

Die Funktion der 1/3 Inositolpolyphosphatkinase Asp1
beim polaren und invasiven Wachstum
der Spaltheefe *Schizosaccharomyces pombe*

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von
Jennifer Pöhlmann
aus Oberhausen

Mai 2010

Aus dem Lehrstuhl für
Funktionelle Genomforschung der Mikroorganismen
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

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

Referent: PD Dr. U. Fleig
Koreferent: Prof. Dr. M. Beye

Tag der mündlichen Prüfung: 8.7.2010

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	8
Zusammenfassung	10
Summary	12
1 Einleitung	14
1.1 Dimorphe Wechsel	15
1.1.1 Adhäsion wird durch spezifische Zelloberflächenproteine vermittelt	16
1.1.2 Morphologische Veränderungen beim dimorphen Wechsel	16
1.2 Polares Wachstum in <i>S. pombe</i>	18
1.2.1 Die Wachstumszonen von <i>S. pombe</i>	18
1.2.2 Das Aktin-Zytoskelett kolokalisiert mit den aktiven Wachstumszonen	19
1.2.3 Die Mikrotubuli transportieren Zellendmarkerproteine zu den Zellenden	21
1.2.4 Der Wechsel von mono- zu bipolarem Wachstum	24
1.2.5 Der dimorphe Wechsel von <i>S. pombe</i>	25
1.3 Inositolpyrophosphate sind mögliche intrazelluläre Signalmoleküle	26
1.3.1 Der Inositolpyrophosphat-Metabolismus	26
1.3.2 Sind Inositolpyrophosphate intrazelluläre Signalmoleküle?	28
1.3.3 Für Inositolpyrophosphate wurden zwei verschiedene Funktionsweisen beschrieben	29
1.3.4 Die Vip1 1/3 Inositolpolyphosphat Kinasefamilie	29
1.4 Zielsetzung dieser Arbeit	31
2 Material und Methoden	33
2.1 Chemikalien	33
2.2 Enzyme	34
Restriktionsenzyme	34
DNA-modifizierende Enzyme	34
Weitere Enzyme	34
2.3 Antikörper	35
2.4 Kits	35
2.5 Sonstige Materialien	35
2.6 Synthetische Oligonukleotide	36
2.7 Plasmide/Vektoren	41
2.8 Stämme	43

2.8.1	<i>S. pombe</i> Stämme	43
2.8.2	<i>S. cerevisiae</i> Stämme	45
2.8.3	<i>E. coli</i> Stämme	45
2.9	Medien und Wachstumsbedingungen	46
2.9.1	Medien und Wachstumsbedingungen für <i>S. pombe</i>	46
2.9.2	Medien und Wachstumsbedingungen für <i>S. cerevisiae</i>	47
2.9.3	Medien und Wachstumsbedingungen für <i>E. coli</i>	48
2.10	DNA-Methoden	49
2.10.1	DNA-Grundtechniken	49
2.10.2	Transformation von Plasmid-DNA in <i>E. coli</i>	49
2.10.3	Gewinnung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	50
2.10.4	PCR	50
2.10.5	DNA-Sequenzierungen	51
2.11	Hefemethoden (<i>S. pombe</i>)	51
2.11.1	Transformation	51
	Lithiumacetat-Transformation	51
	Elektroporation	51
	Homologe Rekombination	52
2.11.2	Erzeugung von <i>asp1</i> ^{H397A} und <i>asp1</i> ^{D333A} Mutantenstämmen	52
	Generierung eines <i>asp1</i> ⁺ / <i>kanMX6</i> Stammes	53
	Generierung eines <i>asp1</i> ^{D333A, H397A} Mutantenstammes durch gerichtete Mutagenese	53
	Nachweis der <i>asp1</i> ^{D333A} und <i>asp1</i> ^{H397A} ORFs mittels PCR	54
	C-terminale GFP-Epitopmarkierung des <i>asp1</i> ^{D333A} ORFs mittels homologer Rekombination	54
2.11.3	Isolierung genomischer DNA aus <i>S. pombe</i>	55
2.11.4	Paarung von <i>S. pombe</i> Stämmen	55
	„Random spore“ Analyse	56
	Tetradenanalyse	56
	Isolierung diploider Stämme	56
	Genotypbestimmung	57
2.11.5	Analyse von adhäsivem und invasivem Wachstum	57
2.11.6	Wachstumsanalyse auf halb-festem Agarmedium	58
2.11.7	Flokkulationsassay	58
2.11.8	Zymolyase-Behandlung	59
2.11.9	Iodfärbung	59
2.11.10	Serielle Tropftests	59
2.11.11	Halo-Assay	60
2.12	Hefemethoden (<i>S. cerevisiae</i>)	60
2.12.1	Transformation	60

Homologe Rekombination.....	60
Klonierungen mittels homologer Rekombination in <i>S. cerevisiae</i>	61
2.12.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>S. cerevisiae</i>	61
2.12.3 Generierung diploider <i>S. cerevisiae</i> Stämme durch Paarungstypwechsel.....	62
2.12.4 Sporulation diploider <i>S. cerevisiae</i> Stämme	62
2.12.5 Bestimmung des Paarungstyps von <i>S. cerevisiae</i>	62
2.12.6 Analyse des haploid invasiven und diploid pseudohyphalen Wachstums.....	63
2.12.7 2-Hybrid-Analyse.....	63
2.13 Mikroskopie	64
2.13.1 Lebendfluoreszenz und Beobachtung der Mikrotubuli-Dynamik	64
2.13.2 Beobachtung von auf der Agaroberfläche oder invasiv wachsenden Zellen.....	65
2.13.3 Lokalisierung von Asp1 mittels Immunofluoreszenz.....	65
2.13.4 Aktinfärbung mittels Rhodamin-Phalloidin	65
2.13.5 Anfärbung der aktiven Wachstumszonen mit Calcofluor Weiß.....	66
2.13.6 Elektronenmikroskopie.....	67
2.14 Proteinmethoden.....	69
2.14.1 Herstellung von Proteinextrakten aus <i>S. pombe</i>	69
2.14.2 Immunopräzipitation.....	70
2.14.3 Western Blot-Analyse.....	70
2.14.4 Coomassie-Färbung.....	71
2.14.5 Proteinkonzentrationsbestimmung.....	71
2.15 Signifikanztests.....	71
3 Ergebnisse.....	72
3.1 Erzeugung von Mutantenstämmen, die spezifische Asp1 Varianten exprimieren.....	72
3.2 Asp1 wird für das bipolare Zellwachstum benötigt.....	73
3.2.1 Das Asp1 Protein wird für ein wildtypisches Mikrotubuli-Zytoskelett benötigt.....	73
3.2.2 Asp1 reguliert die Interphasen-Mikrotubuli-Dynamik	74
3.2.3 In Zellen ohne funktionelle Asp1 Kinasedomäne ist der Zellendmarker Tea1 nicht mehr richtig lokalisiert.....	77
3.2.4 Die Funktion der Asp1 Kinasedomäne wird für die Ausbildung der Wachstumszone am neuen Zellende benötigt.....	78
3.2.5 Asp1 beeinflusst die Stabilität des Aktin-Zytoskeletts und die Verteilung der Aktinflecken auf die Zellenden.....	81
3.2.6 Asp1 ist in die Ausbildung des Septums involviert	83
3.2.7 Die Expression der Asp1 ^{D333A} Variante supprimiert die Zytokinesedefekte des <i>cdc3-124</i> Mutantenstammes.....	84
3.2.8 Die Asp1 ^{H397A} Variante kann mit den Wachstumszonen kolokalisieren.....	87

3.2.9	Die <i>asp1</i> Mutantenstämme haben eine veränderte Zellwand	88
3.3	Asp1 reguliert den dimorphen Wechsel von <i>S. pombe</i>	90
3.3.1	Die Expression der Asp1 ^{H397A} Variante führt zu Zell-Zell-Adhäsion.....	90
3.3.2	Die Expression der Asp1 ^{H397A} Variante führt zu Zell-Substrat-Adhäsion	92
3.3.3	Die Expression der Asp1 ^{H397A} Variante führt zu invasivem Wachstum.....	93
3.3.4	Die Erhöhung der intrazellulären Inositolpyrophosphat-Konzentration führt zu Adhäsion und invasivem Wachstum	94
3.3.5	Die Funktion von Asp1 beim dimorphen Wechsel ist konserviert.....	95
3.3.6	Der cAMP/PKA Signalweg wird für das invasive Wachstum benötigt	97
3.3.7	Gibt es extrazelluläre Signale, die invasives Wachstum unabhängig von Asp1 auslösen können?.....	100
3.4	Charakterisierung des pseudohyphalen Wachstums von <i>S. pombe</i>	101
3.4.1	Das Wachstum ist unabhängig von der Position der Zellen in den pseudohyphalen Strukturen.....	102
3.4.2	Pseudohyphal wachsende Zellen weisen ein verändertes polares Wachstumsmuster auf	103
3.4.3	Der Zellendmarker Tea1 ist in pseudohyphal wachsenden Zellen anders als in hefeförmig wachsenden Zellen lokalisiert.....	105
3.4.4	Pseudohyphal wachsende Zellen haben Zytokinesedefekte.....	106
3.4.5	Die Rolle des Mikrotubuli- und Aktin-Zytoskeletts beim invasiven Wachstum	107
3.5	Eine mögliche Rolle von Zyklin-abhängigen Kinasen bei der Regulation des dimorphen Wechsels	109
3.5.1	Asp1 benötigt die Anwesenheit der Zyklin-abhängigen Kinase Pef1 für die Regulation des adhäsiven Wachstums	110
3.5.2	Asp1 benötigt die Anwesenheit des „nucleosome assembly protein“ Nap1 für die Regulation des invasiven Wachstums, jedoch nicht die Funktion der Zyklin-abhängigen Kinase Cdc2.....	111
3.5.3	Asp1 benötigt nicht die Anwesenheit von Cdk8 für die Regulation des adhäsiven und invasiven Wachstums	113
3.6	Primärcharakterisierung der Funktionsweise der Asp1 Proteindomänen.....	114
3.6.1	Die Asp1 Protein besteht aus zwei funktionellen Domänen	114
3.6.2	Die Asp1 Phosphatasedomäne reguliert die Funktion der Asp1 Kinasedomäne	114
3.6.3	Gibt es eine Asp1-Asp1-Interaktion?	117
3.6.4	Die Asp1 Domänen können ihre Funktionen als separate Moleküle ausführen.....	118
4	Diskussion	121
4.1	Asp1 wird für die Definition des Zellendes und das bipolare Wachstum benötigt.....	121
4.2	Asp1 reguliert den dimorphen Wechsel von <i>S. pombe</i>	128
4.3	Der dimorphe Wechsel von <i>S. pombe</i> geht mit Veränderungen des Wachstumsmusters einher	133
4.4	Sind Inositolpyrophosphate intrazelluläre Signalmoleküle?.....	136

4.5	Hat die Asp1 Phosphatasedomäne eine regulatorische Funktion?	138
	Literaturverzeichnis	141
	Zusätzliche Abbildungen	152
	Publikationen	155
	Danksagung	156
	Erklärung	157

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
<i>A. nidulans</i>	<i>Aspergillus nidulans</i>
ATP	Adenosintriphosphat
Bp	Basenpaar(e)
C	Cytosin
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CDK	„cyclin dependent kinase“
C-Terminus	Carboxy-Terminus
ddH ₂ O	zweifach destilliertes Wasser
<i>D. discoideum</i>	<i>Dictyostelium discoideum</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EMM	Edinburgh-Minimalmedium
g	Gramm
G	Guanin
GAP	„GTPase-activating protein“
GEF	„guanine-nucleotide exchange factor“
GFP	„green fluorescent protein“
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde(n)
HA	Hämagglutinin
IP ₆	Inositolhexakisphosphat (InsP ₆)
IP ₇	Diphosphoinositolpentakisphosphat (PP-InsP ₅)
1/3 -IP ₇	1/3-Diphosphoinositolpentakisphosphat (1/3-PP-InsP ₅)
5-IP ₇	5-Diphosphoinositolpentakisphosphat (5-PP-InsP ₅)
IP ₈	Bis-Diphosphoinosiltetrakisphosphat ((PP) ₂ -InsP ₄)
IP6K	Inositolhexakisphosphatkinase
1/3 Kinase	Vip1 1/3 Inositolpolyphosphatkinase
Kap.	Kapitel
kBp	Kilobasenpaar(e)
kDa	Kilodalton
kV	Kilovolt

l	Liter
LatB	Latrunculin B
μF	Mikrofarad
μl	Mikroliter
μM	Mikromolar
M	Molar
MAP	„mitogen activated protein“
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MM	Minimalmedium (<i>S. pombe</i>)
n	Anzahl
ng	Nanogramm
NETO	„new end take off“
N-Terminus	Amino-Terminus
OD	optische Dichte
ORF	„open reading frame“
PCR	„polymerase chain reaction“
PKA	cAMP-abhängige Proteinkinase A
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	„revolutions per minute“
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
sec	Sekunde(n)
<i>S. pombe</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TBZ	Thiabendazol
+TIPs	„plus end tracking proteins“
u	unit(s)
ü/N	über Nacht
YE5S	Vollmedium (<i>S. pombe</i>)
YPD	Vollmedium (<i>S. cerevisiae</i>)

Zusammenfassung

Die Regulation des polarisierten Wachstums von eukaryotischen Zellen erfolgt durch ein zellinternes Polaritätssystem, das hauptsächlich aus dem Mikrotubuli- und Aktin-Zytoskelett sowie damit assoziierten Proteinen besteht und das definierte Wachstumszonen etabliert und aufrechterhält. Extrinsische Signale können das interne System und damit auch die Wachstumszonen beeinflussen. Dies geschieht auf dramatische Weise bei dem dimorphen Wechsel von Pilzen, einem Wechsel zwischen einer einzelligen, sog. Hefeform und einer multizellulären, hochpolarisiert wachsenden filamentösen Form. Diese Wechsel werden durch eine Vielzahl extrazellulärer Stimuli ausgelöst und gelten als bedeutende Virulenzfaktoren von pathogenen Pilzen. Auch die Modellhefe *Schizosaccharomyces pombe* zeigt unter spezifischen Bedingungen einen Wechsel zu einer filamentösen, invasiv wachsenden Form, der bisher jedoch kaum untersucht wurde. Dagegen ist *S. pombe* eines der am besten charakterisierten Modellsysteme für die zellinterne Regulation des polarisierten Wachstums. In dieser Arbeit wurde das Asp1 Protein als ein zentraler Regulator des polarisierten Wachstums und des dimorphen Wechsels von *S. pombe* identifiziert. Asp1 ist ein Mitglied der evolutionär konservierten Vip1 1/3 Inositolpolyphosphat Kinasefamilie, die spezifische Inositolpyrophosphate generiert. Die physiologische Rolle dieser Moleküle ist noch weitgehend unverstanden, jedoch wurde eine Beteiligung an der Regulation Zyklin-abhängiger Kinasen demonstriert.

Diese Arbeit zeigt, dass Asp1 beim polarisierten Wachstum der *S. pombe* Hefeform für den Wechsel von monopolarer zu bipolarer Wachstum benötigt wird, einem wichtigen Ereignis im *S. pombe* Zellzyklus. Die gewonnenen Daten implizieren, dass Inositolpyrophosphate an der Auslösung dieses Vorgangs beteiligt sind. Zudem nimmt Asp1 Einfluss auf das Mikrotubuli- und Aktin-Zytoskelett sowie auf die Lokalisierung eines Zellendmarkerproteins. Dies legt nahe, dass Inositolpyrophosphate weitere Funktionen beim polarisierten Wachstum haben. Im Vergleich zur Hefeform weist die filamentöse Form von *S. pombe* eine veränderte Auswahl der Zellenden als Wachstumszonen und überwiegend monopolarer Wachstum auf. Bei der Regulation dieser veränderten Wachstumsform ist Asp1 ebenfalls eine zentrale Komponente. Dabei handelt es sich um eine neue und konservierte Funktion der 1/3 Kinasefamilie, die auch für die 1/3 Kinase Vip1 in der Knosphefe *S. cerevisiae* gezeigt wurde. Inositolpyrophosphate dienen dabei offenbar als Signalmoleküle, da die vermutliche Erhöhung ihrer zellulären Konzentration eine verstärkte zelluläre Antwort hervorruft. Ebenfalls für den dimorphen Wechsel von *S. pombe* benötigt wird der cAMP/PKA Signalweg, der dem Asp1 Protein vorgeschaltet aktiv ist. Darüberhinaus wurden mit der Zyklin-abhängigen Kinase Pef1 und dem „nucleosome assembly protein“ Nap1 zwei mögliche Interaktionspartner von Asp1 identifiziert. Somit bietet diese Arbeit einen Ausgangspunkt für die Aufklärung des komplexen Mechanismus, der den dimorphen Wechsel kontrolliert und

dessen zentrale Komponenten die 1/3 Kinasen sind. 1/3 Kinasen besitzen eine charakteristische Zweidomänenstruktur mit einer N-terminalen Kinasedomäne und einer C-terminalen putativen Phosphatasedomäne unbekannter Funktion. Durch genetische Analysen wurden erstmalig konkrete *in vivo* Hinweise dafür erhalten, dass die C-terminale Domäne die Funktion der Kinasedomäne negativ reguliert. Somit kann die Feinabstimmung der zellulären Antwort auf extrinsische Signale durch dasselbe Protein erfolgen.

Summary

Polarised growth of eukaryotic cells is regulated by an internal polarity system, mainly consisting of the microtubule and actin cytoskeleton and associated proteins, that establishes and maintains defined growth zones. Additionally, the internal system and thus the growth zones can be influenced by extrinsic cues. One of the most dramatic examples is seen in the dimorphic switch of fungi, a transition between a unicellular, so-called yeast form and a multicellular, highly polarised filamentous form. These transitions can be caused by various environmental stimuli and are thought to be important virulence factors of pathogenic fungi. Under certain conditions the model yeast *Schizosaccharomyces pombe* is able to undergo a switch to a filamentous, invasively growing form. Yet this type of growth has hardly been studied to date. However *S. pombe* is one of the best characterised model systems in terms of the internal regulation of polarised growth. This work identified the Asp1 protein as a key regulator of both the *S. pombe* polarised growth and the dimorphic switch. Asp1 is a member of the evolutionarily conserved Vip1 1/3 inositol polyphosphate kinase family that generates a specific class of inositol pyrophosphates. Little is known about the function of these small molecules but an involvement in the regulation of cyclin-dependent kinases has been demonstrated.

This work shows that during polarised growth of the *S. pombe* yeast form, Asp1 is required for the transition from monopolar to bipolar growth which is an important event during the *S. pombe* cell cycle. The data obtained imply that inositol pyrophosphates are involved in triggering this event. Furthermore, Asp1 influences the microtubule and actin cytoskeleton as well as the localisation of a cell end marker protein, suggesting that inositol pyrophosphates have multiple functions in regulating polarised cell growth. In comparison to the yeast form the *S. pombe* filamentous growth form shows an altered selection of growing cell ends and predominantly monopolar growth. Asp1 is a key component regulating this transition. Thus, a new and conserved role for the 1/3 kinase family has been uncovered, as the Vip1 1/3 kinase also regulates the dimorphic switch in the budding yeast *S. cerevisiae*. In this process inositol pyrophosphates seem to act as signalling molecules, as a probable increase in their cellular amount increases the cellular response. Likewise, the cAMP PKA pathway is required for the *S. pombe* dimorphic switch and acts upstream of Asp1. In addition, the cyclin-dependent kinase Pef1 and the nucleosome assembly protein Nap1 were found to be potential Asp1 interaction partners. Thus, this work provides a starting point to unravel the complex machinery controlling the dimorphic switch with 1/3 kinases being a central part of this regulation. 1/3 kinases have a conserved dual-domain structure consisting of an N-terminal kinase domain and a C-terminal putative phosphatase domain of unknown function. Genetic analysis has provided the first *in vivo* evidence of the C-terminal domain being a negative

regulator of the kinase domain function. Therefore, the fine tuning of the cellular response to environmental cues can be modulated by the same protein.

1 Einleitung

Der Begriff *Zellpolarität* beschreibt die strukturell und funktionell gerichtete Organisation einer Zelle, die bei fast allen eukaryotischen Zellen vorkommt. Sie bildet die Basis für die Ausbildung von Zellformen, die Zelldifferenzierung und den Aufbau von multizellulären Strukturen wie Geweben und Organen (Bryant & Mostov, 2008). Die Zellpolarität wird durch ein intrinsisches System reguliert, das hauptsächlich aus dem Aktin- und Mikrotubuli-Zytoskelett und Zellpolaritätsproteinen besteht. Extrinsische Signale können dieses intrinsische System beeinflussen und Zellpolarität induzieren oder umgestalten (Siegrist & Doe, 2007). Eine Form der Zellpolarität ist das polarisierte Wachstum, bei dem distinkte Wachstumszonen an definierten Regionen des Zellkortex ausgebildet werden. Dies geschieht z.B. bei den auswachsenden Axonen von Nervenzellen, an deren Spitze sich Rezeptoren befinden, die durch extrinsische Signale aktiviert werden. In der Folge akkumulieren Aktinfilamente und Mikrotubuli in der Axonspitze und polarisieren das Wachstum in Richtung des extrinsischen Signals (Quinn & Wadsworth, 2008).

Die wohl extremste Form des polarisierten Wachstums ist bei den unbegrenzt wachsenden Hyphen von filamentösen Pilzen zu finden, ein Kontinuum aus elongierten, an ihren Polen miteinander verbundenen Zellen (Fischer et al, 2008). Dabei kommt es an der Hyphenspitze zur Ausbildung einer initialen Wachstumszone und deren kontinuierlicher Beibehaltung, mitunter sogar unabhängig des mitotischen Zellzyklus (Riquelme et al, 2003; Steinberg, 2007). Charakteristisch für diese Wachstumszone ist der sog. Spitzenkörper, eine Ansammlung von sekretorischen und endozytotischen Vesikeln an der Hyphenspitze. Aktinfilamente, Mikrotubuli und damit assoziierte Proteine koordinieren den Transport von Vesikeln, Proteinen und mRNAs von und zur Hyphenspitze (Fischer et al, 2008; Steinberg, 2007). Extrinsische Signale beeinflussen die Orientierung und Ausdehnung der Hyphen (Brand & Gow, 2009). Die grundlegenden Prinzipien und molekularen Mechanismen des polarisierten Wachstums sind konserviert und finden sich auch bei den einfachen Pilzen wieder (Fischer et al, 2008). Diese haben zudem die Fähigkeit, als Antwort auf extrinsische Signale zwischen einer einzelligen Form und einer multizellulären, hyphenähnlichen Wachstumsform zu wechseln.

1.1 Dimorphe Wechsel

Das Vorkommen einer einzelligen, sog. Hefeform und einer multizellulären, filamentösen und hyphenähnlichen Wachstumsform bei vielen einfachen Pilzen wird als Dimorphismus bezeichnet. Der dimorphe Wechsel, d.h. der reversible Wechsel von der einen zur anderen Wachstumsform, ist mit gravierenden Veränderungen des polarisierten Wachstums- und Zellteilungsverhaltens verbunden und somit mit einer Umorganisation des internen Polaritätssystems. Darüberhinaus kommt es häufig auch zu Veränderungen der Zellwandkomposition und der Annahme adhäsiver Zellwandeigenschaften (Klein & Tebbets, 2007; Palecek et al, 2002). Dimorphe Wechsel können durch eine Vielzahl von äußeren Stimuli wie Nährstoffmangel, Änderung des pH-Wertes oder des Sauerstoffgehaltes der Umgebung ausgelöst werden (Berman, 2006; Nadal et al, 2008). Bei pathogenen Pilzen wird der dimorphe Wechsel typischerweise bei Kontakt mit dem Wirtsorganismus ausgelöst und ist ein wichtiger Virulenzfaktor (Klein & Tebbets, 2007; Nadal et al, 2008). So wird z.B. bei dem humanpathogenen Pilz *Histoplasma capsulatum* der dimorphe Wechsel zur einzelligen Hefeform durch die Körpertemperatur von 37°C ausgelöst (Holbrook & Rappleye, 2008). Auch die nicht-pathogenen Modellhefen, die unter normalen Laborbedingungen in der einzelligen Hefeform vorkommen, zeigen unter spezifischen Bedingungen einen dimorphen Wechsel zu einer filamentösen Wachstumsform (Amoah-Buahin et al, 2005; Gancedo, 2001). Allgemein ist der dimorphe Wechsel eine Anpassung der sesshaften Pilze an sich verändernde Umweltbedingungen. So kann z.B. die filamentöse Form auf der Suche nach Nährstoffen weit in die Umgebung vordringen, während die Hefeform leicht über den Blutkreislauf im Wirt verbreitet wird (Gancedo, 2001; Zarnack & Feldbrugge, 2007).

Die Weiterleitung eines extrinsischen Signals, welches einen dimorphen Wechsel und die damit verbundenen morphologischen Veränderungen auslöst, geschieht durch die Aktivierung verschiedener Signaltransduktionswege, die eine Änderung der Genexpression bewirken (Madhani & Fink, 1998). Obwohl dimorphe Wechsel durch vielfältige Signale ausgelöst werden, ist an der Weiterleitung dieser Signale in der Regel der cAMP/PKA Signalweg beteiligt (Nadal et al, 2008; Wendland, 2001). Dieser beinhaltet ein Rezeptor-gekoppeltes, heterotrimeres G-Protein, dessen aktivierte α -Untereinheit über eine Aktivierung der Adenylatzyklase die intrazelluläre cAMP-Konzentration steigert (Hoffman, 2005). cAMP aktiviert die cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA), deren Zielproteine Transkriptionsfaktoren im Zellkern sind. So aktiviert die PKA beispielsweise in der einzelligen Knospenhefe *Saccharomyces cerevisiae* bei Stickstoffmangel und gleichzeitiger Anwesenheit von Glucose den Transkriptionsfaktor Flo8, der die Transkription filamentierungsspezifischer Gene aktiviert (Kobayashi et al, 1996; Rupp et al, 1999).

1.1.1 Adhäsion wird durch spezifische Zelloberflächenproteine vermittelt

Pilze haben die Fähigkeit zur Adhäsion an Oberflächen. Generell muss zwischen Zell-Zell- und Zell-Substrat-Adhäsion unterschieden werden. Bei der Zell-Zell-Adhäsion oder „Flokkulation“ adhären viele einzelne Zellen aneinander, was zur Ausbildung großer Zellklumpen oder -flocken führt, die beim Wachstum in Flüssigkultur auf den Boden des Gefäßes herabsinken. Die Flokkulation tritt meistens bei hoher Zelldichte ein, z.B. bei Erreichen der stationären Wachstumsphase, und wird als ein Mechanismus angesehen, Zellen im Inneren des Zellaggregates vor schlechten Umweltbedingungen zu schützen (Verstrepen & Klis, 2006). Bei der Zell-Substrat-Adhäsion findet Adhäsion an eine organische oder abiotische Oberfläche statt. Sie ist z.B. die Grundlage für die Ausbildung eines Biofilms, der ebenfalls Schutz vor äußeren Gegebenheiten bietet oder verhindert, dass Zellen von einem nährstoffreichen Substrat weggewaschen werden (Verstrepen & Klis, 2006). Beide Formen der Adhäsion werden durch exponierte Zelloberflächenproteine, sog. Adhäsine, vermittelt. Diese sind kovalent mit der Zellwand verknüpft und binden spezifisch an Zucker- oder Peptidreste auf der Oberfläche anderer Zellen oder eines Substrates (Verstrepen & Klis, 2006). Die Adhäsion ist keine konstitutive Eigenschaft, sondern ihr Auftreten wird häufig umweltbedingt, z.B. bei Nährstoffmangel oder Stress, ausgelöst (Verstrepen & Klis, 2006). Sie kann unabhängig eines dimorphen Wechsels auftreten, geht jedoch oft mit einem dimorphen Wechsel einher und ist deshalb ebenfalls ein wichtiger Virulenzfaktor (Klein & Tebbets, 2007; Palecek et al, 2002). So exprimieren Zellen des Pilzes *Blastomyces dermatidis* nur in der pathogenen Hefeform ein Adhäsine, welches die Anhaftung sowohl an Makrophagen als auch an das Lungengewebe seines Wirts ermöglicht (Klein & Tebbets, 2007). Viele dimorphe Pilze können auf der Suche nach Nährstoffen auch invasiv in ein Substrat einwachsen. Dazu benötigen sie adhäsive Eigenschaften kombiniert mit dem hochpolarisierten Wachstum der filamentösen Form (Palecek et al, 2002).

1.1.2 Morphologische Veränderungen beim dimorphen Wechsel

Um zwischen einer einzelligen Hefeform und einer hochpolarisierten filamentösen Form zu wechseln, müssen veränderte polarisierte Wachstums- und Zellteilungseigenschaften angenommen werden. Dies ermöglicht es der filamentösen Form, sich effizient in eine definierte Richtung auszubreiten. Beim hefeförmigen Wachstum teilen sich die Zellen durch die Ausbildung eines Teilungsseptums, welches eingeschnürt wird und die Folgezellen vollständig voneinander separiert. Das filamentöse Wachstum ist gekennzeichnet durch eine ausbleibende oder unvollständige Zellseparierung nach der Septierung, so dass die Zellen kettenförmig miteinander verbunden bleiben (Bahler, 2005; Sipiczki, 2007; Wang, 2009). Die

entstehenden Filamente werden als „echte Hyphen“ bezeichnet, wenn es zu keiner Einschnürung des Septums kommt. Bei „Pseudohyphen“ findet eine weitgehende Einschnürung des Septums statt, die Zellen werden jedoch nicht vollständig voneinander separiert und bleiben an schmalen Verbindungsstücken miteinander verbunden (Sipiczki, 2007). Bei beiden Formen kann es an den Septierungsstellen zu Verzweigungen kommen (Amoah-Buahin et al, 2005; Bahler, 2005; Gimeno et al, 1992; Sipiczki et al, 1998a). Der dimorphe Wechsel kann entweder das hyphale oder das pseudohyphale Wachstum beinhalten, bei manchen Organismen wie z.B. *Candida albicans* kommen neben der Hefeform sowohl die hyphale als auch die pseudohyphale Form vor (Bastidas & Heitman, 2009). Am Beispiel des dimorphen Wechsels von *C. albicans* können auch die Änderungen des polarisierten Wachstums beschrieben werden. *C. albicans* teilt sich durch Knospung. In der Hefeform wachsen die Knospen zunächst polarisiert an ihrem distalen Pol, d.h. ihrer Entstehungsstelle gegenüberliegend, und später unpolarisiert isotrop, so dass ovale Zellen entstehen (Berman, 2006). In der filamentösen Form wachsen die Knospen ausschließlich polarisiert an ihrem distalen Pol und elongieren dadurch stark (Berman, 2006). Dieses hochpolarisierte Wachstumsverhalten wird durch eine polarisierte Lokalisierung von Zellpolaritätsproteinen und des Aktin-Zytoskeletts begleitet (Berman, 2006). Generell muss bei einem dimorphen Wechsel die intrinsische Zellpolaritätsmaschinerie in Antwort auf das extrinsische Signal neu positioniert und orientiert werden (Zarnack & Feldbrugge, 2007). Für das Verständnis dieser Vorgänge ist die Spalthefe *Schizosaccharomyces pombe* ein idealer Modellorganismus. Ein dimorpher Wechsel von einer einzelligen Hefeform zu einer filamentösen Form kommt auch bei *S. pombe* vor, doch wurde dort bisher kaum untersucht. Jedoch ist das intrinsische Polaritätssystem der *S. pombe* Hefeform eines der am besten charakterisierten Systeme für das polare Wachstum (Chang & Martin, 2009).

1.2 Polares Wachstum in *S. pombe*

1.2.1 Die Wachstumszonen von *S. pombe*

Die Hefeform von *S. pombe* besitzt eine charakteristische, zylindrische Zellform. Die Zellen wachsen an den gegenüberliegenden Zellenden und teilen sich durch mediale Durchschnürung (Abb. 1). Das Wachstum erfolgt durch die Einlagerung neuen Zellwandmaterials in die bereits bestehende Zellwand. Dies geschieht entweder an den Zellenden oder bei der Teilung in der Zellmitte in Form des Septums. Dementsprechend können drei distinkte Wachstumszonen definiert werden: die beiden Zellenden und die Teilungszone. Die Aktivität dieser Wachstumszonen ändert sich im Verlauf des Zellzyklus (Abb. 1). Die Hauptwachstumsphase von *S. pombe* ist die G2-Phase des Zellzyklus. Die aus der Zellteilung hervorgegangenen Tochterzellen wachsen zu Beginn der G2-Phase zunächst nur monopolar an ihren alten Zellenden, welche schon vor der Zellteilung bestanden haben (Abb. 1) (Mitchison & Nurse, 1985). Erst im weiteren Verlauf der G2-Phase, nachdem die Zellen ca. ein Drittel des Zellzyklus hinter sich gebracht haben, wird auch das neue Zellende als Wachstumszone aktiviert. Dieser Wechsel von monopolarer zu bipolarer Wachstum wird als „new end take off“ (NETO) bezeichnet (Abb. 1) (Mitchison & Nurse, 1985). Die Zellen wachsen fortan bipolar, bis sie eine Länge von 14 μm erreicht haben, und treten dann in die Mitose ein (Fantès, 1977).

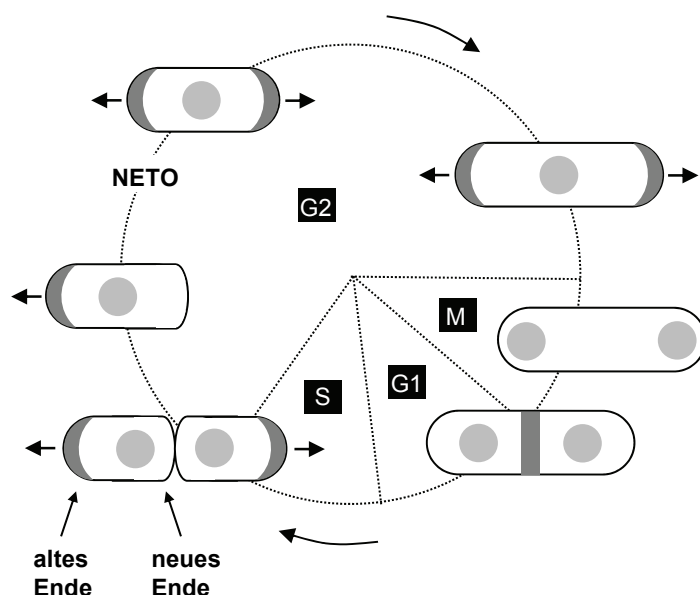


Abbildung 1: Polares Wachstum in der Spalthefe *S. pombe*. In *S. pombe* findet Wachstum entweder an den Zellpolen oder an der Teilungszone statt. Die Aktivität der Wachstumszonen ändert sich im Verlauf des Zellzyklus. Nach der Zytokinese wachsen die Tochterzellen monopolar an den alten Zellenden. An einem bestimmten Punkt in der G2-Phase des Zellzyklus wird das neue Zellende als Wachstumszone aktiviert (NETO), und bipolares Wachstum findet bis zum Eintritt in die Mitose statt. In der späten Mitose wird in der Zellmitte eine andere Wachstumszone ausgebildet, das Teilungsseptum. Dunkelgrau: Wachstumszonen. Hellgrau: Zellkern. Zeichnung verändert nach La Carbona et al, 2006.

Während der Mitose findet kein Wachstum statt. Nach Beendigung der Mitose, in der G1-Phase des Zellzyklus, entsteht eine neue Wachstumszone in der Zellmitte, das Teilungsseptum (Abb. 1). Nach der Zellteilung wird das Wachstum der Tochterzellen dann wieder monopolar an den alten Zellenden aufgenommen. Das polare Wachstum wird durch ein Zusammenspiel des Mikrotubuli- und Aktin-Zytoskeletts, Zellpolaritätsproteinen und der Zellform reguliert (Terenna et al, 2008). Dabei wird das Aktin-Zytoskelett für das Wachstum und die Zellpolarität *per se* benötigt, das Mikrotubuli-Zytoskelett für die Aufrechterhaltung vorhandener und die Positionierung neuer Wachstumszonen, Zellpolaritätsproteine dienen als räumliche Marker für das Aktin- und Mikrotubuli-Zytoskelett und die Zellform beeinflusst die räumliche Organisation des Zytoskeletts (Terenna et al, 2008). Zwischen allen diesen Faktoren existieren zudem eine Vielzahl positiver Rückkopplungsmechanismen (Chang & Martin, 2009; Terenna et al, 2008).

1.2.2 Das Aktin-Zytoskelett kolokalisiert mit den aktiven Wachstumszonen

Das Aktin-Zytoskelett ist essentiell für das Wachstum. Während des gesamten Zellzyklus von *S. pombe* kolokalisiert das Aktin-Zytoskelett mit den aktiven Wachstumszonen (Marks et al, 1986). Anders als in höheren Eukaryoten generiert das Aktin-Zytoskelett in *S. pombe* vermutlich nicht die Kraft für das Zellendwachstum, sondern hat seine hauptsächliche Funktion bei der Endo- und Exozytose (Chang & Martin, 2009; Minc et al, 2009). Dennoch generiert das Aktin-Zytoskelett die Kraft für die Septierung der Zellen bei der Zellteilung (Chang & Martin, 2009). Um diese Funktionen ausführen zu können, sind die Aktinfilamente in drei unterschiedlichen Strukturen organisiert: den Aktinflecken, den Aktinkabeln oder als kontraktiler Aktinring.

Während des Zellendwachstums in der Interphase sind Aktinflecken an den wachsenden Zellenden konzentriert und Aktinkabel verlaufen von den Zellenden in das Zellinnere hinein (Abb. 2A). Aktinflecken bestehen aus verzweigten Aktinfilamenten und einer Vielzahl damit assoziierter Proteine (Moseley & Goode, 2006). Eine essentielle Komponente der Aktinflecken ist der konservierte Arp2/3 Komplex, der für den Aufbau und die Funktion der Aktinflecken benötigt wird (Pollard, 2007). Die Lokalisierung der Aktinflecken an den Zellenden ist abhängig von der Anwesenheit von Zellendmarkerproteinen, die genauen Mechanismen zur Lokalisierung bzw. Bildung der Aktinflecken sind jedoch noch nicht aufgeklärt (Chang & Martin, 2009; Niccoli et al, 2003). An den Zellenden kolokalisieren die Aktinflecken mit den Zellkortexregionen, an denen Endozytose stattfindet, und die Menge der Endozytose korreliert mit der Menge der Aktinflecken an den Zellenden (Gachet & Hyams, 2005). Sie werden für die Internalisierung endozytotischer Vesikel und deren Transport zur

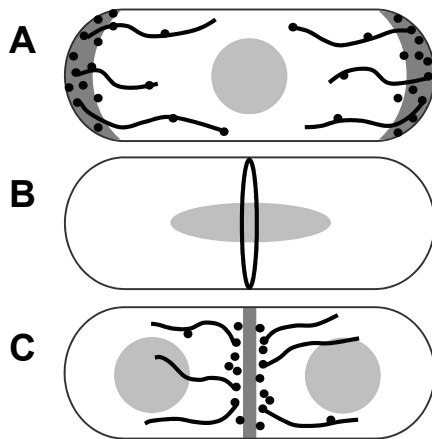


Abbildung 2: Die Organisation des Aktin-Zytoskeletts in *S. pombe*. (A) Während der Interphase sind die Aktinflecken an den wachsenden Zellenden konzentriert. Aktinkabel reichen von den Zellenden in das Zellinnere hinein. (B) Während der Mitose bildet sich ein kontraktiler Aktinring in der Zellmitte aus. (C) Nach Beendigung der Mitose und der Kontraktion des Aktinrings trennt ein Septum die beiden Tochterzellen. Aktinflecken lokalisieren zu beiden Seiten des Septums. Aktinkabel reichen nun von der Zellmitte aus in das Zellinnere hinein. Dunkelgrau, Wachstumszonen. Hellgrau, Zellkern. Zeichnungen verändert nach Chang & Martin, 2009.

Zellvakuole, möglicherweise entlang der Aktinkabel, benötigt (Gachet & Hyams, 2005). Die exakte Funktion der Endozytose für das Wachstum an den Zellpolen ist bisher noch ungeklärt.

Die Aktinkabel sind mit den Aktinflecken assoziiert und bestehen aus parallel gebündelten Aktinfilamenten (Kamasaki et al, 2005). Diese werden durch das Interphasen-Formin For3, welches durch Zellendmarker an die Zellenden rekrutiert wird, ausgebildet (Kap. 1.2.4) (Feierbach & Chang, 2001). Aktinkabel werden durch das Tropomyosin Cdc8 stabilisiert (Arai et al, 1998). Aktinkabel können als ein Schienensystem für den Transport von sekretorischen Vesikeln zu den Zellpolen angesehen werden (Motegi et al, 2001). An den Zellpolen fusionieren diese Vesikel mit der Zellmembran. Sie enthalten Komponenten für die Zellwandneusynthese und die Umgestaltung der Zellwand (La Carbona et al, 2006). Dadurch bestimmt die Ausrichtung der Aktinkabel den Ort des polaren Wachstums. Defekte Komponenten sowohl der Aktinflecken als auch der Aktinkabel führen in der Regel zu einem fast vollständigen Polaritätsverlust und zu ovalen Zellen (Chang & Martin, 2009). Demnach wird das Aktin-Zytoskelett nicht nur für das Wachstum, sondern auch für die Zellpolarität *per se* benötigt.

Während der Mitose wird das Aktin-Zytoskelett von den Zellenden in die Zellmitte rekrutiert, wo zunächst der kontraktile Aktinring geformt wird (Abb. 2B) (Pelham & Chang, 2002). Während dieser Ring kontrahiert, wird die Zellmembran eingezogen und das Septum aus neu synthetisiertem Zellwandmaterial ausgebildet, welches dem kontrahierenden Ring vom Zellkortex ins Zellinnere folgt, wo es sich schließlich vollständig schließt (Wolfe & Gould, 2005). Mit der Formation des Septums lokalisieren Aktinflecken zu beiden Seiten des Septums, und Aktinkabel reichen von dort in das Zelllumen der Folgezellen (Abb. 2C). Die Orientierung der Aktinkabel ist im Vergleich zum Zellendwachstum umgekehrt, so dass sekretorische Vesikel mit Komponenten zur Zellwandneusynthese nun zur Zellteilungszone

transportiert werden können (Kamasaki et al, 2005). Die genaue Funktion der Aktinflecken für die Septierung ist nicht vollständig geklärt, sie werden jedoch, gemeinsam mit den Aktinkabeln, sowohl für die Endozytose als auch für die Exozytose benötigt (Gachet & Hyams, 2005; Gould & Simanis, 1997). Für die räumliche Separierung der aus der Septierung resultierenden Tochterzellen müssen das Septum sowie die das Septum umgebende Zellwand durch Zellwand-hydrolysierende Enzyme abgebaut werden (Sipiczki, 2007). Nach der Zellteilung nehmen die Tochterzellen das Wachstum an den alten Zellenden und später auch am neuen Zellende auf. Für die Positionierung bzw. Aufrechterhaltung der Wachstumszonen an den Zellenden müssen Zellendmarkerproteine zu den Zellenden transportiert werden. Dazu wird das Interphasen-Mikrotubuli-Zytoskelett benötigt.

1.2.3 Die Mikrotubuli transportieren Zellendmarkerproteine zu den Zellenden

In der Interphase des Zellzyklus sind die Mikrotubuli in drei bis fünf Bündeln entlang der zellulären Längsachse organisiert (Abb. 3A) (Hagan & Hyams, 1988). Diese Ausrichtung wird hauptsächlich durch die zylindrische Zellform determiniert (Piel & Tran, 2009; Terenna et al, 2008). Die undynamischen Minus-Enden der Mikrotubuli sind in der Zellmitte antiparallel gebündelt, die dynamischen Plus-Enden polymerisieren von der Zellmitte aus in Richtung der Zellenden (Abb. 3A, B) (Drummond & Cross, 2000). Treffen sie dabei auf den seitlichen Zellkortex auf, werden sie durch einen bisher noch nicht identifizierten Mechanismus zum Zellende hin umgelenkt (Brunner & Nurse, 2000; Grallert et al, 2006). Die Mikrotubuli gehen einen transienten Kontakt mit dem Zellende ein, wobei ihre Polymerisierung stark verlangsamt und zeitweise gestoppt wird (Pausierung), ohne jedoch um das Zellende herumzuwachsen (Drummond & Cross, 2000; Grallert et al, 2006). Anschließend setzt die schnelle Depolymerisierung zurück zur Zellmitte ein (Abb. 3B).

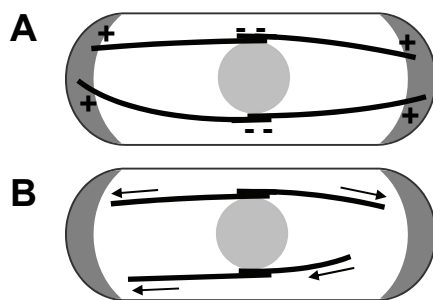


Abbildung 3: Das Interphasen-Mikrotubuli-Zytoskelett in *S. pombe*. (A) Während der Interphase ist das Mikrotubuli-Zytoskelett entlang der zellulären Längsachse organisiert. Die Minus-Enden der Mikrotubuli sind in der Zellmitte antiparallel gebündelt und mit der Kernmembran assoziiert. (B) Die Mikrotubuli unterliegen einem ständigen Wechsel zwischen Polymerisierung der Plus-Enden in Richtung der Zellenden und Depolymerisierung zurück zur Zellmitte. +, Plus-Ende. -, Minus-Ende. Dunkelgrau, Wachstumszonen. Hellgrau, Zellkern.

Die Dynamik und Stabilität der Mikrotubuli wird durch Mikrotubuli-assoziierte Proteine reguliert. Unter ihnen ist die Gruppe der präferentiell am Mikrotubuli-Plus-Ende lokalisierten Proteine (+TIPs), der verschiedene, konservierte Proteinfamilien angehören (Akhmanova & Steinmetz, 2008). In *S. pombe* sind die Proteine Mal3, Tip1 und Peg1 jeweils Mitglieder der EB-, CLIP170- bzw. CLASP-Proteinfamilien der +TIPs. Sie interagieren physikalisch miteinander, lokalisieren und funktionieren jedoch weitgehend unabhängig voneinander (Beinhauer et al, 1997; Busch & Brunner, 2004; Grallert et al, 2006). Mal3 und Tip1 üben einen stabilisierenden Einfluss auf die Mikrotubuli aus (Beinhauer et al, 1997; Brunner & Nurse, 2000; Busch & Brunner, 2004; Grallert et al, 2006). *In vitro* Analysen zeigen für Mal3, dass es die Rate der Mikrotubuli-Depolymerisierung reduziert und die Frequenz der „Rettungs“-Ereignisse, d.h. der erneuten Polymerisierung der Mikrotubuli, erhöht (Katsuki et al, 2009). Der Defekt oder Verlust von Mal3 oder auch von Tip1 führt demnach zu stark verkürzten Mikrotubuli, die das Zellende nicht mehr erreichen und frühzeitig im Zytoplasma oder am seitlichen Zellkortex depolymerisieren (Beinhauer et al, 1997; Busch & Brunner, 2004; Grallert et al, 2006). Im Gegensatz dazu übt Peg1 wahrscheinlich einen destabilisierenden Einfluss auf die Mikrotubuli aus, da es für die Verlangsamung und Pausierung der Mikrotubuli-Polymerisierung während des transienten Kontakts mit dem Zellende und die anschließende Depolymerisierung benötigt wird, wenngleich andere Studien Peg1 auch stabilisierende Funktionen zuordnen (Bratman & Chang, 2007; Grallert et al, 2006).

Die Mikrotubuli transportieren die Zellendmarkerproteine Tea1 und Tea4 zu den Zellenden. Tea1 ist ein „kelch repeat“ Protein, das außerdem Homologie zur Ezrin-Radixin-Moesin (ERM) Proteinfamilie aufweist (Goode et al, 2000; Mata & Nurse, 1997). In vielen Organismen binden „kelch repeat“ Proteine an Aktinfilamente oder werden für den Aufbau zellulärer Aktinstrukturen benötigt (Goode et al, 2000). ERM-Proteine verbinden Transmembranproteine mit dem Zytoskelett (Fehon et al, 2010; Niccoli et al, 2003). Tea4 gehört zu den SH3-Domänen-Proteinen, welche Protein-Protein-Interaktionen vermitteln (Martin et al, 2005; Reijntj et al, 2010; Tatebe et al, 2005). Der Transport von Tea1 und Tea4 geschieht durch die Zusammenarbeit der Proteine Mal3, Tip1 und des Motorproteins Tea2 (Browning et al, 2003; Busch et al, 2004). Tea2 ist ein Kinesin, welches sich aktiv entlang der Mikrotubuli zu den Plus-Enden bewegt (Browning & Hackney, 2005). Mal3 rekrutiert Tea2 und Tip1 zu den Mikrotubuli, und Tea2 transportiert Tip1 zu den Mikrotubuli-Plus-Enden (Browning & Hackney, 2005; Browning et al, 2003; Busch et al, 2004; Martin, 2009). Dabei interagieren wahrscheinlich sowohl Tip1 als auch Tea2 mit Tea1 und Tea4 (Martin, 2009). Auf diese Weise werden Tea1 und Tea4 mit den wachsenden Mikrotubuli-Plus-Enden zu den Zellpolen transportiert und dort „abgeladen“, wo sie weitere Zellpolaritätsfaktoren und Komponenten des Aktin-Zytoskeletts rekrutieren, um das polare

Zellendwachstum zu initiieren oder aufrechtzuerhalten (Martin, 2009). Tea1 am Zellende spielt auch eine Rolle dabei, die Depolymerisierung der Mikrotubuli am Zellende zu regulieren und kontrolliert somit seine eigene Lokalisierung (Mata & Nurse, 1997; Niccoli et al, 2003). Defekte des Mikrotubuli-Zytoskeletts können zu einer falschen Positionierung der Wachstumszonen und zu aberranten Zellformen wie gebogenen oder T-förmigen Zellen führen, führen aber nicht zu einem generellen Polaritätsverlust, wie es bei Defekten des Aktin-Zytoskeletts der Fall ist (Chang & Martin, 2009). Auch der Verlust der Zellendmarker führt nicht zu einem Verlust der Zellpolarität. Zellen, in denen das nicht-essentielle *tea1⁺* Gen deletiert wurde (*tea1Δ*), zeigen jedoch zwei spezifische Phänotypen. Zum einen beginnen nicht beide Tochterzellen nach der Zytokinese das Wachstum an ihren alten Zellenden. Nur die Tochterzelle, deren altes Ende schon in der Wachstumsphase der Mutterzelle das wachsende Ende war, wächst nach der Zytokinese ebenfalls an ihrem alten Zellende. Die andere Tochterzelle wählt stattdessen das Zellende aus, an dem zuletzt das Aktin-Zytoskelett lokalisiert war (Abb. 4) (Glynn et al, 2001; Niccoli et al, 2003). Zum anderen sind die Zellen nicht in der Lage, im Verlauf ihrer Wachstumsphase das bipolare Zellwachstum zu initiieren (Abb. 4). Tea1 ist somit für das NETO-Ereignis und die Ausbildung einer neuen Wachstumszone essentiell (Glynn et al, 2001).

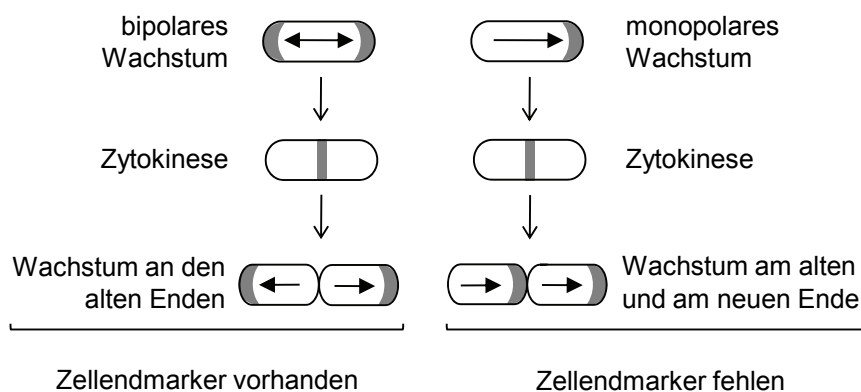


Abbildung 4: Allgemeine Darstellung des polaren Wachstums bei anwesenden oder fehlenden Zellendmarkern. Bei Vorhandensein von Zellendmarkern initiieren die Zellen während ihrer Wachstumsphase das bipolare Zellwachstum und wachsen nach der Zytokinese zuerst monopolar an den alten Zellenden. Zellen ohne Zellendmarker sind nicht in der Lage, das bipolare Zellwachstum zu initiieren und wachsen monopolar bis zum Eintritt in die Mitose. Nach der Zytokinese findet das Wachstum an den Zellenden statt, die schon in der vorherigen Wachstumsphase gewachsen sind. Wurde ein solches Ende nicht vererbt, findet das Wachstum an dem Ende statt, an dem zuletzt eine Wachstumszone vorhanden war. Horizontale Pfeile geben die Wachstumsrichtung der Zellen an. Die Wachstumszonen sind grau hervorgehoben.

1.2.4 Der Wechsel von mono- zu bipolarem Wachstum

Die an der Ausbildung einer zweiten Wachstumszone am neuen Zellende und der Initiierung des bipolaren Zellwachstums (NETO) beteiligten Proteinen können in drei Kategorien eingeordnet werden: Zellendmarkerproteine, Proteinkinasen und Regulatoren des Aktin-Zytoskeletts (Martin & Chang, 2005; Moseley & Nurse, 2009). Nach dem aktuellen Verständnis steht der Tea1-Tea4-Komplex im Zentrum dieser Regulation. Nachdem dieser Komplex durch die Mikrotubuli-Plus-Enden zum Zellende transportiert wurde, wird Tea1 durch seinen Rezeptor, das prenylierte Membranprotein Mod5, am Zellkortex verankert (Abb. 5) (Snaith & Sawin, 2003). Am Zellende rekrutiert der Tea1-Tea4 Komplex eine Vielzahl weiterer Polaritätsfaktoren. Darunter befinden sich Regulatoren der konservierten Rho GTPase Cdc42 mit einer essentiellen Funktion für das polarisierte Wachstum (Miller & Johnson, 1994). Rho GTPasen sind kleine GTPasen der Ras Superfamilie, die als „molekulare Schalter“ angesehen werden, da sie zwischen einer aktiven, GTP-gebundenen Form und einer inaktiven, GDP-gebundenen Form zirkulieren. Ihre Aktivität wird durch sog. „guanine-exchange factors“ (GEFs) positiv und „GTPase-activating proteins“ (GAPs) negativ reguliert (Iden & Collard, 2008). Die Kinase Pom1, ein Mitglied der DYRK „dual specificity“ Familie, die regulatorische Funktionen beim Zellwachstum und der Entwicklung hat, wird durch den Tea1-Tea4-Komplex ans Zellende rekrutiert (Bahler & Nurse, 2001; Bahler & Pringle, 1998; Becker & Joost, 1999; Behrens & Nurse, 2002). Pom1 verhindert die Lokalisierung des Cdc42 GAPs am Zellende und bewirkt so die Aktivierung von Cdc42 (Abb. 5) (Tatebe et al, 2008). Der Tea1-Tea4-Komplex rekrutiert außerdem das Interphasen-Formin For3 und das Aktin-Monomer bindende Protein Bud6 (Feierbach et al, 2004; Glynn et al, 2001). For3 wird durch die gemeinsame Aktivität von Bud6 und Cdc42 aktiviert, woraufhin es zur Ausbildung von Aktinkabeln kommt und der Vesikeltransport zum neuen Zellende stattfinden kann (Abb. 5) (Martin et al, 2007). Noch ist unklar, auf welche Weise die Bildung von Aktinflecken am neuen Zellende reguliert wird. Neben den genannten Proteinen wurde für viele weitere Proteine eine Beteiligung an NETO demonstriert, die z.B. für die Lokalisierung von Tea1-Tea4, die Aktivierung von Cdc42, die Aktinrekrutierung oder den Zellwandauf- und -umbau benötigt werden.

Das initiierende Signal für NETO wurde bisher nicht identifiziert. Die Lokalisierung des Tea1-Tea4-Komplexes selbst kann kein solches Signal sein, da diese Proteine auch während der monopolen Wachstumsphase an beiden Zellenden lokalisieren (Martin et al, 2005; Mata & Nurse, 1997; Tatebe et al, 2005). Eine Voraussetzung für NETO ist jedoch die Vervollständigung der DNA-Replikation bzw. der Abschluss der S-Phase des Zellzyklus und das Erreichen einer kritischen Zelllänge (Mitchison & Nurse, 1985). Dies aktiviert möglicherweise einen Signalweg, ausgehend von Zellzyklusregulatoren, der zur Initiierung

von NETO führt (Chang & Martin, 2009; Martin & Chang, 2005; Moseley & Nurse, 2009). Vieles deutet darauf hin, dass Phosphorylierungsereignisse eine wichtige Rolle bei der Initiierung von NETO spielen. So besitzt z.B. das Cdc42 regulierende GAP eine perfekte Konsensussequenz für die Phosphorylierung durch eine Zyklin-abhängige Kinase (Moseley & Nurse, 2009). Desweiteren wird Tea1 *in vitro* und vermutlich auch *in vivo* durch einen Cdc42 Effektor phosphoryliert und dadurch möglicherweise reguliert (Kim et al, 2003). Die Aktivität der Pom1 Kinase ist ebenfalls zellzyklusreguliert, und monopolar wachsende Zellen haben eine geringere Pom1 Kinaseaktivität als bipolar wachsende Zellen (Bahler & Nurse, 2001).

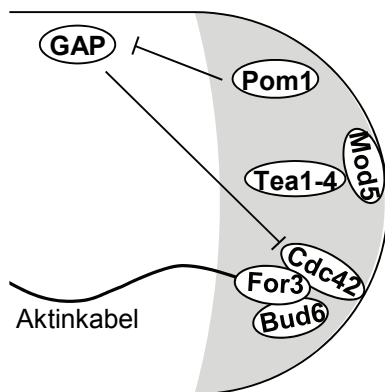


Abbildung 5: Aufbau einer neuen Wachstumszone vermittelt durch den Tea1-Tea4-Komplex. Am Zellende wird der Tea1-Tea4-Komplex durch das Membranprotein Mod5 verankert und rekrutiert weitere Polaritätsfaktoren, darunter das Aktin-Monomer bindende Protein Bud6 und das Interphasen-Formin For3. Die Pom1 Kinase inhibiert die Lokalisierung des GAPs der Rho GTPase Cdc42 und bewirkt so deren Aktivierung am Zellende. Aktives Cdc42 aktiviert gemeinsam mit Bud6 das Formin For3 und es kommt zur Ausbildung von Aktinkabeln. Die Wachstumszone ist grau hervorgehoben. Zeichnung verändert nach Martin, 2009.

1.2.5 Der dimorphe Wechsel von *S. pombe*

S. pombe kommt unter den normalen Laborbedingungen, bei Wachstum in Flüssigkultur oder auf festem Nährboden, fast ausschließlich in der einzelligen Hefeform vor. Doch bereits in der ersten Beschreibung von *S. pombe* kommen sowohl hyphale als auch pseudohyphale Strukturen vor (Lindner, 1893). Unter Laborbedingungen wurde der dimorphe Wechsel von der einzelligen Hefeform zu einer filamentösen Form, die invasiv in das feste Nährmedium einwächst, bei hohen extrazellulären Eisenkonzentrationen oder Stickstoffmangel beobachtet (Amoah-Buahin et al, 2005; Mitsuzawa, 2006; Prevorovsky et al, 2009). Am invasiven Wachstum ist außerdem der cAMP/PKA Signalweg beteiligt (Amoah-Buahin et al, 2005). In einer aktuellen Studie wurden mittels einer *S. pombe* Gendelektionsbank 12 Gene identifiziert, die für das invasive Wachstum essentiell sind, darunter das Gen kodierend für das Formin For3 (Dodgson et al, 2009). In dieser Studie wurde außerdem gezeigt, dass die Mikrotubuli-assoziierten +TIPs Mal3 und Tip1, das Kinesin Tea2 oder die Zellendmarker Tea1 und Tea4 nicht für das invasive Wachstum benötigt werden (Dodgson et al, 2009). Darüberhinaus

wurde die filamentöse Form von *S. pombe* bisher nicht charakterisiert. In dieser Arbeit wurde das Asp1 Protein als ein Regulator sowohl des Wechsels von mono- zu bipolarem Wachstum als auch des dimorphen Wechsels identifiziert. Asp1 ist ein Mitglied der evolutionär konservierten Vip1 1/3 Inositolpolyphosphatkinase Proteinfamilie, die für die Generierung spezifischer Inositolpyrophosphate benötigt wird.

1.3 Inositolpyrophosphate sind mögliche intrazelluläre Signalmoleküle

1.3.1 Der Inositolpyrophosphat-Metabolismus

Inositolphosphate sind kleine, zytosolische Moleküle, deren Ursprung das *myo*-Inositol ist (Abb. 6A). *myo*-Inositol ist eine Komponente der Inositolphospholipide zytoplasmatischer Membranen und kommt dort unter anderem als Phosphatidylinositol-(4,5)-Bisphosphat (PIP₂) vor (Di Paolo & De Camilli, 2006). Die Hydrolyse von PIP₂ durch die Phospholipase C führt zur Freisetzung von Ins(1,4,5)P₃, welches durch verschiedene Enzyme schrittweise zur Phytalsäure Ins(1,2,3,4,5,6)P₆ (Inositolhexakisphosphat, InsP₆) phosphoryliert werden kann, bei der alle sechs Kohlenstoffatome des Inositolrings kovalent mit einer Phosphatgruppe verknüpft sind (Bhandari et al, 2007a; Burton et al, 2009). InsP₆ kann nun durch die Addition zusätzlicher Phosphatgruppen zu PP-InsP₅ (Diphosphoinositolpentakisphosphat, InsP₇) oder (PP)₂-InsP₄ (Bis-Diphosphoinosiltetrakisphosphat, InsP₈) „pyrophosphoryliert“ werden. Da die unterschiedlichen Inositolphosphate erst nach und nach identifiziert wurden und es eine hohe Anzahl an Varianten gibt, fehlt bisher eine eindeutige Nomenklatur (Shears, 2009). Zur Vereinfachung werden die relevanten Moleküle in dieser Arbeit als „IP₆“, „IP₇“ und „IP₈“ sowie IP₇ und IP₈ als „Inositolpyrophosphate“ bezeichnet. Inositolpyrophosphate werden durch die Aktivität zweier konservierter Proteinfamilien gebildet, die jeweils verschiedene IP₇ Isomere generieren und gemeinsam für die Generierung von IP₈ benötigt werden (Abb. 6B). Die „klassische“ Familie der sog. IP₆ Kinasen (IP6Ks) fügt eine zweite Phosphatgruppe an Position 5 des Inositolrings an und generiert 5-IP₇ (Abb. 6B, C). 5-IP₇ ist das hauptsächlichste IP₇ Isomer in Säugerzellen (Albert et al, 1997). Der Verlust der *S. cerevisiae* IP6K Kcs1 führt zu einer mehr als 80%igen Reduktion der IP₇ Gesamtmenge in diesen Zellen (Saiardi et al, 2000). Daher wird 5-IP₇ als das überwiegende IP₇ Isomer angesehen. Daneben gibt es das 1-IP₇ oder 3-IP₇ (Abb. 6C). Da diese beiden Isomere enantiomerisch sind, konnte bisher nicht zwischen ihnen unterschieden werden (Lin et al, 2009). 1/3-IP₇ wird durch die erst kürzlich identifizierte Vip1 1/3 Inositolpolyphosphat Kinasefamilie (1/3 Kinasefamilie) generiert, die später eingehender beschrieben wird (Kap. 1.3.4) (Choi et al, 2007; Fridy et al, 2007; Lin et al, 2009; Mulugu et al, 2007). Da die 5-IP₇ und 1/3-IP₇ Moleküle das

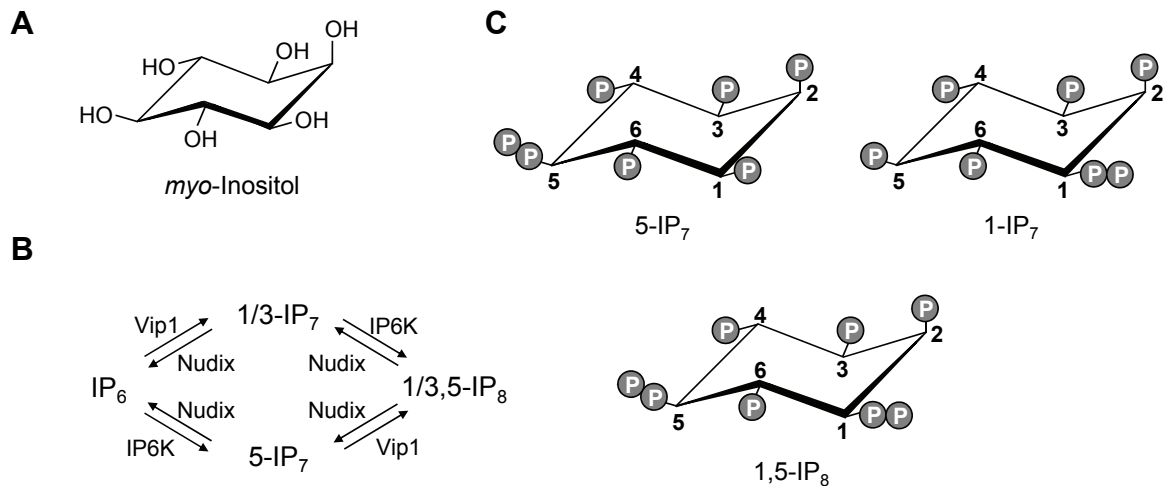


Abbildung 6: Darstellung und Bildung von Inositolpyrophosphaten. (A) Schematische Darstellung des *myo*-Inositols in der thermodynamisch bevorzugten Sesselkonformation. (B) Bildungsweg der Inositolpyrophosphate ausgehend von IP_6 . Die IP6K Familie phosphoryliert IP_6 an Position 5 des Inositolrings zu $5-IP_7$, die Vip1 1/3 Kinasefamilie phosphoryliert IP_6 an Position 1 oder 3 zu $1/3-IP_7$. Die gemeinsame Aktivität der IP6Ks und Vip1 1/3 Kinasen führt zur Bildung von $1/3,5-IP_8$. Nudix-Hydrolasen dephosphorylieren $5-IP_7$, $1/3-IP_7$ und $1/3,5-IP_8$. (C) Schematische Darstellung von $5-IP_7$, $1/3-IP_7$ (am Beispiel von $1-IP_7$) und $1/3,5-IP_8$ (am Beispiel von $1,5-IP_8$). P = Phosphatgruppe. Zeichnung verändert nach Shears, 2009.

