

**Die Funktion des Mikrotubuli-assoziierten *S. pombe*  
Proteins Mal3p in der Mitose**

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

zur

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

vorgelegt von

Corina Vietmeier-Decker  
aus Lengerich (Westf)

Düsseldorf 2004

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

Referent: Prof. Dr. Johannes H. Hegemann

Koreferent: Prof. Dr. Peter Westhoff

Tag der mündlichen Prüfung: 24. Juni 2004

## Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungsverzeichnis	8
2	Zusammenfassung	10
3	Einleitung	11
3.1	Der eukaryontische Modellorganismus <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	11
3.2	Das Zentromer der Spalthefe	12
3.3	Der mitotische Spindelfaserapparat	15
3.4	Die evolutionär konservierte Gruppe der EB-1 Proteine	18
3.5	Das Spalthefeprotein Mal3p ist Mitglied der evolutionär konservierten EB-1 Proteinfamilie	20
3.6	Zielsetzung dieser Arbeit	22
4	Material und Methoden	23
4.1	Chemikalien	23
4.2	Enzyme	25
4.2.1	Restriktionsendonukleasen	25
4.2.2	Polymerasen, modifizierende Enzyme	25
4.3	Sonstige Materialien	26
4.4	Oligonukleotide	26
4.5	Plasmide	28
4.6	<i>S. pombe</i> DNA Banken	29
4.7	Stämme	30
4.7.1	<i>S. pombe</i> Stämme	30
4.7.2	<i>S. cerevisiae</i> Stämme	32
4.7.3	<i>E. coli</i> Stämme	32
4.8	Antikörper	33
4.9	Medien und Wachstumsbedingungen	33
4.9.1	Medien für <i>S. pombe</i>	33
4.9.2	Medien für <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	34
4.9.3	Medien für <i>Escherichia coli</i>	34
4.10	DNA-Grundtechniken	35
4.11	Transformation	35
4.12	Komplementation des <i>mal3-1</i> Thiabendazol-hypersensitiven Phänotyps	36
4.13	Verkürzung des <i>spc7<sup>+</sup></i> offenen Leserahmens	37
4.14	Herstellung von <i>spc7<sup>+</sup></i> Deletionskassetten	37

4.14.1 Generierung von zwei <i>spc7</i> <sup>+</sup> Deletionskassetten mit kurzen Homologiebereichen	38
4.15 Generierung von <i>spc7</i> <sup>+</sup> Deletionskassetten mit längeren Homologiebereichen	38
4.15.1 Erzeugung von zwei Deletionskassetten mit einem <i>his3</i> <sup>+</sup> Selektionsmarker	38
4.15.2 Erzeugung von zwei Deletionskassetten mit einer <i>kanMx6</i> -Modulsequenz	39
4.16 Fusion des endogenen <i>spc7</i> <sup>+</sup> ORFs mit einem GFP- und HA-Epitop	40
4.17 Screening von zwei c-DNA Genbanken	41
4.18 Verkürzungen des <i>mal3</i> <sup>+</sup> ORF	42
4.19 Untersuchungen zur genetischen Interaktion in <i>S. pombe</i> Stämmen	43
4.20 Deletion des <i>SPC105</i> ORFs	43
4.21 C-terminale Fusion des <i>SPC105</i> ORFs mit einem GFP- bzw. HA-Epitop	44
4.22 Klonierung des <i>SPC105</i> in <i>S. pombe</i> Vektoren	44
4.23 <i>TetO</i> -Promotorsystem	45
4.24 Southern-Blotanalyse	46
4.25 Northern-Blotanalyse	46
4.26 Mikroskopie	47
4.27 Analyse des DNA-Profiles von <i>S. cerevisiae</i> Zellen mittels Durchflußcytometrie-Analyse	48
5 Ergebnisse	49
5.1 Isolierung extragener Multikopie-Suppressoren des <i>mal3-1</i> Thiabendazol-hypersensitiven Phänotyps	49
5.2 Nachweis der Suppression des <i>mal3-1</i> TBZ-hypersensitiven Phänotyps durch serielle Tropftestuntersuchungen	50
5.3 Analyse der Suppressorplasmide mittels Restriktions-, PCR- und Sequenzanalyse	52
5.3.1 Analytische Spaltung der genomischen <i>S. pombe</i> DNA-Bankplasmide	52
5.3.1.1 Analytische Spaltung mit BamHI/HindIII zur Bestimmung der Insertgrößen der genomischen <i>S. pombe</i> DNA-Bankplasmide	52
5.3.1.2 Gruppierung der DNA-Bankplasmide durch systematische Restriktionsanalyse	53
5.3.2 PCR-Analyse zur Identifizierung bereits bekannter <i>S. pombe</i> DNA-Genbankinserts	54
5.4 Komplementation des <i>mal3-1</i> Minichromosomenverlustes durch genomische <i>S. pombe</i> DNA-Bankplasmide	56

5.5	Komplementation der TBZ-Hypersensitivität des <i>mal3</i> <sup>+</sup> Deletionsstammes durch verschiedene Suppressorplasmide	59
5.6	Weiterführende Analysen zu den offenen Leserahmen der genomischen <i>S. pombe</i> DNA-Banksequenzen	61
5.6.1	Charakterisierung der Suppressorinserts, die die TBZ-Hypersensitivität des <i>mal3-1</i> Stammes supprimieren	62
5.6.1.1	Das Suppressorinsert CD-1 enthält drei offene Leserahmen, von denen das <i>pad1</i> <sup>+</sup> Gen die Hypersensitivität des <i>mal3-1</i> Stammes gegenüber TBZ supprimiert	62
5.6.1.2	CD-3 enthält einen ORF, der vermutlich für ein Protein der Ergosterolbiosynthese kodiert	65
5.6.1.3	CD-12 zeigt keine deutliche Übereinstimmungen mit DNA-Sequenzen des <i>S. pombe</i> Genoms	66
5.6.2	Charakterisierung der Suppressorinserts, die erhöhten Minichromosomenverlust und die TBZ-Hypersensitivität des <i>mal3-1</i> Stammes supprimieren	67
5.6.2.1	Ein ORF auf CD-2/CD-15 kodiert für ein Protein mit Homologie zum Mikrotubuli-assoziierten <i>S. cerevisiae</i> Protein Dam1	67
5.6.2.2	CD-6 enthält den ORF SPCC10.20.02, der für ein neues Zentromerprotein in <i>S. pombe</i> kodiert	69
5.6.2.3	CD-11 enthält den <i>dis2</i> <sup>+</sup> ORF, der für eine Serin/Threonin Proteinphosphatase kodiert und an der Regulation der Chromosomensegregation beteiligt ist	70
5.6.2.4	Im Suppressorinsert CD-13 sind DNA-Sequenzen von fünf verschiedenen ORFs enthalten	71
5.6.2.5	Ein ORF auf CD-14 kodiert für das Protein Asp1p, welches eine wichtige Rolle für die Funktion des Aktinzytoskeletts besitzt	73
5.6.2.6	CD-17 enthält drei ORFs, die vermutlich für Proteine mit einer Funktion bei der Proteinmodifikation, der Translation bzw. der Transkription kodieren	76
5.6.2.7	CD-18 enthält ORFs, die für ein Protein mit einem RNA-Bindemotiv und eine spezifische t-RNA-Synthetase des Zytoplasmas kodieren	78

5.6.2.8	CD-19 enthält ORFs, die für eine Aminosäuresynthetase, eine Doppelstrang-spezifische Ribonuklease und ein ER-Golgi Transportprotein kodieren	80
5.6.2.9	Ein ORF der Insertsequenz von CD-20 zeigt Homologie zu einem evolutionär konservierten Mikrotubuli-bindenden Protein	81
5.6.2.10	CD-21 kodiert für ein evolutionär konserviertes Protein, welches an der Regulation der Kinetochoraktivität beteiligt ist	83
5.7	Identifizierung und Charakterisierung von Spc7p als neues <i>S. pombe</i> Zentromerprotein	87
5.7.1	Spc7p ist ein funktionell evolutionär konserviertes Protein	87
5.7.2	Deletion des offenen Leserahmens durch homologe Rekombination	89
5.7.3	Verifizierung des <i>spc7<sup>+</sup></i> ORFs durch die Analyse von <i>S. pombe</i> Gesamt-RNA und von zwei c-DNA Genbanken	91
5.7.3.1	Ermittlung der Größe von <i>spc7<sup>+</sup></i> messenger-RNA durch Northern-Blotanalyse	92
5.7.3.2	Analyse von zwei <i>S. pombe</i> c-DNA Genbanken	93
5.7.3.2.1	Screening einer c-DNA Bank durch Southern-Blotanalyse und PCR-Analyse	93
5.7.3.2.2	Screening von zwei c-DNA Genbanken durch PCR-Analyse	95
5.7.4	Überexpression einer DNA-Sequenz, die für ein verkürztes Spc7p Protein kodiert, kann die Thiabendazol-Hypersensitivität des <i>mal3-1</i> und <i>mal3Δ</i> Stammes supprimieren	97
5.7.4.1	Klonierung eines verkürzten <i>spc7<sup>+</sup></i> Leserahmens in <i>S. pombe</i> Expressionsvektoren	97
5.7.4.2	Das partielle Spc7p supprimiert die TBZ-Hypersensitivität des <i>mal3-1</i> Stammes und des <i>mal3Δ</i> Stammes	98
5.7.5	Identifizierung von Spc7p als neues <i>S. pombe</i> Zentromerprotein	101
5.7.5.1	Generierung von Spc7-GFPp- bzw. HA-Fusionsproteinstämmen	101
5.7.5.2	Lokalisierung von Spc7p in <i>S. pombe</i> Zellen	103
5.7.5.2.1	Lokalisierung des Spc7-GFPp-Fusionsproteins im Verlauf des Zellzyklus	103
5.7.5.2.2	Colokalisierung von Spc7p und dem Zentromerprotein Mal2p	105
5.8	Identifizierung und Charakterisierung von Spc105 als neues <i>S. cerevisiae</i> Zentromerprotein	108

5.8.1	<i>S. pombe</i> Spc7p und <i>S. cerevisiae</i> Spc105 sind funktionell homologe Proteine	108
5.8.1.1	Suppression der TBZ-Hypersensitivität des <i>BIMI</i> Deletionsstammes durch <i>SPC105</i>	108
5.8.1.2	Suppression der TBZ-Hypersensitivität des <i>mal3-1</i> und <i>mal3Δ</i> Stammes durch <i>SPC105</i>	109
5.8.1.2.1	Klonierung von <i>SPC105</i> in <i>S. pombe</i> Expressionsvektoren	109
5.8.1.2.2	Suppression der Hypersensitivität des <i>mal3-1</i> und <i>mal3Δ</i> Stammes gegenüber TBZ durch Überexpression von <i>SPC105</i>	110
5.8.2	Identifizierung von Spc105 als neues <i>S. cerevisiae</i> Zentromerprotein	111
5.8.2.1	Herstellung eines Spc105-GFP-Fusionsprotein Stammes	112
5.8.2.2	Lokalisierung des Spc105-GFP-Fusionsproteins in der Zelle	113
5.8.3	Eine partielle Deletion des <i>SPC105</i> offenen Leserahmens ist bedingt lebensfähig	115
5.8.3.1	Deletion des <i>SPC105</i> offenen Leserahmens durch homologe Rekombination	115
5.8.3.2	Die Tetradenanalyse zeigt, daß die partielle Deletion des <i>SPC105</i> offenen Leserahmens nur bedingt lebensfähig ist	116
5.8.4	Phänotypische Charakterisierung des <i>SPC105</i> Deletionsstammes	118
5.8.4.1	Die Deletion des <i>SPC105</i> Gens führt zu stark reduziertem Wachstum und zu veränderter Zellmorphologie	118
5.8.4.2	Die Deletion des <i>SPC105</i> Gens führt zu Fehlern bei der DNA-Verteilung	120
5.8.5	<i>SPC105</i> hat einen Einfluß auf die korrekte Verteilung eines Chromosomenfragmentes	121
5.8.5.1	Integration des heterologen <i>tetO</i> -Promotors vor den <i>SPC105</i> offenen Leserahmen	122
5.8.5.2	Die Expression von <i>SPC105</i> durch einen Fremdpromotor führt zum erhöhten Verlust eines zusätzlichen Chromosomenfragmentes	123
5.9	Weiterführende Analysen zur Bestimmung der Funktion des <i>Schizosaccharomyces pombe</i> Proteins Mal3p	128
5.9.1	Generierung und Analyse zweier unterschiedlich N-terminal verkürzter Mal3p Proteine	129
5.9.1.1	Generierung von N-terminal verkürzten Mal3p Proteinvarianten	129
5.9.1.2	Funktionelle Analyse der verkürzten Mal3p Proteinvarianten	130

5.9.2	Untersuchung der genetischen Interaktion von <i>mal3</i> <sup>+</sup> mit Mutanten des Spindelkontrollpunktes, des Zentromers und des Mikrotubuli-Plusendkomplexes	134
5.9.2.1	Der Spindelkontrollpunkt liegt im <i>mal3Δ</i> Stamm aktiviert vor	135
5.9.2.2	<i>mal3</i> <sup>+</sup> zeigt keine genetische Interaktion mit Mutanten des Zentromers	137
5.9.2.3	<i>mal3</i> <sup>+</sup> zeigt eine starke genetische Interaktion mit einer Mutante des Mikrotubuli-Plusendkomplexes	138
6	Diskussion	142
6.1	Genetische Interaktion von <i>mal3</i> <sup>+</sup> mit Mutanten des Mikrotubuli-Plusendkomplexes und des Spindelkontrollpunktes	143
6.2	Bedeutung der Suppressoren der verbleibenden Insertsequenzen für die mitotische Funktion von Mal3p	145
6.3	Ein Regulator des Aktinzytoskeletts supprimiert die mitotischen <i>mal3-1</i> Mutantenphänotypen	146
6.4	Interaktion von Mal3p mit dem Mikrotubuli-assoziierten Protein Stu1p	147
6.5	Interaktionen von Mal3p mit Proteinen, die eine evolutionär konservierte Bedeutung für die bipolare Verknüpfung des Zentromers mit der Spindel besitzen	148
6.6	Interaktion von Mal3p mit den neuen Zentromerproteinen Spc7p aus <i>S. pombe</i> und Spc105 aus <i>S. cerevisiae</i>	150
7	Literaturverzeichnis	153
8	Anhang	166
8.1	Tabellen	166
8.2	Verwendete Transformationskassetten zur Deletion des <i>spc7</i> <sup>+</sup> ORFs	168
8.3	Ansequenzierung der c-DNA-Bankplasmide	170
8.4	Abbildungsverzeichnis	171
8.5	Tabellenverzeichnis	173
8.6	Publikationen	174
8.7	Verwendete Internetseiten zur Daten- und Literaturrecherche	174
9	Danksagung	175

# 1 Abkürzungsverzeichnis

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
ade	Adenin
Amp	Ampicillin
bp	Basenpaare
bidest. H <sub>2</sub> O	zweifach destilliertes Wasser
C-terminale	Carboxy-terminale
Δ	Deletion
DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
g	Gramm
G1	Gap 1-Phase des Zellzyklus
G2	Gap 2-Phase des Zellzyklus
GFP	„green fluorescence protein“ (grün fluoreszierendes Protein)
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
h	Stunde(n)
his	Histidin
kbp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
konz.	konzentriert
kV	Kilovolt
l	Liter
leu	Leucin
M	Molar
mal	„minichromosome altered loss“ (veränderter Minichromosomenverlust)
min	Minute(n)
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar

---

MM	Minimal Medium
M-Phase	Teilungsphase
N-terminale	Amino-terminale
OD	Optische Dichte
ORF	„open reading frame“ (offener Leserahmen eines Gens)
PCR	„polymerase chain reaction“ (Polymerasekettenreaktion)
s	Sekunde(n)
S-Phase	Synthese-Phase des Zellzyklus
SPB	Spindelpolkörper
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>S. pombe</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
TBZ	Thiabendazol
thia	Thiamin
ura	Uracil
UV-Licht	ultraviolette Licht
yEGFP	„yeast enhanced green fluorescent protein“ (verstärktes grün fluoreszierendes Protein der Hefe)

## 2 Zusammenfassung

Während der Mitose wird das verdoppelte genetische Erbmateriale der Zellen präzise auf die entstehenden Folgezellen verteilt. Verschiedene Teilprozesse müssen dabei korrekt und hochreguliert aufeinander folgen. Neben dem Aufbau eines funktionsfähigen Spindelapparates ist die dynamische Interaktion zwischen den Plusenden spezifischer Mikrotubuli und dem Kinetochor, einem Multiproteinkomplex, der auf der Zentromer-DNA ausgebildet wird, von entscheidender Bedeutung.

In der vorliegenden Arbeit wurde die mitotische Funktion des Mikrotubuli-assoziierten Mal3p Proteins der Spaltheefe *Schizosaccharomyces pombe*, einem Mitglied der evolutionär konservierten EB-1 Familie, näher analysiert. Mitglieder dieser Proteinfamilie haben eine wichtige Bedeutung für die Funktion und die Dynamik der Mikrotubulstrukturen. Das EB-1 Protein des Menschen ist an der Ausbildung und Stabilisierung der Kinetochor-Mikrotubuli-Verknüpfung beteiligt. Der Nachweis der genetischen Interaktion zwischen *mal3Δ* und einer Mutante des Mikrotubuli-Plusendkomplexes zeigt, daß auch das Mal3p Protein, als Bestandteil des Plusendkomplexes in der Spaltheefe, eine wichtige Funktion für die Verknüpfung der Chromosomen mit der Spindel besitzt. Außerdem wird der Spindelkontrollpunkt, der den korrekten Aufbau des mitotischen Spindelapparates und die bipolare Verknüpfung der Chromosomen mit der Spindel überprüft, im *mal3Δ* Stamm aktiviert.

Durch einen umfangreichen extragenen Multikopie-Suppressorscreen mit einer genomischen *S. pombe* Genbank wurden 85 neue Suppressoren der mitotischen *mal3-1* Mutantenphänotypen identifiziert. Durch verschiedene Analysen konnte die Anzahl der Suppressoren auf zehn neue Komplementationsgruppen reduziert werden. Ihre Bedeutung für die Chromosomensegregation wurde gezeigt. Fünf Suppressoren wurden als Komponenten der mitotischen Spindel und des Kinetochors charakterisiert. Durch die Identifikation eines Suppressors, der wichtig für die Verteilung der zellulären Aktinflecken der Spaltheefe ist, wurde eine Verbindung zwischen dem Mikrotubuli-assoziierten Mal3p Protein und dem Aktinzytoskelett ermittelt.

Der Suppressor *spc7<sup>+</sup>* wurde für eine detailliertere Analyse ausgewählt. Die Proteine Spc7p aus *S. pombe* und Spc105 aus *S. cerevisiae* besitzen funktionelle Homologie und wurden als neue Kinetochorproteine der Hefen charakterisiert. Beide Proteine zeigen eine wichtige Bedeutung für die Erhaltung der genomischen Stabilität. Die Deletion bzw. die veränderte Expression führt zu mitotischen Defekten und zu einer Fehlverteilung der DNA.

### 3 Einleitung

#### 3.1 Der eukaryontische Modellorganismus *Schizosaccharomyces pombe*

Bei der vegetativen Vermehrung eukaryontischer Zellen wird das genetische Erbmateriale repliziert und während der Mitose unter Ausbildung eines mitotischen Spindelfaserapparates gleichmäßig auf die entstehenden Folgezellen verteilt. Für die erfolgreiche Ausbildung zweier erbgleicher Tochterkerne und Erhaltung der Ploidie müssen unterschiedliche Teilprozesse präzise und hochreguliert ablaufen. Defekte im Ablauf der Mitose sind häufig letal für die Zellen bzw. werden mit einer Vielzahl von Krankheiten in Verbindung gebracht (Übersichtsartikel Cahill et al., 1999). Eine fehlerhafte Verteilung der DNA und eine erhöhte chromosomale Instabilität wurden im Zusammenhang mit der Entstehung von Krebs beschrieben (Lengauer et al., 1998; Fodde et al., 2001; Kaplan et al., 2001).

Für eine präzise Segregation der verdoppelten Schwesterchromatiden auf die Tochterkerne müssen die Chromosomen bipolar mit den dynamischen Mikrotubulstrukturen der mitotischen Spindel verknüpft werden. Die Verknüpfung zwischen der Zentromer-DNA und den Mikrotubulenden der mitotischen Spindel erfolgt über den Multiproteinkomplex des Kinetochors. An der Ausbildung dieser Verknüpfung sind unter anderem verschiedene Proteine, die spezifisch an das Plusende der Mikrotubuli bzw. das Kinetochor binden, beteiligt (Übersichtsartikel von Schuyler et al., 2001 bzw. Mimori-Kiyosue et al., 2003). Der korrekte Aufbau der mitotischen Spindel und die bipolare Verknüpfung der Kinetochore mit den Plusenden der Mikrotubulstrukturen werden durch das evolutionär konservierte System des Spindelkontrollpunktes überprüft. Defekte im Spindelaufbau oder der bipolaren Kinetochor-Mikrotubuli-Verknüpfung führen zu einem transienten Arrest in der Metaphase des Zellzyklus (Übersichtsartikel Amon, 1999; Gardner et al., 2000).

Die Spaltheife *Schizosaccharomyces pombe* kann als eukaryontischer Modellorganismus zur Identifizierung neuer Komponenten, die für die mitotische Segregation der Chromosomen benötigt werden, eingesetzt werden. Die Strukturen und Abläufe in der Mitose bei diesem einzelligen haploiden Ascomyceten sind teilweise sehr ähnlich zu den beobachteten Prozessen in höheren Eukaryonten und lassen sich leicht studieren (Funabiki et al., 1993). Das nur 13,8 Megabasenpaar große Genom liegt auf drei Chromosomen verteilt vor und wurde im Rahmen des *S. pombe* Genomprojektes sequenziert (Wood et al., 2002). Wie auch bei den höheren Eukaryonten, wird das zytoplasmatische Mikrotubulizytoskelett der Spalthefezelle zu Beginn der Mitose abgebaut und es wird eine bipolare mitotische Spindel ausgebildet (Hagan et al.,

1998). Auch in diesem Organismus kondensieren die Chromosomen und werden nach Ausbildung einer Kinetochor-Mikrotubuli-Verknüpfung durch einwirkende Kräfte und dynamische Veränderungen der mitotischen Spindel in der Äquatorialebene der Zellen angeordnet. Der Aufbau des *S. pombe* Zentromers zeigt durch seine Größe und den Besitz repetitiver Sequenzen Ähnlichkeiten zu den Zentromerstrukturen höherer Eukaryonten (Pluta et al., 1995). Außerdem sind eine Reihe von Proteinen mit wichtiger Bedeutung für die Funktion und den strukturellen Aufbau des Kinetochors und der mitotischen Spindel in der Spaltheife evolutionär konserviert. Das in dieser Arbeit untersuchte Mikrotubuli-assoziierte Mal3p Protein ist ein funktionelles Homolog des menschlichen EB-1 Proteins (Beinhauer et al., 1997). Zur Einführung in diesen Themenkomplex werden im folgenden Teil das Zentromer der Spaltheife, der mitotische Spindelfaserapparat und die EB-1 Familie detaillierter dargestellt.

