

# Funktionelle Analyse neuer mitotischer Regulationsmechanismen in Schizosaccharomyces pombe

Inaugural – Dissertation

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

> vorgelegt von Boris Topolski aus Duisburg

Düsseldorf, Mai 2013

aus dem Institut 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 Korreferent: Prof. Dr. P. Westhoff

Tag der mündlichen Prüfung: 20.06.2013

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	8
Zusammenfassung	10
Summary	12
1 Einleitung	14
1.1 Genomstabilität und Krankheiten	14
1.2 <i>S. pombe</i> als Modellorganismus für die Erforschung mitotischer Prozesse	15
1.3 Der Zellzyklus in <i>S. pombe</i>	16
1.4 Die Mitose in <i>S. pombe</i>	17
1.5 Komponenten der Chromosomensegregation	19
1.5.1 Das Zentromer-Chromatin in Eukaryoten	20
1.5.1.1 Das Zentromer-Chromatin in <i>S. pombe</i>	21
1.5.1.2 Die Histon H3- Variante CENP-A/Cnp1	23
1.5.2 Komponenten des Kinetochors	25
1.5.2.1 Der Sim4-Komplex	25
1.5.2.1.1 Der COMA-Komplex in <i>S. cerevisiae</i>	27
1.5.2.1.2 Der CAAN-Komplex in Vertebraten	28
1.5.2.2 Der DASH-Komplex	29
1.5.2.3 Der NMS-Komplex	30
1.5.3 Die mitotische Spindel	32
1.5.3.1 Spindel-Mikrotubuli assoziierte Proteine	35
1.5.3.1.1 Mitose-relevante Motorproteine	35
1.5.3.1.2 Dis1	35
1.5.3.1.3 Das S. pombe "End binding protein 1" (EB1) Mal3	36
1.5.4 Wächter der korrekten Chromosomensegregation	37
1.5.4.1 Der mitotische Spindelkontrollpunkt	37
1.5.4.2 Die Aurora B Kinase	38
1.6 Das Asp1 Protein ist eine katalytische Komponente des Inositolpolyphosphat Zyklus	39
1.7 Zielsetzung dieser Arbeit	42
2 Material und Methoden	43
2.1 Chemikalien	43
2.2 Geräte	45
2.3 Antikörper	46

Inhaltsverzeichnis

2.4	Enzyme	47
2.4.1 Restriktionsenzyme		47
2.4	2 Weitere Enzyme	47
2.5	Kits	47
2.6	Sonstige Materialien	47
2.7	Synthetische Oligonukleotide	48
2.8	Plasmide	50
2.9	Stämme	
2.9	1 S. pombe Stämme	<b>5</b> 2
2.9	2 E. coli Stämme	
2.10	Medien und Wachstumsbedingungen	54
2.1	).1 S. pombe	54
2.1	0.2 Serielle Tropftestanalysen "Tropftests"	57
2.1	D.3 E. coli	57
2 1 1		
2.11	DNA Grunatechniken	57 57
2.1	1.1 DNA-Praparation aus <i>E. Con</i>	٥٥ ۶۵
2.1		Jo 58
2.1	1.4 Transformation in <i>E. coli</i>	58
2.1	1.5 <i>in vitro</i> Klonierungen mit <i>E. coli</i>	50
2 1 2		
2.12	DNA Sequenzierung	59
2.13	S. pombe Methoden	60
2.1	B.1 Präparation genomischer DNA aus S. pombe	60
2.1	3.2 "PCR auf Zellen"	60
2.1	3.3 Paarung von S. pombe Stämmen	60
2.1	3.4 Sporenseparation mittels Mikromanipulator	61
2.1	3.5 "Random Spore" Methode	61
2.1	B.6 Plasmidtransformation von S. pombe Zellen	62
2.1	3.7 Transformation mittels homologer Rekombination	62
2.13.7.1 C-terminale GFP-Epitopmarkierung von Fta2-2916		
2.14	Proteinmethoden	63
2.1	4.1 Proteinisolation aus S. pombe	63
2.1	4.2       Konzentrationsbestimmung von Proteinextrakten	63
2.1	1.3 Immunpräzipitation	63
2.1	1.4 Proteinauftrennung und Entwicklung	64
2	.14.4.1 Quantifizierung der Bandenintensität entwickelter Membranen	64

2.15	Mikr	oskopie	65
2.15	.1	Immunfluoreszenz	65
2.15	.2	Lebendzellfluoreszenz	65
2.15	.3	Konfokale Lebendzellfluoreszenz	65
2.15	.4	Quantifizierung von Lebendzellfluoreszenz Signalen	66
2.16	Bere	chnung der statistischen Signifikanz	67
Erge	bnisse	2	68
3.1	Asp1	generierte Inositolpolyphosphate regulieren die Mitose in S. pombe	68
3.1.3	1 IP	Aktivität verschiedener Asp1 Varianten	68
3.1.2	2 De	er Phänotyp eines mal3-1 Mutantenstammes kann durch Expression von $asp1^{1-364}$ sup	primiert
wer	den _		70
3.1.3	3 As	p1 generiertes IP7 wird für den Spindelaufbau benötigt	70
3	.1.3.1	Asp1 generiertes IP7 wird für eine stabile Spindelmitte benötigt	72
3	.1.3.2	Asp1 reguliert die Stabilität der Spindelmitte	73
3	.1.3.3	Asp1 generiertes IP7 wird für den Aufbau der Metaphasenspindel benötigt	76
3.1.4	4 as	p1 <sup>D333A</sup> Zellen arretieren transient in der Metaphase	79
3	.1.4.1	Der Spindelkontrollpunkt liegt in <i>asp1</i> <sup>D333A</sup> Zellen aktiviert vor	83
3	.1.4.2	Asp1 wird für die bipolare Kinetochor-Mikrotubuli-Verknüpfung benötigt	87
3	.1.4.3	Verlust der Bub3-abhängigen Kontrolle der Kinetochor-Mikrotubuli-Verknüpfung	führt zu
m	nassive	n Segregationsdefekten	90
	3.1.4	.3.1 asp1 <sup>D333A</sup> bub3∆ Zellen können polyploid werden	93
3	.1.4.4	Die Aurora Kinase Ark1 lokalisiert in Abhängigkeit der Asp1 generierten IP7-Menge	94
3.1.5	5 Di	e Dauer der mitotischen Spindelphasen wird durch Asp1 generiertes IP $_7$ moduliert	96
3	.1.5.1	Die Mikrotubuli-Elongation in Phase I ist in <i>asp1</i> <sup>D333A</sup> Zellen schneller	96
3	.1.5.2	Phase II ist in <i>asp1</i> <sup>H397A</sup> Zellen verkürzt	98
3	.1.5.3	Die Mikrotubuli-Elongation in Phase III ist in <i>asp1</i> <sup>D333A</sup> Zellen schneller	102
3.1.6	5 As	p1 generiertes IP $_7$ beeinflusst einen Subkomplex des Sim4-Kinetochor-Komplexes	105
3.1.7	7 Ki	netochor-Lokalisation der Mal2 und Fta2 Proteine wird durch IP $_7$ reguliert	108
3	.1.7.1	Extra Asp1 generiertes IP $_7$ reduziert die Kinetochor-Lokalisation der Proteine Mal2 u	nd Fta2
			108
	3.1.7	.1.1 Extra Asp1 generiertes $IP_7$ reduziert auch die Menge an Kinetochor-asso	ziiertem
	wildt	ypischen Mal2 und Fta2	109
3	.1.7.2	Kinetochor-Lokalisation von Mal2 und Fta2 ist bei Abwesenheit von Asp1 generie	erten IP7
V	erstärl		111
	3.1.7	.2.1 Die Menge an Kinetochor-assoziiertem wildtypischen Mal2 und Fta2 wird	ebenfalls
	verst	ärkt, wenn weniger Asp1 generiertes IP7 vorliegt	112
3.1.8	B Di	e reduzierte Kinetochor-Lokalisation von Mal2 und Fta2 durch mehr Asp1 generiertes	IP <sub>7</sub> führt
zu m	nitotise	chen Defekten	114

3.1.9 Die erhöhte Kinetochor-Lokalisation von Mal2 und Fta2 durch weniger Asp1 generiert	es IP7 kann
zu einer partiellen Suppression der Temperatursensitivität der Mutantenstämme führen	119
3.1.9.1 Die korrekte Chromosomensegregation im <i>mal2-1</i> Stamm ist abhängig von physi	ologischen
IP <sub>7</sub> -Mengen	120
3.1.9.2 Im <i>asp1</i> <sup>D333A</sup> <i>mal2-1</i> Stamm treten massivere Spindeldefekte auf	122
3.1.10 Der 13 Komponenten umfassende Sim4-Komplex besteht aus Subkomp	lexen mit
entgegengesetzter Funktion	125
2.2. Charalterisianung der autwassenen Gummasian und Simt Kanalau Mutantanstömmasse	duurah alam
3.2 Charakterisierung der extragenen Suppression von Sim4-Komplex-Wutantenstammen	aurch den
2.2.1 Übereursteelen des suit <sup>+</sup> OPE führt zu einer Desie ehhänsigen Supersonien de	12/
3.2.1 Oberexpression des suit OKF funct zu einer Dosis-abhängigen Suppression de	5 JU2-291
	127
3.2.2 Sull Oberexpression supprimiert die Temperatursensitivität aller getesteten Mutan	enstamme
	128
3.2.3 <i>sul</i> 1 ist ein Sim4-Kinetochor-Komplex spezifischer Suppressor	130
3.2.3.1 Die Suppression durch extra <i>sui1</i> erfolgt unabhängig von der siRNA a	ibhängigen
Heterochromatin-Bildung	131
3.2.4 Extra <i>sui1</i> <sup>+</sup> verstärkt die CENP-A/Cnp1 abhängige transkriptionelle Stillegung de	er inneren
Chromatin-Struktur	133
3.2.5 Die meisten Sim4-Kommplex-Mutantenstämme können auch durch extra $cnp1^*$ s	upprimiert
werden	135
3.2.5.1 Die Überexpression von $sui1^*$ erhöht die Proteinmenge sowie die Kinetochor-	assoziierte
Menge des Mal2 Proteins	137
3.2.5.2 <i>eif5</i> <sup>+</sup> wirkt antagonistisch zu <i>sui1</i> <sup>+</sup>	139
4 Diskussion	141
4.1 Inositolpolyphosphate sind Masterregulatoren der Mitose	142
4.1.1 Asp1 generiertes IP <sub>7</sub> moduliert Aufbau und Funktion des Kinetochors	142
4.1.2 Aufbau und Dynamik der mitotischen Spindel	147
4.1.3 Funktion des mitotischen Spindelkontrollpunktes	149
4.1.3.1 Ist Asp1 eine Komponente des mitotischen Spindelkontrollpunktes?	151
4.1.4 Funktionsweise von Asp1 generiertem IP <sub>7</sub>	152
4.2 Sui1: Ein neuer Regulator des Sim4-Kinetochor-Komplexes	155
4.2.1 Überexpression von $sui1^{+}$ kann die Proteinmenge von Komponenten des Sim4-k	(inetochor-
Komplexes erhöhen	155
4.2 Die Desulation der Mal2 Manze durch Suit erfelst auf Ehene der Trevelatione Initiation	150
4.5 Die Regulation der Maiz Menge durch Sult erfolgt auf Ebene der Translations-Initiation	158
5 Anhang	162
6 Abbildungsvorzeisbnis	166
	100

Inhaltsverzeichnis

7	Literaturverzeichnis	168
8	Publikationen	183
9	Danksagung	184
10	Erklärung	185

# Abkürzungsverzeichnis

μΙ	Mikroliter
μm	Mikrometer
Abb.	Abbildung
ATP	Adenosintriphosphat
Вр	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
C. elegans	Caenorhabditis elegans
СDК	"cyclin dependent kinase"
C-Terminus	Carboxy-Terminus
D. melanogaster	Drosophila melanogaster
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E. coli	Escherichia coli
EMCCD	"Electron multiplying charge-coupled device"
g	Gramm
genom. DNA	genomische DNA
GFP	"green fluorescent protein"
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde(n)
IF	Immunfluoreszenz
kDa	Kilodalton
Μ	Molar
mCherry	"red fluorescent protein variant"
min	Minute(n)
ml	Milliliter
MM	Minimalmedium
mM	Millimolar
Ν	Anzahl
ng	Nanogramm
N-Terminus	Amino-Terminus
ON	Oligonukleotide
ORF	Offener Leserahmen

PCR	Polymerase-Kettenreaktion	
RNA	Ribonukleinsäure	
rpm	Umdrehungen pro Minute	
S. cerevisiae	Saccharomyces cerevisiae	
S. pombe	Schizosaccharomyces pombe	
sec	Sekunde(n)	
SPB	Spindelpolkörper	
TBZ	Thiabendazol	
ü/N	über Nacht	
WB	Westernblot	
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-indoxyl-β-D-galactopyranoisid	
X <sup><u>R</u></sup>	<u>R</u> esistenz	
YE5S	" <u>v</u> east <u>e</u> ctract <u>5c</u> omponents" (Vollmedium)	
z. B.	zum Beispiel	
Δ	Deletion	

# Zusammenfassung

Der Zugewinn oder Verlust einzelner Chromosomen oder Genabschnitte wird von der Natur nur selten toleriert. Diese Aneuploidienmanifestieren sich oft als beeinträchtigte Fitness einzelner Zellen oder ganzer Organismen.Maligne Tumore, welche durch die Akkumulation aneuploider Zellen geprägt sind, haben durch ihren unkontrollierten Stoffwechsel und ihre rapide Teilungsfähigkeit zwar einen Überlebensvorteil gegenüber benachbarten Zellverbänden, sind aber durch den Funktionsverlust von Geweben letztendlich letal für den Organismus. Aneuploide Zellen werden heute als Auslöser füreine Vielzahl von Krebsarten, neurodegenerativen Erkrankungen sowie vorzeitiger Zellalterung diskutiert.

Doch wie entsteht Aneuploidie, also der Verlust oder Zugewinn ganzer Chromosomen oder Genabschnitte? Viele Studien zeigen, dass Fehler während der Mitose wie eine inkorrekte Verbindung der Spindelfasern mit den Chromosomen, ein aberranter Aufbau der Spindel oder ein funktionsloser Spindelkontrollpunkt zu aneuploiden Zellen führen können. Von besonderem Interesse ist hier einMultiproteinkomplex, der Kinetochor, welcher auf dem Zentromer-Chromatin assembliert und die Mitose reguliert.

Die wichtigstenKinetochorproteine bilden zwei evolutionär konservierteKinetochor-Großkomplexe, welche in unserem Modellsystem der Spalthefe*Schizosaccharomyces pombe* als NMS- und Sim4-Komplex bezeichnet werden. Die 13 Proteine des Sim4-Komplexes bildendurch die Rekrutierung weiterer Proteine ein komplexes Netzwerk, welchesfür die Aufrechterhaltung der speziellen Chromatin-Struktur des Zentromers, die Verbindung der Chromosomen mit der mitotischen Spindel, sowie die Qualitätskontrolledieser Verbindungen benötigt wird.Die zugrundeliegenden Regulationsmechanismen welche beschreiben,wie die Feinabstimmung dieser Prozesse durch den Sim4-Komplex erfolgt,sind bisher kaum verstanden.

In dieser Arbeit war es mir möglichzwei neue Komponenten zu charakterisieren, welchedurch spezifische Wirkweisen auf den Sim4-Komplex, die Regulation mitotischer Prozesse vermitteln. Dabei handelt es sich zum einen um die Asp1 Proteinkinase, zum anderen um den*S. pombe* Translations-Initiations-Faktor 1, Sui1. Meine Analysen zeigen, dass diese beiden Proteine die Funktionsweise des Sim4-Komplexes in unterschiedlicher und wahrscheinlich nicht voneinander abhängiger Weise regulieren.

Das Asp1 Protein ist ein Mitglied der hochkonservierten eukaryotischen Vip1-Familie der 1/3-Inositolpolyphosphatkinasen, welche kleine ringförmige Signalmoleküle, sogenannte Inositolpolyphosphate (IPs) generieren.Proteine dieser Familie weisen eine charakteristische Zwei-Domänen Struktur auf, bestehend aus einer N-terminalen Kinasedomäne und einer C-terminalen Domäne, welche Homologie zu sauren Histidin-Phosphatasen aufweist. Ausgehend vom IP<sub>6</sub> wird durch die katalytische Aktivität der Kinasedomäne IP<sub>7</sub>generiert. Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass diese enzymatische Aktivität negativ durch die C-terminale Phosphatasedomäne reguliert wird. Durch Lebendzellfluoreszenz-Analysen von Hefe-Stämmen, welche Asp1 Varianten exprimieren, die kein oder mehr als die wild-typische Menge von IP<sub>7</sub> generieren,konnte ich zeigen, dass Inositolpolyphosphate drei mitotische Komponenten regulieren:

(1) Die Kinetochor-Lokalisation der Sim4-Kinetochor-Komplex-Komponenten Mal2 und Fta2 wird durch IP<sub>7</sub> moduliert. Erhöhte Mengen an IP<sub>7</sub> führen zu einer verminderten Kinetochor-Lokalisation dieser Proteine, während Abwesenheit von IP<sub>7</sub>zu einer stärkeren Lokalisation dieser Proteine führt. Genetische Analysen zeigen, dass möglicherweise auch andere Sim4-Komplex-Komponenten durch diese Signalmoleküle reguliert werden.

(2) Die Stabilität und Dynamik der mitotischen Spindel wird durch Asp1 generiertes IP<sub>7</sub> moduliert. Verlust von Asp1 generiertem IP<sub>7</sub>resultiert in instabilen Spindelmitten, welche zu brechenden Metaphasenspindelnführen können. Erhöhte IP<sub>7</sub>Mengen haben dagegen einen stabilisierenden Einfluss auf die mitotische Spindel. Die Elongationsgeschwindigkeit der mitotischen Spindel in der Prometaphase und der Anaphase B wird ebenfalls durch die Menge an IP<sub>7</sub> beeinflusst.

(3) Der Übergang von der Metaphase in die Anaphase A wird durch die Menge an Asp1 generiertem IP<sub>7</sub> moduliert. Verlust von IP<sub>7</sub> führt zu einem transienten Arrest in der Metaphase, wohingegen hohe IP<sub>7</sub>Mengen dazu führen, dass die Zelle die Metaphase schneller durchläuft. Weitere Daten deuten auf eine spezifische Funktion von Asp1 für die Aktivität des mitotischen Spindelkontrollpunktes hin, welcher den Übergang von der Metaphase in die Anaphase A kontrolliert.

Ein zweiter Regulator des Sim4-Komplexes ist das Sui1 Protein.Das sui1<sup>+</sup> Gen wurde in unserer Arbeitsgruppe als Multikopien Suppressoreines Sim4-Komplex-Mutantenstammes isoliert.Bei Sui1 handelt es sich um den S. pombe Translations-Initiations-Faktor 1, welcher in höheren Eukaryonten alsKomponente des 48S Präinitiationskomplexes für die korrekte Erkennung des AUG-Kodons einer mRNA benötigt wird. Überexpression von sui1<sup>+</sup> supprimiert exklusivSim4-Komplex-Mutantenstämme. Überexpression von *sui1*<sup>+</sup> verstärkt die transkriptionelle Stilllegung der inneren Zentromerregion, deren Struktur durch den Einbau Zentromer spezifischer Nukleosomen vermittelt wird, welche die Histon H3 Variante CENP-A/Cnp1 beinhalten. Extra sui1<sup>+</sup>erhöht die zelluläre Proteinmenge wie auch die Kinetochor-Lokalisation des Mal2 Proteins. Überexpression eines Sui1 Antagonisten, des Translations-Initiations-Faktors 5 ( $eif5^+$ ) reduziert dagegen die Mal2 Proteinmenge. Diese Daten deuten drauf hin, dass die Proteinmenge von Komponenten des Sim4-Kinetochor-Komplexes durch einen neuen Regulationsmechanismus auf Ebene der Translations-Initiation kontrolliert wird.

# Summary

The gain or loss of individual chromosomes or gene fragments is poorly tolerated by nature. Aneuploidy is often manifested as impaired fitness of individual cells or whole organisms. Malignant tumors are characterized by the accumulation of aneuploid cells and an uncontrolled metabolism. However the survival advantage of these rapidly dividing cells in comparison tonearby groups of cells can lead to a functional loss of tissues thus being lethal for the organism.Aneuploid cells are discussed to cause a variety of cancers, neurodegenerative diseases, and premature cellular aging.

But how does aneuploidy meaning the gain or loss of whole chromosomes occur? Many studies show that mitotic defects such as the incorrect connection of the spindle fibers to the chromosomes, an aberrant spindle structure or the functional loss of the spindle checkpoint can lead to aneuploidy. Consequentlykinetochores which assemble on centromeric chromatin and regulate mitosis are of particular interest. The most important kinetochore proteins form two evolutionary conserved kinetochore complexes referred to as the NMS- and the Sim4-complex in the fission yeast*Schizosaccharomyces pombe*. The 13 componentSim4-kinetochore-complexrecruitsother kinetochore components therebyforming a complex networkrequired for the maintenance of the specialcentromeric chromatin structure, thebinding of chromosomes to spindle microtubules and the quality control of the spindle-kinetochore connection. The underlying regulatory mechanisms describing the fine tuning of Sim4 complex specific mitotic events are poorly understood.

This work represents the characterization of two novel components mediating a Sim4 complex specific regulation of mitotic processes. These componentsare the Asp1 protein kinase and the *S. pombe* translation initiation factor 1 Sui1. These proteins appear to regulate the Sim4-kinetochore-complex in an independent manner. The Asp1 protein is a member of the highly conserved eukaryotic Vip11/3 inositol polyphosphate kinase family generating small circular signal molecules called inositol polyphosphates (IPs). Members of this family are characterized by a specificdual domain structure consisting of a N-terminal kinase domain and a C-terminal domain which has homology to histidine acid phosphatases. Using IP<sub>6</sub>as a substrate the catalytic activity of the kinase domain generates IP<sub>7</sub>. Our group has shown that this enzymatic activity is modulated negatively by the C-terminal part of the protein. I could identify diverse roles of inositol polyphosphates during mitosis with the help ofmitotic yeast cells expressing Asp1 variants that generated no or more than the wild-type amount of IP<sub>7</sub>:

(1) Kinetochore localization of Sim4 complex components Mal2 and Fta2 is modulated by IP<sub>7</sub>. Increased IP<sub>7</sub>amounts lead to decreased kinetochore localization of these proteins, whereas the absence of IP<sub>7</sub>boosts kinetochore localization of Mal2 and Fta2. Genetic analysis indicates that possibly other Sim4 complex components are also regulated by these signaling molecules. (2) Spindle stability and dynamic is modulated by Asp1 generated IP<sub>7</sub>. Unstable spindle mid-zones due to loss of IP<sub>7</sub>can lead to metaphase spindle breakage. In contrastincreased IP<sub>7</sub> amounts stabilize the mitotic spindle overlap zones. Furthermore the amount of IP<sub>7</sub>affects the spindle elongation rate in pro-metaphase and anaphase-B.

(3) The metaphase to anaphase-A transition is modulated by Asp1 generated IP<sub>7</sub>. Loss of IP<sub>7</sub>results in atransient metaphase arrest, whereas high amounts lead to cellsthat pass faster through metaphase. Additional data suggest a specific Asp1 function for mitotic spindle checkpoint activity which controls the metaphase toanaphase-A transition.

The Sui1 protein represents the second regulator of the Sim4-kinetochore-complex characterized in this work. In our lab the *sui1*<sup>+</sup> gene was isolated as a multi-copy suppressor of a Sim4-complex mutant strain. Sui1 known as the *S. pombe* translation initiation factor 1 is part of the 48S preinitiation complex being responsible for start codon recognition of mRNAs in higher eukaryotes.*sui1*<sup>+</sup> overexpression suppresses exclusively Sim4 complex mutant strains. Transcriptional silencing of the inner centromere which is maintained by the incorporation of nucleosomes containing the histone H3 variant CENP-A/Cnp1 is increased by overexpression. However overexpression of the*sui1*<sup>+</sup> antagonist *eif5*<sup>+</sup> reduces the Mal2 protein level. Thus the protein level of Sim4-kinetochore-complex componentsappears to be controlled by a regulatory mechanism at translation initiation.

# 1 Einleitung

# 1.1 Genomstabilität und Krankheiten

Die Stabilität des Genomsist ein fundamentaler Prozess, der das Überleben eines Organismus gewährleistet. Diese ist gekennzeichnet durch die Aufrechterhaltung eines euploiden Genoms, also dem Besitz eines exakten Vielfachen eines haploiden Chromosomensatzes. Genomstabilität wird durch die korrekte Verdopplung der DNA während der Replikation sowie durch die präzise Weitergabe der Chromosomen an zwei Folgezellen während der Mitoseund Meiose gewährleistet.Dagegen bezeichnet Aneuploidie das Abweichen von einem exakten Vielfachen des haploiden Chromosomensatzes. Diese Abweichung hat massive Auswirkungen auf die Dosis einzelner Gene und somit auf die Überlebensfähigkeit bzw. die Fitness eines Organismus (Siegel & Amon 2012; Papamichos-Chronakis & Peterson 2013). Aneuploidien, die während der menschlichen Oogenese bzw. Spermatogenese durch fehlerhafte Weitergabe einzelner Chromosomen auftreten,können im Falle einer Befruchtung zu Monosomien und Trisomien führen. Diese sind in den meisten Fällen nicht lebensfähig und führen zum Abort des Embryos. Das bekannteste Beispiel für eine lebensfähige Trisomie beim Menschen ist die des Chromosoms 21, welche zum Krankheitsbild des Down Syndrom führt (Petersen & Mikkelsen 2000). Monosomien dagegen sind beim Menschen nur lebensfähig, wenn sie das X-Chromosom betreffen, welches in diesem Fall nur in einfacher Kopienzahl vorliegt. Diese Monosomie führt zum Krankheitsbild des Turner Syndroms, welches neben physiologischen Merkmalen auch durch dieSterilität betroffener Frauen gekennzeichnet ist (Ranke & Saenger 2001).

Bereits 1882 beschrieb Walther Flemming die strukturellen Komponenten, die für die Weitergabe der Chromosomen und damit die Genomstabilität relevant sind: Die mitotische Spindel und definierte Bereiche auf den Chromosomen wo diese mit dem Chromatin assoziieren(Flemming 1882). Damit begründete Walther Flemming die Erforschung mitoserelevanter Prozesse, die bis heute versucht, die genaue Feinabstimmung der Chromosomensegregation zu verstehen. Heute wissen wir, dass es Hunderte von Komponenten gibt, die für die Definition des Zentromers auf den Chromosomen, den Aufbau derKinetochore und die Struktur und Dynamik der mitotischen Spindel verantwortlich sind. Des Weiteren wurde eine Vielzahl an regulatorischen Proteinen und Signalwegen identifiziert, die die Korrektheit sowie die genaue zeitliche Abfolge der Mitose kontrollieren(Musacchio & Hardwick 2002; Buscaino *et al.* 2010; Akiyoshi & Biggins 2012; Carmena *et al.* 2012).Defekte, die bei einer dieser Strukturen bzw. Mechanismen auftreten, können in somatischen Zellen zu Aneuploidie führen, was mit einer Vielzahl von Krankheiten assoziiert ist. Es wurde beispielsweise gezeigt, dass Proteine, welche für die Definition des Zentromerabschnittes auf dem Chromosom sowie für den Aufbau des Kinetochors relevant sind, in Zellen vieler Darmkrebsarten überexprimiert werden (Tomonaga *et al.* 2003; Tomonaga *et al.* 2005). Auch regulatorischeKomponenten, wie z.B. die Aurora Kinase, ein Schlüsselregulator der Mitose, oder Komponenten des mitotischen Spindelkontrollpunktes, welcher die korrekte Ausrichtung der Chromosomen in der Metaphase kontrolliert, sind in Zellen einiger Krebsartenüberexprimiert oder liegen nicht mehr funktionell vor (Bischoff *et al.* 1998; Cahill *et al.* 1998; Zhou *et al.* 1998; Zou *et al.* 1999). Auch neurodegenerative Erkrankungen wie Alzheimer sowie die vorzeitige Zellalterung werden mit einem Verlust der Genomstabilität in Verbindung gebracht (Johnson *et al.* 1999; Arendt 2012). Dies verdeutlicht die Relevanz, das Verständnis der komplexen Mechanismen und deren Feinabstimmung zu verstehen, welche für die korrekte Weitergabe des genetischen Materials essentiell sind.

# **1.2** S. pombe als Modellorganismus für die Erforschung mitotischer Prozesse

Die Spalthefe *Schizosaccharomyces pombe* hat sich in der Zellbiologie für die Erforschung mitotischer Prozesse als klassischer Modellorganismus etabliert. *S. pombe* ist gekennzeichnet durch eine zylindrische Zellmorphologie mit ca. 3 µm Durchmesser. Die Zellenwachsen jeweils nur an den Enden, gefolgt von einer Teilung im Zentrum der Zelle (Streiblova & Wolf 1972).*S. pombe* lässt sich leicht im Labor kultivieren und ist für genetische Manipulationen effizient zugänglich. Mittels Homologer Rekombination können Gene deletiert, gerichtet mutiert oder für mikroskopische bzw. biochemische Untersuchungenmit Epitopen endogen markiert werden.Durch Paarung verschiedener Stämme können genetische Merkmale beliebig kombiniert werden. Des Weiteren ermöglicht ein etabliertes künstliches plasmid-kodiertes Expressionssystem sowie eine simple Prototrophie-Selektion die Überexpression einzelner Gene oder Genomabschnitte (Forsburg 2003; Forsburg & Rhind 2006; Sabatinos & Forsburg 2010).

Die Spalthefe besitzt sogenannte "regionale Zentromere", die im grundlegenden Aufbau sowie in Funktion denen höherer Eukaryonten entsprechen (Buscaino *et al.* 2010). Des Weiterem sind die Proteine, welche den Kinetochor bilden, sowie die regulatorische Komponenten der Chromosomensegregation zum Teil evolutionär hoch konserviert(Akiyoshi & Biggins 2012; Carmena *et al.* 2012; Kops & Shah 2012). Im Gegensatz zu höheren Eukaryonten ist es in diesem einzelligen Organismus durch eine kurze Generationszeit von ca. 2,5h sowie neuen Techniken in der Mikroskopie möglich, Komponenten der Chromosomensegregation in lebenden Zellen zu untersuchen. Damit eignet sich *S. pombe* hervorragend für die Aufklärung mitotischer Prozesse, deren Relevanz sich auf höhere Eukaryonten bzw. auf die menschliche Physiologie übertragen lässt.

# **1.3** Der Zellzyklus in *S. pombe*

Als Zellzyklus wird die sich wiederholende zyklische Abfolge zellulärer Prozesse genannt, die zur Vervielfältigung einer jeden Zelle führen. Die zentralen Ereignisse, die für die Duplikation einer Zelle essentiell sind, sind die Replikation der DNA in der S-Phase (<u>S</u>ynthese) und die Verteilung der Chromosomen an die Tochterzellen in der M-Phase (<u>M</u>itose). Zwischen diesen Phasen befinden sich jeweils die "gap" Phasen, wobei die "gap" Phase zeitlich vor der S-Phase als G1-Phase und die "gap" Phase nach der S- und vor der M-Phase als G2-Phase bezeichnet wird. In diesen "gap" Phasen findet zum einen das Wachstum der Zelle statt, zum anderen werden hier die Vorbereitungen zum Eintritt in die S- bzw. M-Phase getroffen. Die Phasen G1, S und G2 werden gemeinsam als Interphase bezeichnet (Morgan 2007).

*S. pombe* verbringt ca. 70% des Zellzyklus in der G2-Phase, welche die Hauptwachstumsphase dieses Organismus repräsentiert (Abb. 1-1).Dagegen sind G1- und S-Phase vergleichsweise kurz. In logarithmisch wachsenden *S. pombe* Kulturen beginnt die S-Phase bereits, bevor die Zytokinese beendet ist. Der Eintritt in die M-Phase wird vom G2/M-Kontrollpunkt kontrolliert, der den Eintritt in die Mitose nur erlaubt, wenn alle Bedingungen, wie z.B. die kritische Größe der Zelle, erfüllt sind. Sind Nährstoffe im Medium begrenzt, ist es der Zelle möglich, ausgehend von der G1-Phase in die G0-Phase einzutreten. Dies ermöglicht der Zelle unter Mangelbedingungen über einen längeren Zeitraum zu überleben (Nurse 1990; Forsburg & Nurse 1991; Novak *et al.* 1998).



#### Abb. 1-1Der Zellzyklus der Spalthefe Schizosaccharomyces pombe

Die Zelle durchläuft eine zyklische Abfolge von Wachstum, Teilung und DNA-Replikation. Die Interphase umfasst die G1-, S- und G2-Phase. Auf die Interphase folgt die Mitose (M). Das Hauptwachstum der Zelle erfolgt in der G2-Phase, in der sich *S. pombe* ca. 70% des Zellzyklus aufhält. In der anschließenden Mitose erfolgt die Segregation der Schwesterchromatiden zu den Zellenden. Die anschließende Zytokinese ist erst nach dem Durchschreiten der G1-Phase beendet. In der S-Phase erfolgt die Replikation der DNA. Zur Vereinfachung ist nur eines der drei *S. pombe* Chromosomen gezeigt.

# 1.4 Die Mitose in S. pombe

Das Überschreiten des G2/M-Kontrollpunktes ist abhängig von der Aktivität Zyklin-abhängiger-Kinasen, welche in ihrer inhibierten Form den Eintritt in die Mitose reprimiert. Erst wenn alle Bedingungen für den Eintritt, wie z.B. die Verdopplung der DNA und der kritischen Zelllänge erfüllt sind, werden diese aktiviert (Gould & Nurse 1989; Nurse 1990).

Während der Mitose in *S. pombe* bleibt die Kernmembran erhalten und wird nicht abgebaut. Man spricht daher von einer geschlossenen Mitose. Der Spindelpolkörper (im Folgenden SPB genannt), das *S. pombe* Äquivalent des Zentrosoms in Vertebraten, verbleibt während der Interphase

außerhalb des Zellkerns und wird erst zu Beginn der Mitose in den Zellkern eingelagert (Ding *et al.* 1997). Während der Interphase finden sich die Zentromere der Chromosomen im Kern nahe dem SPB gebunden vor (Abb. 1-2A)(Funabiki *et al.* 1993).Die SPBs, welche zu diesem Zeitpunkt bereits dupliziert vorliegen, werden in der Mitose in die Kernmembran eingelagert, separieren sich in der Prometaphase voneinander und bauen die mitotische Spindel auf (Abb. 1-2B) (Hagan & Hyams 1988; Hagan & Yanagida 1995; Ding *et al.* 1997).



#### Abb. 1-2 Schematische Darstellung der Mitose in S. pombe

**A:**In der Interphase liegen die Zentromere (blau) im Kern nahe den SPBs (rot) gebunden vor, welche sich außerhalb der Kernmembran (grau) befinden. Bei Eintritt in die Mitose werden die Interphasen-Mikrotubuli (grün) abgebaut.**B**: Zu Beginn der Mitose (Prometaphase) separieren die SPBs, welche nun in die Kernmembran eingebettet sind, voneinander und bauen die mitotische Spindel auf. Da es sich in *S. pombe* um eine geschlossene Mitose handelt, wird die Kernmembran nicht abgebaut. **C**: In der Metaphase verbleibt die mitotische Spindel bei einerkonstanten Länge.<u>Vergrößerung</u>:DiePol zu Pol Mikrotubuli, welche von beiden SPBs

ausgebildet werden, überlagern antiparallel in der Mitte der Spindel. Gleichzeitig kommt es zur Ausbildung der Kinetochor-Mikrotubuli, welche die Spindelpole mit den Zentromeren verknüpfen. **D**:Wenn alle Schwesterchromatiden korrekt bipolar verknüpft sind, erfolgt der Eintritt in die Anaphase A, bei der die Schwesterchromatiden zu den Spindelpolen transportiert werden. **E**:Nachdem alle Schwesterchromatiden die Spindelpole erreicht haben, erfolgt in der Anaphase B durch Polymerisation der überlagernden Pol zu Pol-Mikrotubuli die Elongation der mitotischen Spindel, welche die Spindelpole mit den Chromosomen zu den entgegengesetzten Zellenden transportiert. **F**: Nach der Zytokinese liegen zwei identische Folgezellen vor und die DNA ist zu diesem Zeitpunkt bereits wieder repliziert.

Mikrotubuli, welche während der Mitose innerhalb des Kerns zwischen den SPBs gebildet werden, können in zwei Arten unterteilt werden. "Pol zu Pol-Mikrotubuli", welche von beiden SPBs ausgebildet werden, erstrecken sich zu Beginn der Mitose noch über die gesamte Länge der mitotischen Spindel und sind für die Separation der SBPs verantwortlich. "Kinetochor-Mikrotubuli" binden die Kinetochore und verknüpfen die Chromosomen, welche sich in der Metaphase ausgerichtet haben, mit den Spindelpolen (Abb. 1-2C, Vergrößerung) (Ding et al. 1993). Der Eintritt in die Anaphase A ist abhängig von der Aktivität des "Anaphase Promoting Complex" (APC), welcher solange inaktiv vorliegt, bis alle Chromosomen korrekt mit den SPBs verknüpft sind. Wird dieser zum Ende der Metaphase aktiviert, degradiert dieser Securin, was wiederum die Aktivierung von Separasen zur Folge hat, welche die Kohäsine zwischen den Schwesterchromatiden spalten (Peters 2006). Durch Depolymerisation der Kinetochor-Mikrotubuli werden die Schwesterchromatiden anschließend zu den SPBs transportiert (Abb. 1-2D) (Mitchison & Salmon 2001; Sharp & Rogers 2004). In der Anaphase B finden sich nur noch "Pol zu Pol-Mikrotubuli" vor, welche sich in der Mitte an ihrem dynamischen Plus-Ende antiparallel überlagern. Diese werden in der Mitte stabilisiert, und durch Polymerisation an den Mikrotubuli-Plus-Enden sowie Gleitbewegungen der antiparallel überlagernden Mikrotubuli kommt es zu einer Elongation der Spindel in Anaphase B (Abb. 1-2E) (Ding et al. 1993; Hagan 1998; Khodjakov et al. 2004). Nach der Spindelelongation in Anaphase B wird die Spindel von der Mitte aus abgebaut. Anschließend werden die Interphasen-Mikrotubuli wieder aufgebaut und die Zelle durchläuft die Zytokinese. Diese ist erst beendet nachdem die DNA bereits wieder repliziert wurde (Abb. 1-2F)(Hagan & Hyams 1988).

# **1.5** Komponenten der Chromosomensegregation

Die für die Segregation der Chromosomen relevanten Proteine sowie die komplexen Kontrollmechanismen der Mitose umfassen Hunderte von Komponenten(Musacchio & Hardwick 2002; Buscaino *et al.* 2010; Akiyoshi & Biggins 2012; Carmena *et al.* 2012). Einige der für diese Arbeit relevanten Komponenten werden im Folgenden vorgestellt. Dabei werde ich zunächst beschreiben, wie Zentromer-Chromatin definiert ist und welche Eigenschaften es aufweist (Kapitel 1.5.1).

Anschließend werden die Kinetochor-Komplexe von *S. pombe* sowie funktionelle Homologe in anderen Eukaryoten vorgestellt (Kapitel 1.5.2).InKapitel 1.5.3 werden Aufbau und Dynamik der mitotischen Spindel sowie Spindel assoziierte Proteine beschrieben. Des Weiteren werden die Wächter der Chromosomensegregation vorgestellt, welche die Korrektheit sowie die zeitliche Abfolge der Mitose regulieren(Kapitel 1.5.4).

## **1.5.1** Das Zentromer-Chromatin in Eukaryoten

Das Zentromer ist ein definierter Bereich auf dem Chromosom, der während der Mitose über Kinetochorproteine mit der mitotischen Spindel verknüpft wird.DieHiston-Komposition dieses Chromatin-Abschnittes unterscheidet diesen fundamental vom restlichen Chromatin. Größe und Beschaffenheit des Zentromer-Chromatins variieren innerhalb der Eukaryonten.Das sogenannte Punkt-Zentromer der Knospungshefe*S. cerevisiae* ist lediglich 125Bp groß und wird nur von einem Mikrotubulus der mitotischen Spindel gebunden(Pluta *et al.* 1995). Auf der anderen Seite erstrecken sich die Zentromere von Mensch und Maus über mehrere Megabasen-Paare. Da bei diesen Beispielen ein definierter Bereich des Chromosoms als Zentromer definiert wird, spricht man auch von regionalen Zentromeren(Buscaino *et al.* 2010). Regionale Zentromere im Menschen bestehen dabei hauptsächlich aus repetitiven AT-reichen α-Satelliten, die von SINEs (<u>s</u>hort intersperced <u>n</u>uclear <u>s</u>equences) und LINEs (long intersperced <u>n</u>uclear <u>s</u>equences)durchsetzt sind. Im Gegensatz zum Punkt-Zentromer in *S. cerevisiae* assoziieren in höheren Eukaryoten mehrere Mikrotubuli mit dem Zentromer-Chromatin(Schueler & Sullivan 2006; Buscaino *et al.* 2010).Im Gegensatz zu regionalen Zentromeren, ist in sogenannten holozentrischen Organismen, wie z.B. *C. elegans*, das gesamte Chromosom durchsetzt mit Zentromer-Abschnitten(Maddox *et al.* 2004).

Neben Zentromer-Abschnitten, die über ihre DNA-Sequenz bestimmt werden, können auch Bereiche des Chromosoms die Aufgabe eines Zentromers übernehmen, die keinerlei Charakteristika normaler Zentromer-Abschnitte, wie z.B. repetitiver Sequenzen, aufweisen. Diese sogenannten Neozentromere wurden beispielsweise in der Fruchtfliege, in humanen Zellen aber auch in derMais-Pflanze beschrieben (Maggert & Karpen 2001; Warburton 2004; Nasuda *et al.* 2005; Marshall *et al.* 2008).Neozentromere können entstehen, wenn der normale Zentromer-Abschnitt nicht mehr funktionell vorliegt. Die Deletion von Zentromer-Abschnitten in *S. pombe* und *Candida albicans* kann zur Formierung von Zentromeren in Bereichen führen, die keinerlei Sequenzähnlichkeit mit normalen Zentromer-Abschnitten aufweisen (Ishii *et al.* 2008; Ketel *et al.* 2009).

Trotz der unterschiedlichen Struktur und Größe der Zentromere verschiedener Organismen gibt es jedoch eine fundamentale Gemeinsamkeit, wodurch diese epigenetisch definiert werden: die

besondere Komposition der Nukleosomenin dieser Region, welche für die Chromosomensegregation essentiell ist (Stoler *et al.* 1995; Howman *et al.* 2000; Takahashi *et al.* 2000a; Blower & Karpen 2001; Oegema *et al.* 2001; Goshima *et al.* 2003). Nukleosomenorganisieren DNA zu Chromatin und bestehen im Wesentlichen aus den Histonen H2A, H2B, H3 und H4, wobei der Grad der Kompaktierung durch Modifikation einzelner Histone variiert werden kann (Kamakaka & Biggins 2005). Zentromer-Chromatinbesitzt neben kanonischen Nukleosomen zentromer-spezifische Nukleosomen, in denen das Histon H3 durch die Histon H3-Variante CENP-A/Cnp1 (Cnp1=CENP-A in *S. pombe*)ersetzt wird.Diese CENP-A/Cnp1-Nukleosomen werden für die Assemblierung des Kinetochors benötigt.

## **1.5.1.1** Das Zentromer-Chromatin in *S. pombe*

Das Zentromer-Chromatin in *S. pombe* ist abhängig vom Chromosom zwischen 35Kb (Chromosom I) -110Kb (Chromosom III) groß. Es ist regional aufgebaut und besteht aus einer inneren Region und einer äußeren Region (Abb. 1-3). Die innere Region gliedert sich in eine zentrale Domäne (*cnt*: "<u>cent</u>ral core domain"), welche von inneren repetitiven Sequenzen (*imr*L/R: "<u>i</u>nner<u>m</u>ost <u>r</u>epeats", Links/<u>R</u>echts) umgeben ist. Diese innere Region (*cnt* + *imr*) wird von äußeren repetitiven Sequenzen (*otr*L/R: "<u>out</u>ermost <u>r</u>epeats", <u>L</u>inks/<u>R</u>echts)flankiert (Abb. 1-3, grau).Im Gegensatz zum *imr*-Abschnittbesteht der *cnt*-Abschnitt aus nicht-repetitiven DNA-Sequenzen. Aufgrund der spezifischen CENP-A/Cnp1-Nukleosomen-Struktur in der inneren Region und der Kinetochor-Assemblierung findet sich hier eine spezielle Chromatin-Struktur vor. Diese spezielle Form des Chromatins führt ebenfalls zu einer transkriptionellen Inaktivität dieses Bereiches, so dass Markergene, die hier eingebracht werden, nur sehr schlecht transkribiert werden. Die Aufrechterhaltung dieser Chromatin-Struktur ist abhängig vom Einbau von CENP-A/Cnp1-Nukleosomen, deren Aufrechterhaltung wiederum abhängig ist von Komponenten des Sim4-Kinetochor-Komplexes(Wood *et al.* 2002; Pidoux & Allshire 2004).



#### Abb. 1-3 Schematische Darstellung des Zentromer-Chromatin Bereichs in S. pombe

Das Zentromer-Chromatin in *S. pombe* gliedert sich in eine innere und eine äußere Region. Die äußere Region (*otr*) besteht aus repetitiven Sequenzen, welche die innere Region links (L) und rechts (R) umgeben. Das Chromatin liegt hier als Heterochromatin vor, welches unter anderem für die Schwester-Chromatid Kohäsion benötigt wird. Die innere Region besteht aus *cnt*-Abschnitten sowie umgebenden inneren repetitiven *imr*-Abschnitten. Die innere Region besteht aus einer speziellen Chromatin-Struktur, welche durch den Einbau CENP-A/Cnp1-spezifischer Nukleosomen und der Kinetochor-Assemblierung gekennzeichnet ist.

Des Weiteren ist die Aufrechterhaltung der Chromatin-Struktur der inneren Region abhängig von der Heterochromatin-Struktur der äußeren repetitiven Sequenzen (*otr*) (Folco *et al.* 2008; Kagansky *et al.* 2009). Heterochromatin ist dadurch charakterisiert, dass die Histone unteracetyliert und methyliert vorliegen. DieMethylierung von Histon H3 wirddurch die Aktivität des siRNA-Signalweges aufrechterhalten (Abb. 1-4).Die RNA Polymerase II (Rdp1) transkribiert DNA-Sequenzen aus dem *otr*-Abschnittund produziert doppelsträngige RNA, welche von der Ribonuclease Dicer (Dcr1) in kleine doppelsträngige "short interfering"siRNAprozessiert wird. Die katalytische Untereinheit Ago1 des RITS-Komplexes ("RNA induced transcriptional silencing complex") kann diese siRNAs binden und wird in Abhängigkeit von diesen zum Zentromer rekrutiert.Der RITS-Komplex wiederum rekrutiert unter anderem die Histon-Methyl-Transferrase Clr4, welche das Lysin 9 von Histon H3 methyliert. Diese methylierten Histone können durch die Chromodomäne von Heterochormatin-Proteinen (HPs) gebunden werden. Das HP1 Homolog in *S. pombe* Swi6 rekrutiert Kohäsine, welche die Schwester-Chromatid-Kohäsion während der frühen Mitose aufrechterhält, bis diese in der Anaphase A gespalten werden (Djupedal *et al.* 2009; Alper *et al.* 2012; Reyes-Turcu & Grewal 2012). Einleitung



# Abb. 1-4 Die Aufrechterhaltung des Zentromer-Heterochromatinsdes *otr*-Abschnitts erfolgt in Abhängigkeit des siRNA-Signalweges

Die Abbildung zeigt stark schematisch einzelne Schritte der Ausbildung des Heterochromatins in den äußeren repetitiven Bereichen des Zentromer-Chromatins. Derotr-Abschnittwird von der RNA Polymerase II (Rdp1) transkribiert. Diese Transkripte werden durch Dicer (Dcr1) zu siRNA prozessiert. Ago1 wird in Abhängigkeit dieser siRNA rekrutiert. Dadurch erfolgt unter Anderem eine Rekrutierung der Histon Methyl Transferrase Clr4, welche Histon H3 an Lysin 9 methyliert (H3K9me). Diese Methylierung führt zur Rekrutierung von Heterochromatin-Proteinen wie Swi6. Das Heterochromatin der äußeren Region wird ebenfalls für den Aufbau der inneren Region benötigt.

Die Heterochromatin-Struktur und die Swi6 Rekrutierung der äußeren repetitiven Sequenzen ist für die Rekrutierung regulatorischer Komponenten der Chromosomensegregation relevant. Zum einen werden die Shugoshin Proteine Sgo1 und Sgo2 zum Zentromer rekrutiert. Diese erhalten die Schwester-Chromatid-Kohäsion, werden aber auch für die korrekte bipolare Verknüpfung der Chromosomen mit der mitotischen Spindel benötigt (Watanabe & Kitajima 2005; Kawashima *et al.* 2007; Kawashima *et al.* 2010). Zum anderen wird Swi6 zusammen mit den Shugoshin Proteinen für die Rekrutierung des "Chromosomal PassengerComplexes" (CPC) zum Zentromer benötigt (Kawashima *et al.* 2007; Vanoosthuyse *et al.* 2007).Der CPC ist ein regulatorischer Proteinkomplex, der durch seine Lokalisationsänderungen im Verlauf der Mitose die Chromosomen-Kondensation, die korrekte bipolare Verknüpfung der Chromosomen mit der mitotischen Spindel sowie die Ausbildung des kontraktilen Rings während der Zytokinese reguliert (Kapitel 1.5.4.2)(Carmena *et al.* 2012).

Trotz der hohen Divergenz der Zentromere zwischen den Spezies konnte CENP-A/Cnp1als epigenetischer Marker aller bisher untersuchten Zentromere identifiziert werden.

# 1.5.1.2 Die Histon H3- Variante CENP-A/Cnp1

Aufgrund der Tatsache, dass CENP-A/Cnp1 ebenfalls zu Neozentromeren rekrutiert wird sowie aufgrund der Sequenz-Unterschiede eukaryotischer Zentromere wird postuliert, dass die Rekrutierung von CENP-A/Cnp1 nicht sequenzabhängig erfolgen kann. Des Weiteren führt die Überexpression von CENP-A/Cnp1 dazu, dass CENP-A/Cnp1-Nukleosomen auch in Zentromer ferne Bereiche eingebaut werden. Es wird daher davon ausgegangen, dass Bereiche, in denen ein Einbau von CENP-A/Cnp1-Nukleosomen erfolgen soll, zuvor durch andere Faktoren markiert werden müssen (Mehta *et al.* 2010). Die genauer stöchiometrische Zusammensetzung CENP-A/Cnp1 beinhaltender Nukleosomen wird kontrovers diskutiert, mehrere Evidenzen deuten aber auf eine Oktamer-Struktur hin, in der zwei CENP-A/Cnp1 Proteine die zwei H3 Histone ersetzen und zusammen mit je zwei Kopien der Histone H4, H2A und H2B vorliegen (Abb. 1-5) (Shelby *et al.* 1997; Yoda *et al.* 2000; Foltz *et al.* 2006; Black *et al.* 2007; Camahort *et al.* 2009; Sekulic *et al.* 2010). Es werden aber auch stöchiometrisch abweichende Varianten von diesem Modell diskutiert bis hin zu Modellen, bei denen noch weitere CENP-A/Cnp1 spezifische Chaperone mit in den Nukleosomen-Kern eingelagert werden (Dalal *et al.* 2007; Mizuguchi *et al.* 2007; Furuyama & Henikoff 2009). Aktuelle Daten aus *S. cerevisiae* deuten darauf hin, dass die Stöchiometrie CENP-A/Cnp1 spezifischer Nukleosomen zellzyklusabhängig oszilliert. Es wird postuliert, dass CENP-A/Cnp1-Nukleosomen nur in der Anaphase als Oktamer vorliegen. Dagegen sollen über den restlichen Zellzyklus CENP-A/Cnp1-Nukleosomen als sogenanntes Hemisom vorliegen, welche von jedem Histon nur je eine Kopie enthält(Shivaraju *et al.* 2012).



#### Abb. 1-5 Oktamer-Struktur eines CENP-A/Cnp1-Nukleosoms

Schematisches Modell eines CENP-A/Cnp1-Nukleosoms mit einer Oktamer-Struktur bestehend aus 2 CENP-A/Cnp1 Proteinen sowie je 2 Kopien der Histone H4, H2A und H2B.

Abgewandelt nach (Black & Cleveland 2011).

Der zeitliche Einbau von CENP-A/Cnp1 ist zwischen eukaryotischen Organismen verschieden. Zum Beispiel erfolgt die Einlagerung von CENP-A/Cnp1 in Humanzellen bereits zum Ende der Mitose in der Telophase und setzt sich in der frühen G1-Phase fort (Jansen *et al.* 2007). In *S. cerevisiae* erfolgt die Einlagerung neuer CENP-A/Cnp1-Nukleosomen nur während der Replikation in der S-Phase (Pearson *et al.* 2004). Für *S. pombe* ist ein biphasischer Einbau in der S- und späten G2-Phase beschrieben (Takayama *et al.* 2008). Für diesen Einbau wurden in *S. pombe* zwei relevante Mechanismen beschrieben. Zum einen wird das Kinetochorprotein Mis6 und somit der Sim4-Komplex für den Einbau von CENP-A/Cnp1 in S- und G2-Phase benötigt (Takahashi *et al.* 2000a; Takahashi *et al.* 2005). Des Weiteren wird für den Einbau von CENP-A/Cnp1 während der S-Phase ist eng an die DNA-Replikation gekoppelt (Gonzalez *et al.* 2013). Es wird postuliert, dass der zeitlich begrenzte Einbau von CENP-

A/Cnp1-Nukleosomen in Abhängigkeit des CENP-A/Cnp1 Chaperons Scm3 erfolgt, welches CENP-A/Cnp1 direkt binden kann (Pidoux *et al.* 2009; Williams *et al.* 2009). Außerdem ist die Rekrutierung von CENP-A/Cnp1 zum Zentromer abhängig von den Kinetochorproteinen Mis16 und Mis18, indem diese die Deacetylierung von Histonen in der inneren Zentromerregion aufrechterhalten (Hayashi *et al.* 2004). Liegen Komponenten des Sim4-Kinetochor-Komplexes in *S. pombe* nicht mehr funktionell vor, ist der Einbau von CENP-A/Cnp1 ebenfalls fehlerhaft und umgekehrt erfolgt die Rekrutierung des Sim4-Komplex in Abhängigkeit von CENP-A/Cnp1 (Takahashi *et al.* 2000a; Pidoux *et al.* 2003).

# 1.5.2 Komponenten des Kinetochors

#### 1.5.2.1 DerSim4-Komplex

Mittels Affinitätsaufreinigung wurde der 13 Komponenten umfassende Sim4-Komplex isoliert. Dieser besteht aus den Proteinen Dad1, Fta1 bis Fta7, Mal2, Mis6, Mis15, Mis17 und dem Namensgeber dieses Komplexes:dem Sim4 Protein. Alle diese Proteine lokalisieren während des gesamten Zellzyklus konstitutiv am Kinetochor (Liu *et al.* 2005). Dieser Komplex bindet dort in Abhängigkeit von den Proteinen Mis16 und Mis18 (Hayashi *et al.* 2004).

Von den 13 Komponenten dieses Komplexes wurden bis dato8 näher charakterisiert. Bis auf Dad1 haben alle getesteten Komponenten gemeinsam, dass es sich um essentielle Komponenten der Chromosomensegregation handelt. Um dennoch die Funktion dieser Proteine genauer untersuchen zu können, arbeiten wir mit konditional-letalen Mutantenstämmen. Bei diesen handelt es sich um temperatursensitive Mutantenstämme. Diese können bei einer niedrigen Temperatur (permissive Temperatur) wachsen, was eine Kultivierung dieser Stämme ermöglicht. Erst bei höheren Temperaturen (restriktive Temperatur) sterben die Zellendieser Stämme und können auf ihren Phänotyp hin untersucht werden.Konditional letale Mutantenstämme für Sim4-Komplex-Komponenten zeigen massive Chromosomensegregationsdefekte. Des Weiteren ändert sich in diesen Mutantenstämmen die Chromatin-Struktur der inneren Region. Dies liegt vermutlich daran, dass CENP-A/Cnp1-Nukleosomen nicht zur inneren Zentromerregion rekrutiert werden bzw. dort stabil eingebaut werden, da bis auf Dad1 alle bisher getesteten Komponenten für die Lokalisation von CENP-A/Cnp1benötigt werden(Saitoh et al. 1997; Takahashi et al. 2000b; Jin et al. 2002; Pidoux et al. 2003; Hayashi et al. 2004; Kerres et al. 2006). Es fehlen jedoch genaue Studien in S. pombedarüber, welche spezifischen mitotischen Aufgaben die einzelnen Komponenteninnerhalb des Sim4-Komplexes übernehmen.

Die publizierten Komponenten des Sim-4-Komplexes sind in Abb. 1-6 (blau) schematisch dargestellt. Da die genaue Hierarchie dieser Proteine nicht bekannt ist, wurde die Position der Proteine für dieses Modell willkürlich gewählt. Die Pfeile repräsentieren einige der Lokalisationsabhängigkeiten, die zwischen den Proteinen des Sim4-Komplexes bestehen. So besteht beispielsweise beidseitige Lokalisationsabhängigkeit zwischen den Proteinen Mis6, Mis15 und Mis17(Hayashi *et al.* 2004).Diese drei Proteine werden ebenfalls für die Rekrutierung von Fta2 benötigt.Zwischen Mal2 und Fta2 besteht ebenfalls eine beidseitige Lokalisationsabhängigkeit. Da für diese beiden Proteinen neben einer direkten physischen Interaktion auch eine einzigartige genetische Interaktion durch Charakterisierung der konditional letalen Mutantenstämme nachgewiesen werden konnte, werden diese auch als Subkomplex beschrieben. Des Weiteren wird Fta2 für die Lokalisation von Sim4 benötigt.(Kerres *et al.* 2006).Lokalisationsabhängigkeit sowie direkte physische Interaktion besteht auch zwischen den Proteinen Mis6 und Sim4 (Pidoux *et al.* 2003).



Abb. 1-6Schematische Darstellung der Zentromer-Chromatin - Kinetochor - Mikrotubuli-Verknüpfung über denSim4-Komplex

Der Sim4-Komplex assembliert in Abhängigkeit von CENP-A/Cnp1 spezifischen Nukleosomen sowie dem Mis16-Mis18-Komplex an der inneren Zentromerregion (*cnt* + *imr*). Dieser rekrutiert über Dad1 den DASH-Komplex während der Mitose zum Kinetochor. Die genaue Anordnung bzw. Hierarchie der einzelnen Komponenten ist noch unklar. Die Pfeile repräsentieren einige der bisher beschriebenen Lokalisationsabhängigkeiten. Zwischen den Proteinen Mis6, Mis15 und Mis17 besteht beidseitige Lokalisationsabhängigkeit. Einen Subkomplex bilden Mal2 und Fta2. Die Lokalisation von Fta2 ist ebenfalls abhängig von Mis6, Mis15 und Mis17. Lokalisationsabhängigkeit besteht auch zwischen Mis6 und Sim4. Des Weiteren wird Fta2 für die Lokalisation von Sim4 benötigt.Da bisher noch nicht alle möglichen Konstellationen getestet wurden, sind diese Daten noch unvollständig. Der Sim4-Komplex wird für die Rekrutierung der Spindelkontrollpunkt-Komponente Mad2 benötigt. Für das Fta1 Protein ist eine Interaktion mit dem Kinetochorprotein Cnp3 beschrieben.

MitMis6 und Sim4 wurde gezeigt, dass der Sim4-Komplex für die Rekrutierung des Mad2 Proteins verantwortlich ist, welches für die Aktivität des mitotischen Spindelkontrollpunktes benötigt wird (Kapitel 1.5.4.1). Mad2 bindet Kinetochore zu Beginn der Mitose, wenn diese noch nicht mit Mikrotubuli verbunden sind und verhindertden vorzeitigen Eintritt in die Anaphase (Saitoh et al. 2005; Takahashi et al. 2005). Für die anderen Proteine des Sim4-Komplexes wurde dies noch nicht untersucht. Korrespondierend dazu wird der Mad2-abhängigeSpindelkontrollpunktnicht für das Überleben von Sim4-Komplex-Mutantenstämmen benötigt (Jin et al. 2002; Kerres et al. 2006). Dennoch können Sim4-Komplex-Mutantenstämmen per setransient in der Metaphase arretieren (Goshima et al. 1999; Jin et al. 2002). Dieser transiente Arrest wird unter anderem durch das Spindelkontrollpunkt-Protein Mph1 vermittelt. Funktionsverlust dieses zusätzlichen Kontrollmechanismus ist letal für Mutantenstämme des Sim4-Komplexes(Jin et al. 2002; Kerres et al. 2006). Für das Protein Fta1 wurde eine Interaktion mit einem weiteren Kinetochorprotein (Cnp3)beschrieben. Cnp3 rekrutiert einen weiteren Proteinkomplex, für den eine Funktion bei der korrekten Orientierung des Kinetochors während der Mitose beschrieben ist. Es wird spekuliert, dass diese Orientierung durch die Verknüpfung mehrerer Mikrotubuli-Bindestellen an einem Kinetochor vermittelt wird(Gregan et al. 2007; Tanaka et al. 2009).

Für den Sim4-Komplex ist bisher nur eine Verbindung mit der mitotischen Spindel beschrieben. Der Sim4-Komplex rekrutiert über Dad1den DASH-Komplex zum Kinetochor, bei dem es sich um einen Mikrotubuli-bindenden Multi-Proteinkomplex handelt (Abb. 1-6)(Sanchez-Perez *et al.* 2005). Da der DASH-Komplex in *S. pombe*jedoch nicht essentiell ist,wird vermutet, dass noch weitere Verknüpfungen zwischen dem Sim4-Komplex und der mitotischen Spindel existieren.