Pyrophosphat an unterschiedlichen Positionen des Inositolrings tragen, unterscheiden sie sich hinsichtlich ihrer chemischen Struktur und Funktion. Die IP6Ks und 1/3 Kinasen können das IP_7 Isomer der jeweils anderen Kinase als Substrat nutzen und somit $1/3,5-IP_8$ generieren (Abb. 6B, C). Eine weitere Proteinfamilie, die ebenfalls am Inositolpyrophosphat-Metabolismus beteiligt ist, sind die sog. Nudix-Hydrolasen, die die β -Phosphate des Pyrophosphates abspalten und IP_7 zu IP_6 und IP_8 zu IP_7 dephosphorylieren (Abb. 6B) (McLennan, 2006; Safrany et al, 1998; Safrany et al, 1999; Shears, 2009). Somit kann der Inositolpyrophosphat-Metabolismus als ein Zyklus der Phosphorylierung und Dephosphorylierung dieser Moleküle angesehen werden. Die Inhibierung der Nudix-Hydrolasen durch Fluorid führt zu einer vielfachen Erhöhung der intrazellulären Inositolpyrophosphat-Menge. Auf diese Weise konnte gezeigt werden, dass in Säugerzellen je nach Zelltyp bis zu 50% des IP_6 Reservoirs stündlich zu Inositolpyrophosphaten umgesetzt wird; ebenso wurde berechnet, dass auch der IP_7 Bestand in einer 40 minütigen Zeitspanne zehnmals umgesetzt wird (Bennett et al, 2006; Burton et al, 2009; Glennon & Shears, 1993; Menniti et al, 1993; Shears, 2009). Dennoch ist die intrazelluläre Konzentration der Inositolpyrophosphate relativ gering. In Säugerzellen liegt die Konzentration von IP_6 bei ca. 10-60 μM , während die IP_7 Gesamtkonzentration nur 1-5 μM beträgt; die IP_8 Konzentration wiederum erreicht nur 10-20% der IP_7 Gesamtkonzentration (Bennett et al, 2006; Burton et al, 2009; Menniti et al, 1993; Saiardi et al, 2000; Shears, 2009). Die IP_6 und IP_7

Konzentrationen in Hefezellen sind vergleichbar denen in Säugerzellen, jedoch ist die IP₈ Konzentration in *S. pombe* und in *S. cerevisiae* ca. 1,5 - 2fach höher als die jeweiligen IP₇ Gesamtkonzentrationen (Ingram et al, 2003; Saiardi et al, 2000). Der hohe Umsatz der Inositolpyrophosphate führte zu der Vermutung, dass es sich bei ihnen um intrazelluläre Signalmoleküle handelt (Burton et al, 2009; Shears, 2009). Viele Studien zeigen, dass die intrazelluläre Inositolpyrophosphat-Konzentration durch verschiedene extrazelluläre Stimuli verändert wird.

1.3.2 Sind Inositolpyrophosphate intrazelluläre Signalmoleküle?

Der Schleimpilz *Dictyostelium discoideum* ist eine einzellige Amöbe, die sich von Bakterien ernährt. In Hungerphasen setzen die Zellen cAMP frei, das als Lockstoff andere Zellen chemotaktisch anlockt um eine Zellaggregatbildung einzuleiten (King & Insall, 2009). Es konnte gezeigt werden, dass im Verlauf der Zellaggregatbildung die intrazelluläre IP₇ Menge um das 10fache, die IP₈ Menge um das 20 - 30fache ansteigt (Laussmann et al, 2000; Luo et al, 2003). Hierbei muss allerdings beachtet werden, dass die Inositolpyrophosphat-Konzentrationen in *D. discoideum* bereits unter nährstoffreichen Bedingungen 10fach höher sind als in Hefe- oder Säugerzellen, und dass *D. discoideum* teilweise andere IP₇ bzw. IP₈ Isomere generiert (Albert et al, 1997; Laussmann et al, 2000). Ähnliche Beobachtungen wurden auch bei *S. cerevisiae* Zellen gemacht, in denen die intrazelluläre IP₇ Konzentration unter Phosphatmangelbedingungen deutlich ansteigt (Lee et al, 2007). Wie im folgenden Kapitel näher beschrieben wird, ist das spezifische 1/3-IP₇ Isomer an der Phosphathomöostase beteiligt (Lee et al, 2007; Nishizawa et al, 2008). Zellen reagieren auch unter Stresskonditionen mit einer Veränderung der intrazellulären Inositolpyrophosphat-Konzentration. In bestimmten Humanzellen führt osmotischer Stress zu einem Anstieg der IP₈ Konzentration (Choi et al, 2007; Pesesse et al, 2004). Dabei wird vermutet, dass eine humane 1/3 Kinase unter diesen Bedingungen aktiviert wird (Choi et al, 2007). Eine andere Studie zeigt, dass in *S. cerevisiae* die Inositolpyrophosphat-Gesamtmenge bei oxidativem Stress in Form von H₂O₂ erniedrigt wird (Onnebo & Saiardi, 2009). Aufgrund dieser und anderer Befunde wird vermutet, dass Inositolpyrophosphate eine neue Form von intrazellulären Botenstoffen darstellen, die extrinsische oder intrinsische Signale innerhalb der Zelle weiterleiten (Burton et al, 2009; Shears, 2009). Obwohl die genaue Funktion der Inositolpyrophosphate noch nicht identifiziert wurde, wurden für sie zwei verschiedene Funktionsweisen beschrieben, mit denen sie ihre Rolle als mögliche Signalmoleküle wahrnehmen könnten.

1.3.3 Für Inositolpyrophosphate wurden zwei verschiedene Funktionsweisen beschrieben

Bei den Inositolpyrophosphaten handelt es sich um sehr energiereiche Moleküle mit erheblichen elektrostatischen und sterischen Zwängen. Bei der Hydrolyse der Pyrophosphatbindung entsteht daher eine hohe freie Energie, die mit der ATP-Hydrolyse vergleichbar ist (Burton et al, 2009; Laussmann et al, 1996; Shears, 2009). Deshalb wird vermutet, dass Inositolpyrophosphate bei Phosphotransfer-Reaktionen als Phosphatdonor dienen. *In vitro* Studien konnten zeigen, dass Inositolpyrophosphate bestimmte Zielproteine direkt, d.h. in nicht-enzymatischer Weise, phosphorylieren können (Bhandari et al, 2007b; Saiardi et al, 2004). Bei den untersuchten Proteinen handelt es sich vor allem um nukleoläre Proteine. Die Zielproteine müssen zuvor an einem bestimmten Serin-Rest primär phosphoryliert werden (Bhandari et al, 2007b). Inositolpyrophosphate können dann ein β -Phosphat auf das primäre Phosphat übertragen und das Zielprotein „pyrophosphorylieren“ (Bhandari et al, 2007b; Saiardi et al, 2004). Da diese Funktion jedoch *in vivo* bisher nicht nachgewiesen werden konnte, ist die physiologische Relevanz umstritten (Shears, 2009; Yang et al, 2008; York & Hunter, 2004). Eine andere Funktion von Inositolpyrophosphaten konnte spezifisch für 1/3-IP₇ nachgewiesen werden, welches in *S. cerevisiae* abhängig von der Verfügbarkeit anorganischen Phosphates die Aktivität der Zyklin-abhängigen Kinase Pho85 reguliert (Lee et al, 2008; Lee et al, 2007). Unter Phosphat-reichen Bedingungen ist der Pho85-Komplex aktiv und inaktiviert den Transkriptionsfaktor Pho4 (Huang et al, 2007). Bei Phosphatmangel bindet 1/3-IP₇ reversibel an den Pho85-Komplex und vermittelt die Inhibierung von Pho85 (Lee et al, 2008). Der Transkriptionsfaktor Pho4 liegt dann aktiv vor und bewirkt die Transkription der sog. *PHO* Gene, die für die Anpassung an Phosphatmangelbedingungen benötigt werden (Huang et al, 2007). Damit ist eine direkte Verbindung zwischen einem spezifischen Inositolpyrophosphat und der Anpassung an Umweltbedingungen gegeben.

1.3.4 Die Vip1 1/3 Inositolpolyphosphat Kinasefamilie

Die konservierte Vip1 1/3 Inositolpolyphosphat Kinasefamilie wurde zuerst in *S. cerevisiae* beschrieben und nach dem entsprechenden *S. cerevisiae* Protein benannt, welches schon zuvor den Namen Vip1 trug (Mulugu et al, 2007). Da 1/3-IP₇ weniger als 20% der IP₇ Gesamtmenge ausmacht, gelang die Aufdeckung dieses IP₇ Isomers und der 1/3 Kinasefamilie nur in einem Stammhintergrund, in dem die Gene kodierend für die IP6K Kcs1 und die Nudix-Hydrolase Ddp1 deletiert waren (Mulugu et al, 2007). 1/3 Kinasen finden sich in allen eukaryotischen Organismen, in menschlichen Zellen und in Mäusezellen existieren

zwei Familienmitglieder (Choi et al, 2007; Fridy et al, 2007; Mulugu et al, 2007). Charakteristisch für die 1/3 Kinasen ist ihre Zweidomänenstruktur (Abb. 7). N-terminal gelegen befindet sich eine hoch-konservierte „rimK/ATP-grasp“ Superfamiliendomäne, d.h. eine ATP-Bindedomäne mit Homologie zum *E. coli* RimK Protein (Galperin & Koonin, 1997). Diese Kinasedomäne bindet ATP und katalysiert die Phosphorylierung von IP₆ zu 1/3-IP₇ bzw. von 5-IP₇ zu 1/3,5-IP₈ *in vitro* (Choi et al, 2007; Fridy et al, 2007; Lin et al, 2009; Mulugu et al, 2007). Es wird vermutet, dass zumindest in Säugerzellen *in vivo* präferentiell 5-IP₇ als Substrat verwendet bzw. 1/3,5-IP₈ gebildet wird, wenngleich sowohl in Säugerzellen als auch in Hefe *in vivo* ebenso IP₆ als Substrat verwendet bzw. 1/3-IP₇ gebildet wird (Choi et al, 2007; Fridy et al, 2007; Lin et al, 2009; Mulugu et al, 2007; Shears, 2009). Der C-Terminus der 1/3 Kinasen beinhaltet eine ebenfalls konservierte saure Histidin-Phosphatasedomäne (Abb. 7). Diese Domäne kommt in sog. Phytasen vor, welche die Phytalsäure IP₆ spalten und anorganische Phosphate und Inositolphosphate freisetzen (Mullaney & Ullah, 2003). Eine enzymatische Funktion dieser Domäne bei der 1/3 Kinasefamilie konnte jedoch bisher nicht nachgewiesen werden (Choi et al, 2007; Fridy et al, 2007; Mulugu et al, 2007). Saure Histidin-Phosphatasedomänen weisen zwei Sequenzmotive auf, die die Aminosäureabfolgen **RHXXR** bzw. **HD** mit den invariablen katalytischen Resten (fett gedruckt) beinhalten, wobei der Aspartat-Rest des zweiten Sequenzmotivs in der Enzymreaktion als Protonendonator dient (Fridy et al, 2007). Diese Aminosäureabfolgen sind auch bei der 1/3 Kinasefamilie konserviert, mit Ausnahme des Aspartat-Restes, welcher durch Isoleucin, Valin oder Alanin ersetzt ist und ein Grund für eine fehlende enzymatische Aktivität sein könnte (Fridy et al, 2007). Es wird spekuliert, dass die C-terminale Domäne stattdessen eine regulatorische Funktion haben könnte (Fridy et al, 2007; Shears, 2009).

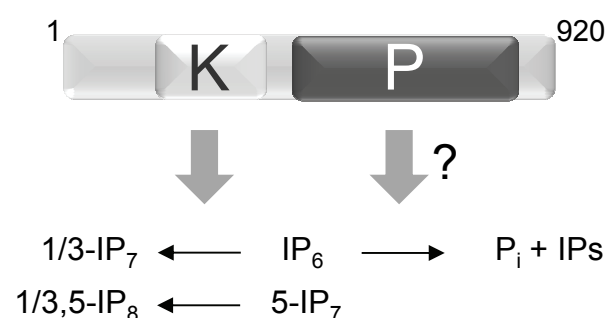


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Vip1 1/3 Inositolpolyphosphat Kinasefamilie mit der N-terminalen „rimK/ATP-grasp“ Superfamiliendomäne (enzymatisch aktive Kinasedomäne, „K“) und der C-terminalen Domäne mit Homologie zu sauren Histidin-Phosphatasen (putative Phosphatasedomäne, „P“) am Beispiel des 920 Aminosäuren umfassenden *S. pombe* Familienmitglieds Asp1. Die Pfam-Datenbank (pfam.sanger.ac.uk/) gibt für die N- bzw. C-terminalen Asp1 Domänen die Aminosäuren 214-354 bzw. 387-861 an. Die Kinasedomäne phosphoryliert IP₆ zu 1/3-IP₇ und 5-IP₇ zu 1/3,5-IP₈. Die putative Phosphatasedomäne hydrolysiert möglicherweise IP₆ zu anorganischen Phosphaten (P_i) und Inositolphosphaten (IPs), eine enzymatische Aktivität dieser Domäne wurde aber bisher nicht nachgewiesen.

1.4 Zielsetzung dieser Arbeit

Das polarisierte Wachstum von *S. pombe* wird durch intrinsische Signale via dem Mikrotubuli- und Aktin-Zytoskelett sowie durch extrinsische Signale reguliert. Daran beteiligt sind das Mikrotubuli-assoziierte Mal3 Protein, das für die Stabilität des Mikrotubuli-Zytoskeletts benötigt wird, sowie das Arp3 Protein, eine essentielle Komponente des Aktin-Zytoskelett assoziierten Arp2/3 Komplexes. Die *S. pombe* 1/3 Inositolpolyphosphatkinase Asp1 wird durch das *asp1*⁺ Gen kodiert, welches ursprünglich als extragener Multikopie-Suppressor der Phänotypen eines *arp3* Mutantenstammes isoliert wurde (Feoktistova et al, 1999). Als 1/3 Kinase weist Asp1 die Zweidomänenstruktur mit einer N-terminalen Kinasedomäne und einer C-terminalen putativen Phosphatasedomäne (im Folgenden als Phosphatasedomäne bezeichnet) auf (Mulugu et al, 2007). Eine weitere Überexpressionsanalyse zeigte, dass die Funktion der Asp1 Kinasedomäne für die phänotypische Suppression des *arp3* Mutantenstammes ausreichend ist (Mulugu et al, 2007). In unserem Labor wurde ein *asp1* Genfragment als extragener Multikopie-Suppressor der Phänotypen eines *mal3* Mutantenstammes isoliert (Vietmeier-Decker, 2004). Dieses Fragment kodiert für eine C-terminal verkürzte Asp1 Variante, der ein Teil der Phosphatasedomäne fehlt. Weitere Überexpressionsanalysen zeigten, dass auch im Falle von *mal3* Mutantenstämmen die Funktion der Kinasedomäne für die phänotypische Suppression ausreichend ist, während die Überexpression des Vollängen Asp1 Proteins dazu nicht in der Lage ist. Demnach musste die Phosphatasedomäne zur Funktion des Asp1 Proteins beitragen, so dass der Verlust ihrer Funktion zu veränderten Phänotypen führt.

Um die Funktion des Asp1 Proteins vollständig zu analysieren, sollten in dieser Arbeit Mutantenstämme erzeugt werden, die unter physiologischen Bedingungen spezifische Asp1 Varianten exprimieren, bei denen entweder die Kinasedomäne oder die Phosphatasedomäne inaktiviert ist. Dadurch sollten deren jeweilige Funktionen voneinander entkoppelt und separat exprimiert werden. Mithilfe dieser Asp1 Varianten sollte untersucht werden, welche Rolle das Asp1 Protein beim polaren Wachstum von *S. pombe* spielt. Dazu sollte beantwortet werden, welchen Einfluss es auf verschiedene Komponenten des internen Polaritätssystems und die Ausbildung der Wachstumszonen hat. Von besonderem Interesse war die Identifizierung von Asp1 als essentieller Faktor für den dimorphen Wechsel von *S. pombe* zur filamentösen Wachstumsform. Daher sollte die Rolle von Asp1 bei dieser Regulation näher bestimmt werden. Dabei stellte sich auch die Frage, ob 1/3 Kinasen eine konservierte Funktion bei der Regulation dimorpher Wechsel haben. Da das filamentöse Wachstum von *S. pombe* bisher nicht charakterisiert wurde, sollte eine Charakterisierung hinsichtlich des polaren Wachstumsverhaltens durchgeführt werden. Schließlich sollte

anhand der phänotypischen Analyse der *asp1* Mutantenstämme die bisher noch unbekannte Funktion der Asp1 Phosphatasedomäne aufgeklärt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden von folgenden Herstellern bezogen:

Chemikalie	Hersteller	Chemikalie	Hersteller
4-Nitrophenylphosphat	Sigma-Aldrich	Kanamycin	Sigma-Aldrich
8-Br-cAMP	Sigma-Aldrich	Kongorot	Sigma-Aldrich
Acrylamid (37,5:1)	Roth	Latrunculin B	Calbiochem
Adeninhemisulfat	Sigma-Aldrich	L-Leucin	Roth
Agar	Difco	Lithiumacetat (LiAc)	Roth
Agarose	Lonza	Lysin	Sigma-Aldrich
Ammoniumchlorid	Sigma-Aldrich	Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Sigma-Aldrich
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck	Magnesiumsulfat	Sigma-Aldrich
Ampicillin	Sigma-Aldrich	Malzextrakt	Difco
Arginin	Roth	Mannose	Sigma-Aldrich
β-Glycerophosphat	Sigma-Aldrich	Methanol	Riedel-de Haën
BCIP	Sigma-Aldrich	Milchpulver	Roth
Borsäure	Grüssing	MOPS	Sigma-Aldrich
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich	Natriumacetat (NaAc)	Merck
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Riedel-de Haën	Natriumazid (NaN ₃)	Sigma-Aldrich
Calcofluor Weiß	Sigma-Aldrich	Natriumchlorid (NaCl)	Normapur
Caspofungin	(bekommen von AG Ernst, Uni. Düsseldorf)	Natriumcitrat	Normapur
Concanavalin A	Sigma-Aldrich	Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva
Coomassie Brilliant Blau	Roth	Natriumfluorid (NaF)	Sigma-Aldrich
Dithiothreitol (DTT)	Roth	Natriumhydroxid (NaOH)	Normapur
DAPI	Sigma-Aldrich	Natriumphosphatglas Typ 45	Sigma-Aldrich
DMF	Merck	Nitro Blue Tetrazolium (NBT)	Sigma-Aldrich
di-Natriumhydrogenphosphat	Merck	Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich
EDTA	Applichem	Pepton	Difco
EGTA	Sigma-Aldrich	Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich
Eisenchlorid (FeCl ₃)	Sigma-Aldrich	Pipes	Sigma-Aldrich
Essigsäure	Riedel-de Haën	Polyethylenglycol 4000 (PEG ₄₀₀₀)	Sigma-Aldrich
Ethanol	Riedel-de Haën	Poly-L-Lysin	Sigma-Aldrich
Ethidiumbromid	Roth	Rapamycin	Sigma-Aldrich
Galaktose	Applichem	Rhodamin-Phalloidin	Invitrogen
Geniticinsulfat (G418)	Calbiochem	Roti®/Phenol/C/I	Roth
Glucose	Roth	Salzsäure	Riedel-de Haën
Glutaminsäure	Sigma-Aldrich	Sorbitol	Sigma-Aldrich
Glycin	Roth	Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Merck
Glyzerin	Roth	Thiabendazol (TBZ)	Sigma-Aldrich
Hefeextrakt	Difco	Thiamin	Sigma-Aldrich
Hefe Stickstoffquelle (YNB)	Difco	Trishydroxymethylaminomethan (Tris)	Normapur
HEPES	Sigma-Aldrich	Triton X-100	Sigma-Aldrich
Histidin	Sigma-Aldrich	Trypton	Difco
Inositol	Sigma-Aldrich	Tryptophan	Roth
Isopropanol	Merck	Tween® 20	Applichem
Isopropyl-β-thiagalactopyranosid (IPTG)	Fermentas	Uracil	Sigma-Aldrich
Kaliumacetat	Grüssing	Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Grüssing
Kaliumchlorid (KCl)	Grüssing	X-Gal	Fermentas
Kaliumhydrogenphthalat	Sigma-Aldrich	Zitronensäure	Sigma-Aldrich
Kanamycin	Sigma-Aldrich		

2.2 Enzyme

Restriktionsenzyme

Enzym	Erkennungssequenz	Hersteller
<i>AccI</i> (<i>XmiI</i>)	GT↓MKAC	Fermentas
<i>Bam</i> HI	G↓GATCC	Fermentas
<i>Bsr</i> GI (<i>Bsp</i> 1407I)	T↓GTACA	Fermentas
<i>Eco</i> RI	G↓AATTC	Fermentas
<i>Hin</i> CI	GTY↓RAC	Fermentas
<i>Hin</i> DI	A↓AGCTT	Fermentas
<i>Nco</i> I	C↓CATGG	Fermentas
<i>Nde</i> I	CA↓TATG	Fermentas
<i>Not</i> I	GC↓GGCCGC	Fermentas
<i>Sac</i> I	GAGCT↓C	Fermentas
<i>Sal</i> I	G↓TCGAC	Fermentas
<i>Spe</i> I (<i>Bcu</i> I)	A↓CTAGT	Fermentas
<i>Xho</i> I	C↓TCGAG	Fermentas

M = A oder C; K = G oder T; Y = C oder T; R = G oder A

DNA-modifizierende Enzyme

Enzym	Hersteller
Alkalische Phosphatase (CIAP)	Fermentas
T4-DNA-Ligase	Fermentas

Weitere Enzyme

Enzym	Hersteller
β-Glucuronidase	Sigma-Aldrich
<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase	Invitrogen
<i>Pfx</i> -DNA-Polymerase	Fermentas
Proteinase K	Roche
RNase A	Sigma-Aldrich
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	eigene Herstellung
Zymolyase	Seikagaku
Lysozym	Sigma-Aldrich

2.3 Antikörper

Primärantikörper	Bestellnummer	Hersteller	Verdünnung
α -c-myc (Maus, monoklonal)	11667149001	Roche	1:400 (WB)
α -GFP (Hase, polyklonal)	A11122	Invitrogen	1:200 (IF) 1:5000 (WB)
α -GST (Hase, polyklonal)	sc-459	Santa Cruz Biotechnology	1:1000 (WB)
α -HA (Maus, monoklonal)	11583816001	Roche	1:250 (WB)
α -Tubulin TAT-1 (monoklonal)	/	K. Gull (Woods et al, 1989)	1:5 (IF)

Sekundärantikörper	Bestellnummer	Hersteller	Verdünnung
α -Hase AP-konj.	S373B	Promega	1:7500 (WB)
α -Maus AP-konj.	S372B	Promega	1:7500 (WB)
α -Maus Cy3-konj.	C2181	Sigma	1:500 (IF)

IF = Immunofluoreszenz; WB = Western Blot

2.4 Kits

Kit	Hersteller
ECL Advance Western Blotting Detection Kit	Amersham
μ MACS™ Epitope Tag Protein Isolation Kit	Miltenyi
Matchmaker GAL4 Two-Hybrid System 3	Clontech
Plasmid Midi Kit	Qiagen
QiaQuick Gel Extraction Kit	Qiagen
QiaQuick PCR Purification Kit	Qiagen
QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene

2.5 Sonstige Materialien

Material	Hersteller
Δ T Culture Dishes	Biopetechs
λ -Phagen DNA	Fermentas
Complete Proteasen Inhibitoren Cocktail	Roche
dNTP Set	Fermentas
Glasperlen (0,4 - 0,6 mm \varnothing)	Sartorius
Heringssamen-DNA	Sigma-Aldrich
Immobilon-P Transfer Membran	Millipore
Küvetten (0,2 cm)	Biorad
Membranfilter	Schleicher & Schüll
Prestained Protein ladder	Fermentas
Rundfilter Cellulose 150 mm \varnothing	Schleicher & Schüll
SeeBlue Plus2 Prestained Standard	Invitrogen
Vectashield Mounting Medium	Vector Laboratories

2.6 Synthetische Oligonukleotide

Nr. in laboreigener Oligonukleotid-sammlung	Sequenz 5' → 3'	Verwendung
113	ctctgcacagcgataaggc	Nachweis der <i>his3</i> ⁺ -Integrationskassette
162	cagctctagctgaatagc	Nachweis der <i>ura4</i> ⁺ -Integrationskassette
163	gagaagctgggtgaagg	Nachweis der <i>ura4</i> ⁺ -Integrationskassette
205	gagcctcttttgcgaaggagcattg	Nachweis der <i>his3</i> ⁺ -Integrationskassette
256	gagtaccatacgcgactaccagattacgctcatatgattcaaaatgcaagtcatcttac	Sequenzierung des <i>asp1</i> ORF
257	tttcagtatctacgattcatctgcagctcgagttaattaatgttaacaggaataaacc	Sequenzierung des <i>asp1</i> ORF
261	acgtgtctgtagtccc	Nachweis der <i>pkGFP/kanMX6</i> -Integrationskassette
302	cctcgacatcatctgccc	Nachweis der <i>kanMX6</i> -Integrationskassette
304	ggatgtatgggctaaatg	Nachweis der <i>kanMX6</i> -Integrationskassette
347	tagatgattctaagtctgcc	Nachweis C-terminale Epitopmarkierung von Asp1
348	ataaccacaatgaggacgg	Nachweis C-terminale Epitopmarkierung von Asp1
361	ttcagcagttataacgaaaaccgaggacctctgcaactcagttcatcttcc caaaaggttattcctgtaacattaatcggatccccgggtaattaa	C-terminale HA-Epitopmarkierung von Asp1
362	taattatgtgcaattactaataaaaatcgttataaaaatgtttatgttatcaaaa acattcgtaaaaagggtaaaagcgggaattcgagctcgtttaaac	C-terminale HA-Epitopmarkierung von Asp1
381	acacgtcgactgtaagcatt	Nachweis der <i>nap1</i> ⁺ Deletion
382	aggatgagctcggaaagtcc	Nachweis der <i>nap1</i> ⁺ Deletion

423	tcgcaatcatttggcgcc	Nachweis C-terminale Epitopmarkierung von Asp1
424	cgtaaatggcaaaggatggctc	Nachweis C-terminale Epitopmarkierung von Asp1
519	cgaaagttggaatagaaatc	Sequenzierung des <i>asp1</i> ORF
520	gactctgaggcaattgaga	Sequenzierung des <i>asp1</i> ORF
605	aaagagagtgagaagaagg	Bestimmung des Paarungstyps von <i>S. pombe</i>
606	aaattgtattggttactaacc	Bestimmung des Paarungstyps von <i>S. pombe</i>
607	gtaggtgtagagtgtggagg	Bestimmung des Paarungstyps von <i>S. pombe</i>
608	cctctaagatatcaattgcg	Sequenzierung des <i>asp1</i> ORF
609	cgttccaagctaagcgtaactg	Sequenzierung des <i>asp1</i> ORF
622	gcacggaatatggactcctcg	Bestimmung des Paarungstyps von <i>S. cerevisiae</i>
623	actccactcaagtaagagttg	Bestimmung des Paarungstyps von <i>S. cerevisiae</i>
624	agtcacatcaagatcgttatgg	Bestimmung des Paarungstyps von <i>S. cerevisiae</i>
648	atcgcgggatccgctgttagctgcctcgccc	Erzeugung von <i>asp1</i> Mutantenstämmen
649	gcatcgagctcattggftaattatgtgcaactactaataaaaatcgttaaa aaatgftatgttatcaaacattcgctcgttaaactggatggc	Erzeugung von <i>asp1</i> Mutantenstämmen
661	cgaaaaccgaggacctctgcaactcagttcatctccaaaaggfttattcc gttaacattaattaaccgctggatccgctgttagctgcctcgccc	Erzeugung von <i>asp1</i> Mutantenstämmen
672	gtcagtcgtatgtgattgc	Nachweis des <i>asp1</i> ^{D333A} ORFs
673	gtcggagtctgcgtgc	Nachweis des <i>asp1</i> ^{H397A} ORFs
674	gttcagaatattccgacatg	Sequenzierung des <i>asp1</i> ORF

675	gtgatcttcacatagactg	Sequenzierung des <i>asp1</i> ORF
676	cgtacaagtaacattgatcgac	Sequenzierung des <i>asp1</i> ORF
677	gtataactgaatcaggactacc	Sequenzierung des <i>asp1</i> ORF
681	cctggtgagagtgtgatacg	Sequenzierung des <i>asp1</i> ORF
775	ggtcggagtctgctgccgaggatcgacacc	gerichtete Mutagenese (<i>asp1</i> ^{D333A, H397A})
776	ggtgtacgatccgcgccagcaggactccgacc	gerichtete Mutagenese (<i>asp1</i> ^{D333A, H397A})
779	catggttcacccaataactatgg	Sequenzierung des <i>asp1</i> ORF / Klonierung des <i>asp1</i> ⁺ ORF in pGBKT7
783	cgagattctgatcatgcttc	Sequenzierung des <i>asp1</i> ORF / Klonierung des <i>asp1</i> ⁺ ORF in pGBKT7
842	ccgaagaagttaagaaaatccttgcttaaaaagattctctaggatcagaa aattatcgcc	Klonierung der 5' oder 3' verkürzten <i>asp1</i> ⁺ ORFs
843	gaaaaaccctagcagtagctggcaaggagacattcctttattaattaatgt taacagg	Klonierung der 5' oder 3' verkürzten <i>asp1</i> ⁺ ORFs
844	catctcccaaaagggttattctgttaacattaataaaaaggaatgtctccc ttgcc	Klonierung der 5' oder 3' verkürzten <i>asp1</i> ⁺ ORFs
845	atthtgaattcgtgctgtttctattatgaatttcatttgagctcgactactaata g	Klonierung der 5' oder 3' verkürzten <i>asp1</i> ⁺ ORFs
846	caatctcattctcactttctgacttatagtcgctttgtaaatgattcaaaatgca agtcac	Klonierung der 5' oder 3' verkürzten <i>asp1</i> ⁺ ORFs
847	gaaaaaccctagcagtagctggcaaggagacattcctttaatgacgttcg gcaacatgaaac	Klonierung der 5' oder 3' verkürzten <i>asp1</i> ⁺ ORFs
848	gatttaaaacttctggactgaaggtagacgattccgtctcatttaacaaagc gactataag	Klonierung der 5' oder 3' verkürzten <i>asp1</i> ⁺ ORFs
850	ctcattctcactttctgacttatagtcgctttgtaaatgagacggaatcggtga ccttcag	Klonierung der 5' oder 3' verkürzten <i>asp1</i> ⁺ ORFs

851	gaggccccaaggggtatgctagttatgcgccgctgcagttaattaatgtt aacaggaataaac	Klonierung des <i>asp1</i> ⁺ ORF in pGBKT7
852	catggaggagcagaagctgatctcagaggaggacctgcatatgattcaa aatgcaagtc	Klonierung des <i>asp1</i> ⁺ ORF in pGBKT7
920	attactacttgctcatatacaaaaaataaaagaagtgcttgccattatatt gggaattgagctcatcaaacctctttcttactattgcactt	Deletion des SPBC1289.15 ORF
921	gacaaagttaagctgctgtataattggtagcatattataagcaaagaaga acaaattgatgcttacatgcttaagctaaaagctaacgaatctttaat	Deletion des SPBC1289.15 ORF
922	aactgaagatattggctttc	Nachweis der SPBC1289.15 Deletion
923	aaatggtaagctacataaa	Nachweis der SPBC1289.15 Deletion
938	actgtaaaaagcatccctatgtgattgaatgtgtatataatccatctctttaaag gtttgataggtagggtcatttcagcataagcctaataatgcccttgc	Deletion des <i>cdk8</i> ⁺ ORF
939	tgaagtagatagtagcggttggaggaaacctcggaatcatcttctgaaatt ctccttctggataatgaatagggtgattgtgtaatgtttaggagc	Deletion des <i>cdk8</i> ⁺ ORF
940	ctaatgtttctgctgccttc	Nachweis der <i>cdk8</i> ⁺ Deletion
941	ctaaataaaaacgacgggtgc	Nachweis der <i>cdk8</i> ⁺ Deletion
942	ttcaccacttaaattaccactgagcatttcatacaaaattcaaaagcatctc gtagcatattaatataattgcagaagggtccggatccccgggtaattaa	Deletion des <i>VIP1</i> ORF
943	aagtttttttttaaaaaaagttagtaaaataactatttagtttgggtactaa attaaaaattgggtgtagcagaattcgagctcgtttaaac	Deletion des <i>VIP1</i> ORF
944	attcctaactcgctatagcc	Nachweis der <i>VIP1</i> Deletion
946	gtttccttactctaccataaggcaagaaattataccaaatccattcaactgt cgaaaagaagagtactttatagttcattttcttactattgcactt	Deletion des <i>aps1</i> ⁺ ORF
947	gaagcaagaaatcaaaaaaattgtaaaataaatttgaataaaagg ttgcaaatggtaaacattatgcatctgtactaaagctaacgaatctttaat	Deletion des <i>aps1</i> ⁺ ORF
948	gacaactgttagcgtgtcg	Nachweis der <i>aps1</i> ⁺ Deletion
949	tgctggaatatatgctgtacc	Nachweis der <i>aps1</i> ⁺ Deletion
950	aaatgaacaggcctctcacacgtctttcggttcatatttagcgatcagaag tcgttaaaaaatttctcctataaaacattttcttactattgcactt	Deletion des SPAC186.01 ORF
951	atgtaaaaaaattatattgatgacctgaaatacaaaaaattaacgaga gtatgtgcaattctaaatttgctgctcaaaaagctaacgaatctttaat	Deletion des SPAC186.01 ORF
952	cgtaacaaatgtgcattgcc	Nachweis der SPAC186.01 Deletion

953	gtgccgataacttgaacag	Nachweis der SPAC186.01 Deletion
959	ttgagaagtgaaacgtcc	Nachweis des <i>VIP1</i> ORF
960	gctagctgacgtcttaggac	Nachweis des <i>VIP1</i> ORF
983	aaaaacagttttagcttaacatcaccttaagtcgtagtcatcgtagagg aggcacttgatattccatcgcacaacataagccttaatgccctgc	Deletion des <i>pef1</i> ⁺ ORF
984	aaataatgatttcaataggaactgaaatgaataaataaaatcgtaatttg gttaaacttttgatgtaatttacagctgtggaatgtgtaggagc	Deletion des <i>pef1</i> ⁺ ORF
985	acggcattttctcactgcttatg	Nachweis der <i>pef1</i> ⁺ Deletion
986	cgactgaaatgcatcagcgagc	Nachweis der <i>pef1</i> ⁺ Deletion
1017	tctgacgcatatccttatggcgc	Nachweis der <i>VIP1</i> Deletion
1058	ctgtttgtctctgttggttgattatatctccaacaaaagggaatcccagt ttgaccttattatattagaattgtctcggatccccgggtaattaa	Deletion des <i>KCS1</i> ORF
1059	aataatgatagttacgaatagataaatgcatttacggactgaaataagcgc agctaaaagaatattcattagttctatccgaattcgagctcgtttaaac	Deletion des <i>KCS1</i> ORF
1060	cttagcttagccatccacaacg	Nachweis der <i>KCS1</i> Deletion
1061	catatatcctcacacgtccgag	Nachweis der <i>KCS1</i> Deletion
1062	agagccttgacctgtctcag	Nachweis des <i>KCS1</i> ORF
1063	tcttacgagggtgaagagc	Nachweis des <i>KCS1</i> ORF
1111	tagatacaattctattacccccatcactctagaactaatgattcaaaatg caagtca	Klonierung von <i>asp1</i> ⁺ / <i>asp1</i> ¹⁻³⁶⁴ in p426/p416
1112	gagggcgtgaatgtaagcgtgacataactaattacatgacttaatgacgtt cggcaacatgaaac	Klonierung von <i>asp1</i> ¹⁻³⁶⁴ in p426/p416
1113	gagggcgtgaatgtaagcgtgacataactaattacatgacttaattaatgtt aacaggaataa	Klonierung von <i>asp1</i> ⁺ in p426/p416

2.7 Plasmide/Vektoren

Nr. in labor-eigener Plasmid-sammlung	Bezeichnung (genetische Marker)	Verwendung	Herkunft
/	pBSK (<i>Amp^r</i>)	Klonierungsvektor	Stratagene
163	pAF1 (<i>Amp^r</i>)	PCR-Vorlageplasmid (Gendeletion mit <i>his3⁺</i>)	U. Fleig
177	GFP/ <i>kanMX6</i> (<i>Amp^r</i>)	PCR-Vorlageplasmid (C-terminale GFP-Epitopmarkierung)	K. Gould
179	HA/ <i>kanMX6</i> (<i>Amp^r</i>)	PCR-Vorlageplasmid (C-terminale HA-Epitopmarkierung/ Gendeletion mit <i>kanMX6</i>)	K. Gould
181	pUR19- <i>mal3⁺</i> (<i>Amp^r</i> , <i>ura4⁺</i>)	Expressionsvektor	U. Fleig
184	pREP3X- <i>mal3⁺</i> (<i>Amp^r</i> , <i>LEU2</i> , Thiamin-reprimierbarer <i>nmt1</i> -Promotor)	Expressionsvektor	U. Fleig
222	pUR19 (<i>Amp^r</i> , <i>ura4⁺</i>)	Expressionsvektor	U. Fleig
262	pREP3X- <i>asp1⁺</i> (<i>Amp^r</i> , <i>LEU2</i> , Thiamin-reprimierbarer <i>nmt1</i> -Promotor)	Expressionsvektor	K. Gould
270	pJR2-3XL (<i>Amp^r</i> , <i>LEU2</i> , Thiamin-reprimierbarer <i>nmt1</i> -Promotor)	Expressionsvektor	U. Fleig
344	pUR19- <i>asp1⁺</i> (<i>Amp^r</i> , <i>ura4⁺</i>)	Expressionsvektor	U. Fleig
522	pBSK- <i>ura4⁺</i> (<i>Amp^r</i>)	PCR-Vorlageplasmid (Gendeletion mit <i>ura4⁺</i>)	U. Fleig
537	pGADT7 (<i>Amp^r</i> , <i>LEU2</i> , HA-Epitop)	2-Hybrid-Analyse	Clontech
538	pGBKT7 (<i>Kan^r</i> , <i>TRP1</i> , c-Myc-Epitop)	2-Hybrid-Analyse	Clontech
539	pGADT7- <i>asp1⁺</i> (<i>Amp^r</i> , <i>LEU2</i> , HA-Epitop)	2-Hybrid-Analyse	U. Fleig
578	pREP3X-GFP- <i>asp1^{D333A}</i> (<i>Amp^r</i> , <i>LEU2</i> , Thiamin-reprimierbarer <i>nmt1</i> -Promotor)	Expressionsvektor	J. York

579	pREP3X-GFP- <i>asp1</i> ^{H397A} (<i>Amp</i> ^r , <i>LEU2</i> , Thiamin- reprimierbarer <i>nmt1</i> -Promotor)	Expressionsvektor	J. York
585	pCL1 (<i>Amp</i> ^r , <i>LEU2</i>)	2-Hybrid-Analyse (Kontrollvektor)	Clontech
586	pGBKT7-53 (<i>Kan</i> ^r , <i>TRP1</i> , c-Myc-Epitop)	2-Hybrid-Analyse (Kontrollvektor)	Clontech
587	pGBKT7-Lam (<i>Kan</i> ^r , <i>TRP1</i> , c-Myc-Epitop)	2-Hybrid-Analyse (Kontrollvektor)	Clontech
594	pBSK- <i>asp1</i> ^{D333A} (<i>Amp</i> ^r)	Erzeugung von <i>asp1</i> Mutantenstämmen	diese Arbeit
595	pBSK- <i>asp1</i> ^{H397A} (<i>Amp</i> ^r)	Erzeugung von <i>asp1</i> Mutantenstämmen	diese Arbeit
600	pBSK- <i>asp1</i> ^{D333A} / <i>kanMX6</i> (<i>Amp</i> ^r)	Erzeugung von <i>asp1</i> Mutantenstämmen	diese Arbeit
601	pBSK- <i>asp1</i> ^{H397A} / <i>kanMX6</i> <i>Amp</i> ^r)	Erzeugung von <i>asp1</i> Mutantenstämmen	diese Arbeit
616	GFP/ <i>ura4</i> ⁺ (<i>Amp</i> ^r)	PCR-Vorlageplasmid (C-terminale GFP- Epitopmarkierung)	V. Jakopec
635	pBSK- <i>asp1</i> ^{D333A,H397A} / <i>kanMX6</i> (<i>Amp</i> ^r)	Erzeugung von <i>asp1</i> Mutantenstämmen	diese Arbeit
653	pGBKT7- <i>asp1</i> ⁺ (<i>Kan</i> ^r , <i>TRP1</i> , c-Myc-Epitop)	2-Hybrid-Analyse	diese Arbeit
671	pJR2-3XL- <i>asp1</i> ³⁶⁵⁻⁹²⁰ (<i>Amp</i> ^r , <i>LEU2</i> , Thiamin- reprimierbarer <i>nmt1</i> -Promotor)	Expressionsvektor	diese Arbeit
672	pJR2-3XL- <i>asp1</i> ¹⁻³⁶⁴ (<i>Amp</i> ^r , <i>LEU2</i> , Thiamin- reprimierbarer <i>nmt1</i> -Promotor)	Expressionsvektor	diese Arbeit
674	pGADT7-T (<i>Amp</i> ^r , <i>LEU2</i> , HA-Epitop)	2-Hybrid-Analyse (Kontrollvektor)	Clontech
771	pBSK- <i>kanMX6</i> (<i>Amp</i> ^r)	Generierung von <i>asp1</i> Mutantenstämmen	diese Arbeit
789	YCp50-HO-12 (<i>Amp</i> ^r , <i>URA3</i>)	Wechsel des Paarungstyps von <i>S. cerevisiae</i>	J. Hegemann
790	p426 (<i>Amp</i> ^r , <i>URA3</i> , Methionin- reprimierbarer <i>MET25</i> - Promotor, <i>CYC1</i> -Terminator, 2μ)	Expressionsvektor	J. Hegemann

791	p416 (<i>Amp^r</i> , <i>URA3</i> , Methionin-reprimierbarer <i>MET25</i> -Promotor, <i>CYC1</i> -Terminator, <i>CEN6/ARS4</i>)	Expressionsvektor	J. Hegemann
798	p426- <i>asp1</i> ¹⁻³⁶⁴ (<i>Amp^r</i> , <i>URA3</i> , Methionin-reprimierbarer <i>MET25</i> -Promotor, <i>CYC1</i> -Terminator, 2μ)	Expressionsvektor	diese Arbeit
799	p416- <i>asp1</i> ¹⁻³⁶⁴ (<i>Amp^r</i> , <i>URA3</i> , Methionin-reprimierbarer <i>MET25</i> -Promotor, <i>CYC1</i> -Terminator, <i>CEN6/ARS4</i>)	Expressionsvektor	diese Arbeit
801	p416- <i>asp1</i> ⁺ (<i>Amp^r</i> , <i>URA3</i> , Methionin-reprimierbarer <i>MET25</i> -Promotor, <i>CYC1</i> -Terminator, <i>CEN6/ARS4</i>)	Expressionsvektor	diese Arbeit

2.8 Stämme

2.8.1 *S. pombe* Stämme

Nr. in laboreigener Stammsammlung	Genotyp	Herkunft
81	<i>cdc2-M63 leu1-32 h⁺</i>	U. Fleig
135	<i>mal3Δ::his3⁺ ade6-M210 his3Δ leu1-32 ura4-D18 h⁺</i>	U. Fleig
605	<i>ade6-M210 his3-D1 leu1-32 ura4-D18 h⁻</i>	K. Gould
606	<i>ade6-M216 his3-D1 leu1-32 ura4-D18 h⁺</i>	K. Gould
607	<i>peg1-1 leu1-32 ura4-D18 h⁻</i>	I. Hagan
771	<i>asp1-pkGFP/ura4⁺ his3-D1 ade6-M210 leu1-32 ura4-D18 h⁻</i>	U. Fleig
831	<i>nap1Δ::kanMX6 ade⁻ his⁻ leu⁻ ura⁻ h⁻</i>	U. Fleig
857	<i>nmt81-GFP-atb2⁺/kanMX6 leu1-32 h⁻</i>	I. Hagan
1156	<i>asp1Δ::kanMX6 ade6-M216 his3-D1 leu1-32 ura4-D18 h⁻</i>	U. Fleig
1157	<i>asp1Δ::kanMX6 ade6-M216 his3-D1 leu1-32 ura4-D18 h⁺</i>	U. Fleig
1308	<i>asp1-HA/kanMX6 ade6-M210 his3D1 leu1-32 ura4-D18 h⁻</i>	diese Arbeit
1355	<i>tea1Δ::ura4⁺ ura4-D18 h⁻</i>	F. Verde
1363	<i>cdc3-124 ura4-D18 h⁻</i>	K. Gould
1364	<i>arp3-c1 his3-237 leu1-32 ura4-D18 h⁺</i>	K. Gould
1365	<i>sop2-1 ade6-M210 leu1-32 ura4-D18 h⁻</i>	K. Gould
1366	<i>act1-48 leu1-32 ura4-D18 lys-131 h⁻</i>	K. Gould
1407	<i>asp1Δ::kanMX6 nmt81-GFP-atb2⁺/kanMX6 ade6-M216 his3D1 leu1-32 h⁺</i>	diese Arbeit
1478	<i>tea2Δ::his3⁺ ade6-M210 his3-D1 leu1-32 ura4-D18 h⁻</i>	J. McIntosh
1511	<i>asp1^{D333A}/kanMX6 ade6-M210 his3-D1 leu1-32 ura4-D18 h⁺</i>	diese Arbeit

1513	<i>asp1⁺/kanMX6 ade6-M210 oder ade6-M216 his3D1 leu1-32 ura4-D18 h⁻</i>	diese Arbeit
1521	<i>asp1^{H397A}-GFP/ura4⁺ ade6-M216 his3-D1 leu1-32 ura4-D18 h⁻</i>	diese Arbeit
1528	<i>asp1^{D333A}/kanMX6 mal3Δ::his3⁺ ade6-M210 his3Δ oder his3D1 leu1-32 ura4-D18 h⁻</i>	diese Arbeit
1530	<i>asp1^{D333A}/kanMX6 cdc3-124 ade6-M210 his3D1 leu1-32 ura4-D18 h⁻</i>	diese Arbeit
1531	<i>asp1^{H397A}/kanMX6 cdc3-124 ade6-M216 his3D1 leu1-32 ura4-D18 h⁹⁰</i>	diese Arbeit
1542	<i>asp1Δ::kanMX6 cdc3-124 ade6-M210 his3D1 leu1-32 ura4-D18 h⁻</i>	diese Arbeit
1579	<i>asp1^{H397A}/kanMX6 ade6-M210 his3-D1 leu1-32 ura4-D18 h⁺</i>	diese Arbeit
1580	<i>asp1^{D333A}-GFP/ura4⁺ ade6-M210 his3-D1 leu1-32 ura4-D18 h⁺</i>	diese Arbeit
1582	<i>asp1^{D333A,H397A}/kanMX6 ade6-M210 his3D1 leu1-32 ura4-D18 h⁻</i>	diese Arbeit
1639	<i>asp1^{H397A}/kanMX6 arp3-c1 ade6-M216 his3⁻ leu1-32 ura4⁺ h⁺</i>	diese Arbeit
1640	<i>asp1^{H397A}/kanMX6 act1-48 leu1-32 ura4-D18 lys1-131 h⁻</i>	diese Arbeit
1641	<i>asp1^{H397A}/kanMX6 mal3Δ::his3⁺ ade6-M210 his3⁻ leu1-32 ura4-D18 h⁻</i>	diese Arbeit
1642	<i>asp1^{D333A}/kanMX6 sop2-1 ade6-M210 leu1-32 ura4-D18 h⁻</i>	diese Arbeit
1643	<i>asp1Δ::kanMX6 sop2-1 ade6-M216 his3D1 leu1-32 ura4-D18 h⁻</i>	diese Arbeit
1646	<i>pmk1Δ::ura4⁺ leu1⁻ ura4⁻ h⁻</i>	T. Toda
1688	<i>gpa2Δ::ura4⁺ leu1⁻ ura4-D18 h⁹⁰</i>	YGRC
1718	<i>sty1Δ::ura4⁺ leu1-32 ura4-D18 h⁺</i>	J. Millar
1722	<i>asp1^{H397A}/kanMX6 sop2-1 ade6-M210 leu1-32 ura4-D18 h⁻</i>	diese Arbeit
1723	<i>asp1^{H397A}/kanMX6 peg1-1 his3-D1 leu1-32 ura4-D18 h⁻</i>	diese Arbeit
1724	<i>asp1^{H397A}/kanMX6 tea2Δ::his3⁺ ade6-M210 his3-D1 leu1-32 ura4-D18 h⁻</i>	diese Arbeit
1725	<i>asp1^{H397A}/kanMX6 pmk1Δ::ura4⁺ leu1⁻ ura4⁻ h⁺</i>	diese Arbeit
1726	<i>asp1^{H397A}/kanMX6 SPBC1289.15Δ::his3⁺ ade6-M210 his3-D1 leu1-32 ura4-D18 h⁺</i>	diese Arbeit
1728	<i>asp1^{H397A}/kanMX6 SPAC186.01Δ::his3⁺ ade6-M210 his3D1 leu1-32 ura4-D18 h⁺</i>	diese Arbeit
1729	<i>aps1Δ::his3⁺ ade6-M210 his3-D1 leu1-32 ura4-D18 h⁻</i>	diese Arbeit
1731	<i>asp1^{H397A}/kanMX6 sty1Δ::ura4⁺ ade6-M210 leu1-32 ura4-D18 h⁺</i>	diese Arbeit
1752	<i>cyr1Δ::ura4⁺ ade6-M216 leu1⁻ ura4-D18 h⁺</i>	YGRC
1753	<i>cdc8-110 leu1-32 ura4-D18 h⁹⁰</i>	YGRC
1759	<i>asp1^{H397A}/kanMX6 cdk8Δ::ura4⁺ ade6-M210 his3D1 leu1-32 ura4-D18 h⁺</i>	diese Arbeit
1760	<i>asp1^{H397A}/kanMX6 nap1Δ::kanMX6 ade6-M216 his3D1 leu1-32 ura4-D18 h⁻</i>	diese Arbeit
1761	<i>asp1^{D333A}/kanMX6 nap1Δ::kanMX6 ade6-M216 his3D1 leu1-32 ura4-D18 h⁻</i>	diese Arbeit
1763	<i>asp1^{H397A}/kanMX6 nmt81-GFP-atb2⁺/kanMX6 leu1-32 ura4-D18 h⁺</i>	diese Arbeit
1764	<i>pef1Δ::ura4⁺ ade6-M210 his3D1 leu1-32 ura4-D18 h⁻</i>	diese Arbeit
1765	<i>asp1^{H397A}/kanMX6 gpa2Δ::ura4⁺ ade6-M210 his3-D1 leu1⁻ ura4-D18 h⁻</i>	diese Arbeit
1766	<i>asp1^{H397A}/kanMX6 cyr1Δ::ura4⁺ ade6-M216 his3-D1 leu1⁻ ura4-D18 h⁺</i>	diese Arbeit
1767	<i>asp1^{H397A}/kanMX6 cdc8-110 ade6-M210 his3-D1 leu1-32 ura4-D18 h⁺</i>	diese Arbeit
1769	<i>cdk8Δ::ura4⁺ ade6-M210 his3D1 leu1-32 ura4-D18 h⁻</i>	diese Arbeit
1770	<i>asp1^{D333A}/kanMX6 cdk8Δ::ura4⁺ ade6-M210 his3D1 leu1-32 ura4-D18 h⁺</i>	diese Arbeit
1771	<i>asp1^{D333A}/kanMX6 tea1-pkGFP/ura4⁺ ade6-M210 his3⁻ leu1-32 ura4-D18 h⁻</i>	diese Arbeit
1772	<i>asp1^{H397A}/kanMX6 tea1-pkGFP/ura4⁺ ade6-M210 leu1-32 ura4-D18 h⁺</i>	diese Arbeit
1774	<i>asp1^{H397A}/kanMX6 tea1Δ::ura4⁺ leu1-32 ura4-D18 h⁻</i>	diese Arbeit
1776	<i>asp1^{H397A}/kanMX6 pef1Δ::ura4⁺ ade6-M210 his3D1, leu1-32 ura4-D18 h⁺</i>	diese Arbeit

1782	<i>asp1^{D333A}/kanMX6 pef1Δ::ura4⁺ ade6-M210 his3D1, leu1-32 ura4-D18 h⁻</i>	diese Arbeit
1783	<i>asp1^{D333A}/kanMX6 cdc2-M63 ade6-M210 his3D1 leu1-32 ura4-D18 h⁺</i>	diese Arbeit
1784	<i>asp1^{H397A}/kanMX6 cdc2-M63 ade6-M210 leu1-32 h⁺</i>	diese Arbeit
1785	<i>tea1⁺-pkGFP/ura4⁺ ade6-M210 leu1-32 ura4-D18 h⁻</i>	U. Fleig
1791	<i>asp1-pkGFP/ura4⁺/asp1-HA/kanMX6 his3-D1/his3-D1 ade6-M210/ade6-M216 leu1-32/leu1-32 ura4-D18/ura4-D18 h⁺/h⁻</i>	diese Arbeit

YGRC = Yeast Genetic Resource Center, Japan

2.8.2 *S. cerevisiae* Stämme

Nr. in laboreigener Stammsammlung	Genotyp	Herkunft
CEN.PK2	<i>MATa/MATα ura3-52/ura3-52 trp1-289/trp1-289 leu2-3,112/leu2-3,112 his3Δ1/his3Δ1</i>	J. Hegemann
572	<i>MATa trp1-901 leu2-3 112 ura3-52 his3-200 gal4Δ gal80Δ LYS2::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3 GAL2_{UAS}-GAL2_{TATA}-ADE2 URA3::MEL1_{UAS}-MEL1_{TATA}-lacZ</i>	Clontech
1778	<i>MATa/MATα ura3-52/ura3-52</i>	J. Hegemann
1779	<i>MATa ura3-52</i>	J. Hegemann
1780	<i>MATa/MATα ura3-52/ura3-52 vip1Δ::kanMX6/VIP1</i>	diese Arbeit
1781	<i>MATa ura3-52 vip1Δ::kanMX6</i>	diese Arbeit
1787	<i>MATa ura3-52 kcs1Δ::kanMX6</i>	diese Arbeit
1788	<i>MATa/MATα ura3-52/ura3-52 kcs1Δ::kanMX6/KCS1</i>	diese Arbeit
1794	<i>MATa/MATα ura3-52/ura3-52 vip1Δ::kanMX6/vip1Δ::kanMX6</i>	diese Arbeit
1795	<i>MATa/MATα ura3-52/ura3-52 kcs1Δ::kanMX6/kcs1Δ:: kanMX6</i>	diese Arbeit

2.8.3 *E. coli* Stämme

Stamm	Genotyp	Herkunft
XL ₋₁ blue	<i>recA1, lac⁻, endA1, gyrA46, thi, hsdR17, supE44, relA1, F['] [proAB⁺, lacIq, lacZΔM15, Tn(tet^r)]</i>	Stratagene

2.9 Medien und Wachstumsbedingungen

2.9.1 Medien und Wachstumsbedingungen für *S. pombe*

Die Anzucht von *S. pombe* erfolgte in flüssigem oder auf festem Vollmedium (YE5S), für Plasmid-Transformanten wurde selektives Minimalmedium (MM oder EMM) mit den benötigten Supplementen verwendet. Die Inkubationstemperatur betrug in der Regel 30°C, temperatursensitive Stämme wurden bei 24°C inkubiert. Zur Reprimierung des *nmt* Promotors wurde dem Medium 5 µg/ml Thiamin zugesetzt; die Dereprimierung erfolgte für 18 h bei 30°C bzw. für 24 h bei 24°C in Thiamin-freiem Medium. TBZ- und LatB-haltige Platten wurden bei 24°C inkubiert.

Vollmedium (YE5S):

10 g Hefeextrakt
 150 ml Adeninstocklösung
 75 ml Uracilstocklösung
 20 ml je Histidin-, Lysin-, und Leucinstocklösung
 40 g Agar (nur für festes Medium)
 in 1645 ml ddH₂O lösen, in 5 x 360 ml portionieren und autoklavieren.
 60 g Glucose in 200 ml ddH₂O lösen, separat autoklavieren und dem Medium anschließend zugeben.

YE5S + G418: 100 mg/l G418 dem abgekühlten Medium zugeben, Platten gießen und bei 4°C lagern

Minimalmedium (MM) bzw. Edinburgh-Minimalmedium (EMM):

5,5 g Na₂HPO₄ x 2 H₂O
 6 g Kaliumhydrogenphthalat
 2 g Glutaminsäure (nur für MM)
 10 g Ammoniumchlorid (nur für EMM)
 40 ml 50 x Salzstocklösung
 2 ml 1000 x Vitaminstocklösung
 0,2 ml 10000 x Mineralstocklösung
 40 g Agar (nur für festes Medium)
 in 1780 ml ddH₂O lösen, in 5 x 360 ml portionieren und autoklavieren.
 40 g Glucose in 100 ml ddH₂O lösen, separat autoklavieren und dem Medium anschließend zugeben.
 Nach dem Autoklavieren werden die benötigten Supplementlösungen zu einer Endkonzentration von 75 mg/l zugefügt.

Supplementstocklösungen (autoklaviert):

2,7 g/l Adeninstocklösung
 2 g/l Uracilstocklösung
 7,5 g/l Histidinstocklösung
 7,5 g/l Lysinstocklösung
 7,5 g/l Leucinstocklösung
 7,5 g/l Argininstocklösung

50x Salzstocklösung:

21,4 g $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$

0,29 g $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$

20 g KCl

0,8 g Na_2SO_4

in 400 ml ddH₂O lösen, autoklavieren und bei 4°C lagern.

1000x Vitaminstocklösung:

1 g Natriumpantothensäure

10 g Nikotinsäure

10 g Inositol

10 mg Biotin

in 1 l ddH₂O lösen, sterilfiltrieren und bei 4°C lagern.

10000x Mineralstocklösung:

5 g H_3BO_3

4 g MnSO_4

4 g $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$

2 g $\text{FeCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$

4 g MoO_3

1 g KI

4 g $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$

10 g Zitronensäure

in 1 l ddH₂O lösen, sterilfiltrieren und bei 4°C lagern.

Thiamin-Stocklösung: 10 mg/ml, sterilfiltriert, Lagerung dunkel bei Raumtemperatur

TBZ-Stocklösung: 10 mg/ml in DMF, Lagerung bei -20°C

LatB-Stocklösung: 1 mg/ml in DMSO, Lagerung bei -20°C

2.9.2 Medien und Wachstumsbedingungen für *S. cerevisiae*

Die Anzucht von *S. cerevisiae* erfolgte in flüssigem oder auf festem Vollmedium (YPD), für Plasmid-Transformanten wurde selektives Minimalmedium (SD) mit den benötigten Supplementen verwendet. Die Inkubationstemperatur betrug 30°C.

Vollmedium (YPD):

20 g Hefeextrakt

40 g Pepton

2 ml Adeninstocklösung (2 g/l)

4 ml Tryptophanstocklösung (5 g/l)

40 g Agar (nur für festes Medium)

in 1788 ml ddH₂O lösen, in 5 x 360 ml portionieren und autoklavieren.

40 g Glucose in 200 ml ddH₂O lösen, separat autoklavieren und dem Medium anschließend zugeben.

YPD + G418: 200 mg/l G418 dem abgekühlten Medium zugeben, Platten gießen und bei 4°C lagern.

SD-Minimalmedium:

3,4 g Hefe Stickstoffquelle (YNB) ohne Aminosäuren und Ammoniumsulfat
10 g Ammoniumsulfat
4 g Drop-out Mix
40 g Agar (nur für festes Medium)

in 1800 ml ddH₂O lösen, den pH-Wert auf ~ 6 einstellen, in 5 x 360 ml portionieren und autoklavieren.
40 g Glucose in 100 ml ddH₂O lösen, separat autoklavieren und dem Medium anschließend zugeben.
Zur Plasmidselektion wird das jeweilige Supplement aus dem Drop-Out Mix ausgelassen.

Drop-out Mix: 0,2 g para-Aminobenzoidsäure; 0,5 g Adenin; 2 g Alanin, Arginin, Asparaginsäure, Cystein, Lysin, Methionin, Phenylalanin, Prolin, Glutamin, Glutaminsäure, Glycin, Histidin, Inositol, Isoleucin, Serin, Threonin, Tryptophan, Tyrosin, Uracil, Valin; 10 g Leucin

2.9.3 Medien und Wachstumsbedingungen für *E. coli*

Die Anzucht von *E. coli* erfolgte in flüssigem oder auf festem LB-Medium bei 37°C. Ampicillin bzw. Kanamycin-haltiges Medium wurde zur Plasmidselektion verwendet. Die blau/weiß Selektion erfolgte auf AIX-Platten.

LB-Medium:

10 g Trypton
5 g Hefeextrakt
5 g NaCl
13,5 g Agar (nur für festes Medium)

in 1 l ddH₂O lösen, den pH-Wert auf 7,5 einstellen, in 5 x 200 ml portionieren und autoklavieren.

