

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Diplomarbeit beschäftigte sich mit der Charakterisierung möglicher Wechselwirkungen mit der Spacer-Region des ABC-Transporters Ste6 aus *S. cerevisiae*, auch D-Box genannt. Verwendet wurde das Two Hybrid-System. So konnte gezeigt werden, daß die D-Box nicht interagiert mit Calmodulin. Es wurden Hinweise gefunden auf eine mögliche Wechselwirkung zwischen dem Paarungspheromon **a**-Faktor und einem basischen Bereich der D-Box, der B-Box. Aufgrund eines Wachstumsdefekts, der durch das verwendete Gal4-Bindedomänenplasmid hervorgerufen wurde, ist eine abschließende Beurteilung jedoch nicht möglich. Sollten sich die Hinweise auf die Interaktion mit dem **a**-Faktor bei der Verwendung eines bereits neu konstruierten Bindedomänenplasmids bestätigen, so können wertvolle Informationen auf die Funktion des vermeintlichen **a**-Faktortransporters Ste6 gewonnen werden.

Um den schnellen Umsatz und die Abbauege von Ste6 zu untersuchen, konnte ein Screen nach Mutanten, in denen Ste6 stabilisiert ist, etabliert werden. Grundlage ist ein Ste6-lacZ-Fusionsprotein, wodurch die erhöhte Proteinmenge anhand der β -Galaktosidaseaktivität nachgewiesen werden kann. Es konnte gezeigt werden, daß das Fusionsprotein biologisch voll aktiv ist, also in Abwesenheit des Wildtypproteins die Sekretion des **a**-Faktors vermittelt. Außerdem verhält sich das Fusionsprotein in wesentlichen Punkten wie das Wildtypprotein: Zellfraktionierungsexperimente mit Sucrosegradienten haben gezeigt, daß beide Proteine hauptsächlich mit internen Membranen assoziiert sind und sich in der Endocytosemutante *end4* der Plasmamembran anhäufen. Ebenso wie Ste6, ist auch Ste6-lacZ in einer *pep4*-Mutante, in der die proteolytische Funktion der Vakuole gestört ist, stabilisiert. Nach einer Mutagenese mit EMS konnten rund 30 Mutanten mit erhöhter β -Galaktosidaseaktivität isoliert werden. Mit Pulse-Chase-Experimenten konnte nachgewiesen werden, daß fünf Mutanten mit besonders hoher β -Galaktosidaseaktivität auch das Wildtypprotein stabilisieren. Durch Transformation mit einer cDNA-Bank und Rückkreuzungsexperimente konnte eine der Mutanten als *pep4*-Stamm identifiziert werden. Durch die Identifizierung einer Mutante, deren stabilisierender Effekt bereits bekannt ist, wurde die Brauchbarkeit des Screens bewiesen. Weitere Mutanten, in denen Ste6 noch stärker stabilisiert ist als in *pep4*-Zellen, stehen für künftige Untersuchungen zur Verfügung.