veränderliche Umweltbedingungen gewährleisten. Auch künstliche Schwächungen der Zellwand durch Mutationen oder Hemmstoffe der Zellwandsynthese

können durch spezielle Mechanismen kompensiert werden. Transkriptionelle Veränderungen werden dabei vor allem durch spezifische MAP (mitogen activated protein)-Kinase Signaltransduktionswege vermittelt (zusammengefaßt in Gustin *et al.*, 1998). Außerdem sind vor allem für Zellwandkomponenten kodierende Gene besonders Zellzyklus-spezifisch reguliert. In den letzten Jahren konnte, besonders durch die Technik der Transkriptom-Analyse mit Hilfe von DNA-Arrays, das Wissen über transkriptionelle Regulationen und deren Zusammenhänge enorm erweitert werden.

1.2.1 Zellzyklusregulation

Von Spellman *et al.* (1998) wurde das *S. cerevisiae* Transkriptom in Abhängigkeit des Zellzyklus untersucht, wobei sich zeigte, daß nur ca. 13% aller Gene eine auffällige Regulation aufweisen. Im Vergleich dazu werden 50% der für Zellwandproteine kodierenden Gene Zellzyklus-abhängigen reguliert. Das Bereitstellen neuen Zellwandmaterials in sekretorischen Vesikeln der Mutterzelle bereits vor der Knospung und ein ungleichmäßiges Wachstum der Zelloberfläche während des Zellzyklus führt dazu, daß die Mehrzahl der Zellwandgene ihr Expressionsmaximum in der späten M-, bzw. frühen G1-Phase erreicht (Caro *et al.*, 1998). Unter diesen zeigen die Gene der PIR-Proteine die stärkste transkriptionelle Regulation. Dabei verhalten sich die Expressionsraten von *PIR2*, *PIR3* und *PIR4* ähnlich denen klassischer Zellzyklusgene *CLN2*, *ASH1* oder *HTA1*, bei *PIR1* ist das Verhältnis zwischen Transkriptionsminimum und -Maximum sogar mehr als doppelt so hoch (Spellman *et al.*, 1998).

Eine ähnliche, wenn auch weniger ausgeprägte Regulation konnte für zwei potentielle Glukanasen *SCW10* und *CRH1* ermittelt werden, was auch ihre postulierte Rolle bei der Quervernetzung der Zellwandkomponenten bestärkt.

Auch die Synthese der Kohlenhydratpolymere der Zellwand, β -1,3 Glukan und Chitin wird Zellzyklus-abhängig kontrolliert. Die β -1,3 Glukansynthase *FKS1*, erreicht ihr Expressionsmaximum am Ende der G1-Phase, wobei gezeigt wurde, daß zusätzlich der Zellwand-Integritäts-Weg (siehe 1.2.2.1) für diese Regulation benötigt wird (Iguar *et al.*, 1996). Die Hauptchitinsynthase *CHS3* wird zwar konstitutiv exprimiert, jedoch wird ihre Aktivität und Lokalisation indirekt durch verschiedene Proteine (*Chs4p*, *Chs5p*, *Chs6p/Csd3p*, *Chs7p*) während des Zellzyklus kontrolliert (Orlean *et al.*, 1997).

1.2.2 MAP-Kinase Signaltransduktionswege

Insgesamt sind bei *S. cerevisiae* fünf funktionell unterschiedliche MAP-Kinase Signaltransduktionswege bekannt (Hunter und Plowman, 1997). Allgemeines Merkmal dieser Signalkaskaden sind Module aus jeweils drei aufeinanderfolgenden Proteinkinasen, wobei nach einer Aktivierung die MAP Kinase Kinase Kinase (MAPKKK) die MAP Kinase Kinase (MAPKK) phosphoryliert, durch welche wiederum die MAP Kinase (MAPK) phosphoryliert wird (Cobb *et al.*, 1995; Cooper, 1994; Marshall, 1994). Die vier in vegetativ wachsenden Zellen vorhandenen MAP-Kinase Wege und einige ihrer Komponenten sind in Abbildung 1-2 dargestellt.

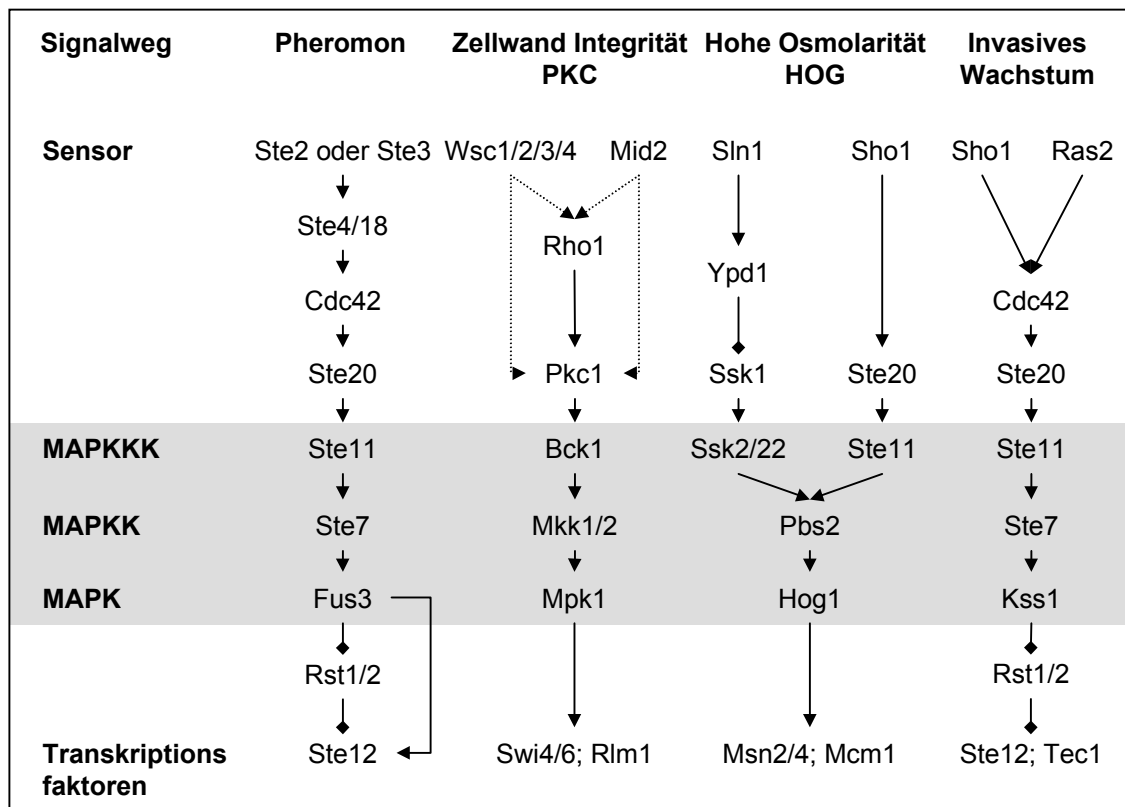


Abb. 1-2: Modell verschiedener MAP-Kinase-Wege (nach Roberts *et al.*, 2000)

Der Pheromon-Weg wird ausgelöst durch α - bzw. a-Faktor. Neben dem Transkriptionsfaktor Ste12p werden durch Fus3p auch dessen negative Regulatoren Rst1p und Rst2p durch Phosphorylierung aktiviert. Nicht gezeigt ist die Aktivierung von Far1p, einem Inhibitor der Cdc28-Cylin Kinase, durch Fus3p, wodurch ein G1-Zellzyklusarrest ausgelöst wird.

Hypoosmolare Bedingungen, erhöhte Temperatur und andere Streßfaktoren aktivieren den Zellwand-Integritäts oder Proteinkinase C (PKC)-Weg. Unklar ist, ob die Sensorproteine Wsc1p-Wsc4p und Mid2p, Pkc1p direkt oder über das kleine G-Protein Rho1p aktivieren.

Der „High Osmolarity Glycerol Response“ (HOG) Signaltransduktionsweg wird durch hyperosmolaren Schock aktiviert und stellt damit einen Antagonisten des PKC-Wegs dar.

In diploiden Zellen löst Stickstoffmangel pseudohyphales Wachstum aus. Ein ähnlicher Phasenwechsel zu invasivem Wachstum kann auch bei haploiden Zellen auf Vollmedium beobachtet werden.

Die Sporulation-MAP-Kinase (Smk1p) des, unter anderem für die Synthese der Sporenwand verantwortlichen, fünften Signaltransduktionswegs ist in vegetativ wachsenden Zellen nicht vorhanden (Gustin *et al.*, 1998).

Obwohl die jeweiligen Auslöser der verschiedenen MAP-Kinase-Wege sehr unterschiedlicher Natur sind, überlappen manche Komponenten der jeweiligen Signaltransduktionskaskaden ebenso wie deren Transkriptionsfaktoren und Zielgene. Wie dabei die Spezifität des Signaltransduktionswegs erhalten bleibt ist zum Teil noch ungeklärt. Eine bereits bekannte Möglichkeit ist die Komplexierung gemeinsamer Elemente mit spezifischen Komponenten. So aktiviert beispielsweise der Transkriptionsfaktor Ste12p (*sterile*) im Pheromon-Signaltransduktionsweg als Homomultimer die Promotoren Paarungs-spezifischer Gene, während ein Heteromultimer aus Ste12p und Tec1p für filamentöses Wachstum wichtige Gene aktiviert (Leberer *et al.*, 1997; Madhani *et al.*, 1997).

Die Fähigkeit von *S. cerevisiae* schnell auf sich ändernde Umweltbedingungen zu reagieren wird vor allem durch den PKC-Weg und den HOG-Weg gewährleistet. Osmotische Veränderungen des umgebenden Mediums beeinflussen direkt den Turgor der Zelle und gefährden so die Integrität der Zellwand.

1.2.2.1 Der PKC-Signaltransduktionsweg

Der Aktivator des aus Bck1p (MAPKKK), Mkk1/2p (MAPKKs) und Mpk1p (MAPK) bestehenden MAP-Kinase-Moduls des Zellwand-Integritäts-Wegs ist die Proteinkinase Pkc1p, ein Homolog der Proteinkinase C aus Säugerzellen. Eine *pkc1*-Nullmutante ist, abhängig vom Stammhintergrund, letal oder nur durch osmotische Stabilisierung des Mediums lebensfähig und zeigt damit den stärksten Phänotyp aller bisher untersuchten Komponenten dieses Signaltransduktionswegs. Eine Deletion von *PKC1* hat ferner direkte Auswirkungen auf die Beschaffenheit der Zellwand. So zeigt eine *pkc1*-Mutante unter osmotisch stabilisierten Bedingungen eine deutlich reduzierte Dicke der Zellwand, wobei sowohl die β -Glukan-, als auch die Mannoproteinschicht betroffen sind (Levin *et al.*, 1994; Roemer *et al.*, 1994; Shimizu *et al.*, 1994).

Der PKC-Weg wird durch verschiedene Reize, wie hypoosmolaren Schock oder Hitzestress aktiviert, wobei die Aufnahme der Reize durch die Typ-I-Transmembranproteine Wsc1-4p (*cell wall integrity and stress response component*) erfolgt. Die in der Plasmamembran lokalisierten WSC-Proteine sind auf Proteinebene

50% homolog und 35% identisch zueinander und haben gemeinsame, charakteristische Merkmale. Neben einer potentiellen Transmembranspanne enthalten alle eine periplasmatische, Serin/Threonin reiche Domäne, welche in ihrer Länge variiert und vermutlich vielfach O-glykosyliert ist. Es wird vermutet, daß dadurch eine starre Verbindung mit der Zellwand hergestellt werden könnte (siehe 1.3.2). Am ebenfalls extrazellulär gelegenen N-Terminus befindet sich ferner ein hochkonserviertes Cystein Motiv (Verna *et al.*, 1997). Im Gegensatz zu *wsc2-4*, führt eine *WSC1*-Deletion zu einem Zell-Lyse Defekt bei 37°C, was auf eine zentrale Funktion von Wsc1p innerhalb der Familie schließen läßt. Dieser Effekt kann durch Deletionen weiterer *WSC*-Gene verstärkt, aber auch mit osmotischer Stabilisierung des Mediums, sowie durch Überexpression anderer Komponenten des Signaltransduktionswegs unterdrückt werden (Verna *et al.*, 1997). Ferner wird der PKC-Weg während des Paarungsprozesses, welcher ebenfalls eine extensive Umorganisation der Zellwand erfordert, über das Membranprotein Mid2p (*mating induced death*) aktiviert. Eine entsprechende Mutante zeigt einen charakteristischen Zell-Lyse Defekt nach einer Inkubation mit Pheromon, welcher durch eine Überexpression von *WSC1* supplemiert werden kann (Ketela *et al.*, 1999). Diese Beobachtung, verbunden mit der Tatsache, daß ein intaktes Mid2p zur Aktivierung der MAP-Kinase Mpk1 nach einer Zellwand-Schädigung notwendig ist, läßt auf eine überlappende Funktion beider Proteine als Sensoren des PKC-Wegs schließen (de Nobel *et al.*, 2000). Auf welche Weise die Informationen durch die Sensor-Proteine auf Pkc1p übertragen werden, ist noch nicht vollständig geklärt, obwohl zahlreiche weitere, Pkc1p übergeordnete Elemente bekannt sind.

Eine wichtiger, direkter Aktivator von Pkc1p ist das kleine GTP-bindende Protein Rho1p (*ras homologue*) (Nonaka *et al.*, 1995). Positiv reguliert wird es durch die GDP/GTP Austausch Faktoren Rom1p und Rom2p (*rho1 multicopy suppressor*) sowie negativ durch die GTPase aktivierenden Proteine Bem2p (*bud emerge*) und Sac7p (*suppressor of actin*). Die phosphorylierte Form von Rho1p führt dabei zu einer Aktivierung von Pkc1p (zusammengefaßt in Heinisch *et al.*, 1999). Ferner erfüllt Rho1p die Funktion einer regulatorischen Untereinheit der β -1,3 Glukansynthase (Fks1p) und ist somit direkt an der Zellwandbiogenese beteiligt (Drgonova *et al.*, 1996; Quadota *et al.*, 1996). Als weitere Pkc1p übergeordnete Komponente konnte Tor2p (*target of rapamycin*) identifiziert werden, welches ein Aktivatorprotein von Rom2p darstellt (Schmidt *et al.*, 1997). Verschiedene Untersuchungen deuten darauf hin, daß

Zellwanddefekte Rom2p- und Rho1p-, nicht aber Tor2p-abhängig zu einer Aktivierung von Pkc1p führen (Bickle *et al.*, 1998).

Unterhalb des MAP-Kinase Moduls konnten als direkte Zielproteine von Mpk1 die Transkriptionsfaktoren Rlm1 (Watanabe *et al.*, 1995) und SBF (*SCF-binding factor*), ein Heterodimer aus Swi4p und Swi6p (Madden *et al.*, 1995), identifiziert werden. SBF ist Ziel verschiedener regulatorischer Signaltransduktionswege und notwendig für eine normale Expression verschiedener Cyclin Gene beim Übergang von G1 zur S-Phase. Damit stellt SBF einen Hauptregulator des Zellzyklus beim G1/S-Übergang und des polarisierten Wachstums von *S. cerevisiae* dar. Nur ein Teil der SBF-Zielgene ist tatsächlich abhängig von phosphoryliertem Mpk1 bzw. einem aktivierten PKC-Weg, wobei der molekulare Mechanismus unbekannt ist (zusammengefaßt in Gustin *et al.*, 1998; Heinisch *et al.*, 1999).

Zielgene von Rlm1p sind vor allem Zellwandgene und Gene, deren Produkte an der Synthese der Zellwand beteiligt sind. In einer Genom-weiten Analyse konnten 25 Gene identifiziert werden, deren Expressionen durch ein konstitutiv aktives Mkk1p beeinflusst werden. Alle transkriptionellen Veränderungen waren dabei ebenso abhängig von Rlm1p (Jung und Levin, 1999).

In der Tabelle 1-1 sind exemplarisch einige Gene dargestellt, deren Expression über den PKC-Weg reguliert wird.

<u>GPI-Proteine:</u>	
<i>SEDI</i>	Zellwandprotein unbekannter Funktion
<i>PST1</i>	potentielles Zellwandprotein
<i>CRH1</i>	potentielle β -1,3 Glukanase
<i>CWPI</i>	Zellwandprotein unbekannter Funktion
<i>SSRI/CCW14</i>	Zellwandprotein unbekannter Funktion
<u>PIR-Proteine</u>	
<i>PIR1</i>	Zellwandprotein unbekannter Funktion
<i>PIR2</i>	Zellwandprotein unbekannter Funktion
<i>PIR3</i>	Zellwandprotein unbekannter Funktion
<i>PIR4</i>	Zellwandprotein unbekannter Funktion
<u>Andere Zellwandproteine</u>	
<i>BGL2</i>	Endoglukanase
<i>YGPI</i>	Zellwandprotein unbekannter Funktion
<u>An der Zellwandbiogenese beteiligt:</u>	
<i>MPK1</i>	MAP-Kinase
<i>FKS2</i>	β -1,3 Glukansynthase
<i>FKS1</i>	β -1,3 Glukansynthase
<i>CHS3</i>	Chitinsynthase

Tab. 1-1: PKC-Weg abhängig regulierte Gene (nach Jung und Levin, 1999)

Die bereits erwähnten Wechselwirkungen des PKC-Wegs mit dem Zellzyklus, sowie zahlreiche Hinweise auf eine Aktivierung der Signalkaskade auch bei der Knospen-, oder „shmoo“-Bildung während der Paarung (Mazzoni *et al.*, 1993; Zarzov *et al.*, 1996), verdeutlichen die Schlüsselfunktion des Zellwandintegritätswegs bei allen morphologischen Veränderungen der Hefezelle, welche eine Umordnung der Zellwand erfordern (Heinisch *et al.*, 1999).

1.2.2.2 Der HOG-Signaltransduktionsweg

Für die Integrität einer wachsenden Hefezelle ist ein osmotischer Gradient an der Plasmamembran nötig, der zu einer Wasseraufnahme aus dem umgebenden Medium und damit zur Erzeugung eines Turgors führt. Die intrazelluläre Osmolarität muß daher stets über der extrazellulären liegen. Eine weitere MAP-Kinase Kaskade reguliert die Anpassung der Hefezelle an hypertones Milieu, welches ein Schrumpfen der Zelle zur Folge hätte und damit vor allem für die Struktur der Zellwand einen Streßfaktor darstellt. Da eine Hauptantwort des Signaltransduktionswegs eine Erhöhung intrazellulärer Osmolyte durch Steigerung der Glycerinbiosynthese ist, wird der Signaltransduktionsweg als HOG (*high osmolarity glycerol response*)-Weg bezeichnet (Abb. 1-2). Allgemein sind die Funktionen des HOG-Wegs die Induktion von spezifischen Streßantwort-Genen (Schuller *et al.*, 1994), die Wiederherstellung der Morphogenese (Brewster und Gustin, 1994) sowie die Repression des Pheromon-Signaltransduktionswegs (Hall *et al.*, 1996).

Das zentrale MAP-Kinase Modul besteht aus fünf Proteinkinasen. Drei MAPKKKs Ssk2p/Ssk22p und Ste11p aktivieren die MAPKK Pbs2p, welche wiederum die MAPK Hog1p phosphoryliert (zusammengefaßt in Gustin *et al.*, 1998). Die Reizaufnahme erfolgt durch die in der Plasmamembran lokalisierten Sensorproteine Sho1p und Sln1p, wobei der molekulare Mechanismus noch unbekannt ist. Es gilt jedoch als erwiesen, daß durch die Sensorproteine tatsächlich eine Veränderung des Turgors und keine Konzentrationsänderung extrazellulärer Osmolyte bzw. intrazellulären Wassers wahrgenommen wird (Gustin *et al.*, 1998; Tamás *et al.*, 2000). Eine Aktivierung des Signaltransduktionswegs bzw. des MAPK-Moduls erfolgt über zwei verschiedene, voneinander unabhängige Mechanismen.

Die Sln1p (*synthetic lethal of N-end rule*) Histidine-Kinase ist Bestandteil eines Drei-Komponenten Systems (Sln1p, Ypd1p, Ssk1p) und unter normalen osmotischen

Bedingungen in einem aktivierten Zustand, wodurch die beiden MAPKKK Ssk2p und Ssk22p negativ reguliert werden (Posas *et al.*, 1996). Bei hypertonischem Schock wird die Sln1p-Kinase inhibiert, Ypd1p und Ssk1p bleiben unphosphoryliert und aktivieren so die MAP-Kinase-Kaskade. Deletionen von *SLN1* und *YPD1* sind für die Zelle letal, da sie zu einer dauerhaften Aktivierung des HOG-Signaltransduktionswegs führen (Maeda *et al.*, 1994; Posas *et al.*, 1996).

Der zweite Membransensor Sho1p (*SH3-domain osmosensor*) bindet zwar direkt über eine SH3-Domäne an die MAPKK Pbs2p, hat jedoch selbst keine Kinasefunktion und benötigt zur Aktivierung die MAPKKK Ste11p und die Proteinkinase Ste20p (Maeda *et al.*, 1995). Diese Komplexierung könnte einen Mechanismus darstellen, der eine spezifische Signalweiterleitung gewährleistet, da sowohl Ste11p als auch Ste20p an zwei weiteren Signaltransduktionswegen beteiligt sind (Abb. 1-2).

Nach einer Phosphorylierung wird Hog1p in den Zellkern transloziert (Ferrigno *et al.*, 1998; Reiser *et al.*, 1999) und aktiviert verschiedene, bislang wenig verstandene Transkriptions-Regulatoren.

Eine Klasse von Streß-Antwort Genen werden zumindest partiell HOG1-abhängig durch die Transkriptionsfaktoren Msn2p und Msn4p reguliert. Diese Gene enthalten in ihrem Promotorbereich STRE (stress response)-Elemente und können auch *HOG1*-unabhängig durch Hitzeschock aktiviert werden. Vertreter dieser Gruppe sind beispielsweise *HSP12* (*heat shock protein*) und die Catalase *CTT1* (Varela *et al.*, 1995; Moskvina *et al.*, 1998).

Mit Hot1p (*high osmolarity transkription*) und Sko1p (*suppressor of PKA overexpression*) konnten spezifische Hog1p-kontrollierte Transkriptionsfaktoren identifiziert werden, welche unabhängig von Msn2p und Msn4p Gene nach hyperosmotischem Schock induzieren, die kein STRE-Element besitzen (Rep *et al.*, 1999). Zu diesen gehören, neben *GPD1* (glycerol phosphate dehydrogenase) und *GPP2* (*glycerol phosphatase*) die für die Glycerinsynthese verantwortlich sind, auch einige Gene, die im Zusammenhang mit oxidativem Streß bekannt sind (Rep *et al.*, 2001). Dies läßt auf eine zusätzliche Verflechtung des HOG-Signaltransduktionswegs mit anderen Streß-abhängigen Regulationsmechanismen schließen.

Desweiteren gibt es verschiedene indirekte Hinweise auf einen Einfluß des HOG-Signaltransduktionswegs auf die Expression von Zellwandgenen, nicht nur nach hypertonischem Schock, sondern auch unter anderen Zellwand-Streß Bedingungen. So sind z.B. *hog1*-Mutanten resistent gegenüber Calcofluor white oder zeigen einen starken

Zell-Lyse Defekt nach β -1,3 Glukanase Inkubation in saurem Milieu (Garcia-Rodriguez *et al.*, 2000; Kapteyn *et al.*, 2001). Über DNA-Microarray Analysen konnte ferner zumindest für vier Zellwandgene, *CWPI*, *HOR7*, *SP11* und *YGPI*, eine Hog1p-abhängige transkriptionelle Regulation direkt gezeigt werden (Rep *et al.*, 2000).

Vor allem der PKC-Weg aber auch der HOG-Weg stellen somit zwei potente Möglichkeiten von *S. cerevisiae* dar, dynamisch in die Synthese und Struktur der Zellwand einzugreifen, sofern deren Integrität durch Streßfaktoren oder auch künstlich durch Mutationen beeinträchtigt wird. Man kann davon ausgehen, daß darüberhinaus weitere, bisher unbekannte Mechanismen existieren, die zu Veränderungen der Zusammensetzung der Zellwand führen.

1.2.3 Kompensationsmechanismen bei Zellwandschäden

Die bereits erwähnte Fähigkeit von *S. cerevisiae* einzelne Komponenten der Zellwand in ihrer Quantität zu verändern, zeigt sich am deutlichsten am sogenannten „Streß-Chitin“. So ist in einer β -1,3 Glukansynthase (*fks1*)-Mutante die Chitinmenge der Zellwand um das 4-10 fache erhöht, während die Menge an Glukan auf ca. die Hälfte reduziert ist (Ram *et al.*, 1995; Dallies *et al.*, 1998). Ähnliche Veränderungen zeigen sich in einer *gas1*-Mutante (glycophospholipid-anchored surface protein). Gas1p ist ein GPI-verankertes Protein, welches vermutlich an der Quervernetzung von β -1,3 Glukan mit anderen Komponenten der Zellwand beteiligt ist. Durch eine Deletion wird etwa 50% des Glukans in das Kulturmedium abgegeben (Ram *et al.*, 1998) und gleichzeitig, analog zur *fks1*-Mutante, der Chitingehalt auf das vierfache erhöht (Popolo *et al.*, 1993; 1997; Valdivieso *et al.*, 2000). Die Kompensation des Glukandefekts ist in beiden Fällen über den PKC-Weg reguliert. Doppeldelationen von *fks1* und *gas1* zusammen mit verschiedenen PKC-Weg Komponenten sind synthetisch letal (Garrett-Engele *et al.*, 1995; Ketela *et al.*, 1999; Popolo *et al.*, 1997). *PKC1*-abhängig wird auch die verbleibende Menge Glukan über eine induzierte β -1,3 Glukansynthase (Fks2p) synthetisiert. Eine gleichzeitige Deletion beider Synthasen kann von der Zelle allerdings nicht mehr kompensiert werden und ist synthetisch letal (Inoue *et al.*, 1995; Mazur *et al.*, 1995). Neben diesen quantitativen Veränderungen konnte in beiden Mutanten auch eine Auswirkung der reduzierten Glukanmenge auf die Verankerung von Mannoproteinen gezeigt werden. GPI-Proteine sind im Wildtyp über β -1,6 Glukan an β -

1,3 Glukan gebunden und lassen sich daher zu 98% mittels β -1,3 Glukanasen aus der Zellwand lösen. Man geht davon aus, daß die restlichen 2% an Chitin gebunden sind, da sie sich erst mit Chitinase aus der Zellwand extrahieren lassen. Dagegen sind in *fks1*-, bzw. *gas1*-Mutanten 40% der GPI-Proteine über β -1,6 Glukan an Chitin gebunden (Kapteyn *et al.*, 1997). Auf welche Weise dieser aufgrund der verringerten β -1,3 Glukanmenge eingeleitete Reparaturmechanismus reguliert wird ist bislang unbekannt. Eine ähnliche Kompensationsmöglichkeit scheint zwischen GPI-Proteinen und PIR-Proteinen zu existieren. In Mutanten mit reduziertem β -1,6 Glukangehalt wird aufgrund der gestörten Verankerung der GPI-Proteine in der Zellwand ein großer Teil dieser ins Medium abgegeben (Lu *et al.*, 1995; Jiang *et al.*, 1996), während die Menge der ausschließlich β -1,3 Glukan verankerten PIR-Proteine von 16% im Wildtyp auf 80% erhöht ist (Kapteyn *et al.*, 1999).

1.3 Modifikationen der Zellwandproteine

Wie bereits erwähnt sind die Proteine der Zellwand neben dem GPI-Anker, vielfach durch N- und O-gebundene Zucker modifiziert. Sowohl die N- als auch die O-Glykosylierung sind für *S. cerevisiae* essentiell (Huffaker und Robbins, 1982; Gentzsch und Tanner, 1996), woraus folgt, daß beide Modifikationen wesentliche Auswirkungen auf die Funktionalität und/oder die Stabilität sekretorischer Proteine haben.

Allgemein werden Protein-gebundenen Oligosaccharidketten verschiedenste Funktionen zugeschrieben. So spielen sie eine wichtige Rolle während der Proteinsortierung, bei der Stabilisierung der Konformation und der Faltung von Proteinen oder der Zell-Zell Interaktion (Helenius, 1994; Akama *et al.*, 2002). Gut untersucht ist auch der Einfluß des Kohlenhydratanteils für spezifische Zelladhäsionsprozesse vor allem bei höheren Eukaryoten. An der Selektin vermittelten Leukozyten Bewegung sind u.a. komplexe N-glykosylierte Proteine maßgeblich beteiligt (McEver *et al.*, 1995).

1.3.1 Protein N-Glykosylierung

Bei der N-glykosidischen Bindung wird eine Kohlenhydratkette über eine Asparaginseitenkette an das Protein gebunden. Bei *S. cerevisiae* unterscheidet man kürzere N-glykosidisch gebundene Zucker des *core*-Typs [GlcNAc₂Man₈₋₁₅] von längeren Oligosaccharidketten, deren *core*-Struktur um eine verzweigte *outer chain* aus

50-200 Mannosen erweitert ist (Herscovics und Orlean, 1993; Lehle und Tanner, 1995). Mehrere N-gebundene Zuckerstrukturen können so die Masse eines Protein um bis zu 100kDa erhöhen (Lipke und Ovalle, 1998).

Die N-Glykosylierung beginnt mit einer schrittweisen Synthese eines $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ -Oligosaccharids an einem Dolicholphosphat-Trägermolekül, welches kotranslational auf Asparaginreste naszierender Polypeptidketten übertragen wird. Dabei werden ausschließlich Asparagine innerhalb eines NXS/T Sequons modifiziert, wobei „X“ eine beliebige Aminosäure mit Ausnahme von Prolin darstellt (Hart et al., 1979, Lehle und Bause, 1984, Gavel und von Heine, 1990). Die Übertragung auf das Protein wird durch die Oligosaccharyltransferase (OST) katalysiert, einem gut untersuchten Komplex aus integralen und Membran-assoziierten Untereinheiten (Silberstein et al., 1992; Kelleher und Gilmore, 1994; Knauer und Lehle, 1994). Weitere Modifizierungen der *core*-Struktur finden bereits im endoplasmatischen Retikulum (ER) durch die Glukosidasen I und II sowie die α -1,2 Mannosidase statt, während die weitere Verlängerung des *core*-Oligosaccharids und die Synthese der *outer chain* im Golgi lokalisiert ist (zusammengefaßt in Hirschberg und Snider, 1987; Roth, 1995).

1.3.2 Protein O-Glykosylierung

Bei der Protein O-Glykosylierung, zum ersten Mal beschrieben von Sentandreu und Northcote (1969 Carbohydr. Res), werden lineare Ketten aus bis zu fünf Mannosylresten auf die Hydroxylgruppe von Serin- und Threonin übertragen. Ein durchschnittliches, glykosyliertes Hefeprotein enthält dabei schätzungsweise mehr als doppelt so viele O- wie N-gebundene Oligosaccharidketten, da ca. 12% aller Protein-gebundenen Mannosylreste in Hefe β -elemenierbar sind (Sentandreu und Northcote, 1969). Die bereits erwähnte hohe Zahl von Serin- und Threoninresten bei Zellwandproteinen ist meist in *Clustern* angeordnet. In untersuchten Fällen hat sich gezeigt, daß die Mehrzahl aller Serin- und Threoninreste eines *Clusters* tatsächlich O-glykosyidisch modifiziert ist (Lipke und Ovalle, 1998).

Die Synthese O-gebundener Mannosen beginnt im ER mit der Übertragung eines Mannosylrests von GDP-Mannose auf das Carrierlipid Dolicholphosphat. Der Mannosylrest wird anschließend von diesem Zuckerdonor durch eine Familie von Protein O-Mannosyltransferasen (PMT) auf Serin- bzw. Threoninreste einer

naszierenden Polypeptidkette übertragen (zusammengefaßt in Strahl-Bolsinger *et al.*, 1998). Im Unterschied zur N-Glykosylierung ist für diese Übertragung keine spezifische Aminosäuresequenz bekannt. Die nachfolgende Addition weiterer Mannosen erfolgt im Golgi, wobei das Zuckernukleotid GDP-Mannose direkt als Donor verwendet wird (Sharma *et al.*, 1974, Bause und Lehle, 1979, Haselbeck und Tanner, 1983).

Das Hefegenom kodiert für eine Familie von insgesamt sieben Protein O-Mannosyltransferasen (Pmt1p-Pmt7p). Die Proteinsequenzen, welche zueinander zu 50-80% homolog sind, besitzen ein gemeinsames, charakteristisches Hydropathieprofil, das auf sieben Transmembranspannen schließen läßt. Bis auf Pmt7p und Pmt5p konnte für alle PMTs eine direkte Beteiligung an der O-Mannosylierung nachgewiesen werden (Gentzsch und Tanner; 1996; 1997; Girrbach *et al.*, 2000). Mit genetischen und biochemischen Methoden konnte ferner gezeigt werden, daß die einzelnen PMTs, vergleichbar mit der N-Oligosaccharyltransferase, in hetero- bzw. homomeren Komplexen in der ER-Membran vorliegen. (Girrbach *et al.*, 2000; persönliche Mitteilung). Über Deletionsanalysen ließ sich ferner eine Substratspezifität der einzelnen PMT-Komplexe für bestimmte Proteine nachweisen. So zeigt sich beispielsweise eine unvollständige Glykosylierung von Chitinase nur in *pmt1* und *pmt2*-Mutanten, nicht aber in *pmt3* oder *pmt4* deletierten Stämmen. In einem *pmt1pmt2*-mutanten Hintergrund führt eine *pmt3*-Deletion hingegen zu einer weiteren Unterglykosylierung von Cts1p, was auf das Vorhandensein kompensatorischer Mechanismen zwischen den einzelnen PMT-Komplexen hindeutet (Gentzsch und Tanner, 1997).

Wie bereits erwähnt besteht die Hefezellwand zu 30% aus an Proteine gebundenen Mannoseresten, wobei davon ausgegangen werden kann, daß auch nahezu alle Proteine der Zellwand O-glykosyliert sind. Die Tatsache, daß manche PMT-Mehrfachdeletionen (*pmt1pmt2pmt4*; *pmt2pmt3pmt4*) für die Zelle letal, andere (*pmt2pmt3*; *pmt2pmt4*; *pmt1pmt2pmt4*) nur durch osmotische Stabilisierung des Mediums lebensfähig sind, könnte auf eine schwere Schädigung der Zellwandstabilität aufgrund einer unvollständigen O-Glykosylierung zahlreicher Zellwandproteine in diesen Mutanten zurückzuführen sein (Gentzsch und Tanner, 1996). Dabei ist sowohl eingeschränkte Funktionalität als auch eine durch Degradation bedingte reduzierte Quantität von Zellwandproteinen als Ursache denkbar. So lassen sich zum einen viele O-glykosylierte Proteine in einer unterglykosylierten Form aus den Zellwänden entsprechender *pmt*-Mutanten isolieren, aber auch eine Verringerung der Proteinmenge einiger Zellwandproteine konnte festgestellt werden (Gentzsch und Tanner, 1997; Bourdineaud

et al., 1998). Konkret konnte für das Membranprotein Axl2p (*axial budding*), welches für ein axiales Knospungsmuster in *S. cerevisiae* benötigt wird, gezeigt werden, daß ein funktionelles *PMT4* nicht nur für die vollständige Glykosylierung des Proteins sondern auch für dessen Stabilität und korrekte Lokalisation benötigt wird (Sanders *et al.*, 1999).

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Die pilzliche Zellwand, insbesondere die der Bäckerhefe *S. cerevisiae* ist seit vielen Jahren Gegenstand zahlreicher Untersuchungen. Auf biochemischem Weg, unter Benutzung spezifischer Enzyme konnte eine Vielzahl von Erkenntnissen über molekulare Bestandteile und deren Architektur erlangt werden, wobei auch strukturelle Details aufgeklärt wurden. Molekularbiologische Untersuchungen anhand von Mutanten lieferten Einsichten in die Synthesewege der Kohlenhydratpolymere, Glukan und Chitin, sowie deren dynamische Regulation in Abhängigkeit von inneren und äußeren Faktoren. Ähnliches gilt für die Mannoproteine der Zellwand, deren Expression ebenso vielfältig reguliert ist. Obwohl davon auszugehen ist, daß diese einen wesentlichen Beitrag zur Biogenese der Zellwand leisten, sind genaue Funktionen einzelner Proteine kaum bekannt. Ferner konnte von geschätzten 50-60 Zellwandproteinen über die Hälfte noch nicht identifiziert werden. Unklar ist vor allem, welche Enzyme für die Quervernetzung der einzelnen Zellwandbestandteile verantwortlich sind.

In der vorliegenden Arbeit sollten zum einen neue an der Zellwandbiogenese beteiligte Proteine identifiziert, aber auch Erkenntnisse über die Funktion bereits bekannter gefunden werden. In einem genetischen Ansatz sollten über die Komplementation synthetisch osmolabiler Zellwandmutanten entsprechende Genprodukte identifiziert werden, die zur Aufrechterhaltung einer stabilen Zellwand nötig sind.

Ferner sollte über eine Genom-weite Expressionsanalyse aufgeklärt werden, auf welche Weise die strukturelle Integrität der Zellwand gewährleistet wird, wenn diese durch das Fehlen mehrerer PIR-, bzw. GPI-Proteine beeinträchtigt ist. Dabei sollten zum einen Einblicke in einen postulierten Kompensationsmechanismus, aber auch Hinweise auf die Funktion dieser Zellwandbestandteile gewonnen werden.

Ein weiterer Schwerpunkt der Arbeit liegt in der Bedeutung der Protein O-Glykosylierung für die Stabilität und die korrekte Lokalisation von Zellwandproteinen. Dazu wurden Modellproteine gewählt, die ausschließlich O-glykosyliert werden, um

einen Einfluß N-gebundener Zucker auszuschließen und für die in vorausgegangenen Arbeiten bereits Hinweise auf einen potentiellen Abbau erhalten wurden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Organismen

Hefestämme (*S. cerevisiae*):

Stamm	Genotyp	Referenz
SEY6210	<i>MATα ura3-53 leu2-3,112 his3-Δ200 trp1-Δ901 lys2-801 suc2-Δ9 GAL</i>	Robinson <i>et al.</i> , 1988
SEY6211	<i>MATα ura3-53 leu2-3,112 his3-Δ200 trp1-Δ901 lys2-801 suc2-Δ9 GAL</i>	Robinson <i>et al.</i> , 1988
<i>sec18</i>	<i>MATα ura3-52 leu2-3,112 suc2-D9 sec18</i>	Novick <i>et al.</i> , 1980
<i>sec18pmt1</i>	<i>MATα ura3-52 leu2-3,112 suc2-D9 sec18pmt1::URA3</i>	diese Arbeit
<i>sec18pmt1pmt2</i>	<i>MATα ura3-52 leu2-3,112 suc2-D9 sec18pmt1::URA3 pmt2Δ::LEU2</i>	diese Arbeit
<i>sec18pmt4</i>	<i>MATα ura3-52 leu2-3,112 suc2-D9 sec18</i>	M. Gentzsch, 1996
<i>sec7</i>	<i>MATα ura3-52 leu2-3,112 suc2-D9 sec7</i>	Novick <i>et al.</i> , 1980
<i>sec7pmt1</i>	<i>MATα ura3-52 leu2-3,112 suc2-D9 sec7 pmt1::URA3</i>	diese Arbeit
<i>sec7pmt1pmt2</i>	<i>MATα ura3-52 leu2-3,112 suc2-D9 sec7 pmt1::URA3 pmt2Δ::LEU2</i>	diese Arbeit
<i>sec1</i>	<i>MATα ura3-52 leu2-3,112 suc2-D9 sec1</i>	Novick <i>et al.</i> , 1980
<i>sec1pmt2</i>	<i>MATα ura3-52 leu2-3,112 suc2-D9 sec1 pmt2Δ::LEU2</i>	diese Arbeit
<i>sec1pmt1pmt2</i>	<i>MATα ura3-52 leu2-3,112 suc2-D9 sec1 pmt1::URA3 pmt2Δ::LEU2</i>	diese Arbeit
YWO333	<i>MATα ade2-1ochre his3-11 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 can1-100</i>	D. Wolf
YWO340	<i>MATα ade2-1ochre his3-11 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 can1-100 pep4::HIS3 prb1::hisG prc1::hisG</i>	D. Wolf
YWO333 <i>pmt1</i>	<i>MATα ade2-1ochre his3-11 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 can1-100 pmt1::URA3</i>	diese Arbeit
YWO333 <i>pmt1pmt2</i>	<i>MATα ade2-1ochre his3-11 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 can1-100 pmt1::URA3 pmt2Δ::LEU2</i>	diese Arbeit
YWO340 <i>pmt1</i>	<i>MATα ade2-1ochre his3-11 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 can1-100 pep4::HIS3 prb1::hisG prc1::hisG pmt1::URA3</i>	diese Arbeit
YWO340 <i>pmt1pmt2</i>	<i>MATα ade2-1ochre his3-11 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 can1-100 pep4::HIS3 prb1::hisG prc1::hisG pmt1::URA3 pmt2Δ::LEU2</i>	diese Arbeit
MEY2342	<i>MATα ura3-53 leu2-3,112 his3-Δ200 trp1-Δ901 lys2-801 suc2-Δ9 GAL ccw12::URA3 ccw13::TRP1 ccw14::his3 tip1::KanMX cwp1::LEU2</i>	M. Ecker, 2000
VMY5678	<i>MATα ura3-53 leu2-3,112 his3-Δ200 trp1-Δ901 lys2-801 suc2-Δ9 GAL ccw5-Δ2 ccw6-Δ ccw7-Δ5 ccw8-Δ1</i>	Mrsa und Tanner, 1999
scw4/scw10 <i>MATα</i>	<i>MATα ura3-53 leu2-3,112 his3-Δ200 trp1-Δ901 lys2-801 suc2-Δ9 GAL scw4::LEU2 scw10::HIS3</i>	Cappellaro <i>et al.</i> , 1998
scw4/scw10 <i>MATα</i>	<i>MATα ura3-53 leu2-3,112 his3-Δ200 trp1-Δ901 lys2-801 suc2-Δ9 GAL scw4::LEU2 scw10::HIS3</i>	Cappellaro <i>et al.</i> , 1998

Bakterienstämme:

Stamm	Genotyp	Referenz
DH5 α	F ⁻ , λ ⁻ , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (<i>r_k</i> ⁻ , <i>m_k</i> ⁺), <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>recA</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15	Hannahan, 1983

2.1.2 Plasmide und Genbanken

2.1.2.1 Plasmide für *E. coli*

Name	Beschreibung	Referenz
pGEM T _{easy}	3'-T overhang cloning vector for PCR products	Promega

2.1.2.2 Plasmide für *S. cerevisiae*

Name	Beschreibung	Referenz
pCS19	<i>ori, ampR, CEN15, ARS1, URA3</i>	Sengstag, 1987
pFA6	<i>GFP(S65T)-kanMX6</i>	Bähler <i>et al.</i> ,
pRS416	<i>ori, ampR, lacZ, CEN6, ARS4, URA3</i>	Stratagene
pRS426	<i>ori, ampR, lacZ, 2μ, URA3</i>	Stratagene
YCp50	<i>ori, ampR, CEN4, ARS1, URA3</i>	Rose <i>et al.</i> , 1987
pAXL2	<i>AXL2-HA</i>	Roemer und Bussey, 1995
pWSC1		S. Strahl
pDis2	Konstrukt zur Disruption von <i>PMT1</i> (<i>pmt1Δ::URA3</i>) in pUC19	Strahl-Bolsinger, 1993
pBDis	Konstrukt zur Disruption von <i>PMT2</i> (<i>pmt2Δ::LEU2</i>) in Bluescript SK ⁻	Lussier <i>et al.</i> , 1995
CB612- <i>KRE1</i> -HA	<i>KRE1</i> -HA in pVT102U (Vernet <i>et al.</i> , 1987)	Roemer und Bussey, 1995

2.1.2.3 Genbank

Partieller Sau3AI-Verdau von genomischer DNA des Stammes S288C (*MAT a*)

Durchschnittliche Fragmentlänge: 10kb

Genomabdeckung: 95%

Vektor: pCS19

Marker: ampR, URA3

Referenz: Sengstag *et al.*, 1987

Vermehrung in: LB, 50mg/ml Ampicillin, 37°C

Aus der Genbank isolierte Plasmide:

Plasmid	Chromosom	genomischer Bereich
20/3	XIII/XII	XIII 871707-XII 458458
20/44	XII	46425-52930
20/82	XII	42522-52930
20/151	XIII	873430-887408
20/155	XII	45126-52930
41/61	XII	848357-873353
41/101	IV	~934000-949974
55/1	X	593170-605308
55/4	XIII	871707-895053
55/12	XIII	878636-891050
55/13	XIII	868152-881474
55/15	XIII	878487-887301
55/18	VII	1048608-1059769
55/20	XII	367123-387065
78/15	III	195291-203158
78/23	III	205034-212487
78/93	XIV	226441-238438
78/96	XIV	226822-238438