LB + Ampicillin: 50 µg/ml Ampicillin, bei 4°C lagern.

LB + Kanamycin: 50 µg/ml Kanamycin, bei 4°C lagern.

AIX-Platten: 50 µg/ml Ampicillin, 200 µM IPTG, 100 µM X-Gal, bei 4°C lagern.

Ampicillin-Stocklösung: 200 mg/ml, Lagerung in Aliquots bei -20°C

Kanamycin-Stocklösung: 200 mg/ml, Lagerung in Aliquots bei -20°C

IPTG-Stocklösung: 200 mM, Lagerung in Aliquots bei -20°C

X-Gal-Stocklösung: 100 mM in DMF, Lagerung bei -20°C

2.10 DNA-Methoden

2.10.1 DNA-Grundtechniken

- DNA-Konzentrationsbestimmungen erfolgten photometrisch durch Bestimmung der Absorption bei 260 nm. Der Reinheitsgrad der DNA ergab sich aus dem Quotienten der Absorption bei 260 nm und 280 nm.
- Zur Aufkonzentrierung wurde die DNA in Anwesenheit von Alkohol gefällt.
 - Zugabe von 2 Volumen 96% Ethanol und $\frac{1}{10}$ Volumen 3 M Natriumacetat pH 5,5 oder Zugabe von 1 Volumen Isopropanol, gut vortexen
 - 30 min bei 13000 rpm zentrifugieren, Überstand verwerfen
 - 10 min bei 13000 rpm mit 100-150 μ l 70% Ethanol waschen, Überstand verwerfen
 - im Vakuum-Konzentrator trocknen, im gewünschten Volumen ddH₂O aufnehmen und bei 65°C lösen
- Restriktionsenzyme und DNA-modifizierende Enzyme wurden nach Herstellerangaben eingesetzt.
- Zur Gelelektrophorese wurden standardmäßig 1% Agarosegele in TBE-Puffer eingesetzt. Als Größenstandard diente *EcoRI/HindIII* geschnittene λ -Phagen-DNA (444 ng/5 μ l). Fragmentgrößen (in kBp): 0,13 / 0,56 / 0,83 / 0,95 / 1,38 / 1,58 / 1,91 / 2,03 / 2,32 / 2,9 / 3,54 / 4,25, 4,37 / 5,0 / 5,15 / 6,56 / 9,42 / 21,2 / 23,1
- DNA-Elution aus Agarosegelen erfolgte unter Verwendung des „QiaQuick Gel Extraction Kit“ der Firma Qiagen.

2.10.2 Transformation von Plasmid-DNA in *E. coli*

Ein-Minuten-Transformation:

- 1 μ l DNA im Reaktionsgefäß vorlegen und 3 μ l DMSO-kompetente Zellen auf Eis zugeben, mischen
- 1 min bei 42°C erhitzen
- sofort 100 μ l LB-Medium zugeben, ausplattieren, ü/N bei 37°C inkubieren

Elektroporation:

- 40 μ l elektrokompente Zellen mit 2-10 μ l DNA auf Eis mischen und in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette geben
- Elektroporation bei 2,1 kV, 200 Ω , 25 μ F

- 900 µl LB-Medium zugeben, den Ansatz 1 h bei 37°C auf dem Schüttler inkubieren
- ausplattieren, ü/N bei 37°C inkubieren

Transformation in ultrakompetente Zellen:

- 50-150 µl DNA mit 100 µl ultrakompetenten Zellen 20 min auf Eis inkubieren, ausplattieren, ü/N bei 37°C inkubieren

2.10.3 Gewinnung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Zur Gewinnung von Plasmid-DNA aus *E. coli* in kleinem Maßstab (2 ml Kultur) wurde die Methode der alkalischen Lyse angewendet (Maniatis et al, 1989); im großen Maßstab (50 ml Kultur) wurde das „Plasmid Midi Kit“ der Firma Qiagen verwendet, welches ebenfalls auf dem Prinzip der alkalischen Lyse beruhte.

2.10.4 PCR

PCR-Reaktionen wurden standardmäßig mit der *Taq*-DNA-Polymerase durchgeführt. Um DNA-Fragmente für Klonierungen zu amplifizieren, wurden die *Pfx*- oder die *Pfu*-Polymerase mit Proofreading-Funktion eingesetzt. Eine schnelle Methode zum Nachweis von genomischen Integrationen war die sog. „PCR auf Zellen“, bei der die PCR-Reaktion direkt unter Zusatz von Hefezellen erfolgte. Die Anlagerungs-Temperatur richtete sich nach den verwendeten Oligonukleotiden; die Elongationszeit nach der Länge des zu amplifizierenden Fragmentes (~1 min/KBp (*Taq*, *Pfx*) bzw. ~2 min/KBp (*Pfu*)). Es wurden insgesamt 35 Zyklen durchgeführt (Schritte 2-4). Für die Reinigung von PCR-Produkten wurde das QiaQuick PCR Purification Kit der Firma Qiagen verwendet.

Taq-PCR:

5 µl	10 x <i>Taq</i> -Puffer
3 µl	25 mM MgCl ₂
2,5 µl	4 mM dNTPs
1 µl	Vorlage-DNA (10-100 ng)
1 µl	je Oligonukleotid A und B (50 µM)
1 µl	<i>Taq</i> -Polymerase
35,5 µl	ddH ₂ O

Pfx-PCR:

5 µl	10 x <i>Pfx</i> -Puffer
1,5 µl	10 mM dNTPs
1 µl	50 mM MgSO ₄
1 µl	Vorlage-DNA (10-100 ng)
1,5 µl	je Oligonukleotid A und B (10 µM)
0,4 µl	<i>Pfx</i> -Polymerase
39,6 µl	ddH ₂ O

Pfu-PCR:

5 µl	10 x <i>Pfu</i> -Puffer + MgSO ₄
2,5 µl	4 mM dNTPs
1 µl	Vorlage-DNA (10-100 ng)
1 µl	je Oligonukleotid A und B (50 µM)
0,5 µl	<i>Pfu</i> -Polymerase
39 µl	ddH ₂ O

PCR auf Zellen:

3 µl	10 x PCR-Puffer
1,8 µl	25 mM MgCl ₂
1,5 µl	4 mM dNTPs
10 µl	ddH ₂ O + Zellmaterial
0,3 µl	je Oligonukleotid A und B (50 µM)
0,3 µl	<i>Taq</i> -Polymerase
12,8 µl	ddH ₂ O

PCR-Bedingungen:

	<i>Pfx</i> -Polymerase	<i>Pfu</i> -Polymerase	<i>Taq</i> -Polymerase	PCR auf Zellen
1. Denaturierung	94°C, 5 min	94°C, 5 min	94°C, 5 min	94°C, 5 min
2. Denaturierung	94°C, 30 sec	94°C, 15 sec	94°C, 30 sec	94°C, 1 min
3. Anlagerung	50-55°C, 30 sec	48-55°C, 30 sec	48-55°C, 30 sec	50-55°C, 2.5 min
4. Elongation	72°C, 1-3 min	68°C, 1-3 min	72°C, 1-3 min	72°C, 1-3 min
5. fin. Elongation	72°C, 7 min	68°C, 7 min	72°C, 7 min	72°C, 7 min

2.10.5 DNA-Sequenzierungen

DNA-Sequenzierungen wurden vom Biologisch-Medizinischen Forschungszentrum (BMFZ) der Universität Düsseldorf durchgeführt.

2.11 Hefemethoden (*S. pombe*)

2.11.1 Transformation

Lithiumacetat-Transformation

Die Transformation von *S. pombe* Stämmen erfolgte nach der sog. Lithiumacetat-Methode nach Okazaki (Okazaki et al, 1990). Dabei wurde die Zellwand zunächst mittels Inkubation in 0,1 M Lithiumacetat destabilisiert. Es folgte die Zugabe von 500 ng Plasmid-DNA und Aufnahme der Zellen in 50% (w/v) PEG₄₀₀₀. Die DNA wurde durch einen 15 minütigen Hitzeschritt bei 43°C in die Zellen transformiert. Bei der Transformation von linearen DNA-Fragmenten zur homologen Rekombination wurden dem Ansatz 5 µl Heringssamen-DNA (10 mg/ml) zugefügt.

Elektroporation

Bei *asp1Δ* oder *asp1^{D333A}* Stämmen war die zuvor beschriebene Lithiumacetat-Methode nicht erfolgreich. Die Transformation von Plasmid-DNA in diese Stämme erfolgte deshalb durch Elektroporation.

Herstellung von elektrokompetenten *S. pombe* Zellen:

- Die Zellen in MM mit den benötigten Supplementen bei 30°C bis zu einer Zelldichte von 1×10^7 Zellen/ml wachsen lassen
- 50 ml der Kultur abfüllen und 15 min auf Eis stellen. Ab hier müssen die Zellen fortlaufend auf Eis gehalten werden, die verwendeten Lösungen müssen eiskalt sein
Alle Zentrifugationsschritte werden bei 20°C durchgeführt
- 5 min bei 3500 rpm zentrifugieren und 3x mit eiskaltem ddH₂O waschen
- In 5 ml 0,6 M Sorbitol / 25 mM DTT / 20 mM HEPES / pH 7,5 resuspendieren und 15 min bei 30°C inkubieren
- 5 min bei 3500 rpm zentrifugieren und 1x mit eiskaltem 1 M Sorbitol waschen
- Das Zellpellet mit 1 M Sorbitol in insgesamt 500 µl Volumen aufnehmen

Elektroporation:

- Elektroporationsküvetten auf Eis vorkühlen
- 100 ng Plasmid-DNA in einem Reaktionsgefäß vorlegen und 50 µl kompetente Zellen zugeben, den Mix anschließend in eine Küvette geben
- Die Elektroporation erfolgt bei 2,1 kV, 200 Ω, 25 µF
- 900 µl 1 M Sorbitol zugeben und mischen, den Mix anschließend in ein Reaktionsgefäß pipettieren. Die Zellen können ggf. auf Eis inkubiert werden, während weitere Elektroporationen durchgeführt werden
- Die Zellen 10 min bei 30°C inkubieren
- 100 µl auf MM mit den benötigten Supplementen ausplattieren
- Die Transformanten erscheinen nach ca. 6 Tagen

Homologe Rekombination

Gendeletionen oder C-terminale Epitopmarkierungen wurde über homologe *in vivo* Rekombination durchgeführt (Bahler et al, 1998). Die Integrationskassetten wurden in PCR-Reaktionen amplifiziert, wobei die verwendeten Oligonukleotide 5' und 3' jeweils 80 Bp Homologie zum Integrationsort anfügten, und in *S. pombe* transformiert. Die korrekte Integration der Kassetten wurde ebenfalls über PCR verifiziert.

2.11.2 Erzeugung von *asp1*^{H397A} und *asp1*^{D333A} Mutantenstämmen

Zunächst wurde der vollständige *asp1*^{D333A} bzw. *asp1*^{H397A} ORF (DNA zur Verfügung gestellt von J. York, Duke Universität) mit den Restriktionsenzymen *Xho*I und *Bam*HI aus den Plasmiden 578 und 579 ausgeschnitten und in *Xho*I, *Bam*HI geschnittenen pBSK eingefügt

(Generierung der Plasmide 594 und 595). Zeitgleich wurde das *kanMX6* Modul in einer PCR-Reaktion mit den Oligonukleotiden 648 und 649 und Plasmid 179 als Vorlage amplifiziert. Dieses Modul enthält das *kan^r* Gen aus *Escherichia coli*, welches den Zellen Resistenz gegen Geneticin (G-418) verleiht (Bahler et al, 1998; Longtine et al, 1998). Für die Amplifizierung des *kanMX6* Moduls wurde die *Pfx*-Polymerase mit Proofreading-Funktion verwendet. Das Oligonukleotid 648 fügte 5' eine *Bam*HI Restriktionsschnittstelle an. Mit dem Oligonukleotid 649 wurden 3' eine *Sac*I Restriktionsschnittstelle sowie 70 Bp Homologie zur Region unmittelbar 3' des endogenen *asp1⁺* ORFs angefügt. Das 1556 Bp lange PCR-Fragment wurde über blunt-end Ligation in *Hinc*II geschnittenen pBSK kloniert (Generierung von Plasmid 771) und sequenziert. Das *kanMX6* Kasette wurde mit *Bam*HI und *Sac*I aus Plasmid 771 ausgeschnitten, über Gelelution isoliert und mit *Bam*HI, *Sac*I geschnittenen Plasmiden 594 und 595 ligiert (Generierung der Plasmide 600 und 601). Zuletzt wurde das 4293 Bp *asp1^{D333A}/kanMX6* bzw. *asp1^{H397A}/kanMX6* Fragment mit *Nde*I und *Sac*I aus den Plasmiden 600 und 601 ausgeschnitten und über homologe Rekombination in Stamm 605 mit dem wildtypischen *asp1⁺* ORF ausgetauscht. Die korrekte Integration des *kanMX6* Moduls wurde in PCR-Reaktionen mit den Oligonukleotiden 347 und 304 bzw. 302 und 423 verifiziert. Die genomische DNA der erhaltenen Stämme wurde isoliert und der *asp1* ORF vollständig sequenziert. Die Stämme wurden zweimal mit den Wildtypstämmn 605 bzw. 606 zurückgekreuzt.

Generierung eines *asp1⁺/kanMX6* Stammes

Das *kanMX6* Modul wurde mit den Oligonukleotiden 661 und 649 amplifiziert und über homologe Rekombination in Stamm 605 3' des endogenen *asp1⁺* ORFs integriert. Der *asp1⁺/kanMX6* Stamm verhielt sich im seriellen Tropftest unter den getesteten Bedingungen wie der Wildtypstamm (Abb. Z1 im Anhang).

Generierung eines *asp1^{D333A, H397A}* Mutantenstammes durch gerichtete Mutagenese

Die für die H397A Substitution benötigten *asp1* Basenpaarmutation wurde in das vorhandene Plasmid 600 durch gerichtete Mutagenese eingeführt. Dazu wurde das „QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit“ (Stratagene) gemäß Herstellerangaben eingesetzt. Die entstandene *asp1^{D333A, H397A}* Sequenz wurde wie in Kap. 2.11.2 mit *Nde*I und *Sac*I aus dem neu generierten Plasmid 635 ausgeschnitten und durch homologe Rekombination in Stamm 605 integriert.

Nachweis der *asp1^{D333A}* und *asp1^{H397A}* ORFs mittels PCR

Um das Vorhandensein der *asp1* Basenpaarmutationen in einer PCR-Reaktion überprüfen zu können wurden spezifische Oligonukleotide (672 bzw. 673) generiert, die an ihrem 3' Ende Homologie zu der mutierten *asp1* Sequenz aufwiesen. Durch genaue Einstellung der PCR-Bedingungen ergaben diese Oligonukleotide (jeweils gemeinsam mit Oligonukleotid 520) nur mit der mutierten *asp1* Sequenz als Vorlage ein PCR-Produkt (Abb. 8).

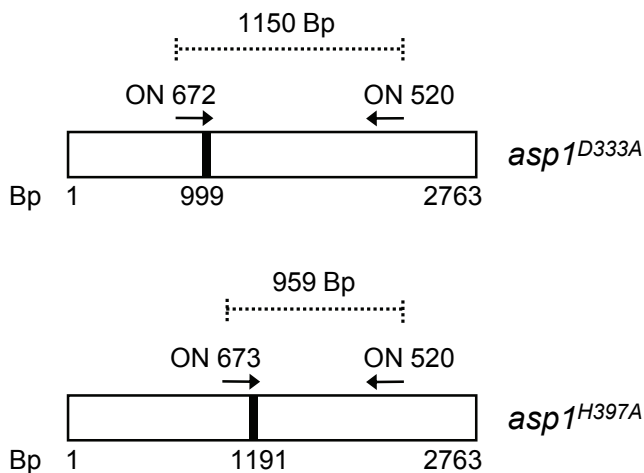


Abbildung 8: Schematische Darstellung des Nachweises der *asp1^{D333A}* und *asp1^{H397A}* ORFs mittels PCR. Bp = Basenpaare. Schwarze Balken geben die mutierten Basenpaare an, Pfeile geben die Bindung der Oligonukleotide (ON) an den *asp1* ORF in 5' zu 3' Richtung an. Gepunktete Linien beschreiben die amplifizierten PCR-Fragmente.

	Kinasedomäne (5' → 3')	Phosphatasedomäne (5' → 3')
wildtypische Sequenz	GT CAG TCG TAT GTG ATT GAT	GTC GGA GTC CTG CGT CAC
mutierte Sequenz	GT CAG TCG TAT GTG ATT GCT	GTC GGA GTC CTG CGT GCC
Oligonukleotidsequenz	GT CAG TCG TAT GTG ATT GC	GTC GGA GTC CTG CGT GC

PCR-Bedingungen: 58°C Annealing-Temperatur, 2,5 min Elongation, 25 Zyklen, MJ Research Thermocycler

C-terminale GFP-Epitopmarkierung des *asp1^{D333A}* ORFs mittels homologer Rekombination

Die Transformation von *asp1^{D333A}* oder *asp1Δ* Stämmen war nur durch Elektroporation möglich, was jedoch für die homologe Rekombination ungeeignet war. Im Laufe dieser Arbeit konnte beobachtet werden, dass die leichte Überexpression von Mal3, kodiert von Plasmid pREP3X-*mal3⁺* unter Promotor reprimierenden Bedingungen (+Thiamin) die Transformation des *asp1^{D333A}* Stammes mit der Lithiumacetat-Methode ermöglichte. Für die C-terminale GFP-Fusion des *asp1^{D333A}* ORFs mittels homologer Rekombination wurden zunächst durch Elektroporation pREP3X-*mal3⁺* Transformanten erzeugt. Diese wurden in selektivem MM mit

Thiamin für 18 h bei 30°C angezogen und dann mit der Lithiumacetat-Methode mit einer GFP/*ura4*⁺ Integrationskassette transformiert. Die Plattierung des Transformationsansatzes erfolgte auf für das Plasmid nicht-selektivem, thiamin-haltigem Minimalmedium. Der Verlust des Plasmides in positiven *asp1*^{D333A}-GFP/*ura4*⁺ Transformanten wurde durch Ausstrich der Zellen auf Leucin-Mangelmedium überprüft.

2.11.3 Isolierung genomischer DNA aus *S. pombe*

- 8 ml YE5S möglichst dicht animpfen und ü/N wachsen lassen
- 5 min bei 3500 rpm abzentrifugieren und in 1 ml SP1 (1,2 M Sorbitol, 50 mM Natriumcitrat, 50 mM Natriumphosphat, 40 mM EDTA, pH 5,6) mit 0,25 mg Zymolyase (frisch zugeben) resuspendieren
- 45 min bei 37°C inkubieren. 5 µl Zellen mit 3 µl 10% SDS mixen und mikroskopisch die Spheroblastierung überprüfen
- Protoplasten 5 min bei 6000 rpm ernten, in 450 µl 5x TE (50 mM Tris pH 8, 5 mM EDTA) resuspendieren
- 50 µl 10% SDS zugeben und 5 min bei Raumtemperatur inkubieren
- 150 µl 5 M Kaliumacetat zugeben und 10 min auf Eis inkubieren
- 10 min bei 13000 rpm zentrifugieren, Überstand in neues Reaktionsgefäß überführen
- 1 Volumen Isopropanol zugeben und 3 min bei 13000 rpm zentrifugieren
- das Pellet mit 70% Ethanol waschen
- Resuspendierung in 250 µl 5x TE mit 2 µg/ml RNase, 20 min bei 37°C inkubieren
- 2 µl 10% SDS und 2 µl Proteinase K (5 mg/ml, frisch angesetzt) zugeben, 60 min bei 55°C inkubieren
- 2x mit 1 Volumen Phenol/Chloroform extrahieren
- Fällung mit 96% Ethanol, anschließend in gewünschtem Volumen (30-50 µl) 1x TE resuspendieren

2.11.4 Paarung von *S. pombe* Stämmen

S. pombe ist ein bevorzugt haploider Organismus, weshalb es nach der Paarung zweier haploider Stämme und anschließender Karyogamie in der Regel unmittelbar zur Ausbildung von Tetraden mit vier haploiden Sporen kommt. Frisch ausgestrichene Zellen von zwei zu paarenden Stämmen mit entgegengesetztem Paarungstyp (h^+ und h^-) wurden in 10-15 µl H₂O miteinander vermengt, auf Malzextraktagar aufgetropft und 3 Tage bei 24°C inkubiert. Das Vorhandensein von Tetraden wurde mikroskopisch überprüft. Die Sporen konnten nun mittels „Random Spore“ oder Tetradenanalyse isoliert werden.

Malzextraktmedium:

12 g	Malzextrakt
56,25 ml	Adeninstocklösung
56,25 ml	Uracilstocklösung
3 ml	Histidinstocklösung
3 ml	Leucinstocklösung
8 g	Agar

in 281,5 ml ddH₂O lösen, den pH-Wert auf 5,5 einstellen und autoklavieren.

„Random spore“ Analyse

Bei der sog. „Random Spore“ Analyse wurden die Zellwände der vegetativen Zellen und der Tetraden enzymatisch abgebaut, während die Sporen intakt blieben. Da die Sporen so nicht mehr einer Tetrade zugeordnet werden konnten, musste der gewünschte Genotyp einwandfrei bestimmt werden können.

- 980 µl ddH₂O in einem Reaktionsgefäß vorlegen und einige Zellen des Paarungsmixes darin resuspendieren
- 20 µl β-Glucuronidase (220 u/Ansatz) zugeben und kurz vortexen
- ü/N bei 24°C inkubieren
- Den Ansatz 2x mit ddH₂O waschen, danach die Anzahl der Sporen/ml mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmen
- 100-200 Sporen auf YE5S plattieren und bei permissiver Temperatur inkubieren

Tetradenanalyse

Aus dem Paarungsmix wurden einige Zellen zunächst in 100 µl ddH₂O resuspendiert und in einem vorgegebenen Areal auf YE5S-Agar aufgetragen. Mit einem Mikromanipulator wurden nun die Tetraden an definierten Positionen auf den Agar abgelegt, anschließend wurden die vier Sporen einer Tetrade voneinander separiert. Dieses Vorgehen erlaubte die Identifizierung von Doppelmутanten anhand der Genotypverteilung innerhalb einer Tetrade.

Isolierung diploider Stämme

Diploide *S. pombe* Stämme wurden mit Hilfe des *ade6-M210/ade6-M216* Komplementations-systems isoliert. Dabei wurde die Tatsache ausgenutzt, dass haploide Stämme mit dem *ade6-M210* oder *ade6-M216* Allel nicht auf Adenin-Mangelmedium wachsen konnten. Waren jedoch beide Allele in demselben Stamm vorhanden kam es zur intragenen Komplementation und Adenin-Prototrophie. Die geeigneten Stämme wurden gepaart und

nach 18-24 h wurde die Paarung unterbrochen und mikroskopisch auf das Vorhandensein von diploiden Zygoten überprüft. Die diploiden Zellen wurden durch mehrfache Einzelzellausstriche auf EMM ohne Adenin isoliert.

Genotypbestimmung

Die Genotypen der verwendeten Stämme wurden folgendermaßen identifiziert:

Marker	Identifizierungskriterium
Prototrophie / Auxotrophie	Wachstum / Nicht-Wachstum auf selektivem Minimalmedium
<i>ade6-M210</i> / <i>ade6-M216</i> Allel	charakteristische Rotfärbung auf Adenin-Mangelmedium (MM + 5 µg/ml Adenin)
<i>kanMX6</i> -Modul	Wachstum auf G418-haltigem Medium
Temperatursensitivität	Nicht-Wachstum bei 36°C Beobachtung der Zellmorphologie
Kältesensitivität	Nicht-Wachstum bei 18°C Beobachtung der Zellmorphologie
Paarungstyp	PCR auf Zellen mit den Oligonukleotiden 605, 606 und 607 ergab folgende PCR-Produkte: Paarungstyp h^+ : 671 Bp Paarungstyp h^- : 432 Bp Paarungstyp h^{90} : 671 Bp und 432 Bp

2.11.5 Analyse von adhäsivem und invasivem Wachstum

Die Analyse des adhäsiven und invasiven Wachstums wurde in Anlehnung an ein Protokoll von Prevorovsky etabliert (Prevorovsky et al, 2009).

- Die Zellen bei der permissiven Temperatur in YE5S oder selektivem MM (für Plasmid-Transformanten) ü/N bis zur logarithmischen Wachstumsphase wachsen lassen
- Die Zellzahl/ml mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmen
- 10^5 Zellen in 5 µl Volumen auf 2% Agarplatten auftropfen. Es ist darauf zu achten, dass die Zellen immer im gleichen Abstand zueinander und zum Rand der Platte aufgetropft werden
- 20 Tage bei permissiver Temperatur wachsen lassen
- Das Zellwachstum dokumentieren: Oberflächenwachstum

- Mit einem sanften Wasserstrahl die Zellen vorsichtig und gleichmäßig vom Agar abspülen, die Platten trocknen lassen und erneut dokumentieren: adhäsives Wachstum
- Die verbleibenden Zellen vorsichtig mit dem Zeigefinger abreiben (Handschuhe tragen), dabei darauf achten dass die Agaroberfläche nicht zerstört wird. Die Platten trocknen lassen und dokumentieren: invasives Wachstum
- Die Anzahl der invasiv gewachsenen Kolonien bestimmen

1 M Eisenchlorid Stocklösung:

$\text{FeCl}_3 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ in ddH_2O : HCl 49:1 lösen und sterilfiltrieren.

0,1 M cAMP Stocklösung:

40 mg 8-Br-cAMP einwiegen, in 990 μl ddH_2O + 10 μl 10 M NaOH lösen, bei -20°C lagern.

2.11.6 Wachstumsanalyse auf halb-festem Agarmedium

Das Wachstum auf halb-festem Agar wurde auf 0.3% Agarplatten untersucht. Der pH-Wert dieser Platten und der regulären, 2% Vergleichsplatten wurde auf 7 eingestellt.

- 2×10^7 Zellen einer \bar{u}/N Kultur 2 min bei 3500 rpm abzentrifugieren, mit ddH_2O waschen
- in 20 μl ddH_2O resuspendieren
- 1 μl ($=10^6$ Zellen) vorsichtig in die Mitte der Agarplatten aufgetropfen und die Platten aufrecht inkubieren

2.11.7 Flokkulationsassay

Die Abhängigkeit der Flokkulation von Hefezellen von Zuckern und Ionen wurde folgendermaßen untersucht (Tanaka et al, 1999):

- Die Zellen in YE5S bei 30°C bis zur stationären Phase und dem Einsetzen der Flokkulation wachsen lassen
- Das Medium mit den suspendierten Zellen möglichst vollständig abnehmen
- Die verbleibenden Zellflocken in 40 ml 10 mM EDTA aufnehmen (Deflokkulation) und 3 min bei 3500 rpm zentrifugieren
- 1x mit 20 ml 10 mM EDTA und 2 x mit ddH_2O waschen
- In 20 ml ddH_2O resuspendieren und die OD_{600} messen
- Je $\text{OD}_{600} = 20$ Zellen in 15 ml Reaktionsgefäß abzentrifugieren

- Je resuspendieren in 5 ml ddH₂O oder 100 mM Zuckerlösung, anschließend ggf. 100 mM Salzlösung zugeben (Volumen zuvor berücksichtigen) und kurz vortexen
- 10 min sedimentieren lassen
- 100 µl von der Oberfläche vorsichtig abpipettieren und OD₆₀₀ messen

2.11.8 Zymolyase-Behandlung

Um die Sensitivität von Stämmen gegenüber enzymatischen Zellwandverdau zu überprüfen, wurde einem Protokoll von Perez und Ribas gefolgt (Perez & Ribas, 2004).

- Die Zellen ü/N bei 30°C in YE5S bis zu einer Dichte von 1×10^7 Zellen/ml wachsen lassen
- 50 ml der Kultur 3 min bei 3500 rpm abzentrifugieren
- 1x in 50 mM Citrat-Phosphatpuffer (7,1 g/l Na₂HPO₄, 11,5 g Zitronensäure, pH 5,6) waschen
- In 50 ml Citrat-Phosphatpuffer resuspendieren und OD₆₀₀ bestimmen (Zeitpunkt 0)
- Ansatz aufteilen: 25 ml ohne / 25 ml mit 20 µg/ml Zymolyase 100T bei 30°C auf dem Schüttler inkubieren
- In regelmäßigen Abständen OD₆₀₀ der Kulturen bestimmen

2.11.9 Iodfärbung

Die Zellen wurden zunächst für 2-3 Tage auf einer entsprechenden Agarplatte wachsen gelassen. Durch Bedampfen der Agarplatte mit Iodkristallen konnte nach einigen Minuten eine bräunliche bis dunkelbraune Färbung der Zellen beobachtet werden. Eine veränderte Färbung im Vergleich zu Wildtypzellen wies dabei auf einen veränderten α-Glucan-Gehalt der Zellwände hin.

2.11.10 Serielle Tropftests

Serielle Tropftests erlaubten die Analyse des Wachstumsverhaltens von Hefestämmen bei unterschiedlichen Konditionen. Die jeweiligen Stämme wurden ü/N bei permissiver Temperatur in Flüssigkultur angezogen und die Zellzahl/ml mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Aus einer Verdünnungsreihe wurden dann je 10⁴, 10³, 10² und 10 Zellen in 5 µl Volumen auf Agarplatten aufgetropft und mehrere Tage inkubiert.

2.11.11 Halo-Assay

- Die Zellen ü/N bei 30°C in YE5S bis zur logarithmischen Wachstumsphase wachsen lassen und die Zellzahl/ml mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmen
- 10⁶ Zellen in 2 ml ddH₂O aufnehmen
- 2 ml 0,8% Agar (handwarm) zugeben und vortexen
- Auf eine vorgefertigte Agarplatte gießen und erkalten lassen
- Filterplättchen (ca. 6 mm Ø) auflegen und Latrunculin B-Lösung auftropfen (5 µl Gesamtvolumen)
- Die Platten 2-3 Tage bei 30°C inkubieren und die Halo-Durchmesser bestimmen

2.12 Hefemethoden (*S. cerevisiae*)

2.12.1 Transformation

Die Transformation von *S. cerevisiae* basierte auf einem Protokoll, bei dem die Zellen durch Behandlung mit Lithiumacetat zugänglich gemacht wurden und die DNA durch einen 30 minütigen Hitzeschritt bei 42°C in die Zellen transformiert wird (Gietz et al, 1995).

Homologe Rekombination

Die homologe Rekombination in *S. cerevisiae* erfolgte nach demselben Prinzip wie bereits für *S. pombe* beschrieben (Kap. 2.11.1.3), wobei lediglich 60 Bp Homologie zum Integrationsort benötigt wurden. DNA-Fragmente konnten ebenfalls über homologe Rekombination in linearisierte Vektoren kloniert werden, wobei sie 5' und 3' jeweils 40 Bp Homologie zueinander bzw. zu den 5' und 3' Enden des Vektors aufwiesen.

Klonierungen mittels homologer Rekombination in *S. cerevisiae*

Folgende Plasmide wurden mittels homologer Rekombination in *S. cerevisiae* kloniert. Die verwendeten PCR-Fragmente wurden mit der *Pfu*-Polymerase amplifiziert und sequenziert.

pJR2-3XL-*asp1*¹⁻³⁶⁴ (672):

- Linearisierung des Plasmids pJR2-3XL (270) mit *XhoI*, *NotI*
- PCR-Fragment *asp1*¹⁻³⁶⁴: 1174 Bp, Oligonukleotide 846 und 847, Vorlageplasmid pREP3X-*asp1*⁺ (262)

pJR2-3XL-*asp1*³⁶⁵⁻⁹²⁰ (671):

- Linearisierung des Plasmids pJR2-3XL (270) mit *BsrGI*
- PCR-Fragment *asp1*³⁶⁵⁻⁹²³: 1752 Bp, Oligonukleotide 850 und 843, Vorlageplasmid pREP3X-*asp1*⁺ (262)
- PCR-Fragment *nmt1* Start: 1259 Bp, Oligonukleotide 842 und 848, Vorlageplasmid pREP3X (270)
- PCR-Fragment *nmt1* Stop: 1077 Bp, Oligonukleotide 844 und 845, Vorlageplasmid pREP3X (270)

pGBKT7-*asp1*⁺ (653):

- Linearisierung des Plasmids pGBKT7 (538) mit *BamHI*, *SalI*
- PCR-Fragment *asp1* N-Terminus: 253 Bp, Oligonukleotide 852 und 779, Vorlageplasmid pREP3X-*asp1*⁺ (262)
- PCR-Fragment *asp1* C-Terminus: 433 Bp, Oligonukleotide 783 und 851, Vorlageplasmid pREP3X-*asp1*⁺ (262)
- Gelelektion eines 2326 Bp *NcoI*, *AccI* Fragments aus Plasmid pGADT7-*asp1*⁺ (539)

p426-*asp1*⁺ / p416-*asp1*⁺ (800/801):

- Linearisierung der Plasmide p426/p416 (790/791) mit *HindIII*
- PCR-Fragment *asp1* N-Terminus: 253 Bp, Oligonukleotide 779 und 1111, Vorlageplasmid pREP3X-*asp1*⁺ (262)
- PCR-Fragment *asp1* C-Terminus: 433 Bp, Oligonukleotide 783 und 1113, Vorlageplasmid pREP3X-*asp1*⁺ (262)
- Gelelektion eines 2326 Bp *NcoI*, *AccI* Fragments aus Plasmid pGADT7-*asp1*⁺ (539)

p426-*asp1*¹⁻³⁶⁴ / p416-*asp1*¹⁻³⁶⁴ (798/799):

- Linearisierung der Plasmide p426/p416 (790/791) mit *HindIII*
- PCR-Fragment *asp1*¹⁻³⁶⁴: 1174 Bp, Oligonukleotide 1111 und 1112, Vorlageplasmid pREP3X-*asp1*⁺ (262)

2.12.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus *S. cerevisiae*

Für die Isolierung von Plasmid-DNA aus *S. cerevisiae* wurden die Hefezellen mit Glasperlen aufgeschlossen und die Plasmid-DNA nach dem Prinzip der alkalischen Lyse isoliert (Fink et al, 1983).

2.12.3 Generierung diploider *S. cerevisiae* Stämme durch Paarungstypwechsel

Die Generierung diploider *S. cerevisiae* Stämme erfolgte in dieser Arbeit durch Transformation haploider Stämme mit dem Plasmid YCp50-HO-12. Die Expression der auf diesem Plasmid kodierten HO-Endonuklease befähigt die Zellen zum Paarungstypwechsel und führt zum Auftreten von *MATa* und *MAT α* Zellen in derselben Kolonie. Durch Ausstrich der Transformanten auf YPD Medium wurden diese zur Paarung angeregt und diploide Stämme durch mehrfachen Einzelzellausstrich auf YPD Medium isoliert. Der Plasmidverlust wurde durch Ausstrich auf entsprechendem Selektivmedium sichergestellt.

2.12.4 Sporulation diploider *S. cerevisiae* Stämme

Um diploide *S. cerevisiae* Stämme sporulieren zu lassen und die haploiden Sporen zu isolieren, wurde einem Protokoll aufgeführt in „Yeast Protocols“ (Xiao, 2006) gefolgt. Die Zellen wurden dabei für drei Tage in Präsporulationsmedium angezogen und danach in Sporulationsmedium überführt. Nach 6-14 Tagen (bzw. mindestens 30% Sporulation) Inkubation wurden die vegetativen Zellen mit β -Glukuronidase verdaut und die Sporen mit Mineralöl extrahiert. Die isolierten Sporen wurden auf nicht-selektivem YPD Medium bis zur Koloniebildung inkubiert.

Präsporulationsmedium:

8 g Hefeextrakt
3 g Pepton
100 g Glukose
in 1 l ddH₂O lösen und autoklavieren.

Sporulationsmedium:

1 g Hefeextrakt
10 g Kaliumacetat
0,5 g Glukose
in 1 l ddH₂O lösen und autoklavieren.

2.12.5 Bestimmung des Paarungstyps von *S. cerevisiae*

Die Bestimmung des Paarungstyps von *S. cerevisiae* Stämmen erfolgte mittels PCR auf Zellen mit den Oligonukleotiden 622, 623 und 624 und ergab folgende PCR-Produkte: *MATa*: 544 Bp, *MAT α* : 404 Bp.

2.12.6 Analyse des haploid invasiven und diploid pseudohyphalen Wachstums

Für die Analyse des haploid invasiven bzw. diploid pseudohyphalen Wachstums von *S. cerevisiae* wurde wie für *S. pombe* beschrieben verfahren (Kap. 2.11.5). Haploide Stämme wurden auf YPD-Agar inkubiert, diploide Stämme auf SLAHD-Agar (Gimeno et al, 1992). Um den Einfluss der Expression von Asp1¹⁻³⁶⁴ oder Asp1 auf das pseudohyphale Wachstum des *vip1Δ/VIP1* Stammes zu untersuchen, wurde dieser Stamm mit den Plasmiden 798, 799, 800 und 801 transformiert. Die Transformanten wurden ü/N in selektivem SD-Medium angezogen und anschließend 2x mit ddH₂O gewaschen. 10⁵ Zellen in 5 µl Volumen wurden auf SLAHD-Medium aufgetropft. Bereits geringe Variationen dieses Mediums führen zu einem verändertem pseudohyphalen Wachstumsverhalten. Deshalb wurden Plasmide mit *CEN* (Niedrigkopie) oder 2µ Sequenzen (Hochkopie), auf die nicht durch Weglassen einer Medienkomponente selektioniert werden musste, und *MET25* Promotor, der nicht durch bestimmte Medienzusätze angeschaltet werden musste, verwendet.

SLAHD-Medium:

Komponente	Stocklösungen	Endkonzentration
Hefe Stickstoffquelle (YNB) ohne Aminosäuren und Ammoniumsulfat	4x (sterilfiltriert)	6,7 g/l
Glukose	40% (autoklaviert)	2%
Ammoniumsulfat	10 mM (sterilfiltriert)	0,05 mM
L-Histidin Hydrochlorid	0,5 M (sterilfiltriert)	0,2 mM
Uracil	20 mM (autoklaviert)	0,5 mM
Agar	4% (3x mit ddH ₂ O gewaschen, autoklaviert; kann nach dem Autoklavieren nur 1x aufgeköcht werden)	2%

2.12.7 2-Hybrid-Analyse

Für 2-Hybrid-Analysen wurde das Matchmaker „GAL4 Two-Hybrid System 3“ der Firma Clontech gemäß Herstellerangaben verwendet.

2.13 Mikroskopie

Invasiv oder auf der Agaroberfläche gewachsene Hefezellen wurden mit einem Zeiss Axioskop fotografiert. Fluoreszenzmikroskopie sowie DIC-Aufnahmen wurden an einem Zeiss Axiovert 200 Fluoreszenzmikroskop durchgeführt. Die Visualisierung von Tea1-pkGFP in invasiv wachsenden Zellen erfolgte durch konfokale Mikroskopie am Zeiss LSM 510 Meta.

2.13.1 Lebendfluoreszenz und Beobachtung der Mikrotubuli-Dynamik

Tea1-pkGFP Stämme wurden ü/N in sterilfiltriertem MM bis zur logarithmischen Wachstumsphase angezogen und anschließend analysiert. Für die Beobachtung der Mikrotubuli-Dynamik wurden Stämme verwendet, die endogen ein GFP-Atb2 Fusionsprotein unter Kontrolle des *nmt81* Promotors exprimierten, welches die Visualisierung der Mikrotubuli in lebenden Zellen erlaubte (Garcia et al, 2001).

- Die Zellen ü/N frisch auf MM mit den benötigten Supplementen und Thiamin ausstreichen
- Die Zellen am nächsten Morgen in 20 ml sterilfiltriertem MM ohne Thiamin überimpfen und 48 h bei 30°C auf dem Schüttler inkubieren; die Kultur kann ggf. zwischendurch verdünnt werden
- 10 µl der Zellkultur mit 5 µl Concanavalin A (1 mg/ml) mischen und zentriert auf einem Deckgläschen leicht antrocknen lassen (überschüssiges Medium kann mit einem Papiertuch vorsichtig abgenommen werden)
- zwei schmale Streifen doppelseitiges Klebeband im Abstand von ca. 1,5 cm auf einen Objektträger kleben, das Deckgläschen invertieren und auf dem Klebeband befestigen
- die so entstandene Kammer kann mit ca. 100 µl Medium unterspült werden
- am Fluoreszenzmikroskop mit 63x Objektiv wird das GFP-Signal der immobilisierten Zellen in Zeitintervallen von 10 sec aufgenommen; die Fluoreszenzlampe wird zwischen den Aufnahmen ausgeschaltet um ein zu schnelles Ausbleichen zu verhindern
- die Mikrotubuli-Dynamik kann mit Hilfe der Openlab Software nach verschiedenen Parametern ausgewertet werden

Lebendfluoreszenz-Medium:

20 ml	Prä-Mix (5,5 g Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O, 6 g Kaliumhydrogenphthalat, 2 g Glutaminsäure in 100 ml, sterilfiltriert)
20 ml	Glucose (40 g/100 ml, sterilfiltriert)
15 ml	Adeninstocklösung
15 ml	Uracilstocklösung
4 ml	Histidinstocklösung
4 ml	Leucinstocklösung
4 ml	Lysinstocklösung
16 ml	50x Salzstocklösung
800 µl	1000x Vitaminstocklösung
80 µl	10000x Mineralstocklösung
301 ml	steriles ddH ₂ O

2.13.2 Beobachtung von auf der Agaroberfläche oder invasiv wachsenden Zellen

Die Beobachtung von invasiv oder auf der Agaroberfläche wachsenden Zellen wurde mit dem „ΔT Culture Dish System“ (Bioptechs) durchgeführt. Die Zellen wurden dazu ü/N (Oberflächenwachstum) oder 20 Tage (invasives Wachstum) auf YE5S-Agar vorinkubiert und in 1-2 mm dicken Agarblöcken mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die Agarblöcke wurden auf beheizbare ΔT-Objektträger platziert und mit einem beheizbaren Deckel verschlossen. Die Temperatur von Objektträger und Deckel wurde auf 30°C eingestellt. Die wachsenden Zellen wurden im Zeitabstand von 30 min mit einem 40x Objektiv und DIC Optik fotografiert.

2.13.3 Lokalisierung von Asp1 mittels Immunofluoreszenz

Für die Lokalisierung von GFP-Asp1^{D333A} bzw. GFP-Asp1^{H397A} wurden 7,5x 10⁷ Zellen mit einem Filtrationsgerät auf Membranfiltern gesammelt und in insgesamt 10 ml eiskaltem Methanol für 8 min bei -20°C fixiert. Die weitere Behandlung der Zellen erfolgte nach Standardprotokollen (Bridge et al, 1998; Hagan & Hyams, 1988).

2.13.4 Aktinfärbung mittels Rhodamin-Phalloidin

Vorbereitung des Rhodamins:

- 300 µg in 1,5 ml Methanol lösen, bei -20°C lagern
- vor Gebrauch 15 µl im Vakuum-Konzentrator bei niedrigster Temperatur trocknen, bis das Methanol vollständig verdampft ist

- in 50 µl PEM durch häufiges Auf- und Abpipettieren lösen, bei 4°C lagern. Die gebrauchsfertige Lösung kann ca. 2 Wochen verwendet werden

Fixierung:

- 3 g PFA in 7 ml PEM (100 mM Pipes, 1 mM EGTA, 1 mM MgSO₄, pH 6,9) / 1,2 M Sorbitol und 60 µl 10 M NaOH bei 65°C im Wasserbad lösen; das Volumen anschließend mit PEM / 1,2 M Sorbitol auf exakt 10 ml einstellen
- 7,5x 10⁷ Zellen in 6,5 ml Volumen mit 6,5 ml YE5S / 2,4 M Sorbitol mischen und 5 min bei der vorherigen Inkubationstemperatur inkubieren; danach 2 ml PFA-Lösung zugeben und 30 min auf dem Rad fixieren
- Die Zellen 3 min bei 3500 rpm abzentrifugieren
- 3x mit 1 ml PEM 1 min bei 4000 rpm waschen
- 30 sec in 1 ml 1% Triton X-100 (in PEMS) bei Raumtemperatur inkubieren
- 3x mit 1 ml PEM waschen, in 1 ml PEM resuspendieren und bei 4°C lagern

Färbung:

- Die Zellen 1 min bei 4000 rpm pelletieren und den Überstand vollständig abziehen
- 1 µl des Zellpellets möglichst flüssigkeitsfrei entnehmen
- 7 µl Rhodamin-Lösung zugeben und gut mischen
- 30 min dunkel rotieren lassen
- Die Zellen 1 min bei 4000 rpm abzentrifugieren und 2x mit 15 µl PEM waschen
- In 10 µl PEM resuspendieren
- 3 µl auf Objektträger geben, mit Deckgläschen luftblasenfrei bedecken und mit Nagellack versiegeln
- ü/N bei 4°C lagern und am folgenden Tag auswerten

2.13.5 Anfärbung der aktiven Wachstumszonen mit Calcofluor Weiß

Ansetzen einer Calcofluor Weiß-Stocklösung (5 mg/ml):

- 50 mg Calcofluor Weiß in ein 15 ml Reaktionsgefäß einwiegen und ca. 7 ml ddH₂O zugeben
- Durch tropfenweise Zugabe von 10 M NaOH das Calcofluor Weiß vollständig in Lösung bringen
- Mit ddH₂O auf 10 ml Gesamtvolumen auffüllen und in Aliquots dunkel bei -20°C lagern

Färbung:

- Die Zellen ü/N bis zur logarithmischen Wachstumsphase wachsen lassen

- 1 ml der Kultur 2x 1 min bei 4000 rpm abzentrifugieren (das Reaktionsgefäß nach dem ersten Zentrifugationsschritt um 180° drehen)
- Das Zellpellet in 40 µl ddH₂O + 10 µl Calcofluor Weiß-Lösung (50 µg/ml, Endkonzentration = 10 µg/ml) resuspendieren und 3 min dunkel inkubieren
- Die gefärbten Zellen können am Fluoreszenzmikroskop mit 10 msec Belichtung fotografiert werden

2.13.6 Elektronenmikroskopie

Die Elektronenmikroskopie wurde unter Mithilfe von Frau Nissen (Institut für Parasitologie, Universität Düsseldorf) durchgeführt.

Fixierung:

- 10⁸ Zellen einer logarithmischen ü/N Kultur mit einem Filtrationsgerät auf Membranfilter sammeln und in 1 ml eiskaltem Glutaraldehyd (5% in 0,1 M Na-Cacodylatpuffer, pH 7,2) aufnehmen
- Die Zellen werden bis zur Einbettung dunkel bei 4°C gelagert

Osmierung:

- Die Zellen 3 min bei 13.000 rpm zentrifugieren, Überstand abnehmen
- 1 h in 0,1 M Na-Cacodylatpuffer waschen, die Pufferlösung dabei mehrmals wechseln
- 2 h in OsO₄ (2% in 0,1 M Na-Cacodylatpuffer pH 7,2, 0,8% Kaliumhexacyanoferrat) inkubieren
- 1 h in 0,1 M Na-Cacodylatpuffer waschen (s.o.), zum Schluß Überstand sehr gut abziehen
- 200 µl 3,5% Low Melting Agarose zum Zellpellet geben und gut verrühren; Inkubation auf Eis bis der Agar vollständig ausgehärtet ist
- Den Agarblock mit einem Skalpell aus dem Reaktionsgefäß herauslösen und in ein Schnappdeckelglas geben. Mit 0,1 M Na-Cacodylatpuffer überschichten

Entwässerung:

- Zur Entwässerung werden die Zellen in eiskaltem Aceton mit aufsteigender Konzentration inkubiert
- | | |
|------------------------|------------|
| 50% | 1 x 10 min |
| 70% | 2 x 10 min |
| 80% | 2 x 10 min |
| 90% | 2 x 10 min |
| 96% | 2 x 10 min |
| 100% | 2 x 10 min |
| 100% mit Molekularsieb | 1 x 10 min |

Einbettung:

- Zur Einbettung werden die Zellen stufenweise bei Raumtemperatur mit Aralditlösungen (1 Teil Araldit, 1 Teil Araldithärter, 1,8% Beschleuniger) überschichtet
 - Araldit:Aceton 1:2 1-2 h
 - Araldit:Aceton 1:1 1-2 h
 - Araldit:Aceton 2:1 ü/N
 - Reines Araldit ü/N
- Den Agarblock zerteilen, mit reinem Araldit in Form eingießen
- ü/N bei 45°C und 3 Tage bei 60°C aushärten lassen

Semi-Schnitte:

- Die Aralditblöcke im Mikrotom einspannen. Mit einer Rasierklinge werden die Blöcke getrimmt, wobei überschüssiges Araldit um die enthaltenen Zellen herum abgetragen wird
- Mit einem Glasmesser werden 0.99 µm Schnitte angefertigt
- Den Schnitt auf einem Wassertropfen auf einem Gelatine-beschichteten Objektträger ablegen, ein Chloroform-getränktes Filterpapier kurz darüber halten um den Schnitt zu glätten
- Bei 60°C auf einer Heizplatte trocknen lassen
- Ein Tropfen Methylenblaulösung auf den Schnitt geben und 30 sec färben, anschließend mit ddH₂O spülen
- Die Schnitte können nun unter dem Mikroskop begutachtet werden

Ultra-Schnitte:

- Mit einem Diamanten werden am Mikrotom 70 nm Schnitte angefertigt und auf ein Kupfernetz abgelegt (durchgeführt von Frau Nissen)

Kontrastierung:

- Die Kupfernetze an einem Kontrasterring befestigen
- Kurz in 50% Ethanol legen
- 20 min dunkel in Uranylacetat lagern (5% in 50% Ethanol)
- 2x mit 50% Ethanol und 1x mit ddH₂O spülen
- Kurz in 0,02 M NaOH legen
- 20 min dunkel in Bleicitrat lagern (1,33 g Bleinitrat, 1,76 g tri-Natriumcitrat-Dihydrat, 8 ml NaOH, auf 50 ml auffüllen mit abgekochtem ddH₂O; das Nitrat geht in Citrat über)
- 2x mit 0,02 M NaOH und 1x mit ddH₂O spülen
- Kupfernetze ü/N trocknen lassen
- Die Zellen können nun am Elektronenmikroskop aufgenommen werden

2.14 Proteinmethoden

2.14.1 Herstellung von Proteinextrakten aus *S. pombe*

- alle Schritte werden bei 4°C bzw. auf Eis durchgeführt; die verwendeten Lösungen müssen eiskalt sein
- 2×10^8 Zellen einer logarithmisch gewachsenen ü/N Kultur 5 min bei 3000 rpm ernten
- 1x mit 5 ml STOP-Puffer waschen
- Zellen im verbleibenden Überstand resuspendieren, in 1,5 ml Reaktionsgefäß überführen und erneut 5 min bei 10000 rpm zentrifugieren
- Überstand vollständig abziehen, Zellen in 10 µl HB15-Puffer resuspendieren
- 6x 20 sec mit 2-3 Volumen Glasperlen vortexen
- 1 ml HB15-Puffer zugeben, mehrmals auf- und abpipettieren und in ein neues Reaktionsgefäß überführen
- den Zellaufschluß mikroskopisch überprüfen
- 30 min bei 13000 rpm zentrifugieren
- den Überstand (Proteinlösung) abnehmen und aliquotiert bei -20°C lagern
- für die Auftrennung der Proteine in SDS-Polyacrylamidgelen werden 32,5 µl Proteinextrakt mit 12,5 µl 4x SDS-Gelladepuffer und 5 µl 1 M DTT versetzt

STOP-Puffer (pH 8 mit NaOH):

Komponente	Stocklösungen	Endkonzentration
NaCl	1 M (autoklaviert)	150 mM
NaF	1 M (Lagerung bei 4°C)	50 mM
EDTA	100 mM (autoklaviert)	10 mM
NaN ₃	100 mM (Lagerung bei 4°C)	1 mM

HB15-Puffer:

Komponente	Stocklösungen	Endkonzentration
Mops	250 mM (autoklaviert)	25 mM
β-Glycerophosphat	500 mM (sterilfiltriert)	60 mM
p-Nitrophenylphosphat	100 mM (Lagerung bei -20°C)	15 mM
MgCl ₂	100 mM (autoklaviert)	15 mM
EGTA	100 mM (autoklaviert)	15 mM
DTT	1 M (Lagerung bei -20°C)	1 mM
Natriumorthovanate	1 mM (Lagerung bei -20°C)	0,1 mM
Triton X-100	20% (v/v)	1%
PMSF	100 mM (in Isopropanol, Lagerung bei -20°C)	1 mM
Complete Proteasen-Inhibitor		1 Tablette/ 50 ml Puffer

2.14.2 Immunopräzipitation

Immunopräzipitationen wurden mit dem „µMACS Epitope Tag Protein Isolation Kit“ der Firma Miltenyi in Übereinstimmung mit den Herstellerangaben durchgeführt. Es wurden je 250 µl Proteinextrakt eingesetzt, als Waschpuffer wurde HB15-Puffer verwendet.

2.14.3 Western Blot-Analyse

- die Proben 10 min bei 100°C aufkochen und auf ein 7% SDS-Polyacrylamidgel auftragen
- Elektrophorese bei 100 V; Laufpuffer: 100 ml 10 x Laufpuffer (30 g Tris, 144 g Glycin, ad 1 l ddH₂O), 10 ml 10% SDS, 890 ml ddH₂O
- Transfer auf PVDF-Membran (Immobilon-P, Methanol equilibriert) 1 h bei 300 mA; Transferpuffer: 5,8 g Tris, 2,9 g Glycin, 3,7 ml 10% SDS, 200 ml Methanol, ad 1 l ddH₂O
- Blockierung der Membran für 2 h bei Raumtemperatur; Blockierungslösung: 3% Milchpulver in PBS/Tween
- Inkubation der Membran mit Erstantikörper (in Blockierungslösung) ü/N bei 4°C
- die Membran 1x 15 min und 3x 5 min in PBS/Tween waschen
- Inkubation der Membran mit AP-konjugiertem Zweitantikörper (in Blockierungslösung) 2-4 h bei Raumtemperatur
- die Membran 1x 15 min und 3x 5 min in PBS/Tween waschen, anschließend in DIGP3 (100 mM Tris/HCl pH 9.5, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂) equilibrieren
- die Membran mit 20 ml DIGP3 + 33 µl BCIP + 66 µl NBT dunkel bis zur Entwicklung der Farbreaktion inkubieren
- die Reaktion durch Waschen der Membran in ddH₂O abstoppen

Zusammensetzung des Sammelgels:

1,5 ml Acrylamid (37,5:1)
 2,5 ml 4x Sammelgelpuffer
 (0,5 M Tris/HCl pH 6.8, 0.4% SDS)
 6 ml ddH₂O
 200 µl 10% APS
 20 µl TEMED

Zusammensetzung des Trenngels (7%):

4,6 ml Acrylamid (37,5:1)
 5 ml 4x Trenngelpuffer
 (1,5 M Tris/HCl pH 8.8, 0.4% SDS)
 10,2 ml ddH₂O
 200 µl 10% APS
 20 µl TEMED

2.14.4 Coomassie-Färbung

SDS-Polyacrylamidgele wurden nach der Elektrophorese für 1 h in Coomassie-Färbelösung (0,25 g Coomassie Brilliant Blau R250, 10 ml Essigsäure, 45 ml Methanol, 45 ml ddH₂O) gefärbt und 1-2 h unter mehrmaligem Auswechseln der Entfärbelösung (450 ml 96% Ethanol, 100 ml Essigsäure, 450 ml ddH₂O) entfärbt.

2.14.5 Proteinkonzentrationsbestimmung

1-5 µl Proteinextrakt wurden in insgesamt 800 µl ddH₂O und 200 µl Bradford-Reagenz aufgenommen, 10 min inkubiert und die Absorption bei 595 nm bestimmt. Ebenso wurde eine Eichgerade mit definierten Mengen BSA erstellt (Stocklösung 10 mg/ml; Endkonzentrationen 1-10 µg/ml); die Berechnung der Proteinkonzentration erfolgte anhand der Geradengleichung der Eichgerade.

2.15 Signifikanztests

Häufigkeiten von Merkmalen wurden mit Hilfe des χ^2 -Tests auf Unabhängigkeit geprüft. Der Vergleich einzelner Stichproben mit einem festen Wert wurde mit dem Ein-Stichproben-*t*-Test durchgeführt. Zum Vergleich zweier unabhängiger Stichproben wurden bei Varianzhomogenität der Zwei-Stichproben-*t*-Test, bei Varianzheterogenität der näherungsweise Welch-Test durchgeführt. Als Signifikanzniveau α wurde 5% festgelegt.

3 Ergebnisse

3.1 Erzeugung von Mutantenstämmen, die spezifische Asp1 Varianten exprimieren

In dieser Arbeit wurden Mutantenstämmen generiert, die unter physiologischen Bedingungen spezifische Proteinvarianten der *S. pombe* 1/3 Kinase Asp1 exprimieren, bei denen entweder die N-terminale Kinasedomäne oder die C-terminale Phosphatasedomäne inaktiviert ist. Um dies zu erreichen, wurde jeweils eine einzelne Aminosäure der Kinasedomäne oder der Phosphatasedomäne mit Alanin substituiert. Dabei handelt es sich um D333, ein essentieller katalytischer Aspartat-Rest der Kinasedomäne, und H397, ein hoch-konserviertes Histidin der Phosphatasedomäne (Abb. 9A) (Mulugu et al, 2007).

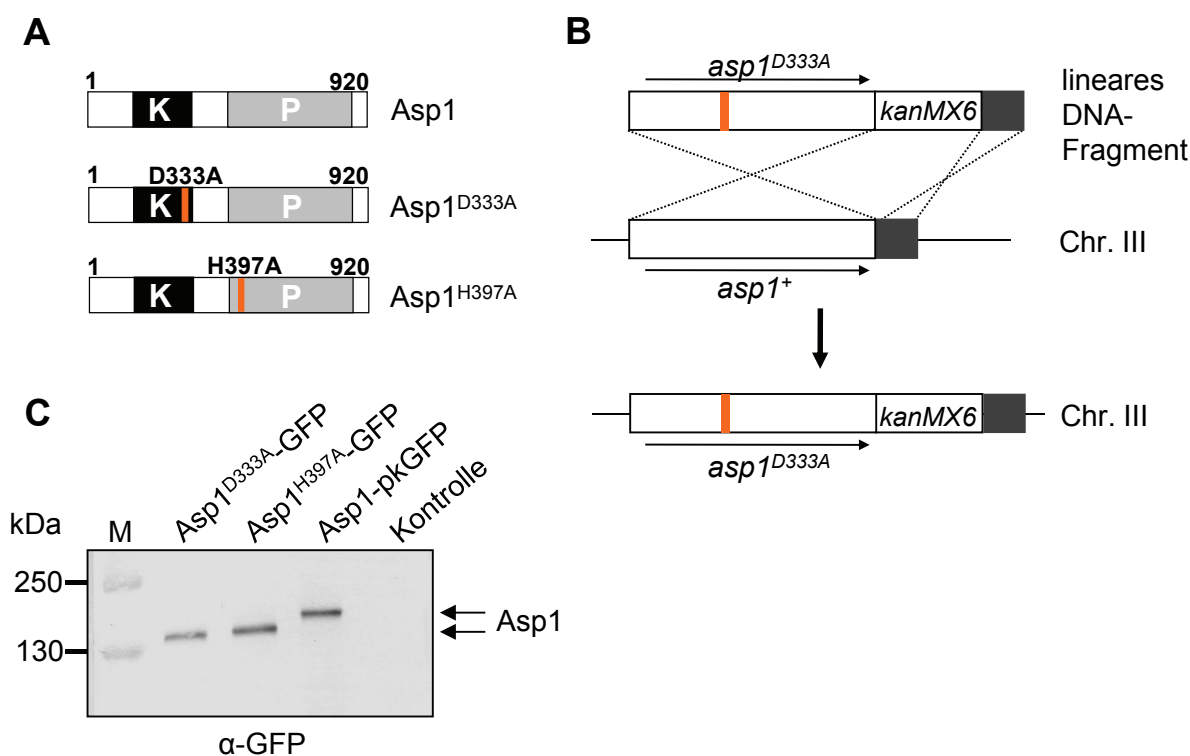


Abbildung 9: Erzeugung von Mutantenstämmen, die spezifische Asp1 Varianten exprimieren. (A) Schematische Darstellung der jeweils 920 Aminosäuren umfassenden Asp1 Varianten mit der N-terminalen Kinasedomäne („K“) und C-terminalen Phosphatasedomäne („P“). Orange Linien geben die Position der D333A und H397A Substitutionen an. (B) Schematische Darstellung der Generierung des *asp1*^{D333A} Mutantenstammes. Der endogene *asp1*⁺ ORF auf Chromosom III (Chr. III) wurde durch homologe Rekombination gegen ein lineares *asp1*^{D333A}/*kanMX6* Fragment ausgetauscht. Zusätzliche homologe Sequenzen sind dunkelgrau unterlegt. Orange Linien markieren die Position der Basenpaarmutationen. (C) Asp1^{D333A}-GFP, Asp1^{H397A}-GFP und Asp1-pkGFP wurden mittels Immunopräzipitation mit α-GFP Antikörpern aus vergleichbar konzentrierten Proteinextrakten isoliert, mittels SDS-PAGE (7%) aufgetrennt und im Western Blot mit α-GFP Antikörper nachgewiesen. Als Kontrolle diente ein wildtypischer Stamm. Aufgrund des zusätzlichen pk-Epitops läuft Asp1-pkGFP höher als Asp1^{D333A}-GFP bzw. Asp1^{H397A}-GFP. Asp1^{D333A}-GFP und Asp1^{H397A}-GFP: 133 kDa, Laufhöhe ca. 137 kDa; Asp1-pkGFP: 137 kDa, Laufhöhe ca. 143 kDa. M, Größenstandard.

Zur Generierung der Asp1^{D333A} oder Asp1^{H397A} exprimierenden Mutantenstämme wurden die entsprechenden Basenpaarmutationen in den endogenen *asp1*⁺ ORF eingeführt (Abb. 9B). Dazu wurden lineare DNA-Fragmente, die aus dem mutierten *asp1*^{D333A} oder *asp1*^{H397A} ORF sowie einem *kanMX6* Modul als Selektionsmarker bestanden, in einen Wildtypstamm transformiert, so dass durch homologe Rekombination der wildtypische *asp1*⁺ ORF gegen den mutierten *asp1*^{D333A} oder *asp1*^{H397A} ORF ausgetauscht wurde (Abb. 9B) (Kap. 2.11.2). Das *kanMX6* Modul integrierte dabei 3' des *asp1* ORF. Im Vorfeld wurde ausgeschlossen, dass seine Anwesenheit das Zellwachstum beeinflusst (Abb. Z1 im Anhang). Die endogene Integration des *asp1*^{D333A} und *asp1*^{H397A} ORFs wurde mittels PCR-Analyse und Sequenzierung verifiziert (Abb. Z1 im Anhang). Da kein Asp1 Antikörper zur Verfügung stand, wurden endogene *asp1-gfp* Fusionen erzeugt, um zu bestimmen, ob die Asp1^{D333A} und Asp1^{H397A} Varianten in der gleichen Menge wie wildtypisches Asp1 exprimiert werden. Die Fusionsproteine wurden mittels Immunopräzipitation aus vergleichbar konzentrierten Proteinextrakten isoliert und im Western Blot nachgewiesen. Die Asp1^{D333A}-GFP und Asp1^{H397A}-GFP Fusionsproteine lagen in vergleichbaren Mengen wie das Asp1-pkGFP Fusionsprotein vor (Abb. 9C). Somit wurden Mutantenstämme erzeugt, in denen anstelle des wildtypischen Asp1 Proteins jeweils Varianten mit einer einzelnen Aminosäuresubstitution unter physiologischen Bedingungen exprimiert werden.

