

Charakterisierung des neuen äußeren Kinetochorsubkomplexes Spc7-Sos7 in der Spaltheefe *Schizosaccharomyces pombe*

Inaugural – Dissertation

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

vorgelegt von

Visnja Jakopec

aus Neuss

Düsseldorf, April 2011

Aus dem Institut für Mikrobiologie,
Lehrstuhl für funktionelle Genomforschung der Mikroorganismen
der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

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

Referent: PD Dr. U. Fleig

Koreferent: Prof. Dr. P. Westhoff

Tag der mündlichen Prüfung: 20.06.2011

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	3
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	7
ZUSAMMENFASSUNG	9
SUMMARY	11
 1 EINLEITUNG	 13
1.1 Die Verbindung von Defekten in der Chromosomensegregation und schwerwiegenden Erkrankungen ...	13
1.2 Mitotische Komponenten in der Krebstherapie	15
1.3 Die Spalthefe <i>S. pombe</i> als Modellorganismus für die Aufklärung mitotischer Prozesse	16
1.4 Die Chromosomensegregation ist in den Zellzyklus eingebettet.....	17
1.5 Die Mitose in <i>S. pombe</i>	18
1.6 Zentromer-Chromatin in Eukaryoten.....	21
1.6.1 Die Zentromerregion der Spalthefe <i>S. pombe</i>	22
1.6.2 Die Divergenz der Zentromere zwischen den Spezies	24
1.7 Der Kinetochorkomplex	27
1.7.1 Die Chromatin-interagierenden Kinetochorproteine	27
1.7.1.1 Der Mis16-Mis18-Komplex	28
1.7.1.2 Der Sim4-Komplex	28
1.7.1.3 Der Mal2-Fta2-Subkomplex in <i>S. pombe</i>	30
1.7.2 Die Spindel-interagierenden Kinetochorproteine	31
1.7.2.1 Der DASH-Komplex	31
1.7.2.2 Der NMS-Komplex: 1. Der MIND-Subkomplex	32
1.7.2.3 Der NMS-Komplex: 2. Der Ndc80-Subkomplex	33
1.7.2.4 Der NMS-Komplex: 3. Die Spc7/Spc105/Blinkin/KNL-1-Familie	34
1.8 Die mitotische Spindel	36
1.8.1 Aufbau der mitotischen Spindel	36
1.8.2 Bindung der mitotischen Spindel an die Kinetochore	37
1.8.3 Die mitotische Spindel in der Anaphase	39
1.9 Komponenten des mitotischen Spindel-Apparates	40
1.9.1 Motorproteine	40
1.9.1.1 Dynein.....	41
1.9.1.2 Kinesine.....	41
1.9.2 Mikrotubuli-assoziierte Proteine (MAPs)	42
1.9.3 Chromosomaler Passenger Komplex (CPC)	43
1.9.4 Der Mikrotubuli-Bündler Ase1.....	44
1.9.5 Die Clp1 Phosphatase	44
1.10 Zielsetzung dieser Arbeit.....	45

2 MATERIAL UND METHODEN	46
2.1 Chemikalien	46
2.2 Enzyme	47
2.3 Sonstige Materialien	48
2.4 Kits	48
2.5 Antikörper	49
2.6 Bioinformatische Programme	50
2.7 Oligonukleotide, Vektoren und <i>S. pombe</i> Stämme	50
2.8 weitere Zellen oder Zelllinien	62
2.9 Medien und Kultivierung	63
2.10 Paarung haploider <i>S. pombe</i> Stämme und Genotypbestimmung	65
2.11 Transformation und Transfektion	66
2.12 Molekularbiologische Methoden	69
2.13 Biochemische Methoden	71
2.14 Immunpräzipitation	73
2.15 Mikroskopie	75
2.16 Durchflusszytometrie <i>S. pombe</i>	78
3 ERGEBNISSE	79
3.1 Das konservierte Spc7 Protein wird für die Spindel-Integrität benötigt und verbindet den Sim4- und den NMS- Kinetochorkomplex	79
3.1.1 Die <i>spc7-23</i> Mutante zeigt die stärksten Defekte in der Chromosomensegregation	79
3.1.2 Die Abnahme von Spc7-23-GFP am Kinetochor korreliert mit dem Anstieg der Defekte in der Chromosomensegregation	82
3.1.3 Der Spindelkontrollpunkt liegt im <i>spc7-23</i> Mutantenstamm aktiviert vor	83
3.1.4 Der NMS-Komplex wird nicht für die transkriptionelle Stilllegung des Zentromers benötigt	84
3.1.5 Spc7 stellt eine Komponente des NMS-Komplexes dar, die eng mit dem MIND-Komplex interagiert	86
3.1.6 Spc7 und der Mal2-Fta2-Subkomplex des Sim4-Superkomplexes interagieren miteinander	89
3.1.7 Spc7 wird für die Integrität der Spindel benötigt	93
3.1.8 Genetische Interaktionen zwischen Spc7 und Mikrotubuli Plusend assoziierten Proteinen	95
3.2 Identifizierung der Spc7 Kinetochor- und Spindel-Bindedomänen	98
3.2.1 Spc7-N-GFP ko-lokalisiert mit der mitotischen Spindel während Spc7-C-GFP am Kinetochor assoziiert	98
3.2.2 Zwei Domänen des N-Terminus von Spc7 interagieren mit der mitotischen Spindel	99
3.2.2.1 Spc7 besitzt zwei NLS-Sequenzen im N-Terminus	99
3.2.2.2 Die Assoziation des N-Terminus von Spc7 an die mitotische Spindel erfolgt über mindestens zwei Domänen	101
3.2.2.3 Eine direkte Interaktion zwischen Spc7-N und Tubulin kann nicht nachgewiesen werden	101
3.2.2.4 Spc7 besitzt eine NES-Sequenz	102
3.2.2.4.1 Das Entfernen der Spc7 NES-Sequenz führt zur Akkumulation des Proteins im Zellkern	103
3.2.2.5 N-terminale Spc7 Fragmente beeinflussen das Wachstum des Wildtypstammes	104
3.2.3 Die Kinetochorbindedomäne des Spc7 Proteins kann auf die AS Region 1116-1290 eingegrenzt werden	105
3.2.3.1 Spc7 kann eventuell an Membranen assoziieren	107
3.2.3.2 Die Expression des Spc7 F13-NLS Fragments führt zu einer veränderten Ploidie	108

3.2.3.3 Die Anwesenheit des F5 bzw. F7 Fragments führt zu einer erhöhten TBZ-Sensitivität.....	110
3.2.3.4 Die Überexpression der Spc7 Fragmente FC und F5 supprimiert den ts Phänotyp der <i>spc7-23</i> und <i>sos7-178</i> Kinetochormutanten	111
3.2.4 Spc7 besitzt mindestens vier NLS-Sequenzen	112
3.2.5 Das Spc7 Protein agiert über verschiedene Domänen mit der Spindel und dem Kinetochor	114
3.3 Identifizierung und Analyse neuer Spc7 Interaktionspartner.....	115
3.3.1 <i>mpd2</i>⁺ und <i>btf3</i>⁺, zwei ORFs auf dem V11 Plasmid, supprimieren den Wachstumsdefekt der <i>spc7-23</i> Mutante	115
3.3.1.1 Weitergehende Charakterisierung des <i>mpd2</i>⁺ Suppressors	117
3.3.1.1.1 Die <i>mpd2</i> ⁺ Überexpression führt zu einer Spc7-23-GFP Re-Assoziation an den Kinetochorkomplex	117
3.3.1.1.2 Zusätzliches <i>mpd2</i> ⁺ supprimiert den Wachstumsdefekt einer Vielzahl von Stämmen mit mutanten Kinetochorkomponenten.....	118
3.3.1.2 Btf3 beeinflusst das Mikrotubuli Zytoskelett und supprimiert die Chromosomensegregationsdefekte der <i>spc7-23</i> Mutante	119
3.3.1.2.1 Die Suppression des ts Phänotyps der <i>spc7-23</i> Mutante durch extra <i>btf3</i> ⁺ ist dosisabhängig.....	119
3.3.1.2.2 Zusätzliches <i>btf3</i> ⁺ führt zu einer Spc7-23-GFP Re-Lokalisierung	120
3.3.1.2.3 Das Btf3 Protein lokalisiert hauptsächlich im Zytoplasma.....	122
3.3.1.2.4 Btf3 ist ein nicht-essentiell Protein, das die Anzahl der Mikrotubuli beeinflusst	123
3.3.1.2.5 Durch die Abwesenheit von Btf3 wird das Wachstum von mutanten Kinetochorstämmen negativ beeinflusst	126
3.3.2 Extra <i>Sos8</i> supprimiert den temperaturabhängigen Phänotyp vieler Stämme mit mutanten Kinetochorkomponenten.....	127
3.3.3 Die NMS-Komponente <i>Sos7</i> ist essentiell für die Chromosomensegregation in <i>S. pombe</i> und Mitglied einer neuen evolutionär konservierten Kinetochorproteinfamilie	129
3.3.3.1 Identifizierung von <i>sos7</i> ⁺ als Suppressor des ts Phänotyps der <i>spc7</i> ^{ts} Mutanten	129
3.3.3.2 Die Überexpression von <i>Sos7</i> führt zu einer Re-Lokalisierung von Spc7-23 am Kinetochor	131
3.3.3.3 <i>Sos7</i> ist eine essentielle, konstitutive Komponente des Kinetochors	133
3.3.3.4 <i>Sos7</i> kann <i>in vivo</i> mit sich selbst interagieren	135
3.3.3.5 Generierung und Primärcharakterisierung der <i>sos7</i> ^{ts} Mutanten	136
3.3.3.6 Defekte im <i>Sos7</i> Protein führen zu Chromosomenfehlsegregation	139
3.3.3.7 Die letzten sieben AS des <i>Sos7</i> Proteins scheinen für dessen Stabilität benötigt zu werden	142
3.3.3.8 <i>Sos7</i> wird nicht für die transkriptionelle Stilllegung der zentralen Zentromerregion benötigt	144
3.3.3.9 Weitergehende Analyse der <i>sos7Δ7</i> Mutante.....	145
3.3.3.9.1 <i>Sos7</i> wird für den Eintritt in die M-Phase benötigt	145
3.3.3.9.2 Die Elongation der <i>sos7Δ7</i> Zellen geht mit einer Erhöhung der Ploidie einher.....	147
3.3.3.10 Die Überexpression von <i>sos7-c</i> führt zu massiven Defekten in der Chromosomensegregation.....	150
3.3.3.11 Der negative Wachstumseffekt von <i>Sos7-C</i> wird teilweise durch GFP-Atb2 supprimiert	152
3.3.3.12 Der Aufbau der bipolaren Spindel wird durch <i>Sos7-C</i> gestört.....	152
3.3.3.13 <i>Sos7-C</i> kann am Kinetochor assoziieren	156
3.3.3.14 <i>Sos7</i> und <i>Spc7</i> interagieren physikalisch miteinander	158
3.3.3.15 <i>Sos7</i> ist eine neue Komponente des NMS-Komplexes	160
3.3.3.16 Das <i>Sos7</i> Protein wird nicht für die Kinetochorassoziation von Sim4-Komplex Komponenten benötigt	165
3.3.3.17 <i>Sos7</i> ist ein hochkonserviertes Protein.....	167
3.3.3.18 <i>Sos7</i> ist nicht in Hefen mit einem Punktzentromer konserviert.....	169
3.3.3.19 Das humane C10orf118 Protein ist vermutlich kein Homolog vom <i>S. pombe</i> <i>Sos7</i>	171

3.3.3.20 Der anti- <i>S. pombe</i> -Sos7 Antikörper bindet eine DNA-assoziierte Struktur in humanen Zellen	173
3.3.3.21 Ist Zwint das humane Sos7 Homolog?	175
3.4 <i>fta2-291</i> Suppressor Screen: zwei neue Fta2 Interaktionspartner	177
3.4.1 Der Translations-Initiationsfaktor <i>sui1</i> ⁺ agiert als Suppressor des mutanten Phänotyps verschiedener Stämme des Sim4-Komplexes.....	177
3.4.2 Die Anwesenheit des V23 Plasmids supprimiert spezifisch den Wachstumsdefekt der <i>fta2-291</i> Mutante	179
3.5 Etablierung eines neuen Klonierungssystems für <i>S. pombe</i> Plasmide in der Hefe <i>S. cerevisiae</i>.....	180
3.5.1 <i>S. pombe</i> Plasmide der pUR- und pREP- Serie sind auch in <i>S. cerevisiae</i> funktionell	180
3.5.2 <i>In vivo</i> Rekombination eines <i>S. pombe</i> Vektors in <i>S. cerevisiae</i> ist möglich	182
3.5.3 Vom <i>S. pombe nmt1</i> ⁺ -Promotor gelesene Proteine werden auch in <i>S. cerevisiae</i> transkribiert	183
4 DISKUSSION	185
Spc7 und Sos7 bilden einen Subkomplex des äußeren Kinetochors, der für die Kinetochor-Mikrotubuli-Verknüpfung essentiell ist	185
I. Die Funktion des Spc7 Proteins	186
4.1.1 Spc7 wird für die Kinetochor-Spindel-Verknüpfung benötigt.....	186
4.1.2 Die Assoziation von Spc7 mit der mitotischen Spindel.....	190
4.1.3 Spc7 beeinflusst den Aufbau und die Funktion der mitotischen Spindel	194
4.1.4 Der <i>spc7</i> Suppressor Btf3 beeinflusst das Mikrotubuli-Zytoskelett und supprimiert dadurch möglicherweise den Wachstumsdefekt der <i>spc7</i> Mutante	196
4.1.5 Mögliche Gründe für die Suppression durch Mpd2	198
II. Die Funktion des Sos7 Proteins	200
4.2.1 Die Sos7-Proteinfamilie bildet eine neue Untereinheit des NMS-Komplexes und ist strukturell mit der Zwint- und Kre28-Familie verwandt	200
4.2.2 Sos7 ist eine essentielle, konstitutive Komponente des Kinetochors, die für die Verknüpfung mit den Spindel-Mikrotubuli benötigt wird	203
4.2.3 Die Expression einer C-terminalen Sos7 Variante führt zu massiven Defekten im Aufbau und der Integrität der mitotischen Spindel.....	204
III. Spc7 und Sos7 bilden einen Subkomplex innerhalb des NMS-Komplexes	206
IV. Neue Interaktionspartner des Fta2 Kinetochorproteins.....	209
4.4.1 Supprimiert Pin1 oder das durch SPCC16C4.02c ORF kodierte Protein den Wachstumsdefekt der <i>fta2-291</i> Mutante?	210
4.4.2 Beeinflusst Sui1 die Histon H3 Variante CENP-A und somit den Sim4-Komplex?	211
V. Aufbau des <i>S. pombe</i> Kinetochors: Der NMS- und Sim4-Komplex	213
4.5.1 Das Kinetochor assembliert vermutlich horizontal in <i>S. pombe</i>	213
4.5.2 Die NMS- und Sim4-Kinetochorkomplexe sind genetisch über die Spc7-Sos7- und Mal2-Fta2-Subkomplexe miteinander verbunden	216
LITERATURVERZEICHNIS	219
PUBLIKATIONEN	234
DANKSAGUNG	235
ERKLÄRUNG.....	236

Abkürzungsverzeichnis

Δ	Gen-Deletion
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
+TIP	Plus-End-assoziierte Proteine
μl	Mikroliter
μM	Mikromolar
μm	Mikrometer
<i>A. flavus</i>	<i>Aspergillus flavus</i>
<i>A. gossypii</i>	<i>Ashbya gossypii</i>
<i>A. nidulans</i>	<i>Aspergillus nidulans</i>
A	Adenin
Abb.	Abbildung
AD	Aktivierungsdomäne
AK	Antikörper
Amp ^R	Ampicillin-Resistenz
APC	“anaphase promoting complex”
arg	Arginin
ARS	autonom replizierende Sequenzen
AS	Aminosäure/n
BD	Bindedomäne
Bp	Basenpaar/e
bzw.	beziehungsweise
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
<i>C. glabrata</i>	<i>Candida glabrata</i>
C	Cystein
C	Cytosin
C-Terminus	Carboxy-Terminus
ca.	circa
CH-Domäne	Calponin-Homologie-Domäne
Chr.	Chromosom
D	Asparaginsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EMM	Edinburgh Minimal Medium
F	Phenylalanin
G	Glycin
G	Guanin
g	Gramm
G1-Phase	“gap 1” (postmitotische Phase in der Interphase)
G2-Phase	“gap 2” (postsynthese Phase in der Interphase)
G418	Geneticin-Disulfat
GFP	grün fluoreszierendes Protein
h	Stunde/n
HeLa	erste humane Zelllinie der Patientin <u>Henrietta Lacks</u>
His	Histidin
Hyg ^R	Hygromycin-Resistenz
I	Isoleucin
IF	Immunfluoreszenz

<i>K. lactis</i>	<i>Klyveromyces lactis</i>
Kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
<i>L. thermotolerans</i>	<i>Lachancea thermotolerans</i>
L	Leucin
leu	Leucin
LMB	Leptomycin B
M-Phase	Teilungsphase
MAP	Mikrotubuli-assoziiertes Protein
Mb	Megabasenpaare
MBC	Methyl-2-benzimidazolcarbamat
Min	Minute/n
MM	Minimal Medium
MTOC	Mikrotubuli organisierendes Zentrum
<i>N. crassa</i>	<i>Neurospora crassa</i>
N-Terminus	Amino-Terminus
N	Asparagin
NAC	„nascent-polypeptide-associated complex“
ng	Nanogramm
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
OD	optische Dichte
ORF	offener Leserahmen eines Gens
PAA	„post anaphase array“
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
Q	Glutamin
R	Arginin
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RZZ-Komplex	Rod-ZW10-Zwilch-Komplex
S-Phase	Synthesephase des Zellzyklus
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>S. japonicus</i>	<i>Schizosaccharomyces japonicus</i>
<i>S. macrospora</i>	<i>Sordaria macrospora</i>
<i>S. pombe</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
S	Serin
sek	Sekunde
SPB	Spindelpolkörper
T	Threonin
T	Thymin
TBZ	Thiabendazol
thia	Thiamin
ts	temperatursensitiv
ura	Uracil
Ü/N	über Nacht
<i>V. polyspora</i>	<i>Vanderwaltozyma polyspora</i>
V	Valin
W	Tryptophan
X	Stopp
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid
Y	Tyrosin
YFP	gelb fluoreszierendes Protein
z. B.	zum Beispiel
<i>Z. rouxii</i>	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
z. T.	zum Teil

Zusammenfassung

Eine der frühesten zytologischen Untersuchungen eukaryotischer Zellen durch Walther Flemming im Jahre 1882 identifizierte eine Region auf jedem Chromosom, die für die präzise Verteilung des Chromatins essentiell ist. Heute weiß man, dass in dieser spezifischen DNA-Region eine Protein-Maschinerie assembliert, die als Kinetochor bezeichnet wird. Der Kinetochorkomplex ist zirka 5 MDa groß und besteht aus bis zu 100 Proteinen, die in mehreren, teilweise hoch konservierten Subkomplexen organisiert sind. Fast 140 Jahre nach Flemming's Arbeiten ist die genaue Wirkungsweise der einzelnen Subkomplexe dieses zentralen Regulators der Mitose immer noch nicht verstanden und, wie meine Arbeit zeigt, sind immer noch nicht alle essentiellen Komponenten dieser Protein-Maschinerie identifiziert. Der korrekte Ablauf der Mitose wird durch den Kinetochorkomplex dirigiert und resultiert in der genauen Verteilung der duplizierten Chromosomen auf die beiden Folgezellen. Fehler in diesem Prozess führen zu Aneuploidie, dem Verlust oder Zugewinn ganzer Chromosomen. Aneuploide Zellen sind meist nicht lebensfähig oder führen zu Abnormitäten. So wird Aneuploidie mit einer Vielzahl von Tumorarten, neurodegenerativen Krankheiten und auch der Zell- und Organismus-Alterung in Verbindung gebracht.

Die Kinetochorsubkomplexe können in DNA interagierende und mit dem Spindel-Apparat interagierende Proteine unterteilt werden. In unserer Modellhefe, der Spalthefe *Schizosaccharomyces pombe*, ist der Sim4-Kinetochorsubkomplex mit dem Zentromerchromatin assoziiert, während der evolutionär hoch konservierte NMS-(Ndc80-Komplex/MIND-Komplex/Spc7) Kinetochorsubkomplex essentiell für die Kinetochor-Spindelmikrotubuli-Verknüpfung ist.

Diese Arbeit befasst sich mit der Funktionsweise der NMS-Komponente Spc7, die mit 153,5 kDa das größte *S. pombe* Kinetochorprotein darstellt. Meine zellbiologischen und genetischen Analysen zeigen, dass Spc7 ein Verbindungsglied zum separat existierenden Sim4-Komplex bildet und dass Spc7 zusammen mit dem MIND-Komplex eine Untereinheit des NMS-Komplexes darstellt. Der C-terminale Teil des Spc7 Proteins bindet an den Kinetochorkomplex, während der N-terminale Teil direkt mit Mikrotubuli-assoziiert. Mit der Generierung und Analyse von 36 unterschiedlich großen Spc7 Proteinfragmenten konnten die Kinetochor-Bindedomäne auf 175 Aminosäuren eingegrenzt und drei potentielle Mikrotubuli-bindende Domänen identifiziert werden. Außerdem wurden die NLS- und NES-Sequenzen dieses Proteins identifiziert. Die Generierung der unterschiedlichen Spc7 Konstrukte in *S. pombe* Plasmiden wurde mit einer von mir entwickelten *in vivo* Klonierungsmethode durchgeführt.

Neben seiner Funktion am Kinetochor reguliert der C-Terminus von Spc7 auch die Formation und Integrität der bipolaren Spindel. Die Expression einer dominant negativen Spc7 Variante in *S. pombe* führt zu massiven Spindeldefekten in allen 3 mitotischen Spindelstadien.

Mit Hilfe einer hoch saturierten extragenen Multikopien-Suppressoranalyse einer *spc7* Mutante konnte ich mehrere neue Interaktionspartner dieser Kinetochorkomponente identifizieren. Ich habe die Funktion von 3 dieser Proteine, nämlich Btf3, Mpd2 und Sos7 charakterisiert, wobei mein Hauptaugenmerk auf der Analyse des Sos7 Proteins lag. Mit Sos7 gelang die Identifikation einer bis dato nicht bekannten, hoch konservierten Familie von Kinetochorproteinen. Sos7 ist eine essentielle neue Komponente des NMS-Komplexes, die über ihr C-terminales Ende direkt mit Spc7 interagiert. Durch Generierung und Analyse von konditional-letalen *sos7* Mutanten konnte eine essentielle Rolle von Sos7 bei der Chromosomensegregation, der Verknüpfung der antiparallelen Mikrotubuli der bipolaren Spindel sowie beim Aufbau des MIND-Spc7-Sos7 Subkomplexes definiert werden.

Eine Datenbank-Analyse identifizierte eine Reihe von Sos7-ähnlichen Proteinen in Pilzen. Keines dieser Proteinen wurde bis dato charakterisiert, allerdings zeigt meine Analyse des Sos7 homologen Proteins aus *S. japonicus*, dass Sos7 eine neue Familie von Kinetochorproteinen definiert. Interessanterweise kommen Sos7 Homologe nicht in Mitgliedern der Familie der *Saccharomycetaceae* vor, die im Gegensatz zu den übrigen Pilzen und höheren Eukaryoten ein Punktzentromer tragen. Somit kann die evolutionäre Weiterentwicklung des Zentromers erstmals anhand einer Proteinfamilie dokumentiert werden.

Summary

One of the earliest cytological analyses of eukaryotic cells conducted by Walther Flemming in 1882 revealed on every chromosome a region that is essential for precise chromatin segregation. Today it is known that on this specific chromatin-region a huge protein machinery, the kinetochore, assembles. The kinetochore complex has a molecular mass of approximately 5 MDa and contains up to 100 proteins. These proteins are organized into different protein subcomplexes some of which show evolutionary conservation. Nearly 140 years after Flemming's discovery the specific function of some subcomplexes is still poorly understood. Indeed as shown by my work, not all components of this broad protein machinery have been identified.

The kinetochore complex orchestrates mitosis which results in the accurate segregation of the duplicated chromosomes to the two daughter cells. Defects in this process lead to aneuploidy i. e. the loss or gain of whole chromosomes. In most cases aneuploid cells are not viable or can lead to severe abnormalities. Thus a connection exists between aneuploidy, cancer, neurodegenerative diseases and ageing.

The kinetochore subcomplexes can be divided roughly into the chromatin and spindle interacting components. In our model organism, the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*, the Sim4 kinetochore complex is associated with the centromere chromatin while the evolutionary conserved NMS-(Ndc80-complex/MIND-complex/Spc7) kinetochore subcomplex is essential for the kinetochore-spindle-microtubule connection.

In this work I have analyzed the function of the NMS network component Spc7, the largest kinetochore protein in *S. pombe* of 153.5 kDa size. My cell biological and genetic analyses revealed a role for Spc7 as a connecting element to the separate Sim4 complex and uncovered that Spc7 together with the MIND complex forms a subunit of the NMS network.

The C-terminus of Spc7 is kinetochore connected while the N-terminus associates with microtubules. With the generation and analysis of 36 different Spc7 fragments I mapped the kinetochore binding domain to a 175 amino acid region and identified three putative microtubule binding sites. To generate the different Spc7 constructs I developed an *in vivo* cloning system in *S. cerevisiae*.

Apart from its function at the kinetochore the C- terminus of Spc7 is also required for the formation and integrity of the bipolar spindle. The expression of a dominant negative Spc7 variant in *S. pombe* leads to massive defects in all of the three mitotic spindle stages.

With a highly saturated multicopy suppressor screen of a *spc7* mutant I isolated several new interaction partners of this kinetochore component. I characterized 3 of these proteins, namely Btf3, Mpd2 and in great detail Sos7. Sos7 is an essential new component of the NMS network and interacts via its C-terminus with Spc7. With the generation and analysis of

conditional lethal *sos7* mutants, I discovered an essential role for Sos7 in chromosome segregation, the connection of antiparallel microtubules of the bipolar spindle and the assembly of the MIND-Spc7-Sos7 subcomplex.

A data base search identified many Sos7-like proteins. None of them has been characterized but my analysis of the *S. japonicus* Sos7 homologue revealed a new family of kinetochore proteins. Interestingly the family of *Saccharomycetaceae* which carries in contrast to other fungi and higher eukaryotes a point-centromere, harbors no Sos7 homologue. Therefore the evolutionary developments of kinetochore complexes can be documented using this protein family.

1 Einleitung

1.1 Die Verbindung von Defekten in der Chromosomensegregation und schwerwiegenden Erkrankungen

Die präzise Verteilung des Erbmateri­als auf die Folgezellen ist essen­tiell für den Fortbestand allen Lebens. Dabei müssen die Chromatiden präzise verdoppelt und während der Meiose oder Mitose akkurat verteilt werden. Kann die eukaryotische Zelle diese Prozesse nicht gewährleisten, können Aneuploidien auftreten (Cimini & Deg­rassi, 2005). Aneuploidie, der Zugewinn oder Verlust ganzer Chromosomen, führt meist zum Zelltod. Beim Menschen sind nur drei Trisomien bekannt, die lebensfähig sind. Die bekannteste ist die Trisomie 21, auch Down Syndrom genannt, bei der Chromosom 21 in dreifacher Kopie vorliegt. Bei Patienten mit Down Syndrom treten häufig sowohl körperliche Fehlbildungen als auch Störungen der geistigen Entwicklung auf. Mit Ausnahme von Mosaik-Trisomien gehen Trisomien aus meiotischen Defekten hervor (Gardiner et al, 2010; Patterson, 2009). Fehler in der Mitose können folgenreiche Erkrankungen auslösen. So finden sich aneuploide Nervenzellen bei Patienten mit neurodegenerativen Erkrankungen wie der Alzheimer Erkrankung, auch wenn bisher nicht gezeigt werden konnte, ob die Erkrankung eine Konsequenz der Chromosomenfehlverteilung ist (Iourov et al, 2011; Migliore et al, 2011; Ward et al, 1979; Zekanowski & Wojda, 2009).

Des Weiteren gibt es Zusammenhänge zwischen Aneuploidie und der vorzeitigen Organismus-Alterung. Diese wurden in Mäusen gefunden, bei denen die Expression der Spindelkontrollpunkt­komponente BubR1 nur 10 % der wildtypischen beträgt. Der evolutionär konservierte Spindelkontrollpunkt kontrolliert vor der Segregation der Schwesterchromatiden, ob diese korrekt bipolar mit der mitotischen Spindel verknüpft sind. Erst nach dem erfolgreichen Anbinden der bipolar ausgerichteten Schwesterchromatiden an die mitotische Spindel wird die Arretierung, die bis zu diesem Zeitpunkt durch den Spindelkontrollpunkt aufrechterhalten wurde, aufgehoben und die Schwesterchromatiden werden segregiert. Mäuse, die nun eine zu geringe Menge an BubR1 besitzen zeigen neben einer verkürzten Lebensspanne eine Vielzahl von Alterserscheinungen wie Muskelschwund und altersbedingte Erkrankungen (Baker et al, 2005; Baker et al, 2004; Baker et al, 2008). Die reduzierte Menge an BubR1 in den Mäusen geht mit massiven Defekten in der Chromosomensegregation und daraus resultierenden Aneuploidien einher (Baker et al, 2004; Fang & Zhang, 2011).

Aneuploide Zellen werden häufig in Tumorzellen diagnostiziert (Fang & Zhang, 2011; Foijer, 2010). Krebserkrankungen sind eine der häufigsten Todesursachen in Industriestaaten. Im Jahre 2009 war laut Statistischem Bundesamt Krebs die zweithäufigste Todesursache in Deutschland. Eine Vielzahl von Forschungseinrichtungen versucht Krebs zu bekämpfen,

aber um Krebszellen gezielt vernichten zu können, ist es von essentieller Bedeutung die involvierten Komponenten zu identifizieren und deren Wirkmechanismus zu verstehen. Obwohl bereits Hanseemann (1890) und Boveri (1914) postulierten, dass Tumore durch eine unkorrekte Zahl an Chromosomen ausgelöst werden, ist bis heute unklar, ob Aneuploidie eine Voraussetzung oder die Konsequenz der Tumorentstehung ist (De Wulf et al, 2009d; Thompson et al, 2010). Eine anerkannte Antwort auf die Frage der Krebsentstehung gibt es nicht. Man ist sich allerdings darüber einig, dass die Abfolge von Wachstum, Zellteilung und Apoptose, dem programmierten Zelltod, der eingeleitet wird, wenn schwerwiegende Defekte in der Zelle auftreten, in Krebszellen gestört ist (Hanahan & Weinberg, 2000). Die allgemeingültige Hypothese besagt, dass mehrere Veränderungen in einer gesunden Zelle auftreten müssen, die u. a. die unkontrollierte Proliferation der Zelle einleiten und den Prozess der Apoptose ausschalten, damit diese zur Krebszelle wird (Hanahan & Weinberg, 2000).

Aufgrund von endogenen oder exogenen Ursachen treten in jedem Lebewesen vereinzelt Mutationen im Genom auf. Dabei sind Mutationen besonders schwerwiegend in Komponenten, die den Zellzyklus und damit die Abfolge von Wachstum, Zellteilung und ggf. Apoptose überwachen, sowie solchen, die an der präzisen Replikation der Chromatiden sowie deren akkuraten Verteilung auf die Tochterzellen beteiligt sind. Diese lösen meist eine Instabilität des Genoms aus, in der viele den Auslöser von Krebs sehen. Bei genomischer Instabilität wird zwischen Mikrosatelliteninstabilität (MIN) oder chromosomaler Instabilität (CIN) unterschieden (Thompson et al, 2010; Weaver & Cleveland, 2006). Da MIN keine Aneuploidien in Krebszellen hervorruft wird im Folgenden nur CIN diskutiert (Lengauer et al, 1997; Strate & Syngal, 2005; Weaver & Cleveland, 2006).

CIN führt zur Aneuploidie und wurde in über 85 % der soliden Krebsarten diagnostiziert (Rajagopalan & Lengauer, 2004; Weaver & Cleveland, 2006). Die Mechanismen, die zu CIN führen, setzen die Genauigkeit der Mitose herab und beinhalten unter anderem Defekte in folgenden Prozessen:

- die Kohäsion, die Verbindung der Schwesterchromatiden, die nach der Chromatin-Replikation bis zur eigentlichen Separation der Schwesterchromatiden aufrecht erhalten werden muss,
- Zellzyklusregulatoren, die die Abfolge von Wachstum und akkurater Zellteilung überwachen und gegebenenfalls den Zelltod auslösen,
- sowie die Zentrosomen, von denen aus die mitotische Spindel polymerisiert (Thompson et al, 2010).

Ein großer Teil der Mechanismen die zu CIN führen geht auf die Fehlregulation von Komponenten des Kinetochorkomplexes zurück und beinhaltet:

- den Aufbau der Kinetochore, die als Multiproteinorganellen auf dem Zentromerchromatin assemblieren und für die Bindung an die Mikrotubuli des Spindel-Apparates benötigt werden,
- die Kinetochor-Mikrotubuli Verknüpfung selbst,
- den Spindelkontrollpunkt, der am Kinetochor assembliert wird und dort erst nach korrekter Bindung der Kinetochore an die Mikrotubuli ein Signal zur Fortsetzung der Mitose gibt (Thompson et al, 2010).

In einer Vielzahl von Krebsarten konnten besonders häufig Mutationen, erhöhte Expressionsmengen sowie veränderte epigenetische Modifikationen einer Vielzahl von Kinetochorkomponenten festgestellt werden. So wurden in Krebszellen häufig Mutationen im Tumorsuppressor „Adenomatous Polyposis Coli“ gefunden, der zeitweise am Kinetochor assoziiert und für dessen Funktion und Struktur essentiell ist (De Wulf et al, 2009d). Das Kinetochorprotein HEC1 („highly expressed in cancer“), eine Komponente des auch in *S. pombe* konservierten Ndc80-Komplexes, wurde aufgrund einer erhöhten Expression in Krebszellen identifiziert und die Kinetochor-assoziierten Spindelkontrollpunktkomponenten Bub1 und BubR1, die die korrekte Verknüpfung der Kinetochore mit den Mikrotubuli überwachen, sind in Tumorzellen aberrant modifiziert (De Wulf et al, 2009d).

Das humane Homolog des in dieser Arbeit untersuchten evolutionär konservierten Spc7 Kinetochorproteins ist ebenfalls bei Patienten mit Lungenkrebs hoch exprimiert diagnostiziert worden (Takimoto et al, 2002). Außerdem findet man in Patienten mit akuter lymphoblastischer Leukämie ein Hybridprotein, das aus dem N-Terminus der MLL1-Histon Methyltransferase und dem C-Terminus des humanen Spc7 gebildet wurde und aufgrund einer Translokation zweier Chromosomen entstanden ist (Ansari et al, 2009; Hayette et al, 2000; Hess, 2004). Da meine Arbeiten und die anderer Arbeitsgruppen zeigen konnten, dass der C-Terminus von Spc7 für eine Kinetochorassoziation ausreichend ist, kann vermutet werden, dass das MLL1-Fragment über Spc7-C fälschlicherweise am Kinetochor assoziiert und dort durch Änderungen in der Chromatinstruktur fatale Defekte in der Chromosomensegregation auslöst (Kerres et al, 2007; Kiyomitsu et al, 2007).

1.2 Mitotische Komponenten in der Krebstherapie

Das Hauptmerkmal von Tumoren ist die unkontrollierte Proliferation der Krebszellen. Mit Substanzen, die eine wachstumshemmende Wirkung besitzen, wird versucht den Tumor

chemisch an weiterem Wachstum zu hindern und ihn zu zerstören. Eine Vielzahl von den heute eingesetzten Zytostatika wirken direkt gegen die Mikrotubuli, aus denen der Spindel-Apparat aufgebaut ist. Prinzipiell wird zwischen zwei Gruppen von Mikrotubuli angreifenden Zytostatika unterschieden: solche, die den Aufbau des Spindel-Apparates stören, z. B. die Vincaalkaloide und solche, zu denen die Taxane gehören, die den Abbau verhindern (Pellegrini & Budman, 2005; Rowinsky et al, 1992). Diese Zytostatika wirken systemisch auf alle teilenden Zellen und verursachen eine Vielzahl von Nebenwirkungen. Da Mikrotubuli auch in nicht mitotischen Prozessen essentiell sind, sind gegen Mikrotubuli gerichtete Zytostatika im geringen Maße toxisch für alle Zellen (De Wulf et al, 2009c).

All diese Erkenntnisse forcieren die Suche nach Mitteln, die nur Mitose-relevante Proteine direkt angreifen. Hierfür bieten sich vor allem bereits identifizierte Kinetochorproteine oder Spindel-Apparat-assoziierte Proteine an, deren Funktionsweise oder Modifizierungen bereits bekannt sind. Zum einen wird durch direkte Bindung eines Zytostatikums an ein Kinetochorprotein versucht, dessen Funktionsverlust herbeizuführen und die Zellteilung zu inhibieren. Da aber auch solche Zytostatika systemisch agieren, wird zusätzlich versucht neue Zytostatika zu entwickeln bzw. Naturstoffe zu isolieren, die nur die in Krebszellen epigenetisch veränderten Proteine wie die Spindelkontrollpunkt-komponenten Bub1 bzw. BubR1 erkennen und inhibieren (De Wulf et al, 2009c).

Mit systematischen genomweiten Analysen wird nach weiteren neuen Komponenten gesucht, die in den Prozess der CIN involviert sind (Collins et al, 2007; Yuen et al, 2007). So wurden z. B. 130 Stämme der Knospungshefe *S. cerevisiae* in einem Instabilitätsassay isoliert, bei denen die Abwesenheit von jeweils nur einem Protein zu einer erhöhten Verlustrate eines nicht essentiellen Chromosoms führte und Genkonversion und Translokationen im Genom auftreten lies (Yuen et al, 2007). Die Genprodukte dieses Assays waren u. a. am Replikationsursprung oder am Chromatin selbst, dem Kinetochor oder den Mikrotubuli-assoziiert (Yuen et al, 2007). Durch die Charakterisierung dieser und weiterer Komponenten, die in den Zellzyklus bzw. dessen Kontrolle involviert sind, sollte zukünftig die Entwicklung neuer relativ nebenwirkungsfreier Zytostatika möglich sein, mit denen proliferierende Krebszellen bekämpft werden können.

1.3 Die Spalthefe *S. pombe* als Modellorganismus für die Aufklärung mitotischer Prozesse

Die Spalthefe *Schizosaccharomyces pombe* eignet sich hervorragend, um die Ereignisse der Zellteilung näher zu untersuchen. Der Ablauf der essentiellen Prozesse, die notwendig sind, damit es zur Verdopplung der Zelle kommt, der Aufbau des Kinetochors und dessen

Verknüpfung an die mitotische Spindel ähneln stark den höheren Eukaryoten. Nicht nur die Prozesse, sondern auch eine Vielzahl von involvierten Komponenten sind evolutionär konserviert. *S. pombe* ist als einzelliger Eukaryot methodisch besser zu handhaben und leichter genetisch manipulierbar (z. B. homologe Rekombination) als Organismen, die aus einer Vielzahl von verschiedenen Geweben bestehen. (Berry & Gould, 1996; de Bruin & Wittenberg, 2009; Gartenberg, 2009; Hayles & Nurse, 2001; Karlsson-Rosenthal & Millar, 2006; Martin, 2009; Pines, 1996). So kann die Spaltheife *S. pombe* als genetischer Modellorganismus zur Isolierung von neuen mitotischen Komponenten sowie deren Charakterisierung genutzt werden.

Mit der Isolierung der evolutionär hoch konservierten NMS-Komplexkomponente Sos7 in *S. pombe* und ihrer Charakterisierung sowie die ihres Interaktionspartners Spc7 gelang es in dieser Arbeit, zu einem besseren Verständnis der mitotischen Prozesse der Kinetochorassemblierung sowie der Mikrotubuli-Kinetochor-Verknüpfung zu kommen. Bereits viele der für Spc7 publizierten Ergebnisse erwiesen sich daraufhin in höheren Eukaryoten als konserviert (Kerres et al, 2007; Kiyomitsu et al, 2007; Schittenhelm et al, 2009).

1.4 Die Chromosomensegregation ist in den Zellzyklus eingebettet

Die Chromosomensegregation erfolgt in der M-(Mitose) Phase des Zellzyklusses, in der das Erbmateriale akkurat auf die beiden Folgezellen verteilt wird (Abbildung 1.1). Diese wird abgelöst durch die Interphase, in der das Zellwachstum stattfindet und die Vorbereitungen für die nächste Zellteilung getroffen werden. Die Interphase gliedert sich in drei Phasen. Die G1-Phase („gap“1 oder Präsynthese-Phase) schließt an die M-Phase an (Abbildung 1.1). Mittels eines Kontrollpunkts wird der Übergang von der G1- zur S-Phase (Synthese-Phase) überwacht. In dieser kommt es zur präzisen Replikation der Schwesterchromatiden. Daraufhin tritt die Zelle in die G2-Phase ein, die in *S. pombe* ca. 70 % des Zellzyklus ausmacht (Abbildung 1.1) (Moser & Russell, 2000). Damit die *S. pombe* Zelle die Interphase verlassen und in die Mitose eintreten kann, muss der G2/M-Kontrollpunkt überschritten werden, der unter anderem überprüft, ob das Chromatin vollständig repliziert wurde. Mit der Aktivierung des MPF („M-Phase promoting factor“), einer Zyklin-abhängigen Kinase, die den Zellzyklus steuert, wird die Mitose eingeleitet (Beck et al, 2010; Hagan, 2008; Moser & Russell, 2000; Nurse, 1990; Perry & Kornbluth, 2007). Die Separation der Schwesterchromatiden und damit der Austritt aus der Mitose werden durch die Deaktivierung des MPF reguliert (Chang et al, 2001; Yanagida, 2000). Die Zelle durchläuft daraufhin die Zytokinese, so dass zwei neue G1-Zellen entstehen (Abbildung 1.1 A).

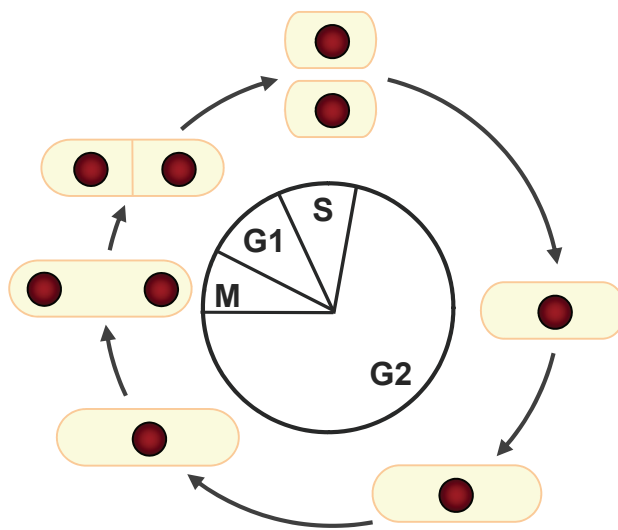


Abbildung 1.1: Vegetativer Zellzyklus der Spaltheefe *Schizosaccharomyces pombe*.

Der Zellzyklus umfasst den Bereich von einer Zellteilung zur nächsten. In diesem Zeitraum durchläuft die Zelle die Interphase, die sich aus G1-, S- und G2-Phase zusammensetzt und die Mitose (M). Zu Beginn der Interphase (G1) zeigen die haploiden *S. pombe* Zellen eine Zelllänge von $\sim 7 \mu\text{m}$. Während der anschließenden S-Phase kommt es zur DNA-Synthese, so dass die Zellen ihre DNA verdoppeln. Die Schwesterchromatiden sind zu diesem Zeitpunkt verbunden. In der G2-Phase, die in *S. pombe* 70 % des Zellzyklus ausmacht, erfolgt das Hauptwachstum. Die Zelle wächst bis zu einer Größe von $\sim 14 \mu\text{m}$

und leitet die Mitose ein, in der jeweils ein Schwesterchromatid zu einem Zellende transportiert wird. Nach Beenden der Mitose, beginnt mit der G1-Phase ein weiterer Zyklus der DNA-Vermehrung und -Teilung. Abbildung modifiziert aus Novak et al, 1998.

1.5 Die Mitose in *S. pombe*

Beim Übergang von G2 in die Mitose kommt es zum Abbau der zytoplasmatischen Interphase-Mikrotubuli (Abbildung 1.2 A) (Hagan & Hyams, 1988). Mit dem Beginn der Prophase werden die Chromosomen ca. fünffach kondensiert. Der Spindelpolkörper („SPB“ - in höheren Eukaryoten das Zentrosom) ist das Mikrotubuli-organisierende Zentrum während der Mitose. Dieser lokalisiert während der Interphase außerhalb des Zellkerns. Mit Beginn der Mitose lagern sich die in der späten G2-Phase duplizierten SPBs in die Kernmembran ein (Abbildung 1.2 B) (Ding et al, 1997; Fong et al, 2010). Anders als in höheren Eukaryoten kommt es in *S. pombe* während der gesamten Mitose nicht zum Abbau der Kernmembran (Hetzer, 2010; McCully & Robinow, 1971; Mitchison, 1970). Man spricht von einer geschlossenen Mitose. Die bipolare mitotische Spindel wird zwischen den SPBs aufgebaut (Abbildung 1.2 B) (Hagan & Petersen, 2000; Yanagida, 1987). Die Mikrotubuli, die die mitotische Spindel aufbauen, werden als Pol-Mikrotubuli bezeichnet: die Mikrotubuli eines SPBs reichen über die Äquatorialebene hinaus und überlappen mit den Mikrotubuli des zweiten SPBs in der Zellmitte (Abbildung 1.2 C) (Hyams & Borisy, 1978; Tanaka & Kanbe, 1986). Außerdem kommt es in der Prophase zur Ausbildung der Astral-Mikrotubuli: Diese gehen ebenfalls vom SPB aus, reichen allerdings in das Zytoplasma. Sie binden während der Mitose an die Zellenden und richten die Spindel korrekt in der Zelle aus (Abbildung 1.2 C) (Carminati & Stearns, 1997; Hagan & Hyams, 1988).

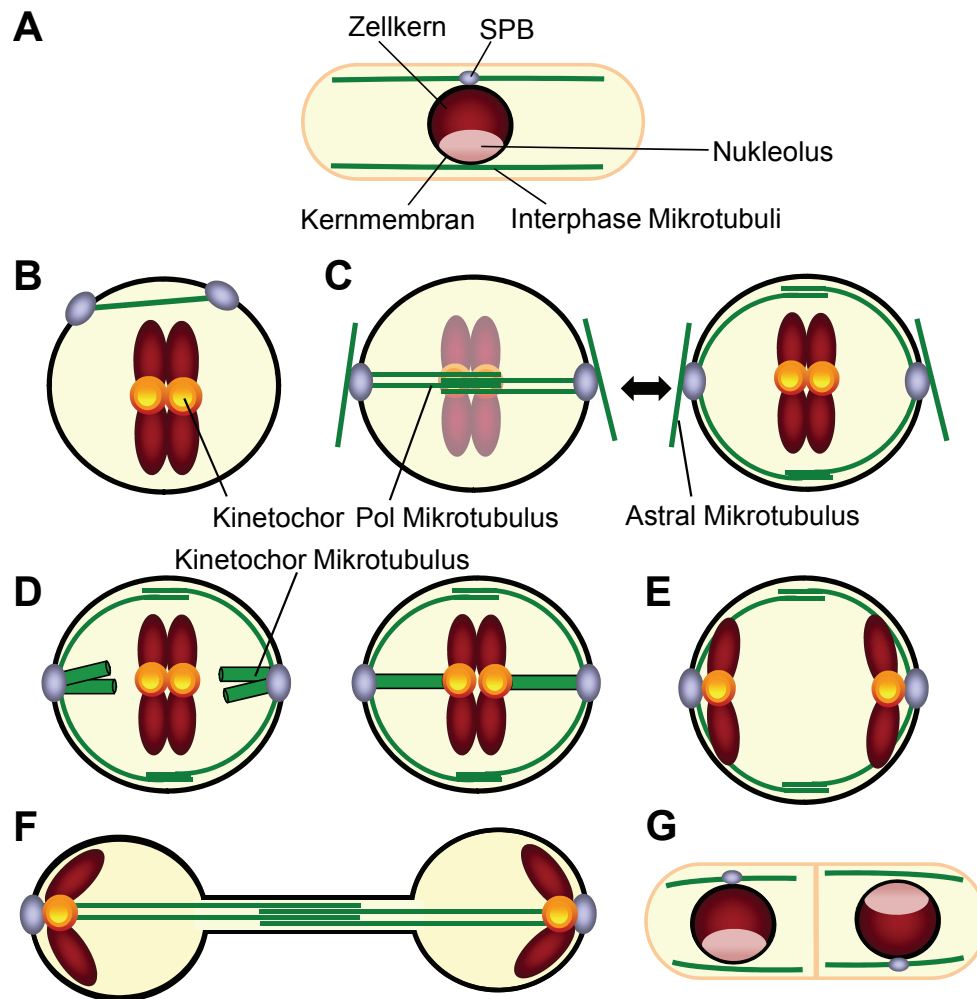


Abbildung 1.2: Die Mitose in der Spaltheife *S. pombe*.

(A) Schematische Darstellung einer Interphase Zelle, mit dem durch die Kernmembran umgebenen Zellkern, den Interphase Mikrotubuli und dem SPB, der sich außerhalb der Kernmembran im Zytoplasma befindet. Gegenüber vom SPB findet sich der Nukleolus. In den nachfolgenden Illustrationen bis einschließlich (F) wird nur der Zellkern vergrößert dargestellt. (B) Der duplizierte SPB wird in die Kernmembran eingelagert. Zwischen den beiden SPBs wird die mitotische Spindel aufgebaut, die aus Pol-Mikrotubuli besteht. Zeitgleich kondensieren die Chromosomen, deren Schwester-Chromatiden mittels Kohäsinen aneinander gekoppelt sind (Kohäsion). Aus Gründen der Vereinfachung wird nur ein Chromosom während der Mitose dargestellt. (C) Die von den SPBs ausgehenden Pol-zu-Pol-Mikrotubuli überlappen in der Zellmitte. Um die folgenden Prozesse besser darstellen zu können, wird für die Pol-zu-Pol-Mikrotubuli die rechte Darstellung im Folgenden gewählt. Auch vom SPB ausgehend polymerisieren die Astralmikrotubuli in das Zytoplasma, sie werden während der Mitose zur Ausrichtung der Spindel in der Zelle benötigt. Aus Gründen der Vereinfachung sind sie nur in (C) dargestellt, sie finden sich aber bis einschließlich der Telophase an den SPBs. (D) Neben den Pol-zu-Pol-Mikrotubuli bilden sich von den SPBs ausgehend Mikrotubuli aus, die an den jeweiligen Kinetochoren der einzelnen Schwester-Chromatiden binden und als Kinetochor-Mikrotubuli bezeichnet werden. Erst wenn geprüft wurde, dass alle Chromosomen korrekt bipolar an der mitotischen Spindel ausgerichtet sind, kommt es zum Übergang in die Anaphase und durch die Degradierung der Kohäsine zum Abbau der Kohäsion. In der Anaphase A (E) werden die Kinetochor Mikrotubuli abgebaut und die Schwester-Chromatiden werden zu den entgegengesetzten SPBs transportiert. Ist dieser Vorgang abgeschlossen (F) kommt es zur rapiden Elongation der Pol-zu-Pol-Mikrotubuli und die DNA wandert zu den gegenüberliegenden Zellenden. (G) Nach der Zytokinese entstehen zwei Folgezellen.

Mit dem Beginn der Metaphase ordnen sich die Chromosomen in der Äquatorialebene der Zelle an (Toda et al, 1981). Während des Arrangements der Chromosomen an der sog. Metaphase Platte, kommt es zur Auflösung der Bindung zwischen den einzelnen Kinetochoren, den Anknüpfungspunkten der mitotischen Spindel an den Chromosomen, die die meiste Zeit im *S. pombe* Zellzyklus an den SPBs gebunden vorliegen (Toda et al, 1981). Die Schwesterchromatiden werden bipolar ausgerichtet und jeweils ein Schwesterkinetochor wird mit den sog. Kinetochor-Mikrotubuli ausgehend von einem der beiden gegenüberliegenden SPBs gebunden (Abbildung 1.2 D) (Joglekar et al, 2010).

Ein weiterer Kontrollpunkt, der Spindelkontrollpunkt, überwacht den Übergang von Metaphase zu Anaphase. Die Bindung der Kinetochore an die Mikrotubuli *per se* und ihre bipolare Ausrichtung werden überwacht. Der Zellzyklus kann am Meta-/Anaphase Übergang in *S. pombe*, anders als in Humanzellen, nur transient aufgehalten werden (Amon, 1999; He et al, 1998; He et al, 1997; Ikui et al, 2002; Millband & Hardwick, 2002).

Nach dem Verlassen der Metaphase kommt es zur Degradierung des Zyklins Cdc13 durch den APC und damit zur Inaktivierung des Cdc2/Cdc13 Dimers. Nur so kann das Ende der Mitose gewährleistet werden (Lorca et al, 1992). Der APC ist auch für die Auflösung der Bindung zwischen den Schwesterchromatiden verantwortlich (Oliveira & Nasmyth, 2010; Tanaka, 2010; Yamashita et al, 1999). Es kommt zur Aufspaltung des Kohäsins, eines Proteinkomplexes, der vermutlich ringförmig das Chromatin der Schwesterchromatiden einschließt, und damit zum Aufheben der Kohäsion (Dorsett, 2010; Nasmyth & Haering, 2009). In der Anaphase A werden die Schwesterchromatiden durch den Abbau der Kinetochor-Mikrotubuli zu den SPBs gezogen (Abbildung 1.2 E) (Ding et al, 1997). Die SPBs weichen durch die rapide elongierenden Pol-zu-Pol-Mikrotubuli in der Anaphase B auseinander und die Schwesterchromatiden werden zu den entgegengesetzten Zellenden transportiert (Abbildung 1.2 F) (Courtheoux et al, 2009; Funabiki et al, 1993; Hagan, 1998).

Zum Ende der Mitose, in der Telophase, werden die Chromosomen wieder de-kondensiert und die mitotische Spindel abgebaut. Durch zwei neue Mikrotubuli-organisierende Zentren (MTOCs) in der Zellmitte, kommt es zum Aufbau des Interphasen-Mikrotubuli-Zytoskeletts. Die darauffolgende Zytokinese lässt zwei unabhängige Folgezellen entstehen (Abbildung 1.2 G) (Hagan et al, 1988; Hagan, 1998; Hagan & Hyams, 1988; Horio et al, 1991; Zimmerman et al, 2004).

1.6 Zentromer-Chromatin in Eukaryoten

Nach der korrekten Bindung der mitotischen Spindel an die Kinetochore kommt es zur Segregation des Chromatins während der Mitose (Lamb & Birchler, 2003). Das Kinetochor, ein spezifischer Proteinkomplex, wird an charakteristischen Strukturen der Chromosomen, den Zentromeren, assembliert (Torras-Llort et al, 2009). Zentromere verschiedener Organismen unterscheiden sich grundlegend in ihrer Struktur und evolvieren sehr stark. Prinzipiell existieren genetisch und epigenetisch definierte Zentromere (Malik & Henikoff, 2009). So sind Punktzentromere genetisch einzig über die DNA Sequenz definiert. Die Knospungshefe *S. cerevisiae* besitzt ein sogenanntes Punktzentromer, das aus 125 Bp besteht. Diese Sequenz genügt, um ein funktionelles Kinetochor entstehen zu lassen (Biggins & Walczak, 2003; Fitzgerald-Hayes et al, 1982; McAinsh et al, 2003).

Bei dem epigenetisch definierten Zentromer kann zwischen zwei Formen unterschieden werden, dem regionalen sowie dem holozentrischen Zentromer (Morris & Moazed, 2007). Die Spaltheife *S. pombe* und andere höhere Eukaryoten besitzen ein regionales Zentromer, das sich über mehrere Kb erstreckt und aus repetitiven DNA-Fragmenten zusammengesetzt ist (Pidoux & Allshire, 2004). Die Länge reicht dabei von 3 - 4,5 Kb in dem pathogenen Pilz *C. albicans* bis zu 4 Mb pro Zentromer beim Menschen (Buscaino et al, 2010). Holozentrische Organismen wie der Fadenwurm *C. elegans* weisen dahingegen kein lokalisiertes Zentromer auf. In solchen Fällen findet sich über den gesamten Bereich des Chromosoms eine große Anzahl von Anknüpfungspunkten für die mitotische Spindel, die bei der Chromosomensegregation parallel genutzt werden (Maddox et al, 2004). Aber auch Organismen mit einem regionalen Zentromer können Chromosomen mit mehr als einem Zentromer aufweisen. So besitzt z.B. die Fruchtfliege *D. melanogaster* Elemente des Zentromers auch in anderen Regionen, die sich über das gesamte Chromosom erstrecken. Diese werden nicht durch ihre Sequenz definiert, stattdessen verhelfen epigenetische Faktoren diesen Regionen als funktionelles, sogenanntes Neozentromer zu dienen (du Sart et al, 1997; Karpen & Allshire, 1997; Maggert & Karpen, 2001; Sun et al, 2003; Williams et al, 1998). Aber auch in *S. pombe* oder humanen Zellen finden sich Chromosomen mit Neozentromeren (Ishii et al, 2008; Marshall et al, 2008). Beim Menschen sind bisher 90 dieser dizentrischen Chromosomen bekannt, auch wenn eins der beiden Zentromere in der Regel nicht aktiv vorliegt (Marshall et al, 2008).

Im Folgenden wird die Zentromerregion der Spaltheife *S. pombe* weiter im Detail besprochen. Diese ist aufgrund des Aufbaus des Zentromer-Chromatins, ihrer Länge, dem Vorhandensein von repetitiven und komplexen Elementen und der Notwendigkeit epigenetischer Faktoren dem Zentromer von höheren Eukaryoten sehr ähnlich (Allshire & Karpen, 2008; Sharp & Kaufman, 2003).

1.6.1 Die Zentromerregion der Spaltheife *S. pombe*

Die Spaltheife *S. pombe* besitzt drei Chromosomen und somit drei Zentromere, die in ihrer Größe von 35 Kb bis 110 Kb variieren. Der Aufbau der Zentromere ist gleich, auch wenn sich die Anzahl der verschiedenen Elemente unterscheidet (Pidoux & Allshire, 2004). Die zentrale Kernregion (*cnt*-, „*central core domain*“) ist in allen drei Zentromeren konserviert und umfasst einen Bereich von vier bis sieben Kb, der keine repetitiven Sequenzen enthält. Anders als die *cnt*-Region sind die sie umgebenden Elemente aus repetitiven Sequenzen zusammengesetzt (Abbildung 1.3). Diese werden, aufgrund ihrer unterschiedlichen Sequenzähnlichkeiten untereinander, in zwei Bereiche unterteilt. Die *imr*-Wiederholungen („*innermost repeats*“) gliedern sich beiderseits direkt an die *cnt*-Region und werden von den *otr*-Wiederholungen („*outermost repeats*“) flankiert. Während die *imr*-Regionen in ihrer Sequenz keine Homologien zwischen den einzelnen Chromosomen aufweisen, offenbaren die *otr* Regionen im *dg*-Element (siehe Abbildung 1.3) 97 % und im *dh*-Element 48 % Homologie zu den Sequenzen der anderen *S. pombe* Chromosomen (Pidoux & Allshire, 2004; Wood et al, 2002). Die Anzahl der *imr*- und *otr*-Bereiche unterscheidet sich auf den drei Chromosomen und erklärt die zu Beginn erwähnten Größenunterschiede.

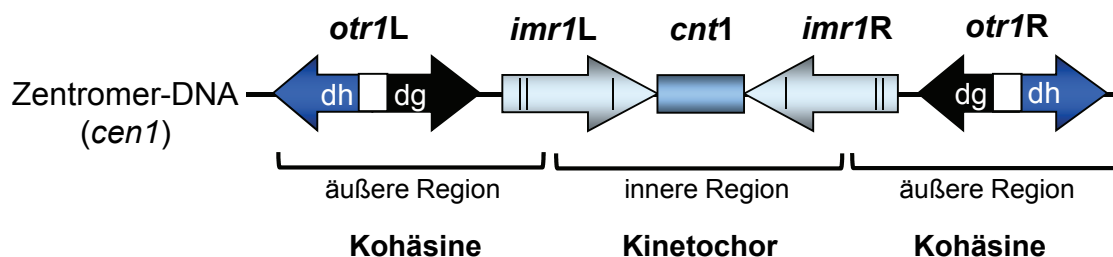


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung des *S. pombe* Zentromers I (*cen1*).

Das Zentromer von Chromosom I (*cen1*) wird aus der zentralen Kernregion (*cnt*) aufgebaut, die von flankierenden inneren (*imr*) und äußeren (*otr*) repetitiven Sequenzen umgeben ist. Die äußeren repetitiven Sequenzen (*otr*) teilen sich in die *dg*- und *dh*-Fragmente, die unterschiedlich stark auf den drei *S. pombe* Chromosomen konserviert sind. Die äußere Region wird aus Heterochromatin aufgebaut und ist für die Kohäsion von essentieller Bedeutung, die innere Region wird aus einer einmaligen Chromatinstruktur gebildet. Diese wird für den Aufbau des Kinetochors *per se* benötigt. Die Trennung der beiden Regionen erfolgt über eine tRNA Chromatinbarriere.

Neben der Gliederung in den *cnt*-Bereich, der von verschiedenen repetitiven Einheiten umgeben ist, erfolgt eine Aufteilung in die innere und die äußere Zentromerregion, die sich durch andersartige Aufgaben und in ihrer Chromatinstruktur unterscheiden (Abbildung 1.3).

Bei Chromatin handelt es sich um einen Komplex aus DNA und Proteinen, den Histonen. Histone treten als Oktamer auf und setzen sich aus vier verschiedenen Histon-Untereinheiten (H2A, H2B, H3 und H4) zusammen. Vereinfacht gesagt wird, je nachdem wie hoch die Packungsdichte der Histone ist, d. h. die Anzahl der Histone in einem DNA-Abschnitt, zwischen Eu- und Heterochromatin unterschieden (Trojer & Reinberg, 2007). Euchromatin, bei dem die Packungsdichte der Histone relativ gering ist, zeigt eine hohe Genaktivität, während Heterochromatin durch die große Anzahl an Histonen sehr kondensiert vorliegt und somit als inaktiv angesehen werden kann (Comings, 1967). Teilweise kommt es bei fakultativem Heterochromatin zu einer Expression von Genen, während konstitutives nie exprimiert wird. Bei der äußeren Region des Zentromers (Abbildung 1.3) handelt es sich um konstitutives, perizentrisches Heterochromatin (Marschall & Clarke, 1995; Polizzi & Clarke, 1991; Takahashi et al, 1992). Die Transkription in diesem Bereich findet zwar in einem geringen Maße statt, die Transkripte werden aber über die RNAi Maschinerie, die ebenfalls in diesem Bereich bindet, in siRNA Elemente umgewandelt und degradiert (Hall et al, 2002; Motamedi et al, 2004).

Über die Anlagerung verschiedener Proteine und weiterer Modifikationsprozesse an den Histonen wird die Post-Transkription stillgelegt (Noma et al, 2004; Verdel et al, 2004; Zhang et al, 2008). Des Weiteren findet eine Unteracetylierung der Lysin-Reste der Histone H3 und H4 und die Methylierung des Lysin 9 an Histon H3 statt (Cheng & Blumenthal, 2010; Ekwall et al, 1997; Nakamura et al, 2001). Diese drei Prozesse (RNAi; Unteracetylierung der Histone; Methylierung von Lysin 9 an Histon 3) sind essentiell für die Heterochromatinbildung, auch wenn noch weitere Histonmodifikationen in dieser Region vorzufinden sind (Bannister et al, 2001; Durand-Dubief & Ekwall, 2008; Rea et al, 2000). Abhängig von der Histon-Methyltransferase, Clr4, die die Methylierung des Lysin-9 von Histon-H3 bewirkt, findet sich das evolutionär konservierte HP1 Homolog Swi6 an der äußeren Region wieder (Allshire et al, 1995; Bannister et al, 2001; Ekwall, 2004; Ekwall et al, 1997; Ekwall & Ruusala, 1994; Haldar et al, 2011; Nakamura et al, 2001; Pidoux & Allshire, 2004; Rea et al, 2000). Dieser stillgelegte Bereich des Zentromers wird für die Kohäsion der beiden Schwesterchromatiden benötigt (Gartenberg, 2009). Dabei lagert sich der aus vier Untereinheiten bestehende ringförmige Kohäsion Komplex nach der Replikation der Chromosomen in der S-Phase an diese an und bindet die beiden Schwesterchromatiden bis zum Eintritt in die Anaphase A aneinander. Für die Anlagerung der Kohäsine wird die Swi6 Assoziation am Heterochromatin benötigt (Cohen-Fix, 2001; Gartenberg, 2009; Nasmyth & Haering, 2009). Neben dem Kohäsion selbst befinden sich in dieser Region noch weitere Proteine, z. B. das Shugoshin, die einen vorzeitigen Abbau der Kohäsine verhindern (Wang & Dai, 2005). Während der Meiose I ändert sich die Zusammensetzung des Kohäsionsrings und weitet sich auf das gesamte innere Zentromer aus, um zu verhindern, dass es zu einer

verfrühten Trennung der Schwesterchromatiden kommt (Holt & Jones, 2009; Watanabe & Kitajima, 2005). Weiterhin wird die Heterochromatin beinhaltende Region, die das zentrale Zentromer umgibt, für den Aufbau eines funktionellen zentralen Zentromers, nicht aber für dessen Fortbestand, benötigt (Chen et al, 2008; Gerace et al, 2010; Kagansky et al, 2009; Zhang et al, 2008). So kann in *S. pombe* Zellen, denen die Methyltransferase Clr4 fehlt, kein neues Zentromer auf artifiziellen Minichromosomen, die kein Heterochromatin enthalten, etabliert werden, wohl aber auf Minichromosomen, die funktionelles Heterochromatin aufweisen (Baum M, 1994; Takahashi et al, 1992).

Auch in der inneren Zentromerregion ist die Transkription stillgelegt. Sie wird durch eine tRNA enthaltende Chromatinbarriere von der äußeren Region abgegrenzt (Huang & Maraia, 2001; Jin et al, 2002; Kniola et al, 2001; Partridge et al, 2000; Pidoux et al, 2003; Scott et al, 2006; Scott et al, 2007). Anders als das perizentrische Heterochromatin der äußeren Region verfügt die zentrale Region über eine einmalige Struktur. (Marschall & Clarke, 1995; Polizzi & Clarke, 1991; Takahashi et al, 1992). Sie ist in *S. pombe* hypoacetyliert, was u. a. zur transkriptionellen Stilllegung dieser Region führt (Hayashi et al, 2004). Des Weiteren ist die Zusammensetzung der Nukleosomen in der zentralen Zentromerregion eine andere. Während ein Nukleosom in der Regel aus je zwei Untereinheiten von Histon H2A, H2B, H3 und H4 besteht, wird das kanonische H3 in dieser spezifischen Region durch die Histon H3 Variante CENP-A („Centromere protein-A“) ersetzt (Palmer et al, 1987; Takahashi et al, 2000). Anders als die anderen aufgeführten Histone werden CENP-A beinhaltende Nukleosomen unabhängig von der Replikation eingebaut. In *S. pombe* erfolgt dieser zum Ende der S-Phase bzw. während der anschließenden G2-Phase (Fujita et al, 2007). Bisher sind nur einige Komponenten bekannt, die diesen Prozess regulieren.

Mit den Ergebnissen der Suppressoranalyse einer Kinetochormutante in dieser Arbeit konnte möglicherweise ein weiterer Faktor identifiziert werden, der an dem Regulationsmechanismus der CENP-A Expression oder dessen Einbau in die Nukleosomen beteiligt ist (Topolski, Jakopec und Fleig, unveröffentlicht).

1.6.2 Die Divergenz der Zentromere zwischen den Spezies

Das Zentromer-Chromatin bildet die Basis für einen der fundamentalsten Prozesse des Lebens. Somit ist es nicht überraschend, dass viele Teilprozesse und beteiligte Komponenten zwischen den Spezies konserviert sind. Aber gerade im Zentromer-Chromatin bestehen auch sehr große Unterschiede zwischen den verschiedenen Organismen. Neben der erwähnten Größe zwischen 125 Bp und mehreren Mb der Zentromere gibt es noch viele weitere Differenzen, die zeigen, dass das Zentromer-Chromatin sehr schnell evolviert.

Während vermutet wird, dass in *S. pombe* nur die äußeren Wiederholungen von ursprünglichen Transposons abstammen, die nicht mehr funktionsfähig sind zeigen sich in *D. melanogaster* größtenteils 5-7 Bp große immer wiederkehrende Einheiten, die als Satelliten bezeichnet und durch teilweise intakte Transposons unterbrochen werden (Dawe, 2003; Hall et al, 2002; Sun et al, 2003; Volpe et al, 2002). Das humane Zentromer besteht u. a. aus sogenannten α -Satelliten, die aus AT reichen 171 Bp umfassenden DNA-Bereichen aufgebaut sind und mehrfach wiederholt werden (Masumoto et al, 2004; Schueler et al, 2001). Vermutlich bilden dabei mehrere hintereinandergeschaltete α -Satelliten eine übergeordnete Einheit (Schueler et al, 2001; Schueler & Sullivan, 2006). Die α -Satelliten Blöcke werden durch LTR („long terminal repeats“) und nicht LTR Retrotransposons unterbrochen, die aus LINE („long interspersed element“) oder SINE („short interspersed element“) Elementen bestehen. In humanen Zellen und Mäusen findet man zusätzlich eine aus 17 Bp bestehende DNA Sequenz, über die das CENP-B Protein am Zentromer binden kann (Okada et al, 2007; Orthaus et al, 2008). Ohne CENP-B kann in diesen Organismen keine *de novo* Bildung des Zentromer-Chromatins erfolgen (Masumoto et al, 2004). Da die CENP-B Sequenz-Box nur in höheren Eukaryoten vorkommt, lässt dies erahnen, wie rapide die Weiterentwicklung der Zentromere erfolgt ist.

Auch Heterochromatin findet sich nicht überall, obwohl es die Zentromerregion in vielen Organismen z. B. *S. pombe* und dem Menschen flankiert und wichtig für dessen Funktion ist (Buscaino et al, 2010). So fehlt sowohl Hefen mit einem regionalen Zentromer z. B. *C. albicans* als auch Hefen mit einem Punktzentromer wie z. B. *S. cerevisiae* viele Komponenten der Heterochromatinmaschinerie, so dass es sich bei Heterochromatin nicht um einen generellen Marker aller Zentromere zu handeln scheint, wie zeitweise angenommen (Camahort et al, 2009; Ketel et al, 2009; Meluh et al, 1998; Stoler et al, 2007).

Mit CENP-A scheint die Komponente gefunden zu sein, die Zentromer-Chromatin definiert. Die evolutionär hoch konservierte Histon H3 Variante CENP-A findet sich in allen bisher untersuchten eukaryotischen Zentromeren, so dass CENP-A anscheinend den generellen Faktor darstellt, der essentiell für den Aufbau der Nukleosomen des Zentromers ist (Henikoff, 2000; Takahashi et al, 2000; Zeitlin, 2010).

So beinhaltet auch das Nukleosom von Organismen mit einem Punktzentromer die Histon H3 Variante (Meluh et al, 1998). Phylogenomische Studien belegen, dass auch Eukaryoten die ein Punktzentromer besitzen, evolutionsgeschichtlich anfangs ein Regionales besaßen. Punktzentromere scheinen sich bisher auf die Familie der *Saccharomycetaceae* zu beschränken, die als Einzige 2 μ m Plasmide tragen. Diese können eigennützig replizieren indem sie Komponenten des Wirtsorganismus nutzen. Womöglich kam es zwischen dem Wirtsorganismus und den 2 μ m Plasmiden zum Austausch verschiedener die Replikation

betreffender Komponenten. So ist in 2 μ m Plasmiden CENP-A im sogenannten Partitionierungslokus integriert (Hajra et al, 2006; Huang et al, 2011; Malik, 2006). Wohingegen Teile des Replikationsapparates dieses Plasmidsystems ins Genom des Wirtsorganismus eingegliedert wurden, die sich über die Zeit durch Selektionsvorteile zur den Punktzentromeren entwickelt haben, wie sie heute vorzufinden sind (Malik & Henikoff, 2009; Velmurugan et al, 2003). Mit dem Verlust des epigenetischen Zentromers ist vermutlich auch der Verlust großer Teile der RNAi bzw. Heterochromatinmaschinerie in der Familie der *Saccharomycetaceae* zu erklären, da diese nicht mehr zur Aufrechterhaltung des vorher epigenetisch definierten Zentromers benötigt werden (Malik & Henikoff, 2009). Dieser Prozess scheint mehrfach in der Familie der *Saccharomycetaceae* aufgetreten zu sein, denn es finden sich viele Zwischenstufen in den verschiedenen Arten der Familie. So besitzt *C. albicans* zwar ein regionales Zentromer, große Teile der Heterochromatinmaschinerie fehlen allerdings (Aravind et al, 2000; Malik & Henikoff, 2009).

Aber auch wenn alle eukaryotischen Organismen CENP-A-Nukleosomen im Zentromer tragen, gibt es doch Unterschiede in Aufbau und Funktion des Proteins. Während der C-Terminus von CENP-A für die Lokalisierung in die Nukleosomen des Zentromers benötigt wird und zwischen den Spezies konserviert ist, findet sich in der N-terminalen Sequenz eine starke Divergenz. Die Variabilität beginnt bereits bei der Länge des N-Terminus, der von z. B. ca. 20 Bp in *S. pombe* bis 200 Bp in *C. elegans* reicht (Torrás-Llort et al, 2009). Unklar ist allerdings, welche Funktion der N-Terminus hat. Einzig bei *S. cerevisiae* und beim Menschen ist jeweils ein Interaktionspartner am Kinetochor bekannt. Während er in *S. cerevisiae* für die Bindung des Ctf19 Kinetochorproteins benötigt wird, wird er in humanen Zellen für die Assoziation von CENP-C, das zusammen mit CENP-A und -B eine zentrale Rolle am humanen Kinetochor übernimmt, gebraucht (Kamakaka & Biggins, 2005). Es treten aber auch Unterschiede bei der Rekrutierung von CENP-A-Nukleosomen zwischen den verschiedenen Organismen auf. In der Spalthefe *S. pombe* kommt es direkt nach der Replikation der Chromosomen zur Einlagerung des neu gebildeten CENP-A in der S- bzw. in der G2-Phase, während in humanen Zellen erst am Ende der Mitose, in der späten Telophase bzw. in der anschließenden G1-Phase, der Einbau erfolgt (Buscaino et al, 2010; Hemmerich et al, 2008). So tragen die humanen Zellen nach der Replikation, bis zum Ende der Mitose nur die halbe Menge an CENP-A in den Nukleosomen der Zentromerregion (Allshire & Karpen, 2008; Black & Bassett, 2008; Fujita et al, 2007; Maddox et al, 2004).

Trotz der vielen Differenzen in den unterschiedlichen Spezies bleibt die allgemeine Funktion des inneren Zentromer-Chromatins erhalten. Sie dient als Assemblierungsfläche des Kinetochors.

1.7 Der Kinetochorkomplex

Das Kinetochor ist ein Multikomponenten-Proteinkomplex, der über die innere Zentromerregion an die Chromosomen bindet und zur Assoziation mit der mitotischen Spindel benötigt wird. *S. cerevisiae* gilt als der das Kinetochor betreffend bislang am besten analysierte Organismus und besitzt den einfachsten Kinetochorkomplex mit mehr als 70 Komponenten (McAinsh et al, 2003; Meraldi et al, 2006). Wie auch in der Spalthefe *S. pombe* findet sich in *S. cerevisiae* das Kinetochor konstitutiv an der Zentromer-DNA assembliert. So konnte in *S. cerevisiae* gezeigt werden, dass es unter wildtypischen Umständen nicht zu einer *de novo* Bildung des Kinetochors kommt (Collins et al, 2005; Gardner et al, 2005; Joglekar et al, 2006; Myhre & Bloom, 2003). Im Gegensatz zu den beiden genannten Hefen, in denen der Großteil der Kinetochorproteine während des gesamten Zellzyklus am Zentromer assoziiert ist, binden in höheren Eukaryoten viele Komponenten erst mit dem Beginn der Mitose und dissoziieren mit dem Abschluss der selbigen (Hayashi et al, 2004; Hemmerich et al, 2008; Liu et al, 2005; McAinsh et al, 2006; Obuse et al, 2004; Pidoux et al, 2003).

Trotz der Differenzen im Aufbau und der Struktur des Zentromers sind sehr viele Kinetochorproteine zwischen den Spezies konserviert (Meraldi et al, 2006). Einige wie der Ndc80-Komplex sind stark konserviert, während andere sich sowohl in ihrer Größe als auch ihrer Aminosäure-Zusammensetzung unterscheiden, aber in ihrer Tertiärstruktur sehr ähnlich sind (z. B. MIND-Komplex) (Maskell et al, 2010; Meraldi et al, 2006). Die Aufteilung der Kinetochorproteine kann grob in zwei Gruppen erfolgen: die Chromatin- und die Spindel-interagierenden Komponenten. Diese beiden Gruppen beinhalten Komponenten, die beide Komplexe verbinden (z. B. MIND-Komplex) und bei denen die Einordnung in eine der Gruppen schwerer fällt.

1.7.1 Die Chromatin-interagierenden Kinetochorproteine

Zu den Chromatin-interagierenden Kinetochorproteinen gehören in *S. pombe* der Mis16-Mis18- sowie der 13 Komponenten Sim4-Komplex, der direkt über den Mis16-Mis18-Komplex an das Zentromer-Chromatin bindet (Abbildung 1.4) (Hayashi et al, 2004; Liu et al, 2005). Beide Komplexe können nur in Abhängigkeit von CENP-A-Nukleosomen am Zentromer assoziieren und werden im Gegenzug für die Lokalisierung dieser in der zentralen Zentromerregion benötigt (Pidoux et al, 2003; Takahashi et al, 2000). Soweit bisher untersucht führen Mutationen in Komponenten beider *S. pombe* Komplexe zur Zerstörung der Chromatinstruktur und zur Aufhebung der transkriptionellen Stilllegung dieser Region (Fleig et al, 1996; Garner et al, 2007; Hayashi et al, 2004; Jin et al, 2002; Pidoux et al, 2003; Takahashi et al, 1994). Viele der Komponenten wie auch teilweise deren Abhängigkeit von CENP-A-Nukleosomen sind in höheren Eukaryoten konserviert (Hayashi et al, 2004).

1.7.1.1 Der Mis16-Mis18-Komplex

Der *S. pombe* Mis16-Mis18-Komplex wird für die Lokalisierung von CENP-A-Nukleosomen und die Aufrechterhaltung des deacetylierten Zustands der zentralen Zentromerregion in der Spalthefe benötigt (Hayashi et al, 2004). Da sich der *S. pombe* Mis16-Mis18-Komplex mit dem Beginn der Metaphase vom Kinetochor löst und erst zum Ende der Mitose wieder am Zentromer-Chromatin assoziiert, wird dieser vermutlich nur während der Interphase für die Aufrechterhaltung der CENP-A Lokalisierung benötigt (Fujita et al, 2007; Hayashi et al, 2004; Pidoux et al, 2009; Williams et al, 2009). In Humanzellen findet sich ein ähnliches Lokalisierungsmuster: in der späten Anaphase bzw. Telophase kommt es zur Zentromerbindung, die bis in die G1-Phase hinein anhält (Fujita et al, 2007). Dies scheint in Zusammenhang mit dem hCENP-A-Nukleosomen Einbau in die Zentromere stattzufinden, denn humanes Mis18 α (eines der drei Mis18 Proteine in humanen Zellen) bindet zeitgleich kurz vor hHJURP („Holliday Junction Recognition Protein“), einem Chaperon, das für die Rekrutierung von humanen CENP-A-Nukleosomen benötigt wird, an die Zentromere und ist vermutlich für dessen Lokalisierung erforderlich, da hHJURP mit der Dissoziation von Mis18 α ebenfalls von den Zentromeren verschwindet. Es wird postuliert, dass hHJURP für den Transport von humanen CENP-A-Nukleosomen zu den Zentromeren benötigt wird und den Einbau der Histon H3 Variante zeitlich und räumlich begrenzt (Dunleavy et al, 2009; Foltz et al, 2009; Fujita et al, 2007; Shuaib et al, 2010).

1.7.1.2 Der Sim4-Komplex

Der 13 Komponenten fassende *S. pombe* Sim4-Komplex wurde kurz vor Beginn meiner Doktorarbeit über eine Affinitätsaufreinigung isoliert und besteht aus Dad1, Fta1-Fta7, Mal2, Mis6, Mis15, Mis17 und Sim4 (Abbildung 1.4) (Liu et al, 2005). Der Komplex bindet über Mis16-Mis18 am Kinetochor und wird neben der CENP-A-Nukleosom Assoziation für die Bindung des Mikrotubuli-assoziierten, äußeren Kinetochorkomplex DASH während der Mitose benötigt (Abbildung 1.4) (Hayashi et al, 2004; Sanchez-Perez et al, 2005). Verschiedene Komponenten des Komplexes (Dad1, Fta1, Fta2, Mal2, Mis6, Mis15, Mis17 und Sim4) wurden in anderen oder unserer Arbeitsgruppe bereits untersucht (Fleig et al, 1996; Hayashi et al, 2004; Liu et al, 2005; Obuse et al, 2004; Pidoux et al, 2003; Takahashi et al, 1994; Tanaka et al, 2009). Die Mehrzahl der untersuchten Mutanten dieser Proteine zeigen Defekte im Aufbau des Kinetochors und der Chromosomenfehlsegregationen auf. Dies gilt ebenfalls für die humanen Orthologe (Foltz et al, 2006; McClelland et al, 2007). Allerdings findet sich dort eine veränderte Gliederung.

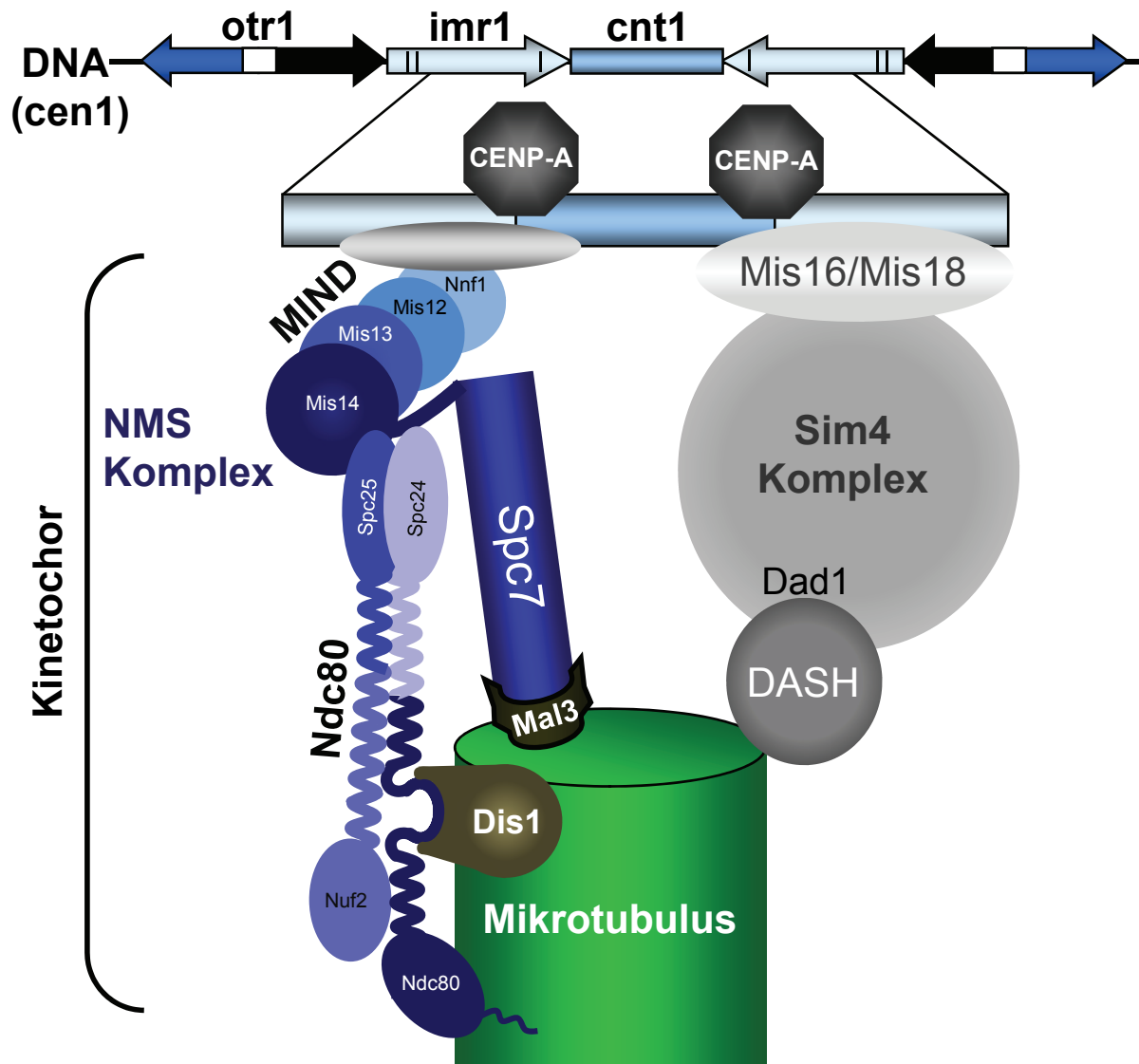


Abbildung 1.4: Schematische Darstellung des *S. pombe* Zentromer-DNA-Kinetochor-Komplexes mit Bindung an einen Mikrotubulus der Spindel.

Die Nukleosomen der zentralen Kernregion (*cnt* und der innere Bereich von *imr*) von Chromosom I (*cen1*) beinhalten wahrscheinlich je 2 Komponenten H2A, H2B, H4 und die Histon H3 Variante CENP-A und bilden somit ein Oktamer. Der Sim4-Komplex, der über den Mis16-Mis18-Komplex an die innere Zentromerregion assembliert, wird für die korrekte Lokalisierung des CENP-A-Nukleosoms benötigt. Über die konstitutive Sim4-Komponente Dad1 assoziiert der DASH-Komplex während der Mitose an das Kinetochor und stellt eine Verbindung zu den Spindel-Mikrotubuli her (hier schematisch durch nur einen Mikrotubulus dargestellt). Der NMS-Komplex bindet über den MIND-Komplex und dieser vermutlich über einen bisher nicht bekannten Interaktionspartner an die zentrale Region der Zentromer-DNA. Die Bindung des MIND-Komplexes ist unabhängig vom Mis16/Mis18-Komplex oder dem CENP-A-Nukleosom. Der NMS-Komplex agiert ebenfalls mit der mitotischen Spindel. Zum einen interagiert das Ndc80 Protein des Ndc80 Komplexes direkt mit einem kurzen, aus der globulären Struktur hervorgehenden Ausläufer mit den Mikrotubuli der Spindel. Des Weiteren kommt es über eine interne Schleife im Ndc80 Protein zu einer indirekten Mikrotubuli-Assoziation mittels des Mikrotubuli-Plusend-gebundenen Dis1 Proteins. Zusätzlich erfolgt eine Interaktion des Spc7 Proteins über das Mikrotubuli-assoziierende Mal3 mit der Spindel. Die Komponenten des NMS-, Mis16/Mis18-, Sim4- und DASH-Komplexes sind in Tabelle 1.1 aufgeführt.

NMS-Komplex		Sim4-Komplex	DASH-Komplex
Ndc80-Subkomplex	Spc7-Sos7-Subkomplex	Dad1 86 AS	Ask1 307 AS
Ndc80 624 AS	Sos7 264 AS	Fta1 280 AS	Dad1 86 AS
Nuf2 441 AS	Spc7 1364 AS	Fta2 351 AS	Dad2 94 AS
Spc24 198 AS		Fta3 230 AS	Dad3 86 AS
Spc25 238 AS		Fta4 233 AS	Dad4 72 AS
		Fta5 385 AS	Dad5 94 AS
MIND-Subkomplex	Mis16 430 AS	Fta6 59 AS	Dam1 155 AS
Mis12 259 AS	Mis18 155 AS	Fta7 244 AS	Duo1 166 AS
Mis13 329 AS		Mal2 303 AS	Spc19 152 AS
Mis14 210 AS		Mis6 672 AS	Spc34 164 AS
Nnf1 205 AS		Sim4 277 AS	

Tabelle 1.1: Komposition der bisher bekannten *S. pombe* Kinetochorproteine.

Aufgeführt sind alle Kinetochor-Subkomplexe mit ihren bisher identifizierten Kinetochorproteinen und der Anzahl der Aminosäuren. Proteine mit über 400 AS sind zusätzlich rot hervorgehoben.

Während CENP-U (SpFta4), CENP-H (SpFta3), CENP-M (SpMis17) und CENP-N (SpMis15) zu den NAC-Proteinen („Nucleosome Associated Complex“) gehören, werden CENP-I (SpMis6), CENP-Q (SpFta7), CENP-O (SpMal2), CENP-P (SpFta2), CENP-L (SpFta1), CENP-K (SpSim4), den CAD-Proteinen („CENP-A Distal“) zugeordnet, die anders als ihre bisher untersuchten *S. pombe* Orthologe nicht für den CENP-A-Nukleosomen Einbau in das Zentromerchromatin benötigt werden (Foltz et al, 2006; Hellwig et al, 2009; Izuta et al, 2006; McClelland et al, 2007; Okada et al, 2006; Orthaus et al, 2006; Przewloka & Glover, 2009). Der NAC- und CAD-Komplex werden als CCAN („Constitutive Centromere-Associated Network“) zusammengefasst, der für die Kinetochorfunktion beim Menschen essentiell ist (Cheeseman & Desai, 2008). Im *S. pombe* Sim4-Komplex sind mit Ausnahme von Fta5, Fta6 und Dad1 alle Komponenten essentiell (Kim et al, 2010; Sanchez-Perez et al, 2005).

1.7.1.3 Der Mal2-Fta2-Subkomplex in *S. pombe*

Da die Mehrzahl der Kinetochorkomponenten essentiell ist, werden die meisten Funktionsstudien in *S. pombe* mit konditional-letalen Mutanten durchgeführt. Unter permissiven Bedingungen können diese (annähernd) wildtypisch wachsen, während unter restriktiven Konditionen der Zelltod eintritt. In unserer Arbeitsgruppe wurde mit dem temperatursensitiven Stamm *mal2-1* eine der ersten Mutanten des Sim4-Komplexes untersucht (Fleig et al, 1996; Jin et al, 2002). Die *mal2-1* Mutante verliert unter permissiven Bedingungen (25 °C) 440 Mal häufiger ein nicht essentielles Minichromosom. Unter restriktiven Bedingungen (> 30 °C) kommt es vermutlich zu Konformationsänderungen im Mal2-1 Protein, die zum Funktionsverlust führen und somit zum Zelltod. Der Verlust von Mal2

führt zur nicht-Trennung der Schwesterchromatiden und damit zu einer massiven Chromosomenfehlsegregation (Fleig et al, 1996; Jin et al, 2002). Fta2 agiert als enger Interaktionspartner von Mal2. Die beiden Proteine bilden einen bisher in ihrer Abhängigkeit voneinander einzigartigen Subkomplex innerhalb des Sim4-Komplexes (Kerres et al, 2006). Während meiner Diplomarbeit wurden von mir konditional-letale *fta2* Mutanten erzeugt, die wie fast alle von unserer Arbeitsgruppe erzeugten Mutantenstämme temperatursensitiv waren. Anders als bei den bisher bekannten Sim4-Kinetochorkomplexmutanten zeigten die *fta2* Mutanten nicht nur Chromosomenfehlsegregation. Es trat häufig die nicht-Trennung des Chromatins trotz elongierter Spindel auf (Jakopec, 2006; Kerres et al, 2006). Diese wird vermutlich durch das Ausbleiben der Kinetochor-Mikrotubuli-Verknüpfung ausgelöst, einem Prozess, in dem der Sim4-Komplex bisher keine direkte Rolle spielt. Mit einer Multikopien-Suppressoranalyse einer konditional-letalen *fta2^{ts}* Mutante im späteren Verlauf meiner Doktorarbeit konnten zwei neue putative Interaktionspartner von Fta2 isoliert werden, von denen eins sowohl Fta2 als auch Mal2, das andere nur Fta2 beeinflusst, so dass zukünftig Aufschluss sowohl über deren gemeinsame Funktion als auch Fta2` einzigartige Rolle am Kinetochor gewonnen werden kann.

1.7.2 Die Spindel-interagierenden Kinetochorproteine

Neben den Chromatin-interagierenden finden sich die Spindel-interagierenden Kinetochorproteine an der Verknüpfungsstelle zwischen den Chromosomen und den Mikrotubuli der Spindel. Während der *S. pombe* DASH-Komplex über die Sim4-Komponenten bindet, findet sich mit dem NMS-Komplex (Ndc80-MIND-Spc7) die Gruppe von Kinetochorproteinen, die für die Assoziation mit der Spindel essentiell sind (Abbildung 1.4) (Liu et al, 2005). Diese setzt sich aus den evolutionär konservierten Ndc80- und MIND-Komplexen, die jeweils aus vier Mitgliedern assembliert werden, sowie dem Spc7 Protein zusammen und lokalisiert unabhängig von CENP-A-Nukleosomen oder dem Sim4-Komplex am Kinetochor (Amor et al, 2004; Kerres et al, 2004; Liu et al, 2005; Shelby et al, 2000; Takahashi et al, 1994). Im Rahmen meiner Doktorarbeit gelang es mir mit Sos7 eine weitere bisher unbekannte essentielle Komponente des NMS-Komplexes zu isolieren.

1.7.2.1 Der DASH-Komplex

S. pombe Dad1 nimmt eine besondere Stellung im DASH-Komplex ein: es ist nicht nur eine Komponente dieses Komplexes, es stellt auch einen Bestandteil des Sim4-Komplexes dar (Abbildung 1.4). Während *S. pombe* Dad1 konstitutiv als Bestandteil des Sim4-Komplexes am Kinetochor lokalisiert, bindet der aus zehn Untereinheiten bestehende DASH-Multiproteinkomplex über Dad1 nur während der Mitose am Kinetochor und verbindet den

Sim4-Komplex mit den Mikrotubuli (Abbildung 1.4). Der *S. pombe* DASH-Komplex selbst wird für die korrekte Chromosomensegregation benötigt, indem er die Bi-Orientierung der Kinetochor-Spindel aufbaut und beibehält. Die Kinetochorbindung ist von den Mikrotubuli der Spindel abhängig, die den DASH-Komplex zum Sim4-Komplex transportieren (Liu et al, 2005; Sanchez-Perez et al, 2005). Während der homologe DASH Komplex aus *S. cerevisiae* als ringförmige Struktur am Mikrotubulus binden kann, findet sich dieser in *S. pombe* nicht ringförmig wieder (Franco et al, 2007; Gao et al, 2010; Kobayashi et al, 2007; Miranda et al, 2005; Ramey et al, 2010; Westermann et al, 2005). Diese Anpassung kann aufgrund der Tatsache erfolgt sein, dass im Gegensatz zu den meisten anderen Organismen in *S. cerevisiae* nur ein Mikrotubulus an ein Kinetochor bindet und dieser leicht durch den DASH-Komplex umschlossen werden kann (Peterson & Ris, 1976). Da mehrere Mikrotubuli zeitgleich viel dynamischer agieren, wäre es ungleich schwerer, einen ringförmigen Komplex zu bilden, da dieser aus einer größeren Anzahl aus Molekülen bestehen müsste, die sich nachteilig auf seine Stabilität auswirken würden. In humanen Zellen, in denen 16-20 Mikrotubuli, im Vergleich zu 2-4 in *S. pombe*, an ein Kinetochor binden, gibt es den DASH-Komplex nicht (Cheeseman et al, 2001; Maiato et al, 2004; Miranda et al, 2005; Ramey et al, 2010; Westermann et al, 2005). Stattdessen findet sich in humanen Zellen der Ska-Komplex („Spinde and kinetochore associated“) (Daum et al, 2009; Gaitanos et al, 2009; Hanisch et al, 2006; Raaijmakers et al, 2009). Obwohl die Komponenten beider Komplexe keine signifikanten Homologien aufweisen, wird spekuliert, dass es sich um funktionelle Homologe handelt, da sie ähnliche Aufgaben erfüllen (Gaitanos et al, 2009; Guimaraes & Deluca, 2009; Hanisch et al, 2006; Theis et al, 2009; Welburn et al, 2009).

1.7.2.2 Der NMS-Komplex: 1. Der MIND-Subkomplex

Der *S. pombe* MIND-Komplex wird aus vier Komponenten assembliert: Mis12, Mis13, Mis14 und Nnf1. Diese zeigen Homologien zu Proteinen in *S. cerevisiae* und höheren Eukaryoten (Hayashi et al, 2004; Obuse et al, 2004; Takahashi et al, 1994). Der humane MIND-Komplex scheint strukturell einem länglichen Stab zu ähneln, in dem die vier Proteine in Reihe gegliedert vorliegen. Das humane Nnf1 Protein befindet sich der Chromatin-, das humane Mis14 Protein der Mikrotubuli-Seite zugewandt (Abbildung 1.4) (Screpanti et al, 2011). Der humane MIND-Komplex bildet über Mis14 die Anlagefläche für den Ndc80-Komplex und unabhängig davon für das Spc7 Protein (Abbildung 1.4) (Kiyomitsu et al, 2010; Kiyomitsu et al, 2007; Maskell et al, 2010; Petrovic et al, 2010; Screpanti et al, 2011). Anders als in humanen Zellen scheinen in *C. elegans* und *S. cerevisiae* sowohl der MIND-Komplex als auch das Spc7 Protein (*C. elegans* KNL-1; *S. cerevisiae* Spc105) für die Assoziation des Ndc80-Komplexes benötigt zu werden (Cheeseman et al, 2006; Maskell et al, 2010; Petrovic

et al, 2010). Im Rahmen dieser Arbeit konnte ich zeigen, dass in *S. pombe* das Abhängigkeitsverhältnis vermutlich mit dem in humanen Zellen übereinstimmt und der SpNdc80-Komplex und SpSpc7 jeweils selbstständig an den MIND-Komplex binden.

Der humane MIND-Komplex bindet über CENP-C am Kinetochor (Screpanti et al, 2011). Auch in der Fruchtfliege *D. melanogaster* wird CENP-C für die Assoziation des MIND-Komplexes benötigt, der *in vitro* direkt über Nnf1, dem Chromatin zugewandten Protein des MIND-Komplexes an CENP-C bindet (Przewloka et al, 2011). In der Spalthefe muss noch geprüft werden, ob MIND ebenfalls über CENP-C direkt am Zentromer bindet. Während das humane CENP-C als Mitglied des möglicherweise zum Sim4-Komplex äquivalenten CCAN Komplex gilt, ist dies in *S. pombe* nicht der Fall, auch wenn das *S. pombe* CENP-C für die Lokalisierung der Sim4-Komponente Fta1 benötigt wird (Cheeseman & Desai, 2008; Tanaka et al, 2009). So wurde das *S. pombe* CENP-C nicht bei der Aufreinigung des Sim4-Komplexes isoliert (Liu et al, 2005). Ob es sich beim *S. pombe* CENP-C um eine essentielle Komponente des Kinetochors handelt ist unklar, erste Studien bestätigten dies, während eine weitere Studie den *S. pombe* CENP-C-ORF deletieren konnte und lebensfähige, aber in ihrem Wachstum eingeschränkte Zellen erhielt (Holland et al, 2005; Tanaka et al, 2009).

Mutationen in den Komponenten des *S. pombe* oder humanen MIND-Komplexes verhindern den korrekten Aufbau des Kinetochors und führen so zu Chromosomenfehlsegregation (Goshima et al, 2003; Hayashi et al, 2004; Kline et al, 2006). In *C. elegans* ist dieser Effekt ebenfalls zu beobachten, nur dass die Abwesenheit des Mis13 den Aufbau des Kinetochors gänzlich verhindert (Cheeseman et al, 2004).

1.7.2.3 Der NMS-Komplex: 2. Der Ndc80-Subkomplex

Die vier essentiellen Proteine Spc24, Spc25, Nuf2 und Ndc80 bilden den Ndc80-Komplex (Liu et al, 2005; Nabetani et al, 2001; Obuse et al, 2004). Der humane Ndc80-Komplex, dessen dreidimensionale Struktur der einer Hantel ähnelt, wird für die Verknüpfung der Spindelmikrotubuli mit dem Kinetochor bei der Chromosomensegregation benötigt und ist der am besten konservierte Kinetochorkomplex (Abbildung 1.4). Humanes Spc24 und Spc25 sind dem Zentromer-Chromatin zugewandt und assoziieren beide über eine direkte Bindedomäne an die MIND-Komponente Mis14 an das Kinetochor. Humanes Ndc80 und Nuf2 hingegen sind den Mikrotubuli zugewandt (Ciferri et al, 2008; Screpanti et al, 2011; Wan et al, 2009; Wei et al, 2007; Wilson-Kubalek et al, 2008). Dabei besitzen Spc24-Spc25 C-terminal eine globuläre Struktur, die an den humanen MIND-Komplex bindet und N-terminal eine langgestreckte Coiled-Coil-Domäne, die für die Assoziation mit Ndc80-Nuf2 benötigt wird (Abbildung 1.4). Ndc80-Nuf2 assoziieren mit ihrer N-terminalen langgestreckten

Coiled-Coil-Domäne an die von Spc24-Spc25. C-terminal tragen beide Proteine ebenfalls eine globuläre Struktur, die eine Calponin-Homologie-(CH) Domäne enthält, die für die Bindung an Mikrotubuli genutzt werden kann. Humanes Ndc80 trägt zusätzlich noch einen kurzen Proteinausläufer, der den direkten Kontakt mit der Spindel ermöglicht (Abbildung 1.4). Während sowohl Ndc80 als auch Nuf2 über ihre Mikrotubuli-assoziiierenden CH-Domänen an Tubulin binden könnten und *in vitro* Mutationen in den Domänen beider Proteine zu einem Verlust der Assoziation zwischen Mikrotubuli und dem Ndc80-Komplex führen, scheint nur das humane Ndc80 Protein für die Assoziation mit der mitotischen Spindel benötigt zu werden (Alushin et al, 2010; Ciferri et al, 2008; Sundin et al, 2011; Wei et al, 2007). Die Ndc80 Komponente besitzt in ihrer langgestreckten Coiled-Coil-Domäne zusätzlich eine Schleifen-Region, die für die Bindung mit dem Mikrotubulus in *S. cerevisiae* und *S. pombe* von essentieller Bedeutung ist (Hsu & Toda, 2011; Maure et al, 2011). In *S. pombe* assoziiert das Mikrotubuli-Plusend-bindende *S. pombe* Dis1 Protein der TOG/MAP215 Familie an die Schleife des SpNdc80 Proteins und bildet somit eine zweite, in diesem Fall indirekte Bindung an die Mikrotubuli (Abbildung 1.4) (Hsu & Toda, 2011). Die direkte Ndc80-Mikrotubuli Bindung wird mittels Phosphorylierung des kurzen Ausläufers durch die Aurora B Kinase reguliert, die das Ndc80 Protein in der Metaphase phosphoryliert. Nach dem Aufheben der Phosphorylierung in der späteren Mitose kommt es zu einer verstärkten Bindung des Ndc80 Proteins an die Mikrotubuli, die die Chromosomensegregation ermöglicht. Diese Phosphorylierung scheint zwischen den Spezies konserviert zu sein (Alushin et al, 2010; Deluca et al, 2011; Sundin & Deluca, 2010).

Der Verlust des *S. pombe* Ndc80-Komplexes führt häufig trotz elongierter Spindel zum Ausbleiben der Chromosomensegregation oder zu einer massiven Fehlverteilung des Chromatins. Es konnten aber auch in einer Vielzahl von Organismen Defekte in der Spindel Morphologie festgestellt werden (Hsu & Toda, 2011; Janke et al, 2001; Kitagawa & Hieter, 2001; Wigge & Kilmartin, 2001).

1.7.2.4 Der NMS-Komplex: 3. Die Spc7/Spc105/Blinkin/KNL-1-Familie

Mit Spc105 wurde in *S. cerevisiae* das erste Mitglied dieser evolutionär konservierten Proteinfamilie entdeckt (Nekrasov et al, 2003). Die Konserviertheit auf Aminosäureebene ist allerdings sehr limitierend. So konnte das *C. elegans* Homolog KNL-1 nur mit dem menschlichen Auge, nicht aber mittels einer Computer-gestützten Analyse identifiziert werden (Cheeseman et al, 2004). Es finden sich im N-Terminus jeweils aus 4-5 Aminosäuren zusammengesetzte konservierte Domänen, deren Funktion allerdings bisher nicht geklärt ist (Cheeseman et al, 2004; Nekrasov et al, 2003). Durch eine Vielzahl von weiteren vollständig sequenzierten Genomen und verbesserten Analyseprogrammen fand

sich eine weitere konservierte Domäne von ca. 100 AS im C-Terminus des Proteins (Meraldi et al, 2006). Das humane Homolog Blinkin (auch AF15q14, D40, hKNL-1, hSpc105 und KIAA1570 genannt) wurde ursprünglich als Hybridprotein mit der MLL1-Histon Methyltransferase in Krebs-Patienten isoliert, das aufgrund einer Chromosomentranslokation entstand (Kapitel 1.1) (Cheeseman et al, 2006; Cheeseman et al, 2004; Hayette et al, 2000; Kiyomitsu et al, 2007; Obuse et al, 2004; Wei et al, 1999). Später wurde es mittels einer Immunpräzipitation der MIND-Komponente Mis12 isoliert und seine Rolle am Kinetochor aufgedeckt (Obuse et al, 2004).

Die Familie der Spc7/Spc105/Blinkin/KNL-1 Proteine (von nun an als Spc7 Proteinfamilie bezeichnet) zeichnet sich durch ihre Größe aus (SpSpc7: 153,5 kDa; Blinkin: 162,6 kDa). Aufgrund dieser wird vermutet, dass sie als Verbindungsglied zwischen dem Chromatin- und Spindel-interagierenden Kinetochor fungieren. In humanen Zellen konnte bereits gezweifelt werden, dass Blinkin die Anlagerungsplattform für Kinetochor-assoziierte Proteine wie die Spindelkontrollpunkt-komponenten Bub1 und BubR1 darstellt (Fujita et al, 2007; Kiyomitsu et al, 2011). Mit dem Mikrotubuli-assoziiierenden Mal3 Protein wurde ein SpSpc7 Interaktionspartner an der Spindel durch unsere Arbeitsgruppe identifiziert und damit die erste Verknüpfung des Kinetochors mit Mikrotubuli-assoziierten Proteinen aufgedeckt (Abbildung 1.4) (Kerres et al, 2004). Dabei ko-assoziiert der N-Terminus von Spc7 mit der mitotischen Spindel, während der am Kinetochor gebundene C-Terminus diese Interaktion vermutlich reguliert (Kerres et al, 2007). Im Rahmen dieser Arbeit konnte ich drei putative Mikrotubuli-assoziiierende Domänen im N-Terminus von Spc7 identifizieren. Einer dieser drei Domänen kommt wahrscheinlich die zentrale Rolle in der Assoziation mit der mitotischen Spindel zu. Unklar ist allerdings, ob diese Assoziation direkt über die Mikrotubuli erfolgt oder über Mikrotubuli-assoziierte Proteine vermittelt wird. Da das *C. elegans* KNL-1, das humane Blinkin und das *S. cerevisiae* Spc105 Homolog *in vitro* Mikrotubuli binden können, könnte diese Funktion konserviert sein, so dass auch das Spc7 Protein die Mikrotubuli direkt binden könnte (Cheeseman et al, 2006; Fujita et al, 2007; Przewlaka & Glover, 2009).

Die Abwesenheit von Spc7 Homologen führt in allen untersuchten Spezies zu Defekten in der Chromosomensegregation oder zum Ausbleiben dieser. So besitzt das *C. elegans* KNL-1 eine zentrale Rolle im Aufbau des Kinetochors, wie RNAi Studien bewiesen haben: in der Abwesenheit von KNL-1 („*kinetochore null*“) bleibt der Aufbau des Kinetochors aus.

Des Weiteren konnten in *S. pombe* *spc7^{ts}* Mutanten massive Defekte im Spindelaufbau und deren Integrität detektiert werden, die allerdings nicht in *S. cerevisiae* oder *D. melanogaster* vorgefunden wurden (Pagliuca et al, 2009; Schittenhelm et al, 2007; Schittenhelm et al, 2009).

Zu Beginn meiner Doktorarbeit wurde das Spc7 Protein mit dem Ndc80- und MIND-Komplex als NMS-Superkomplex aufgereinigt (Liu et al, 2005). Allerdings war nur bekannt, dass diese neun Proteine einen Komplex bilden, die Anordnung in drei Untergruppen wurde in *S. pombe* erst später aufgedeckt (Liu et al, 2005; Meraldi et al, 2006). Einzig in *S. cerevisiae* fand sich mit dem Kre28 Protein eine weitere Komponente des NMS-Komplexes. Kre28 ist ein direkter Interaktionspartner vom *S. cerevisiae* Spc7 Homolog Spc105 (Gatbonton et al, 2006; Nekrasov et al, 2003; Pagliuca et al, 2009). Bis vor kurzem wurde vermutet, dass das Spc7 Protein in anderen Eukaryoten als alleinstehendes Protein im NMS-Komplex agiert. Durch eine Multikopien-Suppressoranalyse einer temperatursensitiven *spc7* Mutante gelang es mir, eine weitere essentielle Komponente des NMS-Komplexes in *S. pombe* zu identifizieren und damit eine Familie von konservierten Kinetochorproteinen zu definieren. Das von mir Sos7 genannte Protein interagiert eng mit Spc7 und bildet mit diesem vermutlich einen Subkomplex im NMS-Superkomplex. Neuere Studien in anderen Organismen offenbaren ebenfalls das Vorhandensein einer essentiellen zehnten Komponente, die eng mit dem jeweiligen Spc7 Homolog zu interagieren scheint (Petrovic et al, 2010).

1.8 Die mitotische Spindel

1.8.1 Aufbau der mitotischen Spindel

Über den Kinetochorkomplex erfolgt die Bindung der Chromosomen an die mitotische Spindel, die für die Segregation der Schwesterchromatiden essentiell ist. Diese ist aus Mikrotubuli aufgebaut, deren Dynamik durch eine Vielzahl von Spindel-assoziierten Proteinen bestimmt wird. Mikrotubuli sind zylindrische, aus α - und β -Tubulin Dimeren aufgebaute Filamente. Ihr Aufbau erfolgt polar, so dass es ein aus α -Tubulin bestehendes Minus- und aus β -Tubulin gebildetes Plus-Ende gibt. Mikrotubuli sind hochdynamische Strukturen, die vor allem an ihren Plus-Enden wachsen und schrumpfen. Das Minus-Ende ist an die Mikrotubuli organisierenden Zentren (MTOC) gebunden, an denen die Polymerisation des Mikrotubulus beginnt, während das Plus-Ende in die Zelle wächst. In der Mitose dienen die SPBs (in humanen Zellen die Zentrosomen) als MTOCs, von denen aus die Mikrotubuli polymerisieren (Dammermann et al, 2003; Heald & Walczak, 2009; Howard & Hyman, 2003; Mitchison & Kirschner, 1984; Mitchison, 1993).

Die Mikrotubuli der mitotischen Spindel werden in drei verschiedene Gruppen unterteilt: 1.) die Pol-Mikrotubuli, 2.) die Kinetochor-Mikrotubuli und 3.) die Astral-Mikrotubuli. Die Pol-Mikrotubuli polymerisieren von einem SPB und überlappen in der Spindelmitte antiparallel mit den Pol-Mikrotubuli, die vom anderen SPB ausgehen. Die Kinetochor-Mikrotubuli binden vom SPB an das Kinetochor eines Schwester-Chromatids. Sowohl die Pol- als auch die

Kinetochor-Mikrotubuli befinden sich in der Spalthefe *S. pombe*, die eine geschlossene Mitose durchläuft, im Zellkern, während sich diese in höheren Eukaryoten, die ihre Kernmembran mit dem Beginn der Mitose abbauen, im Zytoplasma befinden. Die dritte Gruppe, die Astral-Mikrotubuli polymerisiert auch vom SPB aus reichen in *S. pombe* aber in das Zytoplasma. Von dort aus sind sie für die Positionierung der Spindel zuständig, einem Prozess der in der Spalthefe *S. pombe* nicht essentiell ist (Dumont & Mitchison, 2009; Funabiki et al, 1993; Hagan et al, 2001).

1.8.2 Bindung der mitotischen Spindel an die Kinetochore

Die aus Pol-zu-Pol-Mikrotubuli bestehende mitotische Spindel wird zu Beginn der Mitose zwischen den SPB ausgebildet (Pluta et al, 1995). Zeitgleich kommt es zur Ausbildung der Astral-Mikrotubuli.

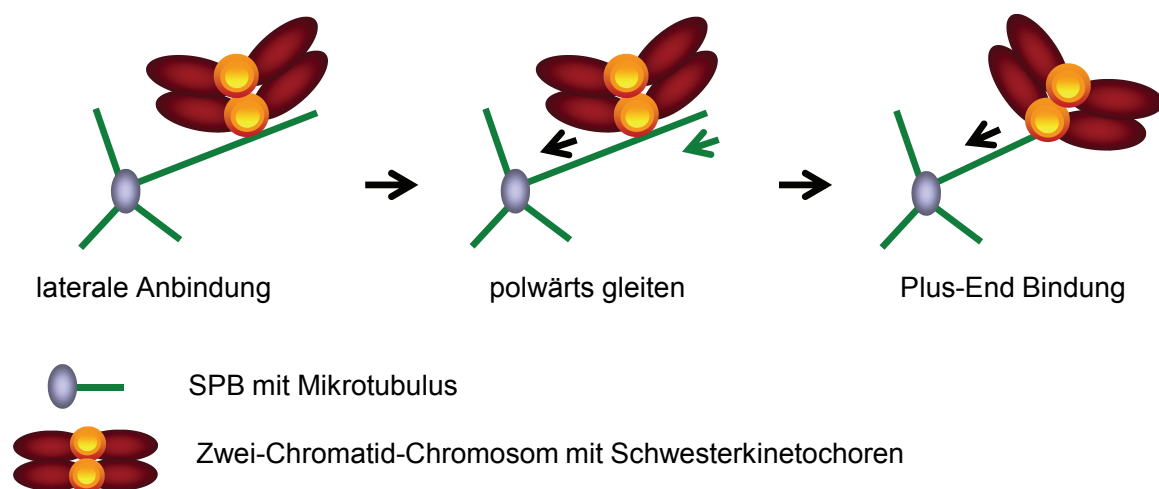


Abbildung 1.5: Kinetochore können lateral und an den Plus-Enden von Mikrotubuli-assoziieren.