Homologe von Proteinen des Sim4-Komplexes wurden ebenfalls ausführlich in Vertebraten und *S. cerevisiae* beschrieben. In*S. cerevisiae*wird der Sim4-Komplex als COMA- und inVertebraten als CCAN-Komplex bezeichnet. Da einige Charakteristika dieser Komplexe in *S. pombe* noch nicht untersucht wurden, werden diese im Folgenden vorgestellt.

## 1.5.2.1.1 Der COMA-Komplex in S. cerevisiae

Der COMA-Komplex in *S. cerevisiae* besteht aus den Proteinen Okp1,Ctf19, Mcm21 und Ame1. Bei Mcm21 handelt es sich um das Mal2-Homolog aus *S. pombe*. In *S. cerevisiae* sind nicht alle

Komponenten dieses Komplexes essentiell, zeigen aber erhöhte Chromosomen-Verlustraten und Defekte bei der Kohäsion der Schwesterchromatiden (Ortiz *et al.* 1999; Poddar *et al.* 1999; Measday *et al.* 2002; De Wulf *et al.* 2003; Fernius & Marston 2009). Mcm21 wird essentiell, wenn der, Chromosomal Passenger Complex" (CPC) nicht mehr funktionell vorliegt, der die Qualität der Kinetochor-Mikrotubuli-Verknüpfung überprüft. Liegen falsch verknüpfte Kinetochore vor, kann der CPC diese durch Phosphorylierung von Substraten lösen und damit korrigieren. Ame1 (das*S. pombe* Mis17 Homolog) interagiert physisch mit dem CPC und wird für dessen Lokalisation am Kinetochor und die Korrektur falscher Verknüpfungen benötigt (Amaro & Meraldi 2009; Knockleby & Vogel 2009; Ng *et al.* 2009). Des Weiteren wird Mcm21 für die Lokalisierung des CPC in die Spindelmittewährend der Anaphase B benötigt (Vizeacoumar *et al.* 2010). Das Protein Bub3, eine weitere Komponente des Spindelkontrollpunktes, bindet vermutlich über den COMA-Komplex am Kinetochor (De Wulf *et al.* 2003; Knockleby & Vogel 2009).

#### 1.5.2.1.2 Der CAAN-Komplex in Vertebraten

In Vertebraten wirdder*S. pombe*Sim4-Komplex als CCAN-Komplex (Constitutive Centromere-Associated Network) bezeichnet. Dieser besteht aus mindestens 16Proteinen: CENP-C, M, N, U, T, W, H, I, K, L, O, P, Q, R, S, und CENP-X (Verdaasdonk & Bloom 2011). Für diesen Komplex wurden mit Zelllinien verschiedener Organismen (Mensch, Frosch und Huhn) ausführliche Studien durchgeführt, die diesen in verschiedene Subkomplexe unterteilen. Die meisten der CCAN-Proteine aus Vertebratenbesitzen homologe Proteine in *S. pombe* (Tabelle 1).

Bei den CCAN-Komponenten CENP-L, -M und -N handelt es sich um Chromatin-nahe Proteine, da diese zum Teil CENP-A/Cnp1-Nukleosomen direkt binden können als auch für deren Lokalisation verantwortlich sind (Foltz *et al.* 2006; Okada *et al.* 2006; Carroll *et al.* 2009).Das Protein CENP-C kann direkt Zentromer-Chromatin als auchCENP-A/Cnp1-Nukleosomen binden(Yang *et al.* 1996; Carroll *et al.* 2010; Guse *et al.* 2011).

Einen Chromatin-nahen Subkomplex, bildet der CENP-T/W/S/X-Subkomplex, da dieser direkt Zentromer-Chromatin über Histon-artige Strukturen binden kann. Es wird spekuliert, dass dieser Komplex eine Verknüpfung zwischen Zentromer-Abschnitten, die Histon-H3- bzw. CENP-A/Cnp1-Nukleosomen enthalten, herstellt.Dieser Subkomplex wird für die Rekrutierung der Subkomplexe CENP-H und CENP-O benötigt.(Hori *et al.* 2008a; Ribeiro *et al.* 2010; Nishino *et al.* 2012; Stellfox *et al.* 2013).

Dem CENP-H-Subkomplex werden CENP-H, I und K zugeordnet. Dieser Subkomplex ist ein Bindeglied zwischen Chromatin-nahen und Spindel-nahen Komponenten, da dieser für die Rekrutierung von

CENP-A/Cnp1-Nukleosomen als auchfür die Rekrutierung des CENP-O-Subkomplexes benötigt wird(Okada *et al.* 2006; McClelland *et al.* 2007; Hori *et al.* 2008b; Verdaasdonk & Bloom 2011; Eskat *et al.* 2012).

CCAN-	Vertebraten	S. pombe
Subkomplex		
	CENP-A*	Cnp1*
	CENP-C	Cnp3 <sup>#</sup>
	CENP-L	Fta1
	CENP-M	Mis17
	CENP-N	Mis15
	CENP-H	Fta3
CENP-H- Subkomplex	CENP-I	Mis6
	CENP-K	Sim4
	CENP-T	Cnp20 <sup>#</sup>
CENP-T/W/S/X-	CENP-W	New1 <sup>#</sup>
Subkomplex	CENP-S	Mhf1 <sup>#</sup>
	CENP-X	Mhf2 <sup>#</sup>
	CENP-O	Mal2
CENP-O-	CENP-P	Fta2
Subkomplex	CENP-Q	Fta7
	CENP-U	Fta4

# Tabelle 1: Homologe Proteine des S. pombeSim4- und des CCAN-Komplexes ausVertebraten

Soweit bekannt, sind die jeweils homologen Proteine der beiden Komplexe nebeneinander gezeigt. Des Weiteren sind die Subkomplexe des CCAN mit den jeweiligen Komponenten angegeben. \*: Cnp1 und CENP-A sind nicht als Komponenten des Sim4- bzw. CCAN-Komplexes beschrieben. <sup>#</sup>: Diese Proteine sind in *S. pombe* nicht als Komponenten des Sim4-Komplexes beschrieben.

Dem CENP-O-Subkomplex werden die Proteine CENP-O, -P, -Q und -U zugeordnet. Dieser Subkomplex befindet sich in der Lokalisations-Hierarchie des CCAN am meisten stromabwärts. Der CENP-O-Subkomplex kann den CCAN vermutlichdurch direkte Bindung an Mikrotubuli mit der mitotischen Spindel verbinden(Amaro *et al.* 2010; Hua *et al.* 2011).

Im Gegensatz zum CCAN-Komplex wurde für den*S. pombe* Sim4-Komplex noch keine direkte Bindung an Mikrotubuli beschrieben. Die einzige bisher beschriebene Verknüpfung des Sim4-Komplexes mit der mitotischen Spindel erfolgt hier über den DASH-Komplex (Sanchez-Perez *et al.* 2005).

# 1.5.2.2 Der DASH-Komplex

Der DASH-Komplex ist ein Mikrotubuli bindender Multiproteinkomplex bestehend aus 10 Komponenten, der in Abhängigkeit des Sim4-Komplexes während der Mitose zum Kinetochor rekrutiert wird (Liu *et al.* 2005; Sanchez-Perez *et al.* 2005). Obwohl dieser Komplex in *S. pombe* nicht essentiell ist, zeigen Deletionsstämme von Komponenten dieses Komplexes erhöhte Segregationsdefekte, arretieren transient in der Metaphase und verursachen eine langsamere Segregationsgeschwindigkeit der Schwesterchromatiden in Anaphase A (Sanchez-Perez *et al.* 2005; Kobayashi *et al.* 2007; Gao *et al.* 2010). Des Weiteren wird der DASH-Komplex essentiell, wenn bestimmte Kinetochor-Komponenten, mitotische Kinesine oder Komponenten des mitotischen Spindelkontrollpunktes nicht mehr funktionell vorliegen(Sanchez-Perez *et al.* 2005; Kobayashi *et al.* 2007; Vanoosthuyse *et al.* 2009).

In *S. cerevisiae* bilden mehrere Kopien des DASH-Komplexes*in vitro* eine Ringstruktur um Mikrotubuli nahe derenPlus-Ende(Miranda *et al.* 2005; Westermann *et al.* 2005).Es wird vermutet, dass die Bewegung des DASH-Komplexes in Richtung des Mikrotubuli-Minus-Endes durch die Depolymerisation am dynamischen Plus-Ende des Mikrotubulus erfolgt (Westermann *et al.* 2006; Efremov *et al.* 2007). Für diese Bewegung ist allerdings nicht die Ringstruktur entscheidend, da auch kleinere DASH-Oligomere als nicht-Ring Form eine dynamische Bindung an Mikrotubuli aufweisen (Gestaut *et al.* 2008).In *S. pombe* wurde gezeigt, dass der DASH-Komplex als nicht-Ring Form existiert (Gao *et al.* 2010). Die Beobachtung, dass der DASH-Komplex in *S. cerevisiae* als auch in *C. albicans* im Gegensatz zu *S. pombe* essentiell ist, wird damit begründet, dass in*S. cerevisiae* wie auch in*C. albicans*Kinetochore nur durch einen Mikrotubulus gebunden werden und dem DASH-Komplex daher eine essentielle Funktion bei der Erhaltung dieser Bindung zukommt (Akiyoshi & Biggins 2012).

Die Bindung des DASH-Komplexes an Mikrotubuli sowie dessen Interaktion mit dem Ndc80-Komplex wird in *S. cerevisiae* von derAurora B Kinase, der katalytischen Untereinheit des CPC,durch Phosphorylierung von Dam1 negativ reguliert (Cheeseman *et al.* 2002; Shang *et al.* 2003; Gestaut *et al.* 2008). Die Proteine des DASH-Komplexes sind in höheren Eukaryonten nicht konserviert. Es wird aber vermutet, dass der Ska-Komplex, welcher in Humanzellen identifiziert wurde, ein funktionelles Homolog darstellt (Buttrick & Millar 2011).Der Ska-Komplex kann Mikrotubuli binden und wird für die korrekte Ausrichtung der Chromosomen benötigt (Jeyaprakash *et al.* 2012).

#### 1.5.2.3 Der NMS-Komplex

Die Hauptverbindung mit der mitotischen Spindel wird in *S. pombe* durch den hochkonservierten NMS-Kinetochor-Komplex (KMN-Komplex in höheren Eukaryonten)vermittelt. Dieser gliedertsich in den Ndc80-, den MIND- und den Spc7-Subkomplex (Abb. 1-7)(Obuse *et al.* 2004; Liu *et al.* 2005; Jakopec *et al.* 2012). Im Gegensatz zum Sim4-Komplex wird der NMS-Komplex unabhängig von CENP-A/Cnp1-Nukleosomen zum Kinetochor rekrutiert, und umgekehrt wird der NMS-Komplex nicht für die Rekrutierung von CENP-A/Cnp1-Nukleosomen benötigt (Goshima *et al.* 1999; Hayashi *et al.* 2004; Obuse *et al.* 2004; Kerres *et al.* 2007; Jakopec *et al.* 2012).

In Humanzellen sowie in *Drosophila* erfolgt die Rekrutierung des KMN-Komplexes über die Interaktion zwischen dem MIND-Komplexund dem Zentromer-Chromatin assoziierten CENP-C Protein (Przewloka *et al.* 2011; Screpanti *et al.* 2011). Des Weiteren wird der Ndc80-Komplex in *S. cerevisiae*wie auch in Vertebraten durch dasZentromer-Chromatin assoziierte CENP-T rekrutiert(Schleiffer *et al.* 2012; Malvezzi *et al.* 2013; Nishino *et al.* 2013). Ob dies in *S. pombe* konserviert ist, ist bisher nicht bekannt. Der MIND-Komplex in *S. pombe* wird für die Rekrutierung der Mikrotubuli-assoziierten Subkomplexe Ndc80 und Spc7benötigt(Kerres *et al.* 2007; Jakopec *et al.* 2012). Die Mikrotubuli-Assoziation des Ndc80-Komplexes erfolgt dabei zum einen über direkte Bindung des Ndc80 Proteins an Mikrotubuli als auch indirekt durch Rekrutierung des Mikrotubuli-Plus-Endes bindenden Proteins Dis1. Die Bindung von Ndc80 an die Mikrotubuli wirdnegativ mittels Phosphorylierung durch die Aurora B Kinase (CPC) reguliert(Hsu & Toda 2011; Akiyoshi & Biggins 2012).



Abb. 1-7: Schematische Darstellung der Zentromer-Chromatin - Kinetochor - Mikrotubuli-Verknüpfung in S. pombe

Der NMS-Komplex wird unabhängig von CENP-A/Cnp1 spezifischen Nukleosomen zum Zentromer rekrutiert. In *S. pombe* ist bisher nicht bekannt, wie die Verknüpfung des NMS-Komplexes mit Zentromer-Chromatin

vermittelt wird. Komponenten des NMS-Komplexes interagieren direkt mit der mitotischen Spindel (Ndc80 und Spc7) als auch indirekt über Mikrotubuli bindende Proteine. Diese indirekten Interaktionen werden über Ndc80 mit Dis1 als auch über Spc7 mit Mal3 vermittelt. Für den NMS-Komplex sind nur die drei Subkomplexe MIND, Ndc80 und Spc7 dargestellt.

Der Spc7-Subkomplex besteht aus Spc7 und dem erst kürzlich in unserer Arbeitsgruppe identifizierten Sos7 Protein (Jakopec *et al.* 2012). Für das Spc7 Homolog aus *C. elegans* wurde eine direkte Bindung an Mikrotubuli *in vitro* beschrieben (Akiyoshi & Biggins 2012). Daten aus unserem Labor deuten ebenfalls darauf hin, dass Spc7 in *S. pombe* direkt Mikrotubuli binden kann (Kerres *et al.* 2007; Jakopec 2011). Eine indirekte Bindung von Spc7 mit der mitotischen Spindel wurde über das Mikrotubuli-Plus-Ende assoziierte Protein Mal3 beschrieben, welches durch Spc7 zum Kinetochor rekrutiert wird (Kerres *et al.* 2004). Erst kürzlich wurde gezeigt, dass die Phosphorylierung von Spc7 durch die Mph1 Kinase für die Rekrutierung weiterer Komponenten des Spindelkontrollpunktes und somit für dessen Aktivität benötigt wird (Shepperd *et al.* 2012; Yamagishi *et al.* 2012).

Über den Kinetochor erfolgt während der Mitose die Verknüpfung der Chromosomen an die mitotische Spindel, deren Aufbau und Dynamik im Folgenden beschrieben wird.

# **1.5.3** Die mitotische Spindel

Mikrotubuli werden aus Heterodimeren, bestehend aus  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin Untereinheiten, zusammengesetzt, welche Filamente in Form hohler Röhren bilden (Akhmanova & Steinmetz 2008). In *S. pombe* kodieren die zwei Gene  $nda2^+$  und  $atb2^+$  für  $\alpha$ -Tubulin und $nda3^+$  für  $\beta$ -Tubulin. Die Expression von  $\alpha$ -Tubulin durch  $nda2^+$  wird in Abhängigkeit der zellulären  $\alpha$ -Tubulin-Konzentration reguliert. Im Gegensatz zu  $nda2^+$  ist  $atb2^+$  nicht essentiell und wird konstitutiv exprimiert(Toda *et al.* 1984; Adachi *et al.* 1986).

Während der Interphase sind die Mikrotubuli als Bündel entlang der Längsachse der Zelle organisiert. Dabei ist das undynamischeMinus-Endeder Mikrotubuli am Mikrotubuli-Organisations-Zentrum (MTOC) außerhalb des Zellkerns gebunden. Das dynamische Mikrotubuli-Plus-Ende ragt in die Zelle hinein und untergeht einer Abfolge von Wachsen (Polymerisation) und Schrumpfen (Depolymerisation) durch Einlagerung bzw. Dissoziation von Tubulin-Dimeren, ein Mechanismus, der "dynamische Instabilität" genannt wird. Bei Eintritt in die Mitose erfolgt eine massive Reorganisation der Mikrotubuli, da zu diesem Zeitpunkt die Interphasenmikrotubuli vollständig depolymerisieren und innerhalb des Kerns die mitotische Spindel aufgebaut wird(Snaith *et al.* 2010; Akiyoshi & Biggins 2012). Die Erscheinungsform der mitotischen Spindel kann in 3 Phasen eingeteilt werden (Abb. 1-8). Phase 1 beinhaltet die Prometaphase, in der die Spindel zwischen den separierten SPBs aufgebaut wird und bis zu einer Länge von ca. 1,5µm elongiert. Phase II beinhaltet Metaphase bis Anaphase A, bei der die Spindellänge relativ konstant bleibt undnur sehr langsam bis zu einer Länge von ca.2-3 µm elongiert. Phase III repräsentiert die Anaphase B,in der die rapide Elongation der Spindel bis zu einer Länge von 10-12 µm erfolgt (Nabeshima *et al.* 1998; Mallavarapu *et al.* 1999).





Links: Schematische Darstellung der 3 Spindelphasen in *S. pombe*. Grün: Mikrotubuli; Grau: Spindelpole (SPBs) Spindelphasen: I: Spindel baut sich in der Prometaphase auf und elongiert bis zu einer Metaphase-typischen Länge. II: Spindel verbleibt in der Metaphase und Anaphase A bei einer konstanten Länge. III: Die Spindel elongiert in Anaphase B zu den Zellenden. Rechts: Beispiele lebender Tubulin-GFP expremierenden Zellen mit dem Schema links entsprechendenrepräsentativen Erscheinungsformen. Bar: 2µm

Für die korrekte Segregation der Chromosomen muss vor Eintritt in die Anaphase A eine bipolare Verknüpfung der Chromosomen erfolgen, bei der jedes Schwester-Chromatid nur mit den Mikrotubuli eines Pols verbunden ist.Zu Beginn der Mitose werden die Chromosomen zunächst nur von den Mikrotubuli eines Spindelpols gebunden.Die Chromosomen werden dann entlang des Mikrotubulus in Richtung des Spindelpols transportiert und anschließend am Mikrotubuli-Plus-Ende des depolymerisierenden Mikrotubulus gebunden. Gleichzeitig können weitere Bindungen mit den Mikrotubuli des gleichen oder des entgegengesetzten Spindelpols erfolgen(Tanaka *et al.* 2005). Während dieser zufälligen Bindung der Mikrotubuli an die Kinetochore treten oft falsche Verknüpfungen in Form von monotelischen,syntelischen oder merotelische Verknüpfungenauf (Abb. 1-9).Bei einer monotelischen Verknüpfung ist nur ein Schwester-Chromatid mit den Mikrotubuli eines Spindelpols verbunden. Komponenten des mitotischen Spindelkontrollpunktes finden sich konzentriert an dem ungebundenen Kinetochor vor und verhindern den Eintritt in die Anaphase A(Musacchio & Salmon 2007; De Wulf *et al.* 2009). Bei syntelischenVerknüpfungen sind beide Schwester-Chromatide mit Mikrotubuli des gleichen Spindelpols verbunden, wohingegen bei

merotelischenVerknüpfungen ein einzelnes Schwesterchromatid mit Mikrotubuli von beiden Spindelpolen gebunden ist. In beiden Fällen liegen zwar keine ungebundenen Kinetochore vor, bei denen eine Anreicherung von Spindelkontrollpunkt Komponenten erfolgen könnte, dennoch liegt bei beiden Verknüpfungen keine bipolare Spannung zwischen den Kinetochoren vor, welche durch die Distanz der Schwesterchromatiden zueinander vermittelt wird. Dies führt vermutlich ebenfalls zur Aktivierung des Spindelkontrollpunktes und verhindert den Eintritt in die Anaphase A. Durch Phosphorylierung mehrerer Substrate kann der "Chromosomal Passenger Complex" falsche Verknüpfungen lösen und erzeugt ungebundene Kinetochore, welche anschließend korrekt bipolar (Abb. 1-9)ausgerichtet werden können (Tanaka *et al.* 2005; Musacchio & Salmon 2007; Gregan *et al.* 2011).





Monotelisch: Nur ein Schwesterchromatid ist mit den Mikrotubuli eines Spindelpols verbunden, was zu einer Fehlsegregation in Anaphase A führt. Syntelisch: Beide Schwesterchromatiden sind mit den Mikrotubuli nur eines Spindelpols verbunden, was ebenfalls zu einer Fehlsegregation führt. Merotelisch: Ein Schwesterchromatid ist mit den Mikrotubuli beider Spindelpole verbunden. Bei dieser Art von Verknüpfung wird dieses Chromatid verzögert oder falsch zu einem der Spindelpole transportiert. Bipolar: Beide Schwesterchromatiden sind nur mit den Mikrotubuli des entgegengesetzten Spindelpols verbunden, was in Anaphase A zu einer korrekten Segregation der Schwesterchromatiden führt.

Nachdem die Schwesterchromatiden in der Anaphase A durch Depolymerisation der "Pol zu Kinetochor" Mikrotubuli an deren Plus-Endezu den Polen segregiert sind, kommt es zu einer Änderung der Struktur der Spindelmitte sowie zu einer veränderten Mikrotubuli- Dynamik(Ding et al. 1993; Rogers et al. 2005). In der Region, in der die antiparallel ausgerichteten Mikrotubuli beider Spindelpole überlagern, kommt es zu einer Stabilisierung durch die Bündelung der Mikrotubuli durch das Protein Ase1 (Loiodice et al. 2005; Yamashita et al. 2005).Durch Polymerisation der Mikrotubuli am Mikrotubuli-Plus-Ende in der Mitte der Spindel und dem Auseinandergleiten der antiparallel gebündelten Mikrotubuli die Spindel die elongiert in Anaphase Β, so dass

Schwesterchromatidenzusammen mit den Spindelpolen zu den Zellenden segregieren. Anschließend wird die Spindel in der Telophase von der Mitte aus abgebaut und das Interphasen Mikrotubuli Zytoskelett wird aufgebaut (Hagan & Hyams 1988; Mallavarapu *et al.* 1999; Sagolla *et al.* 2003).

# 1.5.3.1 Spindel-Mikrotubuli assoziierte Proteine

#### 1.5.3.1.1 Mitose-relevante Motorproteine

Kinesine sind Motorproteine, welche die Fähigkeit besitzen, sich unter ATP-Verbrauch entlang eines Mikrotubulus zu bewegen und während des Zellzyklus diverse Aufgaben übernehmen. Unter anderem sind sie verantwortlich fürdenzellulären Transport und die Zellteilung. Aufgrund ihrer spezifischen Funktionen bzw. Struktur werden Kinesine in 14 Familien eingeteilt, von denen einige eine Relevanz für die Mitose haben(Hirokawa 1998; Miki et al. 2005).Die S. pombe Kinesine Klp5 und Klp6 gehören zur Kinesin 8 Familieund werden für Organisation und Bewegung der mitotischen Spindel sowie die korrekte Ausrichtung der Chromosomen benötigt. Beide Proteine lokalisierenwährend der Metaphase an den Zentromeren sowie der mitotischen Spindel und lokalisieren in Anaphase B in der Spindelmitte.(Garcia et al. 2002b; West & McIntosh 2008; Grissom et al. 2009). Klp5 und Klp6 beeinflussen die Stabilität von Mikrotubuli.Deletionsstämme dieser Komponenten haben beispielsweise stabilere Mikrotubuli und sind resistent gegenüber Mikrotubuli destabilisierenden Substanzen (West et al. 2001; Unsworth et al. 2008). Das S. pombe Kinesin Klp9 gehört zur Kinesin 6 Familie und wird für die Elongation der mitotischen Spindel in Anaphase B benötigt. Diese Funktion wird durch die Lokalisation von Klp9 in die Spindelmitte zusammen mit dem Mikrotubuli-Bündler Ase1 vermittelt. Liegt Klp9 nicht mehr funktionell vor, ist die Geschwindigkeit der Spindelelongation in Anaphase B um ca. 50% reduziert(Fu et al. 2009).

## 1.5.3.1.2 Dis1

Mitglieder der XMAP215/Dis1 Proteinfamilie wurden in höheren Eukaryonten als Mikrotubuli-Polymerasen beschrieben, welche am dynamischen Mikrotubuli-Plus-Ende assoziieren und die Bindung von Tubulin-Dimeren an das wachsende Plus-Ende des Mikrotubulus katalysieren. Dadurch können diese Proteine die Geschwindigkeit der Mikrotubuli-Polymerisation sowohl positiv als auch negativ beeinflussen(Shirasu-Hiza *et al.* 2003; van Breugel *et al.* 2003; Kerssemakers *et al.* 2006; Brouhard *et al.* 2008; Currie *et al.* 2011; Nakamura *et al.* 2012).Dis1 wird durch die NMS-Komponente Ndc80 zum Kinetochor rekrutiert und bindet dort Ndc80. Diese zweite Verknüpfung des Ndc80-Komplexes mit Mikrotubuli wird für die Stabilität der Metaphasenspindel und die korrekte Chromosomensegregation benötigt. Es wird postuliert, dass der Kinetochor über Dis1 einen direkten Einfluss auf die Dynamik der mitotischen Spindel während der Metaphase hat(Nabeshima *et al.* 1998; Hsu & Toda 2011).

# 1.5.3.1.3 Das S. pombe "End binding protein 1" (EB1) Mal3

Mitglieder der EB1 Familie wurden als erstes als Interaktionspartner des Tumorsuppressors "Adenomatous Polyposis Coli" beschrieben(Su *et al.* 1995).EB1 bindet zusammen mit diesem Tumorsuppressor während der Mitose das Plus-Ende der Mikrotubuli nahe den Kinetochoren. Der Verlust dieser Interaktion wird mitChromosomeninstabilität und der Ausbildung von Darmkrebs in Verbindung gebracht (Tirnauer & Bierer 2000; Caldwell & Kaplan 2009). EB1 lokalisiert ebenfalls während der Interphase an wachsenden Mikrotubuli-Plus-Enden durch Tubulinbindung mit der Nterminalen CH-Domäne (calponin homology), wo es die dynamische Instabilität der Mikrotubuli regulieren kann(Hayashi & Ikura 2003; Komarova *et al.* 2009). Die C-terminale EB-Domäne wird dagegen benötigt, um weitere Proteine zu rekrutieren, die mit dem dynamischen Mikrotubuli-Plus-Ende assoziieren,wie z.B. Tip1 in *S. pombe* (Busch & Brunner 2004; Lansbergen & Akhmanova 2006).

Das EB1 Homolog Mal3 in *S. pombe* ist nicht essentiell, *mal3* Mutantenstämme haben aber eine abnormale Zellform, kurze aberrante Interphasenmikrotubuli und sind sensitiv gegenüber Mikrotubuli destabilisierenden Substanzen(Beinhauer *et al.* 1997). In unserer Arbeitsgruppe konnte Mal3 als Interaktionspartner des Kinetochorproteins Spc7 identifiziert werden, wodurchMal3 während der Mitose den NMS-Komplex mit der mitotischen Spindel verbindet (Kerres *et al.* 2004; Kerres *et al.* 2007).Für die mitotische Funktion von Mal3 wird wahrscheinlich auch dessen Interaktion zum Mikrotubuli-Plus-End assoziiertem Protein Tip1 benötigt(Goldstone *et al.* 2010).*mal3* Mutantenstämme zeigen bereits *per se* eine erhöhte Chromosomenverlustrate (Beinhauer *et al.* 1997). Die meisten Fehler bei der bipolaren Verknüpfung werden aber in Abhängigkeit des Spindelkontrollpunktes während der Metaphase korrigiert (Asakawa *et al.* 2005).

In *S. cerevisiae* kann das Mal3 Homolog Bim1 die Aurora Kinase binden und wird durch diese in der Verbindungsregion, welche die CH- und die EB-Domäne miteinander verknüpft, phosphoryliert, was die Bindung von Bim1 an die Mikrotubuli reguliert und die Mikrotubuli-Dynamik beeinflusst(Zimniak *et al.* 2009).In der Anaphase lokalisiert Bim1 zusammen mit der Aurora Kinase in der Spindelmitte, was vermutlich eine stabilisierende Wirkung auf die Spindelmitte hat (Khmelinskii *et al.* 2007; Gardner *et al.* 2008). Eine direkte Interaktion zwischen EB1 und der Aurora Kinase konnte auch in Humanzellen nachgewiesen werden (Sun *et al.* 2008). Ob Mal3 in *S. pombe* von der Aurora Kinase phosphoryliert wird, ist nicht bekannt, allerdings finden sich hier in der Verbindungsregion ebenfalls
Phosphorylierungsstellen, die die Bindung von Mal3 an Mikrotubuli negativ beeinflussen (limori *et al.* 2012).

#### 1.5.4 Wächter der korrekten Chromosomensegregation

#### 1.5.4.1 Der mitotische Spindelkontrollpunkt

Während der zufälligen Bindung der Chromosomen in der Metaphase durch die Kinetochor-Mikrotubuli treten falsche Verknüpfungen auf. Diese werden durch die Aktivität des mitotischen Spindelkontrollpunktes erkannt, welcher den Eintritt in die Anaphase A inhibiert, so dass falsche Verknüpfungen korrigiert werden können. Die evolutionär hochkonservierten Komponenten des Spindelkontrollpunktes sind Mph1, Bub1, Bub3, Mad1, Mad2 und Mad3(Musacchio & Salmon 2007). DieS. pombe Aurora Kinase Ark1 wird ebenfalls für die Aktivität und Rekrutierung des Spindelkontrollpunktes benötigt (Ditchfield et al. 2003; Morrow et al. 2005; Santaguida et al. 2011; Carmena et al. 2012; Heinrich et al. 2012). Treten beispielsweise monotelische Verknüpfungen auf, liegt einer der Kinetochore nicht an Mikrotubuli gebunden vor (im Folgenden: ungebundene Kinetochore) (Abb. 1-9). Komponenten des Spindelkontrollpunktes binden konzentriert an diesen ungebundenen Kinetochoren (Kops & Shah 2012). Sowohl für Proteine des Sim4-Kinetochor-Komplexes (z.B. Mis6) als auch des NMS-Komplexes (z.B. Spc7) konnte eine Abhängigkeit für die Rekrutierung von Komponenten des Spindelkontrollpunktes zu ungebundenen Kinetochoren beobachtet werden(Nabetani et al. 2001; Saitoh et al. 2005; Foley & Kapoor 2012; Yamagishi et al. 2012).Solange Mad2 und Mad1 an ungebundenen Kinetochoren lokalisieren,liegt der "Anaphase Promoting Complex" (APC) inaktiv vor und verhindert den Eintritt in die Anaphase A. Erst wenn Mad2 und Mad1 durch Kinetochor-Mikrotubuli Interaktion dissoziieren, führt dies zu einer Aktivierung des APC (Peters 2006; Musacchio & Salmon 2007).

Innerhalb des Spindelkontrollpunktes wurde für die Rekrutierung der Komponenten an ungebundene Kinetochore eine lokalisationsabhängige Hierarchie beschrieben mit Ark1 und Mph1 an der Spitze und Mad1 und Mad2 am Ende. Die genaue Funktion der einzelnen Komponenten innerhalb des Netzwerkes ist aber noch nicht verstanden(Millband & Hardwick 2002; Windecker *et al.* 2009; Heinrich *et al.* 2012; Ito *et al.* 2012; Yamagishi *et al.* 2012; Zich *et al.* 2012).

Bei syntelischen oder merotelischen Kinetochor-Mikrotubuli-Verknüpfungen sind in beiden Fällen die Kinetochore der Schwesterchromatiden gebunden (Abb. 1-9). Zwar liegen hier keine ungebundenen Kinetochore vor, dennoch würde der Eintritt in die Anaphase in dieser Orientierung zu Segregationsdefekten führen(Tanaka *et al.* 2005; Musacchio & Salmon 2007; Gregan *et al.* 2011). Da Mad1 und Mad2 an diesen Kinetochoren nicht akkumulieren, wird vermutet, dass diese Proteine nur

für die Überprüfung des generellen Vorhandenseins ungebundener Kinetochore benötigt werden (Waters et al. 1998; Skoufias et al. 2001; Zhou et al. 2002). Dennoch arretieren die Zellen transient in der Metaphase, wenn syntelische oder merotelische Verknüpfungen auftreten (Sczaniecka & Hardwick 2008). Neben einer Rekrutierung der unteren Komponenten (Mad3, Mad2, Mad1) sollen Mph1, Bub3 und Bub1 auch für die Korrektur syntelischer und merotelischer Verknüpfungen verantwortlich sein. Zwar ist die Akkumulation dieser Proteine an solchen Kinetochoren im Vergleich zu ungebundenen Kinetochoren auch reduziert, dennoch lassen sich diese auch hier weiterhin detektieren. Wie der Spindelkontrollpunkt beim Auftreten syntelischer und merotelischer Verknüpfungen aktiviert wird und welche Funktion Mph1, Bub3 und Bub1 dabei einnehmen, ist noch nicht verstanden (He et al. 1998; Skoufias et al. 2001; Taylor et al. 2001; Garcia et al. 2002a; Howell et al. 2004; Musacchio & Salmon 2007; Kops & Shah 2012). Es wird postuliert, dass bei merotelischen und syntelischen Verknüpfungen eine fehlerhafte mechanische Spannung auftritt, welche durch die Abstände der Kinetochore zwischen den Schwesterchromatiden bestimmt wird. Es ist aber nicht bekannt, wie der Spindelkontrollpunkt diese mechanische Spannung direkt messen kann. Es wird spekuliert, dass der Spindelkontrollpunkt erst wieder greift, wenn falsche Verknüpfungen gelöst werden und somit wieder ungebundene Kinetochore vorliegen, an denen Komponenten des Kontrollpunktes akkumulieren können. Weitere Hypothesen besagen, dass die Aktivität des Spindelkontrollpunktes nicht direkt mit der Lokalisation der einzelnen Komponenten an ungebundenen Kinetochoren korrelieren muss und daher auch Kinetochor-unabhängig erfolgen kann(Musacchio & Salmon 2007; Nezi & Musacchio 2009; Maresca & Salmon 2010; van der Waal et al. 2012).

Nach welchem Mechanismus das Messen dieser fehlerhaften Verknüpfungen auch erfolgt, in beiden Fällen müssen diese gelöst werden, um anschließend eine korrekte bipolare Ausrichtung zu erzielen. Dies geschieht durch die Aktivität derAurora B Kinase, welche durch Phosphorylierung von Substraten Kinetochor-Mikrotubuli-Verknüpfungen lösen kann (Carmena *et al.* 2012).

#### 1.5.4.2 Die Aurora B Kinase

Die Aurora B Kinase (Ark1 in *S. pombe*) ist die katalytischeUntereinheit des "<u>C</u>hromosomal <u>PassengerComplex</u>" (CPC), zu dem ebenfalls die regulatorischen und rekrutierenden Untereinheiten INCENP, Survivin und Borealin gehören. Der CPC kontrolliert viele Aspekte der Chromosomensegregation wie die Kondensation der Chromosomen bei Eintritt in die Mitose, die korrekte Verknüpfung der Chromosomen mit der mitotischen Spindel in der Metaphase, die Stabilisierung der Spindelmitte in Anaphase B und die Ausbildung des kontraktilen Ringes während der Zytokinese(Carmena *et al.* 2012).

Einleitung

In *S. pombe* lokalisiert Ark1 während der Interphase im Kern(Petersen *et al.* 2001). Beim Eintritt in die Mitose lokalisiert Ark1 konzentriertam Zentromer nahe den Kinetochoren. Des Weiteren findet sich eine weniger intensivere Lokalisation im Bereich der rDNA bzw. der Telomere vor. Die konzentrierte Lokalisation im Bereich der Kinetochore wird durch spezifische Phosphorylierungen der Histone H2 und H3 durch die Haspin Kinase und Bub1 aufrechterhalten. Bei Eintritt in die Anaphase A verschwindet die chromosomale Lokalisation von Ark1 undes lokalisiert in der Spindelmitte, wo die Pol zu Pol-Mikrotubuli antiparallel überlagern(Petersen *et al.* 2001; Vanoosthuyse *et al.* 2007; Nakazawa *et al.* 2008; Yamagishi *et al.* 2010).

Damit falsche Kinetochor-Mikrotubuli-Verknüpfungen korrigiert werden können, müssen diese zuvor gelöst werden. Dieser Verlust der Kinetochor-Mikrotubuli-Interaktion geschieht durch Phosphorylierung von Kinetochorproteinen durch Ark1, wie Ndc80 und Spc7 (Koch *et al.* 2011; Carmena *et al.* 2012).In der aktuell präferierten Modellvorstellung erfolgt die Korrektur falscher Verknüpfungen in Abhängigkeit der Abstände der Kinetochore zwischen den Schwesterchromatiden und damit in Abhängigkeit der mechanischen Spannung zwischen diesen. Diese Abstände sind gering, wenn beispielsweise merotelische und syntelische Verknüpfungen auftreten. In solchen Fällen kann die Aurora B Kinase ihre Kinetochore führt, ist der Eintritt in die Anaphase A durch den Spindelkontrollpunkt inhibiert. Erst bei einer korrekten bipolaren Verknüpfung sind diese Abstände zu groß, so dass die Verbindung zwischen Kinetochor und Mikrotubuli durch die Aurora B Kinase incht mehr gelöst werden kann(Carmena *et al.* 2012; van der Waal *et al.* 2012).

Mit dem Asp1 Protein konnte in dieser Arbeit eine neue Komponente der Chromosomensegregation identifiziert werden, deren katalytische Aktivität mitotische Prozesse modulieren kann.

# 1.6 Das Asp1 Protein ist eine katalytische Komponente des Inositolpolyphosphat Zyklus

Inositolphosphate (im Folgenden IPs) sind ringförmige organische Molekülemit Phosphatgruppen an variablen Stellen der 6 Kohlenstoffatome. Beim IP<sub>6</sub> Molekül liegen alle der 6 Kohlenstoffatome des Inositolrings phosphoryliert vor (Abb. 1-10)(Shears 2004). Inositolpolyphosphate stellen eine hoch energetische Gruppe der IPs dar, welche ausgehend vom IP<sub>6</sub> durch spezifische Polyphosphat-Kinasen generiert werden können. Dabei wird an mindestenseins der 6 Phosphatgruppen des IP<sub>6</sub> Moleküls eine weitere Phosphatgruppe addiert. Zwei dieser Polyphosphat Kinasen können ausgehend vom IP-<sub>6</sub>verschiedene Arten von IP<sub>7</sub>Isomerenerzeugen. IP6Ks (IP<sub>6</sub> Kinasen) katalysieren eine weitere

Phosphatgruppe an Position 5 des IP<sub>6</sub> Moleküls und generieren 5-IP<sub>7</sub>(Abb. 1-10)(Shears 2009). 1/3 Inositolpolyphosphat Kinasenkatalysieren eine weitere Phosphatgruppe an Position 1 oder 3 des IP<sub>6</sub> Moleküls und generieren 1-IP<sub>7</sub> oder 3-IP<sub>7</sub>. Da diese beiden IP<sub>7</sub> Isomere enatiomerisch sind, können sie nicht voneinander unterschieden werden. Sowohl IP6Ks als auch 1/3 Inositolpolyphosphat Kinasen können auch das Produkt der jeweils anderen IP<sub>6</sub>Kinase als Substrat nutzen und dadurch 1,5-IP<sub>8</sub> bzw. 3,5-IP<sub>8</sub>generieren (Abb. 1-10, in dieser Abbildung ist nur 1,5-IP<sub>8</sub> dargestellt).Diphosphoinositol-Polyphosphat-Phosphohydrolasen (DIPPs) können alle IP<sub>8</sub>bzw. IP<sub>7</sub> Isomere als Substrat nutzen, um diese zu IP<sub>7</sub> bzw. IP<sub>6</sub> zu dephosphorylieren (Abb. 1-10)(Shears 2009). Die zelluläre Konzentration der jeweiligen Inositolpolyphosphate ist relativ gering. In Hefe- und Säugerzellen beträgt die Konzentration von IP<sub>7</sub> ca. 0,5 - 5  $\mu$ M. Die IP<sub>8</sub>-Konzentration beträgt ca. 10 - 20% der IP<sub>7</sub>-Konzentration. Dagegen beträgt die Konzentration des Ausgangssubstrates IP<sub>6</sub>bis zu 15 - 60  $\mu$ M (Shears *et al.* 2011).

1/3 Inositolpolyphosphat Kinasen bestehen aus zwei charakteristischen Domänen.Die N-terminale Kinasedomäne weistHomologie zu ATP-grasp Domänen auf und stellt die katalytische Domäne für die Generierung von IP<sub>7</sub> dar. Die C-terminale Domäne weist Homologie zu Histidin-Phosphatasen auf.Für diese Domäne konnte keine enzymatische Aktivität für den Inositolpolyphosphat Zyklus nachgewiesen werden, daher werde ich diese im Folgenden als "Phosphatasedomäne" bezeichnen(Grishin 1999; Choi *et al.* 2007; Fridy *et al.* 2007). Da verkürzte Varianten von 1/3 Inositolpolyphosphat Kinasen ohne die "Phosphatasedomäne" *in vitro*eine höhere enzymatische Aktivität zeigen, wird von einer negativ regulatorischen Funktion der "Phosphatasedomäne" auf die Kinasedomäne ausgegangen(Barker *et al.* 2009).





#### Abb. 1-10Darstellung des Inositolpolyphosphatzyklus

Inositolpolyphosphate werden ausgehend von IP<sub>6</sub> generiert. IP<sub>6</sub>K(IP<sub>6</sub> Kinase) kann IP<sub>6</sub> an Position 5 polyphosphorylieren und produziert 5-IP<sub>7</sub>. 1/3 Kinasen (1/3 Inositolpolyphosphat Kinasen) können IP<sub>6</sub> an Position 1 oder 3 polyphosphorylieren und produzieren 1-IP<sub>7</sub> oder 3-IP<sub>7</sub> (Zur vereinfachten Darstellung ist nur die Polyphosphorylierung an Position 1 gezeigt). Beide Kinasen können auch das Produkt der anderen Kinase als Substrat nutzen und generieren 1,5-IP<sub>8</sub>. DIPPs (Diphosphoinositol-Polyphosphat-Phosphohydrolasen) können 1,5-IP<sub>8</sub>, 5-IP<sub>7</sub> und 1-IP<sub>7</sub> dephosphorylieren.

Für die Funktionsweisen von IPs wurden zwei Mechanismen beschrieben(Bhandari *et al.* 2007; Barker *et al.* 2009). Zum einen konnte gezeigt werden, dass Proteine durch IPs direkt phosphoryliert werden können. Da dabei eines der Polyphosphate direkt auf einen bereits phosphorylierten Serin-Rest des Zielproteins übertragen wird, spricht man von "Polyphosphorylierung". Als Zielproteine für diese direkte Polyphosphorylierung wurden beispielsweise nukleoläre Proteine aus S. *cerevisiae* und Säugerzellenidentifiziert, welche eine Rolle bei der Ribosomenbiosynthese ausüben (Bhandari *et al.* 2007; Barker *et al.* 2009). Diese Funktionsweise konnte aber bisher *in vivo* nicht nachvollzogen werden (Shears *et al.* 2011). Zum anderen wurdegezeigt, dass IPs die Aktivität von Zielproteinen durch direkte Bindung beeinflussen können. Über diesen Mechanismus wurde bisher nurin *S. cerevisiae*eine Funktion für IPs bei der Anpassung an Phosphatmangelbedingungendurch die

Regulation Zyklin abhängiger Kinasen beschrieben (Barker *et al.* 2009).Aktuell werden IPs eine Vielzahl an zellulären Funktionen nachgesagt, wie z.B. die Regulation der Vesikeldynamik bei der Endozytose, die Insulinausschüttung in Pankreaszellen oder der programmierte Zelltod. Dies deutet darauf hin, dass der Inositolpolyphosphat Zyklus durch eine Vielzahl extrazellulärer Signale beeinflusst wird (Chakraborty *et al.* 2011). In unserem Labor konnte gezeigt werden, dass die *S. pombe*1/3 Inositolpolyphosphat Kinase Asp1 für den Wechsel von der einzelligen Hefeform zur invasiv wachsenden Zellform benötigt wird (Pohlmann & Fleig 2010).

In dieser Arbeit konnte anhand der *S. pombe* 1/3 Inositolpolyphosphat Kinase Asp1 zum ersten Mal gezeigt werden, dass Asp1 generiertes 1/3-IP<sub>7</sub> eine Funktion während der Mitose ausübt. Zur Vereinfachung werde ich im Folgenden anstatt "1/3-IP<sub>7</sub><sup>"</sup>, "Asp1 generiertes IP<sub>7</sub>" bzw. "IP<sub>7</sub>" schreiben.

#### 1.7 Zielsetzung dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, zum einen zu untersuchen, ob physiologisch abweichende IP<sub>7</sub> Mengen einen Einfluss auf die Mitose von *S. pombe* haben. Diese Charakterisierung erfolgte anhand der 1/3 Inositolpolyphosphat Kinase Asp1. Mit Hilfe von unterschiedlichen *asp1* Mutantenstämmen sowie der Expression von verkürzten Asp1 Varianten wurden für alle Stadien der Mitose ausführliche Phänotypisierungen durchgeführt. Des Weiteren wurde die Auswirkung unterschiedlicher Asp1 generierter IP<sub>7</sub> Mengen auf bereits bekannte strukturelle sowie regulatorische Komponenten der Chromosomensegregation untersucht. Ein weiterer Teil dieser Arbeit bestand darin, einen neuen Interaktionspartner des Kinetochors zu charakterisieren. Der *S. pombe* Translations-Initiations-Faktor 1 (Sui1) wurde von Frau Dr. Visnja Jakopec in einer Multikopien-Suppressoranalyse für den konditional letalen*fta2-291* Mutantenstamm isoliert. In dieser Arbeit wurde untersucht, über welche Komponenten die Interaktion dieses Proteins mit dem Kinetochor vermittelt wird. Im Rahmen dieser Charakterisierung sollte nachvollzogen werden, über welchen Mechanismus die Interaktion von Sui1 mit dem Kinetochor erfolgt.

## 2.1 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure (MOPS)	Sigma
4,6-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI)	Boehringer
4-Nitrophenylphosphat	Sigma
5-Bromo-4-chloro-3-Indolyl-Phosphat (BCIP)	Sigma
5-Bromo-4-Chloro-3-indoxyl-β-D-galactopyranoisid (X-Gal)	Serva (Heidelberg)
Acrylamid (37,5:1)	Roth
Adenin	Roth
Agarose: SeaKem LE	Biozym
Ammoniumacetat	Roth
Ammoniumchlorid	Roth
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck
Ammoniumsulfat	Roth
Ampicillin	Grünenthal
Arginin	Roth
Bacto Agar	Difco
Bacto Trypton	Difco
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich
Bradford Reagenz	Biorad
Bromphenolblau	Fluka
Calciumchlorid	Sigma
Chloroform	Roth
Concanavalin A	Sigma
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
Dinatrium-Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	AppliChem
di-Natriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	J.T. Baker
Dithiothreitol (DTT)	Roth
Essigsäure	Riedel-deHaën
Ethanol technisch (96 %)	J.T. Baker
Ethidiumbromidlösung (10mg/ml)	Roth
Ethylenglycol-bis (β-Aminoethylether) N,N,N,',N'-Tetraacetat	Sigma

Chemikalie	Hersteller
(EGTA)	
Ficoll 400	GE Healthcare
Geneticinsulfat (G418)	Calbiochem
Glucose Monohydrat	Roth
Glutaminsäure	Sigma
Glycin	Roth
Glyzerin	Roth
Hefeextrakt	Difco
Histidin	Roth
Isopropanol	Roth
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Stehelin (Basel)
Kaliumacetat	Merck
Kaliumchlorid (KCl)	Roth
Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Merck
Kaliumphtalat	Sigma
Lachssperma DNA	Sigma-Aldrich
Lanolin	Sigma
Leucin	Roth
Lithiumacetat (LiOAc)	Roth
Lysin	Roth
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> + 6 $H_2O$ )	Roth
Magnesiumsulfat	Sigma
Mangansulfat	Sigma
Methanol	Riedel-de Haën
Molybdänsäure	Sigma
Natriumacetat (NaOAc)	Roth
Natriumazid (NaN <sub>3</sub> )	Sigma
Natriumchlorid (NaCl)	J.T. Baker
Natriumcitrat	Fluka
Natriumdodecylsulphat (SDS)	Roth
Natriumfluorid (NaF)	Sigma
Natriumhydroxid (NaOH)	Roth
Natrium-Pantothensäure	Sigma
Natriumphosphat	Sigma

Chemikalie	Hersteller
Natriumsulfat	Merck
Nitro Blue Tetrazolium (NBT)	Sigma
Paraffin	Caesar & Loretz
Paraformaldehyd	Sigma
Pepton	Difco
Phenol	Roth
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMFS)	Serva
Piperazin-N,N`-bis (2-ethansulfonsäure) (PIPES)	Sigma
Polyethylenglycol 4000 (PEG)	Sigma
Poly- <i>L</i> -Lysin	Sigma
Sorbit	Roth
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Merck
Thiabendazol (TBZ)	Sigma
Thiamin	Sigma
Trishydroxymethylaminomethan (Tris)	Roth
Triton X-100	Sigma
Uracil	Sigma
Vaseline	Caesar & Loretz
Wasserstoffperoxid	AppliChem
Xylencyanolblau	Serva
Zinksulfat	Sigma
β-Glycerophosphat	Sigma

## 2.2 Geräte

Gerät	Hersteller
Axiostar Plus Mikroskop	Zeiss
Biofuge pico (mit Hereus Sepatech-Rotor #3324)	Heraeus
Biofuge Primo R	Heraeus
BioPhotometer	Eppendorf
Brutschränke	Binder/Heraeus
Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200M	Zeiss
Geldokumentationssystem	Intas
MSM 300 Mikromanipulator	Singer Instruments

Gerät	Hersteller
Multifuge X3R	Thermo Scientific
Nanodrop Spektralphotometer	PEQLAB
Neubauer Zählkammer	Marienfeld
PCR-Thermocycler	Biorad
Precellys Homogenisator	PEQLAB
Speed-Vac Vacuum-Concentrator	Savant
Spinning-Disc Konfokal Mikroskop	Zeiss

## 2.3 Antikörper

Primärantikörper	Ursprung	Verdünnung	Referenz
GFP	Kaninchen	1:200 IF	Invitrogen (A11122)
		1:1000WB	
TAT1 (Tubulin)	Zellkulturüberstand (Maus)	1:5 IF	K. Gull (Woods <i>et al.</i>
			1989)
γ-Tubulin	Maus	1:10000 WB	Sigma (T6557)

Sekundärantikörper	Ursprung	Verdünnung	Referenz
Alexa Fluor <sup>®</sup> 488 Anti Maus	Ziege	1:200	Molecular Probes (A11001)
AP-Anti Kaninchen	Maus	1:10000	Promega (S373B)
AP-Anti Maus	Kaninchen	1:10000	Promega (S372B)
FITC-Anti Maus	Kaninchen	3:500	Sigma (F9137)

## 2.4 Enzyme

## 2.4.1 Restriktionsenzyme

Enzym	Hersteller
Xhol	Thermo Scientific
BglII	Thermo Scientific
BamHI	Thermo Scientific
Bcul(Spel)	Thermo Scientific
Smal	Thermo Scientific

## 2.4.2 Weitere Enzyme

Enzym	Hersteller
Pfu DNA Polymerase	Invitrogen
Phusion Hot Start II High-Fidelity DNA Polymerase	Thermo Scientific
Proteinase K	Roche
RNase A	Sigma
T4-DNA-Ligase	Thermo Scientific
<i>Taq</i> DNA Polymerase	eigene Herstellung
Zymolyase	Seikagaku
β-Glucuronidase	Sigma

## 2.5 Kits

Kit	Hersteller
Plasmid Midi Kit	Qiagen
QiaQuick Gel Extraction Kit	Qiagen
μMACS GFP Isolation Kit	Miltenyi Biotec
QiaQuick PCR Purification Kit	Qiagen

## 2.6 Sonstige Materialien

µMACS Separation Columns

µMACS Seperator

Material

Hersteller

Miltenyi Biotec

Miltenyi Biotec

Material	Hersteller
Complete Protease Inhibitor Cocktail	Roche
Deckgläser (18 x 18 mm)	Diagonal
dNTP Set	Thermo Scientific
Eppendorf Reaktionsgefäße	Eppendorf
Filterpapier Westernblot	VWR
Glasperlen (0,4 - 0,6 mm Ø)	Sartorius
Heringssamen-DNA	Sigma
Immersionsöl 518F	Zeiss
Küvetten (10 x 4 x 45mm)	Sarstedt
Objektträger (76 x 26 mm)	Diagonal
Petrischale 150 mm Ø	Sarstedt
PVDF Transfer Membran	Thermo Scientific
Vectashield Mounting Medium	Vector Laboratories
Zentrifugenröhrchen 15 ml	Sarstedt
Zentrifugenröhrchen 50 ml	Sarstedt
λ-Phagen DNA	Thermo Scientific

# 2.7 Synthetische Oligonukleotide

Nummer	Sequenz (5′ →3′)	Verwendungszweck
57	gtaaaacgacggccagtg	Sequenzierung
58	ggaaacagctatgaccatg	Sequenzierung
98	gataatggacctgttaatcga	Sequenzierung
99	atcgtaatatgcagcttgaat	Sequenzierung
169	tttcggaatttgtatcgcttttcggattcagag	C-terminale GFP-Epitopmarkierung von fta2-291
	aaggttcactactattattacaggcattattt	
	aaacctcatttggggcggatccccgggttaa	
	ttaa	
170	attaaacaagaagttgaatatgcaacccctt	C-terminale GFP-Epitopmarkierung von fta2-291
	ctccgctttaacatttagcttcaataaaccat	
	gttaaaaatatcaatttgaattcgagctcgtt	
	taaac	
171	tagcaacggaagagtagac	Verifikation von <i>fta2-291-gfp</i>
172	cacgcaatgattagaaag	Verifikation von <i>fta2-291-gfp</i>

Nummer	Sequenz (5′ →3′)	Verwendungszweck
290	attccaacatggatgctg	Verifikation der <i>upf1</i> <sup>+</sup> Deletion
302	cctcgacatcatctgccc	Verifikation fta2-291-gfp;Verifikation des
		asp1 <sup>D333A</sup> /asp1 <sup>H397A</sup> -kanMX6 Moduls
303	attcatatcaggattatc	Verifikation der <i>upf1</i> <sup>+</sup> Deletion
304	ggatgtatgggctaaatg	Verifikation von <i>fta2-291-gfp</i>
423	tcgcgaatcattttggcgcc	Verifikation des <i>asp1</i> <sup>D333A</sup> /asp1 <sup>H397A</sup> -kanMX6
		Moduls
585	aggctcgagatggacgatgaagaaggcaa	Klonierung von <i>mal2-1</i> und <i>mal2-30</i>
665	cctactagttcataacgaagcatgactttctg	Klonierung von <i>mal2-1</i> und <i>mal2-30</i>
1134	aggctcgagattgataggaacaacttaat	Klonierung von <i>cnp1</i> <sup>+</sup>
1135	cctactagttttttgttgaatatatagtg	Klonierung von <i>cnp1</i> <sup>+</sup>
1136	aggctcgagatgtctgctattcaaaactt	Klonierung von <i>sui1</i> <sup>+</sup>
1137	cctagatctccgaaaccatgaatcttgatgt	Klonierung von <i>sui1</i> <sup>+</sup>
1154	aacctttctttctaaaaatgtgttacaattatt	Deletion von $upf1^+$
	tacactttgcaaattgacggcttaataacata	
	tcaagttgtctttccagcaaaaattacggctc	
	ctc	
1155	ataaaacttgaacaccaaaaatatcaacaa	Deletion von $upf1^+$
	ataaaagatatgttggcattcgtaattacaa	
	gtaagcaaatacttattaaattcacatacgat	
	tgacgca	
1156	atttacactttgcaaattga	Verifikation der <i>upf1</i> <sup>+</sup> Deletion
1157	aaataaaagatatgttggca	Verifikation der <i>upf1</i> <sup>+</sup> Deletion
1662	taacacctaatataatcggc	Verifikation der <i>bub3</i> <sup>+</sup> Deletion
1663	accgtaattatcactttgaa	Verifikation der <i>bub3</i> <sup>+</sup> Deletion
1664	tttaagtatatgactcgaag	Verifikation der <i>bub3</i> <sup>+</sup> Deletion
1665	tcccaaacacgaaatgattt	Verifikation der <i>bub3</i> <sup>+</sup> Deletion
1666	ttcgttctttcaatagaatt	Verifikation der <i>mad3</i> <sup>+</sup> Deletion
1667	taacttatggctgactataa	Verifikation der <i>mad3</i> <sup>+</sup> Deletion
1668	ccgttggttggaatttgccc	Verifikation der <i>mad3</i> <sup>+</sup> Deletion
1669	ataccgaacatcatctttat	Verifikation der <i>mad3</i> <sup>+</sup> Deletion
1734	aaggtgaataactttcaaag	Verifikation der <i>dam1</i> <sup>+</sup> Deletion
1735	tgagaaataacaccaccatc	Verifikation der <i>dam1</i> <sup>+</sup> Deletion
1736	ctttcattgaacggccagaa	Verifikation der <i>dam1</i> <sup>+</sup> Deletion

Material und Methoden
-----------------------

Nummer	Sequenz (5′ →3′)	Verwendungszweck
1737	aattggccgatacgtatatt	Verifikation der <i>dam1</i> <sup>+</sup> Deletion

## 2.8 Plasmide

Nummer	Bezeichnung	Genetische Marker, Konstruktion	Verwendung	Herkunft
-	pBSK	Amp <sup>R</sup> ,	Klonierung	Stratagene
148	pREP3X- <i>mal2</i> ⁺	pREP3X- <i>mal2⁺, LEU2, Amp<sup>R</sup>,</i>	Expressionsvektor	U. Fleig
		Thiamin-reprimierbarer		
		<i>nmt1</i> <sup>+</sup> Promotor		
177	KLG 1153	gfp/kanMX6, Amp <sup>R</sup> ,	PCR-	K. Gould
			Vorlageplasmid für	
			C-terminale GFP-	
			Epitopmarkierung	
			von <i>fta2-291</i>	
179	KLG 1155	HA/kanMX6, Amp <sup>R</sup> ,	PCR-	K. Gould
			Vorlageplasmid für	
			Deletion von $upf1^+$	
270	pJR2-3XL	pREP3X, <i>LEU2, Amp<sup>R</sup>,</i> Thiamin-	Expressionsvektor	U. Fleig
		reprimierbarer <i>nmt1</i> <sup>+</sup> Promotor	/ Klonierung	
274	pJR2-41XL	pREP41X, <i>LEU2, Amp<sup>R</sup>,</i> Thiamin-	Expressionsvektor	U. Fleig
		reprimierbarer nmt41Promotor	/ Klonierung	
278	pJR2-81XL	pREP81X, <i>LEU2, Amp<sup>R</sup>,</i> Thiamin-	Expressionsvektor	U. Fleig
		reprimierbarer nmt81Promotor	/ Klonierung	
280	pJR1-3XU	pREP3X, <i>ura4⁺, Amp<sup>R</sup>,</i> Thiamin-	Expressionsvektor	
		reprimierbarer <i>nmt1</i> <sup>+</sup> Promotor		
503	pREP3XL <i>-fta2</i> +	pREP3X- <i>fta2⁺, LEU2, Amp<sup>R</sup>,</i>	Expressionsvektor	U. Fleig
		Thiamin-reprimierbarer		
		<i>nmt1</i> <sup>+</sup> Promotor		
505	pUR19 <i>-fta2</i> +	ura4⁺, Amp <sup>R</sup>	Expressionsvektor	
581	pSGP572a	pREP4XU <i>, ura4⁺, Amp<sup>R</sup>,</i> C-	Expressionsvektor	U. Fleig
		terminale GFP Fusionierung,	/ Klonierung	
		Thiamin-reprimierbarer		
		<i>nmt1</i> <sup>+</sup> Promotor		
671	pJR2-3XL- <i>asp1</i> <sup>365-920</sup>	pREP3X- <i>asp1</i> <sup>365-920</sup> , <i>LEU2</i> , <i>Amp</i> <sup>R</sup> ,		
		Thiamin-reprimierbarer		
		<i>nmt1</i> <sup>+</sup> Promotor		
672	pJR2-3XL - <i>asp1</i> <sup>1-364</sup>	pREP3X- <i>asp1<sup>1-364</sup>, LEU2, Amp<sup>R</sup>,</i>	Expressionsvektor	U. Fleig
		Thiamin-reprimierbarer		
		<i>nmt1</i> <sup>+</sup> Promotor		
746	pJR1-3XU- <i>sui1</i> +	pREP3X- <i>sui1</i> <sup>+</sup> , <i>ura4</i> <sup>+</sup> , <i>Amp</i> <sup>R</sup> ,	Expressionsvektor	
		Thiamin-reprimierbarer		
		<i>nmt1</i> ⁺Promotor		
748	pJR1-81XU- <i>sui1</i> +	pREP81X- <i>sui1</i> <sup>+</sup> , <i>ura4<sup>+</sup>, Amp<sup>R</sup>,</i>	Expressionsvektor	