3.2 Asp1 wird für das bipolare Zellwachstum benötigt

3.2.1 Das Asp1 Protein wird für ein wildtypisches Mikrotubuli-Zytoskelett benötigt

Die Suppression der aberranten Phänotypen von *mal3* Mutantenstämmen durch Asp1 Varianten war bisher nur unter Überexpressionsbedingungen untersucht worden (Daten nicht gezeigt) (Beuter, 2006; Vietmeier-Decker, 2004). Die Suppressionsanalyse wurde deshalb anhand der neu generierten *asp1*^{D333A} und *asp1*^{H397A} Mutantenstämme sowie eines *asp1Δ* Deletionsstammes unter endogenen Bedingungen durchgeführt. *mal3* Mutanten- und Deletionsstämme zeigen eine massiv erhöhte Sensitivität gegenüber der Mikrotubuli-destabilisierenden Chemikalie Thiabendazol (TBZ) (Beinhauer, 1999; Beuter, 2006). Deshalb wurden Doppelmутantenstämme zwischen einem *mal3* Deletionsstamm (*mal3Δ*) und *asp1*^{D333A}, *asp1*^{H397A} oder *asp1Δ* erzeugt und ihr Wachstum im seriellen Tropftest auf TBZ-haltigem Medium analysiert. Dabei zeigte sich, dass die Expression von Asp1^{H397A} zu einer Suppression der TBZ-Sensitivität des *mal3Δ* Stammes führte, während die Expression von Asp1^{D333A} die TBZ-Sensitivität noch verstärkte (Abb. 10A). Der Verlust von Asp1 führte ebenfalls zu einer Verstärkung des *mal3Δ* TBZ-Phänotyps (Abb. 10A). Somit wird die TBZ-Sensitivität des *mal3Δ* Stammes von der Funktion der Asp1 Kinasedomäne supprimiert,

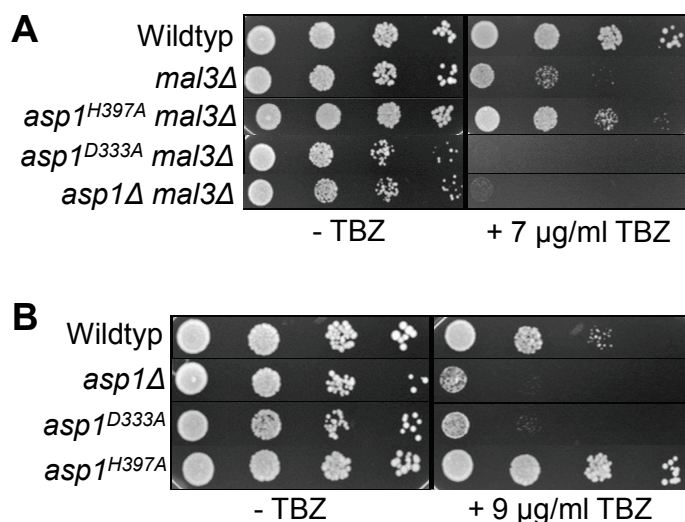


Abbildung 10: Die Expression der Asp1^{D333A} und Asp1^{H397A} Varianten beeinflusst die Stabilität des Mikrotubuli-Zytoskeletts unabhängig von Mal3. (A) Serieller Tropfpest der genannten Stämme auf YE5S ohne oder mit 7 µg/ml TBZ. Inkubation: 24°C (4 Tage). (B) Serieller Tropfpest der genannten Stämme auf YE5S ohne oder mit 9 µg/ml TBZ. Inkubation: 24°C (5 Tage).

Der *asp1Δ* Stamm zeigte im Vergleich zum Wildtypstamm eine erhöhte TBZ-Sensitivität (Abb. 10B). Der *asp1^{D333A}* Stamm zeigte dieselbe erhöhte TBZ-Sensitivität wie der *asp1Δ* Stamm (Abb. 10B). Der *asp1^{H397A}* Stamm war TBZ-resistenter im Vergleich zum Wildtypstamm (Abb. 10B). Die vollständige Funktion des Asp1 Proteins wird demnach für ein wildtypisches Mikrotubuli-Zytoskelett benötigt.

3.2.2 Asp1 reguliert die Interphasen-Mikrotubuli-Dynamik

Um den Einfluss von Asp1 auf das Mikrotubuli-Zytoskelett näher spezifizieren zu können, wurde untersucht, ob und wie der Verlust von Asp1 und die Expression von Asp1^{H397A} die Organisation und Dynamik des Interphasen-Mikrotubuli-Zytoskeletts verändern. In wildtypischen Zellen sind die Interphasen-Mikrotubuli ausgehend von der Zellmitte entlang der zellulären Längsachse organisiert (Abb. 11A). Ihre Plus-Enden polymerisieren in Richtung des Zellendes, Pausieren am Zellende, und depolymerisieren dann zurück zur Zellmitte (Abb. 11B) (Drummond & Cross, 2000). Treffen sie während der Polymerisierung am seitlichen Zellkortex auf, so werden sie zum Zellende hin umgelenkt. Ort und Zeitpunkt der Mikrotubuli-Depolymerisierung werden durch die Interaktion zwischen Mikrotubuli-Plus-End-lokalisierten Proteinen und Faktoren am Zellkortex reguliert (Akhmanova & Steinmetz, 2008). Das dynamische Verhalten der Interphasen-Mikrotubuli wurde in lebenden Zellen gemessen. Dazu wurden Stämme verwendet, die endogen ein GFP- α -Tubulin Fusionsprotein (GFP-Atb2) exprimieren (Garcia et al, 2001). Die Mikrotubuli-Dynamik wird durch diese α -Tubulin Variante nicht verändert (Grallert et al, 2006). In wildtypischen Zellen

konnte dabei das oben beschriebene Verhalten der Interphasen-Mikrotubuli beobachtet werden, ein Beispiel ist in Abb. 11C gezeigt. Der untere Mikrotubulus („a1“ bei 0 sec) polymerisierte in Richtung des linken Zellendes und erreichte es nach 50 sec („a2“ bei 50 sec). Er pausierte 30 sec am Zellende, bevor die Depolymerisierung einsetzte („a3“ bei 90 sec).

Die Interphasen-Mikrotubuli in Zellen des *asp1Δ* Stammes waren desorganisiert, d.h. häufig nicht entlang der zellulären Längsachse organisiert und konnten in bis zu 90° Winkeln zum Zellkortex ausgerichtet sein (Abb. 11D, Mikrotubulus markiert mit „a“ bei 0 sec). Asp1 wird also für die räumliche Organisation der Interphasen-Mikrotubuli benötigt. Zudem fand bei 33.9% der Mikrotubuli die Depolymerisierung nicht am Zellende, sondern bereits im Zytoplasma oder am seitlichen Zellkortex statt (Tab. 1). Beispiele dafür sind ebenfalls in Abb. 11D gezeigt. Der Mikrotubulus markiert mit „b1“ (bei 10 sec) polymerisierte zunächst in Richtung des linken Zellendes, depolymerisierte jedoch verfrüht am seitlichen Zellkortex („b2“ bei 50 sec). Der Mikrotubulus markiert mit „c1“ (bei 60 sec) traf bei der Polymerisierung aufgrund seiner Schrägstellung ebenfalls auf den seitlichen Zellkortex auf und depolymerisierte später dort („c2“ bei 100 sec). Ein weiterer Mikrotubulus markiert mit „d1“ (bei 60 sec) polymerisierte in Richtung des linken Zellendes, depolymerisierte jedoch ebenfalls vor Erreichen des Zellendes frühzeitig im Zytoplasma („d2“ bei 110 sec). Lediglich der Mikrotubulus markiert mit „e“ (bei 100 sec, ein Pfeilkopf zeigt auf das Plus-Ende des Mikrotubulus) erreichte ein Zellende. Die Dauer der Polymerisierung der Mikrotubuli war im *asp1Δ* Stamm ähnlich wie im Wildtypstamm (Tab. 1). Dies spricht dafür, dass die Mikrotubuli im *asp1Δ* Stamm nicht instabiler sind als im Wildtypstamm, und ihre frühzeitige Depolymerisierung nicht auf eine geringere Stabilität zurückgeführt werden kann. Asp1 wird also benötigt, um die Depolymerisierung der Interphasen-Mikrotubuli am Zellende stattfinden zu lassen.

Als nächstes wurde die Mikrotubuli-Dynamik des *asp1^{H397A}* Stammes untersucht. Die Interphasen-Mikrotubuli in Zellen des *asp1^{H397A}* Stammes waren wie in wildtypischen Zellen entlang der zellulären Längsachse organisiert und erreichten während der Polymerisierungsphase die Zellenden (Abb. 11E, Tab. 1). Der Kontakt mit dem Zellende hielt jedoch deutlich länger an als beim Wildtypstamm und betrug 86.5 ± 31 sec (Tab. 1). Interessanterweise kam es zu keiner Pausierung bzw. Verlangsamung der Polymerisierung am Zellende, sondern die Polymerisierung wurde nach Erreichen des Zellendes fortgesetzt. Dies ist anhand des Mikrotubulus in Abb. 11E zu sehen. Zum Zeitpunkt 0 sec waren beide Plus-Enden mit den Zellenden in Kontakt (mit Pfeilköpfen markiert). In den folgenden drei Aufnahmen ist erkennbar, dass sich der Mikrotubulus durch die ausgeübte Kraft der andauernden Polymerisierung zunehmend krümmte. Zum Zeitpunkt 40 sec ging diese

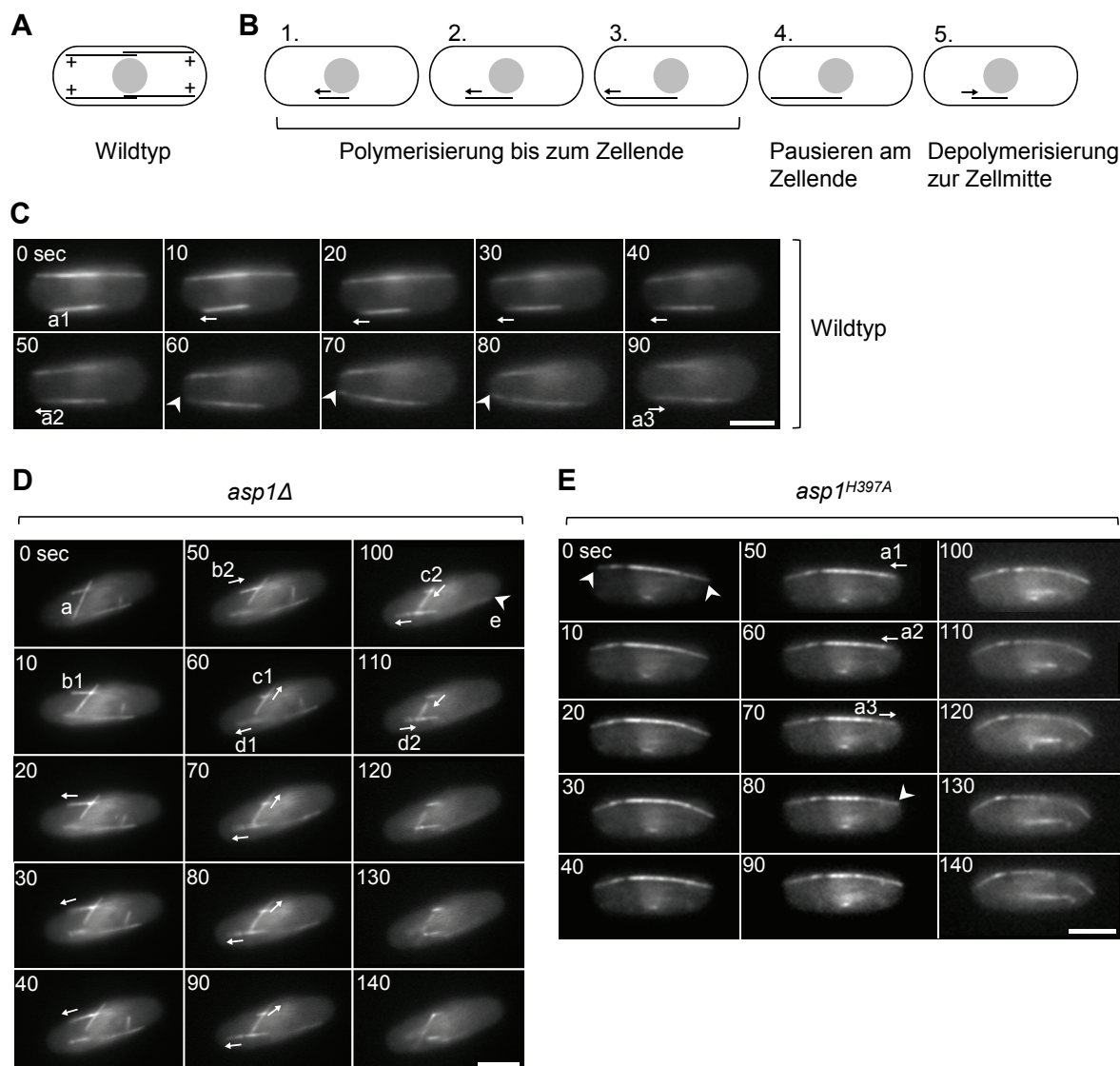


Abbildung 11: Asp1 wird für die Depolymerisierung der Interphasen-Mikrotubuli am Zellende benötigt. (A) Schematische Darstellung des wildtypischen Interphasen-Mikrotubuli-Zytoskeletts. Die Plus-Enden der Mikrotubuli sind mit „+“ markiert. (B) Schematische Darstellung der wildtypischen Mikrotubulidynamik. (C-E) Lebendfluoreszenz-Aufnahmen der Mikrotubuli eines *gfp-atb2⁺* (C; Abbildung entnommen aus eigener Diplomarbeit, 2006), *asp1Δ gfp-atb2⁺* (D) und *asp1^{H397A} gfp-atb2⁺* (E) Stammes. Pfeile beschreiben die Polymerisierungs- oder Depolymerisierung ausgewählter Mikrotubuli, Pfeilköpfe zeigen den Kontakt ausgewählter Mikrotubuli-Enden mit dem Zellende an. Die Zellen wurden bei 30°C in sterilfiltriertem MM vorinkubiert und im Abstand von 10 sec aufgenommen. Buchstaben/Zahlen s. Text. Balken, 5 µm.

Krümmung zurück, da sich das rechte Plus-Ende des Mikrotubulus kurzzeitig vom Zellende zurückzog („a1“ bei 50 sec und „a2“ bei 60 sec). Es polymerisierte jedoch sofort wieder zurück zum rechten Zellende („a3“ bei 70 sec) und blieb fortan konstant mit ihm in Kontakt, so dass es erneut zu einer starken Krümmung des Mikrotubulus kam (Zeitpunkt 90 bis 140 sec). Die Expression von Asp1^{H397A} führt also dazu, dass die Depolymerisierung der Interphasen-Mikrotubuli am Zellende verspätet einsetzt.

	a) Verweildauer am Zellende (sec)	b) Depolymerisierung nicht am Zellende (%)	c) Dauer der Polymerisierung (sec)
Wildtyp	33.8 ± 22.6 (33 ± 27)	19.5 (7.3)	71.2 ± 27.2 (70 ± 32)
<i>asp1Δ</i>	28 ± 19.4	33.9**	68 ± 26
<i>asp1^{H397A}</i>	86.5 ± 31**	7.9*	n.b.

Tabelle 1: Mikrotubuli-Dynamik in den *asp1Δ* und *asp1^{H397A}* Stämmen. Werte in Klammern geben bereits publizierte Werte für einen isogenen Wildtypstamm an (Grallert et al, 2006). n.b., nicht bestimmt. Wildtyp: a) n=29, b) n=154, c) n=50; *asp1Δ*: a) n=31, b) n=254, c) n=61; *asp1^{H397A}*: a) n=25, b) n=88. a) **, p<0,01 verglichen mit dem Wildtypstamm (Welch-Test). b) *, p<0,05; **, p<0,01 verglichen mit dem Wildtypstamm (χ^2 -Test).

3.2.3 In Zellen ohne funktionelle Asp1 Kinasedomäne ist der Zellendmarker Tea1 nicht mehr richtig lokalisiert

Die Interphasen-Mikrotubuli transportieren Zellendmarkerproteine zu den Zellenden (Chang & Martin, 2009). Da Asp1 für die Depolymerisierung der Interphasen-Mikrotubuli am Zellende benötigt wird, stellte sich die Frage, ob Zellendmarker in den *asp1* Mutantenstämmen noch korrekt an den Zellenden lokalisieren. Dies wurde anhand der Lokalisierung des GFP-markierten Zellendmarkers Tea1 in lebenden Zellen des Wildtypstammes sowie der *asp1^{H397A}* und *asp1^{D333A}* Mutantenstämmen analysiert. Dabei fiel zunächst auf, dass sich die GFP-Signalintensität beim *asp1^{D333A}* Stamm deutlich vom Wildtypstamm und dem *asp1^{H397A}* Stamm unterschied. Bei Letzteren war das GFP-Signal klar erkennbar und vergleichbar stark (Abb. 12A, unbearbeitete Aufnahmen). Beim *asp1^{D333A}* Stamm dagegen war das GFP-Signal enorm reduziert und bei unbearbeiteten Aufnahmen nicht auswertbar (Abb. 12A, unbearbeitete Aufnahmen). Die Aufnahmen wurden deshalb nachbearbeitet, um die Lokalisierung von Tea1-pkGFP auch für den *asp1^{D333A}* Stamm auswerten zu können (Abb. 12A, nachbearbeitete Aufnahmen). Im Wildtypstamm lokalisierte Tea1-pkGFP an beiden Zellenden (Abb. 12A, B). Diese Lokalisierung war auch bei dem *asp1^{H397A}* Stamm zu beobachten (Abb. 12A, B). Bei dem *asp1^{D333A}* Stamm war Tea1-pkGFP dagegen neben der sehr schwachen Zellendlokalisierung unterschiedlich lokalisiert. In nur 42% der Zellen lokalisierte es an beiden Zellenden, wobei oftmals eines der Zellenden ein viel schwächeres Signal aufwies als das andere (Abb. 12A, B). In 32% der Zellen lokalisierte Tea1-pkGFP ausschließlich an einem Zellende (Abb. 12A, Zelle 3; Abb. 12B). In 11% der Zellen fand sich Tea1-pkGFP fehllokalisiert in der Nähe des seitlichen Zellkortex; in den übrigen 15% der Zellen war kein Tea1-pkGFP-Signal sichtbar (Abb. 12B). Somit wird die Funktion der Asp1 Kinasedomäne für die wildtypische Lokalisierung des Zellendmarkers Tea1 benötigt. Tea1 spielt eine essentielle Rolle für die Auswahl und Aktivierung von Zellenden als Wachstumszonen (Glynn et al, 2001; Mata & Nurse, 1997). Deshalb wurde im Folgenden

analysiert, wie sich der Funktionsverlust der Asp1 Kinasedomäne auf die Wachstumszonen an den Zellenden auswirkt.

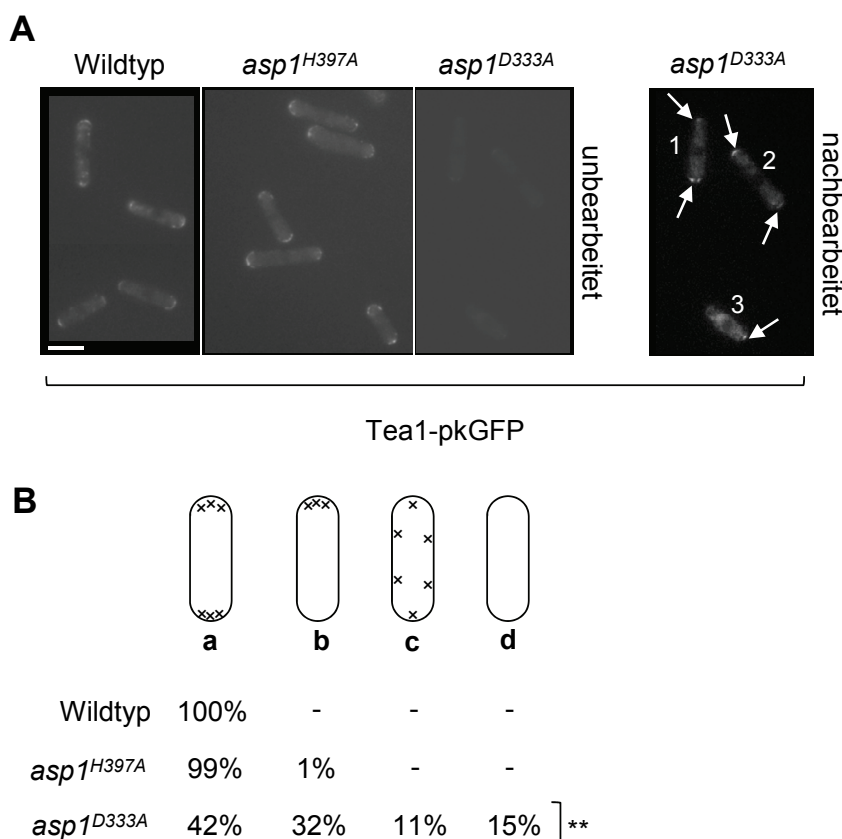


Abbildung 12: Lokalisierung von Tea1-pkGFP in *asp1^{H397A}* und *asp1^{D333A}* Mutantenstämmen. (A) Fluoreszenzaufnahmen lebender, Tea1-pkGFP exprimierender Zellen des Wildtypstammes, des *asp1^{H397A}* oder *asp1^{D333A}* Stammes bei 30°C in sterilisiertem MM. Die GFP-Signale der verschiedenen Stämme wurden mit denselben Kameraeinstellungen aufgenommen, um Unterschiede in der Signalintensität sichtbar zu machen (unbearbeitete Aufnahmen). Um das Tea1-pkGFP Signal im *asp1^{D333A}* Stamm sichtbar zu machen, wurden Helligkeit und Kontrast der Aufnahme angepasst (nachbearbeitete Aufnahme). Pfeile markieren Tea1-pkGFP an den Zellenden des *asp1^{D333A}* Stammes. Zahlen s. Text. Balken, 5 µm. (B) Quantifizierung der Zellen mit Tea1-pkGFP (x) an beiden Zellenden (a), an einem Zellende (b), entlang des Zellkortex (c) oder ohne Tea1-pkGFP Signal (d). Unterschiede in der Signalintensität wurden dabei nicht berücksichtigt. Wildtyp n=61, *asp1^{H397A}* n=89, *asp1^{D333A}* n=65. **, p<0,01 für *asp1^{D333A}* verglichen mit dem Wildtyp (χ^2 -Test).

3.2.4 Die Funktion der Asp1 Kinasedomäne wird für die Ausbildung der Wachstumszone am neuen Zellende benötigt

Während der Wachstumsphase in der Interphase des Zellzyklus findet bei den zylindrischen *S. pombe* Zellen Wachstum ausschließlich an den Zellenden statt (Mitchison & Nurse, 1985). Zu Beginn der Wachstumsphase wächst zunächst nur das alte Zellende, welches schon vor der vorangegangenen Zellteilung vorhanden war (Mitchison & Nurse, 1985). Im weiteren Verlauf der Wachstumsphase kommt es zum NETO-Ereignis, d.h. zur Definition des neuen

Zellendes als zweite Wachstumszone. Dieser Wechsel von mono- zu bipolarem Wachstum erfordert unter anderem eine Mindestzelllänge (Mitchison & Nurse, 1985). Um festzulegen, ob der Funktionsverlust der Asp1 Kinasedomäne dieses Wachstumsverhalten beeinflusst, wurden auf festem Agarmedium wachsende Zellen des *asp1^{D333A}* Mutantenstammes sowie zum Vergleich des Wildtypstammes und des *asp1^{H397A}* Stammes mittels Lebendzellmikroskopie analysiert.

Zuerst wurde die Wahl der Zellenden nach der Zytokinese bestimmt. Bis auf wenige Ausnahmen wuchsen die Zellen des Wildtypstammes und der *asp1^{D333A}* und *asp1^{H397A}* Mutantenstämme nach der Zellteilung an den alten Zellenden (Abb. 13). Ein wildtypisches Asp1 Protein wird daher nicht dafür benötigt, das alte Zellende als Wachstumszone zu definieren.

Wildtyp	24	1	1	-	-
<i>asp1^{H397A}</i>	58	1	1	1	-
<i>asp1^{D333A}</i>	51	-	-	3	1

Abbildung 13: Asp1 wird nicht für das Wachstum am alten Zellende zu Beginn der Wachstumsphase benötigt. Gezeigt sind die wachsenden Zellenden zu Beginn der Wachstumsphase in den genannten Stämmen bei Wachstum auf YE5S-Agar bei 30°C (Zahlen sind absolute Anzahlen in jeweiliger Kategorie). Horizontale Pfeile geben die Wachstumsrichtung der Tochterzellen an.

Als nächstes wurde das Auftreten von NETO überprüft. 96.2% der Wildtypzellen und 82% der Zellen des *asp1^{H397A}* Stammes aktivierten im Verlauf ihrer Wachstumsphase das zweite Zellende und wuchsen bipolar bis zur erneuten Zellteilung (Abb. 14A). Im Gegensatz dazu fand NETO nur bei 16.4% der Zellen des *asp1^{D333A}* Stammes statt, der überwiegende Anteil (83.6%) wuchs bis zur erneuten Zellteilung ausschließlich monopolar (Abb. 14A). Dies ist beispielhaft in Abb. 14B gezeigt. Die rechte, mit einem Stern markierte Zelle begann das Wachstum nach der Zellteilung an ihrem alten Zellende, erkennbar an dessen gleichmäßig abgerundeter Form, und behielt dieses Wachstum bis zur erneuten Zellteilung bei (bei 180 min, ein Pfeilkopf zeigt auf das neu gebildete Septum). Das neue Zellende behielt sein abgeflachte Form bei, dort fand kein Wachstum statt. Die Funktion der Asp1 Kinasedomäne wird also für die Initiierung des bipolaren Wachstums benötigt.

Um zu verifizieren, dass die Zellen des *asp1^{D333A}* Stammes tatsächlich nur ein Zellende als Wachstumszone definieren, wurden die Stämme in Flüssigkultur angezogen und die aktiven Wachstumszonen mit Calcofluor Weiß angefärbt (Abb. 14C). Beim Wildtypstamm und dem *asp1^{H397A}* Stamm war bei kurzen Zellen (Abb. 14C, Zellen 1 und 3) ein Zellende stark, das andere Ende nur schwach angefärbt (monopolares Wachstum; 15.8% bzw. 21%), während

bei den übrigen Zellen beide Zellenden stark angefärbt waren (bipolares Wachstum; 84.2% bzw. 79%) (Abb. 14C, z.B. Zellen 2 und 4). Beim *asp1^{D333A}* Stamm war bei 92.3% der Zellen unabhängig von der Zelllänge nur ein Zellende stark angefärbt (Abb. 14C, z.B. Zellen 5-7). Somit definieren *Asp1^{D333A}* exprimierende Zellen hauptsächlich nur ein Zellende als Wachstumszone.

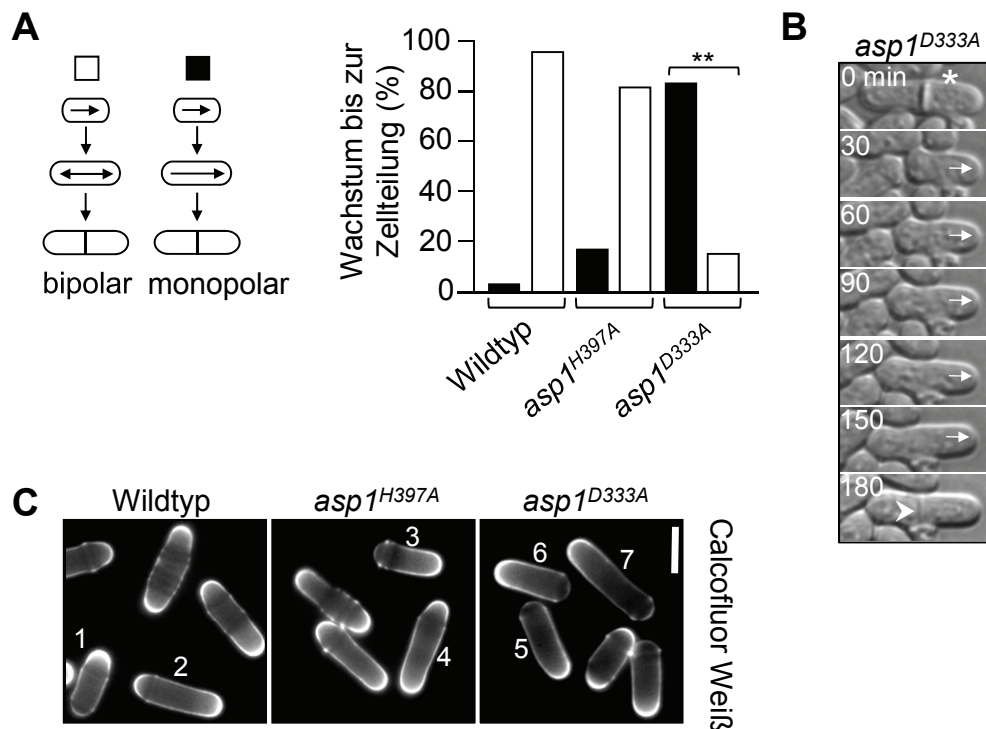


Abbildung 14: Die Funktion der Asp1 Kinasedomäne wird für das bipolare Wachstum benötigt. (A) Prozentualer Anteil von mono- oder bipolarem Wachstum bei den genannten Stämmen bei Wachstum auf YE5S-Agar bei 30°C. Wildtyp: n=26, *asp1^{H397A}*: n=61, *asp1^{D333A}*: n=55. **, p<0,01 verglichen mit dem Wildtyp (χ^2 -Test). (B) Eine auf der Agaroberfläche wachsende Zelle des *asp1^{D333A}* Stammes wurde im Abstand von 30 min fotografiert. Pfeile geben die Wachstumsrichtung der mit dem Stern gekennzeichneten Zelle an, ein Pfeilkopf zeigt auf ein neu ausgebildetes Septum nach 180 min. (C) Fluoreszenzaufnahmen der genannten Stämme nach Anfärbung der aktiven Wachstumszonen mit Calcofluor Weiß. Die Zellen wurden in YE5S bei 30°C vorinkubiert. Zahlen s. Text. Balken, 5 μ m.

Um auszuschließen, dass der Grund für das Ausbleiben von NETO eine zu geringe Länge der Zellen war, wurden die Zelllängen ausgemessen. In bipolar wachsenden Zellen des *asp1^{D333A}* Stammes fand NETO bei einer Zelllänge von $8.3 \pm 0.7 \mu\text{m}$ statt, während die Zellteilung bei mono- und bipolar gewachsenen Zellen gemeinsam bei durchschnittlich $9.3 \pm 0.8 \mu\text{m}$ stattfand (Tab. 2). Die Zellen hatten also im Verlauf ihrer Wachstumsphase durchschnittlich eine Länge erreicht, die ihnen den Wechsel zum bipolaren Wachstum erlaubt hätte.

	a) Zelllänge bei NETO (μm)	b) Zelllänge bei Teilung (μm)
Wildtyp	7.8 ± 0.7	8.6 ± 0.6
<i>asp1</i> ^{H397A}	7.5 ± 0.5	8.6 ± 0.6
<i>asp1</i> ^{D333A}	8.3 ± 0.7	9.3 ± 0.8

Tabelle 2: Zelllängen beim Wachstum auf dem Agar. Wildtyp: a) n=30, b) n=42; *asp1*^{H397A}: a) n=42, b) n=49; *asp1*^{D333A}: a) n=10, b) n=41.

3.2.5 Asp1 beeinflusst die Stabilität des Aktin-Zytoskeletts und die Verteilung der Aktinflecken auf die Zellenden

Das Aktin-Zytoskelett kolokalisiert mit den aktiven Wachstumszonen und ist essentiell für das polare Wachstum (Chang, 2001). Im Folgenden wurde nun untersucht, inwieweit Asp1 die Lokalisierung und Stabilität des Aktin-Zytoskeletts beeinflusst. Eine essentielle Komponente des kortikalen Aktin-Zytoskeletts ist das Arp3 Protein, welches als Teil des Arp2/3 Komplexes die Entstehung neuer Aktinfilamente und der Aktinflecken reguliert (Machesky & Gould, 1999; McCollum et al, 1996). Asp1 wurde ursprünglich als extragener Multikopie-Suppressor eines *arp3* Mutantenstammes isoliert (Feoktistova et al, 1999). Da *arp3*⁺ ein essentielles Gen ist, wurde der konditional-letale, kältesensitive *arp3-c1* Mutantenstamm verwendet (Balasubramanian et al, 1994; McCollum et al, 1996). Unter permissiven Bedingungen, in diesem Fall hohe Temperaturen, ist der Stamm wachstumsfähig, während er unter restriktiven Bedingungen, in diesem Fall niedrige Temperaturen, nicht mehr wachstumsfähig ist. Es wurde also zunächst die Frage beantwortet, welche der Asp1 Varianten unter endogenen Bedingungen in der Lage ist, die Kältesensitivität des *arp3-c1* Stammes zu supprimieren. Dazu wurden Doppelmutantenstämme zwischen *arp3-c1* und *asp1*^{D333A}, *asp1*^{H397A} oder *asp1* Δ erzeugt. Es stellte sich heraus, dass *asp1*^{D333A} *arp3-c1* und *asp1* Δ *arp3-c1* Doppelmutantenstämme nicht hergestellt werden konnten (Abb. Z2 im Anhang). Der Funktionsverlust der Asp1 Kinasedomäne in Kombination mit der *arp3-c1* Mutation ist letal. Deshalb konnte nur das Wachstum des *asp1*^{H397A} *arp3-c1* Doppelmutantenstammes im Vergleich zum *arp3-c1* Stamm im seriellen Tropftest analysiert werden (Abb. 15A). Es zeigte sich, dass die Expression von Asp1^{H397A} die Kältesensitivität des *arp3-c1* Stammes supprimiert. Um den generellen Einfluss von Asp1 auf die Stabilität des Aktin-Zytoskeletts zu definieren, wurde die Sensitivität der *asp1* Mutantenstämme gegenüber der Aktin-destabilisierenden Chemikalie Latrunculin B (LatB) mittels „Halo-Assay“ relativ zum Wildtypstamm bestimmt. Die *asp1* Δ und *asp1*^{D333A} Stämme zeigten eine geringere, der *asp1*^{H397A} Stamm eine höhere LatB-Sensitivität im Vergleich zum

Wildtypstamm (Abb. 15B). Somit wird die vollständige Funktion von Asp1 auch für ein wildtypisches Aktin-Zytoskelett benötigt.

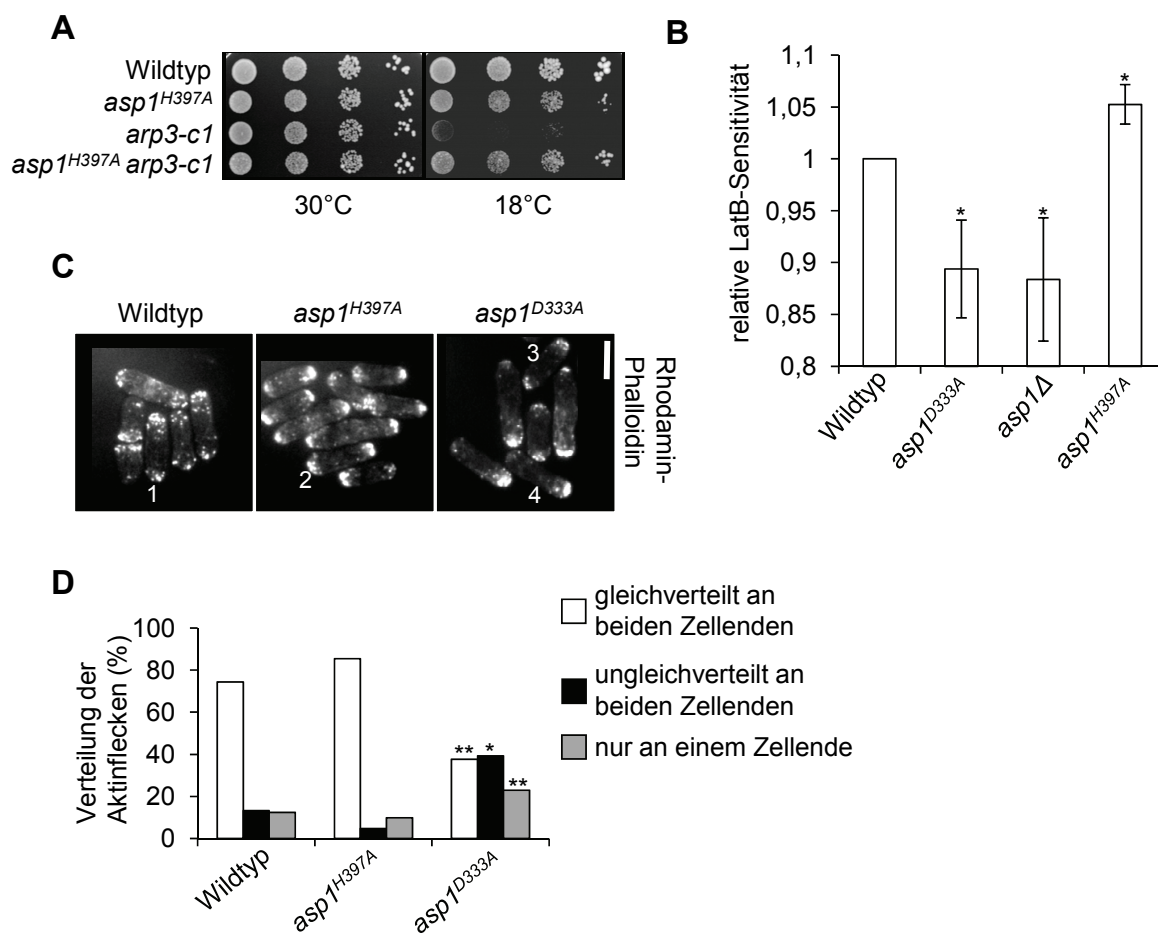


Abbildung 15: Asp1 beeinflusst die Stabilität des Aktin-Zytoskeletts und die Lokalisierung der Aktinflecken. (A) Serieller Tropftest der genannten Stämme auf YE5S. Inkubation: 30°C (3 Tage), 18°C (12 Tage). (B) Die relative LatB-Sensitivität der genannten Stämme wurde mittels eines „Halo-Assays“ in zwei unabhängigen Experimenten bei jeweils zwei unterschiedlichen LatB-Konzentrationen (4 und 6 bzw. 10 und 12 μmol) anhand der Größe der entstandenen Halos bestimmt. Die Analyse erfolgte auf YE5S bei 30°C. Die Sensitivität des Wildtypstammes wurde auf 1 gesetzt. *, $p < 0,05$ verglichen mit dem Wildtyp (Ein-Stichproben- t -Test). (C) Fluoreszenzaufnahmen der genannten Stämme nach Wachstum in YE5S bei 30°C und Anfärbung des Aktins mit Rhodamin-Phalloidin. Zahlen s. Text. Balken, 5 μm . (D) Quantifizierung der Aktinfleckenverteilung in den Zellen aus (C). Wildtyp: $n=129$; $asp1^{H397A}$: $n=192$; $asp1^{D333A}$: $n=265$. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$ verglichen mit dem Wildtyp (χ^2 -Test).

Als nächstes wurde untersucht, ob Asp1 die Lokalisierung des Aktin-Zytoskeletts an den Zellenden beeinflusst. Dazu wurde das Aktin der $asp1^{D333A}$ und $asp1^{H397A}$ Stämme sowie zum Vergleich eines Wildtypstammes nach Wachstum in Flüssigkultur mit Rhodamin-Phalloidin angefärbt (Abb. 15C). Bei dem überwiegenden Anteil der Zellen des Wildtypstammes und des $asp1^{H397A}$ Stammes fand sich eine gleichmäßige Verteilung der Aktinflecken auf die

beiden Zellenden (74.4% bzw. 85.4%) (Abb. 15C, z.B. Zelle 1 und 2; Abb. 15D). Bei den Zellen des *asp1^{D333A}* Stammes waren die Aktinflecken bei der Mehrzahl der Zellen ebenfalls an beiden Zellenden lokalisiert, allerdings nur bei 37.7% der Zellen gleichmäßig verteilt (Abb. 15C, z.B. Zelle 3; Abb. 15D). Bei 23% der Zellen waren die Aktinflecken monopolar an nur einem Zellende lokalisiert (Abb. 15C, z.B. Zelle 4; Abb. 15D). Somit wird Asp1 für die korrekte Lokalisierung der Aktinflecken an den Zellenden benötigt.

3.2.6 Asp1 ist in die Ausbildung des Septums involviert

Bisher wurde gezeigt, dass Asp1 für die Lokalisierung der Aktinflecken an den Zellenden und für die Ausbildung einer neuen Wachstumszone während der Interphase benötigt wird. Eine weitere Wachstumszone wird von *S. pombe* Zellen während der Mitose in Form des Teilungsseptums aufgebaut (Bathe & Chang, 2010). Dazu wird das Aktin-Zytoskelett von den Zellenden in die Zellmitte rekrutiert, wo es den kontraktilen Aktinring ausbildet, der gemeinsam mit den Aktinflecken für die Ausbildung des Septums benötigt wird (Gould & Simanis, 1997; Wolfe & Gould, 2005). Im Folgenden wurde untersucht, ob Asp1 auch an der Ausbildung des Septums beteiligt ist. Bei der Lebendzellmikroskopie von auf der Agaroberfläche wachsenden Zellen wurde bei den *asp1^{D333A}* und *asp1^{H397A}* Mutantenstämmen keine fehlerhafte Septierung festgestellt (Daten nicht gezeigt). Deshalb wurden nun in Flüssigkultur wachsende Zellen verwendet, um das Septum mit Calcofluor Weiß und das es umgebende Aktin mit Rhodamin-Phalloidin anfärben zu können.

Die Anfärbung des Aktins zeigte, dass bei 89.6% der wildtypischen, sich teilenden Zellen die Aktinflecken in einem engen Band um den Zelläquator zu beiden Seiten der Teilungszone konzentriert waren (konzentrierte Aktinflecken) (Abb. 16A). Bei den restlichen 10.4% waren die Aktinflecken weniger konzentriert, in einem ca. zweimal breiteren Bereich um die Zellmitte verteilt (verteilte Aktinflecken) (Abb. 16A). Dieser Phänotyp war bei den *asp1^{D333A}* und *asp1^{H397A}* Stämmen moderat erhöht (15.1% bzw. 23%) (Abb. 16A). Der kontraktile Aktinring selbst wies in den *asp1^{D333A}* und *asp1^{H397A}* Mutantenstämmen keine Anomalien auf (Daten nicht gezeigt). Die Anfärbung der Septen zeigte, dass wildtypische Septen zu 92.3% gerade und in einem 90° Winkel zum Zellkortex ausgerichtet waren (reguläre Septen) (Abb. 16B). Lediglich 7.7% der wildtypischen Septen hatten eine abweichende, d.h. gebogene oder unregelmäßig verdickte Form (irreguläre Septen). Auch dieser Phänotyp war bei den *asp1^{D333A}* und *asp1^{H397A}* Stämmen moderat, in gleichem Maße erhöht (11.4% bzw. 16.5%) wie die Fehllokalisierung der Aktinflecken in der Zellmitte (Abb. 16B). Die abnormen Formen der Septen könnten eine Konsequenz aus der Fehllokalisierung der Aktinflecken sein.

Insgesamt ist Asp1 also auch in die Ausbildung der Wachstumszone in der Zellmitte, dem Septum, involviert.

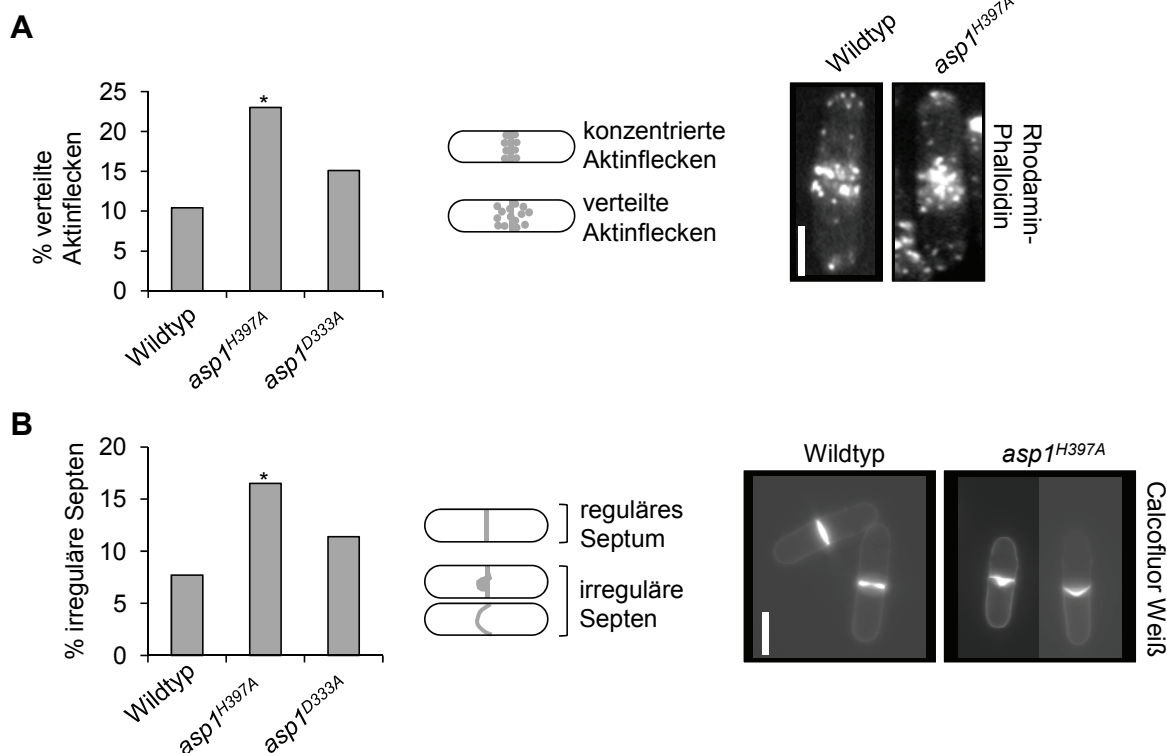


Abbildung 16: Die *asp1^{D333A}* und *asp1^{H397A}* Mutantenstämme weisen Septumsdefekte auf. (A) Links: Prozentualer Anteil von Zellen mit verteilten Aktinflecken in den genannten Stämmen. Wildtyp: n=77, *asp1^{H397A}*: n=122, *asp1^{D333A}*: n=86. *, p<0,05 verglichen mit dem Wildtyp (χ^2 -Test). Mitte: Schemazeichnung der Aktinflecken-Lokalisierung. Rechts: Lokalisierung der Aktinflecken in der Zellmitte im Wildtyp und *asp1^{H397A}* Stamm nach Anzucht in YE5S bei 30°C und Aktin-Färbung mit Rhodamin-Phalloidin. Balken, 5 μ m. (B) Links: Prozentualer Anteil von Zellen mit irregulären Septen in den genannten Stämmen. Wildtyp: n=91, *asp1^{H397A}*: n=164, *asp1^{D333A}*: n=114. *, p<0,05 verglichen mit dem Wildtyp (χ^2 -Test). Mitte: Schemazeichnung von regulären und irregulären Septen. Rechts: Anfärbung der Septen des Wildtyps und des *asp1^{H397A}* Stammes mit Calcofluor Weiß nach Anzucht in YE5S bei 30°C. Balken, 5 μ m.

3.2.7 Die Expression der Asp1^{D333A} Variante supprimiert die Zytokinesedefekte des *cdc3-124* Mutantenstammes

Bei der Ausbildung des kontraktiven Aktinrings spielt das Aktin-Monomer bindende Profilin Cdc3 eine essentielle Rolle (Balasubramanian et al, 1994). Der konditional-letale, temperatursensitive *cdc3-124* Mutantenstamm ist bei der restriktiven Temperatur nicht mehr in der Lage, einen funktionellen Aktinring und somit ein vollständiges Septum auszubilden. Da der Zellzyklus nicht angehalten wird, elongieren die Zellen stark und akkumulieren dabei bis zu acht Zellkerne (Balasubramanian et al, 1994). Zwischen *cdc3⁺* und *asp1⁺* besteht eine

starke genetische Interaktion, da die Deletion von *asp1*⁺ die Temperatursensitivität des *cdc3-124* Mutantenstammes supprimiert (Feoktistova et al, 1999). Um herauszufinden, welche der beiden Funktionen von Asp1 einen negativen Einfluss auf das Wachstum des *cdc3-124* Stammes ausübt, wurden *asp1*^{D333A} *cdc3-124* und *asp1*^{H397A} *cdc3-124* Doppelmutanten erzeugt und ihr Wachstum im seriellen Tropftest untersucht (Abb. 17A). Es zeigte sich, dass der Funktionsverlust der Asp1 Phosphatasedomäne die Temperatursensitivität des *cdc3-124* Stammes noch verstärkte, während der Funktionsverlust der Asp1 Kinasedomäne zu einer klaren Suppression führte (Abb. 17A). Um diese Suppression genauer beschreiben zu können, wurden ein Wildtypstamm, die *cdc3-124*, *asp1*^{D333A} und *asp1*^{D333A} *cdc3-124* Stämme bei der für den *cdc3-124* Stamm restriktiven Temperatur angezogen und das Aktin in der Zellmitte mit Rhodamin-Phalloidin angefärbt und analysiert (Abb. 17B, D). Parallel zur Aktinfärbung wurde die DNA mit DAPI gefärbt, um anhand der Position der Zellkerne die Position der Teilungszone bestimmen zu können (Abb. 17D). Der Wildtypstamm und der *asp1*^{D333A} Mutantenstamm zeigten in der Zellmitte entweder einen wildtypischen Aktinring und/oder ein durchgehendes Band aus Aktinflecken (Abb. 17B). Im Gegensatz dazu waren im *cdc3-124* Mutantenstamm nur Aktinringfragmente oder wenige Aktinflecken am Kortex vorhanden, bei 19.3% der Zellen war kein Aktin in der Zellmitte erkennbar (Abb. 17B, D). Der letztere Phänotyp war bei dem *asp1*^{D333A} *cdc3-124* Stamm nur noch bei 1.9% der Zellen feststellbar (Abb. 17B). 9.4% der Zellen zeigten wieder den wildtypischen Aktinring oder das durchgehende Band aus Aktinflecken (Abb. 17B, D). Desweiteren wurden die Septen der verschiedenen Stämme unter denselben Wachstumsbedingungen mit Calcofluor Weiß angefärbt und analysiert (Abb. 17C, D). Der Wildtypstamm und der *asp1*^{D333A} Stamm bildeten durchgehende Septen aus (Abb. 17C). Demgegenüber wurde bei 91.4% der Zellen des *cdc3-124* Stammes nur fleckenartig an den Zellkortex angelagertes Septenmaterial angefärbt, vollständige Septen wurden nur bei 8.6% der Zellen ausgebildet (Abb. 17C, D). Dagegen waren 86.2% der Zellen des *asp1*^{D333A} *cdc3-124* Stammes wieder in der Lage, ein durchgehendes Septum auszubilden (Abb. 17C, D). Somit hat die Funktion der Asp1 Kinasedomäne im *cdc3-124* Mutantenstamm einen negativen Einfluss auf die Ausbildung des kontraktiven Aktinrings und des Septums.

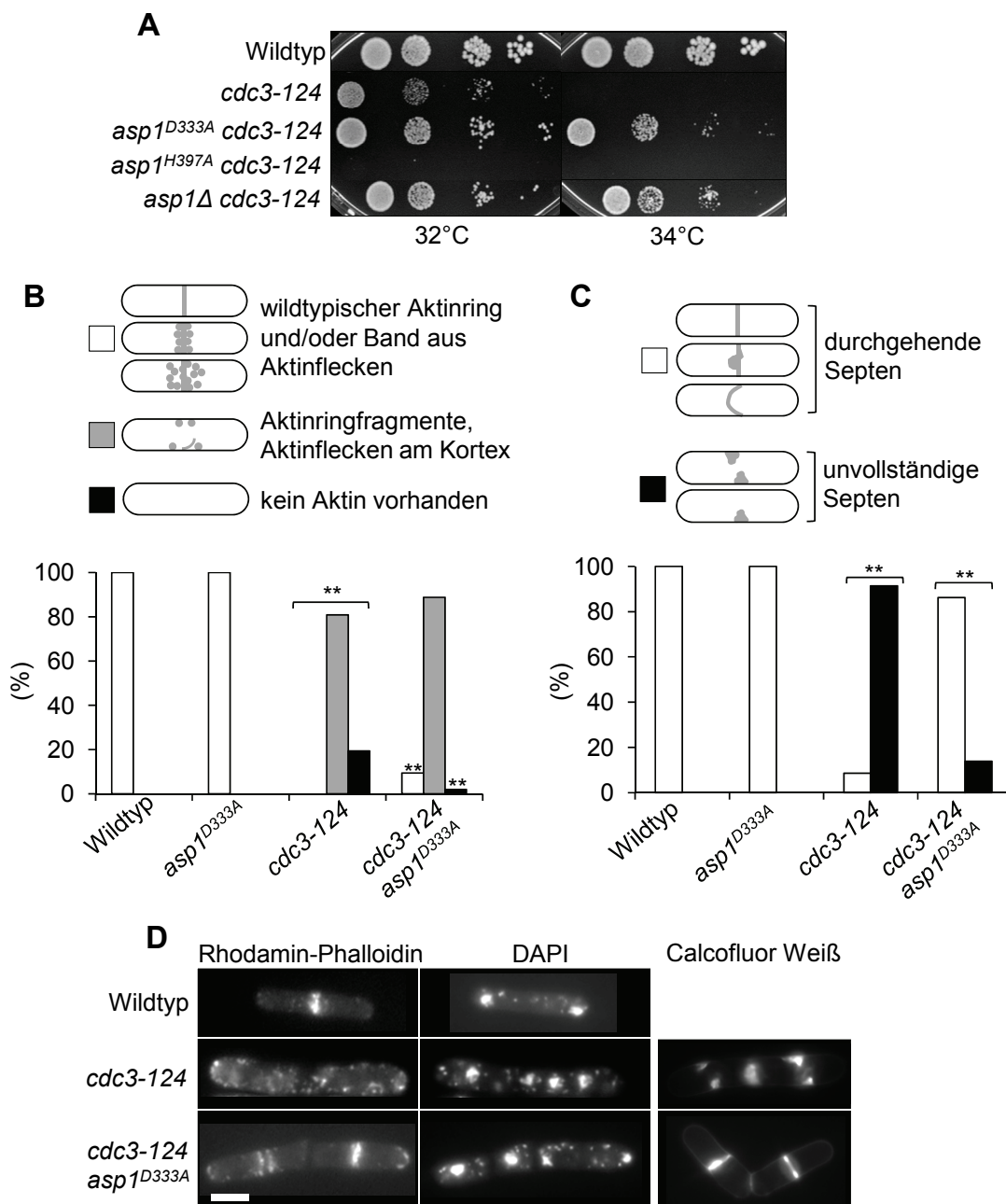


Abbildung 17: Der Funktionsverlust der Asp1 Kinasedomäne supprimiert die Zytokinesedefekte des *cdc3-124* Mutantenstammes. (A) Serieller Tropftest der genannten Stämme auf YE5S. Inkubation: 3 Tage. (B-D) Die genannten Stämme wurden ü/N bei 24°C in YE5S angezogen und für weitere 6 Stunden bei 34°C inkubiert. (B) Das Aktin der Zellen wurde mit Rhodamin-Phalloidin angefärbt und die Anordnung des Aktins in der Zellmitte bestimmt. Wildtyp: n=100, *asp1^{D333A}*: n=92, *cdc3-124*: n=109, *cdc3-124 asp1^{D333A}*: n=107. **, p<0,01 für *cdc3-124* verglichen mit dem Wildtyp sowie für *asp1^{D333A} cdc3-124* verglichen mit *cdc3-124* (χ^2 -Test). (C) Die Septen der Zellen wurden mit Calcofluor Weiß angefärbt und die Anzahl durchgehender oder unvollständiger Septen bestimmt. Wildtyp: n=31, *asp1^{D333A}*: n=48, *cdc3-124*: n=70, *cdc3-124 asp1^{D333A}*: n=80. **, p<0,01 für *cdc3-124* verglichen mit dem Wildtyp sowie für *asp1^{D333A} cdc3-124* verglichen mit *cdc3-124* (χ^2 -Test). (D) Die Septen der Zellen wurden mit Calcofluor Weiß angefärbt, sowie das Aktin und die DNA parallel mit Rhodamin-Phalloidin bzw. DAPI. Balken, 5 μ m.

3.2.8 Die Asp1^{H397A} Variante kann mit den Wachstumszonen kolokalisieren

Obwohl Asp1 an der Ausbildung der Wachstumszonen beteiligt ist, wurde es unter endogenen Expressions- und unter Überexpressionsbedingungen als ein zytoplasmatisch lokalisiertes Protein beschrieben, das nicht mit dem Zytoskelett oder den Wachstumszonen kolokalisiert (Feoktistova et al, 1999). Die Lokalisierung von endogen exprimiertem Asp1-pkGFP ist in Abb. 18A gezeigt. Asp1-pkGFP lokalisierte in allen Zellzyklusphasen im Zytoplasma (Abb. 18A; Zelle 1: G2-Phase, Zelle 2: Mitose, Zellen 3 und 4: Zytokinese). Da die Expression der Asp1^{D333A} und Asp1^{H397A} Varianten zu spezifischen Phänotypen führt, war es jedoch möglich, dass diese Varianten auch eine veränderte Lokalisierung aufweisen. Dies wurde zunächst anhand endogen exprimierter, C-terminal markierter Asp1^{H397A}-GFP und N-terminal markierter GFP-Asp1^{H397A} Fusionsproteine überprüft, wobei jedoch keine veränderte Lokalisierung festgestellt wurde (Daten nicht gezeigt). Um die Menge der Fusionsproteine zu erhöhen und dadurch möglicherweise ein stärkeres GFP-Signal zu erhalten, wurden plasmidkodierte GFP-Asp1^{D333A} und GFP-Asp1^{H397A} Varianten in wildtypischen Zellen überexprimiert. Western Blot-Analysen zeigten, dass die überexprimierten Varianten in ca. 20fach höherer Menge als endogen exprimiertes Asp1-pkGFP vorlagen (Daten nicht gezeigt).

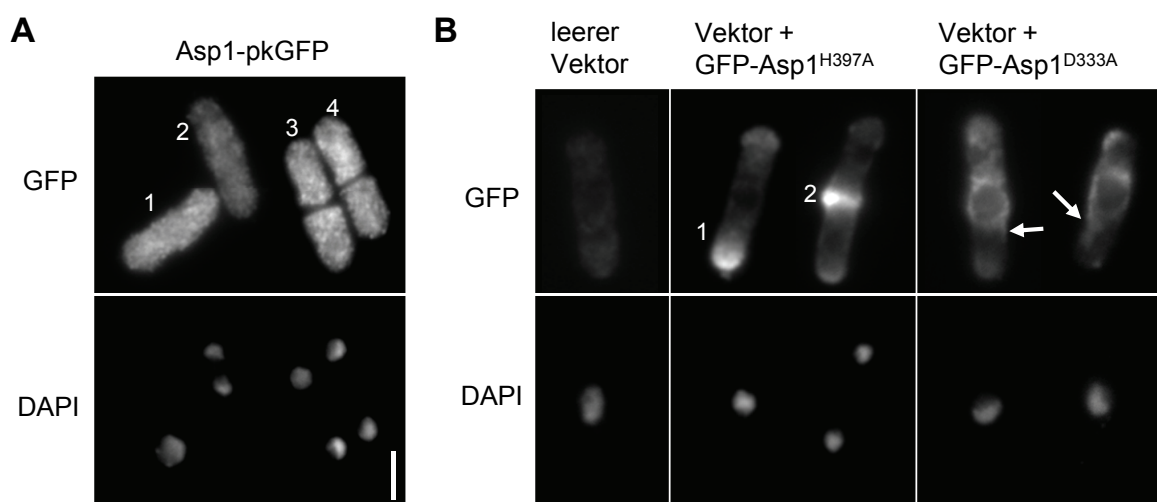


Abbildung 18: Die Asp1^{D333A} und Asp1^{H397A} Varianten zeigen eine spezifische subzelluläre Lokalisierung. (A) Immunofluoreszenz-Aufnahmen eines Asp1-pkGFP exprimierenden Stammes nach Wachstum bei 30°C in YE5S, PFA-Fixierung und Inkubation mit α -GFP Erstantikörper und Cy3-gekoppeltem Zweitantikörper. Die DNA wurde mit DAPI angefärbt. Zahlen s. Text. Balken, 5 μ m. (B) Immunofluoreszenz-Aufnahmen von Wildtypzellen transformiert mit leerem Vektor oder Vektor + *gfp-asp1^{H397A}* oder *gfp-asp1^{D333A}* nach Wachstum für 21 Stunden in EMM -Thiamin bei 30°C, Methanol-Fixierung und Inkubation mit α -GFP Erstantikörper und Cy3-gekoppeltem Zweitantikörper. Die DNA wurde mit DAPI angefärbt. Pfeile markieren die Lokalisierung von GFP-Asp1^{D333A} entlang des Zellkortex. Zahlen s. Text. Balken, 5 μ m.

Unter diesen Bedingungen konnte eine veränderte Lokalisierung der Asp1 Varianten festgestellt werden. GFP-Asp1^{H397A} lokalisierte an den Zellenden, wobei ein Zellende in der Regel deutlich stärker angefärbt war als das andere (Abb. 18B, Zelle 1), sowie am Septum (Abb. 18B, Zelle 2). Asp1^{H397A} kann also an den (möglichen) Wachstumszonen lokalisieren. Bei der GFP-Asp1^{D333A} Variante wurde eine Lokalisierung um den Zellkern und davon ausgehend teilweise entlang des seitlichen Zellkortex beobachtet (Abb. 18B). Ob Asp1^{D333A} dort mit einer zellulären Struktur oder einem Organell kolokalisiert ist im Augenblick noch unklar.

3.2.9 Die *asp1* Mutantenstämme haben eine veränderte Zellwand

Polares Wachstum ist verbunden mit der Synthese neuen Zellwandmaterials und einer Umgestaltung der Zellwand an den Wachstumszonen (Chang & Martin, 2009; Perez & Rincon, 2010). Es stellte sich die Frage, ob Asp1 aufgrund seines Einflusses auf die Ausbildung der Wachstumszonen auch die Zellwand beeinflusst. Die Zellwand vegetativer *S. pombe* Zellen ist überwiegend aus Polysacchariden aufgebaut. Das Hauptpolysaccharid ist β -1,3-verknüpftes D-Glucan mit 2-4% β -1,6-Verzweigungen, das 48-54% der Zellwandpolysaccharide ausmacht. Weitere 28-32% sind α -1,3-verknüpftes D-Glucan mit 7% α -1,4-Verzweigungen. Diese beiden Polysaccharide bilden die Grundstruktur der Zellwand (Perez & Ribas, 2004).