Selten kommt es zu einem direkten Kontakt zwischen Kinetochor und dem Plus-Ende des Mikrotubulus (je nach Organismus können es mehrere sein, zur Vereinfachung wird in diesem Fall nur von einem gesprochen). Meist erfolgt zuerst eine laterale Bindung (links). Die Kinetochore gleiten („sliding“) polwärts an den Mikrotubuli (schwarzer Pfeil, Mitte). Wenn das Plus-Ende des Mikrotubulus aufgrund von De-Polymerisation schrumpft (grüner Pfeil, Mitte) und das Kinetochor erreicht, kann die Plus-End Bindung erfolgen, die stabiler als die laterale ist. Bis das zweite, in der Abbildung noch freie Schwesterkinetochor nicht vom Mikrotubulus des gegenüberliegenden Pols gebunden wird, kann das Chromosom anhand des gebundenen Schwesterkinetochors weiter polwärts gezogen werden („pulling“) (schwarzer Pfeil, rechts). Abbildung modifiziert aus Tanaka et al, 2005.

Mit Beginn der Metaphase in der die Chromosomen sich in der Äquatorialebene anlagern, behält die aus den Pol-zu-Pol-Mikrotubuli bestehende Spindel eine annähernd konstante Länge. Diese liegt in *S. cerevisiae* bei 2 µm, in *S. pombe* bei 2,5 µm und in HeLa Zellen bei 14 µm und wird vermutlich durch die Stabilität bzw. Instabilität der Mikrotubuli und deren assoziierten Proteinen bestimmt (Goshima & Scholey, 2010; Nabeshima et al, 1998; Straight et al, 1998). Parallel dazu bilden sich die Kinetochor-Mikrotubuli aus und „suchen“ nach den Kinetochoren. In *S. cerevisiae* und Vertebraten konnte gezeigt werden, dass es meist erst zu einer lateralen Anbindung der Mikrotubuli an die Kinetochore kommt. Die Kinetochore gleiten („sliding“) lateral polwärts und werden von dem de-polymerisierenden Mikrotubulus über sein Plus-Ende gebunden (Abbildung 1.5). Diese Bindung ist stabiler als eine laterale. Daraufhin werden die Chromosomen im Rahmen der Orientierung der Chromosomen zu den Polen gezogen („pulling“) (Abbildung 1.5) (De Wulf et al, 2009a; Tanaka et al, 2005; Yang et al, 2007). Es wird postuliert, dass weitere Mechanismen bei der Verknüpfung der Kinetochore an die Mikrotubuli eine Rolle spielen. So konnten in menschlichen, in *Drosophila* und *S. cerevisiae* Zellen Mikrotubuli entdeckt werden, die mit den vom SPB ausgehenden Mikrotubuli überlappen (De Wulf et al, 2009a). In Organismen mit einer offenen Mitose nimmt man zusätzlich an, dass ein Ran GTPase-Gradient die Assemblierung der mitotischen Spindel vorantreibt, indem er die Mikrotubuli Polymerisierung beeinflusst (Clarke & Zhang, 2008).

In der Regel wird erst ein Kinetochor der beiden auf dem Schwester-Chromatid vorhandenen durch einen oder mehrere Mikrotubuli, die von einem SPB ausgehen, gebunden. Man spricht in diesem Fall von einer monotelischen Bindung (Abbildung 1.6). Werden hingegen beide Kinetochore eines Chromosoms von den Mikrotubuli eines Pols gebunden, ist diese Verknüpfung syntelisch (Abbildung 1.6). In beiden Fällen findet sich eine Mono-Orientierung der Chromosomen (Tanaka et al, 2005). Mono-orientierte Chromosomen würden zu einer Chromosomenfehlsegregation führen. Damit dies nicht geschieht bindet u. a. die Spindelkontrollpunkt Komponente Mad2 an ungebundene Kinetochore und verhindert den Übergang in die Anaphase (He et al, 1997).

Im Verlauf des Aufbaus einer bipolaren Spindel kann es zu einer fehlerhaften merotelischen Verknüpfung kommen, bei der ein Kinetochor mit Mikrotubuli von beiden Polen gebunden wird (Abbildung 1.6) (Tanaka et al, 2005). Da die mechanische Spannung der bipolaren Bindung durch die merotelische Bindung nicht gegeben ist, bleibt der Spindelkontrollpunkt aktiv, allerdings wird dies durch weitere Spindelkontrollpunkt Komponenten kontrolliert (z. B. Mph1) (He et al, 1998). Wenn eine korrekte bipolare (amphitelische) Spindel aufgebaut ist (Abbildung 1.6) wird der Spindelkontrollpunkt inaktiv und der APC („Anaphase Promoting Complex“), eine Ubiquitin-Ligase, leitet das Ende der Mitose ein. Durch die proteolytische

Aktivität des APC kommt es zur Degradierung des Zyklins Cdc13 und damit zur Inaktivierung der Zyklin-abhängigen Kinase, so dass das Ende der Mitose eingeleitet werden kann (Dorsett, 2010; Lorca et al, 1992; Nasmyth & Haering, 2009; Oliveira & Nasmyth, 2010; Tanaka, 2010; Yamashita et al, 1999). Außerdem wird die Aufspaltung des Kohäsins, und somit die Auflösung der Bindung zwischen den Schwesterchromatiden, durch den APC ausgelöst (Elledge, 1998; Kim et al, 1998; Tanaka et al, 2005).

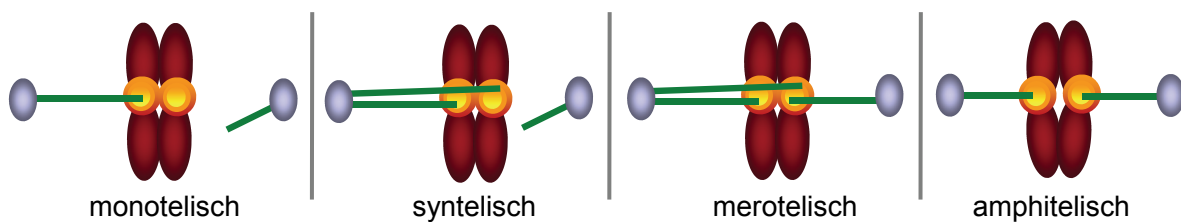


Abbildung 1.6: Mögliche Kinetochor-Mikrotubuli Interaktionen.

Bei **monotelischen** Bindungen zwischen Kinetochor und Mikrotubuli ist nur eins der Schwesterkinetochore mit dem Mikrotubulus verbunden (vereinfacht wird von einem Mikrotubulus gesprochen, es können aber auch je nach Organismus mehrere sein). Dies tritt fast immer zu Beginn der Mitose auf, da meist erst ein Schwesterkinetochor von den Mikrotubuli eines Pols gebunden wird, bevor es zur Verknüpfung des zweiten kommt (Abbildung 1.5). Werden beide Kinetochore von Mikrotubuli desselben Pols gebunden spricht man von **syntelisch**, während wenn ein Schwesterkinetochor von den Mikrotubuli beider Pole erfasst wird von einer **merotelischen** Bindung. Eine korrekte bipolare Spindel, bei der ein Schwesterkinetochor vom Mikrotubulus des einen Pols und das zweite Schwesterkinetochor vom Mikrotubulus des gegenüberliegenden Pols erfasst wird, weist eine **amphitelische** Bindung auf. Erklärung der Symbole in der schematischen Darstellung: siehe Abbildung 1.5. Abbildung modifiziert aus Tanaka et al, 2005.

1.8.3 Die mitotische Spindel in der Anaphase

In der Anaphase A kommt es zur Depolymerisation der Kinetochor-Mikrotubuli, so dass die Schwesterchromatiden getrennt und zu den entgegengesetzten SPBs gezogen werden (Ding et al, 1993; Ding et al, 1997). Der Abbau der Kinetochor-Mikrotubuli wird vermutlich durch das Kinetochor initiiert und kann sowohl am Plus- („Pacman-Mechanismus“) als auch am Minus-Ende („Flux“) erfolgen (Sharp & Rogers, 2004). In *S. pombe* allerdings erfolgt der Abbau nur über den Pacman-Mechanismus am Plus-Ende, während in *Drosophila* Embryonen beide Prozesse beobachtet werden können (De Wulf et al, 2009a; Gadde & Heald, 2004; Kline-Smith et al, 2005). Erst in der sich anschließenden Anaphase B kommt es durch die Elongation der Pol-zu-Pol-Mikrotubuli zum Transport der Schwesterchromatiden zu den entgegengesetzten Zellpolen.

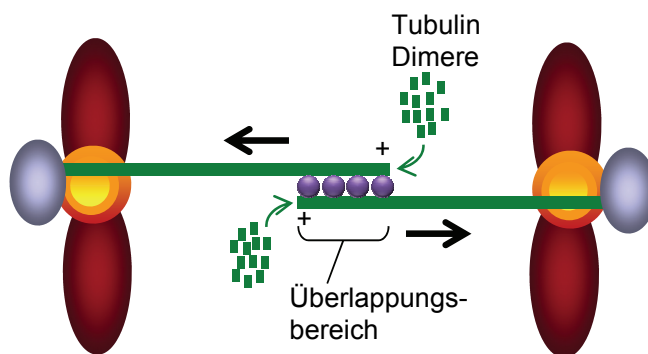


Abbildung 1.7: Spindelelongation während Anaphase B.

Nachdem die Schwesterchromatiden in Anaphase A zu den Zellpolen gezogen wurden folgt Anaphase B. Die Pol-Mikrotubuli wachsen an ihren Plus-Enden (+) die sich im überlappenden Bereich befinden. Durch verschiedene Spindel-Apparat assoziierte Proteine (Ila), die die Mikrotubuli im antiparallelen

Überlappungsbereich bündeln, kommt es zum Auseinanderweichen der Minus-Enden am SPB (schwarzer Pfeil), die zur polwärts Bewegung der getrennten Schwesterchromatiden führt. Erklärung der nicht näher bezeichneten Symbole in der schematischen Darstellung: siehe Abbildung 1.5. Abbildung modifiziert aus Goshima & Scholey, 2010.

Der Prozess der Spindelelongation wird durch die Polymerisation der Pol-Mikrotubuli an ihren Plusenden ausgelöst (Abbildung 1.7). Während der Bereich, in dem die Pol-zu-Pol-Mikrotubuli überlappen und der von verschiedenen Mikrotubuli-assoziierten Proteinen gestützt wird, annähernd konstant lang ist, kommt es zum Auseinandergleiten der antiparallelen Mikrotubuli und dem Transport der SPBs und dem Chromatin zu den Zellenden (Abbildung 1.7) (Civelekoglu-Scholey & Scholey, 2010; Goshima & Scholey, 2010). Ist dieser Prozess beendet, kommt es im Rahmen einer Reorganisation zum Abbau der mitotischen Spindel und zum Aufbau der Interphase Mikrotubuli im Zytoplasma.

1.9 Komponenten des mitotischen Spindel-Apparates

Da Mikrotubuli *in vivo* viel dynamischer agieren als dies *in vitro* der Fall ist, wurde die Existenz von Mikrotubuli-Regulatoren vermutet (Cassimeris et al, 1988; Hunter & Wordeman, 2000). Und tatsächlich wird die Funktion der mitotischen Spindel von einer Vielzahl von Proteinen reguliert die direkt mit dieser interagieren. Prinzipiell wird zwischen zwei Gruppen von Proteinen unterschieden: den Motorproteinen und den Mikrotubuli-assoziierten Proteinen (MAPs).

1.9.1 Motorproteine

Motorproteine können aufgrund einer integrierten Motordomäne unter ATP-Verbrauch entlang der Mikrotubuli wandern und werden vor allem für den Frachttransport benötigt, aber einzelnen Mitgliedern wird auch eine Rolle in der Regulation der Mikrotubuli-Dynamik

zugesprochen (Marx et al, 2006). Es wird zwischen zwei Hauptklassen von Motorproteinen unterschieden, den Kinesinen und den Dyneinen.

1.9.1.1 Dynein

Dyneine sind Minus-End-gerichtete Motorproteine, d. h. Dynein wandert auf dem Mikrotubulus in Richtung Minus-Ende. Dynein wurde zuerst in Flagellen und Zilien entdeckt, wo es für deren Bewegung benötigt wird (Gibbons & Rowe, 1965). Mit spezifischen gegen das in der humanen Zelle vorkommende zytoplasmatische Dynein gerichteten Antikörpern gelang es zu zeigen, dass das Dynein während der Mitose u. a. an den Kinetochoren zu finden ist (Pfarr et al, 1990). Mittlerweile wird postuliert dass es dort zusammen mit seinem Interaktionspartner Dynaktin am RZZ-Komplex bindet, der wiederum über das Kinetochorprotein Zwint am selbigen assoziiert. Dynein wird dort vermutlich für den Abtransport der am RZZ-Komplex gebundenen Spindelkontrollpunkt Komponente Mad2 benötigt, nachdem die Kinetochore mit der mitotischen Spindel verknüpft wurden. So verringert sich die Dyneinkonzentration am Kinetochor während der Metaphase und mit dem Beginn der Anaphase ist Dynein fast gänzlich vom Kinetochor dissoziiert (Bader & Vaughan, 2010; Karess, 2005). In *Drosophila* Embryos konnte außerdem gezeigt werden, dass Dynein für den Minus-End-gerichteten Transport der Chromosomen während der Prometa- und Anaphase A benötigt wird (Sharp et al, 2000). Diese Rolle hat Dynein nicht in *S. pombe*, wo der polwärts gerichtete Transport nur von der Mikrotubuli-Depolymerisation abhängt (Grishchuk & McIntosh, 2006). Nichtsdestotrotz wird Dynein in *S. pombe* für die Oszillation des meiotischen Kerns benötigt und unterstützt die Organisation der Mikrotubuli in Bündeln indem es diese am Minus-Ende verankert (Grishchuk et al, 2007; Yamamoto et al, 1999).

1.9.1.2 Kinesine

Kinesine werden aufgrund von Unterschieden in ihrer Motordomäne in 14 Familien unterteilt (Lawrence et al, 2004). Die Richtung in die sich die Kinesine der jeweiligen Familie bewegen entscheidet sich anhand der Position der Motordomäne. Ist diese N-terminal sind die Kinesine Plus-End-gerichtet. Im Falle einer C-terminalen Lokalisierung bewegen sich die Kinesine Minus-End-gerichtet (z. B. Kinesin-14 Familie). Befindet sich die Motordomäne zentral bewegen sich die Kinesine meist nicht entlang der Mikrotubuli sondern sorgen für deren Destabilisierung (z. B. Kinesin-13 Familie) (Verhey & Hammond, 2009). In *S. pombe* sind 9 Kinesin ähnliche Proteine bekannt. Hier werden jeweils nur die bisher bekannten mitotischen Funktionen der Proteine aufgeführt. Das Plus-End-gerichtete Cut7 (Kinesin-5) wird für die Bildung der mitotischen Spindel benötigt und ist wichtig für die strukturelle Integrität der Metaphase Spindel, wird aber vermutlich nicht für die Elongation der Spindel in

Anaphase B benötigt (Fu et al, 2009; Hagan & Yanagida, 1990; Hagan & Yanagida, 1992). Dies ist in *S. cerevisiae* anders, dort finden sich Cin8 und Kip1 (vormals BimC-Familie) jeweils als Homotetramer in dem überlappenden Bereich der Spindel und sind für das Auseinandergleiten der überlappenden, antiparallel verlaufenden Spindel-Mikrotubuli und somit zur Trennung der Schwesterchromatiden während Anaphase B verantwortlich. Cin8 und Kip1 entgegengesetzt findet sich das Minus-End gerichtete Kar3, das mit seiner Gegenbewegung das Auseinandergleiten der Mikrotubuli antagonistisch reguliert (Saunders et al, 1997; Saunders & Hoyt, 1992). In *S. pombe* finden sich zwei Mitglieder der Kinesin-14 Familie zu der auch das *S. cerevisiae* Kar3 gehört: Pkl1 und Klp2 (Pidoux et al, 1996; Troxell et al, 2001). Pkl1 und Klp2 scheinen in *S. pombe* keinen Einfluss auf das Auseinandergleiten der Spindel-Mikrotubuli während der Anaphase B zu haben (Fu et al, 2009). Allein die Abwesenheit von Klp9, ein Kinesin-6, hat in *S. pombe* einen Effekt auf die Elongation der Spindel-Mikrotubuli, diese verlangsamt sich (Fu et al, 2009). Klp9 bindet phosphorylierungsabhängig den Mikrotubulibündler Ase1, mit dem es gemeinsam während der Anaphase B das Auseinandergleiten der Spindel-Mikrotubuli reguliert (Fu et al, 2009; Goshima & Scholey, 2010). Eine Mikrotubuli de-stabilisierende Wirkung haben Mitglieder der Kinesin-8 und Kinesin-14 Familien. Neben den beiden Kinesin-14 Proteinen Pkl1 und Klp2 der Kinesin-14 Familie kommt diese Rolle in *S. pombe* den Kinesin-8 Proteinen Klp5 und Klp6 zu, die einen Komplex formen und wichtig für die korrekte bipolare Ausrichtung und Bindung der Chromosomen in der Metaphase sind und in der Anaphase A für die Bündlung der Mikrotubuli benötigt werden (Grissom et al, 2009; Sanchez-Perez et al, 2005). Tea2 gehört zu der Kinesin-7 Familie. Ursprünglich wurde angenommen, dass Tea2 keine mitotische Funktion besitzt. Da es in Abwesenheit von Tea2 zu einem erhöhten Verlust eines nicht essentiellen Minichromosoms kommt wird nun postuliert, dass Tea2 eine mitotische, noch nicht bekannte Rolle besitzen könnte, die allerdings nicht über eine direkte Bindung von Tea2 an die mitotische Spindel zustande kommt (Browning et al, 2000; Goldstone et al, 2010; Wu et al, 2006). Klp3 und Klp8 hingegen sind kaum untersucht. Die Überexpression von Klp3 führt zu Zytokinesedefekten, eine mögliche mitotische Rolle ist allerdings unklar (Brazier et al, 2000; Jeong et al, 2002).

1.9.2 Mikrotubuli-assoziierte Proteine (MAPs)

Die Mikrotubuli-assoziierten Proteine umfassen eine Vielzahl von Komponenten und können in verschiedene Gruppen unterteilt werden. Die Plus-End-assoziierten Proteine (+TIPs) binden entlang der Mikrotubuli, lokalisieren jedoch präferenziell an den Plus-Enden. Folgend werden die für diese Arbeit relevanten +TIPs vorgestellt.

Die Plus-End-assoziierte EB1-Familie ist hoch konserviert. Das *S. pombe* Mal3 Protein ist ein Mitglied dieser Familie und reguliert die Mikrotubuli-Dynamik während der Interphase und Mitose (Beinhauer et al, 1997). N-terminal trägt es eine Calponin-Domäne (CH-Domäne) die essentiell für die Bindung an die Mikrotubuli ist (Hayashi & Ikura, 2003). In *S. pombe* interagiert Mal3 mit der Kinetochor-Komponente Spc7 und bildet so eine Verbindung zwischen dem Kinetochor und den Mikrotubuli der mitotischen Spindel (Kerres et al, 2004). Das humane EB1-Protein interagiert mit dem Tumorsuppressor „Adenomatous Polyposis Coli“ am Kinetochor. Die Proteine werden dort für die Chromosomen Kongression während der Metaphase benötigt, nicht aber für die Bindung des Kinetochors an die Mikrotubuli (Draviam et al, 2006; Morrison, 2009).

Auch die TOG/MAP215 Familie gehört zu den +TIPs. In *S. pombe* ist diese Familie durch Alp14 und Dis1 vertreten (Garcia et al, 2001; Nabeshima et al, 1995). Beide Proteine stabilisieren die Mikrotubuli der mitotischen Spindel und werden vermutlich für die Verknüpfung mit dem Kinetochor benötigt. Kürzlich gelang es den Interaktionspartner von Dis1 am Kinetochor zu identifizieren. Dis1 bindet direkt an die Kinetochorkomponente Ndc80 was eine Stabilisierung der Kinetochor-Mikrotubuli Verknüpfung zur Folge hat (Hsu & Toda, 2011).

1.9.3 Chromosomaler Passenger Komplex (CPC)

Der CPC besteht aus der Aurora B Kinase (SpArk1) und den drei nicht-enzymatischen Komponenten INCENP (SpPic1), Survivin (SpBir1) und Borealin (SpNbl1) (Bohnert et al, 2009; Leverson et al, 2002; Petersen et al, 2001; Rajagopalan & Balasubramanian, 2002). Er fungiert zellzyklusspezifisch an verschiedenen Orten in der Zelle. In *S. pombe* ist Aurora B während der G2-Phase in Form von einigen punktförmigen Akkumulationen, die bisher mit keiner bekannten Struktur übereinstimmen, im Zellkern lokalisiert. Zu Beginn der Mitose ko-lokalisiert der CPC mit dem Chromatin und findet sich konzentriert an den Kinetochoren. Diese Bindung löst sich mit dem Eintritt in die Anaphase A auf und der CPC assoziiert daraufhin in der Spindelmittle im Bereich der antiparallel überlappenden Mikrotubuli (Petersen et al, 2001). Die Aurora B Kinase wird u. a. für die Chromosomenkondensation, die Korrektur von falschen Kinetochor-Mikrotubuli Verknüpfungen und die Stabilisierung der mitotischen Spindel benötigt. Des Weiteren hat sie einen Einfluss auf die Zytokinese (Bohnert et al, 2009; Ruchaud et al, 2007; Vader et al, 2006; Vagnarelli & Earnshaw, 2004).

Für den Aufbau einer korrekten bipolaren Spindel müssen z. B. merotelische Kinetochor-Mikrotubuli Verknüpfungen wieder aufgelöst werden. Es wird postuliert, dass Aurora B durch die Phosphorylierung einer Vielzahl von Substraten solche Bindungen löst und durch

Phosphorylierung ebenfalls z. B. die Bindung von Ndc80 zu den Mikrotubuli während der Metaphase schwächt. Die De-Phosphorylierung dieser Substrate zu Beginn der Anaphase erfolgt über die Protein Phosphatase 1 (PP1), die ihrerseits über das humane Spc7 Homolog am Kinetochor assoziiert und als Antagonist der Aurora B Kinase fungiert (Liu et al, 2010).

1.9.4 Der Mikrotubuli-Bündler Ase1

Die Mikrotubuli werden in ihrem antiparallel überlappenden Bereich gebündelt und damit stabilisiert. Ase1 ist ein Mitglied der konservierten ASE1/PRC1/MAP65 Familie und bündelt in *S. pombe* die überlappenden Minus-Enden der Interphase Mikrotubuli und die überlappenden Plus-Enden der mitotischen Pol-zu-Pol-Mikrotubuli (Loiodice et al, 2005; Yamashita et al, 2005). Die Organisation und Stabilisierung der Spindelmitte ist von der Hefe bis zum Menschen konserviert (Mollinari et al, 2002; Schuyler et al, 2003). In *S. pombe* führt die Abwesenheit von Ase1 vor allem zu Defekten in Anaphase B. Dort kommt es in der mittleren Elongationsphase zum Zusammenbruch der mitotischen Spindel. Weiterhin führt die Abwesenheit von Ase1 zu Defekten in der Septumbildung. Diese werden häufig falsch positioniert, so dass eine der beiden Folgezellen das gesamte Chromatin des Zellkerns enthält, die andere aber keine, so dass Zellen mit einem doppelten DNA-Gehalt gebildet werden (Loiodice et al, 2005; Yamashita et al, 2005). Es wird vermutet, dass die Kinase Klp9 zusammen mit Ase1 während Anaphase B für das Auseinandergleiten der antiparallelen Mikrotubuli in der Spindelmitte benötigt wird. Klp9 kann zwar auch ohne Ase1 in der Spindelmitte während Anaphase B binden, eine effiziente Bindung kommt aber erst durch die Assoziation mit Ase1 zustande. Beide Proteine werden vermutlich vor Beginn von Anaphase B durch die Zyklin abhängige Kinase Cdc2 phosphoryliert und können dadurch nicht miteinander interagieren. Durch die der Cdc2 entgegengesetzten Phosphatase Clp1 werden beide Proteine zu Beginn der Anaphase B de-phosphoryliert, so dass es zur Bindung und dann zur Elongation der mitotischen Spindel kommt (Fu et al, 2009). Die Abwesenheit beider Proteine führt zum Tod der Zelle. Da aber die Abwesenheit von nur einer Komponente nicht letal ist, wird vermutet, dass der Prozess der Spindelelongation während der Anaphase B redundant gesteuert wird. So findet sich das Kinesin-5 in der *klp9Δ* Mutante in der Spindelmitte während der Anaphase B, obwohl dies im Wildtyp nicht der Fall ist (Fu et al, 2009).

1.9.5 Die Clp1 Phosphatase

Die *S. pombe* Cdc14 ähnliche Phosphatase Clp1 reguliert den Eintritt in die Mitose und leitet mit dem SIN („septation initiation network“) die Zytokinese ein (Cueille et al, 2001; Trautmann et al, 2004; Trautmann et al, 2001). Mitglieder der Familie der Cdc14

Phosphatasen agieren antagonistisch zu den Zyklin-abhängigen Kinasen und leiten durch die Inaktivierung dieser die Zytokinese ein (Clifford et al, 2008).

Die Aktivität von Clp1 wird durch die Lokalisierung beeinflusst. Während der Interphase findet sich Clp1 am SPB und im Nukleolus. Bei letzterer Lokalisierung wird postuliert, dass das Clp1 Protein dort inaktiviert vorliegt. Mit dem Eintritt in die Mitose dissoziiert Clp1 vom SPB und verlässt den Nukleolus. Clp1 findet sich daraufhin in der Prometaphase an den Kinetochoren. Mit dem Übergang in die Anaphase bindet Clp1 am Aktin-Myosin-Ring, der für die Zytokinese benötigt wird, und an der mitotischen Spindel (Cueille et al, 2001; Trautmann et al, 2004; Trautmann et al, 2001). An den Kinetochoren wird es u. a. für die wildtypische Lokalisierung der Aurora B Kinase benötigt und reguliert die Biorientierung der Chromosomen (Trautmann et al, 2004). An der mitotischen Spindel dephosphoryliert es den Mikrotubulibündler Ase1 und das Kinesins Klp9 und ermöglicht so eine wildtypische Elongation der mitotischen Spindel (Fu et al, 2009). Der Aktin-Myosin-Ring wird bis zum Ende der Mitose über Clp1 stabilisiert (Trautmann et al, 2004). Auch wenn die Regulationsmechanismen die zu den Zellzyklus-spezifischen Lokalisierungen von Clp1 führen noch weitgehend unverstanden sind, wird vermutet, dass diese über den nuklearen Import bzw. Export kontrolliert werden (Trautmann et al, 2004).

1.10 Zielsetzung dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit war die Funktionsanalyse des evolutionär konservierten *Schizosaccharomyces pombe* Spc7 Kinetochorproteins im Kontext des Kinetochoraufbaus sowie der Kinetochor-Mikrotubuli-Verknüpfung. Des Weiteren sollten neue Interaktionspartner von Spc7 identifiziert und deren Rolle während der Chromosomensegregation charakterisiert werden. Hierzu habe ich eine saturierende Multikopien-Suppressoranalyse der *spc7-23* Mutante durchgeführt. Bei einem der isolierten Suppressoren handelte es sich um ein bis dato nicht bekanntes, essentielles Kinetochorprotein. Dieses Protein, von mir Sos7 genannt, stellt das erste Mitglied einer neuen hoch konservierten Familie von Kinetochorproteinen dar. Im Rahmen einer detaillierten Analyse des Sos7 Proteins und der von mir generierten konditional-letalen *sos7* Mutanten sollten dessen Funktion beim hierarchischen Aufbau des Kinetochors, seine Interaktionspartner und seine genaue Rolle bei der präzisen Verteilung der Schwesterchromatiden bestimmt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
Adenin	Roth
Agar	Difco
Agarose	BMA
Ammoniumacetat	Roth
Ammoniumchlorid	Roth
Ammoniumsulfat	Roth
Ampicillin	Sigma
Arginin	Roth
Bacto Agar	Difco
Bacto Trypton	Difco
Biotin	Sigma
Borsäure	Roth
Bovines Serum Albumin (BSA)	Roth
Bradford Reagenz	Biorad
5-Bromo-4-Chloro-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid (X-Gal)	Serva
5-Bromo-4-chloro-3-Indolyl-Phosphat (BCIP)	Sigma
Bromphenolblau	Fluka
Calciumchlorid	Roth
Calcofluor White	Sigma
Chloroform	Roth
Concanavalin A	Sigma
Coomassie Brilliant Blau R250	Serva
D(+)-Glukose	Roth
4,6-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI)	Boehringer
Dimethylformamid (DMF)	Roth
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
Dinatrium-Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	AppliChem
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck
Dithiothreitol (DTT)	Sigma
Eisenchlorid	Sigma
Essigsäure	Roth
Ethanol, technisch (96 %)	Roth
Ethidiumbromid	Roth
Ethylenglycol-bis (β -Aminoethylether)	Sigma
N,N,N',N'-Tetraacetat	
Geneticinsulfat (G418)	Calbiochem
Glutaminsäure	Sigma
Glycerin	Roth
Glycin	Roth
Harnstoff	Serva
Hefeextrakt	Difco
Histidin	Roth
Imidazol	Sigma
Inositol	Sigma
Isopropanol	Roth
Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Sigma
Kaliumacetat	Merck
Kaliumchlorid	Roth
Leucin	Roth
Lithiumacetat	Roth

Chemikalien	Hersteller
Lithiumchlorid	Roth
Lysin	Roth
Magnesiumchlorid	Roth
Magnesiumsulfat	Merck
Manganchlorid	Sigma
Mangansulfat	Sigma
Malzextrakt	Difco
Malzextrakt	Difco
Milchpulver	Roth
Molybdänsäure	Sigma
3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure (MOPS)	Sigma
Natriumacetat	Roth
Natriumazid	Sigma
Natriumchlorid	Roth
Natriumdeoxycholat	Sigma
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth
Natriumhydroxid	Roth
Natrium-Pantothenensäure	Sigma
Natriumsulfat	Sigma
Nicotinsäure	Sigma
Nitro Blue Tetrazolium (NBT)	Sigma
4-Nitrophenylphosphat	Sigma
NONIDET P40 (NP-40)	Sigma
Paraformaldehyd	Fluka bis Nov/09; nun Sigma
Phenol	Roth
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMFS)	Serva
Phloxin-B	Sigma
Piperazin-N,N'-bis (2-ethansulfonsäure) (PIPES)	Sigma
Polyethylenglycol 4000 (PEG)	Fluka
Poly-L-Lysin	Sigma
Salzsäure	Roth
Sorbit	Roth
Thiabendazol	Sigma
Thiamin	Sigma
Tris- (hydroxymethyl) –aminomethan (Tris)	Roth
Triton X-100	Sigma
Uracil	Roth
Wasserstoffperoxid	AppliChem
Xylencyanol	Serva
Zinksulfat	Sigma

2.2 Enzyme

Restriktionsenzyme

Folgende Enzyme wurden von MBI Fermentas (nun Thermo Scientific) bezogen;

Acc65I, *BamHI*, *BclI*, *BcuI*, *BglII*, *Cfr42I*, *DpnI*, *Eco32I*, *EcoRI*, *HindIII*, *KpnI*, *KspAI*, *MssI*, *NdeI*, *NotI*, *PstI*, *PvuII*, *SmaI*, *SmlI*, *XbaI*.

Weitere Enzyme wurden von New England BioLabs bezogen;

BsaAI, *SexAI*, *XcmI*.

Die Enzyme wurden laut Herstellerangaben eingesetzt.

Weitere Enzyme

Enzym	Hersteller
Alkalische Phosphatase (CIAP)	Fermentas
β -Glucuronidase	Sigma
Lysing Enzyme <i>Trichoderma harzianum</i>	Sigma
<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase	Invitrogen
Phusion DNA-Polymerase	Stratagene
Proteinase K	Roche
RNase A	Sigma
T4-DNA-Ligase	Fermentas
T4-DNA-Polymerase	Fermentas
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase (ChIP)	Roche
Trypsin/EDTA	Invitrogen
Zymolyase	Seikagaku

2.3 Sonstige Materialien

Material	Hersteller
λ -Phagen DNA	Fermentas
Amicon® Ultra-4 Centrifugal Filter Einheiten	Millipore
AminoLink® Plus Coupling Resin	Thermo Scientific
Complete Protease Inhibitor Cocktail	Roche
Dialyseschlauch	Serva
dNTP Set	Fermentas
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Invitrogen
Earle's salts	Invitrogen
Eppendorf Reaktionsgefäße	Eppendorf
Fetales Kälberserum (FKS)	Invitrogen
Filterpapier Westernblot	Invitrogen
Glasperlen (0,4 - 0,6 mm Ø)	Sartorius
Hank's Balanced Salt Solution (HBSS)	Invitrogen
Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM)	Invitrogen
Immobilon-P Membran	Millipore
Kulturflasche, 260 ml	Nunc
NHS-activated Sepharose™ 4 Fast Flow	GE Healthcare
Ni-NTA Agarose	Qiagen
ProLong® Gold Antifade	Invitrogen
SeeBlue Plus2 Prestained Standard	Invitrogen
SYTOX Green	Invitrogen
TRITC konjugiertes Lektin	Sigma
Vectashield Mounting Medium	Vector Laboratories
Whatman Filterpapier (Durchmesser: 150 mm)	Whatman
Qiagen – tip 20	Qiagen
Zellkulturplatte (24 Well)	Nunc

2.4 Kits

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

2.5 Antikörper

Primärantikörper	Ursprung	Verdünnung	Referenz
α -Tubulin	Ratte	1:500 Immunfluoreszenz (IF) (human)	Santa Cruz (sc-53030)
γ -Tubulin	Maus	1:500 IF (human)	Sigma (T6557)
Aktin	Maus	1:5000 Westernblot	Amersham (N 350)
Aurora B	Maus	1:500 IF	BD (LA/M1)
C10orf118	Kaninchen	1:50 IF	Sigma (HPA018019)
cnp1	Schaf	1:3000 IF	R. Allshire (Kniola et al, 2001)
c-myc	Maus	1:400 Westernblot	Roche (11667149001)
GFP	Kaninchen	1:200 IF 1:1000 Westernblot	Invitrogen (A11122)
GST	Maus	1:1000 Westernblot	Santa Cruz (sc-459)
HA	Maus	1:50 Westernblot	Roche (11583816001)
HA	Zellkulturüberstand (Maus)	1:5 Westernblot	Laborintern (AluH)
Penta his	Maus	1:2500 Westernblot	Qiagen (34660)
Sos7	Kaninchen	1:50 Westernblot 1:1-1:5 IF	diese Studie
Spc7	Kaninchen	1:50 Westernblot 1:1-1:5 IF	diese Studie
TAT-1 (Tubulin)	Zellkulturüberstand (Maus)	1:5 IF (Hefe)	K. Gull (Woods et al, 1989)
WA3 (β -Tubulin)	Maus	1:50 IF 1:100 Westernblot	Gabe von Euteneuer-Schliewa, Adolf Butenandt
ZWINT-1	Maus	1:500 Westernblot	Sigma (SAB1401561)

Sekundärantikörper	Ursprung	Verdünnung	Referenz
Alexa Fluor®488 Anti Maus	Ziege	1:200 IF	Molecular Probes (A11001)
Alexa Fluor®594 Anti Hase	Ziege	1:200 IF	Molecular Probes (A11012)
Alexa Fluor®594 Anti Schaf	Affe	1:200 IF	Molecular Probes (A11016)
AP-Anti Maus	Kaninchen	1:10000 Westernblot	Promega (S372B)
AP-Anti Kaninchen	Maus	1:10000 Westernblot	Promega (S373B)
Cy3-Anti Maus	Schaf	1:500 IF	Sigma (C2181)
Cy3-Anti Kaninchen	Schaf	1:500 IF	Sigma (C2306)
FITC-Anti Maus	Kaninchen	3:500 IF	Sigma (F9137)
FITC-Anti Kaninchen	Ziege	3:500 IF	Sigma (F0382)

2.6 Bioinformatische Programme

Programm	Verwendung	Referenz
BLAST	Homologie Suche	(Altschul et al, 1990; Altschul et al, 1997)
CLUSTAL W	Multiple Alignments	(Higgins & Sharp, 1988; Higgins et al, 1996; Larkin et al, 2007; Thompson et al, 1994)
FASTA	Homologie Suche	(Lipman & Pearson, 1985; Pearson & Lipman, 1988)
GORIV	Sekundärstruktur-Vorhersage Programm	http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_gor4.html (Garnier et al, 1996)
NetNES 1.1	Vorhersage Programm NES-Sequenzen	http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNES/ (la Cour et al, 2004)
NetPhosYeast 1.0	Vorhersage Programm Phosphorylierungsstellen in Hefen	http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhosYeast/ (Ingrell et al, 2007)
NucPred	Vorhersage Programm NLS-Sequenzen	http://www.sbc.su.se/~maccallr/nucpred/ (Brameier et al, 2007)
BOXSHADE 3.21	Graphische Darstellung von multiplen Alignments	http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html
PhyML 3.0	Phylogenetische Analysen (Maximum Likelihood)	http://www.atgc-montpellier.fr/phyml/execution.php (Guindon et al, 2010; Guindon & Gascuel, 2003)
protdist	Phylogenetische Analysen (Neighbor Joining)	http://mobyle.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py#welcome (Neron et al, 2009)
neighbor		
consense		

2.7 Oligonukleotide, Vektoren und *S. pombe* Stämme

Aufgrund der verschiedenen Themen die in der vorliegenden Arbeit behandelt wurden, erfolgt die Aufzählung der verwendeten Oligonukleotide, Vektoren und *S. pombe* Stämme jeweils separat.

2.7.1 Spc7-Publikation 2007

S. pombe Stämme

Name	Genotyp	Herkunft
1267	<i>mis12-537 spc7-23/his3⁺ ade6-M216 leu1-32 h⁻</i>	diese Studie
1028	<i>spc7-23/his3⁺ his3-D1 ade6-M216 leu1-32 ura4-D18 h⁺</i>	diese Studie
1029	<i>spc7-24/his3⁺ his3-D1 ade6-M216 leu1-32 ura4-D18 h⁺</i>	diese Studie
1027	<i>spc7-30/his3⁺ his3-D1 ade6-M216 leu1-32 ura4-D18 h⁺</i>	diese Studie
1163	<i>nuf2-GFP/ura4⁺ spc7-23/his3⁺ ade6-M216 leu1-32 ura4-D18 h⁺</i>	diese Studie
1249	<i>mis12-GFP/LEU⁺ spc7-23/his3⁺ leu1-32 h⁻</i>	diese Studie
1307	<i>mis14-GFP spc7-23/his3⁺ ura4⁺ leu1-32 h⁺</i>	diese Studie
1266	<i>spc24-GFP/Kan^R spc7-23/his3⁺ ade6-M216his⁻ leu1-32 ura4⁺ h⁺</i>	diese Studie
1069	<i>mal2-GFP/Kan^R spc7-23/his3⁺ his3-D1 ade6-M216 leu1-32 ura4⁺ h⁺</i>	diese Studie
1237	<i>fta2-291/his3⁺ spc7-GFP/Kan^R ade6-M210 ura4⁺ h⁻</i>	diese Studie

Name	Genotyp	Herkunft
1258	<i>sim4-GFP/Kan^R spc7-23/his3⁺ arg3-D4 ade6-M210 ura4⁻ leu1-32 his3-D1 h⁻</i>	diese Studie
1187	<i>dad1-GFP/Kan^R spc7-23/his3⁺ leu1-32 ura4-D18 h⁻</i>	diese Studie
1260	<i>spc7-23/his3⁺ mis15-68 ade6-M216 h⁻</i>	diese Studie
1256	<i>spc7-23/his3⁺ mis17-362 ura4-D18 h⁺</i>	diese Studie
1264	<i>spc7-23/his3⁺ sim4-193 his3-D1 ade6-M210 leu1-32 ura4-D18 h⁺</i>	diese Studie
1088	<i>spc7-23/his3⁺ mal2-1 ade6-M210 leu1-32 ura4-D18 h⁺</i>	diese Studie
1196	<i>spc7-23/his3⁺ mis6-302 leu1-32 ura4-D18 h⁺</i>	diese Studie
1085	<i>fta2-291/his3⁺ spc7-23/his3⁺ leu1-32 ade6-M210 ura4-D18 his3-D1 h⁻</i>	diese Studie
1048	<i>fta2-291/his3⁺ his3⁻ leu1-32 ura4-D18 ade6-M210 h⁻</i>	diese Studie
1175	<i>spc7-23/his3⁺ mad2Δ::ura4⁺ ade6-M216 leu1-32 ura4-D18 h⁺</i>	diese Studie
1177	<i>spc7-23/his3⁺ mph1Δ::ura4⁺ ade6-M216 leu1-32 ura4-D18 h⁻</i>	diese Studie
1062	<i>spc7-23/his3⁺ cnt1(NcoI):arg3 his3-D1 ade6-M210 leu1-32 ura4⁻ arg3-D4 h⁻</i>	diese Studie
1081	<i>spc7-23/his3⁺ otr2(HindIII):ura4⁺ ura4-DS/E leu1-32 ade6-M216 arg3-D4 h⁺</i>	diese Studie
1222	<i>spc7-23/his3⁺ his7⁺::lacI-GFP lys1⁺::LacOP leu1⁻ ura4⁺ h⁺</i>	diese Studie
1060	<i>spc7-30/his3⁺ Kan^R-nmt81-GFP-atb2⁺ leu1-32 h⁻</i>	diese Studie
1254	<i>mis6-3xHA/ LEU⁺ spc7-23/his3⁺ ade6-M216 leu1-32 ura4-D18 h⁺</i>	diese Studie
1228	<i>spc7-HA/Kan^R Kan^R-nmt81-GFP-atb2⁺ leu1-32 h⁻</i>	diese Studie
1244	<i>spc7-23-GFP/Kan^R/his3⁺ his3-D1 ade6-M216 leu1-32 ura4-D18 h⁺</i>	diese Studie
1248	<i>spc7-GFP/Kan^R nuf2-1/ura4⁺ ura4⁻ ade6-M210 his3-D1 h⁻</i>	diese Studie
1269	<i>spc7-GFP/Kan^R mis12-537 leu1-32 h⁺</i>	diese Studie
1224	<i>spc7-23/his3⁺ mal3Δ::his3⁺ his3⁻ ade6-M210 leu1-32 ura4-D18 h⁺</i>	diese Studie
1288	<i>spc7-23/his3⁺ alp14Δ::kan^R ura4⁺ leu1-32 h⁻</i>	diese Studie
1262	<i>spc7-23/his3⁺ peg1-1 ura4-D18 leu1-32 h⁺</i>	diese Studie
498	<i>spc7-HA/Kan^R mal2-GFP/Kan^R ade6-M210 leu1-32 ura4-D6 h⁺</i>	U. Fleig
597	<i>mal2-GFP/Kan^R ade6-M210 leu1-32 ura4-D6 h⁺</i>	U. Fleig
617	<i>spc7-HA/Kan^R ade6-M210 leu1-32 ura4-D6 Ch¹⁶[ade6-M216] h⁻</i>	U. Fleig
852	<i>mal2-1 leu1-32 ade6-M210 ura4-D18 h⁻</i>	U. Fleig
724	<i>spc7-GFP/Kan^R mal2-1 ade6-M210 ura4⁻ Ch¹⁶[ade6-M216] h⁻</i>	U. Fleig
135	<i>mal3Δ::his3⁺ ade6-M210 leu1-32 ura4-D18 his3Δ h⁺</i>	U. Fleig
336	<i>alp14Δ::kan^R ura4⁺ h⁺</i>	T. Toda
IH1563	<i>peg1-1 leu1-32 ura4-D18 h⁻</i>	I. Hagan
FY4540	<i>sim4-193 cnt1(NcoI):arg3 cnt3(NcoI):ade6 otr2(HindIII):ura4 tel1L:his3 ade6-M210 leu1-32 ura4-D18 arg3-D4 his3-D1 h⁻</i>	R. Allshire
FY648	<i>swi6Δ::his1⁺ otr1R(SphI)::ura4⁺ ura4-DS/E leu1-32 ade6-M210 h⁺</i>	R. Allshire
FY5231	<i>sim4-193 arg3-D4 ade6-M210 his3-D1 ura4-D18 leu1-32 h⁺</i>	R. Allshire
KG425	<i>ade6-M210 leu1-32 his3Δ ura4-D18 h⁻</i>	K. Gould
ANF251-9A	<i>nuf2-1/ura4⁺ ura4-D18 h⁺</i>	Y. Hiraoka
SS638	<i>mad2Δ::ura4⁺ leu1-32 ura4-D18 ade6-M210 h⁻</i>	S. Sazer
SS560	<i>mph1Δ::ura4⁺ leu1-32 ura4-D18 ade6-M216 h⁻</i>	S. Sazer
	<i>mis6-302 leu1-32 h⁻</i>	M. Yanagida
	<i>mis15-68 h⁻</i>	M. Yanagida
	<i>mis17-362 h⁻</i>	M. Yanagida
	<i>mis12-537 leu1-32 h⁻</i>	M. Yanagida
	<i>Kan^R-nmt81-GFP-atb2⁺ leu1-32 h⁻</i>	T. Toda

Vektoren

Nr.	Genetische Marker, Konstruktion
159	pUR19-mal2 ⁺ (Q11)
222	pUR19, ura4 ⁺ , Amp ^R
270	pJR-2-3XL, LEU2, Amp ^R , nmt1 ⁺ Promotor
427	spc7-c pJR2-41XU nmt41+ ura4+
483	pJR-2-3XL-spc7-c-gfp (2461-4092 Bp)
489	pJR-2-3XL-spc7 ⁺ -gfp
492	pJR-2-3XL-spc7-n-gfp (1-2460 Bp)

2.7.2 Spc7-Fragmente

S. pombe Stämme

Nr.	Genotyp
135	<i>mal3Δ::his3⁺ ade6-M210 leu1-32 his3Δ ura4-D18 h⁺</i>
605	<i>ade6-M210 leu1-32 his3Δ ura4-D18 h⁻</i>
1028	<i>spc7-23/his3⁺ his3-D1 ade6-M216 leu1-32 ura4-D18 h⁺</i>
1505	<i>mis12-537 leu1-32ura⁻his⁻ade⁻ h⁻</i>
1727	<i>nuf2-1::kan^R ura4-D18 h⁺</i>
1943	<i>sos7Δ7::his3⁺ his3-D1 ade6⁻ leu1-32 ura4-D18 h⁻</i>

Vektoren

Nr.	Bezeichnung	Konstruktion
581*	Vektor	pSGP572a (GFP Fusionsprotein C-terminal), REP4XU, nmt1 ⁺
808	FVL	PCR-Produkt 523/653
654	FN	PCR-Produkt 523/525
641	FC	PCR-Produkt 653/766
626	F1	PCR-Produkt 523/524
627	F2	PCR-Produkt 510/525
628	F3	PCR-Produkt 523/650
629	F4	PCR-Produkt 525/651
630	F5	PCR-Produkt 652/653
631	F6	PCR-Produkt 651/715
632	F7	PCR-Produkt 637/653
633	F8	PCR-Produkt 651/684
636	F9	PCR-Produkt 684/736
637	F10	PCR-Produkt 651/792
638	F11	PCR-Produkt 741/653
639	F12	PCR-Produkt 742/653
640	F13	PCR-Produkt 743/653
655	F14	PCR-Produkt 736/815
656	F15	PCR-Produkt 736/816
657	F16	PCR-Produkt 684/883
658	F17	PCR-Produkt 651/816
634	F18	PCR-Produkt 637/638
660	F19	PCR-Produkt 523/638
661	F20	PCR-Produkt 523/816
803	F21	PCR-Produkt 1076/653
804	F22	PCR-Produkt 1077/653
817	F23	808 mit NotI geöffnet, homologe Rekombination in <i>S. cerevisiae</i> mit Oligonukleotid 1162
818	F24	808 mit NotI geöffnet, homologe Rekombination in <i>S. cerevisiae</i> mit Oligonukleotid 1163
659	Vektor-NLS	NLS-Sequenz mit ATG (SV40) 5' vor der GFP Sequenz, 581 mit NotI geöffnet, homologe Rekombination in <i>S. cerevisiae</i> mit Oligonukleotid 1075, Schnittstellen identisch zu 581
811	F13-NLS	PCR-Produkt 523/524
812	F21-NLS	PCR-Produkt 1076/653
813	F22-NLS	PCR-Produkt 1077/653
843	FVL-L97A	gerichtete Mutagenese der Aminosäureposition 97 (von Leucin nach Alanin) mit den Oligonukleotiden 1079/1080
844	FVL-K26A	gerichtete Mutagenese der Aminosäureposition 26 (von Lysin nach Alanin) mit den Oligonukleotiden 1255/1256
845	FVL-K629A	gerichtete Mutagenese der Aminosäureposition 629 (von Lysin nach Alanin) mit den Oligonukleotiden 1253/1254
846	FVL-R1091A	gerichtete Mutagenese der Aminosäureposition 1091 (von Arginin nach Alanin) mit den Oligonukleotiden 1251/1252
856	FVL-26-629	gerichtete Mutagenese mit den Oligonukleotiden 1253/1254 auf 844
857	FVL-629-1091	gerichtete Mutagenese mit den Oligonukleotiden 1253/1254 auf 846
858	FVL-26-1091	gerichtete Mutagenese mit den Oligonukleotiden 1255/1256 auf 846
859	FVL-26-629-1091	gerichtete Mutagenese mit den Oligonukleotiden 1251/1252 auf 856
862	FN-L97A	gerichtete Mutagenese mit den Oligonukleotiden 1079/1080 auf 654

* = Herkunft; S. Forsburg

Oligonukleotide

Nr.	Sequenz
523	ATAAGATCTATGCCAACATCGCCTCGTCG
653	GATGCGGCCGCGAGCTGTATTTGTTCCAAACAG
525	GATGCGGCCGCTGCCACGGAAGTTGTATTA
766	ATAAGATCTATGAATGAACATGAGAAAGTC
524	GATGCGGCCGCGACCGTTCATGGTTGGTAAAG
510	ATAAGATCTATGCCAAATGGGAACATAATCT
650	TTTGCGGCCGCGCTCGCTCAACCGATTATAGA
651	ATAAGATCTATGAACGAAAATCACGATCAGTC
652	ATAAGATCTATGGTTTCAAGGCAACCCACTGA
715	GATGCGGCCGCGATCCAGAATCAACATCTGCAT
637	AGACAGATCTATGGAATCTTTTACATACAATT
638	AGAGAGCGGCCGCGATTACTTTTCGTTAGGGAAGT
684	ATAAGATCTATGAGTGATAAGTCAGAAAATTT
736	TTTGCGGCCGCGAGATGTAGAATTCTCACAAG
792	TTTGCGGCCGCGTTCCTTCTCTCCATTAGTTA
741	ATAAGATCTATGGGTGATTGGTACGAATGGCG
742	ATAAGATCTATGGGTAGTATTACTACAGTACA
743	ATAAGATCTATGTCTTGCTCTGATTTGGAATT
815	TTTGCGGCCGCGATATGAGGGTATTTCTTCTC
816	TTTGCGGCCGCGAGATGTAGAATTCTCACAAG
883	ATAAGATCTATGAGTGATAAGTCAGAAAATTT
1076	ATAAGATCTATGGCTTGCAGCTCAAATGT
1077	ATAAGATCTATGTCTAAGGTAAAGGTTGT
1162	GATACGATGCCAACTCTACCAAACGTCGAGCCGATAAGCCGGCGGCCGCTTGAGTAAAGGAGAA GAACTTTTCACTGGAGTTGTCCCAA
1163	CCTTATTCAGCCGAGGTTACGGTTGAGATTTTGAGGCAAAGCGGCCGCTTGAGTAAAGGAGAAAG AAGTTTTCACTGGAGTTGTCCCAA
1075	GCCTCGAGAGATCTCCACCGCGGTGGCGGCCGCGCATGGCGGAATTAATTCCCGAGCCTCCAAAAA AGAAGAGAAAGGTGCAATTGGGTACCGCCTTGAGTAAAGGAGAAGAAGTCTTCACT
1079	AGAGACTTCAAATGGAAGACAAACAGCAATTGTGCGGTGAGAC
1080	GTCTCACGCGACAATTGCTGTTTGTCTTCCATTTGAAGTCTCT
1255	GAAACAAAAGTAGGGCGCGTCCACACTCGCT
1256	AGCGAGTGTGGACGCGCCCTACTTTTGTTC
1253	TAAGCTTGGTACTCGGGCAAGACGCTTAAGATATAGC
1254	GCTATATCTTAAGCGTCTTGCCCGAGTACCAAGCTTA
1251	GTTGAGGTTGAGAGGGCACGTCGGCTTCTGAG
1252	CTCAGAAGCCGACGTGCCCTCTCAACCTCAAC

2.7.3 *spc7-23*: extragene Multikopien-Suppressoranalyse

2.7.3.1 V11: Mpd2 und Btf3

S.pombe Stämme

Name	Genotyp	Herkunft
605	<i>ade6-M210 leu1-32 his3Δ ura4-D18 h⁻</i>	K. Gould
845	<i>sim4-193 arg3-D4 ade6-210 his3-D1 ura4-D18 leu1-32 h⁺</i>	R. Allshire
963	<i>Kan^R::nmt81-GFP-atb2⁺ leu1-32 h⁻</i>	T. Toda
1027	<i>spc7-30::his3⁺ his3-D1 ade6-M216 leu1-32 ura4-D18h⁺</i>	U. Fleig
1028	<i>spc7-23::his3⁺ his3-D1 ade6-M216 leu1-32 ura4-D18 h⁺</i>	U. Fleig
1029	<i>spc7-24::his3⁺ his3-D1 ade6-M216 leu1-32 ura4-D18 h⁺</i>	U. Fleig
1048	<i>fta2-291::his3⁺ his3⁻ leu1-32 ura4-D18 ade6-M210 h⁻</i>	U. Fleig
1057	<i>mal2-1 leu1-32 ade6-M210 ura4-D18 h⁺</i>	U. Fleig
1065	<i>mis15-68 leu1-32 ura4-D18 ade6-M210 h⁻</i>	M. Yanagida
1067	<i>mis17-362 his-D1 leu1-32 ura4-D18 ade6-M210 h⁻</i>	M. Yanagida
1140	<i>mph1Δ::ura4⁺ ade6-M216 leu1-32 ura4-D18 his3-D1h⁺</i>	S. Sazer
1141	<i>mad2Δ::ura4⁺ ade6-M216 leu1-32 ura4-D18h⁺</i>	S. Sazer
1244	<i>spc7-23-GFP::Kan^R::his3⁺ his3-D1 ade6-M216 leu1-32 ura4-D18 h⁺</i>	U. Fleig
1505	<i>mis12-537 leu1-32ura⁻his⁻ade⁻ h⁻</i>	M. Yanagida
1554	<i>btf3-3xHA::kan^Rhis3-D1 ade6-M210 leu1-32 ura4-D18 h⁻</i>	dieseStudie
1555	<i>btf3-GFP::kan^Rhis3-D1 ade6-M210 leu1-32 ura4-D18 h⁻</i>	dieseStudie

Name	Genotyp	Herkunft
1574	<i>btf3Δ::kan^Rhis3-D1 ade6-M210 leu1-32 ura4-D18 h⁻</i>	dieseStudie
1604	<i>mal2-1 btf3Δ::kan^Rhis3-D1 ade6-M210 leu1-32 ura4-D18</i>	dieseStudie
1605	<i>spc7-23::his3⁺btf3Δ::kan^Rhis3-D1 ade6-M210 leu1-32 ura4-D18</i>	dieseStudie
1606	<i>fta2-291::his3⁺btf3Δ::kan^Rhis3-D1 ade6-M210 leu1-32 ura4-D18</i>	dieseStudie
1727	<i>nuf2-1::kan^Rura4-D18 h⁺</i>	dieseStudie
1943	<i>sos7Δ7::his3⁺his3-D1 ade6⁻ leu1-32 ura4-D18 h⁻</i>	dieseStudie
1947	<i>sos7-178::his3⁺his3-D1 ade6⁻ leu1-32 ura4-D18 h⁻</i>	dieseStudie
2005	<i>btf3Δ::kan^RKan^R::nmt81-GFP-atb2⁺his3-D1 ade6-M216 leu1-32 h⁺</i>	dieseStudie
2016	<i>mph1Δ::ura4⁺btf3Δ::kan^Rhis3-D1 ade6⁻ leu1-32 ura4-D18h⁺</i>	dieseStudie
2018	<i>mad2Δ::ura4⁺btf3Δ::kan^Rhis3-D1 ade6-M210 leu1-32 ura4-D18 h⁺</i>	dieseStudie

Vektoren

Nr.	Genetische Marker, Konstruktion
222	pUR19; ura4 ⁺ , Amp ^R
692	„V11“ pUR19, Chr. I 4856504-4862291, mpd2 ⁺ , btf3 ⁺ , wsp1 (letzte 762/1919 Bp)
715	„V11-HindIII-Spel-T4“ pUR19, wsp1 (letzte 762/1919 Bp)
716	„V11-HindIII-Spel-Smal-T4“ pUR19, btf3 ⁺
717	„V11-nur mpd2 ⁺ “ homologe Rekombination mit Oligonukleotid 867; pUR19, mpd2 ⁺
282	pJR2-3XU; ura4 ⁺ , Amp ^R , Thiamin-reprimierbare nmt1 ⁺ Promotor
838	pJR2-3XU- mpd2 ⁺ , Vektor (282) KpnI, T4, SacII geöffnet, mpd2 ⁺ -Fragment aus 838 mit PaeI, T4, SacII entfernt, ligiert
286	pJR2-41XU; ura4 ⁺ , Amp ^R , Thiamin-reprimierbare nmt41 ⁺ Promotor
290	pJR2-81XU; ura4 ⁺ , Amp ^R , Thiamin-reprimierbare nmt81 ⁺ Promotor
270	pJR2-3XL; LEU2, Amp ^R , Thiamin-reprimierbare nmt1 ⁺ Promotor
718	pJR2-3XL- btf3 ⁺ } PCR-Produkt (709/710) NotI/PstI geschnitten, in NotI/PstI geöffneten Vektor
719	pJR2-3XU- btf3 ⁺ }
720	pJR2-41XU- btf3 ⁺ }
721	pJR2-81XU- btf3 ⁺ }

T4: Blunting durch T4 DNA Polymerase

Oligonukleotide

Nr.	Sequenz
867	ACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGAATTCGAGCTCGGTACCGGGTGCTAATATATGTAAAGTGACTATGGTATTATCAGTA
709	AAACTGCAGATGGATCCCTCCAAATTGGC
710	AAAGCGGCCGCTTAATCTTGTTCTGTCAAACT
700	btf3Δ kan ^R 5'; ACACATTTTCGGTACCACAACCTTTAGAAACGTCAAGTTCAAGTCCTTCCACAACCAAAAACGTTTGGTCAAATAGAAACAAATGGGTAAGGAAAAGACTCA
701	btf3Δ kan ^R 3'; GATAATACCATAGTCACCTTTACATATATTAGCACCCAAATCTTGAGTCAAAAATCCGACATGAAATATTTTGTTGCTTATTTAGAAAACTCATCGAGCA
704	btf3 ⁺ Tag 5'; GTGAAGGTGAAAAGGGAGCTGATGCACAAGCCGACGATGGAGAAATTCCTGACCTTGTCGAAAAGTTTGACGAACAAGATCGGATCCCCGGGTTAATTAA
705	btf3 ⁺ Tag 3'; GATAATACCATAGTCACCTTTACATATATTAGCACCCAAATCTTGAGTCAAAAATCCGACATGAAATATTTTGTTGCTTATGAATTCGAGCTCGTTTAAAC
707	btf3 ⁺ Verifikation Tag 5'; ACCTTGCTGGCATCCAAGAG
708	btf3 ⁺ Verifikation Tag/Delta 3'; GCCAAGCTTACTTATAAGGA
713	btf3Δ Verifikation Tag 5'; AGCAGGGTAAGTATTGATAT

2.7.3.2 V5: Sosl

S.pombe Stämme

Name	Genotyp	Herkunft
845	<i>sim4-193 arg3-D4 ade6-210 his3-D1 ura4-D18 leu1-32 h⁺</i>	R. Allshire
1026	<i>spc7-5::his3⁺his3-D1 ade6-M210 leu1-32 ura4-D18h⁻</i>	U. Fleig
1027	<i>spc7-30::his3⁺his3-D1 ade6-M216 leu1-32 ura4-D18h⁺</i>	U. Fleig
1028	<i>spc7-23::his3⁺his3-D1 ade6-M216 leu1-32 ura4-D18 h⁺</i>	U. Fleig
1029	<i>spc7-24::his3⁺his3-D1 ade6-M216 leu1-32 ura4-D18h⁺</i>	U. Fleig
1048	<i>fta2-291::his3⁺his3⁻ leu1-32 ura4-D18 ade6-M210 h⁻</i>	U. Fleig

Name	Genotyp	Herkunft
1057	<i>mal2-1 leu1-32 ade6-M210 ura4-D18 h⁺</i>	U. Fleig
1065	<i>mis15-68 leu1-32 ura4-D18 ade6-M210 h⁻</i>	M. Yanagida
1067	<i>mis17-362 his-D1 leu1-32 ura4-D18 ade6-M210 h⁻</i>	M. Yanagida
1505	<i>mis12-537 leu1-32ura⁺his⁻ade⁻h⁻</i>	M. Yanagida
1727	<i>nuf2-1::kan^R ura4-D18 h⁺</i>	Y. Hiraoka
1943	<i>sos7-258X::his3⁺ his3-D1 ade6⁻ leu1-32 ura4-D18 h⁻</i>	diese Studie
1945	<i>sos7-X264::his3⁺ his3-D1 ade6⁻ leu1-32 ura4-D18 h⁻</i>	diese Studie
1947	<i>sos7-178::his3⁺ his3-D1 ade6⁻ leu1-32 ura4-D18 h⁻</i>	diese Studie

Vektoren

Nr.	Genetische Marker, Konstruktion
222	pUR19; ura4 ⁺ , Amp ^R
687	„V5“ pUR19, Chr. I 4414372-4422921, SPAC29E6.07, <i>tbp1⁺</i> , SPAC29E6.09, SPAC29E6.10c
713	„V5-Acc65I“ pUR19, SPAC29E6.09 (435/1020 Bp), SPAC29E6.10c
779	„V5-Acc65I-PstI“ pUR19, SPAC29E6.10c (1764/3258 Bp)
780	„V5-Acc65I-SacI“ pUR19, SPAC29E6.09 (435/1020 Bp), SPAC29E6.10c (3063/3258 Bp, ohne ATG)

2.7.3.3 V7: Sos7

S. pombe Stämme

Name	Genotyp	Herkunft
1797	<i>h⁻ sos7-123 (K123E, L157S, N158S, R237K, M254L, L262L) his3-D1 ade6-M210 leu1-32 ura4-D18 (Nr.1)</i>	diese Studie
1798	<i>h⁻ sos7-179 (H179P) his3-D1 ade6-M210 leu1-32 ura4-D18 (Nr.2)</i>	diese Studie
1799	<i>h⁻ sos7-L261P (L261P) his3-D1 ade6-M210 leu1-32 ura4-D18 (Nr.3)</i>	diese Studie
1800	<i>h⁻ sos7-L261H (L261H) his3-D1, ade6-M210 leu1-32 ura4-D18 (Nr.4)</i>	diese Studie
1801	<i>h⁻ sos7-156 (E156G) his3-D1 ade6-M210 leu1-32 ura4-D18 (Nr.5)</i>	diese Studie
1802	<i>h⁻ sos7-Y258X (Y258Stopp) his3-D1 ade6-M210 leu1-32 ura4-D18 (Nr.6)</i>	diese Studie
1803	<i>h⁻ sos7-189 (N189I, A223T) his3-D1 ade6-M210 leu1-32 ura4-D18 (Nr. 8)</i>	diese Studie
1804	<i>h⁻ sos7-Q260X (Q260X) his3-D1, ade6-M210, leu1-32, ura4-D18 (Nr. 9)</i>	diese Studie
1805	<i>h⁻ sos7-116 (D116V, intron, E156D, L262P) his3-D1 ade6-M210 leu1-32 ura4-D18</i>	diese Studie
1806	<i>h⁻ sos7-209 (L209P) his3-D1 ade6-M210 leu1-32 ura4-D18 (Nr.13)</i>	diese Studie
1807	<i>h⁻ sos7-147 (intron, L147P, S155S, E256G) his3-D1 ade6-M210 leu1-32 ura4-D18 (Nr.15)</i>	diese Studie
1808	<i>h⁻ sos7-228 (N228D, Stopp verschoben; IMRRYR-Stopp) his3-D1 ade6-M210 leu1-32 ura4-D18 (Nr.16)</i>	diese Studie
1809	<i>h⁻ sos7-126 (intron, S126P) his3-D1 ade6-M210 leu1-32 ura4-D18 (Nr.17)</i>	diese Studie
1810	<i>h⁻ sos7-116 (D116G, L209P, T236A) his3-D1 ade6-M210 leu1-32 ura4-D18 (Nr.18)</i>	diese Studie
1811	<i>h⁻ sos7-220 (L147P, Y220C) his3-D1 ade6-M210 leu1-32 ura4-D18 (Nr.19)</i>	diese Studie
1812	<i>h⁻ sos7-82 (L82P, intron, E134G, T166T) his3-D1 ade6-M210 leu1-32, ura4-D18 (Nr.20)</i>	diese Studie
1813	<i>h⁻ sos7-137 (intron, M137V, D163D, E193G, D240D, K244E, L255P, Q263R), his3-D1, ade6-M210, leu1-32, ura4-D18 (Nr.23)</i>	diese Studie
1814	<i>h⁻ sos7-150 (L150P), his3-D1, ade6-M210, leu1-32, ura4-D18 (Nr.24)</i>	diese Studie
1815	<i>h⁻ sos7-S126P (S126P), his3-D1, ade6-M210, leu1-32, ura4-D18 (Nr.26)</i>	diese Studie
1816	<i>h⁻ sos7+6 (Stopp verschoben; IMRRYR-Stopp), his3-D1, ade6-M210, leu1-32, ura4-D18 (Nr.27)</i>	diese Studie
1817	<i>h⁻ sos7-157 (L157S), his3-D1, ade6-M210, leu1-32, ura4-D18 (Nr.29)</i>	diese Studie
1818	<i>h⁻ sos7-178 (I178N), his3-D1, ade6-M210, leu1-32, ura4-D18 (Nr.31)</i>	diese Studie
1819	<i>h⁻ sos7-260 (intron, Q260Stopp), his3-D1, ade6-M210, leu1-32, ura4-D18 (Nr.33)</i>	diese Studie
1820	<i>h⁻ sos7-V115R, his3-D1, ade6-M210, leu1-32, ura4-D18 (Nr. 34)</i>	diese Studie
1821	<i>h⁻ sos7-K112A, his3-D1, ade6-M210, leu1-32, ura4-D18 (Nr. 35)</i>	diese Studie
1822	<i>h⁻ sos7-S110A, his3-D1, ade6-M210, leu1-32, ura4-D18 (Nr. 36)</i>	diese Studie
1823	<i>h⁻ sos7-S110E, his3-D1, ade6-M210, leu1-32, ura4-D18 (Nr. 37)</i>	diese Studie
1914	<i>h⁺ sos7-178/his3⁺ cnt1(NcoI):arg3 ade6-M210 ura4-D18 arg3-D4</i>	diese Studie
1916	<i>h⁻ sos7Δ7/his3⁺ cnt1(NcoI):arg3 ade6-M210 arg3-D4</i>	diese Studie
1918	<i>h⁺ sos7+6/his3⁺ cnt1(NcoI):arg3 arg3-D4</i>	diese Studie
1832	<i>h⁻ sos7+6/his3⁺ spc7-GFP/Kan^R ade6-M210 leu1-32 ura4⁻</i>	diese Studie
1834	<i>h⁺ sos7-178/his3⁺ spc7-GFP/Kan^R ade6-M210 leu1-32 ura4⁻</i>	diese Studie
1842	<i>h⁻ sos7-178/his3⁺ mal2-GFP/Kan^R ade6-M210 leu1-32 ura4⁻</i>	diese Studie
1844	<i>h⁻ sos7-178/his3⁺ fta2-GFP/Kan^R ade6⁻ leu1-32 ura4⁻</i>	diese Studie

Name	Genotyp	Herkunft
1866	<i>h⁺ sos7Δ7/his3⁺ fta2-GFP/Kan^R ade6⁻ leu1-32 ura4⁻</i>	diese Studie
1869	<i>h⁺ sos7Δ7/his3⁺ mal2-GFP/Kan^R ade6-M210 leu1-32 ura4⁻</i>	diese Studie
1873	<i>h⁻ sos7Δ7/his3⁺ spc7-GFP/Kan^R ade6-M210 leu1-32 ura4⁻</i>	diese Studie
1943	<i>h⁻ sos7Δ7/his3⁺ his3-D1 ade6⁻ leu1-32 ura4-D18</i>	diese Studie
1945	<i>h⁻ sos7+6/his3⁺ his3-D1 ade6⁻ leu1-32 ura4-D18</i>	diese Studie
1947	<i>h⁻ sos7-178/his3⁺ his3-D1 ade6⁻ leu1-32 ura4-D18</i>	diese Studie
1971	<i>h⁹⁰ pcp1::pcp1-GFP-HA/Kan^R sos7-cmyc/Kan^R leu1-32 lys1-131 ade6⁻</i>	diese Studie
1701	<i>h⁹⁰ sos7-GFP/Kan^R spc7-23/his3⁺ leu1-32 his3-D1 ura4-D18 ade6⁻</i>	diese Studie
1732	<i>h⁺ sos7-GFP/Kan^R sim4-193 ade6-M210 leu1-32 his3-D1 ura4-D18 arg3-D4</i>	diese Studie
1734	<i>h⁻ sos7-GFP/Kan^R nuf2-1/ura4⁺ ade6-M210 leu1-32 his3-D1 ura4-D18</i>	diese Studie
1736	<i>h⁻ sos7-GFP/Kan^R fta2-291/his3⁺ ade6-M210 leu1-32 his3⁺ ura4-D18</i>	diese Studie
1738	<i>h⁺ sos7-GFP/Kan^R mal2-1 ade6-M210 leu1-32 his3-D1 ura4-D18</i>	diese Studie
1740	<i>h⁻ sos7-GFP/Kan^R mis15-68 ade6-M210 leu1-32 ura4-D18</i>	diese Studie
1742	<i>h⁻ sos7-GFP/Kan^R mis17-362 ade6-M210 leu1-32 his3-D1 ura4-D18</i>	diese Studie
1745	<i>h⁺ sos7-GFP/Kan^R mis6-302 leu1⁻ ura4⁻ ade6⁻</i>	diese Studie
1746	<i>h⁻ sos7-GFP/Kan^R mis12-537 leu1⁻ ura4⁻ his3-D1</i>	diese Studie
1846	<i>h⁺ sos7-cmyc/Kan^R ade6⁻ leu1-32 his3-D1 ura4-D18</i>	diese Studie
1921	<i>h⁺ sos7-178/his3⁺ LacI-GFP/his7⁺ LacO-repeat/lys1⁺ leu1⁻ ura4⁻ ade6-M210</i>	diese Studie
1923	<i>h⁹⁰ sos7Δ7/his3⁺ LacI-GFP/his7⁺ LacO-repeat/lys1⁺ leu1⁻ ura4⁻</i>	diese Studie
1924	<i>h⁹⁰ sos7-178/his3⁺ LacI-GFP/his7⁺ LacO-repeat/lys1⁺ leu1⁻ ura4⁻ ade6-M210</i>	diese Studie
1896	<i>h⁺ cut11-GFP/ura4⁺ sos7Δ7/his3⁺ leu1-32 ura4-D18</i>	diese Studie
1898	<i>h⁺ cut11-GFP/ura4⁺ sos7+6/his3⁺ leu1-32 ura4-D18</i>	diese Studie
1900	<i>h⁻ cut11-GFP/ura4⁺ sos7-178/his3⁺ leu1-32 ura4-D18</i>	diese Studie
1829	<i>h⁻ KanR-nmt81-GFP-atb2⁺ sos7+6/his3⁺ ade6⁻ leu1-32 ura4⁻</i>	diese Studie
1830	<i>h⁻ KanR-nmt81-GFP-atb2⁺ sos7-178/his3⁺ ade6⁻ leu1-32 ura4⁻</i>	diese Studie
1874	<i>h⁻ KanR-nmt81-GFP-atb2⁺ sos7Δ7/his3⁺ ade6⁻ leu1-32 ura4⁻</i>	diese Studie
1832	<i>h⁻ spc7-GFP/Kan^R sos7+6/his3⁺ ade6-M210 leu1-32 ura4⁻</i>	diese Studie
1834	<i>h⁺ spc7-GFP/Kan^R sos7-178/his3⁺ ade6-M210 leu1-32 ura4⁻</i>	diese Studie
1872	<i>h⁹⁰ spc7-GFP/Kan^R sos7Δ7/his3⁺ ade6-M210 leu1-32 ura4⁻</i>	diese Studie
1979	<i>h⁻ sos7-178/his3⁺ sim4-GFP/Kan^R ade6-M210 leu1-32 his3-D1 ura4⁻</i>	diese Studie
1981	<i>h⁻ sos7Δ7/his3⁺ sim4-GFP/Kan^R ade6-M210 leu1-32 his3-D1 ura4⁻</i>	diese Studie
1983	<i>h⁻ sos7+6/his3⁺ sim4-GFP/Kan^R ade6-M210 leu1-32 his3-D1 ura4⁻</i>	diese Studie
1836	<i>h⁺ sos7+6/his3⁺ otr2(HindIII)::ura4⁺ ade6-M210 leu1-32 ura4⁻</i>	diese Studie
1838	<i>h⁻ sos7-178/his3⁺ otr2(HindIII)::ura4⁺ ade6-M210 leu1-32 ura4⁻</i>	diese Studie
1864	<i>h⁺ sos7Δ7/his3⁺ otr2(HindIII)::ura4⁺ ade6-M210 leu1-32 ura4⁻</i>	diese Studie
1941	<i>h⁺ sos7-178/his3⁺ flp1-gfp his3-D1 leu1-32 ura4-D18 ade6⁻</i>	diese Studie
1958	<i>h⁺ sos7Δ7/his3⁺ flp1-gfp his3-D1 leu1-32</i>	diese Studie
1963	<i>h⁺ sos7+6/his3⁺ flp1-gfp his3-D1 leu1-32 ura4-D18</i>	diese Studie
1960	<i>h⁻ sos7Δ7/his3⁺ ase1-gfp leu1⁻ ura4-D18 ade6⁻</i>	diese Studie
1969	<i>h⁹⁰ sos7+6/his3⁺ ase1-gfp leu1⁻ ura4⁻</i>	diese Studie
1965	<i>h⁻ sos7Δ7/his3⁺ pcp1-gfp leu1-32 ura4-D18 ade6⁻</i>	diese Studie
1967	<i>h⁻ sos7-178/his3⁺ pcp1-gfp leu1-32 ura4-D18 ade6⁻ lys1-131</i>	diese Studie
FY222 1	<i>h⁻ cnt1(NcoI)::arg3 ade6-M210 leu1-32 ura4-D18 arg3-D4 his3-D1</i>	R. Allshire
FY523 1	<i>h⁺ sim4-193 arg3-D4 ade6-M210 his3-D1 ura4-D18 leu1-32</i>	R. Allshire
KG425	<i>h⁻ ade6-M210 leu1-32 his3Δ ura4-D18</i>	K. Gould
FY454 0	<i>h⁻ sim4-193 cnt1(NcoI)::arg3 cnt3(NcoI)::ade6 otr2(HindIII)::ura4 tel1L::his3 ade6-M210 leu1-32 ura4-D18 arg3-D4 his3-D1</i>	R. Allshire
FY648	<i>h⁺ swi6Δ::his1⁺ otr1R(SphI)::ura4⁺ ura4-DS/E leu1-32 ade6-M210</i>	R. Allshire
#354	<i>h⁺ cut11-GFP/ura4⁺ leu1-32 ura4-D18</i>	R. McIntosh
ANF25 1-9A	<i>h⁺ nuf2-1/ura4⁺ ura4-D18</i>	Y. Hiraoka
	<i>h⁻ mis6-302 leu1-32</i>	M. Yanagida
	<i>h⁻ mis15-68</i>	M. Yanagida
	<i>h⁻ mis17-362</i>	M. Yanagida
	<i>h⁻ mis12-537 leu1-32</i>	M. Yanagida
FY148 42	<i>h⁹⁰ pcp1::pcp1-GFP-HA/Kan^R ade6-M216 leu1-32 ura4-D18 lys1-131</i>	YGRC
	<i>h⁻ KanR-nmt81-GFP-atb2⁺ leu1-32</i>	T. Toda
	<i>h⁺ LacI-GFP/his7⁺ LacO-repeat/lys1 leu1⁻ ura4⁻</i>	M. Yanagida

Vektoren

Nr.	Konstruktion	Herkunft
559	pGADT7-spc7 ⁺	A. Kerres
560	pGADT7-spc7-c	A. Kerres
662	pJR2-3XU-mis13 ⁺	diese Studie
663	pJR2-41XU-mis13 ⁺	diese Studie
664	pJR2-81XU-mis13 ⁺	diese Studie
677	pJR2-3XU-BBP1 (<i>S. cerevisiae</i>)	diese Studie
678	pJR2-41XU-BBP1 (<i>S. cerevisiae</i>)	diese Studie
679	pJR2-81XU-BBP1 (<i>S. cerevisiae</i>)	diese Studie
683	V1 Chr2, Bereich 1198720-1203923 (5203 Bp), Laborbuch II, S. 84 rpt2 (660/1482 Bp mit ATG), SPRNA27, SPBC725.01, mpr1 (167/888 Bp mit ATG)	diese Studie
684	V2 Chr2, Bereich 3892061-3894294 (2224 Bp), Laborbuch II, S. 84 tea2 (1084/1887 Bp mit ATG)	diese Studie
685	V3 mitochondrial, Bereich 17038-628 (3022 Bp), Laborbuch II, S. 84 atp8 (23/147 Bp ohne ATG), tRNA C, tRNA V, tRNA Y, tRNA R, tRNA I, tRNA S, atp9, tRNA A, tRNA E, cox2	diese Studie
686	V4 Chr2, Bereich 3892061-3894294 (2224 Bp), Laborbuch II, S. 84 tea2 (1084/1887 Bp mit ATG)	diese Studie
687	V5 Chr1, Bereich 4414372-4422921 (8550 Bp), Laborbuch I, S. 94 SPAC29E6.07, tbp1 ⁺ , SPAC29E6.09, SPAC29E6.10c	diese Studie
688	V7 Chr1, Bereich 1275065-1280218 (5144 Bp), Laborbuch I, S. 94 rpl3703 ⁺ , SPAPB17E12.06, sen2 ⁺ , SPAPB17E12.08 (727/834bp mit ATG)	diese Studie
689	V8 mitochondrial, Bereich 12675-13222 (548 Bp), Laborbuch II, S. 142 Intronbereich von cob1	diese Studie
690	V9 Chr2, Bereich 2495456-2496876 (1421 Bp), Laborbuch I, S. 93 SPBC557.05, SPBC365.20c (33/663bp ohne ATG)	diese Studie
691	V10 mitochondrial, Bereich 17038-18218 (1181 Bp), Laborbuch I, S. 93 atp8 ⁺ (23/147bp ohne ATG), tRNA C, tRNA V, tRNA Y, tRNA R, tRNA I, tRNA S, atp9 ⁺ , tRNA A	diese Studie
692	V11 Chr1, 4856504-4862291 (5788 Bp), mpd2 ⁺ , btf3 ⁺ , wsp1 (762/1919 Bp ohne ATG)	diese Studie
693	V12 Chr1, Bereich 1274916-1279963 (5048 Bp), Laborbuch II, S. 142 rpl3703 ⁺ , SPAPB17E12.06, sen2 ⁺ , SPAPB17E12.08 (472/834 Bp mit ATG)	diese Studie
694	V15 mitochondrial, Bereich 17038-19392 (2355 Bp), Laborbuch I, S. 93 ORF identisch zu V3 (685)	diese Studie
695	V16 Chr2, Bereich 70447-71304 (858 Bp), aes1 (648/891 Bp ohne ATG)	diese Studie
696	V24 Chr1, Bereich 4168920-4174324 (5405 Bp), Laborbuch II, S. 156 SPAC25B.08 (1064/1773 ohne ATG), SPAC25B.09, SPAC25B.10, SPAC25B.11 (256/2011 Bp mit ATG)	diese Studie
697	V30 Chr3, Bereich 1255021-1255856 (836 Bp), Laborbuch II, S. 142 SPCC645.10 (577/1514 Bp mit ATG)	diese Studie
698	V32 Chr1, Bereich 1095210-1095928 (2tes Oligo nicht seq.), Laborbuch II, S. 143 hus5	diese Studie
699	V39 Chr2, Bereich 2488369-2489294 (926 Bp), Laborbuch II, S. 143 SPBC557.02c (568/612 Bp mit ATG), pim1 (261/1795 Bp mit ATG)	diese Studie
700	V46 Chr1, Bereich 1272660-1280133 (7474 Bp), Laborbuch II, S. 143 SPAPB17E12.03, csn2 ⁺ , zusätzlich V7 Insert	diese Studie
701	V48 Chr1, Bereich 3582706-3583706 (2tes Oligo nicht seq.), Laborbuch II, S. 143 rad25	diese Studie
702	V225 Chr1, Bereich 1275065-1280218 (5144 Bp), Laborbuch II, S. 143 siehe V7	diese Studie
703	V231 Chr1, Bereich 1274916-1279961 (5046 Bp), Laborbuch II, S. 143 siehe V12	diese Studie
704	V241 Chr1, Bereich 1275129-1280223 (5144 Bp), Laborbuch II, S. 156 siehe V7	diese Studie
705	V250 Chr1, Bereich 1274916-1279963 (5048 Bp), Laborbuch II, S. 143 siehe V12	diese Studie
706	V316 Chr3, Bereich 786326-788552 (2227 Bp), Laborbuch II, S. 142 spc7-c (2063/4095 Bp ohne ATG)	diese Studie
707	V318 Chr1, Bereich 1272660-1280139 (7480 Bp), Laborbuch II, S. 143 siehe V46	diese Studie
708	V322 mitochondrial, Bereich 26-314, Laborbuch II, S. 156	diese Studie

Nr.	Konstruktion	Herkunft
709	V335 Chr1, Bereich 4114002-4115176 (1175 Bp), Laborbuch II, S. 156 hrq1 (1175/3367 Bp ohne ATG und ohne Stopp)	diese Studie
710	V343 Chr1, Bereich 3380964-3386257 (5294 Bp), Laborbuch II, S. 156 SPAC8E11.04c, dmc1 ⁺ , rad24 ⁺ , SPAC8E11.01c (211/1527 Bp mit ATG)	diese Studie
724	V7-Acc65I sen2 (114/1190 Bp mit ATG), SPAPB17E12.08 (727/834 Bp mit ATG)	diese Studie
725	V7-HindIII rpl3703 ⁺	diese Studie
726	V7-HpaI-BamHI, vor Ligation mit T4 DNA Polymerase gebluntet, SPAPB17E12.06 (473/1079 Bp ohne ATG), sen2 ⁺ , SPAPB17E12.08 (727/834 Bp mit ATG)	diese Studie
727	V7-BsaAI-SmaI SPAPB17E12.06, sen2 ⁺ , SPAPB17E12.08 (727/834 Bp mit ATG)	diese Studie
728	V7-PacI-SmaI, vor Ligation mit T4 DNA Polymerase gebluntet, SPAPB17E12.06, sen2 ⁺ , SPAPB17E12.08 (727/834 Bp mit ATG)	diese Studie
729	V7 –sen2- SPAPB17E12.08 BclI geöffneter V7 (688) mittels homologer Rekombination in <i>S. cerevisiae</i> mit Oligo 807 → rpl3703 ⁺ , SPAPB17E12.06	diese Studie
730	V7 –sen2- SPAPB17E12.08 -BsaAI-SmaI BclI geöffneter V7-B-S (727) mittels homologer Rekombination in <i>S. cerevisiae</i> mit Oligo 807 → SPAPB17E12.06	diese Studie
731	V7 –sen2- SPAPB17E12.08 -PacI-SmaI BclI geöffneter V7-P-S (727) mittels homologer Rekombination in <i>S. cerevisiae</i> mit Oligo 807 → SPAPB17E12.06	diese Studie
732	V7-GFP PCR 784/785 GFP in BclI geöffneter V7 (688) mittels homologer Rekombination in <i>S. cerevisiae</i>	diese Studie
733	V7-GFP-BsaAI-SmaI PCR 784/785 GFP in BclI geöffneter V7-BsaAI-SmaI (727) mittels homologer Rekombination in <i>S. cerevisiae</i>	diese Studie
734	V7-GFP-PacI-SmaI PCR 784/785 GFP in BclI geöffneter V7-PacI-SmaI (728) mittels homologer Rekombination in <i>S. cerevisiae</i>	diese Studie
735	sos7 ⁺ cDNA in pBsk (Nr.4) PCR 686/688 auf cDNA Bank in pBsk ⁺ HincII	diese Studie
736	sos7 ⁺ cDNA in pBsk (Nr.7)	diese Studie
737	pJR2-3XU-sos7 ⁺ } PCR Produkt 688/762 XhoI in XhoI/SmaI geöffnete Vektoren	diese Studie
738	pJR2-41XU-sos7 ⁺	diese Studie
739	pJR2-81XU-sos7 ⁺	diese Studie
740	pJR2-3XU-sos7-C } PCR Produkt 688/714 XhoI in XhoI/SmaI geöffnete Vektoren	diese Studie
741	pJR2-41XU-sos7-C	diese Studie
742	pJR2-81XU-sos7-C	diese Studie
760	„V7-his3 ⁺ “ PCR 855/856 2190 Bp his3 ⁺ Fragment für homologe Rekombination in <i>S. cerevisiae</i> in BclI geöffneter V7	diese Studie
761	pBsk-sos7 ⁺ his3 ⁺	diese Studie
762	pJR2-3XU-BBP1 (<i>S. japonicus</i>) PCR 881/882 über NotI/PstI	E. Walla
763	pJR2-41XU-BBP1	E. Walla
764	pJR2-81XU-BBP1	E. Walla
765	pSGP572a-sos7-N-GFP (1-86 AS)	diese Studie
766	pBsk-sos7-K112A-his3 ⁺	diese Studie
767	pBsk- sos7-S110A-his3 ⁺	gerichtete Mutagenese in 761
768	pBsk- sos7-S110E-his3 ⁺	diese Studie
769	pBsk- sos7-R115R-his3 ⁺	diese Studie
775	pJR2-3XU-mis12 ⁺ } Fragment mit XhoI/NotI aus Plasmid 774 in XhoI/NotI geöffnete Vektoren	diese Studie
776	pJR2-41XU-mis12 ⁺	diese Studie
777	pJR2-81XU-mis12 ⁺	diese Studie
778	pKM32-spc7-c (6xHis-spc7-c) PCR 1067/1068 in SmaI geöffneter pKM32	diese Studie
781	pREP3XL-SPAC24C9.12c (Glycinhydroxylmethyltransferase) (Nr. 2)	diese Studie
782	pREP3XL-SPCC1494.05c (ubp12- Ub-C-terminale Hydrolase) (Nr. 4)	sos7-GFP Screen mit der c-DNA Bank
783	pREP3XL-SPAC4F8.07c (hvk2- Hexokinase 2) (Nr. 5)	diese Studie
784	pREP3XL- SPAC1F8.07c (Pyruvat Decarboxylase) (Nr. 6)	diese Studie
785	pREP3XL- nicht sequenzierbar (Nr. 10)	diese Studie

Nr.	Konstruktion	Herkunft
786	pREP3XL- Region aus nmt1 Promotorbereich (Nr. 12)	diese Studie
805	pKM32-sos7-cDNA (6xHis-sos7) PCR 1116/1117 in SmaI geöffneten pKM32	diese Studie
809	pGBKT7-sos7 ⁺ cDNA Fragment, PCR 1069/1070	diese Studie
810	pGBKT7-sos7-201-264 AS PCR 1070/1071	diese Studie
819	pGBKT7-sos7-201-258 AS 810 mit NotI geöffnet, homologe Rekombination in <i>S. cerevisiae</i> mit Oligonukleotid 1072	diese Studie
825	pJR2-3XU-sos7 ⁺ -GFP } PCR 904/906 auf 732 XhoI/NotI kloniert	diese Studie
826	pJR2-81XU-sos7 ⁺ -GFP }	diese Studie
827	pJR2-3XU-sos7-c-GFP } PCR 905/906 auf 732 XhoI/NotI kloniert	diese Studie
828	pJR2-81XU-sos7-c-GFP }	diese Studie
829	pJR2-3XL-sos7 ⁺ } PCR Produkt 688/762 XhoI in XhoI/SmaI geöffnete Vektoren	diese Studie
830	pJR2-41XL-sos7 ⁺ }	diese Studie
831	pJR2-81XL-sos7 ⁺ }	diese Studie
832	pJR2-3XL-sos7-c } PCR Produkt 688/714 XhoI in XhoI/SmaI geöffnete Vektoren	diese Studie
833	pJR2-41XL-sos7-c }	diese Studie
834	pJR2-81XL-sos7-c }	diese Studie
835	pJR2-mis14 PCR 1185/1186 in PstI geöffneten 270 ➔ 1 Mutation im Intron A326G	diese Studie
836	pJR2-spc24 PCR 1177/1178 in PstI geöffneten 270 ➔ 1 Mutation im Intron A589G	diese Studie
837	pJR2-nnf1 ⁺ PCR 1181/1182 in PstI geöffneten 270	diese Studie
841	pSGP572a-sos7-c-GFP	diese Studie
842	pSGP572a-NLS-sos7-c-GFP	diese Studie
860	pJR2-spc25 ⁺ PCR 1175/1176 in PstI geöffneten 270	E. Walla
861	pJR2-nuf2 ⁺ PCR 1179/1180 in PstI geöffneten 270	E. Walla
270	pJR-2-3XL, LEU2, Amp ^R , nmt1 ⁺ Promotor	(Moreno et al, 2000)
272	pJR-2-41XL, LEU2, Amp ^R , nmt1 ⁺ Promotor	(Moreno et al, 2000)
276	pJR-2-81XL, LEU2, Amp ^R , nmt1 ⁺ Promotor	(Moreno et al, 2000)
222	pUR19, ura4 ⁺ , Amp ^R	(Barbet et al, 1992)
282	pJR-2-3XU, ura4 ⁺ , Amp ^R , nmt1 ⁺ Promotor	(Moreno et al, 2000)
286	pJR-2-41XU, ura4 ⁺ , Amp ^R , nmt1 ⁺ Promotor	(Moreno et al, 2000)
290	pJR-2-81XU, ura4 ⁺ , Amp ^R , nmt1 ⁺ Promotor	(Moreno et al, 2000)
581	pSGP572a (GFP Fusionsprotein C-terminal), REP4XU, nmt1 ⁺	S. Forsburg
pKM32	N-terminal 6xHis, Amp ^R	AG Hegemann
759	cDNA ORF C10orf118, Kan ^R IRCMp5012CO72D	ImaGenes
pBYE	N-terminaler GFP-Fusionsprotein	AG Hegemann
682	pBYE-C10orf118	diese Studie
865	cDNA ORF hZwint, Amp ^R IRATp970B03136D	ImaGenes
869	pGBKT7-h Zwint (gesamte c-DNA)	diese Studie
868	pGADT7-h Zwint (gesamte c-DNA)	diese Studie
871	pJR2-h Zwint (gesamte c-DNA)	diese Studie
872	pSGP572a-h Zwint (gesamte c-DNA)	diese Studie

Oligonukleotide

Nr.	Bezeichnung und Sequenz
686	Sos7- Start: ATGGATCAAAATAAATCGAC
688	Sos7-Stopp: TTATTTTGAAGAAGTTGAT
702	Sos7 GFP Tag 5': CGCCCGATGCTGACGCAAAAAACAAGTGCAAAAT TGGTATACCTCGATGCTTGAATTTATGATCAACTTCTCAAAAACGGATCCCCGGGTAAATTA

Nr.	Bezeichnung und Sequenz
703	Sos7 GFP Tag 3': GATGTGTAACCTTAAGGCGCTGGGTTCTAGCA GGAATAGAGATTAGTGTACATATTACTAAAATTGGTTTTTATGAATTCGAGCTCGTTTAAAC
706	Sos7 GFP Tag Verifikation 3': CACCTACAGCTAACATTTCC
685	Sos7 GFP Tag Verifikation 5': ATTATGAATCAGTGATGGAA
1049	Sos7 his3 del 5': TAGACTGCAAAAGCTTAAGCATATTCTGATTCCCTGATTT CTTATTACAAAACAATTTGAGGTTACATCGACGATACCATCTTTACTATTGCACTTATA
1050	Sos7 his3 del 3': GATGTGTAACCTTAAGGCGCTGGGTTCTAGCAGGAATA GAGATTAGTGTACATATTACTAAAATTGGTTTTTATTCTTTAATTCTTTTATTACA
937	Sos7 del Verifikation 5': AAATTTGATACTATGGTGGT
855	Sos7 his3+ 5': AACAAAGTGCAAAATTGGTATACCTCGATGCTTGAAATTTA TGATCAACTTCTTCAAAAATAAGTCGACGGTATCGATAAGCTT
856	Sos7 his3+ 3': AGATTAGTGTACATATTACTAAAATTGGTTTTTAT GCGGCCGCTCTAGAAGTAGT
762	Sos7 5' XhoI (pJR Vektoren): AAACTCGAGATGGATCAAAATAAATCGAC
784	V7-GFP 5': AACAAAGTGCAAAATTGGTATACCTCGATGCTTGAAATTTAT GATCAACTTCTTCAAAAACGGATCCCCGGGTTAATTA
785	V7-GFP 3': GAGATTAGTGTACATATTACTAAAATTGGTTTTTACTA TTTGATAGTTCATCCA
807	V7 –sen2 –ORF 08: AACAAAGTGCAAAATTGGTATACCTCGATGCTTGAAATT TATGATCAACTTCTTCAAAAATAAGACCTGCAGGCATGCAAGCTTGCGTAATCATGGTCATAG
853	Sos7 mut 5': ATGCTCGTTGAAGCGGAAGA
854	Sos7 mut 3': GATGTGTAACCTTAAGGCGC
894	KRE28 BglII 5' 581: AAAAGATCTATGGATACAGGGAGTGCGAG
895	KRE28 NotI 3' pJR: AAAGCGGCCGCTTATTCGTTTGTTAGCTCGC
896	KRE28 NotI 3' 581: AAAGCGGCCGCTTATTCGTTTGTTAGCTCGCTTA
897	KRE28 PstI 5' pJR: AAACGCAGATGGATACAGGGAGTGCGAG
906	sos7-c GFP 5': AAACTCGAGATGCTCGTTGAAGCGGAAGA
957	S.japonicus Sos7 5': ATAAGATCTATGAAGGAATTATTCTCCAA
958	S.japonicus Sos7 3': AAAGCGGCCGCTTACTCGTCATTTGGATTAA
961	Sos7 K112A fwd: GGCTTAAATCCGAAGCAAGAGAAGTTGATTT
962	Sos7 K112A rev: AATCAACTTCTCTTGCTTCGGATTTAAGCC
963	Sos7 S110A fwd: AAGGGGAGGCTTAAAGCCGAAAAAGAGAAG
964	Sos7 S110A rev: CTTCTCTTTTTTCGGCTTTAAGCCTCCCCTT
965	Sos7 S110E fwd: AAGGGGAGGCTTAAAGAGGAAAAAGAGAAG
966	Sos7 S110E rev: CTTCTCTTTTTTCCTCTTTAAGCCTCCCCTT
967	Sos7 V115R fwd: TCCGAAAAAGAGAACGTGATTTGCTCACAGA
968	Sos7 V115R rev: TCTGTGAGCAAATCACGTTCTCTTTTTTCGGA
996	sos7-c BglII 5' 581: AAAAGATCTATGGATCAAAATAAATCGAC
997	sos7-c NotI 3' 581: AAAGCGGCCGCTTTTTGAAGAAGTTGATCAT
1069	pGBKT7-Sos7 5' Start: CTCAGAGGAGGACCTGCATATGGCCATGGAGGCC GAATTCATGGATCAAAATAAATCGAC
1070	pGBKT7-Sos7 3' Stopp: GGGTTATGCTAGTTATGCGGCCGCTGCAGGTC GACGGATCTTATTTTTGAAGAAGTTGAT
1071	pGBKT7-Sos7-201 5': CTCAGAGGAGGACCTGCATATGGCCATGGAGGC CGAATTCATGAATGATGAAAAATACTT
1072	pGBKT7-Sos7 -7 3': GGGTTATGCTAGTTATGCGGCCGCTGCAGGTCGAC GGATCTTAAATTTCAAGCATCGAGGTAT
912	C10orf118 5': TGCTGCTGGGATTACACATGGCATGGATGAGCTCTACAAAA TGTCAGAGACAGACCACAT
913	C10orf118 3': CAAACAACAGATGGCTGGCAACTAGAAGGCACAGTCGA GGTTAGGTTTTCTTTGTCCTCTG
494	mis13 5': ATGAAACGAAAGCCTGAAGA
495	mis13 3': TTAAACTGATTCGTTTGAGG
1064	mis12 5' XhoI: AAACTCGAGATGTTAGTGGAGTTACTAGA
1065	mis12 3' NotI: AAAGCGGCCGCTTAAGGCTCGTCAGTATGTC
1175	spc25 5': CTTTGTTAAATGGCCTCGAGGTCGACTCGCGAGGCGCGC CATGTCTTTGGCAAACCTTTCC
1176	spc25 3': GATCCTGCGGCCGCACTAGTGGTACCCCGCGGGGGCCCTATTA AATCAATTGAGACAGATC
1177	spc24 5': CTTTGTTAAATGGCCTCGAGGTCGACTCGCGAGGCGCGCCATG TCAGACAGTCCAATTGA
1178	spc24 3': GATCCTGCGGCCGCACTAGTGGTACCCCGCGGGGGCCCTACTA TTTTTTGTCCTTACTAT
1179	nuf2 5': CTTTGTTAAATGGCCTCGAGGTCGACTCGCGAGGCGCGCCATG GCACGAAAACACACATT

Nr.	Bezeichnung und Sequenz
1180	nuf2 3': GATCCTGCGGCCGCACTAGTGGTACCCCGCGGGGGCCCTAC TAAGAGTTAGAAGACCTTAAG
1181	nnf1 5': CTTTGTAAATGGCCTCGAGGTCGACTCGCGAGGCGCGCCAT GACTAGTCGAAAGGAGCA
1182	nnf1 3': GATCCTGCGGCCGCACTAGTGGTACCCCGCGGGGGCCCTAT CAACGTTCTATATTTCTTG
1183	ndc80 5': CTTTGTAAATGGCCTCGAGGTCGACTCGCGAGGCGCGCCAT GCAAGATTCTTCTCTTA
1184	ndc80 3': GATCCTGCGGCCGCACTAGTGGTACCCCGCGGGGGCCCTATT ACAGTTCCGAACGAGATA
	mis14 5': CTTTGTAAATGGCCTCGAGGTCGACTCGCGAGGCGCGCCATG TCGTCTCAGGAGATGC
1186	mis14 3': GATCCTGCGGCCGCACTAGTGGTACCCCGCGGGGGCCCTAT TAAGGAGTTTTTTCCAATCGGGC
1116	sos7 Ak 5': CCATCACCATCACCATACGGATCCGCATGCGAGCTCGGT AATGGATCAAAATAAATCGAC
1117	sos7 Ak 3': GGAGTCCAAGCTCAGCTAATTAAGCTTGGCTGCAGGTGATTAT TTTTGAAGAAGTTGAT
1067	spc7-c Ak 5': CCATCACCATCACCATACGGATCCGCATGCGAGCTCGGTA ATGAATGAACATGAGAAGTC
1068	spc7-c Ak 3': GGAGTCCAAGCTCAGCTAATTAAGCTTGGCTGCAGGTGCA CTAGCTGTATTTGTTCCAAA
1249	Sos7-c BglII in 581 5': AAAAGATCTATGCTCGTTGAAGCGGAAGA
1250	Sos7-c NotI in 581 3': AAAGCGGCCGCCTTTTTGAAGAAGTTGATCAT
1345	5' Zwint pGBKT7: CAGAGGAGGACCTGCATATGGCCATGGAGGCCGAAT TCCCGATGGAGGCAGCGGAGACAGAGG
1346	3' Zwint pGBKT7: TTATGCTAGTTATGCGGCCGCTGCAGGTGACGGATC CCCTCATGGCAAATTTACATCTCC
1347	5' Zwint pGADT7: ATTACGCTCATATGGCCATGGAGGCCAGTGAATTCCACCC GATGGAGGCAGCGGAGACAGAGG
1348	3' Zwint pGADT7: TGCAGCTCAGCTCGATGGATCCCGTATCGATGCCAC CCTCATGGCAAATTTACATCTCC

2.7.4 *fta2-291*: extragene Multikopien-Suppressoranalyse

S. pombe Stämme

Name	Genotyp	Herkunft
1048	<i>fta2-291::his3⁺ his3⁻ leu1-32 ura4-D18 ade6-M210 h⁻</i>	U.Fleig
1057	<i>mal2-1 leu1-32 ade6-M210 ura4-D18 h⁺</i>	U. Fleig

Vektoren

Nr.	Genetische Marker, Konstruktion
222	pUR19; ura4 ⁺ , Amp ^R
644	„V23“ pUR19, Chr. III 661564-666743, SPCC16C4.02c, pin1 ⁺
645	„V28“ pUR19, Chr. II 2104873-2111026, SPNCRNA387 (letzte 387/1153 Bp), sui1 ⁺ , SPBC23G7.06c, SPBC23G7.07c, rga7 (letzte 220/2088 Bp)

2.7.5 *S. cerevisiae* *in vivo* Transformationssystem für *S. pombe* Vektoren

Vektoren

Nr.	Bezeichnung	Herkunft
270	pJR-2-3XL, LEU2, Amp ^R , nmt1 ⁺ Promotor	(Moreno et al, 2000)
222	pUR19, ura4 ⁺ , Amp ^R	(Barbet et al, 1992)
282	pJR-2-3XU, ura4 ⁺ , Amp ^R , nmt1 ⁺ Promotor	(Moreno et al, 2000)
675	pSGP572a-BBP1-GFP	diese Studie
668	pJR2-3XU-BBP1	diese Studie
669	pJR2-41XU-BBP1	diese Studie

Nr.	Bezeichnung	Herkunft
670	pJR2-81XU-BBP1	diese Studie
pRS315	CEN6, LEU2, Amp ^R	AG Hegemann
pRS316	CEN6, URA3, Amp ^R	AG Hegemann

Oligonukleotide

Nr.	Bezeichnung und Sequenz
1146	Sc Klonierung Kan ^R 5' CGGTATCGATAAGCTTGATATCGAATTCCTGCAGC CCGGGGGCGCGCCACTTCTAAATAA
1147	Sc Klonierung Kan ^R 3' GCTGGAGCTCCACCGCGGTGGCGGCCGCTCTAG AACTAGTGAATTCGAGCTCGTTTAAAC
1144	Sp Klonierung Kan ^R 5' TTGTAACGACGCGCCAGTGAATTCGAGCTCGGT ACCGGGGCGCGCCACTTCTAAATAA
1145	Sc Klonierung Kan ^R 3' TGATTACGCCAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGAC TCTAGAGAATTCGAGCTCGTTTAAAC

2.8 weitere Zellen oder Zelllinien

E. coli Stämme

Stämme	Genotyp	Herkunft
XL1-blue	<i>recA1, lac-, endA1, gyrA46, thi, hsdR17, supE44, relA1, F'[proAB+, lacIq, lacZΔM15, Tn(tetr)]</i>	Stratagene
GM48	<i>F- LAM- dam-3 dcm-6 thr-1 leuB6 ara-14 tonA31 lacY1 tsx-78 glnV44(Am)galkK2(Oc) galT22 thi-1</i>	(Marinus, 1973)

S. cerevisiae Stämme

Stämme	Genotyp	Herkunft
CEN.PK 2 572	<i>MATa leu2-3,112 ura 3-52 trp1-289 his3Δ1 MAL2-8c SUC2 MATa trp1-901 leu2-3 112 ura3-52 his3-200 gal4Δ gal80Δ LYS2::GAL1UAS-GAL1TATA-HIS3 GAL2UAS-GAL2TATA-ADE2 URA3::MEL1UAS-MEL1TATA-lacZ</i>	AG Hegemann Clontech
bbp1-1	<i>MATa ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1 Δ63 his3 Δ200 leu2 Δ1 bbp1-1</i>	(Schramm et al, 2000)

S. japonicus Stamm

Stamm	Genotyp	Herkunft
NIG5384	<i>matsj-P2028 ura4sj-D3 ade6-domE</i>	(Furuya & Niki, 2009)

humane Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung	Herkunft
HEp-2 Zelllinie	humane Epithelzellen	AG Hegemann
HeLa 229 Zelllinie	menschliche Epithelzellen	AG Piekorz
HEK293T Zelllinie	humane embryonale Nierenzellen	AG Hegemann

2.9 Medien und Kultivierung

Medien und Kultivierung von *E. coli* Zellen

Die Anzucht von *E. coli* Zellen erfolgt Ü/N in flüssigem LB-Medium bei 37 °C unter aeroben Bedingungen. Die Zugabe von 50 µg/ml Ampicillin oder 12,5-50 µg/ml Kanamycin erfolgt bei der Selektion auf Plasmid-Transformanten. Sollten Platten (13,5g/l Agar) mit selektivem Medium hergestellt werden, ließ man das Medium vor der Zugabe des Antibiotikums auf ca. 50 °C abkühlen. Für die Blau/Weiß-Selektion wurde zusätzlich 0,1 mM IPTG und 40 µg/ml X-Gal ausplattiert.

Medien und Kultivierung von *Saccharomyces cerevisiae* Zellen

Die *S. cerevisiae* Stämme werden entweder in YPD oder, wenn sie transformierte Plasmide enthalten, in SD-Medium angezogen, das die notwendigen Supplementlösungen beinhaltet (Kaiser et al, 1994). Festes Medium enthält zusätzlich 20g/l Agar. Die Inkubation der Kulturen erfolgt bei 30 °C. Die temperatursensitive *bbp1-1* Mutante wurde, soweit nicht anders angegeben, bei 25 °C inkubiert.

Medien und Kultivierung von *S. pombe* Zellen

Die *S. pombe* Stämme werden in Vollmedium (YE5S) oder Minimalmedium angezogen. Dem Minimalmedium wurden die notwendigen Supplementlösungen bis zu einer Konzentration von 75 mg/l zugesetzt (Moreno et al, 1991). Es kommen zwei verschiedene Minimalmedien zum Einsatz, die sich in ihrer Stickstoffquelle unterscheiden. Als Standardmedium wird Minimalmedium (MM) verwendet, das Glutaminsäure als Stickstoffquelle enthält. Edinburgh-Minimalmedium (EMM) nutzt Ammoniumchlorid als Stickstoffquelle und wurde bei der Deletion des *sos7⁺*-ORFs verwendet. Festem Nährmedium werden 20 g Agar pro Liter zugegeben. Die Zugabe von Geneticinsulfat (0,1 mg/ml), Thiamin (5 µg/ml), Phloxin B (5 µg/ml), 100 µg/ml Hygromycin B, 100 µg/ml clonNat, 25 µg/ml MBC (frisch in DMSO resuspendiert) oder Thiabendazol (definierte Mengen zwischen 4 – 10 µg/ml) erfolgt in flüssigem Medium bei ca. 50 °C.

Die *S. pombe* Kulturen werden auf festem oder in flüssigem YE5S-Medium angezogen. Die Inkubation erfolgt bei 30 °C oder bei temperatursensitiven Stämmen bei 25 °C.

Transformanten und Stämme mit induzierbarem *nmt1⁺*-Promoter wurden in Minimalmedium angezogen, das die nötigen Supplementlösungen enthielt. Mittels der Zugabe von Thiamin (5 µg/ml) erfolgt die Reprimierung des *nmt1⁺*-Promoters. Unter de-reprimierenden Bedingungen werden Transformanten für 20 h bei 30 °C, oder 24 h bei 25 °C inkubiert und im Tropftest auf Wachstumsunterschiede untersucht. Mikroskopische Analysen des GFP-Atb2 Stammes unter de-reprimierten Bedingungen erfolgen nach 36-48 h. Die Kultur wird dabei in der logarithmischen Phase gehalten.

Durch die Zugabe von TBZ zum Medium kann die Sensitivität von *S. pombe* Stämmen gegen Mikrotubuli-destabilisierende Substanzen auf festem Medium getestet werden. In flüssigem Medium erfolgt die Zugabe von MBC, das zum Abbau sämtlicher Mikrotubuli führt. Des Weiteren kann Phloxin B dem Medium zugesetzt werden. Tote Zellen nehmen dann eine dunkelpinke Färbung an, so dass sie von lebenden Zellen zu unterscheiden sind.

Im Falle einer Stickstoffarretierung werden die Zellen in EMM Medium vorinkubiert. Die logarithmische Kultur wird zwei Mal mit stickstofffreiem Medium gewaschen und für 12-16 h mit einer Zelldichte von $1-2 \times 10^7$ Zellen pro ml bei 25 °C in stickstofffreiem Medium mit den nötigen Supplementlösungen inkubiert. Nachdem mikroskopisch überprüft wurde, ob die Zellen in der G0 Zellzyklusphase sind, werden die Zellen einmal mit vorgewärmten YE5S

gewaschen und daraufhin im vorgewärmten YE5S bei der restriktiven Temperatur inkubiert (Jin et al, 2002).

Medien und Kultivierung von humanen Zelllinien

HEK293T-Zellen werden in IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium) mit 10 % FKS (Fetales Kälberserum) kultiviert.

Die Kultivierung von Hep-2 Zellen erfolgt in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) und zusätzlich:

FKS (hitzeinaktiviert 1 h bei 56 °C)	Endkonzentration: 10 %
MEM nicht essentielle Aminosäuren (100X)	Endkonzentration: 1x
MEM Vitamine (100X)	Endkonzentration: 1x
Gentamycin (50 mg/ml)	Endkonzentration: 50 µg/ml
Amphotericin B (250 mg/ml)	Endkonzentration: 2,5 µg/ml

Die Medien wurden gebrauchsfertig von Dr. Katja Mölleken gestellt.

Passagieren von HEK293T-Zellen

1. Das Medium in dem sich die konfluenten Zellen in der Kulturflasche befinden, wird abgenommen.
2. Die Zellen werden einmal vorsichtig mit 10 ml HBSS gewaschen (Flüssigkeit an nicht bewachsener Seite ins Gefäß geben und durch leichte Schwenkbewegungen über die Zellen führen). Die HBSS Lösung verwerfen.
3. Die Zellen werden mit 10 ml IMDM Medium mit einer Glaspipette von der Kulturflaschenwand gespült und in ein Greinerröhrchen überführt.
4. Die Zellen werden 10 Minuten bei 500 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Zellen werden in 5 ml neuem Medium resuspendiert.
5. Um eine neue große Kulturflasche „anzuimpfen“, werden 15 ml neues Medium in die Flasche gegeben und, je nachdem welche Zellzahl man benötigt, gibt man ca. 0,8-1 ml Zellen aus dem Greinerröhrchen hinzu. Die Zellen können auch in 24-Well Platten überführt werden, die für die Mikroskopie genutzt werden können.

Passagieren von Hep2-Zellen

1. Das Medium wird abgenommen und die Zellen werden einmal mit 10 ml HBSS gewaschen.
2. 5 ml 0,5 X Trypsin/EDTA Lösung wird zu den Zellen gegeben und sie werden 10 Minuten bei RT inkubiert.
3. Die Zellen werden mechanisch abgeklopft. Es erfolgt die Zugabe von 5 ml DMEM und das Überführen in ein Greinerröhrchen.
4. Die Zellen werden 10 Minuten bei 500 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Zellen werden in 5 ml neuem Medium resuspendiert. Nach Bedarf können die Zellen in eine neue Flasche überführt oder in Well-Platten kultiviert werden.

2.10 Paarung haploider *S. pombe* Stämme und Genotypbestimmung

Zur Erzeugung neuer *S. pombe* Stämme, die Merkmale verschiedener Stämme miteinander kombinieren sollten, nutzt man die Gegebenheit, dass haploide *S. pombe* Zellen zwei verschiedene Paarungstypen (h^+ oder h^-) aufweisen. Unter Nährstoffmangelbedingungen (MM ohne Zugabe von essentiellen Aminosäuren) kommt es zur Paarung zweier Zellen mit entgegengesetztem Paarungstyp und zur Ausbildung eines diploiden Stammes, der daraufhin sporuliert und so eine Tetrade bildet (ca. 2-3 Tage bei RT). Nach bestimmten Gesichtspunkten kann nun zwischen zwei verschiedenen Verfahren gewählt werden, mit denen man die Tetrade weiter analysiert. Mit der Tetradenanalyse kann mit Hilfe eines Mikromanipulators jede der vier Sporen einer Tetrade separat und auf einen definierten Platz auf einer Vollmediumsplatte gelegt werden, so dass der Genotyp der einzelnen aus den Tetraden hervorgegangenen Stämme analysiert werden kann. Dieses Vorgehen ist notwendig, wenn man z. B. nicht alle genetischen Marker einwandfrei mittels PCR oder Selektivausstrich bestimmen kann. In anderen Fällen, bei denen die Marker mittels PCR oder Selektivausstrich einwandfrei zugeordnet werden können, wählt man das einfachere Verfahren der „Random Spore“-Analyse. Durch Zugabe von β -Glucuronidase werden sowohl die Zellwände vegetativer Zellen als auch der Ascussack zerstört, die Sporen bleiben aber intakt und können nach ca. 24 h auf Voll- oder Selektivmedium ausplattiert werden. Über die Genotypenbestimmung kann der korrekte Stamm isoliert werden ohne alle Stämme, die aus der Tetrade hervorgegangen sind, zu kennen. Folgende Marker wurden verwendet und wie folgt identifiziert (Tabelle 2.1):

Marker	Identifizierung
<i>ade6-M210</i> / <i>ade6-M216</i>	Rotfärbung auf Adenin-Mangelmedium (MM + 5 μ g/ml Adenin)
<i>hyg^R</i> -Kassette	Wachstum auf Hygromycin-haltigem Medium
<i>kanMX6</i> -Kassette	Wachstum auf G418-haltigem Medium
Kältesensitivität	Nicht-Wachstum bei 20 °C
<i>nat^R</i> -Kassette	Wachstum auf clonNat-haltigem Medium
Paarungstyp (Sunnerhagen, 1993)	h^+ : 671 Bp h^- : 432 Bp $h90$: 671 Bp und 432 Bp
Prototrophie / Auxotrophie	Wachstum / Nicht-Wachstum auf selektivem Minimalmedium
Temperatursensitivität	Nicht-Wachstum bei 37 °C

Tabelle 2.1: *S. pombe* Selektionsmarker und deren Identifizierung.