2.1.3 Sonden für Northern Analysen

Gen	Bereich
<i>ACT1</i>	gesamtes Gen
<i>CHS1</i>	356 – 868
<i>CHS3</i>	188 – 780
<i>CTS1</i>	322 – 947
<i>FKS1</i>	-33 – 369
<i>FKS2</i>	2695 – 3255
<i>GAS1</i>	1054 – 1664
<i>KAR2</i>	36 – 563
<i>KRE1</i>	64 – 566
<i>KRE5</i>	3304 – 3817
<i>KRE6</i>	190 – 761
<i>PRC1</i>	132 – 680
<i>SCW10</i>	192-1026
<i>SED1</i>	194-956
<i>TOS1</i>	221-1002
<i>UTR2</i>	193-1012
<i>YOR389w</i>	249-1071
<i>YPL088w</i>	64-951

2.1.4 Oligonukleotide

TOS1fwd	GCT TGG CTC CCT TCA ACG AG
TOS1rev	GCT GGT GTC ACT TGG CAT AG
SCW10fwd	CAG CAG TAG TGC AGT TGC TTC
SCW10rev	GCT TCG CCG TAA GTA TCA CC
SED1fwd	GCA CCA ACT GAA ACC TCA ACA G
SED1rev	CCG TTA CTG TTG ATG ACA ACG
UTR2fwd	GAT TCA TGT ATG CCT GTA CC
UTR2rev	CCA TCA TGA CCT CAT CAT CG
YOR389wfwd	CCA TCG GAT ATA CAT CCT GTA G
YOR389wrev	GTC GAT ATG GAT TCG ATG CTC C
YPL088wfwd	GGA TGT ATG TCA TAC GGG TCC
YPL088wrev	GGC AAT CGC TTC GTC TAC TC
WSC1seqA	AGA GAG ATA ACC AAG AGG AG
WSC1seqB	GTG TGG TGG TGA AGA TGC C
WSC1seqC	CCA CAG GTA CAG CTG GAT C
CHS4end	CAC TAT ATG CAT TGA GTG
CHS4seqA	GTT GGC ACT TGA CTT TAG AC
CHS4seqB	CCT ACA AAT TCT CCG TCA CCG
CHS4seqC	GCT ACT CAT CCG GAG CAT TTG G
CHS4seqD	GGC ACA GAT TTA TGA AAC AGG
CHS4seqE	CTC TAC TGT GGA CAG TCA AAC
WSC1end	CGT TAC TTC CAG CTC TCC
SCW4A	CTG TAG CTA CCG CTG CTG C
SCW4B	CCA GTA GTC GTT GAA GGC
SCW10A	GCG CAG GTT ACT GTT GTC G
SCW10B	CTG AAG AGC CGC AGG AGC
GB1	CGG AAC AAC TCT CAT TGC
GB2	CGT TGA CCC TGA GCA GGC
PRC1A	CCT CGA CCT GGA TCA TCT C
PRC1B	CCA GCG GCG ACA GTG TTG G
KAR2A	GGT ACC ACT CTC CGA GGT C

KAR2B	GCA TGG GTA ACC TTA GTG C
FKS1C	GCT GAA ATC AAG TCT TTC
FKS1D	CGA ATT TGG TTC TCC ATA AC
KRE1A	GCT GCG GTC ATG GCA GCT G
KRE1B	GGG TCT GGC CTG GTG CCT G
CHS3A	CGC AGG AGC AGA TGA ATC
CHS3B	GGA ACG CGA GGA AGT ATC C
FKS1A	GCA GTT ACG GCC CTC CTG G
FKS1B	GCC TCT AGG GAG TGG TCG C
FKS2A	CAC CCG GTA GCC TGG GAC
FKS2B	GGG ACG TCT ACG ACC ATT C
KRE6A	GCG CGG GAT GGA GAA TCT C
KRE6B	GCT AGC CCA CTA GCA GAC C
KRE5A	GAG TCC GGG CCA GAT GAG G
KRE5B	CAC CAG CAT CTA ACT CCC G
KRE5B	CAC CAG CAT CTA ACT CCC G
GAS1A	GGT AAG TAC TGG TCC GCT G
GAS1B	CCG ACA CCA GCG GCA ATG G
CHS1A	GTC AAC AGC TAC CGT CGG
CHS1B	CGG GTC TGC TAT CAT CAT G
IH3	GCC ATG GGT GAA GGT CTT C
IH4	GGG CTC ACT CAA CAT GCT C
GD1	CAC GCA CGT GAT GAC CAC G
IH1	GGG GAG AAG TAC CAG AAG C
IH2	GGA CTA GCT CTG GGC AGC

2.1.5 Medien, Puffer und Lösungen

5-FOA Platten	0,67 % 2 % 2 % 0,1 % 50mg/ml	Yeast Nitrogen Base ohne Aminosäuren Glucose Agar 5-FOA Uracil weitere Aminosäuren entsprechend jeweiliger Auxotrophiemarker
Blockierungspuffer für Westernblots	50mM 150mM 0,1 % 4 %	Tris/HCl pH 7,5 NaCl Tween 20 Milchpulver
Calcofluor White-Platten	1 % 2 % 2 % 2 % 4µg/ml – 12µg/ml	Bacto Yeast Extrakt Bacto Pepton D-Glukose Agar Calcofluor White (Salz)
Church-Puffer	1mM 7 %	EDTA pH 8,0 SDS
Coomassie-Färbelösung	40 % 0,1 %	Methanol Coomassie Blue R250
Denaturierungspuffer für RNA-Gele	100µl 165µl 500µl 13µl	MESA (10x) Formaldehyd (37 %) Formamid EtBr
Denhardts (100x, 50ml)	5g 5g 5g	Ficoll Polyvinylpyrrolidone BSA
Denhardts-SSC	6x 5x 0,5 %	SSC Denhardts (100x) SDS

	100µg/ml	Herings sperma DNA
DNA-Ladepuffer (10x)	100mM 60 % 0,25 % 0,25 %	EDTA pH 8,0 Glycerin Bromphenolblau Xylen Cyanol
Inkubationspuffer für Westernblots		<i>siehe Blockierungspuffer</i>
K1	50mg/ml Ethanol.	Ninhydrin
K2	4g/ml Ethanol	Phenol
K3 (100ml)	2ml 98ml	KCN Pyridin
Kanamycin-Platten	1 % 2 % 2 % 2 % 200µg/ml	Bacto Yeast Extrakt Bacto-Pepton D-Glukose Agar G418
LacZ2-Puffer	0,1M 2,2mM	Natriumphosphatpuffer pH7,0, Nitrophenyl-β-D-galactopyranosid
LB-Medium	0,5 % 1 % 1 % 50 bzw. 100µg/ml	Bacto Yeast Extrakt Bacto Trypton NaCl Ampicillin
Lowry 1	2 % 0,1M 0,01 % 0,02 %	Na ₂ CO ₃ NaOH CuSO ₄ K-Na-Tartrat
Lowry 2	46,5 %	Folin-Reagenz
MESA	0,4M 0,1M 10mM	MOPS pH 7,0 NaAc EDTA
PBS physiologisch pH 7,4 (10x, 1l)	2,6g 22,5g 87,7g	NaH ₂ PO ₄ Na ₂ HPO ₄ NaCl
RNA-Ladepuffer	10mM 50 % 0,2 %	Natriumphosphatpuffer pH 7,0 Glycerol Bromphenolblau
RNase A-Lösung (100x)	10mg/ml	RNase A in 1Vol. 10mM NaAc pH 5,2, 15min 100°C, + 0,1 Vol 1M Tris pH 7,5
Sammelgelpuffer	0,139M 0,11M	Tris/HCl pH 6,8 SDS
SDS-Probenpuffer (5x)	312,5mM 10 % 20 % 25 % nach Bedarf	Tris/HCl pH 6,8 SDS Saccharose β-MeSH Bromphenolblau
SD-medium	2 % 0,7 % 1,25 g/l	D-Glukose Yeast Nitrogen Base ohne Aminosäuren AS Dropout nach Bedarf wurden Histidin (20mg/l), Leucin (60mg/l), Lysin (30mg/l), Tryptophan (40mg/l), Uracil (19mg/l) zugesetzt
SSC (20x, 1l)	173,3g 88,2g	NaCl Natriumcitrat mit HCl auf pH 7,0 einstellen
STET-Puffer	8 % 50mM 50mM	Saccharose Tris/HCl pH 8,8 EDTA pH 8,0

	5 %	Triton X-100
Strip-Puffer für DNA-Filter (10 l)	50ml 50ml	1M Natriumphosphatpuffer 20% SDS
TBE (5x)	445 mM 5 mM	Tris/Borat pH 8,0 EDTA
TE	10 mM 1mM	Tris/HCl pH 8,0 EDTA
TES	10mM 10 mM 0,5%	Tris/HCl pH 7,5 EDTA pH8,0 SDS
TM	50mM 0,3mM	Tris/HCl pH 7,5 MgCl ₂
TM-P	50mM 0,3mM 1mM 1mM Benzamidin 0,25mM 50µg/ml 20µg/ml 1µg/ml 1µg/ml	Tris/HCl pH 7,5 MgCl ₂ PMSF Benzamidin TLCK TPCK Antipain Leupeptin Pepstatin
Trenngelpuffer (3x)	1,126M 0,3M	Tris/HCl pH 8,8 SDS
YPD-Medium	1 % 2 % 2 %	Bacto Yeast Extrakt Bacto Pepton D-Glukose
Z-Puffer	20mM 85mM 1mM	Tris/HCl, pH7,5 NaCl MgCl ₂

2.1.6 Enzyme, Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Applichem, Darmstadt: MES, MOPS, IPTG

Babco, Berkley (USA): Anti-HA monoklonaler Antikörper

Bachem AG, (Schweiz): Fmoc Aminosäuren

BioRad, München: TEMED, Ammoniumpersulfat

Boehringer, Mannheim: PMSF, RNase A, Restriktions- und modifizierende Enzyme

Braun, Melsungen: Glasperlen (0,45 – 0,50mm Ø)

Charles River GmbH, Kiblegg: Kaninchen: Weiße Neuseeländer

Difco, Detroit (USA): Bacto Pepton, Hefeextrakt, Yeast Nitrogen Base ohne Aminosäuren

Fluka, Neu-Ulm: Octyl-β-D-glucoopyranosid, Piperidin

Gibco, Eggenstein: DNA-Standard 1kb-Leiter

Kodak, Rochester (USA): Biomax MR-Filme

Machery-Nagel, Düren: PVDF Membran, Nucleobond AX Plasmid Reinigungs-System, Nucleo-Spin Extract 2in1 System

MBI-Fermentas, St Leon: Restriktionsenzyme mit Reaktionspuffern, X-Gal

Merck, Darmstadt: D-Glukose, Glycin, alle nicht anderweitig aufgeführten Chemikalien

Metabion, Martinsried: Synthese von Oligonukletiden

MZ-Säulentechnik: RP18 Reversed Phase Säule

Millipore, Eschborn: HPLC-Filter Millipore

MWG-Biotech, Ebersberg: Synthese von Oligonukletiden

Pharmacia, Madison (USA): Restriktionsenzyme, T4 DNA Ligase, Klenow Fragment

Pierce, Rockford (USA): Freundsches Adjuvans, Maleinimide Activatad KLH

Promega, Madison (USA): Miniprep DNA Purification System, Promega Wizard PCR Prep DNA Purification System, pGEM T_{easy} Vektor System
Renner, Dannstadt-Schauernheim: Sterilfilter
Roth, Karlsruhe: Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung, Glycerin, Rotiphenol (H₂O, TE)
Satorius, Göttingen: Nitrozellulose Blotting Membranen, Sterilfilter
Schleicher und Schuell, Dassel: Whatman-Papier
Seikagaku Kogyo, Tokio (Japan): Zymolyse 100T
Serva, Heidelberg: BSA Fraktion V, Coomassie Blau R, Natriumdodecylsulfat (SDS), Visking Dialyseschlauch
Sigma, Deisenhofen: Agarose, Aminosäuren, Ampicillin, α -Naphthylphosphat, Anti-Kaninchen IgG Peroxidase Konjugat, Anti-Maus IgG Peroxidase Konjugat, Antipain, Bromphenolblau, Calcofluor White M2R, Cycloheximid, DMSO, Heringssperma-DNA, HMW-Protein Molekulargewichtsstandard, Kaliumcyanid, Lithiumacetat, PMSF, Ponceau S, Tween 20, Trifluoressigsäure, Triton X-100, Xylencyanol
USB, Bad Homburg: Tris Base
WAK-Chemie Bad Homburg: 5-Fluorotsäure

2.1.7 Internetdienste

The National Center for Biotechnology Information <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
Stanford Genomic Resources <http://genome-www.stanford.edu/>
Proteome, Inc. <http://www.proteome.com/>
PSORT WWW Server <http://psort.nibb.ac.jp/>
ExpASy <http://www.expasy.ch>
Theoretical Bioinformatics Division of the DKFZ <http://www.dkfz-heidelberg.de/tbi/>
Heidelberg
MIPS <http://www.mips.biochem.mpg.de/>
Carbohydrate-Active Enzymes <http://afmb.cnrs-mrs.fr/~pedro/CAZY/>

2.1.8 Software

Accelrys: Omega 2.0
Imaging Research Inc.: AIS (Analytical Imaging Station)
Packard BioScience: OptiQuant Phosphorimaging Software
TBI-Heidelberg: MChips

2.2 Methoden

2.2.1 Anzucht der Organismen und Anlegen von Dauerkulturen

Die Kultivierung von *E. coli* Zellen erfolgte bei 37°C in LB Medium. Bei Plasmid tragenden Stämmen wurde 100µg/ml Ampicillin zugesetzt.

S. cerevisiae Zellen wurden bei 29°C angezogen, mit der Ausnahme von *sec*- und *pmt*-Mehrfachmutanten, welche bei 25°C kultiviert wurden. Für Stämme, die kein Plasmid tragen, wurde YPD zur Anzucht verwendet. Plasmid tragende Hefen wurden in SD-Medium jeweils mit den nötigen Supplementen vermehrt. Zur Kultivierung osmolabiler Hefestämme wurde den Medien 1M Sorbit zugesetzt.

Die Zelldichte in Flüssigkulturen wurde photometrisch über die OD bei 578nm bestimmt. Für die Bestimmung von Überlebensraten wurde die Zelldichte mit Hilfe einer Zählkammer bestimmt.

Zum Anlegen von Dauerkulturen wurden frisch angezogene Flüssigkulturen abzentrifugiert und in frischem Medium mit 15% Glycerin aufgenommen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

2.2.2 Allgemeine genetische Methoden

Standardmethoden (Restriktionsverdau von Plasmid-DNA, Auftrennung der DNA über Gelelektrophorese, Dephosphorylierung, Klenow- und T4-DNA-Polymerase-Reaktion, Ligation, Transformation von *E. coli*) wurden wie in Sambrook *et al.* (1989) beschrieben, durchgeführt.

Die Plasmid Präparation aus *E. coli* erfolgte entweder nach der STET Methode von Holmes und Quigley (1981) oder mit dem WizardTM Miniprep DNA Purification System der Firma Promega. Größere Mengen Plasmid DNA (ca. 100-500µg) wurden mit Hilfe des Nucleobond AX Systems der Firma Machery-Nagel präpariert. *E. coli* Zellen wurden nach der Methode von Chung *et al.* (1989) kompetent gemacht.

2.2.2.1 Elution von DNA aus Agarosegelen

Für präparative Gelelektrophorese mit anschließender Isolation der DNA aus dem Gel wurde LMP-Agarose verwendet, nur bei geringen Größenunterschieden der aufzutrennenden DNA-Fragmenten erfolgte die Isolation aus Standard-Agarosegelen.

Zur Isolation aus dem Gel wurde standardmäßig das Nucleo-Spin Extrakt 2in1 System von Machery-Nagel verwendet.

2.2.2.2 Transformation von *Saccharomyces cerevisiae*

Hefezellen wurden nach der Methode von Schiestl und Gietz (Schiestl und Gietz, 1989, Gietz *et al.*, 1992) kompetent gemacht und transformiert. Je Transformation wurden bis zu 5µg DNA verwendet. Bei der Transformation osmolabiler Stämme wurde allen Lösungen 1M Sorbit zugesetzt. Zur Erhöhung der Ausbeute bei der Transformation mit Genbank wurde pro Ansatz 45µl DMSO vor dem Hitzeschritt zugegeben (Hill *et al.*,

1991). Bei der Transformation von *sec* Mutanten wurde anstelle des Hitzeschritts die Inkubation bei 30°C entsprechend verlängert.

2.2.2.3 Isolierung von Plasmid-DNA aus Hefe

Plasmid-DNA wurde aus ca. 10ml Medium einer ÜN-Kultur isoliert. Hierzu wurde die Kultur abzentrifugiert und das Pellet in 100µl 1M Sorbit, 20mM EDTA pH 8,0, 100U Lyticase aufgenommen. Nach einer Inkubation von 1h bei 37°C wurden 300µl 1M Sorbit, 20mM EDTA pH 8,0 und 200µl *Cell Lysis Solution* (Promega Wizard™ Miniprep System) zugegeben und vorsichtig vermischt. Nach einer 5 minütigen Inkubation bei 65°C wurden 200µl *Neutralisation Buffer* (Promega Wizard™ Miniprep System) zugegeben 15min auf Eis gekühlt und 5min bei 10000g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein 2ml Reaktionsgefäß überführt. Im weiteren wurde nach dem Protokoll des Promega Wizard™ Miniprep Systems verfahren. Zur Transformation in *E. coli* wurden bis zu 15µl dieser Präparation eingesetzt.

2.2.2.4 Isolierung von genomischer DNA aus Hefe

Die Isolierung von genomischer DNA aus Hefe wurde nach der Methode von Hoffman und Winston (1987) durchgeführt. 5ml einer frisch angezogenen ÜN-Kultur (ca. 25-50 OD) wurde abzentrifugiert und das Pellet in 200µl 2 % Triton X-100, 1 % SDS, 100mM NaCl, 100mM Tris/HCl pH 8,0, 1mM EDTA pH 8,0 resuspendiert. Nach Zugabe von 200µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) und 300µl Glasperlen wurden die Zellen durch 4minütiges Vortexen aufgebrochen. Anschließend wurden 200µl TE zugegeben und 5min zur Phasentrennung zentrifugiert. Die wäßrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die DNA durch Zugabe von 1ml Ethanol gefällt und 5sec abzentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen, nochmals zentrifugiert, getrocknet und in 100µl H₂O, 100µg/ml RNase A aufgenommen.

2.2.2.5 DNA-Sequenzanalyse

Alle Sequenzierungen von Plasmid-DNA bzw. PCR-Produkten wurden bei der Firma Seqlab bzw. dem Sequenzierservice der NatFak IV der Universität Regensburg durchgeführt.

2.2.2.6 Isolierung von Gesamt-RNA aus Hefe mit saurem Phenol

Gesamt-RNA für Northern Blots wurde aus ca. 10 OD einer logarithmisch wachsenden Kultur isoliert. Die Kultur wurde abzentrifugiert und in 1ml eiskaltem H₂O (DEPC-behandelt) aufgenommen, in ein Reaktionsgefäß überführt und kurz abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 400µl TES resuspendiert, 400µl saures Phenol zugegeben und 10sec gevortext. Nach mind. 30minütiger Inkubation bei 65°C wurden die Zellen 5min auf Eis gekühlt und weitere 5min bei 14000rpm (4°C) zur Phasentrennung zentrifugiert. Die wäßrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und nochmals 400µl saures Phenol zugegeben. Nach kurzem kühlen auf Eis wurde erneut zur Phasentrennung

zentrifugiert, die wäßrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 400µl Chloroform extrahiert. Nach Zentrifugation wurde die wäßrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die RNA durch Zugabe von 40µl 3M Natriumacetat pH 5,3 und 1ml Ethanol ca. 1h bei -20°C präzipitiert. Die RNA wurde 5min bei 4°C zentrifugiert, kurz mit eiskaltem 70% Ethanol gewaschen und in der Speed-Vac getrocknet. Zur RNA-Gelelektrophorese wurde das Pellet in 50µl H₂O (DEPC) aufgenommen und bei 260nm im Spektralphotometer (GeneQuant) vermessen.

2.2.2.7 Auftrennung und Nachweis von RNA

- *Gelelektrophoretische Auftrennung von RNA*

RNA wurde mit denaturierenden 1-2 % Agarosegelen aufgetrennt. Die Gele enthielten 3,9 % Formaldehyd, als Lauf und Gelpuffer wurde MESA verwendet. 5µl Gesamt-RNA (10-30 µg) wurden zuvor 10min bei 65°C in 15µl Denaturierungspuffer inkubiert anschließend und mit 5µl RNA-Ladepuffer versetzt.

- *Markierung von DNA-Fragmenten*

DNA-Fragmente wurden mit Hilfe des MBI-Fermentas Decalabel™ DNA Markierungs-Systems radioaktiv markiert. Pro Markierung wurden 200ng DNA und 50µCi [α^{32} P]dCTP verwendet. Nicht eingebaute Nukleotide wurden über Nuc Trap Columns (Stratagene) von der Sonde abgetrennt.

- *Northern Blot Analyse*

Nach der Auftrennung wurde die RNA mittels Kappillar-Blot in 20x SSC über Nacht auf NCL-Nitrozellulose übertragen (Referenz!) und durch UV Bestrahlung fixiert (Stratagene). Die Blots wurden bis zur Hybridisierung im getrockneten Zustand aufbewahrt.

- *Hybridisierung*

Northern Blots wurden entweder mit Church-Puffer oder mit Denhardts-SSC hybridisiert. Die Hybridisierung mit [32 P] markierten Sonden erfolgte stets bei 65°C und ÜN nach einer 2-3 stündigen Vorhybridisierung ohne Sonde.

Der Blot wurde mit 2x SSC, 0,1 % SDS kurz bei RT und anschließend 2mal für jeweils 10-30min mit 0,1x SSC, 0,1 % SDS bei 68°C gewaschen. Die Detektion der hybridisierten DNA erfolgte mittels Phosphorimager und durch Auflegen eines Röntgenfilms.

2.2.3 Methoden zur Expressions-Analyse mit DNA-Filtern

Alle Methoden in Anlehnung an Hauser *et al.* (1998).

2.2.3.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus Hefe für cDNA Synthesen

RNA zur Synthese von cDNA für Genome-Arrays wurde mit Hilfe des RNeasy Midi Systems von QIAGEN isoliert. Hierfür wurde ein logarithmisch wachsende Zellkultur zentrifugiert und das Zellpellet in 500-1000µl Medium resuspendiert und vorsichtig in flüssigen Stickstoff getropft. Zur RNA-Präparation wurden 2-3 gefrorene Zelltropfen in einem microDismembrator (Braun, Melsungen) bei einer Frequenz von 2600rpm 2min mechanisch aufgeschlossen. In einem 15ml Falcon Gefäß wurden 1,9ml RTL Puffer des

QIAGEN RNeasy Midi Systems und 19 μ l β -Mercaptoethanol vorgelegt und die gefrorenen Zellfragmente zugegeben. Alle weiteren Schritte wurden gemäß des QIAGEN Protokolls durchgeführt. Die Quantität und Qualität der RNA wurde durch photometrische Messung bei 260nm bzw. auf einem Agarosegel überprüft.

2.2.3.2 Einzelstrang-cDNA Synthese

Für die cDNA Synthese wurden 20-30 μ g RNA in 11,5 μ l DEPC-H₂O aufgenommen, 500ng oligo dT₁₅ (Gibco BRL) zugegeben, gut vermischt und 5sec zentrifugiert. Nach einer 10 minütigen Inkubation bei 70°C wurde die RNA kurz auf Eis gekühlt. Die Synthese Reaktion wurde mit dem Life Technologies SuperScript II-System durchgeführt. Nach Zugabe von 6 μ l *5x First Strand Buffer*, 3 μ l 0,1M DTT, 1,5 μ l AGT+C Mix wurde die Reaktion kurz auf 42°C erwärmt und 5 μ l ³³P α -dCTP (50 μ Ci) sowie 2 μ l SuperScript II reverse Transkriptase zupipettiert. Die Reaktionszeit auf 42°C betrug 60min, wobei nach 30min 1 μ l SuperScript II zugegeben wurde. Der Einbau der radioaktiven Nukleotide wurde durch Präzipitation mit Trichloressigsäure (2.2.3.3) überprüft, hierfür wurde 1 μ l entnommen.

Die Template-RNA wurde mit NaOH hydrolysiert. Hierzu wurden 1 μ l 1 % SDS, 1 μ l 0,5M EDTA pH 8.0 und 3 μ l 3M NaOH zugegeben und zunächst 30min bei 65°C, anschließend 15min bei RT inkubiert. Die Reaktion wurde mit 10 μ l 1M Tris/HCl pH 8.0 und 3 μ l 2N HCl neutralisiert.

Zur Präzipitation der cDNA wurden 5 μ l NaOAc pH 5.3, 5 μ l tRNA (10mg/ml) und 60 μ l Isopropanol zugegeben. Nach der 30 minütigen Fällung bei -20°C wurde die cDNA 30min bei 14000rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die cDNA in 100 μ l H₂O resuspendiert. Überstand und cDNA wurden mit einem Handzählrohr grob vermessen.

2.2.3.3 Präzipitation von Nucleinsäuren mit TCA

1 μ l der reversen Transkriptase Reaktion wurde mit 7 μ l 0,05M EDTA pH 8,0, 7 μ l H₂O und 5 μ l tRNA (10mg/ml) gut vermischt und zu gleichen Teilen auf 2 Stücke Whatman GF-F Filterpapier pipettiert. Nachdem beide Filter trocken waren, wurde ein Filter in eine eiskalte Mischung aus 10 % TCA und 1 % Natriumpyrophosphat getaucht und für insgesamt 15min auf Eis inkubiert, wobei die Lösung zweimal gewechselt wurde. Unter diesen Bedingungen werden nur RNA und DNA-Moleküle größer als 50b an der Oberfläche des Filters präzipitiert. Der 2. Filter diente als Kontrolle der Gesamtradioaktivität. Beide Filter wurden anschließend mit Ethanol 2min bei RT gewaschen und nach dem Trocknen in 3ml Szintillationscocktail überführt und gezählt. Der Einbau der Radioaktivität in Prozent ergibt sich aus dem Verhältnis von TCA-Filter zu Kontrollfilter.

2.2.3.4 Alkaline Gelelektrophorese

Zur Überprüfung der Qualität radioaktiver Gesamt-cDNA Präparationen wurden alkaline Agarosegele verwendet. Hierzu wurde 0,7g Agarose in 50ml H₂O gelöst und anschließend auf ca. 60°C abgekühlt. Nach Zugabe von 250 μ l 10N NaOH und 100 μ l 0,5M EDTA wurde das Gel für wenigstens 30min in Laufpuffer (50mM NaOH, 1mM EDTA) equilibriert. Je 10 μ l aufzutrennende Probe wurde mit 2 μ l DNA-Alkali-

Ladepuffer versetzt. Der DNA-Standard wurde mit ausreichendem Abstand von den radioaktiven Proben aufgetragen. Der Gellauf wurde bei 4°C bei 45V ca. 5h durchgeführt. Vor der Gel Trocknung wurde die Standardspur abgetrennt, für mindestens 30min in 1M Tris pH7,5, 1M NaCl neutralisiert und abschließend mit EtBr-Lösung gefärbt. Das Gel wurde entweder für mehrere Stunden zwischen Whatman-Papier Stapeln oder auf einem Gel trockner bei 50°C unter Vakuum getrocknet. Der Nachweis der cDNA erfolgte über Autoradiographie.

2.2.3.5 Hybridisierung und Regeneration von DNA-Filtern

Vor jeder Hybridisierung mit [³³P] markierter cDNA wurden die Nylon-Filter zusammen mit Gaze gleicher Größe Luftblasen-frei gerollt und in Hybridisierungsröhren für 2-3h bei 65°C mit 20ml Church-Puffer vorhybridisiert. Die cDNA wurde vor der Zugabe mit 10µl 3M NaOH oder durch Erhitzen (5min, 100°C) denaturiert. Die Hybridisierung erfolgte in 5ml vorgewärmten Church-Puffer bei 65°C für ca. 20h.

Die Filter wurden mit 40mM Natriumphosphatpuffer pH 7,2, 0,1 % SDS zunächst kurz bei RT und anschließend für 30min bei 65°C gewaschen.

Zur Detektion wurden die Filter in feuchtem Zustand in Zellophan eingeschlagen und eventuelle Luftblasen vorsichtig entfernt. Die Expositionsdauer der Phosphorimager-Screens betrug ca. 60h.

Zur Regeneration wurde pro Filter mind. 300ml Strip-Puffer aufgekocht und die Filter zunächst 2mal mit je 100ml heißem Strip-Puffer kurz geschwenkt und anschließend mit dem restlichen Puffer so lange inkubiert bis dieser auf RT abgekühlt war. Abschließend wurden die Filter auf Whatman Papier getrocknet und bis zu ihrer nächsten Verwendung in Church-Puffer bei 37°C gelagert.

2.2.4 Allgemeine proteinbiochemische Methoden

2.2.4.1 Proteinbestimmung

Proteinbestimmungen wurden mit der Methode nach Lowry *et al.* (1951) durchgeführt. Die Probe wurde auf 100µl Volumen gebracht und nach der Zugabe von 1ml Lowry 1 für 10min bei RT inkubiert. Es wurden 100µl Lowry 2 zugegeben und die Mischung weitere 30min bei RT inkubiert. Zur Eichung des Tests wurden Messungen mit BSA-Mengen von 1 bis 15µg durchgeführt. Die Proteinkonzentration wurde photometrisch bei 740nm bestimmt.

2.2.4.2 Auftrennung und Nachweis von Proteinen

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

Die Auftrennung von Proteinen erfolgte über 7 – 15 % SDS-Polyacrylamidgele (Laemmli, 1970), wobei die aufzutrennenden Proben je nach Volumen mit 2 – 5x SDS-Probenpuffer versetzt wurden. Die Elektrophorese wurde bei 25mA pro Gel bis zum Auslaufen der blauen Farbstoffbande durchgeführt.

- *Anfärben von Proteinbanden*

Auf SDS-Gelen aufgetrennte Proteinbanden wurden mit Coomassie Blue Lösung angefärbt. Als Entfärber wurde 10 % Isopropanol, 10 % Essigsäure verwendet. Färbung von SDS-Gelen mit Silbernitrat wurde nach der Vorschrift von Heukeshoven und Derrick (1988) durchgeführt.

- *Western Blot Analyse*

Zum Immunnachweis wurden Proteine nach der Auftrennung über SDS-PAGE elektrophoretisch 1,5 – 2h bei 150mA auf Nitrozellulosemembranen überführt (Dunn, 1986) und anschließend reversibel mit Ponceau S (Sigma) gefärbt. Zur Absättigung der Membran wurde diese mindestens 30min in Blockierungspuffer inkubiert. Anschließend wurde im gleichen Puffer der primäre Antikörper entsprechend verdünnt (siehe Tabelle) und der Blot soweit nicht anders angegeben 1h bei RT oder ÜN bei 4°C inkubiert. Die sekundären, Peroxidase gekoppelten Antikörper wurden den Herstellerangaben gemäß verwendet. Die Detektion des gebundenen Peroxidase Konjugats erfolgte mit Hilfe des ECL Western Blot Detektions Systems (Amersham) nach Vorschrift des Herstellers.

Verwendet wurden folgende Antikörper in angegebener Verdünnung:

Antikörper gegen	Verdünnung	Bezugsquelle
Aga2p	1000	C. Cappellaro
Cts1p	1000 – 2500	T. Immervoll
Gas1p	2500	L. Popolo
HA-Epitop	5000	BabCo
Hsp150p	5000	M. Makarow

2.2.4.3 Präparation von Zellwänden und Membranen für SDS-PAGE

20-50 OD Hefezellen in logarithmisch wachsenden Kultur wurden geerntet, einmal mit TM-Puffer gewaschen und in 100 – 300µl TM-P aufgenommen. Der Glasperlenaufschluß wurde in 4x 1min Intervallen durchgeführt. Dazwischen wurde die Zellsuspension für jeweils 30sec auf Eis gekühlt.

Die Suspension wurde von den Glasperlen durch Zentrifugation getrennt und die Zellwände 20sec bei 14000rpm pelletiert. Der Überstand wurde durch eine weitere Zentrifugation für mind. 30min bei 20000g und 4°C (SS34-Rotor) in eine cytosolische Fraktion und ein Gesamtmembranpellet getrennt.

2.2.4.4 Präparation von Zellwänden zur Zellwandanalyse

50 OD Hefezellen einer Kultur in logarithmischer oder stationärer Wachstumsphase wurden geerntet und das Gewicht des Zellpellets bestimmt. Nach 3 maligen Waschen mit 10mM Tris/HCl pH 7,5, 1mM PMSF, 10mM Natriumazid wurden die Zellen im gleichen Puffer aufgeschlossen und die Zellwände bei 1000g abzentrifugiert. Das Pellet wurde erneut gewogen, 5mal mit 1M NaCl, 1mM PMSF und 1mal mit H₂O gewaschen und anschließend lyophilisiert. Die getrockneten Wände wurden in 4N

Trifluoressigsäure bei 100°C 4h hydrolysiert und nach kurzem Abkühlen auf Eis 5min zentrifugiert um eventuelle Zellwandreste aus dem Hydrolysat zu entfernen. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und im Wasserbad bei 37°C-45°C mit Stickstoff zur Trockne abgeblasen. Nach einer Zugabe von 500µl Methanol wurde erneut abgeblasen, der Rückstand in 300µl Millipore-Wasser aufgenommen und bei 5000g für 5min über einen Millipore Ultrafree-MC Filter (Porengröße 0,2µm) zentrifugiert.

Die Analyse wurde mit 10µl einer 1:20 Verdünnung durchgeführt, wobei die Auftrennung über eine CarboPacPA1-Säule in 160mM NaOH erfolgte.

2.2.4.5 HF-Spaltung glykosylierter Proteine

Um die Größe der Polypeptidkette glykosylierter Proteine über SDS-PAGE zu bestimmen zu können mußten N- und O-gebundene Zuckerketten chemisch mit HF abgespalten werden. Der zu spaltende Proteinextrakt wurde hierfür am Tag vor der Durchführung in einem Reaktionsgefäß lyophilisiert und anschließend im Exikator über Phosphorpentoxid gehalten. Gasförmiges HF wurde zunächst in flüssigen Stickstoff eingeleitet und gefroren, anschließend durch vorsichtiges erwärmen wieder verflüssigt. Das Pellet wurde in 300µl HF aufgenommen, bis zur vollständigen Lösung gevortext und die Reaktionsgefäße zwischen 2 Metallplatten so verschraubt, daß kein HF austreten konnte. Nach einer Reaktionszeit von 3h auf Eis, wurde das HF mit Stickstoff abgeblasen und das entstandene Pellet im Speed Vac Konzentrador vollständig getrocknet.

Zur Gelelektrophorese wurde das Pellet in 1x SDS-Probenpuffer aufgenommen und mit gesättigter Tris-Base Lösung neutralisiert.

2.2.5 Extraktion von Zellwandproteinen

2.2.5.1 Aga2p

Die Isolierung der α -Agglutinin UE Aga2p erfolgte nach Watzel *et al.* (1988). Hefezellen einer logarithmisch wachsenden Kultur des Paarungstyps *MATa* wurden geerntet und mit frischem YPD-Medium auf eine Konzentration von 1 OD/ml eingestellt. 2ml der Kultur wurde in einem neuen Reaktionsgefäß mit 20µg α -Faktor für 2h bei 29°C induziert. Die Zellen wurden anschließend geerntet, mit 1ml TM-Puffer gewaschen und in 30µl 50mM Tris/HCl pH 8,5, 2mM DTT für 1h bei 4°C geschüttelt. Nach Abzentrifugation der Zellen wurde der Überstand mit 5x SDS-Probenpuffer versetzt und über ein 15 %iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt.

2.2.5.2 Cts1p

Chitinase (Cts1p) wurde mit Chitin aus dem Kulturmedium nach der Vorschrift von Kuranda und Robbins (1991) oder direkt in der Zellwand nachgewiesen. Hierzu wurden präparierte Zellwände von 10-50 OD Hefezellen in 1x SDS-Probenpuffer aufgenommen, 5min bei 95°C inkubiert und 5min bei 14000rpm zentrifugiert. Vom Überstand wurde ein Äquivalent von 0,5–2 OD auf einem 8 %igen SDS Polyacrylamidgel aufgetrennt. In Sekretionsmutanten wurde Cts1p auch aus der cytosolischen Fraktion nachgewiesen.

2.2.5.3 Pir2p (Hsp150)

Zur Isolierung von Pir2p aus dem Kulturmedium wurden Hefezellen einer logarithmischen Kultur geerntet und in frischem YPD-Medium zu einer OD von 100 resuspendiert. 100 - 200µl wurden in ein 2ml Reaktionsgefäß überführt und 60 – 90min bei 37°C geschüttelt. Die Hefen wurden anschließend kurz abzentrifugiert und 10-20µl des Medienüberstands nach Inkubation mit 5x SDS-Probenpuffer (95°C, 5min) über SDS-PAGE aufgetrennt.

Zum intrazellulären Nachweis von Pir2p in Sekretionsmutanten wurden 20-50 OD Zellen nach der Inkubation bei 37°C aufgeschlossen und die cytosolische Fraktion über SDS-PAGE aufgetrennt.

2.2.5.4 Kre1p

Mit dem Plasmid CB612-*KRE1*-HA (Roemer und Bussey, 1995) transformierte Hefezellen wurden in SD-Medium zu einer Zelldichte von 0,5–1 OD angezogen, geerntet und aufgeschlossen (2.2.4.3). Präparierte Gesamtmembranen und Zellwände wurden direkt in 1x SDS-Probenpuffer aufgenommen und 5min auf 95°C erhitzt. Anschließend wurde 5min bei 14000rpm zentrifugiert und vom Überstand eine 0,5 – 1 OD entsprechende Menge auf 8-10 %igen SDS-Gelen aufgetrennt.

2.2.6 Test auf Zellwandstabilität

Die Stabilität der Zellwand von *S. cerevisiae* Stämmen wurde mit Hilfe von Plattentests indirekt bestimmt. $1-2 \times 10^7$ Zellen einer logarithmisch wachsenden Kultur wurden in 100µl 1M Sorbit aufgenommen und eine 1:10 Verdünnungsreihe hergestellt. Von 5 bzw. 6 Ansätzen wurden 5µl auf Test bzw. Kontrollplatten getropft. Zur Quantifizierung der Osmolabilität wurden YPDS und YPD-Platten verwendet. Sensitivität gegenüber Zellwand destabilisierenden Substanzen wurde mittels Calcofluor White-Platten getestet.

2.2.7 Agglutinationstest

Um die Agglutinationsfähigkeit von *S. cerevisiae* Stämmen zu testen, wurden 2×10^7 Zellen einer logarithmisch wachsenden Kultur mit der entsprechenden Zellmenge des entgegengesetzten Paarungstyps in 50µl YPD und 150µl 0,1M Natriumphosphatpuffer (pH 6.3) in einer Mikrotiterplatte vermischt. Die Ansätze wurden für 60-90min auf einem Horizontalschüttler geschwenkt dabei die Bildung von Agglutinaten überprüft.

2.2.8 Komplementation von OSS-Mutanten

Zur Komplementation osmolabiler Mutanten wurden 10 Transformationsansätze zu je 5 OD Zellen mit je 1µg Genbank transformiert. Die Transformationen wurden wie in 2.2.2.2 beschrieben durchgeführt. Nach 2-3 Tagen wurden die Klone auf je 2 Calcofluor White-Platten (10µg/ml) replikaplatziert und bei 29°C inkubiert. Komplementierende Klone wurden nach 2-3 Tagen gepickt und auf SD-ura Platten ausgestrichen. Durch Ausstreichen auf Calcofluor White-Platten (10µg/ml) wurden diese Transformanten

erneut auf Zellwandstabilität getestet und aus allen positiven die Plasmide isoliert. So isolierte Plasmide wurden in die jeweilige OSS-Mutante retransformiert und erneut auf Komplementation des osmolabilen Phänotyps überprüft. Die Inserts komplementierender Plasmide wurden mit den Primern (GB1, GB2) ansequenziert.

2.2.9 Synthese und Reinigung von Peptiden

Alle Lösungsmittel und Reagenzien für die Peptidsynthesen wurden vor der Verwendung über ein Molekularsieb getrocknet und über Whatman GF/C Filter filtriert. Die Fritte des Reaktionsgefäßes wurde vor jeder Synthese vom Glasbläser durch Ausglühen gereinigt, anschließend wurde das Gefäß silikonisiert und getrocknet.

Alle Syntheseschritte wurden im halbautomatischen Peptidsynthesizer durchgeführt. Entfernung von Schutzgruppen und das Abspalten vom Trägerpolymer erfolgte manuell.

2.2.9.1 Synthese unmodifizierter Peptide

Für die Standardsynthese wurde 0,2mmol eines Polystyren gekoppelten Fmoc-Cysteins als erste Aminosäure verwendet. Dieses wurde zunächst im Reaktionsgefäß in DMF gequollen und nach 20min abgesaugt. Die Vollständigkeit jeder Reaktion wurde mit dem Kaisertest (2.1.1.3) bestimmt, hierfür wurde nach der Schutzgruppenabspaltung und am Ende des Programms jeweils ca. 5mg des Harzes entnommen. Bei positivem Ergebnis wurde mit der Synthese der nächsten Aminosäure fortgefahren.

Programmablauf für die Kopplung einer Aminosäure:

- Waschen mit DMF, 2x 1min
- Schutzgruppen abspalten in 20% Piperidin/DMF, 2x 5min
- Waschen mit DMF (Ventil2), 2x 1min
- Waschen mit DMF (Ventil3), 2x 1min
- Zugabe von 0,6mmol Fmoc-Aminosäure und 0,9mmol HOBt, gelöst in 5ml DMF/MeCl₂, anschließend 2min schütteln.
- Zugabe von 0,66mmol 1M DCC.
- 90min Schütteln
- Waschen mit DMF (Ventil2), 1min
- Waschen mit Isopropanol, 1min
- Waschen mit DMF (Ventil3), 1min
- Waschen mit Isopropanol, 1min

Abspaltung vom Harz und Fällung des Peptids

Vor der Abspaltung vom Harz wurden zuvor die Schutzgruppen der letzten gekoppelten Aminosäure im Synthesizer mit 20% Piperidin/DMF entfernt. Anschließend wurde das Harz in einen Erlenmeyerkolben überführt, 9ml TFA, 0,5ml Ethanedithiol und 0,5ml H₂O zugegeben und für 2h unter dem Abzug geschüttelt. Das Harz wurde über einen Rundfilter abgesaugt und jeweils 2mal mit 20% TFA/MeCl₂ und MeCl₂ gewaschen. Das Filtrat wurde in eine Rundkolben (NS21) überführt und 40ml Et₂O zugegeben. Das Peptid wurde ÜN bei -20°C gefällt, über einen 20mm Hirschtrichter abgesaugt und mit Et₂O gewaschen. Der Niederschlag wurde zusammen mit dem Filter für 2 Tage im Exikator getrocknet.

2.2.9.2 Synthese mannosylierter Peptide

Für die Synthese eines Peptids mit mannosylierter Aminosäure wurde 0,12mmol eines SASRIN gekoppelten Fmoc-Cysteins verwendet. Die Kopplungsreaktion der modifizierten Aminosäure wurde aufgrund des geringen Volumens der Edukte manuell in einem silikonisierten Pyrexröhrchen durchgeführt. Die Abspaltung der Fmoc Schutzgruppe des Cysteins sowie die Waschstrepe vor und nach der Kopplung wurden wie in 2.2.6.1 beschrieben im Peptidsynthesizer durchgeführt.

Die Stabilität der Mannose am Serin würde durch die Verwendung von TFA beeinträchtigt werden, daher wurden für die Abspaltung vom Harz und die Fällung des Peptids andere Bedingungen gewählt.

Hydrazinolyse

Mit einem Gemisch aus Hydrazin und DMA wurde neben der Deacetylierung der Mannose und der Entfernung der terminalen Fmoc-Schutzgruppe auch das Peptid vom Harz abgespalten. Hierzu wurde das Harz noch im Peptidsynthesizer 5mal mit DMA gewaschen und zum Überführen in einen Erlenmeyerkolben trocken gesaugt. Zusammen mit 16ml/g DMA wurden 4ml/g Hydrazinhydrat zugegeben und der Kolben 6h bei RT geschwenkt. Anschließend wurde das Harz über einen Filter (G2/G3) abgesaugt und 2mal mit DMA gewaschen. Im Rotationsverdampfer wurde das während der Reaktion entstandene Hydrazin zusammen mit dem DMA aus dem Filtrat abgezogen und das Peptid-Hydrazid mit H₂O ausgefällt.