Die *asp1* Mutantenstämme und ein Wildtypstamm wurden mit dem Enzym Zymolyase behandelt, welches das Hauptpolymer der Zellwand, β -1,3-Glucan, spaltet und zur Zellyse führt (Abb. 19A) (Perez & Ribas, 2004). Die *asp1*^{D333A} und *asp1* Δ Stämme erwiesen sich im Vergleich zum Wildtypstamm als resistent gegenüber dieser Behandlung, der *asp1*^{H397A} Stamm hingegen war Zymolyase-sensitiver und lysierte früher als der Wildtypstamm (Abb. 19A). Desweiteren wurde das α -1,4-Glucan der Zellwände durch eine Braunfärbung der Zellen durch kurzzeitige Ioddampf-Exposition detektiert (Vos et al, 2007). Zellen der *asp1*^{D333A} und *asp1* Δ Stämme verfärbten sich unter Ioddampf dunkelbraun, ihre Zellwände weisen offenbar einen höheren α -1,4-Glucan-Gehalt auf als Zellen des Wildtypstammes oder des *asp1*^{H397A} Stammes, die sich nur schwach verfärbten (Abb. 19B). Diese Ergebnisse weisen auf eine möglicherweise veränderte Zusammensetzung der Zellwände der *asp1* Mutantenstämme hin. Um zu sehen, ob die Zellwände dieser Stämme auch strukturell verändert sind, wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen angefertigt. Zellwände des Wildtypstammes und des *asp1*^{H397A} Stammes wiesen die charakteristische, ca. 200 nm dicke, 3-lagige Struktur mit zwei äußeren, Elektronen-dichten Lagen und einer inneren, nicht-Elektronen-dichten Lage auf (Abb. 19C) (Perez & Ribas, 2004). Diese innere, aus den

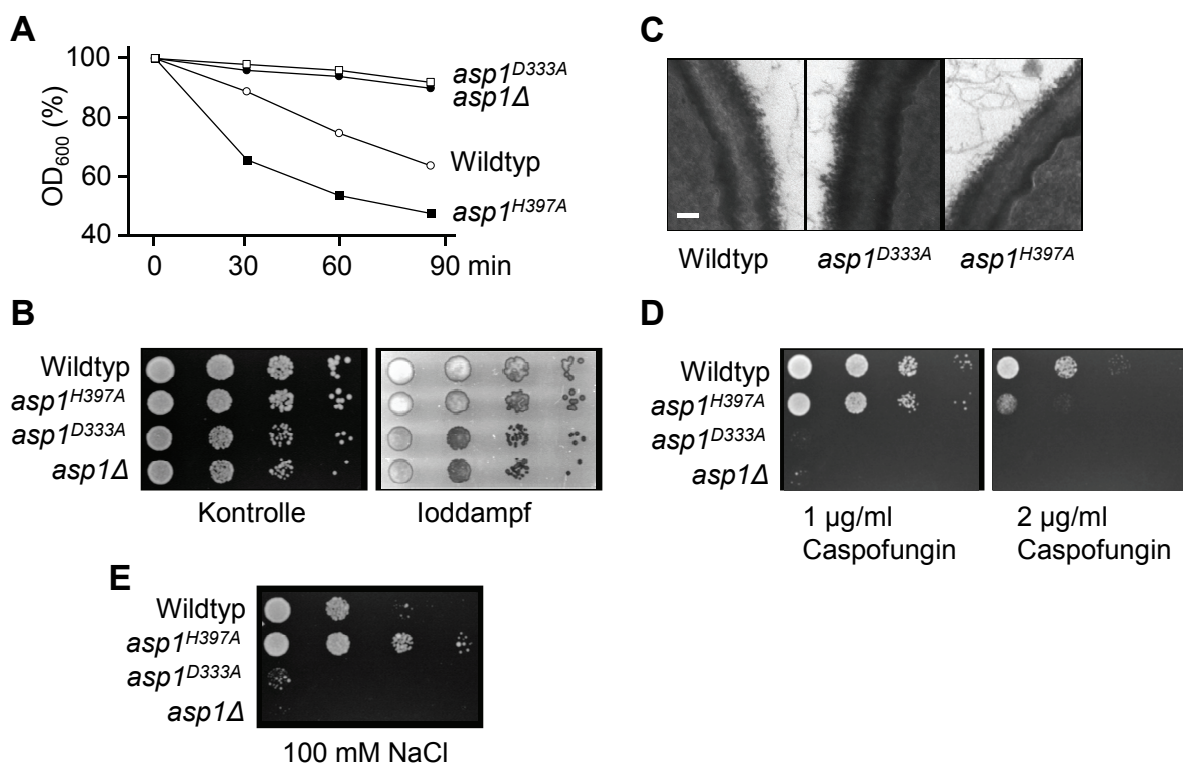


Abbildung 19: Die *asp1* Mutantenstämme haben eine veränderte Zellwand. (A) Die genannten Stämme wurden bei 30°C in YE5S bis zur logarithmischen Wachstumsphase angezogen und die OD₆₀₀ vor oder nach Zugabe von 20 µg/ml Zymolyase in 30-minütigen Abständen bestimmt. Die OD₆₀₀ vor Zymolyase-Zugabe (Zeitpunkt 0) wurde auf 100% gesetzt. (B) Serieller Tropftest der genannten Stämme auf YE5S. Die Agarplatte wurde fotografiert, für einige Minuten mit Iod bedampft und erneut fotografiert. Inkubation: 24°C (4 Tage). (C) Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Zellwände der genannten Stämme. Vergrößerung: 22 000 X; Balken, 100 nm. Die Aufnahmen wurden mit Hilfe von Frau Nissen, Institut für Parasitologie, Universität Düsseldorf, durchgeführt. (D, E) Serieller Tropftests der genannten Stämme auf YE5S mit 1 µg/ml oder 2 µg/ml Caspofungin bzw. 100 mM NaCl. Inkubation: 24°C (4 Tage).

Glucanen aufgebaute Lage, erschien in den Zellwänden des *asp1^{D333A}* Stammes dichter; die Zellwand war mit durchschnittlich 250 nm dicker als die wildtypische Zellwand (Abb. 19C). Dies deutet darauf hin, dass die Zellwände des *asp1^{D333A}* Stammes einen erhöhten Glucan-Gehalt aufweisen. Desweiteren wurde überprüft, ob die *asp1* Mutantenstämme verändert auf Substanzen reagieren, die inhibitorisch auf die Zellwandassemblierung wirken. Die *asp1^{D333A}* und *asp1Δ* Stämme reagierten sehr sensitiv auf die Anwesenheit des β-1,3-Glucansynthase-Inhibitors Caspofungin (Tab. 3, Abb. 19D). Bei höheren Caspofungin-Konzentrationen zeigte auch der *asp1^{H397A}* Stamm ein deutlich reduziertes Wachstum im Vergleich zum Wildtypstamm (Tab. 3, Abb. 19D). Calcofluor Weiß und Kongorot hatten keinen Einfluss auf das Wachstum dieser Stämme (Tab. 3, Abb. Z3 im Anhang).

Um festzustellen, ob die *asp1* Mutantenstämme aufgrund der Zellwandveränderungen erhöht sensitiv oder resistent auf Stress reagieren, wurden die Stämme in Gegenwart verschiedener Stressoren inkubiert. Der *asp1*^{H397A} Stamm zeigte sich dabei im Vergleich zum Wildtypstamm resistent, die *asp1*^{D333A} und *asp1Δ* Stämme sensitiv gegenüber osmotischem Stress in Form von NaCl (Tab. 3, Abb. 19E). Osmotischer Stress in Form von KCl oder Sorbitol hatte nur einen milden Effekt (Tab. 3, Abb. Z3 im Anhang). Oxidativer Stress oder Detergenz zeigten keine Wirkung auf das Wachstum der *asp1* Mutantenstämme (Tab. 3, Abb. Z3 im Anhang).

	Substanz	<i>asp1</i> ^{H397A}	<i>asp1</i> ^{D333A}	<i>asp1Δ</i>
Inhibierung der Zellwandassemblierung	Calcofluor Weiß	/	/	/
	Kongorot	/	/	/
	Caspofungin	leicht sensitiv	sensitiv	sensitiv
Salzstress / osmotischer Stress	NaCl	resistent	sensitiv	sensitiv
	KCl	sensitiv	/	/
	Sorbitol	leicht sensitiv	/	/
oxidativer Stress	H ₂ O ₂	/	/	/
Detergenz	SDS	/	/	/

Tabelle 3: Sensitivität der *asp1* Mutantenstämme gegenüber verschiedenen Stressoren. /, kein Einfluss.

3.3 Asp1 reguliert den dimorphen Wechsel von *S. pombe*

3.3.1 Die Expression der Asp1^{H397A} Variante führt zu Zell-Zell-Adhäsion

Während der phänotypischen Analyse der *asp1* Mutantenstämme konnte eine starke Zell-Zell-Adhäsion bei dem Asp1^{H397A} exprimierenden Stamm beobachtet werden. Diese Flokkulation äußerte sich in einem starken Verklumpen der Zellen auf festem und in flüssigem Medium und trat hauptsächlich nach Erreichen der stationären Phase ein (Abb. 20A, B). Sie war unabhängig von der Art des Mediums (z.B. Vollmedium oder Minimalmedium) und der Inkubationstemperatur (Daten nicht gezeigt). Beim Wildtypstamm trat die Flokkulation erst nach mehrtägiger Inkubation in der stationären Phase und in geringerem Maße als beim *asp1*^{H397A} Stamm auf (Abb. 20C). Die *asp1*^{D333A} oder *asp1Δ* Stämme flokkulierten unter denselben Bedingungen nicht (Abb. 20A). Die Flokkulation hängt also von der Funktion der Asp1 Kinasedomäne ab, wohingegen die Funktion der Phosphatasedomäne einen negativen Einfluss zu haben scheint.

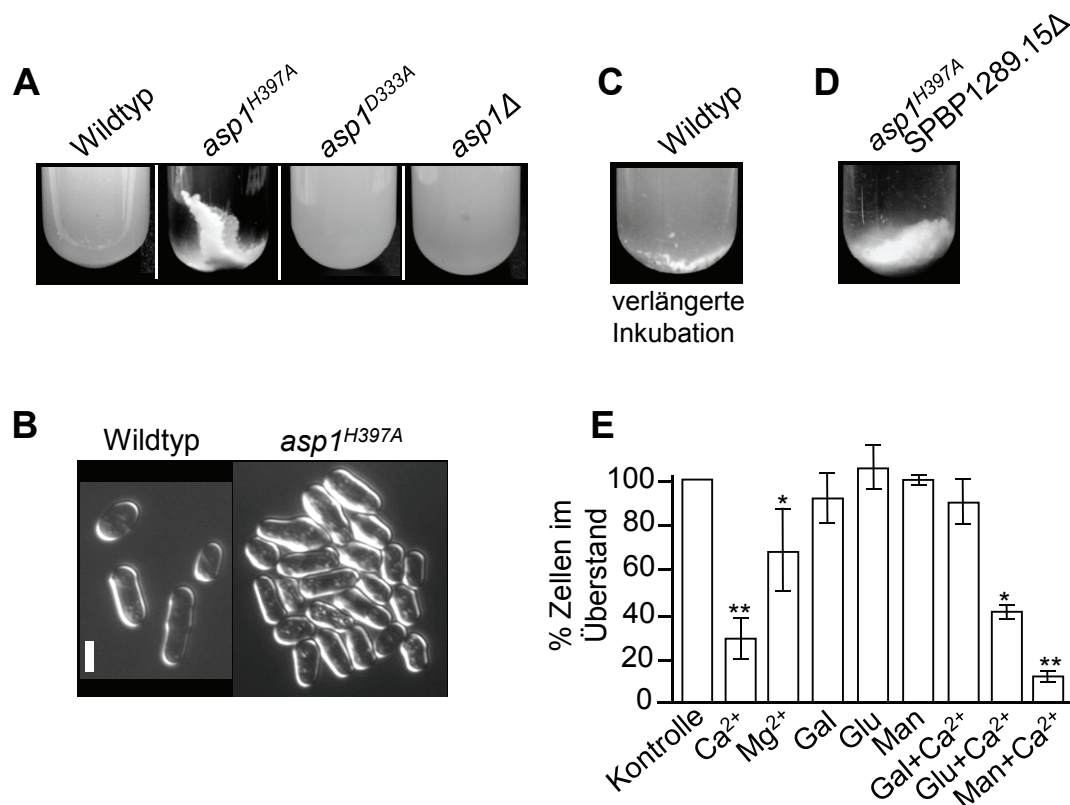


Abbildung 20: Die Expression von $Asp1^{H397A}$ führt zu Flokkulation. (A) Die genannten Stämme wurden im Reagenzglas in YE5S bei 30°C bis zur stationären Phase angezogen und fotografiert. (B) DIC-Aufnahmen von Wildtypzellen in Suspension und Zellen des $asp1^{H397A}$ Stammes aus (A). Balken, 5 µm. (C) Der Wildtypstamm wurde wie in (A) angezogen, jedoch länger in der stationären Phase inkubiert. Unter diesen Bedingungen konnte eine leichte Flokkulation auch bei diesem Stamm beobachtet werden. (D) Der $asp1^{H397A}$ SPBP1289.15Δ Stamm wurde wie in (A) angezogen und fotografiert. (E) Flokkulierende Zellen des $asp1^{H397A}$ Stammes wurden mit EDTA deflokkuliert. Nach Resuspendierung in H₂O (Kontrolle), 100 mM CaCl₂ (Ca²⁺) oder 100 mM MgCl₂ (Mg²⁺), 100 mM Galaktose (Gal), 100 mM Glukose (Glu), 100 mM Mannose (Man) oder 100 mM Galaktose, 100 mM Glukose oder 100 mM Mannose mit 100 mM CaCl₂ und 10 minütiger Sedimentation wurde jeweils die OD₆₀₀ der in Suspension verbliebenden Zellen gemessen und für die Kontrolle auf 100% gesetzt. Es wurden jeweils mindestens drei unabhängige Experimente durchgeführt. *, p<0,05; **, p<0,01 verglichen mit dem Wildtyp (Ein-Stichproben-t-Test).

Die Zell-Zell-Adhäsion wird durch spezifische Zelloberflächenadhäsine vermittelt (Verstrepen & Klis, 2006). Für *S. pombe* wurden anhand einer Datenbankanalyse 9 putative Adhäsine identifiziert aber bisher nicht hinsichtlich ihrer Funktion bei der Flokkulation charakterisiert (Linder & Gustafsson, 2008). Der *S. pombe* ORF mit der systematischen Bezeichnung SPBC1289.15 kodiert für ein hypothetisches Adhäsine, für das Homologie zum *S. cerevisiae* Flo11 Protein nachgewiesen wurde, welches eine wichtige Rolle bei der Flokkulation von *S. cerevisiae* Zellen spielt (Guo et al, 2000; Linder & Gustafsson, 2008). Um zu erfahren, ob dieses Adhäsine auch für die Flokkulation des $asp1^{H397A}$ Stammes benötigt wird, wurde der SPBC1289.15 ORF in diesem Stamm deletiert. Der resultierende $asp1^{H397A}$ SPBC1289.15Δ

Stamm flokkulierte jedoch nach wie vor, so dass geschlossen werden kann, dass dieses hypothetische Adhäsine nicht oder nicht allein für die Flokkulation benötigt wird (Abb. 20D).

Die aktive Konformation der Adhäsine hängt in der Regel von Ca^{2+} Ionen ab (Verstrepen & Klis, 2006). Durch Zugabe von EDTA zu flokkulierenden Zellen können diese Ionen komplexiert und die Zellen deflokkuliert werden (Tanaka et al, 1999). Dies wurde sich zunutze gemacht um zu bestimmen, von welchen Ionen die Flokkulation des *asp1^{H397A}* Stammes abhängt. Die Zugabe von Ca^{2+} zu EDTA-behandelten, deflokkulierten *asp1^{H397A}* Zellen führte zum erneuten, starken Ausflocken der Zellen, während Mg^{2+} nur einen schwachen Effekt hatte (Abb. 20E). Die Konformation der Adhäsine des *asp1^{H397A}* Stammes hängt demnach stark von Ca^{2+} und zum Teil auch von Mg^{2+} Ionen ab.

Adhäsine binden u.a. an Zuckerreste von Glykoproteinen in den Zellwänden anderer Zellen (Verstrepen & Klis, 2006). Um diese Zuckerreste bei dem *asp1^{H397A}* Stamm zu identifizieren, wurden deflokkulierte Zellen in verschiedenen Zuckerlösungen resuspendiert, um die Bindestellen der Adhäsine abzusättigen. Die anschließende Zugabe von Ca^{2+} konnte keine erneute Flokkulation auslösen, wenn die Zellen zuvor in Galaktoselösung resuspendiert wurden (Abb. 20E). Die Flokkulation wird also vermutlich durch die Bindung der Adhäsine an Galaktosylgruppen von Zellwandglykoproteinen verursacht.

3.3.2 Die Expression der *Asp1^{H397A}* Variante führt zu Zell-Substrat-Adhäsion

Der *asp1^{H397A}* Stamm, und unter bestimmten Bedingungen auch der Wildtypstamm, besitzen adhäsive Eigenschaften die zur Zell-Zell-Adhäsion führen. Es stellte sich die Frage, ob diese adhäsiven Eigenschaften auch die Adhäsion an ein Substrat ermöglichen, z.B. an die Oberfläche des festen Nährmediums. Um dies festzustellen, wurden der Wildtypstamm, der *asp1^{H397A}* Stamm und zur Kontrolle die *asp1^{D333A}* und *asp1 Δ* Stämme auf Agarplatten aufgetropft und inkubiert (Abb. 21A, obere Reihe). Das Wachstum wurde dokumentiert und anschließend die Agaroberfläche mit einem sanften Wasserstrahl abgespült (Abb. 21A, mittlere Reihe). Der Wildtypstamm zeigte dabei an den Kolonierändern Adhäsion an den Agar und wurde an diesen Stellen nicht von der Oberfläche abgespült. Bei dem *asp1^{H397A}* Stamm war die Adhäsion an den Agar massiv verstärkt und fast alle Zellen blieben haften. Die adhäsiven Eigenschaften der beiden Stämme ermöglichen also auch die Substrat-Adhäsion, und die Stärke der Zell-Zell-Adhäsion korreliert mit der Stärke der Zell-Substrat-Adhäsion. Dementsprechend zeigten die *asp1^{D333A}* und *asp1 Δ* Stämme massiv reduzierte Substrat-Adhäsion und ließen sich fast vollständig von der Agaroberfläche abspülen. Die Zell-Zell-Adhäsion basiert wahrscheinlich auf einer Galaktose-abhängigen Bindung von

Adhäsionen an Zellwandglykoproteine (Kap. 3.3.1). Da Agar ein Galaktose-Polymer ist, könnte die Bindung an die Agaroberfläche durch denselben Mechanismus vermittelt werden.

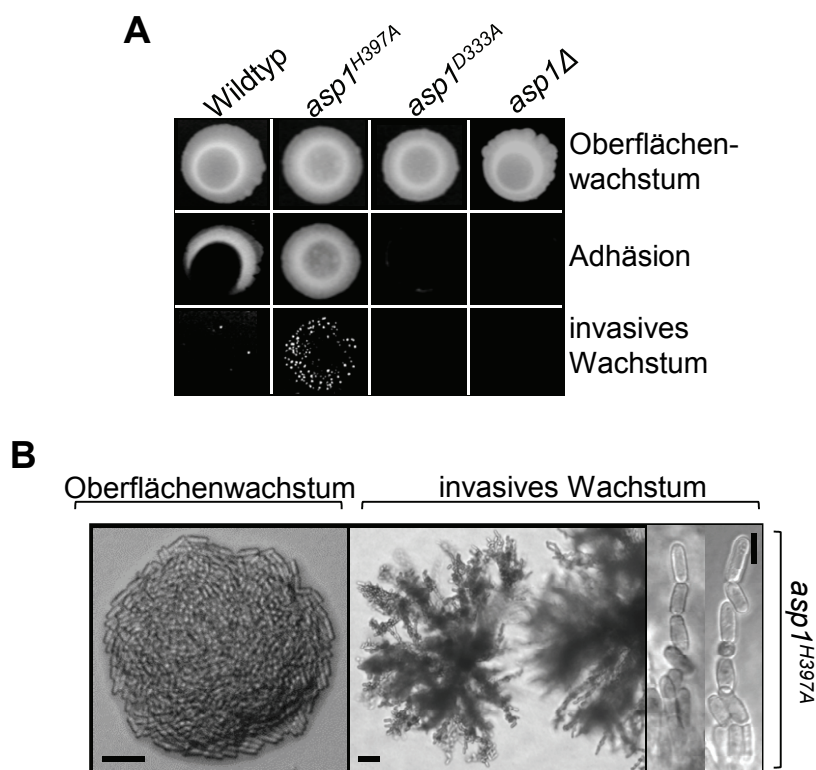


Abbildung 21: Die Expression von $Asp1^{H397A}$ führt zu Substrat-Adhäsion und invasivem Wachstum. (A) Die genannten Stämme wurden auf YE5S-Agar aufgetropft und 20 Tage bei 30°C inkubiert (Oberflächenwachstum). Adhäsion = nach Abspülen der Agaroberfläche mit Wasser. Invasives Wachstum = nach Abreiben aller verbleibenden Zellen von der Agaroberfläche. (B) Aufnahme von oberflächlich (links, Balken 20 µm) oder invasiv wachsenden Kolonien (Mitte, Balken 20 µm) des $asp1^{H397A}$ Stammes und DIC-Aufnahmen einzelner Pseudohyphen (rechts, Balken 5 µm).

3.3.3 Die Expression der $Asp1^{H397A}$ Variante führt zu invasivem Wachstum

Da der Wildtypstamm und der $asp1^{H397A}$ Stamm in der Lage sind, an den festen Nährboden zu adhären, wurde nun untersucht, ob diese Substrat-Adhäsion es den Zellen auch ermöglicht, invasiv in das Nährmedium einzuwachsen. Um dies zu sehen, wurden die adhärenierenden Zellen aus Abb. 21A vollständig von der Agaroberfläche abgerieben. Dabei zeigte sich, dass Zellen invasiv in den Nährboden eingewachsen waren und unter der Agaroberfläche Kolonien gebildet hatten (Abb. 21A, untere Reihe). Die Anzahl der invasiv wachsenden Kolonien korrelierte erneut mit der Stärke der Substrat-Adhäsion, so dass beim Wildtypstamm wenige (ca. 3-6), beim $asp1^{H397A}$ Stamm sehr viele (ca. 50-100) und bei den $asp1^{D333A}$ und $asp1Δ$ Stämmen gar keine invasiv wachsenden Kolonien vorhanden waren.

Invasives Wachstum konnte nach ca. 8 Tagen Inkubation bei 30°C beobachtet werden und trat, ähnlich der Adhäsion von Wildtypzellen, zuerst an den Rändern der auf der Agaroberfläche wachsenden Kolonien auf (Abb. 21A, untere Reihe und Daten nicht gezeigt).

Mikroskopische Aufnahmen von auf der Agaroberfläche oder invasiv, unter der Oberfläche wachsenden Zellen sind in Abb. 21B zu sehen. Auf der Oberfläche wachsende Zellen waren neben- und übereinander angeordnet und bildeten kompakte, runde Kolonien aus. Unter der Oberfläche wachsende Zellen waren hintereinander in langen, pseudohyphalen Strukturen angeordnet und bildeten myzelartige Kolonien aus. Somit hatte nicht nur ein Wechsel vom Oberflächenwachstum zum invasiven Wachstum stattgefunden, sondern auch ein dimorpher Wechsel vom normalen hefeförmigen Wachstum zu einer filamentösen Wachstumsform.

3.3.4 Die Erhöhung der intrazellulären Inositolpyrophosphat-Konzentration führt zu Adhäsion und invasivem Wachstum

Die adhäsiven und invasiven Eigenschaften des Wildtypstammes und des *asp1*^{H397A} Stammes benötigen eine funktionelle Asp1 Kinasedomäne. Dies legt nahe, dass Asp1 spezifische Inositolpyrophosphate an der Regulation beteiligt sind. Deshalb wurde untersucht, ob eine Erhöhung der intrazellulären Inositolpyrophosphat-Konzentration Zell-Zell-, Zell-Substrat-Adhäsion und invasives Wachstum auslösen kann. Erreicht wurde dies durch das Ausschalten von Proteinen, die Inositolpyrophosphate abbauen. So ist in Abwesenheit der *S. pombe* Nudix-Hydrolase Aps1 die intrazelluläre IP₇ Konzentration um das 3fache erhöht (Ingram et al, 2003). Tatsächlich führte die Deletion des *aps1*⁺ Gens im Wildtypstamm zu Flokkulation, Adhäsion der Zellen an die Agaroberfläche und invasivem Wachstum (Abb. 22A, B). Die Aktivität von Nudix-Hydrolasen kann durch Fluorid inhibiert werden (Safrany et al, 1998). Das invasive Wachstum des Wildtypstammes konnte durch den Zusatz von Natriumfluorid zum Nährmedium konzentrationsabhängig erhöht werden (Abb. 22C). Somit sind Inositolpyrophosphate an der Regulation des adhäsiven und invasiven Wachstums beteiligt. Verbunden mit den vorherigen Ergebnissen impliziert dies, dass Asp1 spezifische Inositolpyrophosphate bei der Regulation des dimorphen Wechsels von *S. pombe* eine zentrale Rolle spielen.

Die bisherigen Experimente machen eine Unterscheidung zwischen Asp1 spezifischen IP₇ oder IP₈ Molekülen bei der Beteiligung am dimorphen Wechsel nicht möglich, da in Abwesenheit der wildtypischen Asp1 Kinasedomäne keines dieser Moleküle generiert werden kann. Um diese Unterscheidung vorzunehmen, sollte der SPCC970.08 ORF, kodierend für die *S. pombe* IP6K Kcs1, welche gemeinsam mit Asp1 für die Generierung von IP₈ benötigt wird, deletiert und die Fähigkeit dieser Zellen zum invasiven Wachstum ermittelt

werden. Die Generierung eines haploiden SPCC970.08 Δ Stammes war jedoch nicht möglich und wie aktuell publiziert wurde, ist dieser ORF in *S. pombe* essentiell (Kim et al, 2010). Deshalb kann im Augenblick nicht unterschieden werden, ob Asp1 spezifisches IP₇ oder IP₈ an der Regulation des dimorphen Wechsels beteiligt ist.

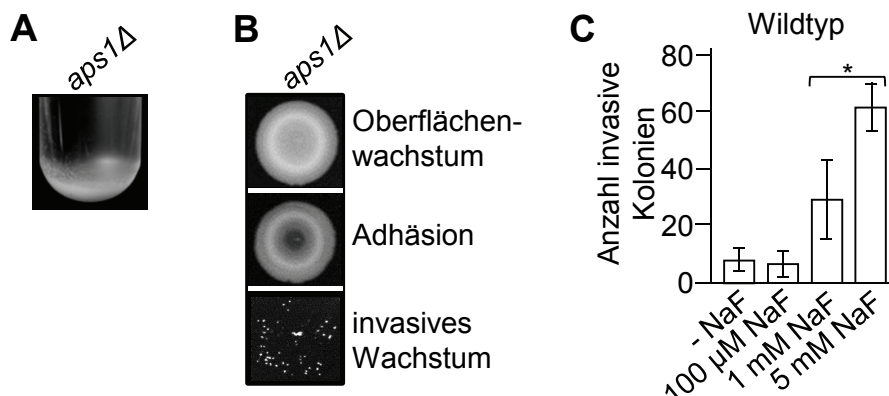


Abbildung 22: Die Abwesenheit oder Inhibition von Nudix-Hydrolasen führt zu Flokkulation und invasivem Wachstum. (A) Der *aps1Δ* Stamm wurde im Reagenzglas in YE5S bei 30°C bis zur stationären Phase angezogen und fotografiert. (B) Der *aps1Δ* Stamm wurde auf YE5S-Agar aufgetropft und 20 Tage bei 30°C inkubiert (Oberflächenwachstum). Adhäsion = nach Abspülen der Agaroberfläche mit Wasser. Invasives Wachstum = nach Abreiben aller verbleibenden Zellen von der Agaroberfläche. (C) Ein Wildtypstamm wurde auf YE5S-Agar ohne oder mit 100 μ M, 1 mM oder 5 mM NaF aufgetropft und 20 Tage bei 30°C inkubiert. Nach Abreiben aller Zellen von der Agaroberfläche wurde die Anzahl invasiv wachsender Kolonien bestimmt und graphisch aufgetragen. *, p < 0,05 für 1 mM NaF verglichen mit 5 mM NaF (Welch-Test).

3.3.5 Die Funktion von Asp1 beim dimorphen Wechsel ist konserviert

Asp1 ist ein Mitglied der konservierten Vip1 1/3 Inositolpolyphosphat Kinasefamilie (Lin et al, 2009; Mulugu et al, 2007). Deshalb wurde aufgeklärt, ob Mitglieder dieser Proteinfamilie auch in anderen Organismen an der Regulation des dimorphen Wechsels beteiligt sind. Dies wurde anhand des dimorphen Wechsels von *S. cerevisiae*, bei dem ebenfalls ein Wechsel von der einzelligen Hefeform zu einer invasiven, pseudohyphalen Form stattfindet, untersucht. Beim dimorphen Wechsel von *S. cerevisiae* wird zwischen haploiden und diploiden Stämmen unterschieden. Beim „haploid invasiven Wachstum“ penetrieren die Zellen den Agar unterhalb der Kolonie, was bei Inkubation auf Vollmedium beobachtet werden kann (Roberts & Fink, 1994). Beim „diploid pseudohyphalen Wachstum“ wachsen die Pseudohyphen auf der Agaroberfläche aus der Kolonie heraus, was bei Inkubation auf speziellem Stickstoffmangelmedium analysiert werden kann (Gimeno et al, 1992). Desweiteren wurden für die nachfolgenden Experimente Stämme mit Σ 1278b Hintergrund

verwendet, die, im Gegensatz zu den meisten *S. cerevisiae* Laborstämmen, zum dimorphen Wechsel in der Lage sind (Gimeno et al, 1992).

Zuerst wurde das *VIP1* Gen im haploiden *S. cerevisiae* Wildtypstamm deletiert und die Fähigkeit des Deletionsstammes zum invasiven Wachstum untersucht. Der *vip1Δ* Stamm zeigte noch invasives Wachstum, dieses war verglichen mit dem Wildtypstamm jedoch massiv reduziert (Abb. 23A). *Vip1* wird also für das haploid invasive Wachstum benötigt. Als nächstes wurde das *VIP1* Gen heterozygot im diploiden Wildtypstamm deletiert und das pseudohyphale Wachstum analysiert. Der diploide Wildstamm entwickelte an den Kolonierändern zahlreiche Pseudohyphen, während der *vip1Δ/VIP1* Stamm in der einzelligen Hefeform verblieb (Abb. 23B). *Vip1* wird also auch für das diploid pseudohyphale Wachstum benötigt. Bemerkenswert ist, dass bereits eine 50%ige Reduktion der *Vip1* Proteinmenge, wie sie für den heterozygoten *vip1Δ/VIP1* Stamm angenommen wird, zu einem Verlust des pseudohyphalen Wachstums führt.

Um zu überprüfen, ob *S. pombe* *Asp1* und *S. cerevisiae* *Vip1* funktionell orthologe Proteine sind, wurde untersucht, ob *Vip1* durch die heterologe Expression von *Asp1* substituiert werden kann. Dazu wurden plasmidkodiertes, wildtypisches *asp1*⁺ oder *asp1*¹⁻³⁶⁴, kodierend für die *Asp1* Kinasedomäne, im heterozygoten *vip1Δ/VIP1* Stamm exprimiert. Anschließend wurde die Fähigkeit zum pseudohyphalen Wachstum der Transformanten analysiert. Der Wildtypstamm oder *vip1Δ/VIP1* Stamm transformiert mit dem leeren Vektor zeigten erwartungsgemäß normales bzw. kein pseudohyphales Wachstum (Abb. 23C). Die Expression von wildtypischem *Asp1* konnte bei Verwendung des Hochkopie-Vektors das pseudohyphale Wachstum des *vip1Δ/VIP1* Stammes wiederherstellen (Abb. 23C). Bei Verwendung des Niedrigkopie-Vektors war dies nicht möglich. Die Expression der *Asp1* Kinasedomäne (*Asp1*¹⁻³⁶⁴) konnte unabhängig vom Vektortyp und stärker als wildtypisches *Asp1* die Fähigkeit zum pseudohyphalen Wachstum des *vip1Δ/VIP1* Stammes wiederherstellen (Abb. 23C).

Aufgrund der konservierten Funktion der *Vip1* Proteinfamilie wurde an dieser Stelle noch einmal die Frage aufgegriffen, ob *Vip1* spezifisches IP₇ oder IP₈, welches nur durch die gemeinsame Aktivität von *Vip1* und *Kcs1* produziert werden kann, für die Regulation des dimorphen Wechsels benötigt wird. Die Deletion von *KCS1* ist in *S. cerevisiae* nicht letal, führt jedoch zu einem massiven Wachstumsdefekt der Zellen (Dubois et al, 2002; Saiardi et al, 2000). Deshalb konnte nur das diploid invasive Wachstum eines heterozygoten *kcs1Δ/KCS1* Stammes untersucht werden. Dieser Stamm zeigte pseudohyphales Wachstum, das in der Stärke vergleichbar mit dem Wildtypstamm war (Abb. 23D). Da die heterozygote Deletion von *VIP1* bereits zu einem vollständigen Verlust des pseudohyphalen

Wachstums führt, könnte dies ein Hinweis darauf sein, dass Kcs1 und somit IP₈ Moleküle nicht an der Regulation des dimorphen Wechsel beteiligt sind.

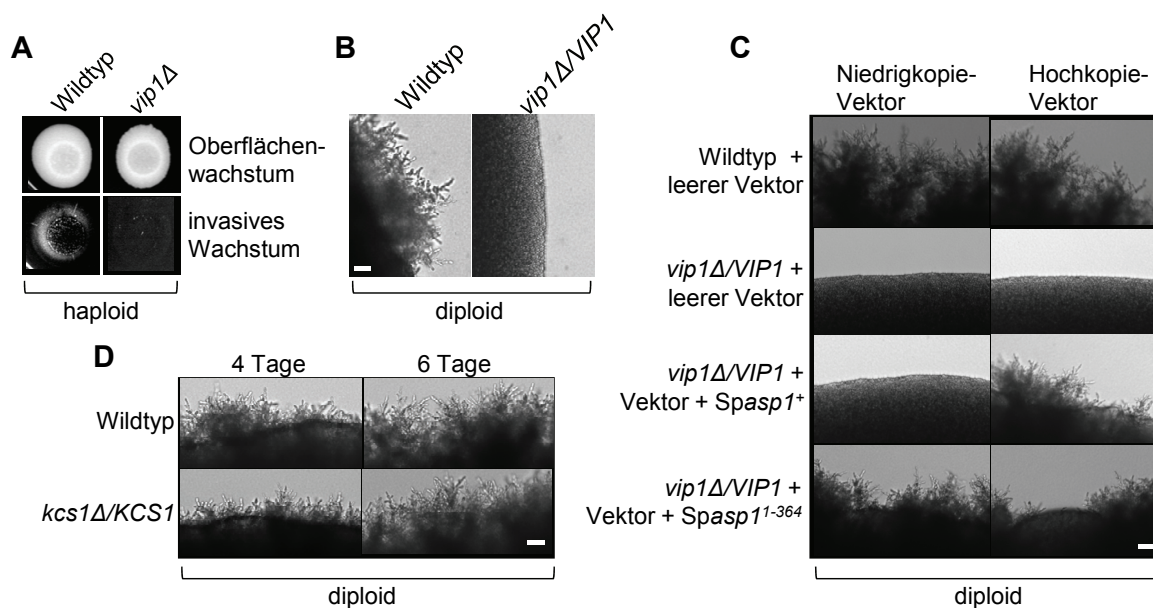


Abbildung 23: Die Funktion der Vip1 1/3 Kinasefamilie beim dimorphen Wechsel ist konserviert. (A) Ein haploider *S. cerevisiae* Wildtypstamm und *vip1Δ* Deletionsstamm wurden auf YPD-Agar aufgetropft und 9 Tage bei 30°C inkubiert (Oberflächenwachstum). Invasives Wachstum = nach Abreiben aller Zellen von der Agaroberfläche. (B) Ein diploider *S. cerevisiae* Wildtypstamm und ein *vip1Δ/VIP1* Stamm wurden auf SLAHD-Agar aufgetropft und bei 30°C inkubiert. Das pseudohyphale Wachstum an den Kolonierändern wurde nach 7 Tagen fotografiert. Balken, 20 µm. (C) Ein diploider *S. cerevisiae* Wildtypstamm transformiert mit leerem Vektor (Niedrigkopie (*CEN*) oder Hochkopie (2µ)) sowie ein *vip1Δ/VIP1* Stamm transformiert mit leerem Vektor (*CEN* oder 2µ) sowie mit Vektor + *Spasp1*¹⁻³⁶⁴ (*CEN*), *Spasp1*¹⁻³⁶⁴ (2µ), *Spasp1*⁺ (*CEN*) oder *Spasp1*⁺ (2µ) wurden auf SLAHD-Agar aufgetropft und bei 30°C inkubiert. Das pseudohyphale Wachstum an den Kolonierändern wurde nach 5 Tagen fotografiert. Balken, 20 µm. (D) Die genannten, diploiden *S. cerevisiae* Stämme wurden behandelt wie in (B), das pseudohyphale Wachstum an den Kolonierändern wurde nach 4 und 6 Tagen fotografiert. Balken, 20 µm.

3.3.6 Der cAMP/PKA Signalweg wird für das invasive Wachstum benötigt

Dimorphe Wechsel werden in Reaktion auf veränderte Umweltbedingungen ausgelöst, wobei extrazelluläre Signale durch Signalkaskaden innerhalb der Zelle weitergeleitet werden (Madhani & Fink, 1998). Im Folgenden wurde der Signalweg identifiziert, der das Asp1 abhängige, invasive Wachstum reguliert. Dazu wurden Doppelmutantenstämme zwischen *asp1*^{H397A} und Genen kodierend für zentrale Komponenten der vier in *S. pombe* bekannten Signalwege erzeugt und die Fähigkeit dieser Stämme zum invasiven Wachstum bestimmt.

Die Deletionen von *pmk1*⁺ oder *sty1*⁺, kodierend für die MAP Kinasen der Zellintegritäts- und Stressantwort-Signalwege, hatten dabei keinen negativen Einfluss auf das invasive

Wachstum des *asp1^{H397A}* Stammes (Tab. 4, Abb. Z4A im Anhang) (Millar et al, 1995; Toda et al, 1996; Zaitsevskaya-Carter & Cooper, 1997). *spk1⁺* kodiert für die MAP Kinase des Paarungssignaltransduktionsweges (Gotoh et al, 1993). Ein *spk1Δ* Stamm wies einen massiven Paarungsdefekt auf, so dass keine Doppelmutanten mit *asp1^{H397A}* durch Kreuzung hergestellt werden konnten. Um dies zu umgehen, wurde die *Asp1^{H397A}* Variante im *spk1Δ* Stamm überexprimiert. Sie konnte invasives Wachstum auslösen, weshalb auch der Paarungssignaltransduktionsweg nicht für das *Asp1* abhängige, invasive Wachstum benötigt wird (Tab. 4, Abb. Z4B im Anhang). Zuletzt wurde die Beteiligung von Komponenten des cAMP/PKA Signalweges untersucht, welcher als Antwort auf das Glucoseangebot die Bildung von intrazellulärem cAMP reguliert (Shemarova, 2009; Tamaki, 2007). Doppelmutanten zwischen *asp1^{H397A}* und *gpa2Δ*, kodierend für die α -Untereinheit des heterotrimeren G-Proteins, oder *cyr1Δ*, kodierend für die Adenylatzyklase, zeigten kein invasives Wachstum mehr (Tab. 4, Abb. 24A) (Isshiki et al, 1992; Kawamukai et al, 1991). Der cAMP/PKA Signalweg ist also an der Regulation des invasiven Wachstums beteiligt. Um zu bestimmen, ob der cAMP/PKA Signalweg *Asp1* vor- oder nachgeschaltet aktiv ist, wurden der Wildtypstamm und die *asp1^{H397A}* und *asp1^{D333A}* Stämme auf 8-Br-cAMP haltigem Medium inkubiert, einem Zellmembran-permeablen cAMP Analog. Dabei konnte beim Wildtypstamm und dem *asp1^{H397A}* Stamm eine weitere Steigerung des adhäsiven und invasiven Wachstums beobachtet werden, während der *asp1^{D333A}* Stamm unverändert kein adhäsives oder invasives Wachstum aufwies (Abb. 24B, C). Dies zeigt, dass der cAMP/PKA Signalweg *Asp1* vorgeschaltet ist und eine funktionelle *Asp1* Kinasedomäne für die Signalweiterleitung benötigt wird.

Signaltransduktionsweg	Komponente	Funktion	Abhängigkeit des <i>asp1^{H397A}</i> invasiven Wachstums
cAMP/PKA	Gpa2	α -Untereinheit des heterotrimeren G-Proteins	abhängig
	Cyr1	Adenylatzyklase	abhängig
Zellintegrität	Pmk1	MAP Kinase	nicht abhängig
Stressantwort	Sty1	MAP Kinase	nicht abhängig
Pheromonantwort	Spk1	MAP Kinase	nicht abhängig

Tabelle 4: Abhängigkeit des invasiven Wachstums des *asp1^{H397A}* Stammes von Signaltransduktionswegen.

Als nächstes wurde untersucht, ob Adhäsion und invasives Wachstum durch Erniedrigung der Glucosekonzentration im Medium reduziert werden können. Dabei ergab sich, dass eine Senkung der Glucosekonzentration auf 1% die Adhäsivität sowohl des Wildtypstammes als auch des *asp1^{H397A}* Stammes deutlich reduzierte (Abb. 24D). Entgegen der Erwartung zeigten beide Stämme jedoch eine Erhöhung der Anzahl der invasiv wachsenden Kolonien,

wenngleich diese Kolonien eine viel geringere Größe aufwiesen. Dies zeigte zum ersten Mal, dass Adhäsivität und Invasivität nicht streng miteinander gekoppelt sind und bedeutet, dass diese beiden Eigenschaften durch mehr als einen Signalweg und auf parallelen Wegen reguliert werden.

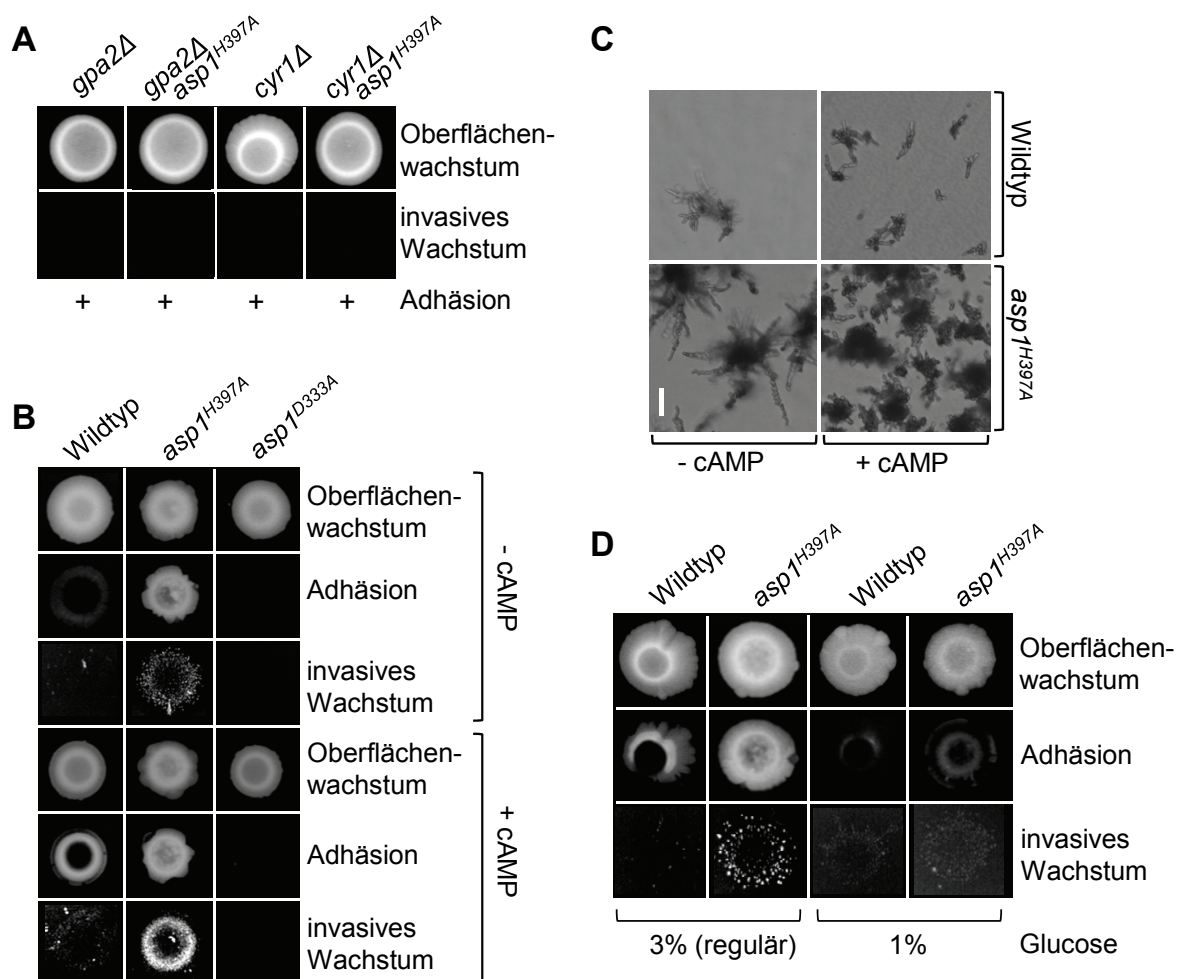


Abbildung 24: Der cAMP/PKA Signalweg wird für das invasive Wachstum benötigt. (A) Die genannten Stämme wurden auf YE5S-Agar aufgetropft und 20 Tage bei 30°C inkubiert (Oberflächenwachstum). Adhäsion = nach Abspülen der Agaroberfläche mit Wasser. +, wildtypische Adhäsionsstärke. Invasives Wachstum = nach Abreiben aller verbleibenden Zellen von der Agaroberfläche. (B) Die genannten Stämme wurden auf YE5S-Agar mit oder ohne 1 mM 8-Br-cAMP aufgetropft und 13 Tage bei 30°C inkubiert (Oberflächenwachstum). Adhäsion = nach Abspülen der Agaroberfläche mit Wasser. Invasives Wachstum = nach Abreiben aller verbleibenden Zellen von der Agaroberfläche. (C) Mikroskopische Aufnahmen des invasiven Wachstums der Stämme in (B). Balken, 20 µm. (D) Die genannten Stämme wurden auf YE5S-Agar mit 3% oder 1% Glucose aufgetropft und wie in (B) analysiert.

3.3.7 Gibt es extrazelluläre Signale, die invasives Wachstum unabhängig von Asp1 auslösen können?

Die vorherigen Ergebnisse zeigen, dass die Funktion der Asp1 Kinasedomäne eine zentrale Rolle bei der Regulation des dimorphen Wechsels von *S. pombe* spielt und für das invasive Wachstum benötigt wird. Es stellte sich daher die Frage ob es Konditionen gibt, unter denen diese Ereignisse auch unabhängig von Asp1 ausgelöst werden können. Zwei solcher Konditionen wurden im Folgenden getestet. Als erstes wurde die Fähigkeit der Zellen, invasiv in das Nährmedium einzuwachsen, durch eine geringere Festigkeit des Mediums erleichtert. Festes Medium enthält standardgemäß 2% Agar. 0.3%ige Agarplatten führten beim Wildtypstamm und dem *asp1^{H397A}* Stamm zu einer völlig veränderten Kolonimorphologie (Abb. 25A). Die Zellen wuchsen direkt in den Agar ein und breiteten sich unterhalb der Agaroberfläche in alle Richtungen aus. An einigen Stellen bildeten sich lange, federartige Strukturen. Dieses ungewöhnliche Wachstum war beim *asp1^{H397A}* Stamm stärker als beim Wildtyp ausgeprägt (Abb. 25A). Der *asp1^{D333A}* und der *asp1Δ* Stamm wuchsen auch unter diesen, für das invasive Wachstum vereinfachten Bedingungen nicht invasiv und breiteten sich gleichmäßig auf der Agaroberfläche aus. Diese veränderte Form des invasiven Wachstums ist also ebenfalls abhängig von einer funktionellen Asp1 Kinasedomäne.

Adhäsives und invasives Wachstum von *S. pombe* wird durch hohe extrazelluläre Eisenkonzentrationen stimuliert (Prevorovsky et al, 2009). Deshalb wurde das invasive Wachstum der analysierten Stämme auf eisenhaltigem Medium untersucht. Es zeigte sich, dass die Anwesenheit von Eisen das invasive Wachstum auch bei den *asp1^{D333A}* und *asp1Δ* Stämmen auslöste (Abb. 25B). Somit gibt es zusätzliche Signalwege in der Zelle, die invasives Wachstum unabhängig von Asp1 induzieren können.

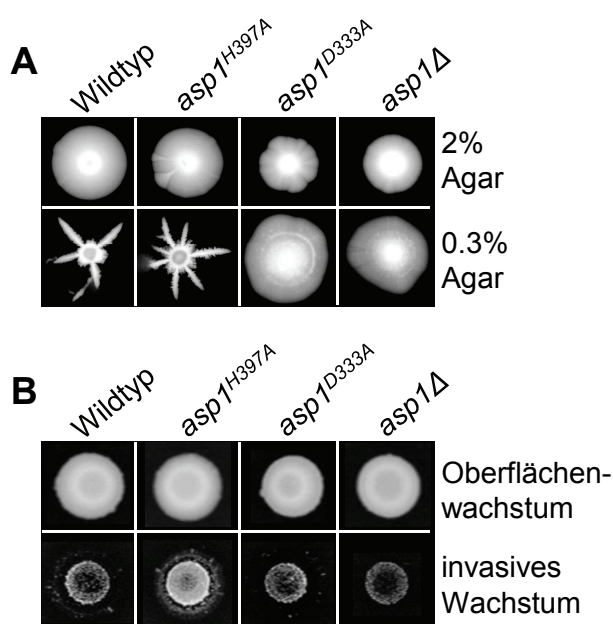


Abbildung 25: Analyse des invasiven Wachstums auf halb-festem oder eisenhaltigem Agar. (A) Die genannten Stämme wurden auf YE5S-Medium mit 2% (festes Medium) oder 0.3% Agar (halb-festes Medium) aufgetropft und 13 Tage bei 30°C inkubiert. (B) Die genannten Stämme wurden auf YE5S-Agar mit 10 mM FeCl_3 aufgetropft und 20 Tage bei 30°C inkubiert (Oberflächenwachstum) und alle Zellen von der Oberfläche abgerieben (invasives Wachstum).

3.4 Charakterisierung des pseudohyphalen Wachstums von *S. pombe*

Die Morphologie von auf dem Agar oder im Agar wachsenden *S. pombe* Kolonien ist sichtbar unterschiedlich (Abb. 26A). Auf der Agaroberfläche sind die Zellen nebeneinander angeordnet und bilden runde Kolonien aus. Im Agar sind die Zellen hintereinander in langen Zellketten angeordnet, die ausgehend von einem dichten Koloniezentrum in das sie umgebende Substrat einwachsen (Abb. 26A, B). Demnach scheinen die pseudohyphal wachsenden Zellen veränderte Wachstumseigenschaften aufzuweisen. Um dieses Wachstum zu charakterisieren und die Entstehung der pseudohyphalen Strukturen zu verstehen, wurden invasiv, pseudohyphal wachsende Zellen mittels Lebendzellmikroskopie aufgenommen und analysiert. Die Analysen erfolgten an Zellen des Wildtypstammes und des *asp1^{H397A}* Stammes. Ein Beispiel der durchgeführten Aufnahmen des *asp1^{H397A}* Stammes

A „Hefeform“, Oberflächenwachstum pseudohyphale Form, invasives Wachstum

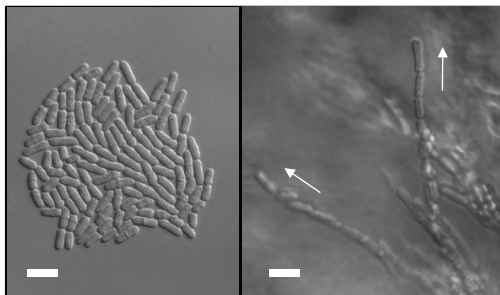
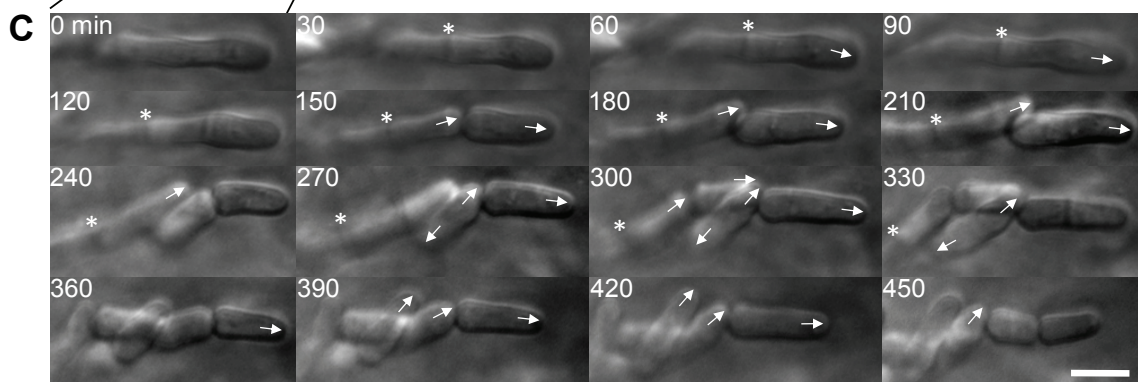
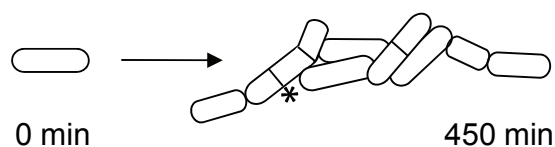
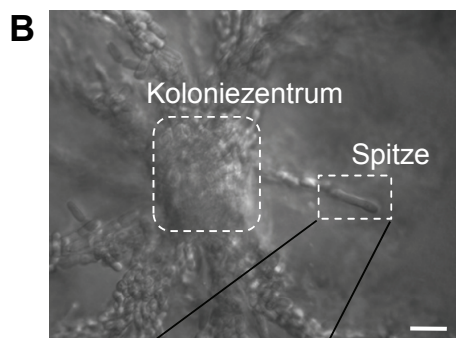


Abbildung 26: Lebendzellmikroskopie des invasiven Wachstums. (A) DIC-Aufnahmen von Wildtypzellen in der oberflächlich wachsenden „Hefeform“ oder invasiv wachsenden, pseudohyphalen Form bei 30°C auf bzw. in YE5S-Agar. Pfeile geben die Wachstumsrichtung zweier Pseudohyphen an. Balken, 10 µm. (B) Übersichtsbild einer invasiven Kolonie des *asp1^{H397A}* Stammes. Balken, 5 µm. (C) Das Wachstum der in (B) umrandeten Zelle an der Spitze einer Pseudohyphe wurde bei einer eingestellten Temperatur von 30°C im Abstand von 30 Minuten fotografiert. Die Weiterentwicklung der pseudohyphalen Struktur aus dieser Zelle ist zur Übersicht in der darüber stehenden Schemazeichnung dargestellt. Sterne markieren ein sich nicht einschnürendes Septum, Pfeile geben die Wachstumsrichtung der Zellen an. Balken, 5 µm.



ist in Abb. 26B bzw. C zu sehen. Das Wachstum der in Abb. 26B umrandeten Zelle an der Spitze einer pseudohyphalen Struktur konnte über einen Zeitraum von 7,5 Stunden verfolgt werden. Die Weiterentwicklung der pseudohyphalen Struktur aus dieser Zelle kann anhand der Bilderserie nachvollzogen werden und ist außerdem in der darüber abgebildeten Schemazeichnung dargestellt (Abb. 26B, C). Das Zellwachstum in den pseudohyphalen Strukturen konnte von der Spitze der Strukturen aus bis zu 12 Zellen weit in das Kolonieinnere hinein beobachtet werden, da die Zellen an diesen äußeren Abschnitten noch nicht von Zellen in anderen Ebenen verdeckt wurden. Die folgenden Analysen beziehen sich daher auf das Wachstum dieser äußeren Abschnitte der pseudohyphalen Strukturen.

3.4.1 Das Wachstum ist unabhängig von der Position der Zellen in den pseudohyphalen Strukturen

Bei der Analyse des pseudohyphalen Wachstums wurde als erstes die Frage beantwortet, ob alle Zellen einer pseudohyphalen Struktur wachsen oder ob sich das Wachstum auf die Spitze dieser Struktur beschränkt. Dazu wurde unterschieden zwischen der „1. Zelle“, die am weitesten vom Koloniezentrum entfernt ist und die Spitze der pseudohyphalen Struktur ausmacht, ihr folgend der „2. Zelle“, und allen darauf folgenden Zellen, die als „ ≥ 3 . Zelle“ zusammengefasst wurden. Es stellte sich heraus, dass Wachstum bei fast allen analysierten Zellen stattfand, unabhängig von ihrer Position innerhalb der pseudohyphalen Struktur (Abb. 27).

		Koloniezentrum) ≥ 3 . 2. 1. Spitze			
%	Wachstum	83	97	100	Wildtyp
	kein Wachstum	6	3	-	
	Lyse	11	-	-	
	Wachstum	95	93	71	<i>asp1^{H397A}</i>
	kein Wachstum	2,5	7	19	
	Lyse	2,5	-	10	

Abbildung 27: Zuordnung von Wachstum, Nicht-Wachstum oder Zellyse in % zur Position der Zellen in den Pseudohyphen. Wildtyp: n=24 (1.) / 30 (2.) / 48 (≥ 3 .); *asp1^{H397A}*: n=39 (1.) / 45 (2.) / 52 (≥ 3 .).

3.4.2 Pseudohyphal wachsende Zellen weisen ein verändertes polares Wachstumsmuster auf

Um das pseudohyphale Wachstumsmuster zu charakterisieren, wurde zunächst bestimmt, ob nach der Zytokinese die alten Zellenden der Tochterzellen als Wachstumszonen definiert werden, wie es beim Wachstum auf der Agaroberfläche der Fall ist (vgl. Kap. 3.2.4) (Mitchison & Nurse, 1985). Dabei stellte sich heraus, dass bei dem überwiegenden Anteil der pseudohyphal wachsenden Zellen nach der Zytokinese eine Tochterzelle an ihrem alten Zellende wuchs, die andere Tochterzelle aber an ihrem neuen Zellende (Abb. 28A).

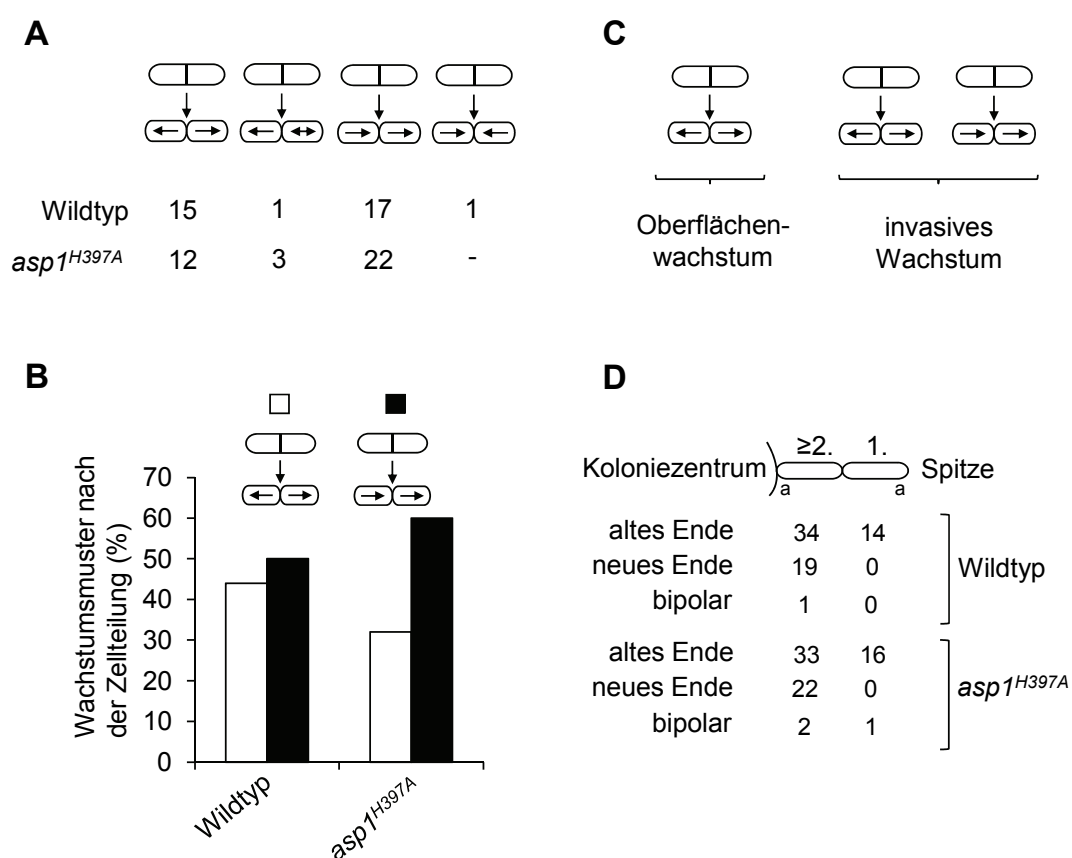


Abbildung 28: Pseudohyphales Wachstum kann vom alten oder neuen Zellende begonnen werden. (A) Wachsende Zellenden nach der Zellteilung beim invasiv wachsenden Wildtypstamm und *asp1^{H397A}* Stamm nach 20tägiger Vorinkubation bei 30°C auf YE5S-Agar. Zahlen sind absolute Anzahlen der Zellen in jeweiliger Kategorie. Horizontale Pfeile geben die Wachstumsrichtung der Tochterzellen an. (B) Prozentuale Verteilung der zwei Wachstumsmuster bei den Zellen aus (A). Wildtyp: n=34; *asp1^{H397A}*: n=37. (C) Schematische Darstellung der ausgewählten Zellenden zu Beginn der Wachstumsphase beim Oberflächen- und invasiven Wachstum. (D) Zuordnung des Wachstumsbeginns am alten, neuen oder beiden Zellenden zur Position der Zellen in der Pseudohyph. Zahlen sind absolute Anzahlen der Zellen in jeweiliger Kategorie. „a“ = altes Zellende.

Dieser Phänotyp trat bei 50% der Zellen des Wildtypstammes und bei 60% der Zellen des *asp1^{H397A}* Stammes auf und war im Vergleich zum Wachstum auf der Agaroberfläche signifikant erhöht ($p < 0,01$, χ^2 -Test) (Abb. 28B). Somit kann beim pseudohyphalen Wachstum nach der Zytokinese entweder das alte oder das neue Zellende als Wachstumszone definiert werden (Abb. 28C). Bezogen auf die 1. und ≥ 2 . Zellen der pseudohyphalen Strukturen fand sich jedoch, dass dieser Phänotyp nur bei ≥ 2 . Zellen beobachtet werden konnte (Abb. 28D). 1. Zellen wuchsen immer an ihrem alten Zellende (Abb. 28D).

Als nächstes wurde untersucht, ob die pseudohyphal wachsenden Zellen ebenso wie Zellen auf der Agaroberfläche in der Lage sind, im Verlauf der Wachstumsphase auch das zweite Zellende als Wachstumszone zu aktivieren (vgl. Kap. 3.2.4) (Mitchison & Nurse, 1985). Es zeigte sich, dass bei 54% der Zellen des Wildtypstammes und 70.2% der Zellen des *asp1^{H397A}* Stammes NETO nicht stattfand und die Zellen bis zur nächsten Zellteilung monopolar blieben (Abb. 29A). Auch dieser Phänotyp war gegenüber dem Wachstum auf der Agaroberfläche signifikant erhöht ($p < 0,01$, χ^2 -Test). Um zu überprüfen, ob monopolar wachsende Zellen die für NETO kritische Zelllänge erreichen, wurden die Zelllängen ausgemessen. Die durchschnittliche Zelllänge der bipolar wachsenden Zellen betrug bei NETO $9.3 \pm 1.5 \mu\text{m}$ (Wildtyp) bzw. $9.3 \pm 1.3 \mu\text{m}$ (*asp1^{H397A}*). Die durchschnittliche Zelllänge der mono- und bipolar wachsenden Zellen betrug jedoch $11.4 \pm 1.7 \mu\text{m}$ (Wildtyp) bzw. $11.9 \pm 2.1 \mu\text{m}$ (*asp1^{H397A}*) (Tab. 5). Das Ausbleiben von NETO kann deshalb nicht in einer zu geringen Zelllänge begründet sein. Bei dem überwiegenden Teil der pseudohyphal wachsenden Zellen wurde der Wechsel zum bipolaren Wachstum nicht ausgeführt (Abb. 29B). Anders als bei der Wahl des Zellendes nach der Zytokinese konnte jedoch keine besondere Verteilung von mono- und bipolarem Wachstum auf die Zellposition innerhalb der Pseudohyphen festgestellt werden (Abb. 29C).