2.11 Transformation und Transfektion

Transformation in *E. coli* Zellen

Drei verschiedene Methoden werden zur Transformation von *E. coli* Zellen verwendet. Die „One-Minute“-Transformation erfolgt in DMSO-kompetente *E. coli* Zellen, die Elektroporation in elektrokompente Zellen und die ultrakompente Transformation in chemisch kompetente Zellen. Elektroporation und Transformation in ultrakompente Zellen werden bei sehr geringen Mengen an eingesetzter DNA (z. B. Ligation, Transformation von aus *S. pombe* isolierten Plasmiden) verwendet. Die „One-Minute“-Transformation erfolgt, wenn hoch konzentrierte DNA-Mengen transformiert werden sollen.

Transformation in *S. cerevisiae* Zellen

Die Transformation in *S. cerevisiae* wird nach der hochkompetenten Protokoll von Gietz durchgeführt (Gietz R.D., 2006).

Für die Hefe-2-Hybrid Analyse wird nach Herstellerangaben der Firma Clontech des „GAL4 Two-Hybrid System 3“ vorgegangen.

Transformation in *S. pombe* Zellen

Zur Transformation von *S. pombe* Zellen wurde die Lithiumacetat Methode nach Okazaki angewandt (Okazaki et al, 1990). Bei Plasmidtransformationen wurden 500 ng DNA eingesetzt. Um die Integration linearer DNA-Fragmente zu erleichtern, wurden dem Transformationsansatz je 5µl Carrier-DNA (10mg/ml) zugesetzt.

Homologe Rekombination in *S. pombe*

Mittels homologer Rekombination kann man in *S. pombe* einen genetischen Marker in das Genom einbringen. Für die Fusion wählt man zwischen dem 5'-oder 3'-Ende eines ORFs, während bei einer 5' Fusion bedacht werden sollte, dass es durch die veränderte DNA-Sequenz im 5' Bereich zu Veränderungen in der Promoterregion und der Aktivität kommen kann. Im Rahmen einer Deletion wird in der Regel der gesamte ORF gegen einen genetischen Marker ausgetauscht. Ein Homologiebereich von 80 Bp 5' und 3' der genomischen Region, die variiert werden soll ist ausreichend. Für die Amplifikation des genetischen Markers werden Oligonukleotide erstellt, die neben dem Homologiebereich zum Genom ca. 20 Bp aufweisen, die jeweils homolog zur Start- und Endsequenz des genetischen Markers sind. Neben dem genomischen Marker selbst werden ca. 400 Bp 5' und 3' amplifiziert, die den putativen endogenen Promotor und Terminator enthalten sollten. Diese Bereiche sollten im *S. pombe* Stamm, in dem die homologe Rekombination stattfinden soll, fehlen, da sonst der genetische Marker auch an dieser Position ins Genom integrieren könnte. Eine Überprüfung der korrekten Integration erfolgt durch Selektivausstrich der Transformanten und PCR. Dabei wird die Integration 5' und 3' mit spezifischen Oligonukleotiden überprüft die jeweils 5' bzw 3' der veränderten Region binden. Als zweites Oligonukleotid wird neben dem, das in der Region außerhalb des Austausches bindet, eins verwendet, das spezifisch den eingebrachten genetischen Marker bindet.

spc7-23 Multikopien-Suppressoranalyse

Der *spc7-23* Mutantenstamm wurde mit einer genomischen *S. pombe* DNA-Bank transformiert (Barbet et al, 1992). Nach 48 h Inkubation bei der permissiven Temperatur, wurden die Platten replika-plattiert (Phloxin B haltige ura⁻-Platten) und für weitere 4 Tage bei der restriktiven Temperatur von 32,5 °C inkubiert. 102/370.000 Transformanten wurden

isoliert, die Wachstum bei 32,5 °C zeigten. Geht man von einer durchschnittlichen Insertlänge von 4 Kb aus, entspricht dies einer ca. 90 fachen Abdeckung des *S. pombe* Genoms. Über Restriktionsanalysen (*HindIII*, *XbaI*), PCR-Analysen (*spc7-c* (2461-4092 Bp) und *spc7⁺*) bzw. Sequenzierungen wurden die DNA-Fragmente der 102 Plasmide bestimmt. 66 Plasmide trugen den wildtypischen *spc7⁺*-ORF, der in der Lage war den Wachstumsdefekt der *spc7-23* Mutante bei allen Temperaturen zu supprimieren (Daten nicht gezeigt). Die genomischen DNA Fragmente der übrigen Plasmide enthielten die in Tabelle 2.2 dargestellten Informationen.

Name	auf genomischen DNA-Insert kodierte ORFs
V1	rpt2 (erste 660/1482 Bp) , SPRRNA27, SPBC725.01, mpr1 (erste 167/888 Bp)
V2 (2x)	tea2 (1084/1887 Bp mit ATG)
V3 (6x)	atp8 (23/147 Bp ohne ATG), tRNA C, tRNA V, tRNA Y, tRNA R, tRNA I, tRNA S, atp9, tRNA A, tRNA E, cox2
V5 (4x)	SPAC29E6.07, tpb1 ⁺ , SPAC29E6.09, SPAC29E6.10c
V7 (11x)	rpl3703 ⁺ , SPAPB17E12.06 , sen2 ⁺ , SPAPB17E12.08 (727/834bp mit ATG)
V8	Intronbereich von cob1
V9	SPBC557.05, SPBC365.20c (letzte 33/663bp)
V11 (2x)	mpd2⁺ , btf3⁺ , wsp1 (762/1919 Bp ohne ATG)
V16	aes1 (648/891 Bp ohne ATG)
V24	SPAC25B.08 (letzte 1064/1773 Bp), SPAC25B.09, SPAC25B.10, SPAC25B.11 (erste 256/2011 Bp)
V30	SPCC645.10 (577/1514 Bp mit ATG)
V32	hus5
V39	SPBC557.02c (568/612 Bp mit ATG), pim1 (261/1795 Bp mit ATG)
V48	rad25
V335	V335 hrq1 (1175/3367 Bp ohne ATG und ohne Stopp)
V343	SPAC8E11.04c, dmc1 ⁺ , rad24 ⁺ , SPAC8E11.01c (211/1527 Bp mit ATG)

Tabelle 2.2: Suppressor Plasmide der *spc7-23* Suppressor Analyse.

Falls das DNA Fragment häufiger isoliert wurde, ist dies unterhalb des Namens angegeben. Es findet sich jeweils das Plasmid dargestellt, dass das kürzeste DNA Fragment trägt.

***fta2-291* Multikopien-Suppressoranalyse**

Nach der Transformation der temperatursensitiven *fta2-291* Mutante mit einer genomischen *S. pombe* Genbank wurden 247.500 Transformanten erhalten (Barbet et al, 1992). Geht man von einer durchschnittlichen Insertgröße von vier Kb aus, deckt dies ca. 60 fach das Genom ab. Nach vier Tagen konnten 113 Kolonien bei der restriktiven Temperatur (32 °C) Kolonien bilden. 71 der ursprünglich 113 Plasmide führten nach der Retransformation der Plasmide in den *fta2-291* Stamm weiterhin zu Wachstum bei der nicht-permissiven Temperatur, so dass die genomischen Inserts dieser Plasmide mittels Restriktionsanalyse und/oder Sequenzierung identifiziert wurden. 40 der Plasmide enthielten das wildtypische *fta2⁺*-Fragment. Durch die Rückgewinnung des wildtypischen *fta2⁺*-ORFs kam es zu einer vollständigen Suppression der temperatursensitiven Phänotyps (Daten nicht gezeigt). Weitere 24 Vektoren trugen den bereits als Suppressor bekannten *mal2⁺*-ORF. Bei fünf

Plasmiden war keine Sequenzierung möglich und zwei Plasmide führten zur Suppression des ts Phänotyps der *fta2-291* Mutante, ohne dass die Plasmide *fta2⁺* oder *mal2⁺* beinhalteten (V23, V28) (Tabelle 2.3).

Name	auf genomischen DNA-Insert kodierte ORFs
V23	SPCC16C4.02c, <i>pin1⁺</i>
V28	SPNCRNA387 (letzte 387/1153 Bp), <i>sui1⁺</i> , SPBC23G7.06c, SPBC23G7.07c, <i>rga7</i> (letzte 220/2088 Bp)

Tabelle 2.3: Suppressor Plasmide der *fta2-291* Suppressor Analyse.

Heterozygote Deletion des *sos7⁺*-ORFs

Ein diploider *S. pombe* Stamm wird mittels des *ade6-M210/ade6-M216* Markersystems erstellt. Jeder der Stämme trägt dabei einen *ade6⁻*-Marker, der ihn Adenin auxotroph macht. Sind aber beide Allele in demselben Stamm vorhanden, kommt es zur intragenen Komplementation und damit zur Adenin-Prototrophie. Die Stämme mit den entgegengesetzten Paarungstypen wurden gepaart und nach 24 h auf EMM ohne Adenin ausgestrichen. Die hier isolierten Kolonien wurden auf Sporulation untersucht und nur solche, die noch sporulierten, für die Transformation eingesetzt. Bei der Transformation wurde der 1079 Bp große *sos7⁺*-ORF gegen die 2140 Bp große *his3⁺*-Kassette ausgetauscht. Von drei Transformanten, die mittels PCR die heterozygote Deletion des *sos7⁺*-ORFs aufwiesen, und weiterhin in der Lage waren zu sporulieren, wurden 75 Tetraden separiert. Jeweils nur zwei der vier Sporen bildeten lebensfähige Kolonien aus, die alle Histidin auxotroph waren.

Transfektion von HEK293T-Zellen mittels Calcium Phosphat

Bei der Transfektion kommt es zur Bindung von Plasmid-DNA an Calciumphosphat, welches von den humanen Zellen aufgenommen wird. Alle Transfektionen wurden in HEK293T Zellen durchgeführt.

1. 10^5 HEK293T-Zellen werden in 24-Well Platten ausgesät und für ca. 24 Stunden inkubiert.
2. 2 µg Plasmid-DNA wird mit 10 µl 1 M CaCl_2 und 30 µl H_2O gemischt.
3. Die DNA/ CaCl_2 Lösung wird tropfenweise unter Vortexen zu 40 µl 2 x BBS (50 mM BES pH 6.95, 280 mM NaCl, 1,5 mM Na_2HPO_4) gegeben und 15 - 20 Min bei RT inkubiert.
4. Die Lösung wird vorsichtig zu den Zellen gegeben.
5. Nach 3-6 Stunden werden die Zellen auf den Deckgläschen mit frischem (vorher erwärmten) Medium gewaschen (Alternativ kann die DNA-Lösung auch bis zur Mikroskopie auf den Zellen verbleiben. Überlebensfähigkeit muss bei unterschiedlichen Fragmenten getestet werden, es kommt in der Regel zur Erhöhung der Transfektionseffizienz).
6. Nach 24-48 Stunden wird das Medium abgenommen und die Zellen werden 2 x mit HBSS gewaschen.
7. Die Zellen werden mit Methanol oder 3,7 % Paraformaldehyd fixiert (siehe 2.14).

2.12 Molekularbiologische Methoden

DNA-Präparation aus *E. coli*

Die Plasmidpräparation erfolgt im kleinem Maßstab durch die alkalische Methode nach Ish-Horowicz (Maniatis et al, 1989). Größere Mengen Plasmid-DNA werden mittels des Plasmid Midi Kits (Qiagen, Hilden) isoliert.

DNA-Präparation aus *S. cerevisiae*

Die Plasmidpräparation aus *S. cerevisiae* wird mittels alkalischer Lyse leicht modifiziert laut Birnboim & Doly durchgeführt (Birnboim & Doly, 1979).

DNA-Präparation aus *S. japonicus*

Die genomischer DNA aus *S. japonicus* Zellen wird genauso wie die aus *S. pombe* Zellen isoliert (Hoffman & Winston, 1987). Anstelle der Zymolyase werden die Lysing Enzyme von *Trichoderma harzianum* (Sigma, L-1412) für den Zellaufschluss verwendet.

DNA-Präparation aus *S. pombe*

Die Gewinnung genomischer DNA aus *S. pombe* Zellen erfolgt nach dem Protokoll von Hoffmann (Hoffman & Winston, 1987).

Zur Isolation von Plasmiden aus der Spalthefe *S. pombe* wird das Geneclean Kit (MP Biomedicals, LLC.) laut Herstellerangaben verwendet. Alternativ kann ein leicht modifiziertes Protokoll aus dem Paul Nurse Labor verwendet werden (http://biosci.osu.edu/~nile/nurse_lab_manual.pdf);

1. Eine 2 ml Kultur wird ÜN angezogen.
2. Zellen werden 5 Min bei 3500 rpm zentrifugiert.
3. Der Überstand wird verworfen und die Zellen werden im übrigen Medium resuspendiert.
4. Es erfolgt die Zugabe von 0,2 ml (2 % Triton X-100, 1 % SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris /HCl (pH 8,0), 1mM Na₂EDTA). Durch Vortexen werden die Zellen und der Puffer gemischt.
5. Zugabe von 0,2 ml Phenol und 0,3 g Glassperlen (Salzsäure behandelt).
6. Die Proben werden 2 Min unter dem Abzug gevortex und 8 Min bei 13000 rpm zentrifugiert.
7. Die obere Schicht wird in ein neues Eppendorfreaktionsgefäß überführt und erneut mit 0,2 ml Phenol gereinigt (kurzes Vortexen ausreichend).
8. Zugabe von 0,2 ml Chloroform, vortexen und Zentrifugation.
9. Die DNA wird mit Ethanol gefällt und mit 70 %igem Ethanol gewaschen.
10. Das Pellet wird in 10 µl 1xTE aufgenommen.
11. 1-5 µl werden für die Elektroporation in *E. coli* eingesetzt.

DNA-Fällung

Die DNA-Fällung erfolgt durch Zugabe von 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat und 2,5 Volumen 96 %igem Ethanol oder 1 Volumen Isopropanol. Der Ansatz wird 30 Min bei 13000 rpm zentrifugiert und der Überstand wird verworfen. Die DNA wird zusätzlich mit 1 ml 70 %igem Ethanol gewaschen.

DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von neu klonierten Plasmiden, die im Rahmen einer Multikopien-Suppressoranalyse isoliert wurden, erfolgte im Biologisch-Medizinischen Forschungszentrum der Universität Düsseldorf (BMFZ).

DNA-Amplifizierung mittels PCR

Die DNA-Amplifizierung mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) erfolgt nach Standardprotokollen (Maniatis et al, 1989). Für die Amplifikation von Fragmenten, die für Klonierungen oder zur Sequenzierung benötigt werden, verwendet man proof-reading Polymerasen. Andere Amplifizierungen erfolgen mit der *Taq*-Polymerase. Bei der sog. Kolonie-PCR werden für die PCR-Reaktion *S. pombe* Zellen eingesetzt, deren enthaltene genomische DNA als Vorlage zur Amplifikation dient. DNA-Fragmente aus Agarosegelen werden laut Herstellerangaben des Qiagen Gel Extraktionskits isoliert.

Mutagene PCR zur Erzeugung Konditional-letaler *sos7^{ts}* Mutanten

Um eine oder zwei Mutationen in den 1079 Bp *sos7⁺*-ORF einzubringen, wurde das Protokoll verwendet, in dem während meiner Diplomarbeit der 1056 Bp *fta2⁺*-ORF von mir mutagenisiert wurde (Jakopec, 2006). Dabei konnten jeweils eine oder zwei Mutationen in den *fta2⁺*-ORF eingebracht werden. Der *sos7⁺*-ORF wurde in einen Vektor kloniert, der 3' vom ORF das *his3⁺* Gen aufwies, mit dem die Integration in das *S. pombe* Genom überprüft werden konnte. Mittels mutagener PCR (siehe Tabelle 2.4) wurde ein 3247 Bp großes DNA-Fragment erstellt. Aufgrund der räumlichen Nähe am 3' Ende von *sos7⁺* zu *sen2⁺* wies das 3' Oligonukleotid die ersten 47 Bp des *sen2⁺*-ORFs auf. Dieses PCR Produkt wurde in den KG425 (UFY605) transformiert und auf MM Platten ohne Histidin plattiert. Nach 2 Tagen bei 25 °C wurden die Platten auf histidinfreie MM Platten mit Phloxin B replikaplattiert, so dass temperatursensitive Kolonien durch ihre dunklere Färbung zu erkennen waren. Alle 52 putativen Kandidaten wurden mittels PCR überprüft und 33 wiesen die komplette Integration des PCR-Fragmentes auf. Nachdem überprüft wurde, dass die Überexpression von *sos7⁺* die Temperatursensitivität bei allen Temperaturen aufheben konnte, wurden die Punktmutationen im *sos7^{ts}*-ORF durch Sequenzierung bestimmt. Drei Mutanten wurden im Folgenden weiter analysiert; *sos7-178* [817 (T zu A) → I178N], *sos7Δ7* [1058 (T zu A) → Y258X; vorzeitiges Stopp, es fehlen sieben AS], und *sos7+6* [1076 (zusätzliches A, anstelle von TAA (Stopp) → ATA A) → X264IMRRYRX; sechs AS mehr als der ursprüngliche ORF am 3' Ende].

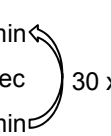
PCR-Protokoll ungerichtete Mutagenese			PCR-Programm	
	mutagener Ansatz	Kontrolle		
Oligonukleotid # 1	2 µl	1 µl	94 C	5 min
# 2	2 µl	1 µl	98 C	1 min
10x PCR-Puffer	10 µl	10 µl	50 C	30 sec
MgCl ₂ 25 mM	24 µl	6 µl	72 C	4 min
dNTP's 4 mM	5 µl	5 µl	72 C	5 min
dATP 100 mM	0,8 µl	-		
dGTP 100 mM	0,8 µl	-		
dTTP 100 mM	0,8 µl	-		
Template DNA (761)	1 µl	1 µl		
H ₂ O	52,85 µl	75 µl		

Tabelle 2.4: Mutagenes PCR-Protokoll für die ungerichtete Mutagenese des *sos7⁺*-ORFs.

2.13 Biochemische Methoden

Induktion der Genexpression in *E. coli*

1. 50 ml ÜN Vorkultur wird in selektivem LB Medium animpft.
2. Eine 1 l Hauptkultur (vorgewärmtes Medium) wird mit einer OD₆₀₀ von ca. 0,1 angeimpft (ungefähr 20-30 ml der Vorkultur).
3. Erreicht die Kultur eine OD₆₀₀ von ca. 0,3, wird die Expression des 6xHis-Sos7 bzw. 6xHis-Spc7-C Fusionsproteins unter der Kontrolle des *lac*-Promotors durch die Zugabe von IPTG (Endkonzentration: 1mM) induziert.
4. Nach vier Stunden bei 37 °C werden die *E. coli* Zellen geerntet, indem sie für 10 Min bei 5000 rpm bei RT abzentrifugiert werden.
5. Das Pellet wird mit 20 ml PBS Puffer gewaschen und 15 Min bei 4000 rpm erneut zentrifugiert.
6. Das so gewonnene Zellpellet wird in 2 ml PBS Puffer resuspendiert (sehr gut resuspendieren!) und bis zur Weiterverarbeitung bei -20 °C gelagert.

Affinitätschromatografische Aufreinigung von denaturierten Proteinen

Die Affinitätschromatografie erfolgt über die Bindung des 6xHis Fusionsproteins an stationäre Ni-NTA Agarose (Qiagen).

1. Das Zellpellet einer induzierten *E. coli* Kultur wird aufgetaut und in 30 ml Puffer B (8 M Harnstoff; 0,1 M NaH₂PO₄, 10 mM Tris/HCl, pH 8,0) resuspendiert.

Achtung! Das 6xHis-Spc7-C Protein konnte nur bei Zugabe von 2 % SDS isoliert werden!

2. Die Zellen werden für mindestens eine Stunde bei RT auf dem Rad inkubiert.
3. Das Lysat wird 10 Min bei 10000 rpm (Avanti J-25) zentrifugiert. Der Überstand wird in ein Rotkappenröhrchen überführt.
4. Dem aufgereinigtem Lysat wird 2 ml Ni-NTA Agarose hinzugefügt und mindestens eine Stunde auf dem Rad bei RT inkubiert.
5. Das Lysat-Ni-NTA Gemisch wird auf eine Säule mit einem Durchmesser von ca. 1 cm gegeben, die einen Gazestopfen besitzt, so dass die Ni-NTA Agarose in der Säule bleibt.
6. Nachdem das Material durchgelaufen ist, wird die Säule mit 15 ml Puffer B gewaschen.
7. Die Säule wird mit 20 ml Puffer C (8 M Harnstoff, 0,1 M NaH₂PO₄, 10 mM Tris/HCl, pH 6,3) und 20 mM Imidazol gewaschen.
8. Das 6 x Histidin-markierte Protein wird mit 3x 2 ml Puffer C (+ 250 mM Imidazol) eluiert. Dazu wird die Säule mit dem Elutionspuffer beladen und 5 Min inkubiert (durch eine Klemme kann die Säule verschlossen und damit der Durchlauf verhindert werden). Die einzelnen Fraktionen werden aufgefangen und getrennt mittels einer SDS-PAGE analysiert. Die Ni-NTA wird gesammelt und mit NiSO₄ regeneriert.

Dialyse von denaturierten Proteinen

Für die Herstellung von Antikörpern werden zum Einen denaturierte, zum Anderen auch re-naturierte Proteine benötigt. Dazu werden die Proteine mittels Dialyse in ihren re-naturierten Zustand zurückgefaltet.

1. Ein ca. 10 cm langer Dialyseschlauch wird 10 Min in deion. Wasser bei 100 °C erhitzt.
2. Der Dialyseschlauch wird mit einer Klemme an einem Ende verschlossen und mit der Proteinsuspension gefüllt. Der Dialyseschlauch wird auch am zweiten Ende mit einer Klammer verschlossen.

6xHis-Spc7-C;

3. Die Proteinsuspension wird zweimal gegen 2 l 1xPBS für ca. 12 h bei 4 °C dialysiert.
4. Die Suspension wird aus dem Dialyseschlauch entnommen und ggf. erfolgt eine Aufkonzentration des Proteins mittels Zentrifugation in einer Amicon Filter Einheit.

6xHis-Sos7;

3. Die Proteinsuspension wird schrittweise gegen 50:50 Puffer B:NaCl-Puffer (300 mM NaCl, 50 mM Tris/HCl pH 8, 1 mM EDTA, 1 % Glycerin), 25:75 %, 12,5 %:87,5 %, usw. bei RT (schnelles Vorgehen, da naturierte Proteine möglichst kühl gelagert werden sollten) dialysiert, bis es sich in reinem NaCl-Puffer befindet. Es erfolgt ein weiterer Dialyse Schritt im Kühlschrank gegen frischen NaCl-Puffer.
4. Die Suspension wird aus der Dialyseschlauch entnommen und ggf. erfolgt eine Aufkonzentration des Proteins mittels Zentrifugation in einer Amicon Filter Einheit.
5. Es wird eine Proteinmengenbestimmung durchgeführt und mittels SDS-PAGE werden die Proteine weiter analysiert.

SDS-PAGE

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration wird Bradfordreagenz laut Herstellerangaben eingesetzt. Die Probenaufbereitung, die Herstellung von SDS-Polyacrylamidgelen und deren Übertragen auf eine Nylonmembran erfolgen nach Standardprotokollen (Maniatis et al, 1989). Die Farbentwicklung erfolgt entweder mittels alkalischer Phosphatase oder mit dem ECL-Kit. Die Detektion der Signale erfolgt dann im LAS 1000 Spektrometer.

Coomassie-Färbung

Die Coomassie-Färbung erfolgt mit dem nicht giftigem „Mikrowellen-Coomassie“ (US-Patent von Ewald M. Wondrak (US2001046709, US6555382 (B2), US6319720 (B1))).

Die Coomassie-Lösung wird wie folgt hergestellt;

60-80 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 unter Rühren in 1 l ddH₂O lösen (2-3 Stunden bei RT). Anschließend Salzsäure bis zu einer Konzentration von 35 mM hinzugeben und die Lösung dunkel lagern. Die Lösung kann mehrfach verwendet werden.

1. Das Polyacrylamidgel wird in eine Schale mit Wasser überführt und für 30 Sekunden bei 600 Watt in der Mikrowelle erhitzt (Achtung! Nicht zum Kochen bringen).
2. Das Gel wird einige Minuten auf dem Schüttler in der Lösung geschüttelt und ein zweites Mal wie in Schritt 1 gewaschen.
3. Das Wasser wird entfernt und die Färbelösung wird hinzugegeben und 30 Sekunden bei 600 Watt in der Mikrowelle erhitzt.
4. Nach einigen Minuten erscheinen die Proteinbanden. Sollte der Hintergrund zu stark gefärbt sein, kann durch das Schütteln in H₂O der Hintergrund herausgewaschen werden.

Generierung polyklonaler Sos7 und Spc7-C Antikörper

Für die Immunisierungen von jeweils zwei Kaninchen wurde zum einen die letzten 1635 Bp des *spc7⁺*-ORFs, die für den 544 AS umfassenden C-Terminus kodieren, und zum anderen die gesamte c-DNA des *sos7⁺*-ORFS in den pKM32-Vektor kloniert, so dass sie N-terminal einen 6xHis Tag aufwiesen. Sos7 und Spc7-C Proteine wurden gewonnen und mittels des 6xHis Fusionsproteins unter denaturierenden Bedingungen aufgereinigt.

Jeweils 400 µg denaturiertes Protein wurden aus einem Coomassie gefärbten 10 % SDS Gel ausgeschnitten und an die Firma Eurogentec (Seraing, Belgien) gesandt, die die Immunisierungen durchführte. Beim Spc7-C Protein wurden aufgrund der großen Anzahl an Degradierungsbanden 600 µg Protein aufgetragen und nur die Spc7-C, aber keine der Degradierungsbanden ausgeschnitten.

Neben zwei jeweils 100 µg Immunisierungen mit denaturiertem Protein, erfolgte eine dritte mit nativem Protein. Dazu wurde das Spc7-C Protein gegen 1xPBS, und das Sos7 Protein gegen NaCl-Puffer dialysiert. Da erste Antikörpertests keine Signale in der Immunfluoreszenz zeigten, wurden die Kaninchen zusätzlich ein zweites Mal mit 100 µg nativem Antigen immunisiert.

Die so gewonnenen Antikörper wurden erfolgreich in Westernblot Analysen eingesetzt. Für die Verwendung in der Immunfluoreszenz musste der Antikörper zusätzlich mit NHS-Sepharose Antigen aufgereinigt werden.

Antigen-Aufreinigung polyklonaler Antikörper mittels NHS-Sepharose

Der erhaltene Sos7 und Spc7-C Antikörper konnte zwar für die Westernblot-Analyse eingesetzt werden, allerdings war eine Immunfluoreszenz mit den Antikörpern nicht erfolgreich. So wurde die Reinheit und Spezifität über eine Antigen-Aufreinigung mittels NHS-aktivierter Sepharose verbessert werden.

Alle Puffer und Lösungen werden im Kühlschrank oder auf Eis aufbewahrt!

1. 1,5 ml Sepharose in Isopropanol werden in eine leere Säule mit Fritte gegeben.
 2. Das Isopropanol wird durch 20 ml 1 mM HCl herauswaschen.
 3. Die Sepharose wird mit 10 ml Kopplungspuffer (0,2 M NaHCO₃, 0,5 M NaCl, pH 8,3) gewaschen.
 4. 1-2 mg Proteinlösung in 1xPBS werden mit demselben Volumen an Kopplungspuffer gemischt und die verschlossene Säule wird Ü/N bei 4 °C auf dem Rad inkubiert.
- Achtung!** Das Sos7 Protein befindet sich zu diesem Zeitpunkt im NaCl-Puffer (300 mM NaCl, 50 mM Tris/HCl pH 8, 1 mM EDTA, 1 % Glycerin). Da das Tris an die Sepharose binden würde, ist dieser Puffer ungeeignet. Es muss vor Beginn eine Umpufferung in 1xPBS erfolgen.
5. 4 ml Blockierungslösung (0,5 M Ethanolamin, 0,1 M Tris, pH 8,5) wird hinzugefügt und 4 h bei 4 °C auf dem Rad inkubiert.
 6. Einmal wird mit 15 ml Puffer 1 (0,1 M Tris, pH 8,0) gewaschen.
 7. Einmal wird mit 10 ml Puffer 2 (0,1 M Natriumacetat, 0,5 M NaCl, pH 4,0) gewaschen.
 8. Erneut wird mit 10 ml Puffer 1 gewaschen.
 9. 2 ml polyklonales Antikörperserum werden mit 8 ml 0,1 M Tris, pH 8,0 vermischt und auf die Säule gegeben. Die Suspension wird Ü/N (oder mindestens 2 h) bei 4 °C auf dem Rad inkubiert.
 10. Die Säule wird mit 10 ml 10 mM Tris pH 7.5 gewaschen.
 11. Die Säule wird mit 10 ml 500 mM NaCl gewaschen.
 12. 1. Elution des Antikörpers: saure Elution mit 2 ml 100 mM Glycin, pH 2,5 für 5 Min bei 4 °C inkubieren und das Eluat in 0,2 ml 1 M Tris, pH 8,0 auffangen um den pH-Wert zu neutralisieren. Vorgang ein zweites Mal wiederholen.
 13. 2. Elution des Antikörpers: basische Elution mit 2 ml 2,5 M Triethanolamin, pH 11,5 für 5 Min bei 4 °C inkubieren und das Eluat in 0,2 ml 1 M Tris, pH 8,0 auffangen um den pH-Wert zu neutralisieren. Auch die basische Elution wird 2x durchgeführt.

2.14 Immunpräzipitation

Immunpräzipitation – *S. pombe*

Die Gewinnung des Zelllysats und die Co- bzw. die Immunpräzipitation erfolgt, wie in Kerres et al. 2004 beschrieben. Anstelle des HEPES-Puffers wurde ab 2007 der HB-15 Puffer (25 mM MOPS, 60 mM β-Glycerophosphat, 15 mM pNitrophenylphosphat, 15 mM MgCl₂,

15 mM EGTA, 1 mM DTT, 0,1 mM Natriumorthovanat, 1 % Triton-X100, 1 mM PMSF, 1 x Complete Protease Inhibitor) verwendet.

Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP)

Die ChIP-Methode erfolgt nach dem Protokoll von Inga Karig, einem ehemaligen Mitglied unseres Labors (Karig, 2004).

Immunpräzipitation – humane Zelllinien

Herstellen des humanen Zelllysats für die IP

1. Hep2-Zellen werden in geeigneter Verdünnung in einer großen Flasche ausgesät.
2. Nach ca. 24 h werden die Zellen geerntet (Zellrasen sollte nicht ganz konfluent sein, um so eine möglichst hohe Anzahl an mitotischen Zellen zu gewährleisten).
3. Das Medium wird abgenommen und die Zellen vorsichtig mit 10 ml HBSS gewaschen.
4. Zugabe von 2 ml RIPA Puffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris, 0,5 % Na-Deoxycholat, 2 % SDS, 1 % NP-40) + 10 % Protease Inhibitor. Die Zellen werden mit einem dünnen Film des Puffers überschichtet und für 10-30 Min im Kühlschrank inkubiert (gelegentlich leicht schütteln).
5. Die im RIPA Puffer gelösten Zellen werden in ein Greiner Röhrchen überführt und 10 Sek mit dem Ultraschallstab behandelt (Arbeitsleistung: 40 %) (Bandalin Sonopuls, HD 2200; MS 73 Spitze).
6. Die Zellsuspension wird 1 Min bei 13000 rpm zentrifugiert und der Überstand wird in ein neues Eppendorfgefäß überführt.

Antikörperbindung an die AminoLink Plus Matrix

1. Mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze werden 50 µl der AminoLink Plus Matrix (vorher gut schütteln) in die Säule gegeben und 10 sek bei 2000 rpm zentrifugiert.
2. Die Matrix wird 2x mit 200 µl 1xCoupling Puffer (0,01M Natriumphosphat, 0,15 M NaCl, pH 7,2) gewaschen.
3. 10-75 µg aufgereinigter Antikörper (Achtung! Es dürfen keine Amine in der Antikörperlösung vorhanden sein (z.B. Tris, Glycin)) wird mit 1xCoupling Puffer gemischt, so dass ein Endvolumen von 200 µl erreicht wird. Diese Lösung wird direkt auf die Matrix in der Säule gegeben.
4. Zugabe von 3 µl Cyanoborohydrid (5 M) (giftig: unter dem Abzug mit Handschuhen arbeiten).
5. Säule wird mit Deckel verschlossen und 90-120 Min bei Raumtemperatur geschüttelt. Nach Zentrifugation wird der Durchfluss aufgehoben, um zu überprüfen, ob der Antikörper vollkommen gebunden hat (getrennt entsorgen, da sich möglicherweise ungebundenes Cyanoborohydrid in der Lösung befindet).
6. Die Matrix wird 2x mit 200 µl 1x Coupling Puffer gewaschen und
7. 1x mit 200 µl Quenching Puffer (1M Tris/HCl) gewaschen.
8. Der Matrix werden 200 µl Quenching Puffer hinzugegeben.
9. Zugabe von 3 µl Cyanoborohydrid (5 M) (giftig: unter dem Abzug mit Handschuhen arbeiten).
10. 15 Min Inkubation unter leichtem Schütteln. Durchfluss wird abzentrifugiert (getrennt entsorgen, da sich möglicherweise ungebundenes Cyanoborohydrid in der Lösung befindet).
11. Die Matrix wird 2x mit 200 µl 1xCoupling Puffer gewaschen.
12. Die Matrix wird 6x mit 150 µl 1xCoupling Puffer gewaschen.

13. Direktes Fortfahren mit der IP oder Lagerung der Matrix in 200 µl 1xCoupling Puffer bei 4 °C, nachdem sie 2x mit 200 µl 1xCoupling Puffer gewaschen wurde.

Immunpräzipitation – humane Zellen

Alle Schritte bei 4 °C durchführen!

1. Matrix 2x mit 200µl Lysis/Wasch Puffer (0,025 M Tris, 0,15 M NaCl, 0,001 M EDTA, 1 % NP-40, 5 % Glycerol, pH 7,4) waschen (10 sek 2000 rpm).
2. Lysat mit Matrix mischen (abgeschnittene gelbe Spitzen verwenden);
< 500 µl: Säule mit Stöpsel verschließen und Lysat hinzugeben
> 500 µl: Matrix mit Lysat aus Säule spülen (Säule vorher mit Stöpsel verschließen) und in Eppendorfgefäß /Rotkappengefäß geben.
Für 1-2 h oder Ü/N auf dem Rad bei 4 °C inkubieren.
3. Gesamtes Lysat in 500 µl Schritten durch die Säule zentrifugieren (optional; Durchlauf für spätere Analysen sammeln).
4. Säule in ein neues Eppendorfgefäß überführen; 3x mit 200µl Lysis/Wasch Puffer waschen (optional; Durchlauf für spätere Analysen sammeln).
5. Säule in ein neues Eppendorfgefäß überführen; 10 µl sauren Elutionspuffer hinzugeben und zentrifugieren.
6. Eppendorfgefäß nicht wechseln! 2x 50µl sauren Elutionspuffer hinzugeben und je 5 Min bei Raumtemperatur inkubieren. Eluat durch 1/10 Volumen 1 M Tris/HCl, pH 8 puffern und bei -20 °C lagern.
7. Säule in ein neues Eppendorfgefäß überführen; 10 µl basischen Elutionspuffer hinzugeben und zentrifugieren.
8. Eppendorfgefäß nicht wechseln! 2x 50µl basischen Elutionspuffer hinzugeben und je 5 Min bei Raumtemperatur inkubieren. Eluat durch 1/10 Volumen 1 M Tris/HCl, pH 8 puffern und bei -20 °C lagern.
9. Regeneration der Matrix;
 - a) 2x100 µl mit 1xCoupling Puffer waschen.
 - b) 200 µl 1x Coupling Puffer hinzugeben mit Stöpsel und Deckel verschlossen bei 4 °C lagern (optional: Zugabe von 0,02 % Natriumazid).

2.15 Mikroskopie

***S. pombe* Lebendfluoreszenz**

Um die mitotische Spindel in lebenden Zellen zu untersuchen, wurde ein Stamm verwendet, bei dem das GFP-Protein N-terminal am α -Tubulin (GFP-Atb2) befindet, und vom reprimierbaren *nmt81*-Promotor exprimiert wird. Um die volle Expression des Promotors gewährleisten zu können, wurde eine Kultur 36-48 Stunden unter de-reprimierenden Bedingungen in einer Flüssigkultur angezogen. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Zellen permanent in der logarithmischen Wachstumsphase waren. Für die mikroskopische Analyse wurden die Zellen mittels Concanavalin-A-Lektin auf einem Deckgläschen fixiert, so dass die Zellen sich während der Aufnahmen nicht bewegen konnten. Ab 2010 wurden auch Agarplättchen auf Objektträger aufgebracht, auf denen 1 µl der Kultur aufgetropft wurde. Mit einem Deckgläschen versehen und mit VALAP verschlossen sind diese mehrere Stunden kultivierbar (Tran et al, 2004).

Sollte die Signalintensität zweier verschiedener Signale (z.B. GFP) direkt in der Lebendfluoreszenz verglichen werden, kann einer der beiden Stämme mit mit TRITC-

konjugiertem Lektin inkubiert werden. Lektin bindet die Zellwand der *S. pombe* Zellen und der TRITC-Fluoreszenzmarker kann im roten Fluoreszenzkanal detektiert werden. Dafür wird die Kultur abzentrifugiert und in einem geringen Volumen (ca. 20 µl) resuspendiert. 2 µl einer 0,5 mg/ml TRITC-Lösung (in 1xPBS pH 7,4 gelöst) werden hinzugegeben (Grallert et al, 2006). Es erfolgt eine Inkubation von 3 Min, dann werden die Zellen 2x mit 1 ml Medium gewaschen. Nachdem gefärbte und nicht gefärbte Zellen zusammengegeben wurden, muss die Lösung rasch auf das Agarplättchen gegeben werden, da sonst die Restmenge an TRITC gekoppelten Lektin so hoch ist, dass sie auch die vormals nicht gefärbten Zellen anfärbt (ggf. kann die TRITC Färbung auch im „DAPI-Kanal“ analysiert werden, indem sie schwächer erscheint und so die Zahl der Falschpositiven gering gehalten werden kann).

***S. pombe* Immunfluoreszenz**

Die Zellen für Immunfluoreszenz-Mikroskopie wurden, je nach Stammhintergrund und Fragestellung, nach einem von drei verschiedenen Protokollen fixiert (Alfa et al, 1993; Bridge et al, 1998; Hagan & Hyams, 1988). Um GFP-Signale zu detektieren, wurde eine Paraformaldehydfixierung durchgeführt. Leider bleibt durch diese Fixierung nur das mitotische Mikrotubulizytoskelett erhalten. Sind auch die Interphase Mikrotubuli von Interesse, wird eine Methanolfixierung durchgeführt. Sollte nur das Mikrotubulizytoskelett fixiert und später untersucht werden, wurde eine Paraformaldehyd-Sorbit-Fixierlösung verwendet. Die gewünschten Strukturen wurden mit einem Primärantikörper und daraufhin mit einem Fluoreszenzfarbstoff-tragenden Sekundärantikörper behandelt. Die verwendeten Antikörper finden sich in Kapitel 2.5 aufgelistet.

***S. japonicus* Immunfluoreszenz**

Um zu testen, ob der *S. pombe* Sos7 Antikörper auch das *S. japonicus* Sos7 Protein detektieren kann, wurde eine Immunfluoreszenz nach dem *S. pombe* Paraformaldehyd-Protokoll durchgeführt (Hagan & Hyams, 1988). Bei *S. pombe* verwendet man Zymolyase, um die Zellwand durchlässig für den Antikörper zu machen, in *S. japonicus* werden die „Lysing Enzymes“ von *Trichoderma harzianum* verwendet. Sonst wurde das Protokoll identisch abgearbeitet. Als Kontrolle dient die Tubulinfärbung mittels des TAT-1 Antikörpers, der auch bei der Paraformaldehydfixierung das gesamte Interphasezytoskelett sehr gut färbt.

Präparationsprotokolle für die Fixierung und Antikörperfärbung humaner Zellen

Die folgenden Protokolle für die Fixierung und Antikörperfärbung von human Zellen wurden von Stephan Schmidt (AG Piekorz) gestellt. Für die C10orf118-Experimente erfolgte die Durchführung in den Räumen der AG Piekorz (Institut für Biochemie und Molekularbiologie II, Hämatologie und Klinische Immunologie, Universitätsklinikum der Heinrich-Heine-Universität). Alle weiteren Färbungen wurden in den Laboren der AG Hegemann durchgeführt.

Methanol/Aceton Fixierung – humane Zellen

1. Zellkulturwells mit Hilfe einer sterilen Pinzette mit einem Deckgläschen versehen. Geeignete Verdünnung an Zellen hinzugeben und das Deckgläschen mit einer blauen Spitze leicht am Boden andrücken, damit sich nur an einer Seite eine Zellschicht festsetzt.
2. Nach ca. 24 h 1x mit 500 µl 1xPBS waschen und mit der Methanol/Aceton-Lösung (1:1 Mischung, frisch angesetzt, mind. 1 h vorher auf -80 °C (max. 5 d)) aus dem -80 °C-Schrank direkt auf die Zellen pipettieren (ca. 500µl). Die Zellen werden 15 Minuten zur Fixierung in den -20 °C-Schrank gestellt. Anschließend wird die Methanol/Aceton-Lösung abgenommen. (Die Proben sind bis zu 2 Wochen haltbar).

3. Zum Rehydrieren werden die Zellen 2x 5 Min/RT in 1xPBS geschwenkt. Anschließend erfolgt die Blockierung für 20 Minuten bei RT unter leichtem Schwenken (Blockierlösung; 4 % BSA in 1xPBS lösen + 0,05 % Saponin)(ca. 200-300µl pro Well).
4. Nach der Blockierung die Antikörperlösung (1 % BSA in 1xPBS lösen + 0,05 % Saponin) mit Antikörpern (anhand des Datenblattes des Antikörpers zu bestimmen) auf die Zellen geben und bei 4 °C Ü/N unter Schwenken inkubieren (ca. 200-300µl pro Well).
5. Zellen 3x 5 Min bei RT mit 1xPBS waschen. Anschließend den zweiten Antikörper (ebenfalls in Antikörperlösung verdünnt) auf die Zellen geben. Für 1 Stunde bei RT lichtgeschützt schwenken.
6. Anschließend 2x 5 Min bei RT mit 1xPBS waschen.
7. Mit 0,1 µg/ml DAPI in 1xPBS für 3 Minuten inkubieren.
8. 2x 5 Min bei RT mit 1xPBS waschen. Zellen bis zum „eindeckeln“ in 1xPBS stehen lassen.
9. Deckgläschen mit einer Pinzette vom Boden abheben und mit der Pinzette aus dem Well heben. Deckgläschen trocknen lassen und vorsichtig auf das Eindeckelmedium (ProLong® Gold) geben. Proben waagerecht lagern bis da Eindeckelmedium trocken ist (ca. 24 Stunden bei ProLong® Gold).

Paraformaldehyd-Färbung – humane Zellen

1. Zellkulturwells mit Hilfe einer sterilen Pinzette mit einem Deckgläschen versehen. Geeignete Verdünnung an Zellen hinzugeben und das Deckgläschen mit einer blauen Spitze leicht am Boden andrücken, damit sich nur an einer Seite eine Zellschicht festsetzt. Zellen in geeigneter Verdünnung hinzugeben und ca. 24 h auf dem Deckgläschen wachsen lassen.
2. Das Medium abnehmen und die Zellen 1x mit 1xPBS waschen.
3. 500 µl 4 % PFA (PFA-Stocklösung wird eingefroren und vor Verwendung, nach dem Auftauen, sterilfiltriert (20 µm-Filter)) zugeben und 20 Min bei RT inkubieren (nicht schütteln).
4. Zellen 1x mit 1xPBS waschen.
5. Die Zellen werden mit 500 µl 0,25 % Triton X-100 für 5 Min bei RT permeabilisiert (nicht schütteln).
6. Zellen unter Schütteln 1x 5min mit PBS waschen.
7. Das Blockieren erfolgt 1 Stunde in 3 % BSA (in 1xPBS) bei RT unter leichtem Schütteln.
8. 1. Antikörper in 1 % BSA (in 1xPBS) Ü/N bei 4 °C unter leichtem Schütteln mit den Zellen inkubieren.
9. 2x5 Min die Zellen mit 1xPBS waschen.
10. 2. Antikörper in 1 % BSA (in 1xPBS) für 1h bei RT unter leichtem Schütteln mit den Zellen inkubieren.
11. Die Zellen 2x 5 Min mit 1xPBS waschen.
12. Die Zellen mit 500 µl 0,1 µg/ml DAPI 3 Min bei RT unter leichtem Schütteln inkubieren.
13. Zuletzt werden die Zellen 1x 5min mit PBS gewaschen und „eingedeckelt“.
9. Deckgläschen mit einer Pinzette vom Boden abheben und mit der Pinzette aus dem Well heben. Deckgläschen trocknen lassen und vorsichtig auf das Eindeckelmedium (ProLong® Gold) geben. Proben waagerecht lagern bis da Eindeckelmedium trocken ist (ca. 24 Stunden bei ProLong® Gold).

Mikroskope und Software

Die Aufnahmen der humanen Zellen, die mit dem C10orf118 Antikörper behandelt wurden, erfolgten in der AG Piekorz an einem konfokalen Zeiss LSM 510 Mikroskop. Die Aufnahmen wurden mit der Zeiss LSM Image Browser Software bearbeitet.

Die Lebendfluoreszenzaufnahmen erfolgten an einem Zeiss Spinning Disk mit einer Yokagawa CSU Einheit und einer Axio Cam MRm Kamera. Die Aufnahmen wurden mit der Zeiss AxioVision Software bearbeitet.

Die Aufnahmen der fixierten *S. pombe* Zellen und aller weiteren Zellen oder Zelllinien, die nicht einzeln genannt sind, erfolgten am Zeiss Axiovert Weitfeld-Fluoreszenz-Mikroskop, ausgestattet mit einer Hamamatsu Kamera. Die Aufnahmen wurden mit der Openlab Software der Firma Improvision bearbeitet.

2.16 Durchflusszytometrie *S. pombe*

Um den DNA-Gehalt von *S.pombe* Zellen zu ermitteln, wurde das FACS Aria (BD Biosciences) unter der Bedienung von Klaus Meyer verwendet. Die DNA von Kontrollkulturen wurde zusätzlich angefärbt, um so den DNA-Gehalt bestimmen zu können (1 N = Stickstoff arretierte Zellen; 2 N = logarithmische haploide Wildtypkultur; 4 N = logarithmische diploide Wildtypkultur). Das Protokoll wurde der PombeNet-Seite entnommen (<http://www-bcf.usc.edu/~forsburg/yeast-flow-protocol.html>).

1. 10^7 Zellen einer logarithmisch wachsenden Kultur werden 5 Minuten bei 3000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen.
2. Es erfolgt unter vortexen die Zugabe von 1 ml kaltem 70 % EtOH. Die Zellen können bei 4 °C gelagert werden.
3. Zum Waschen werden zu 0,3 ml der fixierten Kultur 3 ml 50 mM Natriumcitrat in einem 15 ml Rotkappenröhrchen gegeben und 5 Minuten bei 3000 rpm zentrifugiert.
4. Der Überstand wird verworfen und das Pellet wird in 0,5 ml 50 mM Natriumcitrat mit 0,1 mg/ml RNase A für 2 Stunden bei 37 °C inkubiert.
5. Für die Färbung;
 - a) Propidium Iodid (PI);
Es erfolgt die Zugabe von 0,5 ml 50 mM Natriumcitrat mit 8 µg/ml PI, so dass die Endkonzentration in der Probe 4 µg/ml beträgt. Höhere PI Konzentrationen können zum Anfärben der Zellenden führen. Die Zellen können so bis zu einer Woche (im Dunkeln, bei 4 °C) gelagert werden. Die Anfärbung sollte mikroskopisch überprüft werden.
 - b) Sytox Green;
Alternativ können die Zellen mit 0,5 ml 50 mM Natriumcitrat mit 2 µM Sytox Green gefärbt werden (Endkonzentration: 1 µM).
6. Vor der FACS-Analyse werden die Proben in ein Eppendorf Reaktionsgefäß überführt und 5 Min mit Ultraschall im Wasserbad behandelt, um so Zellklumpen zu lösen.

3 Ergebnisse

3.1 Das konservierte Spc7 Protein wird für die Spindel-Integrität benötigt und verbindet den Sim4- und den NMS-Kinetochorkomplex

Über eine extragene Multikopien-Suppressoranalyse der *mal3-1* Mutante wurde *spc7⁺* isoliert (Vietmeier-Decker, 2004). Spc7 ist ein essentielles Protein, das konstitutiv an der zentralen Zentromerregion assoziiert und somit eine Komponente des Kinetochors darstellt (Kerres et al, 2004). Von dort aus interagiert es physikalisch mit dem Mikrotubuli-Plusend-bindenden Mal3 Protein (Kerres et al, 2004). Die genaue Rolle des Spc7 Proteins am Kinetochor und bei der Chromosomensegregation wurde mit Hilfe von temperatursensitiven *spc7^{ts}* Mutanten analysiert. Die Spc7 Mutanten wurden von meiner Laborkollegin Anne Kerres erstellt und von uns gemeinsam untersucht. Die daraus erhaltenen Ergebnisse sind publiziert und stammen zu 50 % aus meiner Arbeit (Kerres et al, 2007).

3.1.1 Die *spc7-23* Mutante zeigt die stärksten Defekte in der Chromosomensegregation

Drei *spc7^{ts}* Mutanten wurden mittels ungerichteter Mutagenese des C-Terminus des *spc7⁺*-ORFs (2461-4092 Bp) isoliert: *spc7-23*, *spc7-24* und *spc7-30* waren unfähig bei hohen Temperaturen zu wachsen. Der *spc7-23* Mutantenstamm wies den stärksten temperatursensitiven (ts) Phänotyp auf. Während die *spc7-24* und *spc7-30* Zellen noch bei 32 °C wachsen konnten, stellte der *spc7-23* Stamm das Wachstum bei Temperaturen über 30 °C ein (Abbildung 3.1 A). Eine weitere Analyse zeigte, dass die Lebensfähigkeit bereits nach kurzzeitiger Inkubation bei 36 °C herabgesetzt war (Abbildung 3.1 B). Die Sequenzierung der Mutanten zeigte, dass zwei bzw. drei Punktmutationen im jeweiligen ORF vorhanden waren, die zum Einbau einer anderen Aminosäure führten. In Abbildung 3.1 C ist der Austausch der Aminosäuren in den *spc7^{ts}* Mutanten dargestellt. Diese fanden sich konzentriert in zwei Regionen, die deshalb wahrscheinlich eine entscheidende Rolle für die Funktion des Spc7 Proteins haben (Abbildung 3.1 C; dunkelgrau unterlegt).

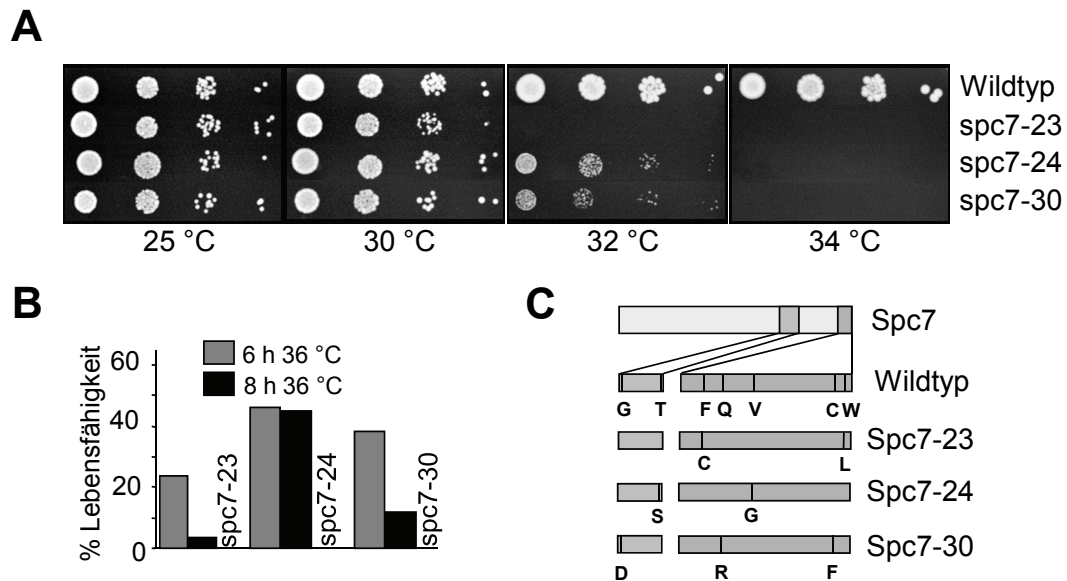


Abbildung 3.1: Der *spc7-23* Mutantenstamm zeigt den stärksten ts Phänotyp.

(A) Serieller Tropfttest (10^4 - 10^1 Zellen) des Wildtypstammes und der *spc7-23*, *spc7-24* und *spc7-30* Mutanten. Die Platten wurden für 3-4 Tage bei den angegebenen Temperaturen inkubiert. **(B)** Lebensfähigkeit der *spc7^{ts}* Mutanten nach 6 oder 8 Stunden bei der restriktiven Temperatur von 36 °C. Die Lebensfähigkeit der Mutanten wurde bestimmt, indem definierte Zellzahlen auf Vollmedium ausgestrichen und bei der permissiven Temperatur inkubiert wurden. **(C)** Das Diagramm zeigt den Austausch der Aminosäuren, der in den *spc7^{ts}* Mutanten gefunden wurde. Der Bp Austausch war wie folgt: *spc7-24* (3340 (A zu T); 3959 (T zu G), *spc7-23* (3887 (T zu G); 4079 (G zu T)), *spc7-30* (3026 (G zu A); 3914 (A zu G); 4067 (G zu T)). Dunkelgrau hinterlegt finden sich die Regionen, in denen die Mutationen im Spc7 Protein gehäuft auftreten. Abbildung übernommen aus Kerres et al, 2007.

Im Folgenden wurde die Chromosomensegregation der drei *spc7^{ts}* Mutanten bei der permissiven und der restriktiven Temperatur untersucht. Bei der permissiven Temperatur zeigten ca. 30 % der *spc7-24* und *spc7-30* Mutantenstämme und über 50 % des *spc7-23* Mutantenstammes Fehler in der Chromosomensegregation (Abbildung 3.2 A links). Bei der restriktiven Temperatur erhöhte sich die Frequenz der fehlerhaften Segregation auf 80 % (*spc7-24* und *spc7-30*) bzw. 95 % (*spc7-23*) (Abbildung 3.2 A rechts). Die folgenden drei Phänotypen wurden hauptsächlich vorgefunden:

- 1) kondensiertes Chromatin, das über einen Teil der Spindel geschmiert vorlag (Abbildung 3.2 B, a und c),
- 2) keine Segregation des Chromatins, trotz elongierter Spindel (Abbildung 3.2 B, b und d) und
- 3) ungleich segregiertes Chromatin (Abbildung 3.2 B, e und f).

Da die *spc7-23* Mutante den stärksten Phänotyp aufzeigte, wurden fast alle weiteren Analysen mit dieser durchgeführt.

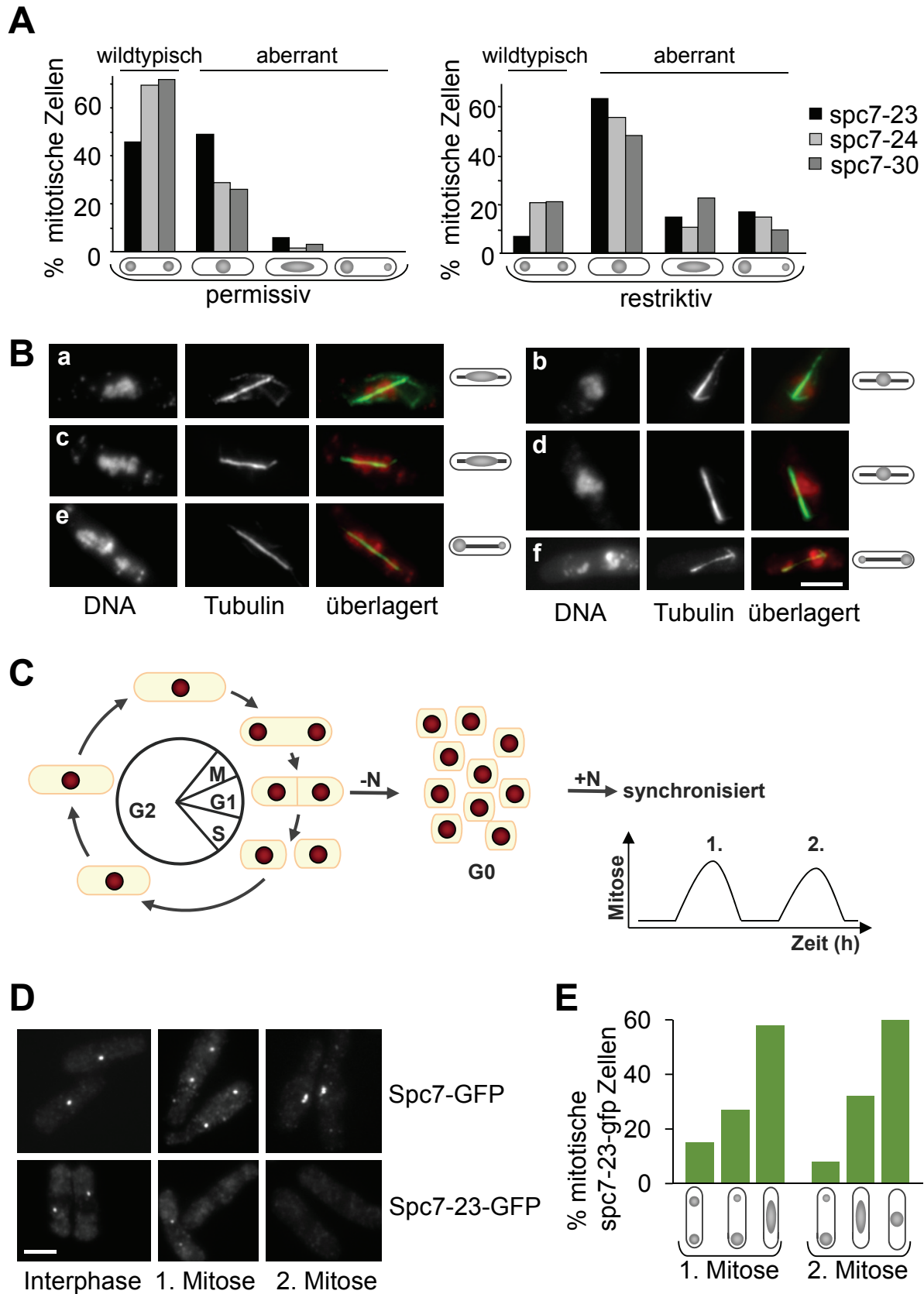


Abbildung 3.2: Primärcharakterisierung der *spc7^{ts}* Mutanten.

(Die Legende findet sich auf der folgenden Seite)

Abbildung 3.2: Primärcharakterisierung der *spc7^{ts}* Mutanten.

(A) Chromatinverteilung in *spc7^{ts}* Zellen, die eine Anaphasespindel aufwiesen. Die Inkubation erfolgte bei der permissiven (25 °C) oder restriktiven Temperatur (6 h bei 36 °C). Linkes Diagramm (von links nach rechts): gleichmäßig verteiltes Chromatin, nicht separiertes Chromatin, geschmiertes und ungleich segregiertes Chromatin (n = 100). (B) Aufnahmen von *spc7-23* Zellen, die nach 6 h bei 36 °C fixiert und mit DAPI und dem anti-Tubulin Antikörper behandelt wurden. Die drei Hauptphänotypen sind gezeigt: Chromatin, das auf der Spindel geschmiert vorliegt (a und c), nicht segregierte DNA trotz elongierter Spindel (b und d), und ungleich segregiertes Chromatin (e und f). DNA: rot; Tubulin: grün. Die Phänotypen sind zusätzlich schematisch dargestellt. Balken, 5 µm. (C) Schematische Darstellung einer Stickstoffarretierung zur Synchronisierung einer *S. pombe* Zellkultur. Eine logarithmisch wachsende *S. pombe* Kultur wurde in stickstofffreies Medium überführt, so dass alle Zellen der Kultur aus der G1- in die G0-Phase übertraten. Durch das Überführen in stickstoffhaltiges Medium traten die Zellen wieder in die G1-Phase ein und durchliefen synchron den Zellzyklus, so dass die erste und zweite Mitose untersucht werden konnte. Im folgenden Versuchsablauf erfolgte die Kultivierung und Arretierung der Zellen bei der permissiven, die Analyse der ersten und zweiten Mitose bei der restriktiven Temperatur. (D) Mikroskopische Aufnahmen synchroner Zellen, die endogen Spc7-GFP oder Spc7-23-GFP exprimieren. Der Verlauf des Experimentes gleicht dem in (C). Während der 1. Mitose zeigten 57 % der Spc7-23-GFP Zellen ein reduziertes GFP-Signal am Kinetochor, die übrigen 43 % kein Spc7-23-GFP Kinetochorsignal (n = 300). Spc7-GFP war während des gesamten Zeitraums permanent am Kinetochor. (E) Phänotypen der synchronisierten Anaphasezellen des *spc7-23* Mutantenstammes während der ersten und zweiten Mitose bei der restriktiven Temperatur (n = 300). Außer Abbildung (C) modifiziert aus Kerres et al, 2007.

3.1.2 Die Abnahme von Spc7-23-GFP am Kinetochor korreliert mit dem Anstieg der Defekte in der Chromosomensegregation

Um zu überprüfen, ob das defekte Spc7-23 Protein unter restriktiven Bedingungen am Kinetochor assoziieren kann, wurde es C-terminal mit dem GFP Protein fusioniert. In einer synchronen Kultur sollte die erste und zweite Mitose der *spc7-23-gfp* und *spc7-gfp* Stämme unter restriktiven Bedingungen untersucht werden. Dafür wurden die Spc7-23-GFP und Spc7-GFP Kultur unter permissiven Konditionen angezogen und mittels Stickstoffarretierung in der G0-Zellzyklusphase synchronisiert (Abbildung 3.2 C). Unter restriktiven Bedingungen wurde die erste und zweite Mitose der synchronisierten Spc7-23-GFP und Spc7-GFP Zellen analysiert (Abbildung 3.2 C) (Kapitel 2.9) (Jin et al, 2002). Während das wildtypische Spc7-GFP über den gesamten Zeitraum am Kinetochor lokalisiert war, fand sich Spc7-23-GFP während der ersten Mitose bereits reduziert am Kinetochor (Abbildung 3.2 D). Zum Zeitpunkt der ersten Mitose zeigten noch 15 % der *spc7-23-gfp* Zellen eine wildtypische Chromatinseparation (Abbildung 3.2 E). In der zweiten Mitose konnte kein Spc7-23-GFP-Signal mehr am Kinetochor detektiert werden (Abbildung 3.2 D). Als Konsequenz des Verlustes des Spc7-23-GFP Proteins am Kinetochor zeigte keine der *spc7-23-gfp* Zellen eine wildtypische Mitose. Dabei kam es in über 60 % der *spc7-23-gfp* Zellen trotz elongierter Spindel zu keiner Trennung des stark kondensierten Chromatins, während die übrigen Zellen

eine Fehlsegregation des Chromatins zeigten (Abbildung 3.2 E). Somit führt die Abwesenheit von Spc7 am Kinetochor zu massiven Defekten während der Mitose.

3.1.3 Der Spindelkontrollpunkt liegt im *spc7-23* Mutantenstamm aktiviert vor

Neben der Fehlsegregation des Chromatins kam es in der *spc7-23* Mutante unter restriktiven Bedingungen häufig zu keiner Chromatinsegregation trotz elongierter Spindel, was einen Verlust der Kinetochor-Mikrotubuli Interaktion vermuten lässt. Deshalb sollte die Ko-Lokalisierung des Zentromer I mit der mitotischen Spindel im *spc7-23* Mutantenstamm analysiert werden (Nabeshima et al, 1998).

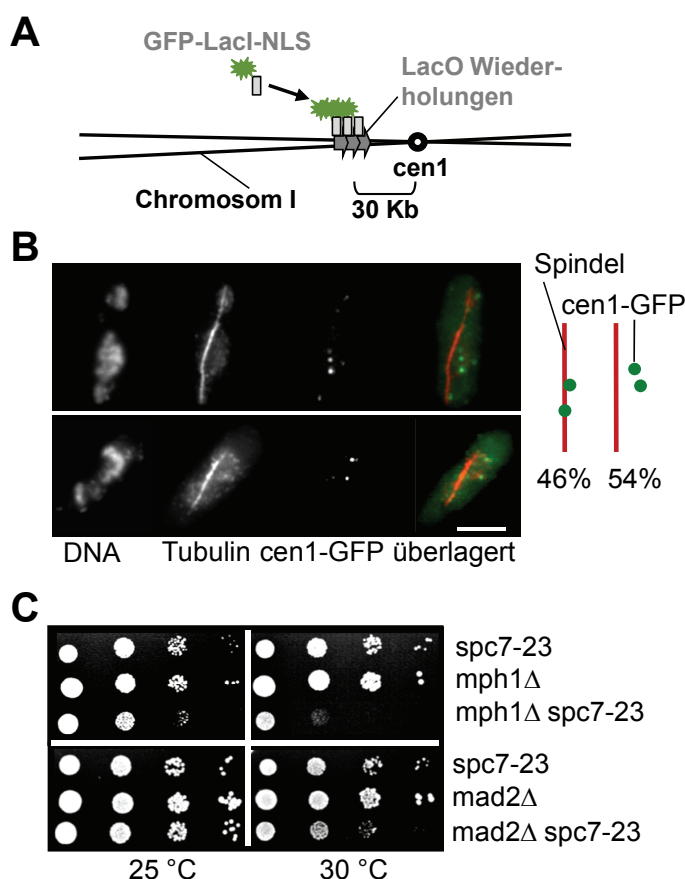


Abbildung 3.3: Der Spindelkontrollpunkt liegt in der *spc7-23* Mutante aktiviert vor.

(A) Schematische Darstellung der Markierung von Zentromer I (cen1) mit GFP. Der *lys1⁺*-ORF befindet sich 30 Kb von Zentromer I entfernt. Dieser wurde durch die aus dem β -Galaktosidase-System stammenden LacO-Wiederholungen ausgetauscht. Das LacI-GFP Fusionsprotein kann mittels der NLS-Sequenz in den Kern, wo es an die LacO-Region bindet. Durch dieses System wird das Verhalten von Zentromer I von Chromosom I studiert, ohne direkte Veränderungen in der eigentlichen Zentromerregion hervorzurufen (Nabeshima et al, 1998).

(B) Aufnahmen von *cen1-gfp spc7-23* Zellen, die 6 h bei 36 °C inkubiert wurden. Die fixierten Zellen wurden mit DAPI, anti-GFP und anti-Tubulin Antikörpern behandelt. *cen1-GFP*: grün; Tubulin: rot. Balken, 5 µm. (rechts) Schematische Darstellung des *cen1-GFP*-Signals relativ zur mitotischen

Spindel (n = 28). (C) Tropftests von *spc7-23*, *mph1Δ*, *mad2Δ* und den entsprechenden Doppelmutanten, die für 3-4 Tage bei den angegebenen Temperaturen inkubiert wurden. Abbildung (A) modifiziert aus Nabeshima et al, 1998, Abbildung (B) modifiziert und (C) übernommen aus Kerres et al, 2007.

Um die Zentromerregion nicht direkt verändern zu müssen und damit ihre Eigenschaften möglicherweise zu zerstören (siehe Kapitel 1.6.1) wurde eine Region, die 30 Kb von Zentromer I entfernt ist, mittels GFP markiert (*cen1-gfp*) (Abbildung 3.3 A). In 46 % der *spc7-23* Zellen, die unter restriktiven Konditionen keine Chromosomensegregation aufwiesen, war das Zentromer I nicht mit der Spindel assoziiert (Abbildung 3.3 B).

Fehlerhafte oder ausbleibende Kinetochor-Mikrotubuli Verknüpfungen führen gewöhnlich zur Aktivierung des Spindelkontrollpunktes (Cleveland et al, 2003; Musacchio & Hardwick, 2002). Die Gene für die Spindelkontrollpunkt Komponenten Mph1 und Mad2 wurden jeweils einzeln im *spc7-23* Stammhintergrund deletiert und das Wachstumsverhalten der Doppelmutanten analysiert. Das Wachstum der *mad2Δ spc7-23* und der *mph1Δ spc7-23* Doppelmutanten, die für die Bindung (Mad2) bzw. für die Korrektheit der Bindung (Mph1) zwischen Mikrotubuli und Kinetochor benötigt werden, verschlechterte sich (Abbildung 3.3 C). Der Verlust von funktionellem Spc7 führt somit zum Ausbleiben oder zu Fehlern bei der bipolaren Verknüpfung der Kinetochore mit der mitotischen Spindel.

3.1.4 Der NMS-Komplex wird nicht für die transkriptionelle Stilllegung des Zentromers benötigt

Durch Chromatin-Immunpräzipitations-Experimente konnte gezeigt werden, dass Spc7 an der zentralen Zentromerregion assoziiert (Kerres et al, 2004). Das Zentromer ist transkriptionell stillgelegt (siehe Kapitel 1.6.1). Der Einbau spezifischer Marker in dieser Region lässt die Wildtypzellen aufgrund der transkriptionellen Stilllegung auxotroph für diesen Marker erscheinen (Abbildung 3.4 A und B) (Pidoux & Allshire, 2000). In Kinetochormutanten kann es zur Aufhebung dieser transkriptionellen Stilllegung kommen, so dass die Stämme somit prototroph für den jeweiligen Marker werden (Allshire et al, 1995; Jin et al, 2002; Pidoux et al, 2003). Der *arg3⁺* Marker in der zentralen Zentromerregion führt im Wildtypstamm zu Argininauxotrophie, Kinetochormutanten wie die *sim4-193* Mutante jedoch können ohne Arginin im Medium wachsen (Pidoux et al, 2003). Obwohl das wildtypische Spc7 in der zentralen Zentromerregion bindet, ist der *spc7-23* Mutantenstamm nicht an der transkriptionellen Stilllegung dieser Region beteiligt (Abbildung 3.4 B).

Weitere Proteine, die an der äußeren Region des Zentromers (*otr*) assoziieren können, sind für die transkriptionelle Stilllegung dort zuständig (Bjerling & Ekwall, 2002; Fishel et al, 1988; Gartenberg, 2009). Eines davon ist das Chromatin-assoziierte Swi6 Protein. Die Abwesenheit von *swi6⁺* führt zur Aufhebung der transkriptionellen Stilllegung der äußeren, nicht aber der zentralen Zentromerregion (Abbildung 3.4 B). Die transkriptionelle Stilllegung der äußeren Zentromerregion wird nicht durch Spc7 verändert (Abbildung 3.4 B).

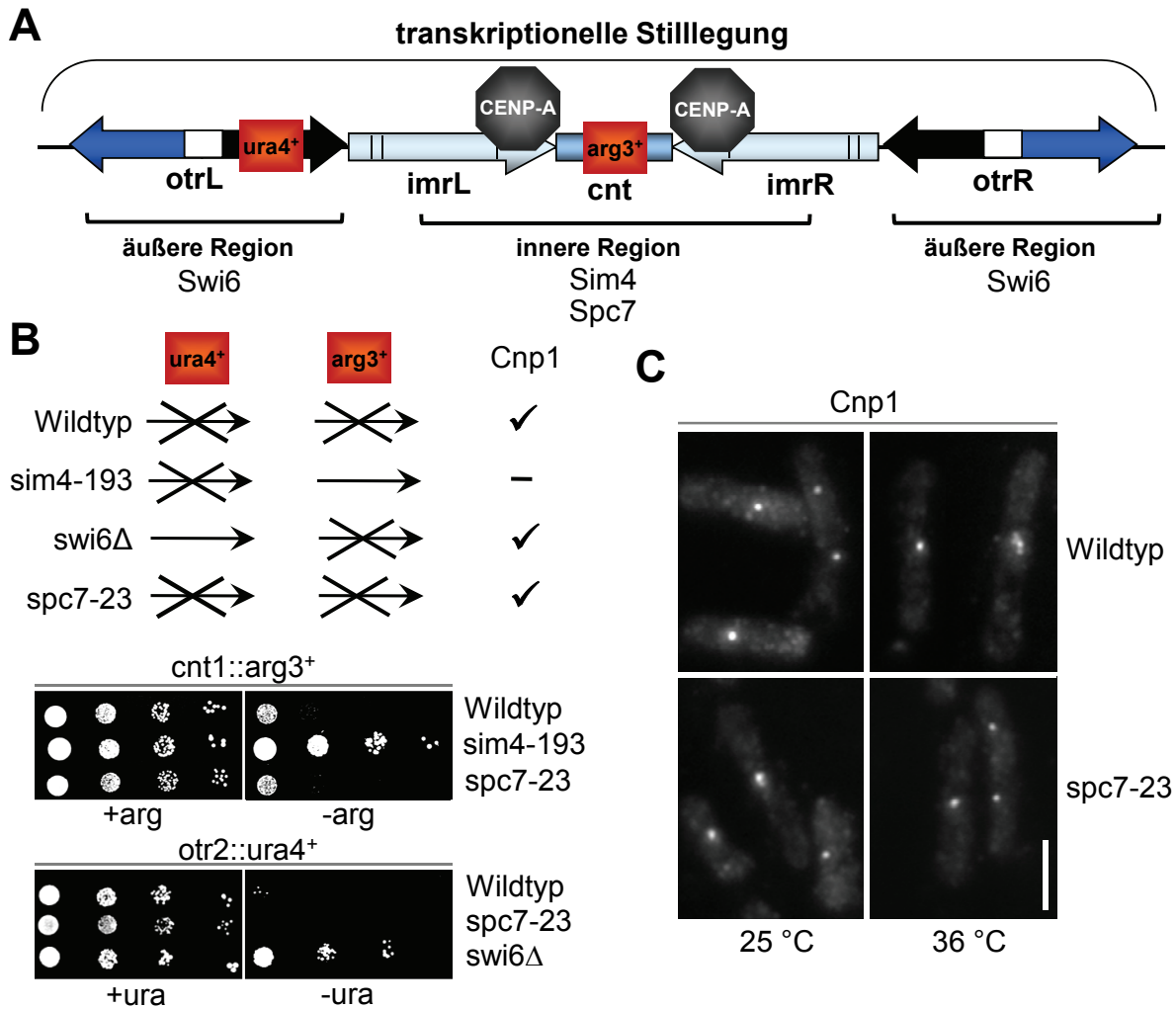


Abbildung 3.4: Spc7 ist nicht an der transkriptionellen Stilllegung des Zentromers beteiligt.

(A) Schematische Darstellung des *S. pombe* Zentromers. Die innere Region ist aus den *cnt* und *imr* (L = links; R = rechts) Elementen aufgebaut, deren Nukleosomen die Histon H3 Variante Cnp1 beinhalten, an denen das Kinetochor assembliert. Die äußere Region ist aus *otr*-Elementen aufgebaut. Die äußere Region ist wie die innere transkriptionell stillgelegt (siehe Kapitel 1.6.1). Der Auxotrophiemarker *arg3⁺* in der zentralen Zentromerregion *cnt* von Chromosom I oder *ura4⁺* in der *otrL*-Region von Chromosom II (hier vereinfacht in einem Zentromer dargestellt) können zur Überprüfung der transkriptionellen Stilllegung der jeweiligen Region genutzt werden. **(B)** Bildliche Darstellung der Transkription (dargestellt durch einen Pfeil) oder transkriptionellen Stilllegung (durchgestrichener Pfeil) des *ura4⁺* oder *arg3⁺* Gens in der *otr2L*- oder *cnt1*-Region im Wildtyp und den *sim4-193*, *swi6Δ* und *spc7-23* Mutantenstämmen. Zusätzlich ist gezeigt, ob die Histon H3 Variante Cnp1 in den Mutantenstämmen unter restriktiven Bedingungen wie im Wildtypstamm lokalisiert. ✓ = wildtypisches Cnp1-GFP-Signal; - = kein Cnp1-GFP-Signal. Exemplarisch ist der Tropftest von Wildtyp, *spc7-23* und *sim4-193* Zellen die das *arg3⁺* Gen in der *cnt1*-Region bzw. das *ura4⁺* Gen in der *otr2L*-Region tragen, gezeigt. Die Zellen wurden auf selektivem Medium mit und ohne Arginin bzw. Uracil für 6 Tage bei 25 °C inkubiert. **(C)** Cnp1-Lokalisierung im Wildtyp oder *spc7-23* Stamm, der bei 25 °C oder 6h bei 36 °C inkubiert wurde. Die Zellen wurden fixiert und mit dem anti-Cnp1-Antikörper behandelt. Balken, 5 µm.

Da Spc7 das erste Kinetochorprotein war, das keinen Einfluss auf die transkriptionelle Stilllegung der Zentromerregionen hatte, wurde bei weiteren mutanten Komponenten des NMS-Superkomplexes die transkriptionelle Stilllegung der inneren und äußeren Region analysiert. Auch Nuf2, eine Komponente des Ndc80-Komplexes und Mis12, eine Komponente des MIND-Komplexes hatten keinen Einfluss auf die transkriptionelle Stilllegung des Zentromers (Daten nicht gezeigt).

Die Lokalisierung der Histon H3 Variante Cnp1 in der zentralen Zentromerregion steht im Zusammenhang mit ihrer transkriptionellen Stilllegung (Abbildung 3.4 A). Cnp1-Nukleosomen lokalisieren in Abhängigkeit von funktionellen Kinetochorproteinen wie Sim4, die für die transkriptionelle Stilllegung der zentralen Zentromerregion essentiell sind (Abbildung 3.4 A). Da Spc7 keinen Einfluss auf die transkriptionelle Stilllegung des Zentromers hat, sollte überprüft werden, ob funktionelles Spc7 für die Lokalisierung von Cnp1 notwendig ist. Wie man in Abbildung 3.4 C erkennt, konnte Cnp1 unabhängig von Spc7 am Kinetochor lokalisieren. Sowohl unter permissiven als auch restriktiven Bedingungen war das Cnp1-Signal am Zentromer in den *spc7-23* Zellen vorzufinden. Der Sim4-Komplex, der die inneren Kinetochorproteine enthält, wird für den Aufbau des Kinetochors und die Aufrechterhaltung eines funktionellen Zentromers benötigt. Er ist für die Cnp1-Nukleosomen Lokalisierung und die transkriptionelle Stilllegung des zentralen Zentromers verantwortlich, während der NMS-Komplex die äußeren Kinetochorproteine beherbergt, die für die Assoziation mit der mitotischen Spindel essentiell sind. Dieser wird nicht für die Lokalisierung von Cnp1-Nukleosomen und die transkriptionelle Stilllegung der zentralen Zentromerregion benötigt. Kommt es zu Defekten in den Komponenten des NMS-Komplexes kann die Funktion des Sim4-Komplexes weiterhin aufrechterhalten werden.

3.1.5 Spc7 stellt eine Komponente des NMS-Komplexes dar, die eng mit dem MIND-Komplex interagiert

Da Spc7 als Komponente des NMS-Komplexes isoliert wurde, sollte der Aufbau dessen im Detail analysiert werden (Liu et al, 2005; Obuse et al, 2004). Um die Frage zu klären, ob Komponenten des NMS-Komplexes in der Abwesenheit von Spc7 am Kinetochor assoziieren können, wurde die Abhängigkeit der mit GFP fusionierten Mitglieder des Komplexes von funktionellem Spc7 untersucht. Während sowohl Nuf2-GFP als auch Spc24-GFP, beides Komponenten des Ndc80-Subkomplexes, sowohl bei der permissiven als auch bei der restriktiven Temperatur eine Kinetochorbindung in der *spc7-23* Mutante aufwiesen (Abbildung 3.5 A und B), fand sich das Mis12-GFP und Mis14-GFP (Komponenten des MIND-Komplexes) Signal nur bei der permissiven Temperatur am Kinetochor wieder (Abbildung 3.5 A und C). Da mit Hilfe einer Westernblot Analyse das Mis12-GFP Protein

unter allen Bedingungen im *spc7-23* Mutantenstamm nachgewiesen werden konnte, wird Spc7 für die Mis12-GFP Kinetochorlokalisierung benötigt (Abbildung 3.5 D). Sowohl das Spc24-GFP als auch das Nuf2-GFP Protein lokalisierten bei der restriktiven Temperatur in der *spc7-23* Mutante am Kinetochor. Somit scheint der Ndc80-Komplex unabhängig von funktionellem Spc7, der MIND-Komplex aber nur in Abhängigkeit von Spc7 am Kinetochor zu binden.

Um zu untersuchen, ob die Mitglieder des NMS-Komplexes für die Bindung von Spc7 am Kinetochor benötigt werden, wurde die Lokalisierung von Spc7-GFP in einem mutanten Stamm des MIND- (*mis12-537*) und des Ndc80-Komplexes (*nuf2-1*) analysiert. Spc7 benötigte funktionelles Mis12 um am Kinetochor zu binden. So konnte ein wildtypisches Spc7-GFP-Signal am Kinetochor nur bei der permissiven Temperatur im *mis12-537* Mutantenstamm vorgefunden werden, unter restriktiven Bedingungen war das Spc7-GFP-Signal massiv reduziert oder nicht mehr detektierbar (Abbildung 3.5 E). Währenddessen war der Ndc80 Komplex nicht für die Kinetochorassoziation von Spc7 erforderlich: unter restriktiven und permissiven Bedingungen fand sich Spc7-GFP korrekt in der *nuf2-1* Mutante am Kinetochor lokalisiert (Abbildung 3.5 A).

Abbildung 3.5: Interaktion von Spc7 mit Komponenten des NMS-Superkomplexes.

(A) Schematische Darstellung der Lokalisierungsabhängigkeit des Spc7 Proteins von Komponenten des NMS-Komplexes. Aufgrund der Tatsache, dass nicht jedes Kinetochorprotein auch in mutanter Form vorliegt, konnte in einigen Fällen die Studie zur Lokalisierungsabhängigkeit nur unidirektional erfolgen (ein Pfeil). Konnten die Abhängigkeitsverhältnisse bidirektional analysiert werden, ist dies in Form eines Doppelpfeils erkennbar. **(B)** und **(C)** Mikroskopische Aufnahmen von *spc7-23* Zellen, die endogenen Spc24-GFP oder Mis12-GFP exprimieren. Die Stämme wurden bei 25 °C oder 6 h bei 36 °C inkubiert und mit DAPI, anti-Tubulin und anti-GFP Antikörper behandelt. Balken, 5 µm. **(D)** Westernblot zur Bestimmung der Mis12-GFP Proteinmenge nach 6 h bei 36 °C in *spc7-23* oder Wildtypzellen. Nach der Isolierung der Proteinextrakte wurde eine Immunpräzipitation mit dem anti-GFP-Antikörper durchgeführt. Aktin diente als Ladekontrolle. **(E)** Aufnahmen des *mis12-537 spc7-gfp* Stammes, der bei 25 °C bzw. 6 h bei 36 °C inkubiert wurde. Nach der Fixierung wurden die Zellen mit DAPI, anti-Tubulin und anti-GFP Antikörpern behandelt. Die Spc7-GFP-Signale sind bei der restriktiven Temperatur durch einen Pfeil gekennzeichnet. Balken, 5 µm. **(F)** Die Lokalisierung von Mis12-GFP wurde unter permissiven (25 °C) und restriktiven Bedingungen (6h 36 °C) im *nuf2-1* Mutantenstamm untersucht. Dafür wurden die Zellen fixiert und mit anti-GFP und anti-Tubulin Antikörpern behandelt. Balken, 5 µm. Das Vorhandensein des endogenen Mis12-GFP-Signals während der Interphase oder Mitose wurde bei der restriktiven Temperatur quantifiziert (n = 100). **(G)** Dieselbe Analyse wie in (F) erfolgte mit dem *nuf2-gfp mis12-537* Stamm. Die Nuf2-GFP-Signale sind bei der restriktiven Temperatur durch Pfeile gekennzeichnet. Balken, 5 µm. **(H)** Schematische Darstellung der Lokalisierungsabhängigkeiten innerhalb des NMS-Komplexes. Bedeutung der Pfeile: siehe (A). Abbildung (A)-(E) modifiziert aus Kerres et al, 2007.

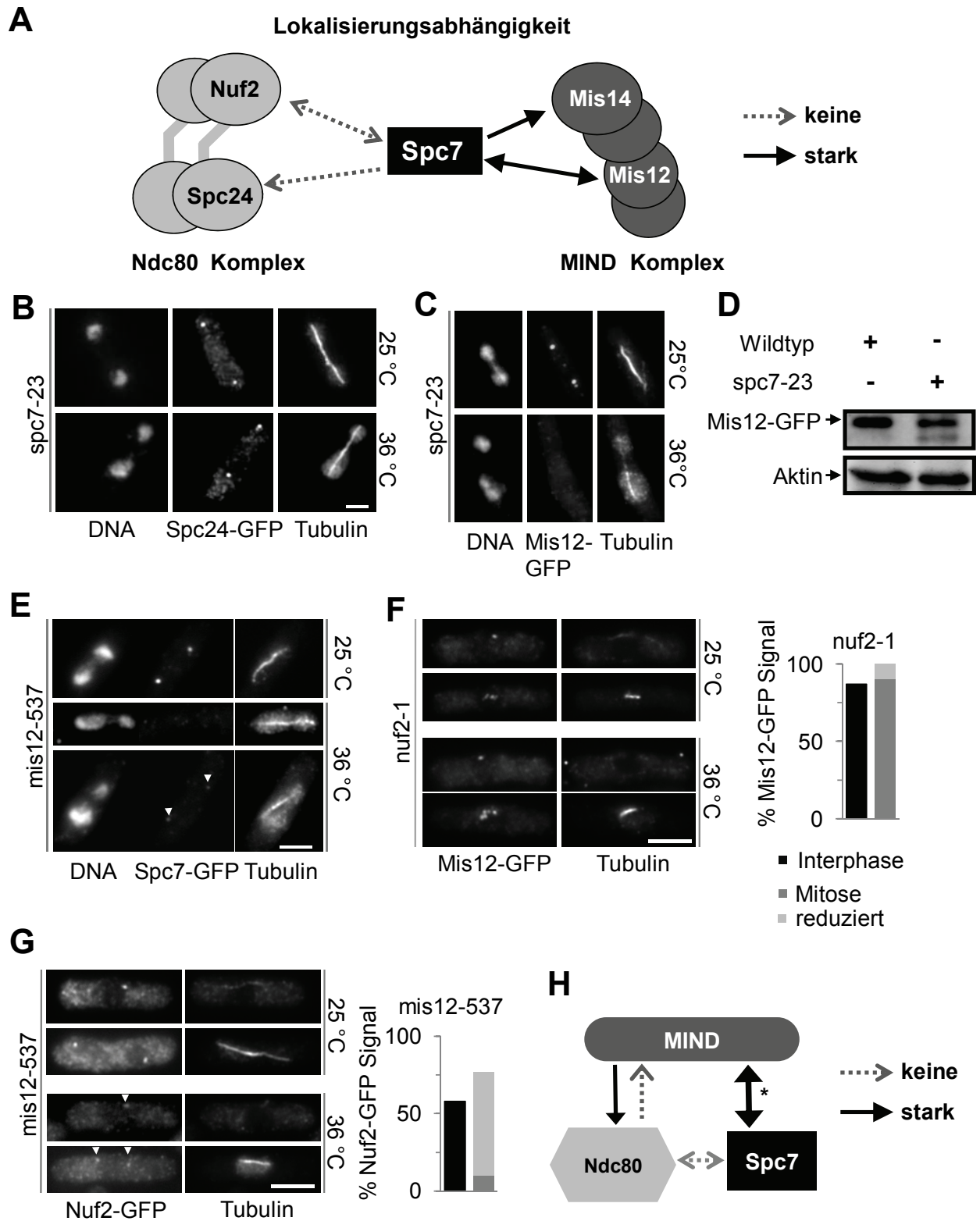


Abbildung 3.5: Interaktion von Spc7 mit Komponenten des NMS-Superkomplexes.

(Die Legende findet sich auf der vorherigen Seite)

Die Abhängigkeit zwischen den Komponenten des MIND-Komplexes und Spc7 wurde auch dadurch dokumentiert, dass die Überexpression von plasmidkodiertem *spc7⁺* den ts Phänotyp der *mis12-537* (Obuse et al, 2004), nicht aber der *nuf2-1* Mutante supprimieren konnte. Auch konnte extra *mis12⁺* den Wachstumsdefekt des *spc7-23*, nicht aber des *nuf2-1* Mutantenstammes supprimieren (Daten nicht gezeigt). Die Subkomplexe MIND und Spc7 weisen somit ein enges Abhängigkeitsverhältnis innerhalb des NMS-Komplexes auf.

Um die Abhängigkeitsverhältnisse innerhalb des NMS-Komplexes vollständig aufzuklären, wurde die Lokalisierung von Mis12-GFP im *nuf2-1* Mutantenstamm und von Nuf2-GFP im *mis12-537* Stamm analysiert. Während die MIND-Komponente Mis12 unter permissiven Bedingungen wildtypisch in der *nuf2-1* Mutante lokalisieren konnte und deren Lokalisierung nur geringfügig unter restriktiven Bedingungen herabgesetzt war, war die Kinetochorlokalisierung der Ndc80 Komponente Nuf2 von funktionellem Mis12 abhängig: bei der nicht permissiven Temperatur zeigten nur 10 % der mitotischen *mis12-357* Zellen ein wildtypisches Nuf2-GFP-Signal, weitere 67 % ein reduziertes und die übrigen *mis12-537* Zellen kein Nuf2-GFP-Signal (Abbildung 3.5 F und G). Aus den Lokalisierungsabhängigkeiten innerhalb des NMS-Komplexes kann gefolgert werden, dass dieser hierarchisch aufgebaut ist. Der MIND-Komplex bildet die Basis, von der aus der Ndc80-Komplex am Kinetochor binden kann (Abbildung 3.5 H). Das Spc7 Protein lokalisiert ebenfalls in Abhängigkeit vom MIND-Komplex am Kinetochor, wird jedoch zeitgleich für die Bindung des MIND-Komplexes an das Kinetochor benötigt, so dass Spc7 und der MIND-Komplex ein engeres Abhängigkeitsverhältnis innerhalb des NMS-Komplexes aufweisen (Abbildung 3.5 H).

3.1.6 Spc7 und der Mal2-Fta2-Subkomplex des Sim4-Superkomplexes interagieren miteinander

Die NMS- und Sim4-Kinetochorkomplexe wurden unabhängig voneinander isoliert (Liu et al, 2005). Um mögliche Interaktionen zwischen den Komponenten des Sim4- und NMS-Komplexes aufzudecken wurde untersucht, ob Mitglieder des Sim4-Komplexes funktionelles Spc7 für die Kinetochorassoziation benötigen oder ob Spc7-GFP in Sim4-Mutantenstämmen eine wildtypische Lokalisierung aufweist. Die Lokalisierung der Sim4-Komponente Fta2 hängt von funktionellem Spc7 ab. Nur unter permissiven Bedingungen konnte Fta2-GFP im *spc7-23* Mutantenstamm am Kinetochor assoziiert vorgefunden werden. Unter restriktiven Bedingungen war das Fta2-GFP-Signal in über 60 % der *spc7-23* Zellen nicht am Kinetochor detektierbar und in fast 30 % nur reduziert vorhanden (Abbildung 3.6 A und B) (Kerres et al, 2006). Die Abhängigkeit des Fta2 Proteins von funktionellem Spc7 zur Kinetochorlokalisierung ist unidirektional.

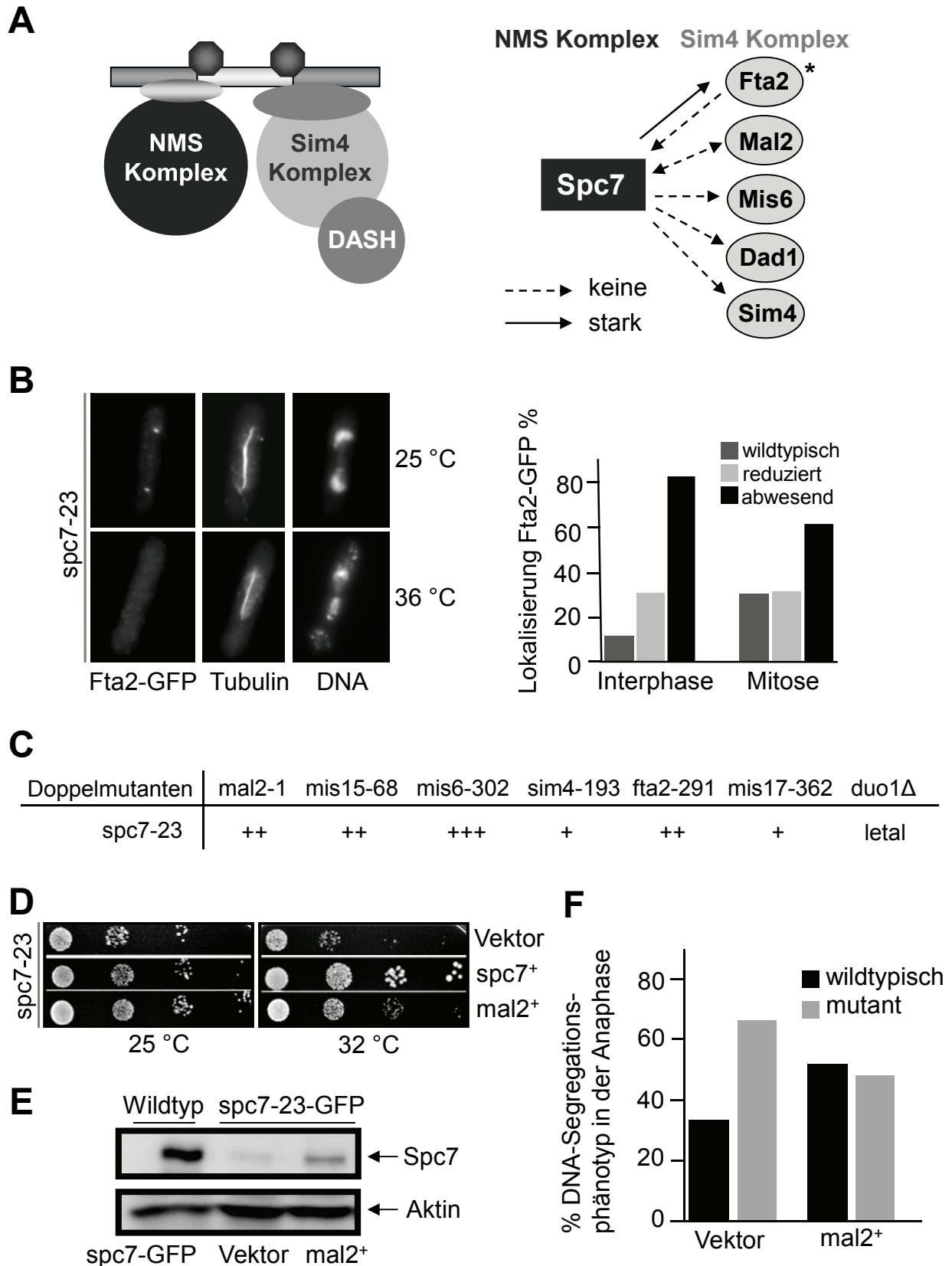


Abbildung 3.6: Spc7 interagiert mit Komponenten des Sim4-Komplexes.

(Die Legende findet sich auf der folgenden Seite)

Abbildung 3.6: Spc7 interagiert mit Komponenten des Sim4-Komplexes.

(A) Schematische Darstellung des *S. pombe* Kinetochors mit dem NMS-, Sim4- und DASH-Komplex (links) (siehe Kapitel 1.7). (Rechts) Abhängigkeit der Kinetochorlokalisierung verschiedener Sim4- und DASH-Komponenten von funktionellem Spc7 und von Spc7-GFP in den *mal2-1* und *fta2-291* Mutantenstämmen bei der restriktiven Temperatur. *Daten wurden aus Kerres et al. 2006 übernommen. **(B)** Mikroskopische Aufnahmen von mitotischen *spc7-23* Zellen, die endogenen Fta2-GFP exprimieren. Der *spc7-23* Stamm wurde bei 25 °C oder für 6 h bei 36 °C inkubiert. Die Zellen wurden fixiert und mit DAPI, anti-Tubulin und anti-GFP Antikörpern behandelt (links). Schematische Darstellung der Fta2-GFP Lokalisierung im *spc7-23* Mutantenstamm, der vor der Analyse 6 h bei 36 °C inkubiert wurde (rechts) (n = 55). **(C)** Genetische Interaktion zwischen *spc7-23* und ts Sim4-Komplexstämmen. + bis +++: schwache bis sehr starke genetische Interaktion. **(D)** Tropftest von *spc7-23* Transformanten, die für 3-4 Tage bei den angegebenen Temperaturen inkubiert wurden. Plasmidkodiertes *mal2⁺* wurde von seinem nativen Promotor und *spc7⁺* vom *nmt41*-Promotor unter de-reprimierenden Bedingungen exprimiert. **(E)** Immunpräzipitationen von GFP fusionierten Spc7 Proteinen. Die Proteinextrakte wurden aus einem Wildtypstamm, der plasmidkodiertes Spc7-GFP enthielt oder aus dem *spc7-23-gfp* Stamm, der den Kontrollvektor oder plasmidkodiertes *mal2⁺* trug, isoliert und mittels Westernblot analysiert. Die Stämme wurden vor der Isolierung der Proteinextrakte für 6 h bei 32 °C inkubiert. Aktin wurde als Ladekontrolle verwendet. **(F)** Chromatinverteilung in Anaphasezellen des *spc7-23* Mutantenstammes, der den Kontrollvektor oder zusätzliches *mal2⁺* trug. Die Zellen wurden 6 h bei 32 °C inkubiert (n = 100). Abbildung (B) modifiziert aus Kerres et al, 2006, übrige Abbildungen aus Kerres et al, 2007.

Während das Fta2 Protein Spc7 für die Kinetochorlokalisierung benötigt, fand sich ein wildtypisches Spc7-GFP-Signal in *fta2-291* Zellen bei der restriktiven Temperatur (Abbildung 3.6 A). Weitere Sim4-Komponenten (Mal2-GFP, Mis6-GFP, Dad1-GFP und Sim4-GFP) benötigten das Spc7 Protein nicht zur Bindung an das Kinetochor (Abbildung 3.6 A).

Mit dem Erzeugen von Doppelmutanten zwischen *spc7-23* und allen bisher bekannten Sim4-Komplex Mutanten sollten mögliche synthetische Effekte untersucht werden. Alle Doppelmutanten wuchsen schlechter als die jeweiligen Einzelmutanten (Abbildung 3.6 C). Des Weiteren war die *spc7-23 duo1Δ* Doppelmutante nicht lebensfähig. Duo1 ist eine nicht essentielle Komponente des Sim4 und des DASH Komplexes, der für die bipolare Bindung der mitotischen Spindel an die Chromosomen benötigt wird (Sanchez-Perez et al, 2005).

Durch die Überexpression von Sim4-Komponenten im *spc7-23* Mutantenstamm wurden weitere Interaktionen zwischen Spc7 und den Mitgliedern des Sim4-Komplexes aufgedeckt. Durch extra *mal2⁺* kam es zu einer partiellen Suppression des *spc7-23* ts Phänotyps (Abbildung 3.6 D), da zusätzliches Mal2 die Spc7-23-GFP Proteinkonzentration erhöhte (Abbildung 3.6 E) und in den *spc7-23* Zellen zu einer Reduzierung der mitotischen Defekte führte (Abbildung 3.6 F). Diese Interaktion zwischen Spc7 und Mal2 ist wahrscheinlich einseitig, denn die Überexpression von *spc7⁺* führte nicht zur Suppression der mutanten

Phänotypen der *mal2-1* Mutante (Daten nicht gezeigt). Die Interaktionen zwischen Spc7 und Fta2 bzw. Mal2 zeigen, dass die biochemisch getrennten NMS- und Sim4-Komplexe genetisch miteinander agieren und dies wichtig für die Funktion des Kinetochors ist.

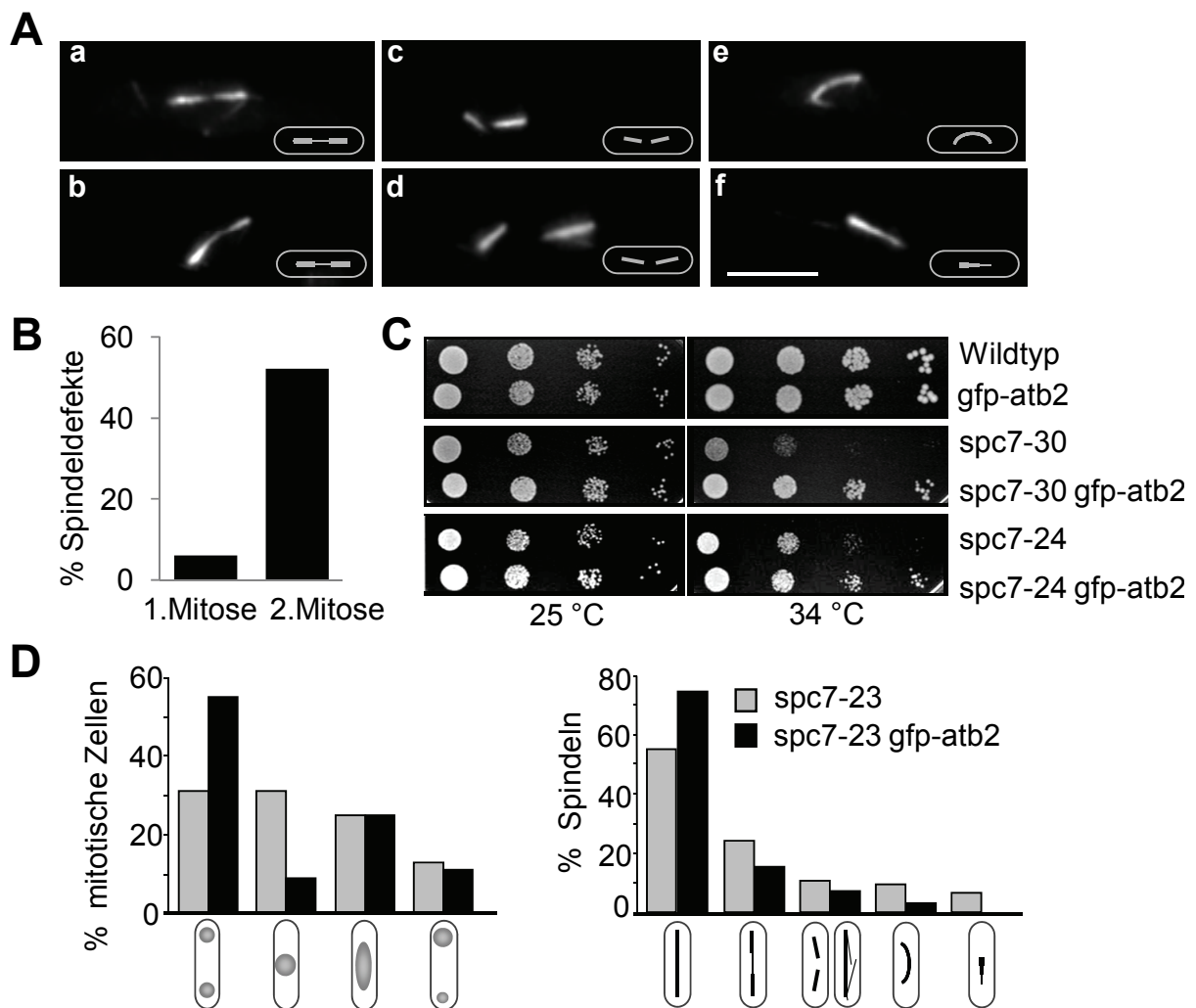


Abbildung 3.7: Spc7 wird für die Integrität der mitotischen Spindel benötigt.

(A) Mikroskopische Aufnahmen von Spindeldefekten die nach 6 h bei 36 °C in der *spc7-23* Mutante beobachtet werden konnten: dünne Spindelmitte (a und b), zwei Spindelhälften in einer Zelle (c und d), gebogene (e), und ungleich angefärbte Spindeln (f). Die Zellen wurden fixiert und mit dem anti-Tubulin-Antikörper behandelt. Balken, 5 µm. (B) Diagramm über die Anzahl der Spindeldefekte in einer synchronen *spc7-23-gfp* Kultur bei der restriktiven Temperatur während der ersten und zweiten Mitose (n = 300). Der Versuchsablauf gleicht dem in Abbildung 3.2 C und D. (C) Tropftest von Wildtyp, *spc7-30* und *spc7-24* Zellen, die endogenen *GFP-atb2* exprimieren. Die Stämme wurden unter de-reprimierenden Bedingungen für 5 Tage bei den angegebenen Temperaturen inkubiert. (D) Chromosomensegregations- und Spindelphänotypen im *spc7-23* und *spc7-23 nmt81-GFP-atb2* (*spc7-23 gfp-atb2*) Stamm nach 6 h bei 34 °C. Das linke Diagramm enthält die Chromosomensegregationsphänotypen. Rechtes Diagramm (von links nach rechts): wildtypische Anaphasen Spindel, Anaphasen Spindel mit einer dünnen Mitte, gebrochene, gebogene oder ungleich angefärbte Anaphasen Spindeln (n = 100). Außer (B) Abbildungen modifiziert aus Kerres et al, 2007.

3.1.7 Spc7 wird für die Integrität der Spindel benötigt

Neben den erwähnten Defekten in der Chromosomensegregation zeigten die *spc7^{ts}* Mutanten anormale mitotische Spindeln (Abbildung 3.7 A). Bei der restriktiven Temperatur wiesen 47 % der *spc7-23* Zellen Defekte im Aufbau der mitotischen Spindel auf. Die fixierten Zellen offenbarten die folgenden aberranten Phänotypen:

- 1) Spindeln mit einer dünnen Mitte (Abbildung 3.7 A, a und b),
- 2) zwei Spindelhälften in einer Zelle, die darauf hindeuten, dass die Spindel gebrochen war (Abbildung 3.7 A, c und d),
- 3) gebogene Spindeln (Abbildung 3.7 A, e) oder
- 4) Spindeln die ungleich gefärbt waren (Abbildung 3.7 A, f).

Der letzte Phänotyp setzte sich jeweils zur Hälfte aus mono- und bipolaren Spindeln zusammen, wie Untersuchungen mit der SPB Komponente Cut12-GFP zeigten (Daten nicht gezeigt). Die Spindelphänotypen korrelierten mit der Menge am Kinetochor detektierbaren Spc7-23-GFP Proteins. So zeigten in einer synchronen Kultur während der ersten Mitose bei der restriktiven Temperatur nur 6 % der *spc7-23* Zellen einen Spindeldefekt, während in der zweiten Mitose, in der kein Spc7-23-GFP-Signal mehr am Kinetochor erkennbar war, stieg die Zahl der Zellen die Defekte aufwiesen auf 52 % an (Abbildung 3.7 B).

Mit Hilfe von GFP-markiertem α -Tubulin (GFP-Atb2) sollte eine Analyse der Spindel- und Interphasen-Mikrotubuli-Dynamik folgen. Das durch Thiamin regulierbare *nmt81-GFP-atb2* wurde in die *spc7^{ts}* Zellen eingebracht (Kapitel 2.9) (Garcia et al, 2001). Durch die Anwesenheit von *nmt81-GFP-atb2* kam es zu einer partiellen Suppression des *ts* Phänotyps der *spc7^{ts}* Mutanten. So konnten die *nmt81-GFP-atb2 spc7^{ts}* Doppelmutanten Wachstum bei Temperaturen zeigen, bei denen die *spc7^{ts}* Einzelmутanten bereits nicht mehr lebensfähig waren (Abbildung 3.7 C). Die Suppression des *ts* Phänotyps der *spc7^{ts}* Mutanten durch die Anwesenheit von *nmt81-GFP-atb2* konnte durch eine Reduktion der Chromatin Fehlsegregation und der Zahl der anormalen Spindeln erzielt werden (Abbildung 3.7 D und Kerres et al, 2007).

Da die Spindeldefekte in den *spc7^{ts}* Mutanten somit nicht durch *nmt81-GFP-atb2* analysiert werden konnten, wurde eine Spc7 Variante verwendet („Spc7-C“), die durch Überexpression zu mitotischen Defekten führt. Die Spindeldefekte und die Chromosomenfehlsegregation die durch die Überexpression von Spc7-C hervorgerufen werden gleichen denen der *spc7^{ts}* Mutanten (Kerres et al, 2007; Kerres et al, 2004). Das Spc7-C Fragment (Aminosäuren 821-1364) bindet konstitutiv am Kinetochor (Kerres et al, 2007). Um zu überprüfen, ob durch die Anwesenheit von Spc7-C der Aufbau des Kinetochors erfolgen kann, wurde *spc7-c* in verschiedenen Stämmen, die GFP fusionierte Kinetochorproteine trugen, überexprimiert.

Das endogen exprimierte Volllängen Spc7-GFP Protein konnte trotz Spc7-C Überexpression am Kinetochor assoziieren. Auch die NMS-Komponenten Spc24-GFP und Mis14-GFP, sowie die Sim4-Komponente Mal2-GFP fanden sich während der Überexpression von *spc7-c* weiterhin am Kinetochor (Abbildung 3.8 A und Kerres et al, 2004). Somit wird durch die *spc7-c* Überexpression der Aufbau des Kinetochors *per se* nicht verhindert.

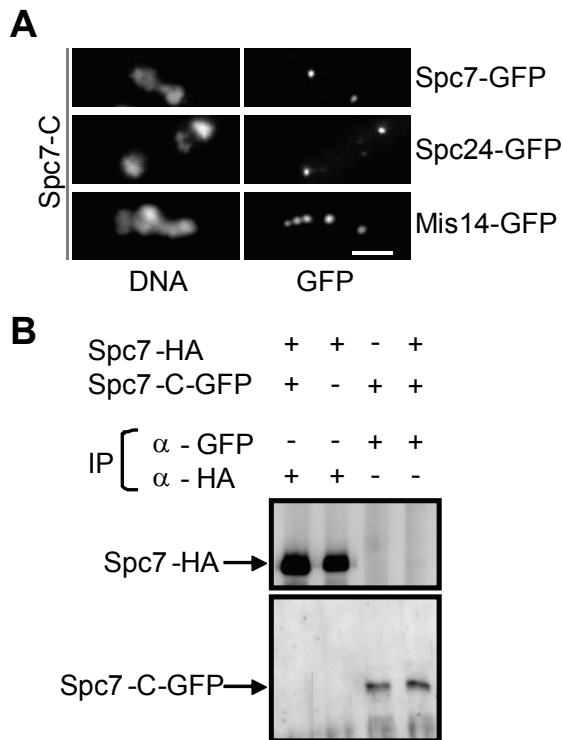


Abbildung 3.8: Komponenten des NMS-Komplexes können trotz extra Spc7-C am Kinetochor lokalisieren.

(A) Mikroskopische Aufnahmen von endogen Spc7-GFP, Spc24-GFP und Mis14-GFP exprimierenden Stämmen, die *spc7-c* vom *nmt1⁺* Promotor für 24 h bei 30 °C überexprimierten. Die Zellen wurden fixiert und mit DAPI und dem anti-GFP Antikörper behandelt. Balken, 5 µm. **(B)** Ko-Immunpräzipitation vom endogen Spc7-HA exprimierenden Stamm mit plasmidkodiertem Spc7-C-GFP. Die Proteinextrakte wurden aus einem logarithmisch wachsenden Wildtyp und dem Spc7-HA Stamm, der entweder den Kontrollvektor trug oder *spc7-c-gfp* überexprimierte, isoliert. Nach der Immunpräzipitation mit dem anti-GFP- oder anti-HA-Antikörper erfolgte eine Analyse der Ko-Immunpräzipitation unter Verwendung von anti-GFP- oder anti-HA-Antikörpern im Westernblot. Abbildung übernommen aus Kerres et al, 2007.

Das Spc7-C Fragment bindet wie auch das volllängen Spc7 Protein am Kinetochor. Mittels Ko-Immunpräzipitation sollte untersucht werden, ob es zu einer direkten Interaktion zwischen dem volllängen Spc7-HA und der C-terminalen mit GFP fusionierten Variante kommt. Die Immunpräzipitation und anschließende Westernblot Analyse zeigte jeweils nur die Spc7 Signale im Westernblot, die mit dem jeweiligen Antikörper isoliert wurden (Abbildung 3.8 B). Eine Ko-Immunpräzipitation zwischen Spc7-HA und Spc7-C-GFP konnte nicht festgestellt werden (Abbildung 3.8 B).

Die Analyse der mitotischen Spindel in Wildtypzellen, die *spc7-c* überexprimieren, offenbarte Defekte in allen Spindelphasen (siehe Kapitel 1.8). Es fanden sich Verzögerungen im Aufbau der Spindel, die Dynamik der mitotischen Spindel war nicht wildtypisch und die Spindelmitte fand sich verändert. Auch der Aufbau der Mikrotubuli organisierenden Zentren (MTOC) im Zytoplasma zu Beginn der Zytokinese blieb häufig in *spc7-c* überexprimierenden Zellen aus.