### 3.2 Das Zentromer der Spaltheife

Die Zentromer-DNA des Chromosoms und der damit assoziierte funktionelle Kinetochor-Komplex sind essentiell für den Ablauf der präzisen und geordneten Verteilung der Chromosomen während der Mitose (Übersichtsartikel Pidoux et al., 2000a). Das Zentromer übernimmt verschiedene Aufgaben in diesem Zusammenhang. Bereiche dieser spezialisierten Region des Chromosoms stellen den Kontakt zwischen den Plusenden mitotischer Spindelmikrotubuli und den Chromosomen her. Zusätzlich assoziieren Motorproteine, die an der Bewegung der Chromosomen entlang der mitotischen Spindelmikrotubuli beteiligt sind oder auch Proteine des Spindelkontrollpunktes mit dem Zentromer (Gardner et al., 2000; Manning et al., 2000; Steinberg et al., 2000). Für verschiedene Komponenten dieser evolutionär konservierten Signalkaskade wurde eine Lokalisierung an Kinetochoren, die nicht bipolar mit der mitotischen Spindel verknüpft sind, nachgewiesen (Chen et al., 1996; Li et al., 1996; Taylor et al., 1998). Auch die verdoppelten Schwesterchromatiden bleiben am Zentromer über eine Proteinverbindung bis zum Übergang zwischen Meta- und Anaphase miteinander verbunden (Yanagida et al., 1995; Funabiki et al., 1996; Tomonaga et al., 2000; Bernard et al., 2001).

Verschiedene Arbeiten haben zur Aufklärung der Struktur der Zentromer-DNA-Sequenz der Spaltheife beigetragen (Nakaseko et al., 1986; Chikashige et al., 1989; Clarke et al., 1990; Murakami et al., 1991; Wood et al., 2002). Die Größe der Zentromer-DNA-Sequenzen liegt für die Spaltheife zwischen 35-110 Kilobasenpaaren (Wood et al., 2002). Dabei verhält sich die Größe der DNA-Sequenzen umgekehrt proportional zur Größe der drei Chromosomen.

Der grundlegende strukturelle Aufbau der drei Zentromere ist gleich (Hahnenberger et al., 1991; Takahashi et al., 1992; Pidoux et al., 2000a). Die DNA-Sequenz jedes der Zentromere ist symmetrisch aufgebaut und besteht aus einer zentralen variablen Kernregion, die durch invertierte Sequenzwiederholungen flankiert wird. Diese Sequenzwiederholungen lassen sich in eine innere und äußere Wiederholungssequenz unterteilen und variieren für die einzelnen Chromosomen in ihrer Größe (Übersichtsartikel Su et al., 1997; Clarke et al., 1998). Dieser strukturelle Aufbau der Zentromer-DNA ist charakteristisch für die sogenannten Regional-Zentromere, die auch für höhere Eukaryonten beschrieben wurden (Pluta et al., 1990; Pluta et al., 1995).

Durch die Interaktion verschiedener Proteine, die direkt oder durch Assoziation mit anderen Proteinen gezielt an unterschiedliche Regionen der Zentromer-DNA binden, entsteht eine komplex organisierte, mehrschichtige Struktur in dieser Region des Chromosoms (Pluta et al., 1990). Dieser spezialisierte Proteinkomplex, der auf dieser spezifischen DNA-Sequenz assembliert, wird als Kinetochor bezeichnet. Eine Reihe der hierbei beteiligten Proteine sind evolutionär konserviert und wurden auch in anderen Eukaryonten beschrieben (Übersichtsartikel von Cheeseman et al., 2002b; Meluh et al., 1998; Takahashi et al., 2000).

Es gibt zwei strukturell und funktionell unterschiedliche Domänen des *S. pombe* Zentromers (Kniola et al., 2001; Appelgren et al., 2003). Eine innere Domäne, die sich über die *cnt*-Region und einen kleinen Teil der *imr*-Region erstreckt, ist Ausgangsbasis für die Assoziation des Kinetochors. Eine zweite äußere Domäne, die den restlichen Teil der *imr*-Region und die *otr*-Region umfaßt, ist aufgrund ihrer besonderen Heterochromatinstruktur wichtig für den Zusammenhalt der Schwesterchromatiden (Bernard et al., 2001; Nonaka et al., 2002). Mit diesen Domänen assoziieren unterschiedliche Proteinsubkomplexe, die entweder spezifisch mit der inneren oder der äußeren Domäne wechselwirken (siehe Abbildung 1; Saitoh et al., 1997; Goshima et al., 1999; Partridge et al., 2000).

Zu den Proteinen, die mit den äußeren repetitiven Zentromerregionen assoziieren, gehören das *S. pombe* Heterochromatin Protein 1 Homolog Swi6p, Chp1p, Rik1p und Clr4p (Übersichtsartikel von Pidoux et al., 2000a; Ekwall et al., 1995; Rea et al., 2000). Clr4p ist ein Homolog der SUV39H1 Säugetierhistonmethyltransferase und modifiziert den Lysinrest 9 von Histon H3 (Rea et al., 2000; Bannister et al., 2001; Lachner et al., 2001; Nakayama et al., 2001). Obwohl diese Proteine nicht essentiell sind, ist ihre Funktion wichtig für den Aufbau der Heterochromatinregion. Die Ausbildung einer geordneten Heterochromatinstruktur ist abhängig von der kovalenten Modifikation durch Acetylierung und Methylierung spezifischer Histonreste (Litt et al., 2001; Noma et al., 2001; Nakagawa et al., 2002). Die Assoziation von

Swi6p und Chp1p an die äußere Domäne ist abhängig von der Funktion der Proteine Rik1p und Clr4p (Ekwall et al., 1996; Rea et al., 2000; Bannister et al., 2001). Auch Rad21p, eine Untereinheit des Proteinkomplexes, der die Schwesterchromatiden bis zur Anaphase verbindet, assoziiert in Abhängigkeit von Swi6p mit dieser Region des Zentromers (Tomonaga et al., 2000; Bernard et al., 2001; Nonaka et al., 2002).

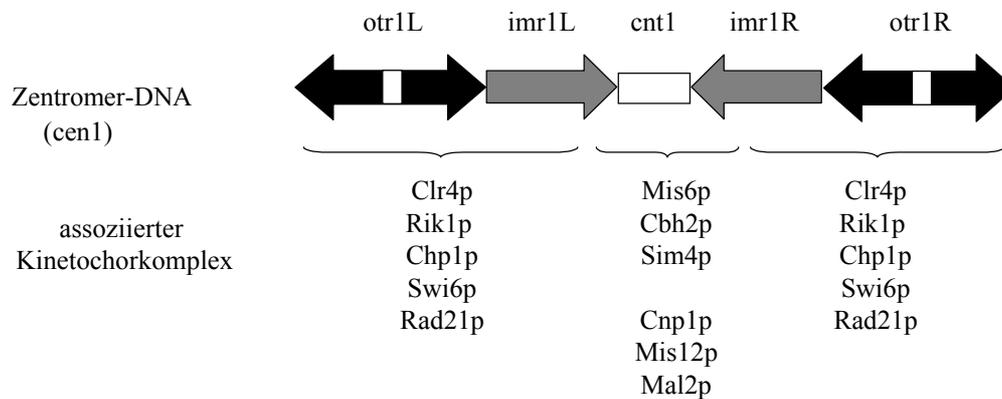


Abbildung 1: Strukturelle Übersicht der Zentromer-DNA von *S. pombe* und damit assoziierter Proteine

Der schematische Aufbau des Zentromers von Chromosom 1 (*cen1*) der Spaltheefe mit der zentralen Kernregion (*cnt*) und den flankierenden inneren (*imr*) und äußeren (*otr*) repetitiven Sequenzen ist dargestellt. Die Assoziation verschiedener Kinetochorproteine mit unterschiedlichen Domänen der Zentromer-DNA ist aufgeführt.

Dagegen assoziieren die Histon H3 Variante Cnp1p von *S. pombe* und Cbh2p, eines der CENP-B homologen Proteine der Spaltheefe, spezifisch mit der zentralen Kernregion der Zentromer-DNA (Baum et al., 2000; Takahashi et al., 2000; Irelan et al., 2001). Die CENP-B Homologe in *S. pombe* beeinflussen die Ausbildung der Heterochromatinstruktur (Nakagawa et al., 2002). Auch die Spalthefefproteine Mis6p, Sim4p, Mis12p und Mal2p assoziieren mit der zentralen Kernregion des Zentromers (Saitoh et al., 1997; Goshima et al., 1999; Jin et al., 2002; Pidoux et al., 2003). Sie sind essentiell für die Ausbildung und den Erhalt der strukturellen Organisation dieses Zentromerbereiches. Mutationen in den Zentromerkomponenten der Kernregion führen zur erhöhten Missegregation der Chromosomen (Saitoh et al., 1997; Goshima et al., 1999; Jin et al., 2002). Die Assoziation von Cnp1p und Sim4p an die innere Domäne ist abhängig von Mis6p (Takahashi et al., 2000; Pidoux et al., 2003).

Über den äußeren Bereich der assoziierten Proteinkomplexe des Kinetochors sind die Chromosomen mit den Plusendmikrotubuli der bipolaren Spindel während der Mitose verbunden. Spezielle Proteinkomplexe, die sich an den polaren Enden der dynamischen Kinetochormikrotubuli ausbilden, besitzen eine wichtige Funktion für die Kinetochor-Mikrotubuliverknüpfung. Für Mis12p konnte eine genetische Interaktion mit Dis1p, einer Komponente des Mikrotubuli-Plusendkomplexes, gezeigt werden (Nakaseko et al., 2001).

### 3.3 Der mitotische Spindelfaserapparat

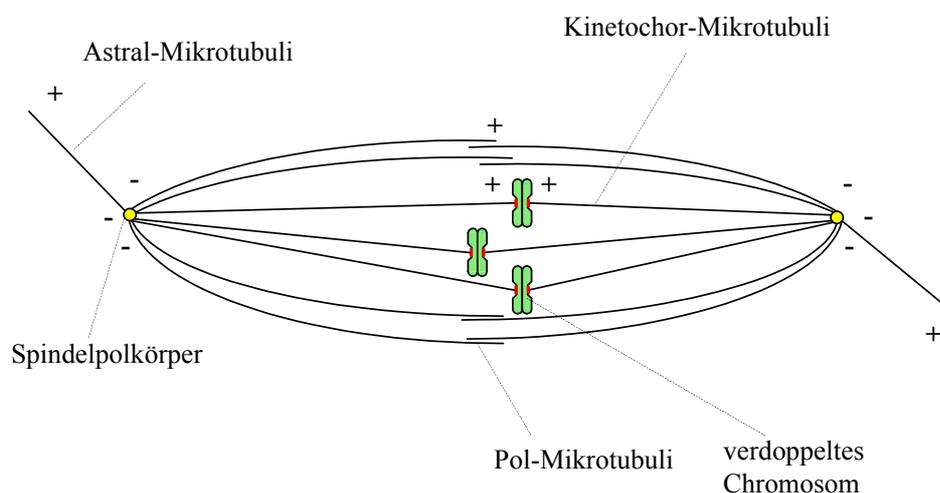
Mit Eintritt in die Mitose werden die röhrenförmigen Mikrotubulistrukturen des Zytoskeletts zum mitotischen Spindelfaserapparat umorganisiert, der zwischen den Spindelpolkörpern der Spaltheife, dem Zentrosomenäquivalent der höheren Eukaryonten, ausgebildet wird (Übersichtsartikel Hagan et al., 1998; Masuda et al., 1992; Ding et al., 1997; Hagan et al., 2000). Der Spindelpolkörper umfaßt eine Reihe von Proteinen, zu denen auch das  $\gamma$ -Tubulin zählt. Vermutlich sind  $\gamma$ -Tubulinkomplexe die Nukleationsstellen für die wachsenden Mikrotubuli der Spindel (Horio et al., 1991; Horio et al., 1994; Masuda et al., 1996; Gunawardane et al., 2000). Auch unterschiedliche Proteine, die strukturelle oder regulatorische Funktionen für die bipolare Spindel besitzen, sind Komponenten des Spindelpolkörpers (Hagan et al., 1995; Nabeshima et al., 1995; Ohkura et al., 1995; Bridge et al., 1998). Daher kann ein Funktionsverlust wichtiger Proteine des Spindelpolkörpers zu Fehlern im Aufbau und der Funktion der bipolaren Spindel führen (Hagan et al., 1990; Hagan et al., 1995).

Die Spindelpolkörper der Spaltheife werden während der späten G<sub>2</sub>-Phase des Zellzyklus im Zytoplasma verdoppelt, bleiben jedoch bis zum Beginn der Ausbildung einer bipolaren mitotischen Spindel miteinander verbunden (Ding et al., 1997). Im Gegensatz zu den höheren Eukaryonten bleibt die Kernmembran während der gesamten Mitose erhalten und die Zellen durchlaufen eine geschlossene Mitose. Durch eine besondere Öffnung in der Kernmembran, eine sogenannte Fenestra-Struktur (lat. Fenster), werden sie jedoch in die Kernmembran integriert (Balczon et al., 1996; Ding et al., 1997). Unter Ausbildung des bipolaren Spindelapparates wandern die Spindelpolkörper zu den gegenüberliegenden Polen des Zellkerns.

Die mitotische Spindel ist ein dynamisches System, das aus Tubulindimeren mit einer globulären  $\alpha$ - und  $\beta$ -Proteinuntereinheit besteht (Adachi et al., 1986; Yanagida et al., 1987). Während das Minusende der Mikrotubulistrukturen am Spindelpolkörper stabilisiert wird, verlängern sich die Mikrotubuli durch Anlagerung bevorzugt an das Plusende von GTP-tragendem Tubulindimeren bzw. verkürzen sich durch Dissoziation von Tubulindimeren (Desai et al., 1997). Diese Veränderungen der Mikrotubulistrukturen wurden als dynamische Instabilität beschrieben (Mitchison et al., 1984). Die Dynamik der Mikrotubulistrukturen wird durch stabilisierende und destabilisierende Faktoren beeinflusst (Übersichtsartikel Walczak, 2000). Sie ist essentiell für die Funktion der Spindel. Durch dynamische Mikrotubulistrukturen wird der Kontakt zwischen den Plusenden der Mikrotubuli und den Kinetochoren der Chromosomen hergestellt. Veränderungen der Spindelstrukturen und der auf die Chromosomen einwirkenden Kräfte bewirken durch Zug- und Gegenzug eine Anordnung der Chromosomen in der Äquatorialebene der Zellen. Schließlich werden im Verlauf der

Anaphase die Schwesterchromosomen unter Verkürzung der Kinetochor-Mikrotubuli bzw. Verlängerung der Pol-Mikrotubuli zu den Zellpolen verschoben.

Der bipolare Spindelfaserapparat besteht aus Bündeln verschiedener tubulärer Mikrotubuli-Strukturen mit unterschiedlicher Ausrichtung in der Zelle, die jeweils spezifische Funktionen übernehmen (siehe Abbildung 2; Tanaka et al., 1986; Ding et al., 1997). Es wird zwischen den kerngerichteten Pol- bzw. Kinetochor-Mikrotubuli und den zur zytoplasmatischen Seite des Spindelpolkörpers gerichteten Astral-Mikrotubuli unterschieden. Die Pol-Mikrotubuli erstrecken sich vom Spindelpolkörper ausgehend zur Kernmitte. Dabei überlagern sich die Pol-Mikrotubuli gegenüberliegender Spindelpolkörper in der Äquatorialebene (Ding et al., 1993; Mastrorade et al., 1993). Die Kinetochor-Mikrotubuli erstrecken sich zwischen dem Spindelpolkörper und den Chromosomen. Sie vermitteln die Verknüpfung zwischen dem Spindelpolkörper und dem Kinetochor des Chromosoms (Hagan et al., 1988; McDonald et al., 1992; McEwen et al., 1997). Die Astral-Mikrotubuli sind von der zytoplasmatischen Seite des Spindelpolkörpers zur Zellperipherie gerichtet. Sie stellen den Kontakt zur Zellrinde her und sind wichtig für die Ausrichtung der Spindel innerhalb der Zelle (Hagan et al., 1988; Alfa et al., 1990; Stearns, 1997). Zwischen den Spindelpolen wird ein dynamisches Kräftegleichgewicht erzeugt, welches ein Ausrichten der Chromosomen innerhalb des Zellkerns ermöglicht und ein Kollabieren der Spindel verhindert (Goldstein et al., 1993; Hagan et al., 1996).



**Abbildung 2: Der mitotische Spindelapparat**

Drei verdoppelte Chromosomen mit roten Kinetochorregionen und der mitotische Spindelapparat sind zu Beginn der Metaphase schematisch dargestellt. Von den gegenüberliegenden Spindelpolkörpern gehen verschiedene Mikrotubulistrukturen aus. Pol-Mikrotubuli überlagern sich in der Zellmitte. Kinetochor-Mikrotubuli verlaufen vom Spindelpolkörper zum Kinetochor. Die Astral-Mikrotubuli sind von den Spindelpolkörpern nach außen gerichtet.

Kommt es beispielsweise zu einem Funktionsverlust der Tubulinuntereinheiten der Mikrotubulistrukturen, so wird keine mitotische Spindel aufgebaut (Umesono et al., 1983). Neben den Tubulinen ist noch eine Vielzahl von Mikrotubuli-assoziierten Proteinen (MAPs) am Aufbau und der Funktion einer bipolaren mitotischen Spindel für die präzise Segregation der Chromosomen beteiligt. Sie interagieren direkt oder indirekt mit den Mikrotubuli und beeinflussen die strukturelle Organisation der Spindel oder die Dynamik ihrer Mikrotubulistrukturen. So wird beispielsweise durch Kinesin-ähnliche Motorproteine die Verknüpfung und das Verschieben antiparalleler Pol-Mikrotubuli zur Generierung der Spindelspannung und Segregation der Schwesterchromosomen ermöglicht (Übersichtsartikel von Barton et al., 1996; Hagan et al., 1992; Pidoux et al., 1996; Jeong et al., 2002). Die Motorproteine sind zusätzlich an der Bewegung der Chromosomen entlang verkürzender mitotischer Spindelstrukturen beteiligt (Übersichtsartikel von Barton et al., 1996; Manning et al., 2000; Steinberg et al., 2000). Im Vergleich dazu stehen die MAPs ohne molekulare Motorfunktion, die sowohl entlang der Mikrotubulstruktur bzw. durch spezifische Bindung an die Enden deren Dynamik und Stabilität beeinflussen.

Einige MAPs assoziieren mit dem Plusende wachsender Mikrotubulistrukturen und sind Bestandteil spezifischer Proteinkomplexe dieser polaren Enden. Es wird angenommen, daß die Plusendkomplexe die Dynamik der Mikrotubuli bzw. ihre Interaktion mit unterschiedlichen Zellkomponenten beeinflussen. Die Interaktion von Vertretern unterschiedlicher evolutionär konservierter Proteinfamilien mit der Zellmembran, Transportvesikel oder den Chromosomen wurden in diesem Zusammenhang beschrieben (Übersichtsartikel von Schuyler et al., 2001).

Die Vertreter der CLIP-170 Familie binden spezifisch an das Plusende wachsender Mikrotubulistrukturen und beeinflussen deren Dynamik (Perez et al., 1999; Brunner et al., 2000). Außerdem wurde für das namensgebende menschliche Protein CLIP-170 eine Assoziation mit nicht bipolar verknüpften Kinetochoren in der Prometaphase beschrieben (Dujardin et al., 1998). Eine Beteiligung an der Ausbildung der Verknüpfung zwischen den Kinetochoren und den Plusenden der Mikrotubuli in der Mitose wird angenommen. Auch das homologe Bik1 Protein aus *S. cerevisiae* wird in polyploiden Zellen vermutlich für die Ausbildung der Kinetochor-Mikrotubuli-Verknüpfung benötigt (Lin et al., 2001). Eine Assoziation von Bik1 mit mitotischen Mikrotubulistrukturen und der Zentromer-DNA wurde gezeigt.

Eine weitere Gruppe von Mikrotubuli-assoziierten Proteinen mit wichtiger Bedeutung für die Dynamik und Organisation der bipolaren Spindel ist die evolutionär konservierte

CLASP/MAST/Orbit/Stu1-Familie (Pasqualone et al., 1994; Inoue et al., 2000; Lemos et al., 2000; Akhmanova et al., 2001). Die CLASP Proteine wurden durch Interaktion mit Mitgliedern der CLIP-170 Proteinfamilie identifiziert (Akhmanova et al., 2001). Verlust der evolutionär konservierten Proteinfunktion führt zu Spindeldefekten in der Mitose. Neben ihrer Funktion für die Zellbewegung und das polarisierte Wachstum wurde eine wichtige Beteiligung im Rahmen der Mitose in der Funktion nachgewiesen. Für das Humanprotein CLASP1 konnte eine Assoziation mit den Plusenden wachsender Mikrotubuli und dem Kinetochor gezeigt werden (Maiato et al., 2003). Auch das MAST/Orbit Gen von *Drosophila melanogaster* kodiert für ein Mikrotubuli-assoziiertes Protein mit essentieller Bedeutung für den Aufbau der bipolaren mitotischen Spindel und für eine korrekte Kinetochor-Mikrotubuli-Verknüpfung (Inoue et al., 2000; Lemos et al., 2000; Maiato et al., 2002). Das homologe Stu1 Protein aus *S. cerevisiae* bindet an die interpolaren Mikrotubulistrukturen der Spindel und besitzt essentielle Bedeutung für die Erzeugung der Spindelspannung (Yin et al., 2002).

Die Spaltheftproteine Alp14p und Dis1p sind Mitglieder der evolutionär konservierten TOG/XMAP215-Proteinfamilie, welche die Dynamik von Mikrotubulistrukturen stabilisierend beeinflusst (Nabeshima et al., 1995; Wang et al., 1997; Charrasse et al., 1998; Cullen et al., 1999; Nakaseko et al., 2001). Als Bestandteil von Proteinkomplexen, die am Ende der Mikrotubuli assoziieren, sind sie vermutlich an der Ausbildung der Kinetochor-Mikrotubuli-Verknüpfung beteiligt (Gard et al., 1987; Vasquez et al., 1994; Garcia et al., 2001). Für die Spaltheftproteine Alp14p und Dis1p konnte eine Assoziation mit dem Zentromer in der Metaphase des Zellzyklus nachgewiesen werden (Garcia et al., 2002).

Auch die Mitglieder der EB-1 Proteinfamilie, zu denen das in dieser Arbeit untersuchte Mal3p gehört, assoziieren mit mitotischen Mikrotubulistrukturen. Ihre Bedeutung für die Funktion und Dynamik der Tubulinstrukturen wird im folgenden Teil detaillierter dargestellt.