Jodolyse

Die Tritylschutzgruppe am S-Atom des Cysteins kann schonend, oxidativ mit Jod entfernt werden ohne die Stabilität der Mannose am Serin zu beeinträchtigen. Hierzu wurde das getrocknete Peptid-Hydrazid zusammen mit äquimolaren Mengen Jod in Methanol gelöst. Die Lösung wurde im Eiswasserbad durch tropfenweises Zugabe von 1M Natriumthiosulfat entfärbt und anschließend das Peptid durch Zugabe von 50ml H₂O präzipitiert. Der Niederschlag wurde gefiltert, getrocknet und anschließend 3mal mit 10ml Petrolether extrahiert.

2.2.9.3 Kaisertest

Die während der Synthese entnommenen Aliquots des Harzes wurden in ein dünnes Reagenzglas überführt und mit jeweils 100µl Lösungen K1, K2 und K3 versetzt. Nach 5min unter gelegentlichem Schütteln bei 95°C im Heizblock sind noch freie reaktive Aminosäuren an einer Blaufärbung von Harz und Lösung zu erkennen. Bei vollständiger Reaktion verbleibt das Harz weiß und die Lösung gelblich.

2.2.9.4 Reinigung von Peptiden über HPLC

Peptide wurden über analytische und präparative Reversed Phase Säulen (RP-18; MZ-Analysentechnik) über HPLC (LKB) gereinigt. Die Säulen wurden in 0,1 % TFA equilibriert und 0,5mg (analytisch) – 50mg (präparativ) Peptid aufgetragen. Die Elution erfolgte über Acetonitrilgradienten bis zu 70 % mit einer Flußrate von 1ml/min. Detektiert wurde mittels Absorptionsmessung bei 220nm.

2.2.10 Kopplung eines Haptens an ein Träger-Protein

Haptene, welche eine bestimmte Molekülgröße bzw. Struktur unterschreiten werden vom Immunsystem schlecht oder gar nicht erkannt, daher mußte das mannosylierte Peptid, um es für eine Immunisierung benutzen zu können, zunächst an ein Trägermolekül gekoppelt werden. Hierfür wurde Maleimid aktiviertes KLH (Pierce) eingesetzt. Es besitzt ein besonders hohes Molekulargewicht (ca. 5Mio Da) und enthält pro Milligramm ca. 0,35µmol reaktiver Gruppen. Es wurden 2mg KLH in 200µl H₂O gelöst und zusammen mit einer equimolaren Menge des Peptids, welches vorher in 500µl PBS aufgenommen wurde, vermischt. Sowohl KLH, als auch das Peptid ließ sich in H₂O bzw. PBS-Puffer nur schlecht in Lösung bringen, daher wurde DMSO in geringen Mengen bis zur vollständigen Lösung zugegeben. Vor und nach der 2stündigen Reaktion bei RT wurden jeweils 20µl für den Ellman-Essay entnommen, mit welchem die Vollständigkeit der Reaktion überprüft wurde. Nach positivem Testergebnis wurde das Konjugat ÜN bei 4°C gegen insgesamt 5l 1x PBS dialysiert, wobei der Puffer nach 2h einmal gewechselt wurde.

Nach der Dialyse wurde das Konjugat sofort zur Immunisierung eingesetzt.

2.2.11 Gewinnung polyklonaler Antikörper

An KLH gekoppelte Peptide wurden zur Gewinnung polyklonaler Antisera 1:1 (Vol/Vol) mit inkomplettem Freundschem Adjuvans zu einer homogenen Emulsion vermischt und in Kaninchen injiziert. Insgesamt wurden 3 Tiere immunisiert, wobei nach jeweils 2 und 5 Wochen 2 weitere Injektion folgten. Jeweils eine Woche nach dem zweiten und dritten Boost wurden den Kaninchen je 5-10ml Blut entnommen, um den Immuntiter des Serums zu bestimmen. Hierzu wurde das Blut in einem 50ml Falcon für 30min bei 4°C gekühlt und anschließend der Blutkuchen vorsichtig mit einer zugeschmolzenen Pasteurpipette vom Rand abgelöst. Nachdem sich ÜN bei 4°C der Blutkuchen vom Serum abgesetzt hatte, wurde dieses vorsichtig in ein neues 12ml Falcon überführt und 5min bei 8000rpm im HB4-Rotor zentrifugiert. Der Überstand wurde aliquotiert bei -80°C aufbewahrt.

3 Ergebnisse

3.1 Stabilität und Lokalisation von Zellwandproteinen in *pmt*-Mutanten

Von M. Gentsch (1996) konnten in *pmt*-Mutanten (*protein mannosyl transferase*) erste Hinweise für eine mögliche Rolle der Protein O-Glykosylierung für die Stabilität so modifizierter Proteine erhalten werden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte versucht werden die Ursache für die reduzierten Mengen verschiedener unterglykosylierter Proteine in *pmt*-Mutanten zu finden. Insbesondere sollte dabei eine mögliche Degradation berücksichtigt werden. Hierzu wurden die sekretorischen Modellproteine Cts1p, Aga2p und Pir2p gewählt, da diese ausschließlich O-gebundene Zucker tragen und so eine Beteiligung der N-Glykosylierung ausgeschlossen werden kann.

3.1.1 Charakterisierung von Cts1p

Die Endochitinase Cts1p hydrolysiert aus β 1-4 N-Acetylglucosaminketten bestehendes Chitin und wurde bereits 1982 von Correa *et al.* beschrieben. Chitin ist trotz seiner geringen Menge (1-2%) ein wesentliches strukturelles Element der Zellwand. Es ist nicht gleichmäßig, sondern vor allem im Bereich der Knospungsnarbe sowie im Septum lokalisiert. Da es sich bei Cts1p um das einzige Chitin-hydrolysierende Enzym in *S. cerevisiae* handelt, kommt diesem Protein eine besondere Bedeutung zu. So hat die Deletion von *CTS1* zwar weder Auswirkungen auf die Lebensfähigkeit noch auf den Chitingehalt der Zellen, jedoch zeigt die Mutante, aufgrund einer fehlenden Hydrolyse des primären Septums, eine deutliche Beeinträchtigung der Trennung von Mutter- und Tochterzelle (Kuranda und Robbins, 1991). Cts1p wird zu einem großen Teil ins Medium sezerniert. Ein Teil jedoch ist über eine nicht kovalente Bindung an Chitin in der Zellwand verankert. Daher läßt sich Cts1p mit SDS aus präparierten Zellwänden, oder auch mit Chitin aus dem Kulturmedium isolieren (Kuranda und Robbins, 1991) und weist dabei ein apparentes Molekulargewicht von etwa 120kDa auf. Die Größe der Polypeptidkette beträgt jedoch nur ca. 60kDa. Da die einzige vorhandene potentielle N-Glykosylierungsstelle von Cts1p *in vivo* nicht genutzt wird, ist dieser Unterschied ausschließlich auf O-glykosidisch gebundene Zuckerketten zurückzuführen (Kuranda und Robbins, 1991). Dieses konnte in den Protein O-Mannosylierungsmutanten *pmt1*

und *pmt2* über eine sichtbare Unterglykosylierung gezeigt werden. Neben diesen qualitativen Größenunterschieden trat in einer *pmt1pmt2*-Doppelmutante auch eine quantitative Verringerung der in das Kulturmedium sezernierten Proteinmenge auf (M. Gentsch, 1996; Abb. 3-1A).

3.1.1.1 Vergleich der Cts1p-Menge in Zellwand und Kulturmedium

Ausgehend von dieser Beobachtung wurde im folgenden die absolute Menge sezernierter Chitinase Cts1p in der *pmt1pmt2*-Mutante und im WT (SEY6210) verglichen. Dabei sollte auch die Frage geklärt werden, ob die Reduktion im Medium der Mutante nur auf eine Verschiebung zur Zellwand-gebundenen Form zurückzuführen war.

Dazu wurden Verdünnungsreihen von Medien- und Zellwandextrakten am Westernblot verglichen. Während im *pmt1pmt2*-Medium deutlich weniger Cts1p vorhanden war (Abb. 3-1, A) entsprach die Menge in der Zellwand der des Wildtyps (Abb. 3-1, B), es fand also keine Anreicherung des Proteins in der Zellwand statt. Ebenfalls auffällig war das durch die Unterglykosylierung hervorgerufene heterogene Laufverhalten von Cts1p in der *pmt1pmt2*-Mutante. Aus diesem Grund wurde auf eine Quantifizierung der Banden verzichtet.

Ferner war die Abnahme im Medium ausschließlich abhängig von den Mannosyltransferasen Pmt1p und Pmt2p. In anderen *pmt*-Mutanten, die zugleich einen geringeren Einfluß auf die Glykosylierung von Cts1p haben, läßt sich keine Veränderung der Chitinasemenge im Medium feststellen (nicht gezeigt).

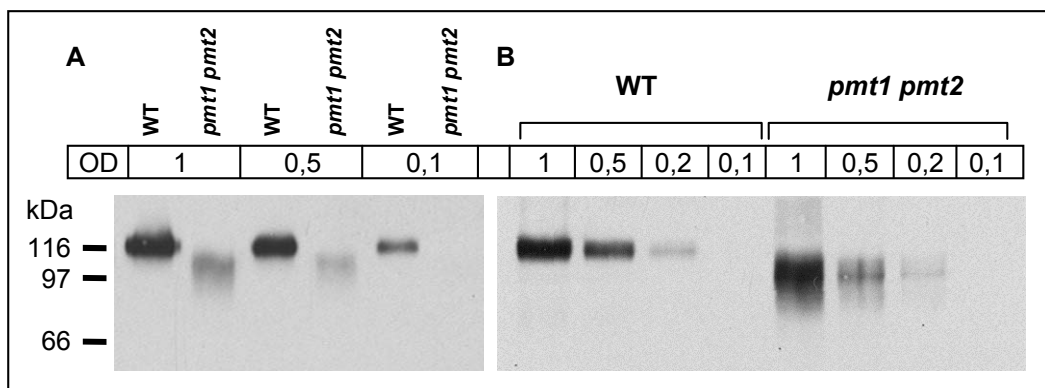


Abb. 3-1: Nachweis von Cts1p im Kulturmedium (A) und in der Zellwand (B)

Cts1p wurde aus dem Medium über Chitin bzw. aus präparierten Zellwänden mit SDS extrahiert. Zur Verdeutlichung quantitativer Unterschiede wurden jeweils Verdünnungsreihen von 1-0,1 OD aufgetragen.

3.1.1.2 *CTS1*-Expression

Eine mögliche Ursache für die Beobachtungen in der *pmt1pmt2*-Mutante ist neben einer Degradation des Proteins eine reduzierte Expression von *CTS1*. Aufgrund der Funktion bei der Trennung von Mutter- und Tochterzelle wird *CTS1* besonders stark Zellzyklus-abhängig reguliert. Da die Generationszeit der *pmt1pmt2*-Mutante im Vergleich zum WT mit 260min fast verdreifacht ist, wurde eine Expressionsanalyse über Northern Blot vorgenommen.

In Abbildung 3-2 ist ein Nachweis der *CTS1*-mRNA im WT und der *pmt1pmt2*-Mutante gezeigt. Im Vergleich zum WT war der relative *CTS1*-mRNA Level sogar leicht erhöht (Faktor 1,28), womit gezeigt werden konnte, daß die Reduktion der Cts1p-Menge in der *pmt1pmt2*-Mutante posttranskriptional stattfinden muß.

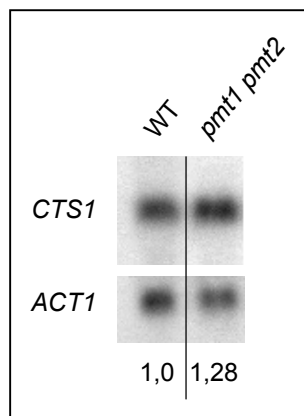


Abb. 3-2: *CTS1* Expression in WT und *pmt1 pmt2*-Mutante
Für den Northern-Blot wurde Gesamt-RNA unsynchronisierter, logarithmisch wachsender Kulturen verwendet. Als Sonde diente ein ca. 600kb großes PCR-Produkt. Die Zahlenwerte geben die relativen *CTS1*-mRNA Level (Phosphorimager) an, normalisiert gegen Aktin und bezogen auf den WT.

3.1.1.3 Intrazelluläre Cts1p Konzentration

Eine weitere Ursache für die verringerte Cts1p-Menge im Kulturmedium der *pmt1pmt2*-Mutante könnte auch in einem generellen Sekretionsdefekt begründet sein. Dabei würde sich das Protein intrazellulär in sekretorischen Kompartimenten und Vesikeln anhäufen.

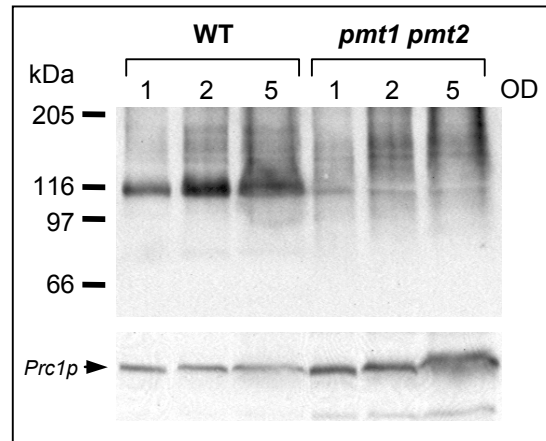
Um diese Frage zu untersuchen wurde Cts1p über Westernblot in aufgeschlossenen WT- bzw. *pmt1pmt2*-Zellen nachgewiesen, wobei zuvor Zellwände und Membranen entfernt wurden.

Allerdings konnte in der PMT-Mutante Cts1p nicht detektiert werden, während es im WT in vollständig glykosylierter Form (116kDa) vorhanden war (Abb. 3-3). Dieses Ergebnis ließ auf eine Degradation des Proteins bereits während der Sekretion schließen, könnte jedoch auch in einer beschleunigten Sekretion begründet sein.

Abb. 3-3: Chitinase vor der Sekretion ins Periplasma

Der Westernblot zeigt aufgetrennte Zellaufschluß-überstände, wobei zuvor Zellwände und Membranen entfernt wurden. Verschiedene OD-Mengen wurden aufgetragen, um evtl. quantitative Unterschiede zu verdeutlichen.

Zur Ladungskontrolle wurde der Blot erneut mit *Prc1* (Carboxypeptidase Y) Antiserum dekoriert und entwickelt.

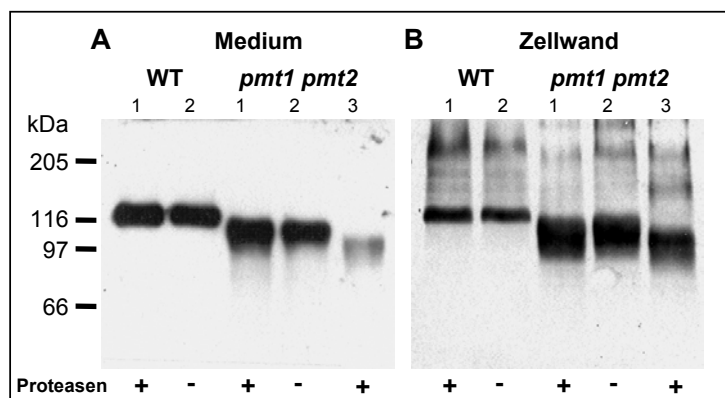
**3.1.1.4 Einfluß vakuolärer Proteasen auf die Cts1p Stabilität**

Holkeri und Makarow (1998) konnten zeigen, daß falsch gefaltete Proteine auch über die Vakuole abgebaut werden. Als Sortierungssignal fungiert dabei die Bindung des Proteins an den Vps10p-Rezeptor im Golgi. Daher sollte zunächst untersucht werden, ob die Reduktion von Cts1p durch einen Abbau durch vakuoläre Proteasen begründet ist. Hierzu wurde *PMT1* zusammen mit *PMT2* in YWO340, einem Proteinase A (*PEP4*), Protease B (*PRB1*) und Carboxypeptidase Y (*PRC1*) defizienten Stamm, disruptiert. Die Deletionen wurden auch in YWO333, dem korrespondierenden WT durchgeführt (HAYwo120), um stammspezifische Unterschiede zu vermeiden. Hierzu wurden die Disruptionsplasmide pDis2 (Strahl-Bolsinger, 1993) für *PMT1* und pBDis (Lussier *et al.*, 1995) für *PMT2* verwendet. In einem Westernblot wurde anschließend Cts1p im Kulturmedium und in der Zellwand von YWO333 und YWO340 jeweils mit und ohne funktionelles *PMT1* und *PMT2* detektiert.

Abb. 3-4: Einfluß vakuolärer Proteasen:

Gezeigt sind Chitinase Westernblots von Medien (A) und Zellwand-extrakten (B) aus YWO333 (1) und YWO340 (2), jeweils mit und ohne *pmt1pmt2*-Deletion.

Zum Vergleich ist zusätzlich eine auf SEY6210 basierende *pmt1pmt2*-Mutante (3) aufgetragen. Aufgetrennt wurden Cts1p-Präparationen sowie SDS-Extrakte von umgerechnet 1 OD Zellen.



Wie in Abbildung 3-4 zu sehen, konnte ein Einfluß vakuolärer Proteasen mit Hilfe der Mutante nicht bestimmt werden, da in diesem Stammhintergrund keine Reduktion der Cts1p-Menge im Kulturmedium einer *pmt1pmt2*-Mutante zu beobachten war.

Eine mögliche Ursache hierfür könnte die unterschiedlich starke Unterglykosylierung in beiden Mutanten darstellen. Die Disruption von *PMT1* zusammen mit *PMT2* wirkte sich in einem YWO333-Stamm weit weniger deutlich auf das Laufverhalten von Cts1p aus, als dies in einem SEY6210-Stamm der Fall war (Abb. 3-4, Spur 3). Dabei war das apparente Molekulargewicht des vollständig glykosylierten Proteins in beiden WT-Stämmen gleich (nicht gezeigt). Die Cts1p-Unterglykosylierung entsprach in der YWO333 *pmt1pmt2*-Mutante in etwa der einer *pmt1*-Mutante im SEY6210-Hintergrund, die ebenfalls keine reduzierten Cts1p-Mengen aufwies.

Die Verwendung des YWO340-Stammes erwies sich daher als ungeeignet um einen Einfluß vakuolärer Proteasen auf eine Mögliche Degradation von Cts1p zu überprüfen.

3.1.1.5 Nachweis von Cts1p in Sekretionsmutanten

Um die Frage zu klären in welchem Kompartiment der Zelle Cts1p abgebaut wird, sollte mit Hilfe von Sekretionsmutanten die quantitative Veränderung des Proteins über den Sekretionsweg in *pmt1pmt2*-Mutanten untersucht werden. *PMT1* und *PMT2* wurden in temperatursensitiven *sec1*, *sec7* und *sec18*-Mutanten deletiert und die Reifung des Proteins im Vergleich zu einer korrespondierenden Ausgangsmutante verfolgt. Die Disruptionen der beiden Gene wurden jeweils wie unter 3.1.1.4 beschrieben durchgeführt.

SEC1: Block der Sekretion zwischen Golgi und Cytoplasmamembran

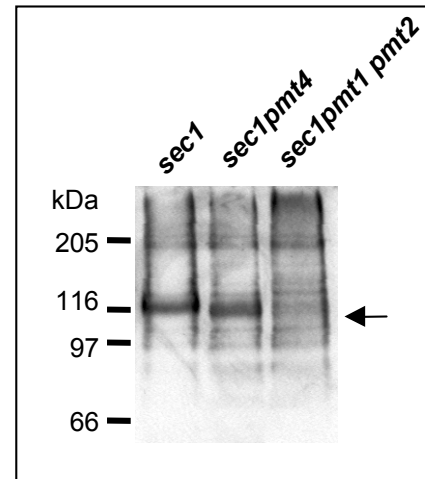
In einer *sec1*-Mutante ist der sekretorische Weg zwischen Golgi und Cytoplasmamembran gestört, wodurch bei restriktiver Temperatur späte sekretorische Vesikel mit vollständig prozessierten Proteinen angehäuft werden (Novick P. *et al.*, 1979, 1980).

Logarithmisch wachsende ÜN-Kulturen gleicher OD wurden 120min bei 37°C gehalten, anschließend aufgeschlossen und Zellwände und Membranen durch Zentrifugation abgetrennt. In Abbildung 3-5 ist ein Westernblot mit den aufgetrennten löslichen Überständen dargestellt. Cts1p wurde bei funktionellem Pmt1p und Pmt2p in einer der sezernierten Form vergleichbaren Größe intrazellulär akkumuliert, während in

dem korrespondierenden *pmt1pmt2*-Überstand kein Signal auf der zu erwartenden Höhe vorhanden war. In einer als Kontrolle aufgetragenen *sec1pmt4*-Mutante war Cts1p leicht unterglykosyliert, quantitativ aber unverändert.

Abb. 3-5: Cts1p in *sec1*-Mutanten bei 37°C

PMT1 und *PMT2* bzw. *PMT4* wurden in ein einem *sec1* Hintergrund (WT) disruptiert. Für den Chitinase-Westernblot wurden die Zellen 120min bei restriktiver Temperatur gehaltenen, anschließend aufgeschlossen und Zellwände sowie Membranen abgetrennt. Pro Spur wurden eine Proteinmenge von 17µg des Überstands aufgetragen.



Damit konnte eindeutig gezeigt werden, daß späte sekretorische Vesikel in einer *pmt1pmt2*-Mutante bereits deutlich weniger Cts1p enthielten, womit von einer intrazellulären Degradation des Proteins ausgegangen werden konnte.

SEC7: Block der Sekretion im Golgi

Sec7p wird als Hüllprotein von *Non-Clathrin Coated Vesicles* für den Proteintransport innerhalb des Golgi benötigt (Wolf *et al.*, 1998). In einer temperatursensitiven *sec7*-Mutante häufen sich bei restriktiver Temperatur sekretorische Proteine vor allem in späten Golgi-Kompartimenten an (Achstetter *et al.*, 1988).

Um zu untersuchen, ob Cts1p bereits im Golgi reduziert ist, wurde analog zur *sec1*-Mutante ein entsprechendes Experiment in einer *sec7pmt1pmt2*-Mutante durchgeführt.

Im Gegensatz zu späten sekretorischen Vesikeln konnte Cts1p im Golgi einer *pmt1pmt2*-Mutante in reduzierter Menge detektiert werden. Das Protein wurde jedoch in dieser Mutante durch die verlängerte Verweildauer im Golgi bei 37°C „übermannosyliert“, wodurch das Molekulargewicht deutlich über das des sezernierten Proteins anstieg, eine Beobachtung die bereits von Kuranda und Robbins (1991) gemacht wurde. Es entstand eine Mischung aus verschiedenen Cts1p-Varianten unterschiedlichen Laufverhaltens, welche über SDS-PAGE als Schmier von 120kDa bis weit über 200kDa nur schlecht aufgetrennt werden konnten (nicht gezeigt). Aufgrund

der heterogenen Mobilität des Proteins war eine hinreichend genaue Quantifizierung der Proteinmenge in einer blockierten *sec7pmt1pmt2*-Mutante nicht möglich.

SEC18: Block der Sekretion zwischen Endoplasmatischen Retikulum und Golgi

Bei restriktiver Temperatur ist in einer *sec18*-Mutante der Vesikeltransfer bereits vom Endoplasmatischen Retikulum (ER) zum frühen Golgi blockiert (Graham und Emr, 1991) und sekretorische Proteine werden daher im ER-Kompartiment angehäuft.

Um eine ER-assoziierte Degradation von Cts1p zu untersuchen, wurde wie bereits für SEC1 und SEC7 beschrieben, das Protein in einer *sec18pmt1pmt2*-, und einer *sec18*-Mutante nachgewiesen und verglichen.

Wie in Abbildung 3-6 gezeigt ist, erhöhte sich in einer *sec18*-Mutante bei 37°C die Mobilität von Cts1p am SDS-Gel im Vergleich zur permissiven Temperatur von 120kDa auf 100kDa, was auf die fehlende Verlängerung der Mannoseketten im Golgi zurückzuführen war. Bei der zusätzlich aufgetretenen 120kDa Bande handelt es sich um vollständig glykosyliertes Cts1p, welches bei permissiver Temperatur nicht mehr sezerniert wurde. In der *sec18pmt1pmt2* Mutante hingegen war auch bei 37°C kein Signal zu erkennen (Abb. 3-6A). Dies läßt auf einen ER-assoziierten Abbau des Proteins über das Proteasom schließen.

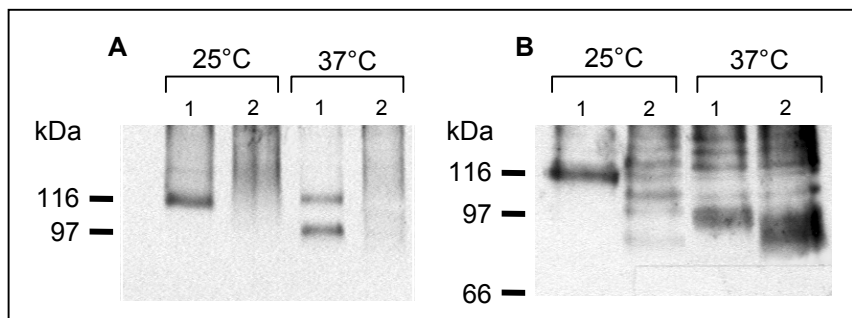


Abb. 3-6: Cts1p in *sec18*-Mutanten bei 25°C und 37°C

Die Westernblots zeigen Cts1p intrazellulär in *sec18* (1) und *sec18pmt1pmt2* (2) bei permissiver (25°C) und restriktiver (37°C) Temperatur. Aufgetragen wurde jeweils 10µg (A) bzw. 30µg (B) Zellysat ohne Zellwände und Membranen. Die Inkubationszeit bei 37°C betrug 90min (A) bzw. 120min (B).

Durch die Temperaturerhöhung von 25°C auf 37°C wurde aber nicht nur die Sekretion blockiert sondern auch das Wachstum der Zellen gestoppt. Die Verdopplungszeit einer *sec18pmt1pmt2*-Mutante lag mit 260min deutlich über der einer *sec18*-Mutante (150min). Um einen Einfluß des verlangsamten Wachstums auf die Blockierung der Sekretion und damit die Akkumulation von Proteinen im ER auszuschließen, wurde für

die PMT-Mutante die Inkubationszeit auf 37°C von 90min auf 120min verlängert. Desweiteren wurde die aufgetragene Proteinmenge von 10µg/Spur auf 30µg/Spur erhöht. Durch diese Maßnahmen war auch in der *sec18pmt1pmt2*-Mutante ein schwaches Cts1p-Signal zu erkennen (Abb. 3-6B). Im Vergleich zur *sec18*-Mutante ist es erwartungsgemäß leicht unterglykosyliert, aber quantitativ wenig beeinträchtigt. Allerdings verursachten die großen Extraktmengen, die zur Visualisierung von Cts1p nötig waren, zahlreiche Kreuzreaktionen des Antiserums mit anderen Proteinen und erschwerten so eine eindeutige Zuordnung des Cts1p-Signals. Wie in Untersuchungen mit Pir2p gezeigt werden konnte, läßt sich durch eine Retention eines Proteins im ER eine Unterglykosylierung fast vollständig kompensieren (3.1.3.2), weshalb davon ausgegangen wurde, daß dies auch für Cts1p der Fall sein könnte.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß Cts1p im Fall einer unzureichenden O-Glykosylierung in einer *pmt1pmt2*-Doppelmutante zu einem großen Teil und sehr wahrscheinlich bereits im ER degradiert wird. Nicht abgebautes Protein wird in einer unterglykosylierten Form nach außen sezerniert und in wildtypischen Mengen in der Zellwand gebunden. Verantwortlich dafür ist vermutlich die spezifische Bindung der Chitinase an das Chitin der Zellwand, dessen Menge in *pmt1pmt2*-Zellwänden nahezu verdreifacht ist (M. Gentzsch; 1996).

3.1.2 Aga2p – α -Agglutinin

Aga2p ist über Disulfidbrücken an Aga1p, einem GPI-verankerten Protein gebunden. Dieser α -Agglutinin Komplex ist nach α -Faktor Induktion ein Bestandteil der Zellwand in MATa Zellen (Watzele *et al.*, 1988, Cappellaro *et al.*, 1991). Aga2p läßt sich mittels SH-Agenzien, wie z.B. DTT oder MeSH, aus Zellwänden intakter Zellen extrahieren und über SDS-PAGE als 22kDa-Bande auftrennen. Die nur 69 Aminosäuren (7,5kDa) große Polypeptidkette des sezernierten α -Agglutinins enthält 21 Serine und Threonine, von welchen ca. 2/3 durch Mannoseketten modifiziert sind (Watzele *et al.*, 1988). Ferner enthält die Proteinsequenz keine N-Glykosylierungstellen (Orlean *et al.*, 1986). Eine Unterglykosylierung des Proteins konnte bereits von M. Gentzsch (1996) in *pmt1* und *pmt2*-Mutanten gezeigt werden, während Pmt4p Aga2p nicht zu glykosylieren scheint.

Um quantitative Auswirkungen durch reduzierte O-Glykosylierung zu untersuchen, wurden *pmt*-Mutanten und WT mit α -Faktor induziert. Anschließend wurde Aga2p in der Zellwand nachgewiesen und quantifiziert. Mit Ausnahme der *pmt3*-Mutante war in allen untersuchten *pmt*-Mutanten die Menge des Proteins in der Zellwand deutlich verringert (Abb. 3-7). Da es sich bei Aga2p um ein induziertes Protein handelt, sind neben einer Degradation des Proteins, verursacht durch verminderte O-Glykosylierung, auch andere Ursachen hierfür denkbar.

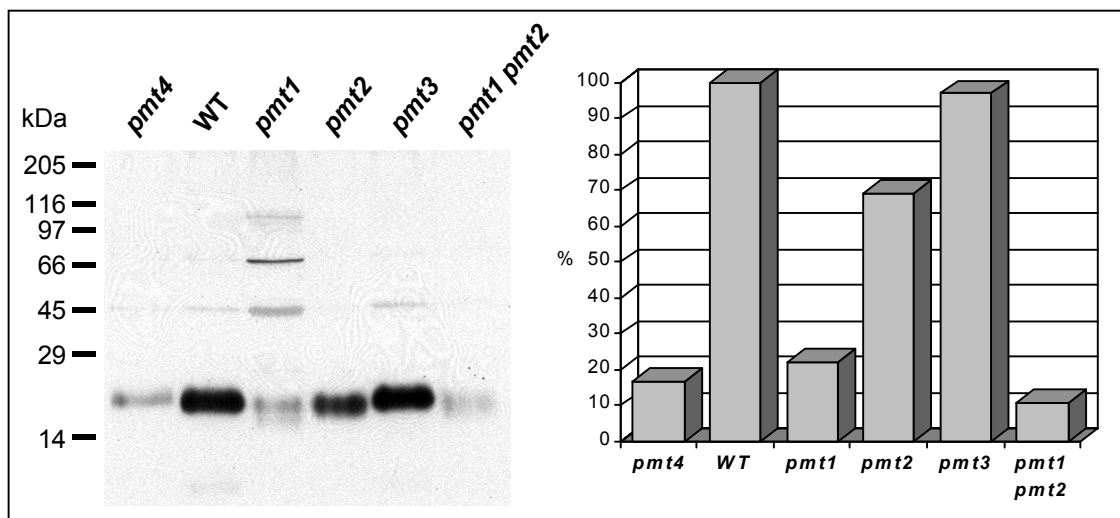


Abb. 3-7: Aga2p, extrahiert aus ganzen Zellen:

Logarithmisch wachsende Zellen wurden wie unter 2.2.5.1 beschrieben mit α -Faktor induziert und anschließend mit 2mM DTT behandelt, wobei sich Aga2p quantitativ aus der Zellwand lösen läßt. Die Extrakte wurden über ein 15% SDS-Gel aufgetrennt und Aga2p mittels Westernblot nachgewiesen. Der polyklonale Antikörper ist gegen das durch HF deglykosylierte Protein gerichtet. Rechts ist eine Quantifizierung der einzelnen Banden über *Optiquant* dargestellt. Die absoluten Werte wurden prozentual zum WT (=100%) normalisiert.

Die Expression der Agglutinine wird nach einem Kontakt der Zelle mit α -Faktor durch den *Pheromone-Response* Signaltransduktionsweg induziert. Desweiteren arretieren so behandelte Hefezellen den Zellzyklus in der G1-Phase und bilden charakteristische Zellverformungen (Shmoo) (Bücking-Throm *et al.*, 1973). Eine Beeinträchtigung der Signalaufnahme durch den Rezeptor bzw. die Weiterleitung des Signals würde daher auch zu reduzierten Aga2p-Mengen führen.

Hinweise für eine Störung der Pheromon-Reaktion konnte bereits für eine *pmt4*-Mutante gezeigt werden. Der Zellzyklus-Arrest setzt in dieser Mutante nach Zugabe von α -Faktor abgeschwächt oder deutlich verlangsamt ein, wobei die Paarungsfähigkeit dadurch nicht beeinträchtigt ist (M. Gentsch, 1996).

Um zu überprüfen, ob eine Störung der Pheromon-Reaktion auch in anderen *pmt*-Mutanten der Grund für die reduzierte Menge Aga2p ist, wurden Knospungs- und Shmoo-Indizes nach α -Faktorgabe bestimmt.

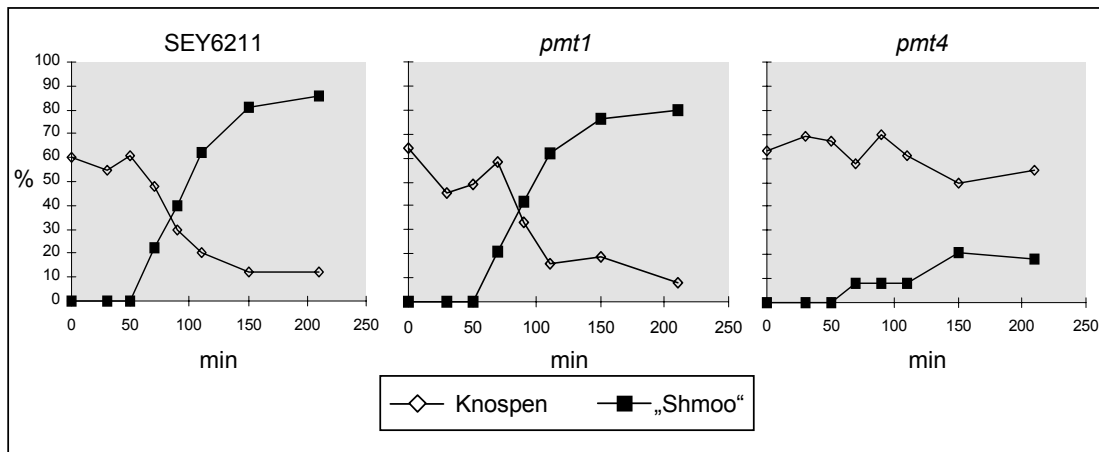


Abb. 3-8: Bestimmung von Knospungs- und Shmoo-Index:

Dargestellt ist die Reaktion unsynchronisierter Flüssigkulturen auf die Zugabe von α -Faktor ($t=30$). Bestimmt wurde jeweils die Zahl der Knospen bzw. Shmoos von ca. 100 Zellen über einen von Zeitraum von 210min.

In Abbildung 3-8 sind exemplarisch Zeitverläufe von Knospung und Shmoo-Bildung dargestellt. Während im WT nach α -Faktor Zugabe der Zellzyklus arretierte und die Zahl der knospenden Zellen binnen 120min auf 10% zurückging, blieb der Knospungsindex der *pmt4*-Mutante erwartungsgemäß über 180min auf einem ähnlichen Niveau. Vereinzelt waren in der *pmt4*-Mutante zwar „Shmoos“ zu erkennen, ihre Anzahl ging während der α -Faktor Induktion jedoch nicht über 20% hinaus. In der *pmt1*-Mutante war jedoch eine reduzierte Sensibilität gegenüber dem Pheromon nicht zu beobachten. Sowohl Knospungsindex als auch Shmoo-Bildung waren auf WT-Niveau.

Übereinstimmend mit diesem Ergebnis sind auch die Expressionsdaten von *AGA2* in der *pmt4*-Mutante. Mittels Northern Blot Analyse wurde die Transkriptmenge von *AGA2* im Wildtyp und den jeweiligen Mutanten über 120min nach Zugabe von α -Faktor verfolgt (Abb. 3-9). Ein Expressionsanstieg von *AGA2* war zwar auch in der *pmt4*-Mutante nach 60min zu erkennen, die mRNA-Menge erreichte aber auch nach 120min nur 20% des Expressionsniveaus des WTs.

Für die *pmt1*-Mutante war nach den Ergebnissen aus den Knospungsindizes ein deutlicher Expressionsanstieg von *AGA2* nach Pheromoninduktion erwartet worden, die

Transkriptmenge erreichte jedoch auch nach 120 min nur 1/5 des Wildtyps und war sogar im Vergleich zur *pmt4*-Mutante um weitere 50% erniedrigt (Abb. 3-9).

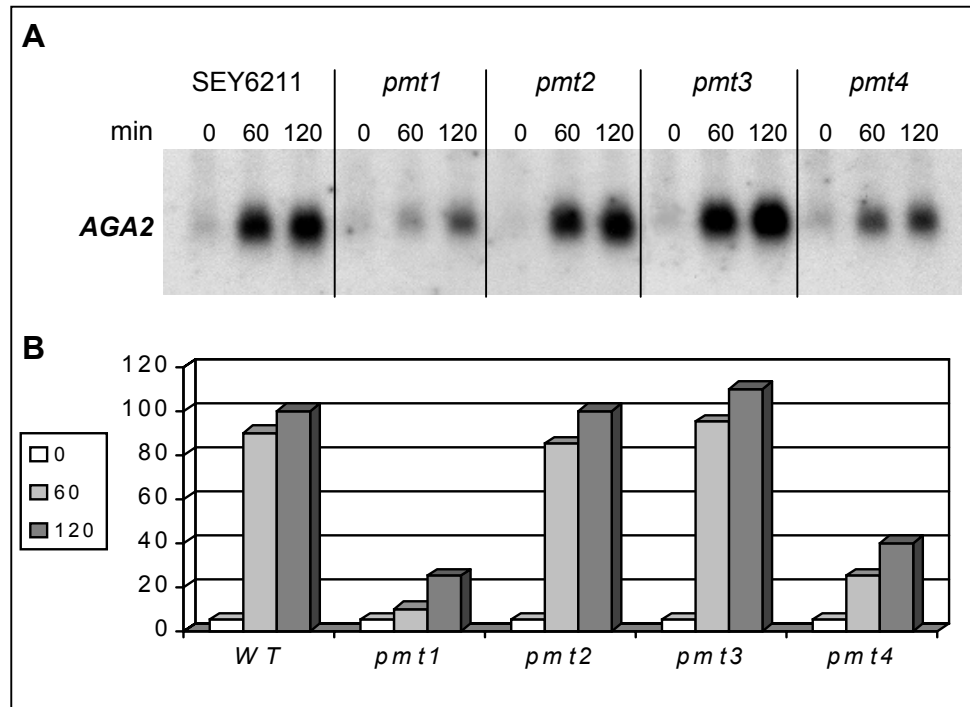


Abb. 3-9: Expression von *AGA2* in *pmt*-Mutanten nach α -Faktor Induktion:

(A) Detektion von *AGA2* mittels einer 350bp PCR-Sonde. Aufgetragen sind jeweils 20 μ g präparierte Gesamt-RNA, t=0 entspricht hier der Zugabe von α -Faktor.

(B) Quantifizierung der Transkriptmengen über Phosphorimager, normalisiert gegen *ACT1* (nicht gezeigt).

Auf diese Weise konnte gezeigt werden, daß sowohl in *pmt1*- als auch in *pmt4*-Mutanten eine reduzierte Expression von *AGA2* nach der Zugabe von α -Faktor die Ursache für die geringere Proteinmenge in der Zellwand darstellt. In allen anderen untersuchten *pmt*-Mutanten war die Induktion von *AGA2* nicht beeinträchtigt.

3.1.3 *Pir2p* / *Hsp150*

Das Hitzeschock Protein Hsp150 / Pir2p wurde zunächst von Russo *et al.* (1992) als ein ins Medium sezerniertes Protein beschrieben. Während *PIR2* bei 30°C konstitutiv exprimiert wird, führt eine Erhöhung der *PIR2*-Transkription bei einer Wachstumstemperatur von 37°C innerhalb von 60min zu einer 7-fachen Zunahme des Proteins im Medium (Russo *et al.*, 1992). Ähnliche Anstiege sind auch bei Stickstoffmangel, in Anwesenheit von Al³⁺-Ionen und nach oxidativem Streß zu beobachten (Lupashin *et al.*, 1992, Russo *et al.*, 1992, Ezaki *et al.*, 1998). Das primäre

Translationsprodukt von Pir2p besteht aus 414AS und wird posttranslational ins ER transloziert (Paunola *et al.*, 1998). Neben der Abspaltung des Signalpeptids (18AS) wird die Polypeptidkette auch durch die Golgi-Protease Kex2p prozessiert, wodurch zwei Untereinheiten (54AS und 342AS) entstehen, welche während der Sekretion nicht kovalent assoziiert bleiben. Bei der ins Medium abgegebenen Form handelt es sich stets um das größere der beiden Fragmente (Russo *et al.*, 1992). Wie alle Proteine der PIR-Familie ist auch Pir2p zumindest teilweise direkt an β -1,3 Glukan in der Zellwand verankert und läßt sich dementsprechend mit β -1,3 Glukanasen oder mit schwacher Lauge aus dieser extrahieren (Mrsa *et al.*, 1997; Kapteyn *et al.*, 1999). Nach wie vor ungeklärt ist um welche Art kovalenter Bindung es sich dabei handelt und auf welche Weise diese katalysiert wird. Das Verhältnis von löslichem zu gebundenen Pir2p liegt bei ca 4:1 (Kapteyn *et al.*, 1999). Das Serin/Threonin reiche Protein (25%) ist sehr stark O-glykosyliert und besitzt außerdem keine N-Glykosylierungsstelle. In Untersuchungen zur Substratspezifität der verschiedenen Pmtps konnte gezeigt werden, daß Pir2p von den Mannosyltransferasen Pmt1p, Pmt2p und Pmt4p glykosyliert wird und daß die Menge des ins Medium sezernierten Proteins in einer *pmt1pmt2*-Mutante sehr stark verringert ist (M. Gentsch, 1996).

3.1.3.1 Pir2p im Kulturmedium von *pmt*-Mutanten

Zunächst sollte Pir2p im Medium von WT und verschiedenen *pmt*-Mutanten untersucht werden. Hierzu wurden die Stämme 90min bei 37°C inkubiert und Pir2p aus dem Medium isoliert. Der Nachweis erfolgte über SDS-PAGE und Westernblot (Abb. 3-10). Im Wildtyp migrierte Pir2p als distinkte Bande auf einer Höhe von 167kDa. Das Laufverhalten in den Mutanten *pmt5* und *pmt6* war nicht beeinträchtigt, während in *pmt4* die Bande leicht nach unten verschoben und zusätzlich eine 92kDa große, diffuse Bande zu erkennen war. Dramatische Veränderungen traten erwartungsgemäß in der Doppelmutante *pmt1pmt2*, aber auch in leicht abgeschwächter Form in den entsprechenden Einzelmutanten auf. Pir2p wurde hier als stark diffuse Bande in einem viel kleineren Molekulargewichtsbereich als im WT aufgetrennt. Während im *pmt2*-Medium ein Teil des Proteins noch eine dem WT vergleichbare Größe aufwies, trat in der Doppelmutante eine niedermolekulare Bande auf, welche mit 30kDa kleiner war, als das theoretische Molekulargewicht der unglykosylierten Polypeptidkette.

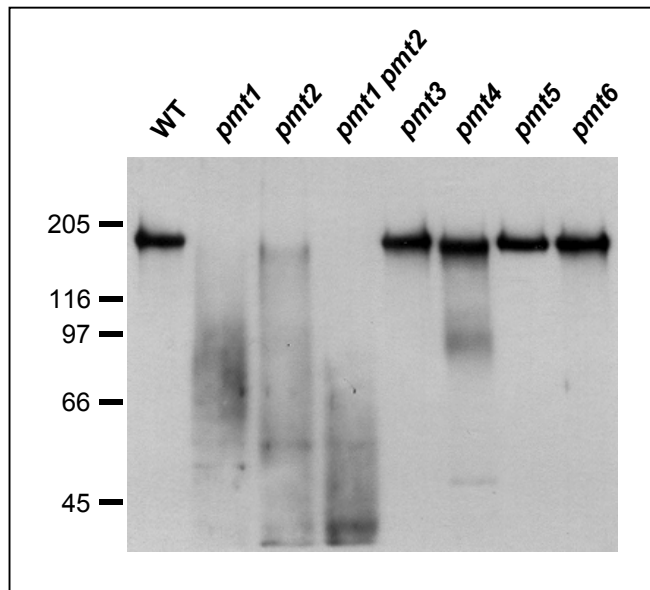


Abb. 3-10: Nachweis von Pir2p im Medium von WT und *pmt*-Mutanten.