Die Vielzahl von verschiedenen Phänotypen, die durch die Überexpression von Spc7-C hervorgerufen werden, können durch die Überexpression bedingte unterschiedliche Spc7-C Proteinmenge erklärt werden.

Neben seiner Funktion in der Mitose, beeinflusst Spc7 auch die Interphase Mikrotubuli. Während im Wildtyp die Interphase Mikrotubuli am Kern mit der Polymerisation beginnen und maximal bis zu den Zellenden wachsen und wieder schrumpfen (Drummond & Cross, 2000), zeigten 20 % der *spc7-c* überexprimierenden Zellen Interphasemikrotubuli die wildtypisch zu den Zellenden wuchsen, dann jedoch nicht schrumpften sondern eine Kurve vollzogen um im Zytoplasma in die entgegengesetzte Richtung weiter zu wachsen (Kerres et al, 2007). Spc7 hat somit als bisher einzig bekanntes Kinetochorprotein einen massiven Einfluss auf die Integrität der Interphasemikrotubuli sowie der Mikrotubuli der mitotischen Spindel.

3.1.8 Genetische Interaktionen zwischen Spc7 und Mikrotubuli Plusend assoziierten Proteinen

Der *spc7-23* Mutantenstamm zeigte Defekte in allen Spindelstadien. Unter anderem wies der *spc7-23* Mutantenstamm Zellen auf, deren Spindelmitte zu dünn war (Abbildung 3.7 A, a und b und Kerres et al, 2007). Als Spindelmitte wird der überlappende Bereich der antiparallelen Mikrotubuli der mitotischen Spindel bezeichnet, der in wildtypischen Zellen relativ kurz ist (Abbildung 3.9 A Mitte). Um die Spindelmitte in dem *spc7-23* Mutantenstamm zu analysieren, wurde die Lokalisierung verschiedener Proteine, die während der Anaphase B in der Spindelmitte assoziieren, bei der restriktiven Temperatur untersucht. Dam1-GFP, eine nicht essentielle Komponente des DASH-Komplexes, war wildtypisch lokalisiert, ebenso das *S. pombe* CDC14 Ortholog Clp1/Flp1 und INCENP (SpPic1), eine für die Lokalisierung benötigte Untereinheit des Aurora B Komplexes (Abbildung 3.9 A) (Franco et al, 2007; Huang et al, 2005; Kobayashi et al, 2007; Leverson et al, 2002; Oliferenko & Balasubramanian, 2001; Sanchez-Perez et al, 2005; Trautmann et al, 2001). Ase1 bündelt antiparallele Mikrotubuli (Loiodice et al, 2005; Yamashita et al, 2005). Das Ase1-GFP-Signal befand sich im *spc7-23* Mutantenstamm in einem viel größeren Bereich der mitotischen Spindel (Abbildung 3.9 A). Dies deutet an, dass der Überlappungsbereich der mitotischen Spindel in der *spc7-23* Mutante deutlich erweitert war. Auch die Aurora B Kinase (Ark1) in *S. pombe*, war nicht wildtypisch sondern vergleichbar mit Ase1-GFP in der *spc7-23* Mutante lokalisiert (Abbildung 3.9 A) (Leverson et al, 2002; Loiodice et al, 2005; Petersen et al, 2001; Yamashita et al, 2005). Spc7 spielt also neben seinen verschiedenen Funktionen am Kinetochor auch eine gravierende Rolle beim Aufbau der mitotischen Spindel.

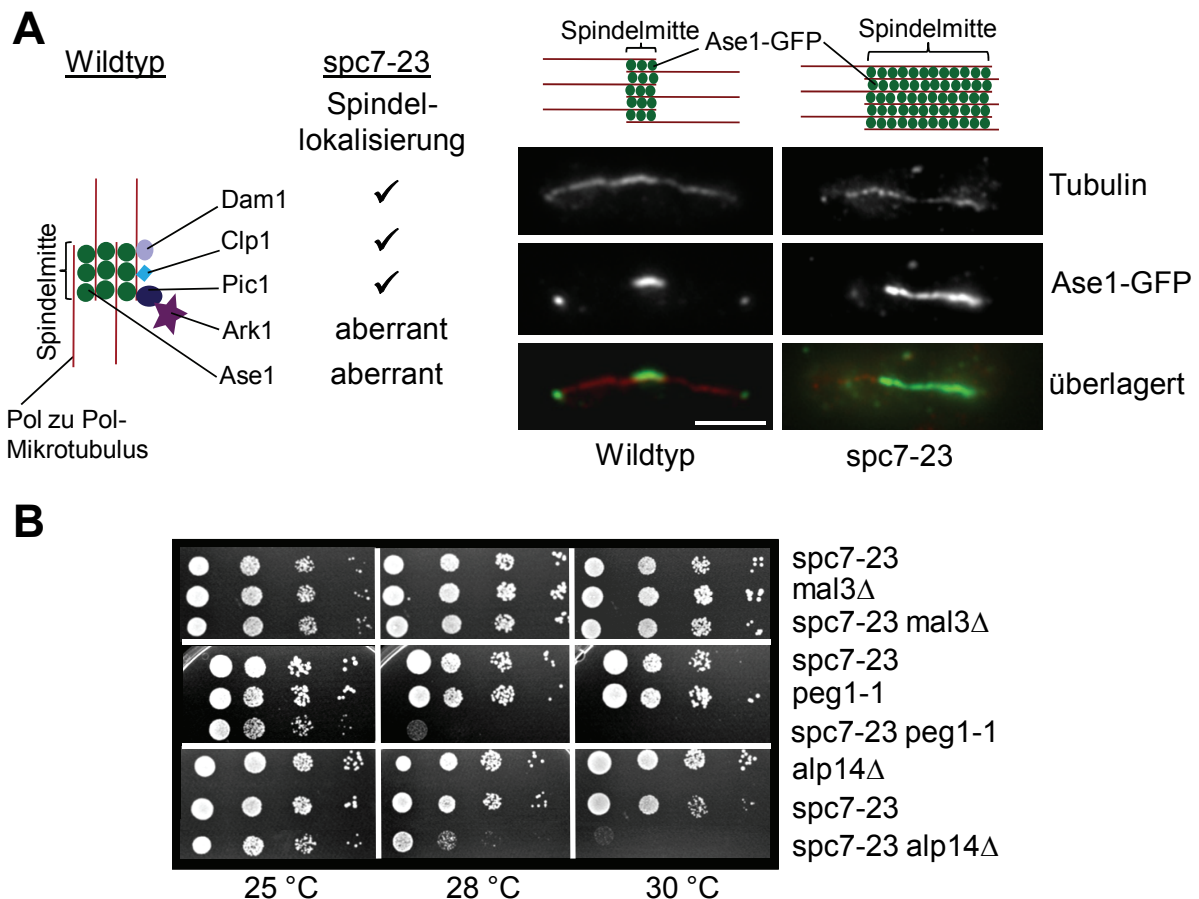


Abbildung 3.9: Interaktion von Spc7 mit Komponenten der mitotischen Spindel.

(A) Komponenten, die während der Anaphase B in der Mitte der mitotischen Spindel lokalisieren (Dam1-GFP, Clp1-GFP, Pic1-GFP, Ark1-GFP und Ase1-GFP), wurden in der *spc7-23* Mutante und im Wildtypstamm nach 6 h bei der restriktiven Temperatur untersucht. Links findet sich schematisch die Lokalisierung der GFP fusionierten Proteine im Wildtyp und die Analyse der Lokalisierung im *spc7-23* Mutantenstamm bei der restriktiven Temperatur. Rechts ist beispielhaft die Ase1-GFP Lokalisierung im Wildtyp und der *spc7-23* Mutante nach 6 h bei 36 °C gezeigt. Die Zellen wurden fixiert und mit anti-GFP und anti-Tubulin Antikörpern behandelt. Balken, 5 µm. (B) Tropftest der *spc7-23*, *mal3Δ*, *peg1-1* und *alp14Δ* Mutantenstämme und den entsprechenden Doppelmutanten bei den angegebenen Temperaturen. Die Platten wurden 3-6 Tage inkubiert. Abbildung (B) aus Kerres et al, 2007 übernommen.

Da Spc7 den Aufbau und die Integrität der mitotischen Spindel massiv beeinflusst, sollte die genetische Interaktion zwischen Spc7 und verschiedenen Komponenten untersucht werden, die an den Plusenden der Mikrotubuli lokalisieren. Die Überexpression von *spc7⁺* führte zur Suppression des Wachstumsdefektes der *mal3-1* Mutante (Kerres et al, 2004). Mal3 ist ein Mikrotubuli-Plusend-assoziiertes Protein, das physikalisch an Spc7 bindet (Beinhauer et al, 1997; Kerres et al, 2004). Es wurde überprüft, ob der Phänotyp, der durch die Abwesenheit anderer Mikrotubuli-Plusend-assoziiierter Proteine in den Mutanten *dis1-288*, *dis1Δ*, *alp14Δ* oder *peg1-1* ausgelöst wurden, durch die Überexpression von *spc7⁺* supprimiert werden

konnte. Alp14 und Dis1 sind Mitglieder der TOG/XMAP215 Familie und Peg1 stellt das *S. pombe* CLASP Ortholog dar (Garcia et al, 2001; Grallert et al, 2006; Nabeshima et al, 1995; Nakaseko et al, 2001; Ohkura et al, 1988). Weder konnten die mutanten Phänotypen der *dis1-288* und *peg1-1* Mutantenstämme noch der Deletionsstämme *dis1Δ* und *alp14Δ* durch extra *spc7⁺* supprimiert werden (Kerres et al, 2004 und Daten nicht gezeigt).

Die Analyse von Doppelmutanten zwischen *spc7-23* und den eben aufgeführten Stämmen sollte Aufschluss darüber geben, ob diese Mikrotubuli-assoziierten Komponenten im selben Pfad wie Spc7 agieren. Die *mal3Δ spc7-23* Mutante zeigte keinen synergetischen Effekt, beide Proteine agieren im selben Pfad und führen nicht zu einer Verschlechterung des Wachstums der Doppelmutante verglichen mit den Einzelmутanten (Abbildung 3.9 B). Die *alp14Δ spc7-23* und *peg1-1 spc7-23* Doppelmutanten zeigten schlechteres Wachstum im Vergleich zu den Einzelmутanten (Abbildung 3.9 B). Sie agieren wahrscheinlich unabhängig von Spc7 und Defekte bzw. die Deletion dieser Proteine führen zu einer weiteren Verschlechterung des Wachstums. Dies gilt auch für Dis1, denn die *dis1Δ spc7-23* bzw. *dis1-288 spc7-23* Doppelmutanten waren bei allen getesteten Temperaturen nicht lebensfähig (Daten nicht gezeigt). Also scheint vermutlich nur Mal3 von den hier untersuchten Proteinen im selben Pfad wie Spc7 zu agieren. Peg1, Alp14 und Dis1 agieren möglicherweise mit anderen Kinetochorproteinen, um die Chromosomen an die mitotische Spindel zu binden.

3.2 Identifizierung der Spc7 Kinetochor- und Spindel-Bindedomänen

Zu Beginn meiner Arbeit war nicht geklärt, welche Region im Spc7 Protein für die Kinetochor-Assoziation benötigt wird. Außerdem sollten weitere funktionelle Domänen dieses 153,5 kDa großen Proteins mit Hilfe von GFP fusionierten Teilfragmenten des *spc7*⁺-ORFs kartiert werden. Dafür wurden insgesamt 36 unterschiedliche Spc7 Varianten generiert und als GFP-Fusionsproteine exprimiert.

3.2.1 Spc7-N-GFP ko-lokalisiert mit der mitotischen Spindel während Spc7-C-GFP am Kinetochor assoziiert

Das als Suppressor der *mal3-1* Mutante isolierte Spc7-C (AS 821-1364) wurde mit dem GFP-Protein fusioniert und seine subzelluläre Lokalisierung bestimmt. Spc7-C-GFP assoziiert wie das volllängen Spc7-GFP am Kinetochor (Abbildung 3.10) (Kerres et al, 2007; Kerres et al, 2004). Die ersten 820 AS des Spc7 Proteins („Spc7-N“) wurden ebenfalls als GFP-Fusionsprotein generiert und die subzelluläre Lokalisierung untersucht. Überraschenderweise war Spc7-N-GFP Kern-, jedoch nicht Kinetochor-assoziiert. Außerdem zeigten mitotische Zellen teilweise punktförmige Spc7-N-GFP-Signale, die mit der mitotischen Spindel ko-lokalisierten (Abbildung 3.10 Mitte).

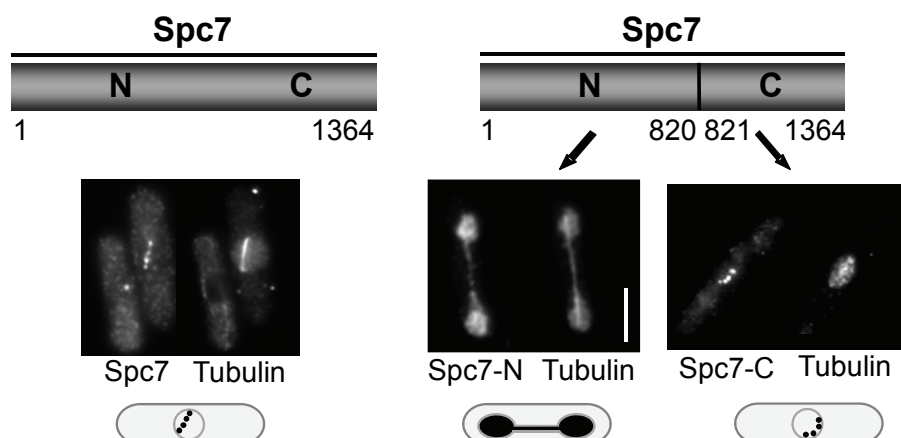


Abbildung 3.10: Der N-Terminus von Spc7 ko-lokalisiert mit der mitotischen Spindel.

Lokalisierung des volllängen Spc7 (links) bzw. N- und C-terminaler Spc7 Varianten (rechts), die mit GFP fusioniert wurden. Die jeweiligen Fragmente wurden vom *nmt1*⁺-Promotor unter de-reprimierten Bedingungen exprimiert. Nach 20 h bei 30 °C wurden die Zellen fixiert und mit anti-Tubulin und anti-GFP Antikörpern behandelt. Balken; 5 µm. Die Lokalisierung des Spc7-GFP, Spc7-C-GFP und Spc7-N-GFP sind schematisch unterhalb der Mikroskopieaufnahmen dargestellt (hellgrau: *S. pombe* Zelle; graue Linie: Kernmembran; schwarz: Spc7-GFP-Signal). Abbildung modifiziert aus Kerres et al. 2007.

3.2.2 Zwei Domänen des N-Terminus von Spc7 interagieren mit der mitotischen Spindel

Um die Mikrotubuli-assoziiierende Domäne zu identifizieren, wurden verschiedene N-terminale Spc7 Fragmente generiert. Der hierfür verwendete Expressionsvektor (pREP) zeigt eine höhere Expression als derjenige, der für die ersten Lokalisierungsstudien der Spc7 Fragmente (pJR2) verwendet wurde (Moreno et al, 2000). Um auszuschließen, dass es durch die erhöhte Expression zu einer veränderten Lokalisierung kommt, wurde zuerst das Original Spc7-N-GFP im pREP-Vektor überexprimiert. Spc7-N-GFP („N“) zeigte auch bei starker Überexpression keine veränderte Lokalisierung in Wildtypzellen (Daten nicht gezeigt). 14 der erzeugten N-terminalen Spc7 Varianten sind in Abbildung 3.11 aufgeführt.

3.2.2.1 Spc7 besitzt zwei NLS-Sequenzen im N-Terminus

Das 117,9 kDa große Spc7-N-GFP muss wahrscheinlich mittels aktiven Transports in den Zellkern gelangen, denn nur Proteine mit einer Größe unter ca. 50 kDa können sich durch Diffusion frei zwischen Zytoplasma und Zellkern bewegen (Macara, 2001). Größere Proteine werden durch Transportproteine wie das evolutionär konservierte Importin, das über eine Erkennungssequenz (NLS („Nukleare Lokalisierungs-Sequenz“)) an die Proteine bindet, aktiv in den Zellkern importiert. Um zu überprüfen ob Spc7-N ein oder mehrere NLS-Sequenzen trägt, wurden die von mir generierten verkürzten N-terminalen Spc7 Varianten im Wildtyp überexprimiert und die Lokalisierung der Fusionsproteine überprüft.

Neun der N-terminalen Fragmente wiesen eine Kernlokalisierung auf, während die übrigen vier Fragmente gleichverteilt in der Zelle zwischen Zellkern und Zytoplasma vorlagen (Abbildung 3.11). Diese vier Fragmente (F10, F14, F15 und F17) mit jeweils einer Größe unter 50 kDa konnten vermutlich über Diffusion in den Zellkern gelangen. Die neun Kern-lokalisieren Fragmente enthielten entweder die AS Region 581-690 (F16) oder F20 (AS 1-540), so dass der N-Terminus von Spc7 mindestens zwei NLS-Sequenzen besitzt (Abbildung 3.11). Die im F2 Fragment enthaltende F16 Region ist um 18 AS verkürzt. Die NLS-Sequenz im Spc7 F20 Fragment kann auf den Bereich zwischen 1-319 AS eingegrenzt werden, da das den AS Bereich von 320-540 umfassende F17 Fragment in der gesamten Zelle vorzufinden ist (Abbildung 3.11). Eine auf dem NucPred-Programm beruhende bioinformatische Suche nach NLS-Sequenzen im Spc7 Protein bestätigte diese Funde und grenzte die zwei möglichen NLS-Signale auf die AS Bereiche 23-25 und 628-637 ein (Abbildung 3.11, unten) (Brameier et al, 2007). Eine weitere Analyse der NLS-Sequenzen erfolgt zusammen mit den putativen NLS-Sequenzen des C-Terminus von Spc7 in Kapitel 3.2.4.

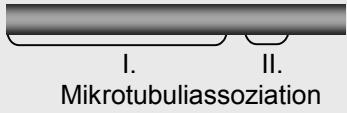
Name	schematische Darstellung	AS	kDa	Lokalisierung
N		1-820	90,9	<u>Spindel/Kern*</u>
F1		1-598	66,2	<i>Spindel/Kern</i>
F2		599-820	24,8	<i>Spindel/Kern</i>
F3		1-690	76,8	<u>Spindel/Kern*</u>
F4		320-820	56,0	<u>Spindel/Kern</u>
F6		320-740	47,2	<u>Spindel/Kern</u>
F8		320-690	41,8	<u>Spindel/Kern</u>
F10		320-418	11,2	<i>Gesamte Zelle</i>
F9		419-690	30,7	<u>Spindel/Kern</u>
F14		419-580	18,1	<i>Gesamte Zelle</i>
F15		419-540	13,5	<i>Gesamte Zelle</i>
F16		581-690	12,6	<u>Spindel/Kern</u>
F17		320-540	24,7	<i>Gesamte Zelle</i>
F20		1-540	59,6	<i>Spindel/Kern</i>
NLS-1 NLS-2				
experimentell festgelegte NLS-Sequenz		bioinformatisch vorhergesagte NLS-Sequenz		
NLS-1 (AS 1-319)		AS 23-25		
NLS-2 (AS 581-690)		AS 628-637		

Abbildung 3.11: Analyse der N-terminalen Spc7 Fusionsdomänen.

Schematische Darstellung der N-terminalen Spc7-Fragmente, deren Proteingröße und Lokalisierung. Die Fragmente wurden in einen durch Zugabe von Thiamin reprimierbaren Vektor (*nmt1⁺*) kloniert, der C-terminal die GFP-Sequenz aufwies. Um möglichst gleiche Bedingungen für die erzeugten Fragmente zu schaffen, wurden jeweils identische Schnittstellen im Vektor verwendet (*Bgl*II und *Not*I), so dass der Abstand zum Promotor immer gleich war. Einzig Proteinf фрагmente, die kein Startkodon besaßen, erhielten mittels PCR eines. Für die Lokalisierungsexperimente wurden die Plasmide in einen *S. pombe* Wildtypstamm transformiert. Alle Lokalisierungsexperimente wurden unter de-reprimierten Bedingungen nach einer Inkubation von 20-26 h bei 30 °C durchgeführt. Konnte ein GFP-Signal nach spätestens 26 h detektiert werden, ist der Ort der Lokalisierung schwarz und unterstrichen dargestellt, war ein GFP-Signal erst nach 48 h detektierbar, in grauer, kursiver Schrift. * = Die Fluoreszenzintensität des GFP-Signals war schwächer im Vergleich zu den anderen nach spätestens 26 h detektierten GFP-Signalen. Die Wahl der AS-Bereiche der Spc7 Fragmente erfolgte mit Hilfe des Sekundärstruktur-Vorhersageprogramms GORIV, um mögliche funktionelle Motive wie α -Helices oder β -Faltblätter nicht zu zerstören (Garnier et al, 1996). Die zwei Domänen, die eine Ko-Assoziation mit Mikrotubuli aufwiesen, sind im Spc7-N Fragment eingezeichnet. Unten: die zwei experimentell festgelegten NLS-Sequenzen im N-Terminus von Spc7 sind den beiden durch das NucPred-Programm hervor gesagten NLS-Sequenzen gegenübergestellt (Brameier et al, 2007).

3.2.2.2 Die Assoziation des N-Terminus von Spc7 an die mitotische Spindel erfolgt über mindestens zwei Domänen

Um die Domäne der Spindelassoziation des Spc7-N Fragments zu identifizieren wurden die verschiedenen N-terminalen Spc7 Fragmente auf ihre Lokalisierung während der Mitose untersucht. Alle N-terminalen Spc7 Fragmente, die den AS Bereich 581-690 (F16) enthielten, wiesen ein Spindel-assoziiertes GFP-Signal auf, so dass in den im F16 Fragment enthaltenen 120 AS eine Bindestelle an die mitotische Spindel enthalten ist (Abbildung 3.11). Aber auch das F20 Fragment (AS 1-540) kann mit der mitotischen Spindel ko-assoziiieren (Abbildung 3.11). Eine bioinformatische Suche nach für die Mikrotubuliassoziation bekannten Motiven führte jedoch weder im F16 noch im F20 Fragment zu einem Ergebnis (Daten nicht gezeigt).

3.2.2.3 Eine direkte Interaktion zwischen Spc7-N und Tubulin kann nicht nachgewiesen werden

Der N-Terminus von Spc7 kann in Abhängigkeit vom Spc7 C-Terminus mit der mitotischen Spindel assoziieren. Die Frage war nun, wie Spc7-N an der Spindel assoziiert. Das Mikrotubuli-assoziierte Mal3 Protein ist bereits als Interaktionspartner von Spc7 an der mitotischen Spindel bekannt, da es mit Spc7 ko-immunpräzipitiert. Unklar war allerdings, ob Spc7 nur indirekt oder auch direkt an die mitotische Spindel binden kann. Durch Ko-Immunpräzipitation wurde deshalb analysiert, ob Spc7 direkt mit den α -/ β -Tubulin-Untereinheiten der mitotischen Spindel interagiert. Zuerst wurde die Interaktion zwischen Spc7 und α -Tubulin (Atb2) überprüft. Spc7-HA konnte mit einem anti-HA Antikörper und GFP-Atb2 mit einem anti-GFP Antikörper präzipitiert werden. Eine Ko-Immunpräzipitation konnte jedoch nicht nachgewiesen werden (Abbildung 3.12 A)

In einer weiteren Ko-Immunpräzipitation wurde in dem Spc7-HA GFP-Atb2 Stamm mit einem spezifischen Antikörper gegen β -Tubulin die Interaktion von Spc7-HA und β -Tubulin untersucht. Nach der Immunpräzipitation von Spc7-HA mit dem anti-HA Antikörper konnte kein β -Tubulin Signal detektiert werden (Abbildung 3.12 B). Aus versuchstechnischen Gründen war nur eine unidirektionale Analyse möglich. Als Positivkontrolle fungierte die Ko-Immunpräzipitation zwischen α - und β -Tubulin, bei der β -Tubulin über GFP-Atb2 immunpräzipitiert werden konnte (Abbildung 3.12 B, linke Spalte).

Somit war eine direkte Interaktion zwischen den Mitgliedern des α -/ β -Tubulin Dimers und Spc7 nicht nachweisbar. Die Interaktion von Spc7 mit der mitotischen Spindel scheint über Mikrotubuli-assoziierte Proteine zu erfolgen. Ob Spc7 mit noch weiteren Mikrotubuli-assoziierten Proteinen neben Mal3 interagiert, werden zukünftige Studien zeigen müssen.

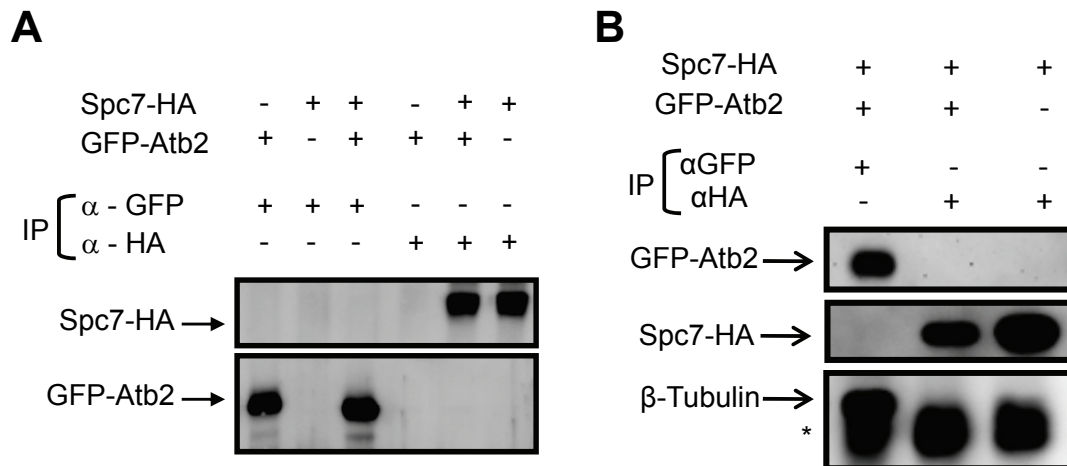


Abbildung 3.12: Eine direkte Interaktion von Spc7 mit Tubulin kann nicht in logarithmisch wachsenden Kulturen nachgewiesen werden.

(A) Spc7-HA und GFP-Atb2 zeigen keine direkte Interaktion in einer logarithmisch wachsenden *S. pombe* Kultur. Proteinextrakte wurden aus dem Spc7-HA, GFP-Atb2 oder Spc7-HA GFP-Atb2 Stamm isoliert. Für die Immunpräzipitation wurde der anti-GFP oder anti-HA Antikörper eingesetzt. Die Interaktion wurde mittels einer Westernblot Analyse mit anti-GFP bzw. anti-HA Antikörpern überprüft. (B) Proteinextrakte eines Spc7-HA oder Spc7-HA GFP-Atb2 Stammes wurden isoliert und mit anti-GFP bzw. anti-HA Antikörpern immunpräzipitiert. Die Proben wurden mittels Westernblot Analyse unter Verwendung eines anti-GFP, anti-HA oder anti- β -Tubulin Antikörpers untersucht (anti- β -Tubulin Antikörper; WA3 Antikörper; Geschenk an Gabriele Köhler von Prof. Manfred Schliwa, Ludwig-Maximilians-Universität München). * = unspezifische Hintergrundbande. Abbildung (A) übernommen aus Kerres et al, 2007.

3.2.2.4 Spc7 besitzt eine NES-Sequenz

Die verschiedenen N-terminalen Spc7 Fragmente wiesen unterschiedlich starke GFP-Signale auf. Dies ist in Abbildung 3.13 exemplarisch für zwei Fragmente dargestellt. Die Wildtypzellen, die das Spc7 F3 (AS 1-690) Proteinfragment überexprimierten (rot markierte Zellen) wiesen ein viel weniger intensives GFP-Signal als F8 überexprimierende Zellen auf (Abbildung 3.13). Dem F8 Fragment fehlten, anders als dem F3 Fragment, die ersten 319 AS. Auch die übrigen N-terminalen Spc7 Fragmente, denen die ersten 319 AS fehlten, zeigten ein sehr starkes GFP-Signal, das durch eine erhöhte Proteinakkumulation im Kern begründet werden kann (Daten nicht gezeigt).

Der Transport aus dem Zellkern erfolgt vorwiegend über das evolutionär konservierte Exportin, das über eine sogenannte NES-Sequenz („Nukleare Export Sequenz“) ein Protein bindet und aktiv aus dem Kern befördert (Benditt et al, 1989; Hood & Silver, 1999; Moroiaru, 1998; Moroiaru, 1999; Wen et al, 1995). Das Entfernen der NES-Sequenz kann die Proteinmenge im Kern erhöhen. Mit dem NetNES 1.1-Programm wurde tatsächlich

bioinformatisch eine putative NES-Sequenz an AS Position 97 des Spc7 Proteins ermittelt (Wahrscheinlichkeit: 67 %) (la Cour et al, 2004).

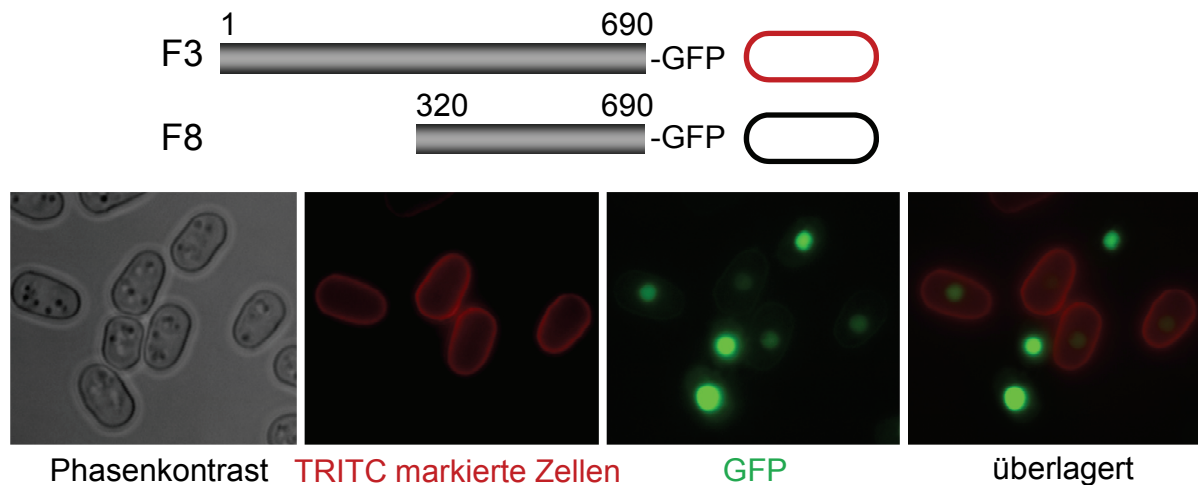


Abbildung 3.13: Spc7 enthält in den ersten 319 AS eine NES-Sequenz.

Schematische Darstellung zweier Spc7 Fragmente (F3 und F8), die jeweils mit GFP fusioniert wurden. Jedes der Fragmente wurde separat in den Wildtypstamm transformiert und dort überexprimiert. Um lebend die Intensität der GFP-Signale beider Fragmente unterscheiden zu können, wurden die Zellen, die das Spc7 F3 Fragment überexprimieren, zusätzlich mit TRITC konjugiertem Lektin inkubiert, so dass die Zellwand rot markiert ist (schematisch durch eine rot umrandete Zelle dargestellt). Die nicht markierten Zellen sind schematisch durch eine schwarz umrandete Zelle dargestellt. Die mikroskopischen Aufnahmen zeigen den Wildtypstamm, der entweder das Spc7 F3 (rot umrandete Zellen) oder das Spc7 F8 Fragment überexprimiert. Während das Spc7 F8 Fragment in ca. 80 % der Zellen nach 24 h detektiert werden konnte, fand sich das Spc7 F3 Fragment in 50 % der Wildtypzellen.

3.2.2.4.1 Das Entfernen der Spc7 NES-Sequenz führt zur Akkumulation des Proteins im Zellkern

Um zu untersuchen, ob Spc7 die bioinformatisch ermittelte NES-Sequenz *in vivo* existiert wurde AS 97 mittels gerichteter Mutagenese im plasmidkodierten *spc7-n* mutiert. Eine Analyse von Spc7-N-L97A überexprimierenden Wildtypzellen zeigte, dass die Anzahl der Zellen die ein GFP-Signal zeigten, um das ca. dreifache anstieg (Abbildung 3.14 A). Auch die GFP-Signalintensität des Spc7-N-L97A Fragments war in vielen der Wildtypzellen verglichen mit den Spc7-N-GFP überexprimierenden Zellen erhöht, so dass es anscheinend zu einer erhöhten Proteinakkumulation im Zellkern gekommen ist.

Da es sich bei Spc7-N um ein Teilfragment des Spc7 Proteins handelt, sollte getestet werden welche Wirkung das Entfernen der NES-Sequenz auf das Volllängenprotein hat (Spc7-L97A-GFP). Auch in Spc7-L97A-GFP überexprimierenden Zellen kam es zu einer

erhöhten Akkumulation des Proteins: neben dem Kinetochorsignal wurde im gesamten Kern das GFP-Signal detektiert (Abbildung 3.14 B). Daraus kann geschlossen werden, dass sich an AS Position 97 des Spc7 Proteins eine *in vivo* verwendete NES-Sequenz befindet.

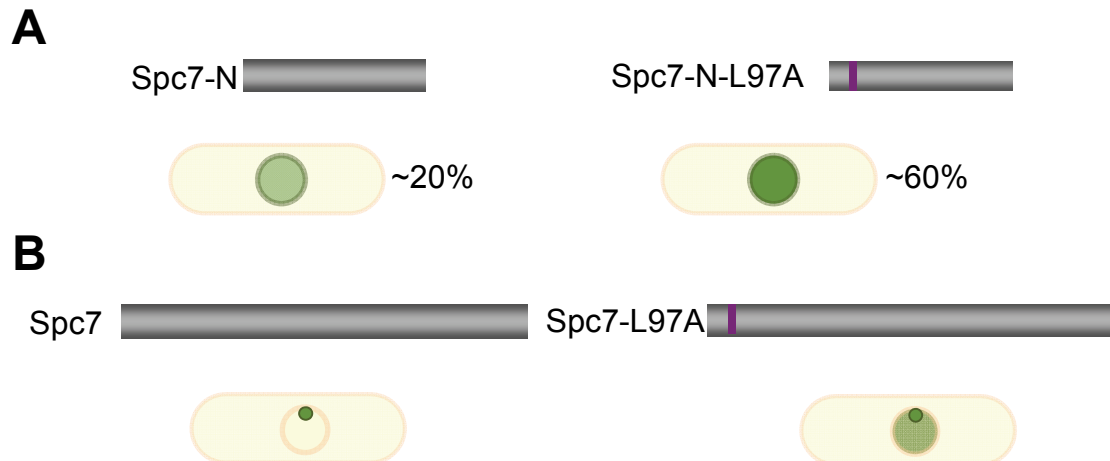


Abbildung 3.14: Der Verlust der NES-Sequenz in Spc7 führt zur Akkumulation des Proteins im Zellkern.

(A) Schematische Darstellung des Spc7-N bzw. des Spc7-N-L97A Fragments. Die violette Kennzeichnung zeigt den AS Austausch, durch den die NES-Sequenz mutiert wurde. An Spc7 AS Position 97 wurde Alanin statt Leucin eingebaut (Spc7-N-L97A). Die Lokalisierung wurde nach 24 h bei 30 °C in lebenden Wildtypzellen auf Intensität und Anzahl der Zellen untersucht, die ein GFP-Signal aufwiesen (n = 300). **(B)** Entfernung der NES-Sequenz im volllängen Spc7 Protein (Spc7-L97A). Die Intensität des jeweiligen GFP-Signals ist schematisch dargestellt.

3.2.2.5 N-terminale Spc7 Fragmente beeinflussen das Wachstum des Wildtypstammes

Die Phänotypen einer Überexpression der N-terminalen Spc7 Fragmente auf das Wachstumsverhalten des Wildtypstammes wurden unter verschiedenen Bedingungen bestimmt. Die Überexpression von Spc7-N-GFP („N“) verursachte einen kältesensitiven Wachstumsdefekt, der in Anwesenheit der übrigen N-terminalen Spc7 Fragmente nicht beobachtet wurde (Abbildung 3.15 A). Außerdem hat Spc7-N-GFP einen negativen Einfluss auf das Wachstum des Wildtypstammes auf Medium mit TBZ, das die Mikrotubuli destabilisiert (Abbildung 3.15 A, siehe 30 °C).

Einzig die Überexpression des Spc7 F2 Fragments hatte eine positive Wirkung auf das Wachstum der Wildtypzellen: diese waren TBZ-resistenter. Dieser Effekt war bei 37 °C am stärksten (Abbildung 3.15 A und Daten nicht gezeigt). Möglicherweise besitzt das F2 Fragment (AS 599-820) eine weitere Mikrotubuli-assoziierte Domäne die diesen Effekt

auslöst. Diese wäre nicht in dem Teil des Fragments das die F16 AS Sequenz enthält, da dieses keine TBZ-Resistenz auslösen kann. Dies müsste allerdings mit einem GFP-Fusionsprotein untersucht werden.

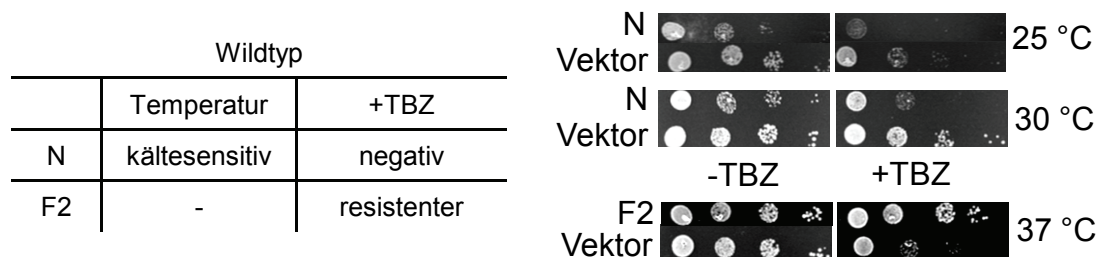


Abbildung 3.15: N-terminale Spc7 Fragmente beeinflussen das Wachstum des Wildtypstammes.

Alle in Abbildung 3.11 dargestellten N-terminalen Spc7 Fragmente wurden im Wildtypstamm überexprimiert und auf Veränderungen im Wachstum bei unterschiedlichen Temperaturen und auf TBZ-haltigem Medium untersucht. In der Tabelle sind nur die Spc7 Fragmente angegeben, die eine Wachstumsveränderung hervorgerufen haben. Kältesensitiv = marginales Wachstum bei 25 °C und eingeschränktes bei 30 °C, - = keinen Effekt; negativ = verschlechtertes Wachstum, resistenter = TBZ-resistenter als Wildtypzellen, die den Kontrollvektor tragen. Zusätzlich sind die Tropftests des Wildtypstammes gezeigt, der die Spc7 Fragmente N (Spc7-N) oder F2 überexprimiert. Die plasmid-selektiven Platten wurden bei den angegebenen Temperaturen für 5-6 Tage inkubiert.

3.2.3 Die Kinetochorbindedomäne des Spc7 Proteins kann auf die AS Region 1116-1290 eingegrenzt werden

Die letzten 544 AS des Spc7 Proteins („Spc7-C“) sind für eine Kinetochorlokalisierung ausreichend (Kerres et al, 2007). Da der jetzt verwendete Expressionsvektor (pREP) eine höhere Expression als der vorher verwendete (pJR2) zeigte, wurde zuerst überprüft ob diese die Lokalisierung verändert (Moreno et al, 2000). Dies war nicht der Fall (Abbildung 3.16 A).

Zur Identifizierung der Kinetochorbindedomäne wurden verkürzte C-terminale Spc7-Fragmente erstellt und ihre Lokalisierung untersucht. Das Vorgehen glich dem der N-terminalen Spc7 Varianten.

Die Spc7 Fragmente F7 (AS 911 -1364), F11 (AS 1000-1364) und F12 (AS 1052-1364) waren Kinetochor-lokalisiert (Abbildung 3.16 A). F11 und F12 allerdings zeigten ein reduziertes Kinetochorsignal, das vermutlich auf die geringere Proteinmenge gegenüber den

C, F5 und F7 Fragmenten zurückzuführen ist (Daten nicht gezeigt). Das F13 Fragment (AS 1116-1364) fand sich gleichverteilt im Zytoplasma und Zellkern wieder und zeigte keine detektierbare Kinetochorlokalisierung (Abbildung 3.16 A).

A

Name	schematische Darstellung	AS	kDa	Lokalisierung und Signalintensität
C		821-1364	62,7	
F5		720-1364	73,7	
F7		911-1364	51,3	
F11		1000-1364	42,1	
F12		1052-1364	36,0	
F13		1116-1364	28,5	
F22		1290-1364	8,4	
F21		1209-1364	18,0	
F21-NLS		1209-1364	22,0	
F13-NLS		1116-1364	32,5	
F22-NLS		1290-1364	12,4	
F18		911-1208	33,4	---

Kinetochorbindedomäne



Abbildung 3.16: Die Kinetochorbindedomäne des Spc7 Proteins kann auf die AS Region 1116-1290 eingegrenzt werden.

(A) Schematische Darstellung der C-terminalen Spc7-Fragmente, deren Proteingröße, Lokalisierung und Signalintensität. Die zwei violetten Boxen zeigen schematisch die Positionen der Mutationen in den bekannten *spc7^{ts}*-Mutanten (linke Box: 1009-1114 AS; rechte Box: 1296-1360 AS). In blau ist schematisch die NLS-Sequenz eingezeichnet. --- = kein GFP-Signal in den Wildtypzellen detektierbar.

(B) Wildtypzellen, die entweder GFP (TRITC markierte, rot umrandete Zellen) bzw. NLS-GFP (nicht-markierte Zellen) überexprimieren. Es wurde die Polyomavirus SV-40 NLS-Sequenz verwendet (Kalderon et al, 1984). Die Intensität des GFP-Signals wurde in lebenden Zellen nach 24 h in thiaminfreiem Medium bestimmt.

Es schien zum Verlust einer NLS-Sequenz in der Spc7 AS Region 1052-1116 gekommen zu sein. Die Signalintensität des F13 GFP-Signals selbst war sehr gering, so dass es unmöglich war eine Aussage über die Kinetochorassoziation abzugeben. Mit dem NucPred-Programm wurde tatsächlich eine putative NLS-Sequenz an Position 1091-1104 vorhergesagt (Brameier et al, 2007).

Um den Proteinimport in den Zellkern zu forcieren, wurde im Expressionsvektor 5' der für GFP kodierenden Sequenz zusätzlich die NLS-Sequenz des Polyomavirus SV-40 großen T-Antigens kloniert. Zuerst wurde überprüft, ob die zusätzliche SV-40-NLS-Sequenz (von nun an als NLS-Sequenz bezeichnet) die GFP-Signalintensität im Zellkern erhöhen konnte. Während das GFP-Protein ohne NLS-Sequenz gleichverteilt in der Zelle vorlag, war die Intensität des NLS-GFP-Signals im Zellkern verstärkt (Abbildung 3.16 B).

Nachfolgend wurde das F13-NLS-GFP Fragment (AS 1116-1364) generiert. Das F13-NLS-GFP Fragment fand sich im Zellkern wieder und war Kinetochor-assoziiert (Abbildung 3.16 A). Noch kürzere Varianten von Spc7-C wie das F22 Fragment (AS 1290-1364) wurden ebenfalls als NLS-GFP Fusionsprotein exprimiert. Das F22-NLS Fragment exprimierende Zellen zeigten jedoch das GFP-Signal ausschließlich im Zellkern, nicht jedoch am Kinetochor lokalisiert (Abbildung 3.16 A). Durch weitere Teilfragmente wie F21 (AS 1209-1364), das vermutlich mit der Vakuolenmembran ko-lokalisiert (Kapitel 3.2.3.1) oder F18 (AS 911-1208), dessen Signal nicht detektierbar war, die Spc7 Kinetochorbindedomäne nicht weiter eingegrenzt werden (Abbildung 3.16 A).

Zusammenfassend zeigen diese Experimente, dass der AS Bereich 1116-1290 für die Kinetochorbindung von Spc7 ausreicht. Da sich diese Domäne im konservierten Teil des Proteins wiederfindet, ist diese in anderen Eukaryoten wahrscheinlich konserviert.

3.2.3.1 Spc7 kann eventuell an Membranen assoziieren

Das Spc7 F21 Fragment wies eine unerwartete Lokalisierung in der *S. pombe* Zelle auf: es ko-assoziierte vermutlich mit der Vakuolenmembran, die in Form von einer Vielzahl von kreisförmigen Strukturen frei im Zytoplasma verteilt vorliegen (Abbildung 3.17) (Takegawa et al, 2003). Dies müsste durch Ko-Lokalisationsstudien mit z. B. dem Fluoreszenzmarker FM4-64, der spezifisch die Vakuolenmembran von Hefen markiert, überprüft werden. Allerdings ist dieses Lokalisierungsmuster sehr typisch, so dass es vermutlich bestätigt werden kann (Takegawa et al, 2003; Vida & Emr, 1995). Auch das mit NLS-Sequenz versehene F21 Fragment wies ausschließlich diese Lokalisierung auf (Abbildung 3.16 A und Abbildung 3.17). Da die NLS-Sequenz anscheinend nicht den Kerntransport forcieren kann, scheint die Membranassoziation irreversibel. Dies wurde durch den Befund erhärtet, dass

sich die Lokalisierung der F21 und F21-NLS GFP-Fragmente auch nach 48 Stunden nicht geändert hat (Daten nicht gezeigt). Weitere Analysen werden zeigen müssen, ob das volllängen Spc7 Protein an Membranen assoziieren kann und falls dies der Fall sein sollte, welche Rolle es dort übernimmt.

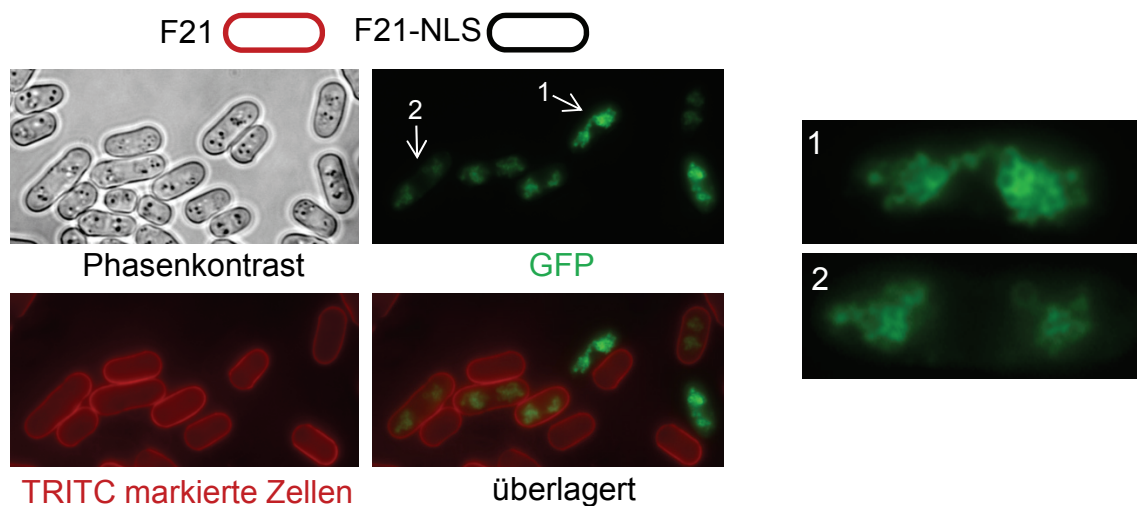


Abbildung 3.17: Die Spc7 Teilfragmente F21 und F21-NLS (AS 1209-1364) sind vermutlich Vakuolenmembran-assoziiert.

Mikroskopische Aufnahmen lebender Wildtypzellen, die das Spc7 Fragment F21 (TRITC markierte (rote) Zellen) bzw. F21-NLS (nicht-markierte Zellen) überexprimieren. Die Inkubation erfolgte für 24 h bei 30 °C. Rechts findet sich je eine Wildtypzelle die F21-NLS (Zelle 1) bzw. F21 (Zelle 2) überexprimiert, vergrößert wieder.

3.2.3.2 Die Expression des Spc7 F13-NLS Fragments führt zu einer veränderten Ploidie

Interessanterweise zeigte die F13-NLS überexprimierende Wildtypkultur eine Elongation der Zellen. Eine Zellelongation kann durch Defekte ausgelöst werden, die den Eintritt in die Mitose verzögern. Außerdem sind diploide Zellen ebenfalls im Vergleich zu haploiden Zellen elongiert. Im Gegensatz dazu wiesen die F13 ohne NLS-Signal überexprimierenden Wildtypzellen keine elongierten Zellen auf (Abbildung 3.18 A). Um den Grad der Elongation zu ermitteln, wurde die Zelllänge von mitotischen Zellen bestimmt, denn *S. pombe* Zellen wachsen nur während der Interphase und zeigen mit dem Eintritt in die Mitose keine weitere Verlängerung der Zellen. Die mitotischen Zellen der F13 überexprimierenden Wildtypkultur wiesen eine durchschnittliche Zelllänge von 12 µm auf, während mitotische F13-NLS überexprimierende Zellen im Schnitt eine Zelllänge von 20 µm aufzeigten, was der

Durchschnittslänge von diploiden Zellen entspricht (Abbildung 3.18 B) (<http://www-bcf.usc.edu/~forsburg/plasmids.html>).

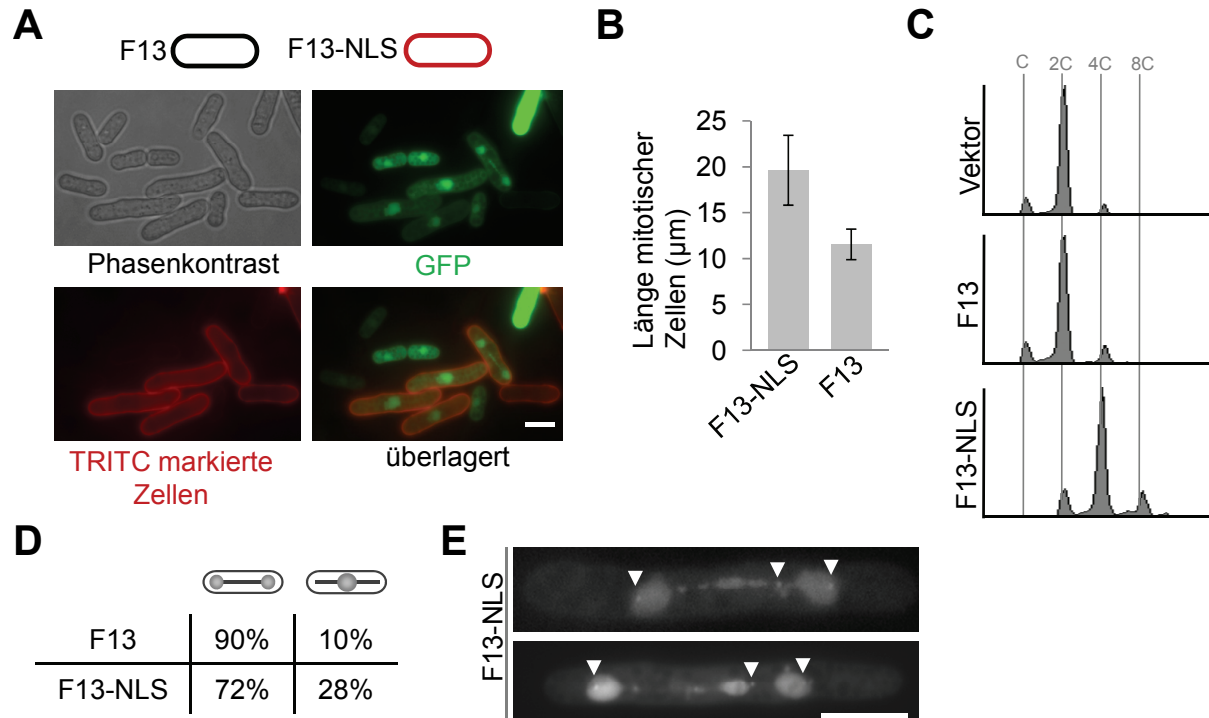


Abbildung 3.18: Spc7 F13-NLS-GFP überexprimierende Wildtypzellen sind diploid.

(A) Mikroskopische Aufnahmen lebender Wildtypzellen, die das Spc7 Fragment F13-NLS (rot, durch TRITC markierte Zellen) bzw. F13 (nicht-markierte Zellen) überexprimieren. Die Zellen wurden 24 h unter de-reprimierenden Bedingungen inkubiert. Balken, 10 µm. (B) Die Länge der F13-NLS oder F13 überexprimierenden Zellen wurde nach 24 h bei 30 °C ermittelt. Es wurde nur die Länge von mitotischen Zellen ausgewertet (n = 30 bzw. n = 23). (C) Mittels FACS-Analyse wurde der DNA-Gehalt von *S. pombe* Wildtypzellen, die die Spc7 Fragmente F13 bzw. F13-NLS für 22 h bei 30 °C unter de-reprimierten Bedingungen überexprimierten, untersucht (n = 10000). Als Kontrolle diente der Kontrollvektor. Die SYTOX Green Färbung wurde vor der FACS-Analyse mikroskopisch kontrolliert. Die FACS-Messungen wurden zusammen mit Klaus Meyer an einem FACSAria (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) durchgeführt. (D) Die zusätzliche NLS-Sequenz des F13-NLS Fragments führt zur vermehrten nicht-Trennung der DNA (n = 100). Die Zellen wurden nach 24 h (ohne Thiamin) fixiert und mit einem anti-Tubulin Antikörper und DAPI behandelt (n = 100). (E) Lokalisierung des Spc7 F13-NLS Signals in Wildtypzellen nach 48 h bei 30 °C. Die F13-NLS Kinetochor GFP-Signale sind zusätzlich mit einem Pfeil gekennzeichnet. Balken, 10 µm.

Mittels Durchflusszytometrie (FACS) wurde der DNA-Gehalt von F13 und F13-NLS überexprimierenden Zellen bestimmt. Haploide *S. pombe* Zellen befinden sich ca. 70 % des Zellzyklusses in der G2-Phase, so dass die Hauptpopulation einer logarithmischen Wildtypkultur einen DNA-Gehalt von 2 C aufweist (Abbildung 3.18 C: Vektor) (Sazer &

Sherwood, 1990). Dies war bei Wildtypzellen, die das Spc7 F13 Fragment exprimierten, der Fall (Abbildung 3.18 C: F13). Unterdessen wies eine F13-NLS überexprimierende Wildtypkultur, die während der Interphase nur einen Zellkern aufwies, hauptsächlich einen 4 C DNA-Gehalt auf und war somit diploid (Abbildung 3.18 C: F13-NLS).

Um zu überprüfen, ob die Kinetochorassoziation von F13-NLS die Chromatinsegregation beeinflusst, wurden mitotische F13 bzw. F13-NLS überexprimierende Zellen analysiert. Nach 24 h zeigten nur 10 % der das Spc7 F13 Fragment überexprimierenden Anaphase-Zellen keine Trennung des Chromatins (Abbildung 3.18 D). In F13-NLS überexprimierenden Zellen stieg die Anzahl der Defekte in der Chromosomensegregation an: in 28 % der Wildtypzellen blieb die Chromatinsegregation trotz elongierter Spindel aus (Abbildung 3.18 D). Nach 48 h trat in den F13-NLS überexprimierenden Zellen ein weiterer Phänotyp auf: ein Teil der Chromosomen war merotelisch an die Spindel gebunden (Abbildung 3.18 E). Auch nahm die Zelllänge der F13-NLS überexprimierenden Zellen weiter zu (Vergleiche Abbildung 3.18 A und E).

Durch die Überexpression des Spc7 F13-NLS Fragments kommt es zu einer Erhöhung der Ploidie der Zelle. Weitere Analysen werden zeigen müssen, wie dieser Phänotyp ausgelöst wird.

3.2.3.3 Die Anwesenheit des F5 bzw. F7 Fragments führt zu einer erhöhten TBZ-Sensitivität

Die Überexpression des Spc7-C Fragments führte zu Wachstumsdefekten und zusätzlich eine extremen TBZ-Sensitivität im Wildtyp und führte zu Defekten in der Chromosomensegregation (Abbildung 3.19 A und B). Durch die Überexpression der unterschiedlichen C-terminalen Spc7 Fragmente sollte getestet werden, welcher Bereich des Proteins für den Phänotyp verantwortlich ist. Die Überexpression des F5 Fragments, das zusätzlich die letzten 101 AS des als N-Terminus definierten Fragments trug, verstärkte den negativen Wachstumsdefekt des Wildtypstammes auf TBZ-haltigem Medium sogar gegenüber dem FC Fragment (Abbildung 3.19 C). Die Überexpression von Spc7-C („C“) führte erst bei höheren TBZ-Konzentrationen zu Wachstumsdefekten (Daten nicht gezeigt). Auch in Anwesenheit des F7 Fragments kam es zu einer erhöhten TBZ-Sensitivität, die jedoch bei kürzeren Spc7-C Fragmenten nicht auftrat (Abbildung 3.19 C und Daten nicht gezeigt). Da das F7 Fragment (AS 911-1364), nicht aber das F11 (AS 1000-1364) diesen Effekt auslöst, scheint die Überexpression des Spc7 AS Bereichs 821-999 die TBZ-Sensitivität hervorzurufen.

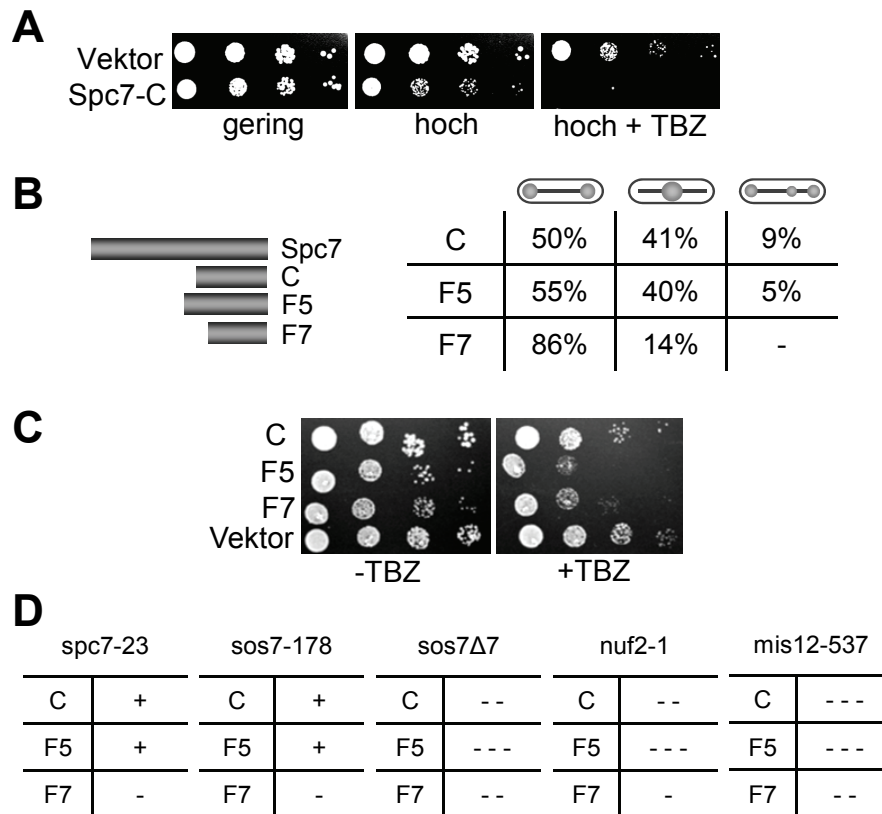


Abbildung 3.19: Die Überexpression verschiedener C-terminaler Spc7 Fragmente führt zur TBZ-Sensitivität im Wildtypstamm.

(A) Tropftest des Wildtypstammes, der Spc7-C überexprimiert. Die thiaminhaltigen (gering = geringe Expression) und thiaminfreien (hoch = hohe Expression) Platten wurden 6 Tage bei 25 °C inkubiert. +TBZ = das Medium enthielt zusätzlich die Mikrotubuli-destabilisierende Substanz TBZ. (B)-Schematische Darstellung der Spc7 Fragmente Spc7-C („C“) (AS 821-1364), F5 (AS 720-1364) und F7 (AS 911-1364). Rechts: Phänotypisierung der Chromosomensegregation im Wildtypstamm, der die Spc7 Fragmente C, F5 bzw. F7 für 20 h bei 30 °C überexprimiert (n = 100). Wildtypische DNA-Segregation (links), keine DNA-Segregation trotz elongierter Spindel (Mitte) und merotelische Kinetochor-Spindel-Verknüpfung (rechts) (n = 100). (C) Tropftest des Wildtypstammes, der die Spc7 Fragmente C, F5 und F7 überexprimiert. Die thiaminhaltigen Platten wurden 6 Tage unter plasmid-selektiven Bedingungen bei 25 °C inkubiert. (D) Zusammenfassung der Phänotypen, die durch die Überexpression der C-terminalen Spc7 Fragmente in den mutanten NMS-Komplexstämmen *spc7-23*, *sos7-178*, *sos7Δ7*, *nuf2-1* und *mis12-537* ausgelöst wurden. + = Suppression, (+) = leichte Suppression, (-) - (---) = leichter bis starker Wachstumsdefekt. Abbildung (A) übernommen aus Kerres et al, 2007.

3.2.3.4 Die Überexpression der Spc7 Fragmente FC und F5 supprimiert den ts Phänotyp der *spc7-23* und *sos7-178* Kinetochormutanten

Die *spc7^{ts}* Mutanten haben alle Mutationen im C-terminalen Teil des Proteins (Kapitel 3.1.1). Um zu überprüfen, ob die Überexpression der C-terminalen Spc7 Fragmente zu einer Suppression der Wachstumsdefekte der *spc7-23* Mutante führen, wurden alle erzeugten Fragmente in die *spc7-23* Mutante transformiert und die Phänotypen analysiert. Nur die Anwesenheit der Spc7 Fragmente Spc7-C und F5 konnte den ts Phänotyp des *spc7-23*

Stammes supprimieren, während die der Spc7 F7 und F18 Fragmente bereits bei der permissiven Temperatur zur Verschlechterung des Wachstums führte (Abbildung 3.19 D).

Auch der Wachstumsdefekt der *sos7-178* Mutante konnte durch die Überexpression der Spc7-C und F5 Fragmente supprimiert werden (Abbildung 3.19 D) (*sos7^{ts}* Mutanten: siehe Kapitel 3.3.3). Während durch die Überexpression des F7 Fragments ebenfalls eine Verschlechterung des Wachstums in der *sos7-178* Mutante beobachtet werden konnte, kam es durch extra F13-NLS zu einer leichten Suppression (Abbildung 3.19 D). Der *ts* Phänotyp anderer mutanter Komponenten des NMS-Komplexes konnte nicht durch zusätzliches Spc7-C, F5 oder F13-NLS supprimiert werden (Abbildung 3.19 D).

In Anwesenheit der Spc7-C und F5 Fragmente in den *spc7-23* und *sos7-178* Mutanten kommt es zur Komplementation der mutanten Phänotypen dieser Stämme, während kürzere Spc7 Fragmente diesen Effekt nicht hervorrufen können. Somit wird die Region die im Spc7-C Fragment, nicht aber in den kürzeren Fragmenten kodiert ist (AS 821-910), vermutlich für die Interaktion mit den defekten Proteinen oder mit deren Interaktionspartnern benötigt.

3.2.4 Spc7 besitzt mindestens vier NLS-Sequenzen

Die bisherigen Analysen der Spc7 Teilfragmente ergaben, dass sich sowohl im N-Terminus als auch im C-Terminus NLS-Sequenzen befinden. Diese sind:

- 1) im AS Bereich 1-319,
- 2) im AS Abschnitt 581-690 (Kapitel 3.2.2.1) und
- 3) im AS Bereich 1052-1116 (Kapitel 3.2.3).

Eine auf dem NucPred-Programm beruhende Suche grenzte die drei möglichen NLS-Signale auf die in Abbildung 3.20 A dargestellten Bereiche ein (durchgehend markiert) (Brameier et al, 2007). Eine vierte putative NLS-Sequenz wurde an AS Position 904 hervorgesagt, die in den folgenden Studien jedoch nicht analysiert wurde (Abbildung 3.20 A, nicht-durchgehende Markierung).

Um zu überprüfen, ob die drei experimentell identifizierten NLS-Sequenzen *in vivo* funktionell sind, wurde jede putative NLS-Sequenz einzeln mittels gerichteter Mutagenese im plasmidkodierten *spc7⁺*-ORF (FVL) geändert (Abbildung 3.20 A). Die Lokalisierung und Intensität der drei Spc7 Fragmente, denen je eine putative NLS-Sequenz fehlte, glich dem Wildtyp Spc7-GFP-Signal (Abbildung 3.20 B). Daraufhin wurden alle möglichen Spc7 Varianten erstellt, denen je zwei putative NLS-Signale fehlten (Abbildung 3.20 B). Alle zeigten eine mit dem Wildtyp-Signal vergleichbare Kinetochorassoziation (Abbildung 3.20 B).

Die Mutation aller drei putativen NLS-Sequenzen des Spc7 Proteins zeigte eine massiv reduzierte Kinetochorlokalisierung (Abbildung 3.20 B). Da aber weiterhin ein Spc7-NLS1,2,3-GFP-Signal am Kinetochor ausgemacht werden konnte, muss noch mindestens eine weitere NLS-Sequenz im Spc7 Protein vorhanden sein. Diese muss zukünftig ermittelt werden.

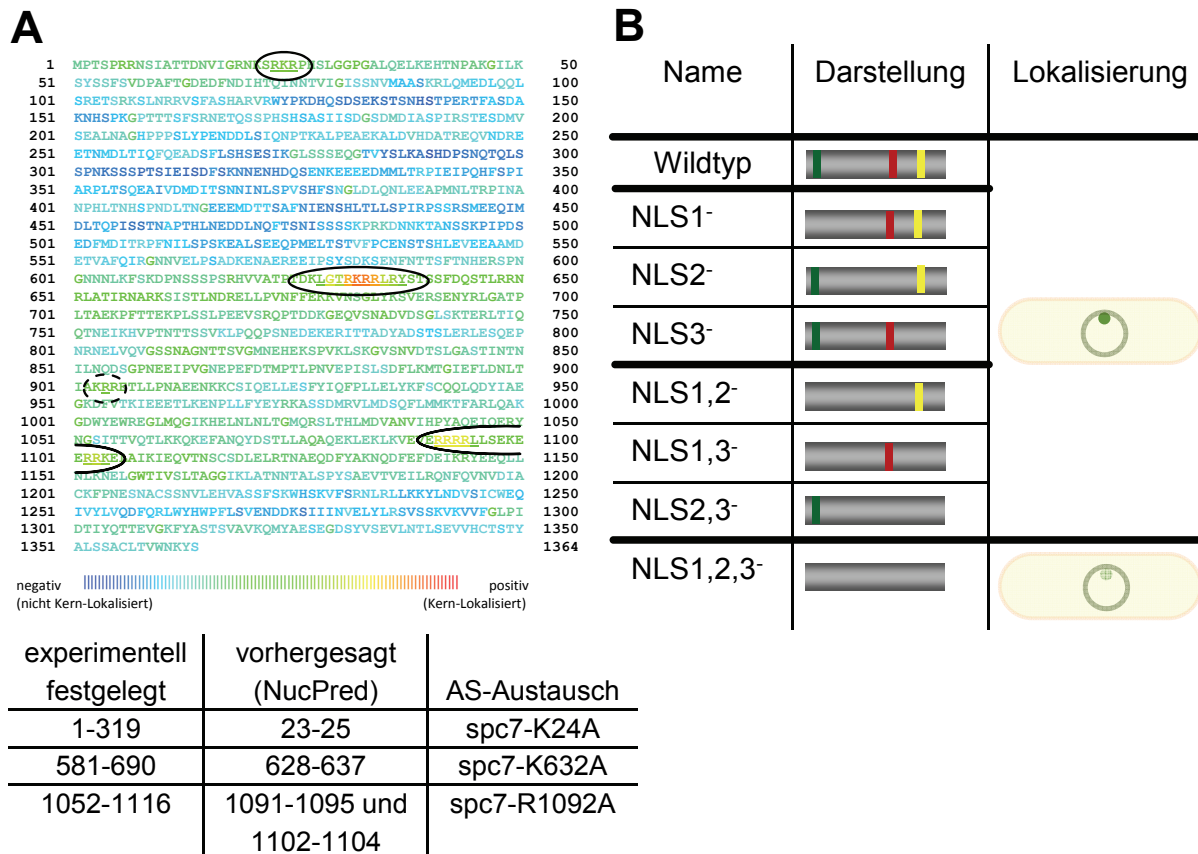


Abbildung 3.20: Spc7 besitzt *in vivo* mehr als drei NLS-Sequenzen.

(A) Vorhersage einer möglichen Kernlokalisierung von Spc7 unter Verwendung des NucPred-Programms. Sequenzabschnitte, die einen negativen bzw. positiven Effekt auf die Kern-Lokalisierung haben, sind farblich gekennzeichnet (negativ: dunkelblau; positiv: rot). Unterstrichene Regionen geben eine putative NLS-Sequenz an (sind zusätzlich eingekreist). Im AS Bereich 1091-1095 und 1102-1104 findet sich eine bipartite NLS-Sequenz. Darstellung des NucPred-Programms übernommen (Brameier et al, 2007). Unten: Die Angabe der AS Bereiche des Spc7 Proteins mit NLS-Sequenz, die durch die Lokalisierungsstudien erhalten wurden (links), verglichen mit denen, die durch das NucPred-Programm vorhergesagt wurden (Mitte). Durch gerichtete Mutagenese erfolgte der Austausch charakteristischer Aminosäuren (K = Lysin; R = Arginin; A = Alanin) so das die mutierte Sequenz nicht mehr als NLS-Signal dienen konnte. Dies wurde mittels des NucPred-Programms überprüft und bestätigt. (B) Schematische Darstellung und Lokalisierung der plasmidkodierte volllängen Spc7 Proteine, bei denen durch den gezielten Einbau eines Alanins (farbliche Markierung) die potentiellen NLS-Sequenzen mutiert wurden. NLS1⁻ = *spc7-K24A*; NLS2⁻ = *spc7-K632A*; NLS3⁻ = *spc7-R1092A*. Es wurde jeweils eine der drei potentiellen NLS-Sequenzen (oben) geändert. Außerdem wurden Varianten erzeugt, bei denen zwei potentielle NLS-Sequenzen (Mitte), oder alle drei vorhergesagten NLS-Sequenzen mutiert wurden (NLS1,2,3⁻)(unten).

3.2.5 Das Spc7 Protein agiert über verschiedene Domänen mit der Spindel und dem Kinetochor

Mit Hilfe dieser Studie konnte die Funktionsweise des Kinetochorproteins Spc7 näher charakterisiert werden. Spc7 assoziiert über seinen N-Terminus an der mitotischen Spindel und der C-Terminus ist am Kinetochor lokalisiert (Abbildung 3.21). Die Kinetochorbindedomäne wurde von mir auf 175 Aminosäuren (AS Bereich 1116-1290) eingegrenzt, die sich im konservierten Teil des Proteins befinden (Abbildung 3.21) (Petrovic et al, 2010).

Neben drei NLS-Sequenzen, die höchstwahrscheinlich für die Kernlokalisierung des 153,5 kDa Proteins benötigt werden, findet sich noch mindestens eine vierte. Interessanterweise weist der N-Terminus eine *in vivo* verwendete NES-Sequenz auf, so dass die Proteinkonzentration von Spc7 während des Zellzyklusses im Zellkern reguliert werden muss oder Spc7 eine Funktion außerhalb des Zellkerns erfüllt (Abbildung 3.21). Weiterhin wurden zwei Domänen identifiziert, die für die Mikrotubuliassoziation über Mikrotubuli-bindende Proteine benötigt werden und sich im N-Terminus befinden (Abbildung 3.21). Eine mögliche dritte muss über weitere Experimente noch bestätigt werden (AS 691-820). Ob Spc7 neben Mal3 noch weitere Mikrotubuli-assoziierte Interaktionspartner besitzt muss ermittelt werden. Zusätzlich wurde durch die Isolierung einer möglicherweise Membran-assoziiierenden Domäne eine bislang unbekannte Funktion des Spc7 Proteins am Kinetochor aufgedeckt.

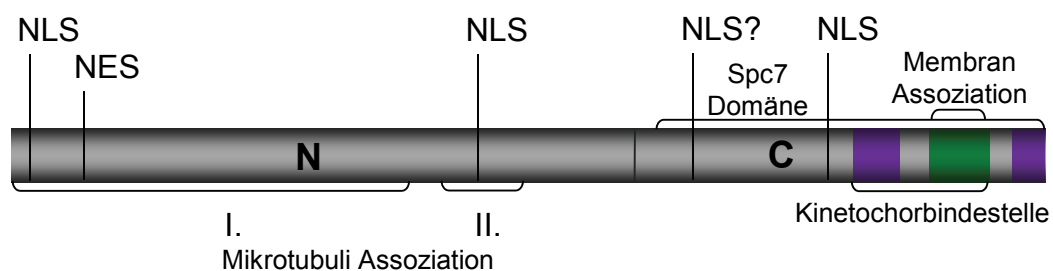


Abbildung 3.21: Kartierung der Spc7 Funktionsdomänen.

Schematische Darstellung des Spc7 Proteins. Das Protein ist in den N-Terminus (AS 1-820) und C-Terminus (AS 821-1364) gegliedert. Im N-Terminus findet sich außerdem eine NES-Sequenz (AS 97), zwei NLS-Sequenzen (AS 23-25 und 628-637) und zwei putative Proteindomänen, die für die Assoziation mit der mitotischen Spindel benötigt werden (AS 1-540 und 581-690). Im C-Terminus finden sich vermutlich zwei weitere NLS-Sequenzen, die erste an AS Position 1091-1104 wird *in vivo* verwendet, die bioinformatisch identifizierte NLS-Sequenz an AS Position 904 muss in zukünftigen Analysen untersucht werden. Der konservierte Bereich im C-Terminus reicht von AS 878-1364 („Spc7 Domäne“) (Petrovic et al, 2010). In violett sind die Bereiche eingezeichnet, in denen die Mutationen der *spc7^{ts}* Mutanten gehäuft auftreten (AS 1009-1114 und 1296-1360). In grün ist der Part des Spc7 Proteins gekennzeichnet, der vermutlich mit Membranen assoziieren kann (AS 1209-1290) und die Kinetochorbindedomäne von Spc7 befindet sich in der AS Region 1116-1290.

3.3 Identifizierung und Analyse neuer Spc7 Interaktionspartner

Zur Identifizierung neuer Interaktionspartner des Spc7 Proteins wurde eine extragene Multikopien-Suppressoranalyse durchgeführt. Unter Verwendung des *spc7-23* Mutantenstammes und einer genomischen *S. pombe* DNA-Bank (Barbet et al, 1992) wurden 102 von 370.000 Transformanten (ca. 90 fache Abdeckung des Genoms) isoliert, die in der Lage waren, bei der restriktiven Temperatur von 32,5 °C zu wachsen. 66 genomische Fragmente der Plasmide wurden über Restriktionsanalysen und PCR-Analysen bzw. Sequenzierungen dem wildtypischem *spc7⁺* -ORF zugeordnet. Die genomischen DNA-Fragmente der übrigen 36 Plasmide wurden mittels Sequenzierung bestimmt (Kapitel 2.11). Es folgte eine detaillierte Untersuchung dreier Suppressorplasmide (V5, V7 und V11), die mehrfach isoliert wurden.

Das V7-Suppressorplasmid enthielt eine genomische DNA-Sequenz, die insgesamt elfmal isoliert werden konnte. Damit war Sos7, das Protein das als alleiniger Suppressor der *spc7-23* Mutante isoliert wurde, der Suppressor der am häufigsten isoliert werden konnte. Das bis dato nicht bekannte Sos7 Protein konnte als eine neue Komponente des Kinetochors identifiziert werden, die eng mit Spc7 interagiert (Kapitel 3.3.3). Das genomische Fragment von Suppressorplasmid V5 war in drei weiteren Plasmiden enthalten und kodierte für ein bereits als Suppressor einer Mutante des MIND-Komplexes isoliertes Protein (Kapitel 3.3.2) (Obuse et al, 2004). Das V11-Suppressorplasmid wurde zweimal isoliert und mit dem NAC- („*n*ascent-*p*olypeptide-*a*ssociated *c*omplex“) Protein Btf3 und Mpd2 konnten zwei bereits bekannte Proteine identifiziert werden, die genetisch mit Spc7 interagieren.

3.3.1 *mpd2⁺* und *btf3⁺*, zwei ORFs auf dem V11 Plasmid, supprimieren den Wachstumsdefekt der *spc7-23* Mutante

Das zwei Mal isolierte V11-Suppressorplasmid wies jeweils die identische genomische *S. pombe* Insert Sequenz auf; ein 5788 Bp großes Fragment von Chromosom I, das den *mpd2⁺*-, den *btf3⁺*- und ein Teilfragment des *wsp1*-ORFs trägt (Abbildung 3.22 A). Das *btf3⁺* Gen kodiert für das Btf3 Protein, das einerseits in der Lage ist an DNA zu binden, um dort vermutlich als Transkriptionsfaktor zu wirken, und andererseits neu synthetisierte, ungefaltete Proteine vom Zytoplasma abschirmt, um eine korrekte Proteinfaltung zu ermöglichen (Whitby & Dixon, 2001). *mpd2⁺* wurde ursprünglich als Suppressor der *cdc7-PD1* Mutante isoliert, die hohe Mengen der Zellzyklus regulierenden Plo1-Kinase benötigt um zu überleben (Cullen et

al, 2000). Cdc7 ist eine für die Chromatinreplikation und Zellseptierung essentielle Serin/Threonin Kinase (Dolan et al, 2010; Liang & Fantes, 2007; Patel et al, 2008). Die Polo Kinasen sind evolutionär hoch konserviert und regulieren viele mitoserelevante Proteine (Hagan, 2008). Desweiteren enthält das genomische DNA-Fragment vom V11-Suppressor einen Teil des *wsp1*⁺-ORFs, kodierend für Wsp1, einen wichtigen Bestandteil des Aktinzytoskeletts (Chang & Martin, 2009; Petrasek & Schwarzerova, 2009; Sirotkin et al, 2005).

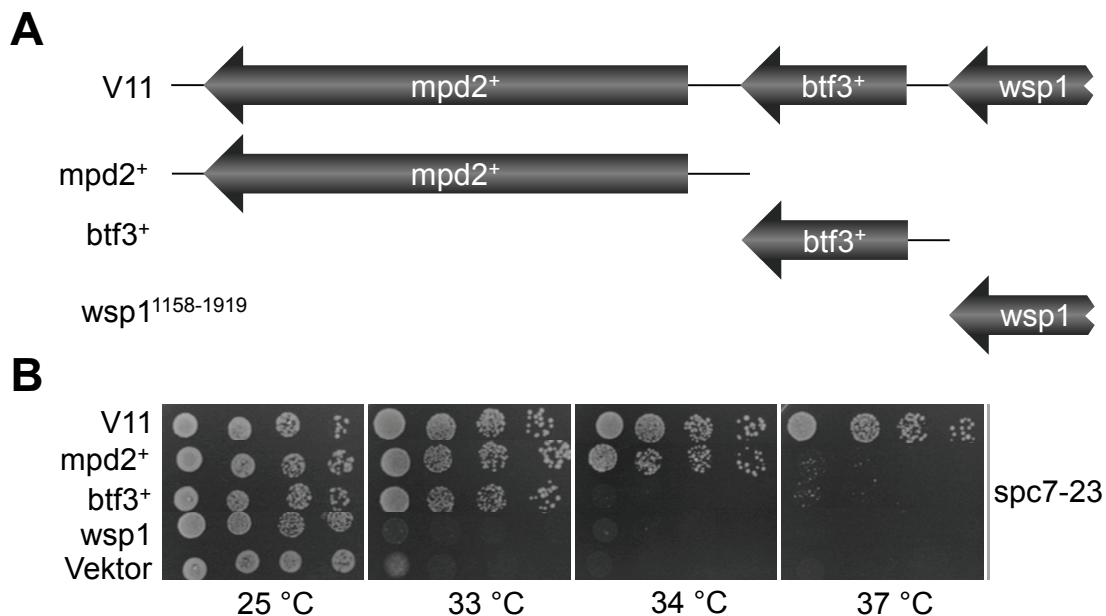


Abbildung 3.22: Plasmidkodierte *btf3*⁺ und *mpd2*⁺ supprimieren den temperaturabhängigen Wachstumsdefekt der *spc7-23* Mutante.

(A) Schematische Darstellung des genomischen Fragments, des V11-Suppressorplasmids. Das DNA-Fragment mit einer Größe von 5788 Bp von Chromosom I (Chr.I; 4856504-4862291) enthält den *mpd2*⁺, *btf3*⁺-ORF und die letzten 762 Bp des 1919 Bp umfassenden *wsp1*⁺-ORFs. Die Pfeile zeigen die Transkriptionsrichtung an. Durch Umklonierungen wurden jeweils pUR19-Plasmide (pUR19: Plasmidrückgrat der verwendeten genomischen Bank) erzeugt, die nur eines der drei Gene samt der in V11 vorhandenen 5' Region bis zum folgenden ORF tragen, die vermutlich den endogenen Promotor beinhaltet. **(B)** Tropftest (10⁴-10¹ Zellen) von *spc7-23* Zellen, die die in (A) gezeigten Plasmide tragen. *wsp1* = *wsp1*¹¹⁵⁸⁻¹⁹¹⁹. Die Platten wurden bei den angegebenen Temperaturen für 5-6 Tage unter plasmid-selektiven Bedingungen inkubiert.

btf3⁺ und *mpd2*⁺ wurden einzeln *in vivo* in *S. cerevisiae* (Kapitel 3.5) mit ihrem Wildtyp-Promotor in pUR19-Plasmide kloniert. Auch das *wsp1*-Fragment, das im V11-Plasmid keine endogene Promotorregion enthielt, wurde umkloniert (Abbildung 3.22 A). Die Anwesenheit dieser drei Plasmide im *spc7-23* Stamm zeigte, dass zusätzliches *btf3*⁺ oder *mpd2*⁺ fähig

waren, die Temperatursensitivität dieses Stammes zu supprimieren (Abbildung 3.22 B). Die Suppression war allerdings schwächer als die, die in den *spc7-23* Zellen auftrat, die das V11-Plasmid enthielten. Während die Anwesenheit von V11 zum Wachstum der *spc7-23* Zellen bis einschließlich 37 °C führte, kam es durch extra *btf3*⁺ nur zu Wachstum bis 33 °C und durch zusätzliches *mpd2*⁺ bis einschließlich 34 °C (Abbildung 3.22 B).

Da die Anwesenheit des *wsp1* tragenden Plasmids keinen Effekt auf das Wachstum der *spc7-23* Mutante zeigte, kann die stärkere Suppression durch die Anwesenheit des V11-Plasmids auf einen additiven Effekt von *mpd2*⁺ und *btf3*⁺ zurückgeführt werden (Abbildung 3.22 B). Daher wurden die beiden isolierten Suppressoren detaillierter untersucht.

3.3.1.1 Weitergehende Charakterisierung des *mpd2*⁺ Suppressors

3.3.1.1.1 Die *mpd2*⁺ Überexpression führt zu einer Spc7-23-GFP Re-Assoziation an den Kinetochorkomplex

Im Folgenden wurde analysiert, wie es durch die Überexpression von *mpd2*⁺ zur Suppression des ts Phänotyps der *spc7-23* Mutante kommt. In *spc7-23* Zellen, die mit dem Kontrollvektor oder dem *mpd2*⁺ enthaltenden Vektor transformiert waren, wurde die Anzahl von wildtypischen Mitosen bei der restriktiven Temperatur bestimmt. Die *mpd2*⁺ überexprimierenden *spc7-23* Zellen zeigten zu 69 % wildtypische DNA-Segregation im Vergleich zu 36 % in *spc7-23* Zellen, die nur den Kontrollvektor enthielten (Abbildung 3.23 A). Die Überexpression von *mpd2*⁺ reduziert daher die Chromosomenfehlsegregation der *spc7-23* Mutante.

Da das mutierte Spc7-23-GFP Protein unter restriktiven Konditionen nicht mehr Kinetochor-lokalisiert ist, wurde mikroskopisch untersucht, ob die *mpd2*⁺ Überexpression zu einer Assoziation des Spc7-23-GFP Proteins am Kinetochor führt (Kapitel 3.1.2) (Kerres et al, 2007). In *spc7-23-gfp* Zellen, die den Kontrollvektor enthielten, zeigte sich bei der permissiven Temperatur (25 °C) ein schwaches Spc7-23-GFP-Signal (Abbildung 3.23 B, oben, mit Pfeil gekennzeichnet), das nach 6 h bei der restriktiven Temperatur nicht mehr detektierbar war (Abbildung 3.23 B). Im Gegensatz dazu kam es durch die erhöhte Mpd2-Menge bei 32 °C zu einer Lokalisierung von Spc7-23-GFP am Kinetochor (Abbildung 3.23 B, unten). Die Intensität des Spc7-23-GFP-Signals war in Zellen, die *mpd2*⁺ überexprimieren, höher als in denen, die nur den Kontrollvektor trugen (Abbildung 3.23 B).

Das zusätzliche Mph2 ist also in der Lage, die Spc7-23-GFP Proteinmenge am Kinetochor zu erhöhen oder zu stabilisieren.

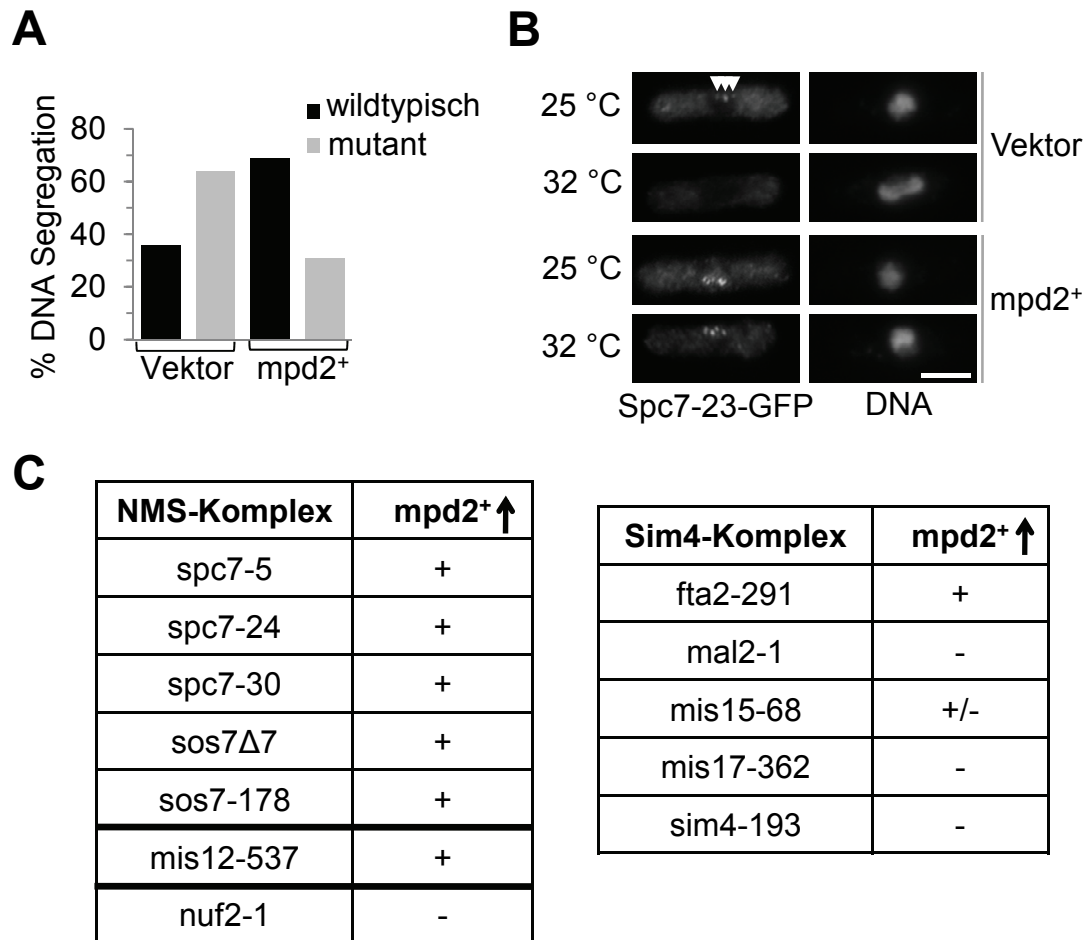


Abbildung 3.23: Die *mpd2*⁺ Überexpression supprimiert den Wachstumsdefekt verschiedener mutanter Stämme des Kinetochors.

(A) *spc7-23* Zellen transformiert mit dem Kontrollvektor oder pUR19-*mpd2*⁺, wurden in flüssigem Selektivmedium ÜN bei der permissiven Temperatur vorinkubiert. Nach weiteren 6 Stunden bei der restriktiven Temperatur von 33 °C wurden die Zellen fixiert und auf Defekte in der DNA-Segregation untersucht (n = 100). **(B)** Lokalisierung des Spc7-23-GFP Proteins in Zellen, die den Kontrollvektor oder pUR19-*mpd2*⁺ tragen, bei der permissiven Temperatur von 25 °C, oder nach 6 h bei 32 °C. Die Zellen wurden fixiert und mit anti-GFP, anti-Tubulin Antikörpern und DAPI behandelt. Das Spc7-23-GFP-Signal ist in den Zellen, die mit dem Vektor transformiert wurden, bei 25 °C zusätzlich mit Pfeilen gekennzeichnet. Balken, 5 μm. **(C)** Suppression anderer Stämme mit defekten Kinetochorkomponenten durch *mpd2*⁺. + = Suppression; - = keine Suppression; +/- = sehr schwache Suppression.

3.3.1.1.2 Zusätzliches *mpd2*⁺ supprimiert den Wachstumsdefekt einer Vielzahl von Stämmen mit mutanten Kinetochorkomponenten

Um zu testen, ob das Wachstum anderer Kinetochormutanten durch die Expression von zusätzlichem *mpd2*⁺ beeinflusst wird, wurde *mpd2*⁺ in mutanten Stämmen des NMS- bzw. Sim4-Komplexes überexprimiert. Wie in Abbildung 3.23 C dargestellt ist, wurden alle *spc7*^{ts}- und *sos7*^{ts}-Mutanten supprimiert (Abbildung 3.23 C links) (*sos7*^{ts}-Mutanten: Kapitel 3.3.3).

Zusätzlich konnte die *mis12-537* Mutante (MIND) supprimiert werden (Abbildung 3.23 C, links). Auf das Wachstum der *nuf2-1* Mutante (Ndc80) hatte die Überexpression von *mpd2*⁺ keinen Einfluss (Abbildung 3.23 C, links). Außerdem wurde durch zusätzliches *mpd2*⁺ der Wachstumsdefekt einiger mutanter Stämme des Sim4-Komplexes partiell supprimiert (Abbildung 3.23 C, rechts).

Zusammenfassend scheint es sich bei *mpd2*⁺ um einen generellen Suppressor zu handeln, deshalb wurde die Arbeit an Mpd2 nicht weiter fortgeführt.

3.3.1.2 Btf3 beeinflusst das Mikrotubuli Zytoskelett und supprimiert die Chromosomensegregationsdefekte der *spc7-23* Mutante

3.3.1.2.1 Die Suppression des ts Phänotyps der *spc7-23* Mutante durch extra *btf3*⁺ ist dosisabhängig

Da Mpd2 vermutlich ein genereller Suppressor von Kinetochormutanten ist, wurde untersucht, ob zusätzliches Btf3 ebenfalls das Wachstum von anderen mutanten Kinetochorstämmen beeinflussen kann. Von den getesteten Mitgliedern des NMS-Komplexes konnte nur der ts Phänotyp von *spc7*^{ts}-Mutanten supprimiert werden (Abbildung 3.24 A links). Interessanterweise konnte auch der Wachstumsdefekt des *mal2-1* Stammes (Sim4-Komplex) partiell durch die Überexpression von *btf3*⁺ supprimiert werden (Abbildung 3.24 A rechts).

Der *btf3*⁺-ORF wurde in verschiedene Expressionsvektoren kloniert, die unterschiedlich starke *nmt* Promotoren besitzen (Moreno et al, 2000). Unter nicht reprimierten Bedingungen kann der *nmt1*⁺-Promoter das β -Galaktosidase-Gen in der 300fachen, der *nmt41*⁺-Promoter in der 25fachen und der *nmt81*⁺-Promoter in der 8fachen Menge überexprimieren (Basi et al, 1993; Maundrell, 1990; Moreno et al, 2000). Der laut Datenbank hoch-exprimierte *btf3*⁺-ORF schien durch den endogenen Promotor, der sich vermutlich auf dem Plasmid V11 befand, in viel höherer Menge exprimiert zu werden (Wilhelm et al, 2008): die Überexpression von *btf3*⁺ durch die verschiedenen *nmt*-Promotoren führte zu einer viel geringeren Suppression des *spc7-23* Mutantenstamms als die durch den natürlichen Promotor auf dem V11-Plasmid (Abbildung 3.22 A und B; Abbildung 3.24 B).

Damit ist die Suppression des Chromosomensegregationsdefekts der *spc7-23* Mutante durch die Überexpression von *btf3*⁺ dosisabhängig. Für alle weiteren Überexpressionsanalysen wurde die *btf3*⁺ Plasmidvariante verwendet, die aus dem V11-Plasmid (pUR19- *btf3*⁺) hervorging und somit den eigenen, natürlichen Promotor aufwies.

3.3.1.2.2 Zusätzliches *btf3*⁺ führt zu einer Spc7-23-GFP Re-Lokalisierung

Da das Spc7-23-GFP Protein unter restriktiven Wachstumsbedingungen nicht mehr am Kinetochor assoziiert, wurde überprüft, ob es durch zusätzliches *btf3*⁺ zu einer Re-Lokalisierung des Spc7-23-GFP Proteins kommt (Abbildung 3.24 C). Während es in *spc7-23-gfp* Zellen, die den Kontrollvektor trugen, bei der permissiven Temperatur zu einer schwachen und bei der restriktiven Temperatur zu keiner detektierbaren Kinetochorassoziation des Spc7-23-GFP Proteins kam, fand sich bei der Überexpression von *btf3*⁺ ein deutliches Spc7-23-GFP Kinetochorsignal bei der restriktiven Temperatur (Abbildung 3.24 C). Der Verlust des Spc7-23-GFP Kinetochorsignals bei der restriktiven Temperatur geht einher mit dem Verlust der Spc7-23-GFP Proteinmenge in der Zelle was ebenfalls durch extra *btf3*⁺ supprimiert wird (Abbildung 3.24 D) (Kerres et al, 2007). Zusätzliches *btf3*⁺ scheint zur Suppression des ts Phänotyps der *spc7-23* Mutante zu führen, indem es die Spc7-23 Proteinmenge stabilisiert.

Im Rahmen der ersten Phänotypisierung war es von Interesse, wie extra Btf3 die Phänotypen der *spc7-23* Mutante supprimiert. Dafür wurden *spc7-23* Zellen, die entweder pUR19-*btf3*⁺ oder den Kontrollvektor enthielten, unter restriktiven Wachstumsbedingungen auf mitotische Defekte untersucht. Die Analyse der mitotischen Zellen mit Kontrollvektor zeigte nur 36 % der Zellen mit wildtypischer Chromatinsegregation. Zusätzliches *btf3*⁺ in den *spc7-23* Zellen hingegen befähigte 80 % der Zellen zu einer korrekten Chromatin-Segregation (Abbildung 3.24 E).

Allerdings kam es durch die Überexpression von *btf3*⁺ zu einer Veränderung des Mikrotubuli-Zytoskeletts. In mitotischen *spc7-23* Zellen, in denen das Chromatin segregiert war, zeigte sich vermehrt Mikrotubuli in der Zelle (vergleiche Abbildung 3.24 F, a mit Abbildung 3.24 F, b). Zum einen wies die Spindel eine stärkere Fluoreszenz auf (Abbildung 3.24 F, b), zum anderen war die Anzahl der Mikrotubuli, die im Rahmen der Zytokinese gebildet wurden, unverhältnismäßig hoch (Abbildung 3.24 F, b). Die übrigen 20 % der *spc7-23* Zellen, bei denen es trotz elongierter Spindel zu keiner Chromatin-Segregation kam, haben vermutlich das pUR19-*btf3*⁺ Plasmid verloren. Diese Zellen wiesen den *spc7-23* Phänotyp auf (Abbildung 3.24 F, c).

Somit zeigen meine Ergebnisse das extra *btf3*⁺ die Suppression des ts Phänotyps von *spc7-23* bewirkt, indem es die Chromosomensegregationsdefekte herabsetzt und das Spc7-23 Protein wieder an den Kinetochorkomplex binden lässt. Vermutlich geht die Suppression durch zusätzliches Btf3 auch mit einer Veränderung des Mikrotubuli-Zytoskeletts einher.

A

NMS-Komplex	<i>btf3</i> ⁺ ↑
<i>spc7-5</i>	+
<i>spc7-24</i>	+
<i>spc7-30</i>	+
<i>sos7Δ7</i>	-
<i>sos7-178</i>	-
<i>mis12-537</i>	-
<i>nuf2-1</i>	-

Sim4-Komplex	<i>btf3</i> ⁺ ↑
<i>fta2-291</i>	-
<i>mal2-1</i>	+/-
<i>mis15-68</i>	-
<i>mis17-362</i>	-
<i>sim4-193</i>	-

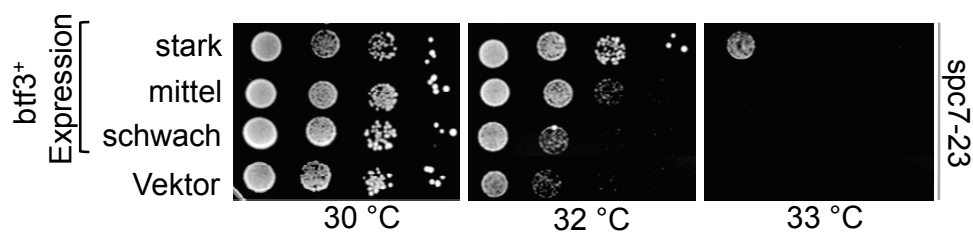
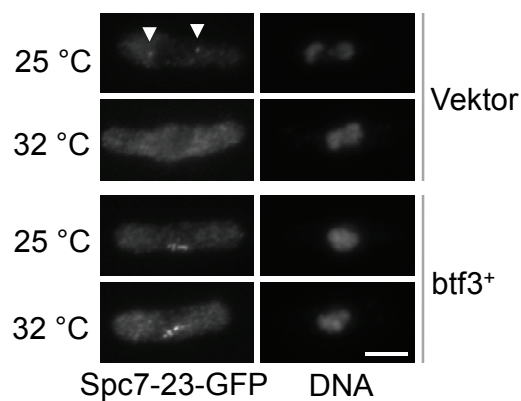
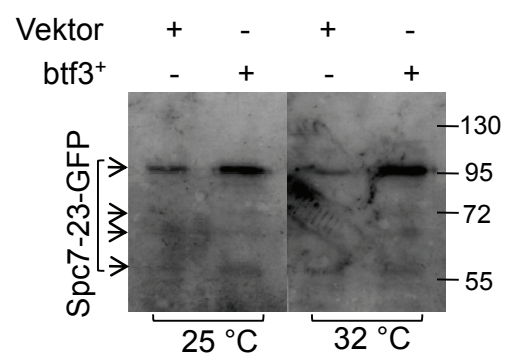
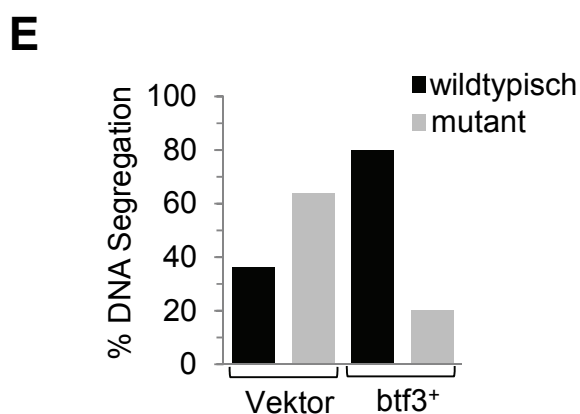
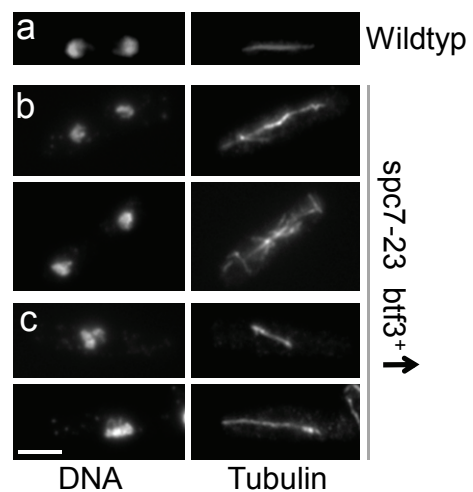
B**C****D****E****F**

Abbildung 3.24: Zusätzliches *btf3*⁺ supprimiert den Chromosomensegregationsdefekt des *spc7-23* Mutantenstammes.

(Die Legende findet sich auf der folgenden Seite)

Abbildung 3.24: Zusätzliches *btf3*⁺ supprimiert den Chromosomensegregationsdefekt des *spc7-23* Mutantenstammes.

(A) Die Überexpression von *btf3*⁺ supprimiert keine weiteren Komponenten des NMS- (links) und nur die *mal2-1* Mutante des Sim4-Komplexes (rechts). + = Suppression; - = keine Suppression; +/- = sehr schwache Suppression. (B) Die Suppression von *spc7-23* Zellen durch *btf3*⁺ ist dosisabhängig. Verschiedene Vektoren, die *btf3*⁺ von unterschiedlich starken Promotoren (*nmt1*⁺; starke Expression, *nmt41*⁺; mittlere Expression; *nmt81*⁺; schwache Expression) exprimieren, wurden in den *spc7-23* Stamm transformiert und in einem seriellen Tropftest auf ihre Suppressionsfähigkeit hin untersucht. Die Platten wurden bei den angegebenen Temperaturen 5 Tage inkubiert. Der Tropftest wurde von Eva Walla durchgeführt. (C) Mikroskopische Aufnahmen von Spc7-23-GFP in Zellen die den Kontrollvektor oder pUR19-*btf3*⁺ tragen und jeweils bei 25 °C oder 6 h bei 32 °C kultiviert wurden. Die Proben wurden fixiert und mit anti-GFP, anti-Tubulin Antikörpern und DAPI behandelt. Balken, 5 µm. (D) Der Versuchsaufbau gleicht (C), allerdings wurden Proteinextrakte zu den verschiedenen Zeitpunkten isoliert. Identische Proteinmengen wurden jeweils für die Immunpräzipitation (α-GFP) eingesetzt und die Spc7-23-GFP Proteinmenge mittels Westernblot-Analyse (α-GFP) untersucht. (E) *spc7-23* Zellen transformiert mit dem Kontrollvektor oder mit *btf3*⁺ wurden ÜN bei 25 °C vorinkubiert und für weitere 6 Stunden bei der restriktiven Temperatur von 33 °C kultiviert. Die Zellen wurden fixiert und auf mitotische Defekte hin untersucht (n = 100). (F) (a) Mitotische Wildtypzellen, die den Kontrollvektor trugen oder *spc7-23* Zellen, die *btf3*⁺ überexprimieren, wurden 6 h bei der restriktiven Temperatur von 32 °C inkubiert. In (b) sind *btf3*⁺ überexprimierende *spc7-23* Zellen zu sehen, bei denen es zu einer Chromosomensegregation kommt (80 %), während in (c) die *btf3*⁺ überexprimierenden *spc7-23* Zellen keine DNA-Separation trotz elongierter Spindel zeigen (20 %). Die Zellen wurden mit anti-Tubulin Antikörper und DAPI behandelt (n = 50). Balken, 5 µm.

3.3.1.2.3 Das Btf3 Protein lokalisiert hauptsächlich im Zytoplasma

Aufgrund obiger Ergebnisse schien eine Interaktion von Btf3 mit dem Mikrotubuli-Zytoskelett nicht ausgeschlossen. Um zu überprüfen, ob Btf3 mit Mikrotubuli-Strukturen assoziieren kann, wurde der endogene *btf3*⁺-ORF mit GFP bzw. 3xHA fusioniert und die subzelluläre Lokalisierung des Fusionsproteins bestimmt (Abbildung 3.25 A). Btf3-GFP fand sich sowohl in der Interphase als auch während verschiedener Stadien der Mitose im Zytoplasma verteilt wieder (Abbildung 3.25 B). Diese Daten konnten mit Btf3-3xHA reproduziert werden (Daten nicht gezeigt). Geringe Mengen des Proteins sind im Zellkern, denn überexprimiertes Btf3-YFP akkumuliert durch die Zugabe des Exportin Inhibitors Leptomycin B im Zellkern (<http://www.riken.jp/SPD/31/31F10.html>) (Kudo et al, 1999; Matsuyama et al, 2006).

Btf3 ist somit ein hauptsächlich zytoplasmatisch lokalisiertes Protein. Eine transiente Assoziation von einem geringen Anteil an Btf3 mit Tubulin im Zytoplasma oder im Kern mit der mitotischen Spindel kann durch die Immunfluoreszenz Aufnahmen nicht ausgeschlossen werden.

3.3.1.2.4 Btf3 ist ein nicht-essentielles Protein, das die Anzahl der Mikrotubuli beeinflusst

Zu Beginn meiner Analyse war nicht bekannt, ob Btf3 essentiell für das Wachstum von *S. pombe* ist. Aus diesem Grund wurde das *btf3⁺*-Gen gegen eine Kanamycin-Kassette ausgetauscht (Daten nicht gezeigt). Auch nach der Deletion des *btf3⁺*-ORF war der *S. pombe* Stamm lebensfähig, so dass es sich bei Btf3 um ein nicht-essentielles Protein handelt.

Die *btf3Δ* Mutante zeigte verlangsamtes Wachstum im Vergleich zum Wildtyp (Abbildung 3.25 C). Dies war auch im seriellen Tropftest auf Vollmedium bei allen getesteten Temperaturen (25 °C-37 °C) zu erkennen (Daten nicht gezeigt). Da die Überexpression von *btf3⁺* in dem *spc7-23* Stamm zu veränderten Mikrotubuli-Strukturen geführt hat, wurde das Wachstum von *btf3Δ* auf TBZ-haltigem Medium getestet, das einen negativen Einfluss auf das Mikrotubulizytoskelett hat.

Im Vergleich zum Wildtypstamm ist die *btf3Δ* Mutante TBZ resistenter (Abbildung 3.25 D). Dies legte den Verdacht nahe, dass auch die Deletion von *btf3⁺* einen Effekt auf das Tubulin-Zytoskelett hat. Um zu untersuchen, ob auch die Überexpression von *btf3⁺* die Mikrotubuli-Strukturen direkt beeinflusst, wurde zusätzliches Btf3 in den kältesensitiven *nda3^{cs}* und *nda2^{cs}* Tubulinmutanten überexprimiert (Hiraoka et al, 1984; Umesono et al, 1983). Das extra Btf3 führte zu keinerlei Veränderung des Wachstums der mutanten Stämme der Tubulinkomponenten (Daten nicht gezeigt).

Das Mikrotubuli-Zytoskelett der *btf3Δ* Mutante wurde im Rahmen einer Immunfluoreszenz Analyse näher untersucht (Abbildung 3.25 E). Während in den Interphase-Zellen die Mikrotubuli fixiert werden konnten (Abbildung 3.25 E, a), zeigten die Zellen, die sich in der frühen bis mittleren Anaphase befanden, keine mitotische Spindel, wohl aber Strukturen, die auf Astralmikrotubuli hindeuten (Abbildung 3.25 E, b). Auch zwei Wiederholungen des Experiments bestätigten, dass die mitotische Spindel nicht fixierbar und damit nicht analysierbar war, was vermutlich daran lag, dass die Spindel im *btf3Δ* Stamm fragiler als im Wildtyp war (Abbildung 3.25 E, b). Daraufhin wurde *gfp-atb2⁺* verwendet, das es erlaubte, das Mikrotubuli-Zytoskelett in lebenden Zellen zu untersuchen (Kapitel 3.1.7)(Garcia et al, 2001). Nach dem Kreuzen des *gfp-atb2⁺* in den *btf3Δ* Stammhintergrund zeigte sich eine negative genetische Interaktion. Bei Temperaturen von 34 °C oder höher konnte der *gfp-atb2⁺ btf3Δ* Stamm nicht wachsen (Abbildung 3.25 F). Deshalb wurde die Mikrotubuli-Dynamik bei der permissiven Temperatur von 30 °C analysiert. Die Untersuchung zeigte, dass die Interphase-Mikrotubuli in der *btf3Δ* Mutante in geringerer Zahl vorlagen als im Wildtyp (Abbildung 3.25 G). Es zeigte sich für den Wildtyp eine durchschnittliche Anzahl von 3,7 Mikrotubuli pro Zelle, während die *btf3Δ* Mutante nur 2,4 Mikrotubuli pro Zelle aufwies.

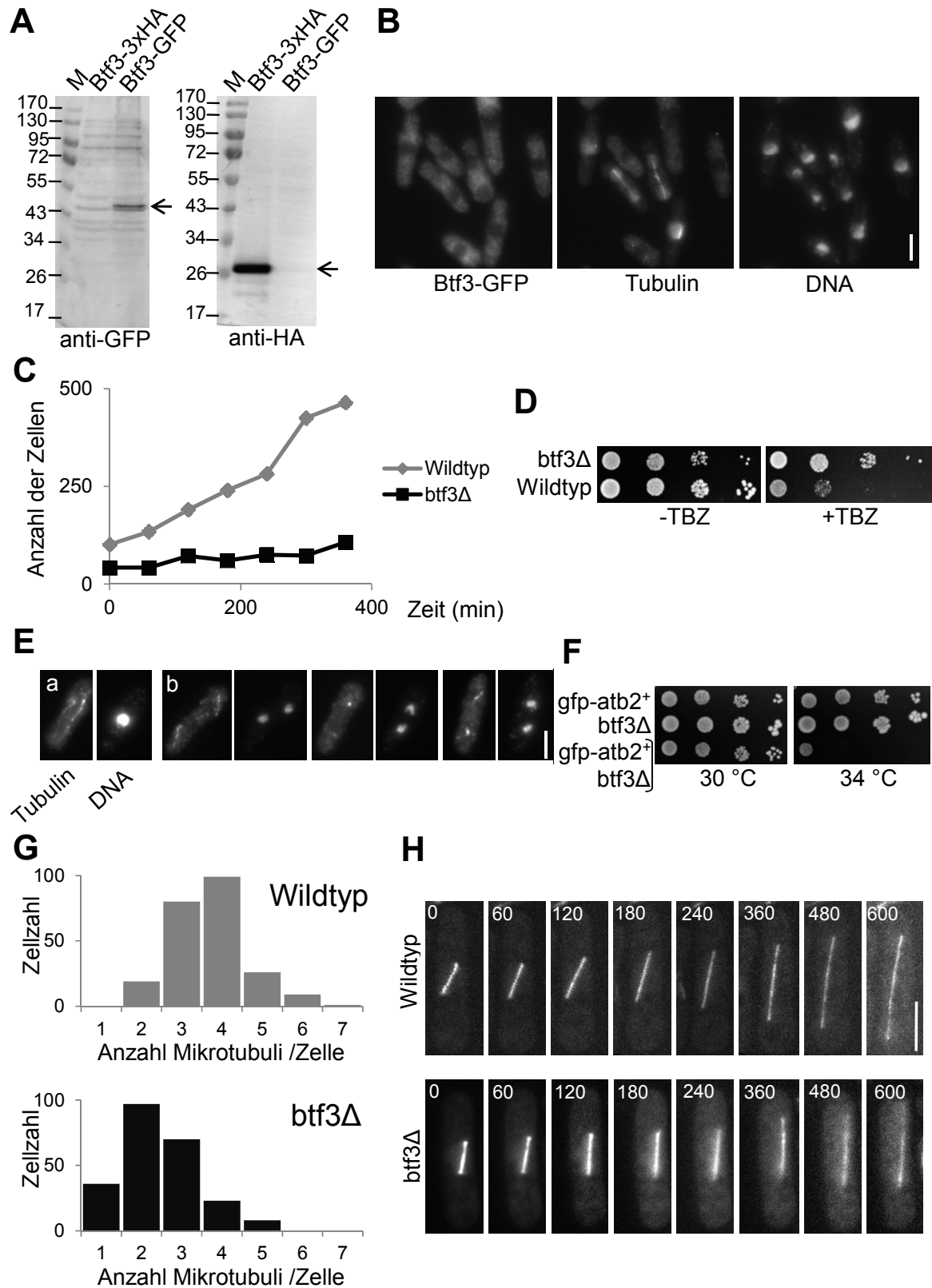


Abbildung 3.25: Die Anzahl der Mikrotubuli ist im *btf3Δ* Stamm verringert.

(Die Legende findet sich auf der nächsten Seite)

Abbildung 3.25: Die Anzahl der Mikrotubuli ist im *btf3Δ* Stamm verringert.