### **3.4 Die evolutionär konservierte Gruppe der EB-1 Proteine**

Die EB-1 Proteinfamilie steht für eine evolutionär konservierte Gruppe von Proteinen, die mit den zytoplasmatischen und mitotischen Mikrotubulistrukturen der Zelle interagieren. Vertreter dieser Gruppe von Mikrotubuli-assoziierten Proteinen wurden bereits in verschiedenen eukaryontischen Organismen beschrieben (Übersichtsartikel Tirnauer et al., 2000; Su et al., 1995; Lu et al., 2001; Rehberg et al., 2002; Tirnauer et al., 2002b). Während in einfachen Eukaryonten meist nur ein Vertreter dieser Proteinfamilie charakterisiert wurde, treten bei den höheren Eukaryonten Genfamilien auf (Su et al., 1995; Beinhauer et al., 1997; Renner et al., 1997; Schwarz et al., 1997; Bu et al., 2001).

Das humane EB-1 Protein wurde aufgrund seiner Interaktion mit dem carboxy-terminalen Bereich des Adenomatous Polyposis Coli (APC) Tumorsuppressorproteins identifiziert (Su et al., 1995). Somatische oder germinale Mutationen im menschlichen APC Gen, die meist den carboxy-terminalen Bereich betreffen, können die Ausgangsbasis für die Entwicklung eines Dickdarmkarzinoms bilden (Grodin et al., 1991; Nishisho et al., 1991; Polakis et al., 1997). Ein Zusammenhang mit der autosomal dominant erblichen Krankheit der Familiären Polyposis coli (FAP) wurde beschrieben (Ichii et al., 1992; Kinzler et al., 1996). Ein APC Homolog für die Hefe ist nicht bekannt.

Neben den Mitgliedern der EB-1 Familie, die entlang der zytoplasmatischen und mitotischen Mikrotubulstrukturen binden, wurde für einige EB-1 Proteine eine Konzentrierung an den Plusenden der Mikrotubulstrukturen nachgewiesen (Tirnauer et al., 1999; Berrueta et al., 1998; Morrison et al., 1998; Juwana et al., 1999; Mimori-Kiyosue et al., 2000; Rehberg et al., 2002; Beuter et al., unveröffentlicht). Neben der Modulation der Mikrotubulidynamik beeinflussen sie auch spezifisch die Bindung anderer Proteine an das Plusende der Mikrotubulstrukturen (Askham et al., 2000; Browning et al., 2003).

Für die Proteine der EB-1 Familie wurde eine Beteiligung an unterschiedlichen Zellprozessen gezeigt. Sie haben eine Bedeutung für das polarisierte Wachstum und die Ausbildung spezifischer Teilungsachsen in unterschiedlichen Organismen (Beinhauer et al., 1997; Lu et al., 2001; Rogers et al., 2002; Browning et al., 2003; Beuter et al., unveröffentlicht). So ist zum Beispiel das nichtessentielle Bim1 Protein der Bäckerhefe Teil eines Proteinkomplexes, der die Spindel in teilenden Hefezellen korrekt positioniert (Schwarz et al., 1997; Hwang et al., 2003). Der mit den Mikrotubuli interagierende Proteinkomplex nutzt zur Ausrichtung der Spindel die polarisierten Aktinkabel der Hefezelle. Die Deletion von *BIM1* führt zu verkürzten zytoplasmatischen Mikrotubulstrukturen und einer fehlerhaften Positionierung der mitotischen Spindel (Tirnauer et al., 1999). In *Drosophila melanogaster* trägt das EB-1 Homolog zur Ausbildung der Teilungsachse in Embryonalzellen bei und ist auch hier für die Positionierung der mitotischen Spindel von großer Bedeutung (Lu et al., 2001; Rogers et al., 2002). Dies zeigt, daß die Mitglieder der EB-1 Familie auch eine wichtige Bedeutung im Rahmen der Mitose besitzen. Verlust der Proteinfunktion führt zu vielfältigen Defekten im Aufbau und der Funktion des mitotischen Spindelapparates und zu einer unpräzisen Segregation der Chromosomen (Beinhauer et al., 1997; Schwarz et al., 1997; Lengauer et al., 1998; Rehberg et al., 2002; Rogers et al., 2002). Für das Humanhomolog EB-1 und APC wird eine Beteiligung an der Ausbildung und Stabilisierung von Kinetochor-Mikrotubuli-Verknüpfungen vermutet (Fodde et al., 2001; Kaplan et al., 2001). Auch die Assoziation des

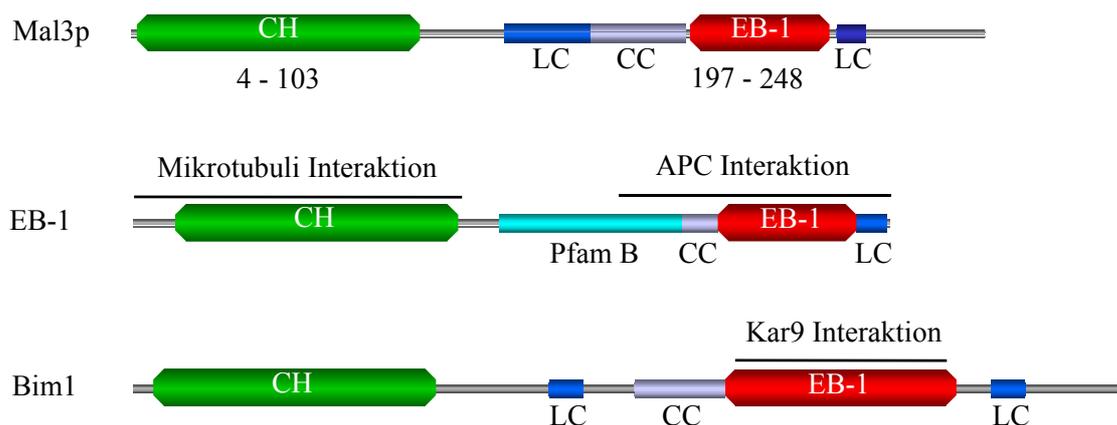
EB-1 Familienmitgliedes von *Dictyostellium discoideum* mit den Strukturen des Kinetochor wurde beschrieben (Rehberg et al., 2002).

### 3.5 Das Spaltheferprotein Mal3p ist Mitglied der evolutionär konservierten EB-1 Proteinfamilie

Ausgangspunkt dieser Arbeit ist das Spaltheferprotein Mal3p, welches durch die Arbeiten in unserem Labor als erstes Homolog zum humanen EB-1 Protein identifiziert und charakterisiert wurde (Beinhauer et al., 1997). Das EB-1 Homolog der Bäckerhefe ist das Bim1 Protein (Schwarz et al., 1997). Nach Angaben der Datenbank zeigen die beiden Proteine eine Identität von mehr als 34 % zum humanen EB-1 Protein und weisen den Besitz konservierter Proteindomänen auf (siehe Abbildung 3; Bu et al., 2003; Hayashi et al., 2003). Auch die funktionelle Konservierung innerhalb der EB-1 Proteinfamilie wurde bereits bestätigt. So kann die Expression des menschlichen Homologs EB-1 in der Spaltheife den Funktionsverlust einer *mal3*<sup>+</sup> Deletion ausgleichen (Beinhauer et al., 1997; Browning et al., 2003).

Das 35 kDa große, nichtessentielle Mal3p Protein der Spaltheife assoziiert mit zytoplasmatischen und mitotischen Mikrotubulstrukturen. Es lokalisiert dabei sowohl entlang der Mikrotubulstrukturen als auch an deren Plusenden (Beinhauer et al., 1997; Browning et al., 2003; Beuter et al., unveröffentlicht).

Das Protein besitzt eine wichtige Bedeutung für zwei grundlegende Prozesse der Spaltheife. Einerseits übernimmt das Mal3p Protein eine wichtige Funktion für das polarisierte



**Abbildung 3: Proteindomänenvergleich verschiedener Mal3p Homologe**

Der Vergleich der Proteine Mal3p (Spaltheife), EB-1 (Mensch) und Bim1 (Bäckerhefe) zeigt das Vorkommen einer konservierten N-terminalen Calponin-Homologiedomäne und einer C-terminalen EB-1 Domäne. Bereiche des Proteins, für die spezifische Interaktionen bekannt sind, werden durch Striche gekennzeichnet. Die Abbildung wurde der Datenbank entnommen und modifiziert. Abkürzungen: CH= Calponin-Homologiedomäne, CC= Coiled Coil-Struktur, LC= Bereiche geringer Komplexität, PfamB= Region mit Ähnlichkeit bei einigen Mitgliedern der EB-1 Familie

Wachstum der zylindrischen Spalthefezellen (Browning et al., 2003; Beuter et al., unveröffentlicht). Im Vergleich zu den zylindrischen Wildtypzellen sind die Zellen des Deletionsstammes gebogen oder weisen zusätzliche Verzweigungen auf (Beinhauer et al., 1997). Die zytoplasmatischen Mikrotubulibündel sind stark verkürzt und erstrecken sich nicht mehr bis in die Zellenden. Die Deletion oder Mutation im *mal3<sup>+</sup>* Gen führt zur Hypersensitivität gegenüber der Mikrotubuli-destabilisierenden Chemikalie Thiabendazol (TBZ). Es wird vermutet, daß das Mal3p Protein die zytoplasmatischen Mikrotubulistrukturen stabilisiert und die korrekte Ausbildung wichtiger Proteinkomplexe an deren Enden ermöglicht (Beinhauer et al., 1997; Browning et al., 2003). Die hohe Dynamik und die Funktionalität der Mikrotubulistrukturen sind wichtig für die Ausbildung der Wachstumszonen der Zellen (Übersichtsartikel Hayles et al., 2001; Mata et al., 1997).

Andererseits besitzt das Mal3p Protein eine wichtige Funktion für die korrekte Segregation der Chromosomen in der Mitose. Der Gendefekt der *mal3-1* Mutante führt zu einer erhöhten genetischen Instabilität (Beinhauer et al., 1997). Fehlerhafte Verknüpfungen der Chromosomen mit der mitotischen Spindel wurden beobachtet (eigene Daten, unveröffentlicht). Zusätzlich ist der Anteil der Zellen mit kondensierten Chromosomen beim *mal3-1* Stamm im Vergleich zum Wildtyp erhöht (Beinhauer et al., 1997). Dies könnte ein Hinweis für die Aktivierung des Spindelkontrollpunktes sein. Der Spindelkontrollpunkt ist ein evolutionär konserviertes Kontrollsystem, welches sowohl Schädigungen im Aufbau des Spindelapparates, als auch die bipolare Kinetochor-Mikrotubuli-Verknüpfung während der Mitose überprüft (Übersichtsartikel von Gardner et al., 2000). Defekte führen zu einer Aktivierung dieses Kontrollpunktes und dadurch bedingt zu einem transienten Arrest in der Metaphase des Zellzyklus. Auch die Deletion des homologen Proteins in *Dictyostellium discoideum* führt zu mitotischen Spindeldefekten und einer Verzögerung im Zellzyklus (Rehberg et al., 2002).

Durch immunfluoreszenz-mikroskopische Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß sich mitotische Spindeln des *mal3<sup>+</sup>* Deletionsstammes schwächer anfärben lassen als vergleichbare Kontrollspindeln (Beinhauer et al., 1997). Vermutlich setzen sich die mitotischen Spindeln des *mal3<sup>+</sup>* Deletionsstammes aus weniger Mikrotubulibündeln zusammen als die des Wildtyps. Zellen, die *mal3<sup>+</sup>* überexprimieren, zeigen deutliche Defekte bei der Ausbildung der bipolare Spindel (Beinhauer et al., 1997). Abnormale Spindelstrukturen sind auch für Deletionen anderer Homologe der EB-1 Familie bekannt (Schwarz et al., 1997; Rehberg et al., 2002; Rogers et al., 2002). Die genaue Bedeutung dieses Mikrotubuli-assoziierten Proteins für die Funktion und den Aufbau der mitotischen Spindel konnte bisher nicht ermittelt werden.

### 3.6 Zielsetzung dieser Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit war es, die mitotische Funktion des Mal3p Proteins der Spaltheefe *Schizosaccharomyces pombe* in der Mitose näher zu analysieren und Proteine, die mit dem Mal3p Protein interagieren, zu identifizieren und zu charakterisieren. Zu Beginn dieser Arbeit wurde dafür ein sehr umfangreich ausgelegter extragener Multikopie-Suppressorscreen der *mal3-1* Mutantenphänotypen durchgeführt. Neue Suppressoren, die den Chromosomenverlust und dadurch auch die mitotischen Defekte des *mal3-1* Stammes ausgleichen konnten, sollten so identifiziert werden. Verschiedene Proteine, die offensichtlich als Komponenten des Zentromers oder der mitotischen Spindel eine wichtige Bedeutung für die Chromosomensegregation haben, wurden ermittelt. Der Suppressor *spc7<sup>+</sup>*, der für ein neues Zentromerprotein der Spaltheefe kodiert, wurde für eine detailliertere Analyse ausgewählt. Auch eine Funktionsanalyse des Mal3p Proteins und die Ermittlung der genetischen Interaktion zwischen *mal3Δ* und veränderten Genen ausgewählter Komponenten des Zentromers, des Mikrotubuli-Plusendkomplexes und Komponenten des Spindelkontrollpunktes haben zur Klärung der mitotischen Mal3p Funktion beitragen.

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Chemikalien

<b>Chemikalie</b>	<b>Lieferant</b>
Adenin	Roth (Karlsruhe)
Agar	Difco (USA)/Gibco (Schottland)
Agarose	BMA (USA)
Ammoniumacetat	Roth (Karlsruhe)
Ammoniumchlorid	Roth (Karlsruhe)
Ammoniumsulfat	Roth (Karlsruhe)
Ampicillin	Grünenthal (Aachen)
Bacto Agar	Difco (USA)
Bacto Trypton	Difco (USA)
Bacto yeast nitrogen base (YNB)	Difco (USA)
Biotin	Sigma (Deisenhofen)
Borsäure	Roth (Karlsruhe)
Bovines Serum-Albumin (BSA)	Roth (Karlsruhe)
5-Bromo-4-Chloro-3-indoxyl- $\beta$ -D-galactopyranosid (X-Gal)	Serva (Heidelberg)
Bromphenolblau	Fluka (Buchs)
Casein Pepton	Gibco (Schottland)
Chloroform	Roth (Karlsruhe)
D(+)-Glukose	Roth (Karlsruhe)
DAPI (4,6-Diamidino-2-Phenylindol)	Boehringer (Mannheim)
di-Natriumhydrogenphosphat	Roth (Karlsruhe)
N,N-Dimethylformamid	Roth (Karlsruhe)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma (Deisenhofen)
Na-Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Roth (Karlsruhe)
EGTA	Sigma (Deisenhofen)
Eisenchlorid	Sigma (Deisenhofen)
Essigsäure	Roth (Karlsruhe)
Ethanol, technisch (96 %)	Roth (Karlsruhe)
Ethidiumbromid	Roth (Karlsruhe)
Geneticinsulfat (G418)	Calbiochem (USA)
Glutaminsäure	Sigma (Deisenhofen)
Glutaraldehyd	Fluka (Buchs)
Glycerin	Roth (Karlsruhe)
Glycin	Roth (Karlsruhe)
Harnstoff	Serva (Heidelberg)
Hefeextrakt	Difco (USA)
Histidin	Roth (Karlsruhe)
Inositol	Sigma (Deisenhofen)
Isopropanol	Roth (Karlsruhe)
Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Stehelin (Basel)
Kaliumacetat	Merck (Darmstadt)
Kaliumchlorid	Roth (Karlsruhe)

---

<b>Chemikalie</b>	<b>Lieferant</b>
Leucin	Roth (Karlsruhe)
Lithiumacetat	Roth (Karlsruhe)
Lithiumchlorid	Roth (Karlsruhe)
Lysin	Roth (Karlsruhe)
Magnesiumchlorid	Roth (Karlsruhe)
Manganchlorid	Aldrich
Magnesiumsulfat	Merck (Darmstadt)
Maleinsäure	Sigma (Deisenhofen)
Mangansulfat	Sigma (Deisenhofen)
Malzextrakt	Difco (USA)
Methanol	Roth (Karlsruhe)
Mineralöl	Sigma (Deisenhofen)
Molybdänsäure	Sigma (Deisenhofen)
N,N-Dimethylformamid	Merck (Darmstadt)
N-Lauroylsarcosin	Sigma (Deisenhofen)
Natriumacetat	Roth (Karlsruhe)
Natriumazid	Fluka (Buchs)
Natriumchlorid	Roth (Karlsruhe)
Natriumdihydrogenphosphat	Roth (Karlsruhe)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth (Karlsruhe)
Natriumhydroxid	Roth (Karlsruhe)
Natrium-Pantothensäure	Sigma (Deisenhofen)
Natriumsulfat	Sigma (Deisenhofen)
Paraformaldehyd	Fluka (Buchs)
Phenol	Roth (Karlsruhe)
Phthalsäure	Sigma (Deisenhofen)
Piperazin-N,N'-bis (2-ethansulfonsäure) (PIPES)	Sigma (Deisenhofen)
Polyethylenglycol 3350 (PEG)	Roth (Karlsruhe)
Propidiumjodid	Sigma (Deisenhofen)
Salzsäure	Roth (Karlsruhe)
Sorbitol	Roth (Karlsruhe)
Thiamin	Sigma (Deisenhofen)
Tris- (hydroxymethyl) -aminomethan (Tris)	Roth (Karlsruhe)
Triton	Sigma (Deisenhofen)
Tryptophan	Roth (Karlsruhe)
Thiabendazol	Sigma (Deisenhofen)
Uracil	Roth (Karlsruhe)
Xylencyanol	Serva (Heidelberg)
Zinksulfat	Sigma (Deisenhofen)
Zitronensäure	Sigma (Deisenhofen)

---

## 4.2 Enzyme

### 4.2.1 Restriktionsendonukleasen

Enzym	Hersteller
<i>AatII</i>	Fermentas (Litauen)
<i>Acc65I</i>	Fermentas (Litauen)
<i>AccI</i>	Fermentas (Litauen)
<i>BamHI</i>	Fermentas (Litauen)
<i>BclI</i>	Fermentas (Litauen)
<i>DraI</i>	Biolabs (USA)
<i>EaeI</i>	Biolabs (USA)
<i>EcoRI</i>	Fermentas (Litauen)
<i>EcoRV</i>	Fermentas (Litauen)
<i>HincII</i>	Fermentas (Litauen)
<i>HindIII</i>	Fermentas (Litauen)
<i>MscI</i>	Biolabs (USA)
<i>NotI</i>	Fermentas (Litauen)
<i>PaulI</i>	Fermentas (Litauen)
<i>PstI</i>	Fermentas (Litauen)
<i>SacI</i>	Fermentas (Litauen)
<i>SalI</i>	Fermentas (Litauen)
<i>SmaI</i>	Fermentas (Litauen)
<i>SpeI</i>	Biolabs (USA)
<i>StuI</i>	Biolabs (USA)
<i>StyI</i>	Biolabs (USA)
<i>XbaI</i>	Fermentas (Litauen)
<i>XhoI</i>	Fermentas (Litauen)

### 4.2.2 Polymerasen, modifizierende Enzyme

Enzym	Hersteller
Alkalische Phosphatase	Boehringer (Mannheim)
$\beta$ -Glucuronidase	Sigma (Deisenhofen)
<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase	Promega (USA)
<i>Pfx</i> -DNA-Polymerase	Gibco (Schottland)
RNaseA	Sigma (Deisenhofen)
T4-DNA-Ligase	Fermentas (Litauen)
T4-DNA-Polymerase	Fermentas (Litauen)
Taq-DNA-Polymerase	Eigene Herstellung
Zymolyase	Seikagaku (Japan)

### 4.3 Sonstige Materialien

Material	Firma
λ-Phagen DNA	Fermentas (Litauen)
Diafilm, Ektachrome 50	Kodak (USA)
Eppendorf Reaktionsgefäße	Eppendorf (Kromburg)
Geneclean-Kit	Bio101 (USA)
Nucleo Spin Extraktionskit	Macherey & Nagel (Düren)
Glasperlen (0,45-0,5 mm)	B.Braun (Melsungen)
Heringssamen-DNA	Sigma (Deisenhofen)
Nylonmembran	Millipore (USA)
Nylonmembranfilter	Boehringer (Mannheim)
Whatman Papier (3MM)	Schleicher & Schüll (Dassel)

### 4.4 Oligonukleotide

Nummer	Name	Sequenz (5'-3')	Verwendungszweck
23	spc5prime	ATG CCA ACA TCG CCT CGT CGC AAT AGT ATA GCG ACG ACC GAT AAT GTT ATA GGA AGA AAC AAA AGT AGG AAG CGT CCA CAC TCG GAT CCC CGG GTT AAT TAA	homologe Rekombination
24	spc3prime	TGT ATT TGT TCC AAA CAG TAA GAC AAG CAG ACG AAA GGG CAT AAG TTG ATG TAC AAT GCA CTT CCG AAA GAG TAT TCG AAT TCG AGC TCG TTT AAA C	homologe Rekombination
28	spc105tag5	ATA CTC TTT CGG AAG TGG TGC ATT GTA CAT CAA CTT ATG CCC TTT CGT CTG CTT GTC TTA CTG TTT GGA ACA AAT ACA GCC GGA TCC CCG GGT TAA TTA A	homologe Rekombination
29	spc105tag3	CTT TAG TAA CAT GTG AAT TAA CGA AAA CGA ATG AAC TAG TAT ACA ACA AGG ATA AAT GAT ATT TCC AAG CGT TAA GCA CAG AAT TCG AGC TCG TTT AAA C	homologe Rekombination
126	del105 5'	ATG AAT GTG GAT GAA AGA AGC CGG ATT GGG GGT AGA GAG AAG GAT CAG CTG AAG CTT CGT ACG C	homologe Rekombination
127	del105 3'	CAA AAG CGC TTC CTC TTC CTC AGT TTG AGT AAT TTT CAC CGG AAA CAA GAG CTT TGC ATA GGC CAC TAG TGG ATC TG	homologe Rekombination
135	spc105 5'tag	TTC CTT CAT TTA CGA AAA GTA GAA TAC ATT TAG AGT TTA CGC GGA TCC CCG GGT TAA TTA AC	homologe Rekombination
136	spc105 3'tag	AAA TTG TTT GAA CTT TCC TGC CGG CGG GGC AGT TAA AAA TCG AAT TCG AGC TCG TTT AAA C	homologe Rekombination
203	tet05'	AAA CAA AGG CTA ATT AGA CAC TAC ACT CAG TGA TTA AGT AGC ATA GGC CAC TAG TGG ATC TG	homologe Rekombination
204	tet03'	TCT CTC TAC CCC CAA TCC GGC TTC TTT CAT CCA CAT TCA TGA TAT CGA ATT CCG AAT TGA TCC	homologe Rekombination
20	mal3del1	GCG GTA CCA CTT TGT AGC CTA GCA TG	Klonierung
21	mal3del2	GCT CTA GAC TCG AGA TGA ATT CCT CTG CAG GA	Klonierung
43	spedipl5'	CGA ACT ATC ATT ACA ATT TCT TAT G	Klonierung
45	spedipl./ges	ACG AAC CAA CTT GAA CAA GTT CAT TCC G	Klonierung
108	spcverk5	CGC GGA TCC ATG AAT GAA CAT GAG AAG TC	Klonierung/Sonden- herstellung
109	spcverk3	TCC CCC GGG CTA GCT GTA TTT GTT CCA AA	Klonierung
176	CDF5prime	ACG CGT CGA CGC ATC AGT TAC TGC GAT ACG TAA CTC	Klonierung/Sonden- herstellung
177	CDFdelORF3prime	GGA ATT CAT ATT AAT GGG AAT GAT TAG CTA TG	Klonierung
178	CDFpartORF3prime	GGA ATT CCA AAT GCA GGT AAT ACA ACT TCC G	Klonierung
179	GFP3prime	GGA ATT CGA GCT CGT TTA AAC TGG ATG	Klonierung
180	GFP5prime	TCC CCC GGG GAG TTT GTA ACA GCT GCT GGG ATT AC	Klonierung