Bei der Analyse der pseudohyphal wachsenden Zellen wurde außerdem beobachtet, dass wachsende Zellen ihre Form an benachbarte, „im Weg liegende“ Zellen anpassten (Abb. 29D). Die Position der Wachstumszonen wird bei pseudohyphal wachsenden Zellen also auch durch physische externe Faktoren beeinflusst.

	a) Zelllänge bei NETO	b) Zelllänge bei Teilung
Wildtyp	9.3 ± 1.5	11.4 ± 1.7
<i>asp1^{H397A}</i>	9.3 ± 1.3	11.9 ± 2.1

Tabelle 5: Zelllängen beim pseudohyphalen Wachstum (μm). Wildtyp: a) $n=16$, b) $n=37$; *asp1^{H397A}*: a) $n=15$, b) $n=52$.

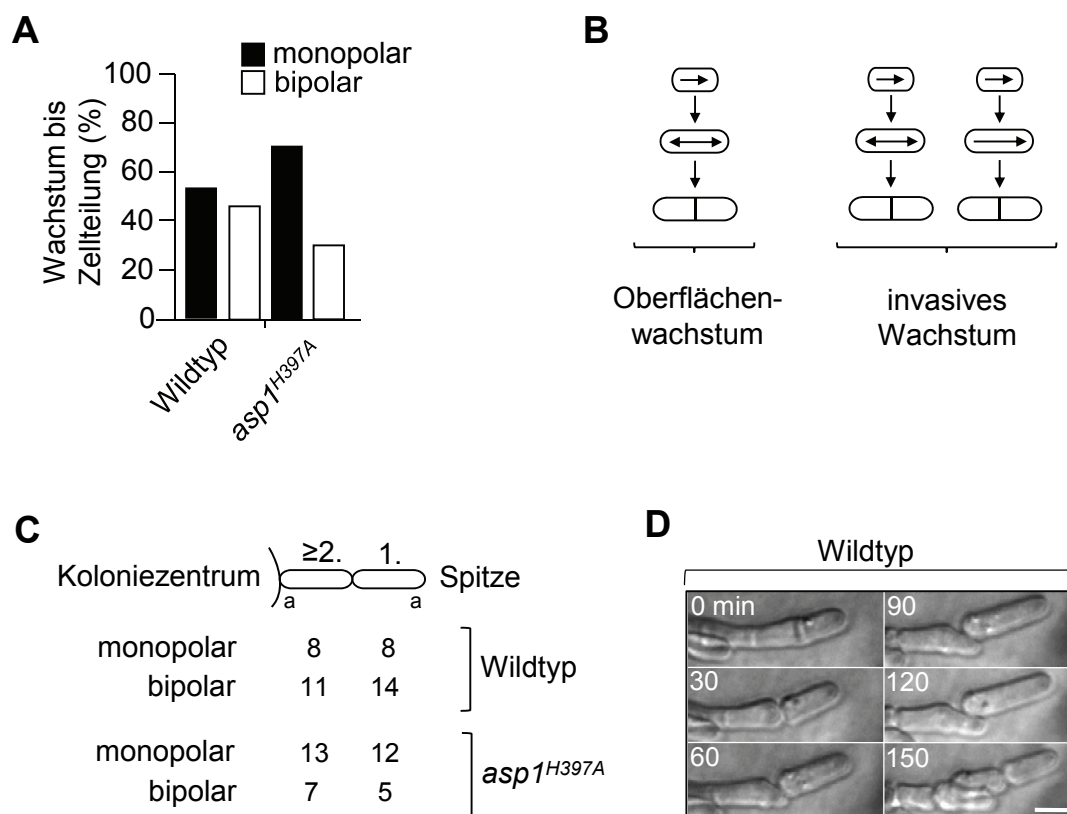


Abbildung 29: Pseudohyphales Wachstum ist überwiegend monopolar. (A) Prozentualer Anteil von mono- und bipolarem Wachstum bis zur Zellteilung beim invasiv wachsenden Wildtypstamm (n=41) und *asp1^{H397A}* Stamm (n=57) nach 20tägiger Vorinkubation bei 30°C auf YE5S-Agar. (B) Schematische Darstellung der überwiegenden Wachstumsformen beim Oberflächen- und invasiven Wachstum. (C) Zuordnung der Zellen aus (A) zur Position in der Pseudohyphe. Zahlen sind absolute Anzahlen der Zellen in jeweiliger Kategorie. „a“ = altes Zellende. (D) Beispiel der Anpassung der Zellform an benachbarte Zellen bei einer invasiv wachsenden Wildtypzelle. Balken, 5 µm.

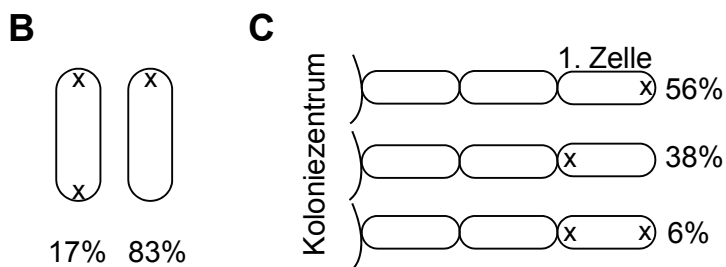
3.4.3 Der Zellendmarker Tea1 ist in pseudohyphal wachsenden Zellen anders als in hefeförmig wachsenden Zellen lokalisiert

Da pseudohyphal wachsende Zellen ein verändertes Muster des Zellendwachstums aufweisen, stellte sich die Frage, ob Zellendmarker in diesen Zellen anders lokalisiert sind. Dies wurde beispielhaft anhand der Lokalisierung des GFP-markierten Zellendmarkers Tea1 in pseudohyphal wachsenden Wildtypzellen untersucht (Abb. 30). Bei in Flüssigkultur wachsenden Wildtypzellen lokalisierte Tea1-pkGFP konzentriert an beiden Zellenden (Kap. 3.2.3). Interessanterweise war das Tea1-pkGFP Signal bei pseudohyphal wachsenden Zellen von den Zellenden ausgehend weit in Richtung der Zellmitte verteilt (Abb. 30A). Desweiteren zeigte sich, dass Tea1-pkGFP in 83% der pseudohyphal wachsenden Zellen an nur einem Zellende lokalisierte (Abb. 30A, B). Um zu sehen, ob es sich dabei um das wachsende Zellende handelte, wurde die Lokalisierung von Tea1-pkGFP in den 1. Zellen der

Pseudohyphen untersucht, welche immer an ihren alten Zellenden wachsen (Kap. 3.4.2). Tea1-pkGFP lokalisierte jedoch nur in 62% dieser Zellen am alten Zellende, in den übrigen Zellen war es am neuen Zellende lokalisiert (Abb. 30C). Das wachsende Zellende pseudohyphal wachsender Zellen wurde somit nicht immer durch Tea1-pkGFP markiert. Dies bedeutet, dass Tea1 in pseudohyphal wachsenden Zellen eine andere Rolle spielt als beim Wachstum auf der Agaroberfläche bzw. in Flüssigkultur.



Abbildung 30: Lokalisierung von Tea1 in invasiv wachsenden Wildtypzellen. (A) Überlagerte Phasenkontrast und Tea1-pkGFP Aufnahmen von invasiv wachsenden Zellen nach 44tägiger Vorinkubation bei 30°C auf YE5S-Agar. Zahlen s. Text. Balken, 10 µm. (B) Prozentuale Verteilung von Zellen aus (A) mit Tea1-pkGFP (x) an einem oder beiden Zellenden (n=42). (C) Prozentuale Verteilung der Tea1-pkGFP Lokalisierung am alten, neuen oder an beiden Zellenden in den 1. Zellen der Pseudohyphen (n=16).



3.4.4 Pseudohyphal wachsende Zellen haben Zytokinesedefekte

Obwohl in den pseudohyphalen Strukturen fast alle analysierten Zellen und nicht nur die 1. Zellen wachsen, sind die Zellen kettenartig hintereinander angeordnet. Pseudohyphales Wachstum wird durch Defekte bei der Zellteilung erleichtert (Bahler, 2005). Eine mögliche Ursache für die besondere Anordnung der Zellen ist also, dass die Septen während der Zytokinese weniger effizient aufgelöst werden und die Tochterzellen an ihren neuen Zellenden partiell verbunden blieben. Jedoch war es nicht möglich zu unterscheiden, ob die

Zellen aufgrund von Zytokinesedefekten oder durch den Druck des sie umgebenden Substrats nah beieinander positioniert bleiben. Dennoch konnten innerhalb der pseudohyphalen Strukturen Zellen beobachtet werden, die zwar ein Septum ausbildeten, dieses aber nicht einschnürten und die Tochterzellen sich nicht voneinander trennten (in Abb. 26C mit einem Stern markiert). Das Wachstum und die Teilung der Tochterzellen selbst schritten normal voran. Dieser massive Zytokinesedefekt trat bei 8% der Zellen des Wildtypstammes und bei 18.5% der Zellen des *asp1^{H397A}* Stammes auf (Abb. 31). Beim Wachstum der Zellen auf der Agaroberfläche wurde dieser Defekt nicht beobachtet (Kap. 3.2.6).

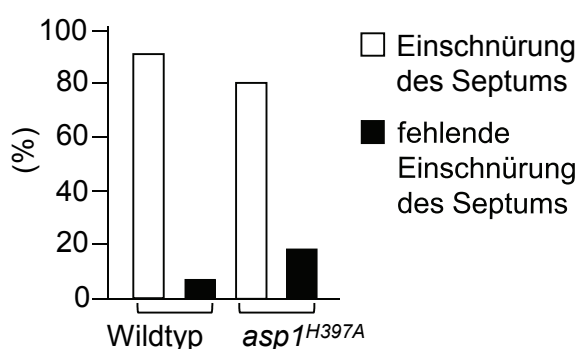


Abbildung 31: Pseudohyphal wachsende Zellen zeigen Defekte bei der Einschnürung des Septums. Prozentuale Verteilung von eingeschnürten oder nicht eingeschnürten Septen bei invasiv wachsenden Zellen des Wildtypstammes (n=96) oder *asp1^{H397A}* Stammes (n=54) nach 20tägiger Vorinkubation bei 30°C auf YE5S-Agar.

3.4.5 Die Rolle des Mikrotubuli- und Aktin-Zytoskeletts beim invasiven Wachstum

Pseudohyphal wachsende *S. pombe* Zellen weisen dieselbe zylindrische Form wie auf der Agaroberfläche wachsende Zellen auf und wachsen polar an ihren Zellenden. Sowohl die zylindrische Zellform als auch das polare Wachstum benötigen ein funktionelles Mikrotubuli- und Aktin-Zytoskelett (Chang & Martin, 2009). Deshalb wurde die Notwendigkeit des Mikrotubuli- und Aktin-Zytoskeletts für das invasive Wachstum untersucht. Dazu wurde die Fähigkeit von Stämmen mit fehlenden oder defekten Komponenten des Zytoskeletts zum invasiven Wachstum bestimmt.

Mal3 und Peg1 sind Komponenten des +TIP Komplexes, der die Mikrotubuli-Stabilität an den Plus-Enden reguliert (Beinhauer et al, 1997; Grallert et al, 2006). Die durchschnittliche Invasivität des *mal3Δ* Deletionsstammes war höher als die des Wildtypstammes (Abb. 32A, C). Der temperatursensitive *peg1-1* Stammes war bei der permissiven Temperatur ähnlich invasiv wie der Wildtypstamm (Abb. 32D, Abb. Z5 im Anhang). Tea2 ist ein Mikrotubuli-Plus-End-gerichtetes Kinesin, welches auch die Mikrotubuli-Dynamik beeinflusst und für den Transport des Zellendmarkers Tea1 zu den Zellenden benötigt wird (Chang & Martin, 2009). Der *tea2Δ* Deletionsstamm zeigte bei den vorliegenden Bedingungen kein invasives

Wachstum (Abb. 32C, Abb. Z5 im Anhang), ist dazu jedoch unter anderen Bedingungen in der Lage (Dodgson et al, 2009). Der *tea1Δ* Deletionsstamm war ähnlich invasiv wie der *asp1^{H397A}* Stamm (Abb. 32C, Abb. Z5 im Anhang). Die Abwesenheit von Tea1 begünstigt also invasives Wachstum. Insgesamt haben Komponenten des Mikrotubuli-Zytoskeletts unterschiedliche Einflüsse auf die Fähigkeit zum invasiven Wachstum. Dennoch war die Invasivität von Doppelmutantenstämmen zwischen *asp1^{H397A}* und den oben genannten Deletionen/Mutationen jeweils höher als die Invasivität des *asp1^{H397A}* Stammes selbst. So zeigten ein *asp1^{H397A} peg1-1* und ein *asp1^{H397A} tea2Δ* Stamm tendenziell, ein *asp1^{H397A} mal3Δ* und ein *asp1^{H397A} tea1Δ* Stamm signifikant erhöhtes invasives Wachstum (Abb. 32A, C, D, Abb. Z5 im Anhang). Demzufolge wird ein wildtypisches Mikrotubuli-Zytoskelett nicht für das invasive Wachstum benötigt.

Desweiteren wurde das invasive Wachstum von Stämmen mit defekten Komponenten des Aktin-Zytoskeletts untersucht. Arp3 und Sop2 sind Komponenten des Arp2/3 Komplexes, der für die Entstehung und Funktionalität der Aktinflecken benötigt wird, während das Tropomyosin Cdc8 für die Stabilisierung von Aktinkabeln benötigt wird (Balasubramanian et al, 1996; Balasubramanian et al, 1992; McCollum et al, 1996). Bei Act1 handelt es sich um Aktin selbst (McCollum et al, 1999). *arp3-c1*, *sop2-1*, *cdc8-110* und *act1-48* Mutantenstämme zeigten bei permissiver Temperatur kein invasives Wachstum (Abb. 32A, C, D, Abb. Z5 im Anhang). Ein wildtypisches Aktin-Zytoskelett wird somit für das invasive Wachstum benötigt. Dementsprechend wurde das ausgeprägte invasive Wachstum des *asp1^{H397A}* Stammes durch das Einkreuzen der *sop2-1*, *cdc8-110* oder *act1-48* Mutationen stark reduziert (Abb. 32A, C, D, Abb. Z5 Anhang). Eine Ausnahme bildete jedoch der *asp1^{H397A} arp3-c1* Doppelmutantenstamm, der ein massiv erhöhtes invasives Wachstum aufwies (Abb. 32A, C). Dies könnte möglicherweise mit einem verstärkten Zytokinesedefekt dieses Stammes zusammenhängen, da Zellen innerhalb der Pseudohyphen sehr viel akkurater aneinandergereiht waren (Abb. 32B). Die Notwendigkeit des Aktin-Zytoskeletts für das invasive Wachstum wurde durch die Inkubation des *asp1^{H397A}* Stammes auf LatB-haltigem Medium bestätigt. Die Destabilisierung des Aktin-Zytoskeletts durch diese Chemikalie bewirkte eine massive Reduktion des invasiven Wachstums dieses Stammes (Abb. 32C, Abb. Z5 im Anhang).

An dieser Stelle zeigte sich erneut, dass die Stärke der Substrat-Adhäsion nicht mit der Fähigkeit zum invasiven Wachstum korrelieren muss. So zeigte der *act1-48* Stamm eine hohe Substrat-Adhäsion, aber kein invasives Wachstum (Abb. 32C, Abb. Z5 im Anhang). Umgekehrt zeigte der *asp1^{H397A} mal3Δ* Stamm eine wildtypische Adhäsionsstärke, aber stark erhöhtes invasives Wachstum (Abb. 32A, C).

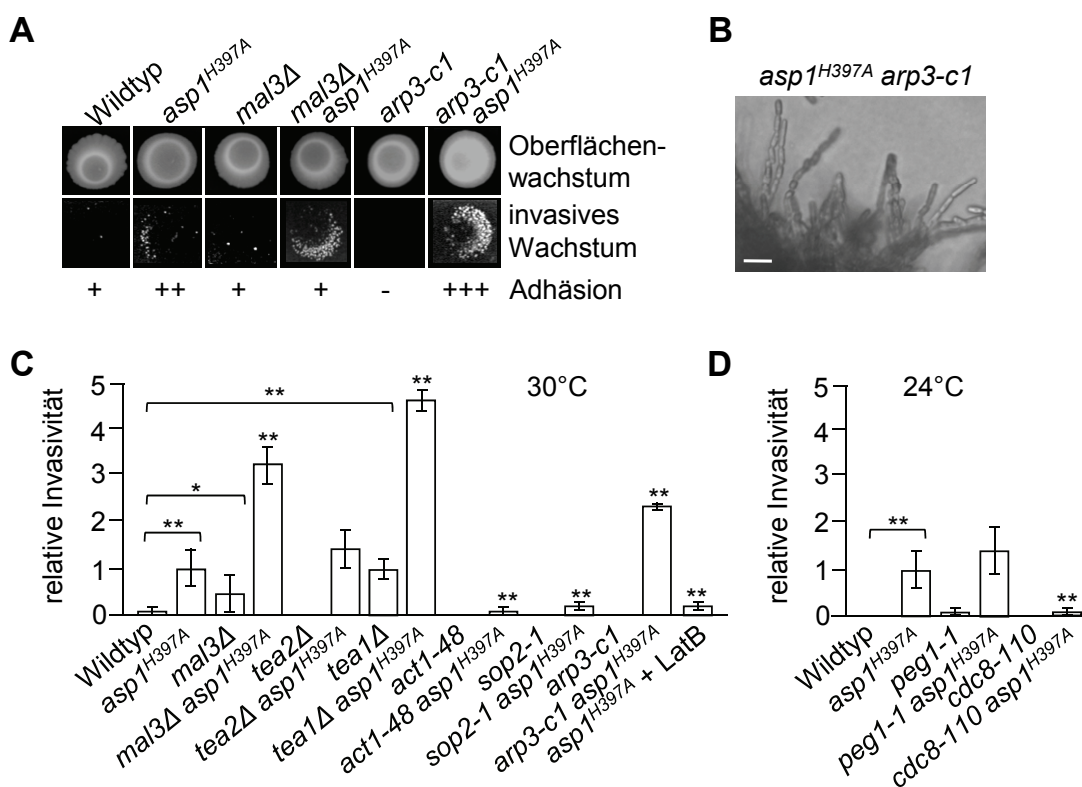


Abbildung 32: Einfluss des Mikrotubuli- und Aktin-Zytoskeletts auf das invasive Wachstum. (A) Die genannten Stämme wurden auf YE5S-Agar aufgetropft und 20 Tage bei 30°C inkubiert (Oberflächenwachstum). Adhäsion = nach Abspülen der Agaroberfläche mit Wasser. +, wildtypische Adhäsionsstärke. Invasives Wachstum = nach Abreiben aller verbleibenden Zellen von der Agaroberfläche. (B) Mikroskopische Aufnahme einer invasiv wachsenden Kolonie des *asp1^{H397A} arp3-c1* Stammes. Balken, 10 µm. (C und D) Quantifizierung des invasiven Wachstums der genannten Stämme. Die Zellen wurden wie in (A) beschrieben bei 30°C (C) oder 24°C (D) inkubiert und die Anzahl invasiv wachsender Kolonien bestimmt. Die Invasivität des *asp1^{H397A}* Mutantenstammes wurde auf 1 gesetzt. *, $p < 0,05$ für den *mal3Δ* Stamm verglichen mit dem Wildtypstamm (Welch-Test). **, $p < 0,01$ für die *asp1^{H397A}* und *tea1Δ* Stämme verglichen mit dem Wildtypstamm und für die *mal3Δ asp1^{H397A}*, *tea1Δ asp1^{H397A}*, *act1-48 asp1^{H397A}*, *sop2-1 asp1^{H397A}*, *arp3-c1 asp1^{H397A}*, *asp1^{H397A} + LatB* und *cdc8-110 asp1^{H397A}* Stämme verglichen mit *asp1^{H397A}* Stamm (Welch-Test).

3.5 Eine mögliche Rolle von Zyklin-abhängigen Kinasen bei der Regulation des dimorphen Wechsels

Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass Asp1 eine zentrale Rolle bei der Regulation des dimorphen Wechsels spielt und diese Funktion konserviert ist. Weitere Proteine, für die eine wichtige Funktion bei dieser Regulation angenommen wird, sind die Zyklin-abhängigen Kinasen (Wang, 2009). Vieles deutet darauf hin, dass Asp1 möglicherweise Zyklin-abhängige Kinasen (CDKs) reguliert. Deshalb wurden drei der *S. pombe* CDKs hinsichtlich ihrer Beteiligung am Asp1 abhängigen dimorphen Wechsel analysiert. Dabei handelte es sich zunächst um die CDK Pef1. Das *S. cerevisiae* Pef1 Ortholog Pho85 wird durch Vip1

spezifisches IP₇ inhibiert und ist das einzige, bisher identifizierte Zielprotein von Vip1 (Lee et al, 2008; Lee et al, 2007). Desweiteren wurden die CDK Cdc2 und in diesem Zusammenhang das „nucleosome assembly protein“ Nap1 untersucht. Das *nap1⁺* Gen wurde ebenfalls als extragener Multikopie-Suppressor eines *mal3* Mutantenstammes isoliert (Beinhauer, 1999). In *S. cerevisiae* interagiert Nap1 zum einen physikalisch mit Vip1 (Krogan et al, 2006; Krogan et al, 2004). Zum anderen wird es, gemeinsam mit dem Zyklin Clb2, für die vollständige Funktion der Cdc2 orthologen CDK Cdc28 benötigt (Kellogg & Murray, 1995). Als drittes wurde die CDK Cdk8 untersucht, eine Komponente des Multiproteinkomplexes Mediator, der als Vermittler zwischen spezifischen Transkriptionsaktivatoren und der RNA-Polymerase II agiert (Linder et al, 2008). *cdk8* Mutanten- oder Deletionsstämme weisen einen starken Flokkulationsphänotyp auf, der durch die Hochregulation verschiedener Zelloberflächen-Adhäsine ausgelöst wird (Linder et al, 2008). Im Folgenden wurde nun analysiert, wie sich der (Funktions-)Verlust der CDKs auf das Auftreten von Zell-Zell-, Zell-Substrat-Adhäsion und invasivem Wachstum auswirkt.

3.5.1 Asp1 benötigt die Anwesenheit der Zyklin-abhängigen Kinase Pef1 für die Regulation des adhäsiven Wachstums

Um die Beteiligung der CDK Pef1 an der Regulation des dimorphen Wechsels zu untersuchen, wurde das *pef1⁺* Gen deletiert. Der *pef1Δ* Deletionsstamm zeigte dem Wildtypstamm vergleichbare adhäsive Eigenschaften (Abb. 33A, B). Die adhäsiven Eigenschaften des *asp1^{H397A}* Stammes wurden jedoch durch die Deletion von *pef1⁺* aufgehoben bzw. stark reduziert (Abb. 33A, B). Asp1 benötigt somit die Anwesenheit von Pef1, um das adhäsive Wachstum zu regulieren. Der *pef1Δ* Stamm zeigte ein dem *asp1^{H397A}* Stamm vergleichbares, hohes Maß invasiven Wachstums (Abb. 33C). Somit wäre die Inhibierung von Pef1 durch Asp1 spezifische Inositolpyrophosphate eine Möglichkeit, das invasive Wachstum zu regulieren. Dennoch trat bei dem *asp1^{D333A} pef1Δ* Stamm kein invasives Wachstum mehr auf, weshalb Pef1 nicht das einzige Zielprotein von Asp1 bei der Regulation des invasiven Wachstums sein könnte (Abb. 33B). Die invasiv wachsenden Kolonien der *pef1Δ* und *asp1^{H397A} pef1Δ* Stämme waren nach einer vergleichbaren Inkubationszeit in der Regel deutlich kleiner als die des *asp1^{H397A}* Stammes (Abb. 33C). Das invasive Wachstum des *pef1Δ* Stammes trat möglicherweise zu einem späteren Zeitpunkt ein. Dies könnte bedeuten, dass die Abwesenheit von Pef1 unabhängig von Asp1 zu invasivem Wachstum führt.

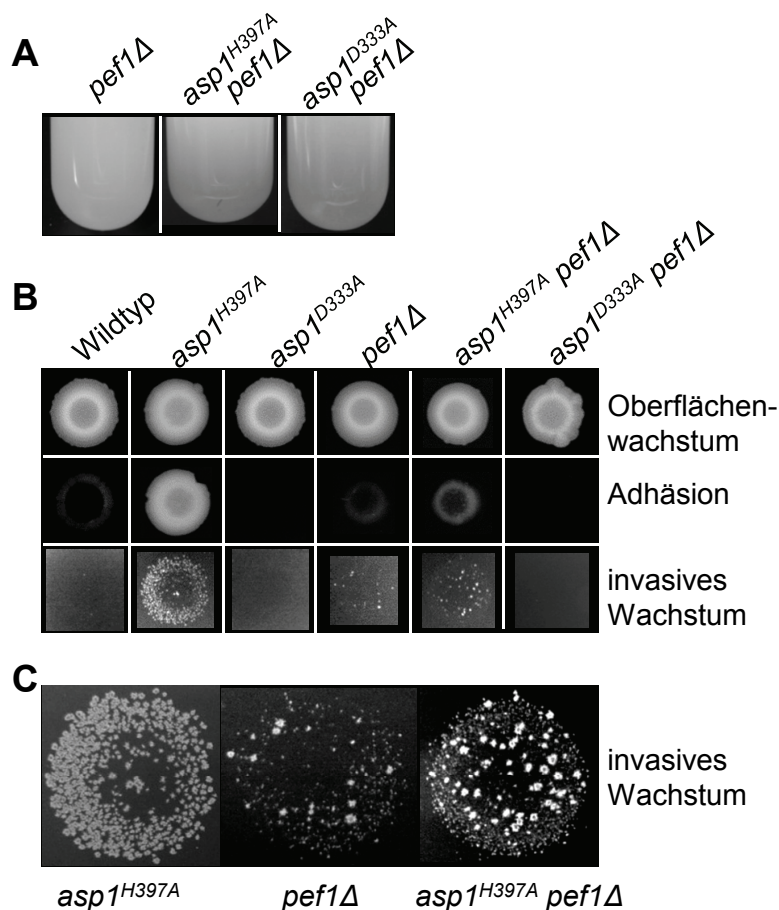


Abbildung 33: Asp1 benötigt die Anwesenheit von Pef1 für die Regulation des adhäsiven Wachstums. (A) Die genannten Stämme wurden im Reagenzglas in YE5S bei 30°C bis zur stationären Phase angezogen und fotografiert. (B) Die genannten Stämme wurden auf YE5S-Agar aufgetropft und 20 Tage bei 30°C inkubiert (Oberflächenwachstum). Adhäsion = nach Abspülen der Agaroberfläche mit Wasser; invasives Wachstum = nach Abreiben aller verbleibenden Zellen von der Agaroberfläche. (C) Nahaufnahmen des invasiven Wachstums der Stämme aus (B).

3.5.2 Asp1 benötigt die Anwesenheit des „nucleosome assembly protein“ Nap1 für die Regulation des invasiven Wachstums, jedoch nicht die Funktion der Zyklin-abhängigen Kinase Cdc2

Da *cdc2⁺* ein essentielles Gen ist, wurde die Beteiligung der CDK Cdc2 am dimorphen Wechsel anhand des temperatursensitiven *cdc2-M63* Mutantenstammes bei der permissiven Temperatur analysiert. Dabei zeigte sich, dass der *cdc2-M63* Stamm eine erhöhte Zell-Zell- und Zell-Substrat-Adhäsion und erhöhtes invasives Wachstum im Vergleich zum Wildtypstamm aufwies (Abb. 34 A-C). Diese Phänotypen traten bei einem *asp1^{D333A} cdc2-M63* Stamm jedoch nicht mehr auf (Abb. 34 A-C). Ein *asp1^{H397A} cdc2-M63* Stamm besaß vergleichbare adhäsive und invasive Eigenschaften wie der *asp1^{H397A}* Stamm (Abb. 34 A-C, vgl. Kap. 3.3.1). Cdc2 spielt also ebenfalls eine Rolle beim dimorphen Wechsel, wird jedoch scheinbar nicht von Asp1 für die Regulation des adhäsiven oder invasiven Wachstums benötigt.

Der Verlust des Nap1 Proteins führte nicht zu veränderten adhäsiven Zelleigenschaften und wirkte sich auch nicht negativ auf die Zell-Zell- oder Zell-Substrat-Adhäsion des *asp1^{H397A}* Stammes aus (Abb. 34D, Daten nicht gezeigt). Allerdings zeigte ein *asp1^{H397A} nap1Δ* Stamm

ein stark reduziertes invasives Wachstum im Vergleich zum *asp1^{H397A}* Stamm (Abb. 34D, E). Asp1 benötigt damit die Anwesenheit von Nap1, um das invasive Wachstum effizient zu regulieren.

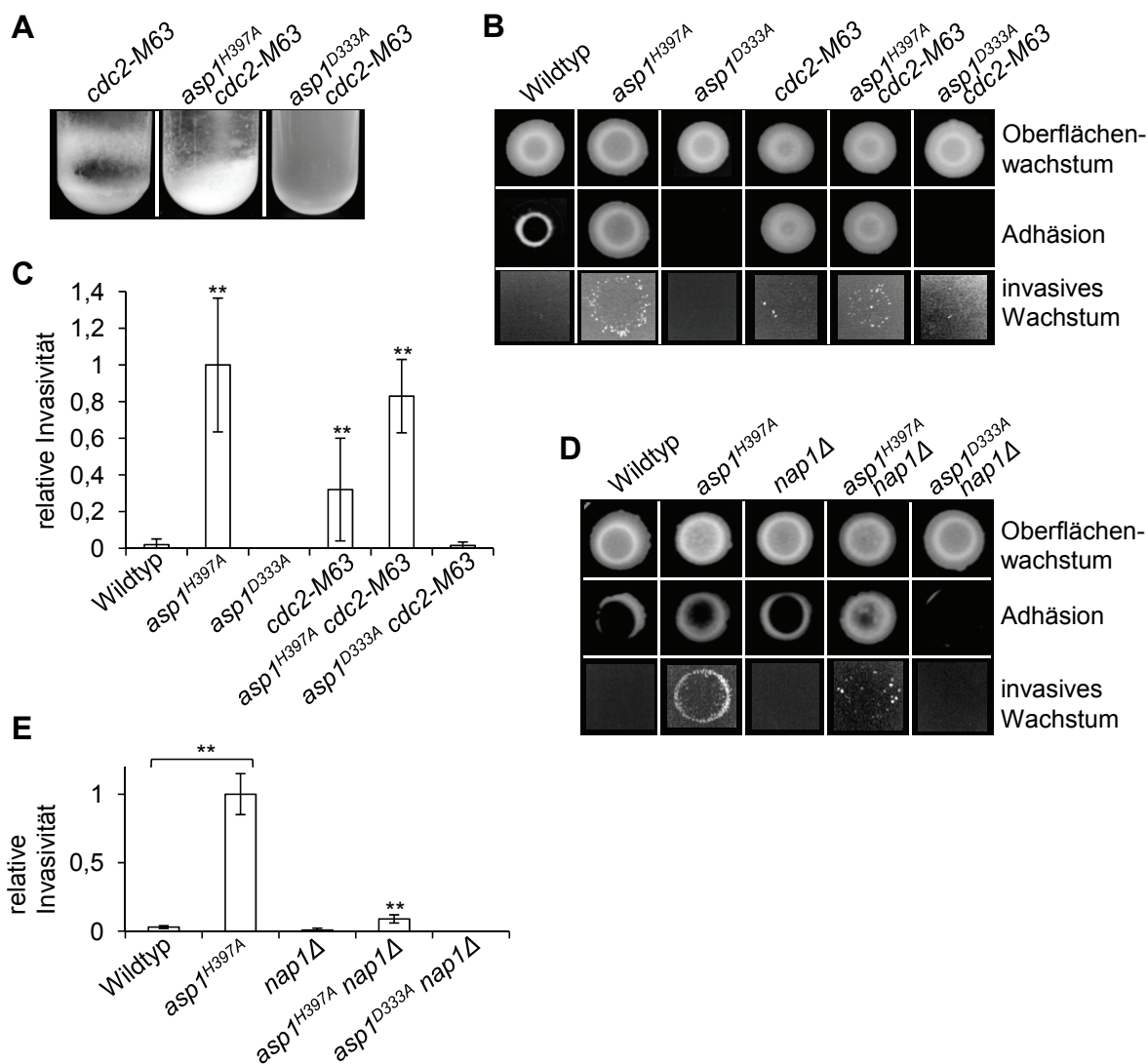


Abbildung 34: Asp benötigt die Anwesenheit von Nap1 für die Regulation des invasiven Wachstums, nicht jedoch die Funktion von Cdc2. (A) Die genannten Stämme wurden im Reagenzglas in YE5S bei 24°C bis zur stationären Phase angezogen und fotografiert. (B) Die genannten Stämme wurden auf YE5S-Agar aufgetropft und 20 Tage bei 24°C inkubiert (Oberflächenwachstum). Adhäsion = nach Abspülen der Agaroberfläche mit Wasser; invasives Wachstum = nach Abreiben aller verbleibenden Zellen von der Agaroberfläche. (C) Quantifizierung des invasiven Wachstums aus (B). Die Anzahl invasiv wachsender Kolonien wurde ausgezählt und für den *asp1^{H397A}* Mutantenstamm auf 1 gesetzt. **, $p < 0,01$ verglichen mit dem Wildtypstamm (Welch-Test). (D) Die genannten Stämme wurden auf YE5S-Agar aufgetropft und 20 Tage bei 30°C inkubiert (Oberflächenwachstum). Adhäsion = nach Abspülen der Agaroberfläche mit Wasser; invasives Wachstum = nach Abreiben aller verbleibenden Zellen von der Agaroberfläche. (E) Quantifizierung des invasiven Wachstums aus (D). Die Anzahl invasiv wachsender Kolonien wurde ausgezählt und für den *asp1^{H397A}* Mutantenstamm auf 1 gesetzt. **, $p < 0,01$ für *asp1^{H397A}* Stamm verglichen mit dem Wildtypstamm und den *asp1^{H397A} nap1Δ* Stamm verglichen mit *asp1^{H397A}* Stamm (Welch-Test).

3.5.3 Asp1 benötigt nicht die Anwesenheit von Cdk8 für die Regulation des adhäsiven und invasiven Wachstums

Der Verlust der CDK Cdk8 durch die Deletion des *cdk8⁺* Gens führte erwartungsgemäß zu einem starken Flokkulationsphänotyp und auch zu starker Substrat-Adhäsion (Abb. 35A, B). Beide Phänotypen waren bei einem *asp1^{D333A} cdk8Δ* Stamm reduziert (Abb. 35A, B). Somit wird die funktionelle Asp1 Kinasedomäne für die adhäsiven Eigenschaften des *cdk8Δ* Stammes benötigt. Die Deletion des SPAC186.01 ORFs, kodierend für ein putatives, in einem *cdk8* Mutantenstamm ca. 100fach hochreguliertes Adhäsins, hat keinen negativen Effekt auf die Flokkulation des *asp1^{H397A}* Stammes (Abb. 35A) (Linder et al, 2008). Der *cdk8Δ* Stamm zeigte außerdem invasives Wachstum (Abb. 35B). Der *asp1^{H397A} cdk8Δ* Stamm zeigte einen additiven, invasiven Wachstumsphänotyp, während der *asp1^{D333A} cdk8Δ* Stamm kein invasives Wachstum mehr zeigte (Abb. 35B). Somit wird die funktionelle Asp1 Kinasedomäne auch für das invasive Wachstum des *cdk8Δ* Stammes benötigt. Jedoch scheint Asp1 die Anwesenheit von Cdk8 weder für die Regulation des adhäsiven noch des invasiven Wachstums zu benötigen.

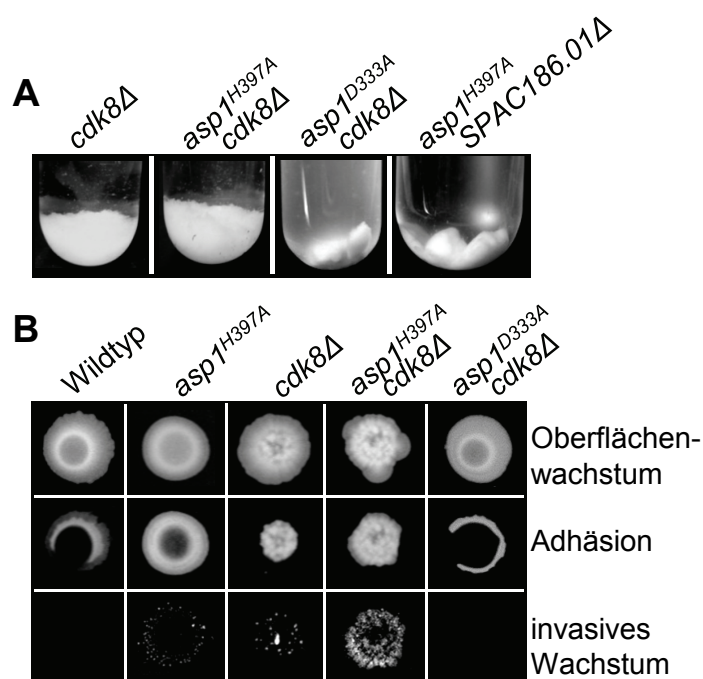


Abbildung 35: Asp1 benötigt nicht die Anwesenheit von Cdk8 für die Regulation des adhäsiven und invasiven Wachstums. (A) Die genannten Stämme wurden im Reagenzglas in YE5S bei 30°C bis zur stationären Phase angezogen und fotografiert. (B) Die genannten Stämme wurden auf YE5S-Agar aufgetropft und 20 Tage bei 30°C inkubiert (Oberflächenwachstum). Adhäsion = nach Abspülen der Agaroberfläche mit Wasser; invasives Wachstum = nach Abreiben aller verbleibenden Zellen von der Agaroberfläche.

3.6 Primärcharakterisierung der Funktionsweise der Asp1 Proteindomänen

3.6.1 Die Asp1 Protein besteht aus zwei funktionellen Domänen

Für Asp1 wurden in dieser Arbeit die N-terminale Kinasedomäne und die C-terminale Phosphatasedomäne als funktionelle Domänen identifiziert. Um auszuschließen, dass noch weitere funktionelle Domänen vorhanden sind, wurde ein weiterer Mutantenstamm erzeugt, bei dem sowohl in der Kinasedomäne als auch der Phosphatasedomäne die D333A bzw. H397A Aminosäureaustausche vorgenommen wurden und somit beide Domänen nicht mehr funktionell sind. Der Phänotyp dieses *asp1^{D333A, H397A}* Mutantenstammes wurde anhand des Wachstums auf TBZ-haltigem Medium analysiert (Abb. 36). Dabei wies der *asp1^{D333A, H397A}* Mutantenstamm denselben TBZ-sensitiven Phänotyp wie die *asp1^{D333A}* und *asp1Δ* Stämme auf (Abb. 36). Dies bestätigt, dass die Funktionen der Kinasedomäne und der Phosphatasedomäne für die vollständige Funktion des Asp1 Proteins ausreichend sind.

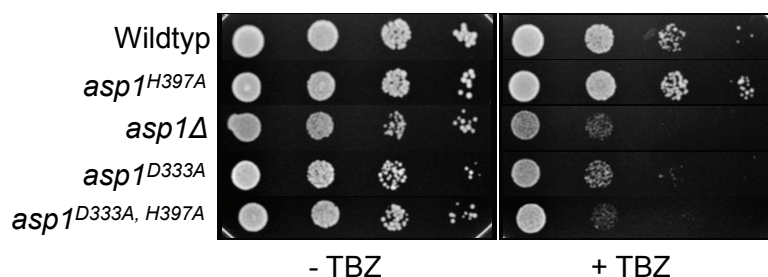


Abbildung 36: Ein *asp1^{D333A, H397A}* Mutantenstamm verhält sich wie die *asp1^{D333A}* und *asp1Δ* Mutantenstämme. Serieller Tropftest der genannten Stämme auf YE5S (ohne oder mit 9 µg/ml TBZ). Inkubation: 24°C (4 Tage).

3.6.2 Die Asp1 Phosphatasedomäne reguliert die Funktion der Asp1 Kinasedomäne

Die phänotypische Analyse der *asp1* Mutantenstämme zeigt, dass die Phänotypen dieser Stämme einem bestimmten Muster folgen. Der Funktionsverlust der Kinasedomäne wirkt sich phänotypisch wie der Verlust des vollständigen Asp1 Proteins aus, beides führt zu im Vergleich zum Wildtyp weniger stark ausgeprägten Phänotypen (Abb. 37). Liegt jedoch ausschließlich eine funktionelle Kinasedomäne und eine mutierte Phosphatasedomäne vor, wie es bei dem *asp1^{H397A}* Mutantenstamm der Fall ist, so führt dies zu im Vergleich zum Wildtyp stärker ausgeprägten Phänotypen (Abb. 37). Demnach muss die Asp1 Phosphatasedomäne einen negativen Einfluss auf die Funktion der Kinasedomäne haben, welcher durch die H397A Substitution bei der Asp1^{H397A} Variante entfällt. Um dies zu

überprüfen, wurde die Phosphatasedomäne überexprimiert und der Einfluss auf die Phänotypen des Wildtyps und der verschiedenen *asp1* Mutantenstämme analysiert.

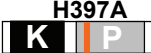




Stamm	TBZ-Resistenz	LatB-Sensitivität	Zymolyase-Sensitivität	adhäsives Wachstum	invasives Wachstum
 H397A <i>asp1^{H397A}</i>	++	++	++	++	++
 <i>asp1⁺</i>	+	+	+	+	+
 D333A <i>asp1^{D333A}</i>	-	-	-	-	-
 <i>asp1Δ</i>	-	-	-	-	-
 D333A H397A <i>asp1^{D333A, H397A}</i>	-	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.

Abbildung 37: Die Phänotypen der *asp1* Mutantenstämme folgen einem Muster (Darstellung an fünf Beispielen). +, wildtypisch; ++, stärker als Wildtyp; -, weniger als Wildtyp; n.b., nicht bestimmt. K, Kinasedomäne; P, Phosphatasedomäne. Orange Linien geben die Position der D333A bzw. H397A Substitutionen an. (B) Serielle Tropftests der genannten Stämme auf YE5S-Agar (ohne oder mit 9 µg/ml TBZ). Inkubation: 24°C (4 Tage).

Dazu wurde ein Expressionsvektor verwendet, der den *asp1^{D333A}* ORF unter Kontrolle des Thiamin-regulierbaren *nmt1* 3X Promotors enthielt (Mulugu et al, 2007). Unter reprimierten Bedingungen (+Thiamin) liegt eine niedrige Expression vor, unter dereprimierten Bedingungen (-Thiamin) eine hohe, genabhängig ca. 300fach stärkere Expression (Moreno et al, 2000). Die Proteinmenge des vektorkodierten Asp1^{D333A} war unter hohen Expressionsbedingungen ca. 20fach höher als die der endogen kodierten Asp1 Varianten (Daten nicht gezeigt). Die Auswirkung der Überexpression der Asp1^{D333A} Variante wurde zunächst anhand der TBZ-Phänotypen des Wildtyps und der *asp1* Mutantenstämme analysiert. Dabei zeigte sich, dass das Wachstum des Wildtypstammes und des *asp1^{H397A}* Stammes, welche beide eine funktionelle Asp1 Kinasedomäne besitzen, durch die Überexpression von Asp1^{D333A} auf TBZ-haltigem Medium deutlich reduziert wurde (Abb.

38A). Im Gegensatz dazu hatte die Überexpression von Asp1^{D333A} keinen Einfluss auf das Wachstum der *asp1*^{D333A} und *asp1*Δ Stämme auf TBZ-haltigem Medium (Abb. 38A). Die Überexpression der Asp1 Phosphatasedomäne wirkt sich also tatsächlich nur dann aus, wenn eine funktionelle Asp1 Kinasedomäne vorhanden ist. Zudem wurde das Wachstum des Wildtypstammes und des *asp1*^{H397A} Stammes, unabhängig ihrer unterschiedlichen TBZ-Phänotypen, auf dasselbe Niveau reduziert wie das der *asp1*^{D333A} und *asp1*Δ Stämme (Abb. 38A). Die Überexpression der Phosphatasedomäne bewirkt also einen Phänotyp, der den Funktionsverlust der Kinasedomäne widerspiegelt. Desweiteren wurde untersucht, welchen Einfluss die Überexpression der Asp1^{D333A} Variante auf die adhäsiven und invasiven Eigenschaften des *asp1*^{H397A} Stammes hat. Die Überexpression von Asp1^{D333A} führte zu einem vollständigen Verlust der Adhäsion und des invasiven Wachstums (Abb. 38B). Auch hier zeigte sich also, dass die Überexpression der Phosphatasedomäne den Phänotyp des Funktionsverlustes der Kinasedomäne erzeugt. Dies bedeutet, dass die Phosphatasedomäne die Funktion der Kinasedomäne negativ reguliert.

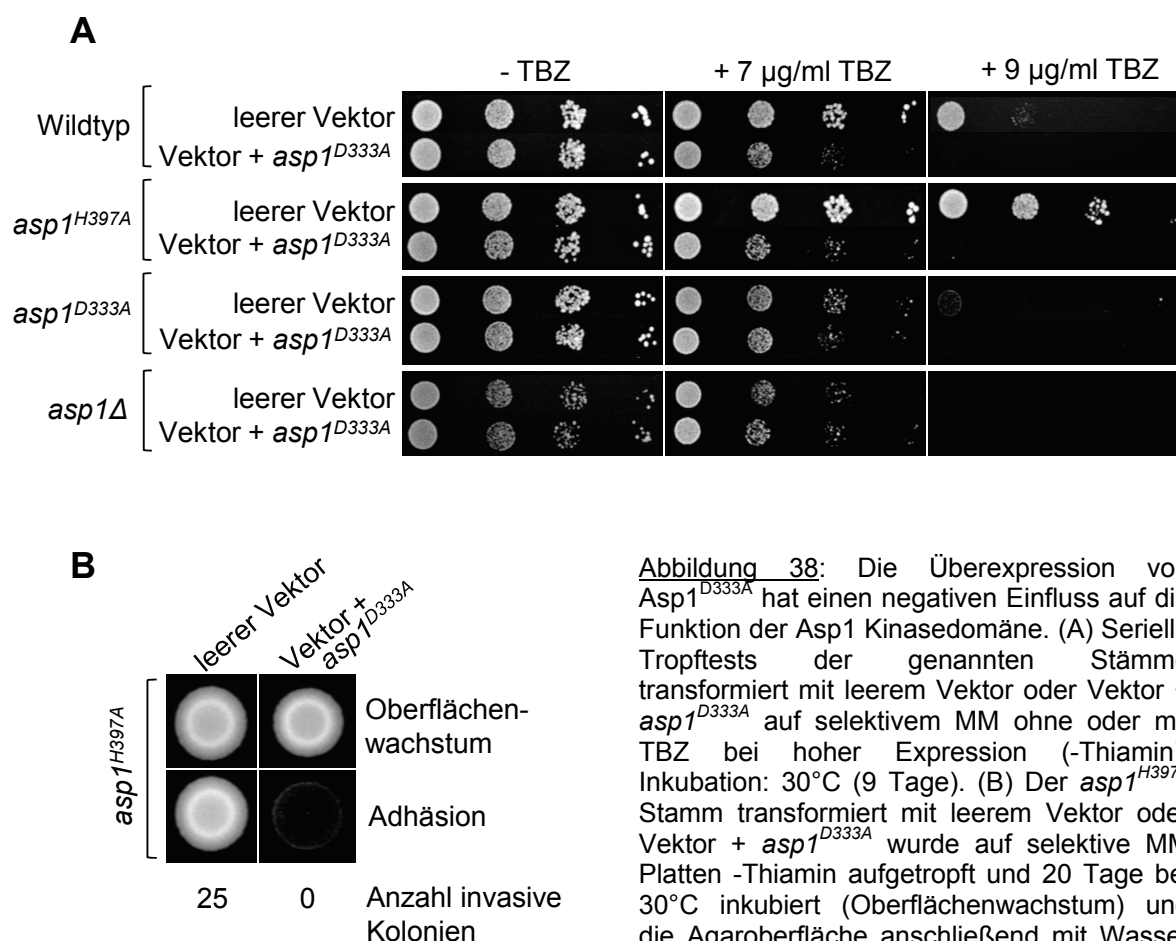


Abbildung 38: Die Überexpression von Asp1^{D333A} hat einen negativen Einfluss auf die Funktion der Asp1 Kinasedomäne. (A) Serielle Tropftests der genannten Stämme transformiert mit leerem Vektor oder Vektor + *asp1*^{D333A} auf selektivem MM ohne oder mit TBZ bei hoher Expression (-Thiamin). Inkubation: 30°C (9 Tage). (B) Der *asp1*^{H397A} Stamm transformiert mit leerem Vektor oder Vektor + *asp1*^{D333A} wurde auf selektive MM Platten -Thiamin aufgetropft und 20 Tage bei 30°C inkubiert (Oberflächenwachstum) und die Agaroberfläche anschließend mit Wasser abgespült (Adhäsion). Die Anzahl invasiv wachsender Kolonien ist angegeben.

3.6.3 Gibt es eine Asp1-Asp1-Interaktion?

Nachdem gezeigt wurde, dass die Asp1 Phosphatasedomäne die Funktion der Kinasedomäne reguliert, stellte sich die Frage, ob dies möglicherweise durch eine direkte räumliche Interaktion der beiden Domänen erreicht wird. Für *S. pombe* Asp1 wurde spekuliert, dass es als Dimer vorliegen könnte, und für das *S. cerevisiae* Ortholog Vip1 wurde publiziert, dass es an andere Vip1 Moleküle bindet (Feoktistova et al, 1999; Krogan et al, 2004). Deshalb sollten weitere Hinweise auf eine Asp1-Asp1-Interaktion mittels 2-Hybrid-Analyse und Ko-Immunopräzipitation erlangt werden. Die 2-Hybrid-Analyse in *S. cerevisiae* beruht auf der Aktivierung von Reporter genen bei positiver Interaktion zweier getesteter Proteine, was durch die Verwendung von entsprechendem Indikatormedium sichtbar wird. Eine Aktivierung der Reporter gene *HIS3*, *ADE2* oder *lacZ* durch Interaktion zwischen Asp1 und Asp1, d.h. Zellwachstum auf Histidin- oder Adenin-Mangelmedien oder eine Blaufärbung der Zellen durch β -Galaktosidase-Nachweis, konnte jedoch nicht festgestellt werden (Abb. 39A).

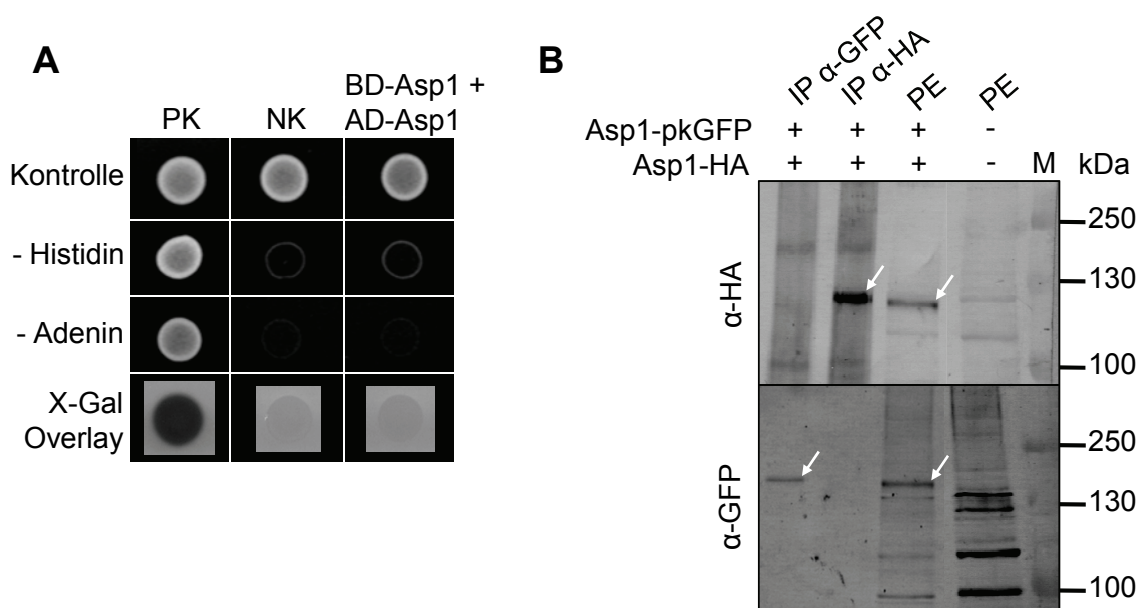


Abbildung 39: Eine Asp1-Asp1-Interaktion kann nicht nachgewiesen werden. (A) 2-Hybrid-Analyse. Asp1 wurde an die *S. cerevisiae* GAL4-Bindedomäne (BD) und die GAL4-Aktivierungsdomäne (AD) fusioniert. Die Expression der BD-Asp1 und AD-Asp1 Fusionsproteine wurde verifiziert (Daten nicht gezeigt). BD-Asp1 und AD-Asp1 exprimierende *S. cerevisiae* Zellen wurden auf Histidin- und Adenin-Mangelmedien aufgetropft, um die Aktivierung der *HIS3* und *ADE2* Reporter gene festzustellen. Die Expression von β -Galaktosidase wurde mittels „X-Gal-Overlay“ nachgewiesen. PK, Positivkontrolle; NK, Negativkontrolle. (B) Ko-Immunopräzipitation. Proteinextrakte eines diploiden, Asp1-pkGFP und Asp1-HA exprimierenden Stammes und eines haploiden Wildtypstammes wurden hergestellt. Die Asp1 Fusionsproteine aus den Proteinextrakten des diploiden Stammes wurden mittels Immunopräzipitation mit α -GFP bzw. α -HA Antikörpern isoliert. Die Isolate (IP) und Proteinextrakte (PE) wurden jeweils aufgeteilt, parallel auf zwei SDS-Gele (7%) aufgetragen und die Fusionsproteine im Western Blot mit α -GFP bzw. α -HA Antikörpern nachgewiesen. Pfeile markieren Asp1-HA (α -HA Blot) bzw. Asp1-pkGFP (α -GFP Blot). M, Größenstandard.

Für die Durchführung der Ko-Immunopräzipitation wurde ein diploider *S. pombe* Stamm hergestellt, welcher Asp1-pkGFP und Asp1-HA Fusionsproteine exprimiert. Diese wurden mittels α -GFP und α -HA Antikörpern aus Proteinextrakten isoliert und im Western Blot nachgewiesen. Asp1-pkGFP konnte nur im α -GFP Isolat nachgewiesen werden und nicht im α -HA Isolat; umgekehrt galt dies auch für Asp1-HA (Abb. 39B). Somit konnte kein Hinweis auf eine Asp1-Asp1-Interaktion erhalten werden.

3.6.4 Die Asp1 Domänen können ihre Funktionen als separate Moleküle ausführen

Für ein weiteres Verständnis der Funktionsweise der Asp1 Domänen wurde abschließend der Frage nachgegangen, ob die beiden Domänen ihre jeweiligen Funktionen als separate Moleküle erfüllen können. Um dies zu überprüfen, wurden weitere, N- oder C-terminal verkürzte Asp1 Varianten erzeugt und überexprimiert. Asp1¹⁻³⁶⁴ umfasst den N-terminalen, nur die Kinasedomäne enthaltenden Abschnitt des Proteins, während Asp1³⁶⁵⁻⁹²⁰ den C-terminalen, nur die Phosphatasedomäne enthaltenden Abschnitt umfasst (Abb. 40). Asp1, Asp1^{D333A} und Asp1^{H397A} exprimierende Vektoren lagen bereits vor (Abb. 40) (Feoktistova et al, 1999; Mulugu et al, 2007). Die Menge der überexprimierten, separaten Asp1 Kinase- und Phosphatasedomänen ist geringer als die der überexprimierten Asp1^{D333A} oder Asp1^{H397A} Varianten (persönliche Mitteilung M. Schulte). Die unterschiedlichen Vektoren wurden in die *asp1* Mutantenstämme transformiert und die Funktionalität von Asp1¹⁻³⁶⁴ und Asp1³⁶⁵⁻⁹²⁰ im Vergleich zu Asp1^{H397A} und Asp1^{D333A} überprüft.

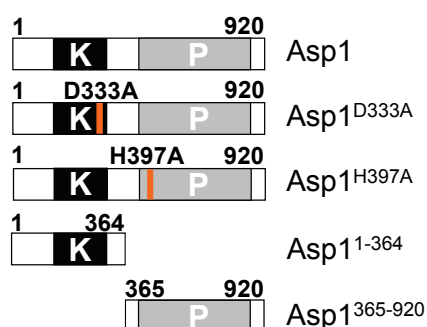


Abbildung 40: Schematische Darstellung der untersuchten, überexprimierten Asp1 Varianten. K, Kinasedomäne; P, Phosphatasedomäne. Orange Linien geben die Position der D333A bzw. H397A Substitutionen an.

Als erstes wurde untersucht, ob die separate Asp1 Kinasedomäne (Asp1¹⁻³⁶⁴) den Verlust von Asp1 im *asp1* Δ Stamm ausgleichen kann. Dies wurde im Vergleich zur Asp1^{H397A} Variante anhand der TBZ-Sensitivität des *asp1* Δ Stammes im seriellen Tropftest analysiert (Abb. 41A). Die Überexpression von Asp1^{H397A} war bei hohen Expressionsbedingungen letal (Abb. 41A) (Mulugu et al, 2007). Deshalb konnte die Überexpression dieser Variante nur bei niedrigen Expressionsbedingungen untersucht werden. Dabei supprimierte Asp1^{H397A} klar die

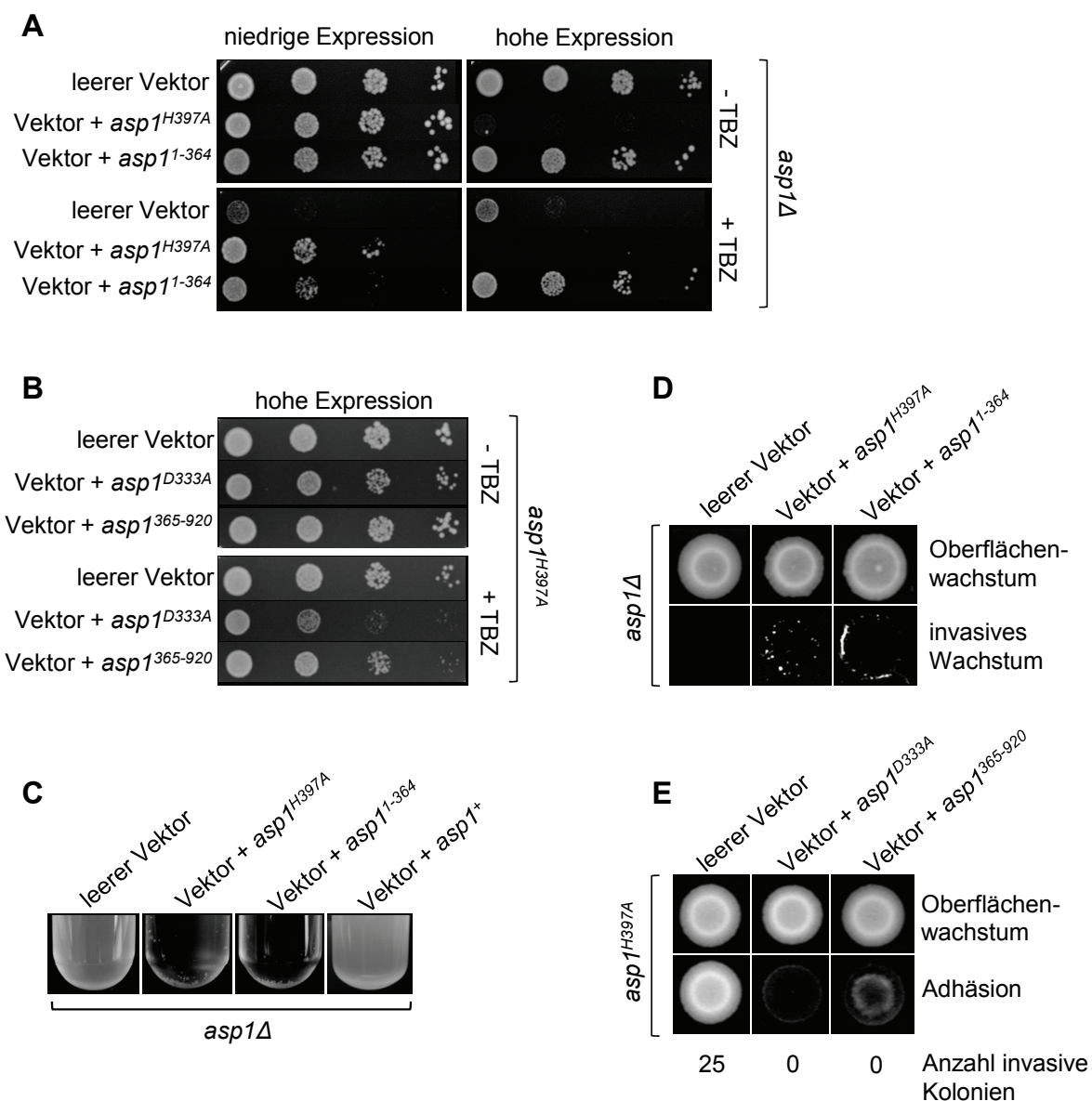


Abbildung 41: Die Asp1 Domänen können ihre jeweiligen Funktionen als separate Moleküle ausführen. (A) Serieller Tropftest des *asp1*Δ Stammes transformiert mit leerem Vektor oder Vektor + *asp1*^{H397A} oder *asp1*¹⁻³⁶⁴ auf selektivem MM (ohne oder mit 9 µg/ml TBZ) bei niedriger (+Thiamin) oder hoher (-Thiamin) Expression. Inkubation: 24°C (11 Tage). (B) Serieller Tropftest des *asp1*^{H397A} Stammes transformiert mit leerem Vektor oder Vektor + *asp1*^{D333A} oder *asp1*³⁶⁵⁻⁹²⁰ auf selektivem MM (-Thiamin, ohne oder mit 9 µg/ml TBZ). Inkubation: 24°C (9 Tage). (C) Der *asp1*Δ Stamm transformiert mit leerem Vektor oder Vektor + *asp1*^{H397A}, *asp1*¹⁻³⁶⁴ oder *asp1*⁺ wurde 18 h bei 30°C im Reagenzglas in selektivem MM (-Thiamin) angezogen und fotografiert. (D) Der *asp1*Δ Stamm transformiert mit leerem Vektor (-Thiamin) oder Vektor + *asp1*^{H397A} (+Thiamin) oder Vektor + *asp1*¹⁻³⁶⁴ (-Thiamin) wurde auf selektives MM aufgetropft und 20 Tage bei 30°C inkubiert (Oberflächenwachstum). Invasives Wachstum = nach Abreiben aller Zellen von der Agaroberfläche. (E) Der *asp1*^{H397A} Stamm transformiert mit leerem Vektor oder Vektor + *asp1*^{D333A} oder *asp1*³⁶⁵⁻⁹²⁰ wurde auf selektives MM (-Thiamin) aufgetropft und 20 Tage bei 30°C inkubiert (Oberflächenwachstum). Adhäsion = nach Abspülen der Agaroberfläche mit Wasser. Die Anzahl invasiv wachsender Kolonien ist angegeben.