(A) Proteinextrakte wurden aus einer Btf3-GFP bzw. Btf3-3xHA Kultur isoliert und mittels Westernblot-Analyse (anti-GFP bzw. anti-HA Antikörper) untersucht. Das Btf3-GFP Protein (mit Pfeil gekennzeichnet) zeigte die erwartete Laufhöhe von ca. 45 kDa (Btf3: 16,2 kDa + GFP: 27 kDa), während bei Btf3-3xHA (mit Pfeil gekennzeichnet) ein Signal von ca. 28 kDa detektiert wurde, obwohl seine molekulare Masse eigentlich bei 19 kDa liegt. M = Marker (kDa). **(B)** Mikroskopische Aufnahmen des endogen mit GFP fusionierten Btf3 Proteins während des Zellzyklusses. Die Zellen wurden fixiert und mit anti-GFP, anti-Tubulin Antikörpern und DAPI markiert. Aufgrund der Fixierung war in den Interphase Zellen kein Tubulinsignal detektierbar (Kapitel 2.15). Balken, 5 µm. **(C)** Die Zellzahl einer logarithmisch wachsenden Wildtyp bzw. *btf3Δ* Kultur wurde über die Zeit bei 30 °C ermittelt. **(D)** Der *btf3Δ* Stamm ist TBZ resistenter als der Wildtypstamm. Die Inkubation des Tropftests der Wildtyp und *btf3Δ* Zellen erfolgte bei 25 °C für 6 Tage. (TBZ: 10 µg/ml) **(E)** Mikroskopische Aufnahmen von fixierten Zellen in der Interphase (a) oder in der Mitose (b). Die Zellen wurden bei 30 °C vorinkubiert, nach der Fixierung wurde das Tubulin und die DNA mit einem anti-Tubulin Antikörper und DAPI behandelt. Balken, 5µm. **(F)** *gfp-atb2*, *btf3Δ* und die Doppelmutante wurden auf YE5S-Platten getropft. Die Platten wurden bei den unterschiedlichen Temperaturen für 3 Tage inkubiert. **(G)** Die Anzahl der Mikrotubuli pro Zelle während der Interphase wurde lebend im Wildtyp und im *btf3Δ* Stamm mit Hilfe von GFP-Atb2 bei 30 °C bestimmt (n = 234). Es wurden nur G2-Zellen ausgewertet. **(H)** Lebendaufnahmen einer mitotischen Spindel im Wildtyp oder im *btf3Δ*-Stamm (die Spindel wurde mittels GFP-Atb2 markiert). Die Zellen wurden bei 30 °C inkubiert. Balken, 5 µm. Die in (C), (D) und (F) durchgeführten Versuche wurden von Eva Walla nach meiner Vorgabe ausgeführt, für (A) hat Eva Walla die Proteinextrakte isoliert und die anschließende Westernblot Analyse der von mir generierten Stämme durchgeführt.

Bei dieser Differenz handelt es sich um einen signifikanten Unterschied ($p < 0,001$) (ermittelt durch den T-Test).

Wie in Abbildung 3.25 G zu sehen ist, zeigte *btf3Δ* hauptsächlich zwei oder drei Mikrotubuli pro Zelle, während der Wildtyp hauptsächlich drei oder vier Mikrotubuli aufwies (Abbildung 3.25 G). In lebenden *btf3Δ* Zellen konnte, im Gegensatz zu fixierten Zellen, mittels GFP-Atb2 die Spindel detektiert werden. Erste Daten offenbarten, dass die Dynamik, mit der die Spindel in *btf3Δ* Zellen elongiert, der des Wildtypstammes glich (Abbildung 3.25 H). Allerdings erstreckt sich die mitotische Spindel in der *btf3Δ* Zelle nicht über die gesamte Zelle, bevor diese in die Zytokinese eintritt (Abbildung 3.25 H und Daten nicht gezeigt). Bei einer Länge von 8,7 µm beendet die *btf3Δ* Zelle die Spindelelongation und tritt in die Zytokinese ein, während sich die Spindel der Wildtypzelle über eine Länge von 11 µm erstreckt bevor der Abbau der Spindel eingeleitet wird (Abbildung 3.25 H und Daten nicht gezeigt).

Btf3 scheint sowohl während der Interphase als auch Mitose einen Einfluss auf das Mikrotubulizytoskelett zu haben. Die Tatsache, dass die mitotische Spindel in Immunfluoreszenz Analysen im *btf3Δ* Stamm nicht fixierbar ist, lässt vermuten, dass die Spindelstruktur fragiler als im Wildtypstamm ist.

3.3.1.2.5 Durch die Abwesenheit von Btf3 wird das Wachstum von mutanten Kinetochorstämmen negativ beeinflusst

Zuletzt wurde untersucht, ob die Abwesenheit von *btf3*⁺ einen negativen Effekt auf Komponenten des Kinetochors hat. In Abbildung 3.26 A sieht man, dass die *spc7-23 btf3Δ* Doppelmutante im Gegensatz zu den Einzelmутanten bei 30 °C verschlechtertes und bei 31 °C gar kein Wachstum zeigte. Ähnliche Beobachtungen konnten in Bezug auf Komponenten des Sim4-Komplexes gemacht werden. Das Wachstum der *mal2-1 btf3Δ* und *fta2-291 btf3Δ* Doppelmutanten war bei 25 °C leicht verschlechtert, bei 28 °C sehr gering und bei 30 °C, im Gegensatz zu den Einzelmутanten, nicht mehr vorhanden (Abbildung 3.26 B). Somit bestehen zwischen Btf3 und Komponenten des Kinetochors starke genetische Interaktionen.

Btf3 konnte als neuer genetischer Interaktionspartner von Spc7 identifiziert werden. Btf3 scheint über seinen Einfluss auf die Mikrotubuli, die in dieser Arbeit erstmal beschrieben wurden, mit Spc7 zu interagieren. Eine weitere Aufschlüsselung in der Zukunft sollte Auskunft über die genaue Rolle von Btf3 in der Mitose geben.

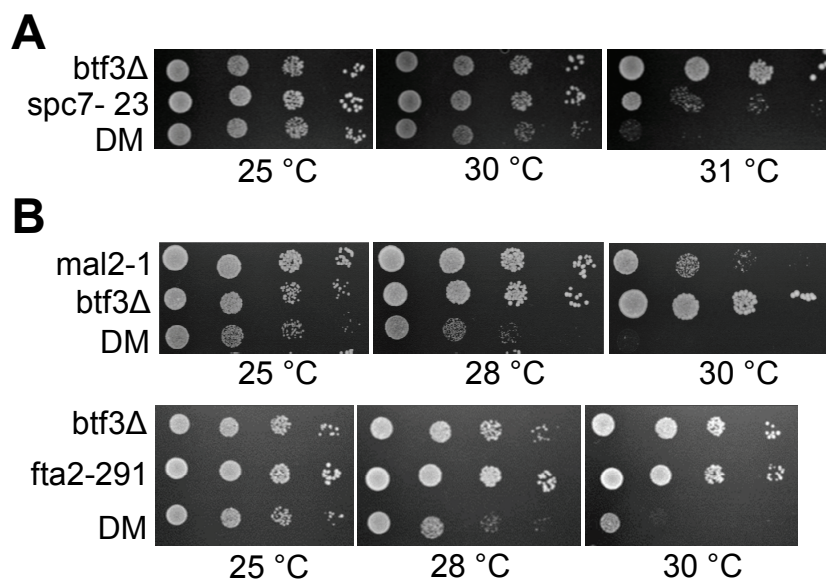


Abbildung 3.26: Die Abwesenheit von Btf3 führt zur Verschlechterung des Wachstums von Stämmen mit mutanten Kinetochorkomponenten.

(A) und (B) Kinetochordoppelmutanten wurden in einem Tropftest auf Wachstumsdefekte bei unterschiedlichen Temperaturen untersucht. (A) Die *spc7-23* Mutante wurde mit *btf3Δ* gekreuzt und im Tropftest analysiert. (B) Zusätzlich wurden die *mal2-1* bzw. *fta2-291* Mutanten (Sim4-Komplex) mit *btf3Δ* gekreuzt und samt Ausgangsstämmen auf YE5S-Platten getropft. Die Platten wurden bei den unterschiedlichen Temperaturen für 5 Tage inkubiert. Die Doppelmutanten wurden von Eva Walla nach meiner Vorgabe mittels Tetradenanalyse erzeugt und getropft.

3.3.2 Extra Sos8 supprimiert den temperaturabhängigen Phänotyp vieler Stämme mit mutanten Kinetochor-komponenten

In der *spc7-23* Multikopien-Suppressoranalyse wurden vier Plasmide isoliert, die ein genomisches *S. pombe* DNA-Fragment enthielten, auf dem mindestens die ORFs SPAC29E6.07- SPAC29E6.10c kodiert waren, hier durch das Suppressorplasmid V5 gezeigt (Abbildung 3.27 A) (Kapitel 3.3). Der ORF mit dem systematischen Namen SPAC29E6.10c war bereits als Suppressor der *mis12-537* Mutante isoliert worden (Obuse et al, 2004). Da Mis12 eng mit Spc7 interagiert sollte getestet werden, ob extra SPAC29E6.10c den Wachstumsdefekt der *spc7-23* Mutante supprimieren kann. Durch Umklonieren wurde ein Plasmid erzeugt, das SPAC29E6.10c samt der auf dem Plasmid vorhandenen Promotorregion enthielt und ein kurzes Teilfragment des SPAC29E6.09 ORFs, das keinen natürlichen Promotor enthielt und das vermutlich nicht funktionell ist (Abbildung 3.27 A). Die Anwesenheit des verkürzten Plasmids (V5-Acc651) konnte wie das V5 Plasmid den ts Phänotyp des *spc7-23* Mutantenstammes supprimieren (Abbildung 3.27 B und Daten nicht gezeigt).

Da sowohl der ts Phänotyp der *spc7-23* als auch der *mis12-537* Mutante durch die Überexpression des von nun als Sos8 („*suppressor of spc7-23*“) bezeichneten Proteins supprimiert werden konnte wurde geprüft, ob andere Kinetochormutanten ebenfalls durch zusätzliches *sos8*⁺ supprimiert werden können. Der mutante Phänotyp aller weiteren *spc7*^{ts} Mutanten und der *sos7*^{ts} Mutanten (siehe Kapitel 3.3.3) wurde durch zusätzliches Sos8 supprimiert. Nur das Wachstumsverhalten des *nuf2-1* Mutantenstammes wurde nicht durch extra *sos8*⁺ verändert, somit hatte die Überexpression von Sos8 nur auf den Ndc80-Komplex des NMS-Superkomplexes keinen Einfluss (Abbildung 3.27 C). Der Wachstumsdefekt vieler mutanter Stämme des Sim4-Komplexes, außer der des *mis15-68* Mutantenstammes, konnte ebenfalls durch zusätzliches *sos8*⁺ supprimiert werden (Abbildung 3.27 C links). Somit hat Sos8 möglicherweise einen generellen Effekt auf das Kinetochor, der es ihm ermöglicht, diverse Kinetochormutanten zu supprimieren.

In einem genomweiten Ansatz wurde die Lokalisierung von Sos8, allerdings nicht unter endogenen Bedingungen, bestimmt (Matsuyama et al, 2006). Sos8 lokalisiert konzentriert in Flecken im Zytoplasma, die keinem bekannten Kompartiment der Zelle zugeordnet werden konnten (http://www.riken.jp/SPD/Img_page/30_iP/30C07_Loc.html) (Matsuyama et al, 2006). Um herauszufinden wo das endogene Sos8 lokalisiert, wurde der *sos8*⁺-ORF 3' mit *gfp* fusioniert. Doch weder in einer lebenden noch in fixierten Sos8-GFP Zellen konnten

GFP-Signale detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Dies könnte durch eine unter der Detektionsgrenze liegende Sos8 Proteinmenge oder durch falsche Annotation des *sos8*⁺-ORFs erklärt werden. Aus Zeitgründen ist keine weitere Analyse des *sos8*⁺ erfolgt.

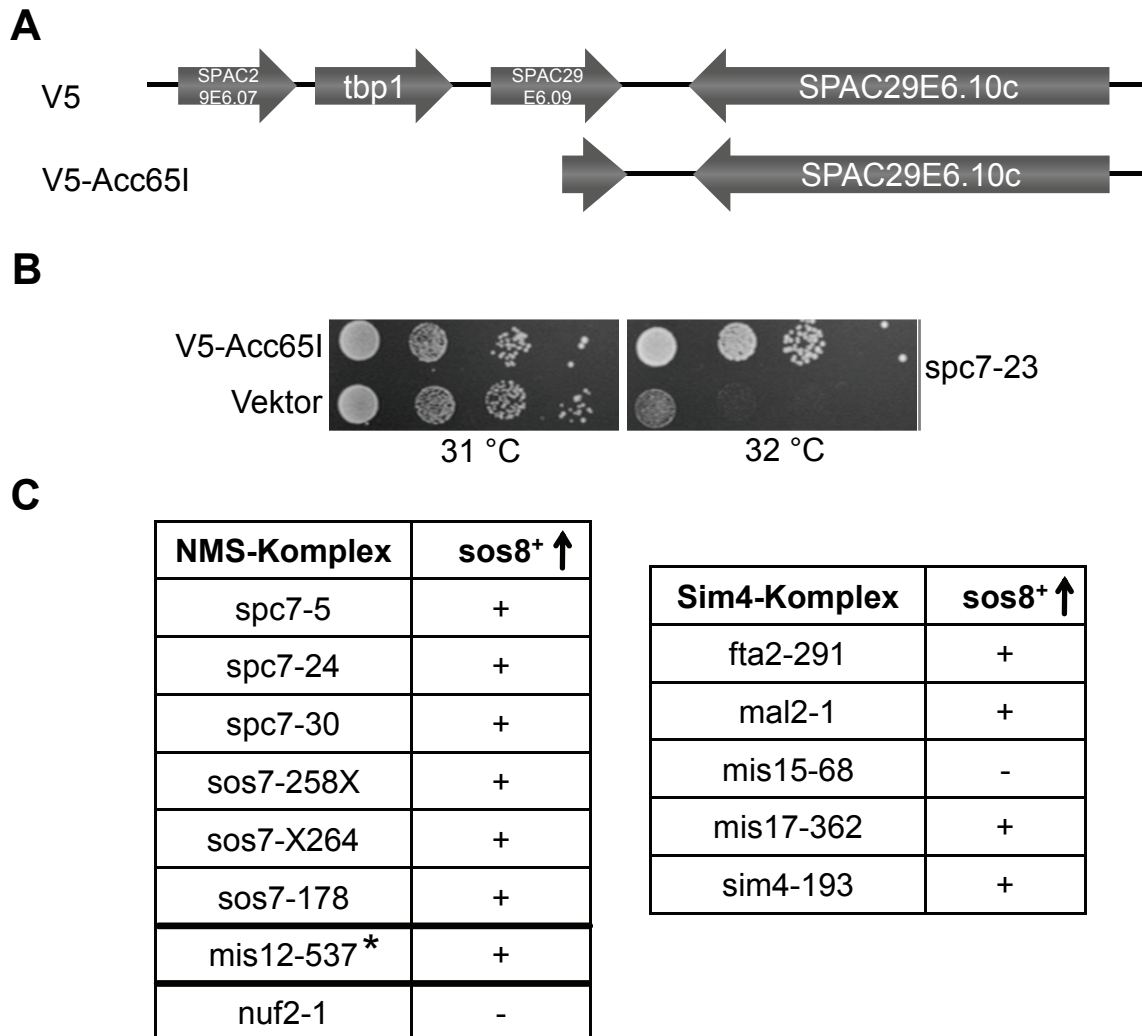


Abbildung 3.27: Extra *sos8*⁺ führt zum Wachstum einer Vielzahl von mutanten Kinetochorkomponenten bei der vormals restriktiven Temperatur.

(A) Das aus der *spc7-23* Multikopien-Suppressoranalyse isolierte V5 Plasmid enthält ein 8550 Bp großes genomisches *S. pombe* DNA-Fragment von Chromosom I (4414372-4422921 Bp), auf dem vier vollständige ORFs kodiert sind. Drei weitere Genbankplasmide wurden isoliert, die ebenfalls mindestens dieses Fragment enthielten. Durch das Restriktionsenzym *Acc65I* wurde ein 3708 Bp großes DNA-Fragment des V5 Plasmids entfernt, so dass das resultierende Plasmid (V5-Acc65I) nur den SPAC29E6.10c-ORF und die letzten 435 Bp des 1020 Bp umfassenden SPAC29E6.09-ORFs enthielt. Die Pfeile zeigen die Transkriptionsrichtung an. (B) Das in (A) beschriebene Plasmid V5-Acc65I und der Kontrollvektor wurden in die *spc7-23* Mutante transformiert und auf ihre Suppressionsfähigkeit in einem Tropftest untersucht. Die selektiven Platten wurden bei den angegebenen Temperaturen für 5 Tage inkubiert. (C) Extra *sos8*⁺ supprimiert Komponenten des NMS- (links) bzw. des Sim4-Komplexes (rechts). + = Suppression; - = keine Suppression; * = publiziert in Obuse et al, 2004.

3.3.3 Die NMS-Komponente *Sos7* ist essentiell für die Chromosomensegregation in *S. pombe* und Mitglied einer neuen evolutionär konservierten Kinetochorproteinfamilie

3.3.3.1 Identifizierung von *sos7*⁺ als Suppressor des ts Phänotyps der *spc7*^{ts} Mutanten

Die in *spc7-23* durchgeführte Multikopien-Suppressoranalyse identifizierte 11 Plasmide, die mindestens die vier in Abbildung 3.28 A aufgeführten ORFs enthielten (V7-Genbankplasmid als Beispiel). Somit handelte es sich bei diesem extragenen Suppressor um einen starken Interaktionspartner von Spc7, deren Analyse einen Hauptteil meiner Doktorarbeit darstellt. Die Anwesenheit von V7 supprimierte den ts Phänotyp der *spc7-23* Mutante unabhängig vom Spc7 Interaktionspartner Mal3 (Abbildung 3.28 A). Allen vier Genprodukten wurde über Homologie eine Funktion zugeordnet. Bei Sen2 handelt es sich um eine putative Untereinheit der t-RNA Splicing Endonuklease. Rlp3703 stellt vermutlich ein Protein der 60 S Ribosomen dar und SPAPB17E16.08 kodiert für ein putatives N-Glykolysierungsprotein. Der vierte ORF, SPAPB17E12.06, wurde aufgrund eines zusätzlichen Nukleotids in Exon II als Pseudogen definiert (*S. pombe* gene DB, Sanger Zentrum, Cambridge, Großbritannien). Über Subklonierungen wurde der ORF identifiziert, der die Suppression hervorrief. Nachdem ausgeschlossen wurde, dass Sen2, Rlp3703 oder das von SPAPB17E16.08 kodierte Protein als Suppressor der *spc7-23* Mutante agierten, kam nur noch der SPAPB17E12.06-ORF in Frage (Abbildung 3.28 C). Tatsächlich war die Überexpression von SPAPB17E12.06 ausreichend, um den ts Phänotyp der *spc7-23* Mutante in gleichem Maße zu supprimieren, wie dies in Anwesenheit des V7 Plasmids geschah (Abbildung 3.28 C). Mit einer Analyse der c-DNA sollte Aufschluss über das von SPAPB17E12.06 kodierte Protein gewonnen werden. Die c-DNA des SPAPB17E12.06 ORF wurde aus einer *S. pombe* c-DNA Bank isoliert und sequenziert (Kapitel 2.11). Die Sequenzierung zeigte, dass der SPAPB17E12.06 ORF falsch annotiert wurde, da es ein fünftes Intron gab (Abbildung 3.28 D). Dieses führte zum Wegfall des zusätzlichen Nukleotids, das die Einordnung als Pseudogen verursachte. Außerdem begann das erste Intron vier Nukleotide früher als in der Datenbank angegeben (Abbildung 3.28 D). Der bisher unbekannte ORF wurde als *sos7*⁺ („suppressor of *spc7*“) bezeichnet und besteht aus 795 Bp, die für ein 264 AS Protein mit einer molekularen Masse von 30,5 kDa kodieren.

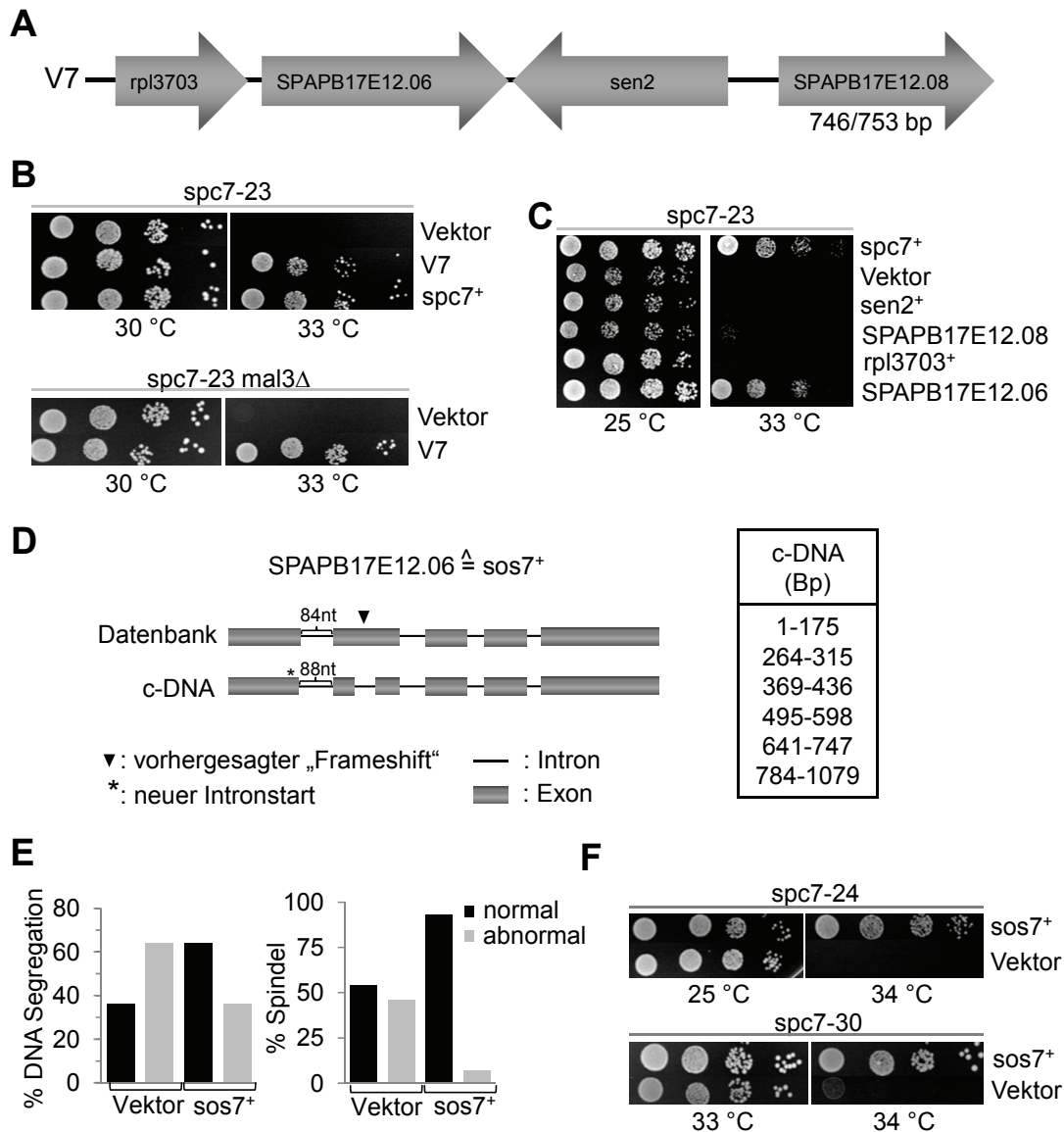


Abbildung 3.28: *sos7+* supprimiert die aberranten Phänotypen der *spc7-23* Mutante.

(A) Schematische Darstellung des 5144 Bp großen genomischen *S. pombe* DNA Fragments von Chromosom I (1275065-1280218 Bp) des V7-Suppressorplasmids. Auf dem Fragment sind die Informationen für drei vollständige ORFs (*rpl3703*⁺, SPAPB17E12.06 und *sen2*⁺) und die ersten 746 Bp des 753 Bp fassenden SPAPB17E12.08-ORF kodiert. Die Pfeile geben die Leserichtung an.

(B) Serieller Tropftest (10^4 - 10^1 Zellen) des *spc7-23* bzw. *spc7-23 mal3Δ* Mutantenstammes, der *spc7+* oder das V7-Plasmid (V7) trägt. Die Platten wurden bei der permissiven (30 °C) und restriktiven (33 °C) Temperatur für 5 Tage inkubiert.

(C) Tropftest des *spc7-23* Stammes, der jeden der in (A) dargestellten ORFs separat überexprimiert. Als Kontrolle dienten *spc7+* und der Vektor. Die Platten wurden für 5-6 Tage bei den angegebenen Temperaturen inkubiert.

(D) SPAPB17E12.06 wurde aufgrund eines zusätzlichen Nukleotids (Position ist mit einem Pfeil gekennzeichnet) als Pseudogen definiert. Die Analyse der c-DNA ergab, dass die Region, die das zusätzliche Nukleotid enthalten sollte, nicht Part der c-DNA ist. Zusätzlich beginnt das erste definierte Intron 4 Nukleotide früher als annotiert. Die c-DNA Sequenz ist angegeben. 795 Bp kodieren somit für ein aus 264 AS bestehendes Sos7 Protein.

(E) Quantitative Analyse der Suppression der Chromatinsegregations- oder der mitotischen Spindeldefekte der *spc7-23* Mutante durch *sos7+* bei der semi-permissiven Temperatur (34 °C). Die Zellen wurden fixiert und mit DAPI und dem anti-Tubulin Antikörper behandelt (n = 100).

(F) Tropftest der *spc7-24* und *spc7-30* Mutantenstämme, die den Kontrollvektor oder *sos7+* tragen, bei den angegebenen Temperaturen. Die Inkubation erfolgte für 5-6 Tage.

Um zu überprüfen, wie zusätzliches Sos7 den ts Phänotyp der *spc7-23* Mutante supprimieren konnte, wurde die Chromosomenfehlsegregation und mitotischen Spindeldefekte untersucht. Durch zusätzliches Sos7 kam es zur Herabsetzung der Defekte in der Chromosomensegregation von 64 % auf 36 %. Die Fehler im Spindelaufbau und ihrer Funktion wurden von 46 % auf 7 % reduziert (Abbildung 3.28 E).

Weiterhin wurde überprüft, ob extra Sos7 den Wachstumsdefekt der übrigen *spc7^{ts}* Mutanten supprimieren konnte (Kerres et al, 2007). Auch die *spc7-24* und *spc7-30* Mutantenstämme konnten durch zusätzliches Sos7 wieder bei der restriktiven Temperatur wachsen, so dass es sich nicht um eine allelspezifische Suppression der *spc7-23* Mutante handelte (Abbildung 3.28 F).

Sos7⁺ ist somit ein neues, bisher falsch annotiertes Gen in *S. pombe*. Sos7 wurde als genetischer Interaktionspartner von Spc7 identifiziert.

3.3.3.2 Die Überexpression von Sos7 führt zu einer Re-Lokalisierung von Spc7-23 am Kinetochor

Um zu prüfen, ob es durch zusätzliches *sos7⁺* zu einer Re-Lokalisierung des defekten Spc7-23 Proteins am Kinetochor kommt, wurde *sos7⁺* in einem *spc7-23-gfp* Stamm überexprimiert. Eine Überexpression von *sos7⁺* konnte den ts Phänotyp des *spc7-23-gfp* Stammes jedoch nicht supprimieren. Dies resultiert vermutlich aus der Tatsache, dass Spc7 und Sos7 über ihren jeweiligen C-Terminus interagieren und die C-terminale GFP-Fusion diese Interaktion stört (siehe später). Deshalb konnte die Untersuchung nur im *spc7-23* Stamm erfolgen. Aus diesem Grund wurde ein *S. pombe* anti-Spc7 Antikörper generiert. Als Antigen diente der C-Terminus von Spc7 (821-1364 AS). *spc7-c* wurde in einen *E. coli* Expressionsvektor kloniert und N-terminal an 6xHis fusioniert (Kapitel 2.13). Das Spc7-C Antigen zeigte ein Signal auf der erwarteten Höhe im SDS-Gel und konnte mit Hilfe des anti-penta-His Antikörpers im Westernblot detektiert werden (Abbildung 3.29 A). Das Spc7-C Antigen wurde für die Immunisierung zweier Hasen eingesetzt (Kapitel 2.13). Der erhaltene polyklonale anti-Spc7 Antikörper wurde in der Westernblot Analyse getestet, indem der Proteinextrakt eines endogen Spc7-GFP exprimierenden Stammes isoliert und mit dem anti-GFP Antikörper immunpräzipitiert wurde. Mittels des anti-GFP und anti-Spc7 Antikörpers konnten im Westernblot die vier charakteristischen Spc7-GFP-Signale detektiert werden (Abbildung 3.29 B, oben). Das Prä-Immun Serum diente als Kontrolle (Abbildung 3.29 B, oben).

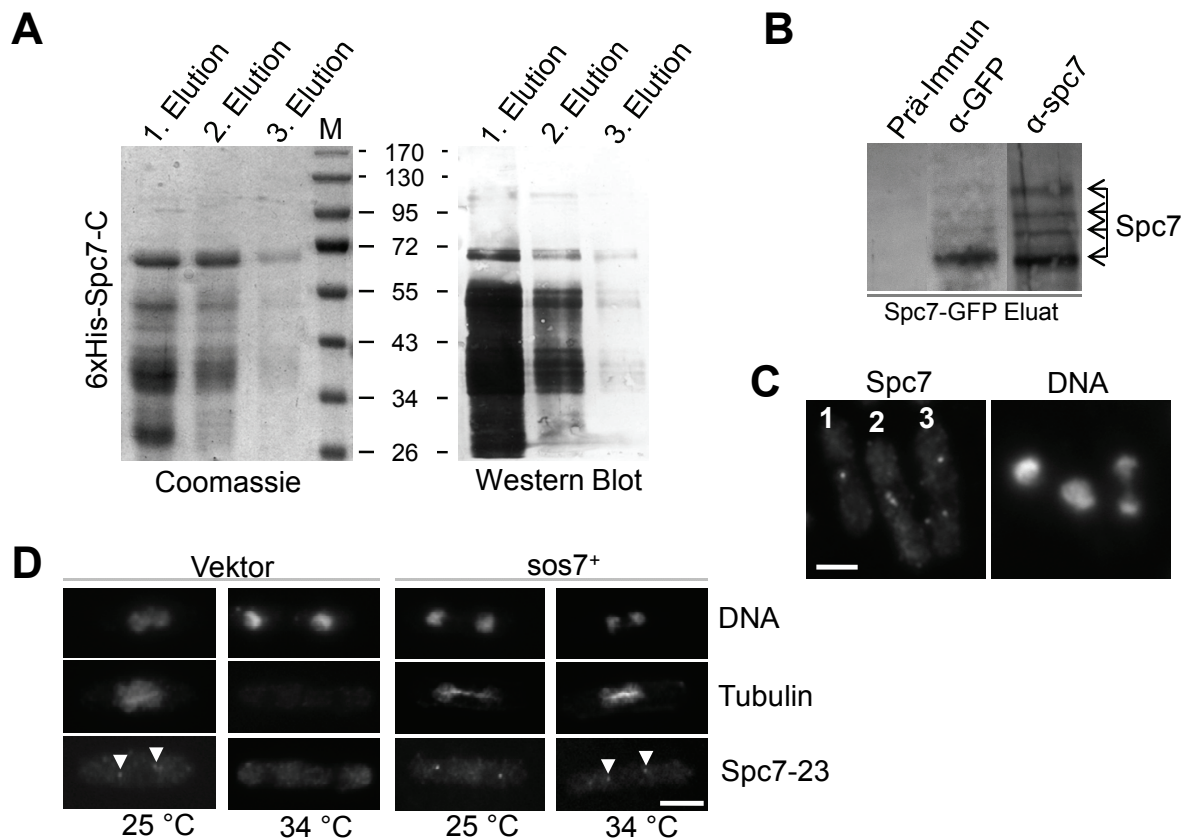


Abbildung 3.29: *sos7*⁺ supprimiert die *spc7-23* Mutante durch Re-Lokalisierung des mutanten Proteins am Kinetochor.

(A) Das aus *E. coli* isolierte 6xHis-Spc7-C Protein wurde über Affinitätschromatographie mit stationärer Ni-NTA Agarose aufgereinigt und in drei Elutionen isoliert. Diese drei Elutionen wurden auf Proteingehalt und –Abbau mittels eines Coomassie gefärbten SDS-Gels überprüft (links). Im Westernblot wurde zusätzlich mit einem anti-5xHis Antikörper untersucht, ob es sich um das 6xHis-Spc7-C Protein handelt. Marker (M) in kDa. (B) Gleiche Mengen des durch Immunpräzipitation gewonnenen Spc7-GFP Eluats wurden in drei verschiedenen Ansätzen unter Verwendung des anti-GFP, des anti-Spc7 Antikörpers und des Prä-Immun Serums in einer Westernblot Analyse untersucht. (C) Immunfluoreszenzaufnahmen von Wildtypzellen (30 °C), die nach der Fixierung mit Antigen aufgereinigtem anti-Spc7 Antikörper behandelt wurden. Die DNA wurde mit DAPI behandelt. Zelle 1: Interphase; Zelle 2: Metaphase; Zelle 3: Anaphase. Balken, 5 µm. (D) Re-Lokalisierung des Spc7-23 Proteins am Kinetochor bei der restriktiven Temperatur durch die Überexpression von *sos7*⁺. Mikroskopische Aufnahmen fixierter *spc7-23* Zellen, die *sos7*⁺ bei der permissiven oder restriktiven Temperatur überexprimierten. Schwache Spc7-23 Signale wurden zusätzlich mit einem Pfeil gekennzeichnet. Der Anti-Spc7, der anti-Tubulin Antikörper und DAPI wurden verwendet. Balken, 5 µm.

Für die Immunfluoreszenz Analyse wurde der anti-Spc7 Antikörper mittels Antigenaufreinigung aufgearbeitet (Kapitel 2.13). In Interphase Zellen konnte jeweils ein mit der DNA ko-assoziiertes Spc7 Signal detektiert werden (Abbildung 3.29 C, Zelle 1). Die Kinetochore der drei *S. pombe* Chromosomen sind zu diesem Zeitpunkt eng miteinander verbunden und sind so nur als ein Signal detektierbar. Während der Metaphase waren bis zu sechs Spc7 Signale erkennbar, da die Verbindung der Kinetochore untereinander, die in

Interphase Zellen und vermutlich in der späten Mitose vorzufinden ist zu diesem Zeitpunkt aufgehoben ist (Abbildung 3.29 C, Zelle 2) (Kapitel 1.5). Nachdem alle Chromosomen bipolar an der mitotischen Spindel ausgerichtet wurden, kommt es zur Trennung der Schwesterchromatiden, die zu den entgegengesetzten Polen der Zelle gezogen werden. Zellen in Anaphase B zeigen erwartungsgemäß zwei Kinetochorsignale (Abbildung 3.29 C, Zelle 3).

Mit Hilfe des anti-Spc7 Antikörpers konnte nun die Frage beantwortet werden, ob es durch die Überexpression von *sos7*⁺ zu einer Re-Lokalisierung des Spc7-23 Proteins kommt. Dies ist der Fall: während das Spc7-23 Protein bei der permissiven Temperatur sowohl in der *sos7*⁺ überexprimierten als auch den in der den Vektor tragenden Kultur am Kinetochor assoziierte, konnte bei der restriktiven Temperatur nur in Zellen die zusätzliches *sos7*⁺ exprimierten ein Kinetochor gebundenes Spc7-23 Signal detektiert werden (Abbildung 3.29 D).

3.3.3.3 *Sos7* ist eine essentielle, konstitutive Komponente des Kinetochors

Um die subzelluläre Lokalisierung von *Sos7* zu bestimmen, wurde der endogene *sos7*⁺-ORF mit dem *gfp*-ORF fusioniert. Dies führte zu einer leichten Temperatursensitivität des *Sos7*-GFP Stammes bei Temperaturen über 35 °C (Daten nicht gezeigt). Alle weiteren Arbeiten mit diesem Stamm wurden deshalb bei Inkubationstemperaturen bis 34 °C durchgeführt. Die *Sos7*-GFP Lokalisierung ist identisch zu der eines *S. pombe* Kinetochorproteins (Fleig et al, 1996; Hayashi et al, 2004; Liu et al, 2005; Obuse et al, 2004; Pidoux et al, 2003; Takahashi et al, 1994; Tanaka et al, 2009). In Interphase Zellen wurde je ein mit der DNA ko-lokalisierendes *Sos7*-GFP-Signal detektiert (Abbildung 3.30 A Zelle 1). Während der Metaphase waren bis zu sechs *Sos7*-GFP-Signale erkennbar (Abbildung 3.30 A Zelle 2) (Kapitel 1.5). In der Anaphase B konnten zwei *Sos7*-GFP-Signale detektiert werden, von denen jeweils eins zu einem der entgegengesetzten Zellpole transportiert wurde (Abbildung 3.30 A Zelle 3). Somit handelt es sich bei *Sos7* um ein neues konstitutives Kinetochorprotein.

Um zu überprüfen, ob *Sos7* auch am SPB assoziiert, wurde ein Stamm untersucht, dessen SPB Komponente *Pcp1* mit GFP fusioniert war (Flory et al, 2002). *Sos7* wurde von mir endogen mit dem 13myc Fusionsprotein markiert. Da nur in der Metaphase die Bindung der Kinetochore untereinander und deren Assoziation an den SPB aufgehoben ist, wurde zusätzlich die Spindelkontrollpunkt-Komponente *mad2*⁺ überexprimiert. Diese führt zu einer Metaphase Arretierung und damit zu einer Anhäufung von Metaphasezellen. Die Analyse der Metaphasezellen zeigte *Sos7*-13myc einzig Kinetochor lokalisiert (Abbildung 3.30 B). Somit handelt es sich bei *Sos7* um ein *bona fide* Kinetochorprotein.

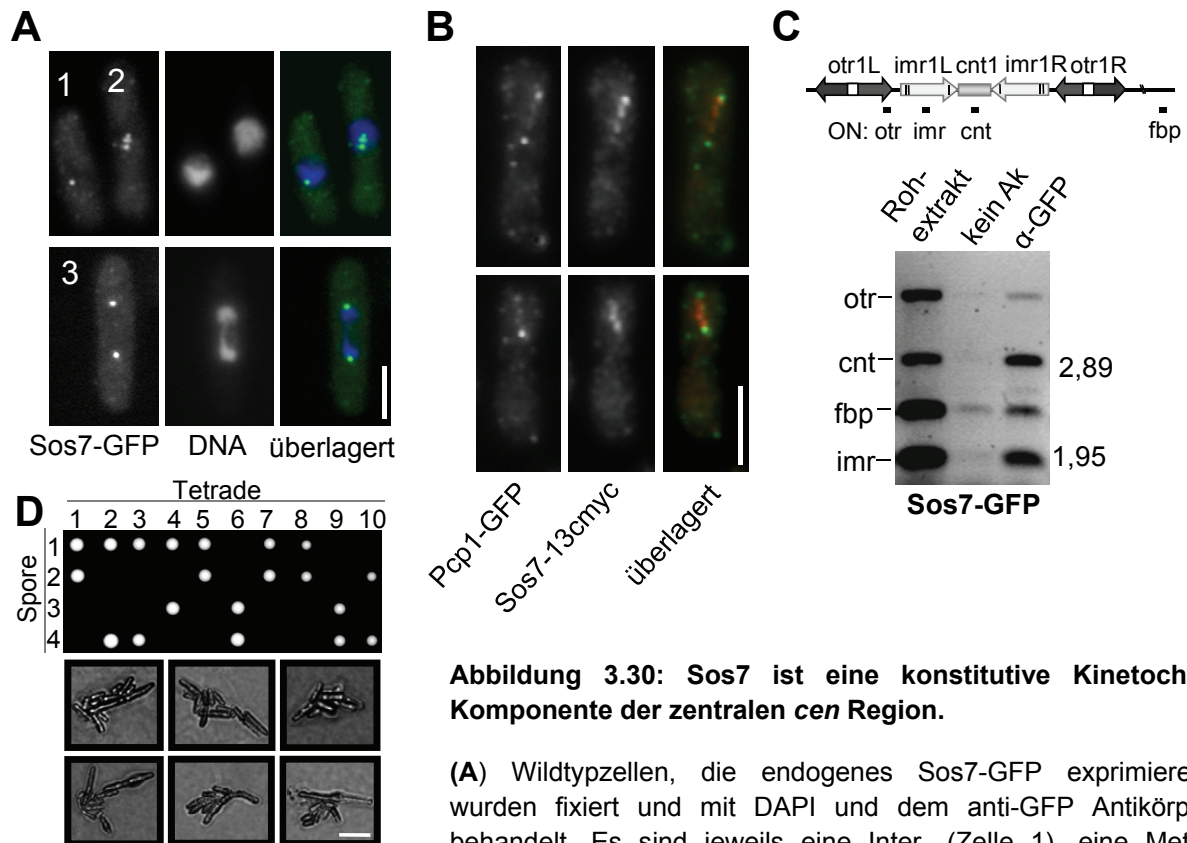


Abbildung 3.30: Sos7 ist eine konstitutive Kinetochor Komponente der zentralen *cen* Region.

(A) Wildtypzellen, die endogenes Sos7-GFP exprimieren, wurden fixiert und mit DAPI und dem anti-GFP Antikörper behandelt. Es sind jeweils eine Inter- (Zelle 1), eine Meta- (Zelle 2) und eine Anaphasen Zelle gezeigt. Die Sos7 Zellen wurden bei 30 °C inkubiert. Sos7-GFP: grün, DNA: blau. Balken, 5 µm. (B) Mikroskopische Aufnahmen von Methanol fixierten Pcp1-GFP Sos7-13cmyc Zellen, die die Spindelkontrollpunkt Komponente *mad2*⁺ überexprimieren. Sos7-13cmyc lokalisiert ausschließlich am Kinetochor (n = 50). Pcp1-GFP: grün, Sos7-13cmyc: rot. Balken, 5 µm. (C) Sos7 assoziiert mit der zentralen Region von *cen1*. Nach der Fixierung eines endogenen Sos7-GFP exprimierenden Stammes wurde unter Verwendung des anti-GFP-Antikörpers eine Chromatin Immunpräzipitation durchgeführt. Die nicht-präzipitierten und die immunpräzipitierten Extrakte wurden mittels multiplex PCR analysiert. Dafür wurden Oligonukleotide (ON) verwendet, die verschiedene Regionen des Zentromer I (*cen1*) amplifizieren: *cnt*, *imr*, *otr*. Als Kontrolle außerhalb des Zentromers wurde *fbp* eingesetzt. Der Rohextrakt gilt als Positivkontrolle. Die Anreicherung in der zentralen Region im Vergleich zum Rohextrakt ist angegeben. (D) *sos7*⁺ ist ein essentielles Gen in der Spaltheife *S. pombe*. Die Tetraden Analyse von 75 diploiden Hefezellen, die eine heterozygote *sos7* Deletion trugen, führte nur zur Bildung von zwei lebensfähigen Kolonien. Die beiden anderen Sporen germinierten zwar, nach wenigen Zellteilungen stoppte aber das Wachstum (unten). Balken, 10 µm.

Um zu überprüfen, ob die Kinetochorlokalisierung von Sos7 das Mikrotubuli-Zytoskelett benötigt, wurde einer logarithmisch wachsenden Sos7-GFP Kultur die Mikrotubuli-destabilisierende Substanz Methyl-2-benzimidazolcarbamate (MBC) zugesetzt. Diese führt zur Destabilisierung des gesamten Mikrotubulizytoskeletts (Sanchez-Perez et al, 2005). Auch nach dem Abbau des Mikrotubulizytoskeletts blieb das Sos7-GFP-Signal weiterhin Kinetochor-assoziiert, während ein weiteres Kinetochorprotein, Dam1-GFP, das abhängig vom Transport durch Mikrotubuli am Kinetochor lokalisiert, nach der Zugabe von MBC vom

Kinetochor disassoziierte (Sanchez-Perez et al, 2005) (Daten nicht gezeigt). Sos7 bindet somit unabhängig von Mikrotubuli am Kinetochor.

Mit Hilfe einer Chromatin-Immunpräzipitation sollte die Region des Zentromers bestimmt werden, an der Sos7-GFP assoziiert. Das *S. pombe* Zentromer besteht aus drei Regionen; der zentrale Kern (*cnt*), der von den inneren, sich wiederholenden Sequenzen (*imr*) und zusätzlich von den äußeren, sich wiederholenden Sequenzen (*otr*) umgeben ist. Das innere Zentromer besteht aus der *cnt* und *imr* Region und bildet die Anlagerungsplattform für den Kinetochorkomplex. Die äußere Zentromerregion wird für die Anlagerung der Kohäsine benötigt (Kapitel 1.6.1) (Kerres et al, 2006; Kerres et al, 2007; Pidoux et al, 2003). Nach der Chromatin-Immunpräzipitation von Sos7-GFP wurden mittels multiplex PCR alle drei Regionen des Zentromers und als euchromatische Negativkontrolle die *fbp* Region amplifiziert (Partridge et al, 2000). Sos7 wies nur eine Anreicherung der *cnt* und *imr* Regionen auf, die bei 2,89 bzw. 1,95 verglichen mit der Negativkontrolle lagen (Abbildung 3.30 C). Infolgedessen lokalisiert Sos7 an den Kinetochorkomplex über die zentrale Zentromerregion.

Ein Großteil der Kinetochorkomponenten ist essentiell (Jin et al, 2002; Kerres et al, 2006; Kerres et al, 2007; Nabetani et al, 2001; Pidoux et al, 2003; Takahashi et al, 1994). Für die Analyse, ob Sos7 essentiell für das Wachstum der *S. pombe* Zellen ist, wurde in einem diploiden Wildtypstamm eine Kopie des *sos7⁺* Gens durch den *his3⁺*-Marker ausgetauscht und der Stamm im Folgenden sporuliert (Kapitel 2.11). Die Analyse von 75 Tetraden ergab, dass jeweils nur aus 2 von 4 Sporen lebensfähige Kolonien hervorgingen, die alle Histidin auxotroph waren, also nicht den *sos7⁺::his3⁺* Genotyp aufwiesen (Kapitel 2.10, Abbildung 3.30 D, oben). Die *sos7⁺::his3⁺* Sporen waren zwar in der Lage zu germinieren, stellten das Wachstum jedoch nach wenigen Teilungen ein (Abbildung 3.30 D, unten).

Somit ist Sos7 ein neues, konstitutiv an der zentralen Zentromerregion assoziiertes, essentielles Kinetochorprotein.

3.3.3.4 Sos7 kann *in vivo* mit sich selbst interagieren

Um zu prüfen, ob das volllängen Sos7 mit Sos7 Varianten interagieren kann, wurde mit Ko-Immunpräzipitationen getestet. Die Experimente wurden in einem endogen *sos7-13cmyc* exprimierenden Stamm durchgeführt der zusätzlich plasmidkodiertes *sos7⁺-gfp*, *sos7-c-gfp* bzw. *sos7-n-gfp* exprimierte. Nach der Immunpräzipitation von Sos7-13cmyc konnten sowohl das volllängen Sos7-GFP als auch die N- und C-terminalen Sos7 Fragmente detektiert werden (Abbildung 3.31 B). Sos7 ist in der Lage *in vivo* mindestens Dimere zu bilden.

Sos7-13myc	+	+	+	+	+	+	+	+
Sos7-GFP	+	-	-	-	+	-	-	-
Sos7-C-GFP	-	+	-	-	-	+	-	-
Sos7-N-GFP	-	-	+	-	-	-	+	-
IP	α-cmyc	-	-	-	-	+	+	+
	α-GFP	+	+	+	+	-	-	-

Abbildung 3.31: Sos7 interagiert mit sich selbst.

Ko-Immunpräzipitation des endogen Sos7-13myc exprimierenden Stammes, der *sos7⁺-gfp*, *sos7-c-gfp* oder *sos7-n-gfp* überexprimiert. Die Proteinextrakte wurden isoliert, nachdem die Zellen 20 h bei 30 °C unter de-reprimierenden Bedingungen inkubiert wurden, und die Sos7 Varianten daraufhin mit dem anti-GFP oder dem anti-cmyc Antikörper immunpräzipitiert. Zur Detektion wurde in der Westernblot Analyse der anti-GFP Antikörper eingesetzt. + = das

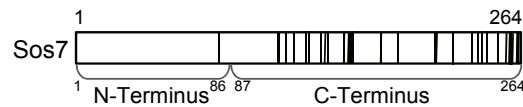
Fusionsprotein ist vorhanden bzw. mit diesem Antikörper wurde immunpräzipitiert; - = das Fusionsprotein ist **nicht** vorhanden bzw. mit diesem Antikörper wurde **nicht** immunpräzipitiert; IP = Immunpräzipitation; α = Antikörper.

3.3.3.5 Generierung und Primärcharakterisierung der *sos7^{ts}* Mutanten

Um die Funktion von Sos7 während der Mitose zu analysieren, wurden durch eine ungerichtete Mutagenese des gesamten *sos7⁺*-ORFs temperatursensitive *sos7* Allele erzeugt (Kapitel 2.11). 33 *ts* Mutantenstämme wurden isoliert, die durch plasmidkodiertes *sos7⁺* wieder wildtypisches Wachstum bei der restriktiven Temperatur zeigten (Daten nicht gezeigt). Die Sequenzierung der *sos7* ORFs offenbarte 18 verschiedene *sos7^{ts}* Mutanten (Abbildung 3.32 A und B). Der Großteil der Mutationen fand sich im C-Terminus des Sos7 Proteins. Außerdem zeigten sechs *sos7^{ts}* Mutanten Mutationen in einem der fünf Introns des *sos7* Gens (Abbildung 3.32 B).

In einer Primäranalyse wurde getestet, wie sich die plasmidkodierte Expression von *sos7⁺*, *sos7-c* (kodiert für AS 87-264) und *sos7-n* (kodiert für AS 1-86) auf das Wachstum der *sos7^{ts}* Mutantenstämme auswirkte. Die Überexpression von *sos7⁺* führte in allen *sos7^{ts}* Mutanten zu wildtypischem Wachstum bei erhöhter Temperatur (Abbildung 3.32 B). Dies war bei der Überexpression von Sos7-N nicht der Fall, in einigen Mutanten kam es zur Verschlechterung des Wachstums bei der permissiven Temperatur (Abbildung 3.32 B). Die Überexpression des plasmidkodierten Sos7-C Fragments konnte den Wachstumsdefekt von einigen *sos7^{ts}* Mutanten supprimieren (Abbildung 3.32 B). Die *sos7^{ts}* Mutanten verhielten sich bei der Überexpression von Sos7-C unter permissiven Konditionen allerdings unterschiedlich: einige *sos7^{ts}* Stämme zeigten bei der permissiven Temperatur eine Verschlechterung des

Wachstums, andere wuchsen wildtypisch, obwohl *sos7^{ts}* Mutanten aus beiden Kategorien unter restriktiven Bedingungen supprimiert wurden (Abbildung 3.32 B).

A**B**

Nr.	Mutationen im <i>sos7</i> -ORF	Suppression des <i>ts</i> Phänotyps			Zell- elongation
		<i>Sos7</i>	<i>Sos7</i> -C	<i>Sos7</i> -N	
1	K123E, L157S, N158S, R237K, M254L	+	++	-	
2	H179P	+	++	-	
3	L261P	+	n.b.	-	
4	L261H	+	-----	-	
6	Y258Stopp „<i>sos7</i>Δ7“	+	++		**
10	D116V, intron, E156D, L262P	+	++	-	
12	L209P	+	- → +	-	
15	intron, L147P	+	n.b.	-	
16	N228D, +6 AS bis Stopp	+	++	-	
17	intron, S126P	+	- → ++	-	
18	D116G, L209P, T236A	+	++		
19	L147P, Y220C	+	- → +	-	
21	L82P, intron, E134G,	+	- → +		
23	intron, M137V, E193G, K244E, L255P, Q263R	+	++		
24	L150P	+	-----	-	
27	+6 AS bis Stopp „<i>sos7</i>+6“	+	- → +		
29	L157S	+	-----		
31	I178N „<i>sos7</i>-178“	+	-----		
33	intron, Q260Stopp	+	++		*

+ = Suppression

----- = kein Effekt auf das Wachstum

n.b. = nicht bestimmt

- = verschlechtertes Wachstum

** = Zellelongation (Anzahl der Sterne = Stärke der Elongation)

- → + = bei permissiver Temperatur: verschlechtertes Wachstum bei restriktiver Temperatur: Suppression

Abbildung 3.32: Suppression der *sos7^{ts}* Mutanten durch *Sos7* Varianten.

(A) Schematische Darstellung des aus 264 AS bestehenden *Sos7* Proteins. Mutationen, die in den *sos7^{ts}* Mutanten identifiziert wurden, sind durch einen schwarzen Strich dargestellt. (B) In der Tabelle finden sich Angaben zu den exakten Positionen der Mutationen im *Sos7* Protein und die Veränderung der AS, die sie hervorrufen. Des Weiteren ist angegeben, welchen Einfluss die Überexpression von *sos7⁺*, *sos7-c* bzw. *sos7-n* auf das Wachstumsverhalten der verschiedenen *sos7^{ts}* Mutanten hat. Zwei der Mutantenstämme weisen bei der restriktiven Temperatur eine Elongation der Zellen auf. Die drei Mutanten, die für die folgenden Analysen ausgewählt wurden, sind zusätzlich fett hervorgehoben. In Anführungszeichen findet sich die Bezeichnung unter der sie im Folgenden geführt werden.

So zeigte die *sos7Δ7* Mutante durch extra *sos7-c* wieder Wachstum bei der restriktiven Temperatur (Abbildung 3.33). Die Überexpression von *sos7-c* hatte zusätzlich einen negativen Effekt auf das Wachstum der *sos7Δ7* Mutante bei der permissiven Temperatur (Abbildung 3.33). Dies konnte jedoch nicht bei der *sos7-178* Mutante beobachtet werden. Der mutante Phänotyp der *sos7-178* Mutante und anderer *sos7^{ts}* Mutanten, die eine Mutation in dem AS Bereich 150-178 trugen, wurde nicht durch Sos7-C supprimiert (Abbildung 3.33 und Abbildung 3.32 B). Der negative Wachstumseffekt, der durch die Überexpression von *sos7-c* in der *sos7Δ7* Mutante auftrat, konnte ebenfalls nicht in der *sos7-178* Mutante detektiert werden (Abbildung 3.33). Dies lässt die Vermutung zu, dass Sos7-C mit dem volllängen Sos7 Protein *in vivo* interagiert und dass diese Interaktion in der *sos7-178* und den *sos7^{ts}* Mutanten, die eine Mutation im AS Bereich 150-178 trugen, gestört ist.

Neben den Suppressionsstudien wurde die Zellmorphologie der *sos7^{ts}* Mutanten analysiert. Zwei der *sos7^{ts}* Mutantenstämme wiesen unter restriktiven Bedingungen eine Subpopulation auf, deren Zellen elongierten (Abbildung 3.32 B). In beiden Stämmen fehlten dem Sos7 Protein die letzten 5 bzw. 7 Aminosäuren („*sos7Δ5*“ und „*sos7Δ7*“). Dabei zeigte die *sos7Δ7* Mutante eine stärkere Elongation der Zellen als *sos7Δ5* (Daten nicht gezeigt).



Abbildung 3.33: Plasmidkodiertes Sos7-C suppressiert nicht alle *sos7^{ts}* Mutanten.

Tropftest der *sos7Δ7* und *sos7-178* Mutanten, die *sos7⁺* oder *sos7-c* vom *nmt1⁺* Promotor unter de-reprimierenden Bedingungen jeweils bei der permissiven und restriktiven Temperatur überexprimieren. Die plasmidselektiven Platten wurden bei den angegebenen Temperaturen 5-6 Tage inkubiert.

Die 18 verschiedenen von mir erzeugten *sos7^{ts}* Mutanten weisen hauptsächlich Mutationen in ihrem C-Terminus auf. Dieser Part ist somit wichtig für die Funktion des Proteins. Aufgrund von den Ergebnissen von Suppressionsstudien wird vermutet, dass der C-Terminus von Sos7 (genauer die AS Region 150-178) für eine Dimerbildung benötigt wird.

3.3.3.6 Defekte im Sos7 Protein führen zu Chromosomenfehlsegregation

Für die weitere Analyse der mitotischen Funktion des Sos7 Proteins wurden drei *sos7^{ts}* Mutanten ausgewählt. Da nicht ausgeschlossen werden konnte, dass es durch eine Mutation in einem der fünf Introns zu einer Veränderung der Proteinstruktur kommt (z. B. ausbleiben des oder verändertes Splicing), wurde kein *sos7^{ts}* Stamm ausgewählt, der eine Mutation in einem Intron aufwies. Weiterhin wurden *sos7^{ts}* Mutanten ausgeschlossen, die mehr als eine Mutation trugen.

Da der *sos7Δ7* Mutantenstamm mit der Elongation von einer Subpopulation von Zellen unter restriktiven Bedingungen einen ungewöhnlichen Phänotyp aufwies, der bisher noch bei keiner Kinetochormutante beobachtet werden konnte, wurde diese Mutante für die weitere Analyse ausgewählt (Abbildung 3.34 A). Neben der *sos7Δ7* Mutante wurde die *sos7+6* Mutante analysiert, die ein zusätzliches Nukleotid im eigentlichen Stoppkodon aufweist. Dieses hat zur Folge, dass sich anstelle des Stopps sechs zusätzliche AS (IMRRYR) am 3' Ende des Sos7 Proteins befinden (Abbildung 3.34 A). Außerdem wurde die *sos7-178* Mutante analysiert, die eine Punktmutation aufzeigte, die zum Austausch von Isoleucin zu Asparagin an AS Position 178 führte (Abbildung 3.34 A).

Die drei *sos7^{ts}* Mutanten wiesen eine unterschiedlich stark ausgeprägte Temperatursensitivität auf: so konnte der *sos7Δ7* Mutantenstamm nur bis einschließlich 27 °C wachsen, während die semi-permissive Temperatur des *sos7+6* Stammes bei 31 °C und der *sos7-178* Mutante bei 34 °C lag (Abbildung 3.34 B). Im Folgenden wurde die Chromosomensegregation der drei *sos7^{ts}* Mutanten unter restriktiven Bedingungen in einer logarithmisch wachsenden Kultur untersucht. Die *sos7^{ts}* Mutanten wiesen folgende Defekte in der Chromosomensegregation auf:

- 1) keine Segregation des kondensierten Chromatins trotz elongierter Spindel (Abbildung 3.34 C, a),
- 2) über die Spindel geschmiertes bzw. bei der Chromosomensegregation nicht bis zu den Enden der Zelle transportiertes Chromatin, obwohl die Spindel elongierte (Abbildung 3.34 C, b und c) und
- 3) ungleiche Chromosomensegregation (Abbildung 3.34 C, d und e).

Dabei konnte bei *sos7^{ts}* Zellen die ungleiche DNA Segregation aufweisen, zwischen zwei Phänotypen unterschieden werden: Zellen, deren Chromatin mit den Spindelenden ko-lokalisierte (Abbildung 3.34 C, d) und solche, deren Chromatin vermutlich merotelisch verknüpft war und somit durch den mechanischen Zug von beiden SPBs langsamer transportiert wurde (Abbildung 3.34 C, e).

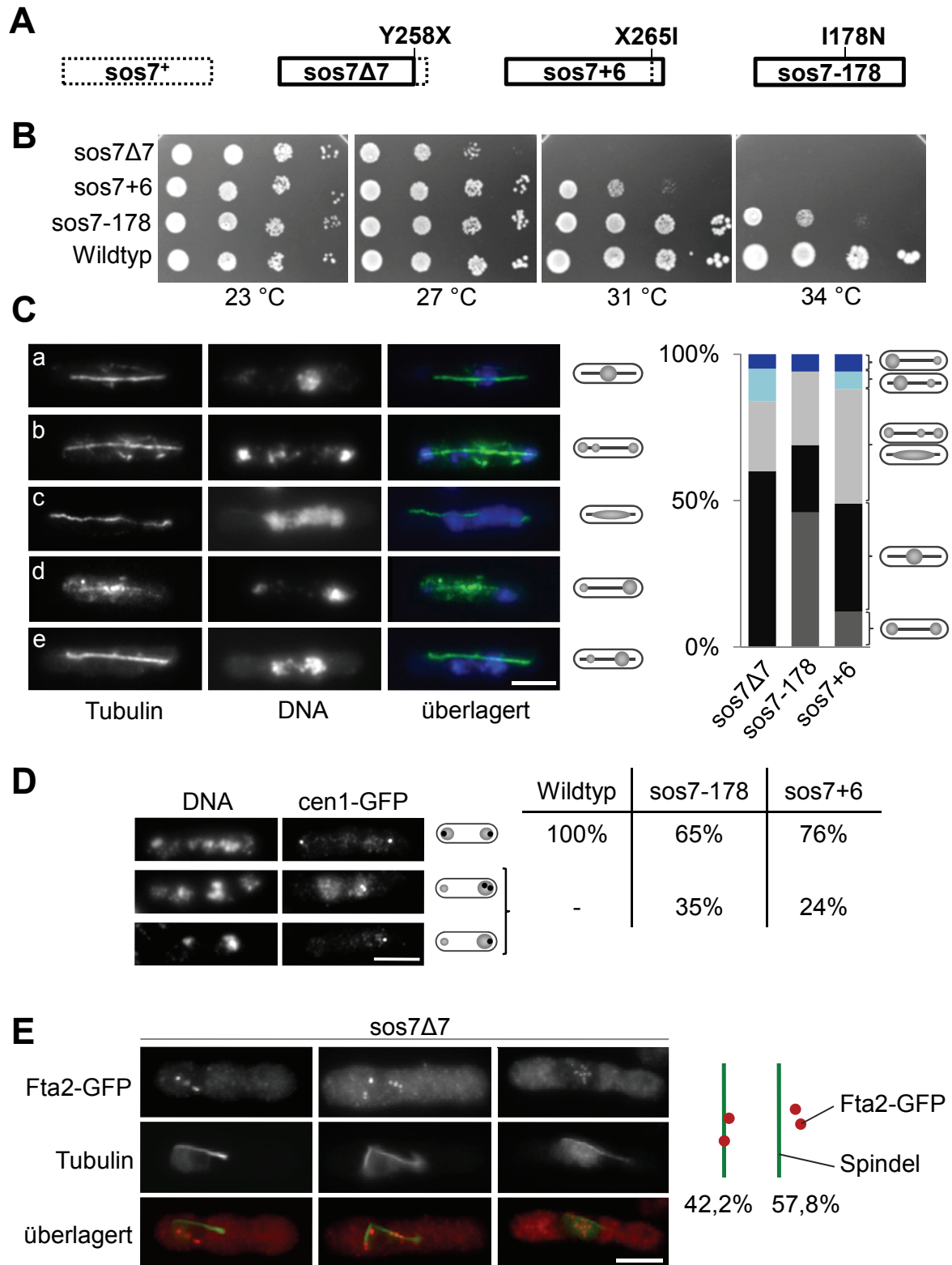


Abbildung 3.34: Sos7 ist für die Chromosomensegregation essentiell.

(Die Legende findet sich auf der folgenden Seite)

Abbildung 3.34: Sos7 ist für die Chromosomensegregation essentiell.

(A) Der Aminosäureaustausch der drei *sos7^{ts}* Mutanten ist schematisch angegeben (I = Isoleucin; N = Asparagin; Y = Tyrosin; X = Stopp). Mit dem vorzeitigen Stopp in der *sos7Δ7* Mutante und dem verspäteten Stopp in der *sos7+6* Mutante kommt es zur Verkürzung oder Verlängerung des *sos7*-ORF, der jeweils gepunktet schematisch eingezeichnet ist. (B) Serieller Tropftest des Wildtyp, des *sos7Δ7*, *sos7+6* und *sos7-178* Stammes bei den angegebenen Temperaturen. Die Platten wurden 3-4 Tage inkubiert. (C) Links: Defekte in der Chromosomensegregation der *sos7^{ts}* Mutantenstämme nach 6 h bei der restriktiven Temperatur (a+c: *sos7Δ7*; b+e: *sos7-178*; d: *sos7+6*). Die Zellen wurden fixiert und mit DAPI und dem anti-Tubulin Antikörper behandelt. DNA: blau; Spindel: grün. Balken, 5 μm. Rechts: Die verschiedenen Defekte wurden quantitativ ausgewertet (n = 100). (D) Die *cen1-gfp* Verteilung während der Mitose wurde im Wildtyp, in der *sos7+6* und *sos7-178* Mutante bei der restriktiven Temperatur (6 h 36 °C) untersucht. Die Zellen wurden fixiert und mit DAPI und dem anti-GFP Antikörper behandelt. Beispielhaft sind *sos7-178* Zellen gezeigt. Balken, 5 μm. Die *cen1*-GFP Verteilung wurde quantifiziert (rechts) (n = 100). (E) Links: Fta2-GFP-Signale in mitotischen *sos7Δ7* Zellen, die mit bzw. nicht mit der mitotischen Spindel ko-lokalisieren. Die Zellen wurden 6h bei 36 °C inkubiert, fixiert und mit dem anti-GFP- und anti-Tubulin Antikörper behandelt. Fta2-GFP: rot; Spindel: grün. Rechts: Schematische Darstellung der quantitativen Auswertung des links gezeigten Experiments (n = 327 Fta2-GFP-Signale).

Der *sos7Δ7* Mutantenstamm zeigte den stärksten Phänotyp; 60 % der Zellen waren bei der restriktiven Temperatur nicht in der Lage die Chromosomen zu segregieren, obwohl die Spindel elongiert war. Weitere 24 % der mitotischen Zellen wiesen über die Spindel geschmiertes Chromatin auf und die übrigen 16 % offenbarten eine Fehlverteilung des Chromatin (Abbildung 3.34 D). Während es in der *sos7Δ7* Mutante zu keiner wildtypischen Chromosomensegregation kam, gelang diese noch in 12 % der *sos7+6* und 46 % der *sos7-178* Zellen (Abbildung 3.34 C rechts). Weitere 37 % der mitotischen *sos7+6* Zellen wiesen keine Chromatinsegregation und 39 % geschmierte Chromatiden oder teilweise merotelisch verknüpftes Chromatin auf (Abbildung 3.34 C rechts). Beim *sos7+6* Stamm war die Verteilung dieser beiden Phänotypen fast identisch (23 % bzw. 25 %) (Abbildung 3.34 C rechts).

In allen *sos7^{ts}* Zellen, in denen die mitotische Spindel elongierte, ohne das Chromatin zu trennen, oder deren Chromatin merotelisch verknüpft war und somit langsamer transportiert wurde, konnte der SPB am Ende der Spindel assoziiert vorgefunden werden (Daten nicht gezeigt). Somit hat Sos7 keinen Einfluss auf die Bindung der mitotischen Spindel an die SPBs.

Um aufzuklären wie die Fehlverteilung des Chromatins in den *sos7^{ts}* Mutanten ausgelöst wird, wurde die Ko-Lokalisierung von Zentromer I (*cen1-gfp*) mit der mitotischen Spindel in den *sos7^{ts}* Mutanten analysiert (Kapitel 3.1.3) (Nabeshima et al, 1998). In Anaphase-Wildtypzellen fanden sich je zwei *cen1*-GFP-Signale die mit der DNA assoziiert jeweils zu

einem der beiden Zellpole wanderten. In 35 % der *sos7-178* und 24 % der *sos7+6* Zellen, die eine Trennung des Chromatins aufwiesen konnte eine Fehlsegregation von Chromosom I festgestellt werden. Dort fand sich jeweils nur ein oder zwei eng miteinander verbundene cen1-GFP-Signale ko-lokalisiert mit der DNA an einem Zellpol (Abbildung 3.34 D). Infolge der Experimente mit *sos7+6* und *sos7-178* kann die Chromosomenfehlverteilung in den *sos7^{ts}* Mutanten durch eine Nicht-Trennung der Schwesterchromatiden erklärt werden.

Die Tatsache, dass häufig keine Chromosomensegregation in den *sos7^{ts}* Mutanten stattfand, könnte durch den Verlust der Interaktion zwischen Kinetochor und den Mikrotubuli der mitotischen Spindel erklärt werden. Deshalb wurde im *sos7Δ7* Stamm die Ko-Lokalisierung des Kinetochorproteins Fta2-GFP, das unabhängig von Sos7 am Kinetochor lokalisiert (Kapitel 3.3.3.16) mit der mitotischen Spindel untersucht. In 57,8 % der *sos7Δ7* Zellen war Fta2-GFP und somit das Kinetochor nicht mit der mitotischen Spindel assoziiert. In *sos7^{ts}* Zellen fehlt somit häufig die Verknüpfung zwischen den Kinetochoren und den Spindel-Mikrotubuli (Abbildung 3.34 E).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass Sos7 für die Chromosomensegregation, insbesondere aber für die bipolare Orientierung der Chromosomen und deren Verknüpfung mit den Mikrotubuli der mitotischen Spindel benötigt wird.

3.3.3.7 Die letzten sieben AS des Sos7 Proteins scheinen für dessen Stabilität benötigt zu werden

Um zu klären, ob das defekte Sos7 Protein in den *sos7^{ts}* Mutanten unter restriktiven Bedingungen weiterhin am Kinetochor assoziiert, wurde ein polyklonaler anti-Sos7 Antikörper hergestellt. Das verwendete Antigen umfasste das gesamte Sos7 Protein, das zu Aufreinigungszwecken N-terminal mit dem 6xHis Fusionsprotein versehen wurde. Wie man auf dem Coomassie-gefärbten SDS-Gel sieht, konnte das 6xHis-Sos7 Protein fast gänzlich ohne Degradierungsprodukte gewonnen werden. Die Firma Eurogentec (Belgien) führte die Immunisierung zweier Hasen mit dem Sos7 Antigen durch (Kapitel 2.12). Der gewonnene anti-Sos7 Antikörper konnte in Westernblot Analysen ohne Modifikationen eingesetzt werden und war in der Lage, sowohl das volllängen Sos7-GFP, als auch die N- und C-terminalen Sos7 Varianten zu detektieren (Abbildung 3.35 B). Da das Prä-Immun Serum die Sos7 Varianten nicht detektieren konnte, ist der anti-Sos7 Antikörper somit funktionell (Daten nicht gezeigt). Für die Immunfluoreszenz wurde der anti-Sos7 Antikörper über das Sos7 Antigen aufgereinigt, bevor er zur Detektion des wildtypischen Sos7 Proteins eingesetzt werden konnte (Abbildung 3.35 C links, Kapitel 2.12).

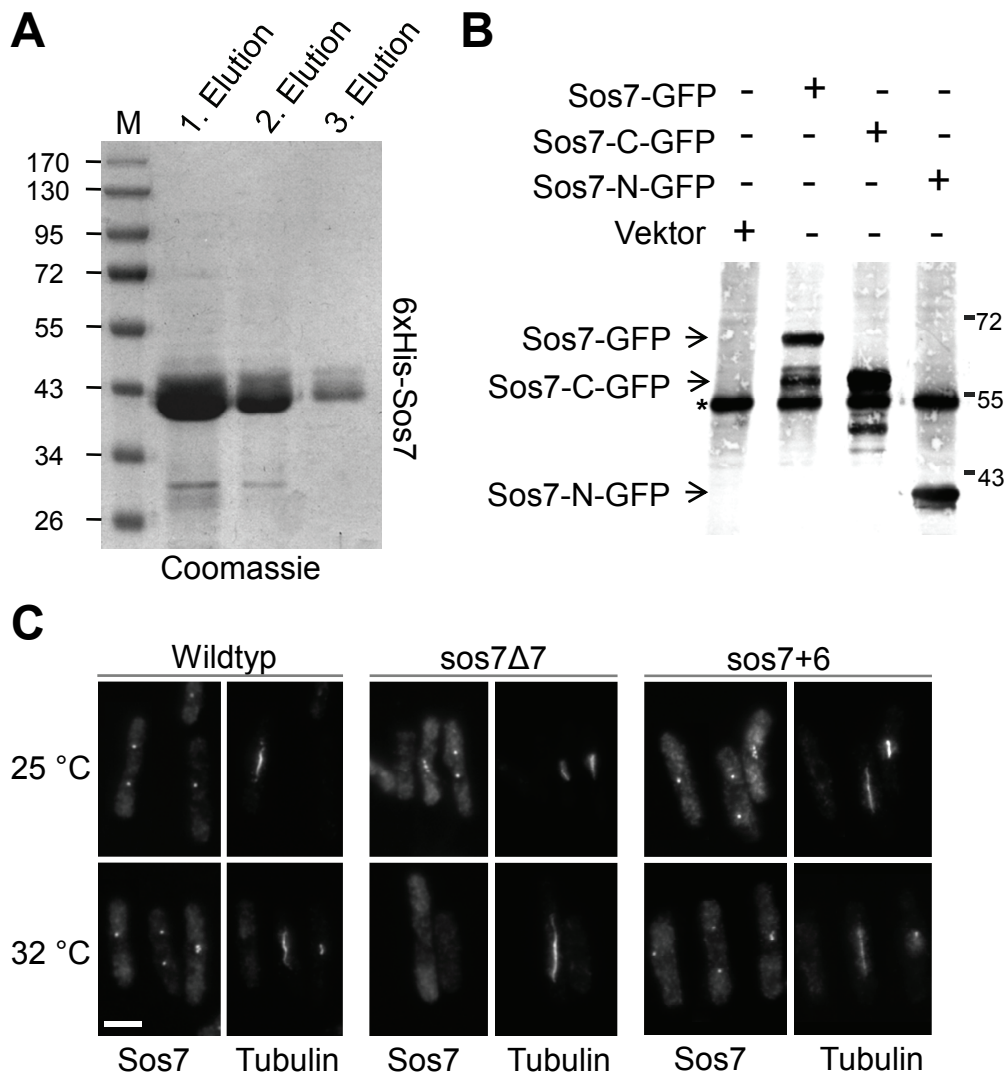


Abbildung 3.35: Die Kinetochor Assoziation vom Sos7Δ7 geht verloren, während Sos7+6 auch unter restriktiven Bedingungen am Kinetochor lokalisiert.

(A) Zur Erzeugung eines polyklonalen anti-Sos7 Antikörpers wurde für die Immunisierung das gesamte Sos7 Protein mit 6xHis fusioniert und aus *E. coli* isoliert. Es finden sich die 1.-3. Elution einer in Kapitel 2.13 beschriebenen Proteinisolierung in einem Coomassie gefärbten SDS-Gel. Marker links in kDa. **(B)** Der durch die Immunisierung gewonnene Antikörper ist in der Lage das volllängen Sos7-GFP, Sos7-C-GFP und Sos7-N-GFP zu detektieren. Die Fragmente wurden in einem *S. pombe* Wildtypstamm überexprimiert. Aus diesen Transformanten wurden die Proteinextrakte isoliert und über das GFP-Fusionsprotein, das sich an allen Fragmenten C-terminal befand, immunpräzipitiert. Die Immunpräzipitate wurden auf einer SDS-PAGE aufgetrennt und in einem Westernblot analysiert. + = der jeweilige Vektor, der eine Sos7 Variante trägt, wurde in Wildtypzellen exprimiert. - = der jeweilige Vektor, der eine Sos7 Variante trägt, ist in den Wildtypzellen **nicht** vorhanden. Marker rechts in kDa. **(C)** Die Wildtyp, sos7Δ7 oder sos7+6 Zellen wurden bei der permissiven, oder 6 h bei der restriktiven Temperatur inkubiert, bevor sie fixiert wurden. Die Zellen wurden mit anti-Tubulin und Antigen aufgereinigtem anti-Sos7 Antikörper behandelt. Balken, 5 μm.

Mit dem anti-Sos7 Antikörper wurde nun getestet, ob die Sos7Δ7 und Sos7+6 Proteine bei der restriktiven Temperatur Kinetochor assoziiert sind. Unter permissiven Bedingungen waren Sos7Δ7 und Sos7+6 korrekt lokalisiert (Abbildung 3.35 C). Bei der restriktiven Temperatur war Sos7Δ7 weder in mitotischen noch in Interphase Zellen am Kinetochor

detektierbar (Abbildung 3.35 C Mitte). Indes blieb die Kinetochorassoziation von Sos7+6 auch unter restriktiven Konditionen bestehen und war in der Intensität mit dem Sos7 Signal im Wildtyp vergleichbar (Abbildung 3.35 C).

Diese Ergebnisse deuten an, dass die letzten sieben AS des Sos7 Proteins für die Stabilität des Proteins benötigt werden.

3.3.3.8 Sos7 wird nicht für die transkriptionelle Stilllegung der zentralen Zentromerregion benötigt

Die zentrale Region des Zentromers ist transkriptionell nicht aktiv (Kapitel 1.6.1). Der Sim4-Komplex wird für den Aufbau des inneren Kinetochors und für die Aufrechterhaltung der transkriptionellen Stilllegung der zentralen Zentromerregion benötigt, während bis dato die Komponenten des NMS-Komplexes nicht dafür benötigt werden (Kapitel 3.1.4). Um zu prüfen, ob Sos7 für die transkriptionelle Stilllegung des zentralen Zentromers benötigt wird, wurde der *arg3⁺* Marker in der zentralen Zentromerregion der *sos7^{ts}* Mutanten eingekreuzt (Kapitel 3.1.4). Aufgrund der transkriptionellen Stilllegung der zentralen Zentromerregion kam es im Wildtyp nicht zur Transkription des Markers und der Stamm war Arginin auxotroph (Pidoux & Allshire, 2000).

In Kinetochormutanten des Sim4-Komplexes wie der *sim4-193* Mutante kam es zur Aufhebung dieser transkriptionellen Stilllegung und dadurch zur Transkription des Markers, die nun Arginin prototrophen *sim4-193* Zellen konnten auch ohne Arginin im Medium wachsen (Abbildung 3.36) (Allshire et al, 1995; Jin et al, 2002; Pidoux et al, 2003). Dies ist bei den *sos7^{ts}* Mutantenstämmen nicht der Fall (Abbildung 3.36). Somit wird Sos7 nicht für die Stilllegung der zentralen Zentromerregion benötigt (Kerres et al, 2007).

Auch die äußere Zentromerregion ist transkriptionell stillgelegt (Kapitel 1.6.1). Allerdings sind die Mechanismen der Stilllegung und die involvierten Komponenten andere. Ist der *ura4⁺* Marker in der äußeren Zentromerregion von Chromosom II (*otr2*) im Wildtypstamm eingebaut, so wird dieser nicht transkribiert (Kapitel 3.1.4). In Stammmhintergrund, in dem die für die Stilllegung der äußeren Region benötigte Komponente Swi6 deletiert ist, kommt es jedoch zur Transkription des *ura4⁺* Markers und die *swi6Δ* Zellen sind Uracil prototroph. Sos7 wird allerdings auch nicht für die transkriptionelle Stilllegung der äußeren Zentromerregion benötigt, denn in den *sos7^{ts}* Mutanten kommt es zu keinem Wachstum auf uracilfreiem Medium (Abbildung 3.36) (Partridge et al, 2000).

Sos7 wird nicht für die transkriptionelle Stilllegung des Zentromer-Chromatins benötigt.

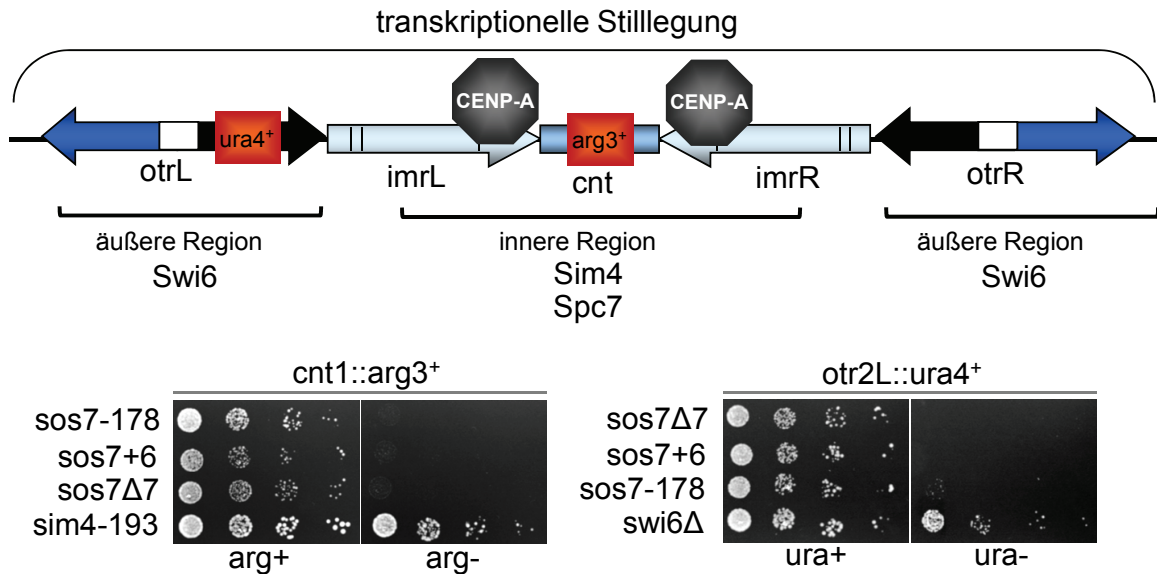


Abbildung 3.36: Sos7 wird nicht für die transkriptionelle Stilllegung des Zentromers benötigt.

Oben: Schematische Darstellung des *S. pombe* Zentromers. Die innere Region ist aus den *cnt* und *imr* (L = links; R = rechts) Elementen aufgebaut, deren Nukleosomen (H2A₂, H2B₂, Cnp1₂, H4₂) anstelle von Histon H3 die Histon H3 Variante Cnp1 beinhalten und an der das Kinetochor aufgebaut wird und somit Sim4 und Sos7 lokalisieren. Die innere Region wird von der äußeren umgeben, die zum Teil aus *imr* Elementen und *otr* Elementen aufgebaut ist und an der u.a. das Swi6 Protein lokalisiert. Die äußere Region ist wie die innere transkriptionell stillgelegt. Die transkriptionelle Stilllegung erfolgt allerdings auf unterschiedlichen Wegen (Kapitel 1.6.1). Der Prototrophiemarker *arg3⁺* in der zentralen Zentromerregion *cnt* von Chromosom I oder *ura4⁺* in der *otrL*-Region von Chromosom II (hier vereinfacht in einem Zentromer dargestellt) können zur Überprüfung der transkriptionellen Stilllegung der jeweiligen Region genutzt werden. Unten: Tropftest der *sos7^{ts}* Mutanten und *sim4-193* Zellen, die das *arg3⁺* Gen in der zentralen Zentromerregion von Chromosom I (*cnt1*) tragen, oder *sos7^{ts}* Mutanten und *swi6Δ* Zellen die das *ura4⁺* Gen in der *otr* Region von Chromosom II (*otr2*) tragen. Die Zellen wurden auf nicht selektivem und selektivem Medium für 5 Tage bei 25 °C inkubiert.

3.3.3.9 Weitergehende Analyse der *sos7Δ7* Mutante

3.3.3.9.1 Sos7 wird für den Eintritt in die M-Phase benötigt

Der Verlust der letzten sieben AS des Sos7 Proteins weist zusätzliche Phänotypen auf, die in den anderen *sos7^{ts}* Mutanten nicht beobachtet wurden. Mit einer detaillierten Analyse der *sos7Δ7* Mutante sollte Aufschluss über weitere Funktionen des Sos7 Proteins gewonnen werden. *sos7Δ7* Interphase Zellen wiesen eine Verzögerung im Übergang von der G2-Phase in die Mitose auf. Im Wildtyp wird der SPB zum Ende der G2-Phase dupliziert und mit dem Beginn der Mitose in die Kernmembran eingelagert. Somit können für einen nur kurzen Zeitraum zwei aneinander gebundene SPBs detektiert werden. Dieser Zeitraum in der *sos7Δ7* Mutante hingegen deutlich verlängert (Ding et al, 1993; Ding et al, 1997). So konnte im Wildtyp nur in 2 % der Zellen ein bereits verdoppelter aber noch nicht in die

Kernmembran eingebundener SPB vorgefunden werden, während in der *sos7Δ7* Mutante 53 % der Zellen dies aufzeigten (Abbildung 3.37 A). Dieser Phänotyp kann mit einer G2-Arretierung am Übergang zur Mitose erklärt werden (Ding et al, 1997).

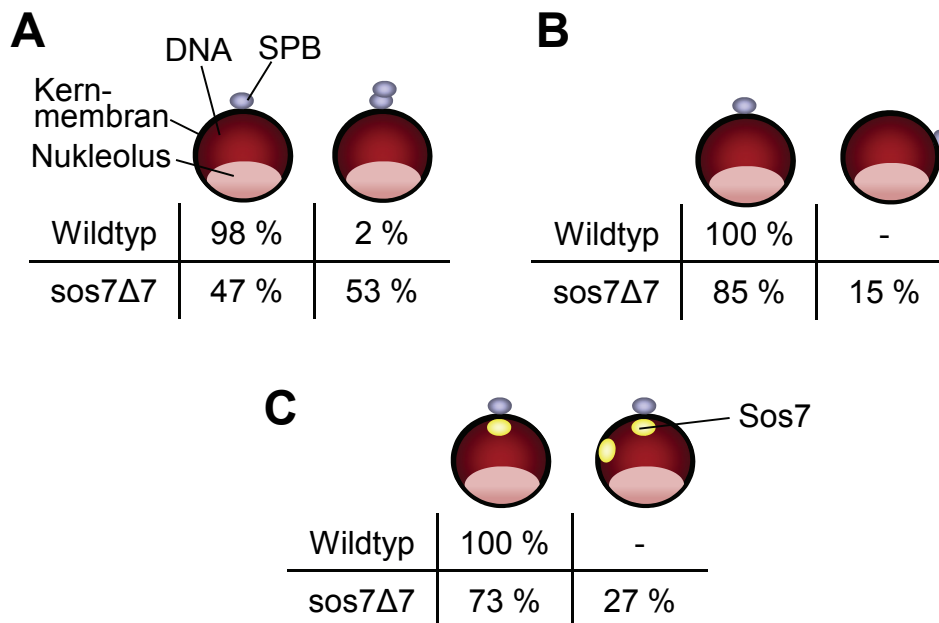


Abbildung 3.37: *sos7Δ7* Zellen weisen Defekte in der Positionierung des SPB auf und arretieren am G2-M-Phase Übergang.

In (A), (C) und (D) wurden der Wildtyp oder der *sos7Δ7* Stamm, die jeweils endogen die SPB Komponente Pcp1-GFP exprimierten, bei der permissiven Temperatur (25 °C) inkubiert bevor die Kulturen fixiert wurden. Die Zellen wurden jeweils mit dem anti-GFP Antikörper und DAPI behandelt. In (C) wurde zusätzlich der anti-Sos7 Antikörper eingesetzt. **(A)** Schematische Darstellung eines Interphase Zellkerns. Der SPB befindet sich dem Nukleolus gegenüberliegend. Zum Ende der G2-Phase kommt es zur Duplikation des SPB, der erst mit dem Beginn der Mitose in die Kernmembran eingelagert wird. In der *sos7Δ7* Mutante ist die Zahl der Interphase Zellen, die zwei zusammenhängende SPB tragen, erhöht. Wildtyp: n = 100; *sos7Δ7*: n = 32. **(B)** Die Position des SPB (Pcp1-GFP) in Interphase Zellen des Wildtyps oder der *sos7Δ7* Mutante wurde bei der permissiven Temperatur (25 °C) ermittelt (n = 33). **(C)** Die Position des Kinetochors wurde anhand des Sos7 Signals im Wildtyp oder der *sos7Δ7* Mutante bestimmt. Der SPB war mit Pcp1-GFP markiert.

Die Analyse der *sos7Δ7* Mutante offenbarte zusätzlich, dass der SPB nicht immer korrekt lokalisiert war. Während im Wildtypstamm der SPB immer gegenüber von Nukleolus assoziiert, fand sich in 15 % der *sos7Δ7* Zellen ein fehllokalisiertes SPB-Signal in direkter räumlichen Nähe des Nukleolus (Abbildung 3.37 B) (Ding et al, 1993; Ding et al, 1997). Auch die Bindung der Kinetochore untereinander in der direkten räumlichen Nähe zum SPB

während der Interphase war gestört (Funabiki et al, 1993). In 27 % der Zellen fanden sich zwei Kinetochorsignale anstelle von einem. Dasjenige Signal, das mit dem anti-Sos7 Antikörper detektiert wurde, war nicht mehr SPB-assoziiert (Abbildung 3.37 C).

Sos7 wird somit auch für den Eintritt in die Mitose und für die Bindung der Kinetochore untereinander während der Interphase benötigt.

3.3.3.9.2 Die Elongation der *sos7Δ7* Zellen geht mit einer Erhöhung der Ploidie einher

Eine Subpopulation der *sos7Δ7* Zellen wies bei der restriktiven Temperatur Zellen auf, die länger als wildtypische Zellen waren (Abbildung 3.32 B). Zellelongation geht mit einer längeren Wachstumsphase einher, die durch Hindernisse in der Interphase oder dem Eintritt in die Mitose hervorgerufen werden (Fantès, 1979). Die Länge der Zellen dieser Subpopulation wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt (Kapitel 2.16). Als Kontrolle dienten der Wildtypstamm und die *sos7-178* Mutante. In Abbildung 3.38 A ist die Länge der Zellen einer logarithmischen Wildtypkultur mittels Dot-Plot dargestellt. Die *sos7-178* Zellen zeigen die gleiche Zelllänge, die Signale finden sich konzentriert in der unteren Hälfte des Dot-Plots. Die *sos7Δ7* Zellen waren weniger konzentriert und nahmen einen viel längeren Bereich der Diagonale ein. Im oberen Bereich fanden sich die elongierten Zellen (Abbildung 3.38 A). Um die Zahl der elongierten Zellen zu bestimmen, wurde ein definierter Bereich im Dot-Plot festgelegt, in dem sich die großen Zellen befinden mussten (P1 Bereich in Abbildung 3.38 A). Während nur 0,09 % der Wildtypzellen und 0,24 % der *sos7-178* Zellen in diesem Bereich detektiert werden konnten, waren es 5,15 % bei der *sos7Δ7* Mutante (Abbildung 3.38 A).

Um die Zellelongation der im P1 Abschnitt angesiedelten *sos7Δ7* Zellen zu verifizieren, wurden diese herausortiert. Eine mikroskopische Analyse dieser *sos7Δ7* Zellen ergab, dass sie eine durchschnittliche Zelllänge von 32,0 µm hatten (Wildtyp: 14 µm). 90 % der Zellen zeigten ein DNA-Signal in der Zellmitte, die übrigen 10 % wiesen segregierte Chromosomen auf (Abbildung 3.38 B). Im Gegensatz dazu fanden sich im Wildtyp oder in der *sos7-178* Mutante nicht elongierte Zellen im P1 Bereich, sondern mehrere zusammenhängende *S. pombe* Zellen, die durch unvollständige Separierung verbunden waren (Daten nicht gezeigt).

Um zu überprüfen, ob die elongierten *sos7Δ7* Zellen einen wildtypischen Chromatin-Gehalt aufweisen, wurde mittels Durchflusszytometrie der DNA-Gehalt der Wildtyp, *sos7-178* und *sos7Δ7* Zellen bestimmt. Bereits unter permissiven Bedingungen fanden sich in der *sos7Δ7* Kultur im Vergleich zur Wildtypkultur oder dem *sos7-178* Mutantenstamm verhältnismäßig viele Zellen die einen DNA-Gehalt von 4 C bzw. 8 C aufwiesen (Abbildung 3.38 C).

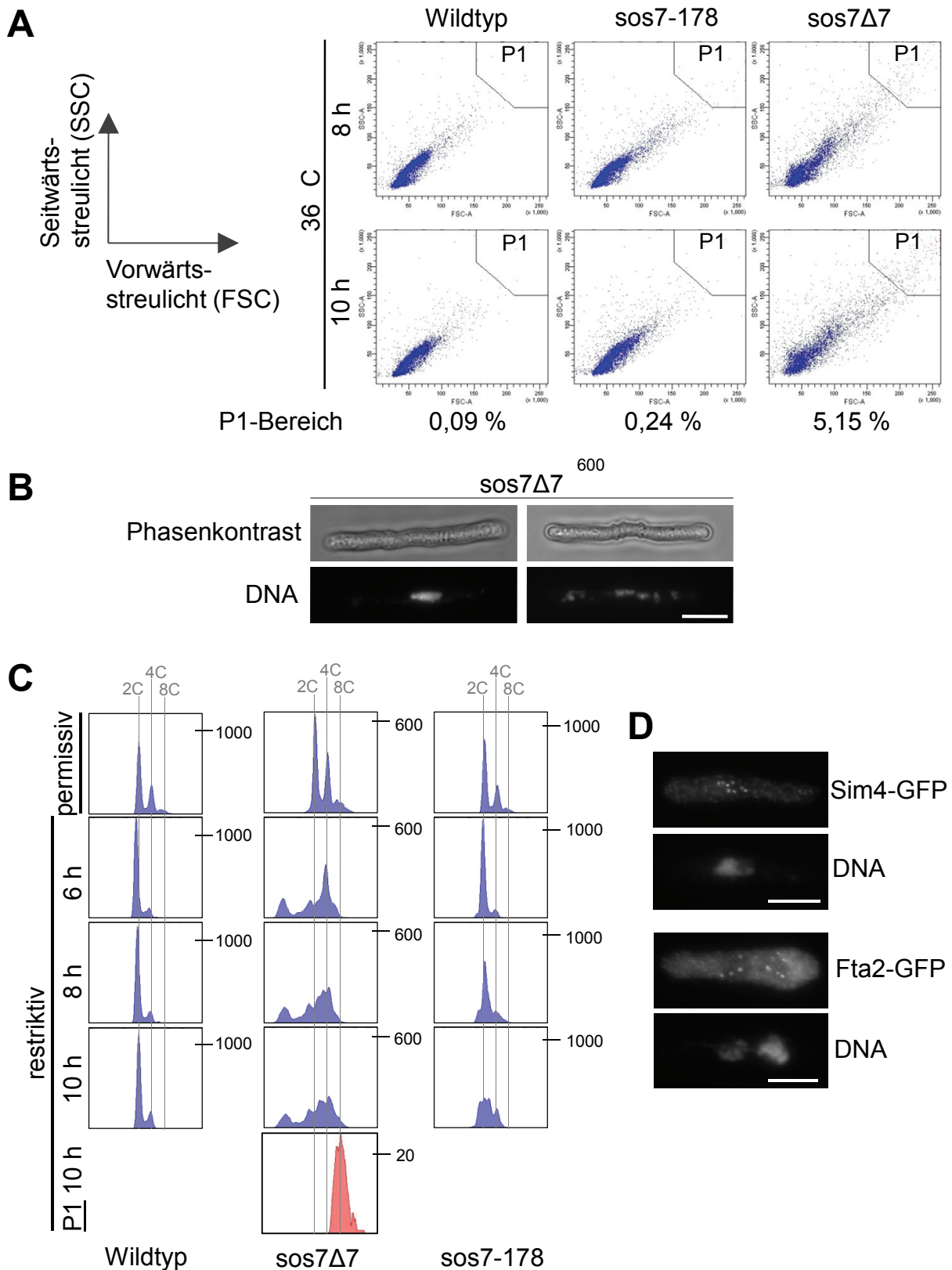


Abbildung 3.38: Eine Subpopulation der *sos7 Δ 7* Zellen weist einen erhöhten DNA-Gehalt auf.

(Die Legende findet sich auf der folgenden Seite)

Abbildung 3.38: Eine Subpopulation der *sos7Δ7* Zellen weist einen erhöhten DNA-Gehalt auf.

(A) Die Länge der Wildtyp, *sos7Δ7* und *sos7-178* Zellen wurden mit Hilfe von Durchflusszytometrie (FACS) bestimmt. Die Zelllänge wird anhand des Vorwärts- (FSC) und Seitwärtsstreulichts (SSC) bestimmt und ist in einem Dot-Plot dargestellt. Nahmen die Zellen in der Länge oder Breite zu, fanden sich diese im rechten Bereich der X-Achse (Vorwärtsstreulicht) oder im oberen Bereich der Y-Achse (Seitwärtsstreulicht) wieder. Die Zelllängen des Wildtypstammes, der *sos7Δ7* und *sos7-178* Mutante, die 8 bzw. 10 Stunden bei 36 °C inkubiert wurden, ist dargestellt. Die Zellen wurden mit Ethanol fixiert. Die Zahl der großen Zellen wurde in einem definierten Bereich gemessen (P1, rot dargestellt). Die Menge an Zellen, die sich in diesem Bereich nach 10 h befanden, ist angegeben (n = 10000). **(B)** Die *sos7Δ7* Zellen aus dem in (A) definierten Bereich (10 h 36 °C) wurden sortiert und mikroskopisch untersucht. Die DNA wurde mit DAPI behandelt. Die durchschnittliche Zelllänge betrug 32,0 µm (n = 100). Balken, 10 µm. **(C)** DNA Gehalt des Wildtypstammes, der *sos7Δ7* oder *sos7-178* Mutante bei 25 °C nach 6h, 8 h oder 10 h bei 36 °C, der mittels FACS-Analyse bestimmt wurde (n = 10000). Zusätzlich ist der DNA-Gehalt der *sos7Δ7* Zellen im P1-Bereich aus (A) nach 10 h bei der restriktiven Temperatur angegeben. Die Zellen wurden mit Ethanol fixiert und die DNA mit Sytox Green gefärbt. **(D)** Mikroskopische Aufnahmen von fixierten *sos7Δ7* Zellen, die endogen Sim4-GFP oder Fta2-GFP exprimieren. Nachdem die Zellen 6 h bei der restriktiven Temperatur (36 °C) inkubiert wurden, wurden sie fixiert und mit dem anti-GFP Antikörper und DAPI behandelt. Balken, 5 µm. Die FACS-Analysen in (A) und (C) wurden zusammen mit Klaus Meyer durchgeführt.

Unter restriktiven Konditionen konnte eine Zunahme des 4 C und höheren DNA-Gehaltes in den *sos7Δ7* Zellen festgestellt werden (Abbildung 3.38 C, 6 h). Zusätzlich zeigten sich Zellen mit einem DNA-Gehalt weit unterhalb von 2 C. Bei diesen Zellen handelt es sich höchstwahrscheinlich um „leere“ Zellen, die keinen Zellkern mehr enthalten, aber aufgrund der vorhandenen mitochondrialen DNA detektierbar sind (Abbildung 3.38 C). Da die *sos7Δ7* Mutante bei der restriktiven Temperatur Chromosomenfehlsegregation aufwies, kam es über die Zeit zum Verlust von definierten 2 C, 4 C oder höheren Ploidie Signalen (Abbildung 3.38 C, 8 und 10 h). Die *sos7-178* Mutante hingegen zeigte bei der restriktiven Temperatur hauptsächlich Zellen mit einem 2 C, also einem haploiden DNA-Gehalt. Über die Zeit breitete sich der Bereich aufgrund der Chromosomenfehlsegregationen aus, die Zellen jedoch wiesen einen DNA-Gehalt etwas unterhalb 2 C bis etwas mehr als 4 C auf und zeigten eine weniger starke Varianz als die *sos7Δ7* Mutante (Abbildung 3.38 C).

Die Zunahme der DNA-Menge in der *sos7Δ7* Mutante konnte durch die Anzahl der Kinetochorsignale bestätigt werden, die bei der restriktiven Temperatur beobachtet werden konnten. Eine Vielzahl von *sos7Δ7* Zellen zeigte in der Metaphase mehr als die in der haploiden Zelle auftretenden sechs Signalen. Beispielhaft ist in Abbildung 3.38 D je eine *sos7Δ7* Zelle erkennbar, die mehr Sim4-GFP oder Fta2-GFP-Signale aufweist, als es in der Wildtyp Situation vorzufinden ist.

Der *sos7Δ7* Stamm weist als erste Kinetochormutante eine Subpopulation an Zellen auf, in denen es zur Erhöhung der Ploidie kommt. Wie dieser Phänotyp in den *sos7Δ7* Mutaten ausgelöst wird und in welche Zellzyklus-kontrollierenden Prozesse Sos7 involviert ist, muss in weiteren Experimenten analysiert werden.

3.3.3.10 Die Überexpression von *sos7-c* führt zu massiven Defekten in der Chromosomensegregation

Die Überexpression von *sos7-c* wirkte sich auf das Wachstum der Mehrheit der *sos7^{ts}* Mutanten negativ aus. Alle *sos7^{ts}* Stämme, mit Ausnahme derer, die eine Mutation in AS Bereich zwischen 150-178 trugen, wuchsen bei der permissiven Temperatur schlechter (Abbildung 3.31 A und Abbildung 3.32 B). Es sollte überprüft werden, ob die Überexpression von Sos7-C auch einen negativen Effekt auf das Wachstum des Wildtypstammes hat. Wie man in Abbildung 3.39 A erkennen kann, löste eine hohe *sos7-c* Expression im Wildtyp einen dosisabhängigen, kältesensitiven Wachstumsdefekt aus. Eine hohe Expression führte bei 25 °C zu gar keinem und bei 30 °C zu stark reduziertem Wachstum. Bei 37 °C konnten diese Transformanten zwar besser als bei niedrigeren Temperaturen wachsen, jedoch nicht so gut wie Zellen die nur den Kontrollvektor trugen (Abbildung 3.39 A).

Um die Defekte, die durch die Überexpression von Sos7-C verursacht wurden, zu bestimmen, wurden fixierte *sos7-c* exprimierende Wildtypzellen mikroskopisch untersucht. Hier zeigten sich sowohl Fehler beim Spindelaufbau als auch bei der Chromosomensegregation. Auffällig war, dass 50 % der mitotischen Zellen eine kurze Spindel aufwiesen. Die Länge dieser Spindeln entsprach nicht immer exakt der einer Metaphasespindel. Häufig waren sie etwas länger (ca. 3-3,5 µm statt 2,5 µm) (Abbildung 3.39 B, oben) (Nabeshima et al, 1998). Da das Chromatin in diesen Zellen hochkondensiert und nicht getrennt war, deutete dies auf einen Metaphase Arretierung hin (Abbildung 3.39 B, oben). Hefezellen, die lange in der Metaphase arretiert sind, zeigen eine verlängerte Metaphasenspindel (Jakopec und Fleig, unveröffentlicht). Nur 10 % dieser Spindeln sahen morphologisch wildtypisch aus, die übrigen waren gebrochene, gebogene oder sehr viel dünnere Spindeln (Abbildung 3.39 B, oben).

Die restlichen mitotischen Zellen dieser Kultur zeigten längere Spindeln (Abbildung 3.39 B, unten). Allerdings kam es bei 43 % dieser Zellen trotz Elongation der Spindel zu keiner Segregation des Chromatins (Abbildung 3.39 B, unten). Während 13 % der Zellen eine morphologisch wildtypische Spindel zeigten, waren die Spindeln in den übrigen 45 % entweder sehr dünn oder gebogen (Abbildung 3.39 B, unten). Insgesamt war die Struktur der Spindeln aberrant, da die anti-Tubulin Färbung punktierte Strukturen zeigte, die nicht dem Aufbau der normalen bipolaren Spindel entsprachen (Abbildung 3.39 B, unten).

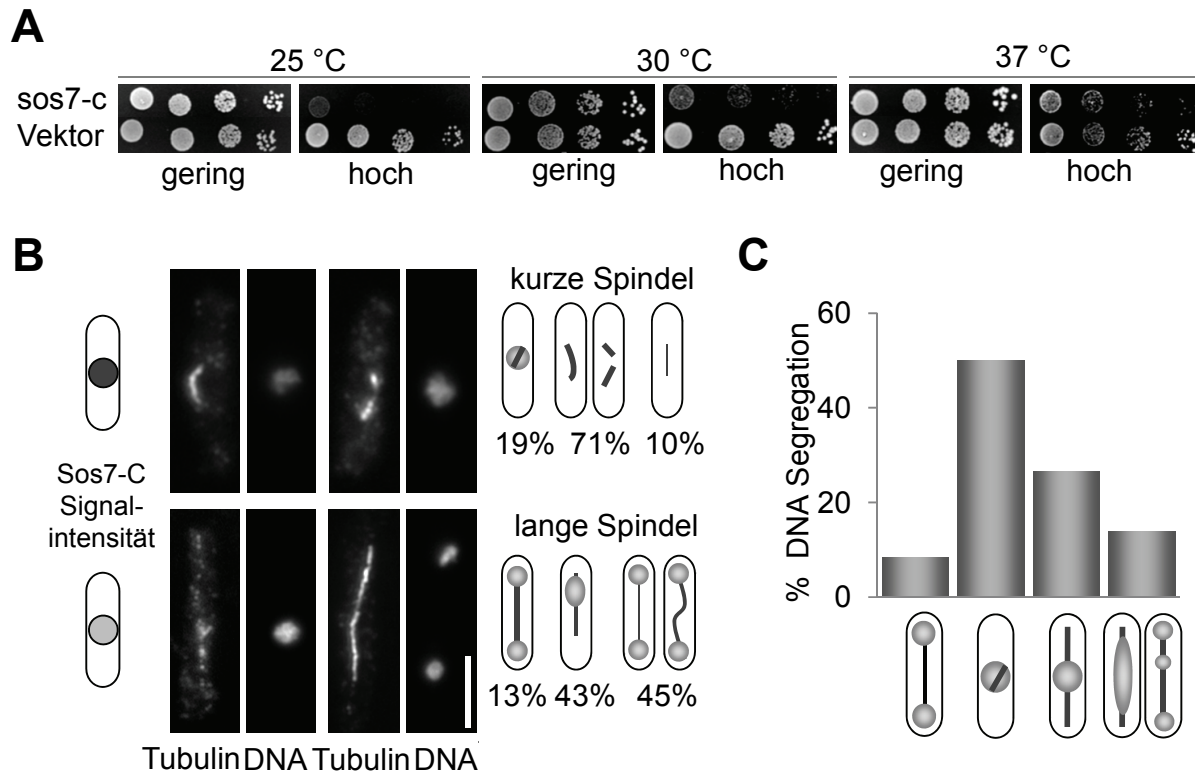


Abbildung 3.39: Die Sos7-C Überexpression führt zu schweren Mitosedefekten.

(A) Tropftest von Wildtypzellen, die *sos7-c* unter Kontrolle des *nmt1*⁺-Promoters oder den Kontrollvektor tragen. Die thiaminhaltigen (geringe Expression) und thiaminfreien (hohe Expression) Platten wurden bei den angegebenen Temperaturen 5-6 Tage inkubiert. (B) Mikroskopische Aufnahmen von *sos7-c* überexprimierenden Zellen nach 20 h bei 30 °C unter de-reprimierenden Konditionen. Die Zellen wurden fixiert und mit dem anti-Tubulin Antikörper und DAPI behandelt. Links findet sich schematisch die Sos7-C-NLS-GFP-Signal Intensität, die in Zellen mit einer kurzen bzw. mit einer langen Spindel hauptsächlich detektiert werden konnte. Die Defekte der mitotischen Spindel sind gezeigt. Oben finden sich kurze Spindeln von Zellen die sich in der Metaphase befanden. Unten sind die Phänotypen von Zellen aufgeführt, die sich in der späten Anaphase befanden und lange Spindeln aufwiesen. Die Spindeldefekte wurden jeweils quantifiziert (n = 50). Balken, 5 µm. (C) Die Defekte in der Chromosomensegregation aus Experiment (B) angegeben (n = 100).

Die unterschiedlichen Phänotypen einer *sos7-c* Überexpression basierten auf den unterschiedlichen Sos7-C Mengen, die in der Zelle exprimiert wurden. Um zu prüfen, welcher Spindeldefekt mit einer hohen Sos7-C Proteinmenge in der Zelle einhergeht, wurde die Sos7-C Signalintensität in mitotischen Zellen bestimmt. Dabei fand sich ein Zusammenhang zwischen einem sehr starken Sos7-C Fluoreszenzsignal, das vermutlich mit einer großen Sos7-C Menge einhergeht, und Zellen die nur eine kurze Spindel aufwiesen (Abbildung 3.39 B). Zellen, die längere Spindeln trugen, wiesen in der Regel ein geringeres Sos7-C Signal und somit vermutlich auch eine geringere Proteinmenge auf (Abbildung 3.39 B).

Die Spindeldefekte gingen mit massiven Defekten in der Chromosomensegregation einher. Nur 8,5 % der *Sos7-C* exprimierenden Wildtypzellen verteilten ihr Chromatin gleichmäßig (Abbildung 3.39 C). Die Mehrzahl der mitotischen Zellen (50 %) wies eine etwas längere Metaphasespindel samt hochkondensiertem Chromatin auf. In weiteren 26,5 % blieb das hochkondensierte Chromatin weiterhin in der Zellmitte liegen, obwohl die mitotische Spindel elongierte. Die übrigen 14 % der Zellen zeigten über die Spindel geschmiertes Chromatin oder Chromosomen, die merotelisch gebunden waren und deren Transport somit verlangsamt war (Abbildung 3.39 C).

3.3.3.11 Der negative Wachstumseffekt von *Sos7-C* wird teilweise durch GFP-Atb2 supprimiert

Um die Spindeldefekte einer *sos7-c* überexprimierenden Zelle eingehender zu untersuchen, wurde *Sos7-C* in einem Stamm überexprimiert, in dem die GFP-markierte Spindel in lebenden Zellen untersucht werden konnte (Kapitel 3.1.7) (Garcia et al, 2001). Allerdings führte die Anwesenheit von GFP-Atb2 zur Reduktion der Defekte, die durch die Überexpression von *Sos7-C* ausgelöst wurden (Abbildung 3.40 A). Die Reduktion des *Sos7-C* Phänotyps in GFP-Atb2 exprimierenden Zellen könnte durch eine Stabilisierung der mitotischen Spindel erklärt werden, die durch den Einbau des GFP-Fusionsproteins erfolgt ist, oder durch die Tatsache, dass die Proteinmenge von *Sos7-C* wie auch von GFP-Atb2 durch den *nmt* Promotor reguliert wird und es somit zu Veränderungen in der Expressionsmenge kommt. Trotzdem zeigten nur 25 % der Zellen eine wildtypische Chromatin-Segregation (Abbildung 3.40 B). Deshalb wurden die Spindeln von 26 *sos7-c* exprimierenden GFP-Atb2 Zellen analysiert.

3.3.3.12 Der Aufbau der bipolaren Spindel wird durch *Sos7-C* gestört

Die Formation der mitotischen Spindel und deren Elongation gliedert sich in *S. pombe* in drei Phasen (Nabeshima et al, 1998). In Phase I bildet sich eine bipolare Spindel aus (Abbildung 3.40 C, Bild 1). Daraufhin binden in Phase II die Kinetochor-Mikrotubuli an die Kinetochorkomplexe, während die Pol-zu-Pol-Mikrotubuli in diesem Zeitraum eine fast konstante Länge von 2,5 µm aufweisen (Abbildung 3.40 C, Bild 2-5). Nach der korrekten Verknüpfung werden die Kinetochor-Mikrotubuli abgebaut und die Schwesterchromatiden zu den entgegengesetzten SPBs gezogen (Anaphase A). Danach kommt es zum Eintritt in Phase III und dem rapiden Elongieren der mitotischen Spindel (Anaphase B) (Abbildung 3.40 C). Zum Ende der Anaphase B wird der PAA („post anaphase array“) aufgebaut, der an den Mikrotubuli organisierenden Zentrum (MTOC) im Zytoplasma ausgebildet wird, und den

Zelläquator bildet (Hagan & Petersen, 2000). Dieser ist in der Abbildung 3.40 C mit einem Pfeil gekennzeichnet.

58 % der *sos7-c* überexprimierenden mitotischen Zellen wiesen einen Defekt in einer der drei Phasen auf. In 4/26 Zellen gelang es nicht eine bipolare Spindel aufzubauen. Die Spindeln blieben über den gesamten Zeitraum monopolar (Daten nicht gezeigt). Drei weitere Zellen konnten zwar eine bipolare Spindel aufbauen, allerdings wiesen die Spindeln Defekte in Phase I und II auf. In Abbildung 3.40 D ist beispielhaft eine dieser Spindeln gezeigt. Diese polymerisierte und de-polymerisierte über den gesamten Zeitraum der Aufnahmen permanent zwischen einer Länge von 1,2 µm bis 2,8 µm und war nicht in der Lage mit Phase III zu beginnen. Zusätzlich war die Spindel dünner als im Wildtyp (Abbildung 3.40 D). Die übrigen 19 Zellen wiesen eine mitotische Spindel auf die Phase III kompetent war. Allerdings durchliefen die Spindeln aus acht Zellen Phase III nicht wildtypisch. Wie in Abbildung 3.40 E dargestellt, begann die Spindel mit der Elongation, allerdings brach diese dann aufgrund von einer sehr dünnen Spindelmitte zusammen (Abbildung 3.40 E, 17 Min). Die beiden nun monopolaren Spindeln versuchten weitere 25 Min erneut eine bipolare Spindel aufzubauen, bis ihnen dies aufgrund der räumlichen Nähe zueinander gelang. Auch die jetzt wieder bipolare Spindel elongierte, bis sie erneut aufgrund einer sehr dünnen Spindelmitte zusammenbrach (Abbildung 3.40 E, 80,3 Min). Aufgrund der größeren räumlichen Distanz zwischen den beiden wieder monopolaren Spindeln gelang es im untersuchten Zeitraum nicht wieder eine bipolare Spindel aufzubauen (Abbildung 3.40 E).

Abbildung 3.40: Die Expression von Sos7-C führt zu Defekten in allen 3 Spindelstadien.

(A) Tropftest des GFP-Atb2 Stammes, der *sos7-c* vom *nmt1⁺*-Promotor überexprimiert. Die thiaminfreien Platten wurden 5-6 Tage bei den angegebenen Temperaturen inkubiert. (B) Schematische Darstellung der DNA Segregationsphänotypen die im GFP-Atb2 Stamm auftraten, nachdem dieser *sos7-c* für 36h bei 30 °C unter de-reprimierenden Bedingungen überexprimierte (n = 126). Die Zellen wurden fixiert und mit dem anti-Tubulin Antikörper und DAPI behandelt. (C) Wildtypische Spindelelongation. In Phase I kam es zum Aufbau der bipolaren Spindel. Während Phase II wies die Spindel eine fast konstante Länge auf. Mit dem Beginn von Phase III kam es zur rapiden Elongation der Mikrotubuli der mitotischen Spindel. Das Erscheinen des PAA ist durch einen Pfeil angezeigt. Zeitangabe in Min. Balken, 1,5 µm. (D)-(F) *sos7-c* überexprimierende *gfp-atb2* Zellen. (D) Die Spindel zeigt Probleme in Phase I und II. Sie nahm über den gesamten Zeitraum keine konstante Länge ein. Die Länge der Spindel über die Zeit ist graphisch dargestellt. Balken, 2 µm. (E) Spindel, die sich in Phase III befand, diese aber nicht beenden konnte. Die Spindel elongierte und brach bei einer Länge von 4,2 µm. Nach 25 Min vereinigten sich die monopolaren Spindeln wieder und wuchsen bis zu einer Länge von 6,3 µm. Wieder erfolgte der Bruch der Spindel aufgrund einer dünnen Spindelmitte. Während der übrigen Zeit konnten die beiden monopolaren Spindeln wegen der räumlichen Distanz zwischen ihnen nicht mehr eine bipolare Spindel bilden. Die Länge der Spindel ist über die Zeit angegeben. Balken, 3 µm. (F) Mitotische Spindel am Ende von Phase III. Vor dem Erscheinen des PAA wuchs die Spindel über die Zellenden hinaus und bog sich S-förmig. Das Erscheinen des PAA ist mit einem Pfeil gekennzeichnet. Balken, 5 µm. Abbildung (C) übernommen aus Kerres et al, 2007.