Die Inkubationszeit auf 37°C zur Induktion von *PIR2* betrug 90min. Es wurde jeweils Kulturmedium aufgetragen, das einer Menge von 1 OD Zellen entsprach. Der Nachweis erfolgte mittels polyklonalem Antiserum.

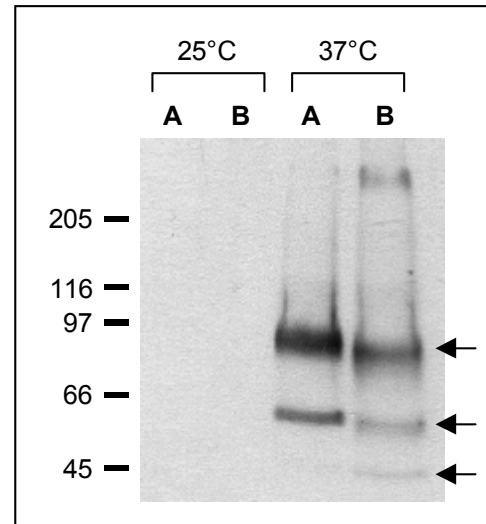
3.1.3.2 Nachweis von Pir2p in Sekretionsmutanten

Um festzustellen ob die qualitativen Veränderungen von Pir2p auf proteolytische Spaltung eines Teils des Proteins zurückzuführen sind, oder es sich lediglich um eine stark ausgeprägte Unterglykosylierung handelt, wurde analog zu den Cts1p-Untersuchungen die Maturation des Proteins im Sekretionsweg verfolgt. Verwendet wurden dazu die in den Abschnitten 3.1.1.4 und 3.1.1.5 beschriebenen Deletionsmutanten.

SEC18: Block der Sekretion zwischen Endoplasmatischem Retikulum und Golgi

In der temperatursensitiven *sec18*-Mutante lag Pir2p nach 90minütiger Induktion bei 37°C in zwei Formen vor, die ein Molekulargewicht von 93kDa bzw. 58kDa aufwiesen (Abb. 3-11). Nicht geklärt werden konnte, warum das Protein in zwei Banden auftrennte. Allerdings waren beide Banden in der *pmt1pmt2*-Mutante mit 82kDa bzw. 53kDa durch die unvollständige Glykosylierung einerseits kleiner als im WT, andererseits deutlich größer als die sezernierten Formen des Proteins. Sowohl im WT als auch in der *pmt1pmt2*-Mutante konnte man eine weitere, sehr schwache Bande erkennen, welche mit 43kDa ungefähr der berechneten Größe des unmodifizierten Proteins entsprach. Da Pir2p postranslational transloziert wird, könnte es sich dabei um die cytosolische und daher unglykosylierte Form handeln. In den analog bei permissiver Temperatur präparierten Kontrollen ließ sich Pir2p in keiner der drei Formen intrazellulär nachweisen.

Abb. 3-11: Intrazellulärer Nachweis von Pir2p in *sec18*
 Dargestellt ist ein Westernblot der ER-Formen von Pir2p in *sec18* (A) und *sec18pmt1pmt2*-Mutanten (B). Aufgetragen wurden jeweils 2 OD des löslichen Überstands einer Zellfraktionierung (siehe Methoden 2.2.5.3).



Hinweise auf proteolytische Spaltung im ER bzw. mit dem ER assoziiert, wie für Cts1p, konnten mittels der *sec18*-Mutante nicht gefunden werden. Eine Degradation des Proteins später im Sekretionsweg erschien ausgehend von der Größe des Proteins im ER jedoch wahrscheinlich. Belege hierfür sollte eine Verfolgung der Freisetzung des im ER akkumulierten Proteins liefern. Bei 37°C wird Pir2p in einer *sec18*-Mutante zum einen verstärkt exprimiert aber auch im ER angehäuft. Umgekehrt sollte ein Wechsel auf permissive Temperatur das akkumulierte Protein freisetzen und zu einem Rückgang der *PIR2*-Expression führen. Dieses Prinzip wurde genutzt um sowohl die intrazelluläre Abnahme als auch die Zunahme des sezernierten Pir2ps im Medium zu verfolgen.

Hierzu wurden zunächst jeweils 5x10 OD Zellen einem Hitzeschock unterzogen. Nach 90min wurden die Ansätze pelletiert und mit Ausnahme des Nullwerts nach einem Waschschrift in vorgewärmtem YPD aufgenommen und auf 25°C inkubiert. Zu entsprechenden Zeitpunkten wurden Zellen und Kulturmedium durch Zentrifugation getrennt. Die Zellen wurden aufgeschlossen, fraktioniert und eine 1 OD entsprechende Menge des löslichen Überstands der Zellfraktionierung sowie des Mediums über SDS-PAGE aufgetrennt.

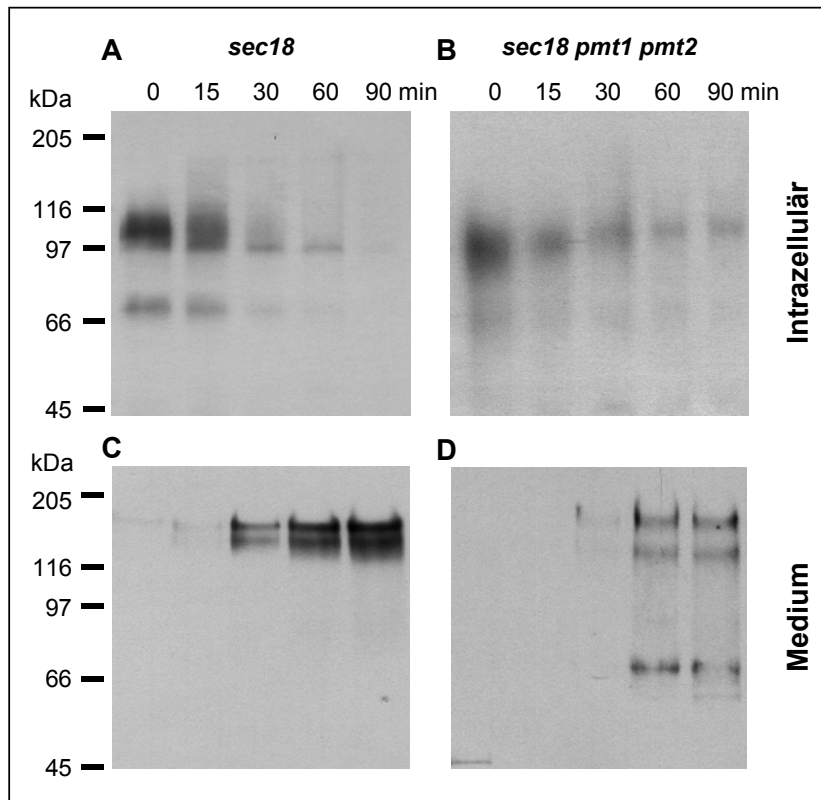


Abb. 3-12: Pir2p Sekretion aus *sec18* nach Temperaturwechsel

Dargestellt sind Westernblots eines Zeitverlaufs der Sekretion von intrazellulär akkumuliertem Pir2p jeweils in *sec18* und *sec18pmt1pmt2*-Mutanten. Verfolgt wurde die Abnahme des Proteins im ER (A, B) bzw. die gleichzeitige Zunahme im Medium (C, D). Je 50 OD Zellen wurden 90min auf 37°C inkubiert Aufgetragen sind jeweils 1 OD des löslichen Überstands einer Zellfraktionierung

Wie in Abbildung 3-12 dargestellt begann die Sekretion intrazellulär akkumulierten Proteins ins Medium in der *sec18*-Mutante bereits nach 15min auf 25°C. Nach 90min war Pir2p vollständig nach außen abgegeben. Auffällig war eine Doppelbande in welche die sezernierte Form von Pir2p auftrennte. Ein ähnliches Laufverhalten wurde bereits von Lupashin *et al.* (1991) für Pir2p als Komponente des gp400 Komplexes beschrieben. Vermutlich handelt es sich hierbei um zwei unterschiedlich prozessierte Formen von Pir2p.

In der *sec18pmt1pmt2*-Mutante wurde Pir2p wie zunächst erwartet leicht unterglykosyliert intrazellulär angehäuft und analog zur *sec18*-Mutante bei permissiver Temperatur binnen 90min nach außen abgegeben. Überraschend war, daß die Größe der sezernierten Form durch die *pmt1pmt2*-Deletion scheinbar nicht beeinflusst war und in einer vergleichbaren Größe ebenfalls in einer Doppelbande aufgetrennt wurde, wobei die untere Form geringfügig kleiner als im WT war (Abb. 3-12D). Eine zusätzliche weitere Bande im Medienextrakt entsprach mit ca. 66kDa eher der erwarteten Größe.

Ferner war die in der *sec18*-Mutante nicht beobachtete leichte Größenzunahme des akkumulierten Proteins auffällig (Abb. 3-12; B).

Ein möglicher Grund für die Größenzunahme von Pir2p in der *sec18pmt1pmt2*-Mutante in diesem Experiment ist die längere Verweildauer des Proteins im ER. Während des 90minütigen Sekretionsblocks oder auch durch eine verlangsamte Translokation wurde das Protein vermutlich durch andere PMTs nahezu vollständig glykosyliert.

SEC1: Block der Sekretion zwischen Golgi und Cytoplasmamembran

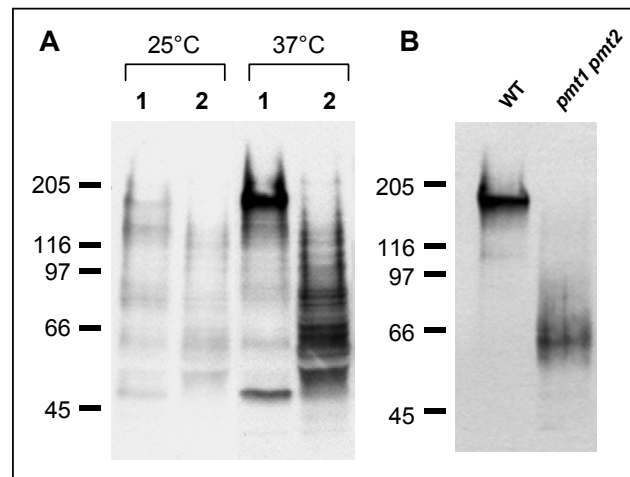
Da die Sekretion von Pir2p COP I-unabhängig verläuft (Gaynor und Emr, 1997), konnte die zur Verfügung stehende *sec7*-Mutante nicht benutzt werden, da in dieser die Sekretion von Pir2p nicht blockiert wird (Lupashin *et al.*, 1992). Um zu zeigen, daß abgebaute Formen des Proteins bereits intrazellulär vorliegen, wurde im folgenden eine *sec1*-Mutante verwendet.

Wie in Abbildung 3-13 (A) dargestellt, konnte Pir2p bei 37°C erwartungsgemäß intrazellulär angereichert werden. In der blockierten *sec1*-Mutante entsprach die Mobilität der Pir2p-Bande der der sezernierten Form (Abb. 3-13, B). In der *sec1pmt1pmt2*-Mutante trennte das intrazelluläre Protein sehr heterogen über einen Molekulargewichtsbereich von 50kDa-100kDa auf, wobei das intensivste Signal, vergleichbar mit der sezernierten Form, auf einer Höhe von 60kDa lag. Man konnte daher davon ausgehen, daß sich die sezernierte Form von Pir2p nicht von der in späten sekretorischen Vesikeln, jedoch deutlich von der ER-Form in einer *sec18pmt1pmt2*-Mutante unterschied. Abbauprodukte von Pir2p wurden jedoch auch in späten sekretorischen Vesikeln nicht eindeutig nachgewiesen.

Abb. 3-13: Pir2p in *sec1*-Mutanten:

A: Aufgetrennt wurden lösliche Überstände von Zellaufschlüssen von *sec1* (1) und der korrespondierenden *pmt1pmt2*-Mutante (2) bei 30°C und nach 90min bei 37°C. Pro Spur wurden 15µg Protein aufgetragen.

B: Zum Vergleich wurden SDS-Extrakte einer 1 OD Zellen entsprechenden Menge Medium von WT und *pmt1pmt2*-Mutante aufgetragen



Deglykosylierung von Pir2p mit Fluorwasserstoff (HF)

Durch eine vollständige chemische Abspaltung aller O-glykosidischen Zucker sollte die genaue Größe der sezernierten Pir2p-Polypeptidkette in WT und *pmt1pmt2*-Mutante bestimmt und verglichen werden. Hierzu wurde lyophyllisiertes Medium Hitze induzierter Zellen mit HF behandelt. Eine dreistündige Inkubation der Proben auf Eis erwies sich als ausreichend für eine vollständige Deglykosylierung des Proteins (Abb. 3-14).

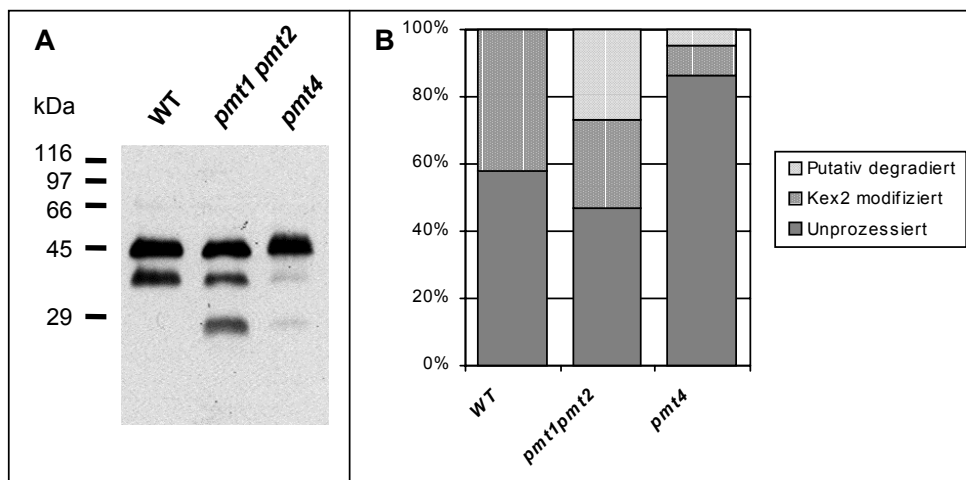


Abb. 3-14: Ins Medium sezerniertes Pir2p nach HF-Spaltung

- A: Westernblot HF-gespaltener Medienproben. Eingesetzt wurde jeweils 100µl Medium (10 OD Zellen) von SEY6210 (WT), *pmt1 pmt1* und *pmt4*-Mutante nach 90min Hitzeschock.
- B: Quantifizierung der einzelnen Banden des Westernblot über Optiquant (8bit Graustufen). Für einen anschaulicheren Vergleich der einzelnen Banden wurde die Summe aller Werte auf 100% normalisiert.

Obwohl das verwendete Pir2p Antiserum gegen das vollständig glykosylierte Protein gerichtet ist, wurden die deglykosylierten Formen in ähnlicher Weise erkannt. Im WT wurden zwei sezernierte *PIR2*-Genprodukte mit apparenten Molekulargewichten von 45kDa bzw. 36kDa nachgewiesen. Dies entsprach näherungsweise den errechneten Größen von 42kDa für das unprozessierte bzw. 35kDa für das Kex2p gespaltene Protein. Beide Formen konnten auch im Medium von *pmt1pmt2*-, bzw. *pmt4*-Mutanten detektiert werden, obwohl die 35kDa Pir2p-Form in der *pmt1pmt2*-Mutante schwächer und in der *pmt4*-Mutante kaum nachweisbar war. Zusätzlich trat in beiden *pmt*-Mutanten eine dritte Form auf, welche mit einem apparenten Molekulargewicht von 26kDa ein mögliches Abbauprodukt darstellen könnte.

Die Quantifizierung der einzelnen Banden ergab, daß in der *pmt1pmt2*-Mutante 27% des sezernierten Pir2p in einer potentiell degradierten Form vorliegen, während der

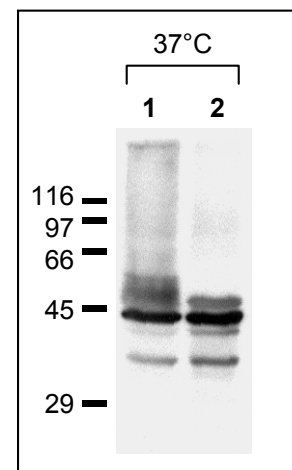
Großteil des Proteins ungespalten (47%), bzw. durch die Kex2p Protease prozessiert (26%) wurde.

In der *pmt4*-Mutante wurden fast 90% von Pir2p unmodifiziert ins Medium sezerniert. Sowohl die Kex2p modifizierte Form als auch das potentielle Abbauprodukt waren mit 9% bzw. 4% unterrepräsentiert.

Im folgenden sollte mit einer weiteren Deglykosylierung von Pir2p in einer *sec1*-Mutante untersucht werden, ob das Protein bereits intrazellulär fragmentiert vorliegt.

Abb. 3-15 Intrazelluläres Pir2p nach HF-Spaltung

Dargestellt ist ein Westernblot mit HF-behandelten Überständen von Zellfraktionierungen. Eingesetzt wurden je 10 OD *sec1* (1) und *sec1 pmt1 pmt2*-Zellen (2). Die Reaktion wurde binnen 3h auf Eis durchgeführt. Der relativ hohe Hintergrund des Blots läßt sich wahrscheinlich auf Kreuzreaktionen mit anderen Proteinen und nicht auf eine unvollständige Spaltung von Pir2p zurückführen



Hierzu wurden je 10 OD Hitze behandelte Zellen aufgebrochen und zentrifugiert. Der lösliche Überstand wurde lyophilisiert und 3h auf Eis mit HF behandelt. Am Westernblot (Abb. 3-15) trennte Pir2p in *sec1* und *sec1pmt1pmt2*-Mutante ähnlich auf. Das apparente Molekulargewicht der Banden lag mit 41kDa bzw. 33kDa im Bereich der für das Medium ermittelten Werte. Die geringfügige Abweichung läßt sich mit der unterschiedlichen Gesamtproteinmenge erklären, welche auf die jeweiligen SDS-Gele aufgetragen wurde. Ein potentiell Abbauprodukt wie im *pmt1pmt2*-Medium konnte in der entsprechenden SEC-Mutante nicht gefunden werden. Daher läßt sich schließen, daß die Degradation von Pir2p nicht in sekretorischen Kompartimenten der Zelle stattfindet, sondern womöglich erst im Kulturmedium, dem Periplasma oder in der Zellwand durch sezernierte Proteasen degradiert wird.

3.1.4 Northern Analyse von *KAR2* und *PRC1* in *pmt*-Mutanten

Im folgenden wurde auf transkriptioneller Ebene nach Hinweisen für einen direkten Einfluß der O-Glykosylierung auf die Stabilität derart modifizierter Proteine gesucht. Dazu wurde die Expression der vakuolären Carboxypeptidase Y (*PRC1*) und des Chaperons *KAR2* (BiP) in verschiedenen *pmt*-Mutanten untersucht.

Carboxypeptidase Y (*PRC1*) wurde als Modellbeispiel vakuolärer Proteasen gewählt, da in PMT-Mehrfachmutanten bereits Hinweise für eine erhöhte Menge auf Proteinebene vorlagen.

Für Kar2p wurde gezeigt, daß es sowohl für die Translokation von Proteinen ins ER (Brodsky *et al.*, 1995), aber auch für deren Stabilisierung benötigt wird. Ferner ist Kar2p auch an der ER assoziierten Protein Degradation (ERAD) beteiligt, vermutlich am Transport ungefalteter Proteine vom ER-Lumen ins Cytosol, dem Ort des proteasomalen Abbaus (Plempner *et al.*, 1997; Brodsky *et al.*, 1999). Transkriptionell wird *KAR2* über ein UPR (*unfolded protein response*)-Element reguliert (Mori *et al.*, 1998). Die Expression kann sowohl durch Hitzeschock als auch durch Inhibition der N-Glykosylierung durch z.B. Tunikamycin induziert werden (Kohno *et al.*, 1993; Cox *et al.*, 1993).

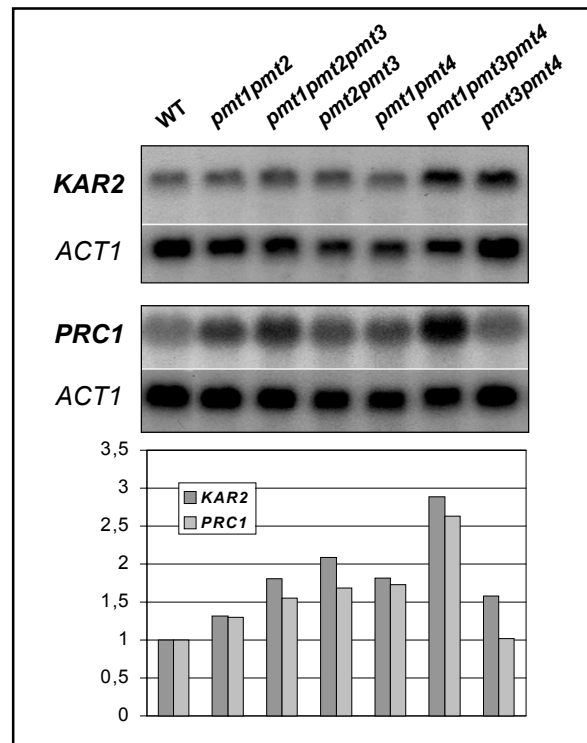
Über Northern Blot Analyse wurden die relativen mRNA-Mengen von *KAR2* und *PRC1* in verschiedenen PMT-Mehrfachmutanten bestimmt (Abb. 3-16). Die Signale wurden quantifiziert, gegenüber einer Aktin-Kontrolle abgeglichen und mit den jeweiligen WT-Signalen verrechnet. Mit Ausnahme der *pmt3pmt4*-Mutante war in allen untersuchten Mutanten die Expression von *KAR2* und *PRC1* erhöht. Auffällig war ebenso, daß die mRNA-Mengen für *KAR2* und *PRC1* in fast allen Mutanten synchron zunahmen, wobei *KAR2* immer stärker induziert wurde als *PRC1*.

Abb. 3-16: *KAR2* und *PRC1* Expression in *pmt*-Mutanten

Northern Blot Analyse von *KAR2* und *PRC1*. Aufgetragen wurde jeweils 20µg Gesamt-RNA logarithmisch wachsender Kulturen gleicher OD. Zur Hybridisierung wurden über PCR synthetisierte Sonden verwendet.

Die Tabelle zeigt die relativen mRNA-Level im Verhältnis zur Aktin-Kontrolle und gegen das jeweilige WT-Signal normalisiert.

Da die *pmt1pmt3pmt4*-Mutante osmotisch stabilisiertes Medium benötigt, wurde kontrolliert, daß die Zugabe von 1M Sorbitol in das Kulturmedium keinen Einfluß auf die Expression der untersuchten Gene im WT hat (nicht dargestellt).



Die Steigerung der Expression von *KAR2* und *PRC1* scheint somit in einem direkten Verhältnis zu einer verminderten oder beeinträchtigten O-Glykosylierung zu stehen. Die Transkription wurde maximal induziert, wenn jeweils ein Vertreter jeder PMT-Familie deletiert wurde (*pmt1pmt3pmt4*).

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß mit Cts1p und Pir2p zwei Zellwandproteine gefunden werden konnten, deren Stabilität direkt mit reduzierter Protein O-Glykosylierung in Zusammenhang gebracht werden konnte. Mit Kre1p wurde ein weiteres Zellwandprotein untersucht, welches in *pmt4* und vor allem in *pmt3pmt4*-Mutanten in der Zellwand stark abnimmt (Gentzsch M., 1996). Ein direkter Bezug zu einer reduzierten O-Glykosylierung ist zwar wahrscheinlich, konnte jedoch nicht nachgewiesen werden, da sich die Mobilität des Proteins am SDS-Gel in den entsprechenden Mutanten nicht sichtbar veränderte (nicht gezeigt). Ein Hinweis, daß es sich bei der Degradation der untersuchten Proteinen um einen generellen Mechanismus handelt, der nicht auf einzelne sekretorische Proteine beschränkt ist, konnte durch Expressions-Analyse von *KAR2* und *PRC1* als Indikatoren erhöhten Proteinabbaus gefunden werden.

3.2 Gewinnung eines polyklonalen Antiserums gegen ein mannosyliertes Peptid

Für eine weitere Untersuchung der Auswirkungen reduzierter O-Glykosylierung auf die Stabilität von Proteinen, aber auch zur Identifizierung neuer, bisher unbekannter Zellwandproteine, sollte ein spezifisch gegen O-glykosylierte Proteine gerichtetes polyklonales Antiserum gewonnen werden. Um ein breites Reaktionsspektrum zu erhalten, mußte die Proteinkomponente des Antigens möglichst klein oder unspezifisch gehalten werden. Um ferner eine Unterscheidung zwischen O-gebundenen und N-gebundenen Mannosen zu ermöglichen, sollte ein möglichst kurzes Peptid mit einer an Serin bzw. Threonin gebundenen Mannose synthetisiert werden. Da sich jedoch ein Peptid von weniger als sechs Aminosäuren aufgrund seiner Größe nicht oder nur schlecht zur Immunisierung eignet, sollte dieses Hapten zunächst an ein Trägerprotein gekoppelt werden.

Um die Spezifität der gewonnenen Antiseren zu testen, wurden desweiteren unmannosylierte Kontrollpeptide CytAlaThrAla (CATA) und CytAlaSerAla CASA synthetisiert, über *reversed phase* (RP)-HPLC gereinigt und massenspektrometrisch überprüft.

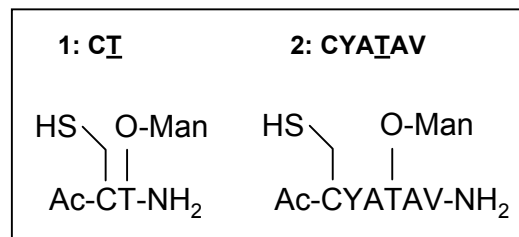
3.2.1 Synthese mannosylierter Peptide und Kopplung an ein Trägerprotein

Zwei verschiedene mannosylierte Dipeptide (CysSer-O-Man; CysThr-O-Man) sollten synthetisiert werden, um sowohl Serin als auch Threonin gebundene Mannose detektieren zu können. Da für die Synthese bereits mannosyliertes Serin bzw Threonin eingesetzt wurde, mußten einige Veränderungen am Standardprotokoll vorgenommen werden um die labile O-glykosyidische Bindung nicht zu gefährden (siehe 2.2.9.2). Besonders die Abspaltung der zahlreichen Schutzgruppen der eingesetzten Aminosäuren bzw. der Mannose erwies sich dabei als problematisch. Zur Abspaltung vom Trägerharz wurde anstelle von Trifluoressigsäure (TFA) ein Gemisch aus Hydrazin und Dimethylacetamid (DMA) verwendet (*Hydrazinolyse*), wodurch bis auf die Tritylschutzgruppe des Cystein-Schwefelatoms auch alle weiteren Schutzgruppen entfernt wurden. Das entstandene Peptid-Hydrazid ließ sich nur schlecht im Rotationsverdampfer vom Hydrazin-DMA Gemisch trennen. Eine Fällung des Produkts mit H₂O war erst nach einer Einengung der Lösung in der Lyophylle möglich. Die

verbliebene Tritylschutzgruppe wurde wie in 2.2.9.2 beschrieben mit Jod entfernt (*Jodolyse*).

Eine Reinigung über eine RP-Säule war aufgrund zu geringer Bindung des Dipeptids nicht erfolgreich. In Ermangelung anderer Reinigungsmethoden wurde auf, von der Fa. Oxford Glycoscience gereinigte Peptide, zurückgegriffen. In Abbildung 3-1 sind die beiden Peptide dargestellt, die zunächst an ein Trägerprotein gekoppelt wurden. Hierzu wurde ein durch Maleimid-Gruppen aktiviertes *keyhole limpet hemocyanin* (KLH) der Firma Pierce verwendet. Dieses Protein eignet sich besonders aufgrund seiner großen molekularen Masse, einer hohen Immunogenität und der großen Zahl reaktiver Gruppen als Trägermolekül inkompletter Immunogene. Die Kopplungsreaktion beruht auf einer kovalenten Bindung im Hapten vorhandener SH-Gruppen an die terminalen Aminogruppen der Lysine des Trägerproteins.

Abb. 3-1: Zur Immunisierung verwandte Haptene
Die Peptide wurden über die SH-Gruppe kovalent an Lysine des KLH-Trägerproteins gekoppelt. Die modifizierte Aminosäure wird im Text unterstrichen dargestellt.



3.2.2 Gewinnung polyklonaler Antiseren

Drei Hasen wurden mehrfach zur Gewinnung des Antiserums mit den gekoppelten Haptenen immunisiert. Dabei wurden zwei Tiere mit dem Peptid CT (Tier 1 und 2) und ein weiteres mit CYATAV (Tier 3) immunisiert. Über Dot-Blots und Westernblots wurden im Verlauf der Immunisierung die induzierten Antikörper-Titer kontrolliert. In den Seren der Tiere 1 und 2 konnten im Vergleich zum Präserum keine CT-spezifischen Antikörper nachgewiesen werden. Das Serum des Tieres 3 zeigte nach 42 Tagen eine schwache Reaktion gegen das Antigen und auch gegen Hefezellwandextrakte (nicht gezeigt). Um die Spezifität bzw. Signalintensität des Serums zu erhöhen wurde das dritte Versuchstier noch zwei weitere Male im Abstand von jeweils 14 Tagen mit CYATAV immunisiert.

Spezifitätstests mit dem Serum des 98. Immunisierungstages sind in Abbildung 3-2 zusammengefaßt.

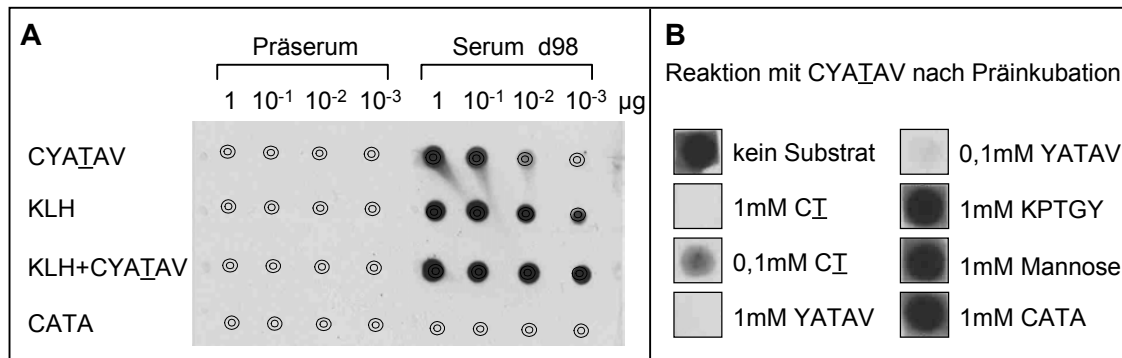


Abb. 3-2: Spezifitätstests mit Serum des 98. Immunisierungstages (d98)

- A: Verdünnungsreihen verschiedener Substrate wurden auf PVDF Membran getropft und mit Serum d98 im Vergleich zu Präserum in einer 1:2000 Verdünnung inkubiert
- B: Serum d98 wurde in einer 1:500 Verdünnung mit verschiedenen Substraten für 1h präinkubiert und anschließend auf Reaktion mit CYA1AV getestet

So konnte gezeigt werden, daß das Serum spezifisch CYA1AV auch ohne Bindung an das KLH-Trägerprotein erkennt, mit dem Kontrollpeptid CATA aber keine Reaktion erfolgt. In Präinkubationstests (Abb. 3-2B) konnten die Antikörper auch mit dem mannosylierten Dipeptid CT nicht aber mit Mannose allein aus dem Serum titriert werden. Sehr gut reagierte aber auch das unmodifizierte Peptid YATAV mit dem Antiserum. Da diese Peptidsequenz in *S. cerevisiae* in keinem bekannten Protein vorhanden ist, wird dadurch die Verwendbarkeit des Antiserums nicht eingeschränkt. In Westernblots mit SDS-Zellwandextrakten konnte mit dem Antiserum neben anderen Proteinbanden auch die ausschließlich O-glykosylierte Chitinase detektiert werden. N-glykosylierte Kontrollproteine wie Carboxypeptidase Y (CPY) oder Fetuin wurden dagegen nicht erkannt (nicht gezeigt). Trotz dieser positiven Ergebnisse erwies sich das Antiserum in von der Fa. Oxford Glycoscience durchgeführten Tests als nicht ausreichend spezifisch. Durch die nötigen geringen Verdünnungen des Serum (1:250 - 1:500) traten bei Zellwand-Westernblots häufig Kreuzreaktionen und hohe Signal-Hintergründe auf. Grund dafür könnte eine Wundinfektion des Kaninchens ca. 14 Tage vor der finalen Entnahme des Serums gewesen sein, wodurch vermutlich Antikörper gegen Zelloberflächen-Proteine von Hefe-Pilzen gebildet wurden. Ein Versuch diese Kreuzreaktionen durch Präinkubation des Antiserums abzureichern, wurde nicht durchgeführt.

3.3 Screen nach neuen Zellwandproteinen

Wie einleitend erwähnt, konnten mit biochemischen Methoden zahlreiche Proteine der Zellwand indentifiziert und charakterisiert werden. Dennoch ist nur von wenigen die genaue Funktion bekannt. Ferner war keines der Proteine für die Integrität der Zellwand essentiell. Durchgeführte Einzeldelationen identifizierter Zellwandproteine hatten keine oder nur geringe Auswirkungen auf die Lebensfähigkeit der Zelle. Ebenso waren Mehrfachmutanten weder letal noch osmolabil (Mrsa *et al.*, 1999; M. Ecker, 2000). Da auch aus diesen Mutanten biochemisch keine neuen Zellwandproteine identifiziert werden konnten, wurde ein genetischer Ansatz gewählt, um nach Zellwandprotein-kodierenden Genen zu suchen (M. Ecker, 2000). Die Strategie des *Screening*-Verfahrens durch Mutagenese und Selektion der Mutanten wird im Folgenden einführend erläutert.

3.3.1 Durchführung des Screenings

Wie bereits beschrieben, ermöglichen Regulationsmechanismen der Hefezelle auch bei starker Reduktion einzelner Komponenten der Zellwand, diese durch Überexpression noch vorhandener auszugleichen. Dieses sollte genutzt werden, um nach synthetisch osmolabilen Mutanten zu suchen. Als Ausgangsstämme für die Mutagenese wurden daher Zellwandmutanten - *pir1pir2pir3pir4* (Δ PIR) und *scw4scw10* (Δ SCW) - anstelle eines WT-Stammes gewählt. Für die Δ PIR-Mutante konnte gezeigt werden, daß diese zwar nicht osmolabil, aber in ihrer Zellwandstabilität dennoch beeinträchtigt ist. So ist die Sensitivität dieser Mutante gegenüber Zellwand-destabilisierenden Agenzien wie *Calcofluor White* (CFW) und Kongorot im Vergleich zum WT erhöht (Mrsa *et al.*, 1999).

Einen ähnlichen Phänotyp weist die Δ SCW-Mutante auf, in welcher mit *SCW4* und *SCW10* zwei potentielle β -1,3 Glukanasen deletiert sind. Ferner ist die Beobachtung, daß sich unter reduzierenden Bedingungen im Vergleich zum WT erheblich mehr Protein aus der Zellwand der Mutante extrahieren läßt, ein weiterer Hinweis auf einen strukturellen Zellwanddefekt (Cappellaro *et al.*, 1998).

Mit beiden Stämmen wurde eine EMS (Ethylmethansulfonat)-Mutagenese unter osmotisch stabilisierten Bedingungen durchgeführt. Die erhaltenen Klone wurden anschließend über Replikplattierung auf Osmolabilität und CFW-Sensitivität selektioniert (M. Ecker, 2000). Die Mutanten wurden entsprechend ihrer

Ursprungsmutante OSP (*osmosensitive* Δ PIR) und OSS (*osmosensitive* Δ SCW) bezeichnet. In Abbildung 3-17 sind weitere Selektionsmaßnahmen zusammengefaßt, durch welche die Zahl erhaltener osmolabiler Mutanten eingeschränkt wurde. Ziel war es Mutanten auszuschließen, die nur indirekt an der Zellwandsynthese beteiligt sind sowie sicherzustellen, daß es sich bei den erzeugten Phänotypen um rezessive Einzelmutanten handelt (M. Ecker, 2000).

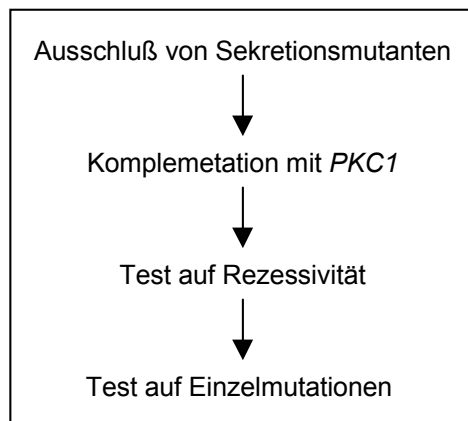


Abb. 3-17: Selektion osmolabiler Mutanten

Sekretionsmutanten wurden zunächst über einen Nachweis saurer Phosphatase ausgeschlossen.

Phänotypisch interessante Klone wurden anschließend mit einem *PKC1/CEN*-Plasmid transformiert und komplementierbare Klone aus dem *Screen* entfernt.

Auf Rezessivität der Mutation wurde über Kreuzung mit einer entsprechenden Ausgangsmutante getestet. Es wurden nur Mutanten weiterverwendet, welche als Diploide nicht osmolabil waren. Durch Sporulation und anschließende Tetradenanalyse wurde ferner auf Einzelmutationen getestet (Aufspaltung des Phänotyps 2:2). Dieser Test konnte mit OSP-Mutanten nicht durchgeführt werden.

Bestandteil dieser Arbeit war die Charakterisierung der aus der Mutagenese des Δ SCW-Stamms hervorgegangenen OSS-Mutanten sowie die Komplementation ihres osmolabilen Phänotyps.

3.3.2 Charakterisierung der OSS-Mutanten

Von insgesamt 14000 Überlebenden der EMS-Mutagenese verblieben nach den verschiedenen Selektionen 11 OSS-Mutanten zur genaueren Charakterisierung.

3.3.2.1 Mikroskopischer Phänotyp

Morphologische Veränderungen der Mutanten nach Inkubation in osmotisch nicht stabilisiertem Medium wurden im Lichtmikroskop analysiert.

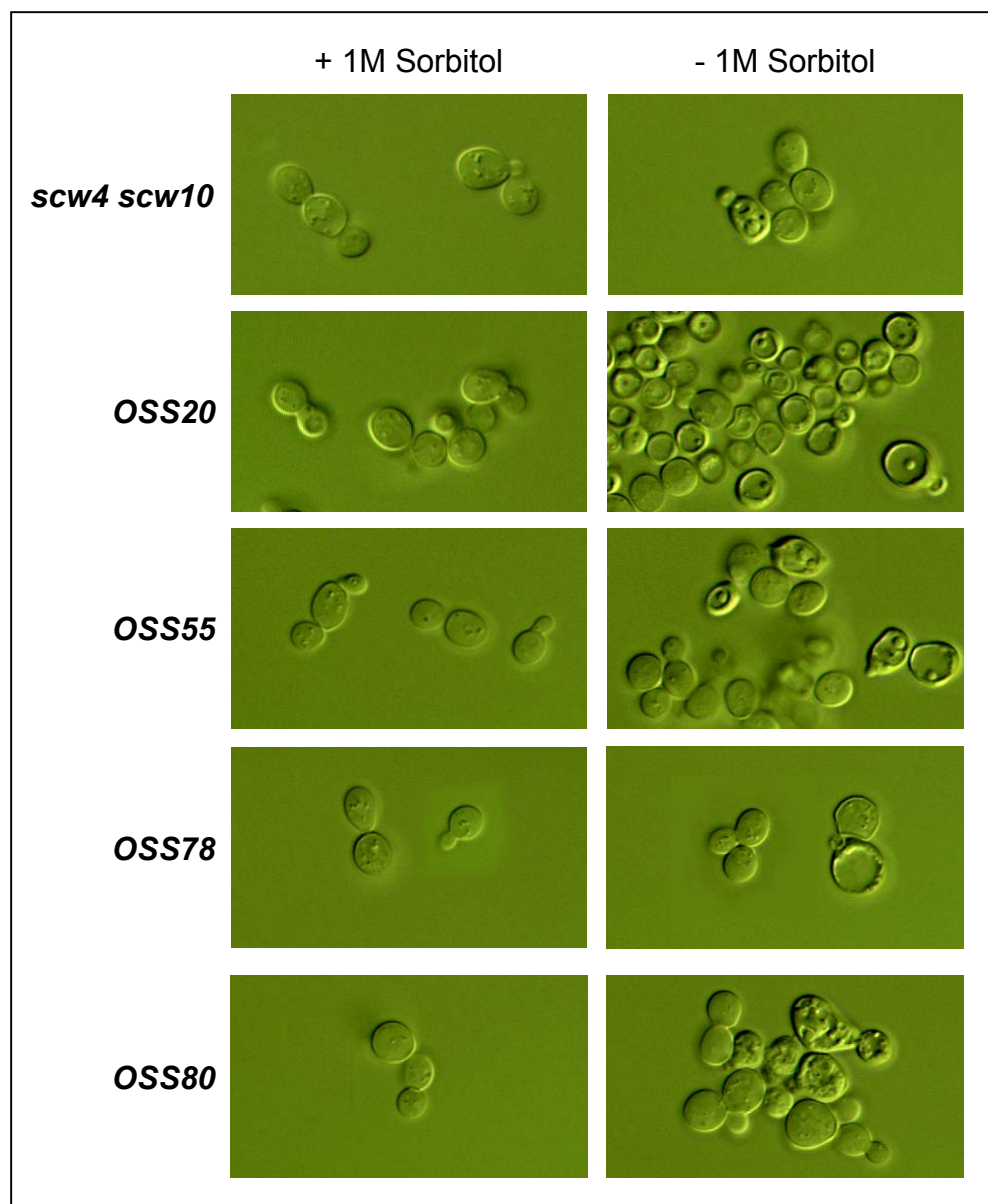


Abb. 3-18: Mikroskopischer Phänotyp ausgewählter OSS-Mutanten

Exemplarisch dargestellt sind OSS-Mutanten sowie die Ausgangsmutante Δ SCW in YPD mit und ohne osmotische Stabilisierung. Die Nomarski-Aufnahmen wurden nach einer Inkubationszeit von ca. 45min gemacht.

In Abbildung 3-18 sind exemplarisch einige OSS-Mutanten im Vergleich zur Δ SCW-Mutante dargestellt. Während die Ausgangsmutante kaum sichtbare Veränderung in beiden Medien aufweist, sind in allen gezeigten Mutanten vielfach Zellen mit stark vergrößerten Vakuolen zu beobachten. Die Mutanten OSS55, OSS80 und besonders OSS20 bilden zudem große Aggregate. Der mikroskopische Phänotyp nicht gezeigter OSS-Mutanten entsprach weitestgehend den abgebildeten. Gravierende Schäden, wie beispielsweise ein Lysieren der Zellen, traten dagegen in keiner Mutante auf.

3.3.2.2 Überlebensrate der OSS-Mutanten in H₂O

Eine Quantifizierung der Osmolabilität der OSS-Mutanten wurde mittels einer Bestimmung der Überlebensrate nach einem hypoosmotischen Schock, durch Inkubation in destilliertem Wasser durchgeführt (Abb. 3-19).

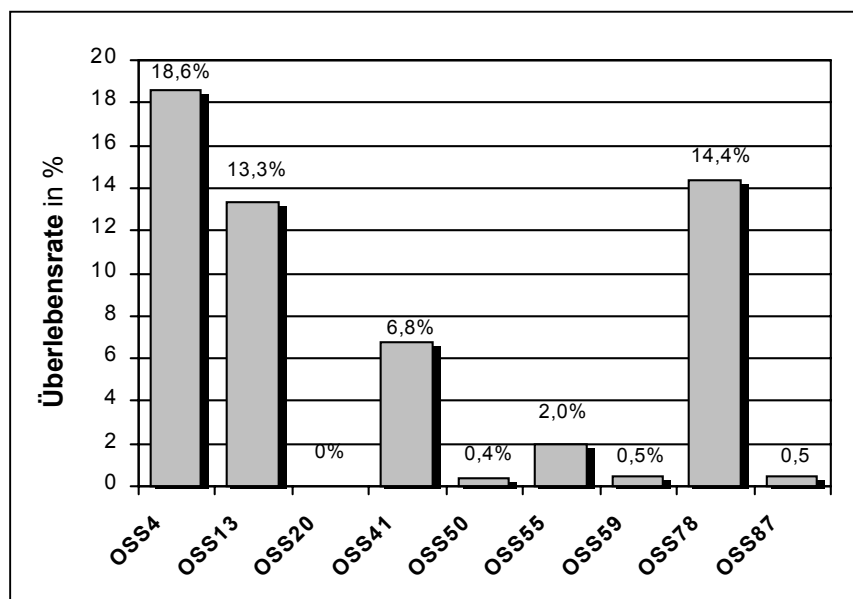


Abb. 3-19: Überlebensrate von OSS-Mutanten in H₂O

Je zwei Aliquots mit errechneten 500 bzw. 5000 Zellen wurden vor und nach einer 20 stündigen Inkubation in destilliertem Wasser auf YPDS-Platten ausplattiert. Nach zwei bis drei Tagen wurden die gewachsenen Klone auf den Platten ausgezählt und so die Überlebensrate der einzelnen Mutanten bestimmt

Die Überlebensrate nach hypoosmotischen Schock lag bei allen getesteten OSS-Mutanten unter 20%, wobei einige mit weniger als 1% Überlebenden dramatische Sterberaten aufwiesen. Ferner war für einige Mutanten die Rate abhängig vom gewählten Anzuchtmedium. So stiegen die Überlebensraten z.B. bei OSS59 und

OSS78 auf deutlich über 20%, wenn die Zellen in SD (*synthetic dextrose*)-Medium anstatt in YPD angezogen wurden (Daten nicht gezeigt).