Nummer	Bezeichnung	Genetische Marker, Konstruktion	Verwendung	Herkunft
755	pBSK <sup>+</sup> - <i>sui1</i> <sup>+</sup>	Thiamin-reprimierbarer nmt1 <sup>+</sup> Promotor sui1 <sup>+</sup> ,Amp <sup>R</sup> ,	PCR- Vorlageplasmid für Klonierung von <i>sui1</i> <sup>+</sup>	U. Fleig
916	pJR2-3XL- <i>asp1</i> <sup>365-920</sup>	pREP3X- <i>asp1</i> <sup>365-920</sup> , <i>LEU2</i> , <i>Amp</i> <sup>R</sup> , Thiamin-reprimierbarer <i>nmt1</i> <sup>+</sup> Promotor	Expressionsvektor	U. Fleig
1013	pBSK- <i>eif5</i> ⁺	eif5⁺ Amp <sup>R</sup> ,	Klonierung	Diese Arbeit
1014	pJR2-3XL- <i>eif5</i> *	pREP3X- <i>eif5</i> <sup>+</sup> , <i>LEU2, Amp<sup>R</sup>,</i> Thiamin-reprimierbarer <i>nmt1</i> <sup>+</sup> Promotor	Expressionsvektor	Diese Arbeit
1015	pJR2-41XL- <i>eif5</i> *	pREP41X- <i>eif5</i> <sup>+</sup> , <i>LEU2</i> , <i>Amp</i> <sup>R</sup> , Thiamin-reprimierbarer <i>nmt41</i> Promotor	Expressionsvektor	Diese Arbeit
1016	pJR2-81XL- <i>eif5</i> *	pREP81X- <i>eif5</i> ⁺, <i>LEU2, Amp<sup>R</sup>,</i> Thiamin-reprimierbarer <i>nmt81</i> Promotor	Expressionsvektor	Diese Arbeit
1017	pSGP572a- <i>sui1-gfp</i>	pREP4X- <i>sui1-gfp</i> , <i>ura4</i> <sup>+</sup> , <i>Amp</i> <sup>R</sup> , C- terminale GFP Fusionierung, Thiamin-reprimierbarer <i>nmt1</i> <sup>+</sup> Promotor	Expressionsvektor	Diese Arbeit
1018	pJR2-3XL- <i>sui1</i> +	pREP3X- <i>sui1</i> <sup>+</sup> , <i>LEU2, Amp<sup>R</sup>,</i> Thiamin-reprimierbarer <i>nmt1</i> <sup>+</sup> Promotor	Expressionsvektor	Diese Arbeit
1019	pJR2-41XL- <i>sui1</i> +	pREP41X- <i>sui1</i> <sup>+</sup> , <i>LEU2</i> , <i>Amp</i> <sup>R</sup> , Thiamin-reprimierbarer <i>nmt41</i> Promotor	Expressionsvektor	Diese Arbeit
1020	pJR2-41XL- <i>cnp1</i> *	pREP41X- <i>cnp1</i> <sup>+</sup> , <i>LEU2</i> , <i>Amp</i> <sup>R</sup> , Thiamin-reprimierbarer <i>nmt41</i> Promotor	Expressionsvektor	Diese Arbeit
1021	pJR2-81XL- <i>cnp1</i> *	pREP81X- <i>cnp1</i> <sup>+</sup> , <i>LEU2</i> , <i>Amp</i> <sup>R</sup> , Thiamin-reprimierbarer <i>nmt81</i> Promotor	Expressionsvektor	Diese Arbeit
1022	pJR2-3XL- <i>mal2-1</i> <sup>+</sup>	pREP3X- <i>mal2-1, LEU2, Amp<sup>R</sup>,</i> Thiamin-reprimierbarer <i>nmt1</i> <sup>+</sup> Promotor	Expressionsvektor	Diese Arbeit
1023	pJR2-3XL- <i>mal2-30</i> ⁺	pREP3X- <i>mal2-30, LEU2, Amp<sup>R</sup>,</i> Thiamin-reprimierbarer <i>nmt1</i> <sup>+</sup> Promotor	Expressionsvektor	Diese Arbeit

## 2.9 Stämme

## 2.9.1 S. pombe Stämme

Nummer	Relevante Genotypen	Herkunft
103	ade6-M210, leu1-32, ura4-D6, Ch16[ade6-M216], h	M. Yanagida
138	mph1∆::ura4⁺, leu1-32, ura4-D18, ade6-M216, h⁻	S. Sazer
139	mad2∆::ura4⁺, leu1-32, ura4-D18, ade6-M210, h⁻	S. Sazer
547	mal2-1-gfp::kan <sup>R</sup> , ade6-M210, leu1-32, ura4-D18, h <sup>-</sup>	U. Fleig
605	his3-D1, ade6-M210, leu1-32, ura4-D18, h <sup>-</sup>	K. Gould
841	cnt1:arg3, arg3-D3, ade6-210, leu1-32, ura4-D18, his3-D1, cnt3:ade6,	R. Allshire
	tel1L: <i>his3</i> , otr2: <i>ura4</i> , $h^+$	
845	<i>sim</i> 4-193, arg3-D4, αde6-210, his3-D1, urα4-D18, leu1-32, h⁺	R. Allshire
851	<i>mal3-</i> 1, <i>ade6-</i> M210, <i>ura4-D18, leu1-32</i> , Ch <sup>16</sup> [ <i>ade6-</i> M216], h <sup>-</sup>	U. Fleig
857	<i>kan<sup>R</sup>::nmt</i> 81:: <i>gfp-atb2⁺, leu1-32,</i> h <sup>-</sup>	I. Hagan
965	dam1∆::kan <sup>R</sup> , ura4-D18, leu1-32, h⁺	J. Millar
1028	spc7-23::his3⁺, his3-D1, ade6-M216, leu1-32, ura4-D18,	U. Fleig
1047	<i>fta2-</i> 88:: <i>his3<sup>+</sup>, his3<sup>-</sup>, leu1-32, ura4-D18, ade6-</i> M210, h <sup>+</sup>	U. Fleig
1048	fta2-291::his3 <sup>+</sup> , his3 <sup>-</sup> , leu1-32, ura4-D18, ade6-M210, h <sup>-</sup>	U. Fleig
1050	fta2-292::his3⁺, his3-Dx, leu1-32, ura4-D18, ade6-M210, h⁻	U. Fleig
1056	<i>nuf2-1::ura4⁺, ura4-D18, leu1-32, ade6-</i> M210 <i>, his3-</i> D1, h <sup>-</sup>	U. Fleig
1057	mal2-1, leu1-32, ade6-M210, ura4-D18, h⁺	U. Fleig
1058	mal2 <sup>+</sup> -gfp::kan <sup>R</sup> , ade6-M210, leu1-32, ura4-Dx, his3-D1, h <sup>-</sup>	U. Fleig
1065	mis15-68, leu1-32, ura4-D18, ade6-M210, h <sup>-</sup>	U. Fleig
1067	<i>mis17-362, his-</i> D1, <i>leu1-32, ura4-D18, ade6-</i> M210, h⁺	U. Fleig
1117	<i>lys1-</i> 131, <i>his7-</i> 366, <i>ura4-D18, leu1-32, ade6-</i> M210, h⁺	U. Fleig
1198	fta2-291::his3⁺, mis6-302, leu1-32, ade6-M210, h⁻	U. Fleig
1219	fta2-291::his3 $^{+}$ , sim4-193, ade6-M210, ura4-D18, leu1-32, his3-D1, h $^{+}$	U. Fleig
1358	ase1-gfp::kan <sup>R</sup> , leu1, ura4, h <sup>-</sup>	T. Toda
1503	<i>mis6-302, leu1</i> <sup>-</sup> , ura <sup>-</sup> , ade <sup>-</sup> , h <sup>+</sup>	M. Yanagida
1505	mis12-537, leu1-32, ura <sup>-</sup> , his <sup>-</sup> , ade <sup>-</sup> ,h <sup>-</sup>	M. Yanagida
1511	<i>asp1<sup>D333A</sup>::kan<sup>R</sup>,his3-D1,ade6-M210,leu1-32,ura4-D18,</i> h <sup>+</sup>	U. Fleig
1529	asp1 <sup>D333A</sup> ::kan <sup>R</sup> ,kan <sup>R</sup> ::nmt81::gfp-atb2 <sup>+</sup> ,leu1-32, ura4-D18, h <sup>+</sup>	U. Fleig
1543	asp1 <sup>D333A</sup> ::kan <sup>R</sup> ,mph1∆::ura4⁺, his3-D1, ade6-M216, leu1-32, ura4-D18, h⁺	U. Fleig
1578	asp1 <sup>H397A</sup> ::kan <sup>R</sup> , mal2-1, ade6-M210, leu1-32, ura4-D18, h <sup>-</sup>	U. Fleig
1579	asp1 <sup>H397A</sup> ::kan <sup>R</sup> ,his3-D1, ade6-M210, leu1-32, ura4-D18, h <sup>+</sup>	U. Fleig
1581	asp1 <sup>D333A</sup> ::kan <sup>R</sup> , mal2-1, ade6-M210, leu1-32, ura4-D18, his3-D1, h <sup>-</sup>	U. Fleig
1717	fta2-291-GFP::kan <sup>R</sup> , his3 <sup>-</sup> , leu1-32, ura4-D18, ade6-210, h <sup>-</sup>	U. Fleig
1763	asp1 <sup>H397A</sup> ::kan <sup>R</sup> ,kan <sup>R</sup> ::nmt81::gfp-atb2 <sup>+</sup> ,leu1-32, ura4-D18, h <sup>+</sup>	U. Fleig
1802	<i>sos7-258</i> :: <i>his3</i> <sup>+</sup> (N228D, Stopp verschoben, IMRRYR-Stopp), <i>his3</i> -D1, <i>ade6</i> -	U. Fleig
	M210, <i>leu1-32, ura4-D18</i> , h <sup>-</sup>	
2052	asp1 <sup>H397A</sup> ::kanR, ase1-gfp-kanR, leu-, ura-, ade6?, h90	U. Fleig
2053	asp1 <sup>D333A</sup> ::kanR, ase1-gfp-kanR, leu-, ura-, his3D1, ade6-M210, h <sup>-</sup>	U. Fleig
2112	<i>clr4</i> ∆:: <i>ura4<sup>+</sup>, ura4-D18, leu1-32,</i> h <sup>-</sup>	YGRC
2113	<i>clr4</i> ∆:: <i>ura4⁺, ura4-D18, leu1-32, ade6</i> -M210, h <sup>90</sup>	YGRC
2114	ago1Δ::kan <sup>R</sup> , h <sup>-</sup>	YGRC

Nummer	Relevante Genotypen	Herkunft
2115	ago1 $\Delta$ ::kan <sup>R</sup> , otr::ura4, leu1, ade6, his $\Delta$ , h <sup>+</sup>	YGRC
2116	$dcr1\Delta::kan^{R}$ , leu1, h	YGRC
2117	rdp1 $\Delta kan^{R}$ , otr:: <i>ura4, leu1, ura4, ade6</i> , h <sup>+</sup>	YGRC
2118	sad1-mcherry::kan <sup>R</sup> , leu1, h	YGRC
2119	leu1-32::SV40::atb2 <sup>+</sup> -gfp[Leu2], ade6-M216, bub1∆GLEBS, mis6-	YGRC
	mcherry::kan <sup>R</sup> , h	
2124	mis18-262, leu1, h	YGRC
2128	$cnp1-1$ , $leu1-32$ $ura4^{+}h^{+}$	U. Fleig
2137	$fta2-291::his3^+$ , clr4 $\Delta$ ::ura4 <sup>+</sup> , ura4-D18, leu1-32 h <sup>-</sup>	Diese Arbeit
2138	mal2-1, $dcr1\Delta::kan^{R}$ , $ura4^{+}$ , $leu1-32$ h	Diese Arbeit
2139	fta2-291:: $his3^+$ , ago1 $\Delta$ :: $kan^R$ , leu1-32ura4-D18 h <sup>-</sup>	Diese Arbeit
2140	fta2-291::his3 <sup>+</sup> , rdp1 $\Delta$ kan <sup>R</sup> , leu1-32ura4-D18 h <sup>+</sup>	Diese Arbeit
2142	mal2-1, $ago1\Delta::kan^{R}$ , leu1-32 ura4 <sup>+</sup> h <sup>-</sup>	Diese Arbeit
2143	mal2-1, clr4Δ::ura4 <sup>+</sup> , ura4-D18, leu1-32 h <sup>-</sup>	Diese Arbeit
2144	mal2-1, clr4 $\Delta$ ::ura4 <sup>+</sup> , ura4-D18, leu1-32h <sup>+</sup>	Diese Arbeit
2146	$mis16-53$ , $leu1-32$ $ura4^+$ h <sup>-</sup>	Diese Arbeit
2154	sad1-mcherry::kan <sup>R</sup> , sos7-qfp::kan <sup>R</sup> , ura4-D18, leu1-32, h <sup>-</sup>	Diese Arbeit
2156	$SV40::atb2^+-qfp[leu2]h^-$	Diese Arbeit
2166	sad1-mcherry::kan <sup>R</sup> , leu1-32, ura4+, lys1-131, his7-366, h <sup>+</sup>	Diese Arbeit
2215	asp1 <sup>D333A</sup> ::kan <sup>R</sup> , mad2∆::ura4 <sup>+</sup> , ura4-D18, leu1-32, h	U. Fleig
2241	sad1-mcherry::kan <sup>R</sup> , LacI-gfp::his7 <sup>+</sup> , LacO-repeat::lys1 <sup>+,</sup> ura4 <sup>+</sup> leu1-32h <sup>90</sup>	Diese Arbeit
2242	sad1-mcherry::kan <sup>R</sup> , asp1 <sup>D333A</sup> ::kan <sup>R</sup> , LacI-gfp::his7 <sup>+</sup> , LacO-repeat::lys1 <sup>+</sup> , h <sup>-</sup>	Diese Arbeit
2249	sad1-mcherry::kan <sup>R</sup> , LacI-gfp::his7 <sup>+</sup> ,LacO-repeat::lys1 <sup>+</sup> , ura4-D18, leu1-32,	Diese Arbeit
	h <sup>-</sup>	
2256	mad3∆::kan <sup>R</sup> , leu1-32, ura4 <sup>+</sup> h <sup>-</sup>	YGRC
2257	bub3Δ::kan <sup>R</sup> , leu1-32, ura4 <sup>+</sup> h <sup>-</sup>	YGRC
2259	bub1-gfp::ura4 <sup>+</sup> , ura4-D18, h <sup>+</sup>	YGRC
2279	asp1 <sup>H397A</sup> ::kan <sup>R</sup> , SV40::atb2 <sup>+</sup> -gfp[Leu2] ura4 <sup>+</sup> h <sup>-</sup>	U. Fleig
2280	asp1 <sup>D333A</sup> ::kan <sup>R</sup> , SV40::atb2 <sup>+</sup> -gfp[Leu2] ura4 <sup>+</sup> h <sup>-</sup>	U. Fleig
2289	<i>bub1-gfp::ura4</i> <sup>+</sup> , <i>asp1</i> <sup>D333A</sup> ::kan <sup>R</sup> leu2 <sup>+</sup> , ura4-D18 h <sup>+</sup>	Diese Arbeit
2291	bub3Δ::kan <sup>R</sup> , asp1 <sup>D333A</sup> ::kan <sup>R</sup> , leu1-32, ura4-D18 h <sup>-</sup>	Diese Arbeit
2292	mad3Δ::kan <sup>R</sup> , asp1 <sup>D333A</sup> ::kan <sup>R</sup> , leu1-32, ura4-D18 h <sup>+</sup>	Diese Arbeit
2304	dam1∆::kan <sup>R</sup> , asp1 <sup>H397A</sup> ::kan <sup>R</sup> , leu1-32, ura4-D18 h <sup>-</sup>	Diese Arbeit
2337	SV40::atb2 <sup>+</sup> -gfp[Leu2], asp1 <sup>D333A</sup> ::kan <sup>R</sup> ,mph1A::ura4 <sup>+</sup> , ura4-D18 h <sup>-</sup>	Diese Arbeit
2345	<i>mal2<sup>+</sup>-gfp::kan<sup>R</sup>,asp1<sup>H397A</sup>::kan<sup>R</sup>leu1-32, ura4-</i> 18, <i>his3-</i> D1, h <sup>-</sup>	Diese Arbeit
2346	mal2 <sup>+</sup> -gfp::kan <sup>R</sup> ,asp1 <sup>D333A</sup> ::kan <sup>R</sup> leu1-32, ura4-18, his3-D1, h <sup>-</sup>	Diese Arbeit
2348	asp1 <sup>H397A</sup> ::kan <sup>R</sup> mal2-1-gfp::kan <sup>R</sup> , leu1-32, ura4-D18, h <sup>+</sup>	Diese Arbeit
2350	asp1 <sup>D333A</sup> ::kan <sup>R</sup> mal2-1-gfp::kan <sup>R</sup> , leu1-32, ura4-D18, h <sup>-</sup>	Diese Arbeit
2357	ark1+-gfp< <kanr h+<="" sid4+-mcherry<<natr="" td=""><td>Silke Hauf</td></kanr>	Silke Hauf
2363	ark1+-gfp< <kanr sid4+-mcherry<<nat<sup="">Rasp1<sup>D333A</sup>::kan<sup>R</sup> , leu2<sup>+</sup>, ura4<sup>+</sup>h<sup>-</sup></kanr>	Diese Arbeit
2365	ark1+-gfp< <kanr nat<sup="" sid4+-mcherry<<="">Rasp1<sup>H397A</sup>::kan<sup>R</sup> , leu2<sup>+</sup>, ura4<sup>+</sup>h<sup>-</sup></kanr>	Diese Arbeit
2367	sad1-mcherry::kan <sup>R</sup> , asp1 <sup>H397A</sup> ::kan <sup>R</sup> LacI-gfp::his7 <sup>+</sup> , LacO-repeat::lys1 <sup>+</sup> ,	Diese Arbeit
	ura4-D18, leu1-32 h	
2369	mal2 <sup>T185P, K198R, L213R</sup> ::his3 <sup>+</sup> , (mal2-30)his3-D1, leu1-32, ura4-D18, h <sup>-</sup>	Diese Arbeit
2370	fta2-gfp::kan <sup>R</sup> asp1 <sup>H397A</sup> ::kan <sup>R</sup> , , ade6-M210, leu1-32, ura4-D18, h <sup>+</sup>	Diese Arbeit

Nummer	Relevante Genotypen	Herkunft
2372	fta2-gfp::kan <sup>R</sup> asp1 <sup>D333A</sup> ::kan <sup>R</sup> ,his3-D1,ade6-M210,leu1-32,ura4-D18, h <sup>-</sup>	Diese Arbeit
2374	<i>fta2-</i> 291-gfp::kan <sup>R</sup> asp1 <sup>H397A</sup> ::kan <sup>R</sup> , , ade6-M210, leu1-32, ura4-D18, h <sup>-</sup>	Diese Arbeit
2376	fta2-291-gfp::kan <sup>R</sup> asp1 <sup>D333A</sup> ::kan <sup>R</sup> ,his3-D1,ade6-M210,leu1-32,ura4-D18, h <sup>-</sup>	Diese Arbeit
2378	asp1 <sup>H397A</sup> ::kan <sup>R</sup> , mal2-1, sad1-mcherry::kan <sup>R</sup> , sos7-gfp::kan <sup>R</sup> , leu1-32, ura4-	Diese Arbeit
	<i>D18</i> , h <sup>-</sup>	
2380	asp1 <sup>D333A</sup> ::kan <sup>R</sup> , mal2-1, sad1-mcherry::kan <sup>R</sup> , sos7-gfp::kan <sup>R</sup> , leu1-32, ura4-	Diese Arbeit
	<i>D18, his3-</i> D1, h <sup>+</sup>	
2386	bub3∆::kan <sup>R</sup> , asp1 <sup>D333A</sup> ::kan <sup>R</sup> sad1-mcherry::kan <sup>R</sup> , LacI-gfp::his7⁺, LacO-	Diese Arbeit
	repeat:: <i>lys1</i> <sup>+</sup> , <i>lys1</i> -131, <i>his7</i> -366, h <sup>-</sup>	
2398	mal2-1, sad1-mcherry::kan <sup>R</sup> , sos7-gfp::kan <sup>R</sup> , leu1-32, ura4-D18, his3-D1, h <sup>+</sup>	Diese Arbeit
		<u>.</u>

YGRC = Yeast Genetic Resource Center, Japan

#### 2.9.2 E. coli Stämme

Stamm	Genotyp	Herkunft
XL1-blue	recA1, lac <sup>-</sup> , endA1, gyrA46, thi, hsdR17, supE44, relA1, F'	Stratagene
	[proAB⁺, laclª, lacZ∆M15, Tn(tet <sup>r</sup> )]	

### 2.10 Medien und Wachstumsbedingungen

#### 2.10.1 *S. pombe*

Die Kultivierung von *S. pombe* Stämmen erfolgte in Vollmedium (YE5S: <u>"v</u>east <u>e</u>ctract <u>5s</u>upplements"). Bei Selektion auf Aminosäureprototrophie nach Plasmidtransformationen oder Paarungsversuchen wurde Minimalmedium (MM) verwendet, bei dem die Aminosäuren nicht zugesetzt wurden, für die der Stamm prototroph sein sollte. Den Medien wurden Supplementlösungen bis zu einer Konzentration von 75 mg/ml zugegeben (Moreno *et al.* 1991). Die Kultivierung in Flüssigkultur für das Anziehen von *S. pombe* Zellen erfolgte auf einem Schüttler bei 30°C für 16h über Nacht (ü/N). Temperatursensitive Stämme (ts) wurden bei 25°C inkubiert. Für die Kultivierung auf festem Medium wurde den Medien 20 g/l Agar zugegeben.

Wurden Stämme auf Sensitivität bzw. Resistenz für die Mikrotubuli destabilisierende Substanz Thiabendazol (TBZ) getestet(Berry & Gould 1997), wurde festem, ca. 50°C warmen, Voll- oder Minimalmedium TBZ in der für den jeweiligen Versuch angegebenen Konzentration zugegeben. Die Inkubation von Platten mit TBZ erfolgte bei 25°C.(TBZ-Stocklösung: 10 mg/ml in DMF, Lagerung bei -20°C)

Die Selektion auf die Resistenz für das Antibiotikum Geneticin-Disulfat (G418) erfolgte auf festem Voll - oder Minimalmedium, dem G418 in einer Endkonzentration von 100 mg/l zugegeben wurde.

Die Platten wurden bei 30°C oder bei temperatursensitiven Stämmen bei 25°C inkubiert. G418 wurde dem Medium erst bei einer Temperatur von ca. 50°C zugegeben. Die Lagerung der Platten erfolgte bei 4°C.

Um in *S. pombe* Zellen die plasmidkodierte Expression von Genen gezielt zu regulieren, wurden Plasmide mit Thiamin-reprimierbaren  $nmt1^{+}(no message)$  in thiamine)Promotoren verwendet(Moreno *et al.* 2000). Sollte die Expression des zu testendem Gens reprimiert sein, wurden die Zellen stets auf Thiamin-haltigem (5 µg/ml) Medium kultiviert. Verlangte die Versuchsanordnung eine Expression des zu testenden Gens wurde der Versuch erst nach einer Inkubationsdauer von 24h in Thiamin-freiem Medium gestartet.

Vollmedium (YE5S):

10 g Hefeextrakt

150 ml Adeninstocklösung

75 ml Uracilstocklösung

20 ml je Histidin-, Lysin-, und Leucinstocklösung

40 g Agar (für festes Medium)

Die oben angegebenen Komponenten wurden in 1515 ml ddH<sub>2</sub>O gelöst und autoklaviert. 60 g Glucose wurde in 200 ml dd<sub>2</sub>O gelöst, separat autoklaviert und dem Medium anschließend zugeben.

Minimalmedium (MM)

5,5 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O

6 g Kaliumhydrogenphtalat

2 g Glutaminsäure

40 ml 50 x Salzstocklösung

2 ml 1000 x Vitaminstocklösung

0,2 ml 10000 x Mineralstocklösung

40 g Agar (für festes Medium)

50 x Salzstocklösung:

21,4 g MgCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O 0,29 g CaCl<sub>2</sub> x 2 H<sub>2</sub>O

20 g KCl

0,8 g Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

Gelöst in 400 ml ddH<sub>2</sub>O, Lagerung

bei 4°C nach dem Autoklavieren.

1000 x Vitaminstocklösung:

1 g Natriumpantothensäure

10 g Nikotinsäure

10 g Inositol

10 mg Biotin

in 1 l ddH<sub>2</sub>O gelöst, sterilfiltriert

und bei 4°C gelagert

10000 x Mineralstocklösung:

 $5 \ g \ H_3 BO_3$ 

 $4 \text{ g} \text{MnSO}_4$ 

 $4~g~ZnSO_4~x~7~H_2O$ 

2 g FeCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O

 $4 \text{ g MoO}_3$ 

1 g KI

 $4~g~CuSO_4~x~5~H_2O$ 

10 g Zitronensäure

in 1 l  $ddH_2O$  gelöst, sterilfiltriert und bei 4°C gelagert

Für die Herstellung von Minimalmedium (MM) wurden die oben angegebenen Komponenten in 1780 ml ddH<sub>2</sub>O gelöst und autoklaviert. 40 g Glucose wurde in 100 ml ddH<sub>2</sub>O gelöst, separat autoklaviert und dem Medium anschließend zugeben.

Nach oder vor dem Autoklavieren wurden die benötigten Supplementlösungen zu einer Endkonzentration von 75 mg/l zugefügt. Für Medium mit limitiertem Adenin wurden lediglich 5 mg/l Adenin zugesetzt.

Supplementstocklösungen:

2 g/l Uracilstocklösung

<sup>2</sup> g/l Adeninstocklösung

<sup>7,5</sup> g/l Histidinstocklösung

7,5 g/l Lysinstocklösung

7,5 g/l Leucinstocklösung

7,5 g/l Argininstocklösung

#### 2.10.2 Serielle Tropftestanalysen "Tropftests"

Tropftests wurden durchgeführt um den Einfluss verschiedener Faktoren oder Konditionen auf das Wachstum von *S. pombe*Stämmen zu untersuchen. Dabei wurde die Zellzahl einer logarithmisch wachsenden Kultur mit einer Zählkammer bestimmt. Anschließend wurde eine Verdünnungsreihe erstellt in der je 5µl einer Verdünnung 10<sup>4</sup>, 10<sup>3</sup>, 10<sup>2</sup> oder 10 Zellen enthalten. Die Verdünnungen wurden nebeneinander auf Platten aufgetragen und mehrere Tage bei entsprechenden Temperaturen inkubiert.

#### 2.10.3 E. coli

Für die Kultivierung von *E. coli* Stämmen wurde LB-Medium verwendet. Für festes Medium wurde 13,5g Agar pro Liter zugegeben. Inkubation in flüssigen und auf festem Medium erfolgte bei 37°C. Für die Selektion auf Plasmide mit Ampicillin Resistenzgen wurde dem Medium bei einer Temperatur von ca. 50°C 50 µg/ml Ampicillin zugegeben. Die Lagerung von Ampicillin-haltigen Platten erfolgte bei 4°C.Für das Verfahren der blau/weiß Selektion bei Klonierungen mit dem pBSK<sup>+</sup> wurde festem Medium bei einer Temperatur von ca. 50°C,0,1 mM IPTG sowie 40 µg/ml X-Gal zugegeben.

LB-Medium: 10 g Trypton 5 g Hefeextrakt 5 g NaCl 13,5 g Agar (für festes Medium)

Gelöst in 1L  $ddH_2O$  und autoklaviert.

#### 2.11 DNA Grundtechniken

DNA-Techniken wie Restriktionsanalysen, Ligationen, sowie Techniken für die DNA-Fällung, -Aufkonzentrierung und Gelelektrophorese wurden gemäß Standardprotokoll durchgeführt(Maniatis *et al.* 1989).Verwendete Restriktionsendonukleasen und Ligasen wurden nach Herstellerangaben eingesetzt.*Eco*R1/*Hind*III geschnittene  $\lambda$  Phagen DNA (444 ng/5  $\mu$ I) diente bei der gelelektrophoretischen Auftrennung von DNA als Längenstandard.

Die Konzentrationsbestimmung von DNA erfolgte entweder photometrisch durch Messung der Absorption bei 260 nm oder durch Vergleich der Bandenintensität mit dem eingesetzten Längenstandard.

#### 2.11.1 DNA-Präparation aus E. coli

Für die Präparation kleiner Mengen DNA aus *E. coli* wurde nach dem Protokoll der alkalischen Lyse verfahren (Ish Horowicz & Burke 1981). Für die Präparation großer Mengen DNA wurde ein "Plasmid Midi Kit" der Firma Qiagen nach Herstellerangaben verwendet.

#### 2.11.2 PCR

Für die Amplifikation von DNA-Fragmenten für Klonierungen wurde die "*Pfu*Polymerase" oder die "Phusion Hot Start II High-Fidelity DNA Polymerase" verwendet. Die Enzyme wurden nach Herstellerangaben eingesetzt. Für die Herstellung großer Mengen DNA für die homologe Rekombination in *S. pombe* wurde die *Taq* Polymerase nach Standardprotokoll verwendet(Sambrook *et al.* 1989).

#### 2.11.3 Aufreinigung von DNA

Die Aufreinigung von Plasmid-DNA sowie von PCR Produkten erfolgte mit einem "QiaQuick PCR Purification Kit" der Firma Quiagen nach Herstellerangaben

#### 2.11.4 Transformation in E. coli

Bei geringen DNA-Konzentrationen wurden elektrokompetente *E. coli* Zellen mittels Elektroporation transformiert. Dabei wurden 40 µlelektrokompetente Zellenmit vorverdünnter DNA auf Eis gemischt und in einer vorgekühlten Elektroporationsküvette bei 2,1 kV, 200  $\Omega$ , 25 µF elektroporiert. Nach einer einstündigen Regenarionsphase bei 37°C in LB-Medium wurden die Zellen auf Ampicillin-haltigen LB-Medium ausplattiert.

Bei hohen DNA-Konzentrationen wurde eine "Ein Minuten Transformation" durchgeführt. Dabei wurden 3µl DMSO-kompetenten Zellen mit 2-3µl DNA vermischt und anschließend 1min bei 42°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen auf Ampicillin-haltigen LB-Medium ausplattiert.

#### 2.11.5 in vitro Klonierungen mit E. coli

Die folgenden Plasmide wurden mittels *in vitro* Ligation mit der T4-DNA Ligase kloniert. Um die korrekte Integration der klonierten DNA-Fragmente zu verifizieren wurden die erstellten Konstrukte analytisch gespalten.

Nummer	Konstrukt	Herstellung
1013	pBSK- <i>eif5</i> ⁺	<i>eif5</i> <sup>+</sup> mit ON 1722 1723 auf genom. DNA (Stamm 605) amplifiziert,
		geschnitten mit Smal/XhoI, in pBSK (Smal/XhoI) kloniert
1014	pJR2-3XL- <i>eif5</i> +	$\mathit{eif5}^{+}$ mit Smal/Xhol aus p1013 ausgeschnitten, in p270 (Smal/Xhol)
		ligiert
1015	pJR2-41XL- <i>eif5</i> +	$\mathit{eif5}^{+}$ mit Smal/Xhol aus p1013 ausgeschnitten, in p274 (Smal/Xhol)
		ligiert
1016	pJR2-81XL- <i>eif5</i> +	$\mathit{eif5}^{+}$ mit Smal/Xhol aus p1013 ausgeschnitten, in p278 (Smal/Xhol)
		ligiert
1017	pSGP572a- <i>sui1-gfp</i>	sui1 mit ON 1136 und 1137 auf genom. DNA (Stamm 605)
		amplifiziert,XhoI/Bg/II geschnitten, in p581 (XhoI/Bg/II) ligiert
1018	pJR2-3XL- <i>sui1</i> +	<i>sui1</i> <sup>+</sup> mit <i>Xho</i> I/ <i>Bam</i> HI aus p755 ausgeschnitten, in p270 ( <i>Xho</i> I/ <i>Bam</i> HI)
		ligiert
1019	pJR2-41XL-sui1 <sup>+</sup>	<i>sui1</i> <sup>+</sup> mit <i>Xho</i> I/ <i>Bam</i> HI aus p755 ausgeschnitten, in p274 ( <i>Xho</i> I/ <i>Bam</i> HI)
		ligiert
1020	pJR2-41XL- <i>cnp1</i> +	<i>cnp1</i> <sup>+</sup> mit ON 1134 und 1135 auf genom. DNA (Stamm 605)
		amplifiziert,Xhol/Spel geschnitten, in p274 (Xhol/Spel) ligiert
1021	pJR2-81XL-cnp1 <sup>+</sup>	<i>cnp1</i> <sup>+</sup> mit ON 1134 und 1135 auf genom. DNA amplifiziert, <i>Xho</i> l/ <i>Spe</i> l
		geschnitten, in p278 (Xhol/Spel) ligiert
1022	pJR2-3XL- <i>mal2-1</i> +	mal2-1 <sup>+</sup> mit ON 585 und 665 auf genom. DNA (Stamm 1057)
		amplifiziert, Xhol geschnitten, in p270 (Xhol/Smal) ligiert
1023	pJR2-3XL- <i>mal2-30</i> +	mal2-1 <sup>+</sup> mit ON 585 und 665 auf genom. DNA (Stamm
		2369)amplifiziert, Xhol geschnitten, in p270 (Xhol/Smal) ligiert

Die Konstrukte 1013, 1014, 1015 und 1016 wurden im Rahmen der Bachelorarbeit von Daniela Heinz unter meiner Anleitung erstellt.

#### 2.12 DNA Sequenzierung

Die korrekte Amplifikation von klonierten DNA-Fragmenten wurde stets mittels Sequenzierung verifiziert. Die Sequenzierungen wurden im Biologisch-Medizinischen Forschungszentrum der Universität Düsseldorf (BMFZ) durchgeführt.

#### 2.13 S. pombe Methoden

#### 2.13.1 Präparation genomischer DNA aus S. pombe

Die Präparation genomischer DNA aus *S. pombe* erfolgte gemäß dem Standardprotokoll nach Hoffmann und Winston (Hoffman & Winston 1987).

#### 2.13.2 "PCR auf Zellen"

Mit der "PCR auf Zellen" wurden Stämme auf das Vorhandensein oder nicht-Vorhandensein bestimmter Genabschnitte hin untersucht. Dabei wurden dem Reaktionsansatz (siehe Tabelle) Hefezellen zugesetzt. Als Anlagerungs-Temperatur wurde standardmäßig 55°C verwendet. Diese konnte aber je nach Art der verwendeten Oligonukleotide abweichen.

25 mM MgCl <sub>2</sub>	1,8 µl
10 x PCR Puffer	3 μΙ
ON a (50 mM)	0,3 µl
ON b (50 mM)	0,3 µl
10 mM dNTP	0,6 µl
Taq-Polymerase	0,3 µl
H <sub>2</sub> O	23,7 μl
Gesamtvolumen	30 µl

#### Programm für "PCR auf Zellen":

1. 94°C	5 min	
2. 94°C	1 min	Schritt 2-4 34 x wiederholen
3. 55°C	2,5 min	
4. 72°C	X min	X = 1 Min. pro kb
5. 12°C	∞	

#### 2.13.3 Paarung von S. pombe Stämmen

Durch Paarung zweier haploider *S. pombe* Stämme mit unterschiedlichen Paarungstyp (h<sup>+</sup> und h<sup>-</sup>) war es möglich genetische Merkmale neu zu kombinieren. Dazu wurde von beiden Stämmen eine geringe Menge Zellmaterial in einem Volumen von 20µl ddH<sub>2</sub>O vermengt und als Tropfen auf festem Malzextrakt Medium aufgetragen.

#### Malzextraktmedium

12 g Malzextrakt

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

in 281,5 ml ddH<sub>2</sub>O gelöst, pH-Wert auf 5,5 eingestellt und autoklaviert

Die Platte wurde für mindestens 2 Tage bei 25°C inkubiert. Zellen mit unterschiedlichem Paarungstyp verschmelzen zu einer diploiden Zelle, welche sich zu einer Tetrade mit vier haploiden Sporen entwickelt. Die Sporen können mittels Mikromanipulator voneinander getrennt werden, oder mittels "Random Spore" Methode auf Selektivmedium vereinzelt werden.

#### 2.13.4 Sporenseparation mittels Mikromanipulator

Mit einem Mikromanipulator wurden die 4 Sporen einer Tetrade voneinander getrennt. Dazu wurde eine geringe Menge Zellmaterial einerPaarungin ca. 100µl ddH<sub>2</sub>O resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde anschließend auf einem Bereich einer Vollmediumsplatte pipettiert. Mit der Glasfasernadel des Mikromanipulators wurden die Tetraden an definierteBereiche der Platte gelegt. Die Platten wurden für ca. 2h Stunden bei 30°C inkubiert, wobei die Ascussäcke aufplatzen und die vier Sporen freigelegt werden. Anschließend wurden die Sporen voneinander separiert und nebeneinander abgelegt. Nach einer Inkubationszeit von 3-4 Tagen wuchs aus jeder Spore ein haploider Stamm heran, der auf seinen Genotypen hin untersucht werden konnte.

#### 2.13.5 "Random Spore" Methode

Um Sporen einer Paarung in einem großen Maßstab zu vereinzeln wurde die "Random Spore" Methode verwendet. Dazu wurde eine geringe Menge Zellmaterial einer Paarung in 980µl ddH<sub>2</sub>O in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß resuspendiert. Dem Gemisch wurden 20µl einer 1:10 verdünnten  $\beta$ -Glucuronidase-Lösung zugesetzt und ü/N bei Raumtemperatur inkubiert. Durch die  $\beta$ -Glucuronidase Behandlung wurde die Zellwand der vegetativen Zellen sowie die der Tetraden verdaut, die Sporenwände blieben jedoch intakt. Der Ansatz wurde 2x mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen und auf entsprechende Selektivplatten ausplattiert. Einzelkolonien, welche aus einer Spore hervorgingen, konnten nach einer Inkubationszeit von 3-4 Tagen vereinzelt werden.

#### 2.13.6 Plasmidtransformation von S. pombe Zellen

Die Transformation von Plasmid DNA in *S. pombe* erfolgte nach der Lithiumacetat-Methode (Okazaki *et al.* 1990). Die Selektion nach Zellen, die ein Plasmid aufgenommen haben erfolgte durch Ausplattierung auf entsprechende Selektivmedien.

#### 2.13.7 Transformation mittels homologer Rekombination

Die Transformation linearer DNA-Fragmente in *S. pombe*für die C-terminale Epitopmarkierung oder Gendeletionerfolgte nach der Lithiumacetat-Methode (Okazaki *et al.* 1990). Dazu wurden DNA-Integrationskassetten so amplifiziert, dass diese 80 Bp Homologie zu dem zu integrierenden Bereich aufwiesen. Für die Selektion enthielt die Integrationskassette ebenfalls das *kan*<sup>R</sup>-Gen, welches den Zellen Resistenz gegen G418 verleiht(Bahler *et al.* 1998; Longtine *et al.* 1998). Neben dieser DNA wurde dem Transformationsansatz 5µl Heringssamen DNA (10 mg/ml) zugesetzt, welche zuvor auf 100°C erhitzt und sofort auf 4°C abgekühlt wurde. Diese soll den Abbau der zu integrierenden DNA durch die Exonukleasen der Hefezelle minimieren.

#### 2.13.7.1 C-terminale GFP-Epitopmarkierung von Fta2-291

Für die C-terminale GFP Epitopmarkierung von Fta2-291 wurde mit den Oligonukleotiden 169 und 170 auf Plasmid 177 als Matrize eine Integrationskassette amplifiziert. Die Integrationskassette wurde mittels homologer Rekombination in Stamm 1048 (*fta2-291*) transformiert (Abb. 2-1)



Abb. 2-1 Schematische Darstellung der C-terminalen GFP-Epitopmarkierung von *fta2-291*. Integration der *gfp-kan<sup>R</sup>*Integrationskassette an den 3' Bereich des *fta2-291* ORF.

Der Transformationsansatz wurde auf G418-haltigem Medium ausplattiert und für ca. 7 Tage bei 25°C inkubiert. Anschließend wurden Einzelkolonien auf G418-haltigen Medium vereinzelt. Die korrekte Integration der Kassette wurde mittels "PCR auf Zellen" mit den Oligonukleotiden 171 und 304 sowie 172 und 302 verifiziert. Eine positive Transformante wurde zweimal gegen den Wildtypstamm zurückgekreuzt.

#### 2.14 Proteinmethoden

#### 2.14.1 Proteinisolation aus S. pombe

1. alle Schritte wurden bei 4°C durchgeführt

2. ca. 150mlZellen einer logarithmisch gewachsenen Kultur 2 min bei 3000 rpm ernten

3. 1x mit 5 ml STOP-Puffer (150mM NaCl, 50mM NaF, 10mM EDTA pH8, 1mM NaN<sub>3</sub>) waschen

4. Zellen in 1 ml STOP-Puffer resuspendieren, in 2 ml Schraubverschluss-Röhrchen

überführen und 1 min bei 10000 rpm zentrifugieren

5. Überstand verwerfen, Zugabe von einem Volumen eines Eppendorf Reaktionsgefäßes an Glasperlen sowie 700µl HB15-Puffer (25mM MOPS, 60mM ß-Glycerophosphat, 15mM pNitrophenylphopsphat, 15mM MgCl<sub>2</sub>, 15mMEGTA,1 mMDTT,0,1 mMNatriumorthovanat,1%Triton-X100,1 mMPMSF, eine Tablette "Complete Protease Inhibitor")

6. Zellaufschluss erfolgte in einem Homogenisator der Firma PEQLAB 2x 5000rpm, Zwischen den Schritten wurden die Ansätze 2min auf Eis inkubiert

7. 1 min bei 15000 rpm zentrifugieren

8. den Überstand abnehmen und erneut 20 min bei 15000 rpm zentrifugieren(für die Isolation großer Mengen an Proteinextrakt (IP Mal2-1-GFP) wurde zu dem verbleibenden Glasperlen-Zellpellet erneut 700µl HB15-Puffer zugegeben und Schritt 6 wiederholt. Dieser Überstand wurde anschließend mit dem des ersten Aufschlusses vermengt)

9. Überstand (Proteinextrakt) in ein neues Eppendorf Reaktionsgefäß überführen

#### 2.14.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinextrakten

1µl Proteinextrakt wurden mit 800µl ddH<sub>2</sub>O und 200µl Bradford Reagenz in einem Eppendorf Reaktionsgefäß vermischt. Gegen eine Negativkontrolle wurde die Absorption bei 595 nm bestimmt. Mit Hilfe einer Eichgraden, welche mit definierten BSA-Konzentrationen (1 - 10 µg/ml) erstellt wurde, konnte die Proteinkonzentration des Proteinextraktes berechnet werden.

#### 2.14.3 Immunpräzipitation

Für die Präzipitation von GFP-Epitopmarkierten Proteinen wurde ein µMACS GFP Isolation Kit der Firma Miltenyinach Herstellerangaben verwendet. Statt der im Kit beigefügten Puffer wurde HB15-Puffer zum Equilibrieren bzw. Waschen der Säulen eingesetzt. Je nach Ansatz wurden 300-900µl Proteinextrakt mit 50-100µl magnetischen Kugeln vermischt. Sollten mehrere Proben miteinander verglichen werden, wurden diese mit HB15-Puffer auf die gleiche Proteinkonzentration verdünnt. Von dieser Verdünnung wurden gleiche Volumen mit dem gleichen Volumen an magnetischen Kugeln für die Prezipitation eingesetzt. 32,5µl des verdünnten Proteinextraktes wurde mit 12,5µl 4xSDS-Ladepuffer und 5µl 1M DTT vermengt und als Ladekontrolle eingesetzt. Für den Elutionsschritt wurden die Säulen vom Magneten entfernt und in ein Eppendorf Reaktionsgefäß gestellt um zu gewährleisten, dass sich sämtliche GFP-Epitopmarkierten Proteine im Eluat befinden.

#### 2.14.4 Proteinauftrennung und Entwicklung

- 1. die Proben wurden 10 min bei 100°C aufgekocht und auf ein 11% SDS-Polyacrylamidgel auftragen
- Elektrophorese erfolgte bei 200V in Laufpuffer (100 ml 10 x Laufpuffer: [30 g Tris, 144 g Glycin, ad 1 l ddH<sub>2</sub>O], 10 ml 10% SDS, 890 ml ddH<sub>2</sub>O)
- Transfer erfolgte 30min bei 300mA auf eine PVDF Transfer Membran, welche zuvor in Methanol equilibriert wurde. Membran und Filterpapier wurden in Transferpuffer (5,8g Tris, 2,9g Glycin, 3,7 ml 10% SDS, 200ml Methanol, ad 1l ddH<sub>2</sub>O) equilibriert.
- 4. Blockierung erfolgte für 1h bei Raumtemperatur in Blockierungslösung (3% Milchpulver in PBS/Tween)
- 5. Membran wurde ü/N bei 4°C in Erstantikörperlösung auf einem Rad inkubiert
- 6. Die Membran wurde 5x mit PBS/Tween gewaschen und zwischen den jeweiligen Waschschritten für einige Minuten auf einen Schüttler gestellt.
- 7. Die Membran wurde je nach Ansatz 1-4h mit der Zweitantikörperlösung bei Raumtemperatur auf einem Rad inkubiert.
- 8. Die Membran wurde 5x mit PBS/Tween gewaschen und zwischen den jeweiligen Waschschritten für einige Minuten auf einen Schüttler gestellt.
- Die Membran wurde mit 20ml DIGP3 (100mM Tris/HCl pH9.5, 100mM NaCl, 50mM MgCl<sub>2</sub>), 33µl BCIP und 66µl NBT im Dunkeln für 30 - 60min inkubiert
- 10. Die Reaktion wurde durch Waschen in  $ddH_2O$  gestoppt
- 11. Die entwickelten Membranen wurden mittels Scanner oder Geldokumentationssystems der Firma INTAS digital erfasst.

#### 2.14.4.1 Quantifizierung der Bandenintensität entwickelter Membranen

Die Quantifizierung von Proteinbanden erfolgte mit der Software ImageJ. Dabei wurde ein Messbereich definierter Größe der die Bande einschließt gemessen. Von diesem Wert wurde ein Hintergrundwert abgezogen, der mit einem Messbereich gleicher Größe oberhalb oder unterhalb der Bande gemessen wurde. Wurden mehrere Banden miteinander verglichen wurde stets mit einem Messbereich gleicher Größe gemessen.

#### 2.15 Mikroskopie

Um das Wachstum auf Platten oder die Zellmorphologie zu begutachten oder um die Zellen von Hefekulturen mit einer Zählkammer auszuzählen, wurde ein Standard Lichtmikroskop der Firma Zeiss verwendet.

#### 2.15.1 Immunfluoreszenz

Immunfluoreszenz-Untersuchungen von *S. pombe* Zellen wurden nach der Methode von Hagan und Hyams durchgeführt (Hagan & Hyams 1988). Dabei wurden die Zellen einer Flüssigkultur mit einer 3% Paraformaldehydlösung fixiert und die Zellwände für Antikörper und Farbstoffe durch Behandlung mit Zymolyase permeabilisiert.

Die Anfärbung von Mikrotubuli erfolgte mittels monoklonalem Anti-Maus TAT1 Antikörper (Woods *et al.* 1989). Als Sekundärantikörper wurde entweder ein Alexa Fluor®488 konjugierter Anti-Maus oder ein FITC konjugierter Anti-Maus Antikörper verwendet. Die DNA wurde mit 0,01 µg/ml 4,6-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI) angefärbt.

Begutachtung sowie quantitative Auswertung der Präparate erfolgte an einem Axiovert 200M Fluoreszenzmikroskop (Zeiss). Aufnahmen erfolgten mit einem Spinning-Disc Konfokal Mikroskop (Zeiss) mit einerAxioCam MRm Kamera(Zeiss) oder einer EMCCD Kamera (Rolera). Digital Nachbearbeitung erfolgte mit der Software ZEN 2011 (Zeiss) und PowerPoint.

#### 2.15.2 Lebendzellfluoreszenz

Um die Expression bzw. das Vorhandensein epitopmarkierter Proteine in lebenden Zellen zu beobachten wurde ein Axiovert 200M Fluoreszenzmikroskop (Zeiss) verwendet. Dabei wurden 5µl Kultur auf einen Objektträger gegeben, mit einem Deckglas bedeckt und mit Nagellack versiegelt.

#### 2.15.3 Konfokale Lebendzellfluoreszenz

Um das Verhalten bzw. die Dynamik epitopmarkierter Proteine in lebenden Zellen über lange Zeiträume zu beobachten wurden Zellen auf "Agarose pads"fixiert (Tran *et al.* 2004). Dies gewährleistet zum einen, dass die Zellen über lange Zeiträume ihre Position nicht verändern und schafft durch eine durchgehende Versorgung mit Nährstoffen ein natürliches Umfeld. Dazu wurde flüssigem Minimalmedium mit den benötigten Supplementlösungen 2 % Agorose zugesetzt. Um die Hintergrundfluoreszenz möglichst gering zu halten wurde Agarose eingesetzt welche auch für die DNA-Elektrophorese geeignet ist. Das Medium wurde mit der Agarose in der Mikrowelle gelöst, anschließend in Eppendorf Reaktionsgefäßen aliquotiert und bei Raumtemperatur gelagert. "Agarose pads" wurden zu Beginn eines jeden Versuches frisch angefertigt. Dazu wurde 2% Agarose-Medium bei 100°C im Heizblock gelöst. 40µl des heißen Mediums wurden auf einen Objektträger gegeben welcher anschließend mit einem zweiten Objektträger bedeckt wurde. Mit Scherbewegungen wurden die beiden Objektträger vorsichtig voneinander getrennt, so dass das ausgehärtete "Agarose pad" in der Mitte eines der Objektträger verblieb.

1 - 1,5ml einer logarithmisch wachsenden Kultur wurden 1 min bei 3000rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde in ca. 50μl frischem Mediumsresuspendiert. 1-5μl dieser Zellsuspension wurden auf das "Agar pad" aufgetragen und je nach Eigenschaft für einige Minuten leicht angetrocknet. Das "Agar pad" wurde mit einem Deckglas bedeckt und mit 100°C heißem VALAP versiegelt. Bei VALAP handelt es sich um eine 1:1:1 Mischung von Vaseline, Paraffin und Lanolin, welches die Austrocknung des "Agar pads" verhindern soll, gleichzeitig aber den Luftaustausch ermöglicht. Auf diese Weise konnten über mehrere Stunden hinweg epitopmarkierte Proteine in lebenden *S. pombe* Zellen aufgenommen werden.

Die Aufnahme erfolgten mit einem Spinning-Disc Konfokal Mikroskop (Zeiss) mit einer AxioCam MRm Kamera (Zeiss) oder einer EMCCD Kamera (Rolera). Die Bilder wurden mit der Software Axiovision (Zeiss) oder Zen 2011 (Zeiss) erfasst und nachbearbeitet. Wenn nicht anders angegeben erfolge die Aufnahme bei Raumtemperatur (20°C) und einer Belichtungszeit von 400ms je Kanal. Pro Zeiteinheit wurden standardmäßig 15 Ebenen mit einer Dicke von 0,5 µm aufgenommen. Die Signale jeder Ebene wurden mit der Funktion "Maximum Intensity Projection" auf eine Ebene projiziert.

#### 2.15.4 Quantifizierung von Lebendzellfluoreszenz Signalen

Um dieFluoreszenzintensität eines epitopmarkierten Proteins in lebenden Zellen bei verschiedenen Stämmen oder Bedingungen zu vergleichen wurden diese unter gleichen Bedingungen behandelt (Temperatur, Art und Charge des Mediums, Charge sowie Beschaffenheit des "Agar pads", Inkubationszeit, Laserintensität, Belichtungszeit, Kameraeinstellungen, eventuelles Streulicht).

Alle Aufnahmen einer zu vergleichenden Versuchsanordnung wurden auf die gleiche Weise digital nachbearbeitet (identische schwarz/weiß Werte für Helligkeit und Kontrast, gleiche Art der Exportierung von Abbildungen). Für die Quantifizierung wurden Aufnahmen, welche auf eine Ebene projiziert wurden im Tiff Format (ohne Konvertierung) exportiert. Quantifizierung erfolgte mit der Software ImageJ. Dabei wurde ein Messbereich definierter Größe der das zu messende Signal einschließt gemessen. Von diesem Wert wurde ein Hintergrundwert abgezogen, der mit einem Messbereich gleicher Größe in der Nähe des Signals gemessen wurde. Alle Signale bzw. Abbildungen einer oder unterschiedlicher Kulturen einer Versuchsanordnung wurden mit einem Messbereich gleicher Größe gemessen.

## 2.16 Berechnung der statistischen Signifikanz

Um unabhängige Stichproben miteinander zu vergleichen wurde bei Varianzhomogenität der Zwei-Stichproben-T-Test, bei Varianzheterogenität der näherungsweise Welch-Test verwendet. AlsSignifikanzniveauαwurde5%festgelegt.

#### Ergebnisse 3

# 3.1 Asp1 generierte Inositolpolyphosphate regulieren die Mitose in S. pombe

#### 3.1.1 IP<sub>7</sub> Aktivität verschiedener Asp1 Varianten

In unserem Labor wurde in einer extragenen Multikopien-Supressoranalyse mit einem konditional letalen mal3 Mutantenstamm ein verkürztes asp1 Genfragment isoliert, welches für eine N-terminale Variante des Asp1 Proteins(Asp1<sup>1-794</sup>) kodiert (Vietmeier-Decker 2004). Das Asp1 Protein ist eine Inositolpolyphosphatkinase und weist eine für 1/3 Polyphosphatkinasen charakteristische Domänenstruktur auf, bestehend aus der N-teminalen Kinasedomäne (Aminosäure 1-364) und aus einer C-terminalen Domäne (Aminosäure 365-920), die Homologie zu Histidin-Phosphatasen aufweist (Abb. 3-1)(Fridy et al. 2007; Mulugu et al. 2007). In unserem Labor wurden von Frau Dr. Jennifer Pöhlmann asp1 Mutantenstämme generiert, welche für Asp1 Varianten kodieren, bei denen hoch konservierte Aminosäuren der Kinase- bzw. der putativen "Phosphatasedomäne" substituiert wurden. Im Falle der Kinasedomäne wurde ein hoch-konservierter Aspartat-Rest an Position 333 innerhalb des katalytischen Zentrums mit Alanin substituiert (=Asp1<sup>D333A</sup>). Im Falle der "Phosphatasedomäne" wurde ein hoch konservierter Histidin-Rest an Position 397 gegen Alanin ausgetauscht (=Asp1<sup>H397A</sup>) (Abb. 3-1).



Darstellung der Asp1 Varianten, die in asp1 Mutantenstämmen exprimiert werden Bei Stamm *asp1*<sup>D333A</sup> liegt Aspartat-Rest des der Asp1 Proteins an Position 333 mit Alanin substituiert

vor. Bei Stamm asp1<sup>H397A</sup> liegt der Histidin-Rest an Position 397 des Asp1 Proteins Alanin mit substituiert vor.  $asp1^+$ = Wildtyp

Die "Phosphatasedomäne"besitzt selbst keine nachgewiesene enzymatische Funktion (Choi et al. 2007; Fridy et al. 2007; Shears 2009). In unserem Labor konnte aber gezeigt werden, dass die "Phosphatasedomäne" eine negativ-regulatorische Funktion auf die Kinasedomäne ausübt (Abb. 3-2A) (Pohlmann & Fleig 2010).

Um zu zeigen, dass die Kinasedomäne von Asp1 für die Produktion von IP<sub>7</sub> verantwortlich ist, wurde in einem *in vitro* Kinase Assay von Herrn Pascal Ramrath überprüft, ob durch rekombinante Asp1-Varianten im Reaktionsansatz vorhandenes IP<sub>6</sub> mit ATP zu IP<sub>7</sub> phosphoryliert werden kann (Abb. 3-2B). Es zeigte sich, dass Varianten mit funktioneller Kinasedomäne (Asp1<sup>1-364</sup>, Asp1, Asp1<sup>H397A</sup>) generellIP<sub>7</sub>produzieren können, wohingegen kein IP<sub>7</sub> erzeugt wird, wenn das katalytische Zentrumder Kinasedomäne mutiert vorliegt (Asp1<sup>D333A</sup>). Des Weiteren wird 3-5 mal mehr IP<sub>7</sub> generiert, wenn die "Phosphatasedomäne" nicht (Asp1<sup>1-364</sup>) oder nicht funktionell (Asp1<sup>H397A</sup>) vorliegt(Abb. 3-2B, (Pohlmann & Fleig 2010)).

Α





**A**: Schematische Darstellung des Asp1 Proteins mit seiner Domänenstruktur. Es konnte gezeigt werden, dass die "Phosphatasedomäne" eine negativ-regulatorische Funktion auf die Kinasedomäne ausübt.**B**: Die Kinase-Assay Reaktion wurde mit einer vergleichbaren Menge der angegebenen Proteinvarianten angesetzt.Nach der Auftrennung auf einem 35,5%-igem Polyacrylamidgel wurde das beinhaltendende IP<sub>6</sub>, IP<sub>7</sub> und ATP mit Toluidin Blau angefärbt. Abbildung wurde entnommen aus (Ramrath 2012). **C**: Graphische Darstellung der Menge an IP<sub>7</sub>, die durch die dargestellten Asp1 Varianten produziert wird.

Somit führt der Austausch desAspartat-Rests an Position 333 zum Verlust der Kinaseaktivität von Asp1 und die "Phosphatasedomäne"übt einen negativ-regulatorischenEinfluss auf die enzymatische Aktivität der Kinasedomäne aus. Zwar wurden diese Experimente *in vitro* durchgeführt, aber vorliegende *in vivo* Experimente liegen damit in Übereinstimmung(Pöhlmann 2010; Pohlmann &Fleig

2010; Ramrath 2012). Für die jeweiligen Asp1-Mutantenstämme bedeutet dies, dass  $asp1^{D333A}$  Zellen kein Asp1 generiertes IP<sub>7</sub> mehr herstellen können und dass die IP<sub>7</sub>-Konzentration in  $asp1^{H397A}$  Zellen im Vergleich zu $asp1^+$  Zellen sehrwahrscheinlich erhöht ist (Abb. 3-2C).

# 3.1.2 Der Phänotyp eines *mal3-1* Mutantenstammes kann durch Expression von *asp1*<sup>1-364</sup> supprimiert werden

Weitere Untersuchungen zeigten, dass die Suppression des*mal3-1* Mutantenstammes durch Expression von Plasmid-kodiertem*asp1*<sup>1-364</sup>, welches für die Kinasedomäne kodiert,erfolgt (Abb. 3-3). Da Mal3 für die Stabilität des Mikrotubuli-Zytoskeletts benötigt wird, ist Wachstum auf Medium dem die Mikrotubuli destabilisierende Substanz Thiabendazol (im Folgenden TBZ) zugesetzt wurde für den *mal3-1* Mutantenstamm letal (Abb. 3-3, (Beinhauer *et al.* 1997; Beinhauer 1999)). Die Expression von *asp1*<sup>1-364</sup> steht unter Kontrolle des *nmt1*<sup>+</sup> Promotors, welcher durch Abwesenheit von Thiamin im Medium dereprimiert vorliegt. Expression von *asp1*<sup>1-364</sup> supprimiert die TBZ-Sensitivität des *mal3-1* Mutantenstammes.



Abb. 3-3 Die TBZ-Sensitivität des *mal3-1* Mutantenstammes wird durch Expression von *asp1*<sup>1-364</sup> supprimiert

Serieller Verdünnungstropftest (10<sup>4</sup>-10<sup>1</sup> Zellen) des mal3-1 Stammes, transformiert mit der VektorkontrolleoderpREP3X-asp1<sup>1-</sup> <sup>364</sup>(*nmt1*<sup>+</sup> Promotor) inkubiert auf Minimalmedium bei 25°C mit und ohne 7µg/ml TBZ. Die Transformanten wurden 24h in flüssigem -Thia plasmid-selektiven Minimalmedium bei 25°C vorkultiviert und auf -Thia plasmid-selektiven Minimalmedium aufgetragen. Inkubationszeit: 6 Tage

Da Mal3 für die korrekte Segregation der Chromosomen benötigt wird(Beinhauer *et al.* 1997; Draviam *et al.* 2006), wurde in dieser Arbeit nun untersucht, ob das Asp1 Proteineinen Einfluss auf mitotische Prozesse in *S. pombe* hat.

## 3.1.3 Asp1 generiertes IP<sub>7</sub> wird für den Spindelaufbau benötigt

Da es sich bei Mal3 um ein Mikrotubuli-assoziiertes Protein handelt(Beinhauer *et al.* 1997; Beinhauer 1999), wurde untersucht, welchen Einfluss Inositolpolyphosphateauf die Organisation und Dynamik der mitotischenSpindelhaben. Dazu wurden Stämme benutzt, die ein GFP-α-Tubulin Fusionsprotein

exprimieren. Das Konstrukt (SV40::*gfp-atb2*<sup>+</sup>), welches für dieses Protein kodiert, steht unter Kontrolle des viralen SV40-Promotors und liegt im *leu1*-ORF endogen integriert vor (Jones *et al.* 1988; Bratman & Chang 2007).

Die Anwesenheit von GFP- $\alpha$ -Tubulin führt zu erhöhter TBZ-Sensitivität im Vergleich zum Wildtypstamm, der dieses Konstrukt nicht exprimiert (Abb. 3-4A; Reihe 1 und 4). Das Vorhandensein des *asp1*<sup>H397A</sup>-Allels führt, wie publiziert, zu einer deutlichen Reduktion der TBZ-Sensitivität (Abb. 3-4A; Reihe 4 und 5)(Pohlmann & Fleig 2010). Das Vorhandensein des *asp1*<sup>D333A</sup> Allelsführt*per se* schon zu schlechtem Wachstum auf TBZ, führt jedoch zusammen mit SV40::*gfp-atb2*<sup>+</sup> zu keinem additiven Effekt (Abb. 3-4A; Reihe3, 4 und 6).

Mit Hilfe eines Spinning Disc-Mikroskops wurden die Mikrotubuli von lebenden  $asp1^+$  SV40::gfp- $atb2^+$ ,  $asp1^{D333A}$ SV40::gfp- $atb2^+$ und  $asp1^{H397A}$ SV40::gfp- $atb2^+$  mitotischenZellen über die Zeit aufgenommen. Dabei zeigte sich, dass  $asp1^{D333A}$  SV40::gfp- $atb2^+$ Zellen mit kurzen, Metaphase-typischen, Spindellängen von ca. 3-5 µm (im Folgenden "kurze Spindeln") eine aberrante Spindelmorphologie aufwiesen.Später werde ich zeigen, dass es sich bei diesen Spindeln um Metaphasenspindeln handelt (Kapitel 3.1.3.3). Diese aberrante Spindelmorphologie beginnt mit dem Auftreten einer dünnen Spindelmitte,gefolgt von dem Zusammenbrechen der mitotischen Spindel (Abb. 3-4B). Auf den letzten drei Bildern dieser Zeitreihe ist zu sehen, dass sich die mitotische Spindel reorganisiert und sich wieder zu einer bipolaren Spindel zusammenfügt. Ein Kollaps kurzer mitotischer Spindeln konnte in  $asp1^+$  SV40::gfp- $atb2^+$  oder  $asp1^{H397A}$  SV40::gfp- $atb2^+$  Zellen nicht beobachtet werden, trat aber in 18% der gemessenen $asp1^{D333A}$ SV40::gfp- $atb2^+$  Zellen auf (Abb. 3-4C). Dies zeigt, dass Asp1 generiertesIP<sub>7</sub> für den Aufbau kurzer, Metaphase-typischer Spindeln benötigt wird.