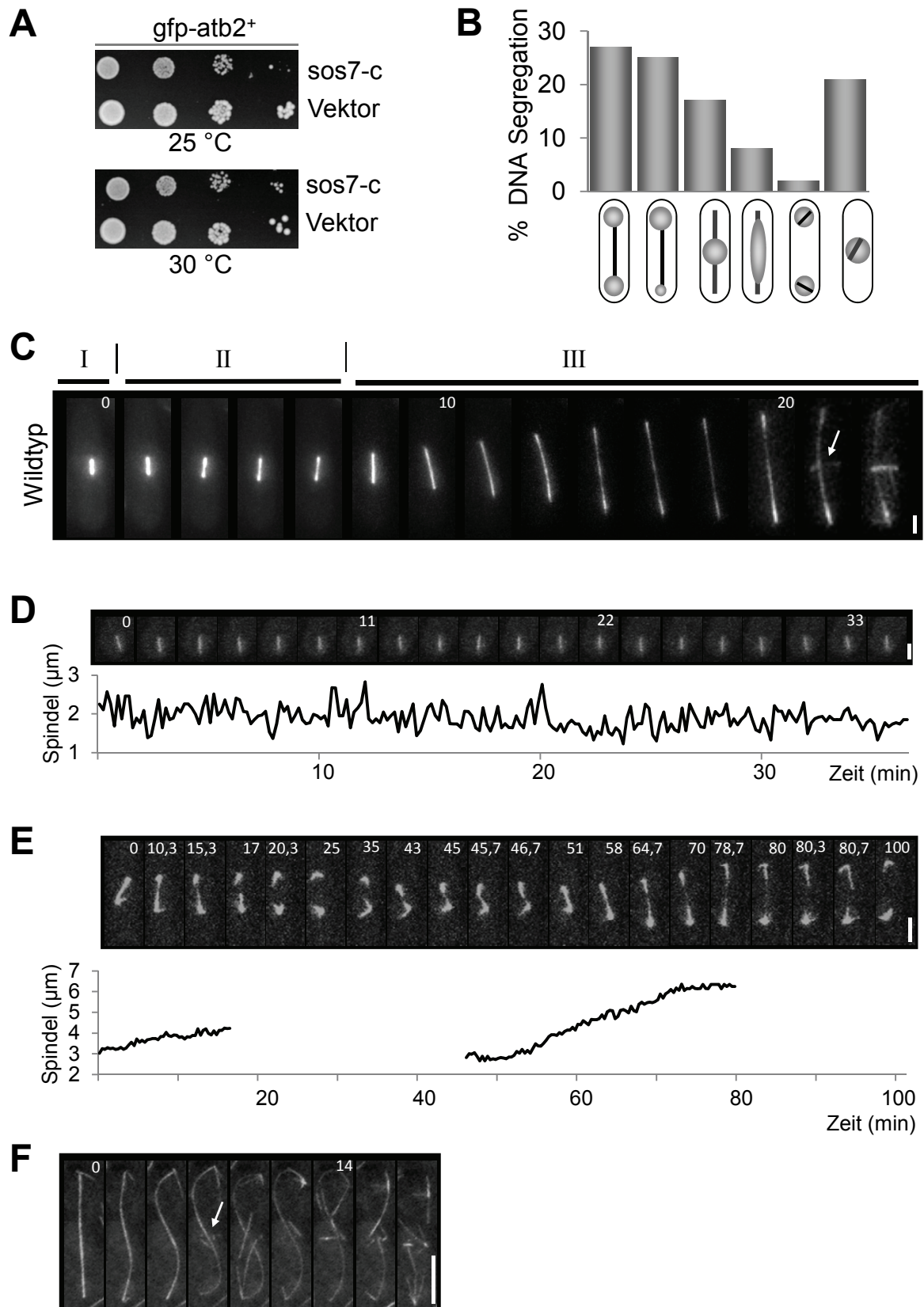


Abbildung 3.40: Die Expression von Sos7-C führt zu Defekten in allen 3 Spindelstadien.

(Die Legende findet sich auf der vorherigen Seite)

Auch beendeten die Zellen mit den gebrochenen Spindeln, die aufgrund der Entfernung zwischen den beiden monopolaren Spindeln nicht wieder fusionierten, nicht die Mitose. Im gemessenen Zeitraum versuchten sie weitere 45 Min eine Spindel aufzubauen. In diesen Zellen konnte in diesem Zeitraum kein PAA beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). 11/26 Spindeln gelang die Elongation der mitotischen Spindel bis zu den Zellenden. Auffällig war allerdings, dass anders als im Wildtyp, die Spindel in der Hälfte dieser *sos7-c* überexprimierenden Zellen zum Ende der Phase III weiter über die Zellenden hinaus elongierte und dadurch eine gebogene Form einnahm. Wie in Abbildung 3.40 F zu sehen ist, polymerisierte die Spindel über beide Zellenden hinaus bevor der PAA aufgebaut wurde. Dieser polymerisierte aberrant und de-polymerisierte daraufhin wieder. Erst nach dem erneuten Aufbau des PAA gelang es der Zelle die mitotische Spindel abzubauen (Abbildung 3.40 F).

Um herauszufinden, wie die Überexpression von Sos7-C die mitotische Spindel beeinflusst, wurde die subzelluläre Lokalisierung von spindelgebundenen Proteinen untersucht. Die Clp1 Phosphatase, die für den Übergang von G2- zur M-Phase benötigt wird zeigte eine veränderte Lokalisierung (Trautmann et al, 2001). In wildtypischen Zellen findet sich Clp1-GFP im Nukleolus und gelegentlich mit dem SPB ko-lokalisiert. Mit dem Beginn der Mitose verlässt Clp1-GFP den Nukleolus und bindet am SPB, dem Aktin-Myosin-Ring und der gesamten mitotischen Spindel. In der späten Mitose ist Clp1-GFP an den Spindelenden und dem überlappenden Bereich in der Spindelmitte konzentriert. Mit dem Abbau der mitotischen Spindel findet sich Clp1-GFP vermehrt am Aktin-Myosin-Ring, bis dieser abgebaut wird und Clp1-GFP wieder hauptsächlich im Nukleolus konzentriert vorliegt (Trautmann et al, 2001). In Sos7-C überexprimierenden Zellen hingegen fand sich in fast jeder Interphase Zelle ein Clp1-GFP-Signal wieder, das vermutlich dem SPB entsprach. Dieses Signal war von der Fluoreszenzintensität viel stärker als das Clp1-GFP-Signal in Zellen, die nur den Kontrollvektor trugen. Auch konnte in der Sos7-C überexprimierenden Kultur kein nukleolares Clp1-GFP-Signal in der Interphase, noch ein mit der mitotischen Spindel ko-assoziiertes Signal detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Sos7-C beeinflusst die Lokalisierung von Clp1-GFP direkt oder indirekt.

Die Überexpression von Sos7-C hat somit massiven Einfluss auf alle drei Spindelstadien. Sos7 beeinflusst vermutlich sowohl die Formation als auch die Integrität der mitotischen Spindel. Der Einfluss kann entweder direkt sein oder durch andere Proteine ausgelöst werden, die so wie Clp1 durch Sos7-C in ihrer Lokalisierung und möglicherweise Funktion beeinflusst werden.

3.3.3.13 Sos7-C kann am Kinetochor assoziieren

Defekte im Aufbau und Funktion der Spindel und Chromosomenfehlsegregation können durch verschiedene Faktoren ausgelöst werden. Um zu überprüfen, ob die Überexpression von Sos7-C den Aufbau des Kinetochors verhindert oder einschränkt wurde es in endogen Sos7-GFP oder Spc7-GFP exprimierende Zellen transformiert. Wie man in Abbildung 3.41 A erkennt, waren in *sos7-c* exprimierenden Zellen sowohl Sos7-GFP als auch Spc7-GFP weiterhin am Kinetochor vorzufinden. Da auch die Intensität der GFP-Signale mit der im Wildtyp zu vergleichen war, wurde durch die Überexpression von *sos7-c* nicht die Bindung von Sos7 und Spc7 am Kinetochor verhindert (Abbildung 3.41 A).

Als nächstes wurde untersucht, ob Sos7-C-GFP mit dem Kinetochor assoziieren kann. Volllängen Sos7-GFP zeigte die korrekte Kinetochorlokalisierung im Wildtypstamm (Abbildung 3.41 B). Das Sos7-C-GFP Signal fand sich jedoch hauptsächlich im Zytoplasma und nur in geringem Maße im Zellkern wieder (Abbildung 3.41 B).

Um zu überprüfen, ob das mit GFP fusionierte Sos7-C Fragment überhaupt funktionell war, wurde es im Wildtypstamm überexprimiert. Die Anwesenheit von Sos7-C-GFP beeinflusste das Wachstum des Wildtypstammes im Gegensatz zu Sos7-C kaum (Abbildung 3.41 C). Um sicherzustellen, dass das Sos7-C-GFP Protein stabil in der Zelle vorlag, wurde der Proteinextrakt von Wildtypzellen, die *sos7⁺-gfp* oder *sos7-c-gfp* überexprimierten, isoliert und immunpräzipitiert. Der Westernblot zeigte, dass das Sos7-C-GFP wie auch das volllängen Sos7-GFP Protein in den Wildtypzellen vorzufinden waren (Abbildung 3.41 D). Damit scheint das GFP-Fusionsprotein zum Funktionsverlust zu führen.

Da Sos7-C-GFP nicht im Zellkern lokalisiert war bestand die Möglichkeit, dass es aufgrund seiner Größe von 47,4 kDa im Gegensatz zu Sos7-C (20,4 kDa) nicht mehr in den Kern gelangen konnte. Der Ausfall des Kerntransport ist naheliegend, denn Proteine mit einer Größe von ca. 50 kDa können je nach Proteinfaltung den Kern gerade noch mittels Diffusion betreten (Macara, 2001). Die Sos7 Varianten besitzen außerdem keine bekannte oder bioinformatisch ermittelbare NLS-Sequenz (Daten nicht gezeigt). Deshalb wurde *sos7-c* in einen Vektor kloniert, der C-terminal vor der *gfp* Sequenz zusätzlich eine NLS-Sequenz trug (Kapitel 3.2.3).

Die Überexpression von Sos7-C-NLS-GFP wies ein ausschließlich im Kern assoziiertes Signal auf (Abbildung 3.41 E). Das GFP-Signal ko-lokalisierte mit dem gesamten Chromatin, schien aber in einigen Zellen den Nukleolus nicht einzunehmen (Abbildung 3.41 E). Indes fanden sich in 1 % der Sos7-C-NLS-GFP exprimierenden Zellen ein schwaches GFP-Signal, das vermutlich mit dem Kinetochor ko-lokalisierte.

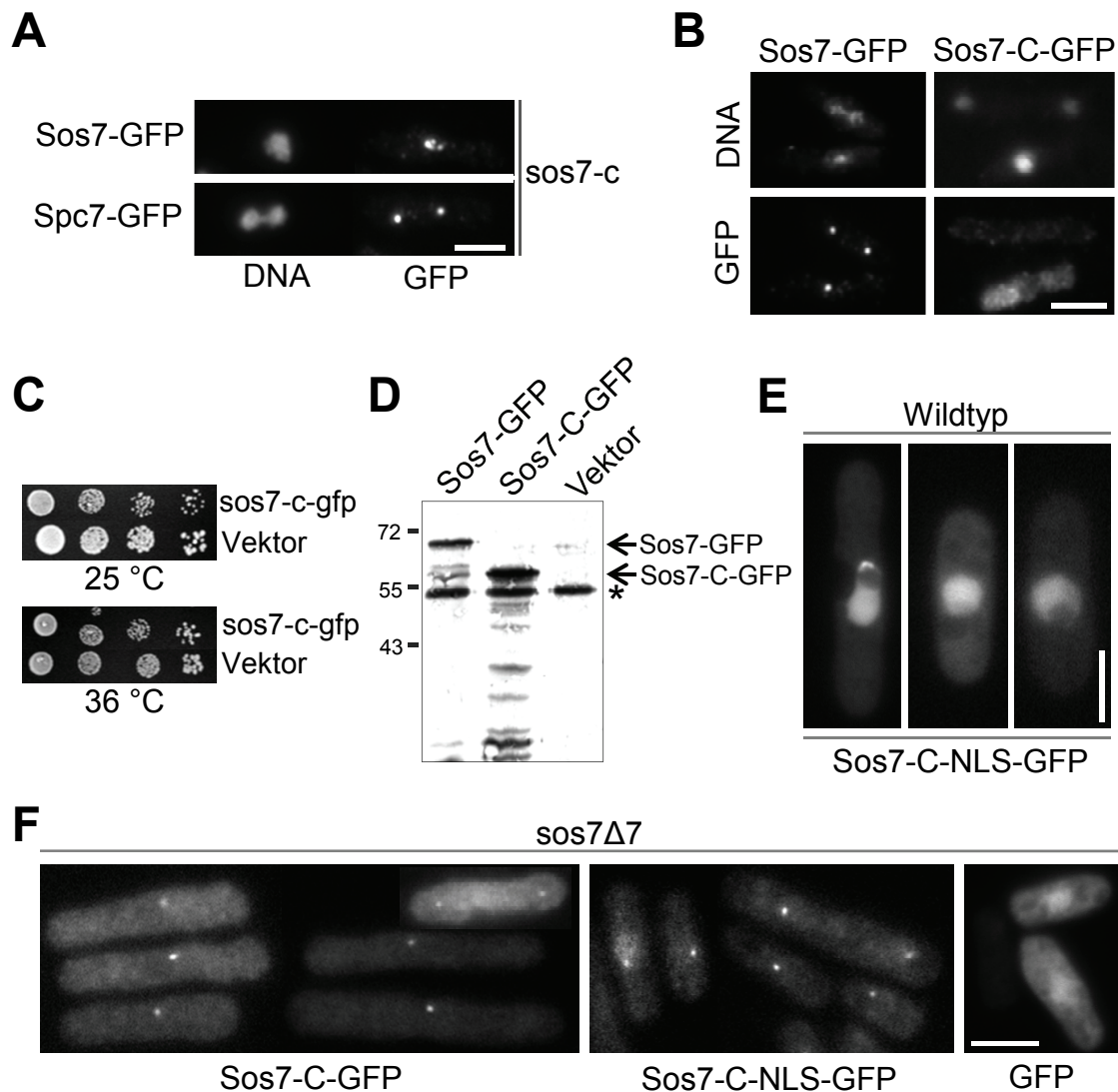


Abbildung 3.41: Subzelluläre Lokalisierung von unterschiedlichen Sos7-C-GFP Varianten.

(A) *Sos7-c* hat keinen sichtbaren Einfluss auf die Lokalisierung von Sos7-GFP oder Spc7-GFP. Endogenes Sos7-GFP oder Spc7-GFP zeigte trotz der Überexpression von *nmt1⁺-spc7-c* nach 20 h bei 30 °C unter de-reprimierenden Bedingungen eine Kinetochorlokalisierung. Die Zellen wurden fixiert und mit anti-GFP Antikörper und DAPI behandelt. Balken, 5 µm. (B) Lokalisierung des plasmidkodierten volllängen Sos7-GFP oder Sos7-C-GFP in Wildtypzellen. Die Kulturen wurden vor der Fixierung 20h bei 30 °C unter de-reprimierenden Bedingungen inkubiert. Balken, 5 µm. (C) Tropftest einer Wildtyp Kultur die *sos7-c-gfp* überexprimiert. Die thiaminfreien Platten wurden 5-6 Tage inkubiert. (D) Die Proteinextrakte eines Wildtypstammes der *sos7⁺-gfp* bzw. *sos7-c-gfp* überexprimierte wurden isoliert und mit dem anti-GFP Antikörper immunpräzipitiert. Die Sos7-GFP bzw. Sos7-C-GFP Proteinmenge wurde nach der Immunpräzipitation in einem Westernblot bestimmt. Es wurden ähnliche Proteinmengen auf dem SDS-Gel aufgetrennt. * = unspezifisches Signal. (E) Mikroskopische Aufnahmen von lebenden *S. pombe* Wildtypzellen, die *sos7-c-nls-gfp* überexprimieren. Balken, 5 µm. (F) *sos7Δ7* Zellen die bei der permissiven Temperatur (25 °C) *sos7-c-gfp* oder *sos7-c-nls-gfp* überexprimieren. Als Kontrolle diente der GFP exprimierende Vektor. Balken, 5 µm.

Da die Kinetochorassoziation eines wildtypischen Kinetochorproteins häufig verhindert, dass Teilfragmente dieses Proteins ebenfalls am Kinetochor assoziieren können (Topolski und Fleig, unveröffentlicht), wurden *sos7-c-gfp* und *sos7-c-nls-gfp* in der konditional-letalen *sos7Δ7* Mutante überexprimiert. Das *Sos7Δ7* Protein assoziiert bei der permissiven Temperatur möglicherweise nicht so stark wie das wildtypische Protein an das Kinetochor, so dass die Teilfragmente, die die identische Bindestelle besetzen, bessere Konditionen als im Wildtyp vorfinden. Tatsächlich lokalisierte sowohl *Sos7-C-GFP* als auch *Sos7-C-NLS-GFP* in den *sos7Δ7* Zellen am Kinetochor, während das GFP Protein, das als Kontrolle fungierte, in der gesamten Zelle vorzufinden war (Abbildung 3.41 F).

Zusammenfassend scheint *Sos7-C* in den Kern gelangen zu müssen um den negativen Wachstumsdefekt in den *S. pombe* Zellen auszulösen. Mit einem C-terminalen Fusionsprotein wird die Funktion des Proteins gestört und massiv herabgesetzt, auch wenn *Sos7-C* weiter stabil exprimiert werden kann.

3.3.3.14 *Sos7* und *Spc7* interagieren physikalisch miteinander

Da *sos7⁺* als Suppressor der *spc7-23* Mutante isoliert wurde, wurde eine mögliche physikalische Interaktion zwischen den beiden Proteinen analysiert. Diese wurde mittels Ko-Immunpräzipitation und anschließender Westernblot Analyse experimentell überprüft. Dafür sollte der mit zwei Fusionsproteinen versehene *spc7-HA sos7-GFP* Stamm erzeugt werden. Allerdings war dieser Stamm nicht lebensfähig (Abbildung 3.42 A).

Die folgenden Interaktionsexperimente wurden deshalb in einem Stamm durchgeführt, in dem nur eine der beiden Komponenten endogen mit einem Fusionsprotein markiert war und die andere Komponente mit einem zweiten Marker plasmidkodiert vorlag. So konnte eine Interaktion zwischen dem volllängen *Spc7-HA* mit dem plasmidkodiertem *Sos7-GFP* gezeigt werden. Diese ist in Abbildung 3.42 B dargestellt. Um die Region der Bindung zwischen *Spc7* und *Sos7* weiter einzugrenzen, wurden N- bzw. C-terminale Fragmente der beiden Proteine verwendet. So wurde der endogen *spc7-ha* exprimierende Stamm mit den *sos7-n-* bzw. *sos7-c-gfp* tragenden Plasmiden transformiert, während der *sos7⁺-13cmyc* Stamm mit den *spc7-n-* bzw. *spc7-c-gfp*-Plasmiden transformiert wurde. Während weder *Spc7-HA* eine Interaktion mit dem N-Terminus von *Sos7-GFP* noch *Sos7-13cmyc* eine mit *Spc7-N* zeigte, konnte sowohl *Spc7-HA* mit *Sos7-C* als auch *Sos7-13cmyc* mit *Spc7-C* interagieren (Abbildung 3.42 B). Somit scheint eine Bindung zwischen *Spc7* und *Sos7* jeweils über ihren C-Terminus zu erfolgen.

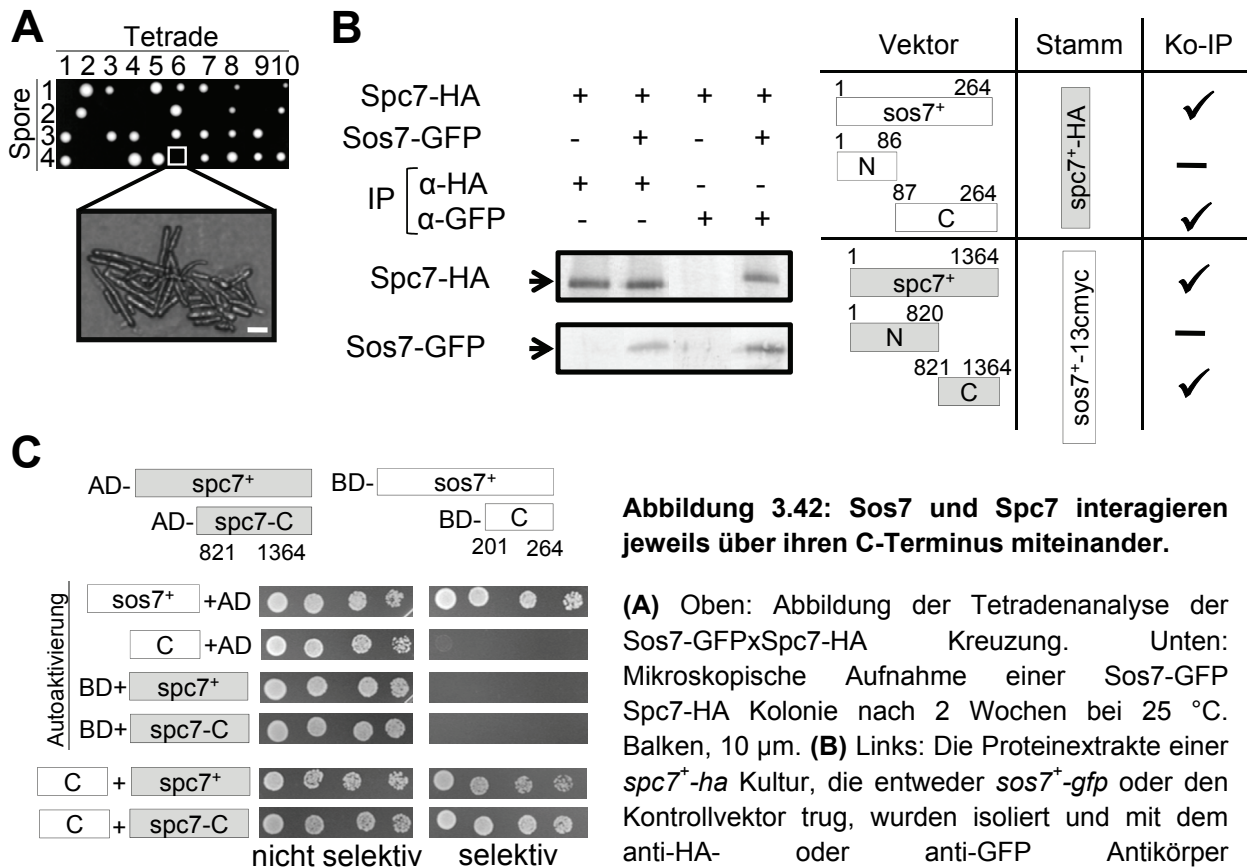


Abbildung 3.42: Sos7 und Spc7 interagieren jeweils über ihren C-Terminus miteinander.

(A) Oben: Abbildung der Tetradenanalyse der Sos7-GFPxSpc7-HA Kreuzung. Unten: Mikroskopische Aufnahme einer Sos7-GFP Spc7-HA Kolonie nach 2 Wochen bei 25 °C. Balken, 10 µm. (B) Links: Die Proteinextrakte einer *spc7⁺-ha* Kultur, die entweder *sos7⁺-gfp* oder den Kontrollvektor trug, wurden isoliert und mit dem anti-HA- oder anti-GFP Antikörper immunpräzipitiert. Die Ko-Immunpräzipitation wurde mittels eines Westernblots analysiert. + = das Fusionsprotein ist vorhanden bzw. mit diesem Antikörper wurde immunpräzipitiert; - = das Fusionsprotein ist **nicht** vorhanden bzw. mit diesem Antikörper wurde **nicht** immunpräzipitiert; IP = Immunpräzipitation; α = Antikörper. Rechts: Sos7 und Spc7 interagierten über deren C-terminale Regionen miteinander. Schematische Darstellung der Ko-Immunpräzipitationen (Ko-IP) die mit dem *spc7⁺-ha* Stamm durchgeführt wurden, der *sos7⁺-*, *sos7-n* bzw. *sos7-c-gfp* überexprimiert, oder dem *sos7⁺-13cmv* Stamm, der *spc7⁺-*, *spc7-n* bzw. *spc7-c-gfp* überexprimiert. Die Sos7 Fragmente wurden willkürlich ausgewählt, Sos7-N entspricht den ersten 86 AS und Sos7-C den AS 87-264. (C) Hefe-2-Hybrid Analyse des AD-(Aktivierungsdomäne) Spc7, AD-Spc7-C und BD-(Bindedomäne)-Sos7 oder BD-Sos7²⁰¹⁻²⁶⁴. Sos7-C besteht anders als zuvor in der Hefe-2-Hybrid Analyse aus dem AS Bereich 201-264. Die Aktivierung wurde auf nicht selektivem und selektivem (Histidin freiem) Medium getestet (n = 7).

Ob die Interaktion zwischen Spc7 und Sos7 direkt ist, wurde in einer Hefe-2-Hybrid Analyse analysiert. Das volllängen *spc7⁺* und *spc7-c* wurden in die Aktivierungsdomäne enthaltenden Plasmide kloniert, während *sos7⁺* und *sos7-c* in die Bindungsdomäne enthaltenden Plasmide kloniert wurden (Kapitel 2.11). Um eine mögliche Autoaktivierung der einzelnen Fragmente auszuschließen, wurden die Spc7 und Sos7 enthaltenden Plasmide jeweils separat auf ihr Wachstum auf selektivem Medium untersucht. Es zeigte sich, dass das an die Bindedomäne gekoppelte volllängen Sos7 Protein auch ohne einen Interaktionspartner in der Lage ist auf selektivem Medium zu wachsen (Abbildung 3.42 C). Damit konnte das volllängen Sos7

Protein in den folgenden Untersuchungen nicht eingesetzt werden und nur die Interaktion zwischen dem Sos7-C Fragment mit dem volllängen Spc7 bzw. dessen C-Terminus wurde untersucht (Abbildung 3.42 C). Wie man aufgrund des Wachstums auf selektivem Medium erkennen konnte, interagiert Sos7-C sowohl mit dem volllängen Spc7 als auch mit der C-terminalen Variante (Abbildung 3.42 C).

Da Spc7 ein enger Interaktionspartner von Sos7 ist und für dessen Kinetochorassoziation benötigt wird, wurde in einer Hefe-2-Hybrid Analyse überprüft, ob der C-Terminus von Sos7 ohne die letzten sieben AS weiterhin mit Spc7-C interagieren kann. Wie man in Abbildung 3.43 sieht, gleicht die Blaufärbung, die als Indikator für eine Interaktion zwischen zwei Proteinen dient, der Spc7-C und Sos7-C exprimierenden *S. cerevisiae* Zellen derer die Spc7-C und Sos7-C* (die letzten sieben AS fehlen) überexprimieren. Folglich werden die letzten sieben AS des Sos7 Proteins nicht für die Interaktion mit Spc7 benötigt.

Damit ist die Interaktion zwischen Sos7 und Spc7 direkt und erfolgt über die C-terminalen Enden. Bei Spc7 sind es die letzten 544 AS. Im Falle von Sos7 konnte die Interaktionsdomäne zu Spc7 auf 57 AS (AS Bereich 201-257) eingegrenzt werden.

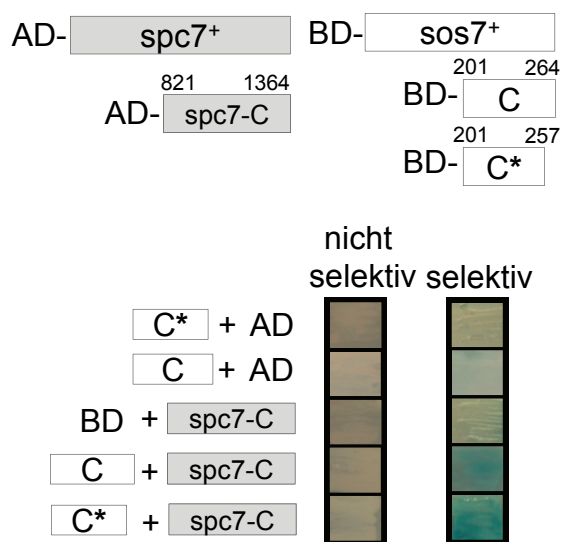


Abbildung 3.43: Die Sos7-Spc7 Interaktion erfolgt nicht über die letzten sieben AS des Sos7 Proteins.

Hefe-2-Hybrid Analyse der Interaktion von Spc7-C mit Sos7-C (AS 201-264) oder Sos7-C* (AS 201-257). ("C*"). Spc7-C befand sich im AD (Aktivierungsdomäne), die Sos7-C Fragmente im BD (Bindedomäne) enthaltenden Vektor. Die Interaktion wurde auf X- α -Gal Platten getestet denen Histidin und Adenin fehlte (selektiv). Die Kontrollen weisen keine Autoaktivierung auf (n = 4).

3.3.3.15 Sos7 ist eine neue Komponente des NMS-Komplexes

Bisherige Analysen den NMS-Komplex betreffend konnten zeigen, dass der MIND-Komplex als Ladestation für Spc7, und den Ndc80-Komplex benötigt wird. Spc7 ist umgekehrt ebenfalls für die Lokalisierung von MIND-Komponenten erforderlich, während Ndc80-Komplex Komponenten dafür nicht benötigt werden (Abbildung 3.44 A) (Kerres et al, 2007).

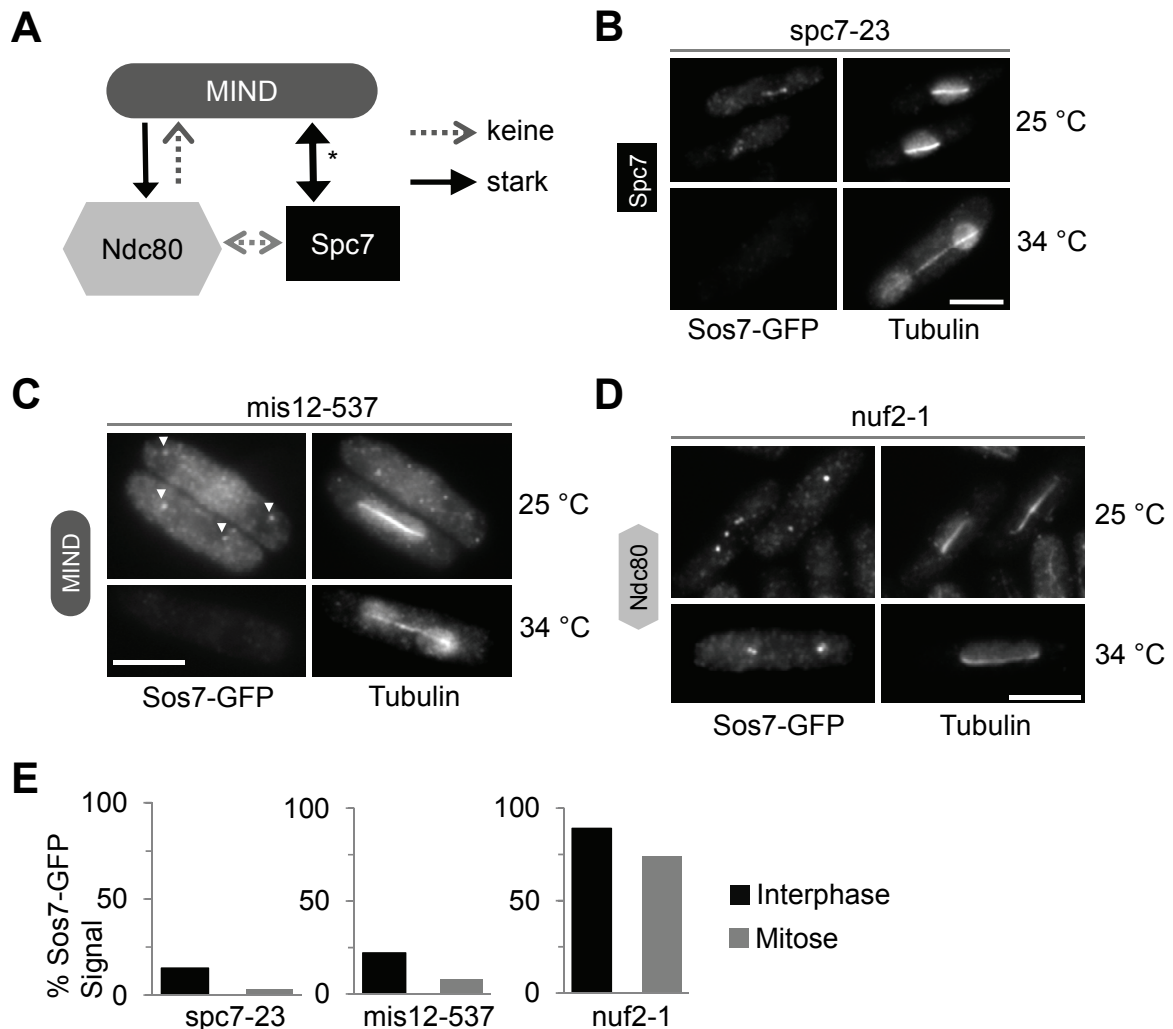


Abbildung 3.44: Sos7 benötigt funktionelles Spc7 und den MIND-Komplex, nicht aber den Ndc80-Komplex, zu Kinetochorlokalisierung.

(A) Schematische Darstellung der Lokalisierungsabhängigkeiten innerhalb des NMS-Komplexes. Da nicht jedes Kinetochorprotein in mutanter Form existiert, konnte in diesen Fällen die Studie zur Lokalisierungsabhängigkeit nur unidirektional erfolgen (ein Pfeil). Konnten die Abhängigkeitsverhältnisse bidirektional analysiert werden, ist dies in Form eines Doppelpfeils erkennbar. (B)-(D) Die *spc7-23*, *mis12-537* oder *nuf2-1* Mutantenstämme, die endogenes Sos7-GFP exprimierten, wurden bei 25 °C oder 6 h bei 34 °C inkubiert und fixiert. In (C) ist das Sos7-GFP-Signal zusätzlich mit einem Pfeil gekennzeichnet. Die Zellen wurden mit anti-GFP und anti-Tubulin Antikörpern behandelt. Balken, 5 µm. (E) Die Anzahl an Zellen aus (B)-(D), die in der Interphase bzw. während der Mitose bei der restriktiven Temperatur ein Sos7-GFP-Signal zeigten, wurde quantifiziert (n = 100).

Sos7 als enger Interaktionspartner von Spc7 ist somit höchstwahrscheinlich eine neue Komponente des NMS-Komplexes. Als erstes wurde deshalb die Lokalisierungsabhängigkeit von Sos7-GFP von den einzelnen Sub-Komplexen des NMS-Superkomplexes untersucht. Zuerst wurde die Kinetochorlokalisierung von Sos7-GFP in *spc7-23* Zellen unter permissiven

und restriktiven Bedingungen analysiert. Bei der permissiven Temperatur wurde ein wildtypisch Kinetochor-assoziiertes Sos7-GFP-Signal detektiert, während bei der restriktiven Temperatur nur 14 % der Interphase Zellen und 3 % der mitotischen Zellen ein Sos7-GFP-Signal am Kinetochor aufwiesen. Somit hängt die Lokalisierung von Sos7 von funktionellem Spc7 ab (Abbildung 3.44 C und E).

Die Kinetochorlokalisierung von Sos7-GFP wurde ebenfalls im mutanten *mis12-537* Stamm des MIND-Komplexes und in im *nuf2-1* Stamm (Ndc80-Komplex) analysiert. Während Sos7-GFP funktionelles Mis12 zur Assoziation an das Kinetochor benötigte, konnte es unabhängig vom Ndc80-Komplex binden. So wiesen in der *mis12-537* Mutante nur 22 % Interphase Zellen und 8 % mitotische Zellen ein Kinetochor assoziiertes Sos7-GFP-Signal bei der restriktiven Temperatur auf (Abbildung 3.44 B und E). Dieses Signal war jedoch stark reduziert im Vergleich zum Wildtyp (Abbildung 3.44 B), wohingegen die Bindung von Sos7-GFP am Kinetochor in der *nuf2-1* Mutante nur geringfügig beeinträchtigt war (Abbildung 3.44 D und E).

Um die Lokalisierungsabhängigkeit der NMS-Komponenten von Sos7 aufzuklären, wurde jeweils die Lokalisierung eines Vertreters der drei Komplexe (Spc7-GFP, Mis12-GFP und Nuf2-GFP) in den *sos7^{ts}* Mutanten analysiert. Das Spc7-GFP-Signal war im *sos7Δ7* Mutantenstamm bereits bei der permissiven Temperatur schwächer als im Wildtyp und unter restriktiven Bedingungen zeigten nur 3 % der Interphase Zellen, aber keine der mitotischen ein Spc7-GFP-Signal am Kinetochor (Abbildung 3.45 A). In den anderen beiden *sos7^{ts}* Stämmen kam es bei der restriktiven Temperatur in einem Teil der Zellen zum Verlust der Kinetochorlokalisierung von Spc7-GFP, doch in den übrigen Zellen war noch eine reduzierte Spc7-GFP Bindung ans Kinetochor zu beobachten (Abbildung 3.45 A).

Auch Mis12 benötigt funktionelles Sos7 zur Lokalisierung. Während bei der permissiven Temperatur Mis12-GFP wildtypisch am Kinetochor in den *sos7^{ts}* Mutanten vorgefunden wurde, fand sich bei der restriktiven Temperatur nur in 14 % der sich in der Interphase und in 4 % der sich in der Mitose befindlichen *sos7Δ7* Zellen ein Kinetochor assoziiertes Mis12-GFP-Signal (Abbildung 3.45 B). In den *sos7+6* und *sos7-178* Mutanten offenbarte sich ein ähnliches Bild (Abbildung 3.45 B). Anders war dies bei der Nuf2-GFP Komponente des Ndc80-Komplexes. Die Kinetochorlokalisierung dieser Komponente war bei der restriktiven Temperatur in der *sos7+6* und *sos7-178* Mutante nur geringfügig herabgesetzt (Abbildung 3.45 C). Die Kinetochorlokalisierung von Nuf2-GFP jedoch in der *sos7Δ7* Mutante nicht analysiert werden, da der *sos7Δ7 nuf2-gfp* Stamm nicht lebensfähig ist (Daten nicht gezeigt).

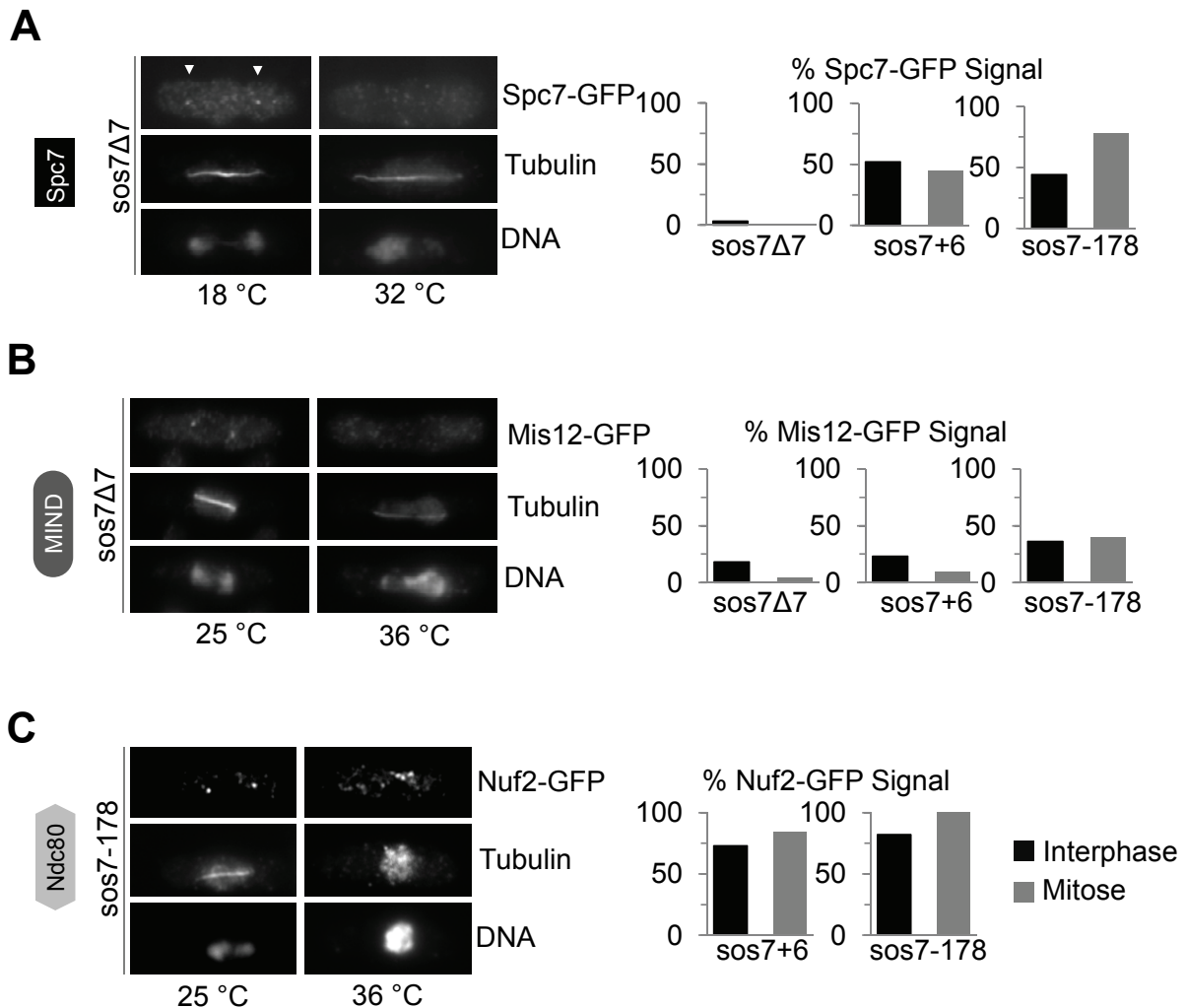


Abbildung 3.45: Spc7 und der MIND-Komplex benötigen funktionelles Sos7 zur Kinetochorassoziation.

(A)-(C) Mikroskopische Fluoreszenzaufnahmen der endogenen Spc7-GFP, Mis12-GFP (MIND-Komplex) oder Nuf2-GFP (Ndc80-Komplex) exprimierenden *sos7^{ts}* Zellen, die bei der permissiven Temperatur (18 °C bzw. 25 °C) oder 6 h bei der restriktiven Temperatur (32 °C bzw. 36 °C) inkubiert wurden. Das Spc7-GFP-Signal ist zusätzlich mit einem Pfeil gekennzeichnet. Die Zellen wurden fixiert und mit anti-GFP, anti-Tubulin Antikörper und DAPI behandelt. Die Lokalisierung der verschiedenen GFP fusionierten NMS-Komponenten in den *sos7^{ts}* Stämmen während der Interphase oder Mitose wurde unter restriktiven Bedingungen quantifiziert (rechte Spalte) (n = 100).

Sos7 wurde als Suppressor der *spc7-23* Mutante isoliert und kann den mutanten Phänotyp aller *spc7^{ts}* Mutanten supprimieren. Im Folgenden sollten die Abhängigkeiten innerhalb des NMS-Komplexes weiter aufgeschlüsselt werden, indem plasmidkodiertes *sos7⁺* in die *mis12-537* und *nuf2-1* Mutantenstämme transformiert und auf seine Suppressionseigenschaften hin untersucht werden sollte. *Sos7⁺* konnte den Wachstumsdefekt der *mis12-537* Mutante supprimieren, nicht aber den des *nuf2-1* Mutantenstammes (Abbildung 3.46 A). Durch die Überexpression verschiedener Komponenten des NMS-Komplexes in den *sos7^{ts}* Mutanten konnte des Weiteren gezeigt werden, dass zusätzliches *spc7⁺* und die MIND Komponenten *mis12⁺* und *mis13⁺* den

Wachstumsdefekt aller *sos7^{ts}* Mutantenstämme supprimieren konnten (Abbildung 3.46 B). Nur die Überexpression der MIND-Komponente *nnf1⁺* führte nicht zur Suppression des ts Phänotyps der *sos7^{ts}* Mutanten (Abbildung 3.46 B). Die beiden Komponenten des Ndc80-Komplexes hingegen waren nicht in der Lage das Wachstumsverhalten der *sos7^{ts}* Stämme zu beeinflussen (Abbildung 3.46 B).

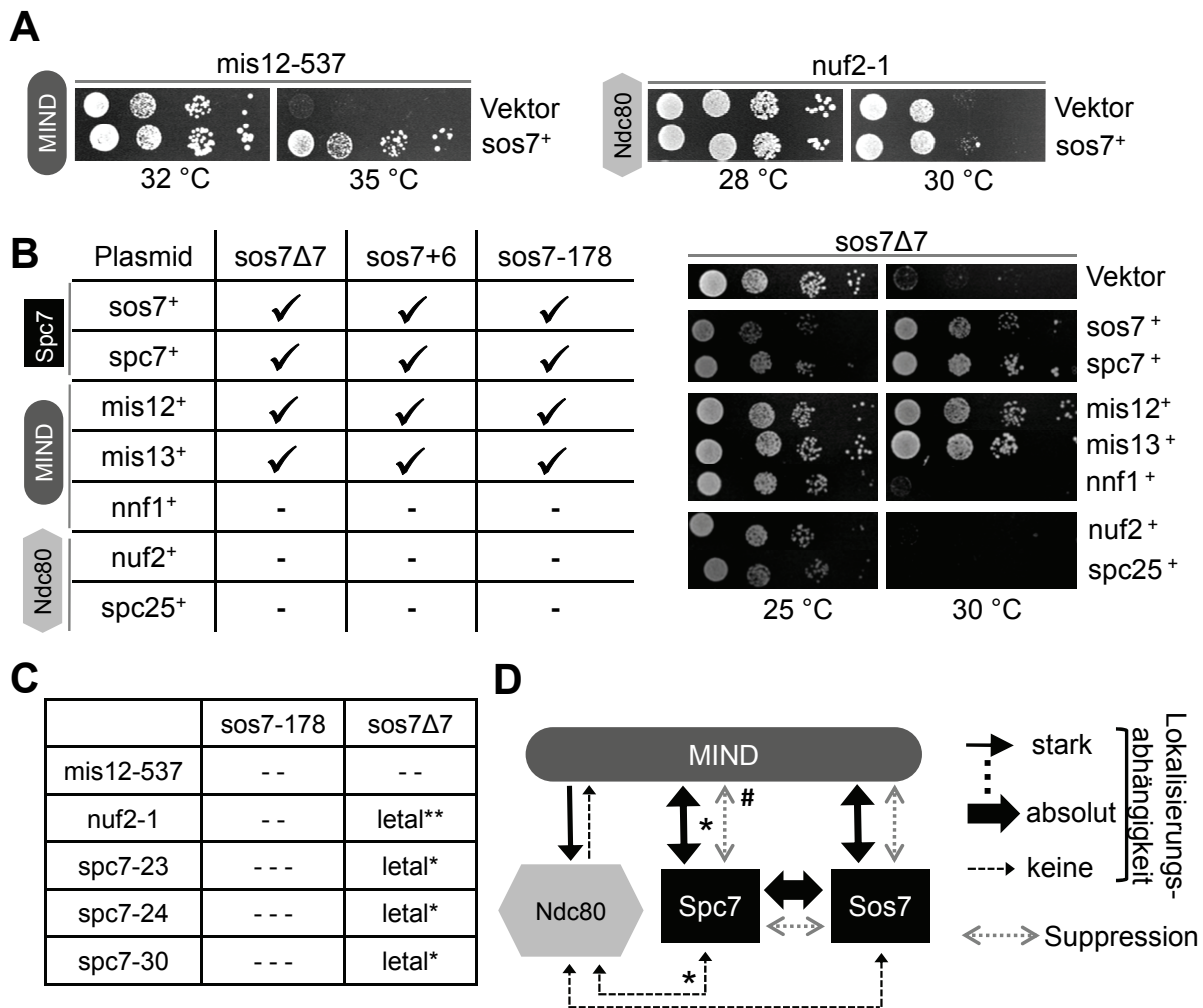


Abbildung 3.46: Der Spc7-Sos7-Komplex interagiert eng mit dem MIND-Komplex, nicht aber mit dem Ndc80-Komplex.

(A) Serielle Tropftests von Mutanten des NMS-Komplexes die *sos7⁺* überexprimieren. Als Kontrolle wurde der Kontrollvektor eingesetzt. Die Platten wurden 5-6 Tage bei der jeweils permissiven oder restriktiven Temperatur inkubiert. (B) Links: Schematische Darstellung der Suppressionseigenschaften der aufgeführten NMS-Komponenten in den *sos7^{ts}* Mutanten. ✓ = Suppression; - = keine Suppression. Rechts: Tropftest der *sos7Δ7* Mutante, die verschiedene Komponenten des NMS-Komplexes überexprimiert. (C) *sos7-178* oder *sos7Δ7* Doppelmутanten mit verschiedenen mutanten Kinetochorkomponenten des NMS-Komplexes. (-) - (---) = Stärke der negativen genetischen der Doppelmутanten mit mutanten Komponenten des NMS- und Sim4-Komplexes (Abbildung 3.47 E), verglichen mit dem Wachstum der einzelnen Mutanten. * Es wurden insgesamt 30 Tetraden ausgewertet. ** Es wurden 12 Tetraden getestet. (D) Zusammenfassung der Lokalisierungsabhängigkeiten und Suppressionsfähigkeiten der verschiedenen Subkomplexe innerhalb des NMS-Superkomplexes. * = Kerres et al., 2007, # = Obuse et al, 2004 (nur unidirektional; extra *spc7⁺* supprimiert den ts Phänotyp von *mis12-537*).

Mit dem Erzeugen von Doppelmutanten zwischen den defekten Komponenten des Ndc80- und MIND-Komplexes sowie Spc7 mit den *sos7^{ts}* Mutanten *sos7Δ7* und *sos7-178* sollte zusätzlich das Abhängigkeitsverhältnis innerhalb des NMS-Komplexes untersucht werden. Alle *sos7-178* Doppelmutanten waren lebensfähig. Dies war nicht der Fall für *sos7Δ7*. Hier konnte nur die *sos7Δ7 mis12-537* Doppelmutante erzeugt werden. Alle weiteren Doppelmutanten mit *sos7Δ7* waren letal (Abbildung 3.46 C).

Die Doppelmutanten mit *sos7-178* zeigten unterschiedlich starke genetische Interaktionen. Die stärkste Interaktion wurde zwischen *sos7-178* und den *spc7^{ts}* Mutanten beobachtet (Abbildung 3.46 C). Aber auch *sos7-178* Doppelmutanten mit *nuf2-1* oder *mis12-537* wiesen eine deutliche Verschlechterung des Wachstums im Vergleich mit den Einzelmутanten auf (Abbildung 3.46 C).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Sos7 eine neue Komponente des NMS-Komplexes darstellt. Die Sos7 und Spc7 Proteine bilden höchstwahrscheinlich einen Subkomplex innerhalb des NMS-Komplexes (Abbildung 3.46 D). Diese Proteine assoziieren physikalisch miteinander und die Lokalisierung des einen Proteins hängt absolut von der Funktionalität des anderen ab. Auch wird der Wachstumsdefekt der *sos7^{ts}* Mutanten durch zusätzliches Spc7 supprimiert und umgekehrt (Abbildung 3.46 D). Der Spc7-Sos7-Komplex interagiert derweil mit dem MIND-Komplex. Die Lokalisierung des Spc7-Sos7-Komplexes am Kinetochor hängt vom MIND-Komplex und umgekehrt ab (Abbildung 3.46 D). Auch können verschiedene Komponenten des einen Komplexes den Wachstumsdefekt der mutanten Mitglieder des anderen Komplexes jeweils supprimieren (Abbildung 3.46 D). Der MIND-Komplex wird aber auch für die Lokalisierung des Ndc80-Komplexes benötigt, der unabhängig vom Spc7-Sos7-Subkomplex am Kinetochor lokalisiert. Die Lokalisierung des Ndc80-Komplex ist hierarchisch. Der Ndc80-Komplex assoziiert über den MIND-Komplex am Kinetochor, beeinflusst aber nicht umgekehrt die Lokalisierung des MIND-Komplexes (Abbildung 3.46 D). Somit wird folgendes Modell für den Aufbau und die Abhängigkeiten innerhalb des NMS-Komplexes postuliert: Der MIND-Komplex bildet eine Ladestation für sowohl den Ndc80- als auch für den Spc7-Sos7-Komplex (Abbildung 3.46 D). Während der Ndc80-Komplex hierarchisch über den MIND-Komplex am Kinetochor bindet, sind die MIND- und Spc7-Sos7-Komplexe in ihrer Lokalisierung voneinander abhängig (Abbildung 3.46 D).

3.3.3.16 Das Sos7 Protein wird nicht für die Kinetochorassoziation von Sim4-Komplex Komponenten benötigt

Neben dem NMS-Komplex existiert der 13 Komponenten fassende Sim4-Kinetochorkomplex (Liu et al, 2005). Der NMS- und Sim4-Komplex wurden zwar unabhängig voneinander biochemisch isoliert, es gibt allerdings Daten, die auf multiple Verbindungen zwischen den

beiden Komplexen hindeuten. So benötigt z. B. die Sim4-Komponente Fta2 funktionelles Spc7 um am Kinetochor assoziieren zu können (Kapitel 3.1.6) (Kerres et al, 2006).

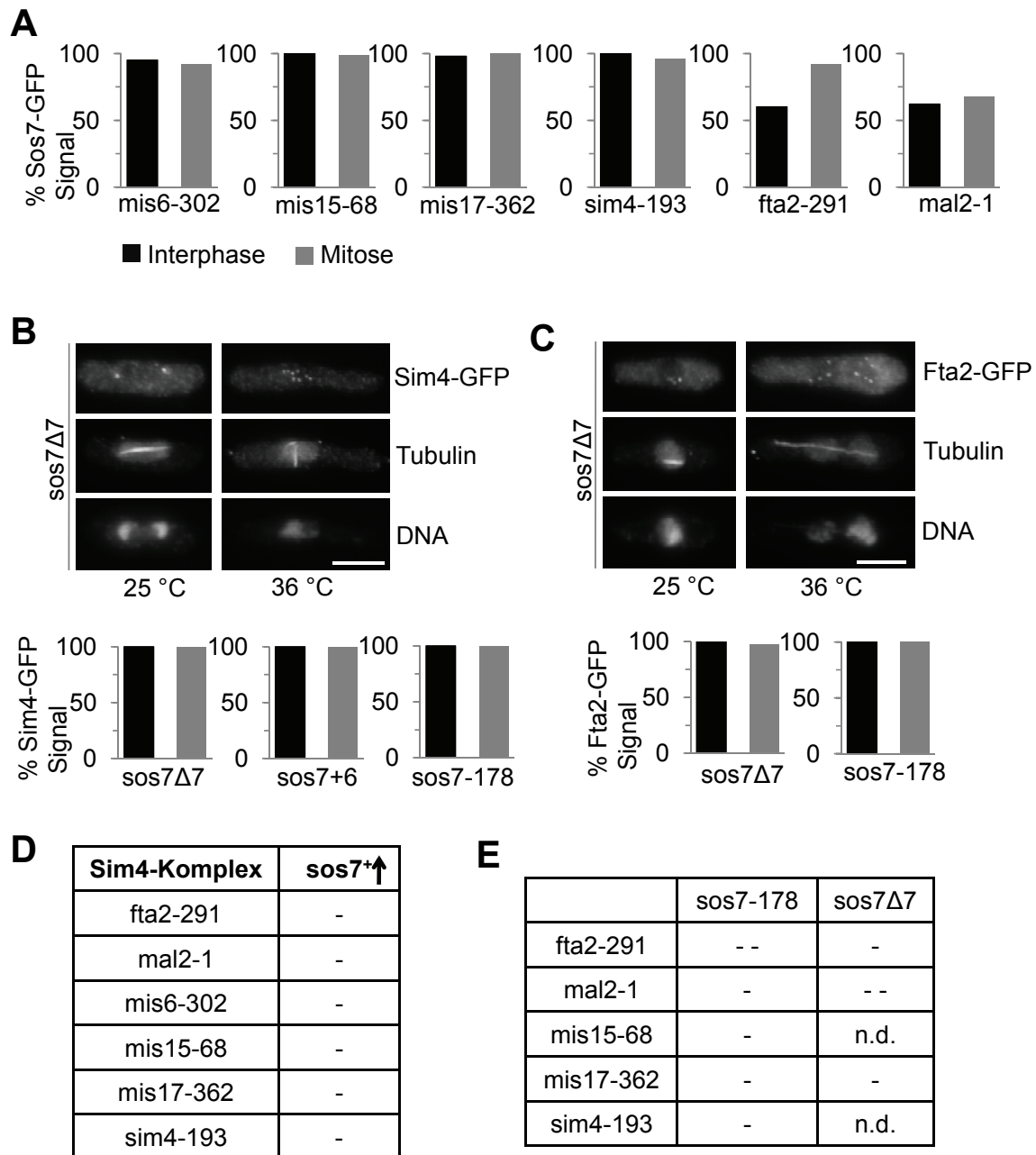


Abbildung 3.47: Die Interaktion zwischen Sos7 und dem Sim4-Komplex.

(A) Quantifizierung des am Kinetochor assoziierten Sos7-GFP-Signals nach 6 Stunden bei der restriktiven Temperatur von 34 °C in den mutanten Sim4-Komplexstämmen *mis6-302*, *mis15-68*, *mis17-362*, *sim4-193*, *fta2-291* und *mal2-1*. **(B)-(C)** Lokalisierung zweier Komponenten des Sim4-Komplexes (Sim4-GFP (links) und Fta2-GFP (rechts)) in den angegebenen *sos7*^{ts} Mutanten unter permissiven und restriktiven Bedingungen. Der anti-GFP, anti-Tubulin Antikörper und DAPI wurden verwendet. Balken, 5 µm. Die Kinetochorlokalisierung der beiden Sim4-Komponenten während der Interphase und Mitose unter restriktiven Bedingungen wurde quantifiziert (n = 100). **(D)** Die Überexpression von *sos7*⁺ führt in mutanten Stämmen des Sim4-Komplexes zu keinen Wachstumseffekt. **(E)** *sos7-178* oder *sos7Δ7* Doppelmутanten mit verschiedenen Kinetochor Komponenten des Sim4-Komplexes. (-) - (--) Stärke der negativen genetischen Interaktion der Doppelmутanten mit mutanten Komponenten des NMS- und Sim4-Komplexes (Abbildung 3.46 C), verglichen mit dem Wachstum der einzelnen Mutanten.; n.d. = nicht detektiert.

Um zu überprüfen, ob Sos7 mit dem Sim4-Komplex interagiert, wurde die Kinetochorlokalisierung des Sos7-GFP Proteins in mutanten Mitgliedern des Sim4-Komplexes und mit GFP fusionierten Sim4-Komponenten in den *sos7^{ts}* Mutanten untersucht.

Während das Sos7-GFP-Signal in den *mis6-302*, *mis15-68*, *mis17-362* und *sim4-193* Mutantenstämmen in weit über 90 % der Zellen bei der restriktiven Temperatur wildtypisch am Kinetochor lokalisiert war, kam es in den *fta2-291* und *mal2-1* Mutantenstämmen zu einer Reduktion des Sos7-GFP-Signals (Abbildung 3.47 A). In 8-40 % der mitotischen oder Interphase Zellen fand sich bei der restriktiven Temperatur kein Kinetochor assoziiertes Sos7-GFP-Signal (Abbildung 3.47 A). Da die Fta2 Kinetochorlokalisierung in der *spc7-23* Mutante herabgesetzt ist, deutet dies auf eine engere Interaktion zwischen dem Spc7-Sos7- und Mal2-Fta2-Komplex hin (Kapitel 3.1.6) (Kerres et al, 2006; Kerres et al, 2007). Umgekehrt jedoch zeigten sowohl Sim4-GFP als auch Fta2-GFP eine wildtypische Kinetochorlokalisierung in den *sos7^{ts}* Stämmen (Abbildung 3.47 B und C). Fta2, das in Abhängigkeit von Spc7 am Kinetochor lokalisiert, benötigt somit nicht dessen Interaktionspartner Sos7 zur Kinetochorassoziation (Kerres et al, 2007).

Des Weiteren wurde plasmidkodiertes *sos7⁺* in den sechs vorhandenen Mutanten des Sim4-Komplexes überexprimiert. Die Überexpression von *sos7⁺* führte in keiner der Mutanten (*fta2-291*, *mal2-1*, *mis6-302*, *mis15-68*, *mis17-362* und *sim4-193*) zu einer Suppression des Wachstumsdefektes (Abbildung 3.47 D).

Um synthetische Interaktionen aufzudecken wurden Doppelmutanten zwischen *sos7 Δ 7* bzw. *sos7-178* und defekten Komponenten des Sim4-Komplexes erstellt. Wie in Abbildung 3.47 E tabellarisch dargestellt, zeigten alle Doppelmutanten eine Verschlechterung des Wachstums im Vergleich zu den Einzelmutanten.

Insgesamt findet sich durch die Tatsache, dass Sos7 zur wildtypischen Kinetochorlokalisierung funktionelles Mal2 und Fta2 benötigt, eine weitere Verbindung zwischen den NMS- und Sim4-Komplexen.

3.3.3.17 Sos7 ist ein hochkonserviertes Protein

Sos7 stellt eine neue Komponente des evolutionär stark konservierten NMS-Komplex` dar. Eine Datenbank Suche unter Verwendung des BLAST Algorithmus zeigte, dass das Sos7 Protein innerhalb einer Vielzahl von Pilzen stark konserviert ist (Abbildung 3.48 A) (Altschul et al, 1990; Altschul et al, 1997). Die Homologie zwischen dem *S. pombe* Sos7 und dem putativen Homolog in *Schizosaccharomyces japonicus* SJAG_03327 erstreckte sich fast über das gesamte Protein und wies bei 36 % der AS Identität und 60 % Homologie auf. Auch

zeigten die *Sos7* Homologe in *Aspergillus nidulans* und *Aspergillus flavus* einen ähnlich langen Homologiebereich mit 31 % bzw. 32 % Identität und 53 % bzw. 54 % Homologie (Abbildung 3.48 A). Währenddessen war der Homologiebereich vom *S. pombe* *Sos7* zu den putativen Homologen in *Neurospora crassa* und *Sordaria macrospora* zwar kürzer, aber in diesem Bereich fand sich 41 % bzw. 42 % Identität und 65 % bzw. 66 % Homologie (Abbildung 3.48 A und Daten nicht gezeigt).

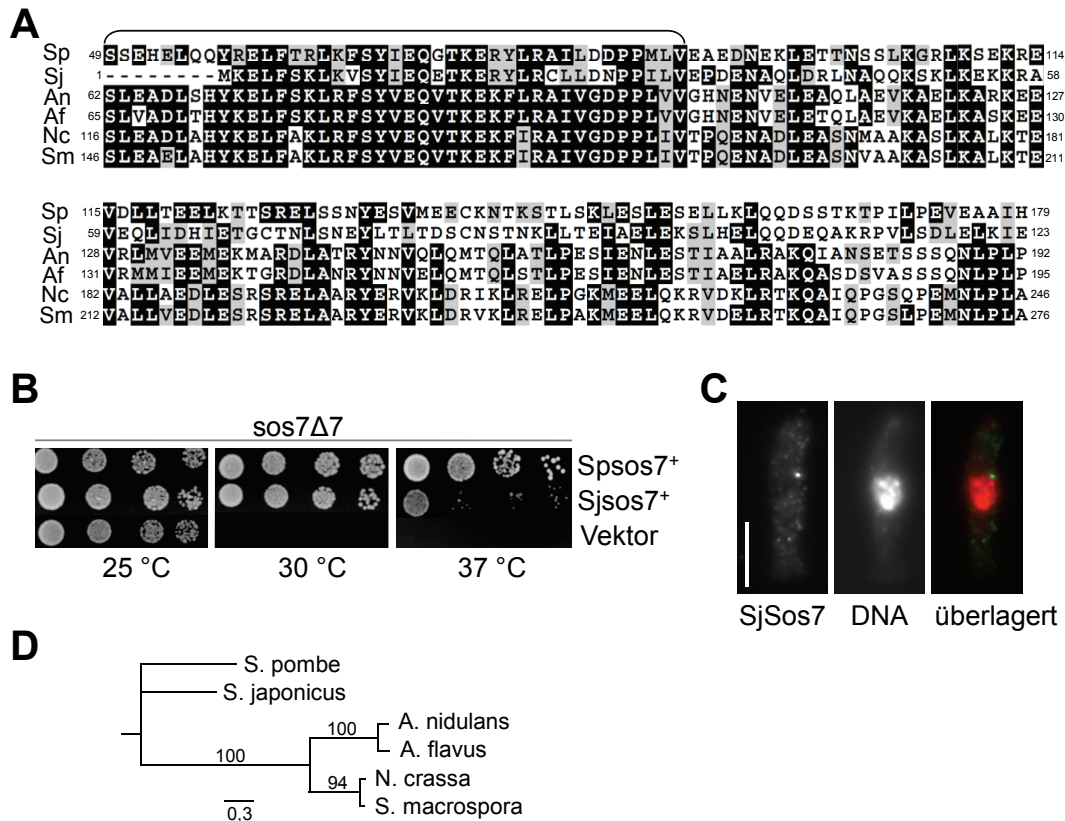


Abbildung 3.48: *Sos7* ist in Pilzen hoch konserviert.

(A) Putative Homologe des *S. pombe* *Sos7* in Pilzen (Sj: *S. japonicus* SJAG_03327, An: *A. nidulans* CBF76747, Af: *A. flavus* NRRL3357, Nc: *N. crassa* CAE76380, Sm: *S. macrospora* SMAC_05415). Finden sich mindestens 50 % identische AS, so sind diese schwarz unterlegt, bei mindestens 50 % Homologie sind die AS grau unterlegt. Der homologe Bereich erstreckt sich über ca. 150 AS, eine 41 AS fassende Region ist besonders konserviert und durch eine Klammer zusätzlich hervorgehoben. Die putativ homologen Proteine wurden durch eine BLAST-Suche identifiziert, mittels ClustalW wurde ein multiples Alignment erstellt und zur Ansicht mit BOXSHADE 3.21 bearbeitet (http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html) (Altschul et al, 1990; Altschul et al, 1997; Fantes, 1979; Higgins et al, 1996; Larkin et al, 2007; Thompson et al, 1994). **(B)** Tropftest der *sos7Δ7* Mutante, die das *S. pombe* *sos7+* oder *S. japonicus* SJAG_03327 (*Sjsos7+*) überexprimiert. Die thiaminfreien selektiven Platten wurden 5-6 Tage bei den angegebenen Temperaturen inkubiert. **(C)** Lokalisierung des endogenen *S. japonicus* *Sos7* Proteins. Die *S. japonicus* Zellen wurden fixiert und mit DAPI und dem anti-*S. pombe*-*Sos7* Antikörper behandelt. Balken 5 µm. Sjsos7: grün; DNA: rot. **(D)** Phylogenetischer Baum (Kladogramm) des *Sos7* Proteins der in (A) dargestellten Pilze. Der Baum wurde mit der Maximum Likelihood Methode berechnet (Felsenstein, 1973). Die Zahl an den Abzweigungen gibt jeweils den Bootstrap Wert an, der bei 100 Wiederholungen ermittelt wurde (Felsenstein, 1992). Die Länge der Äste gibt die Distanz wieder.

Aufgrund der signifikanten Homologie zwischen dem *S. pombe* Sos7 und dem *S. japonicus* SJAG_03327 sollte getestet werden, ob das Homolog aus *S. japonicus* in der Spalthefe *S. pombe* funktionell ist. Dazu wurde die genomische Sequenz des *S. japonicus* SJAG_03327 in einen *S. pombe* Expressionsvektor kloniert und in die *sos7^{ts}* Mutanten transformiert. In Abbildung 3.48 B ist beispielhaft der *sos7Δ7* Mutantenstamm gezeigt, der SJAG_03327 exprimiert. Durch die Expression von SJAG_03327 kam es zur Suppression des Wachstumsdefekts der *sos7^{ts}* Mutanten (Abbildung 3.48 B und Daten nicht gezeigt). Diese war dosisabhängig. So konnte der ts Phänotyp der *sos7Δ7* Mutante bei einer geringen Expression von SJAG_03327 bis einschließlich 30 °C supprimiert werden, während eine hohe Expression zur Suppression bis einschließlich 37 °C führte, auch wenn das Wachstum der SJAG_03327 überexprimierenden Zellen nicht dem wildtypischen Wachstum glich (Abbildung 3.48 B). Somit scheint es sich bei dem durch SJAG_03327 kodierten Protein um ein funktionelles Homolog von *S. pombe* Sos7 zu handeln. SJAG_03327 wird von nun an als *S. japonicus sos7⁺* bezeichnet.

Als nächstes wurde mittels einer Immunfluoreszenz Analyse, bei der der anti-*S. pombe*-Sos7-Antikörper eingesetzt wurde, untersucht ob *S. japonicus* Sos7 Kinetochor-lokalisiert ist. Auch in *S. japonicus* Zellen konnte ein mit der DNA ko-lokalisiertes Signal detektiert werden, das vermutlich dem Kinetochor entspricht. Somit handelt es sich bei dem *S. japonicus* Sos7 höchstwahrscheinlich um ein neues Kinetochorprotein.

Anhand der Proteinsequenzen wurde ein phylogenetischer Baum erstellt, der die evolutionär bedingten Veränderungen zwischen den putativen Sos7 Homologen aufzeigt. Dieser glich in der systematischen Stellung der Pilze *S. pombe*, *A. nidulans* und *N. crassa* dem phylogénomischen Stammbaum der Pilze (Kuramae et al, 2006). Die Sequenz des *S. japonicus* Sos7 Homologs gleicht dem *S. pombe* Protein am meisten. Das enge Verhältnis der beiden Spalthefen ist durch die Tatsache begründet, dass beide zur Familie der *Schizosaccharomycetaceae* gehören. *A. nidulans* und *A. flavus* sind Mitglieder der Familie der *Trichocomaceae* und *N. crassa* und *S. macrospora* der *Sordariaceae*. So haben sich parallel zur Fortentwicklung der einzelnen Pilzfamilien die jeweiligen Sos7 Homologe weiter entwickelt.

Somit handelt es sich bei Sos7 um ein hoch konserviertes Protein.

3.3.3.18 Sos7 ist nicht in Hefen mit einem Punktzentromer konserviert

Trotz der starken und teilweise funktionellen Homologie von Sos7 in den verschiedenen Pilzen, zeigten nicht alle ein Sos7 Homolog. In der Knospungshefe *S. cerevisiae* fand sich z. B. keins. In *S. cerevisiae* ist aber bereits Kre28 als Interaktionspartner von Spc105, dem

S. cerevisiae Homolog von Spc7 identifiziert worden (Nekrasov et al, 2003; Pagliuca et al, 2009). Obwohl Sos7 und Kre28 jeweils mit Spc7 bzw. Spc105 einen Subkomplex am Kinetochor bilden, fand sich zwischen den beiden Proteinen keine nennenswerte Homologie (Daten nicht gezeigt) (Nekrasov et al, 2003). Die beiden Proteine schienen auch funktionell divergent, denn die Überexpression des *S. cerevisiae* *KRE28* konnte nicht den ts Phänotyp der *sos7^{ts}* Mutanten supprimieren (Abbildung 3.49 A).

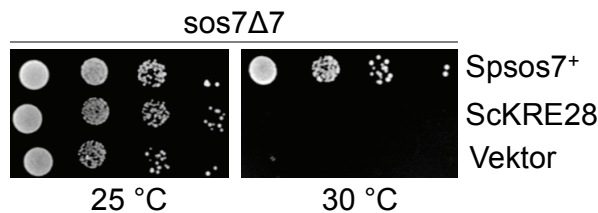
A

Abbildung 3.49: Das *S. cerevisiae* Kre28 ist in der Familie der *Saccharomycetaceae* konserviert.

(A) Tropftest des *sos7Δ7* Stammes, der das *S. pombe* *sos7⁺* oder das *S. cerevisiae* *KRE28* überexprimiert. Die Platten wurden bei der permissiven (25 °C) und restriktiven (30 °C) Temperatur für 5-6 Tage inkubiert. **(B)** Die Hefen *V. polyspora* (Kpol_2002p21), *Z. rouxii* (ZYRO0F18172g), *A. gossypii* (AFR728Wp), *C. glabrata* (CAGL0H01573g), *L. thermotolerans* (KLTH0F00836p) und *K. lactis* (KLLA0C00891g), die alle zur Familie der *Saccharomycetaceae* gehören, wiesen putative Kre28 Homologe auf (jeweils in Klammern angegeben). Die

B

Organismus	Erwartungs- wert	Punkt- zentromer
<i>V. polyspora</i>	3e-45	n.d.
<i>Z. rouxii</i>	1e-29	✓
<i>A. gossypii</i>	1e-28	✓
<i>C. glabrata</i>	3e-24	✓
<i>L. thermotolerans</i>	1e-22	✓
<i>K. lactis</i>	4e-08	✓

Wahrscheinlichkeit, dass es sich um homologe Proteine handelt, ist mit dem Erwartungswert (je kleiner der Wert, desto wahrscheinlicher ist, dass es sich um reale Homologie handelt und nicht um eine rein statistische) angegeben. Außerdem findet sich die Information, ob bei diesen Hefen ein Punktzentromer identifiziert wurde. n.d.= nicht detektiert (Daten ermittelt über eine BLAST Analyse (Altschul et al, 1990; Altschul et al, 1997)).

Eine Datenbankanalyse ergab, dass putative Kre28 Homologe nur in Mitgliedern der Familie der *Saccharomycetaceae* existieren. So gibt es Kre28-ähnliche Proteine u. a. in *Vanderwaltozyma polyspora*, *Zygosaccharomyces rouxii*, *Ashbya gossypii*, *Candida glabrata*, *Lachancea thermotolerans* und *Kluyveromyces lactis* (Abbildung 3.49 B). Bisher konnte in einer Vielzahl von Hefen der *Saccharomyces* Klasse, zu denen die Familie der *Saccharomycetaceae* gehört, ein Punktzentromer identifiziert werden (Kapitel 1.6.2). So tragen alle Hefen, die ein *S. cerevisiae* Kre28 Homolog besitzen, bis auf *V. polyspora*, dessen Zentromer-DNA noch nicht charakterisiert wurde, ein Punktzentromer (Abbildung 3.49 B).

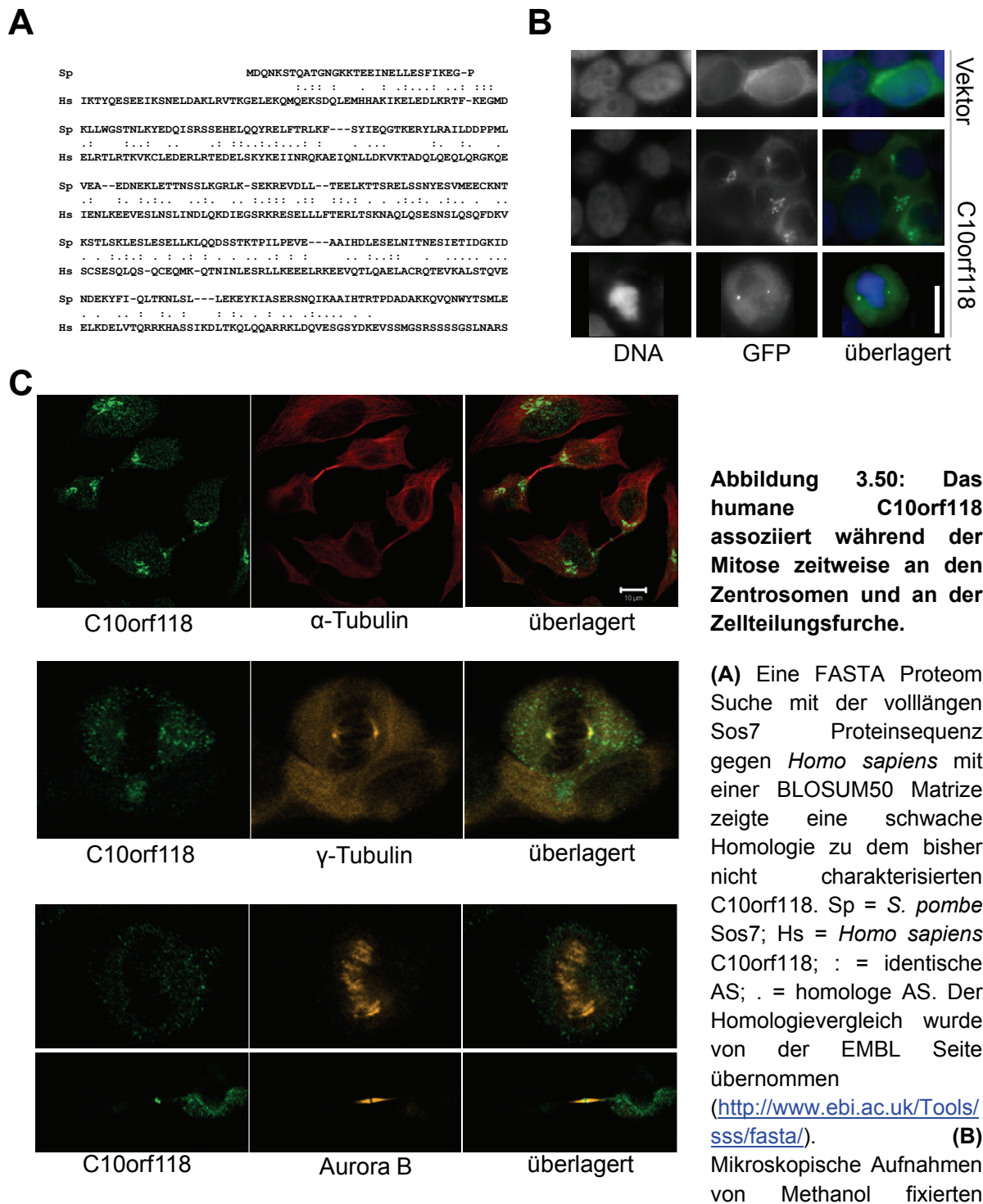
Sos7 ist vermutlich nur innerhalb von Organismen mit einem regionalen Zentromer konserviert, während Punktzentromer tragende Lebewesen ein Kre28 Homolog aufweisen.

3.3.3.19 Das humane C10orf118 Protein ist vermutlich kein Homolog vom *S. pombe* Sos7

Bei der Suche mit dem BLAST-Algorithmus nach Homologen des *S. pombe* Sos7 Proteins konnten keine eindeutigen Kandidaten in höheren Eukaryoten identifiziert werden. Deshalb wurde eine bioinformatische Suche mit dem sensitiveren FASTA Algorithmus gestartet. Die Homologie Suche führte zum humanen, bisher noch nicht untersuchten C10orf118 Protein, das 23,5 % Identität und 59,8 % Homologie zu fast dem gesamten *S. pombe* Sos7 aufwies (Abbildung 3.50 A). Um herauszufinden, ob es sich bei C10orf118 um ein humanes Kinetochorprotein handelt, wurde die c-DNA dieses ORFs in einen Expressionsvektor kloniert, der N-terminal die Information für das GFP-Fusionsprotein aufwies. Nach der Transfektion von HEK293T Zellen mit dem GFP-C10orf118 Vektor fanden sich in fixierten Interphase Zellen punktförmige GFP-C10orf118 Signale akkumuliert in der Nähe des Zellkerns wieder (Abbildung 3.50 B). Dieses Signal entspricht einer Golgi Lokalisierung (Carmena & Earnshaw, 2003). Mit dem Beginn der Mitose kam es zur Defragmentierung des Golgi-Apparates, die auch in den GFP-C10orf118 transfizierten Zellen beobachtet werden konnte (Abbildung 3.50 B) (Misteli, 1996; Sutterlin & Colanzi, 2010). Während der Mitose konnte ein GFP-C10orf118 Signal detektiert werden, das möglicherweise mit den Zentrosomen, den SPBs der humanen Zellen, ko-assoziierte (Abbildung 3.50 B) (Carmena & Earnshaw, 2003). Kinetochorsignale waren in den transfizierten Zellen nicht detektierbar. Unterdessen wies die Transfektion des GFP-Expressionsvektors alleine nur ein diffuses GFP-Signal im Zytoplasma auf (Abbildung 3.50 B).

Um die subzelluläre Lokalisierung von C10orf118 weiter aufzuklären wurde in Zusammenarbeit mit Stephan Schmidt von der AG Piekorz (Institut für Biochemie und Molekularbiologie II, Hämatologie und Klinische Immunologie, Universitätsklinikum Düsseldorf) die Lokalisierung des Sos7 Homologs in HeLa Zellen untersucht.

Das C10orf118 Protein wurde mit einem spezifischen Antikörper behandelt, um nur die Lokalisierung des endogenen Proteins zu analysieren und nicht wie in der Transfektionssituation eine artifizielle C10orf118 Menge. Als Kontrollen wurden α -Tubulin, das ein Teil des Mikrotubuli-Zytoskeletts und der mitotischen Spindel darstellt, γ -Tubulin, das zur Markierung der Zentrosomen dient und die Aurora B Kinase, die während der frühen Mitose mit der DNA und in der späten mit der mitotischen Spindel ko-lokalisiert, verwendet (Lens et al, 2006; MacRae & Langdon, 1989). Für Interphase Zellen konnte die alleinige Golgi Lokalisierung des C10orf118 Proteins bestätigt werden. Das C10orf118 Signal grenzte während der Interphase in der räumlichen Nähe des Zentrosoms gebündelt an den Zellkern an (Abbildung 3.50 C, oben).



Während der Mitose lag der Golgi-Apparat defragmentiert vor und konnte nur punktförmig im Zytoplasma wahrgenommen werden (Misteli, 1996; Sutterlin & Colanzi, 2010). Unterdessen

fand sich in mitotischen Zellen das C10orf118 Protein in der räumlichen Nähe des Zentrosoms (Abbildung 3.50 C Mitte). Dieses Signal ko-lokalisierte nicht mit dem Zentrosom, sondern schien das Zentrosom zu umschließen (Abbildung 3.50 C Mitte). Anfangs wurde eine dem C10orf118 spezifische Funktion, die nicht den Golgi-Apparat betrifft, vermutet. Allerdings belegen jüngste Studien, dass der Golgi-Apparat in humanen Zellen mit den Zentrosomen zusammen wirkt und die Lokalisierung von C10orf118 vermutlich mit der C10orf118 Funktion am Golgi-Apparat einher geht und nicht mit einer zusätzlichen Funktion des Proteins am Zentrosom (Sutterlin & Colanzi, 2010). Somit handelt es sich bei C10orf118 nicht um ein Kinetochorprotein.

In der Zytokinese, nachdem es wieder zum Aufbau des Golgi-Apparates gekommen war, konnte zusätzlich eine C10orf118 Signal in der Zellteilungsfurche detektiert werden (Abbildung 3.50 C, oben und unten). Dies entsprach keiner beschriebenen Lokalisierung des Golgi-Apparates und lässt vermuten, dass das C10orf118 Protein noch weitere Funktionen aufweist.

Jetzige Untersuchungen lassen vermuten, dass es sich bei dem C10orf118 Protein nicht um das Sos7 Homolog handelt. Weitere Analysen werden dies allerdings klären müssen.

3.3.3.20 Der anti-*S. pombe*-Sos7 Antikörper bindet eine DNA-assoziierte Struktur in humanen Zellen

Mittels Homologiesuche gelang es nicht, ein humanes Sos7 Homolog zu identifizieren. Da der anti-*S. pombe*-Sos7 Antikörper, auch das *S. japonicus* Sos7 detektieren konnte, sollte untersucht werden, ob dieser Antikörper auch in humanen Zellen ein potentielles Sos7 Homolog erkennen kann. Tatsächlich wurde in humanen Hep-2 Zellen eine spezifische Struktur, die punktförmig mit der DNA ko-lokalisierte, detektiert. Dieses Signal fand sich sowohl in Interphase als auch mitotischen Zellen, wobei jeweils die Nukleoli ausgeschlossen waren (Abbildung 3.51 A). Diese Lokalisierung schien spezifisch, da das Prä-Immun Serum keine Struktur detektieren konnte (Daten nicht gezeigt).

Eine Immunpräzipitation mit dem anti-Sos7 Antikörper sollte das humane Sos7 Protein identifizieren (Kapitel 2.14). Die isolierten Proteine wurden auf einer SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt. Um nur die Proteine mittels einer massenspektrometrischen Untersuchung weiter zu analysieren, die tatsächlich an den anti-Sos7-Antikörper binden, wurde zusätzlich eine Westernblot Analyse mit dem anti-Sos7 Antikörper durchgeführt. Die Proteinbanden, die ein Coomassie gefärbtes SDS-Gel zeigte, konnten teilweise auf einem Westernblot detektiert werden (Abbildung 3.51 B). Bei den übrigen Signalen im Coomassie gefärbten Gel handelt es sich vermutlich um Interaktionspartner der isolierten Proteine, die

ko-immunpräzipitiert wurden. Drei der Proteinbanden, die auch im Westernblot ein Signal aufwiesen, wurden zur massenspektrometrischen Untersuchung gegeben (Abbildung 3.51 B, mit einem Pfeil im SDS-Gel gekennzeichnet, weiterer Pfeil zeigt das entsprechende Signal im Westernblot). Leider wurden die drei Proteinbanden als RL1D1, NOP56 und NUCL identifiziert. RL1D1 ist ein ribosomales, die L1 Domäne enthaltendes Protein 1, NOP56 stellt das nukleoläre Protein 56 dar und bei NUCL handelt es sich um ein Nukleolin (Abbildung 3.51 B). Diese Proteine wurden vermutlich unspezifisch durch den anti-Sos7 Antikörper gebunden.

Somit war es zum jetzigen Zeitpunkt weder durch Homologiesuche noch durch den anti-Sos7 Antikörper möglich ein Sos7 Homolog in humanen Zellen zu identifizieren.

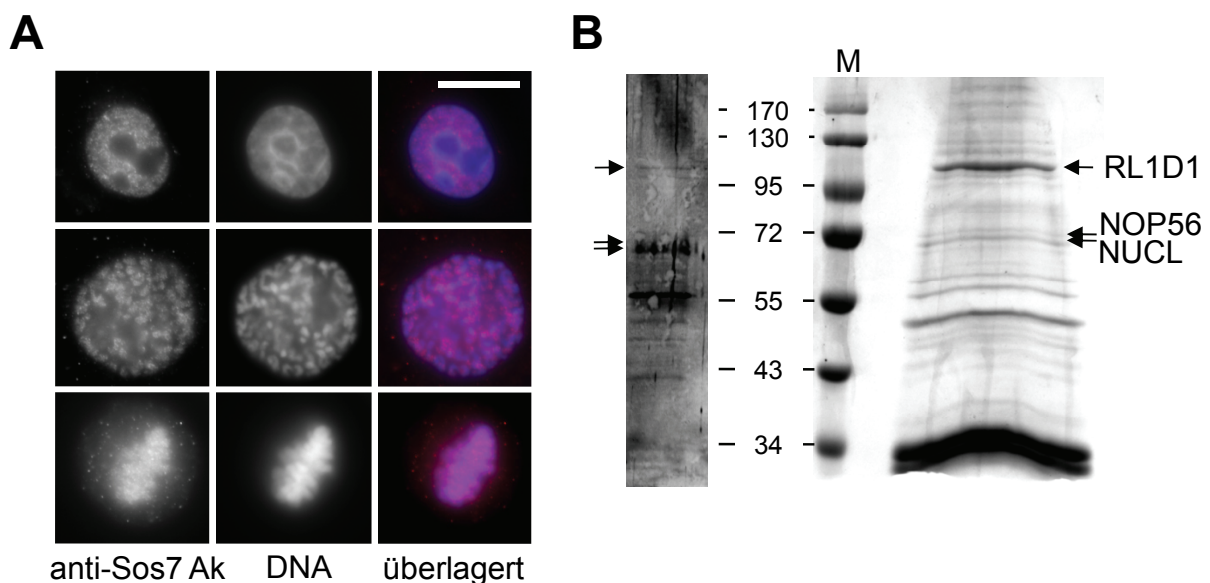


Abbildung 3.51: Immunpräzipitation von Hep-2 Zellen mit dem *S. pombe* anti-Sos7 Antikörper.

(A) Der *S. pombe* anti-Sos7 Antikörper (anti-Sos7 Ak) bindet eine Struktur, die mit der DNA von Hep-2 Zellen ko-lokalisiert. Die humanen Zellen wurden mit PFA fixiert und mit dem anti-Sos7 Antikörper und DAPI behandelt. „humanes Sos7-Signal“: rot; DNA: blau. Balken, 10 μ m. (B) Mittels des *S. pombe* anti-Sos7 Antikörpers wurde eine Immunpräzipitation in Hep-2 Zellen durchgeführt. Das so gewonnene Eluat wurde auf einer SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt (rechts) oder in einem Westernblot analysiert (links). Die mit dem Pfeil gekennzeichneten Proteinbanden, die auch im Westernblot gekennzeichnet sind, wurden aus dem Coomassie gefärbten Gel zur LC-Massenspektrometrie gesandt (Zentrum für Molekulare Medizin Köln, Zentrale Bioanalytik). Markerangabe in kDa.

3.3.3.21 Ist Zwint das humane Sos7 Homolog?

Das humane Spc7 Homolog Blinkin interagiert über seinen C-Terminus in einer Hefe-2-Hybrid Analyse mit dem Kinetochorprotein Zwint (Kiyomitsu et al, 2007). Da ein Sequenz Vergleich zwischen Sos7 und Zwint eine geringe Homologie über das gesamte Protein aufwies, wurde überprüft, ob die beiden Proteine funktionell homolog sind (Abbildung 3.52 A). Die Zwint c-DNA wurde in einen reprimierbaren *S. pombe* Expressionsvektor kloniert und in die *sos7^{ts}* Stämme transformiert. Die Expression von Zwint konnte nicht den Wachstumsdefekt der *sos7^{ts}* Mutantenstämme supprimieren. Dies ist beispielhaft für *sos7-178* in Abbildung 3.52 B gezeigt.

A

```

Sp 1 MDQNKSTQATGNGKKTEEI NELLESFI KEGPKLLWGSTNLKYEDQI SRSSEHELQQYREL 60
Hs 1 MEAAETEAEAAALEVLAEVAGILEP VGLQEEAELPAKI LVEFVVDSQKK-DKLLCSQLQV 59

Sp 61 FTRLKFSYI EQGTIKERYLRAI LDDPMLVEADNEKLETTNSSLKGRLKSEKREVDLLTE 120
Hs 60 ADFLQNI LAQEDTAKGLDPLASEDTSRQKAI AAKEQWKELKATYREHVEAIKI GLTKALT 119

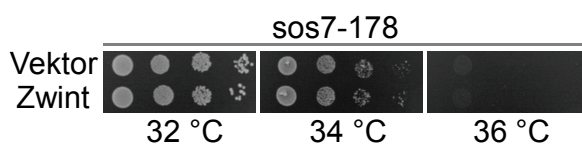
Sp 121 ELKTTSRRELSSNYESVMEECKNTKSTLSKLESLESELLKLQQ-DSSTKTPI LPEVEAAIH 179
Hs 120 QMEEAQRKRTQLREAFEQ LQAKKQVAMEKRRRAVQNQWQLQOEKHLQHLAEVSAEVRERKT 179

Sp 180 DLESNELNI TNESI ETI DGKI DNDE- - - - - KYFI QLTKNLS- - LLEKEYKI ASE- - - - - R 226
Hs 180 GTQQELDRVFQKLGNL KQQAQERDKLQRYQTFLQLLYTLQGKLLFPEAEAEAEENLPDDK 239

Sp 227 SNGI KAAI HTRTPDADAKKQVQNWYTSMLIEI YDQLLQK 264
Hs 240 PQQPTRPQEQTGDTMGRDPGVSEKAVGLQPADGVNLP 277

```

B



C



Abbildung 3.52: *S. pombe* Sos7 und humanes Zwint scheinen strukturell homolog.

(A) Homologievergleich zwischen dem 264 AS fassenden *S. pombe* Sos7 Protein (Sp) und dem humanen aus 277 AS bestehendem Zwint (Hs). Schwarz hinterlegt sind identische, grau hinterlegt homologe AS aufgeführt. (B) Tropfttest des *sos7-178* Stammes, der Zwint exprimiert. Die Platten wurden unter plasmid-selektiven Bedingungen für 5 Tage bei den angegebenen Temperaturen inkubiert. (C) Hefe-2-Hybrid Analyse des humanen volllängen Zwint und dem *S. pombe* Sos7-C Fragment (AS Bereich 201-264). Die Fragmente befanden sich entweder im AD (Aktivierungsdomäne) oder BD (Bindedomäne) tragenden Vektor. Ist kein Fragment angegeben handelt es sich um den Kontrollvektor. 10^5 Zellen wurden auf nicht selektives bzw. selektives Medium (-ade, -his, +X- α -GAL) getropft (n = 4).

Mittels eines plasmidkodierten GFP-Fusionsproteins sollte als nächstes überprüft werden, ob Zwint in *S. pombe* Zellen Kinetochor-assoziiert vorliegt. Weder im Wildtypstamm noch in den *sos7^{ts}* Mutanten konnte ein Kinetochor-assoziiertes Zwint-GFP-Signal detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

Sos7 kann *in vivo* möglicherweise Dimere bilden (Kapitel 3.3.3.4). Da Zwint in einer Hefe-2-Hybrid Analyse mit sich selbst interagieren konnte, sollte überprüft werden, ob das humane Zwint und das *S. pombe* Sos7 Protein in einer Hefe-2-Hybrid Analyse miteinander interagieren (Starr et al, 2000). Da das volllängen Sos7 Protein autoaktiv ist, wurde das C-terminale Sos7 Fragment (AS 201-264) verwendet (Kapitel 3.3.3.14). Während Zwint oder Sos7-C alleine keine Autoaktivierung aufwiesen, kam es bei zeitgleicher Expression beider Proteine zu einer starken Interaktion, die mit der Interaktion von Zwint mit sich selbst zu vergleichen ist (Abbildung 3.52 C). Somit scheinen Sos7 und Zwint strukturell sehr ähnlich aufgebaut.

Mit der Identifikation von Sos7 als neues essentielles Kinetochorprotein des NMS-Komplexes gelang die Isolierung eines neuen Spc7 Interaktionspartners. Die Analyse der *sos7^{ts}* Mutanten gab Aufschluss über die Funktion dieser konservierten Proteinfamilie beim Kinetochoraufbau und der Kinetochor-Mikrotubuli-Verknüpfung. Eine mögliche Homologie zur humanen Zwint Familie konnte aufgedeckt werden.

3.4 *fta2-291* Suppressor Screen: zwei neue Fta2 Interaktionspartner

Um neue Kinetochorproteine oder Regulatoren, die mit Fta2 interagieren zu identifizieren, habe ich eine extragene Multikopien-Suppressoranalyse mit der konditional-letalen *fta2-291* Mutante durchgeführt. Nach der Transformation des temperatursensitiven *fta2-291* Mutantenstammes mit einer genomischen *S. pombe* Genbank (Barbet et al, 1992) konnten 71 Plasmide identifiziert werden, die zu einer Suppression des Nichtwachstumsphänotyp bei der restriktiven Temperatur führten. Mit Hilfe von PCR, Enzymrestriktionsanalysen und Sequenzierung der genomischen Inserts konnten diese Plasmide in drei Gruppen eingeteilt werden (Abbildung 3.53 A). Erstens fanden sich 40 *fta2*⁺ enthaltende Plasmide. Durch die Rückgewinnung des wildtypischen *fta2*⁺-ORFs kam es zu einer vollständigen Suppression des temperatursensitiven Phänotyps (Daten nicht gezeigt). Weitere 24 Vektoren trugen den bereits als Suppressor bekannten *mal2*⁺-ORF (Abbildung 3.53 A). Bei fünf Plasmiden war keine Sequenzierung möglich. Die Anwesenheit zweier Plasmide (V23, V28) führte zur Suppression des ts Phänotyps der *fta2-291* Mutante, ohne dass die Plasmide *fta2*⁺ oder *mal2*⁺ beinhalteten (Abbildung 3.53 A und B).

3.4.1 Der Translations-Initiationsfaktor *sui1*⁺ agiert als Suppressor des mutanten Phänotyps verschiedener Stämme des Sim4-Komplexes

Das Suppressorplasmid V28 enthält ein 6154 Bp großes genomisches *S. pombe* DNA-Fragment von Chromosom II, das fünf offene Leserahmen kodiert (Abbildung 3.53 C). Drei dieser Leserahmen sind vollständig, zwei kodierten nur für Fragmente des jeweiligen Proteins (Abbildung 3.53 C). Die Anwesenheit des V28-Plasmids in *fta2-291* Zellen führte zur partiellen Suppression des ts Phänotyps bis einschließlich 32 °C. Während *fta2-291* Zellen, die nur den Kontrollvektor enthielten, bereits ab Temperaturen von 31 °C kein Wachstum zeigten (Abbildung 3.53 B). Die Überexpression der verschiedenen auf dem V28-Suppressorplasmid kodierten Proteine führte nicht nur zur Suppression des mutanten Phänotyps der *fta2-291* Mutante sondern auch des mutanten *mal2-1* Stammes (Abbildung 3.53 D).

Aus Zeitgründen wurde dieses Projekt im Rahmen einer Promotionsarbeit an Boris Topolski abgegeben. Dieser konnte zeigen, dass die Überexpression des Translations-Initiations Faktor Sui1 alleine zur Suppression des ts Phänotyps der *fta2-291* bzw. *mal2-1* Kinetochormutanten, sowie aller bisher vorhandenen mutanten Stämme des Sim4-Komplexes führt (Boris Topolski, persönliche Mitteilung). Bei *sui1*⁺ handelt es sich nicht um

einen generellen Suppressor aller mutanten Kinetochorkomponenten, so konnte der Wachstumsdefekt der Mutantenstämme des NMS-Komplexes (*nuf2-1*, *mis12-537*, *spc7-23*) nicht durch die Überexpression von *sui1*⁺ supprimiert werden (Boris Topolski, persönliche Mitteilung). Sui1 scheint im direkten Zusammenhang mit den Komponenten des Sim4-Komplexes zu stehen. Eine weitere Analyse des Sui1 Proteins könnte Aufschluss darüber geben, welche Funktion nur vom Sim4-Komplex am Kinetochor übernommen wird.

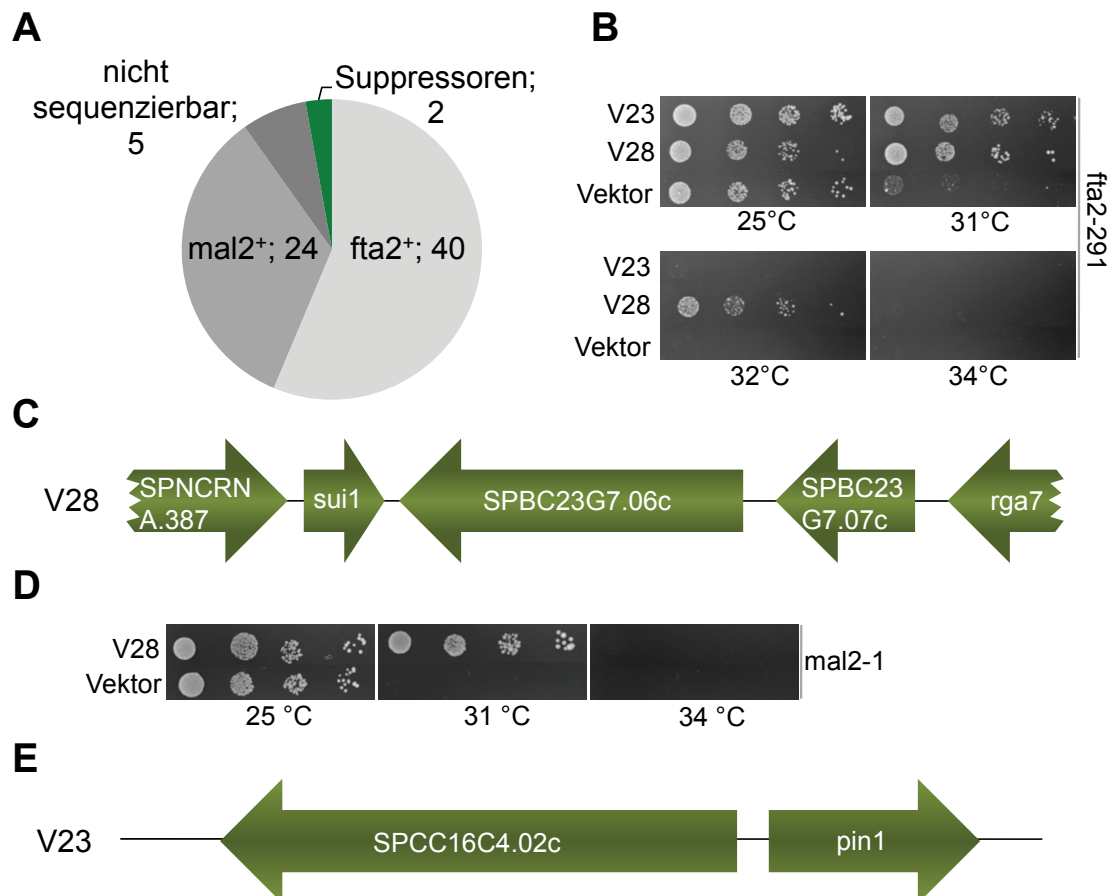


Abbildung 3.53: Die Genbankplasmide V23 und V28 kodieren für zwei verschiedene Suppressoren des mutanten Phänotyps der *fta2-291* Zellen.

(A) Das Tortendiagramm zeigt die 71 Suppressoren und jeweils die Anzahl der bekannten bzw. unbekannten ORFs für die sie kodieren. Fünf Plasmide waren nicht sequenzierbar. **(B)** Serieller Tropftest des *fta2-291* Mutantenstammes, der mit den Genbankplasmiden V23, V28 oder dem Kontrollvektor transformiert wurde. Die selektiven Platten wurden bei den angegebenen Temperaturen für 5-6 Tage inkubiert. **(C)** Schematische Darstellung des 6154 Bp großen genomischen *S. pombe* DNA-Inserts des V28 Plasmids von Chromosom II (Chr. II: 2104873-2111026 Bp). Auf dem Insert sind fünf ORFs kodiert, von denen SPNCRNA.387 (die letzten 459/1153 Bp) und *rga7* (die letzten 220/2088 Bp) nicht vollständig im isolierten Fragment enthalten sind. Die Pfeile zeigen die Transkriptionsrichtung an. **(D)** Die Gegenwart vom V28 Plasmid supprimiert den temperatursensitiven Phänotyp der *mal2-1* Kinetochormutante partiell. Die Inkubation der Tropftestplatten erfolgte bei den angegebenen Temperaturen für 5-6 Tage. **(E)** Bildliche Darstellung des 5180 Bp umfassenden genomischen *S. pombe* DNA-Fragments samt der beiden vollständigen ORFs von Chromosom III (Chr. III: 661564-666743 Bp), die sich auf dem Genbankplasmid V23 befindet.

3.4.2 Die Anwesenheit des V23 Plasmids supprimiert spezifisch den Wachstumsdefekt der *fta2-291* Mutante

Das V23-Plasmid beinhaltet ein 5180 Bp großes genomisches *S. pombe* DNA-Fragment von Chromosom III, das die Sequenz von zwei vollständigen ORFs enthält (Abbildung 3.53 E): den bereits charakterisierten *pin1*⁺-ORF und den bisher unbekannten ORF mit dem systematischen Namen SPCC16C4.02c. Die Peptidyl-Prolyl *cis-trans* Isomerase Pin1 ist in die Zellzyklus Kontrolle involviert, während es sich bei dem bisher nicht charakterisierten Genprodukt, das durch den SPCC16C4.02c-ORF kodiert wird, aufgrund erster Lokalisierungsstudien (http://www.riken.jp/SPD/lmg_page/34_iP/34F05_Loc.html), um ein putatives Kinetochorprotein handeln könnte (Matsuyama et al., 2006). Die Anwesenheit des V23-Genbankplasmids konnte den ts Phänotyp des *fta2-291* Stammes supprimieren (Abbildung 3.53 B). Die *fta2-291* Mutante konnte durch die Überexpression einer der beiden auf V23 kodierten Proteine oder mittels eines synergistischen Effekts beider Proteine bis 31 °C wachsen während *fta2-291* Zellen, die den Kontrollvektor enthielten, nicht dazu in der Lage waren (Abbildung 3.53 B). Der mutante *mal2-1* Stamm konnte nicht durch die Überexpression der beiden auf dem V23 Genbankplasmid kodierten Proteine supprimiert werden (Daten nicht gezeigt), so dass zusätzliches Pin1 oder das von SPCC16C4.02c kodierte Protein als spezifischer Suppressor von *fta2-291* Zellen agieren. Eine folgende Analyse der beiden Proteine kann helfen, die Unterschiede, die zwischen Fta2 und Mal2 bestehen, aufzuklären.

3.5 Etablierung eines neuen Klonierungssystems für *S. pombe* Plasmide in der Hefe *S. cerevisiae*

3.5.1 *S. pombe* Plasmide der pUR- und pREP- Serie sind auch in *S. cerevisiae* funktionell

Von der Knospungshefe *S. cerevisiae* ist bekannt, dass sie mittels homologer Rekombination eine Vielzahl von DNA-Fragmenten in einem Schritt mit einer sehr hohen Effizienz in ein Plasmid integrieren kann. So gelang es das gesamte aus 25 überlappenden Fragmenten bestehende *Mycoplasma genitalium* Genom in einem Schritt in *S. cerevisiae* zu assemblieren (Gibson et al, 2008). Vorteil dieser Methode ist der Erhalt von neuen Plasmiden, die exakt die gewünschte Sequenz enthalten, ohne von mehreren einzigartigen Restriktionsschnittstellen an der richtigen Position abhängig zu sein. Dies ist vor allem in Hinblick auf Plasmide aus einer Multikopien-Suppressoranalyse interessant, die eine genomische DNA Sequenz mit mehr als einem in Frage kommenden Suppressor tragen. Diese könnten so verändert werden, dass sie jeweils nur einen ORF samt der ihm eigenen Promotorregion enthalten, um so einfacher das Gen zu identifizieren, das für den Suppressor kodiert. Allerdings ist diese Methode auf die Knospungshefe beschränkt, da die Plasmide eine *S. cerevisiae* ARS-Sequenz tragen müssen und diese nicht mit der von z. B. *S. pombe* übereinstimmt (Maundrell et al, 1988; Newlon & Theis, 1993).

Da das Erzeugen von Plasmiden durch *in vitro* Methoden eine größere Zahl von Voraussetzungen beinhaltet (z. B. mehrere einzigartige Schnittstellen an der gewünschten Position) und sehr zeitintensiv ist, wurde getestet, ob *S. pombe* Vektoren in *S. cerevisiae* propagiert werden können. Dies gelang mit den *S. pombe* pUR und pREP Vektoren, die den *S. cerevisiae* *LEU2* oder den *S. pombe* *ura4⁺* Prototrophiemarker trugen (Abbildung 3.54 A und B) (Barbet et al, 1992; Gietz R.D., 2006; Maundrell, 1990; Moreno et al, 2000; Sikorski & Hieter, 1989). Die *S. pombe* *his3⁺* Plasmide konnten nicht genutzt werden, da der *his3⁺*-ORF Introns beinhaltet die in *S. cerevisiae* nicht als solche erkannt werden (Kaufer & Potashkin, 2000) (Daten nicht gezeigt).

Wie man in Abbildung 3.54 C sieht, wachsen die *S. cerevisiae* Transformanten mit den *S. pombe* Plasmiden langsamer als solche mit *S. cerevisiae* Plasmiden. Die Transformationseffizienz der *S. pombe* *ura4⁺* Vektoren lag bei 13-16 % der Effizienz des *S. cerevisiae* *URA3* Plasmids, die des *S. pombe* *LEU2* Plasmids lag bei 30 % der Effizienz des *S. cerevisiae* *LEU2* Plasmids (Abbildung 3.54 D).

Die *S. pombe* *ars1* Sequenz ist nicht funktionell in *S. cerevisiae* (Maundrell et al, 1988). Aus diesem Grund wurden andere Regionen gesucht, die auf dem *S. pombe* Plasmid die

Funktion der *S. cerevisiae* ARS Sequenz übernehmen. Dabei konnte im *nmt1*⁺-Promotor, der sich z. B. in den pREP und pJR Plasmiden befindet, eine Sequenz gefunden werden, die mit der *S. cerevisiae* ARS Sequenz übereinstimmt (Position 424-435 des *nmt1*⁺-Promotors) (Celniker et al, 1984). Im pUR19 Vektor fand sich eine solche Sequenz nicht, so dass die im *nmt1*⁺-Promotor beinhaltete Sequenz vermutlich nicht allein als ARS Sequenz dient.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass *S. pombe* Vektoren der pUR19- und pREP-Serie in der Knospungshefe stabil propagiert werden können.

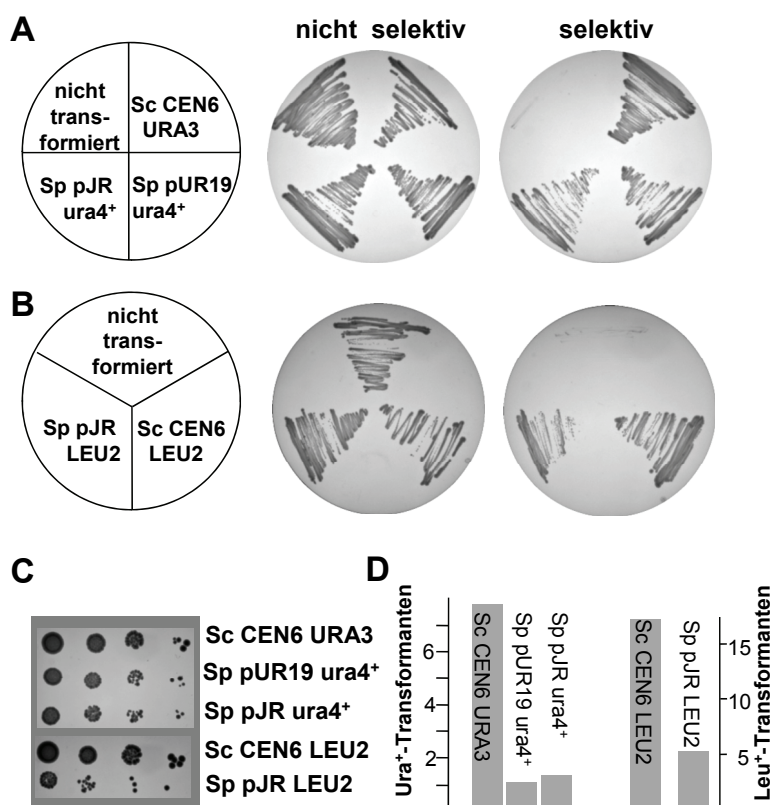


Abbildung 3.54: *S. pombe* Plasmide sind auch in *S. cerevisiae* funktionell

(A) Der *S. cerevisiae* Wildtypstamm CEN.PK2-1 wurde mit dem *S. cerevisiae* Plasmid pRS316 (CEN6 URA3) oder den *S. pombe* Plasmiden pUR19 und pJR2-3XU und dem (B) *S. cerevisiae* Plasmid pRS315 (CEN6 LEU2) oder dem *S. pombe* Plasmid pJR2-3XL transformiert. Die Transformanten wurden unter nicht selektiven und selektiven Bedingungen für 5 Tage bei 30 °C inkubiert. Als Kontrolle diente der untransformierte Ausgangsstamm. (C) Serieller Tropftests (10⁴-10¹ Zellen) des *S. cerevisiae* CEN.PK2-1 Stammes, der die angegebenen Plasmide trägt.

Die Platten wurden 5 Tage bei 30 °C inkubiert. (D) Die Transformationseffizienz der angegebenen Plasmide wurde in 3 unabhängigen Experimenten ermittelt. Die Anzahl der Transformanten beträgt x10⁴/μg DNA. Die Experimente wurden von Eva Walla nach meinen Vorgaben durchgeführt.

3.5.2 *In vivo* Rekombination eines *S. pombe* Vektors in *S. cerevisiae* ist möglich

Da die *S. pombe* Plasmide in *S. cerevisiae* propagiert werden können, war es mittels homologer Rekombination möglich, *S. pombe* Plasmide in *S. cerevisiae* zu klonieren. Als Testexperiment wurde die *kanMX* Kasette in den 4,9 Kb *S. cerevisiae* Vektor pRS316 und den 5,6 Kb umfassenden *S. pombe* Vektor pUR19 in *S. cerevisiae in vivo* kloniert. Die stabile Expression der *kanMX*-Kasette verleiht dem Stamm G418-Resistenz, die auf G418-haltigem Medium überprüft werden kann. Die beiden Plasmide tragen zur Selektion den *ura*⁺ Marker (*URA3*⁺ in *S. cerevisiae*; *ura4*⁺ in *S. pombe*) (Wach et al, 1994). Es wurden jeweils 0,5 µg geschnittenes Plasmid und 1 µg der PCR amplifizierte *kanMX* Kasette, die eine 40 Bp lange, flankierende homologe Sequenz zu dem linken bzw. rechten Plasmidende aufwies, in den *S. cerevisiae* CEN.PK2-1 Stamm transformiert (Abbildung 3.55 A). *Ura*⁺ Transformanten wurden vereinzelt und auf G418-Resistenz getestet. Dabei konnten 89 % (115/130) der *S. cerevisiae* Transformanten und 96 % (151/157) der *S. pombe* Plasmidtransformanten wachsen (Abbildung 3.55 B). Die Integration der *kanMX* Kasette in den Vektor von je vier willkürlich ausgewählten Transformanten wurde zusätzlich über Sequenzierung nachgewiesen (Daten nicht gezeigt).