Nummer	Name	Sequenz (5'-3')	Verwendungszweck
181	PMA5prime	TCC CCC GGG ACA CGA ACT TTG TTG TTT TTA GAT T	Klonierung
182	PMA3prime	AAC AAT GGA TCC TGC TTG ATA TTC	Klonierung
25	spever	GCA TCA TCG TAG TCT ACC GT	Verifikation
36	his3a	GAG CCT CTT TGC GAA GGA GCA TTG	Verifikation
37	pad1re	ATG AAA TGT ATA CAC ACT	Verifikation
38	pad1fo	GCT ATT CAT TTG TCT CTA	Verifikation
51	spc/G/K	CTA CCA AAC TAC TGA AGT AG	Verifikation
59	GFP3' ver	CTT TAG TAA CAT GTG AAT TA	Verifikation
74	his3b	CTC TCG CAC AGC GAT AAG GC	Verifikation
79	mal3amprev	AAT TAG ACG GCT CAA ACA CT	Verifikation
85	mal2ampforw	ATG GAC GAT GAA GAA GGC	Verifikation
86	mal2amprev	TAA CGA AGC ATG ACT TTC	Verifikation
105	spe3'	TGT AGA ATT CTC ACA AGG	Verifikation
128	ver105del 5'	TTA TCG AAG CGA AAG TAT GG	Verifikation
129	ver105WT 3'	TAC GAA AGT AAA ACT ATG CA	Verifikation
130	ver105del 3'	GTG TTT TGG TTT CCA AAG GT	Verifikation
133	spckassU5'	GGT AGT GAT ATG GAC ATT GC	Verifikation/Sondenherstellung
141	spe105ver tag	GAT ATA CTA ACT TTA AGA AG	Verifikation
145	spe7delVeri3	TAA TAA TCC GAG CGA AGC CTA	Verifikation
184	verOligo3'	AGT TCC TTC ATC AAG ATG CA	Verifikation
207	spe7cDNA5	TGT GGT AGC GAC TCC TAC TG	Verifikation
208	spe7cDNA3	CTG ATA GGC TTA TCG GCT CG	Verifikation
210	cDNA 5'	GTC AAC GGT GCA ACC AAC AG	Verifikation
216	spe7C5'	GGT GAT ACA TCG TTG GGC GC	Verifikation
227	verdel7	TGT GCA TTT CCT AAT ATA GTA ACG	Verifikation
263	spe7seq5	AAC ACG GTC ATT GGA ATC TC	Verifikation
335 (S. c.)	kanMxreverseprimer	CCT CGA CAT CAT CTG CCC	Verifikation
361 (S. c.)	kanMxStartverprimer	ATT CCA ACA TGG ATG CTG	Verifikation
363 (S. c.)	kanMxforward	GGA TGT ATG GGC TAA ATG	Verifikation
445 (S. c.)	mal3/5'	TAC CAG TCG ACA TGT CTG AAT CTC GGC AAG	Verifikation
606 (S. c.)	mal3OL-1	ACG AAC TCC AGA TTA TCT TGC	Verifikation
734 (S. c.)	9-1JensIC	ACA CGT CGA CTG TAA GCA TT	Verifikation
745 (S. c.)	9-1Jens4W	AGG ATG AGC TCG GAA GTT CC	Verifikation
57	M13for	GTA AAA CGA CGG CCA GT	Sequenzierung
58	M13rev	GGA AAC AGC TAT GAC CAT G	Sequenzierung
98	nmtP	GAT AAT GGA CCT GTT AAT CGA	Sequenzierung
99	nmtT	ATC GTA ATA TGC AGC TTG AAT	Sequenzierung
160	spe7 Seq3	GCG ACT GAT GTA GAA GCA TA	Sequenzierung
112	spesouth	ATT AGC TAC AAA TAA CAC TG	Sondenherstellung
116	south3	TAT GCT GCG CCG AAG CGA CT	Sondenherstellung
117	south4	CAG AAA TTG CAG AGG TT	Sondenherstellung
124	south5	ATG GAA TGG AAT CGT TGT CG	Sondenherstellung
125	south6	TAG TAT TCC TGC AAT ACA AG	Sondenherstellung

(S. c.): Oligonukleotidsammlung *S. cerevisiae* Labor (J. H. Hegemann)

## 4.5 Plasmide

Name	Wichtige genetische Marker, Konstruktion	Nummer
pBSK	pBIISK <sup>+</sup> , Stratagene, Amp <sup>r</sup>	13 (S. c.)
pUR19	<i>ura4</i> <sup>+</sup> , Amp <sup>r</sup>	222
pREP3x	<i>LEU2</i> , Amp <sup>r</sup> , Thiamin-reprimierbarer <i>nmt1</i> <sup>+</sup> Promotor	147
pREP41x	<i>LEU2</i> , Amp <sup>r</sup> , Thiamin-reprimierbarer <i>nmt1</i> <sup>+</sup> Promotor	105
pJR2-3xU	<i>ura4</i> <sup>+</sup> , Amp <sup>r</sup> , Thiamin-reprimierbarer <i>nmt1</i> <sup>+</sup> Promotor	282
pJR2-41xU	<i>ura4</i> , Amp <sup>r</sup> , Thiamin-reprimierbarer <i>nmt1</i> <sup>+</sup> Promotor	286
<i>mal2</i> <sup>+</sup> /pREP3x	<i>mal2</i> <sup>+</sup> <i>S. pombe</i> c-DNA in pREP3x	148
<i>mal2</i> <sup>+</sup> /pUR19	Q11, <i>mal2</i> <sup>+</sup> <i>S. pombe</i> genomische DNA in Vektor pUR19	159
<i>spi1</i> <sup>+</sup> /pUR19	I1, <i>spi1</i> <sup>+</sup> <i>S. pombe</i> genomische DNA in Vektor pUR19	219
pAF1	Plasmid zur Subklonierung des <i>S. pombe his3</i> <sup>+</sup> Gens; <i>his3</i> <sup>+</sup>	163
	<i>pFA6-GFP(S65T)-kanMx6</i> <sup>r</sup>	177
	<i>pFA6a-3HA-kanMx6</i> <sup>r</sup>	179
p9-1	<i>mal3</i> <sup>+</sup> genomische DNA in pUR19	181
	<i>som1</i> <sup>+</sup> genomische DNA in pUR19	182
	<i>mal3</i> <sup>+</sup> in pREP3x	184
	<i>mal3</i> <sup>+</sup> -yEGFP in pREP3x	193
	<i>mal3Δ7</i> in pREP3x	234
	<i>asp1</i> <sup>+</sup> in pREP3x	262
	<i>mph1</i> <sup>+</sup> in pREP3x	264
K19	<i>SPC105</i> in pBSK	437
pAH3	PCR-Vorlage Plasmid <i>loxP-kanMx-loxP-ADH1<sub>t</sub>-tetO<sub>7</sub>-CYC1</i>	892 (S. c.)
pUG6	PCR-Vorlage Plasmid <i>loxP-kanMx-loxP</i>	457 (S. c.)
p423	2 Micron-Plasmid	474 (S. c.)
	<i>SPC105</i> exprimiert vom 2 Micron-Plasmid	434
CD-1 bis CD-85	Suppressorsequenzen <i>mal3-1</i> , genomische <i>S. pombe</i> Bankinsertsequenzen in pUR19	331-415
CD-K1	C-Terminus <i>spc7</i> <sup>+</sup> ORF in pBSK; 2,2 Kb <i>EcoRI/PstI</i> Fragment aus CD-6/pUR19 gerichtet in pBSK kloniert	439
CD-K2	gesamter <i>spc7</i> <sup>+</sup> ORF in pBSK; 2,5 Kb <i>spc7</i> <sup>+</sup> PCR-Fragment (Oligonukleotide 43/45) <i>PstI</i> geschnitten in <i>NotI/PstI</i> geöffneten Vektor CD-K1 kloniert	431
CD-K3	<i>spc7Δ820</i> /pREP3x; 1,6 Kb <i>spc7</i> <sup>+</sup> PCR-Fragment (Oligonukleotide 108/109) <i>SmaI/BamHI</i> geschnitten in Plasmid 147 kloniert	426
CD-K4	<i>spc7Δ820</i> /pREP41x; 1,6 Kb <i>spc7</i> <sup>+</sup> PCR-Fragment (Oligonukleotide 108/109) <i>SmaI/BamHI</i> geschnitten in Plasmid 286 kloniert	427
CD-K5	<i>spc7</i> <sup>+</sup> 5' flankierende DNA-Sequenz in pBSK; 3,3 Kb PCR-Fragment (Oligonukleotide 181/182) <i>SmaI/BamHI</i> in pBSK kloniert	440

Name	Wichtige genetische Marker, Konstruktion	Nummer
CD-K6	<i>GFP-kanMx6</i> -Modulsequenz in CD-K5 kloniert; 1,7 Kb PCR-Fragment auf p177 (Oligonukleotide 179/180) <i>SmaI/EcoRI</i> in CD-K5 kloniert	441
CD-K7	<i>spc7<sup>+</sup></i> 3' flankierende DNA-Sequenz in CD-K6 kloniert; 2 Kb PCR-Fragment (Oligonukleotide 176/177) <i>SalI/EcoRI</i> in CD-K6 kloniert	424
CD-K8	1,6 Kb 3'-Sequenz des <i>spc7<sup>+</sup></i> und 2 Kb 3' flankierende DNA-Sequenz in CD-K6 kloniert; 3,6 Kb PCR-Fragment (Oligonukleotide 176/178) <i>SalI/EcoRI</i> in CD-K6 kloniert	425
CD-K9	<i>mal3Δ127/pBSK</i> ; 0,5 Kb großes partielles <i>mal3<sup>+</sup></i> PCR-Fragment (Oligonukleotide 20/21) <i>Acc65I/XbaI</i> in pBSK kloniert	442
CD-K10	<i>mal3Δ127/pREP3x</i> ; 0,5 Kb großes <i>mal3<sup>+</sup></i> DNA-Fragment <i>BclI/XhoI</i> aus CD-K9 geschnitten und in <i>BclI/XhoI</i> geöffneten Vektor p184 kloniert	416
CD-K11	<i>mal3Δ127-yEGFP/pREP3x</i> ; 0,5 Kb großes <i>mal3<sup>+</sup></i> DNA-Fragment <i>BclI/XhoI</i> aus CD-K9 geschnitten und in <i>BclI/XhoI</i> geöffneten Vektor p193 kloniert	418
CD-K12	<i>SPC105/pREP3x</i> ; 2,7 Kb <i>SPC105</i> DNA-Fragment <i>BamHI/XhoI</i> aus K19 geschnitten und über <i>BamHI/XhoI</i> in Plasmid 282 kloniert	429
CD-K13	<i>SPC105/pREP41x</i> ; 2,7 Kb <i>SPC105</i> DNA-Fragment <i>BamHI/XhoI</i> aus K19 geschnitten und über <i>BamHI/XhoI</i> in Plasmid 286 kloniert	428
CD-K14	Disruption des <i>spc7<sup>+</sup></i> durch <i>his3<sup>+</sup></i> in pBSK; 2 Kb <i>SmaI/HincII his3<sup>+</sup></i> aus Plasmid 163 über <i>MscI/StyI</i> in CD-K2 kloniert/gleiche Orientierung des ORFs	430

(*S. c.*): Plasmidsammlung *S. cerevisiae* Labor (J. H. Hegemann)

#### 4.6 *S. pombe* DNA Banken

Bank	Vektor, wichtige Marker	Herkunft
genomische DNA-Bank	pUR19, <i>ura4<sup>+</sup></i> , Amp <sup>r</sup>	A. M. Carr, Barbet et al., 1992
c-DNA-Bank	pREP3x, <i>LEU2</i> , Amp <sup>r</sup>	C. J. Norbury und B. Edgar, Universität Oxford
c-DNA-Bank	0,4 Kb bis 2,5 Kb c-DNA in pGAPGH, Amp <sup>r</sup>	BD Biosciences Clontech, USA

## 4.7 Stämme

Die Genotypen aller verwendeten Stämme sind nach ihrer Organismenzugehörigkeit in den Kapiteln 4.7.1 bis 4.7.3 zusammengestellt. Neue Hefestämme wurden durch Kreuzung und anschließende Tetradenanalyse erzeugt.

Die Kreuzung der *S. pombe* Stämme erfolgte auf Malzextraktplatten bei 24 °C. Anschließend wurden die Genotypen durch PCR-Analyse, Betrachtung der Zellmorphologie oder gezielte Selektion nach Markergenen bzw. Wachstumstemperaturen ermittelt. In den Fällen, in denen die Doppelmutante letal ist, wurde auf die Genotypen der fehlenden Sporen durch Verfolgung der Segregation verschiedener Marker bei wachsenden Sporen geschlossen.

Zur Analyse des Minichromosomenverlustes eines *asp1*<sup>+</sup> Deletionsstammes wurde das Minichromosom durch Kreuzung des Stammes UFY191 mit dem Stamm UFY103 eingebracht. Im Anschluß an die Tetradenanalyse wurde der Minichromosomenverlust für zwei Stämme, die sich aus den Sporen entwickelt haben, bestimmt.

Zur Klonierung und Amplifikation von Plasmiden wurden die *E. coli* Stämme XL1-blue und GM48 verwendet, während zur Analyse der c-DNA Bank ausschließlich der Bakterienstamm XL1-blue eingesetzt wurde.

### 4.7.1 *S. pombe* Stämme

Name	Genotyp	Herkunft
UFY25CX	<i>h</i> <sup>+</sup> <i>spi1-25 ade6-M210 leu1-32 ura4-D6 his3Δ</i>	U. Fleig
UFY108/YP10.22a	<i>h</i> <sup>+</sup> <i>ade6-M210 ura4-D6 Ch</i> <sup>16</sup> [ <i>ade6-M216</i> ]	U. Fleig
UFY135	<i>h</i> <sup>+</sup> <i>mal3Δ::his3<sup>+</sup> ade6-M210 leu1-32 ura4-D18 his3Δ</i>	U. Fleig
UFY177	<i>h</i> <sup>+</sup> <i>mal2-GFP/Kan<sup>r</sup> ade6-M210 leu1-32 ura4-D6 Ch</i> <sup>16</sup> [ <i>ade6-M216</i> ]	U. Fleig
UFY454	<i>h</i> <sup>+</sup> <i>mal2-1 ura4-D6</i>	U. Fleig
UFYS203	<i>h</i> <sup>-</sup> <i>mal3-1 ade6-M210 leu1-32 ura4-D6 Ch</i> <sup>16</sup> [ <i>ade6-M216</i> ]	U. Fleig
UFYS220	<i>h</i> <sup>-</sup> <i>mal2-1 ade6-M210 leu1-32 ura4-D6</i>	U. Fleig
UFY39	<i>h</i> <sup>+</sup> <i>ade6-M216 leu1-32</i>	P. Nurse
UFY40	<i>h</i> <sup>-</sup> <i>ade6-M210 leu1-32</i>	P. Nurse
UFY103/YP10.22	<i>h</i> <sup>-</sup> <i>ade6-M210 leu1-32 ura4-D6 Ch</i> <sup>16</sup> [ <i>ade6-M216</i> ]	M. Yanagida
UFY129/KG246	<i>h</i> <sup>-</sup> <i>ade6-M210 leu1-32 ura4-D18 his3Δ</i>	K. Gould
UFY130/KG247	<i>h</i> <sup>+</sup> <i>ade6-M210 leu1-32 ura4-D18 his3Δ</i>	K. Gould
UFY131/KG248	<i>h</i> <sup>-</sup> <i>ade6-M216 leu1-32 ura4-D18 his3Δ</i>	K. Gould
UFY132/KG249	<i>h</i> <sup>+</sup> <i>ade6-M216 leu1-32 ura4-D18 his3Δ</i>	K. Gould
UFY138/SS560	<i>h</i> <sup>-</sup> <i>mph1Δ::ura4<sup>+</sup> ade6-M216 leu1-32 ura4-D18</i>	S. Sazer
UFY139/SS638	<i>h</i> <sup>-</sup> <i>mad2Δ::ura4<sup>+</sup> ade6-M210 leu1-32 ura4-D18</i>	S. Sazer
UFY191/KG956	<i>h</i> <sup>+</sup> <i>asp1Δ::ura4<sup>+</sup> ade6-M210 leu1-32 ura4-D18</i>	K. Gould

Name	Genotyp	Herkunft
UFY205	<i>h<sup>-</sup> mis6-302 leu1-32</i>	M. Yanagida
UFY206	<i>h<sup>-</sup> mis12-537 leu1-32</i>	M. Yanagida
UFY332/NK04	<i>h<sup>-</sup> leu1-32 ura4<sup>r</sup> alp14Δ::Kan<sup>r</sup></i>	T. Toda
UFY333	<i>h<sup>-</sup> dis1-288 leu1-32</i>	M. Yanagida
UFY155	<i>h<sup>-</sup> spc7-GFP/Kan<sup>r</sup> ade6-M210 leu1-32 ura4-D6</i>	Eigene Arbeit
UFY194	<i>h<sup>+</sup> asp1Δ::ura4<sup>+</sup> ade6-M210 leu1-32 ura4-Dx Ch<sup>16</sup>[ade6-M216]</i>	Eigene Arbeit
UFY195	<i>h<sup>-</sup> asp1Δ::ura4<sup>+</sup> ade6-M210 leu1-32 ura4-Dx Ch<sup>16</sup>[ade6-M216]</i>	Eigene Arbeit
UFY196	<i>h<sup>-</sup> mal3Δ::his3<sup>+</sup> mph1Δ::ura4<sup>+</sup> ade6-Mx leu1-32 ura4-D18</i>	Eigene Arbeit
UFY210	<i>h<sup>+</sup> spc7-GFP/Kan<sup>r</sup> ade6-M210 leu1-32 ura4-D6 Ch<sup>16</sup>[ade6-M216]</i>	Eigene Arbeit
UFY214	<i>h<sup>-</sup> spc7-HA/Kan<sup>r</sup> ade6-M210 leu1-32 ura4-D6 Ch<sup>16</sup>[ade6-M216]</i>	Eigene Arbeit
UFY223	<i>h<sup>-</sup> mal3Δ::his3<sup>+</sup> mad2Δ::ura4<sup>+</sup> ade6-M210 leu1-32 ura4-D18</i>	Eigene Arbeit
UFY256	<i>h<sup>+</sup> mal3Δ::his3<sup>+</sup> mal2-1 ade6-M210 leu1-32 ura4-Dx</i>	Eigene Arbeit
UFY498	<i>h<sup>+</sup> spc7-HA/Kan<sup>r</sup> mal2-GFP/Kan<sup>r</sup> ade6-M210 leu1-32 ura4-D6</i>	Eigene Arbeit
UFY499	<i>h<sup>+</sup> mal3Δ::his3<sup>+</sup> mis12-537 leu1-32 ura4-D18</i>	Eigene Arbeit
UFY523	<i>h<sup>-</sup> mal3Δ::his3<sup>+</sup> dis1-288 ade6-M210 leu1-32</i>	Eigene Arbeit
UFY533	<i>h<sup>-</sup> mal3Δ::his3<sup>+</sup> mis6-302 ade6-M2x leu1-32</i>	Eigene Arbeit
UFY627	<i>h<sup>-</sup> spc7-HA/Kan<sup>r</sup> ade6-M210 leu1-32 ura4-D6</i>	Eigene Arbeit

Die Stämme 205 und 206 wurden mit dem Stamm 132 rückgekreuzt bevor sie mit dem Stamm 135 gekreuzt wurden.