SV40::GFP-Atb2

#### Abb. 3-4:Asp1 generiertes IP7 wird für den Spindelaufbau benötigt

**A**: Serieller Verdünnungstropftest ( $10^{4}$ - $10^{1}$  Zellen) der angegebenen Stämme bei 25°C mit und ohne  $10\mu$ g/ml TBZ.Inkubation erfolgte auf Vollmedium. Inkubationszeit: 4 Tage(Der Tropftest wurde von Frau Dr. Jennifer Pöhlmann durchgeführt) **B**: Konfokale Lebendzellfluoreszenzaufnahmen einer*asp* $1^{D333A}$  Zelle, welche das GFP-Atb2-Fusionsprotein unter Kontrolle des SV40-Promotors exprimiert. Zeit zwischen den gezeigten Bildern: 1 min. Der Stammwurde 24h bei 30°C in Minimalmedium (MM) vorinkubiert und auf "agarose pads" gleichen Medientyps aufgetragen. Aufnahme erfolgte bei ca.20°C. Balken:2 µm. Rechts: Schematische Darstellung der zu beobachtenden Spindelmorphologie. Grün: Spindel, grau: Spindelpol**C**: Prozentuales Auftreten der Phänotypen: Spindelbruch (grau) und kein Spindelbruch (schwarz) in mitotischen Zellenmit kurzen Spindeln (*asp* $1^+$ : N=24; *asp* $1^{H397A}$ : N=22; *asp* $1^{D333A}$ : N=17).

#### 3.1.3.1 Asp1 generiertes IP<sub>7</sub> wird für eine stabile Spindelmitte benötigt

Zwar wiesen 82% der kurzen Spindeln in  $asp1^{D333A}SV40::gfp-atb2^{+}$  Zellen keine Spindelbrüche auf (Abb. 3-4C), dennoch hatten auch diese eine aberrante Morphologie. Im Vergleich zum  $asp1^{+}$  SV40:: $gfp-atb2^{+}$  Stamm konnten in diesen Zellenkurze Spindeln mit dünnen Spindelmitten beobachtet werden (Abb. 3-5A).




05P10333A

0%

ospĺž

### Abb. 3-5: Asp1 generiertes IP<sub>7</sub> wird für eine stabile Spindelmitte benötigt

**A**: Repräsentative kurze Spindeln von  $asp1^+$  und *asp1*<sup>D333A</sup>Zellen mit der für die jeweilige Zeitreihe dünnsten Spindelmitte. (Aufnahme erfolgte wie in Abb. 3-4B)Balken: 2 µm.

B: % relative Signalintensität der Spindelmitte in Bezug auf eines der beiden Spindelenden. An der dünnsten Spindel Stelle der wurde die Fluoreszenzintensität der Spindel gemessen (1). Von diesem Wert wurde der Hintergrundwert (2) abgezogen (1-2). Auf die gleiche Weise wurde die Fluoreszenzintensität eines der Spindelenden gemessen und berechnet (3-4). Diese Werte wurden prozentual ins Verhältnis zueinander gesetzt (x100). Der erhaltene Wert (% relative Signalintensität) gibt die prozentuale Signalintensität der Spindelmitte bezogen auf das Spindelende an. Quantifizierung erfolgte mit ImageJ. (*asp1*<sup>+</sup>: N=9; *asp1*<sup>D333A</sup>: N=9; \*: p<0,0005 (Zwei-Stichproben-T-Test) verglichen mit  $asp1^+$ .

Um diesen Phänotyp quantitativ zu erfassen, wurden die relativen Signalintensitäten der Spindelmitte und eines der Spindelenden in Bezug zueinander gesetzt (Abb. 3-5B oben). Zum Messen wurde für die jeweilige Spindel der Zeitpunkt einer Zeitreihe verwendet, bei dem die Spindel in der Mitte am dünnsten war. Der Graph in Abb. 3-5B gibt an, dass in  $asp1^+$ SV40::qfp- $atb2^+$ Zellen die relative Signalintensität der Spindelmitte im Durchschnitt ca. 85% der Signalintensität des Spindelendes beträgt. Dagegen sind die Spindelmitten in *asp1*<sup>D333A</sup>SV40::*gfp-atb2*<sup>+</sup> Zellen signifikant dünner. Hier beträgt die relative Signalintensität der Spindelmitte im Durchschnitt ca. 55% der Signalintensität des Spindelendes. Die Intensität der Spindelenden zwischen  $asp1^+$  SV40::gfp- $atb2^+$ und *asp1*<sup>D333A</sup> SV40::*qfp-atb2*<sup>+</sup> Zellen war vergleichbar. Dies zeigt, dass Asp1 generiertes IP<sub>7</sub> benötigt wird, um die Stabilität der Spindelmitte kurzer Spindeln zu gewährleisten.

### 3.1.3.2 Asp1 reguliert die Stabilität der Spindelmitte

Um besser nachvollziehen zu können, wie das Auftreten dünner Spindelmitten mit einem Bruch der mitotischen Spindel korreliert, wurden die oben beschriebenen Experimente mit einem weiterenStamm wiederholt, bei dem  $\alpha$ -Tubulin ebenfallsmit *gfp* fusioniert vorliegt. Allerding steht bei diesem Stamm die Expression des Konstrukts*nmt81::gfp-atb2*<sup>+</sup> unter Kontrolle des Thiaminreprimierbaren *nmt81* Promotors (Garcia *et al.* 2001).In diesem Stamm treten durch eine geringere Expression von *nmt81::gfp-atb2*<sup>+</sup> im Vergleich zum SV40::*gfp-atb2*<sup>+</sup> Stamm bereits Spindeldefekte auf, wenn *asp1* wildtypisch vorliegt(Garcia *et al.* 2001; Bratman & Chang 2007; Kerres *et al.* 2007; Cassimeris & Tran 2010; Snaith *et al.* 2010; Jakopec 2011). Durch Verwendung dieses Stammes wurde versucht,ob das System dahingehend sensibilisiert werden kann, dass 1. der Phänotyp des *asp1*<sup>D333A</sup> Stammes verstärkt wird und sich 2. auch mögliche Unterschiede zwischen den Stämmen *asp1*<sup>+</sup> und *asp1*<sup>H397A</sup> messen lassen.

Durch die GFP-Epitopmarkierung des  $\alpha$ -Tubulins zeigt dieser Stamm, ähnlich wie der SV40::*gfp-atb2*<sup>+</sup> *per se* eine erhöhte Sensitivität gegenüber TBZ (Abb. 3-6A Reihe 4).Diese TBZ-Sensitivität wird auch hier durch Anwesenheit von*asp1*<sup>H397A</sup>leichtsupprimiert (Abb. 3-6A Reihe 5). Die Anwesenheit von *asp1*<sup>D333A</sup>erhöht dagegen leicht die TBZ-Sensitivität des *nmt81*::*gfp-atb2*<sup>+</sup> Stammes (Abb. 3-6AReihe 6). Bezogen auf das Wachstum der verschiedenen *asp1* Stämme hat die Anwesenheit von *nmt81*::*gfp-atb2*<sup>+</sup> also keinen großen Effekt. Durch mikroskopische Auswertung mitotischer Zellen mitkurzen Spindeln konnten aber für *asp1*<sup>+</sup>*nmt81*::*gfp-atb2*<sup>+</sup>, *asp1*<sup>D333A</sup>*nmt81*::*gfp-atb2*<sup>+</sup> und *asp1*<sup>H397A</sup>*nmt81*::*gfp-atb2*<sup>+</sup>Zellen deutliche Unterschiede beobachtet werden.

Es zeigte sich, dass in*asp1*<sup>+</sup>*nmt81*::*gfp-atb2*<sup>+</sup> Zellen *per se* schon 14% der kurzen Spindelnkollabieren,obwohl hier Asp1 wildtypisch vorliegt (Abb. 3-6B). In *asp1*<sup>D333A</sup>*nmt81*::*gfp-atb2*<sup>+</sup> Zellen war diese Frequenz massiv erhöht. Hier wiesen 91% der kurzen Spindeln einenKollaps auf (Abb. 3-6B), dem das Auftreten einer dünnen Spindelmitte vorausging. In allen beobachteten Fällen war es diesen Zellen aber trotzdem möglich,bipolare Spindeln zu reorganisieren und nachfolgend in die Anaphase einzutreten. Dünne Spindelmitten waren hier bereits in *asp1*<sup>+</sup>*nmt81*::*gfp-atb2*<sup>+</sup> Zellen zu erkennen (Abb. 3-6C).In *asp1*<sup>+</sup>*nmt81*::*gfp-atb2*<sup>+</sup> Zellen beträgt die relative Signalintensität der Spindelmitte im Durchschnitt nur ca. 57% der Signalintensität des Spindelendes. Das zeigt, dass der Verlust von Asp1 generiertem IP<sub>7</sub> das Auftreten von Spindelbrüchen massiv erhöht, wenn die Stabilität der Spindel bereits sensibilisiert ist.



Abb. 3-6:*asp1*<sup>D333A</sup> exprimierende Zellen zeigen eine massive Erhöhung des aberranten Spindelphänotyps des*nmt81::gfp-atb2*<sup>+</sup> Stammes, während *asp1*<sup>H397A</sup> diesen supprimiert A Serieller Verdünnungstropftest  $(10^4-10^1 \text{ Zellen})$  der angegebenen Stämme bei 25°C mit und ohne  $10\mu g/ml$  TBZ.Inkubation erfolgte auf Vollmedium. Inkubationszeit: 4-5Tage. (Der Tropftest wurde von Frau Dr. Jennifer Pöhlmann durchgeführt) B: Prozentuales Auftreten der Phänotypen: Spindelbruch (grau) und kein Spindelbruch (schwarz) in mitotischen*nmt81::gfp-atb2*<sup>+</sup> Zellen mit kurzen Spindeln (*asp1*<sup>+</sup>: N=37; *asp1*<sup>H397A</sup>: N=31; *asp1*<sup>D333A</sup>: N=21). C: % relative Signalintensität der Spindelmitte in Bezug auf eines der beiden Spindelenden. Auswertung erfolgte wie in Abb. 3-5B, Balken: 2  $\mu m(asp1^+: N=9; asp1^{H397A}: N=9; *: p<0,005$ 

(Zwei-Stichproben-T-Test) verglichen mit *asp1*<sup>+</sup>.

Durch Verwendung des nmt81::gfp- $atb2^+$  Stammes war es jetzt möglich, Unterschiede zwischen  $asp1^+$  und  $asp1^{H397A}$  Zellen zu messen.Kollabierten in  $asp1^+nmt81$ ::gfp- $atb2^+$  Zellen 14% der kurzen Spindeln, so wurde dieser Phänotyp durch die Expression des  $asp1^{H397A}$  Allels vollständig supprimiert (Abb. 3-6B). Auch der Phänotyp einer dünnen Spindelmitte, der in $asp1^+nmt81$ ::gfp- $atb2^+$ Zellen auftritt, wird durchAnwesenheit des  $asp1^{H397A}$  Allels supprimiert (Abb. 3-6C). Im Vergleich zu  $asp1^+nmt81$ ::gfp- $atb2^+$ Zellen beträgtin  $asp1^{H397A}nmt81$ ::gfp- $atb2^+$ Zellen die relative Signalintensität der Spindelmitte durchschnittlich 82% der Intensität des Spindelendes.Für $asp1^+nmt81$ ::gfp- $atb2^+$ Spindeln beträgt dieser Wert nur ca. 57%. Das zeigt, dass die Erhöhung der zellulären IP<sub>7</sub>-

Konzentration in  $asp1^{H397A}$  Zellen einen stabilisierenden Einfluss auf Mikrotubuli-Plus-Enden hat, da Phänotypen, die durch sensibilisierte Bedingungenim *nmt81*::*gfp-atb2*<sup>+</sup> Stamm auftreten, supprimiert werden. In Kapitel3.1.5.2wird anhand der Auswertung der Mikrotubuli-Dynamik die Suppression durch das  $asp1^{H397A}$ Allel auf den Phänotyp GFP-Epitopmarkierter Stämme detailliert beschrieben.

### 3.1.3.3 Asp1 generiertes IP<sub>7</sub> wird für den Aufbau der Metaphasenspindel benötigt

Da, wie beschrieben, das Vorhandensein vonGFP-α-Tubulin generell einen Einfluss auf die Stabilität von Mikrotubuli haben kann, wurde untersucht, ob die beschriebenen Spindelbrüche in *asp1*<sup>D333A</sup> Zellen auch zu beobachten sind, wenn α-Tubulin wildtypisch vorliegt. Dazu wurden Stämme hergestellt, bei denen die Spindelpolkörper (SPB)-Komponente Sad1 endogenmit mCherry markiert vorliegt und das Zentromer von Chromosom I mit GFP markiert vorliegt (Abb. 3-7A)(Nabeshima *et al.* 1998; Nakazawa *et al.* 2008). Zur Vereinfachung werde ich im Folgenden SPB-mCherry Zentromer1-GFPschreiben.

Die Anwesenheit von SPB-mCherry Zentromer1-GFP hat keinen Einfluss auf das Wachstum der Stämme (Abb. 3-7B). In der Metaphase befinden sich die beiden Zentromer1-GFP-Signale zwischen den SPBs, welche sich in der Prometaphase voneinander getrennt haben (Abb. 3-7A oben). In Anaphase A segregiert jeweils einZentromer1-GFP zu einem der Spindelpole (Abb. 3-7A Mitte), deren Abstand anschließend in Anaphase B durch die Elongation der Anaphasenspindel zunimmt (Abb. 3-7A unten).In *asp1*<sup>+</sup> SPB-mCherry Zentromer1-GFP Zellen konnten keine Spindelbrüche beobachtet werden (Abb. 3-7C). Tatsächlich traten aber in9% der *asp1*<sup>D333A</sup> SPB-mCherry Zentromer1-GFP Zellen Spindelbrücheauf. Diese konnten sowohl zu frühen als auch zu späten Zeitpunkten der Metaphase stattfinden. In allen Fällen war es auch hier der Zelle möglich, nach dem Kollaps wieder eine Metaphasenspindel aufzubauen.

Die exemplarische Zelle (Abb. 3-7D) zeigt, dass nach der Separation des SPBs und dem Ausrichten der Chromosomen in der Metaphase die Zelle ca.21 min in die Metaphase verbleibt. Während dieser Zeit segregieren die SPBs weiter voneinander bis zu einem Abstand von 4,5 µm (Abb. 3-7D Bild 5). Auf Bild 6 dieser Zeitreihe ist zu erkennen, dassein Kollaps der mitotischen Spindel auftrat, da sich die SPBs wieder aufeinander zu bewegt haben und sich der Abstand zwischen diesen auf 1,5 µm verringert hat. Das zeigt, dass das Auftreten eines Spindel-Kollapses ein genereller Phänotyp von *asp1*<sup>D333A</sup> Zellen ist. Des Weiteren treten diese Spindelbrüche auf, bevor die Schwesterchromatiden segregiert werden;somit brechen diese Spindeln in der Metaphase.





A: Schematische Darstellung der zellulären Lokalisation von Zentromer1-GFP (grün) und SPB-mCherry (rot) in Metaphase (oben) Anaphase A (Mitte) und Anaphase B (unten). Die in diesem Stamm nicht angefärbte Spindel ist als schwarzer Strich dargestellt.**B**: Serieller Verdünnungstropftest( $10^4-10^1$  Zellen) der angegebenen Stämme bei 30°C. Inkubation: 5 Tage auf -Thia Minimalmedium.**C**: Prozentuales Auftreten der Phänotypen: Spindelbruch (grau) und kein Spindelbruch (schwarz) in mitotischenZentromer1-GFP SPB-mCherry Zellen in der Metaphase (*asp1*<sup>+</sup>: N=31; *asp1*<sup>D333A</sup>: N=45)**D**:Exemplarische*asp1*<sup>D333A</sup> (*cen1-gfp, sad1-mCherry*) Zelle mit Spindel-Kollaps. Zeit zwischen den Abbildungen: 6 min. Kultivierung und Aufnahmebedingungen wie in Abb. 3-4B . Balken: 2 µm

Um besser nachvollziehen zu können, was an solchen kollabierenden Spindeln während der Metaphasesowie beim Übergang von der Metaphase in die Anaphase A passiert, wurden *asp1*<sup>D333A</sup> Zellen mit Hilfe eines weiteren Fluoreszenzmarkers aufgenommen. Die *S. pombe* Aurora Kinase Ark1 lokalisiert beim Eintritt in die Mitose auf dem Chromatin und findet sich besonders stark konzentriert in der Nähe der Kinetochore (Abb. 3-8A I)(Petersen *et al.* 2001; Kawashima *et al.* 2007). Beim Eintritt in die Anaphase Arelokalisiert Ark1in der Spindelmitte wo,diePol zu Pol-Mikrotubuli antiparallel überlagern (Abb. 3-8A II) (Petersen *et al.* 2001; Kawashima *et al.* 2012).

In der*asp1*<sup>+</sup>*ark1-gfp* SPB-mCherry Zelle in Abb. 3-8B ist zu Beginn dieser Zeitreihe ein punktförmiges Ark1-GFP-Signal (grün) zu erkennen, welches im Verlauf der Zeitreihe ca. 16 min zwischen den beiden SPBs (rot) verbleibt. Dieser Zeitraum repräsentiert die Chromatin- bzw. Kinetochor-Lokalisation von Ark1 in Prometa- und Metaphase. Zum Ende dieses Zeitraumes erkennt man, wie sich das punktförmige Signal für kurze Zeit in mehrere Signale aufteilt. Beim Eintritt in die Anaphase A (Abb. 3-8B II), nach ca. 18 min, liegt das Ark1-GFP-Signal "geschmiert" zwischen den beiden SPBs vor. Ab diesem Zeitraum beginnt die Spindel-Lokalisation von Ark1 in Anaphase A.



Ark1-GFP SPB-mCherry

**Abb. 3-8:Der Spindel-Kollaps in** *asp*1<sup>D333A</sup> **exprimierenden Zellen erfolgt nicht beim Eintritt in die Anaphase A A**: Schematische Darstellung der zellulären Lokalisation von Ark1-GFP (grün) und SPB-mCherry (rot) in Prometa-/Meta- (I links) und Anaphase (II rechts). Die grünen Punkte repräsentieren die Kinetochor- und Chromatin-Lokalisation von Ark1-GFP in Prometa- und Metaphase. Der grüne Balken repräsentiert die Spindel-Lokalisation von Ark1-GFP ab Anaphase A.Die durch diese Fluoreszenzmarker nicht zu sehenden Strukturen (mitotische Spindel) sind grau dargestellt.**B** + **C**: Lokalisation von Ark1-GFP und SPB-mCherry in  $asp1^{+}$  (B) und  $asp1^{D333A}$  (C). Gezeigt ist nur die Überlagerung der beiden Fluoreszenzsignale. Für  $asp1^{D333A}$  ist eine exemplarische Zelle mit Spindel-Kollaps gezeigt. Dieser Phänotyp trat in 6/33 mitotischen $asp1^{D333A}$  Zellen auf. Zeit zwischen den Abbildungen: 2 min. Kultivierung und Aufnahmebedingungen wie in Abb. 3-4B. Balken: 2 µm. I und II deuten die Zeitpunkte an, bei denen die in A gezeigte Lokalisation von Ark1-GFP beginnt. Stern: Markierung des Zeitpunktes nachdem ein Spindel-Kollaps eintritt. Pfeile in der Vergrößerung deuten punktförmige Kinetochor- und Chromatin-Lokalisation von Ark1-GFP zu diesem Zeitpunkt an.

In der *asp1*<sup>D333A</sup>*ark1-qfp* SPB-mCherry Zelle dagegen ist der Zeitraum, den Ark1 benötigt, um auf der Spindel zu lokalisieren, verlängert. Stattdessen findet sich in dieser Zelle ein ca. 18min langes Stadium vor, bei demanstatt eineseinzigen punktförmigen Signals mehrere punktförmige Ark1-GFP-Signale vorliegen, die sich zwischen den SPBs bewegen. In der asp1<sup>D333A</sup>ark1-gfp SPB-mCherry Zelle ist erst nach ca. 36 min eine für dieAnaphase A typische Lokalisation von Ark1 auf der Spindel zwischen den beiden SPBs zu erkennen (Abb. 3-8C II). Des Weiteren findet in dieser Zelle ein Kollaps der mitotischen Spindel statt. Die mit dem Stern gekennzeichnete Zelle dieser Zeitreihe weist einen SPB-Abstand von 4,5µm auf. Zwei Bilder weiter beträgt dieser Abstand nur 1,1µm, was zeigt, dass hier ein Spindelbruch aufgetreten sein muss. Die Vergrößerung zeigt, dass nach diesem Kollaps noch eindeutige punktförmige Ark1-GFP-Signale zu erkennen sind, was zeigt, dass Ark1 zu diesem Zeitpunkt noch nicht Spindel-lokalisiert ist. 4 min nach dem Bruch hat sich die Spindel bereits wieder reorganisiert und weitere 6min später tritt die Zelle in die Anaphase A ein. Des Weiteren ist zu erkennen, dass die Intensität der Ark1-GFP-Signale vor dem Auftreten des Spindelbruchs massiv abgenommen hat. Ebenfalls ist die anschließende Spindel-Lokalisation in der Anaphase in dieser Zelle, verglichen mit der asp1<sup>+</sup>ark1-gfp SPB-mCherry Zelle, weniger intensiv. Insgesamt konnten mit diesem Fluoreszenzmarker 6/33*asp1*<sup>D333A</sup>*ark1-gfp* SPB-mCherry Zellen mit einem Spindelkollaps beobachtet werden. In allen Fällen war nach dem Kollaps noch eine Chromatin-undKinetochor-Lokalisation von Ark1 zu erkennen. In 5/6 dieser Zellen mit einem Spindelbruch war die Signalintensität von Ark1, wie im gezeigten Beispiel, sowohl in der Meta- als auch in der Anaphase deutlich geringer, verglichen mit  $asp1^+ark1$ -gfp SPB-mCherry Zellen. Dies verifiziert zum einen die Zentromer1-GFP SBP-mCherry Daten, dass die Spindelbrüche während der Metaphase stattfinden, und zum anderen deuten die Daten darauf hin, dass das Auftreten von Spindelbrüchen mit einer reduzierten Kinetochor-Lokalisation von Ark1 in Zusammenhang steht.

### 3.1.4 *asp1*<sup>D333A</sup> Zellen arretieren transient in der Metaphase

*asp1*<sup>D333A</sup>SPB-mCherry Zentromer1-GFPZellen, deren Spindeln nicht kollabieren,zeigen im Vergleich zu *asp1*<sup>+</sup> SPB-mCherry Zentromer1-GFP Zellen eine Verzögerung beim Durchlaufen der Metaphase. Um dies quantitativ zu erfassen, wurde die Bewegung von Zentromer1-GFP und SPB-mCherry in

*asp1*<sup>+</sup>SPB-mCherry Zentromer1-GFP und *asp1*<sup>D333A</sup>SPB-mCherry Zentromer1-GFPZellen, welche nicht in der Metaphase kollabieren, ausgewertet. Der Beginn der Analyse ist diePrometaphase, in der die SPBs voneinander separieren, gefolgt von der Metaphase, in der sich die beiden Zentromer1-GFP-Signale in der Mitte zwischen denSPBs befinden (Abb. 3-9A). In der Anaphase A segregieren die beiden Zentromer1-GFP-Signale zu den SPBs, welche sich in Anaphase B durch die Spindelelongationzu den entgegengesetzten Zellenden bewegen.

Die repräsentativ gezeigte*asp1*<sup>+</sup>SPB-mCherry Zentromer1-GFPZelle benötigt von derSeparation der SPBs bis zur Segregation der Zentromere in Anaphase A einen Zeitraum von ca. 18 min (Abb. 3-9B). Dagegen ist die Dauer bis zur Anaphase A in der gezeigten *asp1*<sup>D333A</sup>SPB-mCherry Zentromer1-GFPZelle mit ca. 34 min deutlich länger (Abb. 3-9C). Um diesen Unterschied besser zu veranschaulichen, sind inAbb. 3-9D für diese beiden Zellen die SPB-Abstände gegen die Zeit aufgetragen. Man sieht deutlich, dass es in der *asp1*<sup>D333A</sup>SPB-mCherry Zentromer1-GFP Zelle länger dauert, bis die Spindelelongation in Anaphase B erfolgt, welche jeweils durch das steile Ansteigen der Linien gekennzeichnet ist. Bei der Auswertung von 19 Zellen zeigte sich, dass die Dauer von der SPB-Separation bis zu Anaphase A in *asp1*<sup>\*</sup>SPB-mCherry Zentromer1-GFPZellen bei durchschnittlich 19,2 min liegt (Abb. 3-9E). In *asp1*<sup>D333A</sup>SPB-mCherry Zentromer1-GFPZellen ist dieser Zeitraum signifikant um ca. 54% länger und beträgt im Durchschnitt 29,6 min. Dies bedeutet, dass *asp1*<sup>D333A</sup> Zellen transient in der Metaphase arretieren.



### Abb. 3-9:*asp1*<sup>D333A</sup>SPB-mCherry Zentromer1-GFPZellen arretieren transient in der Metaphase

**A**:Schematische Darstellung der zellulären Lokalisation von Zentromer1-GFP (grün) und SPB-mCherry (rot) in Prometa-, Meta-, Anaphase A und Anaphase B. Die durch diese Fluoreszenzmarker nicht zu sehenden Strukturen (mitotische Spindel) sind grau dargestellt. Jeweils darunter: Beispielaufnahmen lebender Zellen, übernommen aus B.**B** + **C**: Lokalisation von Zentromer1-GFP und SPB-mCherry in  $asp1^+$  (B) und  $asp1^{D333A}$ Zellen (C). Gezeigt ist nur die Überlagerung der beiden Fluoreszenzsignale. Zeit zwischen den Abbildungen: 2 min. Kultivierung und Aufnahmebedingungen wie in Abb. 3-4B.Balken: 2 µm**D**: Auftragung der SPB-Abstände gegen die Zeit für die in B und C gezeigten Zellen.**E**: Quantifizierung der Zeit, die die angegebenen Stämme benötigen, um von der Prometaphase (Separation der SPBs) in die Anaphase A (Segregation von Zentromer1-GFP auf die SPBs) einzutreten( $asp1^+$ : 19=;  $asp1^{D333A}$ : N=19; \*: p<0,0005 (Welch Test) verglichen mit  $asp1^+$ ).

Andere Arbeitsgruppen haben gezeigt, dass in *S. pombe* eine längere Metaphase mit einer elongierten Metaphasenspindel korreliert (Rajagopalan *et al.* 2004; Choi *et al.* 2009). Nabeshima et

al. konnten zeigen, dass Metaphasespindeln bei 20°C zwar sehr langsam aber um durchschnittlich 0,08  $\mu$ m/min wachsen (Nabeshima *et al.* 1998).Daher wurde untersucht, ob *asp1*<sup>D333A</sup> SPB-mCherry Zentromer1-GFP Zellen im Vergleich zu *asp1*<sup>+</sup> SPB-mCherry Zentromer1-GFP Zellen eine verlängerte Metaphasenspindel zum Ende der Metaphase aufweisen. Um dies zu überprüfen, wurden in *asp1*<sup>+</sup> und *asp1*<sup>D333A</sup> Zellen die Abstände der SPB-mCherry-Signale zu den Zeitpunkten einer Zeitreihe gemessen, in denen die Zentromer1-GFP-Signale zum ersten Mal segregiert vorlagen (Abb. 3-10A unten).





**A**: Gezeigt sind exemplarische  $asp1^+$  Zentromer1-GFP SPB-mCherry und  $asp1^{D333A}$  Zentromer1-GFP SPB-mCherry Zellen. Oben: Zeitpunkt der Zeitreihe 1 min vor der Chromosomensegregation. Unten: Zeitpunkt, bei dem die Chromosomen zum ersten Mal segregiert vorliegen. Abstand zwischen den Bildern: 1 min. Klammer + Längenangabe: Abstand der SPBs zu diesem Zeitpunkt. Balken: 2 µm B: Quantifizierung der SPB-Abstände zum Zeitpunkt, bei dem die Chromosomen zum ersten Mal segregiert vorliegen. ( $asp1^+$ : N=19;  $asp1^{D333A}$ : N=19; \*: p<0,0005 (Zwei-Stichproben-T-Test) verglichen mit  $asp1^+$ .

Es zeigte sich, dass in  $asp1^{D333A}$ SPB-mCherry Zentromer1-GFPZellen die SPB-Abstände zu diesem Zeitpunkt signifikant größer sind als in  $asp1^{+}$ SPB-mCherry Zentromer1-GFPZellen. Bei der Zentromer1-GFP-Segregation beträgt die Distanz zwischen den SPBs in  $asp1^{+}$ SPB-mCherry Zentromer1-GFPZellen durchschnittlich 3,5 µm (Abb. 3-10B). Dagegen ist dieser Abstand in  $asp1^{D333A}$ SPB-mCherry Zentromer1-GFPZellen länger und beträgt durchschnittlich 4,7 µm. Das zeigt, dass  $asp1^{D333A}$ Zellen neben einem transienten Arrest in der Metaphase auch eine korrespondierende Verlängerung der Metaphasenspindel aufweisen.

## **3.1.4.1** Der Spindelkontrollpunkt liegt in *asp1*<sup>D333A</sup> Zellen aktiviert vor

Ein Metaphasearrest ist die zelluläre Antwort des mitotischen Spindelkontrollpunktes auf Defekte bei der Kinetochor-Mikrotubuli-Verknüpfung. Dieser verhindert den Eintritt in die Anaphase A, wenn Kinetochore nicht mit Mikrotubuli verknüpft sind, oder falsche Verknüpfungen auftreten. Beim Spindelkontrollpunkt handelt es sich um einen hochkonservierten Multiprotein-Komplex, der in *S. pombe* aus den Proteinen Ark1, Mph1, Bub3, Bub1, Mad3, Mad2 und Mad1 besteht (Musacchio & Salmon 2007). Für diese Komponenten wurde in *S. pombe* eine lokalisationsabhängige Hierarchie beschrieben, bei der Ark1 und Mph1 an der Spitze stehen (Abb. 3-11A)(Millband & Hardwick 2002; Windecker *et al.* 2009; Heinrich *et al.* 2012; Ito *et al.* 2012; Yamagishi *et al.* 2012; Zich *et al.* 2012). Neben einer Rekrutierung der unteren Komponenten (Mad3, Mad2, Mad1) sollen Mph1, Bub3 und Bub1 auch für die Überprüfung der korrekten bipolaren Verknüpfung verantwortlich sein(He *et al.* 1998; Skoufias *et al.* 2001; Taylor *et al.* 2001; Garcia *et al.* 2002a; Howell *et al.* 2004). Dagegen wird Mad2 nur eine Überprüfung des generellen Vorhandenseins von Kinetochor-Mikrotubuli-Verknüpfungen nachgesagt(Waters *et al.* 1998; Skoufias *et al.* 2001; Zhou *et al.* 2002).

Um zu überprüfen, ob in  $asp1^{D333A}$  Zellen der mitotische Spindelkontrollpunkt aktiviert vorliegt, wurden  $asp1^{D333A}$ Stämme hergestellt, in denenjeweils eines der Gene, die für Komponenten des Spindelkontrollpunktes kodieren deletiert sind und das Wachstum der Doppelmutanten analysiert. Das Wachstum wurde auf TBZ-haltigen Platten untersucht, um das System durch eine sehr moderate Destabilisierung der Mikrotubuli zu sensibilisieren. Durch Zugabe von TBZ konnte für  $asp1^{D333A}$ Stämme in Kombination mit  $mph1\Delta$  oder $bub3\Delta$  ein schlechteres Wachstum, verglichen mit den Ausgangsstämmen, beobachtet werden (Abb. 3-11B).



Abb. 3-11: *asp1*<sup>D333A</sup> zeigt genetische Interaktion mit Komponenten des Spindelkontrollpunktes.

**A**: Schematische Darstellung der Komponenten des Spindelkontrollpunktes und deren hierarchische Struktur nach (Heinrich *et al.* 2012). Die Pfeile repräsentieren einige Lokalisationsabhängigkeiten, die innerhalb dieses Netzwerkesbeschrieben wurden (Pfeil mit durchgezogener Linie: starke Lokalisationsabhängigkeit; Pfeil mit unterbrochener Linie: Partielle Lokalisationsabhängigkeit)**B**: Serieller Verdünnungstropftest (10<sup>4</sup>-10<sup>1</sup> Zellen) der angegebenen Stämme mit der angegebenen Menge an TBZ. Inkubation erfolgte bei 25°C auf-Thia Minimalmedium. Inkubationsdauer: 6-7 Tage

Interessanterweise sind die Wachstumsdefekte von  $asp1^{D333A}$  Zellen in Kombination mit Komponenten weiter unten in der Hierarchie nicht so stark wie mit den oberen Komponenten. Für  $asp1^{D333A}mad2\Delta$  oder  $asp1^{D333A}mad3\Delta$  Zellen konnte kein sichtbar schlechteres Wachstum im Vergleich zu den Ausgangsstämmen beobachtet werden. Dies war auch auf höheren TBZ-Konzentrationen als der hier gezeigten der Fall (Daten nicht gezeigt). Dies lässt vermuten, dass der Spindelkontrollpunkt in  $asp1^{D333A}$  Zellen aktiviert vorliegt, aber die generelle Kinetochor-Mikrotubuli-Verknüpfung, welche durch Mad2 kontrolliert wird, intakt ist.

Um zu überprüfen, ob der Spindelkontrollpunkt für den transienten Arrest in *asp1*<sup>D333A</sup> Zellen verantwortlich ist, wurde die Zeit, in der die Zellen in der Metaphase verbleiben, mit dem SV40::*gfp*-

atb2<sup>+</sup>Fluoreszenzmarker in  $asp1^{D333A}$  und  $asp1^{D333A}mph1\Delta$  Zellen ausgewertet. Diemph1 $\Delta$ Einzelmutante zeigt keinenMetaphasearrest(Rajagopalan *et al.* 2004; Heinrich *et al.* 2012). Die Anwesenheit des SV40::*gfp-atb2*<sup>+</sup> Allels im*asp1*<sup>D333A</sup>*mph1* $\Delta$  Stamm hatte keinen Einfluss auf das Wachstum dieses Stammes auf TBZ (Abb. 3-12A). Die repräsentativ gezeigte *asp1*<sup>D333A</sup>SV40::*gfp-atb2*<sup>+</sup> Zelle benötigt vom Eintritt in die Mitose (Prometaphase)bis zum Beginn der Elongation der Spindel in Anaphase B ca. 45 min (Abb. 3-12B). Dagegen ist dieser Zeitraum in der gezeigten *asp1*<sup>D333A</sup>*mph1* $\Delta$ SV40::*gfp-atb2*<sup>+</sup> Zelle verkürzt. Diese Zelle tritt bereits nach ca. 20 min in die Anaphase B ein (Abb. 3-12C). Die Auftragung der Spindellänge gegen die Zeit in Abb. 3-12D verdeutlicht den massiven Zeitunterschied, bei dem diese beiden Zellen in einem Stadium mit einer kurzen Spindel verbleiben, bevor die Spindelelongation in Anaphase B erfolgt. Im Durchschnitt benötigen *asp1*<sup>D333A</sup>SV40::*gfp-atb2*<sup>+</sup> Zellen hier 39 min, um von der Prometaphase in die Anaphase B einzutreten (Abb. 3-12E). In *asp1*<sup>D333A</sup>*mph1* $\Delta$  SV40::*gfp-atb2*<sup>+</sup> Zellen ist dieser Zeitraum im Durchschnitt auf 18 min verkürzt. Diese Daten zeigen deutlich, dass der transienteMetaphasearrest in *asp1*<sup>D333A</sup> Zellen in Abhängigkeit des Mph1-abhängigen Spindelkontrollpunktes erfolgt.





### 3.1.4.2 Asp1 wird für die bipolare Kinetochor-Mikrotubuli-Verknüpfung benötigt

Im Folgenden wurdeuntersucht, ob der transienteMetaphasearrest im *asp1*<sup>D333A</sup> Stamm durchFehler bei der generellen Kinetochor-Mikrotubuli-Verknüpfung oder während der anschließenden bipolaren Ausrichtung hervorgerufen wird. Hierfür wurde ein Fluoreszenzmarker verwendet, mit dem zwischen diesen beiden Phasen unterschieden werden kann. Die Spindelkontrollpunkt-Komponente Bub1 wird zwar für die Überprüfung beider Phasen benötigt(Skoufias *et al.* 2001; Garcia *et al.* 2002a; Musacchio & Hardwick 2002), zeigt aber in *S. pombe*wie auch in höheren Eukaryonten eine deutlich stärkere Kinetochor- bzw. Chromatin-Lokalisation zu Beginn der Mitose, wenn die Kinetochore ungebunden vorliegen (Bernard *et al.* 1998; Musacchio & Hardwick 2002; Zhou *et al.* 2002; Chen 2004; Howell *et al.* 2004).

In der Prometaphase, wenn die Chromosomen noch nicht mit Mikrotubuli verknüpft sind, lokalisiert Bub1-GFP in wildtypischen S. pombe Zellen als intensives punktförmiges Signal auf den Kinetochoren (Abb. 3-13A links), welches sich beim Übergang in die Metaphase abschwächt (Abb. 3-13A Mitte). Dieser Zeitraum, in dem ein intensives Bub1-GFP-Signal zu beobachten ist, wurde von mir für die folgenden Auswertungen mit T1 bezeichnet. Während der Metaphase verbleibt Bub1-GFP als schwaches Signal auf den Chromosomen. In Anaphase A segregiert es mit den Chromosomen auf die Spindelpole sodass bei Eintritt in Anaphase A zwei schwache Bub1-GFP-Punktean den SPBs zu erkennen sind (Abb. 3-13A rechts). Der Zeitraum, der von mir als T2 benannt wurde, bezeichnet die Dauer, ab der das Bub1-GFP-Signal abgeschwächt vorliegt, bis es in Anaphase A segregiert. Um zu überprüfen, ob der Arrest in *asp1*<sup>D333A</sup> Zellen in T1 oder T2 erfolgt, wurde ein *asp1*<sup>D333A</sup>*bub1-gfp* Stamm konstruiert. Das verbesserte Wachstum des asp1<sup>D333A</sup> bub1-gfp Stammes im Vergleich zum *asp1*<sup>D333A</sup> Stamm auf der Kontrollplatte kann dem Vorhandensein des *ura4*<sup>+</sup>-Markers zugeschrieben werden mit dem die GFP-Epitopmarkierung von Bub1 selektioniert werden kann. Dieser Marker liegt im *asp1*<sup>D333A</sup> Ausgangsstamm nicht vor und führt zu einem langsameren Wachstum. Dies ist ein bei *S*. pombe generell zu beobachtendes Phänomen. Um aber zu zeigen, dass sich das Vorhandensein von bub1-gfp nicht negativ auf den Phänotyp des asp1<sup>D333A</sup> Stammes auswirkt, wurde das Wachstum auf TBZ mit den Ausgangstämmen kontrolliert (Abb. 3-13B). Hier zeigte derasp1<sup>D333A</sup>bub1-gfp Stamm auch nur ein leicht verbessertes Wachstum, verglichen mit dem asp1<sup>D333A</sup> Stamm. Daher wirkt sich die Anwesenheit des bub1-qfp Allels nicht negativ auf das Wachstum dieses Stammesaus.



### Abb. 3-13Bub1-GFP dient als Fluoreszenzmarker für ungebundene Kinetochore

**A**: Schematische Darstellung der Bub1-GFP-Lokalisation in Prometa-, Meta- und Anaphase (kleine grüne Kreise: Bub1-Lokalisation an gebundenen Kinetochoren, große grüne Kreise: Bub1-Lokalisation an ungebundenen Kinetochoren). Die durch diese Färbung nicht zu sehenden Strukturen sind grau dargestellt (graue Balken: Mikrotubuli, graue Kreise: Chromosomen). Unten: Beispielaufnahmen aus lebenden Zellen, übernommen aus Abb. 3-14A**B**: Serieller Verdünnungstropftest ( $10^4$ - $10^1$  Zellen) der angegebenen Stämme bei 25°C mit und ohne 7 µg/ml TBZ. Inkubation erfolgte auf -Thia Minimalmedium. Inkubationsdauer: 6 Tage

Die exemplarische *asp1*<sup>+</sup>*bub1-gfp* Zelle zeigt ab Bild 2 dieser Zeitreihe (Anfang T1) ein starkes Bub1-GFP-Signal, welches sich nach ca. 10 min abschwächt (Ende T1) (Abb. 3-14A). Danach dauert es ca. 12 min bis die diffusen Bub1-GFP-Signale in Anaphase A zu 2 distinkten Punkten segregieren (Ende T2), welche anschließend in Anaphase B, durch die Elongation der mitotischen Spindel, den Abstand zueinander vergrößern. In der exemplarischen *asp1*<sup>D333A</sup>*bub1-gfp* Zelle ist T1 ca. 7 min lang. T2 ist hierdoppelt so lang wie in der *asp1*<sup>+</sup>*bub1-gfp*Zelle und dauert ca. 24 min.





**A** +**B**: Lokalisation von Bub1-GFP in  $asp1^+$  (A) und  $asp1^{D333A}$  (B). Zeit zwischen den Abbildungen: 2 min. Kultivierung und Aufnahmebedingungen wie in Abb. 3-4B. Balken: 2 µm**C**: Quantifizierung von T1 und T2 in den angegebenen Bub1-GFP exprimierenden Stämmen. T1: Dauer des starken Bub1-GFP-Signals T2: Dauer vom Abschwächen des Signals bis Segregation der Signale in Anaphase A. (T1 und T2  $asp1^+$ :N= 30;  $asp1^{D333A}$ : N=29; \*: p<0,0005 (Welch Test) verglichen mit T2  $asp1^+$ .

Im Durchschnitt dauert T1 in *asp1*<sup>+</sup> *bub1-gfp* Zellen 10,8 min und 8,9 min in *asp1*<sup>D333A</sup>*bub1-gfp* Zellen. T2 hat in *asp1*<sup>+</sup>*bub1-gfp* Zellen eine durchschnittliche Länge von 10,7 min. Dieser Zeitraum ist in *asp1*<sup>D333A</sup>*bub1-gfp* Zellen signifikant erhöht und beträgt durchschnittlich 24 min. Das zeigt, dass die generelle Kinetochor-Mikrotubuli-Verknüpfung zu Beginn der Mitose in *asp1*<sup>D333A</sup> Zellen stattfindet, da während des transienten Arrests keine ungebundenen Kinetochore vorliegen. Es treten aber offenbar Probleme während der korrekten bipolaren Ausrichtung der Chromosomen auf.

# 3.1.4.3 Verlust der Bub3-abhängigen Kontrolle derKinetochor-Mikrotubuli-Verknüpfung führt zu massiven Segregationsdefekten

Die Spindelkontrollpunkt-Komponente Bub3 wird essentiell, wenn Spindeldefekte auftreten. Die korrekte bipolare Kinetochor-Mikrotubuli-Verknüpfung in Stämmen, in denen Spindeldefekte auftreten, erfolgt unter anderem in Abhängigkeit von Bub3. Liegt Bub3 hier nicht mehr funktionell vor, führt dies zu massiven Segregationsdefekten (Vanoosthuyse et al. 2009; Windecker et al. 2009).Da Spindeldefekte auch in *asp1*<sup>D333A</sup> Zellen auftraten, wurde untersucht, ob Bub3 in diesem Stamm für die bipolare Kinetochor-Mikrotubuli-Verknüpfung benötigt wird. Um zu untersuchen, ob es in diesem Stamm zu einem Verlust der korrekten bipolaren Verknüpfung kommt, wurde überprüft, welche Arten von Defekten in *asp1*<sup>D333A</sup>*bub3*∆ Zellen vorliegen.Dazu wurden Zellen des*asp1*<sup>D333A</sup> bub3△ Doppelmutanten-Stammes sowie die Ausgangsstämme fixiert, und die Mikrotubuli sowie die DNA wurden mit Antikörpern bzw. DAPI gefärbt (Abb. 3-15A). In den Ausgangsstämmen traten keine signifikanten Segregationsdefekte auf. Nur in *asp1*<sup>D333A</sup> Zellen konnten vereinzelt "lagging chromosomes" beobachtet werden, bei denen ein oder mehrere Chromosomen in der Anaphase noch nicht bis zu einem der Spindelpole transportiert worden waren, obwohl die Spindel bereits elongiert war (Abb. 3-15B). Dieser Phänotyp tritt auf, wenn ein Kinetochor durch Mikrotubuli beider Spindelpole gebunden ist (Griffiths et al. 2008). Dagegen konnten in  $asp1^{D333A}bub3\Delta$  bereits in Zellen mit einer kurzen Spindel aberrante Phänotypen beobachtet werden.In 12% dieser Zellen konntenSpindelnbeobachtet werden, bei denen die gesamte DNA ungleichmäßig auf nur einer Seite der Spindel vorlag (Abb. 3-15A(a)). In 88% der Zellen traten wildtypische kurze Spindeln auf, bei denen die DNA gleichmäßig über die Spindel verteilt vorliegt (Abb. 3-15A (b)). In *asp1*<sup>D333A</sup>*bub3*Δ Zellen in der Anaphase konnte neben einer korrekten Verteilung des Chromatins auf die beiden Spindelenden, verglichen mit den Ausgangsstämmen, massive mitotische Defekte beobachtet werden. Die auftretenden Defekte in der Anaphase wurden in Abb. 3-15B quantifiziert.



Abb. 3-15Bub3 wird in*asp1*<sup>D333A</sup> Zellen für die Korrektur falscher Kinetochor-Mikrotubuli-Verknüpfungen benötigt

**A**:  $asp1^{D333A}bub3\Delta$  Zellen wurden mit Paraformaldehyd fixiert undmit DAPI und anti-Tubulin Antikörperbehandelt. Der Stamm wurde zuvor ü/N bei 30°C in flüssigem Minimalmedium kultiviert. Rechts: schematische Darstellung der beobachtetenPhänotypen: Schwarz: Spindel; grau: Menge und Position der DNA. Phänotypen in Zellen mit kurzer Spindel:a: DNA nur auf einer Seite einer kurzen Spindel. b: wildtypische Situation in der Metaphase. a+b: Prozentuale Verteilung der beiden Phänotypen (N=66; N=Anzahl Zellen mit kurzer Spindel).Phänotypen in der Anaphase: c: morphologisch gleichmäßige Segregation der DNA. d:Ein substantieller Teil der DNA verbleibt in der Mitte und wird nur teilweise zu den Polen transportiert. e: "lagging chromosomes", ein oder mehrere Chromosomen haben den Spindelpol noch nicht erreicht. f: Fehlsegregation: auf einer Seite der Spindel befindet sich eine größere Menge DNA.Balken: 2 µm**B**: Prozentuale Verteilung der in A für Zellen in Anaphasen beschriebenen Phänotypen in den angegebenen Stämmen ( $asp1^{D333A}$ : N=93,  $bub3\Delta$ : N=109,  $asp1^{D333A}bub3\Delta$ : N=95; N=Gesamtzahl Zellen in Anaphase)

In 72% der *asp1*<sup>D333A</sup>*bub3*∆ Zellen in der Anaphase lag die DNA morphologisch wildtypisch auf beide Seiten der Spindel segregiert vor, wie es bei einer korrekten Segregation der Chromosomen der Fall ist (Abb. 3-15A (c)). In 8% der Zellenverblieb ein großer Teil der DNA in der Mitte der Spindelund war nur teilweise zu einem der Pole segregiert (Abb. 3-15A (d)).In 17% der Zellentraten "lagging chromosomes"auf, bei denen einzelne Chromosomen noch nicht segregiert vorlagen (Abb. 3-15A (e)). In 3% der Zellen trateine Fehlsegregation der DNA auf,bei derdie Chromosomen ungleichmäßig auf die Pole verteilt wurden (Abb. 3-15A (f)). Mit Hilfe von Zentromer1-GFP SPB-mCherry war es mir möglich, "lagging chromosomes" in lebenden  $asp1^{D333A}bub3\Delta$  Zellen zu beobachten. Ein Beispiel für diesen Phänotyp in einer lebenden Zelle zeigt Abb. 3-16. Chromosom 1 liegt in dieser  $asp1^{D333A}bub3\Delta$  Zentromer1-GFP SPB-mCherry Zelle in der Anaphase B bereits auf dem rechten SPB segregiert vor. Dagegen besitzt es zum linken SPB zu Beginn dieser Zeitreihe noch einen Abstand von 2,1 µm. Erst nach 2,5 Minuten hat Chromosom 1 auch den linken Spindelpolkörper erreicht, als dieser durch die Spindelelongation in Anaphase B bereits einen Abstand von ca. 15 µm zum rechten Spindelpolkörper aufweist. Zu Beginn der dargestellten Zeitreihe beträgt dieser Abstand erst ca. 13µm. "Lagging Chromosomes" konnten in 2/11 mitotischen  $asp1^{D333A}bub3\Delta$  Zentromer1-GFP SPB-mCherry Zellen beobachtet werden.



### asp1<sup>D333A</sup> bub3∆

### Abb. 3-16 Beispiel für "lagging chromosomes" in lebenden*asp1*<sup>D333A</sup>*bub3*∆ Zellen

Lokalisation von Zentromer1-GFP und SPB-mCherry in einer exemplarischen*asp1*<sup>D333A</sup>*bub3* $\Delta$  Zelle in Anaphase B. Zeit zwischen den Abbildungen:30sec. Kultivierung und Aufnahmebedingungen wie in Abb. 3-4B. Balken: 2 µm; Rechts: Schematische Darstellung der Position von Zentromer1 (grün) zu den betreffenden Zeitpunkten relativ zur Position des SPBs (rot).

Diese Daten zeigen deutlich, dass in  $asp1^{D333A}bub3\Delta$  Zellen Segregationsdefekte auftreten, die darauf hindeuten, dass die Chromosomen nicht korrekt mit den Mikrotubuli verknüpft sind. Das nicht Vorhandensein mitotischer Defekte im  $bub3\Delta$  Stamm zeigt, dass keine falschen Verknüpfungen auftreten, wenn Asp1 wildtypisch vorliegt. Treten in $asp1^{D333A}$  Zellen falsche Verknüpfungen auf, werden diese durch den Spindelkontrollpunkt in Abhängigkeit von Bub3 verbessert und führen nicht zu Segregationsdefekten. Kann diese Verbesserung in  $asp1^{D333A}bub3\Delta$  Zellen nicht mehr erfolgen, da Bub3 deletiert ist, tritt die Zelle trotz falscher Verknüpfungen in die Anaphase A ein, was zu einer falschen Verteilung der DNA führen kann.

### 3.1.4.3.1 asp1<sup>D333A</sup>bub3∆ Zellen können polyploid werden

In wildtypischen Zentromer1-GFP exprimierenden Zellen sind aufgrund eines haploiden Chromosomensatzes 2 Zentromer1-GFP-Signale zu erwarten (Abb. 3-17A). In 2/11 *asp1*<sup>D333A</sup>*bub3*∆Zentromer1-GFP SPB-mCherry Zellen konnten dagegen Mitosen beobachtet werden, die davon abwichen (Abb. 3-17B).



### Abb. 3-17: Beispiel für Polyploidie in lebenden asp1<sup>D333A</sup>bub3∆ Zellen

**A**: Schematische Darstellung der zellulären Lokalisation von Zentromer1-GFP (grün) und SPB-mCherry (rot) inMeta-, Anaphase A und Anaphase B in einer wildtypischen haploiden Zelle.**B**: Lokalisation von Zentromer1-GFP und SPB-mCherry in einer von 2/11*asp1*<sup>D333A</sup>*bub3*Δ mitotischen Zellen. Zeit zwischen den Abbildungen: 1 min. Kultivierung und Aufnahmebedingungen wie in Abb. 3-4B . Balken: 2 µm. Rechts: Vergrößerung sowie schematische Darstellung der Anzahl von Zentromer1 (grün) zu dem betreffenden Zeitpunkt, SPBs (rot).

In diesem Beispiel sind bereits zu Beginn dieser Zeitreihe mehr als 2 Zentromer1-GFP-Signale zu erkennen. Diese Signale bewegen sich im Verlauf der Zeitreihe zwischen den SPBs. Da sich der Abstand zwischen den SPBs vergrößert, handelt es sich vermutlich um eine mitotische Zelle in Anaphase B. Die Vergrößerung rechts zeigt, dass in dieser Zelle 6 Zentromer1-GFP-Signale vorliegen. Dieser Phänotyp ist sehr ungewöhnlich, da polyploide *S. pombe* Zellen *per se* nicht überlebensfähig sind. Die Tatsache dass es sich hier eindeutig um eine mitotische Zelle handelt und es zum Ende der Zeitreihe zu einer partiellen Segregation der Zentromer1-GFP-Signale kommt, zeigt, dass es dieser Zelle dennoch möglich war, in die Mitose einzutreten. Dieser Phänotyp konnte in *asp1*<sup>D333A</sup> Einzelmutanten nicht beobachtet werden, bzw. ist für *bub3*Δ Zellen nicht publiziert. Das zeigt, dass der Verlust der Bub3 abhängigen bipolaren Kinetochor-Mikrotubuli-Verknüpfung in *asp1*<sup>D333A</sup> Zellen zu polyploiden Zellen führen kann denen es sogar möglich ist in die Mitose einzutreten.

### 3.1.4.4 Die Aurora Kinase Ark1 lokalisiert in Abhängigkeit der Asp1 generierten IP<sub>7</sub>-Menge

Die *S. pombe*Aurora Kinase Ark1 wird für die Korrektur falscher Kinetochor-Mikrotubuli-Verknüpfungen benötigt. Liegt Ark1 nicht mehr funktionell vor, führt dies zu Segregationsdefekten. Der Verlust der Kinetochor-Mikrotubuli-Verknüpfung erfolgt bei der Korrektur falscher Verknüpfungen durch Phosphorylierung von Mikrotubuli interagierenden Kinetochorproteinen, wie z.B. Ndc80(Hauf *et al.* 2007; Tsukahara *et al.* 2010; Carmena *et al.* 2012).

Daher wurde untersucht, ob die Lokalisation von Ark1 durch die Reduzierung der Asp1 generierten IP<sub>7</sub>-Menge verändert wird. Dazu wurden in *asp1<sup>+</sup> ark1-gfp* und *asp1<sup>D333A</sup>ark1-gfp* Zellen die Ark1-GFP-Signale nach der SPB-Trennung quantifiziert (Abb. 3-18A).



## Abb. 3-18 Die Lokalisation der *S. pombe* Aurora Kinase Ark1 ist in *asp1*<sup>D333A</sup> Zellen während der Prometaphase reduziert

**A**: links: Ark1-GFP SPB-mCherry exprimierende Zelle in der Prometaphase. Der weiße Kasten im grünen Kanal gibt an, welcher Bereich für die Quantifizierung verwendet wurde. rechts: Lokalisation von Ark1-GFP in je 20  $asp1^+$  und  $asp1^{D33A}$  Zellen während der Prometaphase.**B**: Quantifizierung der relativen Signalintensität von Ark1-GFP in den angegebenen Stämmen. Von der gemessenen Signalintensität für Ark1-GFP wurde die Hintergrundfluoreszenz der Zelle subtrahiert. ( $asp1^+$ :N= 20;  $asp1^{D33A}$ : N=20; \*: p<0,0005 (Zwei-Stichproben-T-Test) verglichen mit  $asp1^+$ ).

Zu Beginn der Mitose lokalisiert Ark1 konzentriert als punktförmiges Signal an den Kinetochoren und als weniger intensives Signal im Bereich der Telomere (Vanoosthuyse *et al.* 2007). In *asp1<sup>+</sup>ark1-gfp* Zellen konnte für Ark1-GFP eine Signalintensität von durchschnittlich 16,3 gemessen werden. In *asp1<sup>D333A</sup>ark1-gfp* Zellen war diese auf durchschnittlich 10,8 reduziert. Dass zeigt, dass die Lokalisation von Ark1 während der Mitose durch eine geringere Menge von Asp1 generiertem IP<sub>7</sub> negativ beeinflusst wird.

Ich konnte also zeigen, dass *asp1*<sup>D333A</sup> Zellen in Abhängigkeit des mitotischen Spindelkontrollpunktes transient in der Metaphase arretieren. Dies deutet auf Probleme während der bipolaren Verknüpfung der Chromosomen hin. Da in der *asp1*<sup>D333A</sup> Einzelmutante keine mitotischen Defekte auftreten, werden falsche Verknüpfungen vermutlich während dieses Arrests korrigiert, sodass die Chromosomen dennoch wildtypisch segregieren. Korrespondierend dazu treten massive mitotische Defekte auf, wenn diese Korrektur durch Deletion von Bub3 nicht mehr möglich ist, was zeigt,

dassder *asp1*<sup>D333A</sup> Stamm auf einen intakten Kontrollpunkt angewiesen ist. Die Aurora Kinase Ark1, welche für das Korrigieren falscher Verknüpfungen benötigt wird ist in *asp1*<sup>D333A</sup> Zellen nicht mehr korrekt lokalisiert. Dies könnte ebenfalls ein Indiz dafür sein, dass Asp1 selbst für die Aktivität des Spindelkontrollpunktes benötigt wird.

## 3.1.5 Die Dauer der mitotischen Spindelphasen wird durch Asp1 generiertes IP<sub>7</sub> moduliert

Die Mitose in *S. pombe* kann in 3 Spindelphasen eingeteilt werden (Abb. 3-19). Phase I, in der sich die mitotische Spindel aufbaut und sich bis zur Länge einer Metaphasenspindel entwickelt; Phase II, bei der die Spindel während der Metaphase bei einer konstanten Länge verbleibt und Fehler bei der bipolaren Chromosomenanordnung dezimiert werden; und Phase III, bei der die Spindel in der Anaphase B bis zu den Zellenden elongiert und dann von der Mitte aus abgebaut wird (Hagan & Hyams 1988).Ich konnte zeigen, dass die Abwesenheit von Asp1 generiertem IP<sub>7</sub> in *asp1*<sup>D33A</sup> zu einem transienten Metaphasearrest und somit zu einer verlängerten Phase II führt (Kapitel 3.1.4). Um zu untersuchen, ob unterschiedliche IP<sub>7</sub>-Mengen einen Einfluss auf alle drei Phasen der Mitose haben, wurde im Folgenden mit Hilfe der Fluoreszensmarker SV40::*gfp-atb2*<sup>+</sup> bzw. Zentromer1-GFP SPB-mCherry die Geschwindigkeit der Mikrotubuli-Polymerisation in Phase I und III sowie ergänzend die Dauer von Phase II in *asp1*<sup>H397A</sup> gemessen.



#### Abb. 3-19Die Spindelphasen von S. pombe

Schematische Darstellung der mitotischen Spindel (grün) in Prometa-, Meta-, Anaphase A und Anaphase B. grün: Spindel, grau: SPBs

### 3.1.5.1 Die Mikrotubuli-Elongation in Phase I ist in *asp1*<sup>D333A</sup> Zellen schneller

Um zu überprüfen, ob die Asp1 generierte IP<sub>7</sub>-Menge einen Einfluss auf die Geschwindigkeit der Mikrotubuli-Polymerisation in der Prometaphase hat, wurde die Geschwindigkeit der SPB-Seperation in Phase I in *asp1*<sup>+</sup>, *asp1*<sup>H397A</sup> und *asp1*<sup>D333A</sup> Zentromer1-GFP SPB-mCherry Zellen gemessen. Für die

Auswertung wurde dazu der Abstand der SPBs 4 min nach Eintritt in die Mitose gemessen (Abb. 3-20A). Als START dieser Messung wurde der Zeitpunkt definiert, an dem die SPB-mCherry-Signale zum ersten Mal als zwei Punkte zu erkennen waren. Den Zeitpunkt 4 min nach dem START Zeitpunkt habe ich willkürlich gewählt und bezeichne diesen als STOP.



Zentromer1-GFP SPB-mCherry

STOP

**Elongationsgeschwindgikeit der Spindel in Phase I A**: Lokalisation von Zentromer1-GFP und SPB-mCherry in  $asp1^+$ und  $asp1^{D333A}$ Stämmen während der Prometaphase. Gezeigt ist nur die Überlagerung der beiden Fluoreszenzsignale. Zeit zwischen den Abbildungen: 30sec. Kultivierung und Aufnahmebedingungen wie in Abb. 3-4B. Balken: 2 µm **B**: Quantifizierung der SPB Separation in Phase I (Prometaphase) in µm/min ( $asp1^+$ : N=20;  $asp1^{D333A}$ : N=20; $asp1^{H397A}$ : N=20. \*: p<0,0005 (Zwei-Stichproben-T-Test) verglichen mit  $asp1^+$ .

Die exemplarisch gezeigte  $asp1^+$  Zentromer1-GFP SPB-mCherry Zelle hat 4 min nach dem START einen SPB-Abstand von 1,6 µm (Abb. 3-20A links). Dieser Abstand ist in der gezeigten  $asp1^{D333A}$ Zentromer1-GFP SPB-mCherry Zelle größer und beträgt 1,9 µm (Abb. 3-20A rechts). Aus diesen Daten ergibt sich, dass die Separation der SPBs in der gezeigten  $asp1^+$  Zentromer1-GFP SPB-mCherry Zelle mit einer Geschwindigkeit von 0,4 µm/min erfolgt. In der gezeigten  $asp1^{D333A}$  Zentromer1-GFP SPBmCherry beträgt dieser Wert 0,48 µm/min. Im Durchschnitt erfolgt die SPB-Separation in Phase I in  $asp1^+$  Zentromer1-GFP SPB-mCherry Zellen mit einer Geschwindigkeit von 0,4 µm/min (Abb. 3-20B). Dieser Wert ist in  $asp1^{D333A}$  Zentromer1-GFP SPB-mCherry Zellen signifikant auf durchschnittlich 0,5 µm/min erhöht. In  $asp1^{H397A}$  Zentromer1-GFP SPB-mCherry Zellen betrug die Geschwindigkeit durchschnittlich 0,43 µm/min und wich somit nicht signifikant von der Geschwindigkeit für

die

*asp1*<sup>+</sup>Zentromer1-GFP SPB-mCherry Zellen ab.Da die Separation der SPBs durch die Elongation der mitotischen Spindel zwischen den SPBs erfolgt, kann dieser Wert auch als Elongationsgeschwindigkeit der mitotischen Spindel in Phase I bezeichnet werden. Dies zeigt, dass *asp1*<sup>D333A</sup> in Phase I eine schnellere Elongation der mitotischen Spindel aufweisen als *asp1*<sup>+</sup> Zellen.