3.3.2.3 Analyse der Zellwand von OSS-Mutanten

Von zur Komplementation ausgewählten OSS-Mutanten wurde die Kohlenhydratzusammensetzung der Zellwand bestimmt. Im Vergleich dazu wurde zusätzlich die Zellwand des WT-Stamms (SEY6210) und der Δ SCW-Mutante untersucht. In Tabelle 3-1 sind jeweils die Zellwandbestandteile Glukan, Mannan und Chitin (N-Acetylglukosamin) dargestellt.

	Glukan	Mannan	N-Acetylglukosamin
SEY6210	46,8%	51,8%	1,4%
Δ SCW	34,7%	63,5%	1,8%
OSS20	30,7%	68,0%	1,3%
OSS41	30,8%	67,8%	1,4%
OSS55	34,5%	64,2%	1,3%
OSS78	34,1%	64,7%	1,2%
OSS80	52,1%	45,3%	2,6%

Tab 3-1: Analyse der Kohlenhydratzusammensetzung

Zur Analyse wurden präparierte Zellwände mit Trifluoressigsäure hydrolysiert.

Bereits die Δ SCW-Mutante zeigte im Vergleich zum WT einen deutlichen Anstieg des Mannans um knapp 12% auf 63,5% bei entsprechendem Rückgang des Glukans. Mit Ausnahme von OSS80 wurden in den OSS-Mutanten keine gravierenden Veränderungen zur Δ SCW-Mutante gemessen. In der OSS80-Mutante fiel vor allem die starke Zunahme des Chitins auf. Mit 2,6% war dieser Wert im Vergleich zum WT fast verdoppelt. Gleichzeitig war in dieser Mutante der Glukangehalt auf über 50% angestiegen (Δ SCW: 34,7%). Eine leichte Erhöhung des Mannans konnte in OSS20 und OSS41 gemessen werden.

3.3.3 Komplementation der OSS-Mutanten

Zur Komplementation wurde eine ARS/CEN-Genbank verwendet, um die Möglichkeit von *multi-copy* Suppressionen zu vermeiden.

Vorausgehend wurden mit verschiedenen OSS-Mutanten sowohl Vektoren ohne Insert (YCp50, pRS416) als auch die Centromer-Genbank testtransformiert. Dabei wurde die Transformationseffizienz durch in 2.2.2.2 beschriebene Maßnahmen entscheidend verbessert, so daß eine angestrebte Kolonienzahl von mehr als 10000 durch insgesamt 10 Ansätze mit je 1 µg Genbank-DNA erreicht werden konnte.

In den Transformationen mit leerem Vektor wurde außerdem eine hohe Reversionsrate der OSS-Mutanten festgestellt. Nach Replikplattierung dieser Transformanten auf YPD bzw. YPD/CFW entstanden meist Rasen kleiner Kolonien, was eine Unterscheidung revertierter und komplementierter Klone unmöglich machte. Um dies zu vermeiden wurde die in 3.3.2.2 beschriebene hohe Sensitivität vieler OSS-Mutanten auf hypoosmotischen Schock genutzt. Nach einer Transformation wurden die Zellen nicht sofort ausplattiert, sondern in osmotisch stabilisiertem Selektivmedium aufgenommen und für ein bis zwei Verdopplungen bei 30°C inkubiert. Der Selektionsdruck liegt dadurch nur auf dem Auxotrophiemarker und nicht auf der Osmolabilität. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert und über Nacht in einem großen Volumen destillierten Wassers aufgenommen. So sollte auf jene Klone selektioniert werden, die ein komplementierendes Gen erhalten und exprimiert haben. Ausplattiert wurden so behandelte Zellen auf osmotisch nicht stabilisiertes Selektivmedium. Diese Methode wurde bei OSS-Mutanten mit besonders niedriger Überlebensrate nach hypoosmotischem Schock angewendet. Andere Mutanten wurden nach der Transformation auf osmotisch stabilisiertes Selektivmedium plattiert und auf YPD/CFW-Platten doppelt überstempelt.

Unabhängig von der angewandten Methode wurden Klone mit positivem Wachstum auf Selektivmedium vereinzelt und von diesen Platten erneut auf YPD/CFW ausgestrichen. Zum Vergleich wurden stets mit leerem Vektor transformierte Kontrollen verwendet.

Aus positiven Klonen wurden die Plasmide isoliert und erneut in die jeweilige Ausgangsmutante transformiert. Vielfach führten diese Retransformationen isolierter, positiver Plasmide nicht mehr zur Komplementation des osmolabilen Phänotyps. Die verbliebenen komplementierenden Plasmide wurden in Restriktionsanalysen verglichen und deren enthaltene Genbankfragmente über terminale Sequenzierung identifiziert.

3.3.3.1 Komplementation der Mutante OSS20

Die OSS20-Mutante wurde wie beschrieben nach der Transformation einem hypoosmotischen Schock unterzogen. Die theoretische Transformationsrate wurde anhand einer Kontrollplatte mit 1/20 des Gesamtansatzes berechnet und betrug ca. 29000 Zellen. Da die Überlebensrate nach der Inkubation in destilliertem H₂O mit ca. 10% höher als erwartet war, wurde zunächst auf YPD/CFW replikaplattiert und 25 gut wachsende Klone anschließend auf YPD/CFW ausgestrichen. Restriktionsanalysen nach Retransformation und erneuter Selektion zeigten, daß verschiedene Plasmide mehrfach vorhanden waren. Insgesamt wurden aus 6 Klonen die Plasmide identifiziert. In Tabelle 3-2 sind die genomischen Bereiche der enthaltenen Inserts wiedergegeben.

Plasmid	Chromosom	Sequenzbereich
p20/3	XIII/XII	XIII 871707-XII 458458 bp
p20/44	XII	46425-53689 bp
p20/82	XII	42522-53689 bp
p20/123	XIII/XII	XIII 871707-XII 458458 bp
p20/151	XIII	873430-887408 bp
p20/155	XII	45126-53689 bp

Tab 3-2: Komplementierende Plasmide der Mutante OSS20

Die Plasmide p20/3 und p20/123 waren identisch und enthielten zwei Fragmente verschiedener Chromosome. Obwohl dadurch eine präzise Identifizierung der enthaltenen offenen Leserahmen nicht durchgeführt werden konnte, war es wahrscheinlich, daß die Komplementation auf dem auf Chromosom XIII enthaltenen *SCW10* beruhte. Die Tatsache, daß auch p20/151 *SCW10* enthielt war zwar zum einen enttäuschend, zeigte aber zum anderen, daß die vorliegende Osmolabilität tatsächlich durch eine Kombination mehrerer Gendefekte erzeugt wurde.

Die Plasmide p20/44, p20/82 und p20/155 enthielten überlappende genomische Bereiche des Chromosom XII (Abb. 3-20). Sechs offene Leserahmen waren allen Fragmenten gemeinsam, doch nur *FPS1* war bereits im Zusammenhang mit Osmolabilität bekannt.

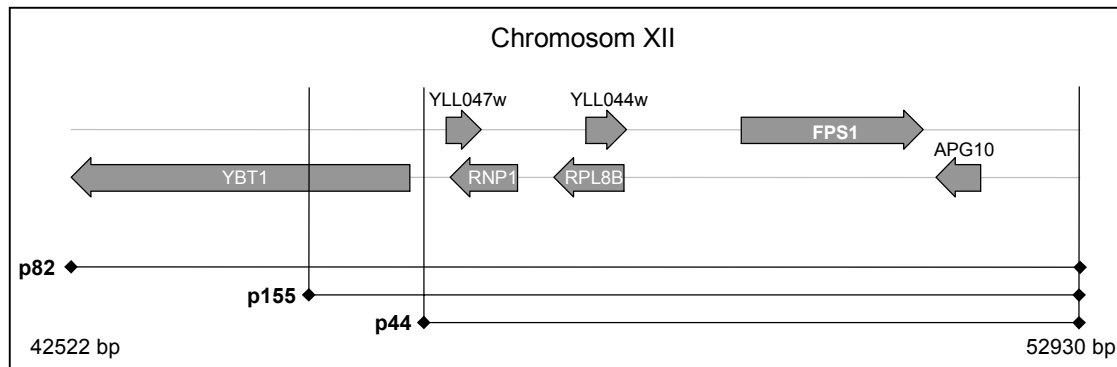


Abb. 3-20: OSS20 kompletierender Bereich auf Chromosom XII (42522-52930 bp)

Fps1p gehört zur Familie der MIP (*major intrinsic protein*) Kanal Proteine und ist für den schnellen Efflux intrazellulär akkumulierten Glycerins während eines hypoosmotischen Schocks verantwortlich, eine Osmolabilität einer entsprechenden Deletionsmutante liegt jedoch nicht vor (Luyten *et al.*, 1995; Tamás *et al.*, 1999).

Ein *FPS1* tragendes Centromer-Plasmid wurde in OSS20 transformiert und die Transformate auf Osmolabilität überprüft. In Abbildung 3-21 sind die Ergebnisse verschiedener Transformationen zusammengefaßt. Neben *SCW10* und den isolierten Genbankfragmenten p20/44, p20/82 und p20/155, komplementiert auch *FPS1* alleine den osmolabilen, bzw. *Calcofluor White*-sensitiven Phänotyp von OSS20.

Es ist bekannt, daß eine schwache Überexpression von *FPS1* zu einem erhöhten intrazellulären Glyceringehalt führt (Luyten *et al.*, 1995), womit ein Wachstumsvorteil unter den gewählten, hypoosmotischen Bedingungen unwahrscheinlich wäre. Ferner wurde über Transformationen von *pFPS1* in verschiedene OSS-Mutanten gezeigt, daß es sich bei der beobachteten Komplementation nicht um eine generelle Suppression handelt, da nur OSS20 mit *FPS1* komplementiert werden konnte (Abb. 3-21B). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde eine Sequenzierung von *FPS1* in OSS20 nicht durchgeführt.

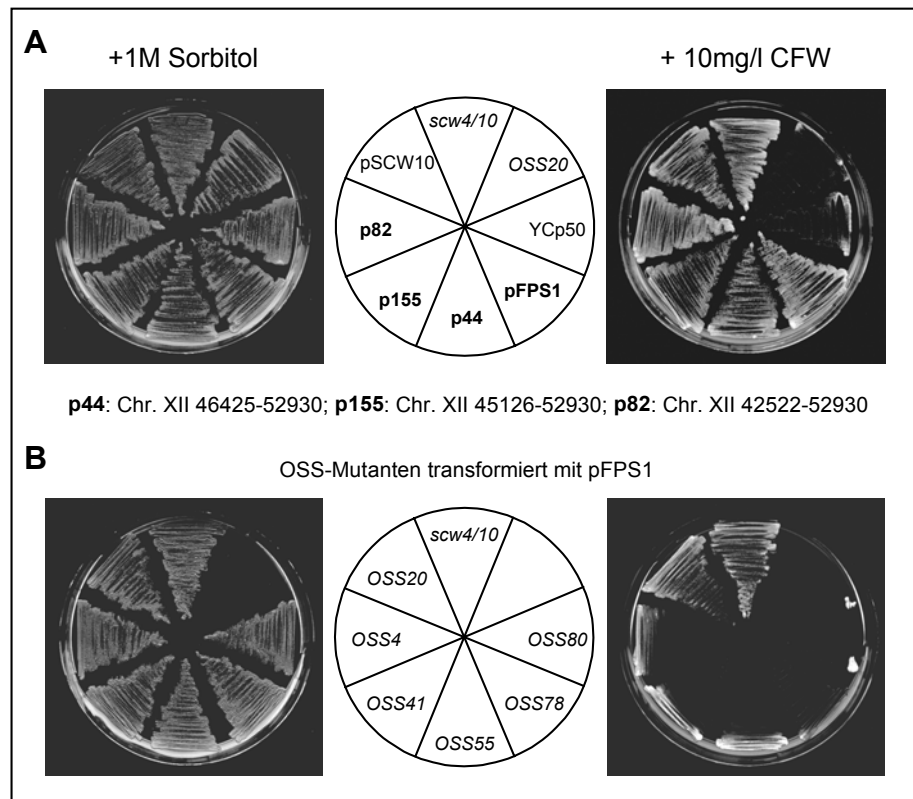


Abb. 3-21: Komplementation der Mutante OSS20

A: Dargestellt ist ein Vergleich des Wachstums von OSS20 auf YPDS und YPD/CFW, transformiert mit den isolierten Genbankvektoren, *pFSP1*, *pSCW10* sowie einem leeren Centromer-Vektor (YCp50). Als Positiv-Kontrolle wurde zusätzlich die *scw4scw10*-Mutante ausgestrichen.

B: Ausgestrichen wurden mit *pFSP1* transformierte OSS-Mutanten im Vergleich zur *scw4scw10*-Mutante

3.3.3.2 Komplementation der Mutante OSS41

Die OSS41-Mutante wurde wie OSS20 nach der Transformation einem hypoosmotischen Schock unterzogen. Von errechneten theoretischen 29000 Transformaten überlebten hier nur 40 Klone die Inkubation in destilliertem Wasser. Diese wurden zunächst auf SD-Medium vereinzelt und anschließend durch Überstreichen auf YPD und YPD/CFW auf Osmostabilität getestet. Insgesamt wurden von 31 positiven Klonen die Plasmide isoliert und über Restriktionsanalysen verglichen. Viele dieser Plasmide komplementierten nach einer Retransformation in OSS41 den osmolabilen Phänotyp jedoch nicht mehr und wurden daher aussortiert. Die meisten verbliebenen Plasmide konnten aufgrund ihres Bandenmusters als *SCW4* oder *SCW10* tragende Plasmide identifiziert werden. Nur eines der terminal ansequenzierten Plasmid-Inserts enthielt weder *SCW10* noch *SCW4*. Abbildung 3-22 zeigt schematisch das ca. 25kb große komplementierende Insert von Plasmid p44/61.

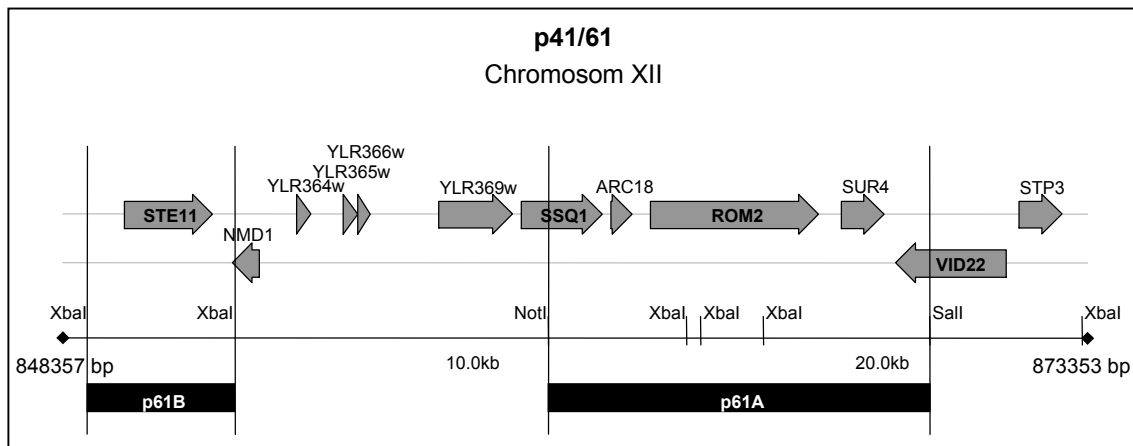


Abb. 3-22: OSS41 komplementierender Bereich auf Chromosom XII (848357-873353 bp)

Dargestellt ist ein Abschnitt von Chromosom XII mit allen vollständig enthaltenen offenen Leserahmen ohne ribosomale Proteine. Die eingezeichneten Restriktionsenzyme wurden für die Subklonierungen der Fragmente p61A bzw. p61B benützt

Zwei der 14 enthaltenen offenen Leserahmen codieren für Signaltransduktionselemente, die im Zusammenhang mit Zellwandintegrität bekannt sind. *Ste11p* ist eine MAPKKK und sowohl am *pheromone response* und *filamentous growth* als auch am HOG-Weg beteiligt (Gustin *et al.*, 1998). Eine direkte Auswirkung einer *STE11*-Disruption auf die Zellwandstabilität ist zwar nicht bekannt, aber in Verbindung mit einer bereits geschwächten Zellwand nicht auszuschließen.

Bei *Rom2p* handelt es sich um einen von zwei GEFs (*GDP/GTP exchange factor*) von *Rho1p* (Ozaki *et al.*, 1996), einem essentiellen kleinen G-Protein, das nicht nur ein Bestandteil des PKC-Wegs, sondern auch die aktivierende Untereinheit der β -1,3-Glukansynthasen *Fks1p* und *Fks2p* ist (Nonaka *et al.*, 1995, Kamada *et al.*, 1995, Quadota *et al.*, 1996).

Daher wurden zwei Bereiche des Plasmids p61, die *STE11* bzw. *ROM2* enthielten, in den Centromer-Vektor pRS416 subkloniert (Abb. 3-22). Die Überprüfung der Transformanten auf Osmostabilität und *Calcofluor White* Sensitivität ist in Abbildung 3-23 dargestellt. Neben dem Ausgangsplasmid p61 komplementiert nur p61A (*ROM2*) nicht aber p61B (*STE11*) den Phänotyp von OSS41.

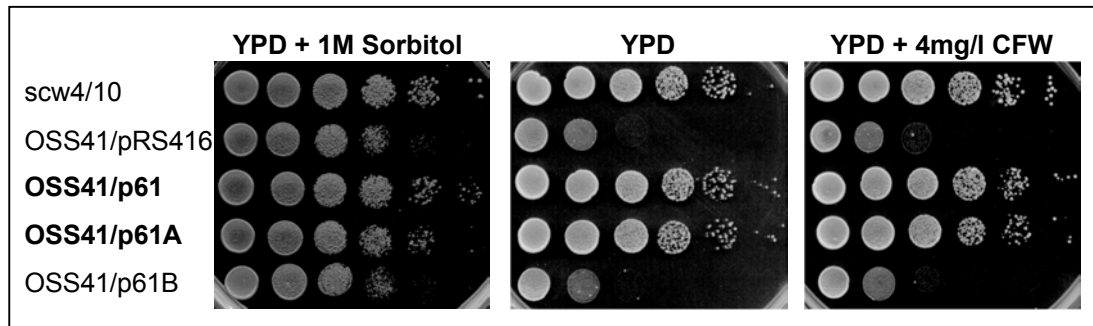


Abb. 3-23: Komplementation der Mutante OSS41 durch *ROM2*

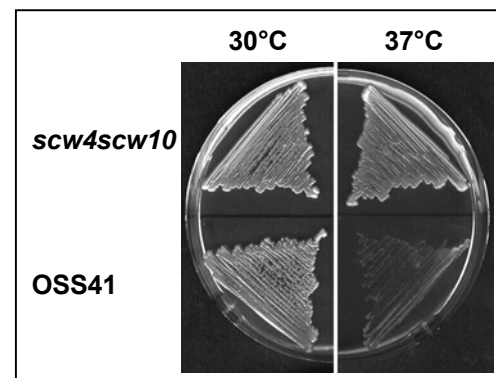
Verschiedene Transformanten der Mutante OSS41 wurden zusammen mit der *scw4scw10*-Mutante in 10er Verdünnungen auf YPDS, YPD und YPD/CFW-Platten aufgetropft.

p61: Chr XII 848357-873353 bp; p61A: *ROM2*; p61B: *STE11*; pRS416: negativ Kontrolle

Im Gegensatz zur *rho1*-Mutante ist eine *ROM2*-Deletion lebensfähig, vermutlich da Rom1p, der zweite GEF für Rho1p, diesen Defekt kompensieren kann (Heinisch *et al.*, 1999). Osmolabilität konnte für eine *rom2*-Mutante nicht gezeigt werden, aber Hypersensitivität gegenüber Hitzeschock. Ein temperatursensitiver Phänotyp konnte ebenfalls für OSS41 auf osmotisch stabilisiertem Medium gezeigt werden (Abb. 3-24). Demzufolge ist anzunehmen, daß tatsächlich *ROM2* in OSS41 defekt ist und in Kombination mit der Deletion von *SCW4* und *SCW10* neben der Temperatursensitivität auch Osmolabilität verursacht. Eine Sequenzierung des entsprechenden Gens aus OSS41 wurde nicht durchgeführt.

Abb. 3-24: Die Mutante OSS41 ist temperatursensitiv

Der Test auf Temperatursensitivität wurde auf osmotisch stabilisierten Platten durchgeführt.



Eine Suppression von OSS41 durch eine zusätzliche Genkopie von *ROM2* kann nicht ausgeschlossen werden, ist aber unwahrscheinlich. Es konnte zwar gezeigt werden, daß eine Überexpression von *ROM2* auf *multicopy*-Plasmiden, mutante Phänotypen verschiedener PKC-Signaltransduktionswegkomponenten supprimieren kann, allerdings geschieht dies nur unvollständig (Jacoby *et al.*, 1998).

3.3.3.3 Komplementation der Mutante OSS55

Im Unterschied zur Transformation der OSS41-Mutante überlebten bei OSS55 relativ viele Klone den hypoosmotischen Schock, allerdings in Kolonien unterschiedlicher Größe. Eine weitere Selektion über Replikaplattierung war daher nicht möglich. Neben ca. 2000 kleinen Kolonien, waren 36 Kolonien von ca. 21000 errechneten Transformaten deutlich größer. Diese wurden zunächst auf Minimalmedium vereinzelt und anschließend auf YPD und YPD/CFW Platten überstrichen. Eine Selektion auf Osmostabilität erwies sich als schwierig, da auch Kontrolltransformaten mit YCp50 zum Teil auf YPD wachsen konnten. Daher wurden im folgenden ausschließlich YPD/CFW-Platten verwendet. Aus 22 positiven Klonen wurden die Plasmide isoliert und einer Restriktionsanalyse unterzogen. Acht Plasmide waren bereits bekannt und enthielten *SCW4* oder *SCW10*, von den übrigen waren einige mehrfach vorhanden. Letztlich wurden acht verschiedene Plasmide in OSS55 retransformiert. Plattentests auf Komplementation des OSS55-Phänotyps waren bei allen Transformaten positiv. Die durch Sequenzierung identifizierten genomischen Bereiche der Plasmid-Inserts sind in Tabelle 3-3 dargestellt.

Plasmid	Chromosom	Sequenzbereich
p55/1	X	593170-605308
p55/4	XIII	871707-895053
p55/12	XIII	878636-891050
p55/13	XIII	868152-881474
p55/15	XIII	878487-887301
p55/18	VII	1048608-1059769
p55/20	XII	367123-387065

Tab 3-3: Komplementierende Plasmide der Mutante OSS55

Vier der erfolgreich sequenzierten Plasmide enthielten *SCW10* (p55/4, p55/12, p55/13, p55/15) und p55/18 trug *SCW4*. Das Plasmid p55/1 enthielt nur drei vollständige offene Leserahmen (Abb. 3-25). Da aufgrund bisheriger Daten nicht vorhersagbar war, welches der Genprodukte die Mutation in OSS55 komplementiert, wurden zwei offene Leserahmen (*BUD4*, *FIP1*) aus dem Genbankvektor geschnitten und dieser religiert.

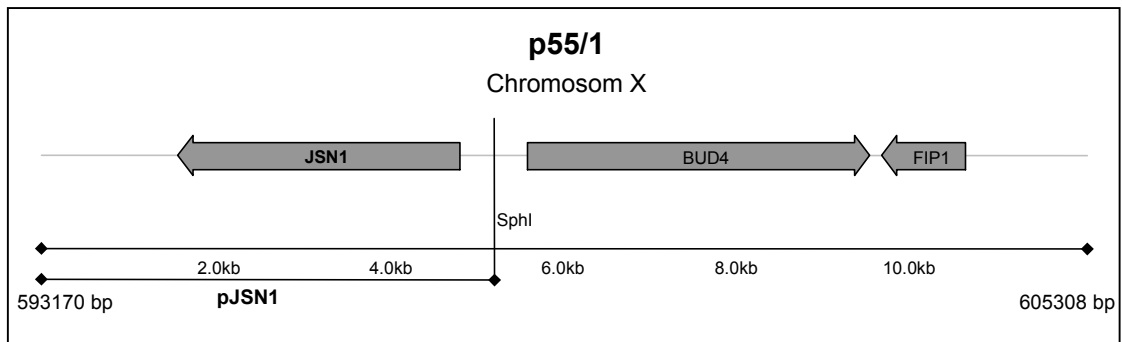


Abb. 3-25: OSS55 komplementierender Bereich auf Chromosom X (593170 - 605308 bp)

Die offenen Leserahmen *BUD4* und *FIP1* wurden über *SphI* Schnittstellen, die singular in Genbankvektor und Insert vorhanden sind, ausgeschnitten. Das religierte Plasmid entspricht *pJSN1*.

Das so erhaltene Plasmid *pJSN1* wurde in OSS55 transformiert und auf Komplementation getestet, indem die erhaltenen Transformanten auf YPD und YPD/CFW-Platten überstrichen wurden. Wie das Ausgangsplasmid *p55/1* komplementierte auch *JSN1* alleine den osmolabilen und *Calcofluor White* sensitiven Phänotyp der OSS55-Mutante.

Eine in Abbildung 3-26 dargestellte Quantifizierung über Tüpfelplatten zeigte jedoch, daß die Komplementation nicht vollständig war. Das Wachstum des Stammes OSS55/*pJSN1* auf YPD oder YPD/CFW ist zwar deutlich besser als die mit dem leeren Vektor transformierte Kontrolle (OSS55/*pRS416*), das Wachstum der *scw4scw10*-Ausgangsmutante wird jedoch nicht ganz erreicht.

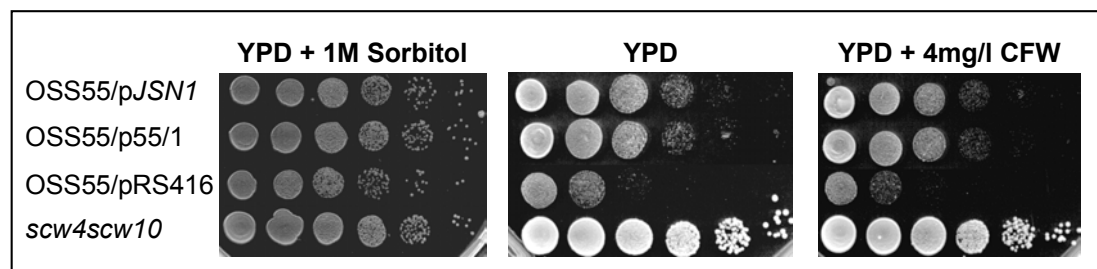


Abb. 3-26: Unvollständige Komplementation der Mutante OSS55 durch *JSN1*

Dargestellt sind Verdünnungsreihen in 10er Schritten ausgehend von ca. 10^6 Zellen, die auf YPDS, YPD und YPD/CFW-Platten aufgetropft wurden.

Eine Erklärung dafür wäre eine Suppression des OSS55-Phänotyps durch eine weitere *JSN1* Genkopie. *Jsn1p* gehört zu einer Familie von fünf homologen Proteinen (Puf-Familie) deren genaue Funktion noch nicht bekannt ist, vermutlich aber im Zusammenhang mit mRNA Stabilisierung steht (Olivas und Parker, 2000). Falls also *JSN1* für die Stabilität eines für die Zellwandintegrität wichtigen Transkripts notwendig

ist, könnte auch eine schwache Überexpression des Gens zu einer Unterdrückung eines Zellwanddefekts führen. Mittels PCR wurde *JSN1* an genomischer DNA sowohl aus OSS55 als auch aus der *scw4scw10*-Mutante amplifiziert. Die *JSN1*-Sequenz beider Stämme war identisch, wodurch die vermutete Suppression bestätigt wurde.

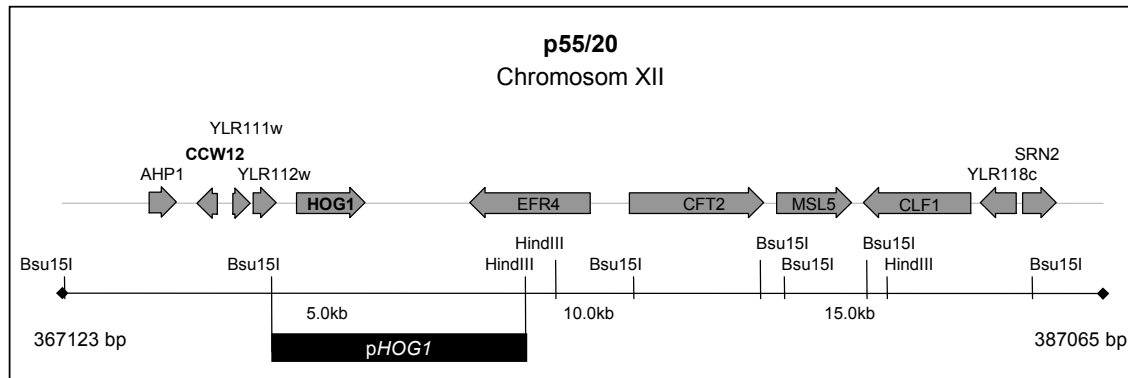


Abb. 3-27: OSS55 komplementierender Bereich auf Chromosom XII (367123 - 387065 bp)

Das Plasmid p55/20 enthielt neben 11 weiteren offenen Leserahmen mit *CCW12* ein für ein GPI-verankertes Zellwandprotein codierendes Gen (Abb. 3-27). Eine Transformation von OSS55 mit einem *CCW12*-Plasmid führte jedoch nicht zur Osmostabilität der Mutante (Abb. 3-28).

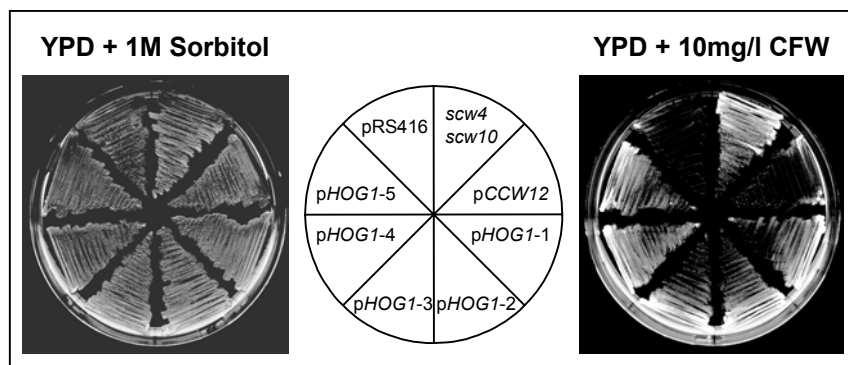


Abb. 3-28: Suppression der OSS55-Mutante durch *HOG1*

Gezeigt ist ein Vergleich des Wachstums von OSS55 auf YPDS und YPD/CFW. Ausgestrichen wurden fünf *HOG1*- und eine *CCW12*-Transformante. Als Kontrolle wurden zusätzlich die *scw4scw10*-Mutante sowie eine Transformante mit Vektor ohne Insert ausgestrichen.

Da eine Überexpression von *HOG1* die Resistenz gegenüber Zellwanddestabilisierenden Agenzien wie *Calcofluor White* und Congo Rot erhöht (Alonso-Monge *et al.*, 1999), lag die Vermutung nahe, daß es sich auch hier um eine

Suppression durch eine weitere Genkopie von *HOG1* handelt. Um dieses nachzuweisen wurde *HOG1* aus p55/20 in den Centromer-Vektor pRS416 subkloniert (Abb. 3-27). Dieses *pHOG1* bezeichnete Plasmid wurde in OSS55 transformiert und mehrere Transformanten auf Osmostabilität und *Calcofluor White* Sensitivität getestet (Abb. 3-28). Im Vergleich zur Kontrolltransformation mit leerem Vektor (pRS416) und der Transformation mit p*CCW12*, konnte *pHOG1* OSS55 komplementieren. Wie bereits *JSNI* wurde auch *HOG1* sowohl aus der *scw4scw10*-Mutante als auch aus OSS55 zunächst über PCR amplifiziert und anschließend sequenziert. Erwartungsgemäß stimmten beide Sequenzen überein.

3.3.3.4 Komplementation der Mutante OSS78

Für eine Komplementation von OSS78 wurde eine Selektion der Transformanten mittels hypoosmotischen Schock zwar versucht, brachte aber kein verwertbares Ergebnis, da zuviele Klone die Inkubation in destilliertem Wasser überlebten und diese auch durch anschließende Replikaplattierungen auf YPD/CFW nicht weiter eingegrenzt werden konnten. In einer neuen Genbank-Transformation wurden die auf osmotisch stabilisiertem Medium plattierten Klone direkt und zweifach auf YPD/CFW (4mg/l und 10mg/l) überstempelt. Die Selektion der 23000 erhaltenen Transformanten ist in Tabelle 3-4 zusammengefaßt. Eines der drei positiven Plasmide (p78/53) komplementierte den osmolabilen Phänotyp von OSS78 nur teilweise und wurde daher nicht näher untersucht. Der chromosomale Bereich von p78/15 ist in Abbildung 3-29 dargestellt.

Transformanten gesamt	23000
positiv nach Replikaplattierung	96
positiv nach Überstreichen auf YPD/CFW	18
Komplementation nach Retransformation	13
Inserts enthalten weder <i>SCW4</i> noch <i>SCW10</i>	3

Tab 3-4: Selektion der OSS78-Genbanktransformation

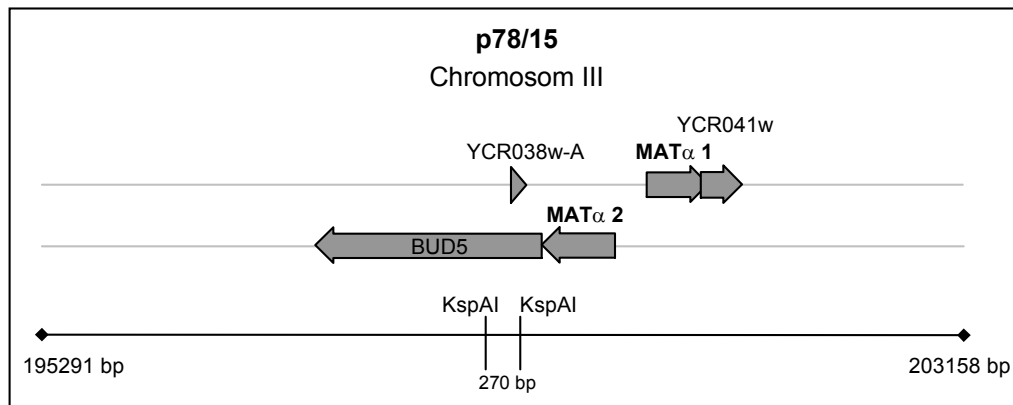


Abb. 3-29: OSS78 komplementierender Bereich auf Chromosom III (195291 – 203158 bp)
 Ein 270 bp großes Stück von p78/15 wurde mit KspAI ausgeschnitten und damit *BUD5* bzw. *YCR038w-A* zerstört. Das religierte Plasmid erhielt die Bezeichnung *pbud5*.

Neben dem *mating type* (MAT) Locus enthielt das ca. 8kb große Insert nur drei weitere vollständige offenen Leserahmen. Um festzustellen welches Gen für die Komplementation von OSS78 verantwortlich ist, wurde zunächst *BUD5* und *YCR038w-A* auf p78/15 zerstört (Abb. 3-29). Da das so erhaltene Plasmid *pbud5* nach Transformation weiterhin zur Osmostabilität von OSS78 führte (Abb. 3-30), konnten diese beiden Gene ausgeschlossen werden.

Für zwei Gene des MAT-Locus (*MAT α 2* und *MAT α 1*) wurde bereits von Verna und Ballester (1999) ein Zusammenhang mit der Erhaltung der Zellwandintegrität nachgewiesen. Besonders die MAT-Gene des entgegengesetzten Paarungstyps waren in der Lage den Phänotyp verschiedener WSC-Mutanten (*cell wall integrity and stress component*) zu supprimieren.

Das Plasmid p78/63, das unter anderem *WSC1* enthielt, konnte den osmolabilen Phänotyp der Mutante OSS78 nicht vollständig komplementieren (nicht gezeigt). Im Zusammenhang mit der Suppression von OSS78 durch *MAT α 2* wäre ein Defekt in diesem Gen wahrscheinlich. Wie einleitend erwähnt (1.2.2.1), wird für die WSC-Proteine als Bestandteil des PKC-Signaltransduktionswegs eine Funktion als Zelloberflächen-Sensor postuliert (Verna *et al.*, 1997; Lodder *et al.*, 1999). Die Deletion von beispielsweise *WSC1* führt zwar nicht zur Osmolabilität der Zelle, die Mutante zeigt jedoch geringfügige Temperatursensitivität bei 37°C und einen Zellyse-Defekt bei 14°C.

Über einen Tüpfeltest wurde das Wachstum verschiedener OSS78-Transformanten verglichen. Wie in Abbildung 3-30 gezeigt, komplementierte eine Transformation mit

pWSC1 den osmolabilen Phänotyp von OSS78 nur teilweise, während *p78/15* und *pbud5* (*Mata.2*) zu einer vollständigen Heilung führten.

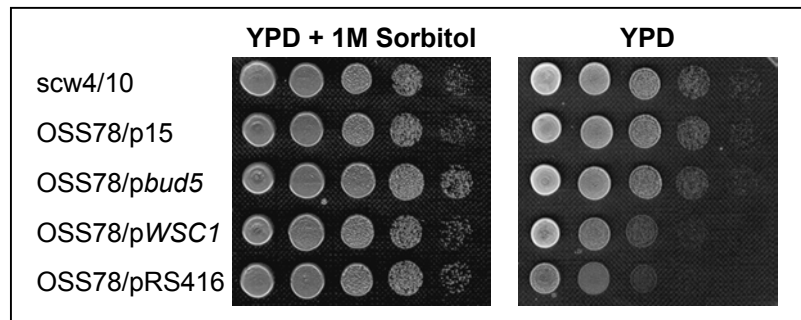


Abb. 3-30: Komplementation der Mutante OSS78

Dargestellt sind Verdünnungsreihen in 10er Schritten ausgehend von ca. 10^6 Zellen, die auf YPDS und YPD-Platten aufgetropft wurden.

Über die Sequenzierung von *WSC1* aus OSS78 konnte letztlich bestätigt werden, daß *WSC1* keine Mutation trägt. Eine Erklärungsmöglichkeit wäre, daß die Mutation in OSS78 in einem der anderen WSC-Gene vorliegt und diese partiell durch eine weitere *WSC1*-Kopie aber auch vollständig durch *MAT α 2* suppremiert werden kann.

3.3.3.5 Komplementationsversuche weiterer OSS-Mutanten

Neben den geschilderten Komplementationen der Mutanten OSS20, OSS41, OSS55 und OSS78 wurden im Rahmen dieser Arbeit weitere OSS-Mutanten mit Genbank transformiert, um deren Phänotyp zu komplementieren.

Die Versuche mit OSS4, OSS59, OSS80 und OSS87 führten zu keinem eindeutigen Ergebnis. Bei den Mutanten OSS80 und OSS87 war eine Ursache die zu schwache Osmolabilität der Mutanten, die sich vor allem nach der Transformation kaum manifestierte und daher eine Selektion erhaltener Klone erheblich erschwerte. OSS4 und OSS59 konnten zwar mehrfach komplementiert werden, jedoch ausschließlich durch *SCW4* bzw. *SCW10*.

3.3.3.6 Identifizierung einer Punktmutation in *CHS4* aus OSP345

In vorangegangenen Arbeiten wurde bereits die aus der Δ *PIR*-Mutante hervorgegangene OSP345-Mutante mit *CHS4* komplementiert, ein eindeutiger Nachweis einer Mutation

in *CHS4* konnte jedoch nicht erbracht werden (M. Ecker, 2000). Bei *Chs4p* handelt es sich um einen posttranskriptionellen Regulator der Chitinsynthase III (Trilla *et al.*, 1997; Ono *et al.*, 2000).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Sequenzanalyse von *CHS4* aus *OSP345* durchgeführt. Der 2091 bp umfassende offene Leserahmen von *CHS4* wurde hierzu über PCR an genomischer DNA von *OSP345* und der Δ *PIR*-Mutante amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden direkt sequenziert und die erhaltenen Sequenzen verglichen.

Gen	Basenaustausch	Aminosäureaustausch
<i>CHS4</i>	Position 1568: G→A	W523→STOP

Tab. 3-5: Sequenzvergleich von *CHS4* aus Δ *PIR* und *OSP345*

Eine eingeführte Punktmutation (Tab. 3-5) führt demnach in *CHS4* zum vorzeitigen Sequenzabbruch nach Aminosäure 523. Man kann daher davon ausgehen, daß ein disruptiertes *CHS4*, zusammen mit dem Fehlen der vier *PIR*-Proteine, für die Osmolabilität von *OSP345* verantwortlich ist.

3.4 Genom-weite Expressionsanalyse multipler Zellwandmutanten

Nachdem durch den genetischen *Screen* keine neuen wichtigen Zellwandkomponenten gefunden werden konnten, wurde nach anderen Möglichkeiten gesucht Gene zu identifizieren, deren Produkte vor allem in der Zellwand selbst eine wichtige Rolle spielen könnten. Hierbei sollte sich der Kompensationsmechanismus der Zellwand zu Nutze gemacht werden. Wie bereits einleitend erwähnt (1.2.3), ist die Hefezellwand ein dynamisches System, welches dazu in der Lage ist sowohl auf Veränderungen äußerer Bedingungen, wie Osmolarität, aber auch auf interne Schwächung durch Reduktion einzelner Strukturelemente zu reagieren. In der Theorie wird die Zellwandintegrität dabei durch Umorganisation und quantitative Veränderung verfügbarer Komponenten gewährleistet. So sollten für die Zellwandintegrität wichtige Gene unter Streßbedingungen oder auch in Zellwandmutanten transkriptionell verändert sein. Um dieses zu untersuchen wurde eine Genom-weite Expressionsanalyse unter Verwendung von *DNA-Arrays* durchgeführt. Das transkriptionelle Profil zweier Zellwandmutanten sollte mit einem Wildtypstamm verglichen werden. Ausgewählt wurden die Stämme

pir1pir2pir3pir4 (Δ PIR) und *ccw12ccw13ccw14tip1cwp1* (Δ GPI), da in diesen Mutanten bereits Hinweise für eine veränderte Transkription einiger Zellwandgene vorliegen, welche im folgenden kurz zusammengefaßt werden.

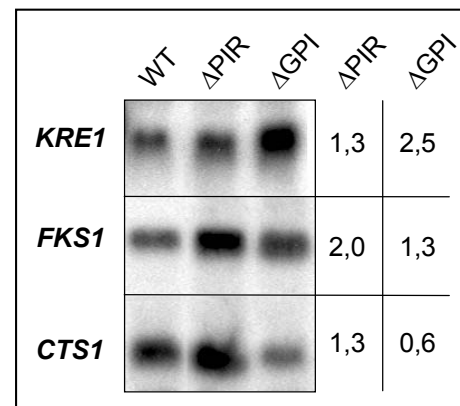
3.4.1 Die Ausgangsmutanten Δ PIR und Δ GPI

Die bereits in Abschnitt 3.3.1 beschriebene Δ PIR-Mutante wurde gewählt, da in diesem Stamm alle Vertreter einer Zellwandproteingruppe deletiert sind. Ferner konnte für *PIR1*, *PIR2*, *PIR3* und *PIR4* eine Regulation durch den Zell-Integritäts-Signaltransduktionsweg gezeigt werden (Jung und Levin., 1999). Dennoch scheint diese Mehrfachmutante eine relativ stabile Zellwand zu besitzen, da sie keine osmotische Stabilisierung zum Wachstum benötigt, sondern lediglich eine Sensitivität gegenüber *Calcofluor White* und Kongo rot aufweist (Mrsa und Tanner, 1999). Über Northern-Analyse wurde die Transkription einiger Gene, deren Produkte an der Biogenese der Zellwand beteiligt sind, in der Δ PIR-Mutante untersucht. Dabei konnte beispielsweise für die β -1,3 Glukansynthase I (*FKS1*) eine Verdopplung der Expression gezeigt werden (Abb. 3-31).