*Ch<sup>16</sup>[ade6-M216]*: 550 Kb Minichromosom (Niwa et al., 1986)

*ade6-Mx*: *ade6-M210* bzw. *ade6-M16*

*ura4-Dx*: *ura4-D6* bzw. *ura4-D18*

4.7.2 *S. cerevisiae* Stämme

Nummer	Stamm	Genotyp	Herkunft
71	YPH499	<i>MAT<sub>a</sub> ura3-52 ade2-101 trp1Δ63 his3Δ200 lys2-801 leu2Δ1</i>	P. Hieter
72	YPH500	<i>MAT<sub>α</sub> ura3-52 ade2-101 trp1Δ63 his3Δ200 lys2-801 leu2Δ1</i>	P. Hieter
368	FY1679	<i>MAT<sub>a</sub> ura3-52 trp1-63 leu2-Δ1 his3-Δ200 GAL2</i> <i>MAT<sub>α</sub> ura3-52 TRP1 LEU2 HIS3 GAL2</i>	B. Dujon
475	CEN.PK2	<i>MAT<sub>a</sub> leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3-Δ1 MAL2-8c SUC2</i> <i>MAT<sub>α</sub> leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3-Δ1 MAL2-8c SUC2</i>	K.-D. Entian
918	YSH12	<i>MAT<sub>a</sub> ura3-52 trp1-289 leu2-3,112 his3Δ1 bim1::loxP-kanMx-loxP</i>	J. H. Hegemann
995	YUG37	<i>MAT<sub>a</sub> ura3-52 trp1Δ63 GAL2 LEU2-tTA (pCM149 integriert an leu2Δ1)</i>	J. H. Hegemann
1903	995+CF	Isogen zu 995 mit pSH53, <i>MAT<sub>a</sub> ura3-52 trp1Δ63 GAL2 LEU2-tTA (pCM149 integriert an leu2Δ1) CF[CEN6 yEGFP3 CYH<sup>8</sup> 2 URA3 SUP11]</i>	J. H. Hegemann
629	72 <sub>c1</sub>	<i>MAT<sub>α</sub> SPC105-GFP/Kan<sup>r</sup> ura3-52 ade2-101 trp1Δ63 his3Δ200 lys2-801 leu2Δ1</i>	Eigene Arbeit
630	22	Isogen zu <i>S. c.</i> #1903, <i>SPC105(-50, -1)::loxP-kanMx-loxP-tetO<sub>7</sub></i>	Eigene Arbeit
632	24	Isogen zu <i>S. c.</i> #1903, <i>SPC105(-50, -1)::loxP-kanMx-loxP-tetO<sub>7</sub></i>	Eigene Arbeit
633	30	Isogen zu <i>S. c.</i> #1903, <i>SPC105(-50, -1)::loxP-kanMx-loxP-tetO<sub>7</sub></i>	Eigene Arbeit
634	31	Isogen zu <i>S. c.</i> #1903, <i>SPC105(-50, -1)::loxP-kanMx-loxP-tetO<sub>7</sub></i>	Eigene Arbeit
	FY1679/ <i>spc105Δ</i>	<i>spc105::Kan<sup>r</sup> MAT<sub>a</sub> ura3-52 trp1-63 leu2-Δ1 his3-Δ200 GAL2</i> <i>SPC105 MAT<sub>α</sub> ura3-52 TRP1 LEU2 HIS3 GAL2</i>	Eigene Arbeit

4.7.3 *E. coli* Stämme

Stamm	Genotyp	Herkunft
XL1-blue	<i>recA1, lac-, endA1, gyrA46, thi, hsdR17, supE44, relA1, F'</i> <i>(proAB+, lacIq, lacZΔM15, Tn(tet<sup>r</sup>))</i>	Stratagene
GM48	<i>thr, leu, thi, lacY, galK, galT, ara, fhuA, tsx, dam, dcm, supE44</i>	Stratagene

## 4.8 Antikörper

Name	Eigenschaften	Spezifität	Verdünnung	Herkunft
TAT-1	Maus	Alpha-Tubulin	1:5	A. Woods
WA3	Maus	Alpha-Tubulin	1:20	E. Schiebel
FITC	Ziege	Kaninchen IgG	1:200	Sigma (F9887)
FITC	Ziege	Maus IgG	1:200	Sigma (F0257)
Cy3	Schaf	Kaninchen IgG	1:200	Sigma (C2306)
Cy3	Schaf	Maus IgG	1:200	Sigma (C-2181)
GFP	Kaninchen	GFP-Epitop	1:200	Molecular Probes (A-11122)
12CA5	Maus	HA-Epitop	1:50	Roche (1583816)
12CA5	Maus	HA-Epitop	1:200	Covance (USA)

## 4.9 Medien und Wachstumsbedingungen

### 4.9.1 Medien für *S. pombe*

Die *S. pombe* Stämme wurden in Vollmedium (YE5S) oder Minimalmedium mit den entsprechenden Zusätzen angezogen (Moreno et al., 1991). Die verwendeten Minimalmedien unterscheiden sich lediglich in der Art ihrer Stickstoffquelle. Während dem Edinburgh Minimalmedium (EMM) Ammoniumchlorid zugefügt wird, enthält das verwendete Standard-minimalmedium (MM) Glutamaminsäure. Die Anzucht der Stämme erfolgte entweder in flüssigen oder festen Medien durch Zugabe von 20 g Agar pro Liter.

Im Rahmen von seriellen Tropftestuntersuchungen wurden die Hefestämme bei Temperaturen zwischen 20 °C und 37 °C inkubiert. Die Anzucht der Vorkulturen erfolgt grundsätzlich bei 30 °C. Abweichungen ergaben sich nur für temperatursensitive Stämme (24 °C bzw. 28 °C). Die Hypersensitivität gegenüber der Mikrotubuli-destabilisierenden Chemikalie Thiabendazol (TBZ) wurde mittels serieller Tropftests bei 24 °C untersucht. Hierfür wurde dem MM TBZ-Konzentrationen zwischen 5 und 7,5 µg/ml zugesetzt. Für alle seriellen Tropftests wurden von logarithmisch wachsenden Kulturen Verdünnungsreihen mit bidest. H<sub>2</sub>O angesetzt und zwischen 10<sup>4</sup> und 10<sup>1</sup> Zellen auf entsprechende Agarplatten getropft.

Für die Selektion von Kanamycin-resistenten Zellen wurde YE5S mit Zusatz von 100 mg Geneticinsulfat (G418) pro Liter verwendet.

Zur Reprimierung des *nmtI*<sup>+</sup> Promotors bei transformierten Plasmiden wurde das MM mit 5 µg Thiamin pro ml versetzt. Zur Dereprimierung des Promotors wurden die *S. pombe*

Zellen, nach Transformation mit den entsprechenden Plasmiden, für 18 Stunden bei 30 °C bzw. für 24 Stunden bei 24 °C in Selektivmedium ohne Thiamin angezogen. Die Gene, die im direkten Anschluß an den Promotor kloniert wurden, werden auf diese Weise überexprimiert. Zur transienten Arretierung der Zellen in der Metaphase des Zellzyklus wurde *mph1*<sup>+</sup> von Plasmid 264 überexprimiert. Die Zellen wurden nach 18 Stunden Inkubation bei 30 °C für die immunfluoreszenz-mikroskopischen Untersuchungen verwendet.

Um die Minichromosomenverlustrate zu bestimmen, wurden die Zellen selektiv auf Medium ohne Adeninzusatz bei 24 °C angezogen. Jeweils 200 Zellen wurden anschließend auf Minimalmedium mit einer limitierenden Adeninkonzentration von 5 µg/ml ausplattiert und für 10 Tage bei 24 °C inkubiert. Adenin-auxotrophe Kolonien zeigen eine rote Koloniefärbung, Adenin-prototrophe wachsen weiß.

Die Zusätze Geneticinsulfat, Thiamin oder TBZ wurden bei einer maximalen Temperatur des Medium von 50 °C zugegeben.

Für die Herstellung von diploiden *S. pombe* Stämmen und zur Tetradenanalyse wurden haploide Stämme mit unterschiedlichem Paarungstyp auf Malzextraktplatten miteinander gekreuzt.

#### **4.9.2 Medien für *Saccharomyces cerevisiae***

Die Anzucht der in Kapitel 4.7.2 aufgelisteten Stämme erfolgte entweder in Vollmedium YPD oder in synthetischem Minimalmedium SD mit entsprechenden Zusätzen (Kaiser et al., 1994). Das Wachstum der Hefestämme erfolgte bei 30 °C.

Für die Selektion Kanamycin-resistenter Zellen wurde dem Vollmedium 200 mg Geneticinsulfat pro Liter zugesetzt. Für die Untersuchung der Hypersensitivität gegenüber der Mikrotubuli-destabilisierenden Chemikalie Thiabendazol (TBZ) in seriellen Tropftests enthielten die YPD Platten zwischen 40 und 100 µg/ml TBZ.

Die Herstellung diploider *S. cerevisiae* Stämme erfolgte durch Kreuzung haploider Stämme unterschiedlichen Paarungstyps in 75 %igem YPD-Medium. Vegetativ wachsende diploide Stämme auf YPD wurden anschließend in 1 %iger Kaliumacetatlösung zur Sporulation angeregt und die Segregation der Marker durch Tetradenanalyse untersucht.

#### **4.9.3 Medien für *Escherichia coli***

Beim Wachstum der *E. coli* Stämme konnte durch Zugabe von 50 mg/ml Ampicillin zu flüssigem oder festem LB-Medium auf Transformanten selektioniert werden. Für eine Blau/Weiß-Selektion wurde auf den Agarplatten zusätzlich 0,8 mg IPTG und 0,8 mg X-Gal ausgestrichen.

#### 4.10 DNA-Grundtechniken

Verwendete DNA-Klonierungsmethoden, Schritte zur Fällung und Aufreinigung der DNA sowie die Amplifizierung von DNA-Sequenzen durch die Polymerase Kettenreaktion (PCR) wurden nach Standardprotokollen des Maniatis (1989) durchgeführt. Alle in Kapitel 4.2 aufgeführten Enzyme wurden hierbei entsprechend den Standardprotokollen und in Übereinstimmung mit den Herstellerangaben eingesetzt. Die Isolierung eines DNA Fragmentes aus einem Agarosegelstück erfolgte mit dem Nucleo Spin Extraktionskit (Macherey und Nagel). DNA bindet hierbei in Anwesenheit von chaotrophen Salzen an eine Silicamembransäule und kann nach Waschschritten wieder durch bidest. H<sub>2</sub>O eluiert werden. Für die Isolierung größerer DNA-Mengen wurde das Qiagen Midi-Prep Kit verwendet, welches die Bakterienzellen durch alkalische Lyse aufschließt (Ish Horowicz et al., 1981). Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *S. pombe* erfolgte mit Hilfe des „GeneClean-Kit“ der Firma Bio101 gemäß den Herstellerangaben. Auch dieses Kit beruht auf dem Prinzip der DNA-Bindung an eine Silica-Matrix bei hohen Konzentrationen chaotropher Salze.

Zur Gewinnung genomischer DNA aus Hefezellen wurde einem Protokoll von Hoffman gefolgt (Hoffman et al., 1987).

#### 4.11 Transformation

Um eine hohe Effizienz bei der Transformation von *S. pombe* Zellen zu erreichen, wurde die von Okazaki beschriebene Lithiumacetatmethode angewendet (Okazaki et al., 1990). Zur Transformation linearer DNA-Fragmente wurde der zu transformierenden linearen DNA 10 µg Heringsamen-DNA zugefügt. Das Transformationsprotokoll von *S. cerevisiae* Zellen beruht auf den Angaben von Gietz (Gietz et al., 1992).

Die Fähigkeit der Hefe zur homologen Rekombination ermöglicht ein Basenpaar-genaues Integrieren/Deletieren genomischer DNA-Sequenzen durch spezielle DNA-Kassetten. Die eingesetzten DNA-Integrationskassetten wurden sowohl durch eine PCR generiert als auch durch gezielte Restriktionsanalyse aus Plasmiden erhalten.

Die Transformation der Plasmide in die *E. coli* Stämme erfolgte nach den Standardprotokollen des Maniatis (1989). Ligationsansätze wurden durch Elektroporation in kompetente *E. coli* Zellen aufgenommen. Der eingesetzte Biorad-Pulser arbeitet mit einer Spannung von 2,5 kV/1 A bei einem Widerstand von 200 Ω. Für die Amplifizierung aller anderen Plasmide wurde eine "Ein-Minuten"-Transformation mit DMSO-kompetenten *E. coli* Zellen durchgeführt, die sich durch ihre Schnelligkeit aber auch durch eine niedrigere Effizienz auszeichnet.

#### 4.12 Komplementation des *mal3-1* Thiabendazol-hypersensitiven Phänotyps

Zur Identifizierung von extragenen *mal3-1* Suppressoren wurde der *mal3-1* Stamm mit 1 µg DNA einer genomischen *S. pombe* Bank (Barbet et al., 1992) transformiert und für 48 Stunden bei 32 °C auf Ura<sup>+</sup> Transformanten selektiert. Bei der verwendeten Genbank handelt es sich um genomische *S. pombe*-DNA, die partiell mit dem Restriktionsenzym *Sau3A* geschnitten und mittels *SalI*-Erkennungsschnittstelle der "Multiple-Cloning-Site" (MCS) in den Vektor pUR19 kloniert wurde. Die durchschnittliche Insertgröße der genomischen *S. pombe*-DNA liegt bei 4 Kb. Putativ positive Transformanten wurden zweimal auf selektiven Platten mit 7,5 µg/ml TBZ replikaplattiert, bevor ihre Plasmide isoliert und in *E. coli* amplifiziert wurden (Moreno et al., 1991). Das Wachstum auf TBZ-haltigem Medium erfolgte bei 24 °C. Um sicherzustellen, daß die beobachtete Suppression der TBZ Hypersensitivität des *mal3-1* Stammes durch einen ORF auf dem transformierten Plasmid beruht, wurden alle isolierten Plasmide in die Hefe retransformiert. Die isolierte DNA wurde in *E. coli* amplifiziert und anschließend in seriellen Tropftests auf selektiven Platten mit 6,5 µg/ml bzw. 7,5 µg/ml TBZ auf Grad des Ausgleiches der TBZ-Hypersensitivität des *mal3-1* und *mal3Δ* Stammes eingestuft. Zusätzlich wurden alle Suppressoren in einem Farbttest auf die Fähigkeit untersucht, auch den erhöhten Verlust des zusätzlichen 550 Bp großen Minichromosoms auszugleichen (Niwa et al., 1986). Der *mal3-1* Stamm besitzt zusätzlich zum *ade6-210* Allel auf Chromosom III ein *ade6-216* Allel auf dem Minichromosom. Beide Punktmutationen dieser *ade6* Allele führen zur Adenin-Auxotrophie. Zellen, die nur ein Allel exprimieren, bilden rote Kolonien aus. Sind beide Allele in einer Zelle vorhanden, werden die Zellen aufgrund intragener Komplementation ereignisse Adenin-prototroph und die Kolonien zeigen eine weiße Koloniefärbung.

Die Insertsequenzen wurden durch Ansequenzierung mit den Oligonukleotiden 57 und 58 bestimmt (Sequlab, Göttingen bzw. BMFZ, Düsseldorf). Die Identifizierung der isolierten Suppressoren erfolgte durch den Abgleich der Sequenzierungsergebnisse mit der *S. pombe* Datenbank des Wellcome Trust Sanger Institute. Zur Ermittlung von homologen Proteinen wurden weitere Datenbanken genutzt, die im Anhang unter Kapitel 8.7 aufgeführt werden.

Zusätzlich wurden Suppressoren durch gezielte Restriktionsanalyse mit unterschiedlichen Enzymen (*BamHI/HindIII*, *PstI*, *EcoRI*, *XhoI*, *SalI*, *XbaI*, *XhoI/DraI*, *PstI/SalI*, *PstI/SacI*, *StyI/SpeI*, *EcoRI/DraI*, *AccI/EaeI*) bei Erhalten übereinstimmender DNA-Bandenmuster gruppiert und durch PCR-Reaktionen zum Nachweis der bereits bekannten offenen Leserahmen *mal3*<sup>+</sup> (Oligonukleotide 445 und 606), *spc7*<sup>+</sup> (Oligonukleotide 51 und 29), *pad1*<sup>+</sup> (Oligonukleotide 37 und 38), *som1*<sup>+</sup> (Oligonukleotide 745 und 734) identifiziert.

Die Fähigkeit des Suppressorinserts CD-1, die Hypersensitivität des *spi1-25* Stammes gegenüber TBZ auszugleichen, wurde durch serielle Tropftestuntersuchungen auf Selektivmedium mit 7 µg/ml TBZ ermittelt. Die Inkubation der Platten erfolgte für 5 Tage bei 24 °C.

#### 4.13 Verkürzung des *spc7<sup>+</sup>* offenen Leserahmens

Durch Klonierung wurde der ORF für ein N-terminal verkürztes Spc7p Protein erhalten. Anstelle des in der Datenbank mit 1364 Aminosäuren angegebenen Proteins ergibt sich ein verkürztes Protein mit nur 545 Aminosäuren, das 2457 Bp nach dem ursprünglichen Start-Codon beginnt. In einer *Pfu*-DNA-Polymerasereaktion mit den Oligonukleotiden 108 und 109 wurde die DNA-Sequenz für die *spc7<sup>+</sup>* Leserahmenverkürzung amplifiziert. Das 1636 Bp große PCR-Produkt wurde mit den Restriktionsenzymen *Sma*I und *Bam*HI geschnitten und gerichtet in die Vektoren pREP3x und pJR2-41xU kloniert, wodurch die Plasmide CD-K3 und CD-K4 erzeugt wurden.

Die Auswirkung des verkürzten Leserahmens wurde nach Transformation der Plasmide in den *S. pombe* Wildtypstamm UFY103 bzw. den *mal3-1* und *mal3Δ* Stamm in seriellen Tropftestuntersuchungen bestimmt. Zur Dereprimierung des *nmt1<sup>+</sup>* Promotors wurden die Transformanten für 18 Stunden bei 30 °C in Selektivmedium ohne Thiamin angezogen. Das Wachstum unter Niedrig- und Hochexpressionsbedingungen wurde auf Platten mit und ohne TBZ-Konzentrationen zwischen 5,5 µg/ml und 7,5 µg/ml analysiert. Die Inkubation der Platten erfolgte für 4 bzw. 5 Tage bei 24 °C.

#### 4.14 Herstellung von *spc7<sup>+</sup>* Deletionskassetten

Um den 4095 Bp großen *spc7<sup>+</sup>* ORF zu deletieren, wurden mittels PCR-Analyse und Klonierung Deletionskassetten erzeugt, welche Homologie zum *spc7<sup>+</sup>* ORF bzw. den flankierenden Bereichen besitzen. Diese Kassetten sollten nach Transformation in *S. pombe* über homologe Rekombination an den chromosomalen *spc7<sup>+</sup>* Genlocus integrieren. Die erzeugten Kassetten unterscheiden sich durch ihre spezifischen Homologiebereiche und die verwendeten Selektionsmarker (siehe Abbildung 4 und Abbildung 63 bis Abbildung 65 im Anhang). Für die Transformation mit den unterschiedlichen Deletionskassetten wurden die haploiden *S. pombe* Stämme mit den UFY-Nummern 39, 40, 103, 129, 130, 131, 132, sowie diploide Stämme, die sich durch Kreuzung ergaben, verwendet (siehe auch Tabelle 9). Die Selektion erfolgte auf Vollmediumplatten mit Zusatz von 100 mg/ml Geneticinsulfat bzw. auf selektiven EMM-Platten ohne Histidin. Bis zum Herausbilden kleiner Transformantenkolonien wurden die Platten für einige Tage bei 30 °C inkubiert. Putativ

positive diploide Transformanten wurden einer Tetradenanalyse unterzogen. Auf korrekte Integration der Kassetten wurde durch PCR- und Southernblot-Analyse getestet (Abbildung 63 bis Abbildung 65 im Anhang).

#### 4.14.1 Generierung von zwei *spc7<sup>+</sup>* Deletionskassetten mit kurzen Homologiebereichen

Zwei Transformationskassetten mit kurzen Homologiebereichen zum *spc7<sup>+</sup>* ORF und einer *kanMx6*-Modulsequenz, die das Wachstum positiver Transformanten auf Geneticinsulfathaltigen Platten ermöglicht, wurden durch PCR-Reaktionen erzeugt (Bahler et al., 1998; siehe Abbildung 28).

Eine 2460 Bp große *GFP*-Kassette, die neben der *GFP*-Sequenz auch die *kanMx6*-Modulsequenz trägt, wurde mit den Oligonukleotiden 23 und 24 auf Plasmid 177 als DNA-Template amplifiziert. Das verwendete Oligonukleotid 23 besitzt 84 Bp, die homolog zum Start-Codon des *spc7<sup>+</sup>* ORFs und den folgenden 81 Basenpaaren (+1 bis +84) sind, gefolgt von 18 Nukleotiden mit Homologie zur DNA-Sequenz des *GFP-kanMx6*-Moduls auf Plasmid 177. Das Oligonukleotid 24 ist homolog zu 79 Bp des *spc7<sup>+</sup>* ORFs (+4010 bis +4089), gefolgt von 20 Nukleotiden zum Plasmid 177.

Zusätzlich wurde eine 1853 Bp große *HA-kanMx6*-Transformationskassette, welche identische Homologiebereiche wie die oben beschriebene *GFP*-Kassette aufweist, durch eine PCR-Reaktion mit den Oligonukleotiden 23 und 24 auf Plasmid 179 amplifiziert.

#### 4.15 Generierung von *spc7<sup>+</sup>* Deletionskassetten mit längeren Homologiebereichen

##### 4.15.1 Erzeugung von zwei Deletionskassetten mit einem *his3<sup>+</sup>* Selektionsmarker

Kassetten mit längeren Homologiebereichen zum *spc7<sup>+</sup>* ORF wurden durch Klonierung generiert (siehe Abbildung 28). Zur Herstellung von Deletionskassetten mit einem *his3<sup>+</sup>* Selektionsmarker und flankierenden *spc7<sup>+</sup>* Homologieregionen wurde zunächst der vollständige Leserahmen von *spc7<sup>+</sup>* kloniert. Das 2222 Bp große Insert des Suppressorplasmids pUR19/CD-6 wurde durch *EcoRI/PstI*-Restriktion isoliert und gerichtet in den Vektor pBSK kloniert (CD-K1). Der fehlende 5'-Bereich des *spc7<sup>+</sup>* ORFs wurde in einer *Pfu*-DNA-Polymerasereaktion mit den Oligonukleotiden 43 und 45 erzeugt. Ein 2514 Bp großes PCR-Fragment wurde nach *PstI* Restriktion in das *PstI/NotI* geschnittene Plasmid CD-K1 integriert. Der 5'-Überhang der *NotI* Restriktion wurde vor der Ligation der DNA-Fragmente in einer *T4*-DNA-Polymerasereaktion aufgefüllt. Das entstandene Plasmid CD-K2, welches den vollständigen *spc7<sup>+</sup>* Leserahmen trägt, wurde für die weiteren Klonierungsschritte

verwendet. Ein 2068 Bp großes *SmaI/HincII* Restriktionsfragment, das den *his3<sup>+</sup>* Selektionsmarker umfaßt, wurde aus dem Plasmid pAF1 isoliert und über die Restriktionsstellen *MscI/StyI* in das Plasmid CD-K2 gebracht, wodurch CD-K14 entstand. Die Orientierung des *his3<sup>+</sup>* ORFs bzw. des *spc7<sup>+</sup>* ORFs verläuft in gleiche Richtung.

Durch spezifische Restriktion von CD-K14 wurden zwei unterschiedliche Transformationskassetten generiert. Mittels *PauI* Restriktion wird ein *his3<sup>+</sup>* DNA-Fragment erhalten, welches im 5'-Bereich von 617 Bp des *spc7<sup>+</sup>* Leserahmens und weiteren 84 Bp flankiert wird (-84 bis +617). Im 3'-Bereich ergibt sich ein Homologiebereich von 609 Bp. Davon sind 415 Bp Teil des *spc7<sup>+</sup>* ORFs, 194 Bp verteilen sich auf die *spc7<sup>+</sup>* 3'-flankierende Region (+3679 bis +4095 und 194 Bp 3'-flankierende Region). Zusätzlich flankieren 54 Bp bzw. 78 Bp, die identisch sind zur Multiple Cloning Site (MCS) des Vektors pBSK, die homologen Bereiche der *PauI* isolierten Transformationskassette.

Durch *AatII/SpeI* Restriktion ergibt sich ein *his3<sup>+</sup>* DNA-Fragment, welches im 5'-Bereich von 309 Bp *spc7<sup>+</sup>* DNA-Sequenz flankiert wird (+308 bis +617). Im 3'-Bereich befinden sich 518 Bp. Davon sind 415 Bp Teil des *spc7<sup>+</sup>* ORFs. Die übrigen entsprechen der *spc7<sup>+</sup>* 3'-flankierenden Region (+3679 bis +4095, einschließlich 103 Bp der flankierenden Region).