### 3.1.5.2 Phase II ist in *asp1*<sup>H397A</sup> Zellen verkürzt

Wie in Kapitel 3.1.3.1 - 3.1.3.2 beschrieben, führt mehr Asp1 generiertesIP<sub>7</sub> inasp1<sup>H397A</sup>nmt81::gfpatb2<sup>+</sup> Zellen dazu, dass die Phänotypendünner Spindelmitten sowie die Spindelbrüche, die imasp1<sup>+</sup>nmt81::qfp-atb2<sup>+</sup> Stamm auftreten, supprimiert werden. Um zu untersuchen, ob eine erhöhte intrazelluläre IP<sub>7</sub>-Menge auch einen Einfluss auf den Aufbau der Spindel hat, wurde die Dauer von asp1<sup>H397A</sup> Phase Ш zwischen*asp1*<sup>+</sup> und Zellen mit Hilfe des SV40::gfpatb2<sup>+</sup>Fluoreszenzmarkersverglichen. Phase I dauert in der repräsentativ gezeigten asp1<sup>+</sup>SV40::gfpatb2<sup>+</sup>Zelle (Abb. 3-21B) ca. 6 min, Phase II dauert ca. 20 min und Phase III dauert ca. 18 min. In der gezeigten asp1<sup>H397A</sup>SV40::gfp-atb2<sup>+</sup>Zelle dauert Phase I ca. 7 min und ist damit mit der Dauer von Phase I in der asp1<sup>+</sup> SV40::qfp-atb2<sup>+</sup>Zelle vergleichbar.Dagegen ist Phase II hier deutlich kürzer und beträgt nurca. 10 min (Abb. 3-21C). Um diesen Unterschied zu verdeutlichen, wurde in Abb. 3-21D die Länge der mitotischen Spindel für die gezeigten Zellengegen die Zeit aufgetragen. Der graue bzw. schwarze Balken unter dem Graph soll die Dauer von Phase I + II in der asp1<sup>H397A</sup> SV40::gfp-atb2<sup>+</sup> bzw. *asp1*<sup>+</sup> SV40::*gfp-atb2*<sup>+</sup> Zelle verdeutlichen. Da die Spindellängen beim Übergang von Phase I zu II sehr variabel und damit nicht klar zu identifizieren sind, wurden für diese und die folgenden Auswertungen die Dauer von Phase I und Phase II als Einheit ausgewertet.

Um zu überprüfen, ob eine verkürzte Metaphase in  $asp1^{H397A}$  SV40::gfp- $atb2^+$  Zellen statistisch signifikant ist, wurde die Gesamtdauer der Spindelphasen I und II in je 16 mitotischen  $asp1^+$  SV40::gfp- $atb2^+$  und  $asp1^{H397A}$  SV40::gfp- $atb2^+$  Zellen quantifiziert. Es zeigte sich, dass  $asp1^+$  SV40::gfp- $atb2^+$  Zellen für den Aufbau der mitotischen Spindel bis zum Beginn der Spindelelongation (Phase I + II) im Durchschnitt 24,3 min benötigen (Abb. 3-21E). In  $asp1^{H397A}$  SV40::gfp- $atb2^+$  Zellen ist diese Zeit signifikant auf durchschnittlich 16,4 min verkürzt. Die Messungen wurden ebenfalls mit Hilfe des nmt81::gfp- $atb2^+$  Fluoreszenzmarkers durchgeführt. Auch hier war in  $asp1^{H397A}$  Zellen Phase II kürzer als in  $asp1^+$  Zellen (Daten nicht gezeigt).





**A**: Schematische Darstellung der mitotischen Spindel (grün) in Prometa-, Meta-, Anaphase A und Anaphase B. Die durch diese Färbung nicht zu SPBs sind grau dargestellt. **B** + **C**: Konfokale Lebendzellfluoreszenz einer  $asp1^+SV40::gfp-atb2^+$  bzw.  $asp1^{H397A}SV40::gfp-atb2^+$  Zelle. Aufnahme erfolgte in 10sec Abständen. Zeit zwischen den gezeigten Bildern: 2 min.Kultivierung und Aufnahmebedingungen wie in Abb. 3-4B. Balken: 2 µm. Die römischen Zahlen sollen den Beginn der in A dargestellten Spindelphasen repräsentieren.**D**: Auftragung der Spindellänge gegen die Zeit für die in B und C gezeigten Zellen. Die Balken unter dem Graph stellen schematisch die Dauer von Phase I+II da. **E**: Dauer der Spindelphasen I + II in  $asp1^+SV40::gfp-atb2^+$  und  $asp1^{H397A}SV40::gfp-atb2^+$  Zellen ( $asp1^{H397A}: N=16; *: p<0,0005$  (Zwei-Stichproben-T-Test) verglichen mit  $asp1^+$ ).

#### Ergebnisse

Die Dauer der Spindelphasen in  $asp1^+$ SV40:: $gfp-atb2^+$  Zellen kann aufgrund abweichender Messtemperaturen nicht mit publizierten Werten verglichen werden. Es ist daher nicht bekannt, ob bei 20°C  $asp1^+$  SV40:: $gfp-atb2^+$ Zellen *per se*durch GFP-epitopmarkiertes  $\alpha$ -Tubulineinen Arrest in Phase II aufweisen(Snaith *et al.* 2010). Um zu überprüfen, ob Phase II im  $asp1^{H397A}$  Stamm, verglichen mit  $asp1^+$  generell kürzer ist, wurden die Messungen unter Bedingungen wiederholt, in denen  $\alpha$ -Tubulin wildtypisch vorliegt. Dazu wurden die Bewegung von Zentromer1-GFPSPB-mCherry in  $asp1^+$ und  $asp1^{H397A}$  Zellen ausgewertet. Die exemplarisch gezeigte  $asp1^+$ Zentromer1-GFP SBP-mCherry Zelle benötigt für Phase I(SPB-Separation)undPhase II (bipolare Anordnung + Anaphase A) ca. 18 min(Abb. 3-22A). Im Durchschnitt liegt diese Zeit in  $asp1^+$ Zentromer1-GFP SBP-mCherry Zellen bei 19,2 min (Abb. 3-22C). Vergleicht man die durchschnittliche Dauer von Phase I und II bei dieser Messung (19,2 min) mit der für  $asp1^+$  SV40:: $gfp-atb2^+$  Zellen (24,3 min, Abb. 3-21E) ergibt sich eine Differenz von 5,1 min. Das zeigt, dass die GFP-Epitopmarkierung von  $\alpha$ -Tubulin generell zu einem transienten Arrest in der Metaphase führt. Die gezeigte  $asp1^{H397A}$ Zentromer1-GFP SBP-mCherry Zelle benötigtfür Phase I und II ca. 16 min (Abb. 3-22B). Auchin diesen Stämmenist diese Zeit in  $asp1^{H397A}$ Zellen, verglichen mit $asp1^+$ Zellen, verkürzt und beträgt hier durchschnittlich 17,2 min (Abb. 3-22C).



Zentromer1-GFP SPB-mCherry

### Abb. 3-22 Mehr Asp1 generiertesIP<sub>7</sub> führt per se zu einer verkürzten Metaphase

**A** + **B**: Lokalisation von Zentromer1-GFP und SPB-mCherry in  $asp1^+$  (A) und  $asp1^{H379A}$  (B). Gezeigt ist nur die Überlagerung der beiden Fluoreszenzsignale. Zeit zwischen den Abbildungen: 2 min. Kultivierung und Aufnahmebedingungen wie in Abb. 3-4B. Balken: 2 µm**C**: Quantifizierung der Zeit, die die angegebenen Stämme für Phase I (Separation der SPBs)und Phase II (Segregation von Zentromer1-GFP) benötigen.( $asp1^+$ : N=19;  $asp1^{H397A}$ : N=23; \*: p<0,005 (Zwei-Stichproben-T-Test) verglichen mit  $asp1^+$ ).

Zum Ende meiner Doktorarbeit war es mir aufgrund neuer technischer Voraussetzungen möglich, diese Messungen bei einer höheren Temperatur (30°C statt 20°C) zu wiederholen. Auch unter diesen Bedingungen war in *asp1*<sup>H397A</sup>Zentromer1-GFP SBP-mCherry Zellen, im Vergleich zu *asp1*<sup>+</sup>Zentromer1-GFP SBP-mCherry Zellen, Phase I und II signifikant verkürzt (Abb. 3-23).



## Abb. 3-23 Mehr Asp1 generiertesIP<sub>7</sub> führt *per se* zu einer verkürzten Metaphase

Quantifizierung der Zeit, die die angegebenen Stämme für Phase I (Separation der SPBs) und Phase II (Segregation von Zentromer1-GFP) benötigen. Diese Auswertung wurde mit Lebendfluoreszenzaufnahmen analog zu Abb. 3-22A-B durchgeführt. Fall erfolgten die Aufnahmen In diesem bei einer Inkubationstemperatur von 30°C. ( $asp1^+$ : N=23;  $asp1^{H397A}$ : N=23; \*:p<0,0005 (Zwei-Stichproben-T-Test) verglichen mit *asp1*<sup>+</sup>)

Aus diesen Daten lassen sich zwei Phänotypen ableiten, die durch mehr Asp1 generiertes IP<sub>7</sub> in  $asp1^{H397A}$  hervorgerufen werden. Zum einen führt das Vorhandensein GFP-epitopmarkierten  $\alpha$ -Tubulins bei einer Messtemperatur von 20°C generell zu einem transienten Metaphasearrest. In  $asp1^{H397A}$  Zellen wird dieser Phänotyp supprimiert. Zum anderen führt aber die Erhöhung der IP<sub>7</sub>-Menge in  $asp1^{H397A}$  Zellen generell zu einer kürzeren Phase II, verglichen mit  $asp1^+$  Zellen, auch wenn  $\alpha$ -Tubulin wildtypisch vorliegt.

### 3.1.5.3 Die Mikrotubuli-Elongation in Phase III ist in *asp1*<sup>D333A</sup> Zellen schneller

Die schnellere Elongationsrate in  $asp1^{D333A}$  Zentromer1-GFP SPB-mCherry Zellen, welche ich für Phase I gezeigt habe,konnte auch in Phase III beobachtet werden (Abb. 3-24).Um diese zu messen, wurde als START der Zeitpunkt von mir definiert, bei dem die Chromosomen bereits segregiert vorliegen und der Abstand zwischen den SPBs genau 5 µm beträgt (Abb. 3-24A+B). 6 min später wurde der Abstand zwischen den SPBs erneut gemessen. Abb. 3-24A zeigt je ein Beispiel einer  $asp1^+$ Zentromer1-GFP SPB-mCherry bzw.  $asp1^{D333A}$  Zentromer1-GFP SPB-mCherry Zelle von START bis STOP der Messung. Um die Unterschiedliche Elongationsgeschwindigkeit besser darzustellen, wurde in Abb. 3-24B für die gezeigten Zellen die Abstände der SPBs gegen die Zeit aufgetragen. Die gezeigte  $asp1^+$  Zentromer1-GFP SPB-mCherry Zelle hat 6 min nach dem START-Zeitpunkt einen SPB-Abstand von 7,6 µm, also erfolgt in diesem Zeitraum eine Zunahme des Abstandes von 2,6 µm. Zu diesem Zeitpunkt beträgt der SPB-Abstand in der gezeigten in  $asp1^{D333A}$  Zentromer1-GFP SPB-mCherry Zelle bereits 8,7 µm, daher erfolgt hier eine Zunahme von 3,7 µm. Für die gezeigten Zellen ergibt sich daraus eine Geschwindigkeit für die SPB Separation in Phase III von 0,43 µm/min in der *asp1*<sup>+</sup>Zentromer1-GFP SPB-mCherry Zelle und 0,62 μm/min in der *asp1*<sup>D333A</sup> Zentromer1-GFP SPB-mCherry Zelle.





Abb. 3-24 Asp1 generiertes IP<sub>7</sub> beeinflusst die Elongationsgeschwindgikeit der Spindel in Phase III A: Lokalisation von Zentromer1-GFP und SPBmCherry in  $asp1^+$  und  $asp1^{D333A}$  in Anaphase B. Gezeigt ist nur die Überlagerung der beiden Fluoreszenzsignale. Zeit zwischen den Abbildungen: 1 min. Kultivierung und Aufnahmebedingungen wie in Abb. 3-4B. Balken: 2 µm **B**: Auftragung der Spindellängen gegen die Zeit für die in A gezeigten Zellen beginnend bei einem SPB-Abstand von 5µm. **C**: Quantifizierung der SPB-Separation in µm/min in den angegebenen Stämmen ( $asp1^+$ : N=13;  $asp1^{D333A}$ : N=13; $asp1^{H397A}$ : N=13 \*: p<0,0005 (Zwei-Stichproben-T-Test) verglichen mit  $asp1^+$ ).

Im Durchschnitt beträgt dieseGeschwindigkeit in  $asp1^+$  Zentromer1-GFP SPB-mCherry Zellen 0,46  $\mu$ m/min (Abb. 3-24C). In $asp1^{D333A}$  Zentromer1-GFP SPB-mCherry Zellen ist dieser Wert auf durchschnittlich 0,67  $\mu$ m/min erhöht. $asp1^{H397A}$  Zentromer1-GFP SPB-mCherry Zellen weisen dagegen mit durchschnittlich 0,51  $\mu$ m/min im Vergleich zu  $asp1^+$  Zentromer1-GFP SPB-mCherry Zellen keine

signifikant abweichende Elongationsrate in Phase III auf. Demnach erfolgt in  $asp1^{D333A}$  Zellen in Phase III eine schnellere Elongation der mitotischen Spindel, wodurch eine schnellere Separation der SPBs zu den Zellenden erfolgt. Wie auch bei der Elongation in Phase I konnte auch hier in  $asp1^{H397A}$  Zellen keine signifikante Abweichung, verglichen mit  $asp1^+$  Zellen, gemessen werden.

Das zeigt, dass durch die Abwesenheit von Asp1 generiertem IP<sub>7</sub> in *asp1*<sup>D333A</sup> Zellen die Elongation der mitotischen Spindel inPrometaphase (Phase I) und Anaphase B (Phase III) erhöht ist. Extra Asp1 generiertes IP<sub>7</sub> in *asp1*<sup>H397A</sup> Zellen hat dagegen unter den von mir gewählten Bedingungen keinen Einfluss auf die Geschwindigkeit der Spindelelongation in Phase I und III. Dagegen ist in *asp1*<sup>H397A</sup>Zellen Phase I + II verkürzt.

Es konnte also gezeigt werden, dass die Asp1 generierte IP<sub>7</sub>-Menge sowohl einen massiven Einfluss auf die Stabilität als auch auf die Funktion der mitotischen Spindel hat. Änderungen der physiologischen Menge an IP<sub>7</sub>führt zu einer veränderten Spindeldynamik in allen drei Spindelphasen. Die stärksten Phänotypen können in Phase II beobachtet werden. Hier führt Abwesenheit von IP<sub>7</sub>zu instabilen und kollabierenden Spindeln sowie zu Fehlern bei der bipolaren Kinetochor-Mikrotubuli-Verknüpfung. Dagegen haben erhöhte IP<sub>7</sub>Mengen einen stabilisierenden Einfluss auf die Spindel in Phase II und verkürzen die Dauer dieser Phase.

## 3.1.6 Asp1 generiertes IP<sub>7</sub>beeinflusst einen Subkomplex des Sim4-Kinetochor-Komplexes

Es konnte gezeigt werden, dass Asp1 generiertes IP<sub>7</sub> für die korrekte Kinetochor-Mikrotubuli-Verknüpfung benötigt wird. Daher wurde untersucht, welcher Teil des Kinetochors betroffen ist, wenn die Asp1 generierte IP<sub>7</sub>-Menge verändert wird. Der Kinetochor in *S. pombe* wurde biochemisch in Form zweier konstitutiv gebundener Großkomplexe isoliert, den NMS-Komplex und den Sim4-Komplex. Es existieren aber auch noch weitere Komplexe, wie z.B. der Mikrotubuli bindende DASH Komplex, welcher jedoch in *S. pombe* nicht essentiell ist (Liu *et al.* 2005). Für einige Kinetochorproteine dieser Komplexe sind konditional letale Mutantenstämme verfügbar. Um zu untersuchen, wie diese Stämme auf unterschiedliche IP<sub>7</sub>-Mengen reagieren, wurde zunächst ein verkürztes *asp1*-Genfragment(*asp1*<sup>1-364</sup>), welches für die Kinasedomäne kodiert im Wildtypstamm und in Kinetochor-Mutantenstämmen des Sim4-Komplexes sowie des NMS-Komplexes exprimiert, umdas Wachstum dieser Stämme zu untersuchen.

Expression von  $asp1^{1-364}$ hatte keinen sichtbaren Effekt auf das Wachstum des Wildtypstammes (Abb. 3-25A). Sowohl unter reprimierten (+Thia) als auch dereprimierten (-Thia) Bedingungen führte hier die Expression von  $asp1^{1-364}$  zu einem mit dem Stamm, transformiert mit der Vektorkontrolle, vergleichbaren Wachstum. Bei den in Abb. 3-25B untersuchten Stämmen handelt es sich um temperatursensitive Mutantenstämme des Sim4-Kinetochor-Komplexes.Die Stämme sind nach den mutierten Allelen benannt, welche für die Komponenten Mal2, Fta2 und Mis6 des Sim4-Kinetochor-Komplexes kodieren. Expression von  $asp1^{1-364}$  im mal2-1, mis6-302 und fta2-291Stamm führte bereits bei der permissiven Temperatur (25°C) zu schlechtem Wachstum (Abb. 3-25B). Des Weiteren ist hier das Wachstum bei der höchsten Temperatur gezeigt, bei der die Stämme generell noch gut wachsen können (semi-permissive Temperatur). Für den mal2-1 Stamm beträgt diese Temperatur 28°C. Inkubation bei 30°C ist letal für diesen Stamm (restriktive Temperatur). Die Stämme fta2-291 und mis6-302 können bei 30°C normal wachsen. Für diese Stämme ist erst die Inkubation bei 32°C letal. Man sieht deutlich, dass in allen drei Stämmen die Expression von  $asp1^{1-364}$  bei den semi-permissiven Temperaturen letal ist.





Abb. 3-25Die Expression von *asp1*<sup>1-364</sup> hat einen negativen Effekt auf einen Subkomplex des Sim4-Kinetochor-Komplexes

**A-B**: Serieller Verdünnungstropftest (10<sup>4</sup>-10<sup>1</sup>) Zellen) der angegebenen Stämme, transformiert mit der Vektorkontrolle oder pREP3X-asp11-364 (*nmt1*<sup>+</sup> Promotor), welche bei den angegebenen Temperaturen auf Minimalmedium inkubiert wurden. Die Stämme wurden 24h in flüssigem +Thia bzw. -Thia plasmid-selektiven Minimalmedium bei 25°C vorkultiviert und auf +Thia bzw. -Thia plasmid-selektiven Minimalmedium aufgetragen. Inkubationsdauer: A: 4 Tage B+C: 5 - 6 Tage.C: Schematische Darstellung des Kinetochors in S. pombe. Der Sim4-Komplex ist rot hervorgehoben.

Dasbeobachtetenicht-Wachstum der Kinetochor-Mutantenstämme bei der semi-permissiven Temperatur, hervorgerufen durch Expression von  $asp1^{1-364}$ ,war spezifisch für Mutantenstämme des Sim4-Kinetochor-Komplexes. Bei den in Abb. 3-26 untersuchten Mutantenstämmen handelt es sich um temperatursensitive Mutantenstämme des NMS-Kinetochor-Komplexes. Expression von  $asp1^{1-364}$  führt in diesen Stämmen sowohl bei der permissivenals auch bei höheren Temperaturen nur zu einem moderat schlechteren Wachstum. Als restriktive Temperatur sind hier für *mis12-537* und *sos7-178* Temperaturen gezeigt, bei denen die Stämme auf +Thia noch wachsen können. Dies liegt daran, dass Thiamin einen generell positiven Effekt auf das Wachstum von *S. pombe* Stämmen hat. Man sieht aber deutlich, dass diese Stämme auf Medium -Thia nur noch sehr schlecht wachsen. Erst unter diesen Bedingungen, wo diese Stämme bereits *per se* sehr angegriffen sind, wirkt sich die Expression von  $asp1^{1-364}$  letal aus.



Abb. 3-26Die Expressionvon *asp1*<sup>1-364</sup> hat einen moderaten Effekt auf das Wachstum von NMS-Komplex-Mutantenstämmen

**A**: Schematische Darstellung des Kinetochors in *S. pombe*. Der NMS-Komplex ist rot hervorgehoben.**B**: Serieller Verdünnungstropftest  $(10^4-10^1 \text{ Zellen})$  der angegebenen Stämme, transformiert mit der VektorkontrolleoderpREP3X-*asp1*<sup>1-364</sup>(*nmt1*<sup>+</sup> Promotor),welche bei den angegebenen Temperaturen auf +Thia bzw. -Thia Minimalmedium inkubiert wurden. Kultivierung erfolgte wie in Abb. 3-25. Inkubationsdauer: 5 - 6 Tage.

Diese Daten deuten darauf hin, dass Asp1 generiertes IP<sub>7</sub>hauptsächlich eine regulierende Funktion für Komponenten des Sim4-Kinetochor-Komplexes hat. Im Folgenden wurde anhand von Mal2 und

Fta2 exemplarisch untersucht, welchen Einfluss unterschiedliche Mengen von Asp1 generiertem IP<sub>7</sub> auf diese Komponenten haben.

### 3.1.7 Kinetochor-Lokalisationder Mal2 und Fta2 Proteine wird durch IP<sub>7</sub> reguliert

## 3.1.7.1 Extra Asp1 generiertesIP<sub>7</sub> reduziert die Kinetochor-Lokalisationder Proteine Mal2 und Fta2

Für die Stämme mal2-1 und fta2-291 konnte gezeigt werden, dass die Mal2-1 und Fta2-291 Proteine eine temperaturabhängige Kinetochor-Lokalisation zeigen((Kerres et al. 2006) und diese Studie: Daten nicht gezeigt). Bei der permissiven Temperatur lokalisieren diese im Vergleich zum wildtypischen Protein bereits reduziert am Kinetochor. Bei hohen Temperaturen können somit diese Proteine nicht mehr am Kinetochor lokalisieren, was zu massiver Fehlsegregation und somit zum Tod des Stammes führt. Die GFP-Fusionsproteine wurden durch GFP-Epitopmarkierung der in Abb. 3-25 beschriebenen Stämme mal2-1 und fta2-291 hergestellt ((Kerres et al. 2006) und diese Arbeit). Um zu untersuchen, welche Auswirkungen mehr Asp1 generiertes IP<sub>7</sub> auf die Kinetochor-Lokalisation von Mal2-1-GFP und Fta2-291-GFPhat, wurde deren Kinetochorsignal-Intensität in asp1<sup>+</sup>mal2-1-gfp und  $asp1^{H397A}mal2-1-gfp$  bzw.  $asp1^{+}fta2-291-gfp$  und  $asp1^{H397A}fta2-291-gfp$  Zellen mittels Lebend-Zell-Mikroskopie in Interphasenzellen quantifiziert(Abb. 3-27A+B). Die relative Signalintensität von Fta2-291-GFP beträgt in *asp1<sup>+</sup>fta2-291-gfp* Zellen durchschnittlich 4,8 und in *asp1<sup>H397A</sup>fta2-291-gfp* Zellen nur 3,5 (Abb. 3-27A). Eine ähnliche Reduktion in asp1<sup>H397A</sup> Zellen kann auch für Mal2-1-GFP beobachtet werden. Hier ist die Signalintensität von durchschnittlich 4,8 in asp1<sup>+</sup>mal2-1-qfp Zellen auf durchschnittlich 3,5 in asp1<sup>H397A</sup>mal2-1-gfp Zellen reduziert (Abb. 3-27B). Das zeigt, dass die Kinetochor-Lokalisation von Mal2-1-GFP sowie Fta2-291-GFP negativ durch eine höhere Menge von Asp1 generiertemIP<sub>7</sub> beeinflusst wird.


Abb. 3-27: Kinetochor-Lokalisation von Mal2-1-GFP und Fta2-291-GFP ist durch extra Asp1 generiertes IP<sub>7</sub> reduziert

**A+B**: Oben: Lebendfluoreszenzaufnahmen der angegebenen Stämme. Stämme wurden 24h bei 25°C in Minimalmedium vorinkubiert und auf "agarose pads" gleichen Medientyps aufgetragen. Aufnahme erfolgte bei ca. 20°C. Laserintensität: 100%. Balken: 2 µm.**A**: Quantifizierung der relativen Signalintensität von Fta2-291-GFP in den angegebenen Stämmen. ( $asp1^+$ : N=50;  $asp1^{H397A}$ : N=50; \*: p<0,0005 (Zwei-Stichproben-T-Test) verglichen mit  $asp1^+$ )**B**: Quantifizierung der relativen Signalintensität von Mal2-1-GFP in den angegebenen Stämmen. ( $asp1^+$ : N=50;  $asp1^{H397A}$ : N=50; terproben-T-Test) verglichen mit  $asp1^+$ )

## 3.1.7.1.1 Extra Asp1 generiertes IP<sub>7</sub> reduziert auch die Menge an Kinetochor-assoziiertem wildtypischen Mal2 und Fta2

Als nächstes wurde untersucht, ob die reduzierte Signalintensität von Mal2-1-GFP und Fta2-291-GFP durch mehr Asp1 generiertes IP<sub>7</sub> spezifisch ist für die temperatursensitiven Mutantenstämme, oder ob diese Reduktion auch beobachtet werden kann, wenn diese Proteine wildtypisch vorliegen.Um dies zu beantworten, wurde die Signalintensität von Mal2-GFP und Fta2-GFP in *asp1*<sup>+</sup> und *asp1*<sup>H397A</sup> Zellen quantifiziert (Abb. 3-28). Generell führt mehr Asp1 generiertesIP<sub>7</sub> hier zu einem ähnlichen Effekt. Die Signalintensität von Fta2-GFP ist von durchschnittlich 7,1 in *asp1*<sup>+</sup>*fta2-gfp*Zellen auf durchschnittlich 4,6 in *asp1*<sup>H397A</sup>*fta2-gfp*Zellen reduziert (Abb. 3-28A). Für Mal2-GFP erfolgt durch mehr Asp1 generiertesIP<sub>7</sub> eine Reduktion von durchschnittlich 6,4 in*asp1*<sup>+</sup>*mal2-gfp* Zellen auf durchschnittlich 5,5 in*asp1*<sup>H397A</sup>*mal2-gfp* Zellen (Abb. 3-28B).





**A+B**: Oben: Lebendfluoreszenzaufnahmen der angegebenen Stämme. Stämme wurden 24h bei 30°C in Minimalmedium vorinkubiert und auf "agarose pads" gleichen Medientyps aufgetragen. Aufnahmenerfolgten bei ca. 20°C. Laserintensität: 20%. Balken: 2 µm**A**: Quantifizierung der relativen Signalintensität von Fta2-GFP in den angegebenen Stämmen. (*asp1*<sup>+</sup>: N=50; *asp1*<sup>H397A</sup>: N=50; \*\*: p<0,0005 (Zwei-Stichproben-T-Test) verglichen mit *asp1*<sup>+</sup>)**B**: Quantifizierung der relativen Signalintensität von Mal2-GFP in den angegebenen Stämmen.Laserintensität: 20%. Balken: 2 µm (*asp1*<sup>+</sup>: N=50; *asp1*<sup>H397A</sup>: N=50; \*: p<0,005 (Zwei-Stichproben-T-Test) verglichen mit *asp1*<sup>+</sup>)**C**: Links: Lebendfluoreszenzaufnahmen von *mal2-gfp* transformiert mit der Vektorkontrolle oderpREP3X-*asp1*<sup>1-364</sup>(*nmt1*<sup>+</sup> Promotor). Die Transformanten wurden 24h bei 30°C inplasmid-selektivenMinimalmediumvorinkubiert und auf "agarose pads" gleichen Medientyps aufgetragen. Aufnahme erfolgte bei ca. 20°C. Laserintensität: 30%. Balken: 2 µm.Rechts: Quantifizierung der relativen Signalintensität von Mal2-GFP. (Vektor: N=50; Kinase: N=50; \*\*: p<0,0005 (Zwei-Stichproben-T-Test) verglichen mit *asp1*<sup>+</sup>)

Um die gemessene Reduktion für Mal2-GFP durch extra Asp1 generiertes IP<sub>7</sub> zu untermauern, wurde zusätzlich untersucht, ob eine Reduktion der Mal2-GFP-Signalintensität auch gemessen werden kann, wenn im *mal2-gfp* Stamm die Asp1 generierte IP<sub>7</sub>-Mengedurch Expression von *asp1*<sup>1-364</sup> erhöht wird (Abb. 3-28C). Da diese Messungen mit 30% Laserintensität statt wie zuvor bei Mal2-GFP und Fta2-GFP mit 20% Laserintensität gemessen wurden, ist das Signal sowie die relative Signalintensität in dieser Messung höher. Abb. 3-28C zeigt, dass die Expression von *asp1*<sup>1-364</sup> zu einer Reduktion von Mal2-GFP am Kinetochor führt. In dem Stamm, transformiert mit der Vektorkontrolle, liegt die Signalintensität bei durchschnittlich 13,9. Die Expression von *asp1*<sup>1-364</sup> führt zu einer Reduktion auf durchschnittlich 9,3.

Um zu überprüfen, ob durch mehr Asp1 generiertes IP<sub>7</sub> die Proteinmenge von Mal2-GFP reduziert wird, wurde Mal2-GFP in  $asp1^+$  mal2-gfpund  $asp1^{H397A}mal2$ -gfpStämmen immunpräzipitiert (Abb. 3-29). Da die Menge an Kinetochorproteinen in der Zelle sehr gering ist, können diese nicht in einem Proteinextrakt direkt detektiert werden, sondern müssen zuvor mit einer Immunpräzipitation angereichert werden. In solchen Immunpräzipitationen aus den Stämmen  $asp1^+$  mal2-gfp und  $asp1^{H397A}mal2$ -gfp konnten vergleichbare Mengen Mal2-GFP detektiert werden. Dieses Ergebnis konnte in 3 voneinander unabhängigen Experimenten verifiziert werden.



Abb. 3-29Mehr Asp1 generiertes IP<sub>7</sub> hat keinen Einfluss auf die Proteinmenge von Mal2-GFP Oben: Westernblot zeigt das Ergebnis einer Mal2-GFP Immunpräzipitation. Proteinextrakte Mal2-GFP exprimierender *asp1<sup>+</sup>mal2-gfp* oder *asp1<sup>H397A</sup>mal2-gfp* Zellen, welche zuvor 24h bei 30°C kultiviert wurden, wurden mit magnetischen anti-GFP Kugeln immunpräzipitiert. Unten:γ-Tubulin: Ladekontrolle

Das zeigt, dass die Fähigkeit von Mal2 und Fta2 am Kinetochor zu lokalisieren negativ durch mehr Asp1 generiertes IP<sub>7</sub> reguliert wird.

# 3.1.7.2 Kinetochor-Lokalisation von Mal2 und Fta2 ist bei Abwesenheit von Asp1 generierten IP<sub>7</sub> verstärkt

Um zu überprüfen, wie sich die Abwesenheit von Asp1 generierten IP<sub>7</sub>auf die Signalintensität von Mal2-1-GFP und Fta2-291-GFP auswirkt, wurde deren Signalintensität in *asp1<sup>+</sup>mal2-1-gfp* und *asp1<sup>D333A</sup>mal2-1-gfp* bzw. *asp1<sup>+</sup>fta2-291-gfp* und *asp1<sup>D333A</sup>fta2-291-gfp* Zellen quantifiziert. Interessanterweise war hier die Kinetochor-Lokalisation beider Proteine deutlich erhöht. Nach der Quantifizierung beider Signale zeigte sich, dass die relative Signalintensität von Fta2-291-GFP von

durchschnittlich 4,4 in  $asp1^{+}fta2-291-gfp$ Zellen auf durchschnittlich um das Doppelte auf 8,3 in  $asp1^{D333A}fta2-291-gfp$ Zellen erhöht ist (Abb. 3-30A). Die Signalintensität von Mal2-1-GFP ist von durchschnittlich 4,8 in  $asp1^{+}mal2-1-gfp$ Zellen auf durchschnittlich 7,8 in  $asp1^{D333A}mal2-1-gfp$ Zellen erhöht (Abb. 3-30B).



## Abb. 3-30Die Abwesenheit von Asp1 generiertemIP<sub>7</sub> erhöht die Kinetochor-Lokalisation von Mal2-1-GFP und Fta2-291-GFP

**A+B**: Oben: Lebendfluoreszenzaufnahmen der angegebenen Stämme. Stämme wurden 24h bei 25°C in Minimalmedium vorinkubiert und auf "agarose pads" gleichen Medientyps aufgetragen. Aufnahme erfolgte bei ca. 20°C. Laserintensität: 100%. Balken: 2 µm.**A**: Quantifizierung der relativen Signalintensität von Fta2-291-GFP in den angegebenen Stämmen. ( $asp1^+$ : N=50;  $asp1^{D333A}$ : N=50; \*: p<0,0005 (Welch Test) verglichen mit  $asp1^+$ )**B**: Quantifizierung der relativen Signalintensität von Stämmen. ( $asp1^+$ : N=50;  $asp1^{D333A}$ : N=50; \*: p<0,0005 (Welch Test) verglichen mit  $asp1^+$ ) **B**: So;  $asp1^{D333A}$ : N=50; \*: p<0,0005 (Welch Test) verglichen mit  $asp1^+$ )

## 3.1.7.2.1 Die Menge an Kinetochor-assoziiertem wildtypischen Mal2 und Fta2 wird ebenfalls verstärkt, wenn weniger Asp1 generiertes IP<sub>7</sub> vorliegt

Auch die beobachtete verstärkte Signalintensität von Mal2 und Fta2 durch Abwesenheit von Asp1 generiertemIP<sub>7</sub> ist nicht spezifisch für die mutanten Proteine, sondern kann auch für die wildtypischen Proteine gemessen werden. Für Fta2-GFP konnte eine Erhöhung von 7,1 in *asp1<sup>+</sup>fta2-gfp* Zellen auf 9,8 in *asp1<sup>D333A</sup>fta2-gfp* Zellen gemessen werden (Abb. 3-31A). Die Intensität von Mal2-GFP ist von 6,4 in *asp1<sup>+</sup>mal2-gfp*Zellen auf 9,3 in *asp1<sup>D333A</sup>mal2-gfp*Zellen erhöht.







Abb. 3-31Kinetochor-Lokalisation von Mal2 und Fta2 ist durch weniger Asp1 generiertes IP<sub>7</sub> verstärkt

**A+B:**Oben: Lebendfluoreszenzaufnahmen der angegebenen Stämme. Bedingungen wie in Abb. 3-28, Laserintensität: 20%. Balken: 2 µmA: Quantifizierung der relativen Signalintensität von Fta2-GFP in den angegebenen Stämmen. (*asp1*<sup>+</sup>: N=50; asp1<sup>D333A</sup>: N=50; \*: p<0,0005 (Welch Test) verglichen mit *asp1*<sup>+</sup>)**B**: Quantifizierung der relativen Signalintensität von Mal2-GFP in den angegebenen Stämmen. ( $asp1^+$ : N=50; asp1<sup>D333A</sup>: N=50; \*: p<0,0005 (Welch Test) verglichen mit *asp1*<sup>+</sup>)**C**:Oben: Westernblot zeigt das Ergebnis einer Mal2-Immunpräzipitation. GFP Proteinextrakte Mal2-GFP exprimierender *asp1<sup>+</sup>mal2-gfp* oder *asp1<sup>D333A</sup>mal2-qfp* Zellen, welche zuvor 24h bei 30°C kultiviert wurden, wurden mit magnetischen anti-GFP Kugeln immunpräzipitiert. Unten:y-Tubulin: Ladekontrolle.

Auch hier wurde überprüft, ob die Proteinmenge von Mal2-GFP trotz einer veränderten Kinetochor-Lokalisation von Mal2-GFP konstant bleibt. Dies ist der Fall, da für Mal2-GFP ähnliche Mengen nach Immunpräzipitation von Proteinextrakten aus den Stämmen*asp1<sup>+</sup>mal2-gfp*und *asp1<sup>D333A</sup>mal2-gfp* Stamm detektiert werden konnten(Abb. 3-31C). Dieses Ergebnis konnte in 3 voneinander unabhängigen Experimenten verifiziert werden.

В

In Abb. 3-32 sind die beobachteten Daten für die Kinetochor-Lokalisation von Mal2 und Fta2 unter verschiedenen IP<sub>7</sub>-Mengen schematisch zusammengefasst.Extra Asp1 generiertesIP<sub>7</sub> führte zu einer reduzierten Kinetochor-Lokalisation von Mal2 und Fta2. Dagegen wardieLokalisation dieser Proteine erhöht, wenn wenigerIP<sub>7</sub> vorliegt. Dies zeigt, dass die Kinetochor-Lokalisation von Mal2 und Fta2 durch die zelluläre IP<sub>7</sub>-Menge moduliert werden kann.



Abb. 3-32Kinetochor-Lokalisation von Mal2 und Fta2 erfolgt in Abhängigkeitder Asp1 generierten IP<sub>7</sub>-Menge

Schematische Darstellung der Beobachtungen für die Signalintensität von Mal2 und Fta2 in *asp1*<sup>D333A</sup> und *asp1*<sup>H397A</sup> sowie bei Expression von Kinase- und "Phosphatasedomäne".

### 3.1.8 Die reduzierte Kinetochor-Lokalisation von Mal2 und Fta2 durch mehr Asp1 generiertesIP<sub>7</sub> führt zu mitotischen Defekten

Die Funktionalität der Proteine Mal2 und Fta2 ist abhängig von deren Fähigkeit am Kinetochor zu lokalisieren. Bei den temperatursensitiven Stämmen *mal2-1* und *fta2-291* führt die Inkubation bei der restriktiven Temperatur zueinem Verlust derKinetochor-Lokalisation von Mal2-1-GFP und Fta2-291-GFP,was zu massiven Segregationsdefekten führt((Fleig *et al.* 1996; Jin *et al.* 2002; Kerres *et al.* 2006) und diese Arbeit (Daten nicht gezeigt)).

Da die Kinetochor-Lokalisation beider Proteine durch eine erhöhte Asp1 generiertelP<sub>7</sub>-Menge gegenüber der wildtypischen Menge reduziert wird, müsste dies Konsequenzen für die Chromosomensegregation haben. Dies wurde anhand des *mal2-1* Stammes exemplarisch überprüft. Wie erwartet, wirkt sich die Erhöhung von Asp1 generiertemIP<sub>7</sub> im *mal2-1* Stamm negativ auf den Phänotyp dieses Stammes aus (Abb. 3-33 - Abb. 3-35). Die Anwesenheit des *asp1*<sup>H397A</sup>-Allels im *mal2-1* Stamm führt bereitsbei 28°C zu schlechterem Wachstum, eine Temperatur bei welcher der *mal2-1* Stamm noch gut wachsen kann, wenn *asp1*<sup>+</sup> endogen wildtypisch exprimiert wird (Abb. 3-33A). Dieses schlechte Wachstum im *asp1*<sup>H397A</sup>*mal2-1* Stamm, verglichen mit den Ausgangsstämmen bei dieser Temperatur, korreliert mit dem erhöhten Auftreten mitotischer Defekte, die im Folgenden vorgestellt werden. Dazu werden in Abb. 3-33 zunächst die Phänotypen von fixierten Zellen in der frühen Mitose und anschließend in Abb. 3-34 in der Anaphase beschrieben. Des Weiteren werdenin Abb. 3-35 einige dieser Phänotypen in lebenden Zellen beschrieben.



В

asp1<sup>H397A</sup> mal2-1

	Tubulin	DNA	überlagert	
spindeln				a
			e***	b b
kurze	€	1 (f)	1 🐣 👔 🖄	C C

С

D





**A**: Serieller Verdünnungstropftest  $(10^{4}-10^{1} \text{ Zellen})$  der angegebenen Stämme bei 25°C und 28°C. Die Stämme wurden ü/N in Minimalmedium vorkultiviert und auf -ThiaMinimalmedium aufgetragen.Inkubationsdauer: 5 Tage **B**: *mal2-1asp1*<sup>H397A</sup> Zellen wurden mit Paraformaldehyd fixiert und mit DAPI und anti-Tubulin Antikörper behandelt. Der Stamm wurde zuvor ü/N bei 28°C in flüssigem Minimalmedium kultiviert. Rechts: schematische Darstellung der beobachteten Phänotypen: Schwarz: Spindel; grau: Position der DNA. a: wildtypische Situation in der Metaphase. b: DNA nur auf einer Seite einer kurzen Spindel. c: kurze Spindeln mit einer monopolaren Morphologie. Balken: 2 µm.**C**: Prozentuale Verteilung der in B für Zellen mit kurzer Spindel beschriebenen Phänotypen in den angegebenen Stämmen (*mal2-1*: N=102, *asp1*<sup>H397A</sup>: N=85, *mal2-1asp1*<sup>H397A</sup>: N=115; N=Gesamtzahl Zellen mit kurzer Spindel). **D**: Weitere Beispiele fürSpindeln mit einer monopolaren Morphologie in fixierten *mal2-1asp1*<sup>H397A</sup> Zellen. Balken: 2 µm

Bei 28°C konnten in fixierten *mal2-1* Zellen mit einer kurzen Spindel nur in 3% der Zellen aberrante kurze Spindeln beobachtet werden, bei denen die gesamte DNA untypisch auf einer Seite der Spindel vorlag (Abb. 3-33C). Dieser Phänotyp konnte in  $asp1^{H397A}$  Zellen nicht beobachtet werden. Dagegen war dieser Phänotyp im *mal2-1*  $asp1^{H397A}$  Stamm massiv erhöht. Neben normalen Metaphasenspindeln in 76% der Zellen (Abb. 3-33B (a)) traten in ca. 19% der Zellen kurze Spindeln auf, bei denen die gesamte DNA nur auf einer Seite der Spindel vorlag (Abb. 3-33B (b)). Des Weiteren konnten nur im *mal2-1*  $asp1^{H397A}$  Stamm in 5% der fixierten Zellen mit einer kurzen Spindel monopolare Spindeln beobachtet werden (Abb. 3-33B (c)). Bei diesen monopolaren Spindeln ragen von einem Spindelpol ausgehend mehrere Mikrotubuli in den Kernhinein. Dieser Phänotyp kann beispielsweise durch kollabierende Spindeln oder Defekte in Phase I hervorgerufen werden. Da monopolare Spindeln im Zusammenhang mit dem *mal2-1* Stamm bisher nicht beschrieben wurden, sind in Abb. 3-33D weitere Beispiele für diesen Phänotyp gezeigt. In den gezeigten Beispielen ragen von einem Spindelpol ausgehend mehrere Mikrotubuli in den Kern hinein, und die Spindel weist eine ungleichmäßig intensive Morphologie auf.

Mitotische Defekte in der Anaphase waren bei 28°C im*mal2-1* Stamm bereits in 24% der Zellen zu beobachten (Abb. 3-34B). Bei diesen Defekten handelte es sich zum einen um "lagging chromosomes" in 11% der Zellen, bei denen ein Teil des Chromatins noch nicht segregiert vorlag. In 13% der *mal2-1* Zellen in der Anaphase war Chromosomenfehlsegregation zu beobachten, bei der auf einer Seite der Spindel mehr DNA vorlag als auf der anderen. Diese Phänotypen waren in der *asp1*<sup>H397A</sup> Einzelmutante nicht zu beobachten, traten aber im*mal2-1asp1*<sup>H397A</sup>Doppelmutanten-Stamm, verglichen mit dem *mal2-1* Stamm, mit einer höheren Frequenz auf, und es waren weitere Phänotypen zu beobachten. Nur 58% der fixierten*mal2-1asp1*<sup>H397A</sup> Zellen in der Anaphase zeigten eine morphologisch gleichmäßige Segregation der DNA (Abb. 3-34A(a), Abb. 3-34B). In 12% der Zellen in der Anaphase traten Spindeln auf,bei denenein substantieller Teil der DNA nicht segregiert in der Mitte einer elongierten Spindel verblieb (Abb. 3-34A(b);Abb. 3-34B). "lagging chromosomes" traten in 20% der Zellen auf (Abb. 3-34A(c);Abb. 3-34B). Chromosomenfehlsegregation konnte in 10% der fixierten *mal2-1asp1*<sup>H397A</sup> Zellen in Anaphase beobachtet werden (Abb. 3-34A(d), Abb. 3-34B).



В

0%

mal2.1

asp1<sup>H397A</sup> mal2-1



 $\bigcirc$ 

esptissia mali

05P11397A

#### Abb. 3-34Mehr Asp1 generiertes IP<sub>7</sub> führt im *mal2-1asp1*<sup>H379A</sup> Stamm zu verstärkter Fehlsegregation

mal2-1asp1<sup>H397A</sup> Zellen wurden **A**: mit Paraformaldehyd fixiert und mit DAPI und anti-Tubulin-Antikörper behandelt. Der Stamm wurde zuvor ü/N bei 28°C in flüssigem Minimalmedium kultiviert. Rechts: schematische Darstellung der beobachteten Phänotypen: Schwarz: Spindel, grau: Menge und Position der DNA. a: morphologisch gleichmäßige Segregation der DNA. b: Ein substantieller Teil der DNA verbleibt in der Mitte und wird nur teilweise zu den Polen transportiert. c: chromosomes", oder "lagging ein mehrere Chromosomen haben den Spindelpol noch nicht erreicht. d: Fehlsegregation: auf einer Seite der Spindel befindet sich eine größere Menge DNA. Balken: 2 µm B: Prozentuale Verteilung der in Afür Zellen in der Anaphase beschriebenen Phänotypenin den angegebenen Stämmen (*mal2-1*: N=79, *asp1*<sup>H397A</sup>: N=88, mal2-1asp1<sup>H397A</sup>: N=60; N=Gesamtzahl Zellen in der Anaphase).

Um einige der beschriebenen Phänotypen in lebenden Zellen zu zeigen, wurden die6 Schwesterchromatiden mit dem epitopmarkierten Kinetochorprotein Sos7-GFPsichtbar gemacht. Der SPB ist hier wieder mit mCherry markiert. Als Kontrolle zeigt Abb. 3-35A die Segregation von Sos7-GFP im *mal2-1* Stamm und soll die wildtypische Situation demonstrieren. Hier verblieben alle Chromosomen in der Mitte der Metaphasenspindel und wurden in der Anaphase A gleichmäßig auf beide Pole verteilt.Abb. 3-35B zeigt den Phänotyp in der frühen Mitose in einer lebenden *mal2-1 asp1*<sup>H397A</sup> Zelle, bei dem die DNA nur mit einer Seite der kurzen Spindel assoziiert vorlag.In der hier gezeigten Zelle lagen im Verlauf der Zeitreihe die Schwesterchromatiden in der Metaphase ungleichmäßig zwischen den Spindelpolen vor. Der Pfeil markiert die Stelle dieser Zeitreihe, bei der alle Chromosomen nur zum linken SPB gezogen wurden. Im weiteren Verlauf dieser Zeitreihe sieht man, dass die Chromosomen in der Anaphase A dennoch gleichmäßig auf beide SPBs segregiert wurden. Um die Phänotypen in der Anaphase in lebenden Zellen du demonstrieren, zeigtAbb. 3-35C ein Beispiel für "lagging chromosomes". Die Kontrollzelle (*mal2-1*) zeigt, dass die Spindelpole in Anaphase B unter wildtypischen Bedingungen erst den Abstand zueinander vergrößern, nachdem alle Chromosomen auf die SPBs segregiert wurden (Abb. 3-35A). Dagegen markieren die Pfeile in der *mal2-1asp1*<sup>H397A</sup> Zelle Chromosomen, die verzögert zu den Spindelpolen segregieren, obwohl diese durch die Spindelelongation in Anaphase B bereits den Abstand zueinander vergrößern (Abb. 3-35C).Abb. 3-35D zeigt Fehlsegregation in einer lebenden Zelle. Die Pfeilemarkieren den Spindelpol, auf dem zum Ende dieser Zeitreihe ein größerer Teil der DNAsegregiert wurde.



### Abb. 3-35DieSegregationsdefekte in lebendenmal2-1asp1<sup>H379A</sup>Zellen

**A-D**: Lokalisation von Sos7-GFP und SPB-mCherry in ausgewählten *mal2-1* Zellen (A) und *mal2-1 asp1*<sup>H379A</sup> Zellen (B-D). Gezeigt ist nur die Überlagerung der beiden Fluoreszenzsignale. Schemata über den Zeitreihen repräsentieren die in Abb. 3-34A beschriebenen Phänotypen. Zeit zwischen den Abbildungen: 1 min. Kultivierung und Aufnahmebedingungen wie in Abb. 3-4B.(Aufnahmen erfolgten bei 28°C). Balken: 2 µm.

Diese Daten zeigen deutlich, dass extra Asp1 generiertes IP<sub>7</sub> im *mal2-1asp1*<sup>H397A</sup>Stamm zum einen dessen restriktive Temperatur im Vergleich zum *mal2-1* Stamm herabsetzt. Die Kinetochor-Lokalisation von Mal2-1-GFP, welche im Vergleich zum wildtypischen Mal2-GFP bereits *per se* reduziert ist, wird durch extra Asp1 generiertes IP<sub>7</sub> noch weiter reduziert. Dies hat massive Auswirkungen auf die Überlebensrate des *mal2-1 asp1*<sup>H397A</sup> Stammes bei 28°C, ausgelöst durch eine Zunahme von mitotischen Defekten wie "lagging chromosomes" und Fehlsegregation, welche in diesem Stamm im Vergleich mit den Ausgangsstämmen mit erhöhter Frequenz auftraten.Des Weiteren treten aber auch aberrante kurze Spindeln mit einer monopolaren Morphologie auf, die im Zusammenhang mit dem *mal2-1* Stamm nur auftritt, wenn die Asp1 generierte IP<sub>7</sub>-Menge erhöht ist.

## 3.1.9 Die erhöhte Kinetochor-Lokalisation von Mal2 und Fta2 durch weniger Asp1 generiertesIP<sub>7</sub> kann zu einer partiellen Suppression der Temperatursensitivität der Mutantenstämme führen

Die Überlebensfähigkeit der Mutantenstämme *fta2-291* und *mal2-1* korreliert mit der Fähigkeit der mutanten Proteine Fta2-291 und Mal2-1, am Kinetochor zu lokalisieren. So führt beispielsweise die Überexpression von *mal2*<sup>+</sup> im *fta2-291* Stamm dazu, dass das Fta2-291 Protein auch bei der restriktiven Temperatur am Kinetochor lokalisieren kann, was diesem Stamm Wachstum bei der restriktiven Temperatur ermöglicht ((Kerres *et al.* 2006) und Daten nicht gezeigt). Da Abwesenheit von Asp1 generiertemIP<sub>7</sub> ebenfalls zu einer verstärkten Kinetochor-Lokalisation von Mal2 und Fta2 führt, wurde überprüft, ob eine Suppression bei der restriktiven Temperatur beobachtet werden kann, wenn die IP<sub>7</sub>-Menge im *mal2-1* und *fta2-291* Stamm reduziert wird. Dazu wurde ein *asp1*-Genfragment (*asp1*<sup>365-920</sup>) in diesen Stämmen exprimiert, welches für die "Phosphatasedomäne" kodiert (Abb. 3-1). Dies führt vermutlich ebenfalls zu einer Reduzierung der Asp1 generierten IP<sub>7</sub>-Menge, da Expression von *asp1*<sup>365-920</sup> die Asp1-Kinaseaktivität *in vivo* negativ reguliert (Pohlmann & Fleig 2010). Wie erwartet konnte für beide Stämme durch Expression von *asp1*<sup>365-920</sup> eine partielle Suppression der Temperatursensitivität beobachtet werden (Abb. 3-36).



Abb. 3-36Reduzierung von Asp1 generiertemIP<sub>7</sub> durch Expressionvon *asp1*<sup>365-920</sup>führt in den Stämmen*mal2-1* und *fta2-291* zu Wachstum bei der nicht-permissiven Temperatur Serieller Verdünnungstropftest (10<sup>4</sup>-10<sup>1</sup> Zellen) der angegebenen Stämme transformiert mit der VektorkontrolleoderpREP3X-*asp1*<sup>365-920</sup>(*nmt1*<sup>+</sup> Promotor),welche bei den angegebenen Temperaturen auf -Thia Minimalmedium inkubiert wurden. Kultivierung erfolgte wie in Abb. 3-25.Inkubationsdauer: 5 Tage

Bei der permissiven Temperatur wird das Wachstum  $asp1^{365-920}$ exprimierender Stämme, verglichen mit den Stämmen, transformiert mit der Vektorkontrolle, durch Expression von  $asp1^{365-920}$ , weder positiv noch negativ beeinflusst. Dagegen ermöglicht es die Expression von  $asp1^{365-920}$ , dem *fta2-291* Stamm ebenfalls bei der restriktiven Temperatur zu wachsen. Für den Stamm, transformiert mit der Vektorkontrolle, ist Inkubation bei dieser Temperatur letal. Diese partielle Suppression ist dagegen für den *mal2-1* Stamm nicht so stark. Inkubation bei 30°C führt hier bei dem Stamm transformiert mit der Vektorkontrolle,verglichen mit der permissiven Temperatur, zu deutlich reduziertem Wachstum. Die Expression von  $asp1^{365-920}$  führt bei 30°C zumindest zu etwas besserem Wachstum, verglichen mit dem Stamm, transformiert mit der Vektorkontrolle. Diese Daten implizieren, dass eineReduktion von Asp1 generiertemIP<sub>7</sub> durch Expression von  $asp1^{365-920}$  ebenfalls zu einer erhöhten Kinetochor-Lokalisation von Mal2-1 und Fta2-291 führen kann, wasdie Mutantenstämme*mal2-1* und *fta2-291* zumindest partiell supprimiert.

# 3.1.9.1 Die korrekte Chromosomensegregation im *mal2-1* Stamm ist abhängig von physiologischen IP<sub>7</sub>-Mengen

Ich konnte zeigen, dass in *asp1*<sup>D333A</sup>*mal2-1* Zellen mehr Mal2-1 am Kinetochor lokalisiert (Kapitel 3.1.7.2). Die Expression von *asp1*<sup>365-920</sup>, welche ebenfalls zu einer Erhöhung von Mal2-1 am Kinetochor führen müsste, kann wie erwartet den *mal2-1* Mutantenstamm dadurch partiell supprimieren. Daher wurde für den *asp1*<sup>D333A</sup>*mal2-1*Stamm ebenfalls ein etwas besseres Wachstum, verglichen mit dem *mal2-1* Stamm erwartet. Das Gegenteil war jedoch der Fall. Anstatt eines besseren Wachstums zeigte der *asp1*<sup>D333A</sup>*mal2-1* Stamm bereits bei 25°C einen massiven Wachstumsdefekt im Vergleich zu den Ausgangsstämmen (Abb. 3-37A). Um zu untersuchen, ob auch hier dieses schlechte Wachstum mit dem Auftreten mitotischer Defekte im Doppelmutanten-Stamm korreliert, wurden die Stämme bei 25°C fixiert und die auftretenden Phänotypen quantifiziert.

Sowohl in *mal2-1* Zellen als auch in *asp1*<sup>D333A</sup> Zellen traten bei 25°C keine aberranten Phänotypen in Zellen mit einer kurzen Spindel auf (Daten nicht gezeigt). Dagegen konnten im *mal2-1asp1*<sup>D333A</sup> Stamm in 5% der Zellen kurze Spindeln beobachtet werden, bei denen die gesamte DNA untypisch nur mit einer Seite der Spindel assoziiert vorlag(Abb. 3-37B (a)). 95% der Zellen wiesen kurze Spindeln mit einer wildtypischen Verteilung der DNA auf (Abb. 3-37B (b)). Für Zellen in der Anaphase konnten im *mal2-1* Stamm bei 25°C nur in 6% der Zellen Fehlsegregtaion und in 2% der Zellen "lagging chromosomes" beobachtet werden (Abb. 3-37C). Auch im *asp1*<sup>D333A</sup> Stamm traten nur vereinzelt "lagging chromosomes" auf.



#### Abb. 3-37Die Abwesenheit vonAsp1 generiertemIP<sub>7</sub> im mal2-1 Stamm führt zu Segregationsdefekten

**A**: Serieller Verdünnungstropftest  $(10^4 - 10^1$  Zellen) der angegebenen Stämme bei 25°C. Die Stämme wurden ü/N in Vollmedium vorkultiviert und auf Vollmedium aufgetragen. Inkubationsdauer: 5 Tage.**B**+**C**: Die Auswertungen erfolgten anhand fixierter Zellen der angegebenen Stämme, welche zuvor ü/N bei 25°C in flüssigem Minimalmedium kultiviert, mit Paraformaldehyd fixiert und mit DAPI und anti-Tubulin-Antikörper behandelt wurden.**B**: Prozentuale Verteilung der Phänotypen in Zellen mit einer kurzen Spindelim *mal2-1asp1*<sup>D333A</sup> Stamm.a: DNA nur auf einer Seite einer kurzen Spindel. b: Wildtypische Situation in der Metaphase. (*mal2-1*: N=163, *asp1*<sup>D333A</sup>: N=98, *mal2-1asp1*<sup>D333A</sup>: N=110; N=Gesamtzahl Zellen mit kurzer Spindel). **C**: Prozentuale Verteilung der für Anaphasen beschriebenen Phänotypen in den angegebenen Stämmen.c: "lagging chromosomes" d: Fehlsegregationder DNA e: morphologisch gleichmäßige Segregation der DNA (*mal2-1*: N=137, *asp1*<sup>D333A</sup>: N=108, *mal2-1asp1*<sup>D333A</sup>: N=109; N=Gesamtzahl Zellen in Anaphase).

Die Häufigkeit dieser Phänotypen in Zellen in der Anaphase ist im *mal2-1asp1*<sup>D333A</sup> Stamm erhöht. "lagging chromosomes" (Abb. 3-37C (c)) konnten hier in 30% der Zellen in der Anaphase beobachtet werden. Dagegen war das Auftreten von Fehlsegregation im *asp1*<sup>D333A</sup>*mal2-1* Stamm nur auf 10% erhöht. Diese Daten zeigen, dass im *asp1*<sup>D333A</sup>*mal2-1* Stamm trotz einer erhöhten Menge von Mal2-1 am Kinetochor bereits bei 25°C mitotische Defekte auftreten, die wahrscheinlich zu einem schlechten Wachstum dieses Stammes, verglichen mit den Ausgangsstämmen, führen. Der *mal2-1* Stamm kann nur durch die Expression von*asp1*<sup>365-920</sup> partiell supprimiert werden, da in dieser Situation *asp1*<sup>+</sup> endogen wildtypisch vorliegt und damit Asp1 generiertes IP<sub>7</sub> zumindest in geringer Menge vorhanden ist. Kann aber im *asp1*<sup>D333A</sup>*mal2-1* Stamm kein Asp1 generiertes IP<sub>7</sub> generiert werden, treten trotz erhöhter Mal2-1-Lokalisation am Kinetochor mitotische Defekte auf. Dies zeigt, dass die korrekte Chromosomensegregation im *mal2-1* Stamm von physiologischen IP<sub>7</sub>-Mengen abhängig ist.

### 3.1.9.2 Imasp1<sup>D333A</sup>mal2-1 Stamm treten massivere Spindeldefekte auf

Das beschriebene Auftreten von "lagging chromosomes" und Chromosomenfehlsegregation konnte in *asp1*<sup>D333A</sup>*mal2-1* Zellen auch mit Hilfe von Sos7-GFP SPB-mCherry in lebenden Zellen beobachtet werden (Anhang Abb. 5-1). Interessanterweise war in lebenden Zellen ein weiterer Phänotyp zu beobachten, der anhand fixierter Präparate nicht zu erkennen war. Die in Kapitel 3.1.3.3 für *asp1*<sup>D333A</sup> Zellen beschriebenen Spindelbrüche traten in *asp1*<sup>D333A</sup>*mal2-1* Zellen in verstärkter Form auf (Abb. 3-38). Wie in Kapitel 3.1.3.3 beschrieben, kommt es in *asp1*<sup>D333A</sup> Zellen in ca. 9% der Zellen zu Spindelbrüchen, wenn  $\alpha$ -Tubulin wildtypisch vorliegt. Für den*mal2-1* Sos7-GFP SPB-mCherry Stammkonnten insgesamt 10 Zellen aufgenommen werden. In keiner dieser Zellen trat ein Kollaps der mitotischen Spindel auf, was zeigt, dass dieser Phänotyp im *mal2-1* Stamm nicht häufig auftritt. In *asp1*<sup>D333A</sup>*mal2-1* Sos7-GFP SPB-mCherry Zellen war in 50% der Zellen (11/22) ein Kollaps der mitotischen Spindel zu beobachten. Wie auch für *asp1*<sup>D333A</sup> Zellen beschrieben, traten alle diese Spindelbrüche in der Metaphase auf, bevor die Chromosomen in der Anaphase A segregierten.





Prozentuales Auftreten der Phänotypen: Spindelbruch (grau) und kein Spindelbruch (schwarz) in mitotischen Zellen mit kurzer Spindel (*asp1*<sup>D333A</sup> Zentromer1-GFP SPB-mCherry: N=45; *mal2-1* Sos7-GFP SPB-mCherry: N=10; *asp1*<sup>D333A</sup> *mal2-1* Sos7-GFP SPB-mCherry: N=22).