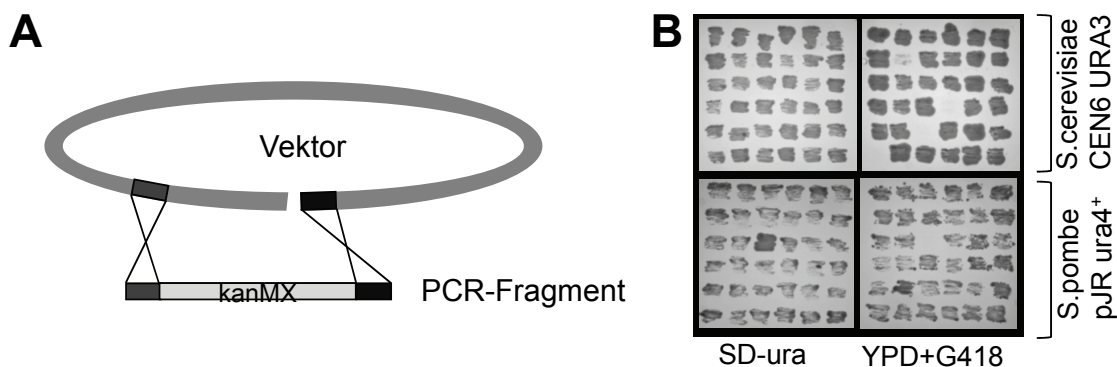


Abbildung 3.55: *In vivo* Rekombination eines *S. pombe* Vektors ist in *S. cerevisiae* möglich

(A) Schematische Darstellung der Integration der *kanMX*-Kasette in einen Vektor mittels homologer Rekombination. Der Vektor wird an (mindestens) einer Position über eine Restriktionsschnittstelle geöffnet. Die *kanMX*-Kasette wurde mittels PCR generiert, die ersten 40 Bp 5' und die letzten 40 Bp 3' sind homolog zu Sequenzen auf dem Vektor (farblich markiert). Die Position des Homologiebereichs kann willkürlich gewählt werden, muss allerdings so gewählt sein, dass der Vektor nach der Integration der *kanMX*-Kasette wieder geschlossen vorliegt. **(B)** Eine 1,8 Kb *kanMX*-Kasette wurde in die angegebenen Plasmide mittels homologer Rekombination in *S. cerevisiae in vivo* kloniert. Die Transformanten wurden auf für die Plasmide selektives Medium (SD-*ura*) ausgestrichen und dann auf Wachstum auf G418-haltigem Medium getestet. Die Platten wurden 2 Tage bei 30 °C inkubiert. Das Experiment wurde von Eva Walla nach meinen Vorgaben durchgeführt.

Die Transformationseffizienz/ μg Plasmid-DNA lag bei $3,4 \times 10^4$ für das *S. cerevisiae* Plasmid und bei 7×10^3 für das *S. pombe* Plasmid. Der einzige Unterschied bestand darin, dass die Transformanten, die die *S. cerevisiae* Plasmide enthalten, früher Kolonien bilden konnten als solche, die die *S. pombe* Plasmide aufwiesen (4 bzw. 11 Tage).

3.5.3 Vom *S. pombe nmt1*⁺-Promotor gelesene Proteine werden auch in *S. cerevisiae* transkribiert

Um zu testen, ob der *S. pombe nmt1*⁺-Promotor auch in *S. cerevisiae* funktionell ist, wurde das *S. cerevisiae BBP1* Gen, das für eine SPB Komponente kodiert, in den *S. pombe* pJR2-3XU Vektor kloniert und in einem temperatursensitiven *S. cerevisiae* Stamm überexprimiert, der einen Defekt im Bbp1 Protein aufweist (*bbp1-1*) (Schramm et al, 2000; Xue et al, 1996). *BBP1* wurde unter Kontrolle des *nmt1*⁺-Promotors exprimiert, denn die Anwesenheit dieses Plasmids konnte die Temperatursensitivität des *bbp1-1* Stammes supprimieren (Abbildung 3.56 A) (Schramm et al, 2000; Xue et al, 1996).

Zur Überprüfung der Funktionalität des *nmt1*⁺ Promotors wurde zusätzlich das *BBP1* Gen in den *nmt1*⁺-Promotor tragenden *S. pombe* pSGP572a Vektor mit *gfp* fusioniert und in einen wildtypischen *S. cerevisiae* Stamm transformiert. Auch das Bbp1-Gfp wurde unter dem *S. pombe nmt1*⁺-Promotor exprimiert, da man ein charakteristisches SPB Signal in lebenden *S. cerevisiae* Zellen detektieren konnte (Abbildung 3.56 B) (Pasion & Forsburg, 1999; Schramm et al, 2000).

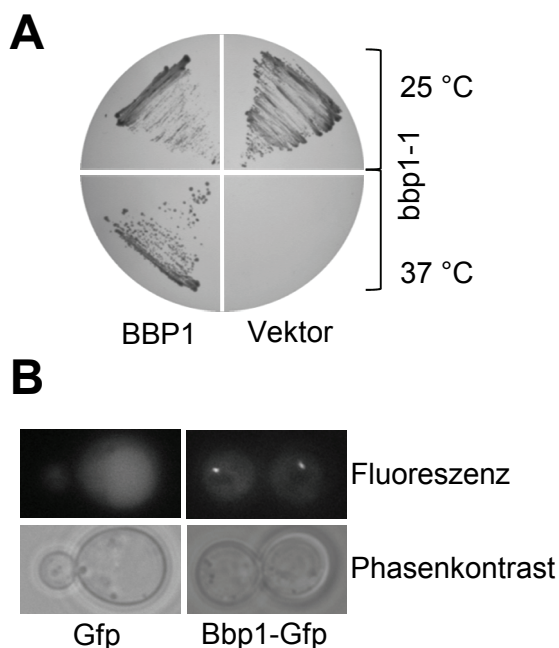


Abbildung 3.56: Der *S. pombe nmt1*⁺ Promotor ist in der Knospungshefe *S. cerevisiae* funktionell

(A) Der temperatursensitive *S. cerevisiae bbp1-1* Mutantenstamm, der den Kontrollvektor oder das *S. pombe* Plasmid pJR2-3XU-BBP1 mit dem *nmt1*⁺ Promotor enthielt, wurden bei 25 °C oder 37 °C für 3 Tage inkubiert. (B) Mikroskopische Aufnahmen von lebenden CEN.PK2-1 Zellen, die das plasmidkodierte Bbp1-Gfp unter dem *nmt1*⁺ Promotor exprimieren. Abbildung oben: Fluoreszenzaufnahmen; Unten: Phasenkontrast. Die Zellen wuchsen in flüssigem SD-ura bei 30 °C an.

Der durch Thiamin regulierbare *S. pombe nmt1⁺*-Promotor kann durch die Zugabe von Thiamin nicht vollkommen reprimiert werden (Moreno et al, 2000). Da das *S. cerevisiae* SD Medium Thiamin enthält, kommt es vermutlich nur zu einer partiellen De-reprimierung des *nmt1⁺*-Promotors. Möglicherweise kann durch Medium ohne Thiamin die *nmt1⁺*-Promotoraktivität und damit die Transkription gesteigert werden. Damit wäre es möglich, *S. pombe* Proteine, deren DNA-Sequenz keine Introns beinhaltet, in *S. cerevisiae* in verschiedenen hohen Dosen zu exprimieren und deren Funktion zu analysieren, ohne die zu Grunde liegenden DNA-Fragmente vorher umklonieren zu müssen.

Neben dem *S. pombe nmt1⁺* Promotor existieren die *nmt41*- und *nmt81*-Promotor Varianten, die eine geringere Aktivität zeigen (Basi et al, 1993; Maundrell, 1990; Moreno et al, 2000). Auch diese wurden in *S. cerevisiae* auf Funktionalität untersucht. Das *S. cerevisiae* Bbp1 konnte auch wenn es vom *nmt41*- oder *nmt81*-Promotor exprimiert wurde den Wachstumsdefekt der *bbp1-1* Mutante supprimieren (Daten nicht gezeigt).

Das *in vivo S. cerevisiae* Rekombinationssystem vereinfacht die Konstruktion neuer *S. pombe* Plasmide mit genau bestimmter DNA-Sequenz. Mittels dieser Technik wurden in der vorliegenden Arbeit viele genomische Plasmidvarianten erstellt. Das Erzeugen neuer Plasmide in der Knospungshefe *S. cerevisiae* ist schneller und effizienter als die *in vitro* Klonierungsmethoden in *E. coli*. Des Weiteren können mehrere Fragmente zeitgleich in einen Vektor integriert werden. Dieser benötigt nur eine Restriktionsschnittstelle, die anders als bei *in vitro* Klonierungen nicht positionsabhängig ist. Zusätzlich können diese *S. pombe* Vektoren als Shuttle-Vektoren für *S. cerevisiae* und *S. pombe* genutzt werden.

4 Diskussion

Spc7 und Sos7 bilden einen Subkomplex des äußeren Kinetochors, der für die Kinetochor-Mikrotubuli-Verknüpfung essentiell ist

Für eine korrekt ablaufende Mitose sind der vollständige Aufbau des Kinetochors sowie die korrekte Kinetochor-Mikrotubuli-Verknüpfung essentiell. In der vorliegenden Arbeit habe ich die Funktion des Spc7 Proteins, einer Komponente des hochkonservierten NMS-Kinetochorkomplexes in der Spalthefe *Schizosaccharomyces pombe* im Detail analysiert. Dabei wurde eine bis dato vollkommen unbekannte Komponente dieses Komplexes als Interaktionspartner von Spc7 identifiziert, die bei einer früheren biochemischen Aufreinigung des NMS-Komplexes nicht gefunden wurde (Liu et al, 2005).

Die Analyse des Spc7 Proteins ergab, dass dieses für die Chromosomensegregation essentiell ist. Es wird sowohl für die korrekte Bi-Orientierung der Chromosomen sowie für die Verknüpfung der Kinetochore mit den Mikrotubuli der Spindel benötigt. Zusätzlich hat Spc7 als erstes Kinetochorprotein einen massiven Einfluss auf die Formation und die Integrität der mitotischen Spindel (Kerres et al, 2007). Anhand des Spc7 Interaktionspartners, der von mir Sos7 genannt wurde, konnte ich die fehlende Komponente des NMS-Komplexes in spezifischen Pilzen identifizieren (Tabelle 4.1). Eine Funktionsanalyse dieses Proteins erfolgte mit Hilfe von mir generierter konditional-letaler Mutanten. Wie Spc7 wird auch das essentielle Sos7 für die bipolare Orientierung und Kinetochor-Spindel-Verknüpfung benötigt. Die Überexpression einer dominant-negativen Sos7-Variante zeigte auch für Sos7 eine Rolle im Aufbau und der Funktion der mitotischen Spindel. Zusätzlich scheint es für den Eintritt in die Mitose benötigt zu werden (Jakopec & Fleig, 2011, in Vorbereitung).

Mit der Identifizierung von Sos7 und der Charakterisierung von Sos7 als Kinetochorprotein sowie dessen Interaktionspartner Spc7 gelang es, ein verbessertes Verständnis für die Assemblierung des NMS-Komplexes sowie dessen Verknüpfung an die Mikrotubuli während der Mitose zu erhalten.

Human	Maus	Huhn	<i>Drosophila</i>	<i>C. elegans</i>	<i>S. pombe</i>	<i>S. cerevisiae</i>
Blinkin	-	Spc105	Spc105	KNL-1	Spc7	Spc105
Zwint	Zwint	Zwint-1	-	-	Sos7	Kre28

Tabelle 4.1: Spc7-Sos7-Komplexe in verschiedenen Spezies. Mit der Isolierung und Charakterisierung von Sos7 konnte ein weiterer konservierter Subkomplex des Kinetochors in *S. pombe* identifiziert werden. - = nicht vorhanden oder noch nicht identifiziert. Tabelle modifiziert aus (De Wulf et al, 2009b).

I. Die Funktion des Spc7 Proteins

4.1.1 Spc7 wird für die Kinetochor-Spindel-Verknüpfung benötigt

Mit Hilfe von temperatursensitiven *spc7* Mutanten wurde die Funktion des Proteins in der Chromosomensegregation untersucht. Nur mit Null-Mutanten, in denen das defekte Protein nicht mehr am Kinetochor assoziiert, ist eine aussagekräftige Funktionsanalyse möglich. Mit Hilfe einer synchronen Spc7-23-GFP Kultur habe ich gezeigt, dass das Spc7-23-GFP Protein unter restriktiven Bedingungen nicht mehr am Kinetochor assoziiert ist (Kerres et al, 2007). Die Abwesenheit von Spc7-23-GFP am Kinetochor geht mit einer geringeren Menge zellulären Spc7 Proteins einher. Somit konnte die Untersuchung des *spc7-23* Stammes Auskunft über die Funktionsweise von Spc7 am Kinetochor geben.

In Abwesenheit von Kinetochor-assoziiertem Spc7 kann keine Chromosomensegregation stattfinden. Das kondensierte Chromatin blieb in der Mitte der mitotischen *spc7-23* Zellen, obwohl die mitotische Spindel elongierte (Kerres et al, 2007). In diesen Zellen konnte häufig beobachtet werden, dass das Zentromer von Chromosom I, das beispielhaft für alle Zentromere gesehen werden kann, nicht mit der mitotischen Spindel ko-lokalisierte, so dass Spc7 wichtig für die Kinetochor-Mikrotubuli-Verknüpfung ist. In den übrigen *spc7-23* Zellen, in denen eine Kinetochor-Mikrotubuli-Verknüpfung erfolgen konnte, zeigen sich gelegentlich Fehlsegregation, aber häufig auch merotelische Verknüpfungen, so dass Spc7 auch für die korrekte Bi-Orientierung der Chromosomen benötigt wird (Kerres et al, 2007).

Das Spc7-homologe *S. cerevisiae* Protein Spc105 wird ebenfalls für die Bi-Orientierung der Chromosomen sowie die Chromosomensegregation benötigt (Nekrasov et al, 2003, Pagliuca et al, 2009). In humanen Zellen führt der Verlust des Spc7-Familienmitglieds Blinkin durch RNAi ebenfalls zu diesen Defekten. Zusätzlich findet sich in humanen Zellen häufig ein Ausbleiben der Spindelkontrollpunkt-Arretierung (Kiyomitsu et al, 2007). Dies wird durch den Verlust der Spindelkontrollpunkt-komponenten Bub1 und BubR1 begründet, die am N-Terminus von Blinkin binden (Kiyomitsu et al, 2007; Kiyomitsu et al, 2011). Ob diese Spindelkontrollpunkt-komponenten ebenfalls in *S. pombe* an Spc7 binden ist unklar. Das Bindemotiv dieser Komponenten im Blinkin Protein ist nur in höheren Eukaryoten konserviert und findet sich nicht im Spaltheife-Protein (Kiyomitsu et al, 2011). Allerdings konnte in einer Hefe-2-Hybrid Analyse gezeigt werden, dass das *Drosophila* Spc105 an Bub1 bindet, obwohl auch hier das Bub1-Bindemotiv im *Drosophila* Spc105 nicht zu finden ist (Schittenhelm et al, 2009; Kiyomitsu et al, 2011).

In *C. elegans* kommt es zwar ebenfalls nicht zur Kinetochor-Mikrotubuli-Verknüpfung, allerdings ist dies in der Tatsache begründet, dass in der Abwesenheit des Spc7-Familienmitglieds KNL-1 im Rahmen von RNAi Experimenten der Aufbau des Kinetochors

ausbleibt, was auch den Proteinnamen erklärt („kinetochore null“) (Desai et al, 2003; Cheeseman et al, 2004). Dies ist in allen anderen Organismen nicht der Fall.

In *D. melanogaster* konnte in RNAi Experimenten des Spc7-Familienmitglieds Spc105 ebenfalls ein Defekt in der Chromosomenausrichtung an der Spindel beobachtet werden (Przewloka et al, 2007). Allerdings fanden sich in *Drosophila* Zellen zeitabhängig unterschiedliche Defekte. Während zu Beginn des Experiments noch eine (fehlerhafte) Segregation des Chromatins beobachtet werden konnte, kam es bei weiterer Inkubation der Zellen zu einer Metaphasen-Arretierung, so dass die Zellen die Mitose nicht beenden konnten (Przewloka et al, 2007; Przewloka & Glover, 2009). Bisher konnte nur in RNAi Experimenten des *Drosophila* Spc105 ein sehr hoher Anteil an arretierten Metaphase-Zellen beobachtet werden. Allerdings ist nicht klar, ob dieser Effekt durch das *Drosophila* Spc105 bedingt ist, oder ein Zusammenhang mit der Effizienz der RNAi Experimente besteht (Przewloka & Glover, 2009). Bei RNAi Analysen kann es häufig nicht zu einer vollkommenen Abwesenheit des Proteins kommen, so dass man nur die Effekte einer reduzierten Proteinmenge analysieren kann. Aber auch in *S. pombe* konnte ich in einer synchronen Spc7-23-GFP Kultur zeitabhängig unterschiedliche Phänotypen detektieren. Die Menge an Spc7-23-GFP am Kinetochor geht mit der Zahl der Defekte in der Chromosomensegregation einher. Während der ersten Mitose, in der ein reduziertes Spc7-23-GFP-Signal am Kinetochor detektiert worden ist, war in über 40 % der Zellen noch Chromosomensegregation zu beobachten, auch wenn diese häufig fehlerhaft war. Während der zweiten Mitose, in der kein Spc7-23-GFP-Signal mehr am Kinetochor detektiert werden konnte, kam es in über 60 % der Zellen trotz elongierter Spindel zu keiner Segregation des hoch kondensierten Chromatins (Kerres et al, 2007).

Außerdem konnte in *S. pombe* *spc7* Mutanten ein aktivierter Spindelkontrollpunkt beobachtet werden (Kerres et al, 2007). Der Spindelkontrollpunkt überwacht die korrekte Verknüpfung der Kinetochore mit den Mikrotubuli. Solange nicht alle Chromosomen bipolar mit der Spindel verbunden sind, bleiben die Zellen in der Metaphase. In *S. pombe* ist diese Arretierung allerdings nur transient, so dass die Anaphase zu einem späteren Zeitpunkt eingeleitet wird. In anderen Systemen ist die Arretierung des Spindelkontrollpunktes nicht transient. Der Spindelkontrollpunkt überwacht zwei verschiedene Zustände. Zum einen wird überprüft, ob die Bindung der Kinetochore an die Mikrotubuli erfolgt (in *S. pombe* durch z. B. Mad2). Zum anderen wird überwacht, dass die mechanische Spannung, die bei einer korrekten bipolaren Verknüpfung auftreten muss, korrekt ist (in *S. pombe* z. B. durch Mph1) (He et al, 1997; He et al, 1998). Allerdings wurden bisher nur die Spindelkontrollpunkt-komponenten Mad2 und Mph1 untersucht, die unabhängig von den Spindelkontrollpunkt-komponenten Bub1 und BubR1 agieren (Tang et al, 2001).

Möglicherweise sind diese es, die die Spindelkontrollpunkt-Arretierung in den *Drosophila* Zellen auslösen. Ob in humanen Zellen, in denen Blinkin durch RNAi inaktiviert wurde, der Mad2-abhängige Spindelkontrollpunkt noch aktiv ist, ist unklar. 35 % dieser Zellen zeigten jedenfalls eine mitotische Arretierung (Kiyomitsu et al, 2007). Diese könnte allerdings auch durch die Tatsache gewährleistet werden, dass im RNAi Experiment keine Null-Situation geschaffen wurde.

Wie kann die Spc7-Familie die Kinetochor-Mikrotubuli-Bindung herstellen und stabilisieren? Sowohl das *C. elegans* auch das *S. cerevisiae* Spc105 können *in vitro* Mikrotubuli binden (Cheeseman et al, 2006; Pagliuca et al, 2009). In *S. pombe* kann der N-Terminus von Spc7 mit den Mikrotubuli interagieren (Kapitel 3.2.1 und 3.2.2) (Kerres et al, 2007). Wie in dieser Arbeit gezeigt, geschieht dies vermutlich über zwei Mikrotubuli-assoziierte Domänen. Des Weiteren interagiert Spc7 in *S. pombe* mit dem Mikrotubuli-assoziierten Protein Mal3 (Kerres et al, 2005).

Somit bildet die Spc7-Familie eine essentielle Proteinverknüpfung zwischen Kinetochor und Mikrotubuli. Diese besteht neben der Verknüpfung zwischen Kinetochor und Mikrotubuli durch den Ndc80-Komplex. Der aus vier Komponenten bestehende Komplex (Spc24, Spc25, Nuf2 und Ndc80) wird häufig als das Hauptbindeglied zwischen dem Kinetochor und den Mikrotubuli erachtet (Przewloka & Glover, 2009). Der Ndc80-Komplex bindet vermutlich über die CH-Domänen von Ndc80 direkt am Mikrotubulus und besitzt zumindest in *S. pombe* eine weitere indirekte Bindestelle über das Mikrotubuli-assoziierte TOG/MAP215 Familienmitglied Dis1 (Ciferri et al, 2008; Hsu & Toda, 2011; Screpanti et al, 2011; Wan et al, 2009; Wei et al, 2007; Wilson-Kubalek et al, 2008). Beim Verlust des Ndc80-Komplexes in allen bisher untersuchten Organismen treten Fehler in der Chromosomen Bi-Orientierung sowie massive Chromosomenfehlsegregation auf (Hsu & Toda, 2011; Janke et al, 2001; Kitagawa & Hieter, 2001; Wigge & Kilmartin, 2001). Diese Defekte gleichen denen von *S. pombe* *spc7* Mutanten. Da jedoch der Ndc80-Komplex unabhängig von Spc7 am Kinetochor assoziiert, sind die Phänotypen dieser beiden NMS-Komponenten unabhängig voneinander zu sehen (Kapitel 3.1.5) (Kerres et al, 2007).

Folglich gibt es mindestens zwei essentielle Kinetochor-Mikrotubuli-Verknüpfungen. Der Ndc80-Komplex sowie die Spc7-Familie scheinen beide für die Assoziation der Kinetochore an die Mikrotubuli benötigt zu werden. Ob diese *in vivo* unabhängig voneinander binden, oder sich gegenseitig für die Mikrotubuliassoziation benötigen, ist bisher unklar. Dass zwei verschiedene Mikrotubuli-Bindestellen im NMS-Komplex existieren, konnte *in vitro* mit dem *C. elegans* NMS-Komplex gezeigt werden (Cheeseman et al, 2006). So bindet sowohl das Spc7 Homolog KNL-1 aus *C. elegans* als auch der Ndc80-Komplex *in vitro* unabhängig voneinander Mikrotubuli (Cheeseman et al, 2006). Der gesamte *C. elegans* NMS-Komplex,

also die Zugabe des Ndc80-Komplexes, MIND-Komplexes und des Spc7 Proteins, zeigt *in vitro* eine verbesserte Bindefähigkeit an die Mikrotubuli. Dieser positive synergistische Effekt kann jedoch nicht durch die Anwesenheit des MIND-Komplexes erklärt werden, der als Bindeglied im NMS-Komplex benötigt wird, alleine allerdings nicht Mikrotubuli binden kann (Cheeseman et al, 2006).

Unter permissiven Bedingungen ist es nicht möglich eine Hefe-Doppelmutante zwischen Ndc80-Komplex- und *spc7*-Mutanten zu erzeugen (Kerres et al, 2007). Auch dieser synergistische Effekt deutet darauf hin, dass es zwei verschiedene Bindestellen im NMS-Komplex gibt, die für die Bindung an die Mikrotubuli benötigt werden.

Außerdem findet sich in *S. cerevisiae* und *S. pombe* der DASH-Komplex, der ebenfalls für die Bindung an die Mikrotubuli genutzt wird. In *S. cerevisiae* kann der DASH-Komplex *in vitro* ringförmig um einen Mikrotubulus binden, so dass postuliert wird, dass dieser *in vivo* ringförmig um den Mikrotubulus bindet (in *S. cerevisiae* wird ein Kinetochor nur von einem Mikrotubulus gebunden) (Miranda et al, 2005; Westermann et al, 2005). Allerdings konnte die ringförmige Struktur *in vivo* bisher noch nicht nachgewiesen werden (McIntosh, 2005). In *S. pombe* allerdings reicht die Anzahl an Molekülen des DASH-Komplexes nicht für eine ringförmige Bindung um die Mikrotubuli aus (Franco et al, 2007; Gao et al, 2010; Kobayashi et al, 2007). In humanen Zellen wurde der Ska-Komplex entdeckt, der ebenfalls eine Mikrotubuli-bindende Funktion zu haben scheint (Daum et al, 2009; Gaitanos et al, 2009; Hanisch et al, 2006; Raaijmakers et al, 2009). Auch wenn keine Homologie auf Aminosäureebene zum DASH-Komplex aufgezeigt werden konnte, wird vermutet, dass es sich um funktionell homologe Komplexe handelt (Gaitanos et al, 2009; Guimaraes & Deluca, 2009; Hanisch et al, 2006; Theis et al, 2009; Welburn et al, 2009).

Während der DASH-Komplex in *S. cerevisiae* essentiell ist, können *S. pombe* Zellen auch in Abwesenheit von Komponenten des DASH-Komplexes die Chromosomen annähernd wildtypisch segregieren. Die Abwesenheit des *S. pombe* DASH-Komplexes, der während der Mitose über den Sim4-Komplex an das Kinetochor bindet, führt nur zu milden Defekten in der Chromosomensegregation (Sanchez-Perez et al, 2005). Da der Ska-Komplex allerdings in Abhängigkeit vom Ndc80-Komplex an das Kinetochor bindet, kann der starke Defekt, der durch Ndc80 RNAi Experimente hervorgerufen wird, ein Zusammenschluss von der Abwesenheit des Ndc80- und Ska-Komplexes sein (Santaguida & Musacchio, 2009). In *S. pombe* schien es sich beim DASH-Komplex um ein redundantes Element der Mikrotubuli-Bindung zu handeln. Allerdings wird der DASH-Komplex in der Abwesenheit vom wildtypischen Spc7 essentiell für die Chromosomensegregation. So ist die *duo1Δ spc7-23* Doppelmutante nicht lebensfähig (Duo1 ist eine Komponente des DASH-Komplexes) (Kerres et al, 2007).

4.1.2 Die Assoziation von Spc7 mit der mitotischen Spindel

Meine Analysen zeigen, dass Spc7 eine essentielle Rolle bei der Kinetochor-Mikrotubuli-Verknüpfung hat. Wie kommt nun die Bindung der Kinetochore an die Mikrotubuli durch Spc7 zustande? Die Überexpression vom N-Terminus von Spc7 führt zur Ko-Assoziation des Fragments entlang der gesamten mitotischen Spindel (Kapitel 3.2.1). Diese Assoziation mit der mitotischen Spindel konnte nicht für das volllängen Spc7 gezeigt werden. Auch die Überexpression des volllängen Spc7-GFP Fusionsproteins zeigte ein rein Kinetochor-assoziiertes GFP-Signal. Die Spc7 Familie bindet über seinen C-Terminus an das Kinetochor (Kerres et al, 2007; Kiyomitsu et al, 2007; Schittenhelm et al, 2009). Diese Bindung, die in *S. pombe* über eine 175 AS-Domäne (AS 1116-1290) erfolgt, führt vermutlich dazu, dass der N-Terminus von Spc7 im volllängen Protein nur an den Plusenden der Mikrotubuli der mitotischen Spindel zu finden ist (Kapitel 3.2.3). Diese Lokalisierung ist allerdings im Augenblick in *S. pombe in vivo* nicht zu überprüfen. Das Plusende der Mikrotubuli kann in lebenden Hefezellen bisher nicht bis auf seine einzelnen Komponenten aufgelöst werden. *In vitro* Studien unter definierten Konditionen und nur mit einer begrenzten Anzahl an unterschiedlichen Mikrotubuli-assoziierten Komponenten haben geholfen, einen ersten Überblick über einige Vorgänge an den Mikrotubuli-Plusenden zu geben. So weiß man heute, dass das Mikrotubuli-Plusend-assoziierte Mal3 für den Transport des ebenfalls an den Plusenden assoziierten Tip1 Proteins benötigt wird (Bieling et al, 2007). Bis heute weiß man aber nicht, wie genau die Verknüpfung der Plusenden der Mikrotubuli mit den Kinetochoren erfolgt (Howard & Hyman, 2003). In humanen Zellen konnte gezeigt werden, dass Fibrillen-artige Strukturen von den Kinetochoren ausgehend die Mikrotubuli binden. Welche Proteine den Fibrillen entsprechen ist bisher unklar. Favorisiert werden der Ndc80-Komplex sowie das humane Spc7 Homolog Blinkin (McIntosh et al, 2008; Santaguida & Musacchio, 2009).

Im Falle der Überexpression von N-terminalen Spc7 Fragmenten kommt es zur Entkopplung der Bindung an das Kinetochor, so dass die Bindung des N-terminalen Spc7 Fragmentes nun nicht mehr nur am Plusende des Mikrotubulus, sondern entlang der gesamten mitotischen Spindelmikrotubuli zu finden sind (Kapitel 3.2.1). Ob der C-Terminus von Spc7 die Lokalisierung vom N-Terminus nur durch die Kinetochorbindung reguliert oder ob weitere Regulationsmechanismen greifen, die die Mikrotubuli-Bindung von Spc7-N beeinflussen, ist momentan unklar. Studien, in denen N-terminale Fragmente an die Spc7 Kinetochorbindedomäne fusioniert werden, könnten möglicherweise Aufschluss darüber geben.

Mit Hilfe von Lokalisierungsstudien der GFP fusionierten N-terminalen Spc7 Proteinfragmente wurden zwei Mikrotubuli-Bindedomänen (AS 1-540; AS 581-690) identifiziert (Kapitel 3.2.2). Eine mögliche dritte (AS 691-820), die in Überexpressionsstudien

einen Mikrotubuli-stabilisierenden Effekt hatte, muss in weiteren Studien noch untersucht werden (Kapitel 3.2.2.5). Unabhängig davon, ob der N-Terminus nun zwei oder drei Mikrotubuli-assoziiierende Domänen besitzt, ist nicht bekannt, wie diese angeordnet sind und ob es eine Wichtung in der Bindung dieser Domänen gibt. So könnte es eine zentrale Mikrotubuli-bindende Domäne geben, die in ihren Bindungseigenschaften die andere(n) Domäne(n) übertrifft. Auch die Frage, ob es einen Regulationsmechanismus gibt und falls ja, wie dieser wirkt, bleibt offen. Neben einer Regulation die über den C-Terminus von Spc7 erfolgen könnte, wäre z. B. Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung ein denkbarer Mechanismus. So wird die Verknüpfung des Ndc80 Proteins im Ndc80-Komplex mit den Mikrotubuli Zellzyklus-spezifisch über Phosphorylierung reguliert. Während der Metaphase werden spezifische Aminosäuren des Ndc80 Proteins durch die Aurora B Kinase phosphoryliert. Dies führt zu einer relativ schwachen Bindung von Ndc80 an die Mikrotubuli. Erst mit dem Eintritt in die Anaphase wird diese Phosphorylierung, die zwischen den Spezies konserviert zu sein scheint, aufgehoben, so dass eine verstärkte Bindung zwischen Ndc80 und den Mikrotubuli vorzufinden ist (Alushin et al, 2010; Deluca et al, 2011; Sundin & Deluca, 2010). Eine solche Regulation wäre auch für die Bindung des N-Terminus von Spc7 vorstellbar, der 75 putative Phosphorylierungsstellen besitzt, die teilweise bereits als *in vivo* genutzte Phosphorylierungsstellen identifiziert wurden (Beltrao et al, 2009).

In diesem Zusammenhang ist die *in vivo* genutzte NES-Sequenz im N-Terminus ebenfalls interessant (im Bereich um AS 97). Bisher ist unklar, wofür diese genutzt wird. Ein Zellzyklus-spezifischer Transport aus dem Zellkern wäre denkbar. Viele Proteine können nur in einem modifizierten Zustand (z.B. Phosphorylierung) den Kern mittels Importin bzw. Exportin betreten oder verlassen (Hood & Silver, 1999). Ob dabei das gesamte Spc7 Protein oder nur ein N-terminales Fragment aus dem Kern exportiert werden würde, ist ebenfalls unklar. Da es sich bei Spc7 um ein konstitutiv am Kinetochor assoziiertes Protein handelt, ist zumindest ausgeschlossen, dass alle volllängen Spc7 Moleküle den Zellkern verlassen. Entweder wird nur ein Anteil des Kinetochor-assoziierten volllängen Proteins aus dem Kern transportiert oder aber ein N-terminales Fragment wird vom C-Terminus des Proteins entkoppelt und verlässt unabhängig von diesem den Kern. Da bisher alle Spc7 Proteinfragmente an ihrem C-Terminus mit GFP fusioniert wurden, könnte zuerst mit einer N-terminalen GFP-Fusion Aufschluss über die Lokalisierung der Spc7 Proteinfragmente gewonnen werden. So könnte möglicherweise auch beobachtet werden, ob es zu einer Abspaltung des N-Terminus von Spc7 kommt. Ein solcher Mechanismus ist allerdings weder für ein Spc7 Homolog noch für ein anderes Kinetochorprotein bisher bekannt. Interessant hierbei ist der Befund, dass das C-terminal mit GFP fusionierte volllängen Spc7 in der Westernblot Analyse vier distinkte Signale aufweist. Eine Analyse dieser vier verschiedenen

Proteinfragmente könnte zukünftig Auskunft über eine mögliche Prozessierung des Spc7 Proteins geben.

Die Frage, wie der N-Terminus von Spc7 mit den Mikrotubuli interagiert, konnte bisher nicht endgültig beantwortet werden. Meine Analyse zeigt, dass Spc7 mit dem Plusend-assoziierten Mal3 assoziiert, aber in *mal3Δ* Zellen ist ebenfalls eine Bindung der N-terminalen Spc7 Fragmente an die Mikrotubuli möglich. Wie kommt diese zustande? Eine bioinformatische Suche nach Mikrotubuli-bindenden Domänen wie die CH-Domäne im Mikrotubuli-Plusend-assoziierten Mal3 Protein, die CAP-Gly-Domäne der gleichnamigen Proteinfamilie oder die TOG-Domäne in Mitgliedern der TOG/XMAP215 Familie blieb erfolglos (Akhmanova & Steinmetz, 2010; Slep & Vale, 2007). Ko-Immunpräzipitationsanalysen haben gezeigt, dass das *S. pombe* volllängen Spc7 Protein *in vivo* nicht mit α - oder β -Tubulin interagiert (Kapitel 3.2.2.3). Für die Spc7 Homologe in *C. elegans* und *S. cerevisiae* jedoch konnte gezeigt werden, dass diese *in vitro* mit Mikrotubuli interagieren (Cheeseman et al, 2006; Pagliuca et al, 2009). Allerdings wurden nicht synthetisch erzeugte Mikrotubuli verwendet, die ausschließlich aus α/β -Dimeren bestehen, sondern es wurden Mikrotubuli aus dem Gehirngewebe von Rindern isoliert und aufgereinigt (Cheeseman et al, 2006; Pagliuca et al, 2009). Bei diesen Verfahren kann nicht ausgeschlossen werden, dass Mikrotubuli-assoziierte Proteine mit aufgereinigt wurden und so die Verbindung zum jeweiligen Spc7 Homolog möglich machen. Weitere Analysen mit synthetisch erzeugten Mikrotubuli sollten Aufschluss geben, ob eine direkte Assoziation der Spc7 Familie mit den Mikrotubuli der Spindel erfolgt. In *S. pombe* ist dies unter den von mir untersuchten Bedingungen nicht der Fall. Allerdings muss in *S. pombe* noch getestet werden, ob der N-Terminus von Spc7 unabhängig von seinem C-Terminus in Ko-Immunpräzipitationsexperimenten mit α - oder β -Tubulin interagieren kann. Denn diese Interaktion könnte im N-Terminus durch die Entkopplung von der Kinetochorbindestelle im C-Terminus möglicherweise einfacher detektiert werden. Somit konnte bisher keine direkte Bindung der Spc7-Familie an die Tubulin-Dimere einwandfrei nachgewiesen werden.

Neben der direkten Bindung könnte die Assoziation an die Mikrotubuli auch indirekt erfolgen. Für das Ndc80-Protein konnte gezeigt werden, dass dieses sowohl direkt über eine Domäne an seinem N-Terminus als auch in *S. pombe* indirekt über das Mikrotubuli-Plusend-assoziierte Dis1 das Kinetochor mit den Mikrotubuli verknüpft (Hsu & Toda, 2011; Sundin et al, 2011).

Das *S. pombe* *spc7⁺* wurde ursprünglich in einer Multikopien-Suppressoranalyse einer *mal3* Mutante isoliert (Kerres et al, 2004). Spc7 interagiert genetisch sowie physikalisch mit Mal3. Diese Verknüpfung ist die erste identifizierte zwischen dem Kinetochorprotein Spc7 und den Mikrotubuli (Kerres et al, 2004). Das Mal3 Protein findet sich präferenziell am Plusende der

Mikrotubuli, wird aber auch über den gesamten Mikrotubulus verteilt vorgefunden (Sandblad et al, 2006). Mal3 stabilisiert die Mikrotubuli, indem es die sogenannte Gitternaht des Mikrotubulus bindet. Die 13 α/β -Protofilamente, die jeweils eine „Reihe“ des Mikrotubulus bilden, werden über die Gitternaht verbunden, die entweder als A-Gitternaht oder B-Gitternaht bezeichnet wird (A-Gitternaht: Bindung α - an α - und β - an β -Tubulin; B-Gitternaht: laterale α - an β -Tubulin-Bindung). Mal3 bindet vermutlich bevorzugt an eine A-Gitternaht und kann womöglich eine B- in eine A-Gitternaht umwandeln (Bieling et al, 2007; des Georges et al, 2008; Katsuki et al, 2009; Sandblad et al, 2006).

In der Abwesenheit von Mal3 werden Defekte in der Chromosomensegregation ausgelöst. So konnte ein erhöhter Verlust eines nicht essentiellen Minichromosoms in *S. pombe mal3Δ* Zellen beobachtet werden (Beinhauer et al, 1997). Auch in anderen Eukaryoten wird Mal3 für die Stabilität der Mikrotubuli benötigt (Berrueta et al, 1998). In humanen Zellen bindet das Mal3 homologe EB1 Protein zusammen mit dem Tumorsuppressor APC am Kinetochor und wird dort für die korrekte Anordnung der Chromosomen während der Metaphase benötigt (Draviam et al, 2006; Morrison, 2009). Allerdings bindet Spc7 nicht alleine über Mal3 an die Spindel-Mikrotubuli, da die N-terminalen Spc7 Fragmente auch in Abwesenheit von Mal3 mit der mitotischen Spindel ko-assoziiieren.

Weitere Plusend-assoziierte Proteine kommen ebenfalls als Spc7-Interaktionspartner in Frage. Allerdings zeigen genetische Daten, dass die beiden *S. pombe* TOG/XMAP215Familienmitglieder Alp14 und Dis1 sowie das CLASP Ortholog Peg1 vermutlich nicht diese Rolle übernehmen (Garcia et al, 2001; Grallert et al, 2006; Kerres et al, 2007; Nabeshima et al, 1995; Nakaseko et al, 2001; Ohkura et al, 1988). Das CLIP170-ähnliche Tip1 Protein kommt ebenfalls nicht in Frage, da dieses in Abhängigkeit von Mal3 am Mikrotubulus bindet (Brunner & Nurse, 2000; Goldstone et al, 2010). Eine mögliche Bindung von Spc7 über weitere Plusend-assoziierte Proteine muss noch untersucht werden. So könnten die Plusend-gerichteten mitotischen Kinesinmotoren als Spc7 Interaktionspartner agieren. Ein möglicher Kandidat wäre Cut7. Das Plus-End-gerichtete Cut7 der Kinesin-5 Familie wird für die Bildung und Integrität der bipolaren Spindel bis zum Beginn der Anaphase benötigt (Fu et al, 2009; Hagan & Yanagida, 1990; Hagan & Yanagida, 1992). Da aber die Funktion einer Vielzahl von Kinesinen bisher kaum untersucht wurde, kommen noch weitere Mikrotubuli-assoziierte Proteine als Interaktionspartner in Frage. Diese müssten jeweils gezielt untersucht werden. Es ist unwahrscheinlich, dass Mikrotubuli-assoziierte Proteine in einer Multikopien-Suppressoranalyse entdeckt werden, da eine Veränderung des stöchiometrischen Verhältnis dieser Proteine zu den Mikrotubuli meist zum Zelltod führt (Beinhauer et al, 1997; Nakaseko et al, 1996).

Somit ist die Spc7 Familie essentiell für die Verknüpfung der Kinetochore mit den Mikrotubuli. Eine direkte *in vivo* Verknüpfung über die α - oder β -Tubulin konnte noch nicht nachgewiesen werden. Mit Mal3 ist bereits ein Mikrotubuli-Plusend-assoziiierter Interaktionspartner von Spc7 bekannt. Allerdings muss Spc7 noch über mindestens ein weiteres Protein an die Mikrotubuli binden. Vorstellbar wäre hier auch eine Bindung an ein Kinetochorprotein, das seinerseits direkt oder indirekt mit den Mikrotubuli interagiert. In zukünftigen Experimenten muss dieser Bindepartner über genetische oder biochemische Methoden identifiziert werden.

4.1.3 Spc7 beeinflusst den Aufbau und die Funktion der mitotischen Spindel

Zu Beginn der Mitose kommt es zwischen den SPBs zum Aufbau der mitotischen Spindel. In *S. pombe* wird zwischen drei Spindelstadien unterschieden (Kapitel 1.8) (Nabeshima et al, 1998). In fixierten *spc7* Mutantenzellen wurden vor allem Defekte in Phase III detektiert (Kerres et al, 2007). In diesen Zellen war die Spindelmitte häufig sehr dünn oder gebrochen, was höchstwahrscheinlich als Konsequenz der dünnen Spindelmitte gewertet werden kann (Kerres et al, 2007). In Lebend-Fluoreszenzaufnahmen konnte außerdem gezeigt werden, dass die Überexpression einer dominant-negativen Spc7-C Variante Defekte in allen drei Spindelstadien hervorrief (Kerres et al, 2007). Neben den Defekten in Phase III, die denen in fixierten *spc7* Zellen sehr ähnelte, konnten diese Zellen teilweise keine bipolare Spindel aufbauen (Phase I) oder verbrachten einen verlängerten Zeitraum in Phase II (Kerres et al, 2007). In *S. pombe* ist bisher nur eine *ndc80* Mutante bekannt, die ebenfalls Defekte beim Aufbau der mitotischen Spindel zeigt (Hsu & Toda, 2011). Diese weist hauptsächlich eine Metaphase Arretierung auf, die mit einer sehr dünnen Spindel einhergeht. An den Spindelenden finden sich sehr starke punktförmige Tubulinsignale, die durch wenige überlappende Mikrotubuli verbunden werden (Hsu & Toda, 2011). In den Spc7-C überexprimierenden Zellen hingegen findet sich zwar eine verlängerte Phase II, die ebenfalls auf eine Metaphase Arretierung hindeutet, allerdings sind keine offensichtlichen Veränderungen in der Spindelmorphologie erkennbar (Kerres et al, 2007).

In *spc7* Zellen, die sich in Phase III befanden, war häufig die Spindelmitte, die aus antiparallel überlappenden Mikrotubuli besteht, nicht wildtypisch positioniert (Ding et al, 1993; Kerres et al, 2007). Ase1, ein Mikrotubuli-Bündler der konservierten ASE1/PRC1/MAP65 Familie, der im Bereich antiparallel verlaufender Mikrotubuli bindet, fand sich in diesen Zellen über einen Großteil der mitotischen Spindel geschmiert wieder. Trotz der Lokalisierung von Ase1 schien es nicht zu einer Stabilisierung der Mikrotubuli in diesem Bereich gekommen zu sein, da die Spindelmitte sehr dünn war und häufig brach. Ein Phänotyp, der auch in der Abwesenheit des nicht essentiellen Ase1 beobachtet wurde

(Loiodice et al, 2005; Yamashita et al, 2005). So ist möglicherweise Ase1 in den *spc7* Mutanten trotz der Lokalisierung im überlappenden Bereich nicht funktionell. Es wird postuliert, dass Ase1 seine stabilisierende Funktion in der Anaphase B nur korrekt ausführen kann, wenn es durch die Clp1 Phosphatase dephosphoryliert wurde (Fu et al, 2009). Sollte dies nicht der Fall sein, könnte dies die *spc7* Phänotypen erklären, die auch in den *ase1Δ* Zellen vorgefunden werden (Loiodice et al, 2005; Yamashita et al, 2005). Da Ase1 aber nicht essentiell ist, muss es zu weiteren Defekten in den *spc7* Mutanten kommen.

Interessanterweise fand sich in den *spc7* Zellen der CPC-Komplex („chromosomal passenger complex“) teilweise ebenfalls falsch lokalisiert wieder. Der CPC ist aus drei strukturellen Komponenten aufgebaut: INCENP (SpPic1), Survivin (SpBir1) und Borealin (SpNbl1). Diese werden zusammen für die Assoziation der Aurora B Kinase (SpArk1) benötigt (Bohnert et al, 2009; Levenson et al, 2002; Petersen et al, 2001; Rajagopalan & Balasubramanian, 2002). Der CPC lokalisiert Zellzyklus-spezifisch: in der Anaphase löst sich der CPC vom Kinetochor und assoziiert in der Spindelmittle, um diese zu stabilisieren (Bohnert et al, 2009; Ruchaud et al, 2007; Vader et al, 2006; Vagnarelli & Earnshaw, 2004). In den *spc7* Zellen ist die strukturelle Komponente INCENP korrekt, die Aurora B Kinase allerdings falsch lokalisiert (Kapitel 3.1.8). Auch in der Abwesenheit der Clp1 Phosphatase kann eine Fehllokalisierung der Aurora B Kinase und Bir1, nicht aber der strukturellen INCENP-Untereinheit des CPC an den Kinetochoren während der Prometaphase festgestellt werden (Trautmann et al, 2004). Da INCENP korrekt lokalisiert ist, kann es zum Wegfall von Regulationsmechanismen gekommen sein, die für die korrekte Lokalisierung der Aurora B Kinase essentiell sind (Tsukahara et al, 2010). Ein mögliches Ausbleiben der Funktion der Aurora B Kinase in der Spindelmittle hat in *S. cerevisiae* Konsequenzen auf die Stabilität der Spindel. So wird der CPC dort unter anderem für die Assoziation des Kinetochorproteins Ndc10 benötigt, das eine Spindel-stabilisierende Wirkung hat (Bouck & Bloom, 2005)..

Das Kinetochorprotein Spc7 beeinflusst sowohl den Aufbau als auch die Integrität der mitotischen Spindel. Die Defekte in der Spindelfunktion führen vermutlich zur Chromosomenfehlsegregation bzw. dem Ausbleiben derselbigen, so dass die *S. pombe* Zelle unter restriktiven Konditionen nicht lebensfähig ist. Wie Spc7 allerdings die Spindel beeinflusst, ist unklar: so könnte es durch die Abwesenheit von Spc7 zur Fehllokalisierung von Mikrotubuli-assoziierten Proteinen kommen, indem diese z. B. nicht mehr modifiziert werden (Abbildung 4.1). Da bisher nur Ndc80 neben Spc7 in *S. pombe* für eine korrekte bipolare Spindel benötigt wird, scheinen die Proteine, die vom Kinetochor aus direkt für die Assoziation an die Spindel essentiell sind, auch die Integrität dieser beeinflussen.

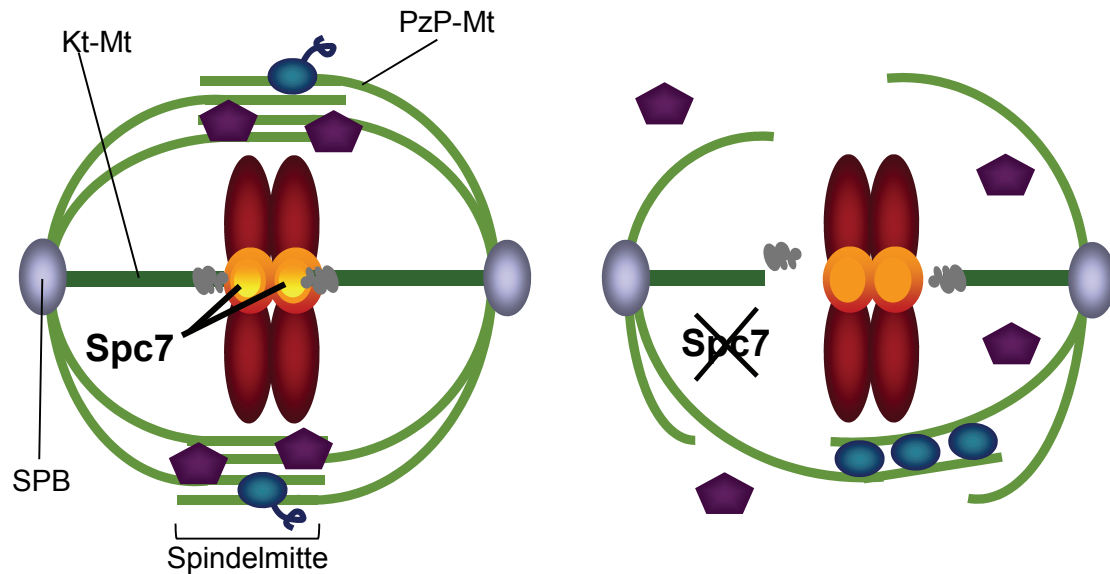


Abbildung 4.1: Durch die Abwesenheit von Spc7 am Kinetochor kommt es zu Defekten im Aufbau und der Funktion der mitotischen Spindel.

Links: Schematische Darstellung eines Schwesterchromatid-Chromosoms, dessen Schwester-Kinetochore über die Kinetochor-Mikrotubuli (Kt-Mt) durch Mikrotubuli-Plusend-assoziierte Proteine (grau) verknüpft sind. Die Pol-zu-Pol-Mikrotubuli (PzP-Mt) überlappen. Dieser Bereich wird als Spindelmittle bezeichnet und hat vor allem in der Anaphase B eine essentielle Bedeutung für das Auseinandergleiten der Mikrotubuli und somit der Chromosomensegregation. Dieser Bereich wird über modifizierte (blau) und nicht-modifizierte (violett) Proteine stabilisiert. Rechts: In der Abwesenheit von Spc7 kommt es zum Ausbleiben der Kinetochor-Mikrotubuli-Verknüpfung. Ob die Mikrotubuli-assoziierten Proteine weiterhin an der Spindel assoziiert sind, ist unklar. Die Pol-zu-Pol-Mikrotubuli sind nicht wildtypisch angeordnet, da vermutlich verschiedene Mikrotubuli-assoziierte Proteine entweder nicht mehr binden können oder aufgrund von fehlenden Modifikationen nicht mehr funktionsfähig sind.

4.1.4 Der *spc7* Suppressor Btf3 beeinflusst das Mikrotubuli-Zytoskelett und supprimiert dadurch möglicherweise den Wachstumsdefekt der *spc7* Mutante

Btf3 wurde als extragener Multikopien Suppressor der *spc7-23* Mutante isoliert. Zu Beginn meiner Arbeit war nicht bekannt, ob Btf3 eine essentielle Komponente des vegetativen *S. pombe* Zellzyklus darstellt. Der Verlust von Btf3 führt in höheren Eukaryoten wie der Maus oder *C. elegans* während der Embryonalentwicklung zum Tode, in *S. cerevisiae* allerdings sind die beiden Btf3 Homologe nicht essentiell (Bloss et al, 2003; Deng & Behringer, 1995; Grallath et al, 2006). Im Rahmen meiner Arbeit konnte ich zeigen, dass Btf3 in *S. pombe* nicht essentiell ist (Kapitel 3.3.1.2.4) Allerdings führte die Deletion von *btf3*⁺ zu einer Verlangsamung des Wachstums der *btf3Δ* Zellen im Vergleich zum Wildtyp (Kapitel 3.3.1.2.4).

Die Btf3 Familie hat bisher zwei Funktionen: Erstens ist Btf3 eine Komponente des NAC-Komplexes („Nascent polypeptide chain“). Der NAC-Komplex ist von den Archaeen bis zum Menschen hoch konserviert und wird stark exprimiert (Beatrix et al, 2000; Rospert et al, 2002). Er ist an der Neubildung von Proteinen beteiligt, die an den Ribosomen erfolgt. Die neu synthetisierte Kette von Aminosäuren verlässt den Ausgang der Ribosomen und befindet sich im ungefalteten Zustand. Damit es nicht zum Abbau des neu synthetisierten Proteins kommt, bindet der am Ribosomen-Ausgang sitzende NAC-Komplex dieselbigen (Beatrix et al, 2000; Wiedmann et al, 1994). Diese Bindung scheint als „Schutzschild“ gegen die frühzeitige Verbindung mit zytosolischen Proteinen zu dienen und/oder Fehler in der Proteinfaltung zu verhindern (Wang et al, 1995). Der NAC-Komplex selbst setzt sich aus Heterodimeren, bestehend aus α -NAC und β -NAC, zusammen. Die meisten Organismen weisen zwei verschiedene β -NAC-Proteine auf. So besitzen humane Zellen zwei verschiedene splicing-Varianten von β -NAC (Zheng et al, 1990), *S. cerevisiae* die Proteine Egd1 und Btt1 (Grallath et al, 2006), aber *S. pombe* nur ein β -NAC-Protein, Btf3 (Andersen et al, 2007).

Zweitens hat Btf3 eine Rolle bei der Transkription: BTF3 („basal transcription factor“) wurde zusammen mit BTF1, BTF2 und STF und mit der RNA Polymerase II als Initiatoren der Transkription isoliert (Fire et al, 1984; Zheng et al, 1990). Das humane BTF3 selbst kann an die RNA Polymerase II binden, so dass in humanen Zellen über BTF3 die Transkription reguliert werden kann (Zheng et al, 1990). In *S. pombe* kann der NAC-Komplex direkt an DNA und zwar an Holliday-Strukturen binden (Whitby & Dixon, 2001). Inwieweit allerdings ein Zusammenhang zur Transkription besteht bzw. welche Funktion die DANN-Bindung darstellt, ist unklar.

Sowohl über die Funktion des NAC-Komplexes an den Ribosomen als auch in der Transkription wäre eine positiver Einfluss auf die Spc7-23-GFP Proteinmenge denkbar, die in *btf3*⁺ überexprimierenden *spc7-23-gfp* Zellen erhöht ist (Kapitel 3.3.1.2.2). Durch zusätzliches Btf3 kommt es zu einer Re-Lokalisierung des Spc7-23-GFP Proteins am Kinetochor. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass eine Kinetochorassoziation des Spc7-23-GFP Proteins zu einer Stabilisierung des Proteins führt und so der Effekt nicht auf der Transkriptionsebene erfolgt. Eine Analyse der mRNA-Menge des *spc7-23-gfp* müsste Aufschluss darüber geben können.

Ein Einfluss auf Transkriptionsebene auf andere Faktoren wäre ebenfalls denkbar. So führt die Abwesenheit von bzw. die Überexpression von Btf3 zu Veränderungen des Mikrotubuli-Zytoskeletts. In Abwesenheit von Btf3 ist die Anzahl an Mikrotubulibündeln in der Interphase verringert sowie die mitotische Spindellänge verkürzt (Kapitel 3.3.1.2.4). Somit müsste auch

die mRNA-Menge der Tubulin-Komponenten in *btf3⁺* überexprimierenden Zellen untersucht werden.

Aber auch eine bis dato nicht beschriebene neue Funktion des Btf3 Proteins wäre denkbar. Die beiden Spindel-Phänotypen, die in der Abwesenheit von Btf3 beobachtet werden, wurden auch in Zellen detektiert, denen der Interphase-Mikrotubuli-Organisator Mto1 fehlt (Venkatram et al, 2004). Eine Rolle von Btf3 bei der Organisation von Mikrotubuli-Bündeln wäre vorstellbar. Interessanterweise führte die Abwesenheit von Btf3 zur Temperatursensitivität von Zellen, in denen die α -Tubulin-Komponente Atb2 als GFP-Fusionsprotein exprimiert wurde (Kapitel 3.3.1.2.4). Es ist zwar publiziert, dass die Fusion des GFP an den N-Terminus das *atb2⁺* α -Tubulin unter der Kontrolle des *nmt81*-Promotors keinen Einfluss auf die Mikrotubuli-Dynamik hat (Grallert et al, 2006). Dies ist jedoch nicht der Fall. So kommt es durch die zusätzliche Expression (*nmt81*-Promotor) des GFP-Fusionsproteins zu einer Stabilisierung der Mikrotubuli-Struktur (Bratman & Chang, 2007). Dies ist in soweit interessant, als das *spc7-23* ebenfalls mit *nmt81-gfp-atb2⁺* genetisch interagiert. GFP-Atb2 ist in der Lage, die Temperatursensitivität des *spc7-23* Stammes partiell zu unterdrücken, vermutlich indem es die Mikrotubuli stabilisiert (Kerres et al, 2007). Weitere Experimente, in denen eine andere GFP- α -Tubulin-Variante (SV40:GFP-Atb2) exprimiert wird, sollten Aufschluss über die wildtypische Situation geben (Bratman & Chang, 2007). Nichtsdestotrotz zeigt dies eine genetische Interaktion zwischen Btf3 bzw. Spc7 und Tubulin auf.

Auch in *S. cerevisiae* finden sich Interaktionen, die auf eine Rolle der beiden Btf3 Homologe an der mitotischen Spindel hindeuten. So interagiert das *S. cerevisiae* Btf3 Homolog Btt1 genetisch mit dem Mikrotubuli-assoziierten Mal3 Homolog Bim1 und führt zu einer Veränderung der Spindel-Morphologie (Vizeacoumar et al, 2010). Auch konnten verschiedene genetische und physikalische Interaktionen zwischen den *S. cerevisiae* Btf3 Homologen mit Komponenten des MIND-Komplexes aufgezeigt werden, der für die Assoziation des Spc7 Homologs Spc105 am Kinetochor benötigt wird (Akiyoshi et al, 2010; Costanzo et al, 2010; Maskell et al, 2010). Sollte sich dies bestätigen lassen, müsste in zukünftigen Studien die Regulation dieses Prozesses durch Btf3 analysiert werden.

4.1.5 Mögliche Gründe für die Suppression durch Mpd2

Zusätzliches Mpd2 konnte den Wachstumsdefekt fast aller mutanten Stämme des NMS-Komplexes sowie einiger des Sim4-Komplexes supprimieren (Kapitel 3.3.1.1.2). Mpd2 ist ein nicht essentielles, evolutionär konserviertes Protein mit einer molaren Masse von 106,1 kDa (Kim et al, 2010). In *S. pombe* wurde es als Suppressor der *cdc7-PD1* Mutante isoliert. Cdc7

ist eine Serin/Threonin Kinase, die essentiell für das Voranschreiten des Zellzyklus` benötigt wird (Fankhauser & Simanis, 1994). *cdc7^{ts}* Mutanten, die ihre Funktion verloren haben, bilden elongierte Zellen mit mehreren Kernen aus. Diese Zellen haben die Fähigkeit zur Septumbildung und Zellteilung verloren (Mehta & Gould, 2006; Sohrmann et al, 1998). Die *cdc7-PD1* Mutante wurde ihrerseits isoliert, da sie nur lebensfähig ist, wenn sehr hohe Mengen der Plo1-Kinase anwesend sind. Die wildtypische Plo1-Konzentration ist für das Wachstum der *cdc7-PD1* Mutante bei hohen Temperaturen nicht ausreichend (Cullen et al, 2000). Die Plo1 Kinase spielt in einer Vielzahl von zellulären Prozessen eine essentielle Rolle, auch sie wird für die Zytokinese benötigt. Plo1 und Cdc7 bilden mit Sid1 und Sid2 die vier Kinasen des SIN („septation initiation network“) (Sawin, 2000). Die Plo1 Kinase agiert oberhalb der Cdc7 Kinase in der Signalkaskade, die die Zytokinese einleitet (Hachet & Simanis, 2008; Mulvihill et al, 1999). Beide Kinasen binden mit dem Eintritt in die Mitose an den SPB. Plo1 bleibt an beiden SPBs bis in der frühen Anaphase B, während Cdc7 zu Beginn an beiden, in Verlauf der Mitose aber nur mit einem SPB ko-lokalisiert (Mulvihill et al, 1999; Sohrmann et al, 1998). Plo1 wird zusammen mit der Clp1 Phosphatase für den Aufbau des funktionellen Aktin-Myosin-Rings benötigt (Bahler et al, 1998; Clifford et al, 2008). Ob Mpd2 ebenfalls in die Zytokinese oder einen anderen Prozess involviert ist, der durch die Plo1- bzw. Cdc7-Kinase reguliert wird, ist unklar. In Rahmen einer Genom-weiten Lokalisierungsstudie der *S. pombe* Proteine wurden Mpd2 Signale in der räumlichen Nähe des Septums vorgefunden. Eine SPB-Lokalisierung während der Mitose kann anhand der Angaben allerdings nicht ausgeschlossen werden (Matsuyama et al, 2006).

In *S. cerevisiae* finden sich zwei Homologe zu Mpd2; *SMY2* und *SYH1*. *SMY2* wurde als Suppressor einer Myosin-Mutante (*myo2-66*) isoliert, die für den Vesikel-Transport benötigt wird (Govindan et al, 1995; Johnston et al, 1991). Interessanterweise findet sich Myo2 auch am kontraktile Aktin-Myosin-Ring in der Knospungshefe (Lillie & Brown, 1994). Da die *myo2-66* Mutante ebenfalls einen Defekt in der Septierung aufweist (Ausbleiben der Septierung mit großer, nicht getrennter Knospe), kommt es durch die Überexpression von *SMY2* möglicherweise zur Suppression eines Zytokinese-relevanten Prozesses (Johnston et al, 1991). Lokalisierungsstudien zeigen, dass es sich bei Smy2 um ein peripheres Membranprotein handelt, dass am Endoplasmatischem Reticulum bindet (Higashio et al, 2008). Von dort aus erfüllt es unterschiedliche Funktionen. Unter anderem wird das Smy2 Protein aktiv, wenn es zu einem Defekt im Einbau des sich verdoppelnden SPB kommt. Es kommt dann zur Bildung und Aktivierung des SESA-Komplexes (Smy2-Eap1-Scp160-Asc1). Dies führt dazu, dass sich der SPB weiter verdoppeln kann, ohne direkt in die Membran eingebunden zu werden (Sezen et al, 2009). Die molekularen Mechanismen, die diesem Prozess zu Grunde liegen, sind allerdings weitgehend unklar.

Eine direkte Assoziation des Smy2 Proteins an den SPB ist nicht bekannt. Da aber in *S. cerevisiae* Defekte in der SPB-Duplikation und –Einlagerung durch den SESA-Komplex und damit möglicherweise durch Smy2 detektierbar sind, ist eine solche Lokalisierung nicht ausgeschlossen. Wäre diese konserviert, könnte das erklären, wie Mpd2 in *S. pombe* mit den zeitweise SPB-assoziierten Komponenten Cdc7 und Plo1 interagiert. Eine direkte Interaktion von Mpd2 mit Spc7 scheint unwahrscheinlich. Kürzlich erschienene Studien, die die Funktionsweise der *S. cerevisiae* Smy2 GYP-Domäne (Glycin-Tyrosin-Phenylalanin) aufgeklärt haben, die sowohl im *S. cerevisiae* Smy2, im *S. pombe* Mpd2 und im humanen GIGYF2 enthalten ist, postulieren, dass die Funktion des Proteins hauptsächlich mit der Existenz der GYP-Domäne einhergeht (Ash et al, 2010). Diese Domäne ist in der Lage, Prolin-haltige Sequenzen zu binden (Kofler & Freund, 2006). Allerdings trägt Spc7 selbst kein prolinreiches Motiv, das mit der Konsensus Sequenz PPG, an die Smy2 präferentiell bindet, übereinstimmt (Daten nicht gezeigt). So dass die Suppression der Temperatursensitivität des *spc7-23* Stammes durch zusätzliches *mpd2*⁺ vermutlich indirekt erfolgt.

Vermutlich hat Mpd2 einen generellen Effekt auf die Mitose bzw. auf die Zytokinese und beeinflusst dadurch indirekt eine Vielzahl von Kinetochorproteinen.

II. Die Funktion des Sos7 Proteins

4.2.1 Die Sos7-Proteinfamilie bildet eine neue Untereinheit des NMS-Komplexes und ist strukturell mit der Zwint- und Kre28-Familie verwandt

Mit der Isolierung und Charakterisierung vom *S. pombe* Sos7 („*suppressor of spc7*“) gelang die Identifizierung eines neuen Interaktionspartners des Spc7 Proteins (Jakopec & Fleig, 2011, in Vorbereitung). Mittels einer Datenbanksuche konnte eine Vielzahl von Sos7 Homologen in anderen Pilzen entdeckt werden, so dass die Sos7 Familie stark konserviert ist. Mit der Analyse des *S. japonicus* Sos7 wurde gezeigt, dass es sich um eine neue Familie von Kinetochorproteinen handelt (Jakopec & Fleig, 2011, in Vorbereitung). Allerdings konnte nicht in allen Pilzen ein Sos7 Homolog isoliert werden. In *S. cerevisiae*, eine das Kinetochor betreffend am besten charakterisierte Hefe fand sich kein Sos7 Homolog. Allerdings besitzt die Knospungshefe *S. cerevisiae* mit Kre28 einen engen Interaktionspartner vom Spc7 homologen Spc105 Protein (Kerres et al, 2004; Nekrasov et al, 2003).

Bisher sind weder in *S. pombe* noch in *S. cerevisiae* weitere Komponenten bekannt, die mit Spc7 bzw. Spc105 einen Subkomplex formen. Dies führt zu folgenden Möglichkeiten:

- 1) das Homolog vom *S. pombe* Sos7 wurde in *S. cerevisiae* noch nicht identifiziert und *vice versa*,
- 2) das *S. pombe* Sos7 und das *S. cerevisiae* Kre28 haben sich während der Evolution soweit auseinander entwickelt, dass sie nun verschiedene Rollen am Kinetochor übernehmen,
- 3) beide Proteine haben unabhängig voneinander eine Spc7-abhängige Funktion am jeweiligen Kinetochor übernommen.

Anders als *S. pombe* weist *S. cerevisiae* ein ausschließlich genetisch definiertes Punktzentromer auf (Meluh et al, 1998). Punktzentromere finden sich nur in der Klasse der *Saccharomyces*. Diese trugen evolutionsgeschichtlich wahrscheinlich anfangs ein regionales Zentromer mit CENP-A beinhaltenden Nukleosomen. Durch die 2 µm Plasmide („selfish DNA“), die nur in der Klasse der *Saccharomyces* zu finden sind, sollen sich die Punktzentromere entwickelt haben (Henikoff, 2000; Malik & Henikoff, 2009; Takahashi et al, 2000; Zeitlin, 2010). *S. pombe* hingegen besitzt ein regionales Zentromer, dass epigenetisch definiert ist (Pidoux & Allshire, 2004). Leider ist die Zentromerregion der Hefen bzw. Pilze *S. japonicus*, *A. nidulans*, *A. flavus*, *N. crassa* und *S. macrospora*, die ein *S. pombe* Sos7 Homolog zeigen, bis dato nicht identifiziert bzw. charakterisiert. Aufgrund der Homologiestudien und der Tatsache, dass bisher nur Hefen der Klasse *Saccharomyces* ein Punktzentromer aufweisen, kann allerdings vermutet werden, dass *S. japonicus*, *A. nidulans*, *A. flavus*, *N. crassa* und *S. macrospora* ebenfalls ein regionales Zentromer tragen. Dieses hat sich vermutlich während der Evolution zusammen mit Sos7 anders entwickelt als das *S. cerevisiae* Kre28 Protein und seine Homologen, die an Punktzentromere assoziieren. Somit gibt es in den Pilzen mindestens zwei Proteinfamilien, die mit Homologen der Spc7-Familie interagieren.

Da sich die Punktzentromere in der *Saccharomyces* Klasse vermutlich erst später entwickelt haben, könnte angenommen werden, dass Sos7 und Kre28 aus demselben Ursprungsprotein hervorgegangen sind, diese sich aber aufgrund der später unterschiedlichen Zentromerregion verschieden weiter entwickelt haben (Malik & Henikoff, 2009). Ob beide Proteine eine ähnliche Funktion am Kinetochor erfüllen ist unklar. Der mutante Phänotyp von *S. pombe* *sos7^{ts}* Mutanten konnte jedoch nicht durch die Expression von *S. cerevisiae* Kre28 supprimiert werden (Kapitel 3.3.3.18).

Im Rahmen einer Datenbanksuche konnte kein Sos7 oder Kre28 Homolog in höheren Eukaryoten identifiziert werden. Dies kann jedoch an den Grenzen der Programme liegen, die für die Datenbanksuche verwendet werden. So können z. B. homologe Proteine, die verschieden evolviert sind und große Veränderungen auf Aminosäureebene erfahren haben, meist nicht mehr durch die verwendeten Suchprogramme gefunden werden. Demgemäß

wurde das *C. elegans* Spc7 Homolog KNL-1 nur mit dem menschlichen Auge und das *D. melanogaster* Spc7 Homolog Spc105 mittels einer Aufreinigungsstudie und anschließender bioinformatischer Arbeiten identifiziert (Cheeseman et al, 2004; Przewloka et al, 2007).

Vermutlich verhält es sich ähnlich zum humanen Sos7 Homolog. Weder konnte bestätigt werden, dass es sich bei C10orf118, das bei einer Homologiesuche als potentielles Sos7-Homolog identifiziert wurde, um ein Kinetochorprotein handelt (Kapitel 3.3.3.19). Noch konnte zum jetzigen Zeitpunkt mit dem anti-*S. pombe* Sos7-Antikörper ein mögliches humanes Sos7 Homolog identifiziert werden (Kapitel 3.3.3.20). Da aber in einer Hefe-2-Hybrid Analyse das humane Zwint als Interaktionspartner vom humanen Spc7 Homolog Blinkin identifiziert wurde und diese beiden Proteine auch in Hühner DT40 Zellen gemeinsam über Aufreinigungsanalysen isoliert werden konnten, wurde vermutet, dass Zwint möglicherweise als humanes Sos7 Homolog agiert (Kiyomitsu et al, 2007; Pagliuca et al, 2009; Starr et al, 2000). Zwint ist während der Mitose Kinetochor-assoziiert und bindet über Blinkin an das Kinetochor. In Hefe-2-Hybrid Analysen wurde gezeigt, dass die Blinkin AS Region 1981-2108 essentiell für die Bindung von Zwint ist (Kiyomitsu et al, 2011). Obwohl diese Region im *S. pombe* Spc7 konserviert ist (AS 998-1157), konnte jedoch das humane Zwint-GFP Fusionsprotein in *S. pombe* nicht am Kinetochor assoziiert vorgefunden werden (Kapitel 3.3.3.21).

Nichtsdestotrotz scheint das humane Zwint strukturelle Ähnlichkeit zum Sos7 Protein aufzuzeigen. So kann Zwint in Hefe-2-Hybrid Analysen sowohl mit sich selbst als auch mit dem C-Terminus des Sos7 Proteins interagieren (Kapitel 3.3.3.21)(Starr et al, 2000). Das *S. pombe* volllängen Sos7 konnte sowohl über ein N- als auch C-terminales Sos7 Fragment ko-immunpräzipitiert werden (Kapitel 3.3.3.4). Ob diese Bindung eine direkte ist oder über einen engen Interaktionspartner wie Spc7 erfolgt, ist bisher nicht klar und müsste noch untersucht werden. Allerdings konnte der Wachstumsdefekt von *sos7^{ts}* Mutanten, die eine Mutation in der AS Region 150-178 trugen, nicht durch die Expression von Sos7-C supprimiert werden. Trugen die *sos7^{ts}* Mutanten allerdings in einem anderen Bereich vom *sos7*-ORF eine Mutation, konnte der mutante Phänotyp durch Sos7-C supprimiert werden. So dass vermutet werden kann, dass Sos7 über diese Region mit sich selbst interagiert. In diesem Zusammenhang ist interessant, dass auch das *S. cerevisiae* Kre28-HA über Kre28-cmyc ko-immunpräzipitiert werden kann (Pagliuca et al, 2009). In *S. cerevisiae* konnte in einem nativen Proteingel gezeigt werden, dass wahrscheinlich zwei Kre28 Moleküle an ein Spc105 binden und somit einen 2:1 Komplex bilden. Postuliert werden zwei verschiedene Kre28-Bindestellen im Spc105 Protein, da Kre28-cmyc in einer *spc105* Mutante nicht mit Kre28-HA ko-immunpräzipitiert werden kann (Pagliuca et al, 2009). Allerdings konnte dies

noch nicht bewiesen werden. In humanen und *S. pombe* Zellen müsste dies noch überprüft werden. Aufgrund der Hefe-2-Hybrid- und Ko-Immunpräzipitations-Analysen in diesen Organismen wäre ein solcher 2:1 Komplex-Aufbau möglich, auch wenn aufgrund der bisherigen Ergebnisse unklar wäre, ob Zwint, Kre28 oder Sos7 jeweils an zwei verschiedenen Bindestellen unabhängig voneinander mit dem jeweiligen Spc7 Homolog interagieren.

Zusammenfassend scheinen drei verschiedene Proteinfamilien in unterschiedlichen Spezies als Interaktionspartner der Spc7-Familie zu existieren: die Sos7- und Zwint-Familie in Organismen mit einem regionalem Zentromer, sowie die Kre28-Proteinfamilie in Punktzentromer tragenden Lebewesen. Weitere Studien werden zeigen müssen, inwieweit diese Proteine auf struktureller bzw. funktioneller Ebene homolog sind.

4.2.2 Sos7 ist eine essentielle, konstitutive Komponente des Kinetochors, die für die Verknüpfung mit den Spindel-Mikrotubuli benötigt wird

Das Sos7 Kinetochorprotein assoziiert wie die übrigen Komponenten des NMS-Komplexes in *S. pombe* konstitutiv am Kinetochor (Goshima et al, 1999; Kerres et al, 2004; Nabetani et al, 2001). In höheren Eukaryoten hingegen assoziieren nur die Komponenten des MIND-Komplexes konstitutiv am Kinetochor, der Ndc80-Komplex sowie das humane Spc7 Homolog Blinkin und Zwint binden nur während der Mitose dort (McAinsh et al, 2006; Obuse et al, 2004). Wie ich mit einer ChIP-Analyse zeigen konnte, erfolgt die Sos7 Kinetochorbindung in *S. pombe* in der zentralen Zentromerregion, in der auch die übrigen Mitglieder des NMS- sowie des Sim4-Komplexes assoziieren (Hayashi et al, 2004; Jakopce & Fleig, 2011, in Vorbereitung; Kerres et al, 2004; Kerres et al, 2006; Pidoux et al, 2003).

Da es sich bei Sos7 um ein essentielles Protein handelt, wurde die Funktion des Proteins durch von mir generierte konditional-letale *sos7* Mutanten analysiert (Jakopce & Fleig, 2011, in Vorbereitung). Meine Experimente zeigten, dass Sos7 für die akkurate Chromosomensegregation benötigt wird: in der *sos7 Δ 7* Mutante, in der unter restriktiven Konditionen das Sos7 Δ 7 Protein nicht mehr am Kinetochor detektiert werden konnte, zeigten 60 % der Zellen keine Segregation des Chromatins, obwohl es in diesen Zellen zur Elongation der mitotischen Spindel kam (Jakopce & Fleig, 2011, in Vorbereitung). In den übrigen 40 % der Zellen konnte zwar eine Segregation des Chromatins erfolgen, allerdings kam es in all diesen Zellen zu einer Fehlverteilung des Chromatins. Eine Analyse des Zentromers von Chromosom I in den *sos7^{ts}* Mutanten offenbarte häufig eine nicht-Trennung der Schwesterchromatiden, so dass Sos7 auch an der korrekten Bi-Orientierung der Chromosomen beteiligt ist (Jakopce & Fleig, 2011, in Vorbereitung). Anders als die *spc7^{ts}*

Mutanten wiesen die untersuchten *sos7^{ts}* Mutanten keine Veränderungen in der Morphologie der mitotischen Spindel auf (Jakopec & Fleig, 2011, in Vorbereitung; Kerres et al, 2007).

Außerdem scheint Sos7 an der Aktivierung des Mad2-abhängigen Spindelkontrollpunkts beteiligt zu sein. So lag in der *sos7-178* Mutante sowohl der Mad2- als auch Mph1-abhängige Spindelkontrollpunkt aktiviert vor. In der *sos7Δ7* Mutante allerdings, der die letzten 7 Aminosäuren des Sos7 Proteins fehlen, konnte keine Aktivierung des Mad2-abhängigen Spindelkontrollpunkts festgestellt werden. So zeigten die *sos7Δ7* Zellen im Gegensatz zu den *sos7-178* Zellen in der Abwesenheit von Mad2 keine Verschlechterung des Wachstums bei der permissiven Temperatur (Daten nicht gezeigt). Da der Mad2-abhängige Spindelkontrollpunkt die Bindung der Kinetochore an die Mikrotubuli *per se* überwacht und in den *sos7Δ7* Mutanten diese Verknüpfung häufig nicht erfolgt, müsste dieser Kontrollpunkt eigentlich aktiviert vorliegen. Da er dies nicht ist, kann möglicherweise das Mad2 Protein in den *sos7Δ7* Zellen nicht mehr am Kinetochor assoziieren. Dies müsste allerdings durch Lokalisierungsstudien noch bewiesen werden. Interessanterweise wird das humane Sos7-homologe Protein Zwint für die Bindung des RZZ-Komplexes benötigt. Der RZZ-Komplex (Rod-ZW10-Zwilch) ist eine aus drei Komponenten bestehende Einheit des Spindelkontrollpunktes, die zuerst in *Drosophila* Zellen identifiziert wurde und vermutlich nur in höheren Eukaryoten konserviert ist. Der RZZ-Komplex ist in die Bindung der Spindelkontrollpunkt-komponenten Mad1 und Mad2 involviert (Karess, 2005; Starr et al, 2000; Wang et al, 2004).

4.2.3 Die Expression einer C-terminalen Sos7 Variante führt zu massiven Defekten im Aufbau und der Integrität der mitotischen Spindel

Obwohl in den bisher untersuchten *sos7^{ts}* Mutanten keine offensichtlichen Defekte in der mitotischen Spidelmorphologie detektiert werden konnten, löst die Überexpression des C-Terminus von Sos7 eine massive TBZ-Sensitivität sowie einen kältesensitiven Wachstumsdefekt aus. Beides deutet auf Defekte im Aufbau und der Funktion des Mikrotubuli-Zytoskeletts hin. Und tatsächlich konnte in Sos7-C überexprimierenden Zellen eine veränderte Morphologie der mitotischen Spindel detektiert werden. Da es sich um eine plasmidkodierte Überexpression handelte, war die Sos7-C Proteinmenge in den Sos7-C exprimierenden Zellen unterschiedlich. Zellen, die eine hohe Sos7-C Proteinkonzentration aufwiesen, hatten meist nur kurze Spindeln von ca. 2,5 - 4 µm, während Zellen, die eine geringere Sos7-C Konzentration aufwiesen, längere Spindeln besaßen (≥ 4 µm).

Ob sich die Zellen, die eine kurze Spindel zeigten, in der Metaphase befanden, ist nicht klar. Neben einer Metaphase-Arretierung, die durch eine fehlerhafte Kinetochor-Mikrotubuli-Verknüpfung erklärt werden könnte, wäre auch ein Defekt im Übergang von Spindelphase II

zu III denkbar. Im Wildtyp kommt es bei diesem Übergang zu einer Änderung der Mikrotubuli-Dynamik. In Spindelphase III sind die Mikrotubuli weniger dynamisch und somit stabiler (Mallavarapu et al, 1999; Nabeshima et al, 1998; Sagolla et al, 2003). Würde dieser Stabilisierung im Übergang zu Phase III nicht stattfinden, könnte dies erklären wieso ein Großteil der untersuchten Zellen Spindeln zeigte, die nicht über die Phase II-Länge hinaus elongieren konnten. So konnte in *S. cerevisiae* Zellen gezeigt werden, dass die Abwesenheit der Cdc14-Phosphatase einen solchen Übergang von Phase II zu III verhindert und somit die Spindelelongation unterbindet (Higuchi & Uhlmann, 2005). In *S. pombe* ist die Cdc14-ähnliche Clp1 Phosphatase allerdings nicht in diesen Prozess involviert.

Viele der untersuchten Spindeln zeigten in den fixierten Sos7-C überexprimierenden Zellen eine dünne bzw. gebrochene Spindelmitte (Kapitel 3.3.3.12). In lebenden Sos7-C überexprimierenden Zellen wurde dieser Phänotyp ebenfalls detektiert. Dort kam es in Zellen, die sich in Spindelphase III befanden, zur Elongation der Spindel. Diese hatten eine sehr dünne Spindelmitte und brachen. Wenn sich die Spindelhälften in räumlicher Nähe zueinander befanden, konnten diese erneut fusionieren. Allerdings schienen die Mikrotubuli in den Sos7-C überexprimierenden Zellen häufig nicht wildtypisch in Phase III zu elongieren. Mit dem Überschreiten einer kritischen Länge der Spindel in der mittleren Anaphase kam es erneut zum Bruch und die Mikrotubuli konnten nicht ausreichend weit polymerisieren, um wieder fusionieren zu können (Kapitel 3.3.3.12).

In Zellen die Sos7-C überexprimierten, konnte eine Fehllokalisierung der Cdc14-ähnlichen Clp1 Phosphatase beobachtet werden. In wildtypischen Zellen findet sich diese mit dem Beginn der Mitose an den Kinetochoren, lokalisiert dann aber während der Anaphase in der Spindelmitte und findet sich zusätzlich am Aktin-Myosin-Ring wieder. Mit dem Beenden der Mitose bindet sie an den SPB und findet sich im Nukleolus wieder, wo Clp1 vermutlich inaktiv vorliegt (Trautmann et al, 2001; Trautmann et al, 2004; Trautmann et al 2005). In Sos7-C überexprimierenden Zellen findet sich kaum eine Nukleolus-Lokalisierung und das Clp1-GFP Protein scheint permanent am SPB assoziiert. Das SPB-Signal ist außerdem im Vergleich zum Wildtyp verstärkt. Somit kommt es in Sos7-C überexprimierenden Zellen zum Verlust des Clp1 Proteins im Zellkern. Clp1 kann deshalb seine Regulation der mitotischen Spindel zu Beginn der Anaphase B nicht ausführen. Dort de-phosphoryliert das Clp1 Protein den Mikrotubuli-Bündler Ase1 sowie dessen Interaktionspartner Klp9, die ihrerseits für die wildtypische Spindelelongation während der Spindelphase III benötigt werden (Fu et al, 2009).

Wie lässt sich aber die permanente SPB-Assoziation des Clp1 Proteins erklären? Entweder kann das Clp1 Protein nicht mehr in den Zellkern importiert werden oder der Export aus dem Kern ist nicht mehr zeitlich limitiert, so dass das Clp1 Protein kontinuierlich aus dem Zellkern

transportiert werden würde. In diesem Zusammenhang ist eine Clp1 Variante interessant, die eine NES-Sequenz trägt. Diese Clp1-NES Variante findet sich nur am SPB, sowie während der Mitose am zytoplasmatischen Aktin-Myosin-Ring (Trautmann & McCollum, 2005). Somit scheint in den Sos7-C überexprimierenden Zellen entweder ein erhöhter Export des Clp1 Proteins aus dem Kern zu erfolgen oder die Clp1 Bindung an den SPB ist in den Sos7-C überexprimierenden Zellen irreversibel, so dass keine Zellzyklus-spezifische Zirkulation des Clp1 Proteins erfolgen kann. In beiden Fällen könnte Clp1 seine Funktion als Phosphatase im Zellkern nicht mehr ausführen. Aber kommt es durch die permanente SPB-Lokalisierung zu einer veränderten enzymatischen Aktivität des Clp1 Proteins am SPB? Ist die Clp1 Phosphatase möglicherweise am SPB permanent aktiv? Durch eine Clp1 Mutante, die keine Phosphatase-Aktivität besitzt, könnte dies in Sos7-C überexprimierenden Zellen überprüft werden.

Die aberrante Lokalisierung von Clp1 kann allerdings nicht alle Defekte begründen, die durch die Überexpression von Sos7-C hervorgerufen werden. Denn die Clp1 Phosphatase ist nicht essentiell für den vegetativen *S. pombe* Zellzyklus und die Abwesenheit dieser ruft nur milde Defekte in der Chromosomensegregation hervor (Trautmann et al, 2001). Deshalb müssen noch andere Prozesse bei der Sos7-C Überexpression gestört sein.

III. Spc7 und Sos7 bilden einen Subkomplex innerhalb des NMS-Komplexes

Biochemisch konnte der evolutionär hoch konservierte NMS-Komplex in *S. pombe* als eine Einheit isoliert werden (Liu et al, 2005; Obuse et al, 2004). Zu Beginn meiner Arbeit bestand dieser aus neun Komponenten. Durch weitere Studien konnten diese in drei Komplexe unterteilt werden: den Ndc80-Komplex mit den vier Mitgliedern Ndc80, Nuf2, Spc24 und Spc25, den MIND-Komplex der aus den Mis12, Mis13, Mis14 und Nnf1 Komponenten assembliert wird und das Spc7 Protein. Auch in anderen Organismen ist die Zusammensetzung des Komplexes konserviert (Cheeseman et al, 2004; Kiyomitsu et al, 2010; Kiyomitsu et al, 2011; Maskell et al, 2010; Meraldi et al, 2006; Nekrasov et al, 2003; Petrovic et al, 2010). Anfangs fand sich nur in *S. cerevisiae* ein zusätzlicher Interaktionspartner des Spc7-Familienmitglieds Spc105, nämlich Kre28 (Nekrasov et al, 2003). Mittlerweile konnte auch in anderen Organismen ein weiteres Mitglied des NMS-Komplexes nämlich der Blinkin Interaktionspartner Zwint identifiziert werden (Obuse et al, 2004; Kiyomitsu et al, 2007). In dieser Arbeit nun habe ich mit der Sos7 Familie den fehlenden Spc7 Interaktionspartner in *S. pombe* identifiziert und charakterisiert (Jakopec & Fleig, 2011, in Vorbereitung). In vielen anderen Organismen gibt es bis dato keinen Spc7 Interaktionspartner. Die Maus besitzt kein Spc7 ähnliches Protein, während *D. melanogaster* und *C. elegans* kein Sos7/Zwint-Homolog aufweisen (Kapitel 4.1: Tabelle 4.1). Vermutlich

können diese aufgrund von geringer Homologie nur durch genetische Analysen oder Aufreinigungsstudien des jeweiligen Ndc80- bzw. MIND-Komplexes gefunden werden, wie dies auch beim Spc7 *Drosophila* Homolog Spc105 der Fall war (Schittenhelm et al, 2007).

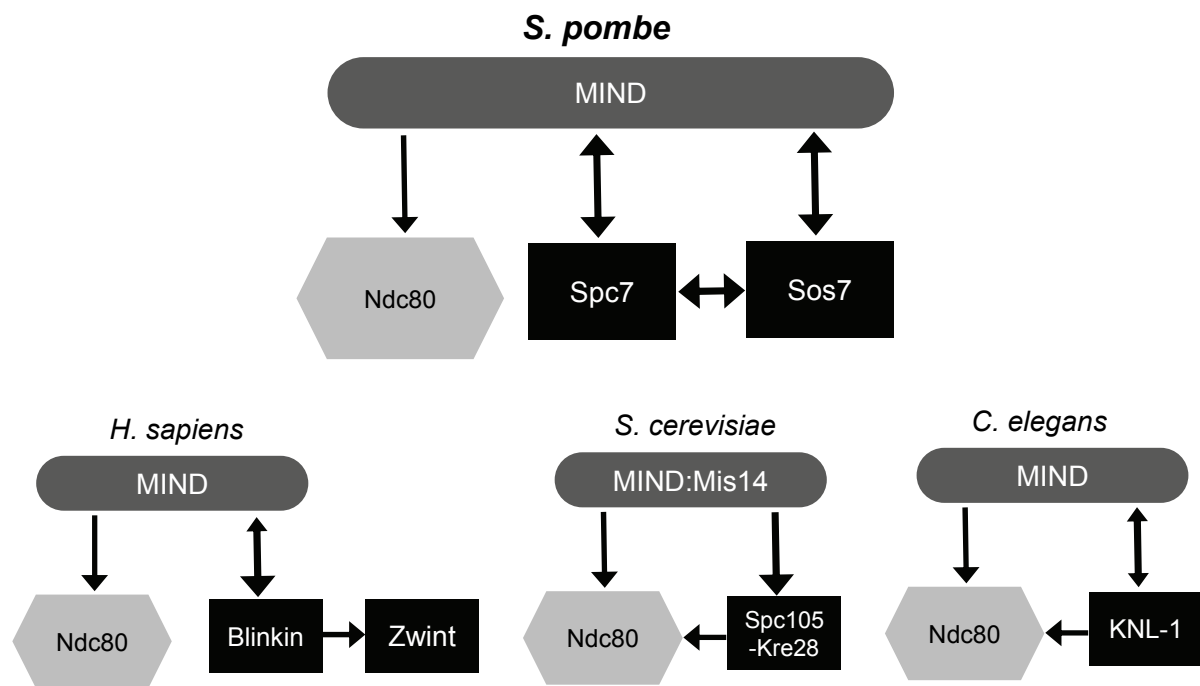


Abbildung 4.2: Abhängigkeitsverhältnis im Aufbau des NMS-Komplexes in verschiedenen Spezies.

Die Pfeile geben jeweils das Abhängigkeitsverhältnis der verschiedenen Komponenten zueinander an. Die Daten für den Aufbau des ***S. pombe*** NMS-Komplexes sind den Lokalisierungsstudien dieser Arbeit entnommen und finden sich im Text beschrieben. Der Aufbau des **humanen** (*H. sapiens*) NMS-Komplexes stammt größtenteils aus den *in vitro* Analysen aus Petrovic et al, 2010. Der humane Ndc80-Komplex sowie das Blinkin Protein binden über die MIND-Komponente Mis14 an das Kinetochor (Petrovic et al, 2010). Das Blinkin Protein ist für die wildtypische Kinetochor-Lokalisierung der MIND-Komponente Mis13 verantwortlich (Cheeseman et al, 2008). Der Aufbau der ***S. cerevisiae*** und ***C. elegans*** NMS-Komplexe wurden aus Petrovic et al, 2010 entnommen. Der Befund, dass in *S. cerevisiae* der Ndc80- sowie der Spc105-Kre28-Komplex über die MIND-Komponente Mis14 am Kinetochor binden, wurde aus Maskell et al, 2010 übernommen.

In meiner Arbeit gelang es mir den hierarchischen Aufbau des NMS-Komplexes in *S. pombe* mit Hilfe von Lokalisierungsstudien von GFP fusionierten Kinetochorproteinen aufzuklären. Es zeigte sich, dass die Komponenten Sos7 und Spc7 in einem sehr engen Verhältnis zueinander stehen. Beide sind absolut essentiell für die Assoziation des jeweils anderen Proteins (Abbildung 4.2) (Jakopec & Fleig, 2011, in Vorbereitung). Sos7 bindet dabei über

die AS Region 201-257 direkt an den C-Terminus vom Spc7 Protein (Kapitel 3.3.3.14). In anderen Organismen ist eine detaillierte Analyse des Spc7-Sos7-Komplexes nicht erfolgt. Einzig konnte in RNAi Analysen vom Spc7 Homolog Blinkin gezeigt werden, dass dieses für die Assoziation des Zwint Proteins am Kinetochor benötigt wird und dass Zwint *in vitro* über Blinkin am NMS-Komplex assoziiert (Abbildung 4.2) (Kiyomitsu et al, 2007; Petrovic et al, 2010). Weitere Analysen werden zeigen müssen, ob auch in humanen Zellen eine solche enge Interaktion zwischen Blinkin und Zwint besteht.

Des Weiteren konnte ich zeigen, dass der MIND-Komplex, sowie die Proteine Spc7 und Sos7 in einem engen Verhältnis zueinander stehen. So ist die Kinetochorassemblierung vom MIND-Komplex von funktionellem Spc7 bzw. Sos7 abhängig und umgekehrt (Abbildung 4.2) (Jakopec & Fleig, 2011, in Vorbereitung; Kerres et al, 2007; Saitoh et al, 2005). Eine engere Interaktion zwischen dem Spc7-Sos7-Subkomplex sowie MIND konnte durch weitere genetische Analysen in *S. pombe* bestätigt werden. So kann zusätzliches *spc7⁺* oder *sos7⁺* eine Mutante des jeweils anderen sowie einen mutanten *mis12* Stamm supprimieren (Jakopec & Fleig, 2011, in Vorbereitung; Kerres et al, 2007). Umgekehrt konnte auch extra *mis12⁺* den aberranten Phänotyp der *spc7* und *sos7* Mutanten supprimieren (Jakopec & Fleig, 2011, in Vorbereitung; Daten nicht gezeigt). Diese engere Interaktion scheint auch in humanen Zellen konserviert zu sein. So wird der MIND-Komplex für die Assoziation des humanen Spc7 Homologs Blinkin benötigt, umgekehrt kann die humane MIND-Komponente Mis13 in Blinkin RNAi Experimenten nicht wildtypisch am Kinetochor lokalisieren (Abbildung 4.2) (Cheeseman et al, 2008).

Der Ndc80-Komplex als weiterer Unterkomplex des NMS-Komplexes wird in *S. pombe* weder für die Kinetochorbindung des MIND-Komplexes noch für die des Spc7-Sos7-Subkomplexes benötigt. Der Ndc80-Komplex selbst, assoziiert über den MIND-Komplex am Kinetochor (Abbildung 4.2) (Jakopec & Fleig, 2011, in Vorbereitung).

Wie *in vitro* Studien gezeigt haben, dient der MIND-Komplex sowohl in *S. cerevisiae* als auch humanen Zellen als Ladestation für den jeweiligen Ndc80-Komplex (Kiyomitsu et al, 2010; Kiyomitsu et al, 2011; Petrovic et al, 2010). In der Abhängigkeit der Kinetochorbindung des Ndc80-Komplexes scheint es allerdings Differenzen zwischen den Spezies zu geben. In humanen Zellen findet, wie auch in *S. pombe*, die Ndc80-Kinetochorbindung unabhängig von Blinkin bzw. Spc7 statt (Jakopec & Fleig, 2011, in Vorbereitung; Petrovic et al, 2010). In *S. cerevisiae* allerdings, wird neben dem MIND-Komplex auch das Spc7 Homolog Spc105 für die Kinetochorassoziation des Ndc80-Komplex benötigt (Abbildung 4.2) (Jakopec & Fleig, 2011, in Vorbereitung; Maskell et al, 2010; Petrovic et al, 2010). Auch in *C. elegans* werden sowohl Komponenten des MIND-Komplexes sowie das Spc7 Homolog KNL-1 für die Kinetochorassoziation des Ndc80-Komplexes benötigt (Abbildung 4.2). Allerdings fehlen in

C. elegans vermutlich die Komponenten des Sim4- bzw. CCAN-Komplexes und das Spc7 Homolog KNL-1 sowie die MIND-Komponente KNL-3 haben eine viel zentralere Rolle am *C. elegans* Kinetochor übernommen. In RNAi Experimenten kommt es in Abwesenheit des *C. elegans* KNL-1 oder KNL-3 („*kinetochore null*“) zum Verlust aller Kinetochorproteine (Cheeseman et al, 2004; Desai et al, 2003). So ist die Lokalisierung von KNL-3 für die von KNL-1 notwendig und umgekehrt kann KNL-3 nicht wildtypisch in der Abwesenheit von KNL-1 am *C. elegans* Kinetochor assemblieren (Cheeseman et al, 2004; Desai et al, 2003).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte der hierarchische Aufbau des NMS-Komplexes in *S. pombe* näher bestimmt werden. Vergleiche mit anderen Organismen zeigen häufig konservierte Abhängigkeiten innerhalb des NMS-Komplexes.

IV. Neue Interaktionspartner des Fta2 Kinetochorproteins

Der aus dreizehn Mitgliedern bestehende Sim4-Komplex wurde biochemisch als Einheit isoliert und wird für die Lokalisierung der Histon H3 Variante CENP-A in den Nukleosomen der zentralen Zentromerregion benötigt (Fleig et al, 1996; Hayashi et al, 2004; Liu et al, 2005; Obuse et al, 2004; Pidoux et al, 2003; Takahashi et al, 1994; Tanaka et al, 2009). Der Sim4-Komplex gliedert sich, wie durch unsere Arbeitsgruppe gezeigt, in verschiedene Subkomplexe (Kerres et al, 2006). Mal2 und Fta2 interagieren stark miteinander und bilden einen dieser Subkomplexe. So ist funktionelles Fta2 für die Kinetochorassoziation von Mal2 verantwortlich und umgekehrt. Außerdem kann jeweils die Überexpression der einen Komponente den Wachstumsdefekt von mutanten Stämmen der anderen Komponente supprimieren (Kerres et al, 2006). Trotzdem besitzen beide Proteine auch unabhängige Funktionen, denn die Deletion des *mal2⁺*-ORF ist auch bei einer Überexpression von *fta2⁺* nicht möglich (Kerres et al, 2006). Durch eine extragene Multikopien-Suppressoranalyse mit einem temperatursensitiven *fta2* Stamm sollten Interaktionspartner von Fta2 isoliert werden, die Aufschluss über die Funktion von Fta2 geben. Es wurden zwei Genbankplasmide isoliert, in deren Anwesenheit der Wachstumsdefekt der Mutante supprimiert werden konnte (Kapitel 3.4). Interessanterweise konnte in Anwesenheit des V28-Suppressorplasmids auch der mutante Phänotyp des *mal2-1* Stammes supprimiert werden, während dies in der Gegenwart des V23-Suppressorplasmids nicht möglich war, so dass anhand der Charakterisierung der Suppressoren sowohl Einblick in die gemeinsame Funktion des Mal2-Fta2-Subkomplexes, als auch in die alleinige des Fta2 Proteins gewonnen werden kann. Das auf dem V28-Suppressorplasmid kodierte Sui1 ist für die Suppression verantwortlich (siehe Kapitel 4.4.2). Der auf V23-Genbankplasmid vorhandene Suppressor wurde jedoch nicht identifiziert. Die beiden auf dem V23-Suppressorplasmid kodierten Proteine werden im Folgenden als mögliche Suppressoren diskutiert.

4.4.1 Supprimiert Pin1 oder das durch SPCC16C4.02c ORF kodierte Protein den Wachstumsdefekt der *fta2-291* Mutante?

Pin1 beeinflusst den Zellzyklus durch gezielte Konformationsänderung von phosphopeptidyl-prolyl haltigen Zielproteinen. In humanen Zellen reguliert Pin1 eine Vielzahl von zellulären Prozessen wie das Zellwachstum, die Chromatin-Replikation, die Chromosomenkondensation und deren Segregation, indem es verschiedene Komponenten des Zellzyklusses modifiziert (Lee et al, 2009; Suizu et al, 2006; Xu & Manley, 2007). Allerdings scheinen nicht alle dieser Funktionen essentiell oder von anderen PPlasen durchführbar, denn das Pin1 Homolog aus *S. pombe*, *D. melanogaster* oder der Maus ist nicht essentiell (Fujimori et al, 1999; Huang et al, 2001; Maleszka et al, 1996). Die Abwesenheit von Pin1 in *S. pombe* hat keinen signifikanten Einfluss auf das Wachstum (Huang et al, 2001). Dies könnte allerdings in einem redundanten System an PPlasen begründet sein.

Aber wie soll zusätzliches Pin1 den Wachstumsdefekt des *fta2-291* Mutantenstammes supprimieren? An AS Position 36-37 findet sich im Fta2 Protein laut bioinformatischen Programmen genau ein phosphoryliertes Serin/Prolin Motiv, das von der PPlase Pin1 modifiziert werden könnte (NetPhosYeast 1.0 Programm: 90 % Wahrscheinlichkeit (Ingrell et al, 2007); ELM-Programm: WW-Bindestelle (Gould et al; Puntervoll et al, 2003)) (Lu et al, 2002). Anders als Fta2 weist Mal2 kein Phosphopeptidyl-prolyl Motiv auf und stellt kein Zielprotein der PPlase Pin1 dar. Dies könnte erklären, warum nur der mutante Phänotyp des *fta2-291* und nicht des *mal2-1* Stammes supprimiert werden konnte. Allerdings würden weitere Untersuchungen zeigen müssen, ob Pin1 wirklich als Suppressor agiert und falls ja, ob durch Pin1 wirklich eine Konformationsänderung im Fta2 Protein hervorgerufen wird. Aber auch SPCC16C4.02c kommt als Suppressor in Frage.

Der offene Leserahmen SPCC16C4.02c kodiert für ein bisher nicht charakterisiertes Protein mit einer molekularen Masse von 63,0 kDa. Es handelt sich um ein in Eukaryoten konserviertes Protein, dass eine DUF1941-Domäne mit bisher unbekannter Funktion aufweist. Das SPCC16C4.02c Genprodukt ist in *S. pombe* essentiell (Kim et al, 2010). In einer Genom-weiten Studie, in der die Lokalisierung von ca. 90 % der *S. pombe* Proteine erfolgte, wurde auch die Lokalisierung des SPCC16C4.02c Genprodukts analysiert. Im Rahmen dieser Untersuchung wurde neben der endogenen Kopie eine weitere unter dem starken *nmt1*⁺-Promotor stehende Kopie am 3' Ende mit *yfp* fusioniert und durch homologe Rekombination in das Genom integriert (Matsuyama et al, 2006). Aufgrund dieser Daten ist das SPCC16C4.02c Genprodukt vermutlich am Kinetochor oder SPB lokalisiert. Neben der putativen Kinetochorlokalisierung fand sich in der mitotischen Zelle eine Ko-Assoziation mit der Spindel. Als Kinetochorprotein wäre das SPCC16C4.02c Genprodukt ein interessanter

und zudem wahrscheinlicher Suppressorkandidat. So interagieren Kinetochorproteine naturgemäß mit anderen Kinetochorproteinen. Bei engen Bindungen kann, wie unter anderem in dieser Arbeit gezeigt wurde, häufig beobachtet werden, dass die Überexpression einer Komponente den Wachstumsdefekt eines mutanten Stammes des Interaktionspartners supprimieren kann (Kerres et al, 2006; Kerres et al, 2007; Pidoux et al, 2003). In diesem Zusammenhang wäre besonders interessant, dass das SPCC16C4.02c Genprodukt mit der mitotischen Spindel ko-lokalisiert. Der Sim4-Komplex zählt zu den Chromatin-interagierenden Kinetochorkomplexen und bildet bisher nur über Dad1 eine Anlagerungsfläche für den nicht-essentiellen DASH-Komplex, der für die Mikrotubulibindung genutzt wird. Eine direkte Assoziation mit der Spindel wurde bisher nicht angenommen (Hayashi et al, 2004; Kerres et al, 2006; Pidoux et al, 2003; Saitoh et al, 1997). Aber da *Fta2* Mutanten einen für den Sim4-Komplex einzigartigen Phänotyp zeigen und bei der restriktiven Temperatur trotz elongierter Spindel keine Chromatin-Trennung auftritt, wird vermutet, dass der Sim4-Komplex eine weitere, möglicherweise direkte Assoziation an die mitotische Spindel zeigt. Denn dieser Phänotyp der nicht-Trennung des Chromatins ist bisher bei mutanten Stämmen des NMS-Komplexes bekannt, die für die Kinetochor-Spindel Verknüpfung essentiell sind (Hsu & Toda, 2011; Kerres et al, 2006; Kerres et al, 2007; Nabetani et al, 2001). Falls bewiesen werden kann, dass SPCC16C4.02c als Suppressor der *fta2-291* Mutante fungiert, müsste zuerst unter endogenen Bedingungen geprüft werden, ob das SPCC16C4.02c Genprodukt am Kinetochor assoziiert.

Eine weitere detaillierte Studie des Suppressors vom V23-Genbankplasmid könnte Aufschluss über die Rolle des *Fta2* Proteins geben, die dieses unabhängig von *Mal2* erfüllt.

4.4.2 Beeinflusst Sui1 die Histon H3 Variante CENP-A und somit den Sim4-Komplex?

Der auf dem V28-Genbankplasmid kodierte Translations-Initiations-Faktor Sui1 konnte als Suppressor der *fta2-291* Mutante isoliert. Neben der *fta2-291* Mutante konnten auch alle weiteren mutanten Sim4-Komplexstämme, nicht aber die des NMS-Komplexes supprimiert werden (Topolski & Fleig, unveröffentlicht). Somit interagiert Sui1 nur mit dem Chromatin-nahen Sim4-Kinetochorkomplex und nicht mit dem Mikrotubuli-assoziierten NMS-Komplex. Bisher ist allerdings keine Funktion von Sui1 bekannt, die diese Interaktion erklären könnte.

Sui1 ist ein essentielles Protein mit einer molekularen Masse von 12,4 kDa. Die Abwesenheit von Sui1 führt zu einem Anschwellen und Abrunden der Zellen mit einhergehender Zelllyse (Omi et al, 1999). Sui1 ist von den Archaeen über das Reich der Bakterien bis zu den Eukaryoten, und dort von Hefen bis zum Menschen, konserviert (Kyrpides & Woese, 1998). Für das humane Sui1 (eIF1) konnte gezeigt werden, dass es als Translations-Initiationsfaktor

fungiert, indem es hilft, das Ribosom am korrekten Start-Kodon der mRNA aufzubauen (Pestova et al, 2001). Außerdem wird durch eIF1 verhindert, dass das Ribosom an einer anderen Stelle als dem Startkodon mit der Translation beginnt (Mitchell & Lorsch, 2008). Diese Funktion ist evolutionär konserviert. So wird der mutante Phänotyp einer temperatursensitiven *S. cerevisiae sui1-1* Mutante durch die Expression von eIF1 vollständig supprimiert (Sheikh et al, 1999). Für das *S. cerevisiae* Sui1-Protein wird eine zusätzliche Funktion am Ribosom angenommen. Treten Mutationen in der mRNA auf, die zu einem vorzeitigen Stopp führen, kommt es zum raschen Abbau der mRNA im Rahmen des „nonsense-mediated mRNA decay“ der von Sui1 selbst aktiviert wird (Cui et al, 1999; Muhlemann et al, 2008). Diese Funktion gilt allerdings als umstritten, so dass sie in diesem Zusammenhang nicht diskutiert wird (Harger & Dinman, 2004).

Für das *S. pombe* Sui1 konnte gezeigt werden, dass Sui1 sowohl für die Initiation als auch für die Elongation der Translation benötigt wird (Gaudon et al, 1999). Durch die Überexpression eines Translations-Initiations-Faktors ist eine erhöhte Translation einer Vielzahl von Proteinen vorstellbar. Da nicht schlüssig ist, wie Sui1 diese Wirkung nur auf die Komponenten des Sim4-Komplexes, nicht aber des NMS-Komplexes hat, ist es wahrscheinlich, dass das extra Sui1 ein anderes Protein in der Zelle beeinflusst, das nur mit Komponenten des Sim4-, nicht aber mit Mitgliedern des NMS-Komplexes interagiert.

Ein möglicher Kandidat in diesem Zusammenhang wäre CENP-A. CENP-A-enhaltende Nukleosomen finden sich in allen Eukaryoten in der Zentromerregion und sind dort essentiell für den Aufbau des Kinetochors (Kapitel 1.6). In *S. pombe* sind bisher alle getesteten Komponenten des Sim4-Komplexes für dessen Einlagerung in das Zentromerchromatin und die Aufrechterhaltung der transkriptionellen Stilllegung des zentralen Zentromers verantwortlich (Kerres et al, 2006; Pidoux et al, 2003; Takahashi et al, 2000). Die NMS-Komponenten werden dahingegen weder für die CENP-A-Nukleosomen Lokalisierung noch für die transkriptionelle Stilllegung der zentralen Zentromerregion benötigt, obwohl sie ebenfalls an dieser assemblieren (Jakopec & Fleig, 2011, in Vorbereitung; Kerres et al, 2007). Aber wie könnte zusätzliches Sui1 das *S. pombe* CENP-A Protein beeinflussen?

In diesem Zusammenhang wurde kürzlich die Rolle des Zellzyklus regulierten GATA Transkriptionsfaktors Ams2 in *S. pombe* entschlüsselt (Takayama & Toda, 2010). Ams2 wurde als Suppressor des Wachstumsdefekts einer CENP-A Mutante isoliert (Chen et al, 2003). Ams2 wirkt nur in einer sehr kurzen Phase während des Zellzyklusses. In der S-Phase, in der die replikationsabhängigen Histone H2A, H2B, H3 und H4 für die neu replizierte DNA benötigt werden, akkumuliert Ams2 im Zellkern und führt zur Transkription dieser. Zum Ende der S-Phase wird Ams2 degradiert, so dass in der G2- und M-Phase kein Ams2 mehr in der Zelle vorliegt. Dadurch wird gewährleistet, dass nur dann eine hohe Zahl

an replikationsabhängigen Histonen gebildet werden, wenn sie von der Zelle benötigt werden (Takayama et al). Auch wenn Ams2 alle replikationsabhängigen Histone beeinflusst, so hat dies keinen Einfluss auf die Transkription des von der Replikation unabhängigen CENP-A Proteins (Takayama & Takahashi, 2007). Bisher ist nicht bekannt, welcher Transkriptionsfaktor CENP-A-spezifisch wirkt und welche weiteren Faktoren für dessen Expression relevant sind. Möglicherweise wird Sui1 in seiner Rolle als Translationsfaktor für die CENP-A Expression benötigt. Durch die Überexpression von Sui1 könnte man sich eine erhöhte Expression von CENP-A vorstellen, die Einfluss auf das Zentromerchromatin hat. Erste Analysen in unserem Labor deuten dies an (Topolski und Fleig, unveröffentlicht). So wird postuliert, dass der Wachstumsdefekt der *S. pombe* CENP-A Mutante durch zusätzliches Ams2 supprimiert wird, indem es die Anzahl der Histonmoleküle in der zentralen Zentromerregion erhöht und diese somit stabilisiert (Takayama & Toda, 2010). Diese Vermutung wird durch die Tatsache gestützt, dass die Überexpression von Histon H4 in *S. pombe* ebenfalls den ts Phänotyp der CENP-A Mutante supprimieren kann (Chen et al, 2003; Takayama & Takahashi, 2007).

Ob Sui1 aufgrund seiner Funktion als Translations-Initiations-Faktor CENP-A beeinflusst, ist unklar. Es wären auch weitere bisher noch nicht bekannte Funktionen denkbar. So ist das *S. pombe* Sui1 bisher kaum analysiert. Die subzelluläre Lokalisierung des Proteins wurde bisher nicht unter endogenen Bedingungen bestimmt. In einer Genom-umfassenden Studie wurde die Lokalisierung des durch den *nmt1*⁺-Promotor exprimierten Sui1-YFP detektiert (Matsuyama et al, 2006). Sui1-YFP lokalisierte sowohl im Zytoplasma als auch gleichermaßen im Zellkern (http://www.riken.jp/SPD/lmg_page/39_iP/39H09_Loc.html). Falls sich Sui1 unter endogenen Bedingungen im Zellkern befindet, kann dies nicht in Zusammenhang mit der Rolle von Sui1 als Translations-Initiations-Faktor an den Ribosomen gebracht werden, da sich diese nur außerhalb des Kernes befinden. Dies könnte auf weitere Funktionen von Sui1 hindeuten, die entweder CENP-A und den Sim4-Komplex direkt oder indirekt betreffen. Weitere Analysen in den verschiedenen Zellzyklusstadien werden zeigen, wie Sui1 die Komponenten des Sim4-Komplexes beeinflusst.

V. Aufbau des *S. pombe* Kinetochors: Der NMS- und Sim4-Komplex

4.5.1 Das Kinetochor assembliert vermutlich horizontal in *S. pombe*

Die Nukleosomen des Zentromers in Eukaryoten beinhalten die Histon H3 Variante CENP-A (Black & Bassett, 2008). In *S. cerevisiae* handelt es sich um ein einzelnes CENP-A enthaltendes Nukleosom, während Organismen mit einem regionalen Zentromer mehrere CENP-A-Nukleosomen besitzen. Die Anzahl und Anordnung der CENP-A-Nukleosomen in

Organismen mit einem regionalen Zentromer ist jedoch bisher nicht genau bekannt: Man geht jedoch davon aus, dass die CENP-A Nukleosomen definiert über das gesamte Zentromer angeordnet sind und durch H3-Nukleosomen flankiert werden (Verdaasdonk & Bloom, 2011). Aufgrund dieser Anordnung, sowie mikroskopischen Aufnahmen im nm-Bereich sind zwei verschiedene Kinetochorassemblierungsmodelle möglich: der horizontale und vertikale Kinetochoraufbau (Santaguida & Musacchio, 2009).

Beim vertikalen Kinetochoraufbau bildet ein CENP-A-Nukleosom die zentrale Plattform für das gesamte Kinetochor. Über das CENP-A-Nukleosom assemblieren in einer sequenziellen Abfolge die Chromatin- und darauffolgend die Spindel-assoziierten Kinetochorproteine (Santaguida & Musacchio, 2009). In einem solchen Falle wären die Verbindungen zwischen den verschiedenen Komponenten sehr eng und der Wegfall von sehr zentralen Komponenten hätte verheerende Folgen für den übrigen Kinetochoraufbau.

Der horizontale Kinetochoraufbau sieht mehr als ein Nukleosom als Plattform für die Kinetochorassemblierung. Das Zentrum der Plattform bilden ein oder mehrere CENP-A Nukleosomen, die von H3-Nukleosomen umschlossen werden (Santaguida & Musacchio, 2009). Für einen horizontalen Aufbau des Kinetochors spricht, dass nicht alle Kinetochorproteine für die Lokalisierung der CENP-A-Nukleosomen benötigt werden bzw. von deren Assoziation in ihrer Kinetochorassoziation abhängen.