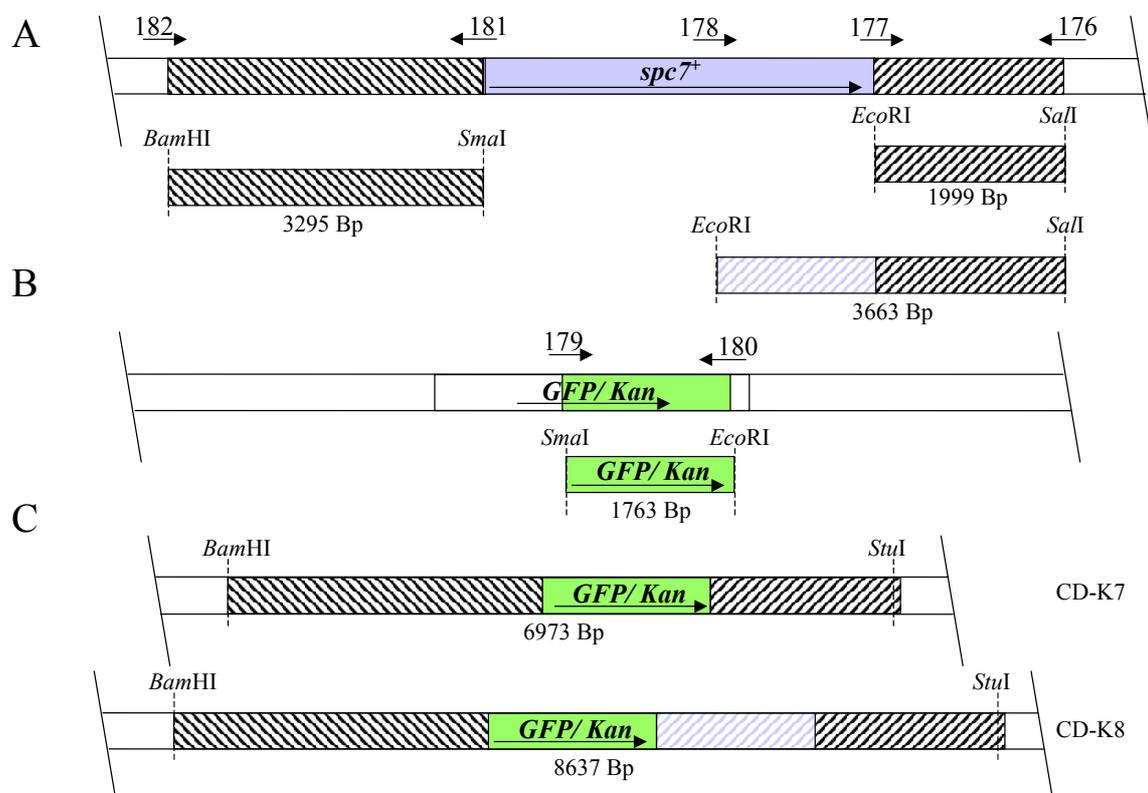
#### 4.15.2 Erzeugung von zwei Deletionskassetten mit einer *kanMx6*-Modulsequenz

Zur Deletion des *spc7<sup>+</sup>* ORFs wurden durch dreistufige Klonierungen zwei Transformationskassetten mit jeweils über 2 Kb Homologieregionen generiert. Die Abbildung 4 verdeutlicht schematisch die Arbeitsschritte in diesem Zusammenhang.

In einer Platinum *Pfx*-DNA Polymerasereaktion auf genomischer DNA wurde mit den Oligonukleotiden 181 und 182 und anschließender *SmaI/BamHI* Restriktion ein 3295 Bp großes DNA-Fragment erzeugt. Dieses DNA-Fragment flankiert den *spc7<sup>+</sup>* ORF am 5'-Ende. Zwischen dem ATG-Codon des *spc7<sup>+</sup>* ORFs und der amplifizierten DNA-Sequenz liegen 26 Bp. Das PCR-Fragment wurde über *SmaI/BamHI* Restriktion in den Vektor pBSK integriert, wodurch das Plasmid CD-K5 entstand. In einem zweiten Schritt wurde auf dem Plasmid 177 mit den Oligonukleotiden 179 und 180 ein DNA-Fragment generiert, welches neben dem partiellen *GFP*-ORF zusätzlich eine *kanMx6*-Modulsequenz enthält. Diese ermöglicht das Wachstum positiver Transformanten auf Geneticinsulfat-haltigen Platten. Das 1763 Bp große *SmaI/EcoRI* Restriktionsfragment wurde gerichtet in Plasmid CD-K5 kloniert, wodurch das Plasmid CD-K6 erhalten wurde. In einem dritten Schritt wurden auf genomischer DNA mit den Oligonukleotiden 176 und 177 und durch anschließende *SalI/EcoRI* Restriktion ein 1999 Bp großes bzw. mit den Oligonukleotiden 176 und 178 und erfolgter Restriktion ein 3663 Bp

großes DNA-Fragment generiert. Diese wurden über die *SalI/EcoRI* Schnittstellen in CD-K6 kloniert, wodurch CD-K7 bzw. CD-K8 erhalten wurden. Das Plasmid CD-K7 besitzt eine 1999 Bp lange DNA-Sequenz, die sich direkt an den 3'-Bereich des *spc7<sup>+</sup>* ORF anschließt. Im Vergleich zu CD-K7 enthält CD-K8 zusätzlich 1664 Bp, die für die letzten 554 Aminosäuren des Spc7p Proteins kodieren.

Um den gesamten *spc7<sup>+</sup>* ORF zu deletieren, wurde ein 6973 Bp DNA-Fragment durch *StuI/BamHI* aus Plasmid CD-K7 herausgeschnitten. Zur Erstellung einer *spc7<sup>+</sup>* Teildeletion wurde ein 8637 Bp DNA-Fragment nach *StuI/BamHI* Restriktion aus Plasmid CD-K8 isoliert (siehe Abbildung 4 und Abbildung 28).



**Abbildung 4: Klonierung der GFP-kanMx6-Transformationskassetten**

Teil A zeigt die genomische DNA-Sequenz des *spc7<sup>+</sup>* ORFs und seine flankierenden Bereiche. Durch PCR-Reaktionen mit den dargestellten Oligonukleotidkombinationen werden spezifische Regionen der DNA-Sequenz amplifiziert.

Teil B zeigt die DNA-Sequenz des Plasmids 177, welches eine GFP-kanMx6-Modulsequenz trägt. Durch PCR-Reaktion wird eine Teilsequenz dieses Moduls synthetisiert. Nach spezifischer Restriktion werden die PCR-Fragmente nacheinander gerichtet in den Vektor pBSK kloniert, wodurch die unter Teil C abgebildeten Insertsequenzen gebildet werden. Durch *BamHI/StuI* Restriktion können ein 6973 Bp großes lineares Fragment als Transformationskassette für die Deletion des gesamten *spc7<sup>+</sup>* ORFs bzw. ein 8637 Bp großes DNA-Fragment für die partielle Deletion isoliert werden.

#### 4.16 Fusion des endogenen *spc7<sup>+</sup>* ORFs mit einem GFP- und HA-Epitop

Durch homologe Rekombination wurde der genomische *spc7<sup>+</sup>* ORF ohne Stop-Codon an eine DNA-Sequenz, die für ein GFP- bzw. HA-Epitop kodiert, fusioniert. Die DNA-Kassette, die

für die Transformation in Stamm UFY103 eingesetzt wurde, war mittels PCR mit den Oligonukleotiden 28 und 29 auf den Plasmiden 177 bzw. 179 erzeugt worden (Longtine et al., 1998).

Das verwendete Oligonukleotid 28 besitzt 80 Bp, die homolog sind zur Sequenz vor dem Stop-Codon, gefolgt von 18 Nukleotiden mit Homologie zur DNA-Sequenz des *GFP-kanMx6*-Moduls auf Plasmid 177. Das Oligonukleotid 29 ist homolog zu 80 Bp zu einer 61 Bp nach dem Stop-Codon 3'-flankierenden Region des *spc7<sup>+</sup>* ORFs, gefolgt von 20 Nukleotiden zum Plasmid 177. Eine PCR-Reaktion mit diesen Oligonukleotiden wurde auch auf Plasmid 179 durchgeführt, welches eine *HA-kanMx6*-Modulsequenz trägt.

Die PCR-Produkte enthalten eine *kanMx6*-Modulsequenz, die positiven Transformanten das Wachstum auf Geneticinsulfat-haltigen Platten ermöglicht. Nach Einbringen der Fusionskassetten in die Hefe wurde bei Geneticinsulfat-resistenten Transformanten die Übergänge über PCR-Reaktionen mit den Oligonukleotiden 51 und 363 bzw. 361 und 145 verifiziert. Um zu testen, ob sich die Fusion mit diesen Sequenzen negativ auf die Funktion des Spc7p Proteins auswirkt, wurden korrekte Transformanten auf Abweichungen im Wachstum bei verschiedenen Temperaturen (20 °C, 24 °C, 32 °C und 37 °C) auf Hypersensitivität gegenüber TBZ (7,5 µg/ml bzw. 10 µg/ml) und auf den Minichromosomenverlust im Vergleich zum isogenen Wildtyp getestet.

#### 4.17 Screening von zwei c-DNA Genbanken

Zur Verifizierung der kodierenden *spc7<sup>+</sup>* Sequenz wurde eine c-DNA Genbank in einem Screening-Verfahren untersucht. Die untersuchte *S. pombe* c-DNA Bank sollte nach vollendeter c-DNA Synthese alle m-RNA Sequenzen der Hefe in Form von doppelsträngigen DNA-Klonen enthalten. Durch Elektroporation wurden die Plasmide in kompetente *E. coli* XL1-blue Zellen eingebracht. Zur Selektion der Transformanten wurden die Bakterien auf LB + Ampicillin-Platten mit einem Durchmesser von 132 mm ausplattiert. Um *spc7<sup>+</sup>*, welches für ein Zentromerprotein kodiert und vermutlich niedrig exprimiert wird, spezifisch nachzuweisen, wurden 30 Platten mit durchschnittlich 45000 Kolonien pro Platte eingesetzt. Nach Inkubation der Platten für 12 Stunden bei 37 °C wurde ein Bakterienkolonieabdruck auf einer Nylonmembranscheibe (Boehringer, Mannheim) erzeugt. Die hohe Bindungskapazität der Filter für DNA nach Lyse der Zellen ermöglicht die Hybridisierung mit einer homologen DIG-markierten *spc7<sup>+</sup>*-Sonde und anschließende Detektion mittels alkalischer Phosphatase. Die eingesetzte Sonde wurde durch PCR Reaktion mit den Oligonukleotiden 108 und 109

hergestellt. Die Durchführung der Koloniehybridisierung erfolgte ohne Abweichungen den Angaben des Herstellers der Membranscheiben.

Alle Kolonien, denen positive Signale auf den Filtern zugeordnet werden konnten, wurden in einer ersten Runde durch Ausschneiden isoliert. Aufgrund der hohen Kolonienzahl pro Platte wurden auch angrenzende Kolonien mit herausgeschnitten. Durch eine zweite Runde der Koloniehybridisierung und durch eine PCR-Reaktion gegen den 3'-Bereich der *spc7<sup>+</sup>* DNA-Sequenz mit den Oligonukleotiden 112 und 109 wurden die positiven Kolonien identifiziert. Die Insertssequenzen der isolierten Plasmide wurden durch Sequenzierung mit dem Oligonukleotid 98 bestimmt und durch einen Abgleich mit der Datenbank des Wellcome Trust Sanger Institute identifiziert (siehe Kapitel 8.7).

Zusätzlich wurden die DNA-Insertsequenzen dieser c-DNA Genbank und einer zweiten c-DNA Genbank (Clontech) durch PCR-Analyse analysiert. Die hierfür verwendeten Oligonukleotide sind homolog zur Sequenz des fehlerhaft klonierten c-DNA Bankinserts bzw. zu Sequenzen des in der Datenbank angegebenen *spc7<sup>+</sup>* ORFs (siehe Abbildung 32).

#### 4.18 Verkürzungen des *mal3<sup>+</sup>* ORF

Zur Identifizierung und Zuordnung von Funktionsdomänen des Mal3p Proteins wurden N-terminale Verkürzungen generiert und der Effekt der verkürzten Mal3p-Varianten in seriellen Tropftests auf Medium mit Thiabendazol untersucht. Durch Klonierung wurde die DNA-Sequenz, die für die ersten 127 Aminosäuren des Mal3p Proteins kodiert, deletiert und Verkürzungen mit und ohne C-terminale GFP-Fusion erzeugt. Ausgangsvektoren für die Klonierung waren die Plasmide p184 und p193. In einer *Pfu*-DNA Polymerasereaktion auf dem Plasmid 184 wurde mit den Oligonukleotiden 21 und 20 ein 509 Bp großes DNA-Fragment amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde *Acc65I/XbaI* geschnitten und gerichtet in den Vektor pBSK kloniert. Das entstandene Plasmid CD-K9 und die Ausgangsvektoren wurden in den *E. coli* Stamm GM48 transformiert und durch *BclII/XhoI* Verdau eine 754 Bp lange *mal3<sup>+</sup>* DNA-Sequenz gegen das verkürzte DNA-Fragment ausgetauscht. Die entstehenden Plasmide CD-K10 und CD-K11 tragen die Information für ein verkürztes Mal3p Protein bzw. verkürztes Mal3-GFPp-Fusionsprotein.

Die Auswirkung des verkürzten *mal3<sup>+</sup>* ORFs wurde nach Transformation der Plasmide in den *S. pombe* Stamm UFY103 bzw. den *mal3Δ* Stamm in seriellen Tropftestuntersuchungen analysiert. Zusätzlich wurde die Sequenz, die für eine N-terminal um 7 Aminosäuren verkürzte Mal3p-Proteinvariante kodiert, in Abhängigkeit vom *nmt1<sup>+</sup>* Promotor des Plasmids 234 exprimiert. Der *nmt1<sup>+</sup>* Promotor wurde durch Inkubation der Transformanten in Selektivmedium

ohne Thiamin für 18 Stunden bei 30 °C dereprimiert. Das Wachstum wurde unter Niedrig- und Hochexpressionsbedingungen und auf Platten mit und ohne TBZ-Konzentrationen von 7,5 µg/ml analysiert. Die Inkubation der Platten erfolgte für 4 bzw. 5 Tage bei 24 °C.

#### 4.19 Untersuchungen zur genetischen Interaktion in *S. pombe* Stämmen

Um in *S. pombe* auf genetische Interaktion zu testen, wurden verschiedene Stämme auf Malz-extraktplatten bei 24 °C miteinander gekreuzt. Doppelmutanten, die sich aus den Sporen der Tetraden entwickelt haben, wurden untersucht. Für jede der Kreuzungen wurden bis zu vier Sporen von jeweils mindestens drei unabhängigen Tetraden untersucht. In den Fällen, in denen die Doppelmutante letal ist, wurde auf die Genotypen der fehlenden Sporen durch Ver-  
folgung der Segregation verschiedener Marker bei den wachsenden Sporen der Tetraden geschlossen.

Der Nachweis des *mal3*<sup>+</sup> ORFs erfolgte durch PCR-Analyse mit den Oligonukleotiden 36 und 79 und Untersuchung der Zellmorphologie bei 20 °C. Der Nachweis temperatursensitiver Allele erfolgte durch Inkubation bei 37 °C für *mis6-302* und *mis12-537* bzw. *dis1-288* bei 20 °C. Für die seriellen Tropftestuntersuchungen wurden Stämme, die das *dis1-288* Allel besitzen, bei 28 °C in YE5S-Medium angezogen. Die Inkubation der übrigen Stämme erfolgte bei 24 °C. Die getesteten Bedingungen für Einzel- und Doppelmutanten auf YE5S-Medium und die Dauer der Inkubation ist in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1: Wachstumsbedingungen zur Untersuchung der genetischen Interaktion

Aufgeführt sind die Inkubationstemperaturen und Inkubationszeiten für Einzel- und Doppelmutanten der verschiedenen Kreuzungen zur Ermittlung der genetischen Interaktion.

Kreuzung	Inkubationstemperaturen	Inkubationszeit
<i>mal3Δ mad2Δ</i>	24 °C, 30,5 °C, 32 °C, 36 °C, 37 °C	2 bis 3 Tage
<i>mal3Δ mph1Δ</i>	22 °C, 24 °C, 32 °C, 37 °C	2 bis 3 Tage
<i>mal3Δ mal2-1</i>	24 °C, 28 °C, 29 °C, 30 °C, 35 °C	2 bis 3 Tage
<i>mal3Δ mis6-302</i>	24 °C, 28 °C, 30 °C, 31 °C, 32 °C, 35 °C, 37 °C	2 bis 3 Tage
<i>mal3Δ mis12-537</i>	24 °C, 28 °C, 30 °C, 31 °C, 32 °C, 33 °C, 34 °C; 35 °C, 37 °C	2 bis 3 Tage
<i>mal3Δ dis1-288</i>	20 °C, 24 °C, 26 °C, 28 °C, 32 °C, 37 °C	2 bis 3 Tage

#### 4.20 Deletion des *SPC105* ORFs

Der 2,7 Kb große *SPC105* ORF, der für ein 917 Aminosäuren großes Protein kodiert, wurde partiell durch homologe Rekombination ab Nukleotidposition +46 nach dem Start-Codon deletiert. Zusätzlich blieben die letzten 234 Bp vor dem Stop-Codon am 3'-Bereich erhalten.

Durch eine PCR-Reaktion mit den Oligonukleotiden 126 und 127 auf Plasmid pUG6 wurde eine 1703 Bp große *kanMx6*-Deletionskassette erzeugt, welche zu jeder Seite von 45 Bp *SPC105* homologen Bereichen flankiert wurde. Da das transformierte DNA-Fragment einen Kanamycinmarker enthielt, konnte mit Geneticinsulfat auf positive Gendeletionen der Stämme 368 und 475 selektioniert werden. Stabile diploide Transformanten der *S. cerevisiae* Stämme 368 und 475, in denen das *SPC105* Gen gegen die Transformationskassette rekombiniert war, wurden einer Tetradenanalyse unterzogen. Die Deletion wurde durch PCR-Analyse der Transformanten mit den Oligonukleotiden 128 und 363 bzw. 130 und 335 verifiziert. Haploide Deletionsstämme wurden durch eine Tetradenanalyse erhalten. Das Wachstum von Deletions- und Wildstämmen wurde bei verschiedenen Temperaturen und Konzentrationen von Thiabendazol analysiert (siehe Tabelle 2).

Tabelle 2: Wachstumsbedingungen zu Untersuchung der *spc105Δ* Deletionsstämme

Zusammengestellt sind die untersuchten Inkubationstemperaturen, die verwendeten Konzentrationen von Thiabendazol (TBZ) und die Dauer der Inkubation.

Inkubationstemperaturen	TBZ-Konzentrationen	Inkubationszeit
24 °C, 28 °C, 30 °C, 35 °C, 37 °C	25 µg/ml; 40 µg/ml; 50 µg/ml Inkubation der Platten bei 30 °C	2 bis 3 Tage

#### 4.21 C-terminale Fusion des *SPC105* ORFs mit einem GFP- bzw. HA-Epitop

In den *S. cerevisiae* Stämmen 71 und 72 wurde der genomische *SPC105* ORF durch homologe Rekombination ohne Stop-Codon an die DNA-Sequenz für ein GFP- bzw. HA-Epitop fusioniert. Hierfür wurde ein PCR-Fragment mit den Oligonukleotiden 135 und 136 auf den Plasmiden 177 bzw. 179 erzeugt (Longtine et al., 1998). Nach Einbringen der Fusionskassetten in die Hefe wurden bei Geneticinsulfat-resistenten Transformanten die Übergänge zwischen genomischer DNA-Sequenz und Transformationskassette durch PCR mit den Oligonukleotiden 141 und 363 bzw. 130 und 361 verifiziert. Stämme, die das Fusionsprotein tragen, wurden anschließend bei 30 °C angezogen und die Lokalisierung des Fusionsproteins immunfluoreszenz-mikroskopisch untersucht.

#### 4.22 Klonierung des *SPC105* in *S. pombe* Vektoren

Der 2,7 Kb große ORF des *SPC105* Gens wurde durch *Bam*HI/*Xho*I Restriktionsanalyse aus dem Plasmid K19 isoliert und gerichtet in die *S. pombe* Vektoren pJR2-3xU und pJR2-41xU kloniert. Die daraus resultierenden Plasmide wurden CD-K12 und CD-K13 genannt.

Die Plasmide wurden in den *S. pombe* Wildtypstamm UFY103 bzw. den *mal3-1* und *mal3Δ* Stamm transformiert und der Effekt der Expression in Abhängigkeit von einem Thiamin-regulierbaren *nmt1*<sup>+</sup> Promotor in seriellen Tropftestuntersuchungen bestimmt. Zur Dereprimierung des *nmt1*<sup>+</sup> Promotors wurden die Transformanten für 18 Stunden bei 30 °C in Selektivmedium ohne Thiamin angezogen. Das Wachstum unter Niedrig- und Hochexpressionsbedingungen wurde auf Platten mit und ohne TBZ-Konzentrationen zwischen 5 µg/ml und 7,5 µg/ml analysiert. Die Inkubation der Platten erfolgte für 4 bzw. 5 Tage bei 24 °C.

#### 4.23 *TetO*-Promotorsystem

Durch homologe Rekombination wurde ein regulierbarer Fremdpromotor vor den *SPC105* Leserahmen ins Genom integriert. Eine *loxP-kanMx-loxP-tetO<sub>7</sub>-CYC1*-Integrationskassette wurde mittels PCR auf dem Plasmid pAH3 mit den Oligonukleotiden 203 und 204 amplifiziert. Das verwendete Oligonukleotid 203 besitzt 40 Nukleotide, die homolog sind zu einer DNA-Sequenz 50 Basenpaare oberhalb des Start-Codons (-90 bis -50), gefolgt von 22 Nukleotiden mit Homologie zur DNA-Sequenz des *loxP-kanMx-loxP*-Markers auf dem Plasmid pAH3. Das Oligonukleotid 204 ist homolog zu den ersten 40 Basenpaaren des *SPC105* ORF (+1 bis +40), gefolgt von 23 Nukleotiden mit Homologie zu dem *tetO<sub>7</sub>-CYC1* Promotor auf dem Plasmid pAH3. Nach Transformation in die haploiden *S. cerevisiae* Stämme mit den Nummern 995 und 1903 wurden Geneticinsulfat-resistente Transformanten auf korrekte Integration der Kassette mittels PCR mit den Oligonukleotiden 363 und 129 bzw. 335 und 128 verifiziert.

Für die Messung des Chromosomenfragmentverlustes wurden Vorkulturen der *p<sub>tetO</sub>-SPC105* Fusionsstämme in SD-Minimalmedium ohne Uracil bei 30 °C angezogen. Die Anzucht der Hauptkulturen erfolgte in SD-Minimalmedium mit Uracil. Die Expression des Leserahmens wurde über Zugabe des synthetischen Tetrazyklin-Derivates Doxyzyklin (100 µg/ml) reguliert. Logarithmisch wachsende Hauptkulturen verschiedener Transformanten wurden regelmäßig verdünnt und bis zu 38 Generationen mit bzw. ohne Doxyzyklin angezogen. Der Chromosomenfragmentverlust wurde zu vier unterschiedlichen Zeitpunkten anhand der Fluoreszenzintensität der Zellen mittels eines Becton-Dickinson FACSsort Gerätes bestimmt. Hierfür wurden die Kulturen mit 0,1 M Tris pH 5 auf OD<sub>600</sub> = 0,06 verdünnt und jeweils 200 µl der Suspension für die Messung verwendet (durchgeführt von Irina Volfson).