Diese 11 beobachteten Spindelbrüche in *asp1*<sup>D333A</sup> *mal2-1* Sos7-GFP SPB-mCherry Zellen konnten aufgrund ihrer Ausprägung in 4 Kategorien eingeteilt werden (Abb. 3-39):

Kategorie 1: In diese Kategorie wurden einmaligeSpindelbrüche eingeteilt. Die gezeigte Zelle befand sich hier bereits in der Metaphase. Zu dem mit dem Stern markierten Zeitpunkt kollabierte die Spindel, reorganisierte sich wieder und trat ca. 12min später in die Anaphase A ein. Diese einmaligen Spindelbrüche konnten in 2/11 *asp1*<sup>D333A</sup> *mal2-1* Sos7-GFP SPB-mCherry Zellen mit Spindelbrüchen beobachtet werden.

Kategorie 2: Diese Kategorie beinhaltet mitotische Zellen, bei denen im Verlauf der Metaphase mehrfach Spindelbrüche (2x bis 3x) auftraten. Die mit jeweils einem Stern markierten Bilder dieser Zeitreihekennzeichnen die Zeiten, nach denen die Spindel kollabierte, da 1 minspäter die SPBs ihren Abstand zueinander verkürzt haben. Des Weiteren markieren die Pfeile Sos7-GFP-Signale, die im Verlauf der Zeitreihe nicht mehr korrekt zwischen den SPBs vorliegen sondern von der typischen Anordnung in der Metaphase seitlich abdriften. Diese mehrfachen Spindelbrüche konnten in 3/11 Zellen mit Spindelbrüchen beobachtet werden.



Abb. 3-39 Abwesenheit von Asp1 generiertemIP<sub>7</sub> im*asp1<sup>D333A</sup>mal2-1* Stamm führt zu massiveren Spindeldefekten

Lokalisation von Sos7-GFP und SPB-mCherry in ausgewählten asp1<sup>D333A</sup> mal2-1 Zellen. Gezeigt ist nur die Überlagerung beiden der Fluoreszenzsignale. Zeit zwischen den Abbildungen: 1 min. Kultivierung und Aufnahmebedingungen wie in (Aufnahmen Abb. 3-4B erfolgten bei 25°C). Balken: 2 μm.

Kategorie 3: In 3/11 Zellen mit Spindelbrüchen waren Chromosomen zu beobachten, die sich beim Eintritt in die Mitose nicht von den separierten SPBs gelöst hatten. Der Pfeil markiert den Zeitpunkt, bei dem die SPBs separiert vorlagen. Zu diesem Zeitpunkt befanden sich alle Sos7-GFP-Signaleallerdings nur auf dem mit dem Pfeil markierten Spindelpol. Zwar lösten sich im Verlauf der Zeitreihe Chromosomen aus dieser Formation, jedoch baute sich erst nach einem Kollaps der Spindel (Stern) eine korrekte Metaphasenspindel auf, die zum Ende der Zeitreihe auch zu einer korrekten Segregation führte.

Kategorie 4: In weiteren 3/11 Zellenkonnten Spindelbrüche beobachtet werden, auf die kurze Zeit später direkt die Segregation der Chromosomen in Anaphase A erfolgte. In diesem Beispiel

erfolgtedirekt 2 min nach dem Kollaps der Spindel (Stern) die Segregation der Chromosomen in Anaphase A. Dies könnte darauf hindeuten, dass die Spindel zu dem Zeitpunkt kollabierte, als der Eintritt in die Anaphase A erfolgte.

Insgesamt zeigen diese Daten, dass Spindelbrüche im *asp1*<sup>D333A</sup>*mal2-1* Stamm häufiger auftreten als im *asp1*<sup>D333A</sup> Stamm. Diese Häufigkeit ermöglicht es, die Artder Spindelbrüche genauer zu kategorisieren. Ob bzw. in welcher Frequenz diese Kategorien von Spindelbrüchen auch im *asp1*<sup>D333A</sup> auftreten, ist unklar, da hierzu nicht genügend Daten vorlagen. Generell deuten die Daten darauf hin, dass es für Spindelbrüche mehrere Zeitpunkte bzw. Frequenzen gibt, mit denen diese auftreten. Dies deutet aufverschiedene Gründe hin, die zu einem Spindelbruch führen können.

# 3.1.10 Der 13 Komponenten umfassende Sim4-Komplex besteht aus Subkomplexen mit entgegengesetzter Funktion

Für alle bisher untersuchten Komponenten des Sim4-Komplexes wurde zwar eine Funktion für den Aufbau des Kinetochors und der Chromosomensegregation beschrieben, allerdings fehlen Studien darüber, welche die spezifischen Aufgaben der einzelnen Komponentendefinieren.

Ich konnte zeigen, dass unterschiedliche Mengen an Asp1 generiertem IP<sub>7</sub>die aberranten Phänotypen von Mutantenstämmen des Sim4-Komplexes modulieren. Interessanterweise waren jedoch die Effekte nicht für jede Komponente dieses Komplexes gleich. Die Expressionvon *asp1*<sup>1-364</sup> ist für die Mutantenstämme *mal2-1* und *fta2-291*bei der semi-permissiven Temperatur letal. Dagegen konnte für den temperatursensitiven*mis15-68* Mutantenstamm, welcher eine mutierte Variante des Sim4-Komplex-Proteins Mis15exprimiert, der gegenteilige Effekt beobachtet werden (Abb. 3-40).



#### Abb. 3-40Der nicht-Wachstumsphänotyp des *mis15-68* Stammes wird durch extra IP<sub>7</sub> supprimiert

Serieller Verdünnungstropftest (10<sup>4</sup>-10<sup>1</sup> Zellen) des*mis15-68*Stammes transformiert mit der VektorkontrolleoderpREP3X-*asp1*<sup>1-</sup> <sup>364</sup>(*nmt1*<sup>+</sup> Promotor),welcher bei den angegebenen Temperaturen auf +Thia bzw. -Thia Minimalmedium inkubiert wurde. Kultivierung erfolgte wie in Abb. 3-25. Inkubationsdauer: 5 Tage Die Expression von *asp1*<sup>1-364</sup> führte im *mis15-68* Mutantenstamm zu einer Suppression der Temperatursensitivität bei der restriktiven Temperatur. DieExpression von *asp1*<sup>1-364</sup> führt zu einer Erhöhung der Asp1 generiertenIP<sub>7</sub>-Menge. DasWachstum der verschiedenen Sim4-Komplex-Mutantenstämme zeigt, dass diese Komponenten eine unterschiedliche Antwort auf das gleiche zelluläre Signal geben. Dies ist ein Indiz dafür, dass die einzelnen Komponenten innerhalb des Komplexes klar voneinander differenzierbare Funktionen haben müssen.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass unterschiedliche Asp1 generierte IP<sub>7</sub>Mengen einen starken Einfluss auf die Zusammensetzung sowie die Funktion des Sim4-Kinetochor-Komplexes haben. Expression von *asp1*-Genfragmenten, welche für die Kinasedomäne bzw. die "Phosphatasedomäne" kodieren, kann je nach Sim4-Komplex-Mutantenstamm sowohl positive als auch negative Auswirkungen auf deren Wachstum haben. Anhand der Mal2 und Fta2 Proteine konnte gezeigt werden, dass deren Lokalisation am Kinetochor durch die Menge an IP<sub>7</sub> moduliert wird, ohne jedoch Auswirkung auf die zelluläre Menge dieser Proteine zu haben. Des Weiteren wurde mit dem *mal2-1* Stamm gezeigt, dass sich sowohl hohe als auch niedrige IP<sub>7</sub>-Mengen negativ auf die Chromosomensegregation in diesem Stamm auswirken.

## 3.2 Charakterisierung der extragenen Suppression von Sim4-Komplex-Mutantenstämmen durch den Translations-Initiations-Faktor Eif1 (Sui1)

# 3.2.1 Überexpression des *sui1*<sup>+</sup> ORF führt zu einer Dosis-abhängigen Suppression des *fta2-291* Mutantenstammes

Um neue Interaktionspartner des Sim4-Kinetochor-Komplexes zu identifizieren, wurde von Frau Dr. Visnja Jakopec ein Suppressor-Screen für den *fta2-291* Mutantenstamm durchgeführt (Jakopec 2011). Eines dieser Plasmide, welches den temperatursensitiven Phänotyp des *fta2-291* Stammes supprimierte, trägt neben weiteren Genen den vollständigen *sui1*<sup>+</sup> ORF. Im Rahmen einer Diplomarbeit konntegezeigt werden, dass *sui1*<sup>+</sup> auf diesem Plasmidfür dieSuppression dieses Stammes verantwortlich war.

Sui1 ist ein hochkonserviertes Protein, bei dem sich den S. es um pombe "eukaryotischenTranslations-Initiations-Faktor 1" (eIF1) handelt. Zusammen mit weiteren Initiations-Faktoren, der 40S Untereinheit des Ribosoms und der tRNA<sub>Met</sub>, bildet eIF1 den 43S Prä-Initiations-Komplex (43S PIC).Durch Rekrutierung weiterer Initiations-Faktoren, welche Strukturen des 5'- bzw. 3'-Endes der mRNA binden, assoziiert der 43S PIC mit der mRNA und bildetden 48S PIC.Der 48S PIC liegt zunächst in einer offenen Konfirmation vor, was diesem ermöglicht, in Abhängigkeit von eIF1 unter ATP Verbrauch die mRNA nach dem AUG Initiations-Kodon zu scannen. Nachdem das AUG-Kodon erkannt wurde erfolgt eine GTP-abhängige Hydrolyse, welche den 48S PIC in diesem Bereich stabilisiert, indem dieser in eine geschlossene Konfirmationüberführt wird. Dadurch dissoziiert eIF1 von der 40S Untereinheit. Durch die Rekrutierung der 60S ribosomalen Untereinheit bildet sich der 80S Initiations-Komplex, und es erfolgt die Elongation der Translation(Hinnebusch 2011).

Liegt eIF1 nicht funktionell vor, wird das AUG-Kodon nicht korrekt erkannt und die Initiation kann auch von nicht-AUG-Kodons erfolgen (Mitchell & Lorsch 2008). Da eIF1 in *S. cerevisiae*als erstes durch die Suppression seines eigenen Phänotyps identifiziert wurde, erhielt eIF1 hier die Benennung Sui1 (<u>sui</u>nitiator codon mutations)(Yoon & Donahue 1992a).

Wie die Plasmid-kodierte Expression des wildtypischen *fta2*<sup>+</sup>, so führt auch extra *sui1*<sup>+</sup> zu einer Suppression des Wachstumsdefektes des*fta2-291* Stammes bei der restriktiven Temperatur (Abb. 3-41A). Dabei handelt es sich um einen Dosis-abhängigen Effekt. Die Expression von *sui1*<sup>+</sup> unter Kontrolle des *nmt81*<sup>+</sup> Promotors, was zu einer massiv schwächeren Überexpression verglichen mit dem *nmt1*<sup>+</sup> Promotor führt, resultiert in eineschwächere Suppression. Die Suppression durch *sui1*<sup>+</sup>korreliert mit der Kinetochor-Lokalisation von Fta2-291-GFP bei der restriktiven Temperatur (Abb. 3-41B). Bei 34°C ist Fta2-291 in dem Stamm, transformiert mit der Vektorkontrolle, nicht mehr Kinetochor-lokalisiert. Überexpression von  $sui1^+$  ermöglicht es dagegen, diesem Protein auch bei dieser Temperatur am Kinetochor zu lokalisieren.



В



## Abb. 3-41*sui1*<sup>+</sup> ist ein dosisabhängiger Suppressor des *fta2-291* Mutantenstammes

A: Serieller Verdünnungstropftest (10<sup>4</sup>-10<sup>1</sup> Zellen) von fta2-291 transformiert mit der Vektorkontrolle, pUR19-fta2<sup>+</sup>, pREP3X-sui1<sup>+</sup>(nmt1<sup>+</sup> Promotor) oder pREP81X-sui1<sup>+</sup>(nmt81<sup>+</sup> Promotor),welche bei den angegebenen Temperaturen auf -Thia Minimalmedium inkubiert wurden. Kultivierung erfolgte wie in Abb. 3-25. Inkubationsdauer: 5 Tage **B**: Derfta2-291-gfpStamm wurde transformiert mit der Vektorkontrolle oder pREP3X-sui1<sup>+</sup> (nmt1<sup>+</sup> Promotor). Der Stamm wurde 24h in flüssigem -Thia Minimalmedium kultiviert und anschließend 6h bei 34°C inkubiert.

## 3.2.2 *sui1*<sup>+</sup> Überexpression supprimiert die Temperatursensitivität aller getesteten Mutantenstämme des Sim4-Komplexes

Um zu untersuchen, ob die Suppression durch extra *sui1*<sup>+</sup> spezifisch für den *fta2-291* Mutantenstamm ist oder auch für weitere Kinetochor-Mutantenstämme beobachtet werden kann, wurde überprüft, wie sich *sui1*<sup>+</sup> Überexpression auf weitere Mutantenstämme des Sim4-Komplexes auswirkt. Interessanterweise zeigte sich, dass nicht nur der*fta2-291*Mutantenstamm, sondern alle getesteten Mutantenstämme des Sim4-Komplexes durch *sui1*<sup>+</sup> supprimiert werden konnten (Abb. 3-42).

Überexpression von  $sui1^+$  im Wildtypstamm führt nur bei 25°C zu einem geringfügig reduziertem Wachstum verglichen mit dem Stamm, transformiert mit der Vektorkontrolle. Generell ermöglicht es  $sui1^+$  Überexpression allen getesteten Mutantenstämmen bei restriktiven Temperaturen zu wachsen, bei denen der jeweilige Stamm, transformiert mit der Vektorkontrolle, nicht mehr wachsen kann

oder im Falle des *mis15-68* Stammes stark reduziertes Wachstum zeigt. Hinsichtlich der Stärke der Suppression sind leichte Unterschiede auszumachen. Die Temperatursensitivität der Mutantenstämme *fta2-291, mal2-1, sim4-193* und *mis17-362* wurde gut durch die Überexpression von *sui1*<sup>+</sup> supprimiert, die des*mis6-302* Mutantenstammesdagegen nicht so stark. Der *mis15-68* Mutantenstamm wurde nur partiell bei 34°C durch extra *sui1*<sup>+</sup> supprimiert. Beidieser Temperaturzeigte der*mis15-68* Stamm, der mit der Vektorkontrolle transformiert wurde, noch leichtes Wachstum, welches aber durch die Überexpression von *sui1*<sup>+</sup> deutlich verbessert ist.



Diese Suppression beschränkt sich nicht nur auf die hier gezeigten Mutantenstämme des Sim4-Komplexes. Auch weitere temperatursensitive*mal2*Mutantenstämme (*mal2-10* und *mal2-20*) und *fta2*Mutantenstämme (*fta2-88* und *fta2-292*) sowie Doppelmutanten-Stämme von Sim4-Komponenten (*fta2-291 sim4-193; fta2-291 mis15-68* und *fta2-291 mis6-302*) konnten durch Überexpression von *sui1*<sup>+</sup> supprimiert werden (Anhang: Abb. 5-2).

### 3.2.3 *sui1*<sup>+</sup> ist ein Sim4-Kinetochor-Komplex spezifischer Suppressor

Der Sim4- und der NMS-Kinetochor-Komplex wurden unabhängig voneinander biochemisch isoliert (Liu *et al.* 2005). Um zu überprüfen, ob *sui1*<sup>+</sup> generell die Fähigkeit hat, Kinetochor-Mutantenstämme zu supprimieren, wurden auch Mutantenstämme des NMS-Komplexes getestet.Hier jedoch zeigte sich, dass durch Überexpression von *sui1*<sup>+</sup> die Temperatursensitivität dieser Mutantenstämme nicht supprimiert werden kann (Abb. 3-43A).





spezifischer Suppressor. Serieller Verdünnungstropftest (10<sup>4</sup>-10<sup>1</sup> **A**: Zellen) der angegebenen Stämme transformiert der Vektorkontrolle oder mit pREP3Xsui1<sup>+</sup>(nmt1<sup>+</sup> Promotor), welche bei den angegebenen Temperaturen auf -Thia Minimalmedium inkubiert wurden. Kultivierung erfolgte wie in Abb. 3-25. Inkubationsdauer: 5 -6 Tage**B**: Schematische Darstellung des Kinetochors in S. pombe. Der NMS-Komplex ist rot hervorgehoben.

Inkubation bei der restriktiven Temperatur ist für die getesteten Stämme letal, trotz Überexpression von *sui1*<sup>+</sup>. Bei 25°C zeigt sich außerdem bei diesen Stämmen, dass Überexpression von *sui1*<sup>+</sup> einen leichten negativen Effekt verglichen mit den Stämmen, transformiert mit der Vektorkontrolle, hat.

Dies bedeutet, dass die Suppression durch *sui1*<sup>+</sup> spezifisch für Mutantenstämme des Sim4-Komplexes ist.

### 3.2.3.1 Die Suppression durch extra *sui1*<sup>+</sup>erfolgt unabhängig von der siRNA abhängigen Heterochromatin-Bildung

In weiblichen embryonischen Mäusezellen wurde gezeigt, dass das Sui1 Homolog eIF1 benötigt wird, um eines der beiden X-Chromosomen zu inaktivieren. Diese Inaktivierung erfolgt durch Ausbildung von Heterochromatin in Abhängigkeit von nicht kodierenden RNAs (Ciaudo et al. 2006). In S. pombewird die Heterochromatin-Struktur der äußeren repetitiven Zentromerbereiche (otr) für den Aufbau der Chromatin-Struktur des inneren Zentromers (imr + cnt) benötigt (Abb. 3-44A)(Pidoux & Allshire 2004; Folco et al. 2008). In der inneren Zentromer-Region (cnt + imr) liegt eine spezielle Chromatin-Struktur vor, die durch den Einbau von CENP-A/Cnp1 spezifischen Nukleosomen bzw. die Kinetochor-Assemblierung aufrechterhalten wird (Allshire & Karpen 2008). Die Ausbildung des Heterochromatins im otr-Abschnitt erfolgt durch die Aktivität des siRNA-Signalweges, welcher kurze nicht-kodierende Transkripte aus diesem Bereich prozessiert (Kapitel 1.5.1.1). Die für diesen Signalweg sowie für die anschließende Ausbildung des Heterochromatins essentiellen Komponenten sind im Wesentlichen die ProteineRdp1, Dcr1, Ago1 und Clr4 (Volpe et al. 2002; Volpe et al. 2003). Um zu überprüfen, ob der siRNA-Signalweg für die Suppression von Sim4-Mutantenstämmen durch *sui1*<sup>+</sup> benötigt wird, wurde anhand der *mal2-1* und *fta2-291*Mutantenstämme exemplarisch untersucht, ob eine Suppression weiterhin möglich ist, wenn essentielle Komponenten dieses Signalweges nicht vorhanden sind (Abb. 3-44B).

### Α

Zentromer I:



Abb. 3-44Die Suppression der Temperatursensitivität von Sim4-Komplex-Mutantenstämmen via *sui1*<sup>+</sup>erfolgt unabhängig von der siRNA abhängigen Heterochromatin-Bildung

**A**: Schematische Darstellung des *S. pombe* Zentromers I. Der *cnt*-Abschnitt ist von inneren (*imr*) und äußeren (*otr*) repetitiven Sequenzen umgeben (L: links; R: rechts). Durch die Prozessierung kleiner nicht kodierender Transkripte aus dem *otr*-Abschnitt kommt es zur Ausbildung von Heterochromatin in diesem Bereich. Diese Prozessierung und Heterochromatisierung erfolgt in Abhängigkeit der Komponenten Rdp1, Dcr1 und Ago1 und führt zur Rekrutierung der Histon-Methyl-Transferrase Clr4, welche Lysin 9 von Histon H3 methyliert. Diese Heterochromatin-Struktur des *otr*-Abschnitts wird ebenfalls für die Rekrutierung von CENP-A/Cnp1 an die innere Region (*cnt* + *imr*) benötigt. **B**: Serieller Verdünnungstropftest ( $10^4$ - $10^1$  Zellen) des angegebenen Stammes transformiert mit der Vektorkontrolle oder pREP3X-*sui1*<sup>+</sup>(*mmt1*<sup>+</sup> Promotor),welcher bei den angegebenen Temperaturen auf -Thia Minimalmedium inkubiert wurde. Kultivierung erfolgte wie in Abb. 3-25. Inkubationsdauer: 5 Tage

Wie für *mal2-1* gezeigt, führt auch im*mal2-1 dcr1* $\Delta$  Stamm, in dem das für die siRNA abhängige Heterochromatin Bildung essentielle Gen *dcr1* deletiert vorliegt, Überexpression von *sui1*<sup>+</sup> zu einer Suppression bei der restriktiven Temperatur. Diese Suppression, trotz eines nicht funktionellen siRNA-Weges, konnte auch für weitere Doppelmutanten von Komponenten dieses Weges, zusammen mit dem *mal2-1* Stamm oder dem *fta2-291* Stamm, reproduziert werden (Anhang: Abb. 5-3). Das zeigt, dass die Heterochromatin-Struktur des *otr*-Abschnitts, welche durch den siRNA-Signalweg aufrechterhalten wird, nicht für die *sui1*<sup>+</sup> Suppression von Sim4-Komplex-Mutantenstämmen benötigt wird.

# 3.2.4 Extra *sui1*<sup>+</sup> verstärkt die CENP-A/Cnp1 abhängige transkriptionelle Stillegung der inneren Chromatin-Struktur

Es konnte gezeigt werden, dass die Temperatursensitivität vonmehreren Mutantenstämmen des Sim4-Komplexes durch Überexpression der Zentromer spezifischen Histon H3-Variante CENP-A/Cnp1 supprimiert werden können (Pidoux et al. 2003; Hayashi et al. 2004). Es war daher denkbar, dass die Suppression dieser Mutantenstämme durch *sui1*<sup>+</sup> mit der Menge an CENP-A/Cnp1 in Verbindung steht. Im Folgenden werde ich zur Vereinfachung statt CENP-A/Cnp1 nur die Nomenklatur von S. *pombe* (Cnp1) verwenden.Da für *cnp1*<sup>+</sup> kein geeigneter Epitop-markierter Stamm zur Verfügung stand und der einzige verfügbare Cnp1-Antikörper zu unspezifisch bindet, konnte nicht direkt überprüft werden, ob die Proteinmenge von Cnp1 durch extra  $sui1^+$  erhöht ist. Da die innere Zentromerregion (*imr* + *cnt*) transkriptionell stillgelegt ist, werden Markergene, die in diesen Bereich eingebracht werden, nur sehr schlecht exprimiert(Pidoux et al. 2003). Es wurde gezeigt, dass durch Überexpression von *cnp1*<sup>+</sup> die transkriptionelle Stilllegung der inneren Zentromerregion verstärkt ist, was auf einem zusätzlichen Einbau von Cnp1-Nukleosomen beruht (Castillo et al. 2007; Joglekar et al. 2008). Es wird vermutet, dass dies durch eine "geringere Zugänglichkeit" für die Transkriptions-Maschinerie hervorgerufen wird, da der Kinetochor in diesem Bereich verstärkt assembliert.Die Rekrutierung von Cnp1 sowie die Aufrechterhaltung der inneren Chromatin-Struktur erfolgt in Abhängigkeit des Sim4- sowie des Mis16-Mis18-Komplexes. In Mutantenstämmen dieser Komplexe kommt es durch Änderungen in der Chromatin-Strukturzu einer Aufhebung der transkriptionellen Spillegung, sodass Markergene abgelesen werden können (Pidoux & Allshire 2000; Takahashi et al. 2000b; Jin et al. 2002; Pidoux et al. 2003; Hayashi et al. 2004; Kerres et al. 2006). Dies wird vermutlich dadurch hervorgerufen, dass in Kinetochor-Mutantenstämmen die Kinetochor-Assemblierung reduziert ist und dieser für die Transkriptions-Maschinerie "zugänglich" wird.

Um zu untersuchen, ob extra*sui1*<sup>+</sup>zu einer"geringen Zugänglichkeit" der inneren Zentromerregionführt, wurde ein Arginin auxotropher (arg3<sup>-</sup>) Stamm verwendet, bei dem der Arginin Marker  $(arg3^{\dagger})$  in diesem Bereich integriert vorliegt(Abb. 3-45A) (Pidoux *et al.* 2003). Aufgrund der transkriptionellen Stillegung des arg3<sup>+</sup> Markers ist das Wachstum auf Medium ohne Arginin deutlich reduziert im Vergleich zu Medium mit Arginin (Wildtyp, Abb. 3-45B). In Sim4-Komplex-Mutantenstämmen kommt es, wie hier für den sim4-193 Stamm gezeigt, zu einer Aufhebung der transkriptionellen Stilllegung was diesem Stamm Arginin Prototrophie verleiht und gutes Wachstum auf -arg Medium ermöglicht (sim4-193, Abb. 3-45B).Um zu prüfen ob durch extra Sui1 die transkriptionelle Stilllegung der der inneren Zentromer-Region verstärkt wird, wurden die in Abb. 3-45C gezeigten -Arg Platten 3 Tage länger inkubiert als die +arg Platten, um das hier gezeigte Wachstum des cnt1::arg3<sup>+</sup> Wildtyp Stammes zu erzielen. Überexpression von sui1<sup>+</sup> führt dazu, dass das Wachstum auf -arg deutlich schlechter ist verglichen mit dem Stamm, transformiert mit der Vektorkontrolle. Das zeigt, dass durch mehr Sui1 die transkriptionelle Stilllegung der inneren Zentromerregion verstärkt wird, wie es auch bei Überexpression von *cnp1*<sup>+</sup> der Fall ist (Abb. 3-45C). Korrespondierend dazu kann auch die Temperatursensitivität eines*cnp1*-1 Mutantenstammes selbst, sowie die für Mutantenstämme der Cnp1 assoziierten Proteine Mis16 und Mis18 durch Überexpression von *sui1*<sup>+</sup> supprimiert werden (Abb. 3-45D).

Α



Abb. 3-45 Extrasui1+ verstärkt die Cnp1 abhängige transkriptionelle Stilllegung der inneren Chromatin-Struktur und supprimiert die gezeigten temperatursensitiven Mutantenstämme

A: Schematische Darstellung des *S. pombe* Zentromers I. Im *cnt*-Abschnitt des verwendeten Stammes ist der *arg3*<sup>+</sup>Marker integriert, der für die Biosynthese von Arginin benötigt wird. Durch die Überprüfung des Wachstums auf Platten ohne Arginin (-arg) kann auf die Stärke der transkriptionellen Stilllegung dieses Bereichs geschlossen werden. Diese erfolgt in Abhängigkeit der Einlagerung Cnp1 spezifischer Nukleosomen, welche für die Rekrutierung des Mis16-Mis18- sowie des Sim4-Komplexes benötigt werden. **B**: Serieller Verdünnungstropftest  $(10^4-10^1 \text{ Zellen})$  des *cnt1::arg3*<sup>+</sup> Wildtyp sowie des *cnt1::arg3*<sup>+</sup> *sim4-193* Stammes bei 25°C auf Minimalmedium mit Arginin (+arg) und ohne Zugabe von Arginin (-arg). Inkubationsdauer: 6 Tage.Abbildung wurde entnommen aus (Jakopec 2011). **C**: Serieller Verdünnungstropftest  $(10^4-10^1 \text{ Zellen})$  des *cnt1::arg3*<sup>+</sup> Stammes transformiert mit der Vektorkontrolle, pREP3X-*sui1*<sup>+</sup>(*nmt1*<sup>+</sup> Promotor) oder pREP41X-*cnp1*<sup>+</sup> (*nmt41*<sup>+</sup> Promotor) bei 30°C auf -Thia Minimalmedium mit Arginin (+arg) und ohne Zugabe von Arginin (-arg). Serieller Verdünnungstropftest  $(10^4-10^1 \text{ Zellen})$  des *cnt1::arg3*<sup>+</sup> Stammes transformiert mit der Vektorkontrolle, pREP3X-*sui1*<sup>+</sup>(*nmt1*<sup>+</sup> Promotor) oder pREP41X-*cnp1*<sup>+</sup> (*nmt41*<sup>+</sup> Promotor) bei 30°C auf -Thia Minimalmedium mit Arginin (+arg) und ohne Zugabe von Arginin (-arg). Kultivierung erfolgte wie in Abb. 3-25.Inkubationsdauer: +arg Platten: 4 Tage; -arg Platten: 7 Tage. **D**: Serieller Verdünnungstropftest  $(10^4-10^1 \text{ Zellen})$  der angegebenen Stämme, transformiert mit der Vektorkontrolle, pREP3X-*sui1*<sup>+</sup> (*nmt41*<sup>+</sup> Promotor),welche bei den angegebenen Temperaturen auf -Thia Minimalmedium inkubiert wurden.Kultivierung erfolgte wie in Abb. 3-25. Inkubationsdauer: 5 - 6 Tage

Diese Daten zeigen, dass durch mehr Sui1 die Cnp1-abhängige transkriptionelle Stilllegung der inneren Zentromerregion verstärkt wird und dass auch Mutantenstämme für die Zentromer-Chromatin nahen Komponenten Cnp1, Mis16 und Mis18 supprimiert werden können.Somit könnte die Überexpression von *sui1*<sup>+</sup> zu mehr Kinetochor-assoziiertem Cnp1 führen.

# 3.2.5 Die meisten Sim4-Kommplex-Mutantenstämme können auch durch extra*cnp1*<sup>+</sup>supprimiert werden

Einige Mutantenstämme des Sim4-Komplexes können durch Überexpression von  $cnp1^+$  supprimiert werden(Pidoux *et al.* 2003; Hayashi *et al.* 2004). Um diese Daten zu vervollständigen, wurde untersucht, ob diese Suppression auch auf weitere Mutantenstämme des Sim4-Komplexes zutrifft. Da starke Überexpression von  $cnp1^+$  unter Kontrolle des  $nmt1^+$  Promotors bereits im Wildtypstamm letal ist (Daten nicht gezeigt), wurde  $cnp1^+$  in den folgenden Experimenten unter Kontrolle des  $nmt41^+$  Promotors überexprimiert, was zu einer moderaten Überexpression führt. Tatsächlich kann eine Suppression der Mutantenstämme mis17-362, sim4-193, mis15-68 und mis6-302 auch durch extra  $cnp1^+$  erfolgen (Abb. 3-46B).

### Α

Zentromer I:



В

cnp1+



Abb. 3-46 Die Suppression von 4/6 Sim4-Komplex-Mutanantenstämme kann auch über extra cnp1<sup>+</sup> erfolgen.

A: Schematische Darstellung des S. pombe Zentromers I. Nun wurde durch Überexpression von *cnp1*<sup>+</sup> getestet, wie sich dies auf Mutantenstämme des Sim4-Komplexes auswirkt. B + **C**: Serieller Verdünnungstropftest (10<sup>4</sup>-10<sup>1</sup> Zellen) der angegebenen Stämme transformiert mit der Vektorkontrolle oder pREP41X-cnp1<sup>+</sup> (nmt41<sup>+</sup> Promotor), welche bei den angegebenen Temperaturen auf -Thia Minimalmedium inkubiert wurden. Kultivierung erfolgte wie in Abb. 3-25. Inkubationsdauer: 5 - 6 Tage

Interessanterweise trifft dies aber nicht auf alle getesteten Sim4-Komplex-Mutantenstämme zu. Die Temperatursensitivität der Stämme mal2-1 und fta2-291 kann nicht durch cnp1<sup>+</sup> Überexpression supprimiert werden (Abb. 3-46C).

Eine Suppression der Temperatursensitivität der Mutantenstämme *mis17-362, sim4-193, mis15-68* und *mis6-302* durch *sui1*<sup>+</sup> wäre demnach durch eine höhere Expression von *cnp1*<sup>+</sup> durch extra *sui1*<sup>+</sup> denkbar. Dadurch kann aber nicht die Suppression der Stämme *mal2-1* und *fta2-291* erfolgen. Eine Suppression dieser Stämme wurde bisher nur beschrieben, wenn *mal2*<sup>+</sup>bzw.*fta2*<sup>+</sup>selbst überexprimiert werden. Dabei kann die Suppression des *fta2-291* Stammes ebenfalls über die Überexpression von *mal2*<sup>+</sup> erfolgen und umgekehrt (Kerres *et al.* 2006). Daher wurde im Folgenden anhand von Mal2 exemplarisch überprüft, ob durch *sui1*<sup>+</sup> Überexpression mehr Mal2 nachgewiesen werden kann.

### **3.2.5.1** Die Überexpression von *sui1*<sup>+</sup> erhöht die Proteinmenge sowie die Kinetochorassoziierte Menge des Mal2 Proteins

Um zu überprüfen,ob extra *sui1*<sup>+</sup> zu einer höheren zellulären Mal2 Proteinmenge führt, wurden sowohl die Proteinmenge als auch die Kinetochor-Lokalisationdes mutanten Mal2-1-GFP Proteins quantifiziert.Abb. 3-47A zeigt eine Immunpräzipitation von Mal2-1-GFP, isoliert aus Zellen, transformiert mit der Vektorkontrolle, oder nach 24 stündiger*sui1*<sup>+</sup> Überexpression. Verglichen mit dem Stamm, transformiert mit der Vektorkontrolle, konnte mehr Mal2-1-GFP immunpräzipitiert werden, wenn *sui1*<sup>+</sup> überexprimiert wird (Abb. 3-47A). Im gezeigten Beispiel war die Proteinmenge von Mal2-1-GFP bei *sui1*<sup>+</sup> Überexpression um ca. 48% erhöht. Die Beobachtung, dass durch extra *sui1*<sup>+</sup> mehr Mal2-1-GFP immunpräzipitiert werden kann, konnte in 7 von 7 voneinander unabhängigen Immunpräzipitationengezeigt werden. Diese Erhöhung war allerdings variabel (siehe Anhang: Abb. 5-4).

Des Weiteren konntedurch*sui1*<sup>+</sup> Überexpression bei der permissiven Temperatur (25°C) mehr Mal2-1-GFP am Kinetochor detektiert werden (Abb. 3-47B). Hier betrug die durchschnittliche Signalintensität von Mal2-1-GFP in demStamm, transformiert mit der Vektorkontrolle, 6,7. Durch *sui1*<sup>+</sup> Überexpression ist die Signalintensität um mehr als das Doppelte auf durchschnittlich 14,9 erhöht. Diese Daten zeigen deutlich, dass die Überexpression von *sui1*<sup>+</sup> zu einer höheren zellulären Mengedes Mal2-1 Proteins führt. Ergebnisse



## Abb. 3-47Die Überexpression von *sui1*<sup>+</sup> erhöht die zelluläre Proteinmenge und Kinetochor-Lokalisationdes Mal2-1-GFP Proteins

A: Oben: Der Westernblot zeigt das Ergebnis einer Mal2-1-GFP Immunpräzipitation. Proteinextrakte Mal2-1-GFP exprimierender Zellen, transformiert mit der Vektorkontrolle oder pREP3X-*sui1*<sup>+</sup> (*nmt1*<sup>+</sup> Promotor), wurden mit magnetischen anti-GFP Kugeln immunpräzipitiert. Die Transformanten wurden zuvor 24h bei 25°C in Minimalmedium -Thia kultiviert.y-Tubulin: Ladekontrolle. Unten: Prozentuale Menge der relativen Bandenintensität von Mal2-1-GFP, welche mit der Bandenintensität der Ladekontrolle ins Verhältnis gesetzt wurde, bezogen auf die Vektorkontrolle. Quantifizierung erfolgte mit ImageJ. B: Lokalisation von Mal-1-GFP inmal2-1-qfp Zellen, transformiert mit der VektorkontrolleoderpREP3X-sui1<sup>+</sup>(nmt1<sup>+</sup> Promotor). Kultivierung erfolgte 24h bei 25°C in flüssigem -ThiaMinimalmedium. Aufnahme erfolgte mit dem Spinning-Disc Konfokal Mikroskop mit 100% Laserintensität. Unten: Quantifizierung der relativen Signalintensität von Mal2-1-GFP in dem Stamm, transformiert mit der Vektorkontrolle und nachsui1<sup>+</sup> Überexpression. Vektorkontrolle: N=20; sui1<sup>+</sup>: N=20; \*: p<0,0005 (Zwei-Stichproben-T-Test) verglichen mit der Vektorkontrolle.**C**: Serieller Verdünnungstropftest (10<sup>4</sup>-10<sup>1</sup> Zellen) der mal2 Mutantenstämme mal2-1 und mal2-30 transformiert mit der Vektorkontrolle, pREP3X-mal2<sup>+</sup>(nmt1<sup>+</sup> Promotor), pREP3X-mal2-30(nmt1<sup>+</sup> Promotor)(mal2-30 Stamm)bzw. pREP3X-mal2-1(nmt1<sup>+</sup> Promotor)(mal2-1 Stamm) oder pREP3X-sui1<sup>+</sup>(nmt1<sup>+</sup> Promotor) bei den angegebenen Temperaturen auf -Thia Minimalmedium. Kultivierung erfolgte wie in Abb. 3-25. Inkubationsdauer: 4-5 Tage

Meine Daten deuten darauf hin, dass *sui1*<sup>+</sup> Überexpression die zelluläre Proteinmenge der mutierten Kinetochorproteine erhöht und dass diese Erhöhung die Temperatursensitivität der Stämme supprimiert. Um diese Hypothese zu testen, wurde untersucht, ob eine Suppression der Temperatursensitivität auch durch eine erhöhte Expression des mutanten Allels erfolgen kann. Ob

dies per se möglich ist, wurde anhand der mal2 Mutantenstämme mal2-1 und mal2-30 untersucht. Dazu wurde der mal2-1bzw. der mal2-30 ORF kloniert und auf einem Plasmid unter Kontrolle des *nmt1*<sup>+</sup> Promotors im *mal2-1bzw. mal2-30* Mutantenstamm überexprimiert (Abb. 3-47C). Die Expression von plasmid-kodiertemmal2-1 im mal2-1 Mutantenstamm führte, wie auch die Expression des wildtypischen  $mal2^+$ , zu einer Suppression der Temperatursensitivität dieses Stammes bis zu einer maximalen Temperatur von 32°C. Bei höheren Temperaturen wurde dieser Stamm nur durch extra mal2<sup>+</sup> vollständig supprimiert (Daten nicht gezeigt). Auch der mal2-30 Stamm konnte durch extra mal2-30 supprimiert werden. Interessanterweise ähnelte in diesem Stamm bei der maximalen Temperatur, bei der noch eine Suppression durch extra mal2-30 erfolgte, die Qualität der Suppression der, die auch für sui1<sup>+</sup> beobachtet werden konnte. Auch hier erfolgte die Suppression, verglichen mit der Positivkontrolle ( $mal2^+$ ), nur partiell. Dies zeigt zum einen, dass die Überexpression des mutanten Allels generell zu einer Suppression der Temperatursensitivität eines mal2 Mutantenstammes führen kann. Diese Suppression kann ähnlich wie die Suppression durch extra *sui1*<sup>+</sup> aber nicht bei jeder Temperatur, sondern nur bis zu einer maximalen Temperaturerfolgen. Dies zeigt, dass eine Suppression der Temperatursensitivität von mal2 Mutantenstämmen durch eine höhere Proteinmenge des mutierten Mal2 Proteinsdurch *sui1*<sup>+</sup> Überexpression erfolgen könnte.

### 3.2.5.2 *eif5*<sup>+</sup> wirkt antagonistisch zu *sui1*<sup>+</sup>

Eine Analyse des humanensui1<sup>+</sup> Homologs elF1und des Translations-Initiations-Faktor 5 (elF5)hat gezeigt, dass deren zelluläre Proteinmenge autoreguliert wird. Diese Autoregulation erfolgt auf der Ebene der Translations-Initiation der elF1- bzw. elF5-mRNA und ist abhängig von der Proteinmenge von elF1 und elF5 selbst. Für den Mechanismus, der zu dieser Autoregulation führte, wurde für elF5 eine antagonistische Wirkung zu elF1 beschrieben(Ivanov *et al.* 2010; Loughran *et al.* 2012). Um zu untersuchen, ob die beschriebenen Phänotypen durch *sui1*<sup>+</sup> Überexpression mit diesem autoregulatorischem Mechanismus im Zusammenhang stehen, wurde untersucht, ob durch Überexpression des *S. pombe eif5*<sup>+</sup> gegenteilige Phänotypen zur Überexpression von *sui1*<sup>+</sup> beobachtet werden konnten.

Dazu wurde zunächst untersucht, welchen Effekt die Überexpression von  $eif5^+$  auf die immunpräzipitierbareProteinmenge von Mal2-1-GFP hat.Tatsächlich konnte durch  $eif5^+$ Überexpression weniger Mal2-1-GFP verglichen mit dem Stamm, transformiert mit der Vektorkontrolle,immunpräzipitiert werden (Abb. 3-48). In diesem Beispiel kam es durch  $eif5^+$ Überexpression zu einer Reduktion der Mal2-1-GFP Proteinmenge von ca. 40%. Eine Reduzierung derProteinmenge von Mal2-1-GFP konnte in 5 von 7 voneinander unabhängigen Versuchen gezeigtwerden. Die Reduzierung durch extra  $eif5^+$  war auch hier variabel (siehe Anhang: Abb. 5-4). In 2 von 7 Versuchen wurden verglichen mit dem Stamm, transformiert mit der Vektorkontrolle, ähnliche Mengen an Mal2-1-GFP immunpräzipitiert.



Abb. 3-48Überexpression von *eif5*<sup>+</sup> reduziert die immunpräzipitierte Menge des Mal2-1-GFP Proteins

Oben: Der Westernblot zeigt das Ergebnis einer Mal2-1-GFP Immunpräzipitation. Proteinextrakte Mal2-1-GFP exprimierender Zellen, transformiert mit der Vektorkontrolle, pREP3X-sui1<sup>+</sup> (nmt1<sup>+</sup> Promotor) oder pREP3X-*eif5*<sup>+</sup> (*nmt1*<sup>+</sup> Promotor) wurden mit magnetischen anti-GFP Kugeln immunpräzipitiert. Die Transformanten wurden zuvor 24h bei 25°C in Minimalmedium -Thia kultiviert. γ-Tubulin: Ladekontrolle. Unten: Prozentuale Menge der relativen Bandenintensität von Mal2-1-GFP, welche mit der Bandenintensität der Ladekontrolle ins Verhältnis gesetzt wurde, bezogen auf die Vektorkontrolle. Quantifizierung erfolgte mit ImageJ.

Damit anhand Proteinmenge konnte der von Mal2 eine antagonistische Wirkung der*eif5*<sup>+</sup>Überexpression im Vergleich zur*sui1*<sup>+</sup>Überexpression nachgewiesen werden. Im Rahmen der Bachelorarbeit von Frau Daniela Heinz konnte gezeigt werden, dass die antagonistische Wirkung von *eif5*<sup>+</sup>auch phänotypisch nachgewiesen werden kann (Heinz 2013). Überexpression von *eif5*<sup>+</sup>war letal für Mutantenstämme des Sim4-Komplexes. Diese Letalität war, ähnlich wie die Suppression durch extra sui1<sup>+</sup>, spezifisch für Mutantenstämme dieses Komplexes. Im Wildtypstamm sowie in Mutantenstämmen des NMS-Komplexes führte Überexpression von *eif5*<sup>+</sup> nur zu leicht reduziertem Wachstum. Diese Daten deuten darauf hin, dass die Translations-Initiations-Faktoren Sui1 und Eif5 eine bisher nicht beschriebene Funktion für die Mitose in S. pombe haben.

### 4 Diskussion

Durch die Phänotypisierung konditional letaler Mutantenstämme, wurde für 7 der 8 bisher charakterisierten Komponenten des Sim4-Kinetochor-Komplexes eine essentielle Funktion für die Segregation der Chromosomen beschreiben. Des Weiteren sind Lokalisationsabhängigkeitensowie genetische Interaktionen für einige Komponenten dieses Komplexes bekannt(Fleig *et al.* 1996; Takahashi *et al.* 2000a; Jin *et al.* 2002; Pidoux *et al.* 2003; Hayashi *et al.* 2004; Kerres *et al.* 2006; Tanaka *et al.* 2009). Dagegen liegen bisher keine Daten darüber vor welche genaue Funktion die einzelnen Komponenten innerhalb des Sim4-Komplexes bei der Mitose einnehmen bzw. über welche Mechanismen diese Proteine reguliert oder rekrutiert werden.

In dieser Arbeit wurde für die Proteine Asp1 und Sui1 erstmals eine mitotische Funktion charakterisiert, welche für beide Komponenten einen Einfluss auf den Sim4-Kinetochor-Komplex beschreibt.Sowohl Sui1 als auch Asp1 können die Komposition/Stöchiometrievon Sim4-Komplex-Komponenten variieren. Meine Analysen deuten darauf hin, dass die Wirkweisen dieser beiden Proteine auf den Sim4-Komplex unabhängig voneinander erfolgen. Asp1/IP<sub>7</sub> kann die Kinetochor-assoziierte Menge von Proteinen dieses Komplexes modulieren, ohne jedoch Einfluss auf deren Proteinmenge zu haben. Neben dieser Modulation reguliert Asp1/IP<sub>7</sub> noch weitere mitotische Komponenten wie den Spindelaufbau und den mitotischen Spindelkontrollpunkt. Asp1/IP<sub>7</sub>hat somit einen Einfluss auf mehrere Aspekte der Chromosomensegregation und übt diese Funktion wahrscheinlich während jeder Zellteilung aus. Interessanterweise reagieren Mutantenstämme des Sim4-Komplexes unterschiedlich auf hohe IP<sub>7</sub> Mengen bzw. Abwesenheit von IP<sub>7</sub>. Damit hatAsp1/IP<sub>7</sub> spezifische Wirkweisen auf einzelne Proteine dieses Komplexes undin Zukunft kann mit Hilfe von Asp1 die Funktion dieser Komponenten in der Mitose seziert werden.

Sui1 kann ebenfalls die Kinetochor-lokalisierte Menge von Proteinen dieses Komplexes erhöhen. Hier erfolgt diese Erhöhung aber vermutlich direkt durch die Erhöhung der Proteinmenge einzelner oder aller Komponenten auf Ebene der Translations-Initiation. Die Suppression von Kinetochor-Mutantenstämmen durch Überexpression von *sui1*<sup>+</sup>war zwar spezifisch für Mutantenstämme des Sim4-Komplexes sowie eng assoziierter Proteine, die Wirkweise von extra *sui1*<sup>+</sup> auf diese Komponenten scheint dagegen eher unspezifisch zu sein. Ob die Modulation der Sim4-Komplex-Komponenten durch Sui1 für das Durchlaufen jeder Mitose benötigt wird, ist unklar. Möglicherweise wird eine Sui1 spezifische Regulation nur unter bestimmten Wachstumsbedingungen benötigt.Die möglichen Funktionsweisenbeiden Sim4-Komplex-Regulatorenwerden im Folgenden diskutiert.

### 4.1 Inositolpolyphosphate sind Masterregulatoren der Mitose

Inositolpolyphosphat Kinasen der 1/3-Familie (auch Vip1-Familie genannt) produzieren IP<sub>7</sub>durch Addition einer weiteren Phosphatgruppe an Position 1 oder 3 des Inositolrings(Shears 2009).Zweizelluläre Funktionen wurden bis dato beschrieben, bei denen diese Moleküle eine Rolle spielen.Unter Phosphatmangelbedingungen in *S. cerevisiae* kommt es durch Bindung von Vip1 generiertem IP<sub>7</sub> an den CDK-Inhibitor Pho81 zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors Pho4, welcher die Expression von Genen vermittelt, die für die Anpassung an Phosphatmangelbedingungen relevant sind. Mit Pho81 wurde in *S. cerevisiae* auch das bisher einzige direkte Target von IP<sub>7</sub> identifiziert(Huang *et al.* 2007; Lee *et al.* 2007; Lee *et al.* 2008). In *S. pombe* wurde eine essentielle Funktion vonIP<sub>7</sub> für den dimorphen Wechsel von Pilzen beschrieben. BeiNahrungs-Mangelbedingungenbenötigt *S. pombe* IP<sub>7</sub>, um von der einzelligen Hefeform zur filamentösen invasiven Form zu wechseln. Dabei konnte außerdem erstmals die postulierte negative regulatorische Funktion der "Phosphatasedomäne" auf die Kinasedomäne *in vivo*demonstriert werden (Pohlmann & Fleig 2010).

In der vorliegenden Arbeit konnte nun zum ersten Mal gezeigt werden, dass Inositolpolyphosphate, welche durch die 1/3-Familie generiert werden, eine Funktion währendder Mitose ausüben. Dabei konnte gezeigt werden, dass physiologisch abweichende IP<sub>7</sub> Mengen einen massiven Einfluss auf alle untersuchtenmitotischenMechanismen bzw. Strukturenhaben. Ich konnte zeigen, dass unterschiedliche IP<sub>7</sub>Mengen(i)einen Einfluss auf die Stöchiometriesowie die Funktion eines spezifischen Teils des Kinetochors haben,(ii) die Stabilität und die Dynamik der mitotischen Spindel beeinflussen und(iii)den mitotischen Spindelkontrollpunktregulieren. diese drei Da mitotischenProzesse miteinander verknüpft bzw. voneinander abhängig sind, ist es naheliegend, dass Inositolpolyphosphaten eine übergreifende modulierende Funktion für die Regulation der Mitose zugesprochen werden kann. Des Weiteren zeigen meine Analysen, dass IP7 Moleküle einen Subkomplex des Kinetochors sowie eine spezifische Funktion des mitotischen Spindelkontrollpunktes regulieren. Somit wurden zum ersten Mal mögliche mitotische Targets von Inositolpolyphosphaten identifiziert.

### 4.1.1 Asp1 generiertes IP7 moduliert Aufbau und Funktion des Kinetochors

Physiologisch abweichende Asp1 generierte IP<sub>7</sub> Mengen haben einen massiven Einfluss auf einen spezifischen Teil des Kinetochors. Die Menge an IP<sub>7</sub> korreliert negativ mit der Kinetochor-Lokalisation von Komponenten des Sim4-Kinetochor-Komplexes. Anhand der Sim4-Komponenten Mal2 und Fta2 konnte ich zeigen, dass die Lokalisation dieser Proteine am Kinetochor durch Asp1 generiertes IP<sub>7</sub>

moduliert werden kann (Kapitel 3.1.7). Abwesenheit von IP<sub>7</sub>führt zu einer erhöhten Lokalisation dieser Proteine, wohingegen hohe IP<sub>7</sub> Mengen die Lokalisation von Mal2 und Fta2 verringert. Erhöhte IP<sub>7</sub> Mengen reduzieren beispielsweise die Menge an Kinetochor-gebundenem Fta2 um ca. 35%, wohingegen Abwesenheit von IP<sub>7</sub>diese um ca. 38% erhöht. Die zelluläre Menge von Mal2 trotz unterschiedlicher IP<sub>7</sub> Mengen bleibt dagegen konstant. Dies zeigt zum einen, dass die Menge an Kinetochor-assoziiertem Mal2 nicht zwingend mit einer höheren bzw. niedrigeren Menge des Proteins korrelieren muss. Weiterhin zeigen diese Ergebnisse, dass IP<sub>7</sub>Mal2 nicht direkt über die Transkription bzw. Translation reguliert, sondern nur den Einbau von Mal2 am Kinetochor positiv bzw. negativ beeinflusst. Zum anderen zeigt die höhere Menge von Kinetochor-gebundenem Mal2 durch Abwesenheit von IP<sub>7</sub>, dass es neben der Kinetochor-assoziierten Menge von Mal2 noch einen weiteren nicht-assoziierten Anteil dieses Proteins in der Zellegibt.

Eine derartige Modulation für Komponenten des Kinetochors wurde bisher noch für keinen Organismus beschrieben. Proteine des Sim4-Komplexes wurden als konstitutiv gebundene Kinetochorproteine beschrieben (Hayashi *et al.* 2006). Es fehlen aber Studien in *S. pombe*, ob die Menge eines dieser Proteine am Kinetochor im Laufe des Zellzyklus bzw. während der Mitose variiert. Daten für das humane Mal2 Homolog CENP-O deuten darauf hin, dass dessen Lokalisation während der Mitose moduliert wird (McAinsh *et al.* 2006). Beim Übergang von der Anaphase A zu Anaphase B konnte für CENP-O eine Reduktion um ca. den Faktor 2 gemessen werden. Eine physiologische Relevanz für diese Reduktion ist jedoch bisher nicht beschrieben worden. In einer weiteren Studie wurde gezeigt, dass CENP-O ähnlich wie CENP-A/Cnp1 in der S-Phase zum Kinetochor rekrutiert wird und, dass die Proteinmenge im Laufe der G2- bzw. S-Phase abnimmt (Eskat *et al.* 2012). Dagegen war es mir möglich zu zeigen, dass eine reduzierte Menge von Mal2 am Kinetochor wahrscheinlich nicht mit einer entsprechend variablen Proteinmenge im Zusammenhang steht (Kapitel 3.1.7.1.1; 3.1.7.2.1).

Durch die Auswertung der Phänotypen von *asp1*<sup>H379A</sup> und *asp1*<sup>D333A</sup> Zellen konnte ich zeigen, dass sich die beschriebene Modulation von Mal2 und Fta2 nicht zwangsläufig negativ auf die Chromosomensegregation auswirken muss. Unter den von mir gewählten Bedingungen konnten in diesen Stämmen keine Segregationsdefekte beobachtet werden. Liegt der Sim4-Komplex dagegen durch Mutantenstämme einzelner Sim4-Komplex-Proteine nicht mehr wildtypisch vor, verursachen physiologisch abweichende IP<sub>7</sub> Mengen Chromosomenfehlsegregation.

Die stärksten negativen Effekte konnten durch Expression der Asp1 Kinasedomäne in Sim4-Komplex-Mutantenstämmen beobachtet werden. Hier führten erhöhte IP<sub>7</sub> Mengen zu starken Wachstumsdefekten der *mal2-1,fta2-291* und *mis6-*302Mutantenstämme bzw. waren letal für diese Stämme. Es konnte gezeigt werden, dass die Funktion von Mal2 und Fta2 mit der der Fähigkeit dieser Proteine am Kinetochor zu lokalisieren korreliert(Jin *et al.* 2002; Kerres *et al.* 2006). Es ist daher naheliegend, dass sich die reduzierte Kinetochor-Lokalisation durch mehr IP<sub>7</sub>negativ auf die Überlebensfähigkeit dieser Stämme auswirkt.

Der negative Effekt durch hohe IP<sub>7</sub> Mengen konnte durch Phänotypisierung eines asp1<sup>H379A</sup>mal2-1 Doppelmutanten-Stammes weiter charakterisiert werden. Hier konnten sowohl in der frühen Mitose als auch in der Anaphase mitotische Defekte beobachtet werden, die zum Teil durch eine Reduktion von Mal2 und Fta2 am Kinetochorbeschrieben worden sind (Fleig et al. 1996; Jin et al. 2002; Kerres et al. 2006). Die ungleichmäßige bzw. unvollständige Segregation des Chromatins in asp1<sup>H379A</sup>mal2-1Zellen, wurde beschrieben, wenn Mal2 bzw. Fta2 nicht mehr wildtypischvorliegt. Auch die beobachteten aberranten kurzen Spindeln könnten mit einer geringeren Mal2 Menge am Kinetochor und einem damit verbundenen Funktionsverlust von Mal2 in Verbindung stehen. Zwar wurde bisher für den Sim4-Komplex keine direkte Bindung an Mikrotubuli bzw. keine Funktion für die Stabilität der mitotischen Spindel beschrieben, dochbereits während meiner Diplomarbeit konnte ich zeigen, dass Mal2 einen Einfluss auf die Stabilität der mitotischen Spindel hat (Topolski 2008). Diese Funktion wurde auch für dasMal2 Homolog CENP-O beschrieben, dader Verlust von CENP-O in Humanzellen ebenfalls zu Spindeldefekten führt (McAinsh et al. 2006; McClelland et al. 2007). Des Weiteren wurde für andere Komponenten des CENP-O Subkomplexesbereits eine direkte Bindung an Mikrotubuli beschrieben (Amaro et al. 2010; Hua et al. 2011). Die genaue Funktion von Mal2 bzw. CENP-O für die Stabilität der mitotischen Spindel ist aber nicht bekannt.Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass sich weitere IP<sub>7</sub>-spezifische Effekte negativ auf das Wachstum des mal2-1 Stammes auswirken, die nicht direkt mit der verminderten Kinetochor-Lokalisation von Mal2 in Verbindung stehen müssen. Ich konnte zeigen, dass mehr IP<sub>7</sub> in *asp1*<sup>H379A</sup> Zellen einen stabilisierenden Effekt auf Mikrotubuli hat und zum anderen Phase II, in der falsche Kinetochor-Mikrotubuli-Verknüpfungen korrigiert werden, in diesen Zellen verkürzt ist. Dagegen hat die Abwesenheit von IP7 einen destabilisierenden Effekt auf Mikrotubuli und führt zu einem transienten Arrest in Spindelphase II.

Für den *mal2-1* Mutantenstamm wurde gezeigt, dass dessen Überlebensfähigkeit bei semipermissiven Bedingungen von einem funktionellen Spindelkontrollpunkt abhängig ist (Jin *et al.* 2002). Dies könnte bedeuten, dass die Korrektur fehlerhafter Kinetochor-Mikrotubuli-Verknüpfungen, die im *mal2-1* Stamm vermehrt auftreten in *asp1*<sup>H379A</sup>*mal2-1*Zellen nicht mehr stattfinden kann, oder durch zu stabile Kinetochor-Mikrotubuli-Verknüpfungen behindert ist. Eine fehlerhafte oder nicht vorhandene Korrektur falscher Kinetochor-Mikrotubuli-Verknüpfungen würde sich negativ auf die Chromosomensegregation in diesem Stamm auswirken. Gerade zu Beginn der Mitose treten häufig fehlerhafte Kinetochor-Mikrotubuli-Verknüpfungen auf, welche erkannt und korrigiert werden müssen(Tanaka *et al.* 2005). In *asp1*<sup>H379A</sup>*mal2-1*Zellen waren häufig kurze Spindeln zu beobachten,
bei denen die gesamte DNA ungleichmäßig nur auf einer Seite der Spindel vorlag. Die Auswertung lebender Zellen zeigte, dass in solchen Zellen alle Chromosomen während der Metaphase nur zu einem der Spindelpole gezogen werden und anschließend bis zu 3 min bei diesem verbleiben, bis diese fehlerhafte Assoziation aufgehoben wurde. Ein ähnlicher Phänotyp konnte beobachtet werden, wenn Komponenten des mitotischen Spindelkontrollpunktes (Bub3) nicht mehr funktionell vorliegen. Die Autoren postulieren, dass in solchen Fällen die Verbesserung von monotelischen Verknüpfungen fehlerhaft ist (Windecker et al. 2009). In diesen Zellen verblieben jedoch nur einzelne Chromosomen über längere Zeit an einem der Spindelpole. Der von mir beobachtete Phänotyp, bei dem alle Chromosomen zu einem Pol gezogen werden und dort über einen längeren Zeitraum verbleiben ist bisher einzigartig. Dieser Phänotyp könnte ein Indiz dafür sein, dass es aufgrund zu stabiler Mikrotubuli in asp1<sup>H379A</sup>mal2-1Zellen länger dauert, bis monotelische Verknüpfungen korrigiert werden. Unklar ist jedoch, warum alle Chromosomen nur zu einem der Spindelpole gezogen werden. In mal3 bub1 Zellen konnte beispielsweise gezeigt werden, dass sich zu Beginn der Mitose die Chromosomen näher am "alten" (oder "Mutter"-) Spindelpolkörper befinden. Treten nun monotelische Verknüpfungen auf, die nicht korrigiert wurden, werden die Chromosomen präferentiell zu diesem alten Spindelpolkörper gezogen und verbleiben dort (Asakawa et al. 2005). Allerdings zeigt meine Analyse, dass die Verteilung aller Chromosomen zu nur einem der SPBs erst stattfand, als diese in der Metaphase zwischen den SPBs vorlagen. Dies würde fehlerhafte Prometaphase-Verknüpfungen ausschließen und könnte darauf hindeuten, dass es neben der räumlichen Nähe der jeweiligen SPBs zu den Chromosomen in der Prometaphase noch weitere Faktoren gibt, welche den alten vom neuen SPB unterscheiden.