In *S. pombe* wird durch den Verlust der CENP-A-Nukleosomen die transkriptionelle Stilllegung der zentralen Zentromerregion aufgehoben. Im Rahmen dieser Arbeit konnte ich zeigen, dass der NMS-Komplex nicht für die transkriptionelle Stilllegung der zentralen Zentromerregion benötigt wird (Jakopec & Fleig, 2011, in Vorbereitung; Kerres et al, 2007). Anders als die Komponenten des NMS-Komplexes werden alle bisher untersuchten Sim4-Komponenten für die transkriptionelle Stilllegung der zentralen Zentromerregion benötigt (Jin et al, 2002; Kerres et al, 2006; Pidoux et al, 2003). Dies würde für eine zentrale Position des Sim4-Komplexes am Kinetochor sprechen, während der NMS-Komplex den Sim4-Komplex flankiert (Abbildung 4.3 A). In humanen Zellen ist die CENP-A-Nukleosomen Lokalisierung vom Sim4-homologen CCAN-Komplex und nicht vom humanen NMS-Komplex abhängig (Foltz et al, 2006; Hellwig et al, 2009; Izuta et al, 2006; McClelland et al, 2007; Okada et al, 2006; Orthaus et al, 2006; Przewloka & Glover, 2009). Allerdings wird der CCAN-Komplex in zwei Untereinheiten unterteilt: die NAC-Proteine („Nucleosome Associated Complex“), die für die Assoziation der CENP-A-Nukleosomen benötigt werden und jene, die nicht für die Bindung dieser benötigt werden, die CAD Proteine („CENP-A Distal“) (Cheeseman & Desai, 2008; Foltz et al, 2006; Hellwig et al, 2009; Izuta et al, 2006; McClelland et al, 2007; Okada et al, 2006; Orthaus et al, 2006; Przewloka & Glover, 2009). So dass am humanen Kinetochor der CCAN-Komplex sowohl zentral, als auch in der aus H3-Nukleosomen

gebildeten Region binden könnte. Und tatsächlich konnte bereits gezeigt werden, dass die CAD-Proteine CENP-T und CENP-W an H3-Nukleosomen assoziieren (Abbildung 4.3 A) (Hori et al, 2008; Santaguida & Musacchio, 2009). Im Falle eines horizontalen Kinetochoraufbaus bleibt die Frage offen, wie der NMS-Komplex an das Zentromerchromatin assoziiert. Möglich wäre eine direkte Bindung an die H3 enthaltenden Nukleosomen, sowie die Assoziation über ein Adapterprotein. Auch einzelne Komponenten des Sim4-Komplexes kämen in Frage. In humanen sowie *Drosophila* Zellen konnte gezeigt werden, dass der NMS-Komplex direkt über das Kinetochorprotein CENP-C bindet (Przewloka et al, 2011; Screpanti et al, 2011).

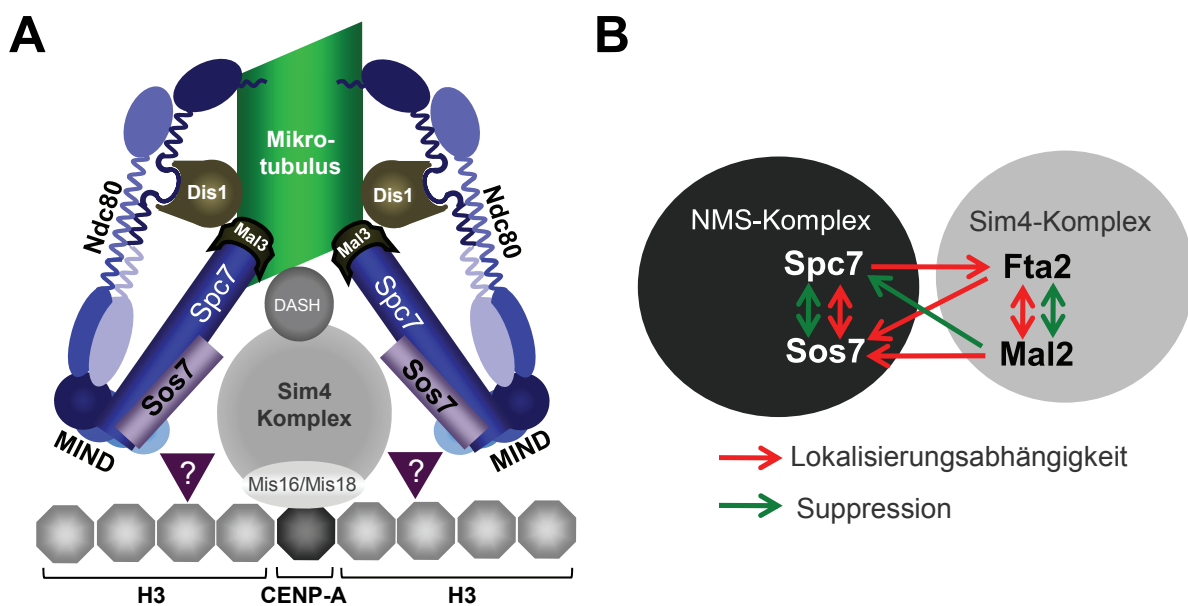


Abbildung 4.3: Modell des horizontalen Kinetochoraufbaus in *S. pombe* sowie die Interaktionen zwischen dem NMS- und Sim4-Komplex.

(A) Der Mis16-Mis18- und der Sim4-Komplex assoziieren über CENP-A enthaltende Nukleosomen mit dem Zentromerchromatin. Während der Mitose bindet der DASH-Komplex über den Sim4-Komplex an das Kinetochor und verbindet diesen mit dem Mikrotubulus. Der aus dem Ndc80-, MIND- und Spc7-Sos7-Komplex aufgebaute NMS-Komplex assoziiert mehrfach mit dem Mikrotubulus. Der Ndc80-Komplex bindet über das Ndc80-Protein sowohl direkt als auch indirekt über das Mikrotubuli-Plusend-assoziierte Dis1 an den Mikrotubulus. Das Spc7 Protein verknüpft das Kinetochor über das Mikrotubuli-assoziierte Mal3 mit dem Mikrotubulus. Wie die Assoziation des NMS-Komplexes an das Zentromerchromatin erfolgt, ist bisher nicht bekannt (violett markiertes Dreieck mit Fragezeichen). Sowohl eine direkte Bindung an die H3 enthaltenden Nukleosomen (→ horizontaler Aufbau), die Bindung an ein bisher nicht bekanntes Adapterprotein oder die Assoziation über einzelne Komponenten des Sim4-Komplexes wären denkbar. Bisher konnte nicht gezeigt werden, ob Kinetochore, die mehrere Mikrotubuli-Bindestellen besitzen, aus mehreren repetitiven Einheiten aufgebaut sind und jeweils einen Mikrotubulus binden oder als Plattform für jeweils alle Mikrotubuli dienen. Die Darstellung zeigt vereinfacht die Bindung eines Mikrotubulus. **(B)** Schematische Darstellung der Interaktion zwischen dem NMS- und dem Sim4-Komplex über den Spc7-Sos7- und Mal2-Fta2-Subkomplex. Spc7 ist für die wildtypische Fta2-Kinetochorassoziation, Fta2 und Mal2 für die Sos7 Lokalisierung notwendig. Zusätzliches Mal2 supprimiert den Wachstumsdefekt von *spc7* Mutantenstämmen. Zusätzlich sind die Interaktionen innerhalb der Subkomplexe angegeben. Doppelpfeil: Interaktion erfolgt in beide Richtungen. Einfachpfeil: Interaktion wurde in beide Richtungen getestet, sie erfolgt allerdings nur in die angegebene.

4.5.2 Die NMS- und Sim4-Kinetochorkomplexe sind genetisch über die Spc7-Sos7- und Mal2-Fta2-Subkomplexe miteinander verbunden

Der NMS- und Sim4-Komplex sind in *S. pombe* unabhängig voneinander isoliert worden (Liu et al, 2005; Obuse et al, 2004). Diese beiden Komplexe interagieren jedoch genetisch miteinander (Kerres et al, 2006; Kerres et al, 2007). In *S. pombe* wird funktionelles Spc7 für die wildtypische Lokalisierung der Sim4-Komplexkomponente Fta2 benötigt, nicht aber für die übrigen Sim4-Mitglieder (Abbildung 4.3). So lokalisiert vor allem Mal2, ein enger Interaktionspartner von Fta2, unabhängig von Spc7. Da diese beiden Komponenten in einem sehr engen Abhängigkeitsverhältnis stehen und jeweils absolut für die Kinetochorassoziation des anderen Proteins benötigt werden, ist anscheinend auch eine reduzierte Fta2 Proteinmenge ausreichend um Mal2 in augenscheinlich wildtypischer Menge am Kinetochor lokalisieren zu lassen (Kerres et al, 2006). Umgekehrt werden sowohl funktionelles Mal2 als auch Fta2 für die Kinetochorbindung von Sos7 benötigt: in der *mal2-1* und *fta2-291* Mutante findet sich jeweils nur eine reduziertes Sos7-GFP-Kinetochorsignal unter restriktiven Konditionen (Abbildung 4.3 B) (Jakopec & Fleig, 2011, in Vorbereitung). Da das Signal von Spc7, mit dem Sos7 einen Subkomplex bildet, in diesen beiden Mutantenstämmen visuell nicht reduziert ist, scheint auch hier eine reduzierte Anzahl von Sos7 Proteinen am Kinetochor für die Spc7 Kinetochorassoziation auszureichen (Jakopec & Fleig, 2011, in Vorbereitung; Kerres et al, 2007). Neben diesen Lokalisierungsabhängigkeiten ist einzig eine weitere zwischen den beiden Komplexen in *S. pombe* bekannt: das Sim4 Protein benötigt für seine Kinetochorassoziation während der Mitose die Ndc80-Komponente Nuf2 (Saitoh et al, 2005).

Auch am humanen Kinetochor scheint eine Verbindung zwischen dem KMN- (humaner NMS-Komplex) und dem CCAN-Komplex zu existieren. Wobei der CCAN-Komplex homologe Proteine des Sim4-Komplexes enthält (Foltz et al, 2006; Hellwig et al, 2009; Izuta et al, 2006; McClelland et al, 2007; Okada et al, 2006; Orthaus et al, 2006; Przewloka & Glover, 2009). Der humane Ndc80-Komplex benötigt neben dem MIND-Komplex auch CCAN-Mitglieder um wildtypisch zu lokalisieren. In diesen Prozess sind vermutlich die CCAN-Komponenten CENP-H, CENP-K und CENP-I involviert, wobei es sich um die Homologe der Sim4-Komponenten Fta3, Mis6 und Sim4 handelt (Hori et al, 2008; Liu et al, 2006; Screpanti et al, 2011). Diese drei CCAN-Komponenten haben ebenfalls einen Einfluss auf die Lokalisierung des humanen Spc7 Homologs Blinkin (Cheeseman et al, 2008; Santaguida & Musacchio, 2009). Zusätzlich beeinflussen die CCAN-Komponenten CENP-T und CENP-W die Lokalisierung des humanen MIND-Komplexes (Hori et al, 2008; Santaguida & Musacchio, 2009).

Eine weitere genetische Interaktion zwischen den Komplexen fand sich in der extragen Multikopien-Suppressoranalyse einer *spc7* Mutante: zusätzliches Mal2 konnte den Wachstumsdefekt von *spc7^{ts}* partiell supprimieren (Abbildung 4.3) (Kerres et al, 2007). Diese Suppression beruht vermutlich auf der Stabilisierung des mutanten Spc7 Proteins. Die exakte Funktion des Mal2 Proteins in der Interaktion zu Spc7 ist allerdings unklar. Diese könnte in die Kinetochor-Spindel-Verknüpfung involviert sein. Denn Mal2 scheint in *S. pombe* den Aufbau und die Funktion der mitotischen Spindel massiv zu beeinflussen. So sind konditional-letale *mal2* Mutanten sensitiv gegen Mikrotubuli-destabilisierende Substanzen und zeigen morphologische und funktionelle Spindeldefekte (Jin et al, 2002; Topolski, 2008). Die Mal2 Funktion an der mitotischen Spindel scheint konserviert, da RNAi Experimente des humanen Mal2 Homologs CENP-O ebenfalls Fehler in der Spindelassemblierung aufweisen (McAinish et al, 2006). Da sowohl das *S. cerevisiae* Mal2 Homolog Mcm21 und das Spc7 Homolog Spc105 bzw. in humanen Zellen CENP-O und Blinkin über eine Affinitätsaufreinigung gemeinsam isoliert wurden, scheint die Interaktion zwischen diesen beiden Proteinen konserviert (De Wulf et al, 2003; Meraldi et al, 2006; Okada et al, 2006).

In *S. cerevisiae* wird das Mal2 Homolog Mcm21 vermutlich als Bindeglied für die Lokalisierung des CPC-Komplexes am Kinetochor benötigt. Die Re-Lokalisierung des CPC in der Spindelmitte während der Anaphase soll ebenfalls über Mcm21 erfolgen, indem dieses SUMO-modifiziert wird (Vizeacoumar et al, 2010). Auch wenn für das *S. pombe* Mal2 eine solche Funktion noch nicht bekannt ist, konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass zumindest Spc7 teilweise an der Assemblierung des CPC in der Spindelmitte benötigt wird: unter restriktiven Konditionen fand sich die Aurora B Kinase als funktionelle Untereinheit des CPC nicht mehr korrekt in der Spindelmitte lokalisiert (Kapitel 3.1.8). Möglicherweise ist dies eine gemeinsame Aufgabe, die von Mal2 und Spc7 erfüllt wird.

Dies könnte auch erklären, warum Mal2 und Spc7 nur in einem geringen Maße ko-immunpräzipitiert werden konnten. Eine Bindung zwischen den Proteinen wäre für diese Funktion nur während der Mitose notwendig. Allerdings könnte zum jetzigen Zeitpunkt nicht ausgeschlossen werden, ob Spc7 und Mal2 auch unabhängig vom NMS-Komplex bzw. Sim4-Komplex miteinander interagieren können.

Eine gemeinsame Funktion von Spc7 und Mal2 an den Mikrotubuli konnte möglicherweise auch durch den Suppressor Btf3 aufgezeigt werden. Extra Btf3, das einen Einfluss auf die Zahl der Mikrotubuli und vermutlich auf deren Struktur hat, konnte bisher exklusiv den aberranten Phänotyp der *spc7* und *mal2* Mutanten supprimieren (Kapitel 4.1.4).

In der vorliegenden Arbeit habe ich durch die Analyse der evolutionär konservierten Spc7 und Sos7 Kinetochorproteine Aufschluss über deren Funktion in der Kinetochorassemblierung in der Spaltheife *S. pombe* gewonnen. Es konnte der hierarchische Aufbau des NMS-Komplexes sowie eine genetische Verbindung zum Sim4-Komplex aufgedeckt werden. Spc7 und Sos7 sind essentiell für die Kinetochor-Mikrotubuli-Verknüpfung und beeinflussen sowohl den Aufbau als auch die Integrität der mitotischen Spindel. Zudem gelang durch die Isolierung von Sos7 die Identifizierung einer bis dato nicht bekannten Kinetochorproteinfamilie in Pilzen. Die Sos7 Familie ist strukturell homolog zu der Zwint-Familie in höheren Eukaryoten. Somit zeigt meine Analyse wieder einmal den Modellcharakter der *S. pombe* Mitose.

Literaturverzeichnis

- Akhmanova A, Steinmetz MO (2010) Microtubule +TIPs at a glance. *J Cell Sci* **123**(Pt 20): 3415-3419
- Akiyoshi B, Sarangapani KK, Powers AF, Nelson CR, Reichow SL, Arellano-Santoyo H, Gonen T, Ranish JA, Asbury CL, Biggins S (2010) Tension directly stabilizes reconstituted kinetochore-microtubule attachments. *Nature* **468**(7323): 576-579
- Alfa CE, Gallagher IM, Hyams JS (1993) Antigen localization in fission yeast. *Methods Cell Biol* **37**: 201-222
- Allshire RC, Karpen GH (2008) Epigenetic regulation of centromeric chromatin: old dogs, new tricks? *Nat Rev Genet* **9**(12): 923-937
- Allshire RC, Nimmo ER, Ekwall K, Javerzat JP, Cranston G (1995) Mutations derepressing silent centromeric domains in fission yeast disrupt chromosome segregation. *Genes Dev* **9**(2): 218-233
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**(3): 403-410
- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**(17): 3389-3402
- Alushin GM, Ramey VH, Pasqualato S, Ball DA, Grigorieff N, Musacchio A, Nogales E (2010) The Ndc80 kinetochore complex forms oligomeric arrays along microtubules. *Nature* **467**(7317): 805-810
- Amon A (1999) The spindle checkpoint. *Curr Opin Genet Dev* **9**(1): 69-75
- Amor DJ, Kalitsis P, Sumer H, Choo KH (2004) Building the centromere: from foundation proteins to 3D organization. *Trends Cell Biol* **14**(7): 359-368
- Andersen KM, Semple CA, Hartmann-Petersen R (2007) Characterisation of the nascent polypeptide-associated complex in fission yeast. *Mol Biol Rep* **34**(4): 275-281
- Ansari KI, Mishra BP, Mandal SS (2009) MLL histone methylases in gene expression, hormone signaling and cell cycle. *Front Biosci* **14**: 3483-3495
- Aravind L, Watanabe H, Lipman DJ, Koonin EV (2000) Lineage-specific loss and divergence of functionally linked genes in eukaryotes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(21): 11319-11324
- Ash MR, Faelber K, Kosslick D, Albert GI, Roske Y, Kofler M, Schuermann M, Krause E, Freund C (2010) Conserved beta-hairpin recognition by the GYF domains of Smy2 and GIGYF2 in mRNA surveillance and vesicular transport complexes. *Structure* **18**(8): 944-954
- Bader JR, Vaughan KT (2010) Dynein at the kinetochore: Timing, Interactions and Functions. *Semin Cell Dev Biol* **21**(3): 269-275
- Bahler J, Steever AB, Wheatley S, Wang Y, Pringle JR, Gould KL, McCollum D (1998) Role of polo kinase and Mid1p in determining the site of cell division in fission yeast. *J Cell Biol* **143**(6): 1603-1616
- Baker DJ, Chen J, van Deursen JM (2005) The mitotic checkpoint in cancer and aging: what have mice taught us? *Curr Opin Cell Biol* **17**(6): 583-589
- Baker DJ, Jeganathan KB, Cameron JD, Thompson M, Juneja S, Kopecka A, Kumar R, Jenkins RB, de Groen PC, Roche P, van Deursen JM (2004) BubR1 insufficiency causes early onset of aging-associated phenotypes and infertility in mice. *Nat Genet* **36**(7): 744-749
- Baker DJ, Jin F, van Deursen JM (2008) The yin and yang of the Cdkn2a locus in senescence and aging. *Cell Cycle* **7**(18): 2795-2802
- Bannister AJ, Zegerman P, Partridge JF, Miska EA, Thomas JO, Allshire RC, Kouzarides T (2001) Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. *Nature* **410**(6824): 120-124.
- Barbet N, Muriel WJ, Carr AM (1992) Versatile shuttle vectors and genomic libraries for use with *Schizosaccharomyces pombe*. *Gene* **114**(1): 59-66
- Basi G, Schmid E, Maundrell K (1993) TATA box mutations in the *Schizosaccharomyces pombe* nmt1 promoter affect transcription efficiency but not the transcription start point or thiamine repressibility. *Gene* **123**(1): 131-136
- Baum M NV, Clarke L. (1994) The centromeric K-type repeat and the central core are together sufficient to establish a functional *Schizosaccharomyces pombe* centromere. *Mol Biol Cell* **5**(7): 747-761.
- Beatrix B, Sakai H, Wiedmann M (2000) The alpha and beta subunit of the nascent polypeptide-associated complex have distinct functions. *J Biol Chem* **275**(48): 37838-37845
- Beck H, Nahse V, Larsen MS, Groth P, Clancy T, Lees M, Jorgensen M, Helleday T, Syljuasen RG, Sorensen CS (2010) Regulators of cyclin-dependent kinases are crucial for maintaining genome integrity in S phase. *J Cell Biol* **188**(5): 629-638
- 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
- Beltrao P, Trinidad JC, Fiedler D, Roguev A, Lim WA, Shokat KM, Burlingame AL, Krogan NJ (2009) Evolution of phosphoregulation: comparison of phosphorylation patterns across yeast species. *PLoS Biol* **7**(6): e1000134
- Benditt JO, Meyer C, Fasold H, Barnard FC, Riedel N (1989) Interaction of a nuclear location signal with isolated nuclear envelopes and identification of signal-binding proteins by photoaffinity labeling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(23): 9327-9331
- Berrueta L, Kraeft SK, Timauer JS, Schuyler SC, Chen LB, Hill DE, Pellman D, Bierer BE (1998) The adenomatous polyposis coli-binding protein EB1 is associated with cytoplasmic and spindle microtubules. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(18): 10596-10601
- Berry LD, Gould KL (1996) Regulation of Cdc2 activity by phosphorylation at T14/Y15. *Prog Cell Cycle Res* **2**: 99-105

- Bieling P, Laan L, Schek H, Munteanu EL, Sandblad L, Dogterom M, Brunner D, Surrey T (2007) Reconstitution of a microtubule plus-end tracking system in vitro. *Nature* **450**(7172): 1100-1105
- Biggins S, Walczak CE (2003) Captivating capture: how microtubules attach to kinetochores. *Curr Biol* **13**(11): R449-460
- Birnboim HC, Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**(6): 1513-1523
- Bjerling P, Ekwall K (2002) Centromere domain organization and histone modifications. *Braz J Med Biol Res* **35**(5): 499-507
- Black BE, Bassett EA (2008) The histone variant CENP-A and centromere specification. *Curr Opin Cell Biol* **20**(1): 91-100
- Bloss TA, Witze ES, Rothman JH (2003) Suppression of CED-3-independent apoptosis by mitochondrial betaNAC in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **424**(6952): 1066-1071
- Bohnert KA, Chen JS, Clifford DM, Vander Kooi CW, Gould KL (2009) A link between aurora kinase and Clp1/Cdc14 regulation uncovered by the identification of a fission yeast borealin-like protein. *Mol Biol Cell* **20**(16): 3646-3659
- Bouck D, Bloom K (2005) The role of centromere-binding factor 3 (CBF3) in spindle stability, cytokinesis, and kinetochore attachment. *Biochem Cell Biol* **83**(6): 696-702
- Brameier M, Krings A, MacCallum RM (2007) NucPred--predicting nuclear localization of proteins. *Bioinformatics* **23**(9): 1159-1160
- Bratman SV, Chang F (2007) Stabilization of overlapping microtubules by fission yeast CLASP. *Dev Cell* **13**(6): 812-827
- Brazer SC, Williams HP, Chappell TG, Cande WZ (2000) A fission yeast kinesin affects Golgi membrane recycling. *Yeast* **16**(2): 149-166
- 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, Hayles J, Mata J, Aveline L, Nurse P, McIntosh JR (2000) Tea2p Is a Kinesin-like Protein Required to Generate Polarized Growth in Fission Yeast. *J Cell Biol* **151**(1): 15-28
- Brunner D, Nurse P (2000) CLIP170-like tip1p spatially organizes microtubular dynamics in fission yeast. *Cell* **102**(5): 695-704
- Buscaino A, Allshire R, Pidoux A (2010) Building centromeres: home sweet home or a nomadic existence? *Curr Opin Genet Dev* **20**(2): 118-126
- Camahort R, Shivaraju M, Mattingly M, Li B, Nakanishi S, Zhu D, Shilatifard A, Workman JL, Gerton JL (2009) Cse4 is part of an octameric nucleosome in budding yeast. *Mol Cell* **35**(6): 794-805
- Carmena M, Earnshaw WC (2003) The cellular geography of aurora kinases. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**(11): 842-854
- Carminati JL, Stearns T (1997) Microtubules orient the mitotic spindle in yeast through dynein-dependent interactions with the cell cortex. *J Cell Biol* **138**(3): 629-641
- Cassimeris L, Pryer NK, Salmon ED (1988) Real-time observations of microtubule dynamic instability in living cells. *J Cell Biol* **107**(6 Pt 1): 2223-2231
- Celniker SE, Sweder K, Srien F, Bailey JE, Campbell JL (1984) Deletion mutations affecting autonomously replicating sequence ARS1 of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **4**(11): 2455-2466
- Chang F, Martin SG (2009) Shaping fission yeast with microtubules. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **1**(1): a001347
- Chang L, Morrell JL, Feoktistova A, Gould KL (2001) Study of cyclin proteolysis in anaphase-promoting complex (APC) mutant cells reveals the requirement for APC function in the final steps of the fission yeast septation initiation network. *Mol Cell Biol* **21**(19): 6681-6694
- Cheeseman IM, Brew C, Wolyniak M, Desai A, Anderson S, Muster N, Yates JR, Huffaker TC, Drubin DG, Barnes G (2001) Implication of a novel multiprotein Dam1p complex in outer kinetochore function. *J Cell Biol* **155**(7): 1137-1145
- Cheeseman IM, Chappie JS, Wilson-Kubalek EM, Desai A (2006) The conserved KMN network constitutes the core microtubule-binding site of the kinetochore. *Cell* **127**(5): 983-997
- Cheeseman IM, Desai A (2008) Molecular architecture of the kinetochore-microtubule interface. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**(1): 33-46
- Cheeseman IM, Niessen S, Anderson S, Hyndman F, Yates JR, 3rd, Oegema K, Desai A (2004) A conserved protein network controls assembly of the outer kinetochore and its ability to sustain tension. *Genes Dev* **18**(18): 2255-2268
- Chen ES, Saitoh S, Yanagida M, Takahashi K (2003) A cell cycle-regulated GATA factor promotes centromeric localization of CENP-A in fission yeast. *Mol Cell* **11**(1): 175-187
- Chen ES, Zhang K, Nicolas E, Cam HP, Zofall M, Grewal SI (2008) Cell cycle control of centromeric repeat transcription and heterochromatin assembly. *Nature* **451**(7179): 734-737
- Cheng X, Blumenthal RM (2010) Coordinated chromatin control: structural and functional linkage of DNA and histone methylation. *Biochemistry* **49**(14): 2999-3008
- Ciferri C, Pasqualato S, Screpanti E, Varetto G, Santaguida S, Dos Reis G, Maiolica A, Polka J, De Luca JG, De Wulf P, Salek M, Rappsilber J, Moores CA, Salmon ED, Musacchio A (2008) Implications for kinetochore-microtubule attachment from the structure of an engineered Ndc80 complex. *Cell* **133**(3): 427-439
- Cimini D, Degraffi F (2005) Aneuploidy: a matter of bad connections. *Trends Cell Biol* **15**(8): 442-451
- Civelekoglu-Scholey G, Scholey JM (2010) Mitotic force generators and chromosome segregation. *Cell Mol Life Sci* **67**(13): 2231-2250
- Clarke PR, Zhang C (2008) Spatial and temporal coordination of mitosis by Ran GTPase. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**(6): 464-477
- Cleveland DW, Mao Y, Sullivan KF (2003) Centromeres and kinetochores: from epigenetics to mitotic checkpoint signaling. *Cell* **112**(4): 407-421

- Clifford DM, Wolfe BA, Roberts-Galbraith RH, McDonald WH, Yates JR, 3rd, Gould KL (2008) The Clp1/Cdc14 phosphatase contributes to the robustness of cytokinesis by association with anillin-related Mid1. *J Cell Biol* **181**(1): 79-88
- Cohen-Fix O (2001) The making and breaking of sister chromatid cohesion. *Cell* **106**(2): 137-140
- Collins KA, Castillo AR, Tatsutani SY, Biggins S (2005) De novo kinetochore assembly requires the centromeric histone H3 variant. *Mol Biol Cell* **16**(12): 5649-5660
- Collins SR, Miller KM, Maas NL, Roguev A, Fillingham J, Chu CS, Schuldiner M, Gebbia M, Recht J, Shales M, Ding H, Xu H, Han J, Ingvarsdottir K, Cheng B, Andrews B, Boone C, Berger SL, Hieter P, Zhang Z, Brown GW, Ingles CJ, Emili A, Allis CD, Toczyński DP, Weissman JS, Greenblatt JF, Krogan NJ (2007) Functional dissection of protein complexes involved in yeast chromosome biology using a genetic interaction map. *Nature* **446**(7137): 806-810
- Comings DE (1967) Histones of genetically active and inactive chromatin. *J Cell Biol* **35**(3): 699-708
- Costanzo M, Baryshnikova A, Bellay J, Kim Y, Spear ED, Sevier CS, Ding H, Koh JL, Toufighi K, Mostafavi S, Prinz J, St Onge RP, VanderSluis B, Makhnevych T, Vizeacoumar FJ, Alizadeh S, Bahr S, Brost RL, Chen Y, Cokol M, Deshpande R, Li Z, Lin ZY, Liang W, Marback M, Paw J, San Luis BJ, Shuteriqi E, Tong AH, van Dyk N, Wallace IM, Whitney JA, Weirauch MT, Zhong G, Zhu H, Houry WA, Brudno M, Ragibizadeh S, Papp B, Pal C, Roth FP, Giaever G, Nislow C, Troyanskaya OG, Bussey H, Bader GD, Gingras AC, Morris QD, Kim PM, Kaiser CA, Myers CL, Andrews BJ, Boone C (2010) The genetic landscape of a cell. *Science* **327**(5964): 425-431
- Courtheoux T, Gay G, Gachet Y, Tournier S (2009) Ase1/Prc1-dependent spindle elongation corrects merotelically during anaphase in fission yeast. *J Cell Biol* **187**(3): 399-412
- Cueille N, Salimova E, Esteban V, Blanco M, Moreno S, Bueno A, Simanis V (2001) Flp1, a fission yeast orthologue of the *S. cerevisiae* CDC14 gene, is not required for cyclin degradation or rum1p stabilisation at the end of mitosis. *J Cell Sci* **114**(Pt 14): 2649-2664
- Cui Y, Gonzalez CI, Kinzy TG, Dinman JD, Peltz SW (1999) Mutations in the MOF2/SUI1 gene affect both translation and nonsense-mediated mRNA decay. *RNA* **5**(6): 794-804
- Cullen CF, May KM, Hagan IM, Glover DM, Ohkura H (2000) A new genetic method for isolating functionally interacting genes: high plo1(+)-dependent mutants and their suppressors define genes in mitotic and septation pathways in fission yeast. *Genetics* **155**(4): 1521-1534
- Dammermann A, Desai A, Oegema K (2003) The minus end in sight. *Curr Biol* **13**(15): R614-624
- Daum JR, Wren JD, Daniel JJ, Sivakumar S, McAvoy JN, Potapova TA, Gorbisky GJ (2009) Ska3 is required for spindle checkpoint silencing and the maintenance of chromosome cohesion in mitosis. *Curr Biol* **19**(17): 1467-1472
- Dawe RK (2003) RNA interference, transposons, and the centromere. *Plant Cell* **15**(2): 297-301
- de Bruin RA, Wittenberg C (2009) All eukaryotes: before turning off G1-S transcription, please check your DNA. *Cell Cycle* **8**(2): 214-217
- De Wulf P, Earnshaw WC, Clayton L, Tanaka TU (2009a) Kinetochore-Microtubule Interactions. In *The Kinetochore*., pp 1-24. Springer New York
- De Wulf P, Earnshaw WC, Fukagawa T, Wulf P (2009b) Kinetochore Composition, Formation, and Organization. In *The Kinetochore*., pp 1-59. Springer New York
- De Wulf P, Earnshaw WC, Liu S-T, Yen TJ (2009c) The Kinetochore as Target for Cancer Drug Development. In *The Kinetochore*., pp 1-25. Springer New York
- De Wulf P, Earnshaw WC, Tomonaga T (2009d) The Kinetochore-Cancer Connection. In *The Kinetochore*., pp 1-22. Springer New York
- De Wulf P, McAnish AD, Sorger PK (2003) Hierarchical assembly of the budding yeast kinetochore from multiple subcomplexes. *Genes Dev* **17**(23): 2902-2921
- Deluca KF, Lens SM, Deluca JG (2011) Temporal changes in Hec1 phosphorylation control kinetochore-microtubule attachment stability during mitosis. *J Cell Sci*
- Deng JM, Behringer RR (1995) An insertional mutation in the BTF3 transcription factor gene leads to an early postimplantation lethality in mice. *Transgenic Res* **4**(4): 264-269
- des Georges A, Katsuki M, Drummond DR, Osei M, Cross RA, Amos LA (2008) Mal3, the *Schizosaccharomyces pombe* homolog of EB1, changes the microtubule lattice. *Nat Struct Mol Biol* **15**(10): 1102-1108
- Desai A, Rybina S, Muller-Reichert T, Shevchenko A, Hyman A, Oegema K (2003) KNL-1 directs assembly of the microtubule-binding interface of the kinetochore in *C. elegans*. *Genes Dev* **17**(19): 2421-2435
- Ding R, McDonald KL, McIntosh JR (1993) Three-dimensional reconstruction and analysis of mitotic spindles from the yeast, *Schizosaccharomyces pombe*. *J Cell Biol* **120**(1): 141-151
- Ding R, West RR, Morhew DM, Oakley BR, McIntosh JR (1997) The spindle pole body of *Schizosaccharomyces pombe* enters and leaves the nuclear envelope as the cell cycle proceeds. *Mol Biol Cell* **8**(8): 1461-1479
- Dolan WP, Le AH, Schmidt H, Yuan JP, Green M, Forsburg SL (2010) Fission yeast Hsk1 (Cdc7) kinase is required after replication initiation for induced mutagenesis and proper response to DNA alkylation damage. *Genetics* **185**(1): 39-53
- Dorsett D (2010) Gene regulation: the cohesin ring connects developmental highways. *Curr Biol* **20**(20): R886-888
- Draviam VM, Shapiro I, Aldridge B, Sorger PK (2006) Misorientation and reduced stretching of aligned sister kinetochores promote chromosome missegregation in EB1- or APC-depleted cells. *Embo J* **25**(12): 2814-2827
- Drummond DR, Cross RA (2000) Dynamics of interphase microtubules in *Schizosaccharomyces pombe*. *Current Biology* **10**: 766-775
- du Sart D, Cancilla MR, Earle E, Mao JI, Saffery R, Tainton KM, Kalitsis P, Martyn J, Barry AE, Choo KH (1997) A functional neo-centromere formed through activation of a latent human centromere and consisting of non-alpha-satellite DNA. *Nat Genet* **16**(2): 144-153
- Dumont S, Mitchison TJ (2009) Force and length in the mitotic spindle. *Curr Biol* **19**(17): R749-761

- Dunleavy EM, Roche D, Tagami H, Lacoste N, Ray-Gallet D, Nakamura Y, Daigo Y, Nakatani Y, Almouzni-Pettinotti G (2009) HJURP is a cell-cycle-dependent maintenance and deposition factor of CENP-A at centromeres. *Cell* **137**(3): 485-497
- Durand-Dubief M, Ekwall K (2008) Heterochromatin tells CENP-A where to go. *Bioessays* **30**(6): 526-529
- Ekwall K (2004) The roles of histone modifications and small RNA in centromere function. *Chromosome Res* **12**(6): 535-542
- Ekwall K, Olsson T, Turner BM, Cranston G, Allshire RC (1997) Transient inhibition of histone deacetylation alters the structural and functional imprint at fission yeast centromeres. *Cell* **91**(7): 1021-1032.
- Ekwall K, Ruusala T (1994) Mutations in rik1, clr2, clr3 and clr4 genes asymmetrically derepress the silent mating-type loci in fission yeast. *Genetics* **136**(1): 53-64
- Elledge SJ (1998) Mitotic arrest: Mad2 prevents sleepy from waking up the APC. *Science* **279**(5353): 999-1000
- Fang X, Zhang P (2011) Aneuploidy and tumorigenesis. *Semin Cell Dev Biol*
- Fankhauser C, Simanis V (1994) The cdc7 protein kinase is a dosage dependent regulator of septum formation in fission yeast. *Embo J* **13**(13): 3011-3019
- Fantes P (1979) Epistatic gene interactions in the control of division in fission yeast. *Nature* **279**(5712): 428-430
- Felsenstein J (1973) Maximum-likelihood estimation of evolutionary trees from continuous characters. *Am J Hum Genet* **25**(5): 471-492
- Felsenstein J (1992) Estimating effective population size from samples of sequences: a bootstrap Monte Carlo integration method. *Genet Res* **60**(3): 209-220
- Fire A, Samuels M, Sharp PA (1984) Interactions between RNA polymerase II, factors, and template leading to accurate transcription. *J Biol Chem* **259**(4): 2509-2516
- Fishel B, Amstutz H, Baum M, Carbon J, Clarke L (1988) Structural organization and functional analysis of centromeric DNA in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Cell Biol* **8**(2): 754-763
- Fitzgerald-Hayes M, Clarke L, Carbon J (1982) Nucleotide sequence comparisons and functional analysis of yeast centromere DNAs. *Cell* **29**(1): 235-244
- Fleig U, Sen-Gupta M, Hegemann JH (1996) Fission yeast mal2+ is required for chromosome segregation. *Mol Cell Biol* **16**(11): 6169-6177
- Flory MR, Morphew M, Joseph JD, Means AR, Davis TN (2002) Pcp1p, an Spc110p-related calmodulin target at the centrosome of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Cell Growth Differ* **13**(2): 47-58
- Foijer F (2010) CINster thoughts. *Biochem Soc Trans* **38**(6): 1715-1721
- Foltz DR, Jansen LE, Bailey AO, Yates JR, 3rd, Bassett EA, Wood S, Black BE, Cleveland DW (2009) Centromere-specific assembly of CENP-a nucleosomes is mediated by HJURP. *Cell* **137**(3): 472-484
- Foltz DR, Jansen LE, Black BE, Bailey AO, Yates JR, 3rd, Cleveland DW (2006) The human CENP-A centromeric nucleosome-associated complex. *Nat Cell Biol* **8**(5): 458-469
- Fong CS, Sato M, Toda T (2010) Fission yeast Pcp1 links polo kinase-mediated mitotic entry to gamma-tubulin-dependent spindle formation. *Embo J* **29**(1): 120-130
- Franco A, Meadows JC, Millar JB (2007) The Dam1/DASH complex is required for the retrieval of unclustered kinetochores in fission yeast. *J Cell Sci* **120**(Pt 19): 3345-3351
- Fu C, Ward JJ, Loidice I, Velve-Casquillas G, Nedelec FJ, Tran PT (2009) Phospho-regulated interaction between kinesin-6 Klp9p and microtubule bundler Ase1p promotes spindle elongation. *Dev Cell* **17**(2): 257-267
- Fujimori F, Takahashi K, Uchida C, Uchida T (1999) Mice lacking Pin1 develop normally, but are defective in entering cell cycle from G(0) arrest. *Biochem Biophys Res Commun* **265**(3): 658-663
- Fujita Y, Hayashi T, Kiyomitsu T, Toyoda Y, Kokubu A, Obuse C, Yanagida M (2007) Priming of centromere for CENP-A recruitment by human hMis18alpha, hMis18beta, and M18BP1. *Dev Cell* **12**(1): 17-30
- Funabiki H, Hagan I, Uzawa S, Yanagida M (1993) Cell cycle-dependent specific positioning and clustering of centromeres and telomeres in fission yeast. *J Cell Biol* **121**(5): 961-976
- Furuya K, Niki H (2009) Isolation of heterothallic haploid and auxotrophic mutants of *Schizosaccharomyces japonicus*. *Yeast* **26**(4): 221-233
- Gadde S, Heald R (2004) Mechanisms and molecules of the mitotic spindle. *Curr Biol* **14**(18): R797-805
- Gaitanos TN, Santamaria A, Jeyaprakash AA, Wang B, Conti E, Nigg EA (2009) Stable kinetochore-microtubule interactions depend on the Ska complex and its new component Ska3/C13Orf3. *Embo J* **28**(10): 1442-1452
- Gao Q, Courthooux T, Gachet Y, Tournier S, He X (2010) A non-ring-like form of the Dam1 complex modulates microtubule dynamics in fission yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(30): 13330-13335
- 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.
- Gardiner K, Herault Y, Lott IT, Antonarakis SE, Reeves RH, Dierssen M (2010) Down syndrome: from understanding the neurobiology to therapy. *J Neurosci* **30**(45): 14943-14945
- Gardner MK, Pearson CG, Sprague BL, Zarzar TR, Bloom K, Salmon ED, Odde DJ (2005) Tension-dependent regulation of microtubule dynamics at kinetochores can explain metaphase congression in yeast. *Mol Biol Cell* **16**(8): 3764-3775
- Garner EC, Campbell CS, Weibel DB, Mullins RD (2007) Reconstitution of DNA segregation driven by assembly of a prokaryotic actin homolog. *Science* **315**(5816): 1270-1274

- Garnier J, Gibrat JF, Robson B (1996) GOR method for predicting protein secondary structure from amino acid sequence. *Methods Enzymol* **266**: 540-553
- Gartenberg M (2009) Heterochromatin and the cohesion of sister chromatids. *Chromosome Res* **17**(2): 229-238
- Gatbonton T, Imbesi M, Nelson M, Akey JM, Ruderfer DM, Kruglyak L, Simon JA, Bedalov A (2006) Telomere length as a quantitative trait: genome-wide survey and genetic mapping of telomere length-control genes in yeast. *PLoS Genet* **2**(3): e35
- Gaudon C, Chambon P, Losson R (1999) Role of the essential yeast protein PSU1 in p6anscriptional enhancement by the ligand-dependent activation function AF-2 of nuclear receptors. *Embo J* **18**(8): 2229-2240
- Gerace EL, Halic M, Moazed D (2010) The methyltransferase activity of Ctr4Suv39h triggers RNAi independently of histone H3K9 methylation. *Mol Cell* **39**(3): 360-372
- Gibbons IR, Rowe AJ (1965) Dynein: A Protein with Adenosine Triphosphatase Activity from Cilia. *Science* **149**(3682): 424-426
- Gibson DG, Benders GA, Axelrod KC, Zaveri J, Algire MA, Moodie M, Montague MG, Venter JC, Smith HO, Hutchison CA, 3rd (2008) One-step assembly in yeast of 25 overlapping DNA fragments to form a complete synthetic *Mycoplasma genitalium* genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(51): 20404-20409
- Gietz R.D. WRA (2006) Yeast Transformation by the LiAc/SS Carrier DNA/PEG Method. In *Methods in Molecular Biology 313: Yeast Protocols, 2nd edition* Xiao W (ed), pp p. 107-120. Totowa, New Jersey: Humana Press
- Goldstone S, Reyes C, Gay G, Courtheoux T, Dubarry M, Tournier S, Gachet Y (2010) Tip1/CLIP-170 protein is required for correct chromosome poleward movement in fission yeast. *PLoS One* **5**(5): e10634
- Goshima G, Kiyomitsu T, Yoda K, Yanagida M (2003) Human centromere chromatin protein hMis12, essential for equal segregation, is independent of CENP-A loading pathway. *J Cell Biol* **160**(1): 25-39
- Goshima G, Scholey JM (2010) Control of mitotic spindle length. *Annu Rev Cell Dev Biol* **26**: 21-57
- Gould CM, Diella F, Via A, Puntervoll P, Gemund C, Chabanis-Davidson S, Michael S, Sayadi A, Bryne JC, Chica C, Seiler M, Davey NE, Haslam N, Weatheritt RJ, Budd A, Hughes T, Pas J, Rychlewski L, Trave G, Aasland R, Helmer-Citterich M, Linding R, Gibson TJ ELM: the status of the 2010 eukaryotic linear motif resource. *Nucleic Acids Res* **38**(Database issue): D167-180
- Govindan B, Bowser R, Novick P (1995) The role of Myo2, a yeast class V myosin, in vesicular transport. *J Cell Biol* **128**(6): 1055-1068
- Grallath S, Schwarz JP, Bottcher UM, Bracher A, Hartl FU, Siegers K (2006) L25 functions as a conserved ribosomal docking site shared by nascent chain-associated complex and signal-recognition particle. *EMBO Rep* **7**(1): 78-84
- 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
- Grishchuk EL, McIntosh JR (2006) Microtubule depolymerization can drive poleward chromosome motion in fission yeast. *Embo J* **25**(20): 4888-4896
- Grishchuk EL, Spiridonov IS, McIntosh JR (2007) Mitotic chromosome biorientation in fission yeast is enhanced by dynein and a minus-end-directed, kinesin-like protein. *Mol Biol Cell* **18**(6): 2216-2225
- Grissom PM, Fiedler T, Grishchuk EL, Nicastro D, West RR, McIntosh JR (2009) Kinesin-8 from fission yeast: a heterodimeric, plus-end-directed motor that can couple microtubule depolymerization to cargo movement. *Mol Biol Cell* **20**(3): 963-972
- Guimaraes GJ, Deluca JG (2009) Connecting with Ska, a key complex at the kinetochore-microtubule interface. *Embo J* **28**(10): 1375-1377
- Guindon S, Dufayard JF, Lefort V, Anisimova M, Hordijk W, Gascuel O (2010) New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst Biol* **59**(3): 307-321
- Guindon S, Gascuel O (2003) A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst Biol* **52**(5): 696-704
- Hachet O, Simanis V (2008) Mid1p/anillin and the septation initiation network orchestrate contractile ring assembly for cytokinesis. *Genes Dev* **22**(22): 3205-3216
- Hagan I, Hayles J, Nurse P (1988) Cloning and sequencing of the cyclin-related cdc13+ gene and a cytological study of its role in fission yeast mitosis. *J Cell Sci* **91** (Pt 4): 587-595
- Hagan I, Yanagida M (1990) Novel potential mitotic motor protein encoded by the fission yeast cut7+ gene. *Nature* **347**(6293): 563-566
- Hagan I, Yanagida M (1992) Kinesin-related cut7 protein associates with mitotic and meiotic spindles in fission yeast. *Nature* **356**(6364): 74-76
- Hagan IM (1998) The fission yeast microtubule cytoskeleton. *J Cell Sci* **111**(Pt 12): 1603-1612
- Hagan IM (2008) The spindle pole body plays a key role in controlling mitotic commitment in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochem Soc Trans* **36**(Pt 5): 1097-1101
- 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
- Hagan IM, Jones N, Carr AM (2001) New insights into development from mitosis of a unicellular yeast. *Dev Cell* **1**(2): 158-160
- Hagan IM, Petersen J (2000) The microtubule organizing centers of *Schizosaccharomyces pombe*. *Curr Top Dev Biol* **49**: 133-159
- Hajra S, Ghosh SK, Jayaram M (2006) The centromere-specific histone variant Cse4p (CENP-A) is essential for functional chromatin architecture at the yeast 2-microm circle partitioning locus and promotes equal plasmid segregation. *J Cell Biol* **174**(6): 779-790

- Haldar S, Saini A, Nanda JS, Saini S, Singh J (2011) Role of Swi6/HP1 self-association-mediated recruitment of Clr4/Suv39 in establishment and maintenance of heterochromatin in fission yeast. *J Biol Chem*
- Hall IM, Shankaranarayana GD, Noma K, Ayoub N, Cohen A, Grewal SI (2002) Establishment and maintenance of a heterochromatin domain. *Science* **297**(5590): 2232-2237
- Hanahan D, Weinberg RA (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* **100**(1): 57-70
- Hanisch A, Sillje HH, Nigg EA (2006) Timely anaphase onset requires a novel spindle and kinetochore complex comprising Ska1 and Ska2. *Embo J* **25**(23): 5504-5515
- Harger JW, Dinman JD (2004) Evidence against a direct role for the Upf proteins in frameshifting or nonsense codon readthrough. *RNA* **10**(11): 1721-1729
- Hayashi I, Ikura M (2003) Crystal structure of the amino-terminal microtubule-binding domain of end-binding protein 1 (EB1). *J Biol Chem* **278**(38): 36430-36434
- Hayashi T, Fujita Y, Iwasaki O, Adachi Y, Takahashi K, Yanagida M (2004) Mis16 and Mis18 are required for CENP-A loading and histone deacetylation at centromeres. *Cell* **118**(6): 715-729
- Hayette S, Tigaud I, Vanier A, Martel S, Corbo L, Charrin C, Beillard E, Deleage G, Magaud JP, Rimokh R (2000) AF15q14, a novel partner gene fused to the MLL gene in an acute myeloid leukaemia with a t(11;15)(q23;q14). *Oncogene* **19**(38): 4446-4450
- Hayles J, Nurse P (2001) A journey into space. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**(9): 647-656
- He X, Jones MH, Winey M, Sazer S (1998) Mph1, a member of the Mps1-like family of dual specificity protein kinases, is required for the spindle checkpoint in *S. pombe*. *J Cell Sci* **111**(Pt 12): 1635-1647
- He X, Patterson TE, Sazer S (1997) The *Schizosaccharomyces pombe* spindle checkpoint protein mad2p blocks anaphase and genetically interacts with the anaphase-promoting complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(15): 7965-7970
- Heald R, Walczak CE (2009) Mitotic Spindle Assembly Mechanisms. In *The Kinetochore*, De Wulf P, Earnshaw WC (eds), pp 1-38. Springer New York
- Hellwig D, Hoischen C, Ulbricht T, Diekmann S (2009) Acceptor-photobleaching FRET analysis of core kinetochore and NAC proteins in living human cells. *Eur Biophys J* **38**(6): 781-791
- Hemmerich P, Weidtkamp-Peters S, Hoischen C, Schmiedeberg L, Eriandri I, Diekmann S (2008) Dynamics of inner kinetochore assembly and maintenance in living cells. *J Cell Biol* **180**(6): 1101-1114
- Henikoff S (2000) Heterochromatin function in complex genomes. *Biochim Biophys Acta* **1470**(1): O1-8
- Hess JL (2004) MLL: a histone methyltransferase disrupted in leukemia. *Trends Mol Med* **10**(10): 500-507
- Hetzer MW (2010) The nuclear envelope. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**(3): a000539
- Higashio H, Sato K, Nakano A (2008) Smy2p participates in COPII vesicle formation through the interaction with Sec23p/Sec24p subcomplex. *Traffic* **9**(1): 79-93
- Higgins DG, Sharp PM (1988) CLUSTAL: a package for performing multiple sequence alignment on a microcomputer. *Gene* **73**(1): 237-244
- Higgins DG, Thompson JD, Gibson TJ (1996) Using CLUSTAL for multiple sequence alignments. *Methods Enzymol* **266**: 383-402
- Higuchi T, Uhlmann F (2005) Stabilization of microtubule dynamics at anaphase onset promotes chromosome segregation. *Nature* **433**(7022): 171-176
- Hiraoka Y, Toda T, Yanagida M (1984) The NDA3 gene of fission yeast encodes beta-tubulin: a cold-sensitive nda3 mutation reversibly blocks spindle formation and chromosome movement in mitosis. *Cell* **39**(2 Pt 1): 349-358
- Hoffman CS, Winston F (1987) A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene* **57**(2-3): 267-272
- Holland S, Ioannou D, Haines S, Brown WR (2005) Comparison of Dam tagging and chromatin immunoprecipitation as tools for the identification of the binding sites for *S. pombe* CENP-C. *Chromosome Res* **13**(1): 73-83
- Holt JE, Jones KT (2009) Control of homologous chromosome division in the mammalian oocyte. *Mol Hum Reprod* **15**(3): 139-147
- Hood JK, Silver PA (1999) In or out? Regulating nuclear transport. *Curr Opin Cell Biol* **11**(2): 241-247
- Hori T, Okada M, Maenaka K, Fukagawa T (2008) CENP-O class proteins form a stable complex and are required for proper kinetochore function. *Mol Biol Cell* **19**(3): 843-854
- Horio T, Uzawa S, Jung MK, Oakley BR, Tanaka K, Yanagida M (1991) The fission yeast gamma-tubulin is essential for mitosis and is localized at microtubule organizing centers. *J Cell Sci* **99** (Pt 4): 693-700
- Howard J, Hyman AA (2003) Dynamics and mechanics of the microtubule plus end. *Nature* **422**(6933): 753-758
- Hsu KS, Toda T (2011) Ndc80 Internal Loop Interacts with Dis1/TOG to Ensure Proper Kinetochore-Spindle Attachment in Fission Yeast. *Curr Biol*
- Huang CC, Hajra S, Ghosh SK, Jayaram M (2011) Cse4 (CenH3) association with the *Saccharomyces cerevisiae* plasmid partitioning locus in its native and chromosomally integrated states: implications in centromere evolution. *Mol Cell Biol* **31**(5): 1030-1040
- Huang HK, Bailis JM, Levenson JD, Gomez EB, Forsburg SL, Hunter T (2005) Suppressors of Bir1p (Survivin) identify roles for the chromosomal passenger protein Pic1p (INCENP) and the replication initiation factor Psf2p in chromosome segregation. *Mol Cell Biol* **25**(20): 9000-9015
- Huang HK, Forsburg SL, John UP, O'Connell MJ, Hunter T (2001) Isolation and characterization of the Pin1/Ess1p homologue in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Cell Sci* **114**(Pt 20): 3779-3788

- Huang Y, Maraia RJ (2001) Comparison of the RNA polymerase III transcription machinery in *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae* and human. *Nucleic Acids Res* **29**(13): 2675-2690
- Hunter AW, Wordeman L (2000) How motor proteins influence microtubule polymerization dynamics. *J Cell Sci* **113 Pt 24**: 4379-4389
- Hyams JS, Borisy GG (1978) Nucleation of microtubules in vitro by isolated spindle pole bodies of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* **78**(2): 401-414
- Ikui AE, Furuya K, Yanagida M, Matsumoto T (2002) Control of localization of a spindle checkpoint protein, Mad2, in fission yeast. *J Cell Sci* **115**(Pt 8): 1603-1610
- Ingrell CR, Miller ML, Jensen ON, Blom N (2007) NetPhosYeast: prediction of protein phosphorylation sites in yeast. *Bioinformatics* **23**(7): 895-897
- Iourov IY, Vorsanova SG, Yurov YB (2011) Genomic landscape of the Alzheimer's disease brain: chromosome instability--aneuploidy, but not tetraploidy--mediates neurodegeneration. *Neurodegener Dis* **8**(1-2): 35-37; discussion 38-40
- Ishii K, Ogiyama Y, Chikashige Y, Soejima S, Masuda F, Kakuma T, Hiraoka Y, Takahashi K (2008) Heterochromatin integrity affects chromosome reorganization after centromere dysfunction. *Science* **321**(5892): 1088-1091
- Izuta H, Ikeno M, Suzuki N, Tomonaga T, Nozaki N, Obuse C, Kisu Y, Goshima N, Nomura F, Nomura N, Yoda K (2006) Comprehensive analysis of the ICEN (Interphase Centromere Complex) components enriched in the CENP-A chromatin of human cells. *Genes Cells* **11**(6): 673-684
- Jakopec V. (2006) Charakterisierung des Mitose-relevanten *fta2⁺* Gens in *Schizosaccharomyces pombe*
- Janke C, Ortiz J, Lechner J, Shevchenko A, Magiera MM, Schramm C, Schiebel E (2001) The budding yeast proteins Spc24p and Spc25p interact with Ndc80p and Nuf2p at the kinetochore and are important for kinetochore clustering and checkpoint control. *Embo J* **20**(4): 777-791
- Jeong JW, Rhee DK, Cho SY, Hae KL, Kim DU, Won M, Kim HB (2002) Cloning and characterization of the kinesin-related protein, Krp1p, in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Cells* **13**(3): 389-398
- Jin QW, Pidoux AL, Decker C, Allshire RC, Fleig U (2002) The mal2p protein is an essential component of the fission yeast centromere. *Mol Cell Biol* **22**(20): 7168-7183
- Joglekar AP, Bloom KS, Salmon ED (2010) Mechanisms of force generation by end-on kinetochore-microtubule attachments. *Curr Opin Cell Biol* **22**(1): 57-67
- Joglekar AP, Bouck DC, Molk JN, Bloom KS, Salmon ED (2006) Molecular architecture of a kinetochore-microtubule attachment site. *Nat Cell Biol* **8**(6): 581-585
- Johnston GC, Prendergast JA, Singer RA (1991) The *Saccharomyces cerevisiae* MYO2 gene encodes an essential myosin for vectorial transport of vesicles. *J Cell Biol* **113**(3): 539-551
- Kagansky A, Folco HD, Almeida R, Pidoux AL, Boukaba A, Simmer F, Urano T, Hamilton GL, Allshire RC (2009) Synthetic heterochromatin bypasses RNAi and centromeric repeats to establish functional centromeres. *Science* **324**(5935): 1716-1719
- Kaiser C, Michaelis S, Mitchell A (1994) *Methods in Yeast Genetics*, 1994 edn. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Kalderon D, Roberts BL, Richardson WD, Smith AE (1984) A short amino acid sequence able to specify nuclear location. *Cell* **39**(3 Pt 2): 499-509
- Kamakaka RT, Biggins S (2005) Histone variants: deviants? *Genes Dev* **19**(3): 295-310
- Karess R (2005) Rod-Zw10-Zwilch: a key player in the spindle checkpoint. *Trends Cell Biol* **15**(7): 386-392
- Karig IE (2004) Funktionelle Analyse mitotischer Komponenten in der Spaltheefe *Schizosaccharomyces pombe*. *Dissertation HHU Düsseldorf*
- Karlsson-Rosenthal C, Millar JB (2006) Cdc25: mechanisms of checkpoint inhibition and recovery. *Trends Cell Biol* **16**(6): 285-292
- Karpen GH, Allshire RC (1997) The case for epigenetic effects on centromere identity and function. *Trends Genet* **13**(12): 489-496.
- 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
- Kaufner NF, Potashkin J (2000) Analysis of the splicing machinery in fission yeast: a comparison with budding yeast and mammals. *Nucleic Acids Res* **28**(16): 3003-3010
- Kerres A, Jakopec V, Beuter C, Karig I, Pohlmann J, Pidoux A, Allshire R, Fleig U (2006) Fta2, an essential fission yeast kinetochore component, interacts closely with the conserved mal2 protein. *Mol Biol Cell* **17**(10): 4167-4178
- Kerres A, Jakopec V, Fleig U (2007) The conserved Spc7 protein is required for spindle integrity and links kinetochore complexes in fission yeast. *Mol Biol Cell* **18**(7): 2441-2454
- Kerres A, Vietmeier-Decker C, Ortiz J, Karig I, Beuter C, Hegemann J, Lechner J, Fleig U (2004) The Fission Yeast Kinetochore Component Spc7 Associates with the EB1 Family Member Mal3 and Is Required for Kinetochore-Spindle Association. *Mol Biol Cell* **15**(12): 5255-5267
- Ketel C, Wang HS, McClellan M, Bouchonville K, Selmecki A, Lahav T, Gerami-Nejad M, Berman J (2009) Neocentromeres form efficiently at multiple possible loci in *Candida albicans*. *PLoS Genet* **5**(3): e1000400
- 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* **28**(6): 617-623
- Kim SH, Lin DP, Matsumoto S, Kitazono A, Matsumoto T (1998) Fission yeast Slp1: an effector of the Mad2-dependent spindle checkpoint. *Science* **279**(5353): 1045-1047
- Kitagawa K, Hieter P (2001) Evolutionary conservation between budding yeast and human kinetochores. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**(9): 678-687.

- Kiyomitsu T, Iwasaki O, Obuse C, Yanagida M (2010) Inner centromere formation requires hMis14, a trident kinetochore protein that specifically recruits HP1 to human chromosomes. *J Cell Biol* **188**(6): 791-807
- Kiyomitsu T, Murakami H, Yanagida M (2011) Protein interaction domain mapping of human kinetochore protein Blinkin reveals a consensus motif for binding of spindle assembly checkpoint proteins Bub1 and BubR1. *Mol Cell Biol*
- Kiyomitsu T, Obuse C, Yanagida M (2007) Human Blinkin/AF15q14 is required for chromosome alignment and the mitotic checkpoint through direct interaction with Bub1 and BubR1. *Dev Cell* **13**(5): 663-676
- Kline-Smith SL, Sandall S, Desai A (2005) Kinetochore-spindle microtubule interactions during mitosis. *Curr Opin Cell Biol* **17**(1): 35-46
- Kline SL, Cheeseman IM, Hori T, Fukagawa T, Desai A (2006) The human Mis12 complex is required for kinetochore assembly and proper chromosome segregation. *J Cell Biol* **173**(1): 9-17
- Kniola B, O'Toole E, McIntosh JR, Mellone B, Allshire R, Mengarelli S, Hultenby K, Ekwall K (2001) The domain structure of centromeres is conserved from fission yeast to humans. *Mol Biol Cell* **12**(9): 2767-2775.
- Kobayashi Y, Saitoh S, Ogiyama Y, Soejima S, Takahashi K (2007) The fission yeast DASH complex is essential for satisfying the spindle assembly checkpoint induced by defects in the inner-kinetochore proteins. *Genes Cells* **12**(3): 311-328
- Kofler MM, Freund C (2006) The GYF domain. *FEBS J* **273**(2): 245-256
- Kudo N, Matsumori N, Taoka H, Fujiwara D, Schreiner EP, Wolff B, Yoshida M, Horinouchi S (1999) Leptomycin B inactivates CRM1/exportin 1 by covalent modification at a cysteine residue in the central conserved region. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(16): 9112-9117
- Kuramae EE, Robert V, Snel B, Weiss M, Boekhout T (2006) Phylogenomics reveal a robust fungal tree of life. *FEMS Yeast Res* **6**(8): 1213-1220
- Kyrpides NC, Woese CR (1998) Universally conserved translation initiation factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(1): 224-228
- la Cour T, Kierner L, Molgaard A, Gupta R, Skriver K, Brunak S (2004) Analysis and prediction of leucine-rich nuclear export signals. *Protein Eng Des Sel* **17**(6): 527-536
- Lamb JC, Birchler JA (2003) The role of DNA sequence in centromere formation. *Genome Biol* **4**(5): 214
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* **23**(21): 2947-2948
- Lawrence CJ, Dawe RK, Christie KR, Cleveland DW, Dawson SC, Endow SA, Goldstein LS, Goodson HV, Hirokawa N, Howard J, Malmberg RL, McIntosh JR, Miki H, Mitchison TJ, Okada Y, Reddy AS, Saxton WM, Schliwa M, Scholey JM, Vale RD, Walczak CE, Wordeman L (2004) A standardized kinesin nomenclature. *J Cell Biol* **167**(1): 19-22
- Lee TH, Tun-Kyi A, Shi R, Lim J, Soohoo C, Finn G, Balastik M, Pastorino L, Wulf G, Zhou XZ, Lu KP (2009) Essential role of Pin1 in the regulation of TRF1 stability and telomere maintenance. *Nat Cell Biol* **11**(1): 97-105
- Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B (1997) Genetic instability in colorectal cancers. *Nature* **386**(6625): 623-627
- Lens SM, Vader G, Medema RH (2006) The case for Survivin as mitotic regulator. *Curr Opin Cell Biol* **18**(6): 616-622
- Leversen JD, Huang HK, Forsburg SL, Hunter T (2002) The Schizosaccharomyces pombe aurora-related kinase Ark1 interacts with the inner centromere protein Pic1 and mediates chromosome segregation and cytokinesis. *Mol Biol Cell* **13**(4): 1132-1143
- Liang J, Fantes P (2007) The Schizosaccharomyces pombe Cdc7 protein kinase required for septum formation is a client protein of Cdc37. *Eukaryot Cell* **6**(7): 1089-1096
- Lillie SH, Brown SS (1994) Immunofluorescence localization of the unconventional myosin, Myo2p, and the putative kinesin-related protein, Smy1p, to the same regions of polarized growth in Saccharomyces cerevisiae. *J Cell Biol* **125**(4): 825-842
- Lipman DJ, Pearson WR (1985) Rapid and sensitive protein similarity searches. *Science* **227**(4693): 1435-1441
- Liu D, Vleugel M, Backer CB, Hori T, Fukagawa T, Cheeseman IM, Lampson MA (2010) Regulated targeting of protein phosphatase 1 to the outer kinetochore by KNL1 opposes Aurora B kinase. *J Cell Biol* **188**(6): 809-820
- Liu ST, Rattner JB, Jablonski SA, Yen TJ (2006) Mapping the assembly pathways that specify formation of the trilaminar kinetochore plates in human cells. *J Cell Biol* **175**(1): 41-53
- Liu X, McLeod I, Anderson S, Yates JR, 3rd, He X (2005) Molecular analysis of kinetochore architecture in fission yeast. *Embo J* **24**(16): 2919-2930
- Loidice I, Staub J, Setty TG, Nguyen NP, Paoletti A, Tran PT (2005) Ase1p organizes antiparallel microtubule arrays during interphase and mitosis in fission yeast. *Mol Biol Cell* **16**(4): 1756-1768
- Lorca T, Labbe JC, Devault A, Fesquet D, Capony JP, Cavadore JC, Le Bouffant F, Doree M (1992) Dephosphorylation of cdc2 on threonine 161 is required for cdc2 kinase inactivation and normal anaphase. *Embo J* **11**(7): 2381-2390
- Lu KP, Liou YC, Zhou XZ (2002) Pinning down proline-directed phosphorylation signaling. *Trends Cell Biol* **12**(4): 164-172
- Macara IG (2001) Transport into and out of the nucleus. *Microbiol Mol Biol Rev* **65**(4): 570-594, table of contents
- MacRae TH, Langdon CM (1989) Tubulin synthesis, structure, and function: what are the relationships? *Biochem Cell Biol* **67**(11-12): 770-790
- Maddox PS, Oegema K, Desai A, Cheeseman IM (2004) "Holo"er than thou: chromosome segregation and kinetochore function in C. elegans. *Chromosome Res* **12**(6): 641-653
- Maggert KA, Karpen GH (2001) The activation of a neocentromere in Drosophila requires proximity to an endogenous centromere. *Genetics* **158**(4): 1615-1628
- Maiato H, DeLuca J, Salmon ED, Earnshaw WC (2004) The dynamic kinetochore-microtubule interface. *J Cell Sci* **117**(Pt 23): 5461-5477

- Maleszka R, Hanes SD, Hackett RL, de Couet HG, Miklos GL (1996) The *Drosophila melanogaster* dodo (dod) gene, conserved in humans, is functionally interchangeable with the ESS1 cell division gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(1): 447-451
- Malik HS (2006) A hitchhiker's guide to survival finally makes CENs. *J Cell Biol* **174**(6): 747-749
- Malik HS, Henikoff S (2009) Major evolutionary transitions in centromere complexity. *Cell* **138**(6): 1067-1082
- Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J (1989) *"Molecular cloning. A laboratory manual."*, Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Marinus MG (1973) Location of DNA methylation genes on the *Escherichia coli* K-12 genetic map. *Mol Gen Genet* **127**(1): 47-55
- Marschall LG, Clarke L (1995) A novel cis-acting centromeric DNA element affects *S. pombe* centromeric chromatin structure at a distance. *J Cell Biol* **128**(4): 445-454
- Marshall OJ, Chueh AC, Wong LH, Choo KH (2008) Neocentromeres: new insights into centromere structure, disease development, and karyotype evolution. *Am J Hum Genet* **82**(2): 261-282
- Martin SG (2009) Geometric control of the cell cycle. *Cell Cycle* **8**(22): 3643-3647
- Marx A, Muller J, Mandelkow EM, Hoenger A, Mandelkow E (2006) Interaction of kinesin motors, microtubules, and MAPs. *J Muscle Res Cell Motil* **27**(2): 125-137
- Maskell DP, Hu XW, Singleton MR (2010) Molecular architecture and assembly of the yeast kinetochore MIND complex. *J Cell Biol* **190**(5): 823-834
- Masumoto H, Nakano M, Ohzeki J (2004) The role of CENP-B and alpha-satellite DNA: de novo assembly and epigenetic maintenance of human centromeres. *Chromosome Res* **12**(6): 543-556
- Matsuyama A, Arai R, Yashiroda Y, Shirai A, Kamata A, Sekido S, Kobayashi Y, Hashimoto A, Hamamoto M, Hiraoka Y, Horinouchi S, Yoshida M (2006) ORFeome cloning and global analysis of protein localization in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Nat Biotechnol* **24**(7): 841-847
- Maundrell K (1990) nmt1 of fission yeast. A highly transcribed gene completely repressed by thiamine. *J Biol Chem* **265**(19): 10857-10864
- Maundrell K, Hutchison A, Shall S (1988) Sequence analysis of ARS elements in fission yeast. *Embo J* **7**(7): 2203-2209
- Maure JF, Komoto S, Oku Y, Mino A, Pasqualato S, Natsume K, Clayton L, Musacchio A, Tanaka TU (2011) The Ndc80 Loop Region Facilitates Formation of Kinetochore Attachment to the Dynamic Microtubule Plus End. *Curr Biol*
- McAinsh AD, Meraldi P, Draviam VM, Toso A, Sorger PK (2006) The human kinetochore proteins Nnf1R and Mcm21R are required for accurate chromosome segregation. *Embo J* **25**(17): 4033-4049
- McAinsh AD, Tytell JD, Sorger PK (2003) Structure, function, and regulation of budding yeast kinetochores. *Annu Rev Cell Dev Biol* **19**: 519-539
- McClelland SE, Borusu S, Amaro AC, Winter JR, Belwal M, McAinsh AD, Meraldi P (2007) The CENP-A NAC/CAD kinetochore complex controls chromosome congression and spindle bipolarity. *Embo J* **26**(24): 5033-5047
- McCully EK, Robinow CF (1971) Mitosis in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*: a comparative study with light and electron microscopy. *J Cell Sci* **9**(2): 475-507
- McIntosh JR (2005) Rings around kinetochore microtubules in yeast. *Nat Struct Mol Biol* **12**(3): 210-212
- McIntosh JR, Grishchuk EL, Morphew MK, Efremov AK, Zhudenko K, Volkov VA, Cheeseman IM, Desai A, Mastronarde DN, Ataullakhanov FI (2008) Fibrils connect microtubule tips with kinetochores: a mechanism to couple tubulin dynamics to chromosome motion. *Cell* **135**(2): 322-333
- Mehta S, Gould KL (2006) Identification of functional domains within the septation initiation network kinase, Cdc7. *J Biol Chem* **281**(15): 9935-9941
- Meluh PB, Yang P, Glowczewski L, Koshland D, Smith MM (1998) Cse4p is a component of the core centromere of *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell* **94**(5): 607-613.
- Meraldi P, McAinsh AD, Rheinbay E, Sorger PK (2006) Phylogenetic and structural analysis of centromeric DNA and kinetochore proteins. *Genome Biol* **7**(3): R23
- Migliore L, Coppede F, Fenech M, Thomas P (2011) Association of micronucleus frequency with neurodegenerative diseases. *Mutagenesis* **26**(1): 85-92
- Millband DN, Hardwick KG (2002) Fission yeast Mad3p is required for Mad2p to inhibit the anaphase-promoting complex and localizes to kinetochores in a Bub1p-, Bub3p-, and Mph1p-dependent manner. *Mol Cell Biol* **22**(8): 2728-2742
- Miranda JJ, De Wulf P, Sorger PK, Harrison SC (2005) The yeast DASH complex forms closed rings on microtubules. *Nat Struct Mol Biol* **12**(2): 138-143
- Misteli T (1996) The mammalian Golgi apparatus during M-phase. *Prog Cell Cycle Res* **2**: 267-277
- Mitchell SF, Lorsch JR (2008) Should I stay or should I go? Eukaryotic translation initiation factors 1 and 1A control start codon recognition. *J Biol Chem* **283**(41): 27345-27349
- Mitchison JM (1970) Physiological and cytological methods for *Schizosaccharomyces pombe*. *Methods Cell Physiol* **4**(4): 131
- Mitchison T, Kirschner M (1984) Microtubule assembly nucleated by isolated centrosomes. *Nature* **312**(5991): 232-237
- Mitchison TJ (1993) Localization of an exchangeable GTP binding site at the plus end of microtubules. *Science* **261**(5124): 1044-1047
- Mollinari C, Kleman JP, Jiang W, Schoehn G, Hunter T, Margolis RL (2002) PRC1 is a microtubule binding and bundling protein essential to maintain the mitotic spindle midzone. *J Cell Biol* **157**(7): 1175-1186

- Moreno MB, Duran A, Ribas JC (2000) A family of multifunctional thiamine-repressible expression vectors for fission yeast. *Yeast* **16**(9): 861-872
- Moreno S, Klar A, Nurse P (1991) Molecular genetic analysis of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Methods Enzymol* **194**: 795-823
- Moroianu J (1998) Distinct nuclear import and export pathways mediated by members of the karyopherin beta family. *J Cell Biochem* **70**(2): 231-239
- Moroianu J (1999) Nuclear import and export pathways. *J Cell Biochem Suppl* **32-33**: 76-83
- Morris CA, Moazed D (2007) Centromere assembly and propagation. *Cell* **128**(4): 647-650
- Morrison EE (2009) The APC-EB1 interaction. *Adv Exp Med Biol* **656**: 41-50
- Moser BA, Russell P (2000) Cell cycle regulation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Curr Opin Microbiol* **3**(6): 631-636
- Motamedi MR, Verdel A, Colmenares SU, Gerber SA, Gygi SP, Moazed D (2004) Two RNAi complexes, RITS and RDRC, physically interact and localize to noncoding centromeric RNAs. *Cell* **119**(6): 789-802
- Muhlemann O, Eberle AB, Stalder L, Zamudio Orozco R (2008) Recognition and elimination of nonsense mRNA. *Biochim Biophys Acta* **1779**(9): 538-549
- Mulvihill DP, Petersen J, Ohkura H, Glover DM, Hagan IM (1999) Plo1 kinase recruitment to the spindle pole body and its role in cell division in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Biol Cell* **10**(8): 2771-2785
- Musacchio A, Hardwick KG (2002) The spindle checkpoint: structural insights into dynamic signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**(10): 731-741
- Mythreye K, Bloom KS (2003) Differential kinetochore protein requirements for establishment versus propagation of centromere activity in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* **160**(6): 833-843
- Nabeshima K, Kurooka H, Takeuchi M, Kinoshita K, Nakaseko Y, Yanagida M (1995) p93dis1, which is required for sister chromatid separation, is a novel microtubule and spindle pole body-associating protein phosphorylated at the Cdc2 target sites. *Genes Dev* **9**(13): 1572-1585
- Nabeshima K, Nakagawa T, Straight AF, Murray A, Chikashige Y, Yamashita YM, Hiraoka Y, Yanagida M (1998) Dynamics of centromeres during metaphase-anaphase transition in fission yeast: Dis1 is implicated in force balance in metaphase bipolar spindle. *Mol Biol Cell* **9**(11): 3211-3225.
- Nabetani A, Koujin T, Tsutsumi C, Haraguchi T, Hiraoka Y (2001) A conserved protein, Nuf2, is implicated in connecting the centromere to the spindle during chromosome segregation: a link between the kinetochore function and the spindle checkpoint. *Chromosoma* **110**(5): 322-334
- Nakamura M, Zhou XZ, Lu KP (2001) Critical role for the EB1 and APC interaction in the regulation of microtubule polymerization. *Curr Biol* **11**(13): 1062-1067.
- Nakaseko Y, Goshima G, Morishita J, Yanagida M (2001) M phase-specific kinetochore proteins in fission yeast. Microtubule- associating Dis1 and Mtc1 display rapid separation and segregation during anaphase. *Curr Biol* **11**(8): 537-549.
- Nasmyth K, Haering CH (2009) Cohesin: its roles and mechanisms. *Annu Rev Genet* **43**: 525-558
- Nekrasov VS, Smith MA, Peak-Chew S, Kilmartin JV (2003) Interactions between centromere complexes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **14**(12): 4931-4946
- Neron B, Menager H, Maufrais C, Joly N, Maupetit J, Letort S, Carrere S, Tuffery P, Letondal C (2009) Mobyle: a new full web bioinformatics framework. *Bioinformatics* **25**(22): 3005-3011
- Newlon CS, Theis JF (1993) The structure and function of yeast ARS elements. *Curr Opin Genet Dev* **3**(5): 752-758
- Noma K, Sugiyama T, Cam H, Verdel A, Zofall M, Jia S, Moazed D, Grewal SI (2004) RITS acts in cis to promote RNA interference-mediated transcriptional and post-transcriptional silencing. *Nat Genet* **36**(11): 1174-1180
- Novak B, Csikasz-Nagy A, Gyorffy B, Chen K, Tyson JJ (1998) Mathematical model of the fission yeast cell cycle with checkpoint controls at the G1/S, G2/M and metaphase/anaphase transitions. *Biophys Chem* **72**(1-2): 185-200
- Nurse P (1990) Universal control mechanism regulating onset of M-phase. *Nature* **344**(6266): 503-508
- Obuse C, Iwasaki O, Kiyomitsu T, Goshima G, Toyoda Y, Yanagida M (2004) A conserved Mis12 centromere complex is linked to heterochromatic HP1 and outer kinetochore protein Zwint-1. *Nat Cell Biol* **6**(11): 1135-1141
- Ohkura H, Adachi Y, Kinoshita N, Niwa O, Toda T, Yanagida M (1988) Cold-sensitive and caffeine-supersensitive mutants of the *Schizosaccharomyces pombe* *dis* genes implicated in sister chromatid separation during mitosis. *Embo J* **7**(5): 1465-1473
- Okada M, Cheeseman IM, Hori T, Okawa K, McLeod IX, Yates JR, Desai A, Fukagawa T (2006) The CENP-H-I complex is required for the efficient incorporation of newly synthesized CENP-A into centromeres. *Nat Cell Biol*
- Okada T, Ohzeki J, Nakano M, Yoda K, Brinkley WR, Larionov V, Masumoto H (2007) CENP-B controls centromere formation depending on the chromatin context. *Cell* **131**(7): 1287-1300
- 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
- Oliferenko S, Balasubramanian MK (2001) Cell cycle: the Flp side of Cdc14. *Curr Biol* **11**(21): R872-874
- Oliveira RA, Nasmyth K (2010) Getting through anaphase: splitting the sisters and beyond. *Biochem Soc Trans* **38**(6): 1639-1644
- Omi K, Sonoda H, Nagata K, Sugita K (1999) Cloning and characterization of *psu1(+)*, a new essential fission yeast gene involved in cell wall synthesis. *Biochem Biophys Res Commun* **262**(2): 368-374
- Orthaus S, Biskup C, Hoffmann B, Hoischen C, Ohndorf S, Benndorf K, Diekmann S (2008) Assembly of the inner kinetochore proteins CENP-A and CENP-B in living human cells. *Chembiochem* **9**(1): 77-92

- Orthaus S, Ohndorf S, Diekmann S (2006) RNAi knockdown of human kinetochore protein CENP-H. *Biochem Biophys Res Commun* **348**(1): 36-46
- Pagliuca C, Draviam VM, Marco E, Sorger PK, De Wulf P (2009) Roles for the conserved spc105p/kre28p complex in kinetochore-microtubule binding and the spindle assembly checkpoint. *PLoS One* **4**(10): e7640
- Palmer DK, O'Day K, Wener MH, Andrews BS, Margolis RL (1987) A 17-kD centromere protein (CENP-A) copurifies with nucleosome core particles and with histones. *J Cell Biol* **104**(4): 805-815
- Partridge JF, Borgstrom B, Allshire RC (2000) Distinct protein interaction domains and protein spreading in a complex centromere. *Genes and Development* **14**: 783-791
- Pasion SG, Forsburg SL (1999) Nuclear localization of *Schizosaccharomyces pombe* Mcm2/Cdc19p requires MCM complex assembly. *Mol Biol Cell* **10**(12): 4043-4057
- Patel PK, Kommajosyula N, Rosebrock A, Bensimon A, Leatherwood J, Bechhoefer J, Rhind N (2008) The Hsk1(Cdc7) replication kinase regulates origin efficiency. *Mol Biol Cell* **19**(12): 5550-5558
- Patterson D (2009) Molecular genetic analysis of Down syndrome. *Hum Genet* **126**(1): 195-214
- Pearson WR, Lipman DJ (1988) Improved tools for biological sequence comparison. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**(8): 2444-2448
- Pellegrini F, Budman DR (2005) Review: tubulin function, action of antitubulin drugs, and new drug development. *Cancer Invest* **23**(3): 264-273
- Perry JA, Kornbluth S (2007) Cdc25 and Wee1: analogous opposites? *Cell Div* **2**: 12
- Pestova TV, Kolupaeva VG, Lomakin IB, Pilipenko EV, Shatsky IN, Agol VI, Hellen CU (2001) Molecular mechanisms of translation initiation in eukaryotes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(13): 7029-7036
- Petersen J, Paris J, Willer M, Philippe M, Hagan IM (2001) The *S. pombe* aurora-related kinase Ark1 associates with mitotic structures in a stage dependent manner and is required for chromosome segregation. *J Cell Sci* **114**(Pt 24): 4371-4384
- Peterson JB, Ris H (1976) Electron-microscopic study of the spindle and chromosome movement in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Sci* **22**(2): 219-242
- Petrasek J, Schwarzerova K (2009) Actin and microtubule cytoskeleton interactions. *Curr Opin Plant Biol* **12**(6): 728-734
- Petrovic A, Pasqualato S, Dube P, Krenn V, Santaguida S, Cittaro D, Monzani S, Massimiliano L, Keller J, Tarricone A, Maiolica A, Stark H, Musacchio A (2010) The MIS12 complex is a protein interaction hub for outer kinetochore assembly. *J Cell Biol* **190**(5): 835-852
- Pfarr CM, Coue M, Grissom PM, Hays TS, Porter ME, McIntosh JR (1990) Cytoplasmic dynein is localized to kinetochores during mitosis. *Nature* **345**(6272): 263-265
- Pidoux AL, Allshire RC (2000) Centromeres: getting a grip of chromosomes. *Curr Opin Cell Biol* **12**(3): 308-319
- Pidoux AL, Allshire RC (2004) Kinetochore and heterochromatin domains of the fission yeast centromere. *Chromosome Res* **12**(6): 521-534
- Pidoux AL, Choi ES, Abbott JK, Liu X, Kagansky A, Castillo AG, Hamilton GL, Richardson W, Rappsilber J, He X, Allshire RC (2009) Fission yeast Scm3: A CENP-A receptor required for integrity of subkinetochore chromatin. *Mol Cell* **33**(3): 299-311
- Pidoux AL, LeDizet M, Cande WZ (1996) Fission yeast pkl1 is a kinesin-related protein involved in mitotic spindle function. *Molecular Biology of the Cell* **7**: 1639-1655
- Pidoux AL, Richardson W, Allshire RC (2003) Sim4: a novel fission yeast kinetochore protein required for centromeric silencing and chromosome segregation. *J Cell Biol* **161**(2): 295-307
- Pines J (1996) Cell cycle: reaching for a role for the Cks proteins. *Curr Biol* **6**(11): 1399-1402
- Pluta AF, Mackay AM, Ainsztein AM, Goldberg IG, Earnshaw WC (1995) The centromere: hub of chromosomal activities. *Science* **270**(5242): 1591-1594
- Polizzi C, Clarke L (1991) The chromatin structure of centromeres from fission yeast: differentiation of the central core that correlates with function. *J Cell Biol* **112**(2): 191-201.
- Przewlaka MR, Glover DM (2009) The kinetochore and the centromere: a working long distance relationship. *Annu Rev Genet* **43**: 439-465
- Przewlaka MR, Venkei Z, Bolanos-Garcia VM, Debski J, Dadlez M, Glover DM (2011) CENP-C Is a Structural Platform for Kinetochore Assembly. *Curr Biol* **21**(5): 399-405
- Przewlaka MR, Zhang W, Costa P, Archambault V, D'Avino PP, Lilley KS, Laue ED, McAnish AD, Glover DM (2007) Molecular analysis of core kinetochore composition and assembly in *Drosophila melanogaster*. *PLoS One* **2**(5): e478
- Punternvoll P, Lindling R, Gemund C, Chabanis-Davidson S, Mattingsdal M, Cameron S, Martin DM, Ausiello G, Brannetti B, Costantini A, Ferre F, Maselli V, Via A, Cesareni G, Diella F, Superti-Furga G, Wyrwicz L, Ramu C, McGuigan C, Gudavalli R, Letunic I, Bork P, Rychlewski L, Kuster B, Helmer-Citterich M, Hunter WN, Aasland R, Gibson TJ (2003) ELM server: A new resource for investigating short functional sites in modular eukaryotic proteins. *Nucleic Acids Res* **31**(13): 3625-3630
- Raaijmakers JA, Tanenbaum ME, Maia AF, Medema RH (2009) RAMA1 is a novel kinetochore protein involved in kinetochore-microtubule attachment. *J Cell Sci* **122**(Pt 14): 2436-2445
- Rajagopalan H, Lengauer C (2004) CIN-ful cancers. *Cancer Chemother Pharmacol* **54** Suppl 1: S65-68
- Rajagopalan S, Balasubramanian MK (2002) *Schizosaccharomyces pombe* Bir1p, a nuclear protein that localizes to kinetochores and the spindle midzone, is essential for chromosome condensation and spindle elongation during mitosis. *Genetics* **160**(2): 445-456
- Ramey VH, Wang HW, Nakajima Y, Wong A, Liu J, Drubin D, Barnes G, Nogales E (2010) The Dam1 ring binds to the E-hook of tubulin and diffuses along the microtubule. *Mol Biol Cell*

- Rea S, Eisenhaber F, O'Carroll D, Strahl BD, Sun ZW, Schmid M, Opravil S, Mechtler K, Ponting CP, Allis CD, Jenuwein T (2000) Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature* **406**(6796): 593-599.
- Rospert S, Dubaquié Y, Gautschi M (2002) Nascent-polypeptide-associated complex. *Cell Mol Life Sci* **59**(10): 1632-1639
- Rowinsky EK, Onetto N, Canetta RM, Arbuck SG (1992) Taxol: the first of the taxanes, an important new class of antitumor agents. *Semin Oncol* **19**(6): 646-662
- Ruchaud S, Carmena M, Earnshaw WC (2007) Chromosomal passengers: conducting cell division. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**(10): 798-812
- Saitoh S, Ishii K, Kobayashi Y, Takahashi K (2005) Spindle checkpoint signaling requires the mis6 kinetochore subcomplex, which interacts with mad2 and mitotic spindles. *Mol Biol Cell* **16**(8): 3666-3677
- Saitoh S, Takahashi K, Yanagida M (1997) Mis6, a fission yeast inner centromere protein, acts during G1/S and forms specialized chromatin required for equal segregation. *Cell* **90**(1): 131-143
- Sanchez-Perez I, Renwick SJ, Crawley K, Karig I, Buck V, Meadows JC, Franco-Sanchez A, Fleig U, Toda T, Millar JB (2005) The DASH complex and Klp5/Klp6 kinesin coordinate bipolar chromosome attachment in fission yeast. *Embo J* **24**(16): 2931-2943
- Sandblad L, Busch KE, Tittmann P, Gross H, Brunner D, Hoenger A (2006) The Schizosaccharomyces pombe EB1 Homolog Mal3p Binds and Stabilizes the Microtubule Lattice Seam. *Cell* **127**(7): 1415-1424
- Santaguida S, Musacchio A (2009) The life and miracles of kinetochores. *Embo J* **28**(17): 2511-2531
- Saunders W, Lengyel V, Hoyt MA (1997) Mitotic spindle function in Saccharomyces cerevisiae requires a balance between different types of kinesin-related motors. *Mol Biol Cell* **8**(6): 1025-1033
- Saunders WS, Hoyt MA (1992) Kinesin-related proteins required for structural integrity of the mitotic spindle. *Cell* **70**(3): 451-458
- Sawin KE (2000) Cytokinesis: Sid signals septation. *Curr Biol* **10**(15): R547-550
- Sazer S, Sherwood SW (1990) Mitochondrial growth and DNA synthesis occur in the absence of nuclear DNA replication in fission yeast. *J Cell Sci* **97** (Pt 3): 509-516
- Schittenhelm RB, Chaleckis R, Lehner CF (2009) Intrakinetochore localization and essential functional domains of Drosophila Spc105. *Embo J* **28**(16): 2374-2386
- Schramm C, Elliott S, Shevchenko A, Schiebel E (2000) The Bbp1p-Mps2p complex connects the SPB to the nuclear envelope and is essential for SPB duplication. *Embo J* **19**(3): 421-433
- Schueler MG, Higgins AW, Rudd MK, Gustashaw K, Willard HF (2001) Genomic and genetic definition of a functional human centromere. *Science* **294**(5540): 109-115
- Schueler MG, Sullivan BA (2006) Structural and functional dynamics of human centromeric chromatin. *Annu Rev Genomics Hum Genet* **7**: 301-313
- Schuyler SC, Liu JY, Pellman D (2003) The molecular function of Ase1p: evidence for a MAP-dependent midzone-specific spindle matrix. Microtubule-associated proteins. *J Cell Biol* **160**(4): 517-528
- Scott KC, Merrett SL, Willard HF (2006) A heterochromatin barrier partitions the fission yeast centromere into discrete chromatin domains. *Curr Biol* **16**(2): 119-129
- Scott KC, White CV, Willard HF (2007) An RNA polymerase III-dependent heterochromatin barrier at fission yeast centromere 1. *PLoS One* **2**(10): e1099
- Screpanti E, De Antoni A, Alushin GM, Petrovic A, Melis T, Nogales E, Musacchio A (2011) Direct binding of cenp-C to the mis12 complex joins the inner and outer kinetochore. *Curr Biol* **21**(5): 391-398
- Sezen B, Seedorf M, Schiebel E (2009) The SESA network links duplication of the yeast centrosome with the protein translation machinery. *Genes Dev* **23**(13): 1559-1570
- Sharp DJ, Rogers GC (2004) A Kin I-dependent Pacman-flux mechanism for anaphase A. *Cell Cycle* **3**(6): 707-710
- Sharp DJ, Rogers GC, Scholey JM (2000) Cytoplasmic dynein is required for poleward chromosome movement during mitosis in Drosophila embryos. *Nat Cell Biol* **2**(12): 922-930
- Sharp JA, Kaufman PD (2003) Chromatin proteins are determinants of centromere function. *Curr Top Microbiol Immunol* **274**: 23-52
- Sheikh MS, Fernandez-Salas E, Yu M, Hussain A, Dinman JD, Peltz SW, Huang Y, Fornace AJ, Jr. (1999) Cloning and characterization of a human genotoxic and endoplasmic reticulum stress-inducible cDNA that encodes translation initiation factor 1(eIF1(A121/SU11)). *J Biol Chem* **274**(23): 16487-16493
- Shelby RD, Monier K, Sullivan KF (2000) Chromatin assembly at kinetochores is uncoupled from DNA replication. *J Cell Biol* **151**(5): 1113-1118
- Shuaib M, Ouararhni K, Dimitrov S, Hamiche A (2010) HJURP binds CENP-A via a highly conserved N-terminal domain and mediates its deposition at centromeres. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(4): 1349-1354
- Sikorski RS, Hieter P (1989) A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in Saccharomyces cerevisiae. *Genetics* **122**(1): 19-27
- Sirotkin V, Beltzner CC, Marchand JB, Pollard TD (2005) Interactions of WASp, myosin-I, and verprolin with Arp2/3 complex during actin patch assembly in fission yeast. *J Cell Biol* **170**(4): 637-648
- Slep KC, Vale RD (2007) Structural basis of microtubule plus end tracking by XMAP215, CLIP-170, and EB1. *Mol Cell* **27**(6): 976-991
- Sohrmann M, Schmidt S, Hagan I, Simanis V (1998) Asymmetric segregation on spindle poles of the Schizosaccharomyces pombe septum-inducing protein kinase Cdc7p. *Genes Dev* **12**(1): 84-94

- Starr DA, Saffery R, Li Z, Simpson AE, Choo KH, Yen TJ, Goldberg ML (2000) HZWint-1, a novel human kinetochore component that interacts with HZW10. *J Cell Sci* **113** (Pt 11): 1939-1950
- Stoler S, Rogers K, Weitze S, Morey L, Fitzgerald-Hayes M, Baker RE (2007) Scm3, an essential *Saccharomyces cerevisiae* centromere protein required for G2/M progression and Cse4 localization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(25): 10571-10576
- Straight AF, Sedat JW, Murray AW (1998) Time-lapse microscopy reveals unique roles for kinesins during anaphase in budding yeast. *J Cell Biol* **143**(3): 687-694
- Strate LL, Syngal S (2005) Hereditary colorectal cancer syndromes. *Cancer Causes Control* **16**(3): 201-213
- Suizu F, Ryo A, Wulf G, Lim J, Lu KP (2006) Pin1 regulates centrosome duplication, and its overexpression induces centrosome amplification, chromosome instability, and oncogenesis. *Mol Cell Biol* **26**(4): 1463-1479
- Sun X, Le HD, Wahlstrom JM, Karpen GH (2003) Sequence analysis of a functional *Drosophila* centromere. *Genome Res* **13**(2): 182-194
- Sundin LJ, Deluca JG (2010) Kinetochore: NDC80 toes the line. *Curr Biol* **20**(24): R1083-1085
- Sundin LJ, Guimaraes GJ, Deluca JG (2011) The NDC80 complex proteins Nuf2 and Hec1 make distinct contributions to kinetochore-microtubule attachment in mitosis. *Mol Biol Cell*
- Sunnerhagen P (1993) PCR used to determine mating type in *S. pombe*. *Biotechniques* **14**(1): 18
- Sutterlin C, Colanzi A (2010) The Golgi and the centrosome: building a functional partnership. *J Cell Biol* **188**(5): 621-628
- Takahashi K, Chen ES, Yanagida M (2000) Requirement of Mis6 centromere connector for localizing a CENP-A-like protein in fission yeast. *Science* **288**(5474): 2215-2219
- Takahashi K, Murakami S, Chikashige Y, Funabiki H, Niwa O, Yanagida M (1992) A low copy number central sequence with strict symmetry and unusual chromatin structure in fission yeast centromere. *Mol Biol Cell* **3**(7): 819-835
- Takahashi K, Yamada H, Yanagida M (1994) Fission yeast minichromosome loss mutants mis cause lethal aneuploidy and replication abnormality. *Mol Biol Cell* **5**(10): 1145-1158
- Takayama Y, Mamnun YM, Trickey M, Dhut S, Masuda F, Yamano H, Toda T, Saitoh S Hsk1- and SCF(Pof3)-dependent proteolysis of *S. pombe* Ams2 ensures histone homeostasis and centromere function. *Dev Cell* **18**(3): 385-396
- Takayama Y, Takahashi K (2007) Differential regulation of repeated histone genes during the fission yeast cell cycle. *Nucleic Acids Res* **35**(10): 3223-3237
- Takayama Y, Toda T (2010) Coupling histone homeostasis to centromere integrity via the ubiquitin-proteasome system. *Cell Div* **5**: 18
- Takegawa K, Iwaki T, Fujita Y, Morita T, Hosomi A, Tanaka N (2003) Vesicle-mediated protein transport pathways to the vacuole in *Schizosaccharomyces pombe*. *Cell Struct Funct* **28**(5): 399-417
- Takimoto M, Wei G, Dosaka-Akita H, Mao P, Kondo S, Sakuragi N, Chiba I, Miura T, Itoh N, Sasao T, Koya RC, Tsukamoto T, Fujimoto S, Katoh H, Kuzumaki N (2002) Frequent expression of new cancer/testis gene D40/AF15q14 in lung cancers of smokers. *Br J Cancer* **86**(11): 1757-1762
- Tanaka K, Chang HL, Kagami A, Watanabe Y (2009) CENP-C functions as a scaffold for effectors with essential kinetochore functions in mitosis and meiosis. *Dev Cell* **17**(3): 334-343
- Tanaka K, Kanbe T (1986) Mitosis in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* as revealed by freeze-substitution electron microscopy. *J Cell Sci* **80**: 253-268
- Tanaka K, Mukae N, Dewar H, van Breugel M, James EK, Prescott AR, Antony C, Tanaka TU (2005) Molecular mechanisms of kinetochore capture by spindle microtubules. *Nature* **434**(7036): 987-994
- Tanaka TU (2010) Kinetochore-microtubule interactions: steps towards bi-orientation. *Embo J* **29**(24): 4070-4082
- Tang Z, Bharadwaj R, Li B, Yu H (2001) Mad2-Independent inhibition of APCdc20 by the mitotic checkpoint protein BubR1. *Dev Cell* **1**(2): 227-237
- Theis M, Slabicki M, Junqueira M, Paszkowski-Rogacz M, Sontheimer J, Kittler R, Heninger AK, Glatzer T, Kruusmaa K, Poser I, Hyman AA, Pisabarro MT, Gstaiger M, Aebersold R, Shevchenko A, Buchholz F (2009) Comparative profiling identifies C13orf3 as a component of the Ska complex required for mammalian cell division. *Embo J* **28**(10): 1453-1465
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**(22): 4673-4680
- Thompson SL, Bakhoum SF, Compton DA (2010) Mechanisms of chromosomal instability. *Curr Biol* **20**(6): R285-295
- Toda T, Yamamoto M, Yanagida M (1981) Sequential alterations in the nuclear chromatin region during mitosis of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*: video fluorescence microscopy of synchronously growing wild-type and cold-sensitive cdc mutants by using a DNA-binding fluorescent probe. *J Cell Sci* **52**: 271-287
- Torras-Llort M, Moreno-Moreno O, Azorin F (2009) Focus on the centre: the role of chromatin on the regulation of centromere identity and function. *Embo J* **28**(16): 2337-2348
- Tran PT, Paoletti A, Chang F (2004) Imaging green fluorescent protein fusions in living fission yeast cells. *Methods* **33**(3): 220-225
- Trautmann S, McCollum D (2005) Distinct nuclear and cytoplasmic functions of the *S. pombe* Cdc14-like phosphatase Clp1p/Flp1p and a role for nuclear shuttling in its regulation. *Curr Biol* **15**(15): 1384-1389
- Trautmann S, Rajagopalan S, McCollum D (2004) The *S. pombe* Cdc14-like phosphatase Clp1p regulates chromosome biorientation and interacts with Aurora kinase. *Dev Cell* **7**(5): 755-762
- Trautmann S, Wolfe BA, Jorgensen P, Tyers M, Gould KL, McCollum D (2001) Fission yeast Clp1p phosphatase regulates G2/M transition and coordination of cytokinesis with cell cycle progression. *Curr Biol* **11**(12): 931-940

- Trojer P, Reinberg D (2007) Facultative heterochromatin: is there a distinctive molecular signature? *Mol Cell* **28**(1): 1-13
- Troxell CL, Sweezy MA, West RR, Reed KD, Carson BD, Pidoux AL, Cande WZ, McIntosh JR (2001) pkl1(+) and klp2(+): Two kinesins of the Kar3 subfamily in fission yeast perform different functions in both mitosis and meiosis. *Mol Biol Cell* **12**(11): 3476-3488
- Tsukahara T, Tanno Y, Watanabe Y (2010) Phosphorylation of the CPC by Cdk1 promotes chromosome bi-orientation. *Nature* **467**(7316): 719-723
- Umesono K, Toda T, Hayashi S, Yanagida M (1983) Cell division cycle genes *nda2* and *nda3* of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* control microtubular organization and sensitivity to anti-mitotic benzimidazole compounds. *J Mol Biol* **168**(2): 271-284
- Vader G, Medema RH, Lens SM (2006) The chromosomal passenger complex: guiding Aurora-B through mitosis. *J Cell Biol* **173**(6): 833-837
- Vagnarelli P, Earnshaw WC (2004) Chromosomal passengers: the four-dimensional regulation of mitotic events. *Chromosoma* **113**(5): 211-222
- Velmurugan S, Mehta S, Uzri D, Jayaram M (2003) Stable propagation of 'selfish' genetic elements. *J Biosci* **28**(5): 623-636
- Venkatram S, Tasto JJ, Feoktistova A, Jennings JL, Link AJ, Gould KL (2004) Identification and characterization of two novel proteins affecting fission yeast gamma-tubulin complex function. *Mol Biol Cell* **15**(5): 2287-2301
- Verdaasdonk JS, Bloom K (2011) Centromeres: unique chromatin structures that drive chromosome segregation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **12**(5): 320-332
- Verdel A, Jia S, Gerber S, Sugiyama T, Gygi S, Grewal SI, Moazed D (2004) RNAi-mediated targeting of heterochromatin by the RITS complex. *Science* **303**(5658): 672-676
- Verhey KJ, Hammond JW (2009) Traffic control: regulation of kinesin motors. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**(11): 765-777
- Vida TA, Emr SD (1995) A new vital stain for visualizing vacuolar membrane dynamics and endocytosis in yeast. *J Cell Biol* **128**(5): 779-792
- Vietmeier-Decker C (2004) Die Funktion des Mikrotubuli-assoziierten *S. pombe* Proteins Mal3p in der Mitose. *Dissertation, HHU Düsseldorf*
- Vizeacoumar FJ, van Dyk N, F SV, Cheung V, Li J, Sydorsky Y, Case N, Li Z, Datti A, Nislow C, Raught B, Zhang Z, Frey B, Bloom K, Boone C, Andrews BJ (2010) Integrating high-throughput genetic interaction mapping and high-content screening to explore yeast spindle morphogenesis. *J Cell Biol* **188**(1): 69-81
- Volpe TA, Kidner C, Hall IM, Teng G, Grewal SI, Martienssen RA (2002) Regulation of heterochromatic silencing and histone H3 lysine-9 methylation by RNAi. *Science* **297**(5588): 1833-1837
- Wach A, Brachat A, Pohlmann R, Philippsen P (1994) New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **10**(13): 1793-1808
- Wan X, O'Quinn RP, Pierce HL, Joglekar AP, Gall WE, DeLuca JG, Carroll CW, Liu ST, Yen TJ, McEwen BF, Stukenberg PT, Desai A, Salmon ED (2009) Protein architecture of the human kinetochore microtubule attachment site. *Cell* **137**(4): 672-684
- Wang H, Hu X, Ding X, Dou Z, Yang Z, Shaw AW, Teng M, Cleveland DW, Goldberg ML, Niu L, Yao X (2004) Human Zwint-1 specifies localization of Zeste White 10 to kinetochores and is essential for mitotic checkpoint signaling. *J Biol Chem* **279**(52): 54590-54598
- Wang S, Sakai H, Wiedmann M (1995) NAC covers ribosome-associated nascent chains thereby forming a protective environment for regions of nascent chains just emerging from the peptidyl transferase center. *J Cell Biol* **130**(3): 519-528
- Wang X, Dai W (2005) Shugoshin, a guardian for sister chromatid segregation. *Exp Cell Res* **310**(1): 1-9
- Ward BE, Cook RH, Robinson A, Austin JH (1979) Increased aneuploidy in Alzheimer disease. *Am J Med Genet* **3**(2): 137-144
- Watanabe Y, Kitajima TS (2005) Shugoshin protects cohesin complexes at centromeres. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **360**(1455): 515-521, discussion 521
- Weaver BA, Cleveland DW (2006) Does aneuploidy cause cancer? *Curr Opin Cell Biol* **18**(6): 658-667
- Wei G, Takimoto M, Yoshida I, Mao PZ, Koya RC, Miura T, Kuzumaki N (1999) Chromosomal assignment of a novel human gene D40. *Nucleic Acids Symp Ser*(42): 71-72
- Wei RR, Al-Bassam J, Harrison SC (2007) The Ndc80/HEC1 complex is a contact point for kinetochore-microtubule attachment. *Nat Struct Mol Biol* **14**(1): 54-59
- Welburn JP, Grishchuk EL, Backer CB, Wilson-Kubalek EM, Yates JR, 3rd, Cheeseman IM (2009) The human kinetochore Ska1 complex facilitates microtubule depolymerization-coupled motility. *Dev Cell* **16**(3): 374-385
- Wen W, Meinkoth JL, Tsien RY, Taylor SS (1995) Identification of a signal for rapid export of proteins from the nucleus. *Cell* **82**(3): 463-473
- Westermann S, Avila-Sakar A, Wang HW, Niederstrasser H, Wong J, Drubin DG, Nogales E, Barnes G (2005) Formation of a dynamic kinetochore-microtubule interface through assembly of the Dam1 ring complex. *Mol Cell* **17**(2): 277-290
- Whitby MC, Dixon J (2001) Fission yeast nascent polypeptide-associated complex binds to four-way DNA junctions. *J Mol Biol* **306**(4): 703-716
- Wiedmann B, Sakai H, Davis TA, Wiedmann M (1994) A protein complex required for signal-sequence-specific sorting and translocation. *Nature* **370**(6489): 434-440
- Wigge PA, Kilmartin JV (2001) The Ndc80p complex from *Saccharomyces cerevisiae* contains conserved centromere component and has a function in chromosome segregation. *Journal of Cell Biology* **152**: 349-360
- Wilhelm BT, Marguerat S, Watt S, Schubert F, Wood V, Goodhead I, Penkett CJ, Rogers J, Bahler J (2008) Dynamic repertoire of a eukaryotic transcriptome surveyed at single-nucleotide resolution. *Nature* **453**(7199): 1239-1243
- Williams BC, Murphy TD, Goldberg ML, Karpen GH (1998) Neocentromere activity of structurally acentric mini-chromosomes in *Drosophila*. *Nat Genet* **18**(1): 30-37

- Williams JS, Hayashi T, Yanagida M, Russell P (2009) Fission yeast Scm3 mediates stable assembly of Cnp1/CENP-A into centromeric chromatin. *Mol Cell* **33**(3): 287-298
- Wilson-Kubalek EM, Cheeseman IM, Yoshioka C, Desai A, Milligan RA (2008) Orientation and structure of the Ndc80 complex on the microtubule lattice. *J Cell Biol* **182**(6): 1055-1061
- Wood V, Gwilliam R, Rajandream MA, Lyne M, Lyne R, Stewart A, Sgouros J, Peat N, Hayles J, Baker S, Basham D, Bowman S, Brooks K, Brown D, Brown S, Chillingworth T, Churcher C, Collins M, Connor R, Cronin A, Davis P, Feltwell T, Fraser A, Gentles S, Gobbe A, Hamlin N, Harris D, Hidalgo J, Hodgson G, Holroyd S, Hornsby T, Howarth S, Huckle EJ, Hunt S, Jagels K, James K, Jones L, Jones M, Leather S, McDonald S, McLean J, Mooney P, Moule S, Mungall K, Murphy L, Niblett D, Odell C, Oliver K, O'Neil S, Pearson D, Quail MA, Rabinowitsch E, Rutherford K, Rutter S, Saunders D, Seeger K, Sharp S, Skelton J, Simmonds M, Squares R, Squares S, Stevens K, Taylor K, Taylor RG, Tivey A, Walsh S, Warren T, Whitehead S, Woodward J, Volckaert G, Aert R, Robben J, Grymonprez B, Weltjens I, Vanstreels E, Rieger M, Schafer M, Muller-Auer S, Gabel C, Fuchs M, Dusterhoft A, Fritz C, Holzer E, Moestl D, Hilbert H, Borzym K, Langer I, Beck A, Lehrach H, Reinhardt R, Pohl TM, Eger P, Zimmermann W, Wedler H, Wambutt R, Purnelle B, Goffeau A, Cadieu E, Dreano S, Gloux S, Lelaure V, Mottier S, Galibert F, Aves SJ, Xiang Z, Hunt C, Moore K, Hurst SM, Lucas M, Rochet M, Gaillardin C, Tallada VA, Garzon A, Thode G, Daga RR, Cruzado L, Jimenez J, Sanchez M, del Rey F, Benito J, Dominguez A, Revuelta JL, Moreno S, Armstrong J, Forsburg SL, Cerutti L, Lowe T, McCombie WR, Paulsen I, Potashkin J, Shpakovski GV, Ussery D, Barrell BG, Nurse P (2002) The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature* **415**(6874): 871-880
- 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
- Wu X, Xiang X, Hammer JA, 3rd (2006) Motor proteins at the microtubule plus-end. *Trends Cell Biol* **16**(3): 135-143
- Xu YX, Manley JL (2007) New insights into mitotic chromosome condensation: a role for the prolyl isomerase Pin1. *Cell Cycle* **6**(23): 2896-2901
- Xue Z, Shan X, Sinelnikov A, Melese T (1996) Yeast mutants that produce a novel type of ascus containing asci instead of spores. *Genetics* **144**(3): 979-989
- Yamamoto A, West RR, McIntosh JR, Hiraoka Y (1999) A cytoplasmic dynein heavy chain is required for oscillatory nuclear movement of meiotic prophase and efficient meiotic recombination in fission yeast. *J Cell Biol* **145**(6): 1233-1249
- Yamashita A, Sato M, Fujita A, Yamamoto M, Toda T (2005) The roles of fission yeast ase1 in mitotic cell division, meiotic nuclear oscillation, and cytokinesis checkpoint signaling. *Mol Biol Cell* **16**(3): 1378-1395
- Yamashita YM, Nakaseko Y, Kumada K, Nakagawa T, Yanagida M (1999) Fission yeast APC/cyclosome subunits, Cut20/Apc4 and Cut23/Apc8, in regulating metaphase-anaphase progression and cellular stress responses. *Genes Cells* **4**(8): 445-463
- Yanagida M (1987) Yeast tubulin genes. *Microbiol Sci* **4**(4): 115-118
- Yanagida M (2000) Cell cycle mechanisms of sister chromatid separation; roles of Cut1/separin and Cut2/securin. *Genes Cells* **5**(1): 1-8
- Yang YL, Duan Q, Guo TB, Wang XX, Ruan Q, Xu GT, Zhang JW, Lu ZY, Xu M, Lu L, Dai W (2007) BubR1 deficiency results in enhanced activation of MEK and ERKs upon microtubule stresses. *Cell Prolif* **40**(3): 397-410
- Yuen KW, Warren CD, Chen O, Kwok T, Hieter P, Spencer FA (2007) Systematic genome instability screens in yeast and their potential relevance to cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(10): 3925-3930
- Zeitlin SG (2010) Centromeres: the wild west of the post-genomic age. *Epigenetics* **5**(1): 34-40
- Zekanowski C, Wojda U (2009) Aneuploidy, chromosomal missegregation, and cell cycle reentry in Alzheimer's disease. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* **69**(2): 232-253
- Zhang K, Mosch K, Fischle W, Grewal SI (2008) Roles of the Ctr4 methyltransferase complex in nucleation, spreading and maintenance of heterochromatin. *Nat Struct Mol Biol* **15**(4): 381-388
- Zheng XM, Black D, Chambon P, Egly JM (1990) Sequencing and expression of complementary DNA for the general transcription factor BTF3. *Nature* **344**(6266): 556-559
- Zimmerman S, Tran PT, Daga RR, Niwa O, Chang F (2004) Rsp1p, a J domain protein required for disassembly and assembly of microtubule organizing centers during the fission yeast cell cycle. *Dev Cell* **6**(4): 497-509

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, Vol. 10: 4167-78

(hauptsächlich Daten aus meiner Diplomarbeit: ca. 5 % stammen aus meiner Doktorarbeit)

The conserved Spc7 protein is required for spindle integrity and links kinetochore complexes in fission yeast.

Kerres A*, Jakopec V*, Fleig U (* gleichberechtigte Autoren)

(50 % der Daten wurden von mir generiert)

Mol Biol Cell. 2007, Vol. 7: 2441-54

Versatile use of *S. pombe* plasmids in *S. cerevisiae*.

Jakopec V, Walla E und Fleig U

(85 % der Daten wurden von mir generiert)

FEMS Yeast, 2011, eingereicht

The new *S. pombe* Ndc80-MIND-Spc7 complex component Sos7 identifies a family of kinetochore proteins that reflect evolutionary alterations in fungal centromeres.

Jakopec V und Fleig U

(100 % der Daten wurden von mir generiert)

2011, in Vorbereitung

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Menschen bedanken, die mich in den letzten Jahren unterstützt haben und so zum Gelingen dieser Arbeit beitrugen.

Zuerst möchte ich mich ganz herzlich bei Frau Dr. Ursula Fleig bedanken, die mir die Möglichkeit gegeben hat, diese Arbeit im Rahmen eines sehr interessanten Projektes in ihrem Labor anzufertigen. Vielen Dank für die motivierende Betreuung sowie die kritischen Anregungen, die dieses Projekt zielstrebig vorangetrieben haben. Für die ermöglichte Teilnahme an den Kongressen in Kopenhagen, Tokyo und Boston und besonders für die Gelegenheit einen Vortrag in Kopenhagen zu halten bin ich sehr dankbar! Speziell möchte ich für die Hilfsbereitschaft in der Endphase danken: das lesen und diskutieren der verschiedenen Manuskriptvarianten hat erheblich zum Gelingen beigetragen.

Ein Dank geht an Herrn Prof. Dr. Peter Westhoff für die Übernahme des Koreferates und die Begutachtung meiner Arbeit in kürzester Zeit.

Ebenfalls danke ich der Gesellschaft von Freunden und Förderern der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf e. V. (Düsseldorf Entrepreneurs Foundation). Durch die Verleihung des Doktorandenstipendiums der Gründerstiftung zur Förderung von Forschung und wissenschaftlichem Nachwuchs haben sie diese Arbeit durch ihre finanzielle Unterstützung zu großen Teilen ermöglicht.

Danken möchte ich auch meiner „Mikroskopie-Facility“: Andrea Scharf, die mich gelehrt hat mit dem LSM-510 umzugehen, Stephan Schmidt für die Mikroskopie und Fixierung im Rahmen der C10orf118-Untersuchungen, Stephanie Grabowski für die Mithilfe bei der Suche nach weiteren subzellulären Lokalisierungen meiner Fragmente und Tobias Troost für die Hilfe am Spinning Disk.

Bedanken möchte ich mich auch bei meinen ehemaligen und jetzigen Arbeitskollegen Andrea, Anne, Boris, Christoph, Eva, Jenni, Marcus, Steffi und Vanessa. Die freundliche Atmosphäre, die fachlichen und manchmal auch nicht-fachlichen Gespräche haben die letzten Jahre zu einer schönen Zeit gemacht. Ein Dank geht an Anne, mit der die Zeit-abhängigen Experimente auch bis mitten in der Nacht erträglich waren und die auch noch nachts den Zellkernaufbau mit mir diskutierte. Außerdem danke ich Eva, besonders für die Motivation zum Ende der Arbeit.

Auch Herrn Prof. J.H. Hegemann und den „Hegemännern“ gilt ebenfalls mein Dank. Die „Hegemänner“ hatten immer ein offenes Ohr für meine fachlichen Probleme und auch immer ein aufmunterndes Wort, wenn nicht alles nach Wunsch lief. Besonders danken möchte ich Katja! Vielen Dank für deine aufmunternden Worte und die großzügige Hilfe bei der Proteinaufbereitung und der Zellkultur! Auch Frauke gilt mein Dank für die Unterstützung in der Zellkultur.

Für die kritische Durchsicht meiner Arbeit danke ich Anne, Eva und Jenni! An Boris geht ein herzlicher Dank für das Beheben aller Formatierungsprobleme, die nicht durch die Tastenkombination Alt+F9 gelöst werden konnten.

Meiner Familie und meinen Freunden sei ebenfalls herzlich gedankt! Ohne euch wäre dies alles so nicht möglich gewesen. Vor allem Thomas gilt mein Dank, der mich immer unterstützt und meine Launen in der Endphase besonnen ertragen hat.

Euch allen vielen Dank!

Erklärung

Die vorgelegte Dissertation wurde von mir eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe verfasst. Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den

Visnja Jakopec