#### 4.24 Southern-Blotanalyse

Zur Überprüfung einer *spc7<sup>+</sup>* Deletion wurden putativ positive Transformanten, transformiert mit unterschiedlichen Transformationskassetten, durch Southern-Blotanalyse untersucht. Der Austausch der genetischen Information durch homologe Rekombination führt zu einer Veränderung des Restriktionsmusters im Genom, da die ursprüngliche genomische DNA-Sequenz des Gens durch die Deletionskassette ersetzt wird. Für die Southern-Blotanalyse wurde sowohl aus den haploiden Stämmen, die sich aus den Sporen der Tetraden ergaben, als auch aus diploiden Transformanten genomische DNA isoliert. Die isolierte Hefe-DNA wurde anschließend mit der Restriktionsendonuklease *EcoRV* in kleinere DNA-Fragmente geschnitten. Die DNA-Fragmente wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt, das DNA-Bandenmuster auf eine Nylonmembran (Millipore, USA) übertragen und durch UV-Bestrahlung fixiert. Durch spezifische Hybridisierung mit einer DIG (Digoxigenin)-markierten homologen DNA-Sonde und anschließendem Farbnachweis mittels alkalischer Phosphatase wurden die Sonden-gebundenen DNA-Fragmente sichtbar gemacht. Die Herstellung und Markierung der Sonde durch PCR folgte den Angaben des "DIG-Labeling and Detection" Kits. Da zur Deletion des *spc7<sup>+</sup>* ORFs verschiedene Deletionskassetten verwendet wurden, wurden unterschiedliche Sonden synthetisiert. Die Sonden, die mit den Oligonukleotiden 109 und 112 bzw. 116 und 117 auf genomischer *S. pombe* DNA synthetisiert wurden, sind homolog zum 3'-Bereich des *spc7<sup>+</sup>* ORFs bzw. der 3'-flankierenden Genregion. Zusätzlich wurden Sonden auf den Plasmiden 177 bzw. 179 mit den Oligonukleotiden 23 und 24 bzw. auf dem Plasmid pAF1 mit den Oligonukleotiden 124 und 125 durch die PCR-Analyse hergestellt. Diese sind homolog zu Sequenzen der verwendeten *kanMx6-* bzw. der *his3<sup>+</sup>*-Transformationskassetten. Bei der Durchführung des Southern-Blots wurde lediglich die SSC-Pufferkonzentration auf 10-fache Konzentration gesenkt und dadurch den Anforderungen der verwendeten Nylonmembran angepaßt.

#### 4.25 Northern-Blotanalyse

Zur Analyse der Länge des *spc7<sup>+</sup>* *m*-RNA Transkripts wurde die Gesamt-RNA mehrerer *S. pombe* Stämme durch Northern- Blotanalyse untersucht. Die isolierte Gesamt-RNA wurde in einem 1,2 %igem Agarose-Formaldehydgel aufgetrennt und das entstandene Bandenmuster auf eine Nylonmembran (NEN Life Science) übertragen. Nach Fixierung an die Membran durch UV-Licht erfolgte die Hybridisierung mit homologen, DIG-markierten DNA-Sonden gegen unterschiedliche Sequenzbereiche des *spc7<sup>+</sup>* ORF. Die Herstellung der Sonden und die Durchführung der Northern-Blotanalyse folgte den Angaben des "DIG-Labeling and

Detection"-Kits in Abstimmung mit den Angaben des Maniatis (1989). Alle Lösungen wurden mit DEPC-behandeltem, RNase freiem Wasser angesetzt und die SSC-Pufferkonzentration wurde auf 10-fache Konzentration gesenkt, um den Anforderungen der verwendeten Nylonmembran zu entsprechen. Verschiedene Sonden wurden zur Identifizierung des *spc7<sup>+</sup>* *m*-RNA Transkripts verwendet (siehe Abbildung 29).

Eine 1061 Bp lange DNA-Sonde wurde durch PCR-Reaktionen auf genomischer *S. pombe* DNA mit dem Oligonukleotiden 133 und 105 erzeugt. Sie umfaßt die Nukleotide der Position +545 bis +1606 nach dem ATG-Codon (+1). Eine 1636 Bp lange Sonde wurde mit den Oligonukleotiden 108 und 109 generiert und ist homolog zum Bereich +2458 bis zum Stop-Codon. Eine 589 Bp lange Sonde, die durch PCR-Reaktion mit den Oligonukleotiden 112 und 109 erzeugt wurde, ist homolog zur DNA-Sequenz von +3505 bis zum Stop-Codon.

#### 4.26 Mikroskopie

Mikroskopische Untersuchungen von Hefezellen wurden mit Zeiss-Axioskop Fluoreszenzmikroskopen und entsprechender Kameraausrüstung durchgeführt. Die mit dem SensiCam Kamerasystem (PCO Computer Optic GmbH) aufgenommenen Bilder wurden mit der Image-Pro-Plus Software bearbeitet. Für die Bearbeitung der Aufnahmen einer Hamamatsu Kamera wurde die Open-Lab Software (Improvision) verwendet.

Für die Immunfluoreszenz mit *S. pombe* wurde den Bedingungen für Aldehydfixierungen, wie in Hagan et al. 1988 beschrieben, gefolgt. Die Lokalisierung des C-terminalen Spc7-GFPp Fusionsproteins im Zellzyklus wurde mit einem polyklonalem Kaninchen anti-GFP Antikörper (Invitrogen), gefolgt von einem Cy3-gekoppeltem anti-Kaninchen Antikörper, untersucht. Die Signale für die Spc7-HAp- und Mal2-GFPp-Fusionsproteine wurden durch Verwendung eines monoklonalen Maus anti-HA Antikörpers (Covance, USA), gefolgt von einem Cy3-gekoppeltem anti-Maus Antikörper bzw. einem Kaninchen anti-GFP Antikörper (Molecular Probes) und einem FITC-gekoppeltem anti-Kaninchen Antikörper, erhalten. Für die Tubulinfärbung in *S. pombe* wurde der primäre monoklonale anti-Tubulin Antikörper TAT1 verwendet, gefolgt von einem sekundären FITC-gekoppeltem anti-Maus Antikörper. Zur Anfärbung der Spindeln im *mal3Δ* Stamm wurde ein Cy3-gekoppelter Antikörper verwendet. Die Anzucht der *mal3Δ* Zellen erfolgte bei 20 °C.

Der Ablauf für die Bearbeitung der Proben von *S. cerevisiae* folgte dem Protokoll nach Scharfenberger et al. 2003. Für die Anfärbung der Tubulinstrukturen in *S. cerevisiae* wurde als primärer Antikörper der monoklonale anti-Tubulin Antikörper WA3, gefolgt von einem Cy3-gekoppeltem anti-Maus Antikörper, eingesetzt. Das Spc105 Fusionsprotein wurde mit

einem Kaninchen anti-GFP Antikörper (Molecular Probes), gefolgt von einem FITC-gekoppeltem anti-Kaninchen Antikörper, erhalten.

Das Chromatin der Zellen wurde durch Zugabe von 0,01 µg/ml 4,6-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI) angefärbt.

Zur Bestimmung der DNA-Fehlverteilung in *mal3Δ mph1Δ* Einzel- und Doppelmutanten wurden die Stämme bei 24 °C in Minimalmedium angezogen und nach Fixierung mit Ethanol das Chromatin mit DAPI angefärbt. Die DNA-Verteilung und Zellmorphologie von jeweils über 350 Zellen wurde ermittelt.

#### **4.27 Analyse des DNA-Profiles von *S. cerevisiae* Zellen mittels Durchflußcytometrie-Analyse**

Durch die Durchflußcytometrie-Analyse wird ein DNA-Profil von Hefezellen erstellt. Dabei wird von jeder Hefezelle der DNA-Gehalt anhand der Intensität der Fluoreszenzfärbung mit Propidiumjodid gemessen. Das DNA-Profil zeigt, wie groß der Anteil der Zellen ist, die sich in der G1-Phase (1C-DNA Gehalt), der S-Phase (zwischen 1C und 2C DNA-Gehalt) oder der G2/M-Phase (2C DNA-Gehalt) befinden. Diese Methode wurde verwendet, um den Einfluß von einer Gendeletion auf die DNA-Verteilung der Zellen in diesen Phasen zu untersuchen. Hierfür wurden  $1 \times 10^7$  Zellen einer *S. cerevisiae* Kultur mit 70 % Ethanol/0,2 M Tris pH 7,5 für zwei Stunden bei Raumtemperatur fixiert. Nach Überführen der Zellen in 0,2 M Tris pH 7,5 wurden die Zellen von 200 µl der Zellsuspension durch 5 Minuten Ultraschallbehandlung in einem Wasserbad vereinzelt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 11 µl RNase (10 mg/ml) und die Inkubation der Proben bei 4 °C über Nacht. Nach einem Waschschrift der Zellen in 0,2 M Tris pH 7,5 wurden die Zellen mit 50 µg/ml Propidiumjodid angefärbt und mittels eines Becton-Dickinson FACSsort Gerätes analysiert. Die Messung der Proben wurde von Irina Volfson durchgeführt.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Isolierung extragener Multikopie-Suppressoren des *mal3-1* Thiabendazolhypersensitiven Phänotyps

Um die Funktion des Mal3p Proteins der Spaltheefe *Schizosaccharomyces pombe* in der Mitose besser zu verstehen und zur Identifizierung von Proteinen, die mit dem Mal3p Protein wechselwirken, wurde ein Multikopie-Suppressorscreen durchgeführt. Für den Screen wurde der *mal3-1* Mutantenstamm verwendet, der eine Hypersensitivität gegenüber der Mikrotubulidestabilisierenden Chemikalie Thiabendazol (TBZ) zeigt. Die Multikopie-Suppressoren wurden durch Suppression dieses Phänotyps identifiziert. Hierfür wurde der *mal3-1* Mutantenstamm mit einer genomischen *S. pombe* Bank (Barbet et al., 1992) transformiert und auf Transformanten, die auf TBZ-haltigem Medium wachsen konnten, selektioniert (siehe Kapitel 4.12). Von insgesamt zirka 114000 Transformanten auf Selektivmedium ohne TBZ konnte nach zweimaliger Selektion auf TBZ-haltigem Medium die Zahl auf 85 Transformanten reduziert werden, die einen reproduzierbaren Ausgleich der TBZ-Hypersensitivität des *mal3-1* Stammes aufwiesen. Die anschließend aus ihnen isolierten genomischen *S. pombe* Genbankplasmide wurden mit der Bezeichnung CD- und einer entsprechenden Identifizierungsnummer für das Suppressorinsert bezeichnet. Plasmide von Transformanten, die keine stabile Suppression zeigten, wurden mit der Bezeichnung CD-negativ versehen und nicht weiter untersucht. Daß die Suppression der TBZ-Hypersensitivität des *mal3-1* Stammes auf Anwesenheit der genomischen Bankplasmide zurückzuführen ist, wurde mittels Retransformation der Plasmide verifiziert (siehe Kapitel 5.2).

Abbildung 5 zeigt am Beispiel von Ausstrichen das Wachstumsverhalten einiger Transformanten. Die Kontrollplatte ohne TBZ zeigt für alle Transformanten gutes Wachstum. Der *mal3-1* Mutantenstamm, transformiert mit dem genomischen Bankvektor pUR19, zeigt kein Wachstum auf TBZ-haltigem Medium. Dagegen zeigt der *mal3-1* Mutantenstamm, transformiert mit pUR19/*mal3*<sup>+</sup>, dem Genbankvektor, der das *mal3*<sup>+</sup> Gen als DNA-Insert trägt, deutliches Wachstum. Die Ausstriche der Transformanten der genomischen Genbank CD-1 und CD-2 zeigen ebenfalls eine Suppression der TBZ-Hypersensitivität, während der Ausstrich CD-negativ keine Suppression aufweist.

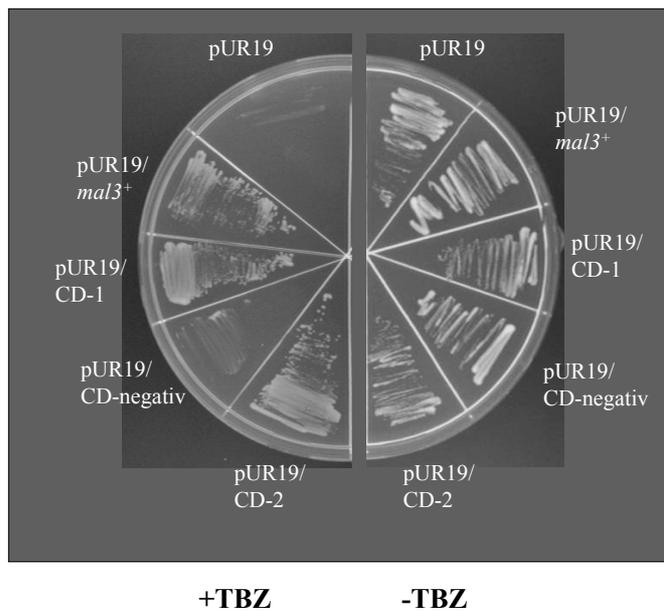


Abbildung 5: Suppression der TBZ-Hypersensitivität des *mal3-1* Stammes

Diese Abbildung zeigt das Wachstum von Ausstrichen des *mal3-1* Mutantenstammes, welcher mit unterschiedlichen Plasmiden transformiert wurde. Gezeigt ist das Wachstumsverhalten für den *mal3-1* Stamm transformiert mit dem Genbankvektor pUR19, pUR19 mit *mal3*<sup>+</sup> als DNA-Insert und einiger Transformanten der genomische *S. pombe* Bank auf Selektivmedium mit 6,5 µg/ml TBZ (+TBZ) und ohne TBZ (-TBZ). Die Platten wurden für 5 Tage bei 24 °C inkubiert.

Insgesamt konnten 85 Transformanten reproduzierbar die TBZ-Hypersensitivität des *mal3-1* Stammes ausgleichen (siehe Tabelle 3). Das 13,8 Mbp große Genom der Spaltheife wurde bei einer durchschnittlichen Größe der genomischen Bankinserts von 4000 Bp in diesem Screen durch die genomische Bank 33-fach abgedeckt. Der Screen ist somit saturierend und jedes Gen, welches plasmidkodiert den *mal3-1* Phänotyp supprimieren kann, sollte isoliert worden sein.

Tabelle 3: Transformationen des *mal3-1* Stammes der genomischen *S. pombe* Bank

Angegeben ist die Anzahl der erhaltenen *mal3-1* Transformanten des genomischen *S. pombe* Bankscreens. Weiter aufgeführt ist die Anzahl der Transformanten, die nach Replikatlattierung auf TBZ-haltigem Selektivmedium und erneutem Ausstreichen gewachsen sind. Die letzte Spalte gibt den Grad der Abdeckung des Genoms an.

Transformanten insgesamt	Ausgleich TBZ-Hypersensitivität	Abdeckung des Genoms bei durchschnittlicher Insertgröße von 4000 Bp
114000	85	33-fach

## 5.2 Nachweis der Suppression des *mal3-1* TBZ-hypersensitiven Phänotyps durch serielle Tropftestuntersuchungen

Um zu überprüfen, ob die Suppression des *mal3-1* TBZ-hypersensitiven Phänotyps auf die Anwesenheit der genomischen Bankplasmide zurückzuführen ist, wurde die Plasmid-DNA der 85 Transformanten isoliert und erneut in den *mal3-1* Stamm eingebracht. Eine Suppression, die nicht plasmidkodiert ist, sondern sich zum Beispiel auf eine zusätzliche Mutation im Genom zurückführen läßt, sollte dadurch ausgeschlossen werden.

Abbildung 6 zeigt das Wachstumsverhalten ausgewählter Retransformanten bei diesen Untersuchungen. Zur Kontrolle des Wachstums auf TBZ-haltigem Medium wurden der leere pUR19 Vektor als Negativkontrolle und pUR19 mit *mal3*<sup>+</sup> als DNA-Insert als Positivkontrolle in den *mal3-1* Stamm transformiert. Abgebildet ist außerdem das Wachstumsverhalten ausgewählter Suppressoren. Auf Platten ohne TBZ zeigen alle getesteten Stämme ein vergleichbar gutes Wachstum. Auf Platten mit TBZ zeigt die Positivkontrolle gutes Wachstum, während die Negativkontrolle unter diesen Bedingungen kein Wachstum aufweist. Die ausgewählten Suppressorplasmide gleichen die Hypersensitivität des *mal3-1* Stammes gegenüber TBZ aus. Der Vergleich des Wachstums der Suppressortransformanten untereinander zeigt, daß es durchaus Unterschiede im Grad des Ausgleiches gibt. Der deutlichste Ausgleich, d. h. das stärkste Wachstum auf TBZ-haltigem Medium, wird für das Suppressorinsert CD-2 erhalten.

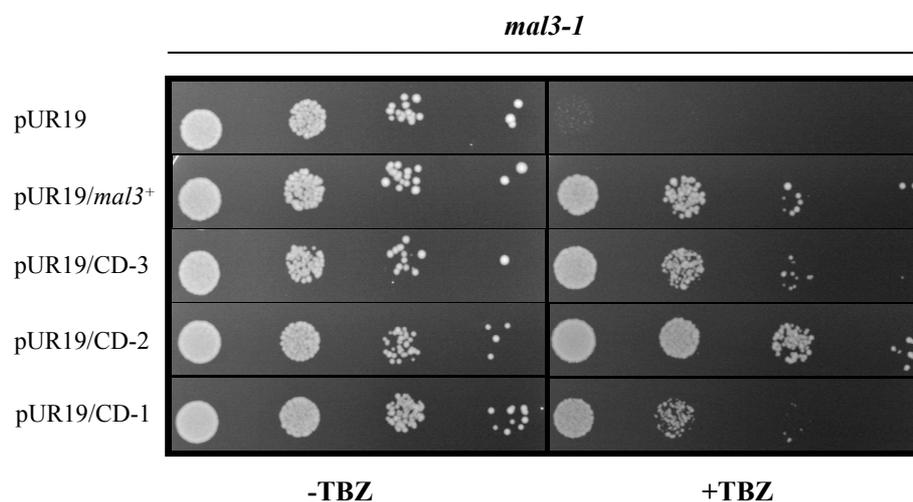


Abbildung 6: Suppression der TBZ-Hypersensitivität des *mal3-1* Mutantenstammes durch verschiedene Plasmidsuppressoren in seriellen Tropftests

Die Abbildung zeigt das Wachstumsverhalten des *mal3-1* Stammes auf Selektivmedium ohne TBZ (-TBZ) und mit 6,5 µg/ml TBZ (+TBZ), der mit unterschiedlichen Plasmiden transformiert wurde. Gezeigt ist das Wachstum der Transformation mit dem Genbankvektor pUR19, pUR19/*mal3*<sup>+</sup> und der genomischen Bankplasmide mit den Insertsequenzen CD-3, CD-2 und CD-1. Die Tropfen zeigen die Verdünnungen von 10<sup>4</sup> bis 10<sup>1</sup> Zellen. Die Platten wurden für 5 Tage bei 24 °C inkubiert.

Im Rahmen der seriellen Tropftestuntersuchungen mit dem *mal3-1* Stamm ließ sich nach Retransformation nicht bei allen 85 Bankplasmiden die Suppression verifizieren, die ein einfaches Ausstreichen auf TBZ-haltigem Medium erkennen ließ. Diese Untersuchungen wurden durchgeführt, da der Tropftest für die Bestimmung der Suppression deutlich sensitiver ist. 10 der isolierten Plasmide zeigten nach Retransformation in den *mal3-1* Stamm keine Suppression der TBZ-Hypersensitivität mehr. Die gezeigte Suppression der Transformanten war somit nicht plasmidkodiert und ist für den weiteren Verlauf des Screens nicht von

Bedeutung. Bei den übrigen 75 Suppressorplasmiden handelt es sich um plasmidkodierte Suppressoren, deren Ausgleich des *mal3-1* TBZ-hypersensitiven Phänotyps bei diesen Untersuchungen verifiziert werden konnte. Sie wurden im Rahmen dieser Arbeit weiter untersucht.

### **5.3 Analyse der Suppressorplasmide mittels Restriktions-, PCR- und Sequenzanalyse**

Die 75 Suppressorplasmide, die den *mal3-1* TBZ-hypersensitiven Phänotyp in den seriellen Tropftestuntersuchungen ausgleichen konnten, wurden parallel weiter durch Restriktions-, PCR- und Sequenzanalyse untersucht. Ziel dieser Untersuchungen war, spezifische Bestandteile der DNA-Insertsequenz des Suppressors zu identifizieren (siehe Kapitel 5.3.2), sowie die Größe des DNA-Inserts zu ermitteln und Übereinstimmungen im Restriktionsmuster der Insertsequenzen zu finden (siehe Kapitel 5.3.1). Übereinstimmungen im Restriktionsmuster der Insertsequenzen sollten das Zusammenfassen von Plasmiden zu Suppressorgruppen mit gleicher Insertsequenz ermöglichen.

#### **5.3.1 Analytische Spaltung der genomischen *S. pombe* DNA-Bankplasmide**

##### **5.3.1.1 Analytische Spaltung mit BamHI/HindIII zur Bestimmung der Insertgrößen der genomischen *S. pombe* DNA-Bankplasmide**

Durch eine Spaltung der 75 Suppressorplasmide mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Hind*III und anschließender Auftrennung der DNA-Fragmente in einem Agarosegel, konnte eine erste Angabe über die Größen der jeweiligen DNA-Inserts gemacht werden. Beide Enzyme flankieren im Polylinker die Schnittstelle *Sal*I, welche für die Klonierung der genomischen Bank verwendet wurde. Abbildung 7 zeigt ein Beispielfoto für eine Gelanalyse. Bei der Restriktion des genomischen Bankvektors pUR19 ergibt sich ein 5,5 Kb großes DNA-Fragment. Das Plasmid pUR19 mit *mal3*<sup>+</sup> als Insert wird in ein 5,5 Kb großes Vektorfragment und ein 2,6 Kb großes Insertfragment gespalten. Auch für die dargestellten Plasmide mit den Insertsequenzen CD-6 und CD-41 werden neben dem 5,5 Kb großen Vektorfragment zusätzliche DNA-Fragmente erhalten. CD-6 wird in zwei DNA-Fragmente von 1,3 Kb und 0,9 Kb gespalten. Die Gesamtgröße des genomischen *S. pombe* DNA-Inserts beträgt 2,2 Kb. CD-41 zeigt ein DNA-Fragment von 2,3 Kb genomischer *S. pombe* DNA.