Im Gegensatz zu hohen IP<sub>7</sub> Mengen kann sich eine verstärkte Lokalisation der Proteine Mal2 bzw. Fta2 durch reduzierte IP<sub>7</sub>Mengen positiv auf den mutanten Phänotyp der temperatursensitiven Mutantenstämme auswirken. Es konnte gezeigt werden, dass die Plasmid-kodierteExpression der Asp1 "Phosphatasedomäne" in einem Wildtypstamm zu geringeren IP<sub>7</sub> Mengen führt(Ramrath 2012). Da geringe IP<sub>7</sub> Mengen zu einer verstärkten Lokalisation von Mal2 und Fta2 führen, konnte durch Expression der Asp1 "Phosphatasedomäne"eine Suppression der Temperatursensitivität des*mal2-1* Stammesbeobachtet werden. Durch diese Daten ist ähnlich wie eine geringere Lokalisation dieser Proteine und daraus resultierende Segregationsdefekte, der Effekt einer stärkeren Lokalisation von Mal2 und Fta2 neben der quantitativen Auswertung der Signalintensitäten auch phänotypisch nachweisbar. Ein ähnlicher Effekt konnte auch beobachtet werden, wenn z.B. *fta2*<sup>+</sup> im*mal2-1* Mutantenstamm überexprimiert wird. Dies führt ebenfalls zu einer verstärkten Kinetochor-Lokalisation von Mal2-1-GFP und zu einer Suppression der Temperatursensitivität dieses Stammes ((Kerres *et al.* 2006) und Daten nicht gezeigt).Die Suppression der Temperatursensitivität des *mal2-1* Stammes durch weniger IP<sub>7</sub> konnte allerdings nur beobachtet werden, wenn Asp1 endogen wildtypisch vorliegt und damit Asp1 generiertes IP7 in der Zelle vorhanden ist. Anwesenheit des asp1<sup>D333A</sup> Allels im mal2-1 Stamm führte zwar zu einer verstärkten Kinetochor-Lokalisation von Mal2-1, dieser Stamm zeigte im Vergleich zu den Einzelmutantenstämmen dennoch schlechteres Wachstum sowie mitotische Defekte. Hauptsächlich traten hier "lagging chromosomes" auf, ein Phänotyp, der durch merotelische Kinetchor-Mikrotubuli-Verknüpfungen hervorgerufen wird (Courtheoux et al. 2009). Dadurch, dass betroffene Kinetochore durch Mikrotubuli beider Spindelpole gebunden sind, kommt es zu einer langsameren Segregation in Anaphase B. Merotelische Verknüpfungen und eine damit verbundene verlangsamte Segregation können zu Aneuploidie führen und sind Auslöser von Krebs in humanen Zellen (Cimini et al. 2001; Ganem et al. 2009; Gregan et al. 2011). Zwar handelt es sich bei diesen "lagging chromosomes" damit per se um eine fehlerhafte Verknüpfung zwischen dem Kinetochor und der mitotischen Spindel, durch Auswertung lebender Zellen konnte ich aber zeigen, dass dies nicht zwangsläufig zu Segregationsdefekten führen muss. Trat dieser Phänotyp in lebenden asp1<sup>D333A</sup>mal2-1 Zellen auf, wurden die betreffenden Chromosomen zwar verzögert in Anaphase A zu einem der Spindelpole transportiert, zum Ende der Mitose kam es jedoch immer zu einer morphologisch gleichmäßigen Verteilung des Chromatins. Diese Defekte können allerdings nicht durch zu viele Mal2-1 Proteine am Kinetochor verursacht worden sein, da die Mal2-1-GFP Signalintensität hier bei weitem nicht die des wildtypischen Mal2 erreichte (Daten nicht gezeigt). Dagegen könnten die beobachteten Defekte das Ergebnis additiver Effekte derasp1<sup>D333A</sup> und mal2-1 Mutationen sein. Sowohl der asp1<sup>D333A</sup> Stamm wie auch dermal2-1 Stamm sind sensitiv gegenüber TBZ, was auf eine instabile mitotische Spindel in beiden Stämme hindeutet(Fleig et al. 1996; Jin et al. 2002; Pohlmann & Fleig 2010). Des Weiteren konnte ich in meiner Diplomarbeit zeigen, dass auch Mal2 für die Stabilität der Spindelmitte benötigt wird(Topolski 2008). Korrespondierend dazu konnte ich in dieser Arbeit zeigen, dass die für asp1<sup>D333A</sup> Zellen beschriebenen Spindeldefekte in *asp1*<sup>D333A</sup>*mal2-1* Zellen mit einer massiv erhöhten Frequenz auftraten. Es wären daher additive Effekte naheliegend, die in asp1<sup>D333A</sup>mal2-1 Zellen zu einer verstärkten Destabilisierung der mitotischen Spindel führen und damit das korrekte Segregationsverhalten der Chromosomen bzw. das Wachstum dieses Stammes negativ beeinflussen.

Zusammenfassend zeigen meine Analysen, dass durch IP<sub>7</sub>die Kinetochor-Assoziation von spezifischen Sim4-Komplex-Komponenten moduliert werden kann. Unter den von mir untersuchten Bedingungen hatte dies im Wildtyp keinen Effekten auf die Chromosomensegregation.Massive Chromosomensegregationsdefekte traten erst auf, wenn Sim4-Komplex-Komponenten mutiert sind. In solchen Fällen haben sowohl hohe IP<sub>7</sub> Mengen als auch der Verlust von Asp1 generiertem IP<sub>7</sub>einen negativen Effekt auf die Überlebensfähigkeit dieser Stämme.

### 4.1.2 Aufbau und Dynamik der mitotischen Spindel

In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal gezeigt, dass die Stabilität der Metaphasenspindel durch IP<sub>7</sub> moduliert wird. Im Vergleich zum Wildtyp führt die Abwesenheit von Asp1 generiertem IP<sub>7</sub> zu dünnen Spindelmitten, die je nach verwendetem Stamm in 20% - 90% Metaphasenspindeln resultieren, die brechen. Dagegen konnte durch erhöhte IP<sub>7</sub> Mengen ein stabilisierender Einfluss auf die mitotische Spindel beobachtet werden. So wurden dünne Spindelmitten und Spindelbrüche, die durch eine geringere  $\alpha$ -Tubulin Mengenhervorgerufen wurden, durch Anwesenheit des *asp1*<sup>H379A</sup> Allels vollständig supprimiert. Damit wurde erstmals gezeigt, dass die Stabilität der mitotischen Spindel durch IP<sub>7</sub> moduliert wird. Korrespondierend dazu wurde gezeigt, dass niedrige IP<sub>7</sub> Mengen zu einer Sensitivität gegenüber TBZ führen, wohingegen hohe IP<sub>7</sub> Mengen die Zelle resistenter gegen diese Mikrotubuli destabilisierende Substanz machen(Pohlmann & Fleig 2010). Mir war es damit möglich die Ursache für diese Sensitivität bzw. Resistenz zu beschreiben.

Die Stabilität der Spindelmitte während der Metaphase wird durch Überlagerung der dynamischen Plus-Enden der Mikrotubuli, sowie durch Mikrotubuli-assoziierte-Proteine aufrechterhalten. Obwohl die Spindel während der Metaphase eine konstante Länge behält, unterliegen die überlagernden Mikrotubuli während dieser Zeit einer hohen Dynamik. Es konnte gezeigt werden, dass diese Dynamik durch eine Abfolge von Polymerisation und Depolymerisation der überlagernden Mikrotubuli bestimmt wird (Mallavarapu et al. 1999; Sagolla et al. 2003). Erst in Anaphase A kommt es zu einer massiven Stabilisierung der überlagernden Mikrotubuli in der Spindelmitte und somit zu einer Änderung der Dynamik dieser Mikrotubuli-Enden, welche durch die verstärkte Rekrutierung des Mikrotubuli-Bündlers Ase1 vermittelt wird (Mallavarapu et al. 1999; Yamashita et al. 2005). Funktionsverlust der Mikrotubuli-Bündelung, ist daher neben kollabierenden Spindeln in der Metaphase hauptsächlich durch brechende Spindeln in der Anaphase B geprägt(Loiodice et al. 2005; Yamashita et al. 2005; Meadows & Millar 2008).Die von mir beobachteten instabilen Spindelmitten und die daraus resultierenden Spindelbrüche konnten dagegen nur während der Metaphase beobachtet werden. Des Weiteren konnte ich zeigen, dass die Rekrutierung von Ase1 und damit die Bündelung der Mikrotubuli in der Metaphase wie auch in der Anaphase in *asp1*<sup>D333A</sup>Zellen wildtypisch ist (Daten nicht gezeigt). Dies deutet darauf hin, dass IP<sub>7</sub>die Stabilisierung der Spindel nicht durch Bündelung reguliert. Dagegen scheint die Dynamik der Mikrotubuli-Plus-Enden betroffen zu sein, welche sich nur in der Metaphase durch hohe bzw. niedrige IP<sub>7</sub> Mengen positiv bzw. negativ auf die Stabilität der Metaphasenspindel auswirkt. Korrespondierend dazu wurden instabile und/oder brechende Metaphasenspindeln beschrieben, wenn z.B. die Proteine Peg1, Dis1 und Alp14 betroffen sind, welche am Plus-Endeder Mikrotubuli assoziieren und die Dynamik des Mikrotubuli-Plus-Endes beeinflussen(Garcia et al. 2001; Grallert et al. 2006; Hsu & Toda 2011).

Einen Einfluss von Inositolpolyphosphaten auf die Dynamik der Mikrotubuli-Plus-Enden konnte ich ebenfalls durch Messung der Geschwindigkeit der Spindelelongation in Phase I und III zeigen. In beiden Phasen zeigtenasp1<sup>D333A</sup> Zellen eine schnellere Elongation der mitotischen Spindel, was auf eine höhere Dynamik durch Abwesenheit von IP7 hindeutet.Weitere Daten aus unserem Labor zeigen, dass dieser Effekt von IP7 auf die Dynamik von Mikrotubuli-Plus-Enden nicht nur auf die Mitose beschränkt ist. Auch in Interphasenzellen konnte für *asp1*<sup>D333A</sup>Zellen eine schnellere Mikrotubuli-Polymerisation gemessen werden (Jennifer Pöhlmann, nicht publizierte Daten). Die Elongation der mitotischen Spindel wird durch Polymerisation in der Überlappungszone der an ihrem Plus-Ende überlagernden Mikrotubuli vermittelt, welche anschließend auseinandergleiten (Masuda et al. 1988; Masuda et al. 1990; Mallavarapu et al. 1999). Korrespondierend dazu konnten Änderungen der Polymerisationsgeschwindigkeit von Mikrotubuli ebenfalls gemessen werden, wenn Proteine betroffen sind, welche die Dynamik des Mikrotubuli-Plus-Endes beeinflussen. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die Polymerisationsgeschwindigkeit von Mikrotubuli in vitrokonzentrationsabhängig gesteigert wird, wenn Homologe der Mikrotubuli-Plus-End assoziierten Proteine Mal3 und Dis1 zum Reaktionsansatz gegeben werden (Brouhard et al. 2008; Vitre et al. 2008; Zimniak et al. 2009). Auch für das S. pombe Mikrotubuli-Plus-End assoziierte Protein Alp14 wurde gezeigt, dass dieses die Dynamik des Mikrotubuli-Plus-Endes als auch die Polymerisationsgeschwindigkeit sowohl positiv als auch negativ beeinflussen kann (Al-Bassam et al. 2012).

Daten aus unserem Labor haben gezeigt, dass die schnellere Polymerisationsgeschwindigkeit von Mikrotubuli in der Interphase durch Verlust von Asp1 generiertem IP<sub>7</sub> auch gemessen werden kann, wenn Mal3 nicht mehr funktionell vorliegt (Jennifer Pöhlmann, nicht publizierte Daten). Dies zeigt, dass die schnellere Polymerisation nicht über dieses Mikrotubuli-Plus-End assoziierte Protein vermittelt wird. Es kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass die Aktivität von Alp14 oder Dis1 durch Asp1 generiertes IP<sub>7</sub> beeinflusst werden kann, da diese Proteine unabhängig von Mal3 rekrutiert werden. Interessanterweise konnte für einen *alp14* $\Delta$  Deletionsstamm eine Resistenz gegenüber hohen IP<sub>7</sub> Mengen beobachtet werden(Jennifer Pöhlmann, nicht publizierte Daten). Damit wäre Alp14 ein mögliches Target von IP<sub>7</sub> bei der Regulation der Dynamik des Mikrotubuli-Plus-Endes.

Somit war es mir möglich zu zeigen, dass die Dynamik des Mikrotubuli-Plus-Endes durch die Menge an IP<sub>7</sub> moduliert werden kann. Abwesenheit von IP<sub>7</sub>führt dazu, dass das Mikrotubuli-Plus-Ende dynamischer ist, was zu einer instabilen Metaphasenspindel führt, sich aber gleichzeitig positiv auf die Polymerisationsgeschwindigkeit in Phase I und III auswirkt. Hohe IP<sub>7</sub> Mengen haben dagegen einen stabilisierenden Einfluss auf Mikrotubuli-Plus-Enden, was eine stabilisierende Wirkung auf die Metaphasenspindel hat. Dagegen scheint diese stabilisierende Wirkung auf das Mikrotubuli-PlusEnde unter den von mir gewählten Bedingungen keinen signifikanten Effekt auf die Polymerisationsgeschwindigkeit in Phase I und III zu haben. Es wäre daher z.B. vorstellbar, dass die Menge oder die Aktivität von Mikrotubuli-Plus-End assoziierten Proteinen durch die Menge an IP<sub>7</sub> positiv oder negativ beeinflusst wird, was sich anschließend direkt auf die Dynamik von Mikrotubuli auswirken würde.

#### 4.1.3 Funktion des mitotischen Spindelkontrollpunktes

Der Eintritt in die Anaphase A unterliegt einem komplexen Regulationsmechanismus, der bis heute nur in Teilen verstanden wurde. Liegen falsche Kinetochor-Mikrotubuli-Verknüpfungen vor, die zu einer fehlerhaften Segregation der Chromosomen führen würden, ist der Eintritt in die Anaphase A blockiert und die Zelle arretiert in der Metaphase bis diese falschen Verknüpfungen korrigiert wurden. Zwei Arten von falschen Verknüpfungen müssen dabei dem Spindelkontrollpunkt "signalisiert" werden. Zum einen wird signalisiert, wenn Kinetochore nicht mit Mikrotubuli verknüpft sind (ungebundene Kinetochore). Zum anderen muss der Spindelkontrollpunkt aktiv bleiben wenn zwar alle Kinetochore *per se* mit Mikrotubuli verknüpf sind, die Qualität dieser Verknüpfungen aber nicht in allen Fällen einer korrekten bipolaren Anordnung entspricht (Kapitel 1.5.3; 1.5.4).

Bis vor kurzem ging man davon aus, dass für diese zwei fehlerhaften Verknüpfungen zwei separate Signalwege existieren. Einer, der die Abwesenheit von Kinetochor-Mikrotubuli-Verknüpfungen kontrolliert und einer, der die Qualität der Verknüpfung überprüft(Skoufias et al. 2001; Pinsky & Biggins 2005; Musacchio & Salmon 2007). Diese Hypothese basierte auf der Beobachtung, dass einzelne Komponenten des Spindelkontrollpunktes nur spezifisch an solchen Kinetochoren lokalisieren, die eine dieser beiden fehlerhaften Verknüpfungen aufweisen. Heute dagegen geht man davon aus, dass diese beiden Wege nicht völlig unabhängig voneinander existieren können, da zwischen den Komponenten der beiden Wege eine lokalisationsabhängige Hierarchie besteht(Heinrich et al. 2012; Shepperd et al. 2012). Bisher existiertnur für einen dieser Wege (ungebundene Kinetochore) ein Modell, wie in dieser Situation ein transienter Arrest in der Metaphase aufrechterhalten wird. Unter anderem binden Mad1 und Mad2 an diese ungebundenen Kinetochore, wodurch eine Inhibierung des "Anaphase Promoting Complex" vermittelt wird und somit der Eintritt in die Anaphase verhindert wird (Musacchio & Salmon 2007). Dagegen gibt es bis heute keinen Nachweis, durch welchen Mechanismus die Zelle in der Metaphase arretiert, wenn die Qualität der Verknüpfungen nicht korrekt ist. Es ist daher nicht bekannt, ob und wenn ja wie in dieser Situation ein Signal erzeugt wird, welches zu einer Inhibierung des "Anaphase Promoting Complex" führt.Es existieren Modelle, welche postulieren, Aktivität lediglich dass die des Spindelkontrollpunktes durch Spannung beeinflusst wird, welche durch die inter-Kinetochor Abstände der Schwesterchromatiden bzw. der Abstände verschiedener Kinetochorproteine eines Schwesterchromatids vermittelt wird (Maresca & Salmon 2010). Durch die Charakterisierung von Asp1 war es mir möglich einen neuen Kandidaten zu identifizieren der möglicherweise für die Überprüfung der Qualität von Kinetochor-Mikrotubuli-Verknüpfungen eine wichtige Funktion einnimmt.

Die Funktion des mitotischen Spindelkontrollpunktes istvon der Menge an Asp1 generiertem IP<sub>7</sub> abhängig.Ähnlich wie für die Lokalisation der Proteine Mal2 und Fta2 und für die Stabilität der mitotischen Spindel, so konnte auch für die Aktivität des Spindelkontrollpunktes eine Modulation beobachtet werden, die von hohen bzw. niedrigen IP<sub>7</sub> Mengen vermittelt wird. Ohne IP<sub>7</sub> benötigten *asp1*<sup>D333A</sup> Zellen,im Vergleich zum Wildtypstamm, ca. 54% länger um von der Metaphase in die Anaphase A einzutreten (Kapitel 3.1.4). Dagegen führen erhöhte IP<sub>7</sub> Mengen dazu, dass die Zellen um ca. 10% schneller in die Anaphase A eintreten als Wildtypzellen(Kapitel 3.1.5.2).

Mit Hilfe des Spindelkontrollpunktproteins Bub1-GFP konnte ich bestimmen, welcherTeildesSpindelkontrollpunktes durch Asp1 generiertes IP<sub>7</sub>beeinflusst wird. Generell ist die Kinetochor-Mikrotubuli-Verknüpfung in  $\alpha sp1^{D333A}$  Zellen vorhanden. Diese Zellen arretieren erst in der Metaphase, nachdem diese Verknüpfungen hergestellt sind. Dies zeigt, dass der Metaphasenarrest, der durch Abwesenheit von IP<sub>7</sub> ausgelöst wird, nicht durchungebundene Kinetochore vermittelt wird. Stattdessen ist hier der Teil des Spindelkontrollpunktes aktiviert, welcher die bipolare Anordnung und damit die Qualität der Kinetochor-Mikrotubuli-Verknüpfungen überprüft. Dieser Arrestin*asp1*<sup>D333A</sup> Zellen konnte durch Funktionsverlust von *mph1*<sup>+</sup> aufgehoben werden (Kapitel 3.1.4.1). Mph1 ist eine Komponente, welche sich am Anfang der lokalisationsabhängigen Hierarchie des Spindelkontrollpunktes befindet und unter anderem für die Überprüfung der Qualität von Kinetochor-Mikrotubuli-Verknüpfungen verantwortlich ist (He et al. 1998; Musacchio & Salmon 2007; Heinrich et al. 2012; Ito et al. 2012; Yamagishi et al. 2012). Dies zeigt, dass der transiente Arrest durch Abwesenheit von IP<sub>7</sub> in Abhängigkeit von Mph1 erfolgt.

Die Aktivierung des Spindelkontrollpunktes wird durch den Funktionsverlust einer Vielzahl von Proteinen vermittelt, welche beispielsweise die Stabilität der Spindel oder die Integrität des Kinetochors beeinflussen (Musacchio & Salmon 2007; Maresca & Salmon 2010). In diesen Fällen treten Fehler bei der Kinetochor-Mikrotubuli-Verknüpfung auf, welche dem Spindelkontrollpunkt signalisiert werden. Die modulierende Wirkung von Asp1 generiertem IP<sub>7</sub>, die sowohl positiven als auch negativen Einfluss auf die Aktivität des Spindelkontrollpunk haben kann, wurde aber bisher nur für Proteine beschrieben, die selbst Bestandteile dieses Signalweges sind. So führt beispielsweise Überexpression von *mph1*<sup>+</sup> zu einem langen Arrest in der Metaphase, wohingegen kein Arrest

erfolgt, wenn *mph1*<sup>+</sup> deletiert ist (He *et al.* 1998). Dies führte zu der Überlegung, dass Asp1/IP<sub>7</sub> eventuell eine Komponente des Spindelkontrollpunktes darstellt.

### 4.1.3.1 Ist Asp1 eine Komponente des mitotischen Spindelkontrollpunktes?

Durch die Auswertung des mitotischen Phänotyps eines asp1<sup>D333A</sup> bub3<sup>Δ</sup> Stammes, in dem die Spindelkontrollpunktkomponente Bub3 nicht mehr vorliegt, konnte ich zeigen, dass zwischen diesen beiden Allelen eine negative genetische Interaktion besteht (Kapitel 3.1.4.3). Hauptsächlich waren hier "lagging chromosomes" zu beobachten, welche durch merotelische Kinetochor-Mikrotubuli-Verknüpfungen verursacht werden (Courtheoux et al. 2009). Dieser Phänotyp trat in einer hohen Frequenz nur auf, wenn 1. durch Asp1 kein IP<sub>7</sub> mehr generiert werden kann und 2. die Spindelkontrollpunktkomponente Bub3 nicht mehr vorliegt. Dies zeigt, dass in *asp1*<sup>D333A</sup> *bub3*∆ Zellen merotelische Verknüpfungen nicht korrigiert werden, bevor die Zelle in die Anaphase A eintritt. Die Korrektur von fehlerhaften Verknüpfungen ist abhängig von der S. pombeAurora Kinase Ark1, welche Kinetochor-Mikrotubuli-Verknüpfungen durch Phosphorylierung von Substraten lösen kann (Hauf et al. 2007; Tsukahara et al. 2010; Carmena et al. 2012). Ich konnte zeigen, dass die Zentromer-Lokalisation von Ark1 in der Prometaphase in *asp1*<sup>D333A</sup>Zellen reduziert ist (Kapitel 3.1.4.4). Die Lokalisation von Ark1 ist ebenfalls reduziert, wenn bub3<sup>+</sup> deletiert ist (Vanoosthuyse et al. 2009; Heinrich et al. 2012). Dies deutet darauf hin, dass Asp1 und Bub3 voneinander unabhängig innerhalb des Spindelkontrollpunktes für die Lokalisation von Ark1 benötigt werden. Die Segregationsdefekte des asp1<sup>D333A</sup> bub3<sup>Δ</sup> Stammes deuteten darauf hin, dass hier die Ark1 abhängige Korrektur falscher Kinetochor-Mikrotubuli-Verknüpfungen nicht mehr erfolgen kann, da in diesem Fall die Rekrutierung von Ark1 nicht mehr oder nur noch in sehr geringen Maße stattfinden kann. Die negative genetische Interaktion zwischen Asp1 und Bub3 ist in S. cerevisiae konserviert. In einem Screen nach neuen Komponenten des mitotischen Spindelkontrollpunktes konnte für einen*bub3∆vip1∆* Doppelmutantenstamm (Vip1=Asp1 in S. pombe) sogar eine synthetische Letalität beobachtet werden(Daniel et al. 2006). Die Hypothese, dass Asp1 eine neue Komponente des mitotischen Spindelkontrollpunktes ist, wurde durch eine genomweite Studie untermauert, bei derS. pombe Gene nach ihrer Signatur in 297 funktionelle Module eingeteilt wurden (Ryan et al. 2012). Diese Signatur ist definiert durch die Art der genetischen Interaktion mit anderen Genen. Interessanterweise hat Asp1 ein ähnliches Interaktions-Profil wie Komponenten des mitotischen Spindelkontrollpunktes wie Mad2, Mad3, Bub3.Wegen dieser ähnlichen genetischen Interaktion zu anderen Genen wurde Asp1 in ein Modul Namens "mitotic checkpoint complex" eingeteilt(Ryan et al. 2012).Die Signale, über welche bei fehlerhaften Kinetochor-Mikrotubuli-Verknüpfungen ein transienter Arrest in der Metaphase vermittelt wird, sind nicht bekannt. Daherwären Asp1 generierte Inositolpolyphosphate potenzielle Kandidaten, die mit ihrem rapiden Umsatz als intrazelluläre Signalmoleküle den Übergang von der Metaphase in die Anaphase A induzieren könnten. Auch die von mir beschriebene Kompositionsänderung des Kinetochors durch unterschiedliche IP<sub>7</sub> Mengen könnte eine Relevanz für die Aktivität des Spindelkontrollpunktes haben. So wurde gezeigt, dass Proteine des Sim4-Kinetochor-Komplexes als Plattform für Komponenten des Spindelkontrollpunktes agieren (De Wulf *et al.* 2003; Saitoh *et al.* 2005; Takahashi *et al.* 2005; Knockleby & Vogel 2009). Des Weiteren wurde für den *mal2-1* Mutantenstamm eine synthetische Letalitätzu Mutantenstämmen des "Anaphase Promoting Complex" nachgewiesen, welcher den Übergang von der Metaphase in die Anaphase kontrolliert(Jin *et al.* 2002). Dies zeigt, dass der Sim4-Kinetochor-Komplex neben Lokalisationsabhängigkeiten auch eine starke genetische Interaktion zum Spindelkontrollpunkt zeigt. Ich postuliere daher, dass sich eine Änderung der Menge von Sim4-Komplex Proteinen am Kinetochor, in Abhängigkeit von IP<sub>7</sub>, auf die Aktivität des mitotischen Spindelkontrollpunktes auswirken könnte.

### 4.1.4 Funktionsweise von Asp1 generiertem IP7

Meine Analysen zeigen, dass Asp1 generiertes IP<sub>7</sub>mehrere mitotische Prozesse reguliert. Für die Kinetochor-lokalisierte Menge der Mal2 und Fta2 Proteine, die Dynamik und Stabilität der mitotischen Spindel als auch für die Funktion des Spindelkontrollpunktes lag der Phänotyp des Wildtypstammes jeweils zwischen dem, der durch hohe IP7 Mengen bzw. Abwesenheit von IP7 beobachtet werden konnte. Dies deutet darauf hin, dass die Prozesse, welche diese mitotischen Komponenten regulieren konzentrationsabhängig durch IP<sub>7</sub> beeinflusst werden. Sowohl Abwesenheit von IP<sub>7</sub> als auch eine IP<sub>7</sub> Menge, die über der physiologischen Menge liegt hat daher eine mitotische Relevanz für die Aktivierung bzw. Deaktivierung von Targets. Eine ähnliche Funktionsweise von Asp1 generiertem IP<sub>7</sub> konnte für den dimorphen Wechsel in S. pombe beobachtet werden (Pohlmann & Fleig 2010). Ausgelöst durch Anpassung an Mangelbedingungen ist es S. pombe Zellen möglich von der einzelligen Hefeform in eine filamentöse invasiv wachsende Form zu wechseln. Hier wurde eine ähnliche Wirkungsweise für unterschiedliche IP<sub>7</sub> Mengen beobachtet. Bei Abwesenheit von IP<sub>7</sub> war es den Zellen nicht mehr möglich trotz Mangelbedingung in die filamentöse Form zu wechseln und damit invasiv zu wachsen. Dagegen reagieren Zellpopulationen verstärkt auf Mangelbedingungen wenn hohe IP<sub>7</sub> Mengen vorliegen, was zu erhöhtem invasivem Wachstum führt. Es wurde gezeigt, dass der dimorphe Wechsel in Abhängigkeit der Asp1 generierten IP7 Menge moduliert wird, was darauf hindeutet, dass die Generierung von IP7 Menge durch externe Signale beeinflusst werden kann(Pohlmann & Fleig 2010).

Unklar ist aber bis heute, über welche Targetsdie Modulation von Prozessen durch IP<sub>7</sub> erfolgt. Korrespondierend zu den von mir identifizierten mitotischen Funktionen von Asp1 war es mir möglich eine Kernlokalisation von Asp1 nachzuweisen (Abb. 4-1). Die hier gezeigte Zelle zeigt repräsentativ die Lokalisation von Asp1-GFP in einer Interphasenzelle. Man sieht, dass Asp1-GFP in einer sichelförmigen Struktur in der Mitte der Zelle akkumuliert, welche die Größe des Nukleolus ausspart.



Asp1-GFP

# Abb. 4-1 Asp1-GFP lokalisiert im Kern von *S. pombe* Zellen

Links: Ein Asp1-GFP exprimierender Stamm wurde 24h bei 30°C in Minimalmedium vorinkubiert und auf "agarose pads" gleichen Medientyps aufgetragen. Aufnahme erfolgte bei ca. 20°C. Laserintensität: 50%. Balken: 2  $\mu$ m. Rechts: Schematische Darstellung einer *S. pombe* Zelle in der Interphase mit Position des Zellkerns sowie des Nukleolus.

Aktuelle Arbeiten aus unserem Labor konnten zeigen, dass ein Asp1-NLS Fusionsprotein ("nuclear localization signal"), den mutanten Phänotyp von Asp1 Mutantenstämmen substituieren kann (Anand Vangala, nicht publizierte Daten). Diese Daten zeigen, dass die Funktionsweise von Asp1 eindeutig im Zellkern vermittelt wird. Passend dazu handelt es sich bei den beschriebenen Interaktionspartnern von Asp1/IP<sub>7</sub>um Proteine, welche ebenfalls eine Funktion im Kern ausüben. Bei dem einzigen bis dato nachgewiesenen direkten Target von IP7, welches durch die 1/3-Kinase-Familie generiert wird, handelt es sich um denCDK-Inhibitor eines Transkriptionsfaktors(Huang et al. 2007; Lee et al. 2007; Lee et al. 2008). In einer weiteren Arbeit konnte gezeigt werden, dass das S. cerevisiae Asp1 Homolog Vip1 das Histon Chaperon Asf1 direkt bindet. Die Autoren postulieren, dass Vip1 zusammen mit Asf1 durch eine Änderung der Heterochromatin-Struktur die Transkription von Genen regulieren kann(Osada et al. 2012). Histon Chaperone wie Asf1 können Histone binden und sowohl den Einbau als auch den Ausbau von Nukleosomen in die DNA bzw. aus der DNA kontrollieren. Zum einenreguliert Asf1 den Einbau von Nukleosomen in die neureplizierte DNAwährend der S-Phase des Zellzyklus (Tyler et al. 1999; Kim et al. 2007; Mousson et al. 2007; Eitoku et al. 2008). Des Weiteren wurde gezeigt, dass Asf1 für den Start der Transkription von Genen benötigt wird, welche beim Phosphat- und Glukosemetabolismus in S. cerevisiae eine Rolle spielen. Damit die für die Transkription dieser Gene relevanten Proteinkomplexe rekrutiert werden können, werden zuvor die Nukleosomen in Abhängigkeit von Asf1 aus der Promotorregion entfernt (Adkins et al. 2004; Adkins et al. 2007). Diese Daten deuten darauf hin, dass der Einbau und/oder Ausbau von

Nukleosomen in das Chromatin durch die Interaktion zwischen Vip1/Asp1 und dem Histon-Chaperon Asf1 vermittelt werden kann. Zwar wurde gezeigt, dass Asf1 nichtfür den Einbau von Zentromerspezifischen Nukleosomen verantwortlich ist(Dunleavy et al. 2009), dennoch zeigen Chaperone, welche für den Einbau speziell dieser Nukleosomen verantwortlich sind und das Histon CENP-A/Cnp1 binden können eine ähnliche Funktionsweise wie Asf1 und können dieses funktionell substituieren(Tanae et al. 2012).Daten aus unserem Labor deuten darauf hin, dass bei Abwesenheit von Asp1 generiertem IP<sub>7</sub> die Rekrutierung von CENP-A/Cnp1-Nukleosomen in die innere Zentromerregion verstärkt ist. Diese Vermutung beruht auf der Beobachtung, dass bei Abwesenheit von Asp1 generiertem IP7 die transkriptionelle Stilllegung dieses Bereiches verstärkt ist (Jennifer Pöhlmann, nicht publizierte Daten). Diese Daten zeigen, dass auch der Einbau Zentromer-spezifischer Nukleosomen durch die Aktivität von Asp1 reguliert werden kann. Es wurde beschrieben, dass dieser Einbau primär während der S-Phase stattfindet und somit an die Replikation der DNA gekoppelt ist (Chen et al. 2003). Eine neue Studie mitS. cerevisiaehat jedoch gezeigt, dass sich die Menge an CENP-A/Cnp1-Nukleosomen ebenfalls während der Mitose ändert(Shivaraju et al. 2012). Die Autoren konnten zeigen, dass sich die Zentromer-lokalisierte Menge von CENP-A/Cnp1 bei Eintritt in die Anaphase B verdoppelt. Diese Verdopplung beruht darauf, dass in der Anaphase B statt einer CENP-A/Cnp1-Kopie zwei CENP-A/Cnp1-Kopien in das Nukleosom eingelagert sind. Eine Verdopplung der Zentromer-lokalisierten Menge von CENP-A/Cnp1 konnte ebenfalls in Candida albicans reproduziert werden und scheint somit in den Pilzen konserviert zu sein (Shivaraju et al. 2012). Der Mechanismus über den diese Einlagerung reguliert wird ist jedochnicht bekannt.

Basierend auf den von mit generierten Daten postuliere ich, dass die Aktivität von Asp1 und damit die Menge an IP<sub>7</sub> beim Übergang von der Metaphase in die Anaphase moduliert werden. Die Änderung der IP<sub>7</sub> Menge könnte dabei von einer hohen Menge in der Metaphase zu einer niedrigen Menge in der Anaphase erfolgen, oder umgekehrt. Durch die Änderung der IP<sub>7</sub> Menge reguliert Asp1 die Komposition des Kinetochors, welche z.B. durch Einlagerung weiterer Zentromer-spezifischer Nukleosomen verändert werden könnte. Ich postuliere, dass die Aktivität von Asp1 während der Metaphase für eine korrekte Komposition des Kinetochors und damit für die korrekte bipolare Ausrichtung der Chromosomen benötigt wird. In Abhängigkeit dieser korrekten bipolaren Ausrichtung könnte Asp1 anschließend den Eintritt in die Anaphase regulieren.

### 4.2 Sui1: Ein neuer Regulator des Sim4-Kinetochor-Komplexes

# **4.2.1** Überexpression von *sui1*<sup>+</sup> kann die Proteinmenge von Komponenten des Sim4-Kinetochor-Komplexes erhöhen

Der S. pombe Translations-Initiations-Faktor 1 (Sui1) wurde von Frau Dr. Visnja Jakopec in einer Multikopien-Suppressoranalyse für den konditional letalen *fta2-291* Mutantenstamm isoliert(Jakopec 2011). In dieser Arbeit konnte ich zeigen, dass Überexpression von *sui1*<sup>+</sup> die Temperatursensitivität aller verfügbaren Mutantenstämme der essentiellen Komponenten des Sim4-Kinetochor-Komplexes supprimiert. Die von mir beobachteteSuppression der Temperatursensitivität durch extra sui1\*war spezifisch für Mutantenstämmedes Sim4-Komplexes, sowiefür die cnp1-1, mis16-53 und mis18-262 Mutantenstämme.*cnp1*<sup>+</sup> kodiert für die Zentromer-spezifische Histon H3-Variante CENP-A/Cnp1 und bildet zusammen mit den Kinetochorproteinen Mis16 und Mis18 eine Bindeplattform für den Sim4-Komplex(Kapitel 3.2.3; 3.2.4). Die Temperatursensitivität von Mutantenstämmen des NMS-Komplexes wurde dagegen nicht von *sui1*<sup>+</sup> supprimiert. Bisher wurde nur für einzelne Sim4-Komplex-Komponenten gezeigt, dass diese durch Überexpression die Temperatursensitivität spezifischer Mutantenstämme des Sim4-Komplexes supprimieren können. So führt beispielsweise die Überexpression von *mal2*<sup>+</sup>spezifisch zu einer Suppression des *fta2-291* Mutantenstammes und umgekehrt kann fta2<sup>+</sup> Überexpression den mal2-1 Mutantenstamm supprimieren (Kerres et al. 2006). Bisher war aber kein Proteinbekannt, welches wenn überexprimiert die Fähigkeit besitzt die Temperatursensitivität aller verfügbaren Mutantenstämme essentieller Komponenten des Sim4-Komplexes zu supprimieren. Dies deutet darauf hin, dass dem Protein Sui1 eine übergeordnete Funktion für den gesamten Sim4-Komplexes zugesprochen werden kann.

Wie kann man durch *sui1*<sup>+</sup> Überexpression eine Suppression der aberranten Phänotypen aller getesteten Mutantenstämme des Sim4-Komplexes bewirken?

Zum einen wäre es möglich, dass durch extra  $sui1^+$  die Proteinmenge vieler Proteine des Sim4-Komplexes erhöht wird. Durch Quantifizierung der Proteinmenge als auch der Kinetochor-Lokalisation des Mal2-1-GFP Proteins konnte ich zeigen, dass Überexpression von  $sui1^+$  die Proteinmenge dieser Komponente des Sim4-Komplexes erhöhen kann. Durch Wachstumsanalysen von zwei unterschiedlichen*mal2* Mutantenstämmen nämlich *mal2-1* und *mal2-30* war es mir möglich zu zeigen, dass die Überexpression des mutanten Allels zu einer Suppression der Temperatursensitivität dieser Mutantenstämme führen kann. Dies zeigt, dass der Funktionsverlust mutierter Mal2 Proteine bei hohen Temperaturen durch eine erhöhte Menge dieser Proteineaufgehoben werden kann. Es wäre daher möglich, dass Überexpression von  $sui1^+$  in Mutantenstämmen des Sim4-Komplexes zu einer erhöhten Proteinmenge der mutierten Proteine führt (Abb. 4-2). Durch diese erhöhte Proteinmenge wäre die Kinetochor-Lokalisation dieser Komponenten erhöht, wodurch es diesen Stämmen möglich ist auch bei hohen Temperaturen zu wachsen. Bei dieser "direkten" Wirkweise erfolgt daher die Suppression der Temperatursensitivität von Mutantenstämmen des Sim4-Komplexes durch extra *sui1*<sup>+</sup> direkt über eine erhöhte Proteinmenge des jeweils mutierten Proteins.Durch diese erhöhte Proteinmenge kann dann der Funktionsverlust dieser Proteine bei hohen Temperaturen funktionell aufgehoben werden.





Gezeigt ist ein Modell, wie durch Überexpression ( $\uparrow$ ) von  $sui1^+$  die Temperatursensitivität eines Mutantenstammes des Sim4-Komplexes supprimiert werden kann. In diesem Modell liegt im jeweiligen Mutantenstamm durch Überexpression von  $sui1^+$  eine höhere Menge des mutierten Proteins vor. Diese erhöhte Proteinmenge führt dann zu einer Suppression der Temperatursensitivität des jeweiligen Mutantenstammes.

Eine zweiteMöglichkeit wäre, dass für die Suppression aller Mutantestämme des Sim4-Komplexes durch *sui1*<sup>+</sup>eine erhöhte Proteinmenge einiger weniger Proteine dieses Kinetochor-Komplexes bzw. nahe assoziierter Proteine ausreicht.Das einzige bekannte Gen, welches durch Überexpression die Temperatursensitivität mehrerer Mutantenstämme des Sim4-Komplexes supprimieren kann ist *cnp1*<sup>+</sup>, welches für die Histon H3 Variante CENP-A/Cnp1 kodiert. Überexpression von *cnp1*<sup>+</sup> kann die Temperatursensitivität von Mutantenstämmen supprimieren, welche mutierte Varianten der Kinetochorproteine Mis6, Mis15, Mis17 und Sim4 exprimieren(Takahashi et al. 2000a; Pidoux et al. 2003; Hayashi *et al.* 2004). Daher wurde in dieser Arbeit untersucht, ob die Suppression durch  $sui1^+$ mit der Proteinmenge an Cnp1 in Verbindung steht. Aus technischen Gründen war es nicht möglich direkt zu überprüfen, ob durch Überexpression von *sui1*<sup>+</sup> eine höhere Menge des Cnp1-Proteins vorliegt. Allerdings gibt es Hinweise, die darauf hindeuten. Ähnlich wie für die Überexpression durch*cnp1*<sup>+</sup>gezeigt,so konnte ich auch für extra *sui1*<sup>+</sup> eine Verstärkung der transkriptionellen Stilllegung der inneren Zentromerregion beobachten. Diese stärkere transkriptionelle Stilllegung wurde bisher nur beschrieben, wenn mehr Cnp1-Nukleosomen in das Zentromer-Chromatin eingebaut werden, sodass dieses für die Transkription von Markergenen weniger zugänglich ist (Castillo et al. 2007; Joglekar et al. 2008). Allerdings kann die Temperatursensitivität der Mutantenstämme des Sim4-Komplexes nicht in jedem Fall durch eine höhere Menge von Cnp1 supprimiert werden. Die *mal2-1* und *fta2-291*Mutantenstämme konnten nicht durch Überexpression von *cnp1*<sup>+</sup> supprimiert werden. Dagegen kann die Temperatursensitivität der Stämme *mal2-1* und *fta2-291* supprimiert werden, wenn eine höhere Proteinmenge von Mal2 bzw. Mal2-1 vorliegt, welche ich bereits nachweisen konnte (Kerres *et al.* 2006). Die "indirekte" Wirkweise von extra *sui1*<sup>+</sup> beschreibt daher ein Modell, in dem durch eine erhöhte Proteinenge von Cnp1 und Mal2 eine Suppression aller Mutantenstämme des Sim4-Komplexes erfolgen könnte (Abb. 4-3).



Abb. 4-3 Indirekte Wirkweise bei der Suppression von Sim4-Komplex Mutantenstämmen durch Überexpression von *sui1*<sup>+</sup>

Gezeigt ist ein Modell, wie durch Überexpression ( $\uparrow$ ) von *sui1*<sup>+</sup> die Temperatursensitivität eines Mutantenstammes des Sim4-Komplexes supprimiert werden kann. In diesem Modell erfolgt die Suppression durch eine höhere Menge von wenigen Komponenten wie Cnp1 und Mal2. Eine erhöhte Menge des Proteins Cnp1 kann die Temperatursensitivität der Mutantenstämme mis17-362, sim4-193, mis15-68 und mis6-302 supprimieren. Eine höhere Menge des Proteins Mal2 bzw. Mal2-1 kann die Temperatursensitivität der fta2-291 bzw. mal2-1Mutantenstämme supprimieren.

Im zweiten Modell führt die Überexpression von *sui1*<sup>+</sup> zu einer höheren Proteinmenge der Proteine Cnp1 sowie Mal2 bzw. Mal2-1. Eine höhere Menge von Cnp1 kann die Temperatursensitivität der Stämme *mis17-362, sim4-193, mis15-68* und *mis6-302* supprimieren. Mit einer höheren Proteinmenge von Mal2 bzw. Mal2-1 kann dagegen eine Suppression der Mutantenstämme *fta2-291* bzw. *mal2-1* erfolgen.

Beide Modelle postulieren, dass die Überexpression von *sui1*<sup>+</sup>somit dieProteinmengevon Komponenten des Sim4-Komplexes erhöhen kann. Da es sich bei Sui1 um den hochkonservierten Translation-Initiations-Faktor 1 handelt, war es naheliegend, dass die höhere Proteinmenge von Mal2 auf Ebene der Translations-Initiation vermittelt wird. Mir war es möglich Fakten zu liefern, die diese Hypothese untermauern.

## 4.3 Die Regulation der Mal2 Menge durch Sui1 erfolgt auf Ebene der Translations-Initiation

Damit eine mRNA korrekt translatiert wird, muss zunächst der 48S Prä-Initiations-Komplex (48S PIC) das AUG Initiations-Kodon erkennen. Solange der 48S PIC eine offene Konfirmation aufweist, scannt dieser Komplex die mRNA nach diesem Kodon(Hinnebusch 2011). Die Aufrechterhaltung dieser offenen Konfirmation ist abhängig von dem Sui1 Homolog eIF1, welches an diesem Komplex gebunden vorliegt. eIF1 blockiert einen Bereich des 48S PIC, wo anschließend unter anderem in Abhängigkeit des Translations-Initiations Faktors 5 (eIF5) der 48S PIC in eine geschlossene Konfirmation überführt wird. Nach der Erkennung des AUGs dissoziiert elF1 vom 48S PIC. Es wird vermutet, dass der C-terminale Teil von eIF5 nun in die Stelle rückt, in der zuvor eIF1 gebunden war. Durch diesen Vorgang wird die anschließende Konfirmationsänderung des 48S PIC vermittelt, welche diesen von einer offenen in eine geschlossene Konfirmation überführt. Dieser geschlossenen Form des 48S PIC ist es nicht mehr möglich auf der mRNA nach dem AUG-Kodon zu scannen. Stattdessen wird dieser fester an die mRNA gebunden, wodurch die anschließende Elongation der Translation vermittelt wird(Nanda et al. 2009; Hinnebusch 2011; Nanda et al. 2013). Es konnte gezeigt werden, dass die Initiation der Translation auch an nicht-AUG Kodons erfolgen kann, wenn eIF1 nicht mehr funktionell vorliegt. Es wird vermutet, dass auf molekularer Ebene in diesem Fall eIF1 schneller vom 48S dissoziiert, so dass das Scannen nach dem AUG-Kodon weniger effizient ist. In diesem Fall wäre es eIF5 schneller möglich in die eIF1 Bindestelle zu rücken (Yoon & Donahue 1992b; Mitchell & Lorsch 2008; Nanda et al. 2009). Des Weiteren konnte in vitro gezeigt werden, dass hohe Mengen an eIF5 zu einer schnelleren Dissoziation von elF1 führen wodurch die Genauigkeit der Start-Kodon-Erkennung reduziert wird. Damit wird auf molekularer Ebene eine antagonistische Wirkung zwischen eIF1 und eIF5 beschrieben, da diese beiden Initiations-Faktoren quasi Konkurrenten für eine Bindestelle im 48S PIC sind(Nanda et al. 2009; Hinnebusch 2011; Nanda et al. 2013).

Um zu prüfen, ob die Interaktion zwischen Sui1 und dem Sim4-Kinetochor-Komplex eventuell auf Ebene der Translations-Initiation vermittelt wird, wurde untersucht ob durch Überexpression von  $eif5^+$  in *S. pombe* gegenteilige Phänotypen zur Überexpression von  $sui1^+$  beobachtet werden können, welche auf eine antagonistische Wirkung hindeuten könnten. Diese antagonistische Wirkung zwischen Sui1 und Eif5 konnte ich in *S. pombe*anhand der Proteinmenge von Mal2 bestätigen. Überexpression von  $sui1^+$  erhöht die Proteinmenge von Mal2, wohingegen Überexpression von  $eif5^+$  diese reduziert. Frau Daniela Heinz konnte in ihrer Bachelorarbeit eine antagonistische Wirkung von Eif5 für die Stabilität des Sim4-Kinetochor-Komplexes *in vivoz*eigen(Heinz 2013). Überexpression von  $sui1^+$  führt spezifisch zu einer Suppression der Temperatursensitivität von Mutantenstämmen des Sim4-Komplexes. Dagegen hat Überexpression von  $eif5^+$  einen massiven negativen Effekt auf das

Wachstum dieser Stämme. Auch dieser negative Effekt war spezifisch für Mutantenstämme des Sim4-Komplexes. Diese Daten deuten darauf hin, dass die Wirkweise von Sui1 auf den Sim4-Komplex auf Ebene der Translations-Initiation vermittelt wird.

Wie aber ist es möglich, dass auf Ebene der Translations-Initiation eine spezifische Wirkweise auf nur einen Komplex des Kinetochors vermittelt werden kann?Einige Studien aus höheren Eukaryoten deuten drauf hin, dass auf Ebene der Translations-Initiation abhängig von der antagonistischen Wirkung zwischen elF1 (Sui1) und elF5 eine stringente Wahl von AUG-Kodons erfolgen kann. Diese Studien basieren auf der Beobachtung, dass die Effizienz der Translations-Initiation nicht nur vom AUG-Kodon selbst, sondern auch von den umgebenden Sequenzen abhängig ist, dem sogenannten AUG-Kontext(Kozak 1984; Ivanov et al. 2010; Loughran et al. 2012). Die Autoren unterscheiden in diesen Arbeiten zwischen "guten" und "schlechten" AUG-Kontexten, welche durch spezifische Nukleotide vor und nach dem AUG-Kodon definiert werden. Die Translation startetpräferentiell an AUG-Kodons mit einem "guten" AUG-Kontext, wenn hohe Mengen an eIF1 (Sui1) vorliegen. Liegen dagegen hohe Mengen an eIF5 vor, ist die Translations-Initiation an AUG-Kodons mit einem "schlechten" Kontext erhöht(Ivanov et al. 2010; Loughran et al. 2012). Interessanterweise hat das AUG von *mal2*<sup>+</sup> einen Kontext, der als "guter" AUG-Kontext definiert wurde. Es wäre daher denkbar, dass die Proteinmenge von Mal2, welche je nachdem ob *sui1*<sup>+</sup> oder *eif5*<sup>+</sup> überexprimiert wird höher oder niedriger ist, in Abhängigkeit des "guten" AUG-Kontextes von mal2<sup>+</sup> reguliert wird. Es wird vermutet, dass die Menge von eIF1 und eIF5 über die AUG-Kontexte der Gene welche für diese Proteine kodieren auf Ebene der Translations-Initiation autoreguliert wird(Ivanov et al. 2010; Loughran et al. 2012). Es liegen jedoch keine Daten vor, ob dieser Mechanismus ebenfalls eine physiologische Relevanz für die Regulation der der Menge weiterer Proteine besitzt. Andere Arbeitsgruppen konnten jedoch zeigen, dass die Menge an eIF1 mit einer Adaptation an zellulären Stress korreliert und damit eine physiologische Relevanz für die Anpassung an Umweltbedingungen hat(Sheikh et al. 1999; Latha 2004 ; Diedhiou et al. 2008; Jin et al. 2008; Biver et al. 2011; Sun & Hong 2012).

Eine Vielzahl von Stresssituationen kann die Stabilität des Genoms beeinflussen. So konnte z.B. in S. cerevisiae gezeigt werden, dass Salzstress, oxidativer Stress und eine Vielzahl von Zellgiften zu Aneuploidie führen (Chen et al. 2012). Daten aus unserem Labor haben gezeigt, dass mehrere Kinetochor-Mutantenstämme sensitiv gegenüber Salzstress sind (Ursula Fleig, nicht publizierte Daten). In einer Doktorarbeit aus unserem Labor konnte außerdem gezeigt werden, dass Hefestämme, welche zusätzliche künstliche Chromosomen tragen sensitiver gegenüber externen Stresssorten sind (Langen 2011). Diese Daten zeigen, dass die Chromosomensegregation sehr umweltbedingte Stresssituationen sensibel auf reagiert. Unklar ist jedoch, durch welcheRegulationsmechanismendie Chromosomensegregation auf veränderte Umweltbedingungen eingestellt wird.

In dieser Arbeit konnte ich zum ersten Mal zeigen, dass eine höhere Menge des *S. pombe* Translations-Initiations Faktors 1 (Sui1) die Menge von Kinetochorproteinen des Sim4-Komplexes erhöht. In mehreren Modellsystemen konnte bereits gezeigt werden, dass elF1 für die Anpassung an veränderte Umweltbedingungen benötigt wird. In verschiedenen Organismen wie Hefe, Hamster, Pflanzen und menschlichen Ziellinien wird elF1 hochreguliert, wenn diese Salzstress oder genotoxischen Giften ausgesetzt werden wodurcheine höhere Stresstoleranz vermittelt werden kann(Sheikh *et al.* 1999; Latha 2004 ; Diedhiou *et al.* 2008; Jin *et al.* 2008; Biver *et al.* 2011; Sun & Hong 2012). Diese Daten zeigen, dass eine hohe Menge an elF1 generell mit einer Anpassung an zellulären Stress in Verbindung zu stehen scheint. Dies deutet darauf hin, dass durch elF1 spezifisch die Menge von Proteinen reguliert wird, welche für die Adaptation an diese veränderten Umweltbedingungen benötigt werden.

Ich postuliere daher, dass unter Stresssituationen wie z.B. Salzstress der Kinetochor "belastbarer" sein muss um unter diesen Bedingungen die korrekte Weitergabe der Chromosomen zu gewährleisten. Ich konnte zeigen, dass der Sim4-Kinetochor-Komplex durch Überexpression von *sui1*<sup>+</sup> stabilisiert werden kann, wenn dessen Stabilität in Kinetochor-Mutantenstämmen sensibilisiert ist. Daher wäre es möglich, dass eine höhere Menge von Sui1 eine physiologische Relevanz für die Adaption der Chromosomensegregation an Stresssituationen besitzt, indem die Menge von Komponenten des Sim4-Komplexes erhöht wird, wodurch dessen Stabilität als Ganzes gewährleistet wird. Diese erhöhte Stabilität auf Stresssituationen könnte zum einen in der Interphase die Verbindungzwischen den Kinetochorenund den SPBs und somit den korrekten Eintritt in die nächste Teilungsphase gewährleisten. Zum anderen könnte diese erhöhte Stabilität auch während der Mitose von Bedeutung sein, indem sie die korrekte Verknüpfung der Kinetochore an die Spindel-Mikrotubuli aufrechterhält. In weiterführenden Studien in unserem Labor wird aktuell der AUG-Kontext von Genen mutiert, welche für Proteine des Sim4-Komplexes kodieren. Diese Arbeiten werden zeigen, ob die Regulation dieses Komplexes über eine stringente Wahl von AUG-Kodons bestimmt wird.

Somit konnte ich in dieser Arbeit zwei neue Proteine charakterisieren, welche einen spezifischen Teil des Kinetochors regulieren. Sowohl Sui1 als auch Asp1 können durch verschiedene Wirkweisen die Komposition des Sim4-Kinetochor-Komplexes verändern. Sui1 kann wahrscheinlichauf Ebene der Translations-Initiation die Menge von Proteinen dieses Komplexesregulieren. Asp1 kann durch die Generierung von Inositolpolyphosphaten die Assoziationvon Sim4-Komplex-Komponentenan den Kinetochor erhöhen ohne jedoch die Menge dieser Proteine zu beeinflussen. Neben der Komposition des Sim4-Komplexes reguliert Asp1 weitere mitotische Komponenten und moduliert die Dynamik der mitotischen Spindel und die Aktivität des Spindelkontrollpunktes. Basierend auf meinen Daten werden in unserem Labor bereits weitere Studien durchgeführt, welche das Verständnis dieser neuen Komponenten der Chromosomensegregation weiterentwickeln werden. Da im Gegensatz zum NMS-Kinetochor-Komplex die Interaktion des Sim4-Komplexes zu weiteren mitotischen Komponenten bisher nur in Teilenerforscht ist, wird meine Arbeit dazu beitragen das Verständnis dieses Teils des Kinetochors weiterzuentwickeln.

## 5 Anhang



Abb. 5-1Beispiele für Fehlsegregation und "lagging Chromosomes" in lebenden *asp1*<sup>D333A</sup>*mal2-1* Zellen A-C: Lokalisation von Sos7-GFP und SPB-mCherry in ausgewählten *mal2-1* Zellen (A) und *mal2-1 asp1*<sup>D33A</sup> Zellen (B-D). Gezeigt ist nur die Überlagerung der beiden Fluoreszenzsignale. Schemata über den Zeitreihen repräsentieren die gezeigten Phänotypen. Zeit zwischen den Abbildungen: 1 min. Kultivierung und Aufnahmebedingungen wie in Abb. 3-4B. (Aufnahmen erfolgten bei 25°C). Balken: 2 μm. **A**: Kontrolle: korrekte Segregation. **B**: Fehlsegregation. An dem mit dem Pfeil markierten SPB befindet sich nach der Chromosomensegregation ein stärkeres Sos7-GFP-Signal.**C**: "lagging Chromosomes". Der Pfeil markiert ein Sos7-GFP-Signal (Chromosom), welches verzögert zum Spindelpol segregiert.





Serieller Verdünnungstropftest ( $10^4$ - $10^1$  Zellen) der angegebenen Stämme transformiert mit der Vektorkontrolle und pREP3X-*sui1*<sup>+</sup>(*nmt1*<sup>+</sup> Promotor) welche bei den angegebenen Temperaturen auf Minimalmedium inkubiert wurden. Kultivierung erfolgte wie in Abb. 3-25. Inkubationsdauer: 5 - 6 Tage



**Abb. 5-3Suppression via sui1<sup>+</sup> ist nicht abhängig von der Heterochromatin-Bildung über den siRNA-Signalweg** Serieller Verdünnungstropftest ( $10^4$ - $10^1$  Zellen) der angegebenen Stämme transformiert mit der Vektorkontrolle und pREP3X-*sui1*<sup>+</sup> welche bei den angegebenen Temperaturen auf Minimalmedium inkubiert wurden. Kultivierung erfolgte wie in Abb. 3-25. Inkubationsdauer: 5 - 6 Tage



Abb. 5-4Überexpression von *sui1*<sup>+</sup> erhöht die immunpräzipitierte Menge von Mal2-GFP. Überexpression von *eif5*<sup>+</sup> reduziert diese.

jeweils oben: Der Westernblot zeigt das Ergebnis einer Immunpräzipitaion von Mal2-1-GFP. Nach der Proteinisolierung aus Mal2-1-GFP exprimierenden Zellen, transformiert mit der Vektorkontrolle, pREP3Xsui1<sup>+</sup>(nmt1<sup>+</sup> Promotor) und pREP3X-eif5<sup>+</sup> (nmt1<sup>+</sup> Promotor) wurde eine Immunpräzipitation mit magnetischen anti-GFP Kugeln durchgeführt. Die Transformanten wurden zuvor 24h bei 25°C in Minimalmedium -Thia kultiviert.  $\gamma$ -Tubulin: Ladekontrolle. Unten: Prozentuale Menge der relativen Bandenintensität von Mal2-1-GFP bezogen auf die Vektorkontrolle. Quantifizierung erfolgte mit ImageJ.