Abb. 3-31: Transkription von *KRE1*, *FKS1* und *CTS1*

Für die Northern-Analysen wurde je 20 μ g Gesamt-RNA von WT, Δ PIR- und Δ GPI-Mutante eingesetzt.

Die Signalintensitäten hybridisierter 32 P-Sonden wurden über Phosphorimager quantifiziert und jeweils gegen *ACT1* normalisiert. Die angegebenen Faktoren beziehen sich auf das jeweilige WT-Signal.



In der Δ GPI-Mutante fehlen fünf bekannte, über einen GPI-Ankerrest kovalent in der Zellwand gebundene Proteine. Wie die Δ PIR-Mutante weist auch diese Mehrfachmutante keinen osmolabilen Phänotyp auf. Auffällig ist, daß bis auf *CCW13* die Einzeldelationen aller in der Δ GPI-Mutante defekten Gene zu *Calcofluor White* Hypersensitivität führten (Van der Vaart, *et al.*, 1995; Moukadiri *et al.*, 1997; Mrsa *et al.*, 1999). Während man bei einer gleichzeitigen Disruption von einer Verstärkung dieses Effekts ausgehen konnte, war jedoch das Gegenteil der Fall. Die Δ GPI-Mutante

zeigte ein mit dem WT vergleichbares Wachstum auf YPD/CFW (M. Ecker, 2000). Dieser indirekte Hinweis einer Kompensation des Zellwanddefekts konnte ebenfalls in Northern-Analysen gestützt werden. In Abbildung 3-31 sind transkriptionelle Veränderungen einiger Zellwandgene in der Δ GPI-Mutante exemplarisch dargestellt. Die Expression von *KRE1*, das an der β -1,6 Glukansynthese beteiligt ist, wurde 2,5fach induziert, während die Transkription der Chitin hydrolysierenden Chitinase (*CTS1*) auf nahezu die Hälfte im Vergleich zum WT reduziert wurde.

3.4.2 Durchführung der DNA-Filter-Analysen

In der Abbildung 3-32 sind die einzelnen Schritte der DNA-Filter-Analyse schematisch dargestellt. Die praktischen Arbeiten wurden größtenteils am *Institut National des Sciences Appliquées* in der Arbeitsgruppe von Prof. J.M. François durchgeführt. Die verwendeten DNA-Filter stammen aus der *Molecular-Genetic Genome Analysis Group* von Prof. J.D. Hoheisel (Deutsches Krebsforschungszentrum), wo auch die Analyse der Daten unter Anleitung von Nicole Hauser durchgeführt wurde.

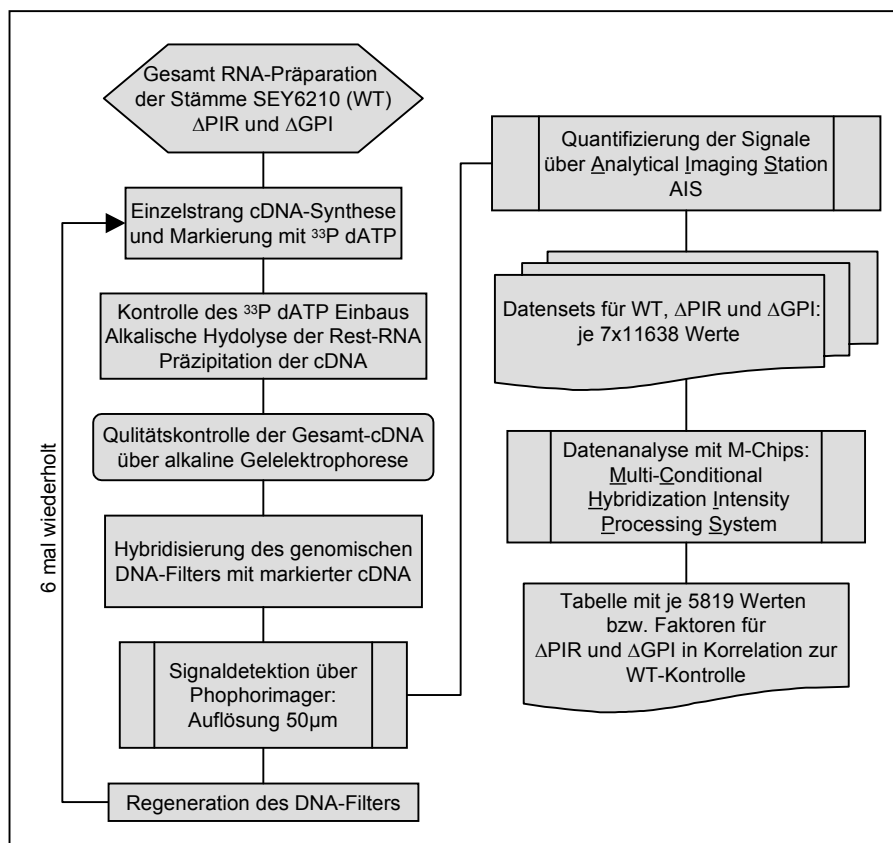


Abb. 3-32: Schematischer Ablauf der Expressionsanalyse von Δ PIR und Δ GPI

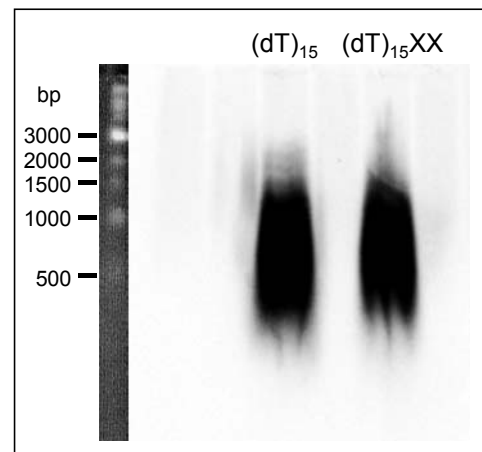
Zur Präparation von Gesamt-RNA wurden WT, Δ PIR- und Δ GPI-Mutante über Nacht auf exakt OD 1 angezogen um möglichst vergleichbare zelluläre Bedingungen zu gewährleisten. Im Unterschied zur phenolischen RNA-Präparation wurden die Zellen für die cDNA-Synthese in gefrorenem Zustand mechanisch aufgeschlossen und Gesamt-RNA mit Hilfe des RNeasy Midi Systems der Fa. Qiagen präpariert. RNA-Abbau und ungleichmäßige Präparation verschieden langer mRNAs wurde so weitestgehend vermieden (Hauser *et al.*, 1998).

Die RNA wurde anschließend durch reverse Transkription in Einzelstrang cDNA überschrieben und gleichzeitig durch den Einbau von ^{33}P -dATP radioaktiv markiert (2.2.3.2). Nach der Hydrolyse restlicher Template-RNA mit NaOH wurde die cDNA mit Isopropanol präzipitiert. Der Einbau wurde durch TCA-Präzipitation im Szintillationszähler quantifiziert (2.2.3.3) und lag im Durchschnitt bei 90%. Um die durchschnittliche Länge der cDNA Transkripte zu überprüfen, wurde ein Aliquot der Präparation mittels alkalischer Gelelektrophorese untersucht (2.2.3.4).

Abb. 3-33: ^{33}P -markierte cDNA

Gezeigt ist ein Vergleich zweier cDNA Synthesen mit Oligo dT_{15} und *geankerten* $dT_{15}\text{XX}$. Letzteres ist ein Primergemisch aus 15 verschiedenen Primern. XX steht dabei für jede mögliche Kombination aus A,C,T und G. Diese soll die Bindung des Primers möglichst nahe am Gen gewährleisten und so die Hybridisierung der cDNA verbessern.

Die cDNAs wurden auf einem alkalischen Agarosegel aufgetrennt, der Nachweis erfolgte über Autoradiographie.



Die Länge der cDNA-Transkripte lag dabei jeweils zwischen ca. 300bp und ca. 2000bp womit eine gute Hybridisierung mit den PCR-Templates der Filter gewährleistet ist (Abb. 3-33).

Die drei verwendeten DNA-Nylonfilter (112-1, 112-2, 112-3) enthielten 5819 von 6116 offenen Leserahmen (ORF) in Form von Vollängen-PCR-Produkten, wobei diese jeweils in Dupplets in einer 4x4 Matrix aufgebracht wurden. 297 Gene fehlten aufgrund von fehlerhaften PCR-Reaktionen (Hauser *et al.*, 1998). Die Hybridisierung erfolgte in Church-Puffer für 20h bei 65°C. Zur Detektion der Signale wurde ein *Phosphorimager Screen* für 60h mit den Filtern exponiert und dieser mit einer Auflösung von 50 μm

eingelassen. Die Filter wurden anschließend regeneriert und vor der erneuten Verwendung auf eventuelle Sondenrückstände kontrolliert.

Hybridisierungen und cDNA-Präparationen wurden siebenmal wie beschrieben durchgeführt, wobei die Filter zur Vermeidung von Artefakten jeweils getauscht wurden. Eine weitere Reproduktion war aufgrund der durch wiederholte Hybridisierung zunehmenden Hintergrundsignale vor allem auf Membran 112-1 nicht möglich.

3.4.3 Auswertung der Expressionsdaten

Nach einer Quantifizierung der *Phosphorimager-Scans* mittels AIS (*Analytical Imaging Station*) erfolgte die Auswertung dieser Daten mittels *M-Chips* Software (*Theoretical Bioinformatics*, Deutsches Krebsforschungszentrum).

Zunächst wurden die einzelnen Signalintensitäten aller Filter mit einer internen Kontrolle normalisiert, um einen Vergleich aller Daten der jeweiligen Filter untereinander zu ermöglichen. Dazu wurden die Daten einer Kontrollhybridisierung mit universellen Oligos verwendet, welche bereits unmittelbar nach der Filterherstellung durchgeführt worden war.

Im nächsten Schritt wurden, jeweils für die einzelnen Bedingungen (WT, Δ PIR und Δ GPI), alle Werte der 5819 ORFs untereinander verglichen, um die Reproduzierbarkeit einzelner Daten zu überprüfen. Es wurden all jene Signale ausgeschlossen, deren Intensität mehr als vierfach über oder unter der Standardabweichung lag.

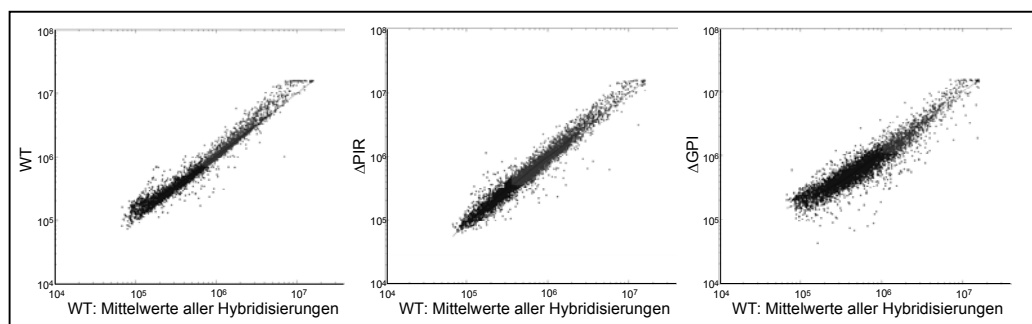


Abb. 3-34: Korrelations-Plots der Expressionsprofile von WT, Δ PIR und Δ GPI

Gezeigt sind Auftragungen der Durchschnittlichen Intensitäten aller Kontroll-Hybridisierungen (WT) gegen jeweils eine WT, Δ PIR und Δ GPI-Hybridisierung. Die WT/WT-Korrelation verläuft idealerweise in einem möglichst schmalen linearen Bereich, während differenziell exprimierte Gene sich je nach Unterschied aus diesem entfernen.

Die verbliebenen Daten können in unterschiedlicher Weise weiter analysiert und dargestellt werden. Über Korrelations-Plots wurden die Expressionsprofile der beiden Mutanten mit dem WT verglichen. Wie in Abbildung 3-34 exemplarisch gezeigt, konnte so abgeschätzt werden, ob und in welchem Maße Gene differentiell exprimiert wurden.

Dabei zeigten sich vor allem zwischen Δ PIR und WT kaum Unterschiede im Expressionsprofil. Im Vergleich der Δ GPI-Mutante mit dem WT waren deutlich mehr Gene zu erkennen, die sich in ihrer Expression unterschieden, wobei sich auch hier durch eine relativ hohe Übereinstimmung mit dem WT Expressionsprofil abzeichnete, daß die Transkriptionsunterschiede nicht dramatisch ausgefallen waren.

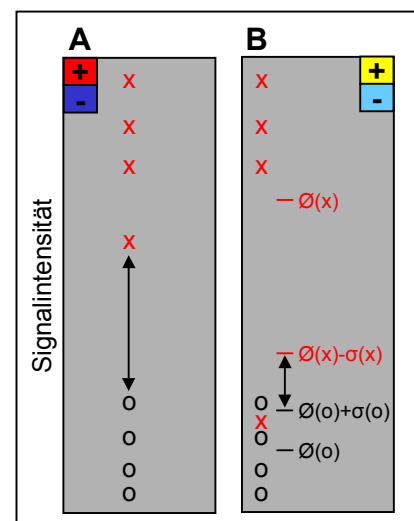
Für alle offenen Leserahmen wurden Expressionsfaktoren im Vergleich zum WT ermittelt. In Abbildung 3-35 sind die Verfahren erläutert, welche zur Ermittlung der durchschnittlichen Transkription verwendet wurden und wie diese gleichzeitig eine Aussage über die Signifikanz der erhaltenen Werte zulassen.

Abb. 3-35: Farbkodierung der Expressionsfaktoren

A: *Min/Max Separation*: Waren die Transkriptlevel eines Gens in einer Mutante (x) in allen Reproduktionen von den Werten der WT-Kontrolle (o) getrennt, wurde der Expressionsfaktor durch den Quotient aus dem kleinsten (x) und dem größten (o)-Wertes wiedergegeben. So ermittelte Faktoren sind höchst signifikant und wurden rot bzw. blau hinterlegt.

B: *Standard Abweichung Separation*: Im Fall einer Vermischung der Daten aus Mutante (x) und Kontrolle (o) wurde aus beiden Sets der Durchschnitt (\emptyset) bestimmt und dieser mit der Standardabweichung (σ) verrechnet. Der Quotient dieser beiden Werte ergab den Expressionsfaktor, welcher gelb bzw. hellblau unterlegt wurde.

Beide Verfahren lassen keinen Rückschluß auf die Höhe des Expressionsfaktors zu.



Nach den Ergebnissen der Korrelations-Analysen waren die Expressionsfaktoren in der Δ PIR-Mutante im Vergleich zum WT kaum verändert. Ein Verlust der PIR-Proteine hat somit zumindest keine Auswirkung auf die Transkription Zellwand-relevanter Gene. Weniger als zehn offene Leserahmen waren um mehr als den Faktor 1,5 differentiell transkribiert, wobei es sich dabei durchwegs um Daten geringer Signifikanz handelte. Eine Auswertung der Expressionsfaktoren einzelner Gene wurde daher nicht durchgeführt.

In der Δ GPI-Mutante hingegen waren insgesamt 159 Gene differentiell exprimiert, wobei 60 Gene induziert und 99 reprimiert wurden. Tabelle 3-6 zeigt eine statistische Zusammenfassung der ermittelten Expressionsfaktoren.

		Durchschnittswerte bestimmt durch:	
		min/max Separation	Separation der Standard-Abweichung
Expressionsfaktor $\geq 1,50$	159	28	131
induziert	60	11	49
reprimiert	99	17	82
Expressionsfaktor $\geq 2,00$	34	16	18
induziert	14	6	8
reprimiert	20	10	10

Tab. 3-6: Differentielle Transkription in der Δ GPI-Mutante

Generell läßt sich sagen, daß die gleichzeitige Deletion von fünf GPI-verankerten Proteinen die Integrität der Zellwand offensichtlich beeinträchtigt, wobei dieser Defekt durch eine Induktion bzw. Repression verschiedener Gene unterdrückt wird und somit der Mutante ein normales Wachstum ermöglicht. Da ein Ziel des *Arrays* das Auffinden neuer Zellwandproteine und möglicher Kompensationsmechanismen darstellte, wurden alle regulierten Gene nach folgenden Selektionskriterien weiter eingegrenzt:

- Bekannte Lokalisation in der Zellwand
- Beteiligung an der Zellwandsynthese oder deren Regulation
- Unbekannter offener Leserahmen mit Signalpeptid
- Vergleich mit DNA-Arrays anderer Zellwandmutanten (Daten zu *fks1-*, *gas1-*, *kre6-*, *mnn9-*, *knr4-*Mutanten von Lagorce *et al.*, unveröffentlicht)
- Hoher Expressionsfaktor bzw. Signifikanz

Insgesamt wurden so 64 offene Leserahmen ausgewählt, die potentiell an der Kompensation eines Zellwanddefekts der Δ GPI-Mutante teilhaben könnten und daher für weitere Untersuchungen in Frage kommen (Tabelle 3-7).

Von den wenigsten dieser Gene ist die Funktion ihrer Produkte bekannt bzw. gut untersucht. 12 Transkripte trugen ein Signalpeptid und kodierten zum Teil für bereits bekannte (7) oder auch potentielle (5) Zellwandproteine.

Gen	ORF	E-Faktor	bekannte Regulation	Genannotation
SCW 10	YMR305C	+3.62	<i>mnn9</i> +4,5; <i>kre6</i> +1,8; <i>gas1</i> +3,5	Zellwandprotein /putative Glukanase
PRB1	YEL060C	+3.50	<i>gas1</i> +11,2; <i>fls1</i> +2,6; <i>mnn9</i> +4,3; <i>kre6</i> +2,7	Vakuoläre Protease B
	YLL053C	+3.44	<i>gas1</i> +3,2; <i>kre6</i> -1,7	
	YOR389W	+3.38	<i>gas1</i> +2,5; <i>mnn9</i> +1,7;	Signalpeptide
	YPL277C	+3.31		99% homolog zu YOR389w
	YDR065W	+2.95	15fach induziert während der Sporulation; <i>knr4</i> -1,9	
	YDR533C	+2.75	<i>mnn9</i> +2,0; <i>kre6</i> +1,8	
	YPL088W	+2.59	<i>fls1</i> +4,5; <i>gas1</i> +3,4; <i>knr4</i> +3,4; <i>kre6</i> +5,3; <i>mnn9</i> +9,8	
EFR3	YMR212C	+2.46		
DIA1	YMR316W	+2.34	<i>fls1</i> +2,5; <i>gas1</i> +4,9; <i>kre6</i> +1,7; <i>mnn9</i> +5,9	Pseudohyphales Wachstum
PRY2	YKR013W	+2.33	<i>gas1</i> +2,9; <i>mnn9</i> +6,3	
SED1	YDR077W	+2.31	<i>fls1</i> +3,6; <i>gas1</i> +3,3; <i>knr4</i> +3; <i>kre6</i> +7,9; <i>mnn9</i> +4,5	Zellwandprotein
	YOR203W	+1.97	<i>fls1</i> +30,6	essentielles Gen
	YDR008C	+1.95		
TOS1	YBR162C	+1.87	<i>mnn9</i> +1,9	Signalpeptid; homolog zu Aga1p
	YNL187W	+1.83	<i>gas1</i> +1,6	
DFG5	YMR238W	+1.78	<i>gas1</i> +4,0; <i>fls1</i> +2,0; <i>mnn9</i> +4,8; <i>kre6</i> +3,2; <i>knr4</i> +2,1	Pseudohyphales Wachstum
SIM1	YIL123W	+1.77	<i>gas1</i> +3,2; <i>mnn9</i> +1,8	
CHA1	YCL064C	+1.76	<i>gas1</i> +2,6; <i>fls1</i> -1,6; <i>mnn9</i> -2,4	Serin/Threonin Deaminase
CEF1	YMR213W	+1.70		
	YIL117C	+1.69	<i>fls1</i> +3,9; <i>mnn9</i> +5,8; <i>kre6</i> +3,5	
SRL1	YOR247W	+1.68	<i>fls1</i> +1,5; <i>mnn9</i> +2,6; <i>kre6</i> +1,8	Signalpeptid
ABP1	YCR088W	+1.65	<i>kre6</i> +1,9	Zytoskelett; Aktin bindendes Protein
ARC15	YIL062C	+1.64	<i>fls1</i> +1,6; <i>kre6</i> +1,5	Zytoskelett
KAR2	YJL034W	+1.63	<i>mnn9</i> +1,8	ER Protein Translokation
	YJR114W	+1.60	<i>fls1</i> -1,6; <i>kre6</i> -1,6	
BGL2	YGR282C	+1.59	<i>mnn9</i> +2,5; <i>kre6</i> +3,0	Zellwandprotein /Endo-1,3-Glukanase
IRA2	YOL081W	+1.58		GAP für Ras1p und Ras2p
CAR2	YLR438W	+1.57	<i>fls1</i> +1,8; <i>mnn9</i> +3,0; <i>kre6</i> +2,8; <i>knr4</i> +1,9	
YHB1	YGR234W	+1.56		Oxidative Stressantwort
SAC6	YDR129C	+1.56		
TOS11	YOR248W	+1.56	<i>fls1</i> +1,7; <i>mnn9</i> +2,3; <i>kre6</i> +2,0	
BFR1	YOR198C	+1.54		Sekretion
PST1	YDR055W	+1.51	<i>fls1</i> +4,5; <i>mnn9</i> +5,0; <i>kre6</i> +7,7; <i>knr4</i> +2,0	sezerniert von Protoplasten
	YLR414C	+1.51	<i>fls1</i> +2,5; <i>mnn9</i> +7,5; <i>kre6</i> +3,1; <i>knr4</i> +2,4	Signalpeptid
	YOR220W	+1.50	<i>fls1</i> +2,1; <i>mnn9</i> +4,4; <i>kre6</i> +2,1	Msn2p, Msn4p abhängig
KSS1	YGR040W	-1.60		MAP-Kinase Pseudohyphales Wachstum
	YLR413W	-1.65		Signalpeptide
FUS1	YCL027W	-1.74	<i>gas1</i> +2,0; <i>mnn9</i> -2,0; <i>kre6</i> -4,7	Paarung, Zellfusion
	YKL107W	-1.80		
OAC1	YKL120W	-1.81		
	YDL241W	-1.84		
	YAL060W	-1.85		
	YOL106W	-1.85		
	YLR387C	-1.87		
SW15	YDR146C	-1.93		Transkriptionsfaktor u.o. für <i>PIR1</i>
BAT1	YHR208W	-2.07		
IOC3	YFR013W	-2.08		
LIF1	YGL090W	-2.09	<i>kre6</i> -3,0	
UTR2	YEL040W	-2.17		Zellwandprotein
CDC123	YLR215C	-2.20	<i>mnn9</i> +1,5	
QR15	YLR204W	-2.21		
GLN1	YPR035W	-2.21	<i>mnn9</i> +1,6; <i>kre6</i> +1,7	Glutamin Synthetase
	YLR282C	-2.47		Signalpeptide
	YDR026C	-2.66		
	YJL072C	-2.70	reprimiert durch hohe Salzkonzentration	
	YDR314C	-2.81	<i>fls1</i> +2,4; <i>mnn9</i> -6,9	
ENA1	YDR040C	-3.16		Plasmamembran ATPase
	YIL080W	-3.16		Pseudogen
IPK1	YDR315C	-3.30	<i>fls1</i> +2,3; <i>mnn9</i> +1,8; <i>kre6</i> +2,5; <i>knr4</i> +1,8	Inositolkinase
	YDR222W	-3.31	induziert durch hohe Salzkonzentration	
	YDR133C	-4.15		
	YDR134C	-4.32	<i>mnn9</i> -1,8	potentielles GPI-Protein
	YDR223W	-4.67	<i>fls1</i> +2,0; induziert durch Pkc1p: +3,42	

Tab. 3-7: Selektion differentiell exprimierter Gene

Dargestellt sind 64 offenen Leserahmen, welche in der Δ GPI-Mutante differentiell exprimiert werden und deren Genprodukte putative Auswirkungen auf die Zusammensetzung und/oder die Biogenese der Zellwand besitzen. Die Expressionsfaktoren (E-Faktor) beziehen sich jeweils auf die entsprechende Transkription im Wildtyp, wobei Induktionen ein positives, Repressionen ein negatives Vorzeichen tragen. Farblich dargestellt ist die Signifikanz der Werte (siehe Abb. 3-35). Grau unterlegt sind Proteine mit Signalpeptid.

3.4.3.1 Differentielle Expression bekannter Zellwandprotein-kodierender Gene in der Δ GPI-Mutante

Mit einem Expressionsfaktor von +3,62 stellte *SCW10* das in der Δ GPI-Mutante am stärksten induzierte Gen dar und scheint damit eine zentrale Funktion bei der Kompensation der Δ GIP-Mutante zu besitzen. *BGL2*, ein weiteres, für ein lösliches Zellwandprotein kodierendes Gen, wurde ebenfalls induziert. Der Expressionsfaktor war allerdings relativ gering (+1,59).

Das in der vorliegenden Arbeit bereits ausführlich beschriebene *SCW10* kodiert für ein zu β -1,3 Glukanasen homologes Protein. Aufgrund der bestehenden Homologie wird für Scw10p eine Beteiligung an der Quervernetzung der Zellwandkomponenten postuliert (Cappellaro *et al.*, 1998). Während für Scw10p eine enzymatische Funktion bislang nicht gezeigt werden konnte, wurde für Bgl2p sowohl β -1,3 Endoglukanaseaktivität *in vitro* (Mrsa *et al.*, 1993) als auch Transglukosidaseaktivität gezeigt (Goldman *et al.*, 1995).

SEDI (*suppressor of erd2 deletion*) kodiert für ein zu Ccw12p homologes GPI-Protein (Hardwick *et al.*, 1992). Zunächst als Zelloberflächenprotein stationärer Hefezellen beschrieben, konnte gezeigt werden, daß *SEDI* unter verschiedenen Streßbedingungen und auch PKC1 abhängig induziert wird (Shimoi *et al.*, 1998; Jung und Levin, 1999).

Das einzige reprimierte bekannte Zellwandgen kodiert für das GPI-verankerte Utr2p/Crh2p (*congo red hypersensitiv*). Für dieses Protein wurde ebenfalls eine Funktion während der Zellwandbiogenese postuliert, da es zum einen ebenfalls Homologien zu β -Glukanasen und Transglykosidasen aufweist und ferner in der Zellwand überwiegend Chitin-kolokalisiert nachgewiesen wurde (Rodríguez-Peña *et al.*, 2000).

Die bekannten Streß-induzierbaren Signaltransduktionswege PKC und HOG schienen in der Δ GPI-Mutante nicht aktiviert zu sein. Zwar waren mit *SEDI* und *PST1* zwei Gene induziert, die auch PKC-abhängig transkribiert werden, die meisten der bekannten Zielgene des PKC- und HOG-Wegs zeigten jedoch keine transkriptionellen Veränderungen. Dazu zählen auch die Gene der PIR-Familie. Damit konnte die, nach biochemischen Hinweisen erwartete Induktion von PIR-Genen in der Δ GPI-Mutante nicht bestätigt werden. Die beobachtete Verdopplung NaOH extrahierbarer PIR-Proteine in der Δ GPI-Mutante (M. Ecker, 2000) ist daher zumindest nicht auf eine transkriptionelle Regulation zurückzuführen.

3.4.3.2 Differentielle Expression unbekannter offener Leserahmen in der Δ GPI-Mutante

Fünf differentiell exprimierte Gene kodierten für unbekannte nicht essentielle Proteine mit Signalpeptid. Eines der in der Δ GPI-Mutante am stärksten induzierten Gene mit einem Expressionsfaktor von +3,38 war YOR389w. Der offene Leserahmen liegt auf Chr XV zwar im Bereich des Telomers, wird aber offensichtlich exprimiert. Ein weiterer, ebenfalls unbekannter ORF YPL277w weist zu YOR389w eine hohe Identität auf. Dieser wurde in der Δ GPI-Mutante ebenfalls stark induziert (+3,31), besitzt jedoch kein Signalpeptid. Aus dem Hydropathieprofil wird deutlich, daß YOR389w möglicherweise für ein Transmembranprotein mit ein oder zwei Membranspannen kodiert (Abb. 3-36).

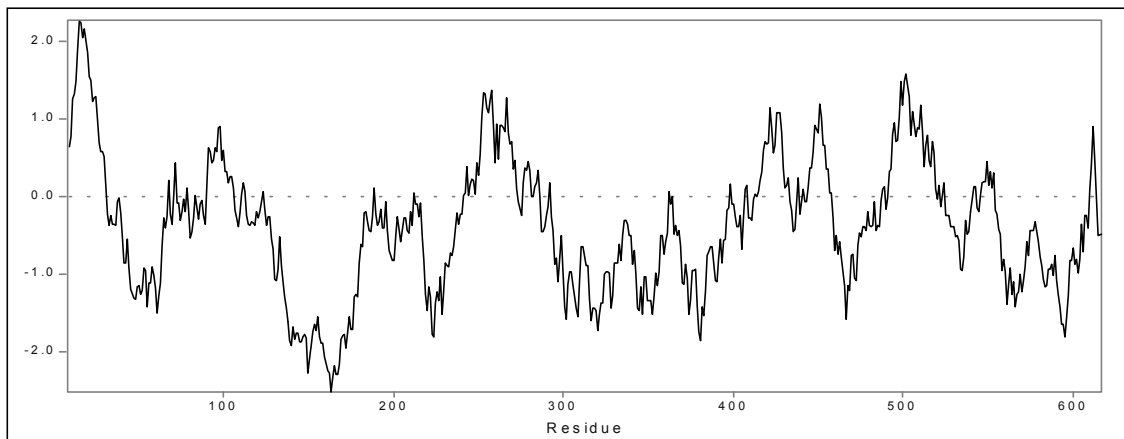


Abb. 3-36: Hydropathieprofil von YOR389w

Das Profil wurde nach Kyte und Doolittle (1982) Algorithmen ermittelt. Dabei wurde eine Fenstergröße von 17 Aminosäuren verwendet.

Ein zweiter unbekannter ORF, YLR414c, kodiert ebenfalls für ein potentielles Transmembranprotein und wurde in der Δ GPI-Mutante 1,5fach induziert. Trotz dieses vergleichsweise geringen Expressionsunterschieds, könnte es sich dennoch um ein interessantes Protein handeln, da es auch in einigen anderen Zellwandmutanten, wie z.B. *fks1*-, *kre6*-, oder *mmn9*-Mutante, positiv reguliert wurde. In Abbildung 3-37 ist das Hydropathieprofil des sehr hydrophoben Proteins dargestellt, wonach man von wenigstens vier Transmembranspannen ausgehen kann. Weitere Informationen konnten über YLR414c nicht erhalten werden.

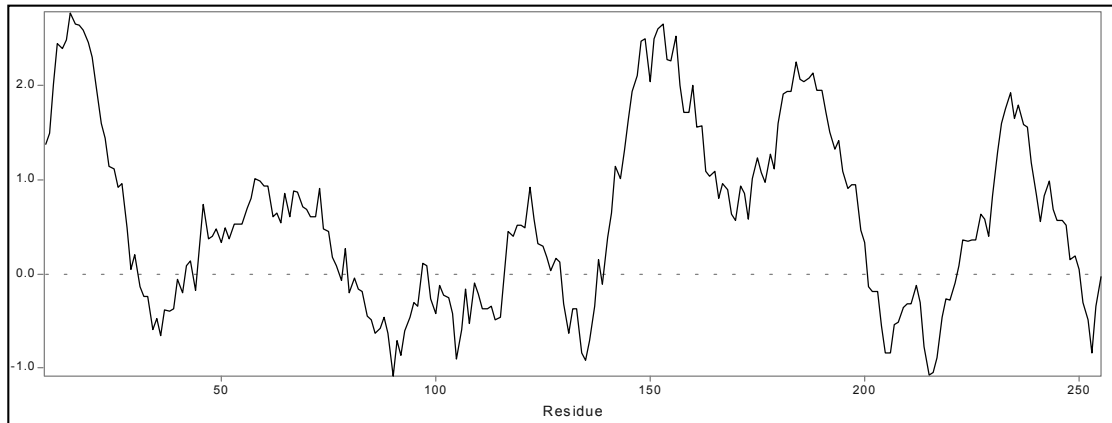


Abb. 3-37 Hydropathieprofil von YLR414c

Das Profil wurde nach Kyte und Doolittle (1982) Algorithmen ermittelt. Dabei wurde eine Fenstergröße von 17 Aminosäuren verwendet.

Ein weiterer interessanter unbekannter ORF, YDR134c, wurde in der Δ GPI-Mutante stark reprimiert (-4,32). Der aufgrund eines internen STOP-Codons als Pseudo-Gen klassifizierte ORF kodiert für ein potentiell GPI-verankertes Zellwandprotein, welches zu 91% identisch mit Ccw12p, einem der in der Δ GPI-Mutante fehlenden Proteine wäre. Über eine Fusion der 40 C-terminalen Aminosäuren konnte bereits gezeigt werden, daß die GPI-Ankersequenz zum einen benützt wird und darüber hinaus das Fusionsprotein effektiv in der Zellwand verankert wird (Hamada *et al.*, 1998; 1999). Andererseits muß man davon ausgehen, daß die mRNA aufgrund des internen STOP-Codons nicht vollständig translatiert wird und daher vermutlich kein funktionelles Protein entsteht.

Über die übrigen regulierten ORFs mit Signalpeptid, YLR413c und YDR282c, konnten keine zusätzlichen Informationen erhalten werden.


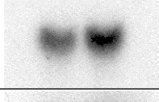
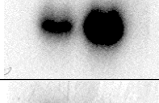
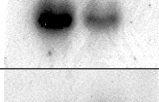
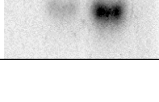
3.4.4 Überprüfung einzelner Daten mittels Northern-Analyse

Obwohl die Expressionsanalyse über DNA-Filter, vor allem durch die häufige Reproduktion, eine sehr zuverlässige Methode darstellt, um transkribierte mRNA-Mengen zu bestimmen, könnten in Abhängigkeit von der RNA-Präparation, der gewählten Hybridisierungsbedingungen und vor allem durch die Computer-unterstützte Auswertung, Unterschiede zu Northern-Blots auftreten. Aus diesem Grund wurden im folgenden die DNA-Array Daten mittels Northern-Blot Analysen bestätigt werden. Hiefür wurden fünf exemplarisch ausgewählte Gene aus WT und Δ GPI-Mutante präparierter Gesamt-RNA nachgewiesen und miteinander verglichen (Abb. 3-38).

Abb. 3-38: Kontrolle einzelner DNA-Array Daten

Für die Northern-Blots wurden jeweils 20µg Gesamt-RNA aus SEY6210 (WT) und Δ GPI-Mutante ausgetragen. Nicht gezeigt ist die durchgeführte Ladungskontrolle über EtBr-Färbung.

Die Signalintensitäten hybridisierter 32 P-Sonden wurden über Phosphorimager quantifiziert. Errechnete Expressionsfaktoren wurden den entsprechenden Daten aus dem DNA-Array gegenüber gestellt.

	SEY 6210 Δ GPI	Northern	Array
<i>SCW10</i>		+ 2,76	+ 3,62
<i>TOS1</i>		+ 1,46	+ 1,87
<i>SED1</i>		+ 2,90	+ 2,31
<i>UTR2</i>		- 2,53	- 2,17
<i>YOR389w</i>		+ 4,41	+ 3,38

Durch einen Vergleich der Expressionsfaktoren wurde deutlich, daß alle untersuchten Gene weitestgehend mit den Daten aus dem DNA-Array übereinstimmen. Auch vergleichsweise geringe transkriptionelle Unterschiede zwischen WT und Δ GPI-Mutante, wie beispielsweise bei *TOS1* konnten im Northern-Blot reproduziert werden.

4 Diskussion

4.1 Stabilität und Lokalisation von Zellwandproteinen in *pmt*-Mutanten

Die Protein O-Mannosylierung ist eine essentielle Proteinmodifikation in *S. cerevisiae* (Gentzsch und Tanner, 1996). Da nahezu alle bekannten Zellwandproteine O-gebundenen Zuckerketten tragen, kann man davon ausgehen, daß diese Modifikation auch für die Zellwandintegrität eine essentielle Bedeutung hat (Kuranda und Robbins, 1991; Chen *et al.*, 1995; Mrsa *et al.*, 1997; Cappellaro *et al.*, 1998). So kann ein Defekt der Protein O-Mannosylierung in den *pmt*-Mehrfachmutanten *pmt2pmt3*, *pmt2pmt4* und *pmt1pmt2pmt3* nur durch osmotische Stabilisierung der Zellen geheilt werden (Gentzsch und Tanner, 1996). In strukturellen Analysen der Zellwand konnten bislang keine Hinweise für eine Beteiligung O-gebundener Saccharide am Erhalt der Zellwandintegrität gefunden werden (Kollar *et al.*, 1997). Daher könnte der osmolabile Phänotyp mancher *pmt*-Mutanten auf eine verringerte Stabilität bzw. Sekretion wichtiger Zellwandproteine zurückzuführen sein, was im Rahmen dieser Arbeit mittels verschiedener Modellproteine untersucht werden sollte.

4.1.1 *Pir2p*

Mit *Pir2p* wurde ein Zellwandprotein untersucht, das sowohl in einer Zellwand-gebundenen Form vorliegt, als auch ins Medium sezerniert wird (Lupashin *et al.*, 1992; Russo *et al.*, 1992; Mrsa *et al.*, 1997). In einer *pmt1pmt2*-Mutante konnte gezeigt werden, daß *Pir2p* nicht nur stark unterglykosyliert ins Kulturmedium abgegeben wird, sondern auch zum Teil fragmentiert vorliegt. In temperatursensitiven *sec*-Mutanten wurde das Protein während der Sekretion in den verschiedenen Kompartimenten nachgewiesen. Dabei konnte festgestellt werden, daß eine Retention von *Pir2p* im Endoplasmatischen Retikulum einer *sec18pmt1pmt2*-Mutante bei restriktiver Temperatur zu einer WT-ähnlichen Glykosylierung führt. Daraus folgt, daß auch andere PMTs in der Lage sind *Pir2p* zu glykosylieren, ihre Affinität jedoch geringer ist als die des *Pmt1p/Pmt2p*-Komplexes. Ihre Aktivität kommt daher erst bei längerer Verweildauer von *Pir2p* im ER bei restriktiver Temperatur zum tragen. Ferner wurde in einer *sec18pmt1pmt2*-Mutante akkumuliertes *Pir2p*, durch wiedereinsetzende Sekretion

bei permissiver Temperatur, als intakte und vollständig glykosylierte Polypeptidkette ins Medium sezerniert.

Über HF-Spaltungen konnte in einer *sec1pmt1pmt2*-Mutante gezeigt werden, daß in späten sekretorischen Vesikeln, Pir2p ausschließlich als intakte Polypeptidkette vorliegt und somit die Spaltung erst im periplasmatischen Raum, der Zellwand oder im Medium stattfindet.

In *S. cerevisiae* sind mehrere sezernierte Proteasen bekannt, die für einen extrazellulären Proteinabbau in Frage kommen. Neben der Pepsin-ähnlichen Bar1p-Protease, die für einen Abbau des α -Faktors verantwortlich ist, gehören dazu auch mehrere GPI-verankerte Proteasen, wie z.B. Yps1p, Yps6p, Yps7p und Mkc7p. Besonders für heterolog exprimierte Proteine konnte eine periplasmatische Degradation durch einige dieser Proteasen gezeigt werden (Hines *et al.*, 1994; Zhang *et al.*, 1997; Kang *et al.*, 2000). Ein Einfluß dieser Enzyme auf Pir2p wurde aber nicht näher untersucht.

Desweiteren konnte für Pir2p eine quantitativ beeinträchtigte Prozessierung des Proteins durch die Golgi-Protease Kex2p nachgewiesen werden, die in einer *pmt4*-Mutante nochmals dramatisch verringert war. Pir2p wird von Kex2p 72AS nach dem START-Codon gespalten (Russo *et al.*, 1992). Bereits im Kulturmedium des Wildtyps konnten nach einer HF-Spaltung zwei sezernierte *PIR2*-Genprodukte mit apparenten Molekulargewichten von 45kDa bzw. 36kDa in einem Verhältnis von 60:40 detektiert werden. Dieses Molekulargewicht entspricht näherungsweise den errechneten Größen des unprozessierten bzw. KEX2-gespaltenen Proteins. In einer *pmt4*-Mutante dagegen war die kleinere Kex2p-prozessierte Form kaum noch nachweisbar. Ein Grund dafür könnte sein, daß Kex2p selbst von Pmt4p nicht aber von Pmt1p oder Pmt2p glykosyliert wird. Die Golgi Protease ist in einer *pmt4*-Mutante stark unterglykosyliert (M.Genztsch, 1996) und könnte dadurch funktionell beeinträchtigt sein.

4.1.2 Cts1p

Die Endochitinase Cts1p wurde aus dem Kulturmedium von *pmt1pmt2*-Mutanten, zum einen unterglykosyliert, aber auch in deutlich reduzierter Menge isoliert (Strahl-Bolsinger *et al.*, 1999), wobei aber der Gehalt in der Zellwand relativ zum WT unverändert blieb. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß weder eine negative Regulation der *CTS1*-Expression noch ein Sekretionsdefekt für den Rückgang der Cts1p-Menge im Kulturmedium von *pmt1pmt2*-Mutanten verantwortlich ist. Über

PMT1-, *PMT2*-Zweifachdeletionen in verschiedenen temperatursensitiven Sekretions-Mutanten konnte gezeigt werden, daß Cts1p intrazellulär, auch bei restriktiver Temperatur, nicht oder nur in stark reduzierten Mengen nachweisbar ist. Die wahrscheinliche Ursache ist ein schneller proteolytischer Abbau des Proteins aufgrund falscher Faltung durch einen ER assoziierten Mechanismus, vermutlich im Proteasom. Ein Hinweis auf eine erhöhte Anzahl falsch gefalteter Proteine in *PMT*-Mehrfachmutanten konnte mittels Northern-Blot Analyse des molekularen Chaperons *KAR2* erhalten werden, dessen Expression beispielsweise in einer *pmt1pmt3pmt4*-Mutante fast verdreifacht ist. Eine ähnliche Zunahme ist bei einem N-Glykosylierungsdefekt in einer *ost3*-Mutante oder nach der Zugabe von Tunikamycin gezeigt worden (Kohno *et al.*, 1993; Silberstein *et al.*, 1998). Herbert *et al.* (1995) konnten nachweisen, daß Kar1p in *S. cerevisiae* nicht nur an der Translokation von Proteinen ins ER, sondern auch an deren Faltung beteiligt ist. Man kann daher davon ausgehen, daß in *pmt*-Mutanten vermehrt ungefaltete Proteine im ER vorliegen.

Die Expression von *KAR2* wird durch den UPR (*unfolded protein response*)-Signaltransduktionsweg reguliert (Mori *et al.*, 1998). Häufen sich zu viele ungefaltete Proteine im Lumen des ER an, wird über den UPR-Weg ein Signal in den Zellkern vermittelt, um die Transkription verschiedener Zielgene zu aktivieren. Durch einen bislang unbekanntem Mechanismus detektiert das Sensorprotein Ire1p, ein Transmembranprotein des ERs, eine Akkumulation ungefalteter Proteine im ER. Durch eine Oligomerisierung von Ire1p, wird durch die cytoplasmatisch, bzw. nucleoplasmatisch lokalisierte Endonukleasedomäne des Proteins ein Intron aus der mRNA des Transkriptionsfaktors *HAC1* gespleißt und durch eine tRNA-Ligase ligiert (Shamu und Walter, 1996; Cox und Walter, 1996; Kawahara *et al.*, 1997). Nach einer vollständigen Translation der gespleißten *HAC1*mRNA, wird mittels einer Bindung von Hac1p an UPR-Elemente die Transkription bestimmter Gene, beispielweise molekularer Chaperone induziert (Abb. 4-1).

Neben der Stabilisierung ungefalteter Proteine, konnte aber auch eine direkte Aktivierung der ER-assoziierten Degradation (ERAD) durch den UPR-Weg gezeigt werden (Friedlander *et al.*, 2000; Ng *et al.*, 2000). Auf diese Weise wird eine Schädigung der Sekretion durch zuviele falsch gefaltete Proteine kooperativ verhindert. Über eine Retranslokation durch den SEC61-Komplex werden falsch gefaltete Proteine aus dem ER entfernt, wobei für lösliche Proteine eine Bindung an Kar2p nötig ist (Plempner *et al.*, 1997; 1998; Brodsky *et al.*, 1999). Der cytoplasmatische Proteinabbau

findet schließlich, abhängig von den Ubiquitin konjugierenden Enzymen Ubc7p und Ubc1p, im Proteasom statt (Sommer und Wolf, 1999; Friedlander *et al.*, 2000).