TBZ-Sensitivität des *asp1Δ* Stammes (Abb. 41A). Die Überexpression von Asp1¹⁻³⁶⁴ suppressierte die TBZ-Sensitivität ebenfalls, jedoch bei niedrigen Expressionsbedingungen weniger als Asp1^{H397A} (Abb. 41A). Dies lag vermutlich an der geringeren Asp1¹⁻³⁶⁴ Proteinmenge. Bei hoher Expression suppressierte Asp1¹⁻³⁶⁴ die TBZ-Sensitivität des *asp1Δ* Stammes stark (Abb. 41A). Somit kann die Asp1 Kinasedomäne ihre Funktion als separates Molekül erfüllen. In einem weiteren seriellen Tropftest wurde die Funktionalität der separaten Asp1 Phosphatasedomäne verglichen mit der Asp1^{D333A} Variante anhand des TBZ-Phänotyps des *asp1^{H397A}* Mutantenstammes überprüft. Auf TBZ-haltigem Medium führte die hohe Überexpression der Asp1^{D333A} Variante zu einer deutlichen Reduktion des Wachstums des *asp1^{H397A}* Stammes (Abb. 41B). Dies konnte ebenfalls, wenn auch in etwas geringerem Maße, bei der Überexpression von Asp1³⁶⁵⁻⁹²⁰ beobachtet werden (Abb. 41B). Die Asp1 Phosphatasedomäne ist somit auch in der Lage, als separates Molekül ihre Funktion zu erfüllen.

Zuletzt wurde überprüft, ob die separaten Asp1 Domänen ihre Funktionen auch bei der Regulation des dimorphen Wechsels ausführen können. Dazu wurde zunächst überprüft, ob überexprimierte Asp1 Varianten mit funktioneller Kinasedomäne die Flokkulation und das invasive Wachstum im *asp1Δ* Stamm wiederherstellen können. Die Überexpression von Asp1^{H397A} und Asp1¹⁻³⁶⁴ führte zu Flokkulation, wildtypisches Asp1 war unter diesen Bedingungen nicht dazu in der Lage (Abb. 41C). Die Überexpression von Asp1^{H397A} und Asp1¹⁻³⁶⁴ führte auch zu invasivem Wachstum des *asp1Δ* Stammes (Abb. 41D). Desweiteren konnte die Überexpression von Asp1³⁶⁵⁻⁹²⁰, genauso wie Asp1^{D333A}, das adhäsive und invasive Wachstum des *asp1^{H397A}* Stammes massiv bzw. vollständig reduzieren (Abb. 41E). Somit können die Asp1 Domänen ihre Funktion auch bei der Regulation des dimorphen Wechsels als separate Moleküle ausführen.

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die 1/3 Kinase Asp1 als ein wichtiger Faktor für das polare Wachstum und den dimorphen Wechsel von *S. pombe* identifiziert und diese Rolle näher untersucht. Beim polaren Wachstum der *S. pombe* Hefeform wurden Asp1 wichtige Funktionen bei der Bestimmung einer neuen Wachstumszone während des Zellzyklus und bei der Organisation des zellinternen Polaritätssystems zugeordnet. Darüberhinaus wird es für die Umsetzung von extrinsischen Signalen in ein verändertes polares Wachstumsmuster und das invasive Wachstum benötigt, dem dimorphen Wechsel. Hierbei handelt es sich um eine konservierte Funktion der 1/3 Kinasen. Desweiteren lassen die gewonnenen Daten darauf schließen, dass der C-terminalen Asp1 Domäne eine regulatorische Funktion zukommt.

4.1 Asp1 wird für die Definition des Zellendes und das bipolare Wachstum benötigt

Das *S. pombe* Asp1 Protein wurde als Mitglied der 1/3 Kinasefamilie identifiziert, jedoch nicht hinsichtlich der enzymatischen Aktivität bei der Generierung spezifischer Inositolpyrophosphate untersucht (Mulugu et al, 2007). In dieser Arbeit war es aufgrund technischer Schwierigkeiten nicht möglich, die enzymatische Kinaseaktivität von Asp1 zu demonstrieren (Daten nicht gezeigt). Die wildtypische Kinasedomäne wird jedoch für die Funktion von Asp1 benötigt und die heterologe Expression der Asp1 Kinasedomäne in *S. cerevisiae* kann den Verlust des *S. cerevisiae* Vip1 Proteins ausgleichen, für das die Kinaseaktivität *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen wurde (Lin et al, 2009; Mulugu et al, 2007). Dies deutet stark darauf hin, dass Asp1 ebenfalls eine funktionelle 1/3 Kinase ist. Deshalb wird im Folgenden von Asp1 spezifischen Inositolpyrophosphaten gesprochen.

Zellen, in denen Asp1 fehlt oder die Asp1^{D333A} Variante exprimiert wird, zeigen variable morphologische Phänotypen. Obwohl der überwiegende Anteil der Zellen die normale zylindrische Zellform von *S. pombe* aufweist, treten häufig auch morphologisch anomale Zellen mit ovaler, geschwollener oder elongierter Form auf, die insgesamt stark vergrößert sind (Daten nicht gezeigt) (Feoktistova et al, 1999). Interessanterweise zeigen Zellen, in denen die *S. pombe* Nudix-Hydrolase Aps1 überexprimiert wird, sehr ähnliche Phänotypen (Ingram et al, 2003). Auch in *S. cerevisiae* sind Zellen, in denen das Gen kodierend für die IP6K Kcs1 deletiert wurde, doppelt so groß wie wildtypische Zellen (Dubois et al, 2002). Inositolpyrophosphate spielen demnach eine Rolle beim korrekten polarisierten Wachstum. *S. pombe asp1* Mutantenstämme sind zu polarem Wachstum in der Lage. Die Expression

der Asp1^{D333A} Variante führt jedoch dazu, dass spezifisch der Wechsel von monopolarer zu bipolarer Wachstum (NETO) nicht mehr stattfindet. Damit NETO stattfinden kann, muss zum einen ein initiiertes Signal erfolgen, zum anderen muss das zellinterne Polaritätssystem entsprechend umorganisiert werden, um das neue Zellende als Wachstumszone zu definieren und zu aktivieren (Chang & Martin, 2009; Martin & Chang, 2005). Die hier erhaltenen Daten geben Hinweis darauf, dass Asp1 spezifische Inositolpyrophosphate sowohl für die korrekte Definition der Zellenden als auch für die Weiterleitung des initiierten Signals für NETO an das zellinterne Polaritätssystem benötigt werden.

Der Verlust des Asp1 Proteins führt dazu, dass die Interphasen-Mikrotubuli desorganisiert in der Zelle vorliegen und häufig aberrant am seitlichen Zellkortex depolymerisieren. Da die Polymerisierungsdauer der Mikrotubuli unverändert ist, scheinen die Mikrotubuli den seitlichen Zellkortex nicht mehr vom Zellende „unterscheiden“ zu können. Asp1 spezifische Inositolpyrophosphate könnten deshalb benötigt werden, um korrekt zwischen den Zellenden und den Zellseiten zu „unterscheiden“ (Abb. 42). Tatsächlich sind die Zellenden des Asp1^{D333A} exprimierenden Stammes auch nicht mehr richtig markiert, da der Zellendmarker Tea1 in diesem Stamm teilweise entlang des seitlichen Zellkortex fehllokalisiert ist und offenbar nicht mehr normal am Zellende akkumuliert. In wildtypischen Zellen erfolgt der Transport des Tea1 Proteins hauptsächlich durch die Mikrotubuli zu den Zellenden, wo Tea1 durch seinen Rezeptor Mod5 verankert wird und die Mikrotubuli depolymerisieren (Behrens & Nurse, 2002; Mata & Nurse, 1997; Snaith & Sawin, 2003). In Abwesenheit von Mod5 akkumuliert Tea1 ebenfalls nicht mehr wie gewohnt an den Zellenden (Snaith & Sawin, 2003). Mod5 selbst ist vermutlich über einen Prenylrest in der Membran des Zellkortex verankert, weshalb die Membranumgebung wichtig für seine Lokalisierung sein könnte (Snaith & Sawin, 2003). Die Zellmembran von *S. pombe* ist, wie in den meisten anderen

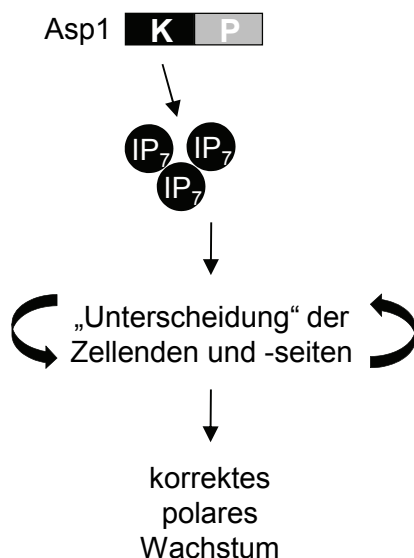


Abbildung 42: Modell für die Funktion Asp1 spezifischer Inositolpyrophosphate beim polaren Wachstum. (A) IP₇ (oder IP₈) ist daran beteiligt, der Zelle die benötigten Informationen für die „Unterscheidung“ der Zellenden von den Zellseiten zu geben. Dadurch nimmt es Einfluss auf den Ort der Mikrotubuli-Depolymerisierung und die Lokalisierung des Tea1 Proteins (s. Text). Darüberhinaus kann es eine weitere Funktion bei der Regulation der Aktinfleckenfunktion an den Zellenden haben (s. Text). Bei der „Unterscheidung“ der Zellenden von den Zellseiten bestehen viele positive Rückkopplungsmechanismen, so dass polares Wachstum auch in Abwesenheit von IP₇ weitgehend möglich ist.

eukaryotischen Zellen auch, in sog. „lipid raft“ Domänen organisiert (Fischer et al, 2008; Wachtler et al, 2003). Sterolreiche Domänen kolokalisieren in vielen Pilzen mit den Wachstumszonen, und finden sich in *S. pombe* an den Zellenden oder während der Zytokinese in der Zellmitte (Fischer et al, 2008; Wachtler et al, 2003). In *A. nidulans* führt die Disruption dieser Domänen zur Fehllokalisierung des Mod5-ähnlichen Proteins TeaR und des Tea1-Orthologs TeaA (Takeshita et al, 2008). Möglicherweise tragen Asp1 spezifische Inositolpyrophosphate zur korrekten Organisation der sterolreichen Domänen und der Lokalisierung des Mod5 Proteins und somit zur korrekten Definition der Zellenden bei. In ihrer Abwesenheit könnte Mod5 fehllokalisiert sein, was sowohl die Akkumulierung von Tea1 am Zellende einschränken würde als auch das „Abladen“ von Tea1 am seitlichen Zellkortex und die dortige Mikrotubuli-Depolymerisierung bewirken würde. Die korrekte Organisation der sterolreichen Domänen hängt von einem funktionellen Aktin-Zytoskelett ab und Aktinfleckendefekte führen zu einer Verteilung der sterolreichen Domänen entlang des seitlichen Zellkortex (Codlin et al, 2008; Takeda & Chang, 2005; Wachtler et al, 2003). Wie später diskutiert wird, wird Asp1 auch für die Funktion der Aktinflecken benötigt. Insgesamt könnten Asp1 spezifische Inositolpyrophosphate also für die Definition spezifischer Kortexregionen und damit für die korrekte „Unterscheidung“ der Zellenden und -seiten benötigt werden (Abb. 42). In ihrer Abwesenheit könnte diese „Unterscheidung“ beeinträchtigt sein, was zu aberranten Zellformen führen kann. Da innerhalb des zellinternen Polaritätssystems vielfältige positive Rückkopplungsmechanismen bestehen, ist polares Wachstum dennoch weitgehend möglich (Abb. 42) (Chang & Martin, 2009).

Die Expression der Asp1^{H397A} Variante führt dazu, dass die Mikrotubuli-Depolymerisierung nach Erreichen des Zellendes verspätet einsetzt. Dieser Phänotyp wurde in verschiedenen Mutantenstämmen beobachtet, bei denen die Funktion von +TIPs oder von für die Mikrotubuli-Depolymerisierung benötigten Faktoren am Zellkortex beeinträchtigt ist (Grallert et al, 2006; Martin-Garcia & Mulvihill, 2009; Niccoli et al, 2003). Auch der Verlust von Tea1 führt zu einer verspäteten Depolymerisierung der Mikrotubuli am Zellende (Mata & Nurse, 1997). Tea1 ist im Asp1^{H397A} exprimierenden Stamm jedoch noch korrekt an den Zellenden lokalisiert. Wie später ausführlicher diskutiert wird, führt die Expression der Asp1^{H397A} Variante vermutlich zu einer gesteigerten Produktion Asp1 spezifischer Inositolpyrophosphate, was zum Wechsel zur pseudohyphalen Wachstumsform führt (Kap. 4.4 und 4.5). Bei der Regulation des polaren Wachstums der pseudohyphalen Form lassen sich viele Parallelen zur Regulation des polaren Wachstums bei der Zellpaarung finden, indem bei beiden Wachstumsformen vermutlich das Tea1-Tea4-System „abgeschaltet“, d.h. scheinbar nicht mehr verwendet wird. Beim „shmoo“ Wachstum in Vorbereitung auf die Zellpaarung wird Tea1 nicht mehr durch die Mikrotubuli transportiert und akkumuliert nicht mehr am wachsenden Zellende (Niccoli & Nurse, 2002). Möglicherweise werden Asp1

spezifische Inositolpyrophosphate benötigt, um das Tea1-Tea4-System zu regulieren. Mit der Expression der Asp1^{H397A} Variante wurde eine artifizielle Situation geschaffen, in der unter Bedingungen, in denen das reguläre, polare Wachstum stattfindet, eine partielle Deregulierung des Tea1-Tea4-Systems durch Überproduktion Asp1 spezifischer Inositolpyrophosphate vorliegen könnte. Tea1 reguliert die Mikrotubuli-Depolymerisierung seitens der Mikrotubuli-Plus-Enden (Behrens & Nurse, 2002). Eine Tea1 Variante, die noch mit den Mikrotubuli assoziieren kann, jedoch nicht mehr am Zellende akkumuliert, löst keine verspätete Mikrotubuli-Depolymerisierung aus (Behrens & Nurse, 2002). Möglicherweise ist also die Assoziation von Tea1 mit den Mikrotubuli im Asp1^{H397A} exprimierenden Stamm beeinträchtigt. Tea1 hat neben dem Mikrotubuli-basierten Transport die Möglichkeit, die Zellenden unabhängig der Mikrotubuli zu erreichen, sofern sein Membranrezeptor Mod5 vorhanden ist (Snaith & Sawin, 2003). Dieser Nebenweg könnte im Asp1^{H397A} exprimierenden Stamm nach wie vor intakt sein, so dass Tea1 korrekt am Zellende akkumuliert. Eine partielle Deregulierung des Tea1-Tea4-Systems wäre auch eine Erklärung für den leichten NETO-Defekt, der im Asp1^{H397A} exprimierenden Stamm beobachtet wurde.

Der Verlust von NETO tritt jedoch hauptsächlich im Asp1^{D333A} exprimierenden Stamm auf. Dies impliziert, dass Asp1 spezifische Inositolpyrophosphate in *S. pombe* für NETO benötigt werden. Der Hauptregulator von NETO ist das Tea1-Tea4-System (Chang & Martin, 2009), und im Asp1^{D333A} exprimierenden Stamm scheint Tea1 nicht mehr effizient an den Zellenden akkumulieren zu können. Dennoch scheint das Tea1-Tea4-System in diesem Stamm nicht völlig dereguliert zu sein, da nach der Zellteilung beide Tochterzellen die alten Zellenden korrekt als Wachstumszonen auswählen. Bei einem *tea1Δ* Deletionsstamm wählt nach der Zellteilung eine Tochterzelle das alte, die andere Tochterzelle das neue Zellende als Wachstumszone aus (Glynn et al, 2001). Dies deutet auch an, dass die geringen Tea1 Mengen an den Zellenden des Asp1^{D333A} exprimierenden Stammes für die Funktion des Tea1-Tea4-Komplexes ausreichend sind. Möglicherweise wird der Tea1-Tea4-Komplex am neuen Zellende jedoch nicht aktiviert. Eine Voraussetzung für NETO ist neben dem Erreichen eines bestimmten Zellzyklusstadiums auch eine Mindestzellgröße (Mitchison & Nurse, 1985). So ist vorstellbar, dass diese Größenkontrolle über die Menge der Inositolpyrophosphate erfolgt, die während des Zellwachstums angehäuft werden könnten, so dass NETO bei Erreichen eines Schwellenwertes ausgelöst wird (Abb. 43A, s.u.). Dies könnte weitere Ereignisse wie z.B. die Aktivierung des Tea1-Tea4-Komplexes einleiten. Eine kritische Menge der Inositolpyrophosphate wäre somit ein auslösender Faktor für NETO. Darüberhinaus kann es noch weitere Signale geben, die z.B. bei Erreichen des erforderlichen Zellzyklusstadiums generiert werden.

Um Wachstumszonen zu aktivieren oder zu deaktivieren und somit auch bei NETO muss das Aktin-Zytoskelett neu lokalisiert werden. Dazu muss eine transiente Aktin-Destabilisierung erfolgen, um freie Aktinmonomere für den Aufbau neuer Aktinstrukturen zur Verfügung zu stellen (Moseley & Goode, 2006; Rupes et al, 1999). So kann NETO z.B. durch einen kurzen Latrunculin A-Puls, der zu einer transienten Aktin-Depolymerisierung führt, in Anwesenheit von Tea1 frühzeitig ausgelöst werden (Rupes et al, 1999). Noch ist nicht klar, auf welchem Weg die Aktin-Destabilisierung bei NETO erfolgt. Eine mögliche Funktion dabei hat die Tyrosinkinase Ssp1, die mit dem Stressantwortsignalweg in Verbindung steht (Rupes et al, 1999). Ssp1 stimuliert die Aktin-Depolymerisierung, und ein *ssp1Δ* Deletionsstamm hat NETO-Defekte (Rupes et al, 1999). Asp1 wird für die Integrität des Aktin-Zytoskeletts benötigt. Der *asp1^{D333A}* Mutantenstamm zeigt eine verminderte Sensitivität gegenüber Aktin-destabilisierenden Konditionen und in den abnorm geformten Zellen der *asp1^{D333A}* und *asp1Δ* Stämme konnten häufig sehr große „Aktinaggregate“ beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Beides lässt vermuten, dass Asp1 an dem Vorgang der Aktin-Destabilisierung beteiligt sein könnte. Tatsächlich zeigten Zellen des *Asp1^{D333A}* exprimierenden Stammes sehr häufig eine Ungleichverteilung der Aktinflecken auf die Zellenden. Dies erweckt den Eindruck, dass die Umverteilung des Aktins, wie sie für NETO benötigt wird, nur unvollständig erreicht wird.

Darüberhinaus geben die vorliegenden Daten Hinweis darauf, dass Asp1 auch für die Funktion der Aktinflecken *per se* benötigt wird. Die Funktion der Aktinflecken während des Zellendwachstums ist die Endozytose und es wurde gezeigt, dass die Abwesenheit von Asp1 zu Endozytosedefekten führt (Feoktistova et al, 1999; Gachet & Hyams, 2005). Interessanterweise zeigen auch Zellen eines *S. cerevisiae kcs1Δ* Deletionsstammes einen fragmentierten Vakuolenphänotyp (Dubois et al, 2002). Inositolpyrophosphate könnten daher generell einen Einfluss auf endozytotische Prozesse haben. Ebenso ist denkbar, dass IP₈ Moleküle, die in beiden Stämmen nicht mehr generiert werden können, bei endozytotischen Prozessen eine Rolle spielen. Eine essentielle Komponente für den Aufbau der Aktinflecken ist der Arp2/3 Komplex (Pollard, 2007). In dieser und in früheren Arbeiten konnte eine starke genetische Interaktion zwischen *asp1⁺* und *arp3⁺* demonstriert werden (Feoktistova et al, 1999; Mulugu et al, 2007). Zellen eines *arp3-c1* Mutantenstammes arretieren bei der restriktiven Temperatur als binukleäre Zellen mit einem ausgebildeten Septum, jedoch fehllokalisierten Aktinflecken (McCollum et al, 1996). Dieser Phänotyp wurde durch einen Defekt bei der Neulokalisierung der Aktinflecken von den Zellenden zur Zellmitte erklärt, wodurch die Zellseparierung ausbleibt (McCollum et al, 1996). Auch die Funktion der Aktinflecken ist in diesem Stamm beeinträchtigt, so dass das Zellendwachstum unter restriktiven Bedingungen nicht mehr stattfinden kann (McCollum et al, 1996). Die Expression der *Asp1^{H397A}* Variante könnte diese Defekte supprimieren, indem sie zum einen die Aktin-

Destabilisierung und Neulokalisierung der Aktinflecken erleichtert, zum anderen auch die Aktinflecken wieder funktionell sind. Auch in *S. cerevisiae* wurde eine genetische Interaktion zwischen *VIP1* und *LAS17*, kodierend für das WASP-Homolog Las17, gefunden (Feoktistova et al, 1999). WASP-Proteine sind Komponenten der Aktinflecken und aktivieren den Arp2/3 Komplex (Li, 1997; Winter et al, 1999). Eine starke genetische Interaktion besteht auch zwischen *asp1⁺* und *cdc3⁺*, kodierend für das Aktin-assoziierte Profilin Cdc3, das eine essentielle Funktion bei der Ausbildung des kontraktiven Aktinrings hat (Balasubramanian et al, 1994; Feoktistova et al, 1999 und diese Arbeit). Die Expression der Asp1^{D333A} Variante supprimiert die Zytokinesedefekte des *cdc3-124* Mutantenstammes, und interessanterweise wurde eine vergleichbare Suppression auch bei Doppelmutantenstämmen zwischen *cdc3-124* und *arp3-c1* bzw. *sop2-1* beobachtet (Balasubramanian et al, 1996; McCollum et al, 1996). Das *sop2⁺* Gen kodiert für eine weitere funktionelle Komponente der Aktinflecken (Balasubramanian et al, 1996). Während der Interphase kolokalisiert Cdc3 mit den Aktinflecken (Balasubramanian et al, 1994). Als eine mögliche Erklärung für die Suppression der Zytokinesedefekte des *cdc3-124* Mutantenstammes wurde vorgeschlagen, dass Cdc3 an den Aktinflecken mit anderen Proteinen interagieren könnte als bei der Formation des kontraktiven Aktinrings, und dass bei einem Aktinfleckendefekt die ersten Interaktionen geschwächt und mehr Cdc3 für die Formation des Aktinrings zur Verfügung stehen könnte (Balasubramanian et al, 1996; McCollum et al, 1996).

Während die funktionelle Verbindung zwischen dem Tea1-Tea4-Komplex und den Aktinkabeln über das Formin For3 gut charakterisiert ist, sind bisher kaum solche Verbindungen zwischen Polaritätsfaktoren am Zellende und den Aktinflecken bekannt. Zwei mögliche Verbindungen sind das Protein Sla2 und die Rho GTPase Cdc42. Bei Sla2 Proteinen handelt es sich um konservierte Multidomänenproteine und Komponenten der Aktinflecken, die verschiedene Proteine und auch Aktinfilamente binden, und sowohl für die Organisation des kortikalen Aktin-Zytoskeletts als auch die Endozytose benötigt werden (Castagnetti et al, 2005; Moseley & Goode, 2006). In *S. pombe* wird Sla2 wahrscheinlich durch den Tea1-Tea4-Komplex an das Zellende rekrutiert und eine spezifische Sla2 Variante verursacht NETO-Defekte mit monopolar lokalisierten Aktinflecken, ohne jedoch die Funktion des Aktin-Zytoskeletts selbst zu beeinträchtigen (Castagnetti et al, 2005). In Säugerzellen aktivieren Cdc42 Rho GTPasen den Arp2/3 Komplex über die Interaktion mit WASP (Chang & Martin, 2009). Bei *S. pombe* Cdc42, das indirekt über den Tea1-Tea4-Komplex aktiviert wird, fehlt jedoch die WASP-Interaktionsdomäne (Chang & Martin, 2009). Insgesamt ist es möglich, dass der Einfluss von Asp1 auf die Funktion der Aktinflecken in Verbindung mit der möglichen Funktion bei der Definition der Zellenden und der Regulation des Tea1-Tea4-Systems steht. Es kann sich dabei aber auch um eine zusätzliche Funktion von Asp1, z.B. als Regulator des Arp2/3 Komplexes, handeln.

Aus den vorliegenden Daten kann ein mögliches Modell für die Rolle der Asp1 spezifischen Inositolpyrophosphate bei NETO vorgeschlagen werden. Wie bereits beschrieben, kann die Menge dieser Moleküle ein kritischer Faktor für NETO sein, d.h. die Inositolpyrophosphate können selbst ein auslösendes Signal für NETO sein (Abb. 43A). Desweiteren aktivieren die Inositolpyrophosphate in diesem Modell den Tea1-Tea4-Komplex am Zellende und verursachen die benötigte Destabilisierung des Aktin-Zytoskeletts, wobei daran auch der Tea1-Tea4-Komplex beteiligt sein kann (Abb. 43B). In Abwesenheit Asp1 spezifischer Inositolpyrophosphate ist NETO nicht möglich. Zusätzliche NETO-Signale, z.B. seitens der Zellzyklusstadiumkontrolle, sind ebenfalls wahrscheinlich.

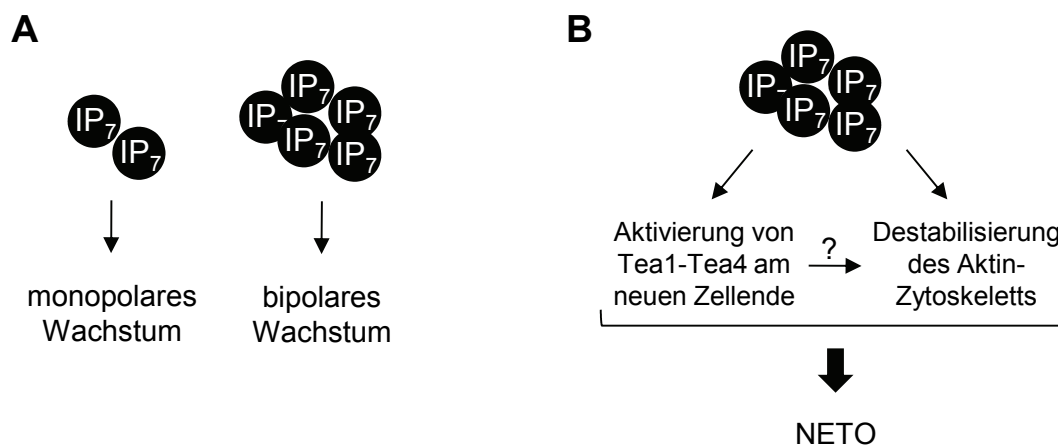


Abbildung 43: Modell für die Funktion Asp1 spezifischer Inositolpyrophosphate bei NETO. (A) Die IP₇ (oder IP₈) Menge ist möglicherweise ein kritischer Faktor für NETO. IP₇ könnte während des Zellwachstums angehäuft werden, so dass bei Erreichen eines bestimmten Schwellenwertes NETO ausgelöst wird. (B) IP₇ (oder IP₈) aktiviert möglicherweise den Tea1-Tea4-Komplex am neuen Zellende und verursacht die Destabilisierung des Aktin-Zytoskeletts. Letzteres wird womöglich auch über den Tea1-Tea4-Komplex reguliert. In Abwesenheit von IP₇ ist NETO nicht mehr möglich. Zusätzliche NETO-Signale sind ebenfalls wahrscheinlich.

Wenn Asp1 spezifische Inositolpyrophosphate Einfluss auf Faktoren an den Zellenden haben, so wäre auch eine dortige Lokalisierung dieser Moleküle sinnvoll. Das Asp1 Protein lokalisiert unter physiologischen Bedingungen im gesamten Zytoplasma (Feoktistova et al, 1999 und diese Arbeit). Diese Lokalisierung wird generell für am Inositolpyrophosphat-Metabolismus beteiligte Proteine beschrieben (Shears, 2009). Es wird jedoch diskutiert, dass spezifische Inositolphosphate und -pyrophosphate innerhalb der Zelle kompartimentalisiert sein könnten, um bestimmte Funktionen durch eine lokale Erhöhung ihrer Konzentration zu vereinfachen (Shears, 2009). Bisher ist es jedoch nicht möglich, diese Moleküle innerhalb der Zelle zu lokalisieren (Shears, 2009). Wie hier gezeigt wurde, kann ein GFP-Asp1^{H397A} Fusionsprotein unter Überexpressionsbedingungen an den Zellenden lokalisieren. Dabei könnte es sich um eine Stabilisierung einer ansonsten nur transienten Lokalisierung des

Asp1 Proteins handeln. Die Aktivität von Asp1 könnte also räumlich reguliert sein, so dass die generierten Inositolpyrophosphate ihre Funktionen direkt am Zellende ausführen könnten.

4.2 Asp1 reguliert den dimorphen Wechsel von *S. pombe*

Durch die Generierung des *asp1*^{H397A} Mutantenstammes wurde in dieser Arbeit das Asp1 Protein als ein zentraler Regulator des dimorphen Wechsels von *S. pombe* identifiziert. Die endogene Expression der Asp1^{H397A} Variante führt zu einem hohen Maß adhäsiven und invasiven Wachstums. Im Gegensatz dazu zeigten *asp1*^{D333A} oder *asp1Δ* Stämme unter den hier vorliegenden Bedingungen keinen dimorphen Wechsel bzw. invasives Wachstum. Diese Stämme zeigten lediglich unter extremen Bedingungen wie hohen Eisenkonzentrationen reduziertes invasives Wachstum, weshalb es sich dabei offenbar um einen separaten Regulationsweg handelt. Die Funktion der 1/3 Kinasen beim dimorphen Wechsel ist konserviert. Die Abwesenheit des *S. cerevisiae* Vip1 Proteins führt ebenfalls zu einem Verlust des haploid invasiven und diploid pseudohyphalen Wachstums, wobei bereits ein heterozygoter *vip1Δ/VIP1* Deletionsstamm einen haploinsuffizienten Phänotyp zeigt. Da Mitglieder der 1/3 Kinasefamilie auch in pathogenen dimorphen Pilzen konserviert sind, könnten 1/3 Kinasen ein wichtiger Virulenzfaktor dieser Organismen sein.

Das verstärkte adhäsive und invasive Wachstum des Asp1^{H397A} exprimierenden Stammes kann wahrscheinlich auf eine erhöhte Menge Asp1 spezifischer Inositolpyrophosphate zurückgeführt werden, da auch die Erhöhung der intrazellulären Inositolpyrophosphat-Menge durch Ausschalten oder Inhibierung der Nudix-Hydrolase Aps1 zu diesen Phänotypen führt. Leider war es nicht möglich zu unterscheiden, ob 1/3 Kinase-spezifische IP₇ oder IP₈ Moleküle an der Regulation des dimorphen Wechsels beteiligt sind, da das Fehlen der putativen IP6K Kcs1 in *S. pombe* letal ist (Kim et al, 2010) und in *S. cerevisiae* zu massiven Wachstumsdefekten führt. Verschiedene Gründe könnten eine Beteiligung von 1/3-IP₇ andeuten. In *S. cerevisiae* führt die angenommene, 50%ige Reduktion der Vip1 Menge im heterozygoten *vip1Δ/VIP1* Stamm zu einem Verlust des pseudohyphalen Wachstums. Im Gegensatz dazu führt die angenommene, 50%ige Reduktion der Kcs1 Menge im heterozygoten *kcs1Δ/KCS1* Stamm zu keiner sichtbaren Verminderung dieser Wachstumsform. Jedoch produziert Kcs1 ca. 80% der IP₇ Gesamtmenge (Saiardi et al, 2000). In *S. cerevisiae* wurde außerdem gezeigt, dass die Kcs1 Proteinmenge unter bestimmten Bedingungen durch die Aktivität von Vip1 reduziert werden kann. Unter Phosphatmangelbedingungen führt die durch Vip1 generiertes 1/3-IP₇ vermittelte Inhibierung der CDK Pho85 zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors Pho4 (Lee et al, 2008; Lee et al,

2007). Pho4 aktiviert dann u.a. die Transkription von „antisense“ und intragenen RNAs im *KCS1* Locus (Nishizawa et al, 2008). Durch Hybridisierung der „antisense“ RNA mit der *KCS1* mRNA und Translation der intragenen RNA kommt es zur Bildung einer verkürzten Kcs1 Variante (Nishizawa et al, 2008). Dies könnte zum einen Vip1 dazu befähigen, mehr von dem gemeinsamen Substrat IP_6 zu nutzen, zum anderen könnte die weitere Phosphorylierung des Vip1 generierten $1/3-IP_7$ zu IP_8 verhindert werden, was insgesamt zu einer Akkumulierung von $1/3-IP_7$ führen würde (Nishizawa et al, 2008). Hierbei könnte es sich um einen generellen Regulationsmechanismus handeln der auch bei einem dimorphen Wechsels angewendet wird, dennoch handelt es sich hier um nicht vergleichbare zelluläre Antworten auf verschiedene Umweltbedingungen. Desweiteren konnte hier für *S. pombe* demonstriert werden, dass die Abwesenheit der Nudix-Hydrolase Aps1 zu einer deutlichen Erhöhung des adhäsiven und invasiven Wachstums führt. Im *aps1Δ* Deletionsstamm ist die intrazelluläre IP_7 Gesamtmenge um das dreifache, die IP_8 Menge nicht signifikant erhöht, dennoch wurde auch hier nicht zwischen $1/3-IP_7$ und $5-IP_7$ unterschieden (Ingram et al, 2003).

Hinsichtlich der zentralen Rolle von Asp1 beim dimorphen Wechsel war es wichtig zu erfahren, welche Faktoren Asp1 vor- bzw. nachgeschaltet sind. An dem Asp1 vermittelten dimorphen Wechsel ist der cAMP/PKA Signalweg beteiligt. Durch die Zugabe von cAMP zum Nährmedium konnte gezeigt werden, dass das cAMP Signal dem Asp1 Protein vorgeschaltet ist. Ein Anstieg der basalen cAMP Menge erhöht die Aktivität der PKA (Hoffman, 2005). Das *S. cerevisiae* Vip1 Protein wurde als phosphoryliertes Protein gefunden und enthält die PKA-Konsensussequenz **RRXS** (Bodenmiller et al, 2008; Kennelly & Krebs, 1991). *In vitro* Analysen, bei denen aufgereinigte Kinasen in Anwesenheit von ATP mit einem „Proteomarray“ inkubiert wurden, ergaben, dass Vip1 durch zwei der drei katalytischen Untereinheiten der *S. cerevisiae* PKA phosphoryliert wird (Ptacek et al, 2005). Auch das *S. pombe* Asp1 Protein wurde in einer großangelegten Phosphorylierungsanalyse als phosphoryliertes Protein gefunden und zwei der vier identifizierten Phosphorylierungsstellen liegen in einer **RXXS** PKA-Konsensussequenz (Wilson-Grady et al, 2008). Somit ist es möglich, dass $1/3$ Kinasen ein direktes Ziel des cAMP/PKA Signalweges sind, um über eine Erhöhung der Inositolpyrophosphat-Konzentration einen dimorphen Wechsel zu bewirken. Auch in *Dictyostelium discoideum* bewirkt die Anwesenheit von cAMP einen Anstieg der intrazellulären Inositolpyrophosphat-Konzentration und einen Entwicklungsprozess, bei dem sich einzelne Zellen zuerst zu einem großen Zellaggregat verbinden und anschließend einen Sporen enthaltenden Fruchtkörper ausbilden (King & Insall, 2009; Laussmann et al, 2000; Luo et al, 2003). Dennoch kann dieser Vorgang nur bedingt mit dem dimorphen Wechsel der Hefen verglichen werden, da *D. discoideum* Zellen eine vielfach höhere

Inositolpyrophosphat-Konzentration enthalten und zum Teil andere Isomere generieren (Albert et al, 1997; Laussmann et al, 2000).

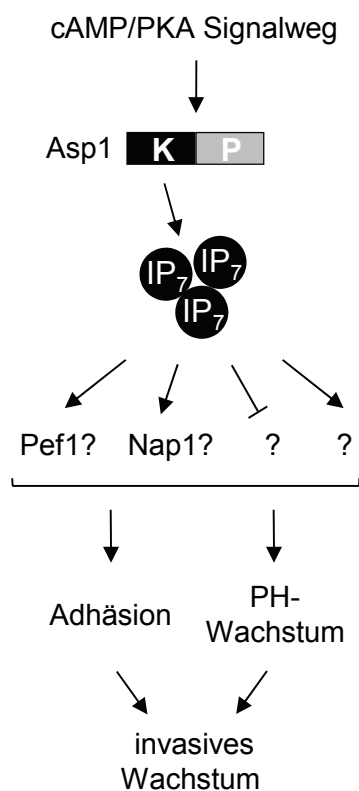
Auf der Suche nach möglichen Interaktionspartnern von Asp1 bei der Regulation des dimorphen Wechsels stellten sich die CDK Pef1 sowie das „nucleosome assembly protein“ Nap1 als mögliche Asp1 Interaktionspartner heraus. Dabei benötigt Asp1 die Anwesenheit von Pef1 für die Regulation des adhäsiven Wachstums, während die Anwesenheit von Nap1 für das invasive Wachstum erforderlich ist. Als weitere mögliche Interaktionspartner wurden die CDKs Cdc2 und Cdk8 analysiert, deren Funktionen jedoch weder für das Asp1 vermittelte adhäsive noch das invasive Wachstum erforderlich zu sein scheinen.

Für die CDK Pef1 liegt in *S. pombe* keine detaillierte Charakterisierung vor (Tanaka & Okayama, 2000). Im Gegensatz dazu ist Pho85 in *S. cerevisiae* bereits sehr gut charakterisiert. Pho85 hat eine Vielzahl von Funktionen während des Zellzyklus und kann dabei mit zehn unterschiedlichen Zyklinen assoziieren, die sich in zwei Subfamilien einteilen lassen (Carroll & O'Shea, 2002; Huang et al, 2007). Eine wichtige Funktion von Pho85, die es hauptsächlich in Assoziation mit Zyklinen der Pho80 Subfamilie ausübt, ist die Regulation der zellulären Antwort auf veränderte Umweltbedingungen (Carroll & O'Shea, 2002; Huang et al, 2007). Pho85 ist im Allgemeinen aktiv, wenn die Umweltbedingungen und die Nährstoffsituation ausreichend sind und schaltet unter diesen Bedingungen unnötige zelluläre Aktivitäten ab (Huang et al, 2007). Ein gut dokumentiertes Beispiel ist die bereits beschriebene Regulation des Phosphatmetabolismus, wobei Pho85 in Assoziation mit dem Zyklin Pho80 und dem CDK-Inhibitor Pho81 unter Phosphatmangelbedingungen vermittelt durch Vip1 spezifisches IP₇ inhibiert wird (Lee et al, 2008; Lee et al, 2007). Die hier gewonnenen Daten deuten an, dass Pef1 in *S. pombe* bei der Regulation der Adhäsion durch Asp1 spezifische Inositolpyrophosphate positiv reguliert werden könnte, um die Expression von Adhäsinen zu erreichen. Dies muss nicht im Widerspruch zu der o.g. negativen Regulation stehen, da es sich bei der Adhäsion um eine völlig andere zelluläre Antwort handelt, an der Pef1 womöglich in Assoziation mit einem spezifischen Zyklin beteiligt ist. Pho85-ähnliche CDKs könnten also generell Zielproteine der Inositolpyrophosphate sein, um die zelluläre Antwort auf verschiedene Umweltbedingungen zu regulieren. Pho85-ähnliche CDKs üben weitere Funktionen beim polaren Wachstum aus. So wird z.B. im pflanzenpathogenen dimorphen Pilz *Ustilago maydis* die entsprechende Cdk5 Kinase für die Aufrechterhaltung des polaren Wachstums der filamentösen Form benötigt und ihr Verlust führt zu einer drastisch reduzierten Virulenz (Castillo-Lluva et al, 2007). Cdk5 assoziiert dabei mit dem Zyklin Pcl12, für das interessanterweise kein eindeutiges Gegenstück in *S. cerevisiae* gefunden wurde (Flor-Parra et al, 2007). Die Abwesenheit von Pef1 in *S. pombe* führt zu starkem invasivem Wachstum. Somit könnten Asp1 spezifische Inositolpyrophos-

phate Pef1 bei der Regulation des pseudohyphalen Wachstums inhibieren. In diesem Fall kann Pef1 dennoch nicht das einzige Zielprotein von Asp1 in dieser Hinsicht sein, da ein *asp1^{D333A} pef1Δ* Stamm unter denselben Bedingungen nicht invasiv wächst. Jedoch bleibt unverständlich, warum Asp1 einen positiven Einfluss auf Pef1 für das adhäsive und einen negativen Einfluss auf Pef1 für das pseudohyphale Wachstum ausüben sollte. Insgesamt müssen weitere Analysen klären, ob Pef1 bei der Regulation des adhäsiven und pseudohyphalen Wachstums dem Asp1 Protein nachgeschaltet ist.

Ein weiterer möglicher Interaktionspartner von Asp1 bei der Regulation des invasiven Wachstums ist das Nap1 Protein. Ein *asp1^{H397A} nap1Δ* Stamm zeigt eine vergleichbare Adhäsion wie der *asp1^{H397A}* Stamm, jedoch massiv reduziertes invasives Wachstum, was darauf hindeutet, dass Nap1 für das pseudohyphale Wachstum *per se* benötigt wird. Interessanterweise wurde *nap1⁺* in unserem Labor ebenfalls als ein extragenetischer Multikopie-Suppressor eines *mal3* Mutantenstammes isoliert (Beinhauer, 1999). Zudem wurde in *S. cerevisiae* eine direkte physikalische Interaktion zwischen Vip1 und Nap1 gefunden (Krogan et al, 2006; Krogan et al, 2004). Beides weist auf gemeinsame Funktionen von 1/3 Kinasen und dem konservierten Nap1 Protein hin. In *S. cerevisiae* wurde Nap1 aufgrund seiner Bindung an das Zyklin Clb2 identifiziert und wird gemeinsam mit Clb2 für die vollständige Funktion der CDK Cdc28 benötigt (Kellogg et al, 1995; Kellogg & Murray, 1995). Dazu gehört auch die Induktion des Wechsels von apikalem zu isotropem Knospenwachstum während der Knospenmorphogenese, der beim pseudohyphalen Wachstum nicht mehr stattfindet (Gimeno et al, 1992; Kellogg & Murray, 1995). Somit könnte die Regulation des Nap1 Proteins ein Mechanismus sein, das veränderte polare Wachstumsverhalten bei einem dimorphen Wechsel zu induzieren. Die Induktion des apikal-isotropen Wechsels erfordert außerdem die Anwesenheit der Gin4 Kinase, einem weiteren direkten Interaktionspartner von Nap1, die für die Organisation des Septinrings an der Verengung zwischen Mutterzelle und Knospe benötigt wird (Altman & Kellogg, 1997; Mortensen et al, 2002). Interessanterweise führt die *GIN4* Deletion in *C. albicans* zu pseudohyphalem Wachstum und einem hyperinvasiven Phänotyp (Wightman et al, 2004). Nap1 ist ein Histonchaperon der konservierten „nucleosome assembly protein“ Familie, die *in vitro* die Nukleosomenbildung aus DNA und Histonen bewirkt (Grande et al, 2008; Ishimi & Kikuchi, 1991; Ishimi et al, 1987). In *S. cerevisiae* ist Nap1 am Kernimport der Histone H2A und H2B und an der transkriptionellen Regulation beteiligt, da in einem *nap1Δ* Deletionsstamm die Transkriptionsmenge von >10% aller Gene um das Zweifache verändert ist (Mosammaparast et al, 2002; Ohkuni et al, 2003). In *S. cerevisiae* ist eine Beteiligung vieler Transkriptionsfaktoren an der Regulation des dimorphen Wechsels bekannt (Palecek et al, 2002). Für *S. pombe* Nap1 wurde eine Rolle bei der transkriptionellen Regulation und Kolokalisierung mit „CHD remodelling factors“ an spezifischen Promotorregionen gezeigt

(Walfridsson et al, 2007). In einer aktuellen Studie wurden mittels einer *S. pombe* Gendelektionsbank essentielle Gene für das adhäsive bzw. invasive Wachstum identifiziert, wobei die Hälfte dieser Gene für Proteine mit Funktionen bei der Transkription oder der Chromatiumgestaltung kodiert (Dodgson et al, 2009). Interessanterweise zeigt der *asp1^{D333A}* Mutantenstamm eine verstärkte transkriptionelle Stilllegung einer Zentromerregion, ein Hinweis darauf, dass Asp1 spezifische Inositolpyrophosphate einen Einfluss auf die Chromatinstruktur haben (Daten nicht gezeigt). Asp1 spezifische Inositolpyrophosphate könnten bei einem dimorphen Wechsel u.a. für eine veränderte Genexpression benötigt werden, möglicherweise in Zusammenarbeit mit oder durch Einfluss auf das Nap1 Protein. Auch hier müssen weiterführende Analysen beantworten, ob Nap1 bei der Regulation des dimorphen Wechsels ein dem Asp1 Protein nachgeschaltetes Protein ist.



Insgesamt ergibt sich aus den gewonnenen Daten, dass Asp1 ein zentraler Bestandteil eines sicherlich komplexen Regulationsmechanismus ist, der den dimorphen Wechsel und das invasive Wachstum kontrolliert. In einem einfachen Modell bewirkt der cAMP/PKA Signalweg die Produktion Asp1 spezifischer Inositolpyrophosphate über eine positive Regulation des Asp1 Proteins (Abb. 44). Dies geschieht möglicherweise durch eine direkte Phosphorylierung von Asp1 durch die PKA. Asp1 spezifische Inositolpyrophosphate leiten das cAMP/PKA Signal an noch nicht identifizierte Zielproteine weiter. Darunter befinden sich möglicherweise die CDK Pef1 und das „nucleosome assembly protein“ Nap1. Durch die Regulation der Zielproteine wird die Ausbildung adhäsiver Zelleigenschaften und der Wechsel zur pseudohyphalen Wachstumsform erreicht, was gemeinsam das invasive Wachstum ermöglicht.

Abbildung 44: Modell für die Regulation des dimorphen Wechsels durch Asp1. Die Aktivierung des cAMP/PKA Signalwegs führt, möglicherweise über die direkte Phosphorylierung des Asp1 Proteins durch die PKA, zur Produktion von IP₇ (oder IP₈). IP₇ leitet das Signal an noch nicht identifizierte Zielproteine, darunter möglicherweise Pef1 und Nap1, weiter. Die Regulation dieser Zielproteine führt zur Ausbildung adhäsiver Zelleigenschaften bzw. dem Wechsel zum pseudohyphalen (PH) Wachstum, was gemeinsam in invasivem Wachstum resultiert.

4.3 Der dimorphe Wechsel von *S. pombe* geht mit Veränderungen des Wachstumsmusters einher

In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal das filamentöse Wachstumsverhalten von *S. pombe* beschrieben. Dabei finden im Vergleich zum hefeförmigen Wachstum drei gravierende Veränderungen statt: die Auswahl des alten oder des neuen Zellendes zu Beginn des Wachstums und überwiegend monopolares Wachstum, sowie eine unvollständige Zellseparierung. Dieses Wachstumsmuster ermöglicht es den Zellen, sich kontinuierlich in eine bestimmte Richtung auszubreiten. Ähnliche Veränderungen des polaren Wachstumsverhaltens wurden auch für andere dimorphe Hefen beschrieben. Die Spalthefe *Schizosaccharomyces japonicus* ist eine nahe Verwandte von *S. pombe*, die echte Hyphen und ein invasiv wachsendes Myzel ausbilden kann (Sipiczki et al, 1998b). Während des Übergangs von der Hefeform zur hyphalen Form, die sich bei *S. japonicus* durch eine starke Elongation der Zellen bemerkbar macht, kommt es ebenfalls zu einem Verlust des bipolaren Wachstums (Sipiczki et al, 1998a). In der Knospenhefe *S. cerevisiae* kommt es bei einem dimorphen Wechsel zu vergleichbaren Ereignissen. In der Hefeform wachsen neue Knospen zunächst apikal und später isotrop, während in den Pseudohyphen ausschließlich apikales Knospenwachstum stattfindet (Gimeno et al, 1992; Kron et al, 1994; Lew & Reed, 1993). In der Hefeform findet die Knospung abhängig von der Ploidie entweder axial oder distal statt, d.h. der Geburtsstelle der Mutterzelle benachbart oder gegenüberliegend (Chant & Pringle, 1991). In der pseudohyphalen Form findet die Knospung ausschließlich distal statt und ermöglicht eine kontinuierliche Verlängerung der Pseudohyphe (Gimeno et al, 1992; Kron et al, 1994), eine Veränderung, die mit der Wahl der Zellenden bei *S. pombe* vergleichbar ist.

Interessanterweise zeigen pseudohyphal wachsende *S. pombe* Zellen ein Wachstumsmuster, das mit einem *tea1Δ* Deletionsstamm vergleichbar ist (Glynn et al, 2001). Tatsächlich sind Tea1 und auch Tea4 für das invasive Wachstum nicht essentiell (Dodgson et al, 2009 und diese Arbeit), und in Abwesenheit von Tea1 ist das invasive Wachstum sogar verstärkt. Dennoch wird Tea1 in invasiv wachsenden Zellen exprimiert und sein Verlust führt zu abnormen Zellformen (Dodgson et al, 2009 und Daten dieser Arbeit nicht gezeigt). Dies deutet darauf hin, dass Tea1 beim pseudohyphalen Wachstum eine andere Rolle spielt als beim hefeförmigen Wachstum. Zwei weitere Konditionen wurden für *S. pombe* beschrieben, bei denen in Reaktion auf extrinsische Signale eine Abweichung vom regulären Wachstumsmuster stattfindet. In Experimenten mit Femtoliterkammern, bei denen die zylindrischen Zellen durch externe Zwänge in eine gebogene Zellform gezwungen wurden, lagerten sich die Mikrotubuli an die konvexe Zellseite an und trafen bei ihrer Polymerisierung auf den konvexen Zellkortex auf (Minc et al, 2009; Terenna et al, 2008). Dies führte, offenbar unabhängig vom Tea1-Tea4-Komplex, zur Akkumulierung von Zellpolaritätsfaktoren an der

Mikrotubuli-Kontaktstelle und unter bestimmten Bedingungen zu einer neuen, ektopischen Wachstumszone (Minc et al, 2009; Terenna et al, 2008). Eine andere Kondition ist die bereits angesprochene Zellpaarung, bei der Zellen das vom Partner ausgesendete Paarungspheromon wahrnehmen und aufeinander zu wachsen, wobei die Position der Wachstumszone von der Position der Pheromonquelle bestimmt wird (Niccoli & Nurse, 2002; Nielsen & Davey, 1995). Bei diesem „shmoo“ Wachstum wachsen die Zellen monopolar mit einem schmalen, wachsenden Ende und einem breiten, nicht-wachsenden Ende (Niccoli & Nurse, 2002). Tea1 akkumuliert in diesen Zellen nicht am wachsenden Ende, weshalb der Tea1-Tea4-Komplex auch beim Wachstum in Antwort auf das Pheromonsignal nicht mehr dieselbe Funktion haben kann wie beim polaren Wachstum (Niccoli & Nurse, 2002). Die Abwesenheit von Tea1 führt sogar dazu, dass die Zellen schneller auf das Pheromonsignal mit einer Neulokalisierung des Aktin-Zytoskeletts reagieren können (Niccoli & Nurse, 2002). Somit ist es möglich, dass das „Abschalten“ des Tea1-Tea4-Systems ein genereller Mechanismus ist, um in Reaktion auf extrinsische Signale Wachstumszonen neu zu definieren und dieses Prinzip auch bei dem dimorphen Wechsel angewendet wird. Wie hier gezeigt wurde, sind pseudohyphal wachsende Zellen in der Lage, Hindernisse in Form anderer Zellen durch Anpassung ihrer Zellform zu umgehen. Auch dieses Verhalten erfordert die Neudefinition einer Wachstumszone und die Umorganisation des internen Polaritätssystems. Beim pseudohyphalen Wachstum führt der Hauptanteil der Zellen NETO nicht durch, es besteht aber kein 100%iger NETO-Verlust. Dies deutet darauf hin, dass das NETO-Signal selbst noch vorhanden ist. Möglicherweise kann dieses Signal nicht mehr effizient „übersetzt“ werden, da das Tea1-Tea4-System weitgehend „abgeschaltet“ ist. Der NETO-Verlust beim pseudohyphalen Wachstum ist bei dem *asp1^{H397A}* Stamm verglichen mit dem Wildtyp stärker ausgeprägt. Da dieser Stamm vermutlich mehr Asp1 spezifische Inositolpyrophosphate produziert, und diese Moleküle das Tea1-Tea4-System regulieren könnten, könnte dieses System im *asp1^{H397A}* Stamm effizienter stillgelegt sein. Wie bereits beschrieben wurde, wird Tea1 beim „shmoo“ Wachstum nicht mehr mit den Mikrotubuli zum Zellende transportiert (Kap. 4.1) (Niccoli & Nurse, 2002). Dies könnte auch beim pseudohyphalen Wachstum der Fall sein und könnte die veränderte Lokalisierung von Tea1 in den pseudohyphal wachsenden Zellen erklären, in denen Tea1 nicht mehr an den Zellenden konzentriert vorgefunden wurde.

Wenn Tea1 in pseudohyphal wachsenden Zellen nicht mehr mit den Interphasen-Mikrotubuli transportiert wird, sind diese dann noch für diese Wachstumsform notwendig? Leider war es nicht möglich, das invasive Wachstum auf bzw. in TBZ-haltigem Medium zu analysieren, da diese Chemikalie wahrscheinlich über den langen Versuchszeitraum nicht stabil bleibt. Die Interphasen-Mikrotubuli werden jedoch nach wie vor für die Positionierung der Wachstumszonen benötigt, da der Verlust wichtiger +TIPs bei invasiv wachsenden Zellen

aberrante Zellformen wie Krümmungen oder Verzweigungen hervorruft (Dodgson et al, 2009 und Daten dieser Arbeit nicht gezeigt). Möglicherweise werden unter diesen Bedingungen andere Marker für die Wachstumszonen exprimiert. Hier lässt sich erneut der Vergleich zum „shmoo“ Wachstum ziehen, bei dem das paarungsspezifische Formin Fus1 exprimiert wird (Nielsen & Davey, 1995; Petersen et al, 1995). Beim „shmoo“ Wachstum ist auch die Mikrotubuli-Dynamik verändert und scheint durch den Verlust des +TIPs Tip1 oder des Kinesins Tea2 nicht beeinflusst zu werden (Niccoli & Nurse, 2002). Darüberhinaus reagieren auch *tip1Δ* oder *tea2Δ* Stämme schneller auf das Pheromonsignal (Niccoli & Nurse, 2002). Auch das invasive Wachstum wird durch den Verlust oder Defekt von +TIPs oder Tea2 verstärkt. Daher kann es sich auch hier um den generellen Effekt handeln, dass der Verlust von Proteinen, die für das reguläre, vegetative Wachstum benötigt werden, die Veränderung des polaren Wachstumsverhaltens in Reaktion auf extrinsische Signale erleichtert. Im Gegensatz zum Mikrotubuli-Zytoskelett wird ein wildtypisches Aktin-Zytoskelett für das invasive Wachstum benötigt. Dies entspricht den Erwartungen, da das Aktin-Zytoskelett für das polare Wachstum *per se* erforderlich ist. Somit waren Stämme mit defekten Aktin-Zytoskelett-Komponenten weitgehend zu invasivem Wachstum unfähig. Die einzige Ausnahme bildete ein *asp1^{H397A} arp3-c1* Stamm, der starkes invasives Wachstum aufwies. Dies kann zum einen mit der starken Suppression des *arp3-c1* Phänotyps durch die *Asp1^{H397A}* Variante, zum anderen durch einen scheinbar verstärkten Zellseparierungsdefekt dieses Stammes erklärt werden.

Die unvollständige Zellseparierung ist ein weiteres Charakteristikum des pseudohyphalen Wachstums. Zudem wurden bei der Analyse des pseudohyphalen Wachstums massive Zytokinesedefekte festgestellt, wobei sich ein Septum ausbildete, jedoch nicht eingeschnürt wurde. Dabei handelt es sich definitionsgemäß um einen hyphalen Phänotyp (Sipiczki, 2007). An der Einschnürung des Septums sind verschiedene Komponenten beteiligt. Darunter befinden sich hauptsächlich die Zellwandhydrolasen Agn1 und Eng1 sowie Proteinkomplexe, die deren Lokalisierung kontrollieren (Bahler, 2005; Dekker et al, 2004; Garcia et al, 2005; Martin-Cuadrado et al, 2003; Martin-Cuadrado et al, 2005; Wang et al, 2002). Die periodische Expression von Agn1 und Eng1 mit einem „peak“ in der späten Mitose steht unter Kontrolle des „forkhead“ Transkriptionsfaktors Sep1 und des Transkriptionsfaktors Ace2 (Alonso-Nunez et al, 2005; Bahler, 2005; Martin-Cuadrado et al, 2003). Interessanterweise führt der Verlust von Sep1 oder Ace2 zu einem hyphalen Phänotyp, d.h. zu zumeist vier Zellen, die durch uneingeschnürte Septen verbunden sind (Bahler, 2005; Dekker et al, 2004). Diese Zellen wachsen jedoch nicht invasiv, d.h. ein Zellseparierungsdefekt führt nicht unweigerlich zu invasivem Wachstum. Anhand der „trimorphen“ Hefe *C. albicans*, die neben der Hefeform sowohl Pseudohyphen als auch Hyphen ausbilden kann, wurde gezeigt, dass Pseudohyphen eine intermediäre Form

darstellen. Dabei kann die Transition von der Hefeform bis zur Hyphenform durch die schrittweise Konzentrationserhöhung eines bestimmten Transkriptionsfaktors bewirkt werden (Bastidas & Heitman, 2009; Carlisle et al, 2009). Ein ähnliches Prinzip könnte auch bei dem dimorphen Wechsel von *S. pombe* angewendet werden, wobei z.B. die Konzentration der Transkriptionsfaktoren Sep1 und Ace2 auf das für das pseudohyphale Wachstum benötigte Niveau gesenkt werden könnte. Bei manchen Zellen könnte dieses Niveau weniger stark kontrolliert sein, so dass es zu dem beobachteten, hyphalen Phänotyp kommt. Auch dieser Phänotyp trat im *asp1^{H397A}* Mutantenstamm häufiger als im Wildtypstamm auf, weshalb auch hier das Sep1-Ace2-System durch eine erhöhte Inositolpyrophosphat-Menge effizienter herunterreguliert werden könnte.

Somit könnten Asp1 spezifische Inositolpyrophosphate bei dem dimorphen Wechsel zur filamentösen Wachstumsform zwei unterschiedliche funktionelle Systeme „abschalten“ oder herunterregulieren, um das pseudohyphale Wachstum zu ermöglichen (Abb. 45). Zum einen könnten sie das Tea1-Tea4-Polaritätssystem „abschalten“, um eine veränderte Wahl der Wachstumszonen und monopolares Wachstum zu ermöglichen. Zum anderen könnten sie das Sep1-Ace2-Transkriptionsfaktorsystem herunterregulieren, um eine vollständige Zellseparierung zu verhindern.

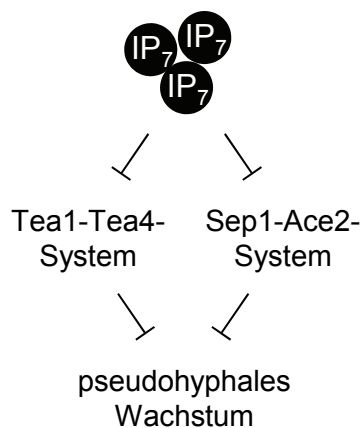
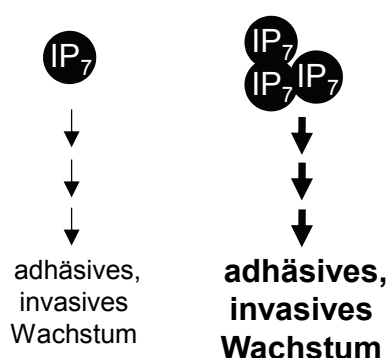


Abbildung 45: Modell für die Regulation der morphologischen Veränderungen beim pseudohyphalen Wachstum. Dabei inhibieren Asp1 spezifische Inositolpyrophosphate (IP₇ oder IP₈) zum einen das Tea1-Tea4-System, zum anderen das Sep1-Ace2-System, und erreichen auf diese Weise sowohl das pseudohyphale Wachstumsmuster als auch eine unvollständige Zellseparierung.

4.4 Sind Inositolpyrophosphate intrazelluläre Signalmoleküle?

Seit langem wird diskutiert, dass Inositolpyrophosphate eine neue Form intrazellulärer Signalmoleküle darstellen könnten. Ihre Konzentrationen sind niedrig, unterliegen einer sehr hohen Fluktuation und reagieren sensibel auf extrazelluläre Stimuli (Burton et al, 2009). Nichtsdestotrotz wurde über diese Eigenschaften bisher nur isoliert berichtet, ohne die Moleküle in einen physiologischen Kontext einzuordnen oder mit einer spezifischen zellulären Antwort auf einen extrazellulären Stimulus in Verbindung zu bringen (Burton et al, 2009). In dieser Arbeit war es zum ersten Mal möglich, spezifische Inositolpyrophosphate mit

einer konkreten zellulären Antwort auf veränderte Umweltbedingungen in Verbindung zu bringen, nämlich dem dimorphen Wechsel. Dabei stellte sich heraus, dass eine Erhöhung der intrazellulären Inositolpyrophosphat-Konzentration, z.B. durch das Ausschalten der *S. pombe* Nudix-Hydrolase, oder wie es bei Überexpression der Asp1^{H397A} oder Asp1¹⁻³⁶⁴ Varianten und letztlich auch im *asp1*^{H397A} Mutantenstamm angenommen wird, zu verstärkten adhäsiven Zelleigenschaften und verstärktem invasivem Wachstum führt (Abb. 46). Eine Eigenschaft von Signalwegen ist, dass die Konzentration eines Signalmoleküls einen bestimmten Schwellenwert überschreiten muss, um eine zelluläre Antwort hervorzurufen (Jordan et al, 2000). Unter nährstoffreichen, stressfreien Wachstumsbedingungen weisen wildtypische *S. pombe* Zellen keine feststellbaren adhäsiven Eigenschaften und kein invasives Wachstum auf. Dies lässt annehmen, dass in unter diesen Bedingungen eine basale Inositolpyrophosphat-Konzentration vorliegt, die unter dem Schwellenwert für einen dimorphen Wechsel liegt, und unter den Bedingungen für einen dimorphen Wechsel über diesen Schwellenwert erhöht wird. Eine „künstliche“, konstante Erhöhung der Inositolpyrophosphat-Konzentration, wie es vermutlich durch die o.g. Manipulationen erreicht wird, führt bereits unter den Bedingungen, unter denen in der Wildtypsituation kein dimorpher Wechsel stattfindet, zu adhäsiven Eigenschaften und verfrühtem invasivem Wachstum. Ein weitere Eigenschaft vieler Signalwege ist, dass die Konzentration von Signalmolekülen nur transient erhöht wird (Jordan et al, 2000). So resultiert z.B. die Stimulierung des cAMP/PKA Signalweges in der vermehrten Bildung von cAMP, dieses wird jedoch durch die gleichzeitige Aktivierung der Phosphodiesterase schnell wieder abgebaut (Hoffman, 2005). Im Falle der Inositolpyrophosphate könnte dies beispielsweise durch die Aktivierung der Nudix-Hydrolasen geschehen. Nichtsdestotrotz führt die vermutlich konstante Konzentrationserhöhung dieser Moleküle durch die o.g. Manipulationen zu stärker ausgeprägten Phänotypen als bei wildtypischen Zellen. Diese Daten deuten insgesamt stark auf eine



Signalfunktion der Asp1 spezifischen Inositolpyrophosphate hin, wobei ihre Konzentrationserhöhung zu einer länger andauernden zellulären Antwort führt. Damit die spezifischen Inositolpyrophosphate als Signalmoleküle eingesetzt werden können, muss ihre Konzentration streng reguliert werden. Wie im Folgenden diskutiert wird, wird diese regulatorische Funktion möglicherweise von der Asp1 Phosphatase-domäne übernommen.

Abbildung 46: Eine erhöhte intrazelluläre Konzentration Asp1 spezifischer Inositolpyrophosphate (IP₇ oder IP₈) führt zu einer Verstärkung des adhäsiven und invasiven Wachstums.