## 6 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1-1 Der Zellzyklus der Spalthefe Schizosaccharomyces pombe	17
Abb. 1-2 Schematische Darstellung der Mitose in <i>S. pombe</i> 1	18
Abb. 1-3 Schematische Darstellung des Zentromer-Chromatin Bereichs in S. pombe	22
Abb. 1-4 Die Aufrechterhaltung des Zentromer-Heterochromatins des otr-Abschnitts erfolgt in Abhängigke	eit
des siRNA-Signalweges	23
Abb. 1-5 Oktamer-Struktur eines CENP-A/Cnp1-Nukleosoms	24
Abb. 1-6 Schematische Darstellung der Zentromer-Chromatin - Kinetochor - Mikrotubuli-Verknüpfung üb	er
den Sim4-Komplex	26
Abb. 1-7: Schematische Darstellung der Zentromer-Chromatin - Kinetochor - Mikrotubuli-Verknüpfung in	s.
pombe	31
, Abb. 1-8 Spindelphasen in <i>S. pombe</i>	33
Abb. 1-9 Darstellungen der möglichen Kinetochor-Mikrotubuli-Verknüpfungen während der Metaphase ur	nd
daraus resultierende Segregation in Anaphase A	34
Abb. 1-10 Darstellung des Inositolpolyphosphatzyklus4	41
Abb. 2-1 Schematische Darstellung der C-terminalen GFP-Epitopmarkierung von ftg2-291	62
Abb. 3-1: Schematische Darstellung der Asp1 Varianten, die in <i>gsp1</i> Mutantenstämmen exprimiert werden f	68
Abb. 3-2: Die Asp1 Kinasedomäne wird negativ durch die "Phosphatasedomäne" reguliert	69
Abb. 3-3 Die TB7-Sensitivität des <i>mal</i> 3-1 Mutantenstammes wird durch Expression von $asn1^{1-364}$ sunnrimie	ərt
	70
Abb. 3-4: Asp1 generiertes IP- wird für den Spindelaufbau benötigt	72
Abb. 3–5: Asp1 generiertes IP, wird für eine stabile Snindelmitte benötigt	72
Abb. 3-6: gsn1 <sup>D333A</sup> exprimierende Zellen zeigen eine massive Erhöhung des aberranten Snindelnhänotw	ne
des nmt81::afn_ath2 <sup>+</sup> Stammes während asn1 <sup>H397A</sup> diesen sunnrimiert	рз 75
Abb. 2-7: gcn <sup>1D333A</sup> everimierende Zellen zeigen einen Kollans der Snindel in der Metanhase	75
Abb. 3-7: usp1 — Explainerende Zenen Zeigen einen Konaps der Spinder in der Metaphase	· ·
Abb. 3-6. Der Spinder-Konaps in dspi expinitierenden zenen erfolgt nicht beim Lintritt in die Anaphase	: A 70
Abb. 2. 9: gcg1 <sup>D333A</sup> SPR mCharny Zontromor1 GED Zollon arrotioron transient in der Metanhase	70 01
Abb. 3-10: Der Metanhassaarrest in gen 1 <sup>D333A</sup> Zollen kerreliert mit der Länge der Metanhassansnindel	07
Abb. 3-10. Der Metaphasearrest in usp1 Zenen Korrenert mit der Lange der Metaphasenspinder	о <u>г</u>
Abb. 3-11. <i>asp1</i> Zeigi genetische interaktion mit komponenten des Spinderkontrompunktes	04
Abb. 3-12. Der Metaphasearrest in uspr Zenen erfolgt in Abhangigkeit des Spinderkontrolipunktes	00
Abb. 3-13 Bub1-GFP dient als Fluoreszenzmarker für ungebundene Kinetochore	00
Abb. 3-14 Bubl-GFP Dynamik in <i>uspi</i> unu <i>uspi</i> Zenen	03
Abb. 3-15 Bub3 wird in <i>asp1</i> Zellen für die Korrektur falscher Kinetochor-Wikrotubuli-Verknupfunge	en 01
Abb. 2.16 Beigniel für Jagging ehremosomes" in Jehenden gen <sup>10333A</sup> huh2A Zellen	97
Abb. 3-16 Beispiel für "lagging chromosomes" in lebenden <i>asp1 σμα</i> 3Δ zeilen	92
Abb. 3-17: Beispiel für Polypiolale in lebenden <i>asp1 bub3</i> 2 Zellen	93
Abb. 3-18 Die Lokalisation der S. <i>pombe</i> Aurora Kinase Arki ist in <i>dspi</i> Zeilen wahrend d	er
Prometaphase reduziert	95
Abb. 3-19 Die Spindelphäsen von S. <i>pombe</i>	96
Abb. 3-20 Asp1 generiertes IP <sub>7</sub> beeinflusst die Elongationsgeschwindgikeit der Spindel in Phase I	97
Abb. 3-21 Menr Asp1 generiertes IP <sub>7</sub> verkurzt Phase II in SV40:: <i>gfp-atb2</i> Zellen	99
Abb. 3-22 Mehr Asp1 generiertes IP <sub>7</sub> fuhrt <i>per se</i> zu einer verkurzten Metaphase	01
Abb. 3-23 Mehr Asp1 generiertes IP <sub>7</sub> führt <i>per se</i> zu einer verkürzten Metaphase	02
Abb. 3-24 Asp1 generiertes IP <sub>7</sub> beeinflusst die Elongationsgeschwindgikeit der Spindel in Phase III	03
Abb. 3-25 Die Expression von <i>asp1</i> hat einen negativen Effekt auf einen Subkomplex des Sim	14-
Kinetochor-Komplexes	06
Abb. 3-26 Die Expression von <i>asp1</i> hat einen moderaten Effekt auf das Wachstum von NMS-Komple	3X-
Nutantenstammen	U7
Abb. 3-27: Kinetochor-Lokalisation von Mal2-1-GFP und Fta2-291-GFP ist durch extra Asp1 generiertes l	1P7
reduziert	U9
Abb. 3-28 Mehr Asp1 generiertes IP <sub>7</sub> reduziert die Kinetochor-Lokalisation von Mal2-GFP und Fta2-GFP 11	10
Abb. 3-29 Mehr Asp1 generiertes IP <sub>7</sub> hat keinen Einfluss auf die Proteinmenge von Mal2-GFP	11
Abb. 3-30 Die Abwesenheit von Asp1 generiertem IP <sub>7</sub> erhöht die Kinetochor-Lokalisation von Mal2-1-GFP ur	nd
Fta2-291-GFP	12
Abb. 3.34 Kineteebey Lebeliesties was Mel3 and Fte3 ist daysh was issued as a significant of the second starts of	12

Abb. 3-32 Kinetochor-Lokalisation von Mal2 und Fta2 erfolgt in Abhängigkeit der Asp1 generierten IP <sub>7</sub> -Menge 114
Abb. 3-33 Mehr Asp1 generiertes IP- führt im <i>mgl2-1gsp1</i> <sup>H379A</sup> Stamm zu aberranten kurzen Spindeln 115
Abb. 3-34 Mehr Asp1 generiertes IP- führt im <i>mal2-1asp1</i> <sup>H379A</sup> Stamm zu verstärkter Fehlsegregation
Abb. 3-35 Die Segregationsdefekte in lebenden <i>mal2-1 asn1</i> <sup>H379A</sup> Zellen
Abb. 3-36 Reduzierung von Asp1 generiertem IP- durch Expression von $asp1^{365-920}$ führt in den Stämmen
mal2-1 und fta2-291 zu Wachstum hei der nicht-nermissiven Temperatur
Abb. 3-37 Die Abwesenheit von Asp1 generiertem IP- im <i>mal2-1</i> Stamm führt zu Segregationsdefekten 121
Abb. 3-38 Die Frequenz von Spindelbrüchen ist im <i>asn1</i> <sup>D333A</sup> mal2-1 Stamm erhöht
Abb. 3-39 Abwesenheit von Asp1 generiertem $IP_{\pi}$ im $asp1^{D33A}ma/2-1$ Stamm führt zu massiveren
Spindeldefekten
Abb. 3-40 Der nicht-Wachstumsphänotyp des <i>mis15-68</i> Stammes wird durch extra IP <sub>2</sub> supprimiert
Abb. 3-41 <i>sui1</i> <sup>+</sup> ist ein dosisabhängiger Suppressor des <i>ftg2-291</i> Mutantenstammes
Abb. 3-42 Überexpression von <i>sui1</i> <sup>+</sup> supprimiert den Wachstumsdefekt aller Mutantenstämme des Sim4-
Komplexes
Abb. 3-43 <i>sui1</i> <sup>+</sup> ist ein Sim4-Komplex spezifischer Suppressor
Abb. 3-44 Die Suppression der Temperatursensitivität von Sim4-Komplex-Mutantenstämmen via <i>sui1</i> <sup>+</sup> erfolgt
unabhängig von der siRNA abhängigen Heterochromatin-Bildung
Abb. 3-45 Extra sui1+ verstärkt die Cnp1 abhängige transkriptionelle Stilllegung der inneren Chromatin-
Struktur und supprimiert die gezeigten temperatursensitiven Mutantenstämme
Abb. 3-46 Die Suppression von 4/6 Sim4-Komplex-Mutanantenstämme kann auch über extra <i>cnp1</i> <sup>+</sup> erfolgen.
Abb. 2-17 Die Überennression von swi1 <sup>+</sup> erhöht die zelluläre Proteinmense und Kinetochar-Lakalisation des
Mal2-1-GEP Proteins
Abb. 3-48 Überexpression von <i>eif5</i> <sup>+</sup> reduziert die immunpräzinitierte Menge des Mal2-1-GEP Proteins
Abb. 4-1 Asp1-GEP lokalisiert im Kern von <i>S. pombe</i> Zellen
Abb. 4-7 Direkte Wirkweise bei der Suppression von Sim4-Komplex Mutantenstämmen durch
Überexpression von <i>sui1</i> <sup>+</sup>
Abb. 4-3 Indirekte Wirkweise bei der Suppression von Sim4-Komplex Mutantenstämmen durch
Überexpression von <i>sui1</i> <sup>+</sup>
Abb. 5-1 Beispiele für Fehlsegregation und "lagging Chromosomes" in lebenden asp1 <sup>D333A</sup> mal2-1 Zellen 162
Abb. 5-2 Überexpression von <i>sui1<sup>+</sup></i> supprimiert weitere <i>mal2</i> und <i>fta2</i> Mutantenstämme sowie Sim4-
Komplex Doppelmutanten-Stämme
Abb. 5-3 Suppression via sui1 <sup>+</sup> ist nicht abhängig von der Heterochromatin-Bildung über den siRNA-
Signalweg
Abb. 5-4 Überexpression von <i>sui1</i> <sup>+</sup> erhöht die immunpräzipitierte Menge von Mal2-GFP. Überexpression von
<i>eif5</i> <sup>+</sup> reduziert diese

### 7 Literaturverzeichnis

- Adachi Y, Toda T, Niwa O, Yanagida M (1986). Differential expressions of essential and nonessential alpha-tubulin genes in Schizosaccharomyces pombe. *Mol Cell Biol.* **6**, 2168-2178.
- Adkins MW, Howar SR, Tyler JK (2004). Chromatin disassembly mediated by the histone chaperone Asf1 is essential for transcriptional activation of the yeast PHO5 and PHO8 genes. *Mol Cell*. **14**, 657-666.
- Adkins MW, Williams SK, Linger J, Tyler JK (2007). Chromatin disassembly from the PHO5 promoter is essential for the recruitment of the general transcription machinery and coactivators. *Mol Cell Biol.* **27**, 6372-6382.
- Akhmanova A , Steinmetz MO (2008). Tracking the ends: a dynamic protein network controls the fate of microtubule tips. *Nat Rev Mol Cell Biol*. **9**, 309-322.
- Akiyoshi B , Biggins S (2012). Reconstituting the kinetochore-microtubule interface: what, why, and how. *Chromosoma*. **121**, 235-250.
- Al-Bassam J, Kim H, Flor-Parra I, Lal N, Velji H, Chang F (2012). Fission yeast Alp14 is a dosedependent plus end-tracking microtubule polymerase. *Mol Biol Cell*. **23**, 2878-2890.
- Allshire RC , Karpen GH (2008). Epigenetic regulation of centromeric chromatin: old dogs, new tricks? *Nat Rev Genet.* **9**, 923-937.
- Alper BJ, Lowe BR , Partridge JF (2012). Centromeric heterochromatin assembly in fission yeastbalancing transcription, RNA interference and chromatin modification. *Chromosome Res.* **20**, 521-534.
- Amaro AC, Meraldi P (2009). COMA puts Ipl1-Sli15 at the right spot. Cell Cycle. 8, 2487-2488.
- Amaro AC, Samora CP, Holtackers R, Wang E, Kingston IJ, Alonso M, Lampson M, McAinsh AD , Meraldi P (2010). Molecular control of kinetochore-microtubule dynamics and chromosome oscillations. *Nat Cell Biol.* 12, 319-329.
- Arendt T (2012). Cell cycle activation and aneuploid neurons in Alzheimer's disease. *Mol Neurobiol*. **46**, 125-135.
- Asakawa K, Toya M, Sato M, Kanai M, Kume K, Goshima T, Garcia MA, Hirata D, Toda T (2005). Mal3, the fission yeast EB1 homologue, cooperates with Bub1 spindle checkpoint to prevent monopolar attachment. *EMBO Rep.* **6**, 1194-1200.
- Bahler J, Wu JQ, Longtine MS, Shah NG, McKenzie A, 3rd, Steever AB, Wach A, Philippsen P, Pringle JR (1998). Heterologous modules for efficient and versatile PCR-based gene targeting in Schizosaccharomyces pombe. Yeast. 14, 943-951.
- Barker CJ, Illies C, Gaboardi GC, Berggren PO (2009). Inositol pyrophosphates: structure, enzymology and function. *Cell Mol Life Sci.* **66**, 3851-3871.
- Beinhauer JD (1999). Mal3p, ein neues und evolutionär konserviertes Mikrotubuli-assoziiertes Protein aus der Spalthefe Schizosaccharomyces pombe. *Dissertation Universität Giessen*.
- Beinhauer JD, Hagan IM, Hegemann JH, Fleig U (1997). Mal3, the fission yeast homologue of the human APC-interacting protein EB-1 is required for microtubule integrity and the maintenance of cell form. *J Cell Biol.* **139**, 717-728.
- Bernard P, Hardwick K , Javerzat JP (1998). Fission yeast bub1 is a mitotic centromere protein essential for the spindle checkpoint and the preservation of correct ploidy through mitosis. J Cell Biol. 143, 1775-1787.
- Berry LD , Gould KL (1997). Fission yeast dim1(+) encodes a functionally conserved polypeptide essential for mitosis. *J Cell Biol*. **137**, 1337-1354.
- Bhandari R, Saiardi A, Ahmadibeni Y, Snowman AM, Resnick AC, Kristiansen TZ, Molina H, Pandey A, Werner JK, Jr., Juluri KR, Xu Y, Prestwich GD, Parang K, Snyder SH (2007). Protein pyrophosphorylation by inositol pyrophosphates is a posttranslational event. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **104**, 15305-15310.

- Bischoff JR, Anderson L, Zhu Y, Mossie K, Ng L, Souza B, Schryver B, Flanagan P, Clairvoyant F, Ginther C, Chan CS, Novotny M, Slamon DJ, Plowman GD (1998). A homologue of Drosophila aurora kinase is oncogenic and amplified in human colorectal cancers. *EMBO J.* **17**, 3052-3065.
- Biver S, Portetelle D , Vandenbol M (2011). Multicopy suppression screen in a Saccharomyces cerevisiae strain lacking the Rab GTPase-activating protein Msb3p. *Biotechnol Lett.* **33**, 123-129.
- Black BE, Brock MA, Bedard S, Woods VL, Jr., Cleveland DW (2007). An epigenetic mark generated by the incorporation of CENP-A into centromeric nucleosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **104**, 5008-5013.
- Black BE , Cleveland DW (2011). Epigenetic centromere propagation and the nature of CENP-a nucleosomes. *Cell*. **144**, 471-479.
- Blower MD , Karpen GH (2001). The role of Drosophila CID in kinetochore formation, cell-cycle progression and heterochromatin interactions. *Nat Cell Biol.* **3**, 730-739.
- Bratman SV , Chang F (2007). Stabilization of overlapping microtubules by fission yeast CLASP. *Dev Cell*. **13**, 812-827.
- Brouhard GJ, Stear JH, Noetzel TL, Al-Bassam J, Kinoshita K, Harrison SC, Howard J, Hyman AA (2008). XMAP215 is a processive microtubule polymerase. *Cell*. **132**, 79-88.
- Buscaino A, Allshire R, Pidoux A (2010). Building centromeres: home sweet home or a nomadic existence? *Curr Opin Genet Dev.* **20**, 118-126.
- Busch KE , Brunner D (2004). The microtubule plus end-tracking proteins mal3p and tip1p cooperate for cell-end targeting of interphase microtubules. *Curr Biol.* **14**, 548-559.
- Buttrick GJ , Millar JB (2011). Ringing the changes: emerging roles for DASH at the kinetochoremicrotubule Interface. *Chromosome Res.* **19**, 393-407.
- Cahill DP, Lengauer C, Yu J, Riggins GJ, Willson JK, Markowitz SD, Kinzler KW, Vogelstein B (1998). Mutations of mitotic checkpoint genes in human cancers. *Nature*. **392**, 300-303.
- Caldwell CM , Kaplan KB (2009). The role of APC in mitosis and in chromosome instability. *Adv Exp Med Biol.* **656**, 51-64.
- 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**, 794-805.
- Carmena M, Wheelock M, Funabiki H, Earnshaw WC (2012). The chromosomal passenger complex (CPC): from easy rider to the godfather of mitosis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **13**, 789-803.
- Carroll CW, Milks KJ , Straight AF (2010). Dual recognition of CENP-A nucleosomes is required for centromere assembly. *J Cell Biol*. **189**, 1143-1155.
- Carroll CW, Silva MC, Godek KM, Jansen LE, Straight AF (2009). Centromere assembly requires the direct recognition of CENP-A nucleosomes by CENP-N. *Nat Cell Biol.* **11**, 896-902.
- Cassimeris L, Tran P (2010). Microtubules: in vivo. Preface. Methods Cell Biol. 97, xvii-xviii.
- Castillo AG, Mellone BG, Partridge JF, Richardson W, Hamilton GL, Allshire RC, Pidoux AL (2007). Plasticity of fission yeast CENP-A chromatin driven by relative levels of histone H3 and H4. *PLoS Genet.* **3**, e121.
- Chakraborty A, Kim S , Snyder SH (2011). Inositol pyrophosphates as mammalian cell signals. *Sci Signal*. **4**, re1.
- Cheeseman IM, Anderson S, Jwa M, Green EM, Kang J, Yates JR, 3rd, Chan CS, Drubin DG, Barnes G (2002). Phospho-regulation of kinetochore-microtubule attachments by the Aurora kinase Ipl1p. *Cell.* **111**, 163-172.
- 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**, 175-187.
- Chen G, Bradford WD, Seidel CW , Li R (2012). Hsp90 stress potentiates rapid cellular adaptation through induction of aneuploidy. *Nature*. **482**, 246-250.
- Chen RH (2004). Phosphorylation and activation of Bub1 on unattached chromosomes facilitate the spindle checkpoint. *EMBO J.* **23**, 3113-3121.
- Choi JH, Williams J, Cho J, Falck JR, Shears SB (2007). Purification, sequencing, and molecular identification of a mammalian PP-InsP5 kinase that is activated when cells are exposed to hyperosmotic stress. *J Biol Chem.* **282**, 30763-30775.

- Choi SH, Peli-Gulli MP, McLeod I, Sarkeshik A, Yates JR, 3rd, Simanis V, McCollum D (2009). Phosphorylation state defines discrete roles for monopolin in chromosome attachment and spindle elongation. *Curr Biol.* **19**, 985-995.
- Ciaudo C, Bourdet A, Cohen-Tannoudji M, Dietz HC, Rougeulle C, Avner P (2006). Nuclear mRNA degradation pathway(s) are implicated in Xist regulation and X chromosome inactivation. *PLoS Genet.* **2**, e94.
- Cimini D, Howell B, Maddox P, Khodjakov A, Degrassi F, Salmon ED (2001). Merotelic kinetochore orientation is a major mechanism of aneuploidy in mitotic mammalian tissue cells. J Cell Biol. 153, 517-527.
- Courtheoux T, Gay G, Gachet Y, Tournier S (2009). Ase1/Prc1-dependent spindle elongation corrects merotely during anaphase in fission yeast. *J Cell Biol.* **187**, 399-412.
- Currie JD, Stewman S, Schimizzi G, Slep KC, Ma A, Rogers SL (2011). The microtubule lattice and plus-end association of Drosophila Mini spindles is spatially regulated to fine-tune microtubule dynamics. *Mol Biol Cell*. **22**, 4343-4361.
- Dalal Y, Wang H, Lindsay S, Henikoff S (2007). Tetrameric structure of centromeric nucleosomes in interphase Drosophila cells. *PLoS Biol.* **5**, e218.
- Daniel JA, Keyes BE, Ng YP, Freeman CO, Burke DJ (2006). Diverse functions of spindle assembly checkpoint genes in Saccharomyces cerevisiae. *Genetics*. **172**, 53-65.
- De Wulf P, Earnshaw WC, Clayton L, Tanaka TU (2009). Kinetochore-Microtubule Interactions. In *The Kinetochore:*): Springer New York, pp.1-24.
- De Wulf P, McAinsh AD , Sorger PK (2003). Hierarchical assembly of the budding yeast kinetochore from multiple subcomplexes. *Genes Dev.* **17**, 2902-2921.
- Diedhiou CJ, Popova OV, Dietz KJ, Golldack D (2008). The SUI-homologous translation initiation factor eIF-1 is involved in regulation of ion homeostasis in rice. *Plant Biol (Stuttg)*. **10**, 298-309.
- Ding R, McDonald KL, McIntosh JR (1993). Three-dimensional reconstruction and analysis of mitotic spindles from the yeast, Schizosaccharomyces pombe. *J Cell Biol.* **120**, 141-151.
- Ding R, West RR, Morphew 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**, 1461-1479.
- Ditchfield C, Johnson VL, Tighe A, Ellston R, Haworth C, Johnson T, Mortlock A, Keen N, Taylor SS (2003). Aurora B couples chromosome alignment with anaphase by targeting BubR1, Mad2, and Cenp-E to kinetochores. *J Cell Biol.* **161**, 267-280.
- Djupedal I, Kos-Braun IC, Mosher RA, Soderholm N, Simmer F, Hardcastle TJ, Fender A, Heidrich N, Kagansky A, Bayne E, Wagner EG, Baulcombe DC, Allshire RC, Ekwall K (2009). Analysis of small RNA in fission yeast; centromeric siRNAs are potentially generated through a structured RNA. *EMBO J.* **28**, 3832-3844.
- 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**, 2814-2827.
- 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**, 485-497.
- Efremov A, Grishchuk EL, McIntosh JR, Ataullakhanov FI (2007). In search of an optimal ring to couple microtubule depolymerization to processive chromosome motions. *Proc Natl Acad Sci* U S A. **104**, 19017-19022.
- Eitoku M, Sato L, Senda T, Horikoshi M (2008). Histone chaperones: 30 years from isolation to elucidation of the mechanisms of nucleosome assembly and disassembly. *Cell Mol Life Sci.* **65**, 414-444.
- Eskat A, Deng W, Hofmeister A, Rudolphi S, Emmerth S, Hellwig D, Ulbricht T, Doring V, Bancroft JM, McAinsh AD, Cardoso MC, Meraldi P, Hoischen C, Leonhardt H, Diekmann S (2012). Stepwise assembly, maturation and dynamic behavior of the human CENP-P/O/R/Q/U kinetochore sub-complex. *PLoS One*. **7**, e44717.

- Fernius J , Marston AL (2009). Establishment of cohesion at the pericentromere by the Ctf19 kinetochore subcomplex and the replication fork-associated factor, Csm3. *PLoS Genet.* **5**, e1000629.
- Fleig U, Sen-Gupta M , Hegemann JH (1996). Fission yeast mal2+ is required for chromosome segregation. *Mol Cell Biol.* **16**, 6169-6177.
- Flemming W (1882). Zellsubstanz, Kern und Zelltheilung. Verlag von F.C.W. Vogel, Leipzig, 191-400.
- Folco HD, Pidoux AL, Urano T , Allshire RC (2008). Heterochromatin and RNAi are required to establish CENP-A chromatin at centromeres. *Science*. **319**, 94-97.
- Foley EA , Kapoor TM (2012). Microtubule attachment and spindle assembly checkpoint signalling at the kinetochore. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **14**, 25-37.
- 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**, 458-469.
- Forsburg SL (2003). Growth and manipulation of S. pombe. *Curr Protoc Mol Biol*. **Chapter 13**, Unit 13 16.
- Forsburg SL , Nurse P (1991). Cell cycle regulation in the yeasts Saccharomyces cerevisiae and Schizosaccharomyces pombe. *Annu Rev Cell Biol.* **7**, 227-256.
- Forsburg SL, Rhind N (2006). Basic methods for fission yeast. Yeast. 23, 173-183.
- Fridy PC, Otto JC, Dollins DE , York JD (2007). Cloning and characterization of two human VIP1-like inositol hexakisphosphate and diphosphoinositol pentakisphosphate kinases. J Biol Chem. 282, 30754-30762.
- Fu C, Ward JJ, Loiodice 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**, 257-267.
- 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**, 961-976.
- Furuyama T , Henikoff S (2009). Centromeric nucleosomes induce positive DNA supercoils. *Cell*. **138**, 104-113.
- Ganem NJ, Godinho SA, Pellman D (2009). A mechanism linking extra centrosomes to chromosomal instability. *Nature*. **460**, 278-282.
- Gao Q, Courtheoux 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**, 13330-13335.
- Garcia MA, Koonrugsa N, Toda T (2002a). Spindle-kinetochore attachment requires the combined action of Kin I-like Klp5/6 and Alp14/Dis1-MAPs in fission yeast. *Embo J.* **21**, 6015-6024.
- Garcia MA, Koonrugsa N , Toda T (2002b). Two kinesin-like Kin I family proteins in fission yeast regulate the establishment of metaphase and the onset of anaphase A. *Curr Biol.* **12**, 610-621.
- 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**, 3389-3401.
- Gardner MK, Haase J, Mythreye K, Molk JN, Anderson M, Joglekar AP, O'Toole ET, Winey M, Salmon ED, Odde DJ, Bloom K (2008). The microtubule-based motor Kar3 and plus end-binding protein Bim1 provide structural support for the anaphase spindle. *J Cell Biol.* **180**, 91-100.
- Gestaut DR, Graczyk B, Cooper J, Widlund PO, Zelter A, Wordeman L, Asbury CL , Davis TN (2008). Phosphoregulation and depolymerization-driven movement of the Dam1 complex do not require ring formation. *Nat Cell Biol*. **10**, 407-414.
- 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**, e10634.
- Gonzalez M, He H, Sun S, Li C , Li F (2013). Cell cycle-dependent deposition of CENP-A requires the Dos1/2-Cdc20 complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **110**, 606-611.

- 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**, 25-39.
- Goshima G, Saitoh S, Yanagida M (1999). Proper metaphase spindle length is determined by centromere proteins Mis12 and Mis6 required for faithful chromosome segregation. *Genes and Development*. **13**, 1664-1677.
- Gould KL , Nurse P (1989). Tyrosine phosphorylation of the fission yeast cdc2+ protein kinase regulates entry into mitosis [see comments]. *Nature*. **342**, 39-45.
- 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**, 2421-2436.
- Gregan J, Polakova S, Zhang L, Tolic-Norrelykke IM , Cimini D (2011). Merotelic kinetochore attachment: causes and effects. *Trends Cell Biol.* **21**, 374-381.
- Gregan J, Riedel CG, Pidoux AL, Katou Y, Rumpf C, Schleiffer A, Kearsey SE, Shirahige K, Allshire RC, Nasmyth K (2007). The kinetochore proteins Pcs1 and Mde4 and heterochromatin are required to prevent merotelic orientation. *Curr Biol.* **17**, 1190-1200.
- Griffiths K, Masuda H, Dhut S, Toda T (2008). Fission yeast dam1-A8 mutant is resistant to and rescued by an anti-microtubule agent. *Biochem Biophys Res Commun.* **368**, 670-676.
- Grishin NV (1999). Phosphatidylinositol phosphate kinase: a link between protein kinase and glutathione synthase folds. *J Mol Biol.* **291**, 239-247.
- 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**, 963-972.
- Guse A, Carroll CW, Moree B, Fuller CJ, Straight AF (2011). In vitro centromere and kinetochore assembly on defined chromatin templates. *Nature*. **477**, 354-358.
- Hagan I, Yanagida M (1995). The product of the spindle formation gene sad1+ associates with the fission yeast spindle pole body and is essential for viability. *J Cell Biol.* **129**, 1033-1047.
- Hagan IM (1998). The fission yeast microtubule cytoskeleton. J Cell Sci. 111, 1603-1612.
- 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**, 343-357.
- Hauf S, Biswas A, Langegger M, Kawashima SA, Tsukahara T, Watanabe Y (2007). Aurora controls sister kinetochore mono-orientation and homolog bi-orientation in meiosis-I. *EMBO J.* **26**, 4475-4486.
- Hayashi A, Asakawa H, Haraguchi T , Hiraoka Y (2006). Reconstruction of the kinetochore during meiosis in fission yeast Schizosaccharomyces pombe. *Mol Biol Cell*. **17**, 5173-5184.
- Hayashi I , Ikura M (2003). Crystal structure of the amino-terminal microtubule-binding domain of end-binding protein 1 (EB1). *J Biol Chem*. **278**, 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**, 715-729.
- 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**, 1635-1647.
- Heinrich S, Windecker H, Hustedt N, Hauf S (2012). Mph1 kinetochore localization is crucial and upstream in the hierarchy of spindle assembly checkpoint protein recruitment to kinetochores. *J Cell Sci.* **125**, 4720-4727.
- Heinz D (2013). Translation-Initiations Regulation des S. pombe Sim4-Kinetochor-Komplexesed^eds).
- Hinnebusch AG (2011). Molecular mechanism of scanning and start codon selection in eukaryotes. *Microbiol Mol Biol Rev.* **75**, 434-467, first page of table of contents.
- Hirokawa N (1998). Kinesin and dynein superfamily proteins and the mechanism of organelle transport. *Science*. **279**, 519-526.
- Hoffman CS, Winston F (1987). A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of Escherichia coli. *Gene*. **57**, 267-272.

- Hori T, Amano M, Suzuki A, Backer CB, Welburn JP, Dong Y, McEwen BF, Shang WH, Suzuki E, Okawa K, Cheeseman IM , Fukagawa T (2008a). CCAN makes multiple contacts with centromeric DNA to provide distinct pathways to the outer kinetochore. *Cell*. **135**, 1039-1052.
- Hori T, Okada M, Maenaka K, Fukagawa T (2008b). CENP-O class proteins form a stable complex and are required for proper kinetochore function. *Mol Biol Cell*. **19**, 843-854.
- Howell BJ, Moree B, Farrar EM, Stewart S, Fang G, Salmon ED (2004). Spindle checkpoint protein dynamics at kinetochores in living cells. *Curr Biol*. **14**, 953-964.
- Howman EV, Fowler KJ, Newson AJ, Redward S, MacDonald AC, Kalitsis P, Choo KH (2000). Early disruption of centromeric chromatin organization in centromere protein A (Cenpa) null mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **97**, 1148-1153.
- Hsu KS, Toda T (2011). Ndc80 Internal Loop Interacts with Dis1/TOG to Ensure Proper Kinetochore-Spindle Attachment in Fission Yeast. *Curr Biol*.
- Hua S, Wang Z, Jiang K, Huang Y, Ward T, Zhao L, Dou Z, Yao X (2011). CENP-U cooperates with Hec1 to orchestrate kinetochore-microtubule attachment. *J Biol Chem*. **286**, 1627-1638.
- Huang D, Friesen H, Andrews B (2007). Pho85, a multifunctional cyclin-dependent protein kinase in budding yeast. *Mol Microbiol.* **66**, 303-314.
- Iimori M, Ozaki K, Chikashige Y, Habu T, Hiraoka Y, Maki T, Hayashi I, Obuse C, Matsumoto T (2012). A mutation of the fission yeast EB1 overcomes negative regulation by phosphorylation and stabilizes microtubules. *Exp Cell Res.* **318**, 262-275.
- Ish Horowicz D, Burke JF (1981). Rapid and efficient cosmid cloning. Nucleic Acids Res. 9, 2989-2998.
- 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**, 1088-1091.
- Ito D, Saito Y, Matsumoto T (2012). Centromere-tethered Mps1 pombe homolog (Mph1) kinase is a sufficient marker for recruitment of the spindle checkpoint protein Bub1, but not Mad1. Proc Natl Acad Sci U S A. 109, 209-214.
- Ivanov IP, Loughran G, Sachs MS, Atkins JF (2010). Initiation context modulates autoregulation of eukaryotic translation initiation factor 1 (eIF1). *Proc Natl Acad Sci U S A*. **107**, 18056-18060.
- Jakopec V (2011). Charakterisierung des neuen äußeren Kinetochorsubkomplexes Spc7-Sos7 in der Spalthefe Schizosaccharomyces pombe ed^eds).
- Jakopec V, Topolski B , Fleig U (2012). Sos7, an essential component of the conserved S. pombe Ndc80-MIND-Spc7 complex, identifies a new family of fungal kinetochore proteins. *Mol Cell Biol.*
- Jansen LE, Black BE, Foltz DR, Cleveland DW (2007). Propagation of centromeric chromatin requires exit from mitosis. *J Cell Biol.* **176**, 795-805.
- Jeyaprakash AA, Santamaria A, Jayachandran U, Chan YW, Benda C, Nigg EA, Conti E (2012). Structural and functional organization of the Ska complex, a key component of the kinetochore-microtubule interface. *Mol Cell*. **46**, 274-286.
- Jin H, Kim HR, Plaha P, Liu SK, Park JY, Piao YZ, Yang ZH, Jiang GB, Kwak SS, An G, Son M, Jin YH, Sohn JH, Lima YP (2008). Expression profiling of the genes induced by Na(2)CO(3) and NaCl stresses in leaves and roots of Leymus chinensis. *Plant Science*. **175**, 784-792.
- 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**, 7168-7183.
- Joglekar AP, Bouck D, Finley K, Liu X, Wan Y, Berman J, He X, Salmon ED, Bloom KS (2008). Molecular architecture of the kinetochore-microtubule attachment site is conserved between point and regional centromeres. *J Cell Biol.* **181**, 587-594.
- Johnson FB, Sinclair DA, Guarente L (1999). Molecular biology of aging. Cell. 96, 291-302.
- Jones RH, Moreno S, Nurse P, Jones NC (1988). Expression of the SV40 promoter in fission yeast: identification and characterization of an AP-1-like factor. *Cell.* **53**, 659-667.
- 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**, 1716-1719.
- Kamakaka RT, Biggins S (2005). Histone variants: deviants? Genes Dev. 19, 295-310.

- Kawashima SA, Tsukahara T, Langegger M, Hauf S, Kitajima TS, Watanabe Y (2007). Shugoshin enables tension-generating attachment of kinetochores by loading Aurora to centromeres. *Genes Dev.* **21**, 420-435.
- Kawashima SA, Yamagishi Y, Honda T, Ishiguro K, Watanabe Y (2010). Phosphorylation of H2A by Bub1 prevents chromosomal instability through localizing shugoshin. *Science*. **327**, 172-177.
- 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**, 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**, 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**, 5255-5267.
- Kerssemakers JW, Munteanu EL, Laan L, Noetzel TL, Janson ME, Dogterom M (2006). Assembly dynamics of microtubules at molecular resolution. *Nature*. **442**, 709-712.
- 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, e1000400.
- Khmelinskii A, Lawrence C, Roostalu J , Schiebel E (2007). Cdc14-regulated midzone assembly controls anaphase B. J Cell Biol. **177**, 981-993.
- Khodjakov A, La Terra S, Chang F (2004). Laser microsurgery in fission yeast; role of the mitotic spindle midzone in anaphase B. *Curr Biol.* **14**, 1330-1340.
- Kim HJ, Seol JH, Han JW, Youn HD , Cho EJ (2007). Histone chaperones regulate histone exchange during transcription. *EMBO J.* **26**, 4467-4474.
- Knockleby J, Vogel J (2009). The COMA complex is required for Sli15/INCENP-mediated correction of defective kinetochore attachments. *Cell Cycle*. **8**, 2570-2577.
- 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**, 311-328.
- Koch A, Krug K, Pengelley S, Macek B, Hauf S (2011). Mitotic substrates of the kinase aurora with roles in chromatin regulation identified through quantitative phosphoproteomics of fission yeast. *Sci Signal.* **4**, rs6.
- Komarova Y, De Groot CO, Grigoriev I, Gouveia SM, Munteanu EL, Schober JM, Honnappa S, Buey RM, Hoogenraad CC, Dogterom M, Borisy GG, Steinmetz MO, Akhmanova A (2009). Mammalian end binding proteins control persistent microtubule growth. *J Cell Biol.* 184, 691-706.
- Kops GJ, Shah JV (2012). Connecting up and clearing out: how kinetochore attachment silences the spindle assembly checkpoint. *Chromosoma*. **121**, 509-525.
- Kozak M (1984). Point mutations close to the AUG initiator codon affect the efficiency of translation of rat preproinsulin in vivo. *Nature*. **308**, 241-246.
- Langen M (2011). Der Zusammenhang zwischen Aneuploidie und Alterung im Modellsystem Hefeed^eds).
- Lansbergen G , Akhmanova A (2006). Microtubule plus end: a hub of cellular activities. *Traffic*. **7**, 499-507.
- Latha RS, GH. Bennett, J. Swaminathan, MS. (2004). Molecular analysis of a stress-induced cDNA encoding the translation initiation factor, eIF1, from the salt-tolerant wild relative of rice, Porteresia coarctata. *Functional Plant Biology*. **31**, 1035–1042.
- Lee YS, Huang K, Quiocho FA, O'Shea EK (2008). Molecular basis of cyclin-CDK-CKI regulation by reversible binding of an inositol pyrophosphate. *Nat Chem Biol.* **4**, 25-32.
- Lee YS, Mulugu S, York JD , O'Shea EK (2007). Regulation of a cyclin-CDK-CDK inhibitor complex by inositol pyrophosphates. *Science*. **316**, 109-112.
- Liu X, McLeod I, Anderson S, Yates JR, 3rd , He X (2005). Molecular analysis of kinetochore architecture in fission yeast. *Embo J.* **24**, 2919-2930.

- Loiodice 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**, 1756-1768.
- Longtine MS, McKenzie A, 3rd, Demarini DJ, Shah NG, Wach A, Brachat A, Philippsen P, Pringle JR (1998). Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in Saccharomyces cerevisiae. *Yeast.* **14**, 953-961.
- Loughran G, Sachs MS, Atkins JF, Ivanov IP (2012). Stringency of start codon selection modulates autoregulation of translation initiation factor eIF5. *Nucleic Acids Res.* **40**, 2898-2906.
- Maddox PS, Oegema K, Desai A , Cheeseman IM (2004). "Holo"er than thou: chromosome segregation and kinetochore function in C. elegans. *Chromosome Res.* **12**, 641-653.
- Maggert KA , Karpen GH (2001). The activation of a neocentromere in Drosophila requires proximity to an endogenous centromere. *Genetics*. **158**, 1615-1628.
- Mallavarapu A, Sawin K, Mitchison T (1999). A switch in microtubule dynamics at the onset of anaphase B in the mitotic spindle of Schizosaccharomyces pombe. *Curr Biol.* **9**, 1423-1426.
- Malvezzi F, Litos G, Schleiffer A, Heuck A, Mechtler K, Clausen T, Westermann S (2013). A structural basis for kinetochore recruitment of the Ndc80 complex via two distinct centromere receptors. *EMBO J*.
- Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J (1989). "Molecular cloning. A laboratory manual.". Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Habor Laboratory Press.
- Maresca TJ , Salmon ED (2010). Welcome to a new kind of tension: translating kinetochore mechanics into a wait-anaphase signal. *J Cell Sci.* **123**, 825-835.
- 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**, 261-282.
- Masuda H, Hirano T, Yanagida M, Cande WZ (1990). In vitro reactivation of spindle elongation in fission yeast nuc2 mutant cells. *J Cell Biol*. **110**, 417-425.
- Masuda H, McDonald KL , Cande WZ (1988). The mechanism of anaphase spindle elongation: uncoupling of tubulin incorporation and microtubule sliding during in vitro spindle reactivation. *J Cell Biol.* **107**, 623-633.
- 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**, 4033-4049.
- 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**, 5033-5047.
- Meadows JC , Millar J (2008). Latrunculin A delays anaphase onset in fission yeast by disrupting an Ase1-independent pathway controlling mitotic spindle stability. *Mol Biol Cell*. **19**, 3713-3723.
- Measday V, Hailey DW, Pot I, Givan SA, Hyland KM, Cagney G, Fields S, Davis TN, Hieter P (2002). Ctf3p, the Mis6 budding yeast homolog, interacts with Mcm22p and Mcm16p at the yeast outer kinetochore. *Genes Dev.* **16**, 101-113.
- Mehta GD, Agarwal MP, Ghosh SK (2010). Centromere identity: a challenge to be faced. *Mol Genet Genomics*. **284**, 75-94.
- Miki H, Okada Y, Hirokawa N (2005). Analysis of the kinesin superfamily: insights into structure and function. *Trends Cell Biol.* **15**, 467-476.
- 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**, 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**, 138-143.
- 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**, 27345-27349.
- Mitchison TJ, Salmon ED (2001). Mitosis: a history of division. Nat Cell Biol. 3, E17-21.
- Mizuguchi G, Xiao H, Wisniewski J, Smith MM, Wu C (2007). Nonhistone Scm3 and histones CenH3-H4 assemble the core of centromere-specific nucleosomes. *Cell*. **129**, 1153-1164.

- Moreno MB, Duran A, Ribas JC (2000). A family of multifunctional thiamine-repressible expression vectors for fission yeast. *Yeast.* **16**, 861-872.
- Moreno S, Klar A, Nurse P (1991). Molecular genetic analysis of fission yeast Schizosaccharomyces pombe. *Methods Enzymol.* **194**, 795-823.

Sunderland, MA: Published by New Science Press in association with Oxford University Press ;

Distributed inside North America by Sinauer Associates, Publishers.

- Morrow CJ, Tighe A, Johnson VL, Scott MI, Ditchfield C, Taylor SS (2005). Bub1 and aurora B cooperate to maintain BubR1-mediated inhibition of APC/CCdc20. *J Cell Sci.* **118**, 3639-3652.
- Mousson F, Ochsenbein F, Mann C (2007). The histone chaperone Asf1 at the crossroads of chromatin and DNA checkpoint pathways. *Chromosoma*. **116**, 79-93.
- Mulugu S, Bai W, Fridy PC, Bastidas RJ, Otto JC, Dollins DE, Haystead TA, Ribeiro AA, York JD (2007). A conserved family of enzymes that phosphorylate inositol hexakisphosphate. *Science*. **316**, 106-109.
- Musacchio A , Hardwick KG (2002). The spindle checkpoint: structural insights into dynamic signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **3**, 731-741.
- Musacchio A, Salmon ED (2007). The spindle-assembly checkpoint in space and time. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **8**, 379-393.
- 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**, 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**, 322-334.
- Nakamura S, Grigoriev I, Nogi T, Hamaji T, Cassimeris L, Mimori-Kiyosue Y (2012). Dissecting the nanoscale distributions and functions of microtubule-end-binding proteins EB1 and ch-TOG in interphase HeLa cells. *PLoS One*. **7**, e51442.
- Nakazawa N, Nakamura T, Kokubu A, Ebe M, Nagao K, Yanagida M (2008). Dissection of the essential steps for condensin accumulation at kinetochores and rDNAs during fission yeast mitosis. *J Cell Biol.* **180**, 1115-1131.
- Nanda JS, Cheung YN, Takacs JE, Martin-Marcos P, Saini AK, Hinnebusch AG, Lorsch JR (2009). eIF1 controls multiple steps in start codon recognition during eukaryotic translation initiation. *J Mol Biol*. **394**, 268-285.
- Nanda JS, Saini AK, Munoz AM, Hinnebusch AG, Lorsch JR (2013). Coordinated movements of eukaryotic translation initiation factors eIF1, eIF1A, and eIF5 trigger phosphate release from eIF2 in response to start codon recognition by the ribosomal preinitiation complex. *J Biol Chem.* **288**, 5316-5329.
- Nasuda S, Hudakova S, Schubert I, Houben A, Endo TR (2005). Stable barley chromosomes without centromeric repeats. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **102**, 9842-9847.
- Nezi L , Musacchio A (2009). Sister chromatid tension and the spindle assembly checkpoint. *Curr* Opin Cell Biol. **21**, 785-795.
- Ng TM, Waples WG, Lavoie BD, Biggins S (2009). Pericentromeric sister chromatid cohesion promotes kinetochore biorientation. *Mol Biol Cell*. **20**, 3818-3827.
- Nishino T, Rago F, Hori T, Tomii K, Cheeseman IM, Fukagawa T (2013). CENP-T provides a structural platform for outer kinetochore assembly. *EMBO J.* **32**, 424-436.
- Nishino T, Takeuchi K, Gascoigne KE, Suzuki A, Hori T, Oyama T, Morikawa K, Cheeseman IM , Fukagawa T (2012). CENP-T-W-S-X forms a unique centromeric chromatin structure with a histone-like fold. *Cell*. **148**, 487-501.

Morgan DO (2007). The cell cycle : principles of control. London

- 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**, 185-200.
- Nurse P (1990). Universal control mechanism regulating onset of M-phase. Nature. 344, 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**, 1135-1141.
- Oegema K, Desai A, Rybina S, Kirkham M, Hyman AA (2001). Functional analysis of kinetochore assembly in Caenorhabditis elegans. *J Cell Biol.* **153**, 1209-1226.
- 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*.
- 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 transcomplementation of Schizosaccharomyces pombe. *Nucleic Acids Res.* **18**, 6485-6489.
- Ortiz J, Stemmann O, Rank S, Lechner J (1999). A putative protein complex consisting of Ctf19, Mcm21, and Okp1 represents a missing link in the budding yeast kinetochore. *Genes and Development*. **13**, 1140-1155.
- Osada S, Kageyama K, Ohnishi Y, Nishikawa J, Nishihara T, Imagawa M (2012). Inositol phosphate kinase Vip1p interacts with histone chaperone Asf1p in Saccharomyces cerevisiae. *Mol Biol Rep.* **39**, 4989-4996.
- Papamichos-Chronakis M , Peterson CL (2013). Chromatin and the genome integrity network. *Nat Rev Genet.* **14**, 62-75.
- Pearson CG, Yeh E, Gardner M, Odde D, Salmon ED, Bloom K (2004). Stable kinetochore-microtubule attachment constrains centromere positioning in metaphase. *Curr Biol.* **14**, 1962-1967.
- Peters JM (2006). The anaphase promoting complex/cyclosome: a machine designed to destroy. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **7**, 644-656.
- 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**, 4371-4384.
- Petersen MB, Mikkelsen M (2000). Nondisjunction in trisomy 21: origin and mechanisms. *Cytogenet Cell Genet.* **91**, 199-203.
- Pidoux AL , Allshire RC (2000). Centromeres: getting a grip of chromosomes. *Curr Opin Cell Biol.* **12**, 308-319.
- Pidoux AL , Allshire RC (2004). Kinetochore and heterochromatin domains of the fission yeast centromere. *Chromosome Res.* **12**, 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**, 299-311.
- 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**, 295-307.
- Pinsky BA , Biggins S (2005). The spindle checkpoint: tension versus attachment. *Trends Cell Biol.* **15**, 486-493.
- Pluta AF, Mackay AM, Ainsztein AM, Goldberg IG, Earnshaw WC (1995). The centromere: hub of chromosomal activities. *Science*. **270**, 1591-1594.
- Poddar A, Roy N, Sinha P (1999). MCM21 and MCM22, two novel genes of the yeast Saccharomyces cerevisiae are required for chromosome transmission. *Mol Microbiol.* **31**, 349-360.
- Pöhlmann J (2010). Die Funktion der 1/3 Inositolpolyphosphatkinase Asp1 beim polaren und invasiven Wachstum der Spalthefe Schizosaccharomyces pombeed^eds). Dissertation Universität Düsseldorf.
- Pohlmann J , Fleig U (2010). Asp1, a conserved 1/3 inositol polyphosphate kinase, regulates the dimorphic switch in Schizosaccharomyces pombe. *Mol Cell Biol*. **30**, 4535-4547.

- Przewloka 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**, 399-405.
- Rajagopalan S, Bimbo A, Balasubramanian MK , Oliferenko S (2004). A potential tension-sensing mechanism that ensures timely anaphase onset upon metaphase spindle orientation. *Curr Biol.* 14, 69-74.
- Ramrath P (2012). Regulation der 1/3 Inositolpolyphosphat Kinase Asp1 in der Spalthefe *Schizosaccharomyces pombe*ed^eds). Masterarbeit Universität Düsseldorf.
- Ranke MB, Saenger P (2001). Turner's syndrome. Lancet. 358, 309-314.
- Reyes-Turcu FE, Grewal SI (2012). Different means, same end-heterochromatin formation by RNAi and RNAi-independent RNA processing factors in fission yeast. *Curr Opin Genet Dev.* 22, 156-163.
- Ribeiro SA, Vagnarelli P, Dong Y, Hori T, McEwen BF, Fukagawa T, Flors C, Earnshaw WC (2010). A super-resolution map of the vertebrate kinetochore. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **107**, 10484-10489.
- Rogers GC, Rogers SL, Sharp DJ (2005). Spindle microtubules in flux. J Cell Sci. 118, 1105-1116.
- Ryan CJ, Roguev A, Patrick K, Xu J, Jahari H, Tong Z, Beltrao P, Shales M, Qu H, Collins SR, Kliegman JI, Jiang L, Kuo D, Tosti E, Kim HS, Edelmann W, Keogh MC, Greene D, Tang C, Cunningham P, Shokat KM, Cagney G, Svensson JP, Guthrie C, Espenshade PJ, Ideker T, Krogan NJ (2012). Hierarchical modularity and the evolution of genetic interactomes across species. *Mol Cell*. **46**, 691-704.
- Sabatinos SA , Forsburg SL (2010). Molecular genetics of Schizosaccharomyces pombe. *Methods Enzymol.* **470**, 759-795.
- Sagolla MJ, Uzawa S, Cande WZ (2003). Individual microtubule dynamics contribute to the function of mitotic and cytoplasmic arrays in fission yeast. *J Cell Sci.* **116**, 4891-4903.
- 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**, 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**, 131-143.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989). *Molecular cloning A laboratory manual*. Cold Spring Habor: Cold Spring Habor Laboratory Press.
- 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, 2931-2943.
- Santaguida S, Vernieri C, Villa F, Ciliberto A , Musacchio A (2011). Evidence that Aurora B is implicated in spindle checkpoint signalling independently of error correction. *EMBO J.* **30**, 1508-1519.
- Schleiffer A, Maier M, Litos G, Lampert F, Hornung P, Mechtler K, Westermann S (2012). CENP-T proteins are conserved centromere receptors of the Ndc80 complex. *Nat Cell Biol*. **14**, 604-613.
- Schueler MG , Sullivan BA (2006). Structural and functional dynamics of human centromeric chromatin. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. **7**, 301-313.
- 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**, 391-398.
- Sczaniecka MM , Hardwick KG (2008). The spindle checkpoint: how do cells delay anaphase onset? SEB Exp Biol Ser. 59, 243-256.
- Sekulic N, Bassett EA, Rogers DJ, Black BE (2010). The structure of (CENP-A-H4)(2) reveals physical features that mark centromeres. *Nature*. **467**, 347-351.
- Shang C, Hazbun TR, Cheeseman IM, Aranda J, Fields S, Drubin DG, Barnes G (2003). Kinetochore protein interactions and their regulation by the Aurora kinase Ipl1p. *Mol Biol Cell*. **14**, 3342-3355.

- Sharp DJ , Rogers GC (2004). A Kin I-dependent Pacman-flux mechanism for anaphase A. Cell Cycle. **3**, 707-710.
- Shears SB (2004). How versatile are inositol phosphate kinases? Biochem J. 377, 265-280.
- Shears SB (2009). Diphosphoinositol polyphosphates: metabolic messengers? *Mol Pharmacol.* **76**, 236-252.
- Shears SB, Gokhale NA, Wang H, Zaremba A (2011). Diphosphoinositol polyphosphates: what are the mechanisms? *Adv Enzyme Regul.* **51**, 13-25.
- 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 stressinducible cDNA that encodes translation initiation factor 1(eIF1(A121/SUI1)). J Biol Chem. 274, 16487-16493.
- Shelby RD, Vafa O , Sullivan KF (1997). Assembly of CENP-A into centromeric chromatin requires a cooperative array of nucleosomal DNA contact sites. *J Cell Biol*. **136**, 501-513.
- Shepperd LA, Meadows JC, Sochaj AM, Lancaster TC, Zou J, Buttrick GJ, Rappsilber J, Hardwick KG, Millar JB (2012). Phosphodependent recruitment of Bub1 and Bub3 to Spc7/KNL1 by Mph1 kinase maintains the spindle checkpoint. *Curr Biol.* 22, 891-899.
- Shirasu-Hiza M, Coughlin P, Mitchison T (2003). Identification of XMAP215 as a microtubuledestabilizing factor in Xenopus egg extract by biochemical purification. *J Cell Biol.* **161**, 349-358.
- Shivaraju M, Unruh JR, Slaughter BD, Mattingly M, Berman J, Gerton JL (2012). Cell-cycle-coupled structural oscillation of centromeric nucleosomes in yeast. *Cell*. **150**, 304-316.
- Siegel JJ, Amon A (2012). New insights into the troubles of aneuploidy. *Annu Rev Cell Dev Biol.* **28**, 189-214.
- Skoufias DA, Andreassen PR, Lacroix FB, Wilson L, Margolis RL (2001). Mammalian mad2 and bub1/bubR1 recognize distinct spindle-attachment and kinetochore-tension checkpoints. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **98**, 4492-4497.
- Snaith HA, Anders A, Samejima I, Sawin KE (2010). New and old reagents for fluorescent protein tagging of microtubules in fission yeast; experimental and critical evaluation. *Methods Cell Biol.* **97**, 147-172.
- Stellfox ME, Bailey AO, Foltz DR (2013). Putting CENP-A in its place. Cell Mol Life Sci. 70, 387-406.
- Stoler S, Keith KC, Curnick KE, Fitzgerald Hayes M (1995). A mutation in CSE4, an essential gene encoding a novel chromatin-associated protein in yeast, causes chromosome nondisjunction and cell cycle arrest at mitosis. *Genes Dev.* **9**, 573-586.
- Streiblova E , Wolf A (1972). Cell wall growth during the cell cycle of Schizosaccharomyces pombe. *Z Allg Mikrobiol*. **12**, 673-684.
- Su LK, Burrell M, Hill DE, Gyuris J, Brent R, Wiltshire R, Trent J, Vogelstein B, Kinzler KW (1995). APC binds to the novel protein EB1. *Cancer Res.* **55**, 2972-2977.
- Sun L, Gao J, Dong X, Liu M, Li D, Shi X, Dong JT, Lu X, Liu C, Zhou J (2008). EB1 promotes Aurora-B kinase activity through blocking its inactivation by protein phosphatase 2A. *Proc Natl Acad Sci* U S A. **105**, 7153-7158.
- Sun YL , Hong SK (2012). Sensitivity of Translation Initiation Factor eIF1 as a Molecular Target of Salt Toxicity to Sodic-Alkaline Stress in the Halophytic Grass Leymus chinensis. *Biochem Genet*.
- Takahashi K, Chen ES , Yanagida M (2000a). Requirement of Mis6 centromere connector for localizing a CENP-A-like protein in fission yeast. *Science*. **288**, 2215-2219.
- Takahashi K, Chen ES , Yanagida M (2000b). Requirement of Mis6 centromere connector for localizing a CENP-A -loke protein in fisssion yeast. *Science*. **288**, 2215-2219.
- Takahashi K, Takayama Y, Masuda F, Kobayashi Y , Saitoh S (2005). Two distinct pathways responsible for the loading of CENP-A to centromeres in the fission yeast cell cycle. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* **360**, 595-606; discussion 606-597.
- Takayama Y, Sato H, Saitoh S, Ogiyama Y, Masuda F, Takahashi K (2008). Biphasic incorporation of centromeric histone CENP-A in fission yeast. *Mol Biol Cell*. **19**, 682-690.
- Tanae K, Horiuchi T, Yamakawa T, Matsuo Y, Kawamukai M (2012). Sim3 shares some common roles with the histone chaperone Asf1 in fission yeast. *FEBS Lett.* **586**, 4190-4196.

- 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**, 334-343.
- Tanaka TU, Stark MJ, Tanaka K (2005). Kinetochore capture and bi-orientation on the mitotic spindle. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **6**, 929-942.
- Taylor SS, Hussein D, Wang Y, Elderkin S , Morrow CJ (2001). Kinetochore localisation and phosphorylation of the mitotic checkpoint components Bub1 and BubR1 are differentially regulated by spindle events in human cells. *J Cell Sci.* **114**, 4385-4395.
- Tirnauer JS , Bierer BE (2000). EB1 Proteins Regulate Microtubule Dynamics, Cell Polarity, and Chromosome Stability. *J Cell Biol*. **149**, 761-766.
- Toda T, Adachi Y, Hiraoka Y, Yanagida M (1984). Identification of the pleiotropic cell division cycle gene NDA2 as one of two different alpha-tubulin genes in Schizosaccharomyces pombe. *Cell*. 37, 233-242.
- Tomonaga T, Matsushita K, Ishibashi M, Nezu M, Shimada H, Ochiai T, Yoda K, Nomura F (2005). Centromere protein H is up-regulated in primary human colorectal cancer and its overexpression induces aneuploidy. *Cancer Res.* **65**, 4683-4689.
- Tomonaga T, Matsushita K, Yamaguchi S, Oohashi T, Shimada H, Ochiai T, Yoda K, Nomura F (2003). Overexpression and mistargeting of centromere protein-A in human primary colorectal cancer. *Cancer Res.* **63**, 3511-3516.
- Topolski B (2008). Isolierung und Charakterisierung neuer Mutanten des Kinetochorproteins Mal2ed^eds).
- Tran PT, Paoletti A , Chang F (2004). Imaging green fluorescent protein fusions in living fission yeast cells. *Methods*. **33**, 220-225.
- Tsukahara T, Tanno Y , Watanabe Y (2010). Phosphorylation of the CPC by Cdk1 promotes chromosome bi-orientation. *Nature*. **467**, 719-723.
- Tyler JK, Adams CR, Chen SR, Kobayashi R, Kamakaka RT, Kadonaga JT (1999). The RCAF complex mediates chromatin assembly during DNA replication and repair. *Nature*. **402**, 555-560.
- Unsworth A, Masuda H, Dhut S , Toda T (2008). Fission yeast kinesin-8 Klp5 and Klp6 are interdependent for mitotic nuclear retention and required for proper microtubule dynamics. *Mol Biol Cell*. **19**, 5104-5115.
- van Breugel M, Drechsel D, Hyman A (2003). Stu2p, the budding yeast member of the conserved Dis1/XMAP215 family of microtubule-associated proteins is a plus end-binding microtubule destabilizer. *J Cell Biol.* **161**, 359-369.
- van der Waal MS, Hengeveld RC, van der Horst A, Lens SM (2012). Cell division control by the Chromosomal Passenger Complex. *Exp Cell Res.* **318**, 1407-1420.
- Vanoosthuyse V, Meadows JC, van der Sar SJ, Millar JB, Hardwick KG (2009). Bub3p facilitates spindle checkpoint silencing in fission yeast. *Mol Biol Cell*. **20**, 5096-5105.
- Vanoosthuyse V, Prykhozhij S, Hardwick KG (2007). Shugoshin 2 regulates localization of the chromosomal passenger proteins in fission yeast mitosis. *Mol Biol Cell*. **18**, 1657-1669.
- Verdaasdonk JS, Bloom K (2011). Centromeres: unique chromatin structures that drive chromosome segregation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **12**, 320-332.
- Vietmeier-Decker C (2004). Die Funktion des Mikrotubuli-assoziierten S. pombe Proteins Mal3p in der Mitose. *Dissertation, HHU Düsseldorf*.
- Vitre B, Coquelle FM, Heichette C, Garnier C, Chretien D, Arnal I (2008). EB1 regulates microtubule dynamics and tubulin sheet closure in vitro. *Nat Cell Biol.* **10**, 415-421.
- Vizeacoumar FJ, van Dyk N, F SV, Cheung V, Li J, Sydorskyy 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, 69-81.
- Volpe T, Schramke V, Hamilton GL, White SA, Teng G, Martienssen RA, Allshire RC (2003). RNA interference is required for normal centromere function in fission yeast. *Chromosome Res.* 11, 137-146.
- 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**, 1833-1837.
- Warburton PE (2004). Chromosomal dynamics of human neocentromere formation. *Chromosome Res.* **12**, 617-626.
- Watanabe Y, Kitajima TS (2005). Shugoshin protects cohesin complexes at centromeres. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* **360**, 515-521, discussion 521.
- Waters JC, Chen RH, Murray AW, Salmon ED (1998). Localization of Mad2 to kinetochores depends on microtubule attachment, not tension. *J Cell Biol*. **141**, 1181-1191.
- West RR, Malmstrom T, Troxell CL, McIntosh JR (2001). Two related kinesins, klp5+ and klp6+, foster microtubule disassembly and are required for meiosis in fission yeast. *Mol Biol Cell*. **12**, 3919-3932.
- West RR , McIntosh JR (2008). Novel interactions of fission yeast kinesin 8 revealed through in vivo expression of truncation alleles. *Cell Motil Cytoskeleton*. **65**, 626-640.
- 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**, 277-290.
- Westermann S, Wang HW, Avila-Sakar A, Drubin DG, Nogales E , Barnes G (2006). The Dam1 kinetochore ring complex moves processively on depolymerizing microtubule ends. *Nature*. 440, 565-569.
- 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**, 287-298.
- Windecker H, Langegger M, Heinrich S, Hauf S (2009). Bub1 and Bub3 promote the conversion from monopolar to bipolar chromosome attachment independently of shugoshin. *EMBO Rep.* **10**, 1022-1028.
- 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, Goble 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, Rabbinowitsch 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, Fritzc 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, 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**, 491-500.
- Yamagishi Y, Honda T, Tanno Y, Watanabe Y (2010). Two histone marks establish the inner centromere and chromosome bi-orientation. *Science*. **330**, 239-243.
- Yamagishi Y, Yang CH, Tanno Y, Watanabe Y (2012). MPS1/Mph1 phosphorylates the kinetochore protein KNL1/Spc7 to recruit SAC components. *Nat Cell Biol*. **14**, 746-752.
- 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, 1378-1395.

- Yang CH, Tomkiel J, Saitoh H, Johnson DH, Earnshaw WC (1996). Identification of overlapping DNAbinding and centromere-targeting domains in the human kinetochore protein CENP-C. *Mol Cell Biol.* **16**, 3576-3586.
- Yoda K, Ando S, Morishita S, Houmura K, Hashimoto K, Takeyasu K, Okazaki T (2000). Human centromere protein A (CENP-A) can replace histone H3 in nucleosome reconstitution in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **97**, 7266-7271.
- Yoon HJ , Donahue TF (1992a). The suil suppressor locus in Saccharomyces cerevisiae encodes a translation factor that functions during tRNA(iMet) recognition of the start codon. *Mol Cell Biol.* **12**, 248-260.
- Yoon HJ , Donahue TF (1992b). The suil suppressor locus in Saccharomyces cerevisiae encodes a translation factor that functions during tRNA(iMet) recognition of the start codon. *Mol-Cell-Biol.* **12**, 248-260.
- Zhou H, Kuang J, Zhong L, Kuo WL, Gray JW, Sahin A, Brinkley BR, Sen S (1998). Tumour amplified kinase STK15/BTAK induces centrosome amplification, aneuploidy and transformation. *Nat Genet.* 20, 189-193.
- Zhou J, Panda D, Landen JW, Wilson L, Joshi HC (2002). Minor alteration of microtubule dynamics causes loss of tension across kinetochore pairs and activates the spindle checkpoint. *J Biol Chem.* **277**, 17200-17208.
- Zich J, Sochaj AM, Syred HM, Milne L, Cook AG, Ohkura H, Rappsilber J, Hardwick KG (2012). Kinase activity of fission yeast Mph1 is required for Mad2 and Mad3 to stably bind the anaphase promoting complex. *Curr Biol.* **22**, 296-301.
- Zimniak T, Stengl K, Mechtler K, Westermann S (2009). Phosphoregulation of the budding yeast EB1 homologue Bim1p by Aurora/Ipl1p. *J Cell Biol.* **186**, 379-391.
- Zou H, McGarry TJ, Bernal T , Kirschner MW (1999). Identification of a vertebrate sister-chromatid separation inhibitor involved in transformation and tumorigenesis [see comments]. Science. 285, 418-422.

## 8 Publikationen

- Sos7, an essential component of the conserved *Schizosaccharomyces pombe* Ndc80-MIND-Spc7 complex, identifies a new family of fungal kinetochore proteins
  Jakopec V, <u>Topolski B</u>, Fleig U.
  Mol. Cell. Biol. August 2012
- Inositol polyphosphates regulate spindle dynamics in *Schizosaccharomyces pombe* <u>Topolski B</u>, Fleig U.
   In Vorbereitung

## 9 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die mich während meiner Promotion begleitet haben und zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

An erster Stelle bedanke ich mich bei Frau Dr. Ursula Fleig, die es mir ermöglicht hat meineDoktorarbeit in ihrer Arbeitsgruppe anzufertigen. Die erstklassige Betreuung, die Diskussionsbereitschaft und die vielen Anregungen in den letzten Jahren haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Besonders für die geduldige Fürsorge in den letzten Monaten sowie das Lesen und Diskutieren meiner Manuskriptvarianten bin ich sehr dankbar. Darüber hinaus bedanke ich mich dafür, dass ich die Möglichkeit hatte an einem internationalen Kongress in Boston teilzunehmen.

Bei Herrn Prof. Dr. Peter Westhoff bedanke ich mich für die Übernahme des Koreferates.

Für die kritische Durchsicht meiner Arbeit und die fachliche Kompetenz während unserer gemeinsamen Laborarbeit geht ein besonderer Dank an Visnja. Für die gemeinsame Zeit, die fachlichen Gespräche und die vielen nichtwissenschaftlichen Diskussionen und Aktivitäten in den letzten Jahren danke ich außerdem meinen Laborkollegen Anand, Eva, Jennie, Markus, Nadine und Pascal.

Besonders unser gemeinsamer Aufenthalt in Boston und New York...

"Ich bin noch einen Cookie von Diabetes entfernt" "Guck mal, ein Streifenhörnchen" "Markus, meinste die merken sofort, dass wir Deutsche sind? …Two beer please! Kellner: Ah, germans" "Kommt Leute, zückt die Kreditkarten" "Haste noch Platz für mich in deinem Koffer frei?"

...wird mir unvergessen bleiben!

Des Weiteren bedanke ich mich bei...

... allen "Hegemännern" für die kollegiale Nachbarschaft, die fachliche Zusammenarbeitund die Kaffeepausen. Ohne euch wird Mittagessen nie wieder so sein wie früher!

... Frau Dr. Stefanie Weidtkamp-Peters, Frau Dr. Ursula Fleig und Herrn Prof. Dr. Johannes H. Hegemann für ihre engagierte Unterstützung rund um das Spinning Disc Mikroskop. Ohne eure kompetente Beratung und organisatorische Initiativewäre diese Arbeit in der Form nicht möglich gewesen!

... Alexander für die Hilfe bei den Kommata.

... einem kleinen roten Plastikeimer. Erst mit deiner Hilfe war es mir möglich für ein stabiles Raumklima zu sorgen: We make it visible!

... Frank und Marco dafür, dass ich jederzeit nach Berlin flüchten konnte wenn mir hier die Decke auf den Kopf gefallen ist. Mit Sekt und Milchreistorte habt ihr es geschafft mir eine andere Sicht auf die Dinge zu geben!

... meiner Familie, Bekannten, und ganz besonders natürlich Waldemar dafür, dass er meine speziellen Launen in den letzten Monaten ertragen hat. Ich glaube zwar nicht an Horoskope, aber ich bin nun einmal Fisch!

## 10 Erklärung

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

Düsseldorf, den

Boris Topolski