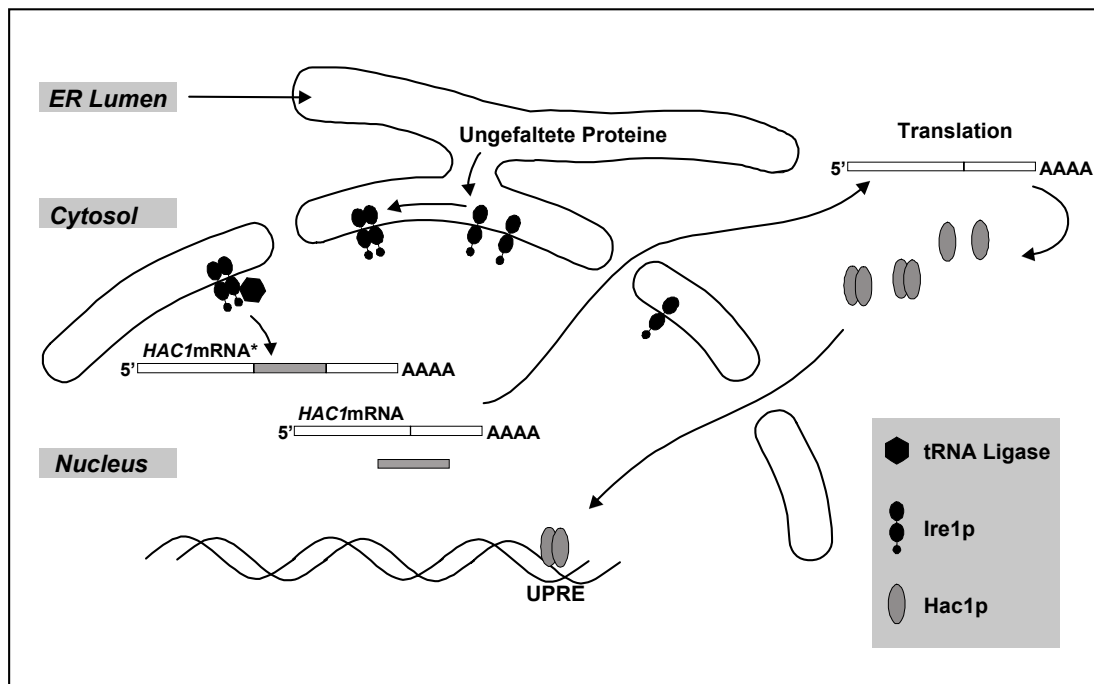


Abb. 4-1: Unfolded Protein Response (UPR) Signaltransduktionsweg nach Sidrauski *et al.* (1998) Modell des UPR in *S. cerevisiae*. Im ER angehäufte ungefaltete Proteine aktivieren das Type-I Transmembranprotein Ire1p, das nach einer Oligomerisierung durch eine Endonuclease Domäne *HAC1*mRNA spleißt. Anschließend wird die mRNA durch eine assoziierte tRNA Ligase ligiert. Obwohl beide Formen der *HAC1*mRNA stabil sind und den Nucleus verlassen können, wird nur die gespleißte Form vollständig translatiert. Über eine spezifische Bindung an UPR-Elemente aktiviert Hac1p nach Import in den Nucleus die Gene der *unfolded protein response*.

Unter normalen Wachstumsbedingungen führt in *S. cerevisiae* nur ein gleichzeitiger Defekt des UPR-Wegs und des ERAD zu schweren Wachstumsstörungen. In *pmt*-Mutanten dagegen ist eine *HAC1*-Deletion vermutlich letal, d.h. ein funktioneller UPR-Weg essentiell (U. Schermer, persönliche Mitteilung). Daraus läßt sich schließen, daß sich in einer *pmt1pmt2*-Mutante durch eine reduzierte O-Glykosylierung falsch gefaltete Proteine im ER anhäufen, über einen aktivierten UPR-Weg teilweise stabilisiert und gefaltet aber auch verstärkt über ERAD abgebaut werden. Besonders stark glykosylierte Proteine, wie beispielsweise Cts1p, wären dadurch stark reduziert. Ein Grund, daß in der Zellwand der *pmt1pmt2*-Mutante mit dem Wildtyp vergleichbare Mengen Cts1p vorhanden sind, ist vermutlich die nicht kovalente Bindung des sezernierten Proteins an das Chitin der Zellwand, welches in einer *pmt1pmt2*-Mutante zudem vermehrt vorhanden ist.

4.2 Screen nach synthetisch osmolabilen Zellwandmutanten

Der Großteil heute bekannter Zellwandproteine wurde in den letzten Jahren auf biochemischem Wege identifiziert. Dabei wurden isolierte Zellwände mit verschiedensten chemischen und enzymatischen Methoden behandelt, um gebundene Proteine zu extrahieren. Konnten zunächst einige prominente Zellwandproteine direkt über polyklonale Antiseren nachgewiesen werden, stellte sich bereits sehr früh heraus, daß es sich bei vielen isolierten Proteinen um cytosolische Kontaminationen handelte (Klis, 1994). Mit Hilfe einer Markierung ganzer Zellen mit einem nicht membrangängigen Biotinreagenz gelang es, Zelloberflächenproteine spezifisch über Streptavidin zu detektieren (Casanova *et al.*, 1992). Zahlreiche bis dahin unbekannte Zellwandproteine konnten mit dieser Technik in *S. cerevisiae* gefunden werden (Mrsa *et al.*, 1997; 1999; Cappellaro *et al.*, 1998). Eine Grenze dieser Methode stellte die nötige Präparation und Reinigung unmarkierter Proteine dar, um diese über N-terminale Sequenzierung zu identifizieren. Nachdem auch in multiplen Zellwandmutanten vergeblich versucht worden war neue Proteine aus der Zellwand zu isolieren, wurde alternativ eine indirekte genetische Methode gewählt. In einem Screen nach synthetisch osmolabilen Zellwandmutanten wurde nach Genen gesucht, deren Deletion in bereits potentiell geschwächten Zellwandmutanten zu einem Verlust der Zellwandintegrität führten (M. Ecker, Dissertation). In der vorliegenden Arbeit wurden einige dieser, aus der EMS-Mutagenese einer *scw4scw10*-Mutante (Δ SCW) hervorgegangenen Mutanten charakterisiert und deren Gendefekte durch Transformation mit einer Centromer-Genbank komplementiert.

Mutante	komplementierende Gene	Zellwandzusammensetzung		
		Glukan	Mannan	Chitin
OSS20	<i>FPS1</i>	30,7%	68,0%	1,3%
OSS41	<i>ROM2</i>	30,8%	67,8%	1,4%
OSS55	<i>JSN1, HOG1</i>	34,5%	64,2%	1,3%
OSS78	<i>MATα2, WSC1</i>	34,1%	64,7%	1,2%

Tab. 4-1: Komplementation und Zellwandzusammensetzung von OSS-Mutanten
Zusammensetzung der Zellwand der Δ SCW-Mutante: Glukan 34,7%; Mannan 63,5%; Chitin 1,8%

In Tabelle 4-1 sind, neben der Kohlenhydratzusammensetzung der Zellwand, die komplementierenden Gene der Mutanten OSS20, OSS41, OSS55 und OSS78

(*osmosensitive* Δ SCW) zusammengefaßt. Ferner wurde der Phänotyp aller untersuchten Mutanten mehrfach mit *SCW4* oder *SCW10* tragenden Plasmiden komplementiert, womit gezeigt wurde, daß die Osmolabilität der OSS-Mutanten jeweils auf eine Kombination mehrerer Gendefekte zurückzuführen ist.

In der Mutante OSS20 konnte der osmolabile Phänotyp durch die Transformation mit *FPS1* geheilt werden. Das zur Familie der MIP (*major intrinsic protein*) Kanal Proteine gehörende Fps1p ist ein in der Plasmamembran lokalisierter Glycerintransporter. *S. cerevisiae* synthetisiert, in Anpassung an ein Wachstum unter hyperosmolaren Bedingungen, Glycerin als intrazellulären Osmolyten um den Turgor der Zelle aufrecht zu erhalten. Hypertonisches Medium führt zu einem schnellen Schließen von Fps1p, womit ein Efflux intrazellulär akkumulierten Glycerins verhindert wird (Luyten *et al.*, 1995; Siderius *et al.*, 2000). Das Gegenteil ist der Fall bei einem raschen Wechsel von hyper- auf hypoosmotisches Medium. Ein sich schnell öffnender Kanal ermöglicht nun den Glycerinausstrom. Eine *fps1*-Mutante ist daher hypersensitiv gegenüber hypoosmolaren Schock, ein Defekt, der sich auch in der OSS20 Mutante zeigt (Tamás *et al.*, 1999; diese Arbeit). Die Osmolabilität der OSS20-Mutante ist jedoch auf eine Kombination mit der Deletion von *SCW4* und *SCW10* zurückzuführen. Zum einen ist eine *fps1*-Mutante nicht osmolabil, zum anderen konnte der Phänotyp der OSS20-Mutante auch mit *SCW4* und *SCW10* komplementiert werden. Da in *S. cerevisiae* konstitutiv Glycerin synthetisiert wird ist in einer *fps1*-Mutante der intrazelluläre Glycerinspiegel um den Faktor 2 erhöht (Philips und Herskowitz, 1997). In Verbindung mit der geschwächten Zellwandstruktur in der Δ SCW-Mutante reicht dieser geringe Anstieg des Turgors offensichtlich aus um einen osmolabilen Phänotyp zu verursachen.

Die Mutante OSS41 konnte durch *ROM2* komplementiert werden, das für einen von zwei GEFs (*GDP/GTP exchange factor*) von Rho1p kodiert. In seiner GTP-gebundenen Form ist dieses kleine G-Protein für die Aktivierung von drei verschiedenen Proteinen verantwortlich. Als regulatorische Untereinheit der β -1,3 Glukansynthase ist Rho1p direkt an der Zellwandbiogenese beteiligt (Drgonova *et al.*, 1996; Quadota *et al.*, 1996). Über eine Aktivierung von Pkc1p spielt das Proteine eine wichtige Rolle im Zellwand-Integritätsweg (Ozaki *et al.*, 1996). Ferner reguliert Rho1p über eine Interaktion mit dem Profilin bindenden Protein Bni1p teilweise die Organisation des Aktin-Cytoskeletts (Kohno *et al.*, 1996; Evangelista *et al.*, 1997). Während die Funktion von Rho1p für *S.cerevisiae* essentiell ist, hat eine *rom2*-Mutante nur einen temperatursensitiven

Phänotyp, da die aktivierende Funktion zumindest zum Teil durch Rom1p, einem weiteren GEF mit geringerer Aktivität, kompensiert werden kann (Ozaki *et al.*, 1996). Analog zu einer *rom2*-Mutante weist OSS41 ebenso einen Wachstumsdefekt bei 37°C auf. Die zusätzliche Osmolabilität könnte auf verschiedene Weise durch einen *ROM2*-Defekt verursacht werden. Für Rom2p wird unter anderem eine zentrale Rolle bei der Signalübertragung von den Sensorproteinen Wsc1-4p auf Rho1p bzw. Pkc1p postuliert (Delley and Hall, 1999). Sollte in der Δ SCW-Mutante ein bereits bestehender Zellwanddefekt PKC-Weg vermittelt kompensiert werden, würde eine *ROM2*-Deletion dieses beeinträchtigen und so den Phänotyp von OSS41 verursachen. Nachdem bislang keinerlei Hinweise auf eine Induktion des PKC-Wegs in der Δ SCW-Mutante schließen lassen, ist eine reduzierte β -1,3 Glukansynthaseaktivität durch die *rom2*-Mutation ebenso wahrscheinlich. Dadurch, daß die Verringerung der β -1,3 Glukanmenge in der Zellwand durch die PKC-abhängige Induktion einer zweiten β -1,3 Glukansynthase (Fks2p) kompensiert wird, wirkt sich ein *ROM2*-Defekt nicht nur auf die Aktivität sondern auch auf die Expression der Synthase aus. Während anscheinend in einer *rom2*-Mutante unter normalen Wachstumsbedingungen genug GTP-gebundenes Rho1p durch Rom1p zu Verfügung gestellt werden kann, um die Stabilität der Zellwand zu gewährleisten, ist verbunden mit einer bereits geschwächten Zellwand in der OSS41-Mutante diese Aktivität nicht mehr ausreichend und führt zur Osmolabilität der Zelle. Unwahrscheinlich ist die Suppression eines anderen Gendefekts durch eine zusätzliche Genkopie von *ROM2*. Dagegen spricht neben dem ts-Phänotyp der OSS41-Mutante, daß beispielsweise der Phänotyp verschiedener PKC-Weg-Komponenten durch eine Überexpression von *ROM2* auf *multicopy*-Plasmiden nur unvollständig unterdrückt werden konnte (Jacoby *et al.*, 1998). Der Zellwanddefekt der Mutante OSS41 wurde jedoch bereits durch die Transformation einer *ROM2*-Kopie vollständig aufgehoben.

OSS55 konnte mit *HOG1*, aber auch teilweise durch *JSNI/PUF1* komplementiert werden. Bei beiden Genen wurde allerdings gezeigt, daß es sich um Suppressoren des osmolabilen Phänotyps der OSS55-Mutante und nicht um den gesuchten Gendefekt handelt. Die genomischen Sequenzen beider Gene wurden in OSS55 überprüft und stimmten mit der WT-Sequenz überein. Eine genaue Funktion von Jsn1p ist nicht bekannt, es gehört jedoch zu einer Familie von fünf homologen Proteinen (Puf-Familie), für die eine Auswirkung auf die mRNA-Stabilität postuliert wurde. In entsprechenden Mutanten konnten für verschiedenen Transkripte eine beschleunigte Degradation

gezeigt werden (Olivas und Parker, 2000). Unter anderem war die mRNA von Hsp12p, das durch verschiedene Streßfaktoren induziert wird, betroffen. Durch eine schwache Überexpression könnte *JSNI* so zu einer Stabilisierung eines für die Zellwand-Integrität wichtigen Transkripts beitragen und auf diese Weise indirekt den Zellwanddefekt von OSS55 partiell kompensieren. Das zweite komplementierende Gen *HOG1*, kodiert für die MAP-Kinase des gleichnamigen Signaltransduktionswegs, der für ein Wachstum bei hyperosmolaren Bedingungen essentiell ist. Aus diesem Grund ist auch eine Mutation dieses Gens auszuschließen, da OSS55 hypertonische Wachstumsbedingungen benötigt. Allerdings konnten Hinweise auf eine Suppression verschiedener Zellwanddefekte durch *HOG1* von Alonso-Monge *et al.* (1999) erhalten werden. Ihren Ergebnissen zufolge verursacht eine Überexpression von *HOG1* eine erhöhte Resistenz gegenüber Zellwand-destabilisierenden Agenzien, wie beispielsweise *Calcofluor White*, Kongo Rot oder Nikkomycin Z. Es ist also durchaus möglich, daß auch durch Mutationen hervorgerufene Zellwanddefekte mittels einer weiteren *HOG1*-Kopie unterdrückt werden können.

Die Mutante OSS78 konnte ebenfalls mit zwei Genen komplementiert werden und auch hier wurde gezeigt, daß es sich um Suppressoren handelt. Eines der Plasmide, welche den osmolabilen Phänotyp von OSS78 vollständig heilen konnten, enthielt die Gene $\alpha 1$ und $\alpha 2$ des MAT (*mating type*)-Locus, wobei OSS78 den entgegengesetzten a-Paarungstyp besitzt. Von Verna und Ballester (1999) wurde für zwei MAT-Gene, *MAT $\alpha 2$* und *MAT $\alpha 1$* , ein überraschender Zusammenhang mit der Zellwandintegrität nachgewiesen. Dabei konnte besonders das Gen des entgegengesetzten Paarungstyps den Phänotyp verschiedener WSC-Mutanten (*cell wall integrity and stress component*) supprimieren, wobei nicht geklärt werden konnte, worauf dieses zurückzuführen war. Ein weiteres komplementierendes Genbankplasmid enthielt zwar *WSC1*, konnte im Unterschied zu *MAT $\alpha 2$* den osmolabilen Phänotyp von OSS78 nicht vollständig beheben. Desweiteren wies die genomische *WSC1*-Sequenz in OSS78 keine Mutation auf. Bei den vier Genprodukten der WSC-Familie handelt es sich um die potentiellen Sensorproteine des PKC-Wegs, die vermutlich mechanisch Zellwanddefekte wahrnehmen und an intrazelluläre Komponenten des PKC-Wegs weiterleiten. Dies konnte durch eine verringerte Phosphorylierung der PKC-abhängigen MAP-Kinase Mpk1p in einer *wsc1wsc2wsc3*-Mutante nach Zellwandstreß belegt werden. Man geht ferner von einer überlappenden Funktion von Wsc1-4p aus, da Deletionen innerhalb der Familie durch Überexpression anderer WSC-Gene suppremierbar sind (Verna *et al.*,

1997). Nachdem sowohl *MAT α 2* und zumindest teilweise *WSC1* die Mutante OSS78 komplementieren, könnte ein Defekt in *WSC2*, *WSC3* oder *WSC4* für den osmolabilen Phänotyp verantwortlich sein.

In der Mutante OSP345 konnte ein Gendefekt identifiziert werden, der zusammen mit dem Fehlen mehrerer PIR-Gene zur Osmolabilität führte. Die bereits in vorangegangenen Arbeiten durchgeführte Komplementation der Mutante ergab einen vermuteten Gendefekt in *CHS4* (M. Ecker, 2000). Dieses Ergebnis konnte im Rahmen dieser Arbeit durch Sequenzierung des Gens bestätigt werden. Demzufolge führt ein Basenaustausch zu einem STOP-Codon und damit zum Sequenzabbruch. Chs4p ist unter anderem für eine korrekte Lokalisation der Chitinsynthase Chs3p verantwortlich (De Marini *et al.*, 1997). Darüberhinaus konnten Ono *et al.* (2000) durch Überexpression von *CHS4* die Aktivität von Chs3p um ein Vielfaches steigern und mit Hilfe einer *Two-Hybrid* Analyse zeigen, daß eine Interaktion beider Proteine für die Aktivierung verantwortlich ist.

Das Ziel mit Hilfe eines *Screen*s nach synthetisch osmolabilen Mutanten Gene zu identifizieren, die direkt am Zellwandaufbau beteiligt sind, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht erreicht werden. Die aufgeklärten Mutationen in *FPS1* und *ROM2*, die zusammen mit der Deletion zweier potentieller Zellwandglukanasen einen osmolabilen Phänotyp verursachten, sind nur indirekt am Erhalt der Zellwandintegrität beteiligt. Generell läßt sich jedoch sagen, daß der Ansatz, Mutanten mit bereits geschwächter Zellwand für einen *Screen* zu benutzen, funktioniert hat. Alle bearbeiteten OSS-Mutanten ließen sich mehrfach mit den Genen der Ausgangsmutante *SCW4* bzw. *SCW10* komplementieren, womit gezeigt werden konnte, daß die Osmolabilität tatsächlich auf eine Kombination mehrerer Gendefekte zurückzuführen ist und auch die Bedeutung von Scw4p und Scw10p für die Zellwandbiogenese belegt wird. Für die Komplementation erwies sich dieser Umstand jedoch als problematisch, da zuviele Klone *SCW4* bzw. *SCW10* enthielten. Vor einer weiteren Komplementation der verbliebenen OSS-Mutanten sollte demnach eine Genbank aus einer *scw4scw10*-Mutante hergestellt werden, um dieses zu umgehen.

4.3 Genom-weite Expressionsanalyse in Zellwandmutanten

In einem alternativen Ansatz wurde im Rahmen dieser Arbeit nach neuen, an der Zellwandbiogenese beteiligten Proteinen gesucht. Da *S. cerevisiae* in der Lage ist bei einem Zellwanddefekt durch Umorganisation und quantitative Veränderung verfügbarer Komponenten die strukturelle Integrität zu gewährleisten, sollten dafür wichtige Gene unter Streßbedingungen oder auch in Zellwandmutanten transkriptionell verändert sein. Eine Genom-weite Expressionsanalyse in zwei Zellwandmutanten, in welchen die Gene der vier PIR-Proteine (Δ PIR) bzw. von fünf GPI-Proteinen (Δ GPI) deletiert waren, wurde benützt um festzustellen, ob und welche transkriptionellen Veränderungen für den Erhalt der Zellwandintegrität dieser Mutanten verantwortlich sind. Dazu wurden mittels *DNA-Arrays* die Expressionsprofile der Δ PIR-Mutante und der Δ GPI-Mutante mit dem eines Wildtyp-Stamms jeweils in der vegetativen Wachstumsphase verglichen.

4.3.1 Das transkriptionelle Profil der Δ PIR-Mutante

Die Deletion von *PIR1-4* führte zu keinen signifikanten transkriptionellen Veränderungen. Dieses Ergebnis war insofern überraschend, da in der Δ PIR-Mutante alle bekannten Vertreter einer Familie von Zellwandproteinen fehlen. Aufgrund gemeinsamer Eigenschaften, vor allem der besonderen, GPI-Anker unabhängigen kovalenten Bindung in der Zellwand, war man davon ausgegangen, daß die PIR-Proteine ein wichtiges strukturelles Element der Zellwand darstellen. *Mrsa et al.* (1999) konnten zeigen, daß Mehrfachdeletionen der PIR-Gene einen synergistischen Phänotyp verursachen. Dies impliziert eine ähnliche Funktion der Proteine in der Zellwand. Die stark Zellzyklus abhängige Regulation der PIR-Gene, verbunden mit einer Induzierbarkeit durch den PKC-Weg, waren weitere Hinweise für eine Beteiligung der Proteine am Erhalt Zellwandintegrität. *Kapteyn et al.* (1999) konnten zeigen, daß in Mutanten mit reduziertem β -1,6 Glukan die in das Medium abgegebenen GPI-Proteine scheinbar quantitativ durch PIR-Proteine ersetzt werden. Dies führte zu der Annahme, daß es sich dabei um einen kompensatorischen Mechanismus handelt, der auch umgekehrt möglich sein könnte. Zumindest auf transkriptioneller Ebene konnte diese Theorie nicht bestätigt werden.

4.3.2 Das transkriptionelle Profil der Δ GPI-Mutante

Während durch das Fehlen der PIR-Proteine keine signifikanten transkriptionellen Veränderungen auftraten, führte der Defekt von fünf GPI-Proteinen zu einer differentiellen Expression von 159 offenen Leserahmen (ORF) um mehr als den Faktor 1,5 im Vergleich zum Wildtyp. 60 davon wurden induziert und 99 reprimiert. Dramatische Unterschiede im Vergleich zum Wildtyp waren nicht festzustellen, bei lediglich 34 Genen lag die transkriptionelle Änderung über dem Faktor 2.

Eine schwere Schädigung der strukturellen Integrität scheint in der Δ GPI-Mutante nicht vorzuliegen, da eine allgemeine Aktivierung des Zellwand-Integritätswegs oder eine Induktion Streß-abhängig regulierter Gene nicht festgestellt werden konnte. Bis auf wenige Ausnahmen blieb die Expression bekannter Zielgene verschiedener Signaltransduktionswege in der Δ GPI-Mutante unverändert. Dazu gehörten auch die Gene der PIR-Proteine, für die eine Regulation durch den PKC-Weg bereits gezeigt werden konnte (Jung und Levin., 1999). Eine gesteigerte Expression war erwartet worden, da in biochemischen Untersuchungen bereits Hinweise für eine mögliche Kompensation fehlender GPI-Proteine durch die PIR-Proteine erhalten wurden (Kapteyn *et al.*, 1999; M. Ecker, 2000). Die in NaOH-Extrakten [³⁵S]-markierter Zellwände festgestellte quantitative Zunahme der PIR-Proteinmenge ist damit nicht auf einen Anstieg der Expression zurückzuführen. Möglicherweise ist eine effizientere Verankerung in der Zellwand für die Zunahme verantwortlich. Zumindest für Pir2p und Pir4p konnte gezeigt werden, daß neben der kovalenten Bindung ein Teil der Proteine über Disulfidbrücken in der Zellwand gebunden wird (Cappellaro *et al.*, 1998; Moukadiri und Zueco, 2001) Darüberhinaus werden die Proteine auch ins Kulturmedium sezerniert (Russo *et al.*, 1992; Moukadiri und Zueco, 2001). Kapteyn *et al.* (2001) zeigten, daß die Abgabe von Pir2p ins Medium pH-abhängig reguliert werden kann. Während bei neutralem äußeren pH der Großteil des Proteins im Medium zu finden ist, wird in saurem Milieu Pir2p hauptsächlich kovalent in der Zellwand gebunden und nur wenig sezerniert. Auf welche Weise diese Lokalisation reguliert wird, konnte bislang nicht geklärt werden. Da aber der HOG-Weg daran beteiligt zu sein scheint, ist es nicht auszuschließen, daß es sich um einen generellen Mechanismus handelt, der nicht nur durch pH-Änderung, sondern auch durch Zellwandschäden ausgelöst werden kann.

4.3.3 Differentiell exprimierte Gene bekannter bzw. potentieller Zellwandproteine in der Δ GPI-Mutante

Für viele der in der Δ GPI-Mutante differentiell exprimierten Gene war ein Bezug zur Zellwand bzw. deren Biogenese nicht bekannt. Daher wurden unter der Berücksichtigung verschiedenener Kriterien 64 Gene ausgewählt, deren Genprodukte direkt an der Kompensation eines Zellwanddefekts beteiligt sein könnten. Neben möglicher Zellwandlokalisation wurden dabei vor allem Daten aus anderen mit Zellwandmutanten durchgeführten DNA-Filter Analysen einbezogen.

4.3.3.1 Differentielle Regulation bekannter offener Leserahmen

Insgesamt konnten sieben differentiell regulierte Gene identifiziert werden, die für bekannte oder postulierte Zellwandproteine kodierten.

Darunter war *CRH2* (*congo red hypersensitiv*) das einzige reprimierte Gen. Zusammen mit zwei weiteren homologen und vermutlich funktionsgleichen Proteinen, Crh1p und Crr1p (*CRH related*), gehört Crh2p zu einer Familie GPI-verankerter, mutmaßlicher Endo β -1,3 Glukanasen (Hamada *et al.*, 1998; Rodríguez-Peña *et al.*, 2000). Mit Hilfe von GFP-Fusionen konnte für Crh1p und Crh2p eine Kolo-kalisation im Chitin-reichen Bereich zwischen Mutter- und Tochterzelle gezeigt werden. Ein Unterschied zwischen *CRH1* und *CRH2* findet sich in der Expression. Während *CRH1* einer starken Zellzyklus-abhängigen Regulation unterliegt, verändert sich die Expression, des in der Δ GPI-Mutante reprimierten *CRH2* nicht. Ferner ist auffallend, daß *CRH1* in verschiedenen Zellwandmutanten, wie z.B. *fks1*, *gas1* oder *kre6*, induziert wurde, während die Expression in der Δ GPI-Mutante nicht verändert war (A. Lagorce, persönliche Mitteilung; diese Arbeit). Die Repression von *CRH2* ist besonders interessant im Zusammenhang mit zwei positiv regulierten löslichen Zellwandproteinen. Nur schwach induziert ist BGL2, daß für die einzige Endo- β -1,3-Glukanase kodiert, für welche neben einer Endo-Glukanaseaktivität auch Transglykosidaseaktivität nachgewiesen wurde (Mrsa *et al.*, 1993; Goldman *et al.*, 1995). Das in der Δ GPI-Mutante am stärksten induzierte Gen war *SCW10*, welches für eine Bgl2p-homologe, potentielle β -1,3 Glukanase kodiert. Aufgrund dieser unterschiedlichen Regulation könnten Bgl2p und Scw10p eine zu Crh2p antagonistische Funktion in der Zellwand besitzen. Ähnlich wie Crh2p mit Crh1p, besitzt auch Scw10p mit Scw4p ein vermutlich funktionsgleiches Homologes, wobei die Identität zwischen beiden Proteinen 63%

beträgt (Volckaert *et al.*, 1997). Zwischen *SCW4* und *SCW10* zeigt sich eine unterschiedliche Regulation im Zellzyklus. Während *SCW4* konstitutiv exprimiert wird, ist die Transkription von *SCW10* stark Zellzyklus-abhängig und erreicht ein Maximum in der frühen G1-Phase (Spellman *et al.*, 1998). Desweiteren wurde *SCW10* nicht nur in der Δ GPI-Mutante, sondern auch in anderen Mutanten der Zellwandbiogenese induziert, wohingegen die Expression von *SCW4* jeweils unverändert blieb (A. Lagorce, persönliche Mitteilung; diese Arbeit). Vermutlich haben Scw4p und Scw10p eine gemeinsame oder überlappende Funktion, die nicht nur im Zellzyklus, sondern auch abhängig von Zellwandschäden differentiell reguliert wird.

Zwei weitere induzierte ORFs, *SEDI* und *PSTI*, kodieren für Proteine mit GPI-Anker, über deren Funktion wenig bekannt ist. Sed1p ist ein abundantes Zellwandprotein stationärer Hefezellen und zu dem in der Δ GPI-Mutante fehlenden Ccw12p homolog (Hardwick *et al.*, 1992; Shimoï *et al.*, 1998). Verschiedenen Hinweisen zufolge, hat Sed1p eine Zellwand-stabilisierende Funktion. So ist beispielsweise in einer *sed1*-Mutante die Resistenz stationärer Zellen gegenüber Zymolyase deutlich verringert (Shimoï *et al.*, 1998). Ferner konnte gezeigt werden, daß die Expression von *SEDI* nicht nur während der stationären Wachstumsphase, sondern auch durch verschiedene äußere Streßfaktoren induziert wird. Die Regulation erfolgt dabei sowohl Msn2p/Msn4p abhängig über ein vorhandenes STRE-Element als auch über den PKC-Weg (Causton *et al.*, 2001, Jung und Levin, 1999). Außerdem erreicht *SEDI*, im Unterschied zu vielen anderen Zellwandgenen, sein Expressionsmaximum bereits in der M-Phase des Zellzyklus (Caro *et al.*, 1998). Von Horie und Isono (2001) postulierten eine wichtige Funktion des Proteins im Zusammenhang mit der Zellwandbiosynthese. Sie konnten zeigen, daß eine gleichzeitige Deletion von *SEDI* und *MNN9* oder *MNN10* für die Zelle letal ist. Mnn9p und Mnn10p sind beides Untereinheiten der im *cis*-Golgi lokalisierten α -1,6-Mannosyl Transferase und damit an der Verlängerung die Oligosaccharidkette von Zellwandproteinen und anderen sekretorischen Proteinen beteiligt (Dean und Poster, 1996; Jungmann und Munro, 1998; Jungmann *et al.*, 1999). Da eine *sed1mnn9*-Doppelmutanten in der M-Phase stirbt, geht man davon aus, daß Sed1p kooperativ mit anderen Mnn9p-modifizierten Interaktionspartnern an der Zellwandbiogenese beteiligt ist (Horie und Isono, 2001).

Für *PSTI* konnte eine Induktion durch Rlm1p, einen Transkriptionsfaktor des Zellwand-Integritätswegs gezeigt werden. Obwohl das Protein nicht direkt in der Zellwand verankert nachgewiesen werden konnte (Hamada *et al.*, 1998), geht man dennoch davon

aus, daß es sich um einen integralen Zellwandbestandteil handelt, da es von protoplastierten Zellen ins Kulturmedium sezerniert wird (Pardo *et al.*, 1999).

TOS1 kodiert für ein relativ schlecht charakterisiertes Protein, das aber zu verschiedenen bekannten Zellwandproteinen Homologien aufweist. Das 45kDa große Tos1p besitzt keine Signalsequenz für eine GPI-Anker Modifizierung, obwohl es zu den GPI-Proteinen Aga1p und Tir2p jeweils 24% identisch bzw. 47% homolog ist (Baur *et al.*, 1995). Da Tos1p ferner zu Scw3p Homologie besitzt, könnte es sich auch um ein lösliches Zellwandprotein handeln.

Mit *SRL1* wurde ein Gen in der Δ GPI-Mutante induziert, für das eine STE7-, bzw. STE12/TEC1-abhängige Expression gezeigt wurde (Madhani *et al.*, 1999). Damit scheint Srl1p während des pseudohyphalen Wachstums eine Rolle zu spielen, wobei unklar ist, ob das Protein einen integralen Zellwandbestandteil darstellt.

4.3.3.2 Differentielle Regulation unbekannter offener Leserahmen

Fünf unbekannte ORFs, deren Genprodukte aufgrund eines N-terminalen Signalpeptids Zellwandbestandteile darstellen könnten, wurden in der Δ GPI-Mutante differentiell exprimiert.

Zwei ORFs, YOR389w und YLR414c waren positiv reguliert und kodieren aufgrund ihres Hydropathieprofils für potentielle Transmembranproteine mit zwei bzw. drei potentiellen Membranspannen. Während YLR414c nur sehr schwach induziert wurde, stellte YOR389w mit einem Expressionsfaktor von +3,38 eines der am stärksten induzierten Gene in der Δ GPI-Mutante dar. Ferner konnte bereits eine ähnliche Induktion von YOR389w in einer *gas1*-Mutante gezeigt werden (A. Lagorce, persönliche Mitteilung). Eine Mutation in *GAS1* hat zu Folge, daß die Verankerung von β -1,3 Glukan in der Zellwand gestört ist und dadurch die kovalente Bindung der Mannoproteine in der Zellwand quantitativ verändert wird (Ram *et al.*, 1998; Kapteyn *et al.*, 1997).

Von drei reprimierten, unbekanntem ORFs, deren Genprodukte ein Signalpeptid besitzen, war YDR134c von besonderem Interesse, da dieser möglicherweise für ein GPI-verankertes Protein kodiert. Im Rahmen eines *Screens* nach potentiellen GPI-Proteinen konnte eine α -Galaktosidase-Fusion der 40 C-terminalen Aminosäuren des Proteins mit Glukanase aus der Zellwand isoliert werden (Hamada *et al.*, 1998). YDR134c wurde jedoch als Pseudo-Gen klassifiziert, da es ein internes STOP-Codon

nach ca. 200bp besitzt. Es ist daher wahrscheinlich, daß die im DNA-*Array* bestimmte Transkriptmenge nicht vollständig translatiert wird und das Protein demnach nicht stabil ist. Der theoretische offene Leserahmen wäre 411bp groß und das Genprodukt zu 91% identisch mit Ccw12p.

Über die ebenfalls negativ regulierten YLR413w und YLR282c konnten bislang kaum zusätzliche Informationen erhalten werden. Während YLR282c als potentieller ORF klassifiziert ist, scheint YLR413w für ein Transmembranprotein mit drei Membranspannen zu kodieren.

Inwieweit die erwähnten Gene bzw. deren Produkte direkt an der Kompensation eines Zellwanddefekts in der Δ GPI-Mutante teilhaben, wird erst durch weitere Untersuchungen mit entsprechenden Mutanten zu klären sein. Dennoch konnte gezeigt werden, daß eine Vielzahl von Genen differentiell reguliert werden, die unter anderem auch an der Zellwandbiogenese beteiligt sind. Bereits das Fehlen von fünf GPI-verankerten Proteinen wird demzufolge unabhängig von bekannten Signaltransduktionswegen kompensiert, wobei potentielle Transglykosidasen, insbesondere Scw10p, eine wichtige Rolle zu spielen scheinen. Dagegen zeigt beispielsweise eine *KRE6*-Deletion, die sich über eine verringerte β -1,6 Glukanmenge indirekt auf alle GPI-Proteine auswirkt, eine starke Induktion der meisten bekannten Zielgene des PKC-Wegs (A. Lagorce, persönliche Mitteilung). Dadurch werden auch viele Gene bekannter Zellwandproteine positiv reguliert, wobei PIR-Proteine und GPI-Proteine gleichermaßen betroffen sind. Der quantitative Anstieg der PIR-Proteine in der Zellwand einer *kre6*-Mutante könnte demnach darauf zurückzuführen sein, daß ebenfalls induzierte GPI-Proteine aufgrund des reduzierten β -1,6 Glukans nicht mehr verankert werden können und ins Kulturmedium sezerniert werden. Ein Vergleich der unterschiedlichen Kompensation in der Δ GPI-Mutante und einer *kre6*-Mutante läßt auch den Schluß zu, daß die durch *in silicio* Studien aufgestellte Schätzung von wenigstens 38 GPI-verankerten Zellwandproteinen in *S. cerevisiae* sehr realistisch ist und damit die meisten GPI-Proteine der Zellwand nicht charakterisiert sind (Caro *et al.*, 1997).

In der Vergangenheit wurden zu Aufklärung der Zellwandbiogenese in *S. cerevisiae* vermehrt DNA-*Arrays* eingesetzt, um transkriptionelle Veränderungen auf äußere Streßbedingungen oder in Mutanten die in Zellwandbiosynthesewegen defekt sind zu untersuchen. Auf diese Weise konnte die Regulation verschiedener Signaltransduktionswege bzw. deren Zielgene zu einem großen Teil aufgeklärt werden.

Häufig können aufgrund der Vielzahl differentiell exprimierter Gene vor allem bei gravierenden Zellwandschäden, vergleichsweise wenig Erkenntnisse über einzelne Zellwandproteine gewonnen werden. In der vorliegenden Arbeit liegt das Interesse insbesondere in der Identifizierung von Genen die direkt am Zellwandaufbau beteiligt sind. Dafür könnte die Genom-weite Expressionsanalyse mit Mutanten deren Genprodukte Zellwand lokalisiert sind von Vorteil sein, da nur wenige Gene differentiell exprimiert sind und daher auch geringfügige Veränderungen registriert werden.

5 Zusammenfassung

Für die Zellwandproteine Cts1p und Pir2p gelang es einen Zusammenhang zwischen reduzierter O-Glykosylierung in *pmt*-Mutanten und der Stabilität der Proteine herzustellen. Dabei konnte für Cts1p gezeigt werden, daß die verringerte Menge des Proteins im Medium einer *pmt1pmt2*-Mutante nicht auf einen Sekretionsdefekt, sondern offensichtlich auf eine beschleunigte ER-assoziierte Degradation zurückzuführen ist. Diese Theorie konnte auch auf transkriptioneller Ebene durch eine nachgewiesene erhöhte Expression des molekularen Chaperons *KAR2*, einem Indikator des aktivierten UPR (*unfolded protein response*)-Weg, gestützt werden. Ferner wurde ein Expressionsanstieg von *PRC1*, welches für die vakuoläre Carboxypeptidase Y kodiert, in *pmt*-Mehrfachmutanten festgestellt.

Für Pir2p wurde eine extrazelluläre partielle Spaltung in einer *pmt1pmt2*-Mutante gezeigt, die auf eine dramatische Unterglykosylierung des Proteins zurückzuführen ist. Sowohl der Glykosylierungsdefekt als auch die damit einhergehende Degradation konnte in einer *sec18pmt1pmt2*-Mutante durch eine Retention von Pir2p im Endoplasmatischen Retikulum bei restriktiver Temperatur fast vollständig aufgehoben werden. Nach einer Rückführung der Mutante auf eine permissive Temperatur wies das Protein ein mit dem Wildtyp vergleichbares apparentes Molekulargewicht auf.

Die in *pmt1*- bzw. *pmt4*-Mutanten ebenfalls reduzierte Menge des durch α -Faktor induzierten Proteins Aga2p konnte auf eine verminderte Expression des korrespondierenden Gens in der entsprechenden Mutante zurückgeführt werden. Dabei wurde gezeigt, daß die Reaktion auf α -Faktor in einer *pmt4*-Mutante generell gestört bzw. verlangsamt abläuft, während in einer *pmt1*-Mutante offensichtlich nur die Expression von *AGA2* reduziert ist.

In einem *Screen* nach synthetisch osmolabilen Mutanten sollten Gene identifiziert werden, die zusammen mit *SCW4* und *SCW10* für eine stabile Zellwand essentiell sind. Im Rahmen dieser Arbeit konnten vier OSS (*osmosensitive scw*)-Mutanten komplementiert werden. In der OSS20 Mutante wurde der osmolabile Phänotyp durch *FPS1* aufgehoben, einem Gen, welches für ein Glycerinkanalprotein kodiert. Mit *ROM2*, das für einen GEF für Rho1p kodiert und damit sowohl an der β -1,3 Glukansynthese als auch am PKC-Weg beteiligt ist, konnte die Mutante OSS41

komplementiert werden. Der Zellwanddefekt der OSS55-Mutante wurde teilweise durch *JSNI* geheilt, für das ein Zusammenhang mit mRNA-Stabilität postuliert wird. Außerdem konnte durch *HOG1*, das für die MAP-Kinase des gleichnamigen Signaltransduktionswegs kodiert, der Zellwanddefekt vollständig aufgehoben werden. In OSS78 wurde der osmolabile Phänotyp durch *Mat α 2* vollständig und teilweise durch *WSC1*, das für eines der Sensorproteine des PKC-Wegs kodiert, komplementiert. Für die Mutanten OSS55 und OSS78 muß von einer Suppression des Zellwanddefekts durch eine zusätzliche Kopie der identifizierten Gene ausgegangen werden, da Mutationen in den jeweiligen Genen nicht nachgewiesen werden konnten.

In zwei Zellwandmutanten, in welchen die Gene der vier PIR-Proteine (Δ PIR) bzw. von fünf GPI-Proteinen (Δ GPI) deletiert waren, wurden Genom-weite Expressionsanalysen mittels *DNA-Arrays* durchgeführt. Anhand der Expressionsprofile konnte festgestellt werden, welche transkriptionellen Veränderungen im Vergleich zum WT für den Erhalt der Zellwandintegrität dieser Mutanten verantwortlich sind.

Da sich das Transkriptom der Δ PIR-Mutante vom WT nicht unterschied, läßt sich schließen, daß der Zellwanddefekt der Mutante nicht wie angenommen durch positive Genregulation anderer Zellwandproteine kompensiert wird.

In der Δ GPI-Mutante dagegen konnte gezeigt werden, daß 159 Gene im Vergleich zum WT differentiell exprimiert sind. Generell läßt sich aus dem Genspektrum schließen, daß die transkriptionellen Veränderungen nicht auf eine Aktivierung bekannter Signaltransduktionswege zurückzuführen sind. Deren Zielgene wurden größtenteils nicht differentiell reguliert. Unter anderem waren 12 Gene bekannter oder potentieller sekretorischer Proteine betroffen. Darunter befand sich auch *SCW10*, welches für eine putative Transglykosidase kodiert und am stärksten induziert wurde.