4.5 Hat die Asp1 Phosphatasedomäne eine regulatorische Funktion?

Die 1/3 Kinasen weisen eine charakteristische Zweidomänenstruktur auf (Fridy et al, 2007; Mulugu et al, 2007). Während die Kinaseaktivität in der N-terminalen Domäne lokalisiert ist, konnte die Funktion der C-terminalen Domäne noch nicht entschlüsselt werden. Aufgrund ihrer Homologie zu sauren Histidin-Phosphatasen ist eine Funktion bei der Spaltung von IP_6 möglich, dennoch schlugen Versuche fehl, diese enzymatische Funktion nachzuweisen (Choi et al, 2007; Fridy et al, 2007). Stattdessen wird vermutet, dass diese Domäne eine regulatorische Funktion besitzen könnte (Fridy et al, 2007; Shears, 2009). Diese Annahme basiert auf der Beobachtung, dass die alleinige Expression des N-Terminus des *S. cerevisiae* Vip1 Proteins oder der humanen 1/3 Kinase PPIP5K1 verglichen mit dem Volllänge Protein *in vitro* zu einer vermehrten Produktion von Inositolpyrophosphaten führt (Fridy et al, 2007; Mulugu et al, 2007). Die *in vivo* Daten dieser Arbeit sprechen ebenfalls dafür, dass die Substitution eines hoch-konservierten Histidinrestes im *S. pombe* Asp1 Protein (Asp1^{H397A}) die Phosphatasedomäne „ausschaltet“ und dies zu einer vermehrten Anwesenheit Asp1 spezifischer Inositolpyrophosphate führt. Ein weiterer konkreter Hinweis auf eine regulatorische Funktion der Phosphatasedomäne ergibt sich aus dem Befund, dass bei Überexpression der Asp1^{D333A} oder der Asp1³⁶⁵⁻⁹²⁰ Variante die Phänotypen des Asp1^{H397A} exprimierenden Stammes supprimiert werden.

Auf welche Weise könnte die Phosphatasedomäne einen regulatorischen Einfluss auf die Menge Asp1 spezifischer Inositolpyrophosphate ausüben? Eine direkte Inhibierung der Asp1 Kinasedomäne z.B. durch eine Konformationsänderung des Proteins und/oder räumlicher Nähe zur Phosphatasedomäne kann nicht ausgeschlossen werden (Abb. 47). Eine Asp1-Asp1-Interaktion konnte hier unter normalen Bedingungen zwar nicht festgestellt werden, findet jedoch möglicherweise unter spezifischen Bedingungen oder in Subkompartimenten der Zelle statt. Auch die Tatsache, dass die Asp1 Domänen als separate Moleküle funktionell sind, schließt eine räumliche Interaktion der Proteinvarianten nicht aus. Verschiedene weitere Alternativen für die regulatorische Funktion der Phosphatasedomäne können ebenfalls in Betracht gezogen werden. So besteht nach wie vor die Möglichkeit, dass die Phosphatasedomäne eine enzymatische Aktivität hat und durch den Abbau von IP_6 Molekülen die Substratverfügbarkeit für die Kinasedomäne verringert (Abb. 47). Für die enzymatische Aktivität der sauren Histidin-Phosphatasen ist u.a. die Anwesenheit zweier essentieller katalytischer Histidinreste erforderlich, die bei den 1/3 Kinasen konserviert sind und sich im Asp1 Protein an den Positionen 397 und 807 befinden (Fridy et al, 2007; Mulugu et al, 2007). Die Expression der Asp1^{H397A} Variante führt zu drastischen Phänotypen und offenbar zu einem Funktionsverlust der Asp1 Phosphatasedomäne. Das ursprünglich in unserem Labor als *mal3* Suppressor isolierte *asp1* Genfragment kodiert für eine verkürzte

Asp1 Variante, bei der das Histidin 807 fehlt. Während die Überexpression dieser Asp1¹⁻⁷⁹⁴ Variante die TBZ-Sensitivität von *ma13* Mutantenstämmen supprimieren kann, ist dies durch die Überexpression des Volllängen Asp1 nicht möglich (Beuter, 2006; Vietmeier-Decker, 2004 und Daten dieser Arbeit nicht gezeigt). Dies deutet an, dass auch bei Expression der Asp1¹⁻⁷⁹⁴ Variante eine erhöhte Inositolpyrophosphat-Menge vorliegt. Die Bedeutsamkeit der katalytisch essentiellen Histidinreste für die Funktion des Asp1 Proteins spricht für die Möglichkeit einer enzymatischen Aktivität der Phosphatasedomäne. Jedoch liegt IP₆ in der Zelle in ca. 50fach höherer Konzentration als 1/3-IP₇ vor (Bennett et al, 2006; Burton et al, 2009; Menniti et al, 1993; Saiardi et al, 2000; Shears, 2009), so dass die Asp1 Phosphatasedomäne eine erhebliche IP₆-Menge abbauen müsste, um die Substratverfügbarkeit für die Kinasedomäne wirkungsvoll zu verringern. Damit würde sie auch die Aktivität der IP6K verringern, da IP₆ als gemeinsames Substrat genutzt wird, und wäre somit unspezifisch. Eine andere Möglichkeit zur Regulation der Menge Asp1 spezifischer Inositolpyrophosphate besteht durch einen positiven Einfluss auf die Aktivität der Nudix-Hydrolasen, wodurch der Inositolpyrophosphat-Abbau gesteigert werden würde (Abb. 47). Es gibt Hinweise darauf, dass Nudix-Hydrolasen in Gegenwart von 1/3,5-IP₈ präferentiell das 1/3 Diphosphat hydrolysieren (Shears, 2009). Eine Stimulierung der Nudix-Hydrolase-Aktivität könnte somit spezifisch der Asp1 Kinaseaktivität entgegenwirken. Die intrazellulären Inositolpyrophosphat-Konzentrationen unterliegen einer hohen Fluktuation, die durch die gleichzeitige Aktivität der IP6K bzw. 1/3 Kinasen und der Nudix-Hydrolasen zustande kommt (Shears, 2009). Die Inhibierung der Nudix-Hydrolasen führt daher zu einer vielfachen Konzentrationserhöhung dieser Moleküle (Shears, 2009). Wie im vorherigen Kapitel diskutiert wurde, handelt es sich bei den Asp1 spezifischen Inositolpyrophosphaten möglicherweise um intrazelluläre Signalmoleküle. Als solche muss ihre Konzentration schnell und dynamisch an externe Stimuli angepasst werden (Burton et al, 2009). Die Kontrolle der

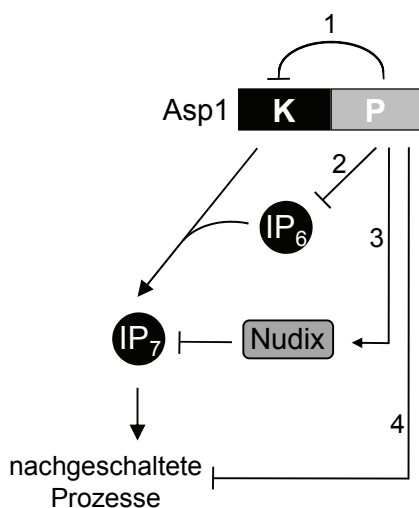


Abbildung 47: Modell für die regulatorische Funktionsweise der Asp1 Phosphatasedomäne. Dazu können verschiedene Möglichkeiten in Betracht gezogen werden: 1) Die Kinasedomäne („K“) wird direkt, z.B. durch eine Konformationsänderung oder Dimerisierung, durch die Phosphatasedomäne („P“) inaktiviert. 2) Der enzymatische Abbau von IP₆ verringert die Substratverfügbarkeit für die Kinasedomäne („K“). 3) Die Aktivierung der Nudix-Hydrolasen führt zum Abbau von IP₇ (oder IP₈). 4) Über eine negative Regulation von nachgeschalteten Prozessen der Asp1 spezifischen Inositolpyrophosphate würde ihre zelluläre Wirkung verhindert werden.

Nudix-Hydrolase-Aktivität könnte daher ein effizienter Mechanismus für die Regulation der Inositolpyrophosphat-Konzentration sein. Zuletzt kann nicht die Möglichkeit außer Acht gelassen werden, dass die Asp1 Phosphatasedomäne den spezifischen Inositolpyrophosphaten nachgeschaltete Prozesse reguliert (Abb. 47). Dies könnte sie z.B. erreichen, indem sie die Verfügbarkeit von Zielproteinen kontrolliert. So könnte die Phosphatasedomäne an Zielproteine binden und sie vor den Inositolpyrophosphat-Molekülen abschirmen.

Eine regulatorische Funktion der Asp1 Phosphatasedomäne eröffnet die Möglichkeit, die Menge der Asp1 spezifischen Inositolpyrophosphate durch die Regulation eines einzigen Proteins zu kontrollieren. Wie bereits beschrieben, wurde Asp1 als ein phosphoryliertes Protein identifiziert (Wilson-Grady et al, 2008). Zwei der identifizierten Phosphorylierungsstellen liegen N-terminal, zwei weitere befinden sich innerhalb der Phosphatasedomäne. Damit könnte die Aktivität der Asp1 Kinase- und Phosphatasedomäne gezielt reguliert werden. Damit wurden die 1/3 Kinasen möglicherweise als „molekulare Schalter“ für die Regulation des dimorphen Wechsels identifiziert.

Literaturverzeichnis

- Akhmanova A, Steinmetz MO (2008) Tracking the ends: a dynamic protein network controls the fate of microtubule tips. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**(4): 309-322
- Albert C, Safrany ST, Bembenek ME, Reddy KM, Reddy K, Falck J, Brocker M, Shears SB, Mayr GW (1997) Biological variability in the structures of diphosphoinositol polyphosphates in *Dictyostelium discoideum* and mammalian cells. *Biochem J* **327**(Pt 2): 553-560
- Alonso-Nunez ML, An H, Martin-Cuadrado AB, Mehta S, Petit C, Sipiczki M, del Rey F, Gould KL, de Aldana CR (2005) Ace2p controls the expression of genes required for cell separation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Biol Cell* **16**(4): 2003-2017
- Altman R, Kellogg D (1997) Control of mitotic events by Nap1 and the Gin4 kinase. *J Cell Biol* **138**(1): 119-130
- Amoah-Buahin E, Bone N, Armstrong J (2005) Hyphal Growth in the Fission Yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Eukaryot Cell* **4**(7): 1287-1297
- Arai R, Nakano K, Mabuchi I (1998) Subcellular localization and possible function of actin, tropomyosin and actin-related protein 3 (Arp3) in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Eur J Cell Biol* **76**(4): 288-295
- Bahler J (2005) A transcriptional pathway for cell separation in fission yeast. *Cell Cycle* **4**(1): 39-41
- Bahler J, Nurse P (2001) Fission yeast Pom1p kinase activity is cell cycle regulated and essential for cellular symmetry during growth and division. *Embo J* **20**(5): 1064-1073
- Bahler J, Pringle J (1998) Pom1p, a fission yeast protein kinase that provides positional information for both polarized growth and cytokinesis. *Genes and Development* **12**: 1356-1370
- Bahler J, Wu JQ, Longtine MS, Shah NG, McKenzie A, 3rd, Steever AB, Wach A, Philippsen P, Pringle JR (1998) Heterologous modules for efficient and versatile PCR-based gene targeting in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* **14**(10): 943-951
- Balasubramanian MK, Feoktistova A, McCollum D, Gould KL (1996) Fission yeast Sop2p: a novel and evolutionarily conserved protein that interacts with Arp3p and modulates profilin function. *Embo J* **15**(23): 6426-6437
- Balasubramanian MK, Helfman DM, Hemmingsen SM (1992) A new tropomyosin essential for cytokinesis in the fission yeast *S. pombe*. *Nature* **360**(6399): 84-87
- Balasubramanian MK, Hirani BR, Burke JD, Gould KL (1994) The *Schizosaccharomyces pombe* *cdc3+* gene encodes a profilin essential for cytokinesis. *J Cell Biol* **125**(6): 1289-1301
- Bastidas RJ, Heitman J (2009) Trimorphic stepping stones pave the way to fungal virulence. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(2): 351-352
- Bathe M, Chang F (2010) Cytokinesis and the contractile ring in fission yeast: towards a systems-level understanding. *Trends Microbiol* **18**(1): 38-45
- Becker W, Joost HG (1999) Structural and functional characteristics of Dyrk, a novel subfamily of protein kinases with dual specificity. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **62**: 1-17
- Behrens R, Nurse P (2002) Roles of fission yeast tea1p in the localization of polarity factors and in organizing the microtubular cytoskeleton. *J Cell Biol* **157**(5): 783-793
- Beinhauer JD (1999) Mal3p, ein neues und evolutionär konserviertes Mikrotubuli-assoziiertes Protein aus der Spaltheife *Schizosaccharomyces pombe*. *Dissertation Universität Giessen*

- Beinhauer JD, Hagan IM, Hegemann JH, Fleig U (1997) Mal3, the fission yeast homologue of the human APC-interacting protein EB-1 is required for microtubule integrity and the maintenance of cell form. *J Cell Biol* **139**(3): 717-728
- Bennett M, Onnebo SM, Azevedo C, Saiardi A (2006) Inositol pyrophosphates: metabolism and signaling. *Cell Mol Life Sci* **63**(5): 552-564
- Berman J (2006) Morphogenesis and cell cycle progression in *Candida albicans*. *Curr Opin Microbiol* **9**(6): 595-601
- Beuter C (2006) Funktionelle Charakterisierung des Mal3 Proteins bei der Organisation des Mikrotubuli-Zytoskeletts der Spalthefe *Schizosaccharomyces pombe*. *Dissertation, HHU Düsseldorf*
- Bhandari R, Chakraborty A, Snyder SH (2007a) Inositol pyrophosphate pyrotechnics. *Cell Metab* **5**(5): 321-323
- Bhandari R, Saiardi A, Ahmadibeni Y, Snowman AM, Resnick AC, Kristiansen TZ, Molina H, Pandey A, Werner JK, Jr., Juluri KR, Xu Y, Prestwich GD, Parang K, Snyder SH (2007b) Protein pyrophosphorylation by inositol pyrophosphates is a posttranslational event. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(39): 15305-15310
- Bodenmiller B, Campbell D, Gerrits B, Lam H, Jovanovic M, Picotti P, Schlapbach R, Aebersold R (2008) PhosphoPep--a database of protein phosphorylation sites in model organisms. *Nat Biotechnol* **26**(12): 1339-1340
- Brand A, Gow NA (2009) Mechanisms of hypha orientation of fungi. *Curr Opin Microbiol* **12**(4): 350-357
- Bratman SV, Chang F (2007) Stabilization of overlapping microtubules by fission yeast CLASP. *Dev Cell* **13**(6): 812-827
- Bridge AJ, Morphew M, Bartlett R, Hagan IM (1998) The fission yeast SPB component Cut12 links bipolar spindle formation to mitotic control. *Genes&Development* **12**: 927-942
- Browning H, Hackney DD (2005) The EB1 homolog Mal3 stimulates the ATPase of the kinesin Tea2 by recruiting it to the microtubule. *J Biol Chem* **280**(13): 12299-12304
- Browning H, Hackney DD, Nurse P (2003) Targeted movement of cell end factors in fission yeast. *Nat Cell Biol* **5**(9): 812-818
- Brunner D, Nurse P (2000) CLIP170-like tip1p spatially organizes microtubular dynamics in fission yeast. *Cell* **102**(5): 695-704
- Bryant DM, Mostov KE (2008) From cells to organs: building polarized tissue. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**(11): 887-901
- Burton A, Hu X, Saiardi A (2009) Are inositol pyrophosphates signalling molecules? *J Cell Physiol* **220**(1): 8-15
- Busch KE, Brunner D (2004) The microtubule plus end-tracking proteins mal3p and tip1p cooperate for cell-end targeting of interphase microtubules. *Curr Biol* **14**(7): 548-559
- Busch KE, Hayles J, Nurse P, Brunner D (2004) Tea2p kinesin is involved in spatial microtubule organization by transporting tip1p on microtubules. *Dev Cell* **6**(6): 831-843
- Carlisle PL, Banerjee M, Lazzell A, Monteagudo C, Lopez-Ribot JL, Kadosh D (2009) Expression levels of a filament-specific transcriptional regulator are sufficient to determine *Candida albicans* morphology and virulence. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(2): 599-604

- Carroll AS, O'Shea EK (2002) Pho85 and signaling environmental conditions. *Trends Biochem Sci* **27**(2): 87-93
- Castagnetti S, Behrens R, Nurse P (2005) End4/Sta2 is involved in establishment of a new growth zone in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Cell Sci* **118**(Pt 9): 1843-1850
- Castillo-Lluva S, Alvarez-Tabares I, Weber I, Steinberg G, Perez-Martin J (2007) Sustained cell polarity and virulence in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis* depends on an essential cyclin-dependent kinase from the Cdk5/Pho85 family. *J Cell Sci* **120**(Pt 9): 1584-1595
- Chang F (2001) Establishment of a cellular axis in fission yeast. *Trends Genet* **17**(5): 273-278
- Chang F, Martin SG (2009) Shaping fission yeast with microtubules. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **1**(1): a001347
- Chant J, Pringle JR (1991) Budding and cell polarity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Opin Genet Dev* **1**(3): 342-350
- Choi JH, Williams J, Cho J, Falck JR, Shears SB (2007) Purification, sequencing, and molecular identification of a mammalian PP-InsP5 kinase that is activated when cells are exposed to hyperosmotic stress. *J Biol Chem* **282**(42): 30763-30775
- Codlin S, Haines RL, Mole SE (2008) btn1 affects endocytosis, polarization of sterol-rich membrane domains and polarized growth in *Schizosaccharomyces pombe*. *Traffic* **9**(6): 936-950
- Dekker N, Speijer D, Grun CH, van den Berg M, de Haan A, Hochstenbach F (2004) Role of the alpha-glucanase Agn1p in fission-yeast cell separation. *Mol Biol Cell* **15**(8): 3903-3914
- Di Paolo G, De Camilli P (2006) Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. *Nature* **443**(7112): 651-657
- Dodgson J, Avula H, Hoe KL, Kim DU, Park HO, Hayles J, Armstrong J (2009) Functional genomics of adhesion, invasion, and mycelial formation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Eukaryot Cell* **8**(8): 1298-1306
- Drummond DR, Cross RA (2000) Dynamics of interphase microtubules in *Schizosaccharomyces pombe*. *Current Biology* **10**: 766-775
- Dubois E, Scherens B, Vierendeels F, Ho MM, Messenguy F, Shears SB (2002) In *Saccharomyces cerevisiae*, the inositol polyphosphate kinase activity of Kcs1p is required for resistance to salt stress, cell wall integrity, and vacuolar morphogenesis. *J Biol Chem* **277**(26): 23755-23763
- Fantes PA (1977) Control of cell size and cycle time in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Cell Sci* **24**: 51-67
- Fehon RG, McClatchey AI, Bretscher A (2010) Organizing the cell cortex: the role of ERM proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**(4): 276-287
- Feierbach B, Chang F (2001) Roles of the fission yeast formin for3p in cell polarity, actin cable formation and symmetric cell division. *Curr Biol* **11**(21): 1656-1665
- Feierbach B, Verde F, Chang F (2004) Regulation of a formin complex by the microtubule plus end protein tea1p. *J Cell Biol* **165**(5): 697-707
- Feoktistova A, McCollum D, Ohi R, Gould KL (1999) Identification and characterization of *Schizosaccharomyces pombe* asp1(+), a gene that interacts with mutations in the Arp2/3 complex and actin. *Genetics* **152**(3): 895-908
- Fink GR, Hicks JB, Sherman F (1983) Methods in yeast genetics, laboratory manual *Cold Spring Harbor Laboratory, New York*

- Fischer R, Zekert N, Takeshita N (2008) Polarized growth in fungi--interplay between the cytoskeleton, positional markers and membrane domains. *Mol Microbiol* **68**(4): 813-826
- Flor-Parra I, Castillo-Lluva S, Perez-Martin J (2007) Polar growth in the infectious hyphae of the phytopathogen *Ustilago maydis* depends on a virulence-specific cyclin. *Plant Cell* **19**(10): 3280-3296
- Fridy PC, Otto JC, Dollins DE, York JD (2007) Cloning and characterization of two human VIP1-like inositol hexakisphosphate and diphosphoinositol pentakisphosphate kinases. *J Biol Chem* **282**(42): 30754-30762
- Gachet Y, Hyams JS (2005) Endocytosis in fission yeast is spatially associated with the actin cytoskeleton during polarised cell growth and cytokinesis. *J Cell Sci* **118**(Pt 18): 4231-4242
- Galperin MY, Koonin EV (1997) A diverse superfamily of enzymes with ATP-dependent carboxylate-amine/thiol ligase activity. *Protein Sci* **6**(12): 2639-2643
- Gancedo JM (2001) Control of pseudohyphae formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev* **25**(1): 107-123
- Garcia I, Jimenez D, Martin V, Duran A, Sanchez Y (2005) The alpha-glucanase Agn1p is required for cell separation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Biol Cell* **97**(7): 569-576
- Garcia MA, Vardy L, Koonrugsa N, Toda T (2001) Fission yeast ch-TOG/XMAP215 homologue Alp14 connects mitotic spindles with the kinetochore and is a component of the Mad2-dependent spindle checkpoint. *Embo J* **20**(13): 3389-3401.
- Gietz RD, Schiestl RH, Willems AR, Woods RA (1995) Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure. *Yeast* **11**(4): 355-360
- Gimeno CJ, Ljungdahl PO, Styles CA, Fink GR (1992) Unipolar cell divisions in the yeast *S. cerevisiae* lead to filamentous growth: regulation by starvation and RAS. *Cell* **68**(6): 1077-1090
- Glennon MC, Shears SB (1993) Turnover of inositol pentakisphosphates, inositol hexakisphosphate and diphosphoinositol polyphosphates in primary cultured hepatocytes. *Biochem J* **293** (Pt 2): 583-590
- Glynn JM, Lustig RJ, Berlin A, Chang F (2001) Role of bud6p and tea1p in the interaction between actin and microtubules for the establishment of cell polarity in fission yeast. *Curr Biol* **11**(11): 836-845
- Goode BL, Drubi GD, Branes G (2000) Functional cooperation between the microtubule and actin cytoskeletons. *Current Opinion in Cell Biology* **12**: 63-71
- Gotoh Y, Nishida E, Shimanuki M, Toda T, Imai Y, Yamamoto M (1993) *Schizosaccharomyces pombe* Spk1 is a tyrosine-phosphorylated protein functionally related to *Xenopus* mitogen-activated protein kinase. *Mol Cell Biol* **13**(10): 6427-6434
- Gould KL, Simanis V (1997) The control of septum formation in fission yeast. *Genes Dev* **11**(22): 2939-2951
- Grallert A, Beuter C, Craven RA, Bagley S, Wilks D, Fleig U, Hagan IM (2006) *S. pombe* CLASP needs dynein, not EB1 or CLIP170, to induce microtubule instability and slows polymerization rates at cell tips in a dynein-dependent manner. *Genes Dev* **20**(17): 2421-2436
- Grande M, Lambea E, Fajardo A, Lopez-Aviles S, Kellogg D, Aligue R (2008) Crosstalk between Nap1 protein and Cds1 checkpoint kinase to maintain chromatin integrity. *Biochim Biophys Acta* **1783**(9): 1595-1604
- Guo B, Styles CA, Feng Q, Fink GR (2000) A *Saccharomyces* gene family involved in invasive growth, cell-cell adhesion, and mating. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(22): 12158-12163
- Hagan IM, Hyams JS (1988) The use of cell division cycle mutants to investigate the control of microtubule distribution in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J Cell Sci* **89**(Pt 3): 343-357

- Hoffman CS (2005) Glucose sensing via the protein kinase A pathway in *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochem Soc Trans* **33**(Pt 1): 257-260
- Holbrook ED, Rappleye CA (2008) *Histoplasma capsulatum* pathogenesis: making a lifestyle switch. *Curr Opin Microbiol* **11**(4): 318-324
- Huang D, Friesen H, Andrews B (2007) Pho85, a multifunctional cyclin-dependent protein kinase in budding yeast. *Mol Microbiol* **66**(2): 303-314
- Iden S, Collard JG (2008) Crosstalk between small GTPases and polarity proteins in cell polarization. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**(11): 846-859
- Ingram SW, Safrany ST, Barnes LD (2003) Disruption and overexpression of the *Schizosaccharomyces pombe* *aps1* gene, and effects on growth rate, morphology and intracellular diadenosine 5',5'''-P₁,P₅-pentaphosphate and diphosphoinositol polyphosphate concentrations. *Biochem J* **369**(Pt 3): 519-528
- Ishimi Y, Kikuchi A (1991) Identification and molecular cloning of yeast homolog of nucleosome assembly protein I which facilitates nucleosome assembly in vitro. *J Biol Chem* **266**(11): 7025-7029
- Ishimi Y, Kojima M, Yamada M, Hanaoka F (1987) Binding mode of nucleosome-assembly protein (AP-I) and histones. *Eur J Biochem* **162**(1): 19-24
- Isshiki T, Mochizuki N, Maeda T, Yamamoto M (1992) Characterization of a fission yeast gene, *gpa2*, that encodes a G alpha subunit involved in the monitoring of nutrition. *Genes Dev* **6**(12B): 2455-2462
- Jordan JD, Landau EM, Iyengar R (2000) Signaling networks: the origins of cellular multitasking. *Cell* **103**(2): 193-200
- Kamasaki T, Arai R, Osumi M, Mabuchi I (2005) Directionality of F-actin cables changes during the fission yeast cell cycle. *Nat Cell Biol* **7**(9): 916-917
- Katsuki M, Drummond DR, Osei M, Cross RA (2009) Mal3 masks catastrophe events in *Schizosaccharomyces pombe* microtubules by inhibiting shrinkage and promoting rescue. *J Biol Chem* **284**(43): 29246-29250
- Kawamukai M, Ferguson K, Wigler M, Young D (1991) Genetic and biochemical analysis of the adenylyl cyclase of *Schizosaccharomyces pombe*. *Cell Regul* **2**(2): 155-164
- Kellogg DR, Kikuchi A, Fujii Nakata T, Turck CW, Murray AW (1995) Members of the NAP/SET family of proteins interact specifically with B-type cyclins. *J Cell Biol* **130**(3): 661-673
- Kellogg DR, Murray AW (1995) NAP1 acts with Clb2 to perform mitotic functions and to suppress polar bud growth in budding yeast. *J Cell Biol* **130**(3): 675-685
- Kennelly PJ, Krebs EG (1991) Consensus sequences as substrate specificity determinants for protein kinases and protein phosphatases. *J Biol Chem* **266**(24): 15555-15558
- Kim DU, Hayles J, Kim D, Wood V, Park HO, Won M, Yoo HS, Duhig T, Nam M, Palmer G, Han S, Jeffery L, Baek ST, Lee H, Shim YS, Lee M, Kim L, Heo KS, Noh EJ, Lee AR, Jang YJ, Chung KS, Choi SJ, Park JY, Park Y, Kim HM, Park SK, Park HJ, Kang EJ, Kim HB, Kang HS, Park HM, Kim K, Song K, Song KB, Nurse P, Hoe KL (2010) Analysis of a genome-wide set of gene deletions in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Nat Biotechnol*
- Kim H, Yang P, Catanuto P, Verde F, Lai H, Du H, Chang F, Marcus S (2003) The kelch repeat protein, Tea1, is a potential substrate target of the p21-activated kinase, Shk1, in the fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biol Chem* **278**(32): 30074-30082
- King JS, Insall RH (2009) Chemotaxis: finding the way forward with *Dictyostelium*. *Trends Cell Biol* **19**(10): 523-530

- Klein BS, Tebbets B (2007) Dimorphism and virulence in fungi. *Curr Opin Microbiol* **10**(4): 314-319
- Kobayashi O, Suda H, Ohtani T, Sone H (1996) Molecular cloning and analysis of the dominant flocculation gene FLO8 from *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* **251**(6): 707-715
- Krogan NJ, Cagney G, Yu H, Zhong G, Guo X, Ignatchenko A, Li J, Pu S, Datta N, Tikuisis AP, Punna T, Peregrin-Alvarez JM, Shales M, Zhang X, Davey M, Robinson MD, Paccanaro A, Bray JE, Sheung A, Beattie B, Richards DP, Canadien V, Lalev A, Mena F, Wong P, Starostine A, Canete MM, Vlasblom J, Wu S, Orsi C, Collins SR, Chandran S, Haw R, Rilstone JJ, Gandi K, Thompson NJ, Musso G, St Onge P, Ghanny S, Lam MH, Butland G, Altaf-Ul AM, Kanaya S, Shilatifard A, O'Shea E, Weissman JS, Ingles CJ, Hughes TR, Parkinson J, Gerstein M, Wodak SJ, Emili A, Greenblatt JF (2006) Global landscape of protein complexes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* **440**(7084): 637-643
- Krogan NJ, Peng WT, Cagney G, Robinson MD, Haw R, Zhong G, Guo X, Zhang X, Canadien V, Richards DP, Beattie BK, Lalev A, Zhang W, Davierwala AP, Mnaimneh S, Starostine A, Tikuisis AP, Grigull J, Datta N, Bray JE, Hughes TR, Emili A, Greenblatt JF (2004) High-definition macromolecular composition of yeast RNA-processing complexes. *Mol Cell* **13**(2): 225-239
- Kron SJ, Styles CA, Fink GR (1994) Symmetric cell division in pseudohyphae of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **5**(9): 1003-1022
- La Carbona S, Le Goff C, Le Goff X (2006) Fission yeast cytoskeletons and cell polarity factors: connecting at the cortex. *Biol Cell* **98**(11): 619-631
- Laussmann T, Eujen R, Weissshuhn CM, Thiel U, Vogel G (1996) Structures of diphospho-myo-inositol pentakisphosphate and bisdiphospho-myo-inositol tetrakisphosphate from *Dictyostelium* resolved by NMR analysis. *Biochem J* **315** (Pt 3): 715-720
- Laussmann T, Pikzack C, Thiel U, Mayr GW, Vogel G (2000) Diphospho-myo-inositol phosphates during the life cycle of *Dictyostelium* and *Polysphondylium*. *Eur J Biochem* **267**(8): 2447-2451
- Lee YS, Huang K, Quioco FA, O'Shea EK (2008) Molecular basis of cyclin-CDK-CKI regulation by reversible binding of an inositol pyrophosphate. *Nat Chem Biol* **4**(1): 25-32
- Lee YS, Mulugu S, York JD, O'Shea EK (2007) Regulation of a cyclin-CDK-CDK inhibitor complex by inositol pyrophosphates. *Science* **316**(5821): 109-112
- Lew DJ, Reed SI (1993) Morphogenesis in the yeast cell cycle: regulation by Cdc28 and cyclins. *J Cell Biol* **120**(6): 1305-1320
- Li R (1997) Bee1, a yeast protein with homology to Wiscott-Aldrich syndrome protein, is critical for the assembly of cortical actin cytoskeleton. *J Cell Biol* **136**(3): 649-658
- Lin H, Fridy PC, Ribeiro AA, Choi JH, Barma DK, Vogel G, Falck JR, Shears SB, York JD, Mayr GW (2009) Structural analysis and detection of biological inositol pyrophosphates reveal that the family of VIP/diphosphoinositol pentakisphosphate kinases are 1/3-kinases. *J Biol Chem* **284**(3): 1863-1872
- Linder T, Gustafsson CM (2008) Molecular phylogenetics of ascomycotal adhesins--a novel family of putative cell-surface adhesive proteins in fission yeasts. *Fungal Genet Biol* **45**(4): 485-497
- Linder T, Rasmussen NN, Samuelsen CO, Chatzidaki E, Baraznenok V, Beve J, Henriksen P, Gustafsson CM, Holmberg S (2008) Two conserved modules of *Schizosaccharomyces pombe* Mediator regulate distinct cellular pathways. *Nucleic Acids Res* **36**(8): 2489-2504
- Lindner P (1893) *Schizosaccharomyces pombe* n. sp., ein neuer Gahrungserreger. *Wochenschr Brauerei* **10**: 1298-1300

- Longtine MS, McKenzie A, 3rd, Demarini DJ, Shah NG, Wach A, Brachat A, Philippsen P, Pringle JR (1998) Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **14**(10): 953-961
- Luo HR, Huang YE, Chen JC, Saiardi A, Iijima M, Ye K, Huang Y, Nagata E, Devreotes P, Snyder SH (2003) Inositol pyrophosphates mediate chemotaxis in *Dictyostelium* via pleckstrin homology domain-PtdIns(3,4,5)P₃ interactions. *Cell* **114**(5): 559-572
- Machesky LM, Gould KL (1999) The Arp2/3 complex: a multifunctional actin organizer. *Curr Opin Cell Biol* **11**(1): 117-121
- Madhani HD, Fink GR (1998) The control of filamentous differentiation and virulence in fungi. *Trends Cell Biol* **8**(9): 348-353
- Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J (1989) *"Molecular cloning. A laboratory manual."*, Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Marks J, Hagan IM, Hyams JS (1986) Growth polarity and cytokinesis in fission yeast: the role of the cytoskeleton. *J Cell Sci Suppl* **5**: 229-241
- Martin-Cuadrado AB, Duenas E, Sipiczki M, Vazquez de Aldana CR, del Rey F (2003) The endo-beta-1,3-glucanase eng1p is required for dissolution of the primary septum during cell separation in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Cell Sci* **116**(Pt 9): 1689-1698
- Martin-Cuadrado AB, Morrell JL, Konomi M, An H, Petit C, Osumi M, Balasubramanian M, Gould KL, Del Rey F, de Aldana CR (2005) Role of septins and the exocyst complex in the function of hydrolytic enzymes responsible for fission yeast cell separation. *Mol Biol Cell* **16**(10): 4867-4881
- Martin-Garcia R, Mulvihill DP (2009) Myosin V spatially regulates microtubule dynamics and promotes the ubiquitin-dependent degradation of the fission yeast CLIP-170 homologue, Tip1. *J Cell Sci* **122**(Pt 21): 3862-3872
- Martin SG (2009) Microtubule-dependent cell morphogenesis in the fission yeast. *Trends Cell Biol* **19**(9): 447-454
- Martin SG, Chang F (2005) New end take off: regulating cell polarity during the fission yeast cell cycle. *Cell Cycle* **4**(8): 1046-1049
- Martin SG, McDonald WH, Yates JR, 3rd, Chang F (2005) Tea4p links microtubule plus ends with the formin for3p in the establishment of cell polarity. *Dev Cell* **8**(4): 479-491
- Martin SG, Rincon SA, Basu R, Perez P, Chang F (2007) Regulation of the formin for3p by cdc42p and bud6p. *Mol Biol Cell* **18**(10): 4155-4167
- Mata J, Nurse P (1997) tea1 and the microtubular cytoskeleton are important for generating global spatial order within the fission yeast cell. *Cell* **89**(6): 939-949
- McCollum D, Balasubramanian M, Gould K (1999) Identification of cold-sensitive mutations in the *Schizosaccharomyces pombe* actin locus. *FEBS Lett* **451**(3): 321-326
- McCollum D, Feoktistova A, Morphey M, Balasubramanian M, Gould KL (1996) The *Schizosaccharomyces pombe* actin-related protein, Arp3, is a component of the cortical actin cytoskeleton and interacts with profilin. *Embo J* **15**(23): 6438-6446
- McLennan AG (2006) The Nudix hydrolase superfamily. *Cell Mol Life Sci* **63**(2): 123-143
- Menniti FS, Miller RN, Putney JW, Jr., Shears SB (1993) Turnover of inositol polyphosphate pyrophosphates in pancreatoma cells. *J Biol Chem* **268**(6): 3850-3856
- Millar JB, Buck V, Wilkinson MG (1995) Pyp1 and Pyp2 PTPases dephosphorylate an osmosensing MAP kinase controlling cell size at division in fission yeast. *Genes Dev* **9**(17): 2117-2130

- Miller PJ, Johnson DI (1994) Cdc42p GTPase is involved in controlling polarized cell growth in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Cell Biol* **14**(2): 1075-1083
- Minc N, Bratman SV, Basu R, Chang F (2009) Establishing new sites of polarization by microtubules. *Curr Biol* **19**(2): 83-94
- Mitchison JM, Nurse P (1985) Growth in cell length in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J Cell Sci* **75**: 357-376
- Mitsuzawa H (2006) Ammonium transporter genes in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*: role in ammonium uptake and a morphological transition. *Genes Cells* **11**(10): 1183-1195
- Moreno MB, Duran A, Ribas JC (2000) A family of multifunctional thiamine-repressible expression vectors for fission yeast. *Yeast* **16**(9): 861-872
- Mortensen EM, McDonald H, Yates J, 3rd, Kellogg DR (2002) Cell cycle-dependent assembly of a Gin4-septin complex. *Mol Biol Cell* **13**(6): 2091-2105
- Mosammaparast N, Ewart CS, Pemberton LF (2002) A role for nucleosome assembly protein 1 in the nuclear transport of histones H2A and H2B. *Embo J* **21**(23): 6527-6538
- Moseley JB, Goode BL (2006) The yeast actin cytoskeleton: from cellular function to biochemical mechanism. *Microbiol Mol Biol Rev* **70**(3): 605-645
- Moseley JB, Nurse P (2009) Cdk1 and cell morphology: connections and directions. *Curr Opin Cell Biol* **21**(1): 82-88
- Motegi F, Arai R, Mabuchi I (2001) Identification of two type V myosins in fission yeast, one of which functions in polarized cell growth and moves rapidly in the cell. *Mol Biol Cell* **12**(5): 1367-1380
- Mullaney EJ, Ullah AH (2003) The term phytase comprises several different classes of enzymes. *Biochem Biophys Res Commun* **312**(1): 179-184
- Mulugu S, Bai W, Fridy PC, Bastidas RJ, Otto JC, Dollins DE, Haystead TA, Ribeiro AA, York JD (2007) A conserved family of enzymes that phosphorylate inositol hexakisphosphate. *Science* **316**(5821): 106-109
- Nadal M, Garcia-Pedrajas MD, Gold SE (2008) Dimorphism in fungal plant pathogens. *FEMS Microbiol Lett* **284**(2): 127-134
- Niccoli T, Arellano M, Nurse P (2003) Role of Tea1p, Tea3p and Pom1p in the determination of cell ends in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* **20**(16): 1349-1358
- Niccoli T, Nurse P (2002) Different mechanisms of cell polarisation in vegetative and shmooing growth in fission yeast. *J Cell Sci* **115**(Pt 8): 1651-1662
- Nielsen O, Davey J (1995) Pheromone communication in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Semin Cell Biol* **6**(2): 95-104
- Nishizawa M, Komai T, Katou Y, Shirahige K, Ito T, Toh EA (2008) Nutrient-regulated antisense and intragenic RNAs modulate a signal transduction pathway in yeast. *PLoS Biol* **6**(12): 2817-2830
- Ohkuni K, Shirahige K, Kikuchi A (2003) Genome-wide expression analysis of NAP1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun* **306**(1): 5-9
- Okazaki K, Okazaki N, Kume K, Jinno S, Tanaka K, Okayama H (1990) High-frequency transformation method and library transducing vectors for cloning mammalian cDNAs by trans-complementation of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nucleic Acids Res* **18**(22): 6485-6489

- Onnebo SM, Saiardi A (2009) Inositol pyrophosphates modulate hydrogen peroxide signalling. *Biochem J* **423**(1): 109-118
- Palecek SP, Parikh AS, Kron SJ (2002) Sensing, signalling and integrating physical processes during *Saccharomyces cerevisiae* invasive and filamentous growth. *Microbiology* **148**(Pt 4): 893-907
- Pelham RJ, Chang F (2002) Actin dynamics in the contractile ring during cytokinesis in fission yeast. *Nature* **419**(6902): 82-86
- Perez P, Ribas JC (2004) Cell wall analysis. *Methods* **33**(3): 245-251
- Perez P, Rincon SA (2010) Rho GTPases: regulation of cell polarity and growth in yeasts. *Biochem J* **426**(3): 243-253
- Pesesse X, Choi K, Zhang T, Shears SB (2004) Signaling by higher inositol polyphosphates. Synthesis of bisdiphosphoinositol tetrakisphosphate ("InsP8") is selectively activated by hyperosmotic stress. *J Biol Chem* **279**(42): 43378-43381
- Petersen J, Weilguny D, Egel R, Nielsen O (1995) Characterization of *fus1* of *Schizosaccharomyces pombe*: a developmentally controlled function needed for conjugation. *Mol Cell Biol* **15**(7): 3697-3707
- Piel M, Tran PT (2009) Cell shape and cell division in fission yeast. *Curr Biol* **19**(17): R823-827
- Pollard TD (2007) Regulation of actin filament assembly by Arp2/3 complex and formins. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **36**: 451-477
- Prevorovsky M, Stanurova J, Puta F, Folk P (2009) High environmental iron concentrations stimulate adhesion and invasive growth of *Schizosaccharomyces pombe*. *FEMS Microbiol Lett* **293**(1): 130-134
- Ptacek J, Devgan G, Michaud G, Zhu H, Zhu X, Fasolo J, Guo H, Jona G, Bretkreutz A, Sopko R, McCartney RR, Schmidt MC, Rachidi N, Lee SJ, Mah AS, Meng L, Stark MJ, Stern DF, De Virgilio C, Tyers M, Andrews B, Gerstein M, Schweitzer B, Predki PF, Snyder M (2005) Global analysis of protein phosphorylation in yeast. *Nature* **438**(7068): 679-684
- Quinn CC, Wadsworth WG (2008) Axon guidance: asymmetric signaling orients polarized outgrowth. *Trends Cell Biol* **18**(12): 597-603
- Reijntjens P, Jorde S, Wendland J (2010) *Candida albicans* SH3-domain proteins involved in hyphal growth, cytokinesis, and vacuolar morphology. *Curr Genet*
- Riquelme M, Fischer R, Bartnicki-Garcia S (2003) Apical growth and mitosis are independent processes in *Aspergillus nidulans*. *Protoplasma* **222**(3-4): 211-215
- Roberts RL, Fink GR (1994) Elements of a single MAP kinase cascade in *Saccharomyces cerevisiae* mediate two developmental programs in the same cell type: mating and invasive growth. *Genes Dev* **8**(24): 2974-2985
- Rupes I, Jia Z, Young PG (1999) Ssp1 promotes actin depolymerization and is involved in stress response and new end take-off control in fission yeast. *Mol Biol Cell* **10**(5): 1495-1510
- Rupp S, Summers E, Lo HJ, Madhani H, Fink G (1999) MAP kinase and cAMP filamentation signaling pathways converge on the unusually large promoter of the yeast FLO11 gene. *Embo J* **18**(5): 1257-1269
- Safrany ST, Caffrey JJ, Yang X, Bembenek ME, Moyer MB, Burkhart WA, Shears SB (1998) A novel context for the 'MutT' module, a guardian of cell integrity, in a diphosphoinositol polyphosphate phosphohydrolase. *Embo J* **17**(22): 6599-6607
- Safrany ST, Ingram SW, Cartwright JL, Falck JR, McLennan AG, Barnes LD, Shears SB (1999) The diadenosine hexaphosphate hydrolases from *Schizosaccharomyces pombe* and *Saccharomyces*

- cerevisiae are homologues of the human diphosphoinositol polyphosphate phosphohydrolase. Overlapping substrate specificities in a MutT-type protein. *J Biol Chem* **274**(31): 21735-21740
- Saiardi A, Bhandari R, Resnick AC, Snowman AM, Snyder SH (2004) Phosphorylation of proteins by inositol pyrophosphates. *Science* **306**(5704): 2101-2105
- Saiardi A, Caffrey JJ, Snyder SH, Shears SB (2000) The inositol hexakisphosphate kinase family. Catalytic flexibility and function in yeast vacuole biogenesis. *J Biol Chem* **275**(32): 24686-24692
- Shears SB (2009) Diphosphoinositol polyphosphates: metabolic messengers? *Mol Pharmacol* **76**(2): 236-252
- Shemarova IV (2009) cAMP-dependent signal pathways in unicellular eukaryotes. *Crit Rev Microbiol* **35**(1): 23-42
- Siegrist SE, Doe CQ (2007) Microtubule-induced cortical cell polarity. *Genes Dev* **21**(5): 483-496
- Sipiczki M (2007) Splitting of the fission yeast septum. *FEMS Yeast Res* **7**(6): 761-770
- Sipiczki M, Takeo K, Grallert A (1998a) Growth polarity transitions in a dimorphic fission yeast. *Microbiology* **144** (Pt 12): 3475-3485
- Sipiczki M, Takeo K, Yamaguchi M, Yoshida S, Miklos I (1998b) Environmentally controlled dimorphic cycle in a fission yeast. *Microbiology* **144** (Pt 5): 1319-1330
- Snaith HA, Sawin KE (2003) Fission yeast mod5p regulates polarized growth through anchoring of tea1p at cell tips. *Nature* **423**(6940): 647-651
- Steinberg G (2007) Hyphal growth: a tale of motors, lipids, and the Spitzenkorper. *Eukaryot Cell* **6**(3): 351-360
- Takeda T, Chang F (2005) Role of fission yeast myosin I in organization of sterol-rich membrane domains. *Curr Biol* **15**(14): 1331-1336
- Takeshita N, Higashitsuji Y, Konzack S, Fischer R (2008) Apical sterol-rich membranes are essential for localizing cell end markers that determine growth directionality in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Mol Biol Cell* **19**(1): 339-351
- Tamaki H (2007) Glucose-stimulated cAMP-protein kinase A pathway in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biosci Bioeng* **104**(4): 245-250
- Tanaka K, Okayama H (2000) A pcl-like cyclin activates the Res2p-Cdc10p cell cycle "start" transcriptional factor complex in fission yeast. *Mol Biol Cell* **11**(9): 2845-2862
- Tanaka N, Awai A, Bhuiyan MS, Fujita K, Fukui H, Takegawa K (1999) Cell surface galactosylation is essential for nonsexual flocculation in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Bacteriol* **181**(4): 1356-1359
- Tatebe H, Nakano K, Maximo R, Shiozaki K (2008) Pom1 DYRK regulates localization of the Rga4 GAP to ensure bipolar activation of Cdc42 in fission yeast. *Curr Biol* **18**(5): 322-330
- Tatebe H, Shimada K, Uzawa S, Morigasaki S, Shiozaki K (2005) Wsh3/Tea4 is a novel cell-end factor essential for bipolar distribution of Tea1 and protects cell polarity under environmental stress in *S. pombe*. *Curr Biol* **15**(11): 1006-1015
- Terenna CR, Makushok T, Velve-Casquillas G, Baigl D, Chen Y, Bornens M, Paoletti A, Piel M, Tran PT (2008) Physical mechanisms redirecting cell polarity and cell shape in fission yeast. *Curr Biol* **18**(22): 1748-1753
- Toda T, Dhut S, Superti-Furga G, Gotoh Y, Nishida E, Sugiura R, Kuno T (1996) The fission yeast pmk1+ gene encodes a novel mitogen-activated protein kinase homolog which regulates cell integrity and functions coordinately with the protein kinase C pathway. *Mol Cell Biol* **16**(12): 6752-6764

- Verstrepen KJ, Klis FM (2006) Flocculation, adhesion and biofilm formation in yeasts. *Mol Microbiol* **60**(1): 5-15
- Vietmeier-Decker C (2004) Die Funktion des Mikrotubuli-assoziierten *S. pombe* Proteins Mal3p in der Mitose. *Dissertation, HHU Düsseldorf*
- Vos A, Dekker N, Distel B, Leunissen JA, Hochstenbach F (2007) Role of the synthase domain of Ags1p in cell wall alpha-glucan biosynthesis in fission yeast. *J Biol Chem* **282**(26): 18969-18979
- Wachtler V, Rajagopalan S, Balasubramanian MK (2003) Sterol-rich plasma membrane domains in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J Cell Sci* **116**(Pt 5): 867-874
- Walfridsson J, Khorosjutina O, Matikainen P, Gustafsson CM, Ekwall K (2007) A genome-wide role for CHD remodelling factors and Nap1 in nucleosome disassembly. *Embo J* **26**(12): 2868-2879
- Wang H, Tang X, Liu J, Trautmann S, Balasundaram D, McCollum D, Balasubramanian MK (2002) The multiprotein exocyst complex is essential for cell separation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Biol Cell* **13**(2): 515-529
- Wang Y (2009) CDKs and the yeast-hyphal decision. *Curr Opin Microbiol* **12**(6): 644-649
- Wendland J (2001) Comparison of morphogenetic networks of filamentous fungi and yeast. *Fungal Genet Biol* **34**(2): 63-82
- Wightman R, Bates S, Amornrattananan P, Sudbery P (2004) In *Candida albicans*, the Nim1 kinases Gin4 and Hsl1 negatively regulate pseudohypha formation and Gin4 also controls septin organization. *J Cell Biol* **164**(4): 581-591
- Wilson-Grady JT, Villen J, Gygi SP (2008) Phosphoproteome analysis of fission yeast. *J Proteome Res* **7**(3): 1088-1097
- Winter D, Lechler T, Li R (1999) Activation of the yeast Arp2/3 complex by Bee1p, a WASP-family protein. *Curr Biol* **9**(9): 501-504
- Wolfe BA, Gould KL (2005) Split decisions: coordinating cytokinesis in yeast. *Trends Cell Biol* **15**(1): 10-18
- Woods A, Sherwin T, Sasse R, MacRae TH, Baines AJ, Gull K (1989) Definition of individual components within the cytoskeleton of *Trypanosoma brucei* by a library of monoclonal antibodies. *J Cell Sci* **93**(Pt 3): 491-500
- Xiao We (2006) Yeast Protocols, 2nd edition. *Methods in Molecular Biology*
- Yang L, Reece JM, Cho J, Bortner CD, Shears SB (2008) The nucleolus exhibits an osmotically regulated gatekeeping activity that controls the spatial dynamics and functions of nucleolin. *J Biol Chem* **283**(17): 11823-11831
- York JD, Hunter T (2004) Signal transduction. Unexpected mediators of protein phosphorylation. *Science* **306**(5704): 2053-2055
- Zaitsevskaya-Carter T, Cooper JA (1997) Spm1, a stress-activated MAP kinase that regulates morphogenesis in *S.pombe*. *Embo J* **16**(6): 1318-1331
- Zarnack K, Feldbrugge M (2007) mRNA trafficking in fungi. *Mol Genet Genomics* **278**(4): 347-359

Zusätzliche Abbildungen

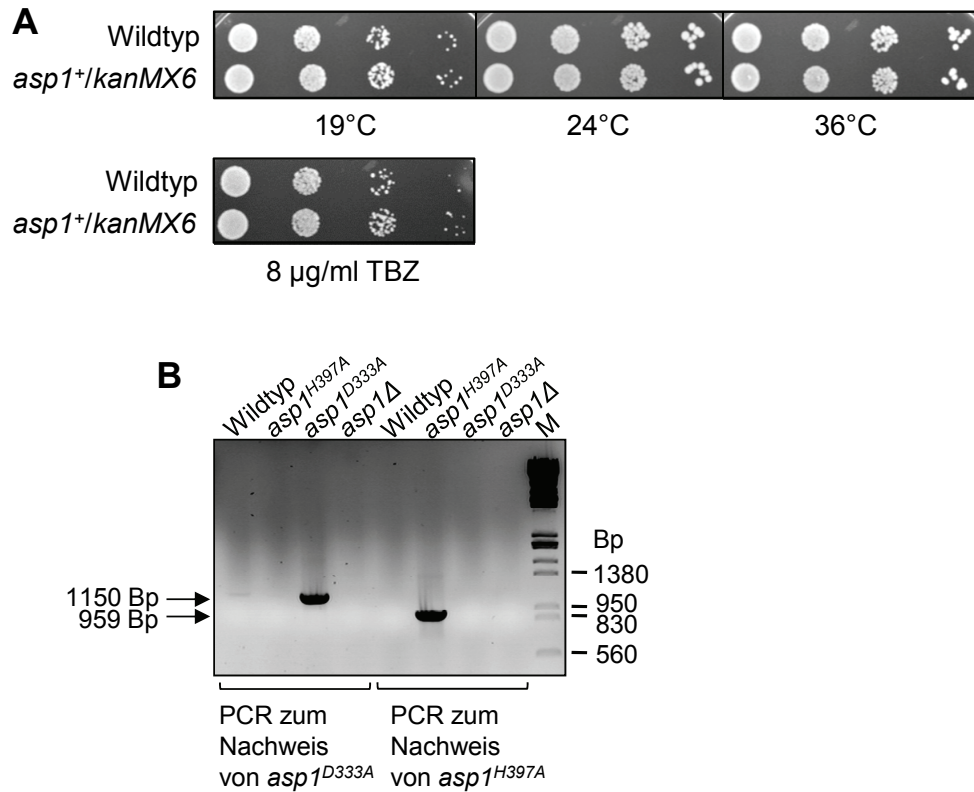


Abbildung Z1: Zusätzliche Information zur Erzeugung der *asp1^{D333A}* und *asp1^{H397A}* Mutantenstämme. (A) Die Integration des *kanMX6* Moduls 3' des *asp1* ORF hat keinen Einfluss auf das Zellwachstum. Serieller Tropftest der genannten Stämme auf YE5S. Inkubation: 19°C (7 Tage), 24°C (5 Tage), 36°C (3 Tage), 8 µg/ml TBZ: 24°C (5 Tage). (B) Nachweis der *asp1^{D333A}* und *asp1^{H397A}* ORFs durch Kolonie-PCR (vgl. Kapitel 2.11.2). Die PCR-Produkte wurden auf einem Agarosegel (1.5%) aufgetrennt. Erwartete Bandengrößen: 1150 Bp (*asp1^{D333A}*), 959 Bp (*asp1^{H397A}*). M, Längenstandard.

	<i>arp3-c1</i> x <i>asp1^{D333A}</i>			<i>arp3-c1</i> x <i>asp1Δ</i>			<i>act1-48</i> x <i>asp1^{D333A}</i>			<i>act1-48</i> x <i>asp1Δ</i>		
G418 Resistenz	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-
Kältesensitivität bei 18°C	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-

Abbildung Z2: Letalität der Doppelmutanten zwischen *asp1^{D333A}* bzw. *asp1Δ* und *act1-48* bzw. *arp3-c1*. Gezeigt ist das Wachstumsvermögen von nur drei der vier Sporen eines Tetratyps nach Kreuzung der gezeigten Stämme und anschließender Tetradenanalyse bei 30°C. G418 Resistenz = Genotyp *asp1^{D333A}* bzw. *asp1Δ*; Kältesensitivität bei 18°C = Genotyp *act1-48* bzw. *arp3-c1*. Anzahl analysierter Tetraden: *asp1^{D333A}* x *arp3-c1*: 2 x nicht-parentaler Dityp, 1 x Tetratyp; *asp1Δ* x *arp3-c1*: 1 x nicht-parentaler Dityp, 1 x parentaler Dityp, 3 x Tetratyp; *asp1^{D333A}* x *act1-48*: 2 x nicht-parentaler Dityp, 1 x parentaler Dityp, 3 x Tetratyp; *asp1Δ* x *act1-48*: 1 x nicht-parentaler Dityp, 2 x parentaler Dityp, 4 x Tetratyp.

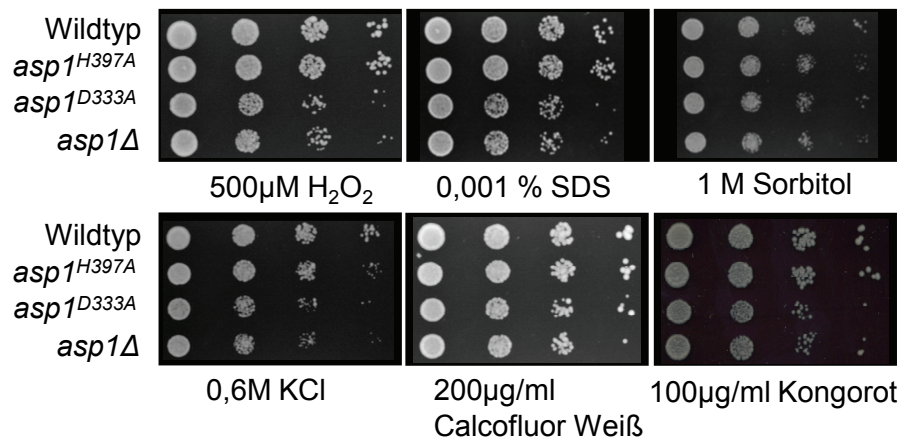


Abbildung Z3: Serielle Tropftests der genannten Stämme auf YE5S mit den angegebenen Zusätzen. Inkubation: 24°C (4 Tage).

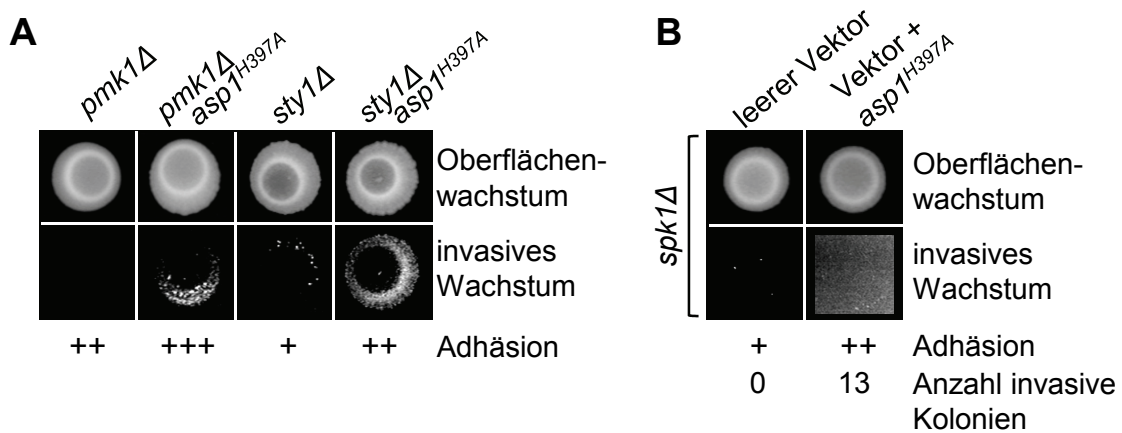


Abbildung Z4: Pmk1, Sty1 und Spk1 abhängige Signalwege werden nicht für das invasive Wachstum benötigt. (A) Die genannten Stämme wurden auf YE5S-Agar aufgetropft und 20 Tage bei 30°C inkubiert (Oberflächenwachstum). Adhäsion = nach Abspülen der Agaroberfläche mit Wasser. +, wildtypische Adhäsionsstärke. Invasives Wachstum = nach Abreiben aller verbleibenden Zellen von der Agaroberfläche. (B) Der *spk1Δ* Stamm transformiert mit leerem Vektor oder Vektor + *asp1^{H397A}* wurde auf selektives MM +Thiamin aufgetropft und 20 Tage bei 30°C inkubiert (Oberflächenwachstum). Adhäsion = nach Abspülen der Agaroberfläche mit Wasser. +, wildtypische Adhäsionsstärke. Invasives Wachstum = nach Abreiben aller verbleibenden Zellen von der Agaroberfläche. Die Anzahl invasiv wachsender Kolonien ist angegeben.

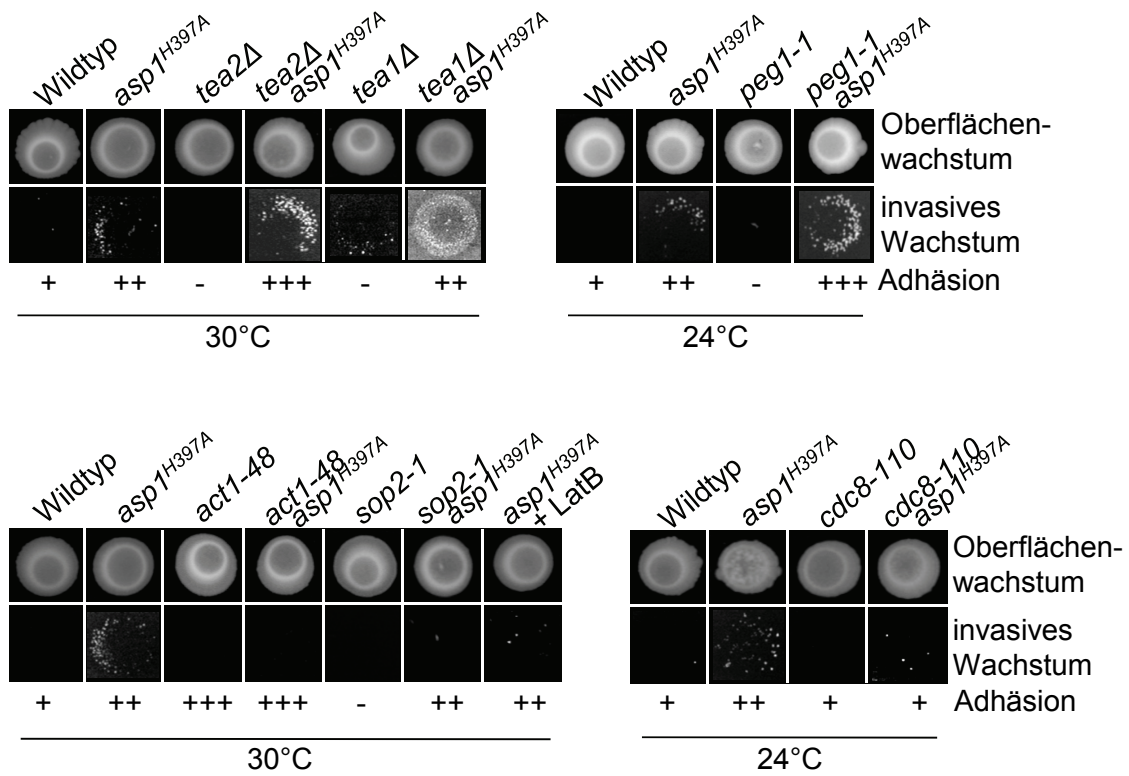


Abbildung Z5: Einfluss des Mikrotubuli- und Aktin-Zytoskeletts auf das invasive Wachstum. Die genannten Stämme wurden auf YE5S-Agar aufgetropft und 20 Tage bei 24°C oder 30°C inkubiert (Oberflächenwachstum). Adhäsion = nach Abspülen der Agaroberfläche mit Wasser. +, wildtypische Adhäsionsstärke. Invasives Wachstum = nach Abreiben aller Zellen von der Agaroberfläche.

Publikationen

- Teile dieser Arbeit wurden zur Publikation eingereicht als:

Asp1, a conserved 1/3 inositol polyphosphate kinase, regulates the dimorphic switch in *S. pombe*.

Pöhlmann J and Fleig U

in Molecular and Cellular Biology 2010

- Weitere Publikationen:

Fta2, an essential fission yeast kinetochore component, interacts closely with the conserved Mal2 protein.

Kerres A, Jakopec V, Beuter C, Karig I, Pöhlmann J, Pidoux A, Allshire R, Fleig U

Mol Biol Cell. 2006 Oct; 17(10):4167-78

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die in den letzten Jahren zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben.

An erster Stelle möchte ich Frau Dr. Ursula Fleig danken, in deren Arbeitsgruppe ich diese Arbeit zu diesem spannenden Thema anfertigen durfte. Dabei möchte ich mich für die engagierte Betreuung, Diskussionsbereitschaft und vielen fachlichen Ratschläge sowohl bei der Laborarbeit als auch bei Präsentationen und in der „Schreibphase“ dieser Arbeit bedanken. Ebenso möchte ich mich für die Möglichkeit bedanken, an den interessanten Konferenzen in Kopenhagen und Tokio teilnehmen zu können.

Herrn Prof. Beye danke ich für die bereitwillige Übernahme des Zweitgutachtens.

Meinen Laborkollegen Boris, Eva, Marcus, Steffi und Visnja danke ich für die gute Laboratmosphäre und Zusammenarbeit. Visnja danke ich für das Korrekturlesen dieser Arbeit. Den Mitgliedern der AG Hegemann danke ich ebenso für das freundliche Institutsklima und die Hilfsbereitschaft bei fachlichen Fragen.

Der größte Dank geht an die Menschen außerhalb der Labors, die mich immer unterstützt und ermutigt haben.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorgelegte Dissertation eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe verfasst habe. Diese Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den

Jennifer Pöhlmann