6 Literaturverzeichnis

- Achstetter T, Franzusoff A, Field C, Schekman R.** SEC7 encodes an unusual, high molecular weight protein required for membrane traffic from the yeast Golgi apparatus. *J Biol Chem.* 1988 Aug 25;263(24):11711-7
- Akama TO, Nakagawa H, Sugihara K, Narisawa S, Ohyama C, Nishimura SI, O'Brien DA, Moremen KW, Millán JL, Fukada MN.** Germ cell survival through carbohydrate-mediated interaction with sertoli cells. *Science.* 2002 Jan 4; 295: 124-7
- Alonso-Monge R, Navarro-Garcia F, Molero G, Diez-Orejas R, Gustin M, Pla J, Sanchez M, Nombela C.** Role of the mitogen-activated protein kinase Hog1p in morphogenesis and virulence of *Candida albicans*. *J Bacteriol.* 1999 May;181(10):3058-68
- Baur S, Becker J, Li Z, Niegemann E, Wehner E, Wolter R, Brendel M.** Sequence analysis of a 5.6 kb fragment of chromosome II from *Saccharomyces cerevisiae* reveals two new open reading frames next to CDC28. *Yeast.* 1995 Apr 30;11(5):455-8
- Bause E, Lehle L.** Enzymatic N-glycosylation and O-glycosylation of synthetic peptide acceptors by dolichol-linked sugar derivatives in yeast. *Eur J Biochem.* 1979 Nov;101(2):531-40
- Bickle M, Delley PA, Schmidt A, Hall MN.** Cell wall integrity modulates RHO1 activity via the exchange factor ROM2. *EMBO J.* 1998 Apr 15;17(8):2235-45
- Bony M, Thines-Sempoux D, Barre P, Blondin B.** Localization and cell surface anchoring of the *Saccharomyces cerevisiae* flocculation protein Flo1p. *J Bacteriol.* 1997 Aug;179(15):4929-36
- Bourdineaud JP, van der Vaart JM, Donzeau M, de Sampaio G, Verrips CT, Lauquin GJ.** Pmt1 mannosyl transferase is involved in cell wall incorporation of several proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol.* 1998 Jan;27(1):85-98
- Brewster JL, Gustin MC.** Positioning of cell growth and division after osmotic stress requires a MAP kinase pathway. *Yeast.* 1994 Apr;10(4):425-39
- Brodsky JL, Goekeler J, Schekman R.** BiP and Sec63p are required for both co- and posttranslational protein translocation into the yeast endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 Oct 10;92(21):9643-6
- Brodsky JL, Werner ED, Dubas ME, Goekeler JL, Kruse KB, McCracken AA.** The requirement for molecular chaperones during endoplasmic reticulum-associated protein degradation demonstrates that protein export and import are mechanistically distinct. *J Biol Chem.* 1999 Feb 5;274(6):3453-60
- Bucking-Throm E, Duntze W, Hartwell LH, Manney TR.** Reversible arrest of haploid yeast cells in the initiation of DNA synthesis by a diffusible sex factor. *Exp Cell Res.* 1973 Jan;76(1):99-110

- Bulawa CE, Slater M, Cabib E, Au-Young J, Sburlati A, Adair WL Jr, Robbins PW.** The *S. cerevisiae* structural gene for chitin synthase is not required for chitin synthesis in vivo. *Cell*. 1986 Jul 18;46(2):213-25
- Bulawa CE.** CSD2, CSD3, and CSD4, genes required for chitin synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*: the CSD2 gene product is related to chitin synthases and to developmentally regulated proteins in *Rhizobium* species and *Xenopus laevis*. *Mol Cell Biol*. 1992 Apr;12(4):1764-76
- Bulawa CE.** Genetics and molecular biology of chitin synthesis in fungi. *Annu Rev Microbiol*. 1993;47:505-34
- Cabib E, Roberts R, Bowers B.** Synthesis of the yeast cell wall and its regulation. *Annu Rev Biochem*. 1982;51:763-93
- Cabib E, Silverman SJ, Shaw JA.** Chitinase and chitin synthase 1: counterbalancing activities in cell separation of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Gen Microbiol*. 1992 Jan;138 (Pt 1):97-102
- Cappellaro C, Hauser K, Mrsa V, Watzele M, Watzele G, Gruber C, Tanner W.** *Saccharomyces cerevisiae* α - and α -agglutinin: characterization of their molecular interaction. *EMBO J*. 1991 Dec;10(13):4081-8
- Cappellaro C, Mrsa V, Tanner W.** New potential cell wall glucanases of *Saccharomyces cerevisiae* and their involvement in mating. *J Bacteriol*. 1998 Oct;180(19):5030-7
- Caro LH, Smits GJ, van Egmond P, Chapman JW, Klis FM.** Transcription of multiple cell wall protein-encoding genes in *Saccharomyces cerevisiae* is differentially regulated during the cell cycle. *FEMS Microbiol Lett*. 1998 Apr 15;161(2):345-9
- Caro LH, Tettelin H, Vossen JH, Ram AF, van den Ende H, Klis FM.** In silico identification of glycosyl-phosphatidylinositol-anchored plasma-membrane and cell wall proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 1997 Dec;13(15):1477-89
- Casanova M, Lopez-Ribot JL, Martinez JP, Sentandreu R.** Characterization of cell wall proteins from yeast and mycelial cells of *Candida albicans* by labelling with biotin: comparison with other techniques. *Infect Immun*. 1992 Nov;60(11):4898-906
- Causton HC, Ren B, Koh SS, Harbison CT, Kanin E, Jennings EG, Lee TI, True HL, Lander ES, Young RA.** Remodeling of yeast genome expression in response to environmental changes. *Mol Biol Cell*. 2001 Feb;12(2):323-37
- Chen MH, Shen ZM, Bobin S, Kahn PC, Lipke PN.** Structure of *Saccharomyces cerevisiae* α -agglutinin. Evidence for a yeast cell wall protein with multiple immunoglobulin-like domains with atypical disulfides. *J Biol Chem*. 1995 Nov 3;270(44):26168-77
- Cid VJ, Duran A, del Rey F, Snyder MP, Nombela C, Sanchez M.** Molecular basis of cell integrity and morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev*. 1995 Sep;59(3):345-86

- Cid VJ, Duran A, del Rey F, Snyder MP, Nombela C, Sanchez M.** Molecular basis of cell integrity and morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev.* 1995 Sep;59(3):345-86
- Cobb MH, Goldsmith EJ.** How MAP kinases are regulated. *J Biol Chem.* 1995 Jun 23;270(25):14843-6
- Conzelmann A, Riezman H, Desponds C, Bron C.** A major 125-kd membrane glycoprotein of *Saccharomyces cerevisiae* is attached to the lipid bilayer through an inositol-containing phospholipid. *EMBO J.* 1988 Jul;7(7):2233-40
- Cox JS, Shamu CE, Walter P.** Transcriptional induction of genes encoding endoplasmic reticulum resident proteins requires a transmembrane protein kinase. *Cell.* 1993 Jun 18;73(6):1197-206.
- Cox JS, Walter P.** A novel mechanism for regulating activity of a transcription factor that controls the unfolded protein response. *Cell.* 1996 Nov 1;87(3):391-404.
- Dallies N, Francois J, Paquet V.** A new method for quantitative determination of polysaccharides in the yeast cell wall. Application to the cell wall defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* 1998 Oct;14(14):1297-306
- de Nobel H, Ruiz C, Martin H, Morris W, Brul S, Molina M, Klis FM.** Cell wall perturbation in yeast results in dual phosphorylation of the Slt2/Mpk1 MAP kinase and in an Slt2-mediated increase in FKS2-lacZ expression, glucanase resistance and thermotolerance. *Microbiology.* 2000 Sep;146 (Pt 9):2121-32
- de Nobel JG, Klis FM, Priem J, Munnik T, van den Ende H.** The glucanase-soluble mannoproteins limit cell wall porosity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* 1990 Nov-Dec;6(6):491-9
- De Sampaio G, Bourdineaud JP, Lauquin GJ.** A constitutive role for GPI anchors in *Saccharomyces cerevisiae*: cell wall targeting. *Mol Microbiol.* 1999 Oct;34(2):247-56
- Dean N, Poster JB.** Molecular and phenotypic analysis of the *S. cerevisiae* MNN10 gene identifies a family of related glycosyltransferases. *Glycobiology.* 1996 Jan;6(1):73-81
- Delley PA, Hall MN.** Cell wall stress depolarizes cell growth via hyperactivation of RHO1. *J Cell Biol.* 1999 Oct 4;147(1):163-74
- Drgonova J, Drgon T, Tanaka K, Kollar R, Chen GC, Ford RA, Chan CS, Takai Y, Cabib E.** Rho1p, a yeast protein at the interface between cell polarization and morphogenesis. *Science.* 1996 Apr 12;272(5259):277-9
- Eamus, D.G. und Jennings, D.H.** (1986) Water, turgor and osmotic potential of fungi. In: Ayres, P.G. und Body, L. (eds.), *Water, fungi and plants*. Cambridge University Press, Cambridge, England, 27-47
- Ecker M.** Die Zellwand der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*: Analyse von Proteinkomponenten und deren Verankerung. 2000. Dissertation. Universität Regensburg

- Evangelista M, Blundell K, Longtine MS, Chow CJ, Adames N, Pringle JR, Peter M, Boone C.** Bni1p, a yeast formin linking cdc42p and the actin cytoskeleton during polarized morphogenesis. *Science*. 1997 Apr 4;276(5309):118-22
- Ezaki B, Gardner RC, Ezaki Y, Kondo H, Matsumoto H.** Protective roles of two aluminum (Al)-induced genes, HSP150 and SED1 of *Saccharomyces cerevisiae*, in Al and oxidativestresses. *FEMS Microbiol Lett*. 1998 Feb 1;159(1):99-105
- Ferrigno P, Posas F, Koepp D, Saito H, Silver PA.** Regulated nucleo/cytoplasmic exchange of HOG1 MAPK requires the importin beta homologs NMD5 and XPO1. *EMBO J*. 1998 Oct 1;17(19):5606-14
- Fleet, G.H.** (1991) Cell walls. In: Rose, A.H. and Harrison, J.S. (eds.), *The Yeasts*, 2. Auflage, Academic Press, New York, Vol. 4., 199-277
- Friedlander R, Jarosch E, Urban J, Volkwein C, Sommer T.** A regulatory link between ER-associated protein degradation and the unfolded-protein response. *Nat Cell Biol*. 2000 Jul;2(7):379-84
- Garcia-Rodriguez LJ, Duran A, Roncero C.** Calcofluor antifungal action depends on chitin and a functional high-osmolarity glycerol response (HOG) pathway: evidence for a physiological role of the *Saccharomyces cerevisiae* HOG pathway under noninducing conditions. *J Bacteriol*. 2000 May;182(9):2428-37
- Garrett-Engle P, Moilanen B, Cyert MS.** Calcineurin, the Ca²⁺/calmodulin-dependent protein phosphatase, is essential in yeast mutants with cell integrity defects and in mutants that lack a functional vacuolar H(+)-ATPase. *Mol Cell Biol*. 1995 Aug;15(8):4103-14
- Gaynor EC, Emr SD.** COPI-independent anterograde transport: cargo-selective ER to Golgi protein transport in yeast COPI mutants. *J Cell Biol*. 1997 Feb 24;136(4):789-802
- Gentsch M, Tanner W.** The PMT gene family: protein O-glycosylation in *Saccharomyces cerevisiae* is vital. *EMBO J*. 1996 Nov 1;15(21):5752-9
- Gentsch M.** Die Bedeutung der Protein O-Glykosylierung für die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*. 1996. Dissertation. Universität Regensburg
- Gentsch M, Tanner W.** Protein-O-glycosylation in yeast: protein-specific mannosyltransferases. *Glycobiology*. 1997 Jun;7(4):481-6
- Gietz D, St Jean A, Woods RA, Schiestl RH.** Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acids Res*. 1992 Mar 25;20(6):1425
- Girrbach V, Zeller T, Priesmeier M, Strahl-Bolsinger S.** Structure-function analysis of the dolichyl phosphate-mannose: protein O-mannosyltransferase ScPmt1p. *J Biol Chem*. 2000 Jun 23;275(25):19288-96
- Goffeau A, Barrell BG, Bussey H, Davis RW, Dujon B, Feldmann H, Galibert F, Hoheisel JD, Jacq C, Johnston M, Louis EJ, Mewes HW, Murakami Y, Philippsen P, Tettelin H, Oliver SG.** Life with 6000 genes. *Science*. 1996 Oct 25;274(5287):546, 563-7

- Goldman RC, Sullivan PA, Zakula D, Capobianco JO.** Kinetics of beta-1,3 glucan interaction at the donor and acceptor sites of the fungal glucosyltransferase encoded by the BGL2 gene. *Eur J Biochem.* 1995 Jan 15;227(1-2):372-8
- Graham TR, Emr SD.** Compartmental organization of Golgi-specific protein modification and vacuolar protein sorting events defined in a yeast sec18 (NSF) mutant. *J Cell Biol.* 1991 Jul;114(2):207-18
- Gustin MC, Albertyn J, Alexander M, Davenport K.** MAP kinase pathways in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1998 Dec;62(4):1264-300
- Hamada K, Fukuchi S, Arisawa M, Baba M, Kitada K.** Screening for glycosylphosphatidylinositol (GPI)-dependent cell wall proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet.* 1998 Apr;258(1-2):53-9
- Hamada K, Terashima H, Arisawa M, Yabuki N, Kitada K.** Amino acid residues in the omega-minus region participate in cellular localization of yeast glycosylphosphatidylinositol-attached proteins. *J Bacteriol.* 1999 Jul;181(13):3886-9
- Haselbeck A, Tanner W.** O-glycosylation in *Saccharomyces cerevisiae* is initiated at the endoplasmic reticulum. *FEBS Lett.* 1983 Jul 25;158(2):335-8
- Hauser K, Tanner W.** Purification of the inducible alpha-agglutinin of *S. cerevisiae* and molecular cloning of the gene. *FEBS Lett.* 1989 Sep 25;255(2):290-4
- Hauser NC, Vingron M, Scheideler M, Krems B, Hellmuth K, Entian KD, Hoheisel JD.** Transcriptional profiling on all open reading frames of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* 1998 Sep 30;14(13):1209-21
- Heinisch JJ, Lorberg A, Schmitz HP, Jacoby JJ.** The protein kinase C-mediated MAP kinase pathway involved in the maintenance of cellular integrity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol.* 1999 May;32(4):671-80
- Helenius A.** How N-linked oligosaccharides affect glycoprotein folding in the endoplasmic reticulum. *Mol Biol Cell.* 1994 Mar;5(3):253-65
- Herscovics A, Orlean P.** Glycoprotein biosynthesis in yeast. *FASEB J.* 1993 Apr 1;7(6):540-50
- Hill J, Donald KA, Griffiths DE, Donald G.** DMSO-enhanced whole cell yeast transformation. *Nucleic Acids Res.* 1991 Oct 25;19(20):5791
- Hines V, Zhang W, Ramakrishna N, Styles J, Mehta P, Kim KS, Innis M, Miller DL.** The expression and processing of human beta-amyloid peptide precursors in *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for a novel endopeptidase in the yeast secretory system. *Cell Mol Biol Res.* 1994;40(4):273-84
- Hirschberg CB, Snider MD.** Topography of glycosylation in the rough endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. *Annu Rev Biochem.* 1987;56:63-87
- Holkeri H, Makarow M.** Different degradation pathways for heterologous glycoproteins in yeast. *FEBS Lett.* 1998 Jun 12;429(2):162-6

- Horie T, Isono K.** Cooperative functions of the mannoprotein-encoding genes in the biogenesis and maintenance of the cell wall in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 2001 Dec;18(16):1493-503.
- Huffaker TC, Robbins PW.** Temperature-sensitive yeast mutants deficient in asparagine-linked glycosylation. *J Biol Chem*. 1982 Mar 25;257(6):3203-10
- Hunter T, Plowman GD.** The protein kinases of budding yeast: six score and more. *Trends Biochem Sci*. 1997 Jan;22(1):18-22
- Hutchins K, Bussey H.** Cell wall receptor for yeast killer toxin: involvement of (1 leads to 6)-beta-D-glucan. *J Bacteriol*. 1983 Apr;154(1):161-9
- Igual JC, Johnson AL, Johnston LH.** Coordinated regulation of gene expression by the cell cycle transcription factor Swi4 and the protein kinase C MAP kinase pathway for yeast cell integrity. *EMBO J*. 1996 Sep 16;15(18):5001-13
- Inoue SB, Takewaki N, Takasuka T, Mio T, Adachi M, Fujii Y, Miyamoto C, Arisawa M, Furuichi Y, Watanabe T.** Characterization and gene cloning of 1,3-beta-D-glucan synthase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem*. 1995 Aug 1;231(3):845-54
- Jacoby JJ, Nilius SM, Heinisch JJ.** A screen for upstream components of the yeast protein kinase C signal transduction pathway identifies the product of the SLG1 gene. *Mol Gen Genet*. 1998 Apr;258(1-2):148-55
- Jiang B, Sheraton J, Ram AF, Dijkgraaf GJ, Klis FM, Bussey H.** CWH41 encodes a novel endoplasmic reticulum membrane N-glycoprotein involved in beta 1,6-glucan assembly. *J Bacteriol*. 1996 Feb;178(4):1162-71
- Jung US, Levin DE.** Genome-wide analysis of gene expression regulated by the yeast cell wall integrity signalling pathway. *Mol Microbiol*. 1999 Dec;34(5):1049-5
- Jungmann J, Munro S.** Multi-protein complexes in the cis Golgi of *Saccharomyces cerevisiae* with alpha-1,6-mannosyltransferase activity. *EMBO J*. 1998 Jan 15;17(2):423-34
- Jungmann J, Rayner JC, Munro S.** The *Saccharomyces cerevisiae* protein Mnn10p/Bed1p is a subunit of a Golgi mannosyltransferase complex. *J Biol Chem*. 1999 Mar 5;274(10):6579-85
- Kamada Y, Jung US, Piotrowski J, Levin DE.** The protein kinase C-activated MAP kinase pathway of *Saccharomyces cerevisiae* mediates a novel aspect of the heat shock response. *Genes Dev*. 1995 Jul 1;9(13):1559-71
- Kang HA, Choi ES, Hong WK, Kim JY, Ko SM, Sohn JH, Rhee SK.** Proteolytic stability of recombinant human serum albumin secreted in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2000 May;53(5):575-82
- Kapteyn JC, Ram AF, Groos EM, Kollar R, Montijn RC, Van Den Ende H, Llobell A, Cabib E, Klis FM.** Altered extent of cross-linking of beta1,6-glycosylated manno proteins to chitin in *Saccharomyces cerevisiae* mutants with reduced cell wall beta1,3-glucan content. *J Bacteriol*. 1997 Oct;179(20):6279-84

- Kapteyn JC, ter Riet B, Vink E, Blad S, De Nobel H, Van Den Ende H, Klis FM.** Low external pH induces HOG1-dependent changes in the organization of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Mol Microbiol.* 2001 Jan;39(2):469-79
- Kapteyn JC, Van Egmond P, Sievi E, Van Den Ende H, Makarow M, Klis FM.** The contribution of the O-glycosylated protein Pir2p/Hsp150 to the construction of the yeast cell wall in wild-type cells and beta 1,6-glucan-deficient mutants. *Mol Microbiol.* 1999 Mar;31(6):1835-44
- Kawahara T, Yanagi H, Yura T, Mori K.** Endoplasmic reticulum stress-induced mRNA splicing permits synthesis of transcription factor Hac1p/Ern4p that activates the unfolded protein response. *Mol Biol Cell.* 1997 Oct;8(10):1845-62
- Kelleher DJ, Gilmore R.** The *Saccharomyces cerevisiae* oligosaccharyltransferase is a protein complex composed of Wbp1p, Swp1p, and four additional polypeptides. *J Biol Chem.* 1994 Apr 29;269(17):12908-17
- Ketela T, Green R, Bussey H.** *Saccharomyces cerevisiae* Mid2p is a potential cell wall stress sensor and upstream activator of the PKC1-MPK1 cell integrity pathway. *J Bacteriol.* 1999 Jun;181(11):3330-40
- Kitagaki H, Shimoi H, Itoh K.** Identification and analysis of a static culture-specific cell wall protein, Tir1p/Srp1p in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem.* 1997 Oct 1;249(1):343-9
- Knauer R, Lehle L.** The N-oligosaccharyltransferase complex from yeast. *FEBS Lett.* 1994 May 9;344(1):83-6
- Koch Y, Rademacher KH.** Chemical and enzymatic changes in the cell walls of *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae* by scanning electron microscopy. *Can J Microbiol.* 1980 Aug;26(8):965-70
- Kohno H, Tanaka K, Mino A, Umikawa M, Imamura H, Fujiwara T, Fujita Y, Hotta K, Qadota H, Watanabe T, Ohya Y, Takai Y.** Bni1p implicated in cytoskeletal control is a putative target of Rho1p small GTP binding protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 1996 Nov 15;15(22):6060-8
- Kohno K, Normington K, Sambrook J, Gething MJ, Mori K.** The promoter region of the yeast KAR2 (BiP) gene contains a regulatory domain that responds to the presence of unfolded proteins in the endoplasmic reticulum. *Mol Cell Biol.* 1993 Feb;13(2):877-90
- Kollar R, Reinhold BB, Petrakova E, Yeh HJ, Ashwell G, Drgonova J, Kapteyn JC, Klis FM, Cabib E.** Architecture of the yeast cell wall. Beta(1-->6)-glucan interconnects mannoprotein, beta(1-->3)-glucan, and chitin. *J Biol Chem.* 1997 Jul 11;272(28):17762-75
- Kuranda MJ, Robbins PW.** Chitinase is required for cell separation during growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* 1991 Oct 15;266(29):19758-67
- Laemmli UK.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970 Aug 15;227(259):680-5

- Leberer E, Thomas DY, Whiteway M.** Pheromone signalling and polarized morphogenesis in yeast. *Curr Opin Genet Dev.* 1997 Feb;7(1):59-66
- Lehle, L und Tanner, W.** Protein glycosylation in yeast. In: Motreuil, J., Schachter, H., Vliegenthart, J.F.G. (eds) *Glycoproteins*, Elsevier Science B.V., Amsterdam, 475-509
- Levin DE, Bowers B, Chen CY, Kamada Y, Watanabe M.** Dissecting the protein kinase C/MAP kinase signalling pathway of *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Mol Biol Res.* 1994;40(3):229-39
- Lipke PN, Ovalle R.** Cell wall architecture in yeast: new structure and new challenges. *J Bacteriol.* 1998 Aug;180(15):3735-40
- Lodder AL, Lee TK, Ballester R.** Characterization of the Wsc1 protein, a putative receptor in the stress response of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* 1999 Aug;152(4):1487-99
- Lu CF, Montijn RC, Brown JL, Klis F, Kurjan J, Bussey H, Lipke PN.** Glycosyl phosphatidylinositol-dependent cross-linking of alpha-agglutinin and beta 1,6-glucan in the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *J Cell Biol.* 1995 Feb;128(3):333-40
- Lupashin VV, Kononova SV, Ratner YeN, Tsiomenko AB, Kulaev IS.** Identification of a novel secreted glycoprotein of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* stimulated by heat shock. *Yeast.* 1992 Mar;8(3):157-69
- Luyten K, Albertyn J, Skibbe WF, Prior BA, Ramos J, Thevelein JM, Hohmann S.** Fps1, a yeast member of the MIP family of channel proteins, is a facilitator for glycerol uptake and efflux and is inactive under osmotic stress. *EMBO J.* 1995 Apr 3;14(7):1360-71
- Madden K, Sheu YJ, Baetz K, Andrews B, Snyder M.** SBF cell cycle regulator as a target of the yeast PKC-MAP kinase pathway. *Science.* 1997 Mar 21;275(5307):1781-4
- Madhani HD, Fink GR.** Combinatorial control required for the specificity of yeast MAPK *Science.* 1997 Feb 28;275(5304):1314-7
- Madhani HD, Galitski T, Lander ES, Fink GR.** Effectors of a developmental mitogen-activated protein kinase cascade revealed by expression signatures of signaling mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Oct 26;96(22):12530-5
- Maeda T, Takekawa M, Saito H.** Activation of yeast PBS2 MAPKK by MAPKKs or by binding of an SH3-containing osmosensor. *Science.* 1995 Jul 28;269(5223):554-8
- Maeda T, Wurgler-Murphy SM, Saito H.** A two-component system that regulates an osmosensing MAP kinase cascade in yeast. *Nature.* 1994 May 19;369(6477):242-5
- Maeden P, Hill K, Wagner J, Slipetz D, Sommer SS, Bussey H.** The yeast KRE5 gene encodes a probable endoplasmic reticulum protein required for (1-6)-beta-D-glucan synthesis and normal cell growth. *Mol Cell Biol.* 1990 Jun;10(6):3013-9

- Manners DJ, Masson AJ, Patterson JC.** The structure of a beta-(1 leads to 3)-D-glucan from yeast cell walls. *Biochem J.* 1973 Sep;135(1):19-30. No abstract available.
- Marshall CJ.** Signal transduction. Hot lips and phosphorylation of protein kinases. *Nature.* 1994 Feb 24;367(6465):686
- Mazur P, Baginsky W.** In vitro activity of 1,3-beta-D-glucan synthase requires the GTP-binding protein Rho1. *J Biol Chem.* 1996 Jun 14;271(24):14604-9.
- Mazur P, Morin N, Baginsky W, el-Sherbeini M, Clemas JA, Nielsen JB, Foor F.** Differential expression and function of two homologous subunits of yeast 1,3-beta-D-glucan synthase. *Mol Cell Biol.* 1995 Oct;15(10):5671-81.
- Mazzoni C, Zarov P, Rambourg A, Mann C.** The SLT2 (MPK1) MAP kinase homolog is involved in polarized cell growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol.* 1993 Dec;123(6 Pt 2):1821-33
- McEver RP, Moore KL, Cummings RD.** Leukocyte trafficking mediated by selectin-carbohydrate interactions. *J Biol Chem.* 1995 May 12;270(19):11025-8
- Montijn RC, van Rinsum J, van Schagen FA, Klis FM.** Glucomannoproteins in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae* contain a novel type of carbohydrate side chain. *J Biol Chem.* 1994 Jul 29;269(30):19338-42
- Montijn RC, Vink E, Muller WH, Verkleij AJ, Van Den Ende H, Henrissat B, Klis FM.** Localization of synthesis of beta1,6-glucan in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol.* 1999 Dec;181(24):7414-20
- Mori K, Ogawa N, Kawahara T, Yanagi H, Yura T.** Palindrome with spacer of one nucleotide is characteristic of the cis-acting unfolded protein response element in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* 1998 Apr 17;273(16):9912-20
- Moskvina E, Schuller C, Maurer CT, Mager WH, Ruis H.** A search in the genome of *Saccharomyces cerevisiae* for genes regulated via stress response elements. *Yeast.* 1998 Aug;14(11):1041-50
- Mouassite M, Camougrand N, Schwob E, Demaison G, Laclau M, Guerin M.** The 'SUN' family: yeast SUN4/SCW3 is involved in cell septation. *Yeast.* 2000 Jul;16(10):905-19
- Moukadiri I, Armero J, Abad A, Sentandreu R, Zueco J.** Identification of a mannoprotein present in the inner layer of the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol.* 1997 Apr;179(7):2154-62
- Moukadiri I, Zueco J.** Evidence for the attachment of Hsp150/Pir2 to the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae* through disulfide bridges. *FEMS Yeast Research.* 2001 241-245
- Mrsa V, Ecker M, Strahl-Bolsinger S, Nimitz M, Lehle L, Tanner W.** Deletion of new covalently linked cell wall glycoproteins alters the electrophoretic mobility of phosphorylated wall components of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol.* 1999 May;181(10):3076-86

- Mrsa V, Klebl F, Tanner W.** Purification and characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* BGL2 gene product, a cell wall endo-beta-1,3-glucanase. *J Bacteriol.* 1993 Apr;175(7):2102-6
- Mrsa V, Seidl T, Gentzsch M, Tanner W.** Specific labelling of cell wall proteins by biotinylation. Identification of four covalently linked O-mannosylated proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* 1997 Sep 30;13(12):1145-54
- Mrsa V, Tanner W.** Role of NaOH-extractable cell wall proteins Ccw5p, Ccw6p, Ccw7p and Ccw8p (members of the Pir protein family) in stability of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Yeast.* 1999 Jul;15(10A):813-20
- Ng DT, Spear ED, Walter P.** The unfolded protein response regulates multiple aspects of secretory and membrane protein biogenesis and endoplasmic reticulum quality control. *J Cell Biol.* 2000 Jul 10;150(1):77-88
- Nonaka H, Tanaka K, Hirano H, Fujiwara T, Kohno H, Umikawa M, Mino A, Takai Y.** A downstream target of RHO1 small GTP-binding protein is PKC1, a homolog of protein kinase C, which leads to activation of the MAP kinase cascade in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 1995 Dec 1;14(23):5931-8
- Olivas W, Parker R.** The Puf3 protein is a transcript-specific regulator of mRNA degradation in yeast. *EMBO J.* 2000 Dec 1;19(23):6602-11
- Ono N, Yabe T, Sudoh M, Nakajima T, Yamada-Okabe T, Arisawa M, Yamada-Okabe H.** The yeast Chs4 protein stimulates the trypsin-sensitive activity of chitin synthase 3 through an apparent protein-protein interaction. *Microbiology.* 2000 Feb;146 (Pt 2):385-91
- Orlean, P.** (1997) Biogenesis of yeast wall and surface components. *Yeast III*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 229-362
- Ozaki K, Tanaka K, Imamura H, Hihara T, Kameyama T, Nonaka H, Hirano H, Matsuura Y, Takai Y.** Rom1p and Rom2p are GDP/GTP exchange proteins (GEPs) for the Rho1p small GTP binding protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 1996 May 1;15(9):2196-207
- Pardo M, Monteoliva L, Pla J, Sanchez M, Gil C, Nombela C.** Two-dimensional analysis of proteins secreted by *Saccharomyces cerevisiae* regenerating protoplasts: a novel approach to study the cell wall. *Yeast.* 1999 Apr;15(6):459-72
- Paunola E, Suntio T, Jamsa E, Makarow M.** Folding of active beta-lactamase in the yeast cytoplasm before translocation into the endoplasmic reticulum. *Mol Biol Cell.* 1998 Apr;9(4):817-27
- Philips J, Herskowitz I.** Osmotic balance regulates cell fusion during mating in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* 1997 138, 961-74
- Plempner RK, Bohmler S, Bordallo J, Sommer T, Wolf DH.** Mutant analysis links the translocon and BiP to retrograde protein transport for ER degradation. *Nature.* 1997 Aug 28;388(6645):891-5

- Popolo L, Gilardelli D, Bonfante P, Vai M.** Increase in chitin as an essential response to defects in assembly of cell wall polymers in the *gpp1delta* mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol.* 1997 Jan;179(2):463-9
- Popolo L, Vai M, Gatti E, Porello S, Bonfante P, Balestrini R, Alberghina L.** Physiological analysis of mutants indicates involvement of the *Saccharomyces cerevisiae* GPI-anchored protein *gp115* in morphogenesis and cell separation. *J Bacteriol.* 1993 Apr;175(7):1879-85
- Posas F, Wurgler-Murphy SM, Maeda T, Witten EA, Thai TC, Saito H.** Yeast HOG1 MAP kinase cascade is regulated by a multistep phosphorelay mechanism in the *SLN1-YPD1-SSK1* "two-component" osmosensor. *Cell.* 1996 Sep 20;86(6):865-75
- Qadota H, Python CP, Inoue SB, Arisawa M, Anraku Y, Zheng Y, Watanabe T, Levin DE, Ohya Y.** Identification of yeast Rho1p GTPase as a regulatory subunit of 1,3-beta-glucan synthase. *Science.* 1996 Apr 12;272(5259):279-81.
- Ram AF, Brekelmans SS, Oehlen LJ, Klis FM.** Identification of two cell cycle regulated genes affecting the beta 1,3-glucan content of cell walls in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 1995 Jan 23;358(2):165-70
- Ram AF, Kapteyn JC, Montijn RC, Caro LH, Douwes JE, Baginsky W, Mazur P, van den Ende H, Klis FM.** Loss of the plasma membrane-bound protein *Gas1p* in *Saccharomyces cerevisiae* results in the release of beta1,3-glucan into medium and induces a compensation mechanism to ensure cell wall integrity. *J Bacteriol.* 1998 Mar;180(6):1418-24
- Ram AF, Kapteyn JC, Montijn RC, Caro LH, Douwes JE, Baginsky W, Mazur P, van den Ende H, Klis FM.** Loss of the plasma membrane-bound protein *Gas1p* in *Saccharomyces cerevisiae* results in the release of beta1,3-glucan into the medium and induces a compensation mechanism to ensure cell wall integrity. *J Bacteriol.* 1998 Mar;180(6):1418-24
- Reiser V, Ruis H, Ammerer G.** Kinase activity-dependent nuclear export opposes stress-induced nuclear accumulation and retention of Hog1 mitogen-activated protein kinase in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell.* 1999 Apr;10(4):1147-61
- Rep M, Proft M, Remize F, Tamas M, Serrano R, Thevelein JM, Hohmann S.** The *Saccharomyces cerevisiae* *Skolp* transcription factor mediates HOG pathway-dependent osmotic regulation of a set of genes encoding enzymes implicated in protection from oxidative damage. *Mol Microbiol.* 2001 Jun;40(5):1067-83
- Rep M, Reiser V, Gartner U, Thevelein JM, Hohmann S, Ammerer G, Ruis H.** Osmotic stress-induced gene expression in *Saccharomyces cerevisiae* requires *Msn1p* and the novel nuclear factor *Hot1p*. *Mol Cell Biol.* 1999 Aug;19(8):5474-85
- Roberts CJ, Nelson B, Marton MJ, Stoughton R, Meyer MR, Bennett HA, He YD, Dai H, Walker WL, Hughes TR, Tyers M, Boone C, Friend SH.** Signaling and circuitry of multiple MAPK pathways revealed by a matrix of global gene expression profiles. *Science.* 2000 Feb 4;287(5454):873-80

- Rodriguez-Pena JM, Cid VJ, Arroyo J, Nombela C.** A novel family of cell wall-related proteins regulated differently during the yeast life cycle. *Mol Cell Biol.* 2000 May;20(9):3245-55
- Roemer T, Bussey H.** Yeast Kre1p is a cell surface O-glycoprotein. *Mol Gen Genet.* 1995 Nov 15;249(2):209-16
- Roemer T, Paravicini G, Payton MA, Bussey H.** Characterization of the yeast (1->6)-beta-glucan biosynthetic components, Kre6p and Skn1p, and genetic interactions between the PKC1 pathway and extracellular matrix assembly. *J Cell Biol.* 1994 Oct;127(2):567-79
- Roncero C, Valdivieso MH, Ribas JC, Duran A.** Isolation and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* mutants resistant to Calcofluor white. *J Bacteriol.* 1988 Apr;170(4):1950-4
- Roy A, Lu CF, Marykwas DL, Lipke PN, Kurjan J.** The AGA1 product is involved in cell surface attachment of the *Saccharomyces cerevisiae* cell adhesion glycoprotein a-agglutinin. *Mol Cell Biol.* 1991 Aug;11(8):4196-206
- Russo P, Kalkkinen N, Sareneva H, Paakkola J, Makarow M.** A heat shock gene from *Saccharomyces cerevisiae* encoding a secretory glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992 Sep 15;89(18):8857
- Sambrook, J, Fritsch, EF, Maniatis, T.** *Molecular cloning: A laboratory manual*, 2nd edition. Cold Spring Harbor Press, New York
- Sanders SL, Gentsch M, Tanner W, Herskowitz I.** O-Glycosylation of Axl2/Bud10p by Pmt4p is required for its stability, localization, and function in daughter cells. *J Cell Biol.* 1999 Jun 14;145(6):1177-88
- Schiestl RH, Gietz RD.** High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier. *Curr Genet.* 1989 Dec;16(5-6):339-46
- Schmidt A, Bickle M, Beck T, Hall MN.** The yeast phosphatidylinositol kinase homolog TOR2 activates RHO1 and RHO2 via the exchange factor ROM2. *Cell.* 1997 Feb 21;88(4):531-42
- Schuller C, Brewster JL, Alexander MR, Gustin MC, Ruis H.** The HOG pathway controls osmotic regulation of transcription via the stress response element (STRE) of the *Saccharomyces cerevisiae* CTT1 gene. *EMBO J.* 1994 Sep 15;13(18):4382-9
- Sentandreu R, Northcote DH.** Yeast cell-wall synthesis. *Biochem J.* 1969 Nov;115(2):231-40
- Shahinian S, Bussey H.** beta-1,6-Glucan synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol.* 2000 Feb;35(3):477-89
- Shahinian S, Dijkgraaf GJ, Sdicu AM, Thomas DY, Jakob CA, Aebi M, Bussey H.** Involvement of protein N-glycosyl chain glucosylation and processing in the biosynthesis of cell wall beta-1,6-glucan of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* 1998 Jun;149(2):843-56

- Shamu CE, Walter P.** Oligomerization and phosphorylation of the Ire1p kinase during intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus. *EMBO J.* 1996 Jun 17;15(12):3028-39
- Sharma CB, Babczinski P, Lehle L, Tanner W.** The role of dolicholmonophosphate in glycoprotein biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem.* 1974 Jul 1;46(1):35-41
- Shaw JA, Mol PC, Bowers B, Silverman SJ, Valdivieso MH, Duran A, Cabib E.** The function of chitin synthases 2 and 3 in the *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. *J Cell Biol.* 1991 Jul;114(1):111-23
- Shaw JA, Mol PC, Bowers B, Silverman SJ, Valdivieso MH, Duran A, Cabib E.** The function of chitin synthases 2 and 3 in the *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. *J Cell Biol.* 1991 Jul;114(1):111-23
- Shematek EM, Braatz JA, Cabib E.** Biosynthesis of the yeast cell wall. I. Preparation and properties of beta-(1 leads to 3)glucan synthetase. *J Biol Chem.* 1980 Feb 10;255(3):888-94
- Shimizu J, Yoda K, Yamasaki M.** The hypo-osmolarity-sensitive phenotype of the *Saccharomyces cerevisiae* hpo2 mutant is due to a mutation in PKC1, which regulates expression of beta-glucanase. *Mol Gen Genet.* 1994 Mar;242(6):641-8
- Shimoi H, Kitagaki H, Ohmori H, Iimura Y, Ito K.** Sed1p is a major cell wall protein of *Saccharomyces cerevisiae* in the stationary phase and is involved in lytic enzyme resistance. *J Bacteriol.* 1998 Jul;180(13):3381-7
- Siderius M, Van Wuytswinkel O, Reijenga KA, Kelders M, Mager WH.** The control of intracellular glycerol in *Saccharomyces cerevisiae* influences osmotic stress response and resistance to increased temperature. *Mol Microbiol.* 2000 Jun;36(6):1381-90
- Sidrauski C, Chapman R, Walter P.** The unfolded protein response: an intracellular signalling pathway with many surprising features. *Trends Cell Biol.* 1998 Jun;8(6):245-9
- Silberstein S, Kelleher DJ, Gilmore R.** The 48-kDa subunit of the mammalian oligosaccharyltransferase complex is homologous to the essential yeast protein WBP1. *J Biol Chem.* 1992 Nov 25;267(33):23658-63
- Silverman SJ, Sburlati A, Slater ML, Cabib E.** Chitin synthase 2 is essential for septum formation and cell division in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988 Jul;85(13):4735-9
- Simons JF, Ebersold M, Helenius A.** Cell wall 1,6-beta-glucan synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* depends on ER glucosidases I and II, and the molecular chaperone BiP/Kar2p. *EMBO J.* 1998 Jan 15;17(2):396-405
- Spellman PT, Sherlock G, Zhang MQ, Iyer VR, Anders K, Eisen MB, Brown PO, Botstein D, Futcher B.** Comprehensive identification of cell cycle-regulated genes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* by microarray hybridization. *Mol Biol Cell.* 1998 Dec;9(12):3273-97

- Strahl-Bolsinger S, Gentzsch M, Tanner W.** Protein O-mannosylation. *Biochim Biophys Acta.* 1999 Jan 6;1426(2):297-307
- Tamas MJ, Luyten K, Sutherland FC, Hernandez A, Albertyn J, Valadi H, Li H, Prior BA, Kilian SG, Ramos J, Gustafsson L, Thevelein JM, Hohmann S.** Fps1p controls the accumulation and release of the compatible solute glycerol in yeast osmoregulation. *Mol Microbiol.* 1999 Feb;31(4):1087-104
- Tamas MJ, Rep M, Thevelein JM, Hohmann S.** Stimulation of the yeast high osmolarity glycerol (HOG) pathway: evidence for a signal generated by a change in turgor rather than by water stress. *FEBS Lett.* 2000 Apr 21;472(1):159-65
- Teunissen AW, Steensma HY.** Review: the dominant flocculation genes of *Saccharomyces cerevisiae* constitute a new subtelomeric gene family. *Yeast.* 1995 Sep 15;11(11):1001-13
- Toh-e A, Yasunaga S, Nisogi H, Tanaka K, Oguchi T, Matsui Y.** Three yeast genes, PIR1, PIR2 and PIR3, containing internal tandem repeats, are related to each other, and PIR1 and PIR2 are required for tolerance to heat shock. *Yeast.* 1993 May;9(5):481-94
- Trilla JA, Cos T, Duran A, Roncero C.** Characterization of CHS4 (CAL2), a gene of *Saccharomyces cerevisiae* involved in chitin biosynthesis and allelic to SKT5 and CSD4. *Yeast.* 1997 Jul;13(9):795-807
- Valdivieso MH, Ferrario L, Vai M, Duran A, Popolo L.** Chitin synthesis in a gas1 mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol.* 2000 Sep;182(17):4752-7
- Valentin E, Herrero E, Pastor, F.I.J., Sentandreu R.** Solubilization and analysis of mannoproteins molecules from the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.* 1984 130, 1419-1428
- Valentin E, Herrero E, Rico H, Miragall F, Sentandreu R.** Cell wall mannoproteins during the population growth phases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Microbiol.* 1987 Jul;148(2):88-94.
- van der Vaart JM, Caro LH, Chapman JW, Klis FM, Verrips CT.** Identification of three mannoproteins in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol.* 1995 Jun;177(11):3104-10
- Varela JC, Praekelt UM, Meacock PA, Planta RJ, Mager WH.** The *Saccharomyces cerevisiae* HSP12 gene is activated by the high-osmolarity glycerol pathway and negatively regulated by protein kinase A. *Mol Cell Biol.* 1995 Nov;15(11):6232-45
- Vazquez de Aldana CR, Correa J, San Segundo P, Bueno A, Nebreda AR, Mendez E, del Rey F.** Nucleotide sequence of the exo-1,3-beta-glucanase-encoding gene, EXG1, of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene.* 1991 Jan 15;97(2):173-82
- Verna J, Lodder A, Lee K, Vagts A, Ballester R.** A family of genes required for maintenance of cell wall integrity and for the stress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 Dec 9;94(25):13804-9

- Volckaert G, Voet M, Robben J.** Sequence analysis of a near-subtelomeric 35.4 kb DNA segment on the right arm of chromosome VII from *Saccharomyces cerevisiae* carrying the MAL1 locus reveals 15 complete open reading frames, including ZUO1, BGL2 and BIO2 genes and an ABC transporter gene. *Yeast*. 1997 Mar 15;13(3):251-9
- Vossen JH, Muller WH, Lipke PN, Klis FM.** Restrictive glycosylphosphatidylinositol anchor synthesis in *cwh6/gpi3* yeast cells causes aberrant biogenesis of cell wall proteins. *J Bacteriol*. 1997 Apr;179(7):2202-9
- Watanabe Y, Irie K, Matsumoto K.** Yeast RLM1 encodes a serum response factor-like protein that may function downstream of the Mpk1 (Slf2) mitogen-activated protein kinase pathway. *Mol Cell Biol*. 1995 Oct;15(10):5740-9
- Watzel M, Klis F, Tanner W.** Purification and characterization of the inducible a agglutinin of *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J*. 1988 May;7(5):1483-8
- Wolf J, Nicks M, Deitz S, van Tuinen E, Franzusoff A.** An N-end rule destabilization mutant reveals pre-Golgi requirements for Sec7p in yeast membrane traffic. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998 Feb 4;243(1):191-8
- Zarrov P, Mazzoni C, Mann C.** The SLT2(MPK1) MAP kinase is activated during periods of polarized cell growth in yeast. *EMBO J*. 1996 Jan 2;15(1):83-91
- Zhang W, Espinoza D, Hines V, Innis M, Mehta P, Miller DL.** Characterization of beta-amyloid peptide precursor processing by the yeast Yap3 and Mkc7 proteases. *Biochim Biophys Acta*. 1997 Nov 27;1359(2):110-22
- Zlotnik H, Fernandez MP, Bowers B, Cabib E.** *Saccharomyces cerevisiae* mannoproteins form an external cell wall layer that determines wall porosity. *J Bacteriol*. 1984 Sep;159(3):1018-26.

DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

An erster Stelle gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. W. Tanner, für seine intensive Unterstützung, seine Diskussionsbereitschaft und das stete Interesse am Fortgang der Arbeit. Außerdem möchte ich mich für die Möglichkeit bedanken, neue Techniken in anderen Laboren kennenzulernen und an verschiedenen Tagungen teilzunehmen.

Besonders möchte ich mich bei Dr. Sabine Strahl bedanken, die sich immer Zeit für Diskussionen und Fragen nahm und mir mit vielfältigen Anregungen und Ratschlägen geholfen hat.

Allen Mitarbeitern der Hefelabore ein ganz herzliches Dankeschön. Margit Ecker, Christiane Endres, Verena Girrbach, Meike Priesmeier, Sergej Šesták und Tobias Willer danke ich für ihre Hilfsbereitschaft und ein überragendes Arbeitsklima. Mein Dank gilt vor allem Ingrid Fuchs für die Hilfe bei der teilweise recht monotonen Komplementation der osmolabilen Hefemutanten. Ebenso möchte ich mich bei Hans-Jürgen Berger und Ulla Kröckl für ihre engagierte Mitarbeit bedanken.

Bei Prof. Dr. L. Lehle möchte ich mich besonders für die zahlreichen HF-Spaltungen und die Kohlenhydratanalysen bedanken, die er mit mir zusammen durchgeführt hat.

Prof. J.M. François sowie allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe am *Institut National des Sciences Appliquées* in Toulouse möchte ich für ihre freundliche Aufnahme danken. Vor allem danke ich Arnaud Lagorce für die Hilfe bei der Durchführung der DNA-Arrays.

Mein Dank gilt auch Prof. J.D. Hoheisel und besonders Dr. Nicole Hauser für ihre Hilfe bei der Auswertung der Array-Daten und die geduldige Einweisung in die Wunderwelt elektronischer Datenanalyse.

Allen Mitgliedern des Lehrstuhl, besonders dem 2. Stock, danke ich für ihre Kollegialität und die gute Atmosphäre.

Ein Dankeschön geht auch an Frau Vroni Mrosek, für ihre Hilfe bei der Vor- und Nachbereitung von Tagungsreisen sowie bei verschiedensten organisatorischen Dingen.

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Zellbiologie und Pflanzenphysiologie der Universität Regensburg unter der Betreuung von Prof. Dr. Widmar Tanner angefertigt.