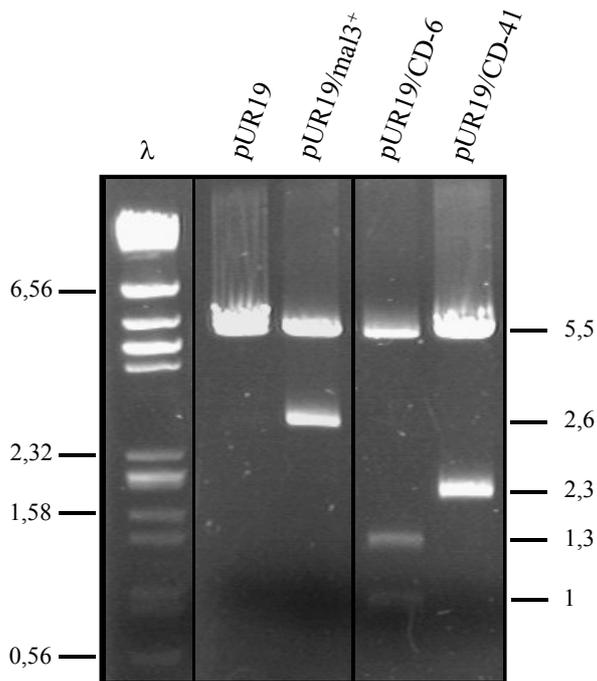


Abbildung 7: Analytische Spaltung mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI/*Hind*III zur Bestimmung der Insertgrößen der Suppressorplasmide

Diese Abbildung zeigt die DNA-Fragmente, die bei der Agarosegelaufreinigung verschiedener Suppressorplasmide nach Restriktion mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Hind*III erhalten wurden. Die Restriktionsansätze wurden neben dem Längenstandard (*Hind*III/*Eco*RI geschnittene  $\lambda$ -Phagen DNA) in einem Agarosegel aufgetrennt. Plasmidauftragung: pUR19, pUR19/*mal3*<sup>+</sup>, Genbankplasmide mit den Insertsequenzen CD-6 und CD-41. Die Länge der DNA-Banden ist in Kilobasen (Kb) angegeben.

In Bezug auf die Gesamtinsertgrößen der verschiedenen Suppressorplasmide, die sich bei der analytischen Spaltung mit Restriktionsenzymen *Bam*HI/*Hind*III ergaben, gab es deutliche Unterschiede. Das kleinste Insert besaß eine Größe von 1,1 Kb genomischer *S. pombe* DNA, das größte Insert eine Gesamtgröße von 7,3 Kb. Die meisten DNA-Inserts wurden in zwei DNA-Fragmente gespalten. Es gab jedoch auch Plasmide, deren Insert in vier DNA-Fragmente gespalten wurde. Einige der Suppressorplasmide zeigten Übereinstimmungen im Restriktionsmuster, d. h. für sie wurden gleiche Fragmentgrößen ermittelt. Weitere Einzeldaten aller Suppressoren sind im Anhang aufgeführt (siehe Tabelle 13).

### 5.3.1.2 Gruppierung der DNA-Bankplasmide durch systematische Restriktionsanalyse

Durch systematische Restriktion mit verschiedenen Enzymen (siehe Kapitel 4.12) sollten Übereinstimmungen im Restriktionsmuster der 75 Suppressorplasmide gefunden und eine Zusammenfassung der Suppressoren in Gruppen ermöglicht werden. Suppressorplasmide, die bei allen durchgeführten Spaltungsansätzen identische Restriktionsmuster aufwiesen, wurden einer Gruppe zugeteilt. Die Analyse der DNA-Inserts durch systematische Restriktion und anschließende Gruppierung der Suppressoren hat sich als durchführbar erwiesen. Es konnten so drei Gruppen gebildet werden, denen sich insgesamt 32 der 75 Suppressorplasmide zuordnen ließen. Tabelle 4 zeigt eine Übersicht über die Insertgröße, die Anzahl der DNA-Fragmente der Gruppen am Beispiel eines *Xho*I/*Dra*I-Verdau, sowie die zugehörigen

Suppressorplasmide an. Die restlichen Suppressoren zeigten keine durchgehend identischen DNA-Fragmente bei den gewählten Restriktionsansätzen. Sie wurden daher nicht weiter in Gruppen unterteilt. Es ist nicht auszuschließen, daß auch sie Übereinstimmungen in den DNA-Insertsequenzen bzw. Teilen dieser DNA-Sequenzen besitzen.

Durch spätere Ansequenzierung der Plasmidinsertsequenzen konnte die gewählte Einteilung der Suppressorgruppen bestätigt werden. Mitglieder einer Gruppe wiesen übereinstimmende Insertsequenzen auf (siehe Kapitel 5.6). Im Rahmen der PCR-Analyse konnte die Zugehörigkeit aller Mitglieder der Gruppe 1 zu dieser Gruppe unabhängig bestätigt werden (siehe Kapitel 5.3.2).

Tabelle 4: Gruppen der genomischen *S. pombe* DNA-Bankplasmide

In dieser Tabelle sind die drei Großgruppen mit ihren entsprechenden Suppressorplasmiden aufgeführt, die bei der systematischen Restriktionsanalyse gebildet werden konnten. Die Zuordnung zu den Großgruppen beruht auf den Ergebnissen verschiedener Restriktionsansätze. Zusätzlich enthält die Tabelle Daten über die Größe des Gesamtinserts, die beim *Bam*HI/*Hind*III-Verdau ermittelt wurde. Ebenfalls aufgelistet ist die Anzahl der Insertfragmente, die bei einer Restriktion mit *Xho*I/*Dra*I erhalten wurde, sowie die Größen dieser Einzelfragmente.

Suppressorinsert	Gesamtgröße des Inserts ( <i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III)	Anzahl der DNA-Fragmente ( <i>Xho</i> I/ <i>Dra</i> I)	Größe der DNA-Fragmente ( <i>Xho</i> I/ <i>Dra</i> I)
<b>Gruppe 1:</b> CD-6, CD-8, CD-9, CD-10, CD-22, CD-24, CD-26, CD-28, CD-36, CD-43, CD-46, CD-51, CD-54, CD-57, CD-58, CD-60, CD-61, CD-64, CD-65, CD-66, CD-68, CD-75, CD-79, CD-83, CD-84, CD-85	2,2 Kb	5	2,3 Kb, 2,0 Kb, 1,6 Kb, 1 Kb, 0,8 Kb
<b>Gruppe 2:</b> CD-15, CD-16, CD-23	1,6 Kb	6	1,9 Kb, 1,5 Kb, 1,4 Kb, 1 Kb, 0,8 Kb, 0,4 Kb
<b>Gruppe 3:</b> CD-7, CD-17, CD-52	4,5 Kb	8	2,4 Kb, 2,3 Kb, 1,5 Kb, 1,4 Kb, 1,1 Kb, 0,9 Kb, 0,7 Kb, 0,4 Kb

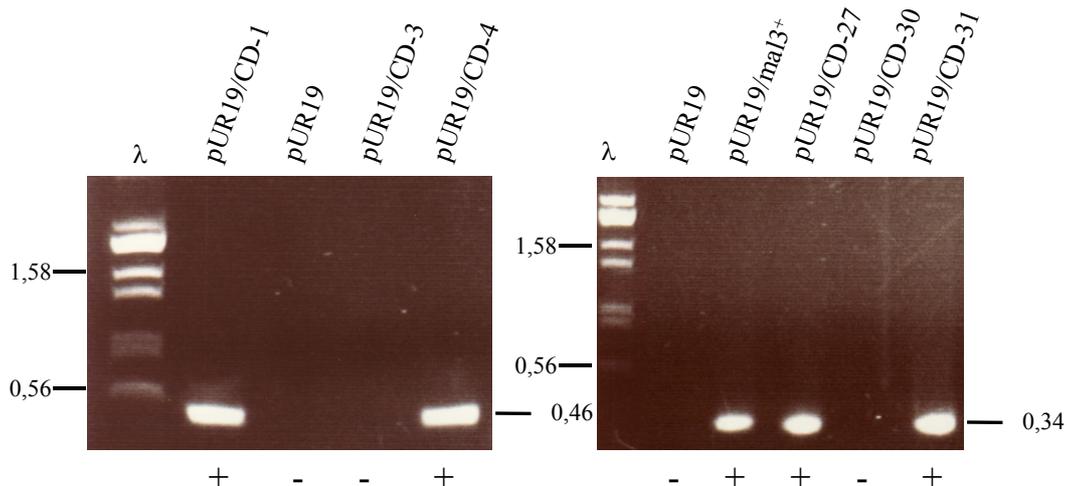
### 5.3.2 PCR-Analyse zur Identifizierung bereits bekannter *S. pombe* DNA-Genbankinserts

Mit der PCR-Analyse wurden alle Suppressorplasmide auf das Vorhandensein von vier offenen Leserahmen (ORFs) überprüft. Diese ORFs wurden ausgewählt, da sie zu Beginn des genomischen *S. pombe* Bankscreens als Insertbestandteile isolierter Suppressorplasmide positiver *mal3-1* Transformanten durch Sequenzierung und Datenbankabgleich ermittelt wurden. Es handelt sich hierbei um die genomischen Wildtypsequenzen für *mal3*<sup>+</sup>, *pad1*<sup>+</sup>, das für die 19S Proteasomenuntereinheit kodiert und einen ORF mit dem systematischen Namen SPCC1020.02 auf Chromosom 3, der im Rahmen dieser Arbeit *spc7*<sup>+</sup> genannt wurde. Ein

weiterer ORF kodiert für das Protein Som1p der Spaltheife, welches vor Beginn des Screens als Suppressor des *mal3-1* TBZ-hypersensitiven Phänotyps identifiziert wurde (persönliche Mitteilung von Dr. J. D. Beinhauer).

Abbildung 8 zeigt Beispiele dieser PCR-Analyse nach Auftrennung in einem Agarosegel. Das linke Gelfoto zeigt die DNA-Fragmente, die bei der PCR-Reaktion mit dem *pad1*<sup>+</sup> ORF erhalten wurden. Die Positivkontrolle CD-1 zeigt das erwartete 460 Bp DNA-Fragment. Für den Bankvektor pUR19 wurde kein PCR-Fragment erhalten. Bei den hier dargestellten Suppressorplasmiden zeigt nur pUR19/CD-4 das erwartete DNA-Fragment. Der *pad1*<sup>+</sup> ORF konnte in diesem Suppressorplasmid als Insertbestandteil durch die PCR-Analyse nachgewiesen werden.

Das rechte Gelfoto zeigt die DNA-Fragmente, welche bei der PCR-Analyse des *mal3*<sup>+</sup> ORFs erhalten wurden. Der Vektor pUR19 zeigt kein PCR-Produkt. PCR-Analysen mit den Insertsequenzen CD-27 und CD-31 als DNA-Template zeigen ebenfalls das erwartete PCR-Fragment von 344 Bp für die Amplifikation des *mal3*<sup>+</sup> ORFs. Somit konnte in diesen Suppressorplasmiden *mal3*<sup>+</sup> als Teil der Insertsequenz über PCR nachgewiesen werden.



**Abbildung 8: Identifizierung von Suppressoren durch PCR-Analyse**

Neben dem Längenstandard wurden Proben der PCR-Reaktionen in einem Agarosegel aufgetrennt. Probenauftragung: linkes Gel: pUR19/CD-1, pUR19, pUR19/CD-3, pUR19/CD-4; rechtes Gel: pUR19, pUR19/*mal3*<sup>+</sup>, pUR19/CD-27, pUR19/CD-30, pUR19/CD-31. Das linke Gel steht für den Nachweis des *pad1*<sup>+</sup> ORFs (erwartetes DNA-Fragment 460 Bp), das rechte Gelfoto für den Nachweis des *mal3*<sup>+</sup> ORFs (erwartetes DNA-Fragment 344 Bp).

In Tabelle 5 sind die Ergebnisse der PCR-Analyse der Plasmide mit den Insertsequenzen CD-1 bis CD-85 zusammenfassend dargestellt. 13 Suppressorplasmide konnten identifiziert werden, in denen das *mal3*<sup>+</sup> Gen als Bestandteil des DNA-Inserts vorlag, während in 11 Fällen der *pad1*<sup>+</sup> ORF nachgewiesen werden konnte. Den größten Anteil bei den Suppressorplasmiden macht der *spc7*<sup>+</sup> ORF mit 26 nachgewiesenen Fällen aus. In keiner PCR-Reaktion

konnte der *som1*<sup>+</sup> ORF nachgewiesen werden. Insgesamt konnten so durch die PCR-Analyse bei 50 der 75 Suppressorplasmide Teile des kodierenden Inserts nachgewiesen und identifiziert werden.

Bei den Suppressorplasmiden, in denen *spc7*<sup>+</sup> als Insertbestandteil durch PCR-Analyse nachgewiesen wurde, handelt es sich um Plasmide, die bereits beim analytischen Restriktionsverdau der Gruppe 1 zugeordnet werden konnten (siehe Tabelle 4). Durch diese parallel durchgeführten Untersuchungen wurden Plasmide mit Übereinstimmungen in den DNA-Insertsequenzen unabhängig voneinander ermittelt.

Tabelle 5: Identifikation von spezifischen ORFs als Teilsequenz von Suppressorplasmiden durch Polymerasekettenreaktion

Die Tabelle stellt die Ergebnisse für den Nachweis der ORFs SPAC18G6.15 (*mal3*<sup>+</sup>), SPAC31G5.13 (*pad1*<sup>+</sup>), SPCC1020.02 (*spc7*<sup>+</sup>) und SPCC364.06 (*som1*<sup>+</sup>) durch die PCR dar. Die Übersicht zeigt die untersuchten ORFs mit der Auflistung der betreffenden Suppressorplasmide, die als positiv identifiziert wurden, sowie der Suppressoren, deren Insertsequenz nicht ermittelt werden konnte. Unter der Einzelauflystung der Suppressoren ist die Gesamtzahl der jeweiligen Gruppenmitglieder aufgeführt.

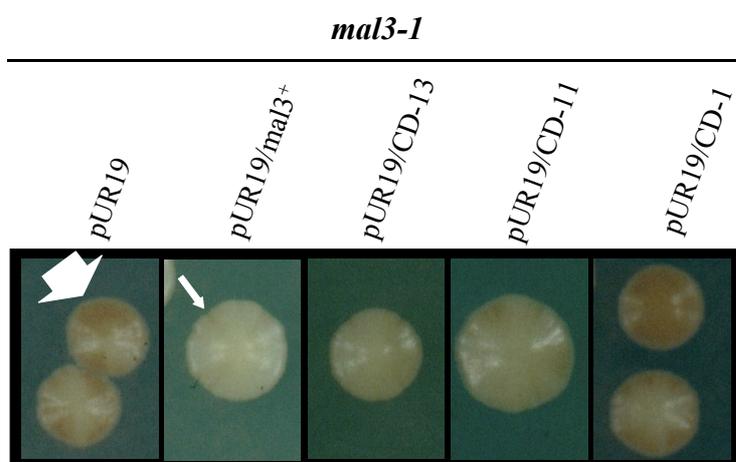
<i>mal3</i> <sup>+</sup>	<i>pad1</i> <sup>+</sup>	<i>spc7</i> <sup>+</sup>	<i>som1</i> <sup>+</sup>	nicht identifiziert
CD-27, CD-31, CD-32, CD-35, CD-37, CD-38, CD-39, CD-41, CD-42, CD-44, CD-45, CD-62, CD-73	CD-1, CD-4, CD-5, CD-25, CD-48, CD-59, CD-71, CD-72, CD-74, CD-81, CD-82	CD-6, CD-8, CD-9, CD-10, CD-22, CD-24, CD-26, CD-28, CD-36, CD-43, CD-46, CD-51, CD-54, CD-57, CD-58, CD-60, CD-61, CD-64, CD-65, CD-66, CD-68, CD-75, CD-79, CD-83, CD-84, CD-85 (auch als Gruppe 1 durch systematische Restriktionsanalyse identifiziert)	/	CD-2, CD-3, CD-7, CD-11, CD-12, CD-13, CD-14, CD-15, CD-16, CD-17, CD-18, CD-19, CD-20, CD-21, CD-23, CD-29, CD-33, CD-34, CD-40, CD-50, CD-52, CD-69, CD-76, CD-78, CD-80
13 Plasmide	11 Plasmide	26 Plasmide	0 Plasmide	25 Plasmide

#### 5.4 Komplementation des *mal3-1* Minichromosomenverlustes durch genomische *S. pombe* DNA-Bankplasmide

Im weiteren Verlauf der Charakterisierung der Suppressoren sollte untersucht werden, ob diese neben der Fähigkeit der Komplementation der TBZ-Hypersensitivität auch den erhöhten Minichromosomenverlust dieses Mutantenstammes ausgleichen können. Die Komplementation des erhöhten Minichromosomenverlustes des *mal3-1* durch ein Suppressorplasmid gilt als spezifisch für die Komplementation des mitotischen Mal3p Defektes. Dagegen kann der Ausgleich der TBZ-Hypersensitivität auch unspezifisch in Bezug auf die Mal3p Funktion erfolgen.

Hierzu wurde der *mal3-1* Mutantenstamm, der zusätzlich zu den drei endogenen Chromosomen ein nichtessentielles Chromosomenfragment enthält (Beinhauer et al., 1997), mit den Suppressorplasmiden transformiert. Eine spezifische Zellzahl der einzelnen Transformantenkulturen wurde auf Indikatorplatten ausplattiert (siehe Kapitel 4.9.1 und Kapitel 4.12). Vererbt die Transformante das Minichromosom stabil, so kommt es durch intragene Komplementation zwischen den mutierten Allelen *ade6-210* auf dem endogenen Chromosom 3 und *ade6-216* auf dem Minichromosom zur Ausbildung weißer Kolonien und die Zellen sind Adenin-prototroph. Ein Verlust des Minichromosoms läßt sich anhand der Ausbildung von roten Sektoren innerhalb der weißen Kolonien bestimmen. Die Zellen dieser Sektoren sind Adenin-auxotroph und eine Farbänderung wird durch die Ansammlung von Zwischenprodukten der Adeninbiosynthese bewirkt.

Abbildung 9 zeigt Beispiele für die Sektorierung der Kolonien verschiedener Transformanten. Die Negativkontrolle *mal3-1/pUR19* zeigt einen 380-fach erhöhten Minichromosomenverlust. Die ausgebildeten Kolonien sind hochsektoriert und besitzen dadurch eine rötliche Koloniefärbung. Der *mal3-1* Stamm, transformiert mit *mal3*<sup>+</sup>, zeigt nur vereinzelt die Ausbildung roter Sektoren innerhalb der ansonsten weißen Kolonie. Die Größe und Position einzelner Sektoren dieser Kolonien werden in der Abbildung durch weiße Pfeile markiert. Die Anwesenheit der Insertsequenzen CD-13 und CD-11 kann den erhöhten Minichromosomenverlust des *mal3-1* Stammes partiell ausgleichen. Beim Grad des Ausgleiches sind durchaus Unterschiede zu erkennen. Die Anwesenheit des Plasmids CD-1 zeigt keine Reduzierung der Koloniesektorierung des *mal3-1* Stammes. Die ausgebildeten Kolonien gleichen dem Erscheinungsbild der Negativkontrolle.



**Abbildung 9: Minichromosomenverlust des *mal3-1* Stammes transformiert mit verschiedenen Plasmiden**

Die Abbildung zeigt die Färbung und Sektorierung von Kolonien des *mal3-1* Stammes auf Selektivmedium (MM - Ura + Ade [5 mg/ml]), der mit unterschiedlichen Plasmiden transformiert wurde. Gezeigt sind Kolonien transformiert mit pUR19, pUR19/*mal3*<sup>+</sup> und des genomischen DNA-Bankvektors mit den Insertsequenzen CD-13, CD-11 und CD-1. Die Platten wurden für 10 Tage bei 24 °C inkubiert. Die Pfeile markieren rote Sektoren in den Kolonien.

Tabelle 6 zeigt zusammenfassend die Ergebnisse, die für den Minichromosomenverlust des *mal3-1* Stammes nach Transformation verschiedener Suppressorplasmide des genomischen Bankscreens erhalten wurden. Plasmide, die durch die Restriktions- und PCR-Analyse der gleichen Gruppe zugeordnet werden konnten, sind in der Tabelle nur einmal aufgeführt. Die zugehörige Suppressorgruppe ist dahinter entsprechend angegeben. Insgesamt konnte bei 12 der untersuchten Komplementationsgruppen ein Ausgleich des Minichromosomenverlustes für den *mal3-1* Stamm festgestellt werden. Der Grad der Suppression variiert auch hier. Durch das Suppressorplasmid pUR19/CD-1 bzw. die entsprechende Gruppe der PCR-Positiven für den *pad1*<sup>+</sup> ORF kann der Minichromosomenverlust nicht ausgeglichen werden. Auch 12 weitere Suppressorplasmide können zwar die erhöhte TBZ-Hypersensitivität des *mal3-1* Stammes ausgleichen, nicht aber den erhöhten Minichromosomenverlust dieses Stammes. Eine Komplementation des erhöhten Minichromosomenverlustes durch ein Suppressorplasmid gilt als spezifisch für den Ausgleich des mitotischen Defekts des *mal3-1* Stammes. Da diese Suppressoren nicht den Minichromosomenverlust ausgleichen, sind sie nicht von Bedeutung für die weitere Analyse des Screens.

Tabelle 6: Minichromosomenverlust von *mal3-1* transformiert mit unterschiedlichen Suppressoren

Die Koloniefärbung und -sektierung des *mal3-1* Mutantenstammes nach Transformation mit verschiedenen Suppressoren auf Selektivmedium (MM -Ura +Ade [5 mg/ml]) wurde ermittelt. Als Vektor für die Suppressoren der genomischen *S. pombe* Bank dient das Plasmid pUR19. Als Negativkontrolle wurde der leere Vektor transformiert, die Positivkontrolle trägt das *mal3*<sup>+</sup> als Insert. Der Grad der Suppression ist in Abstufungen von „-“ = keine Suppression bis „+++“ = gute Suppression aufgeführt. Angegeben sind außerdem die zugehörige Suppressorgruppe und die Anzahl ihrer Mitglieder.

<i>mal3-1</i>	Suppressorgruppe	Anzahl der Mitglieder	Suppression des Mini-chromosomenverlustes
pUR19	/	/	-
<i>mal3</i> <sup>+</sup>	/	/	+++
CD-1	PCR-Positive <i>pad1</i> <sup>+</sup>	11	-
CD-2	/	/	+
CD-3	/	/	-
CD-6	PCR-Positive <i>spc7</i> <sup>+</sup> /Restriktionsanalyse Gruppe 1	26	+
CD-11	/	/	+
CD-12	/	/	-
CD-13	/	/	++
CD-14	/	/	++
CD-15	Restriktionsanalyse Gruppe 2	3	+
CD-17	Restriktionsanalyse Gruppe 3	3	+
CD-18	/	/	+
CD-19	/	/	+
CD-20	/	/	+
CD-21	/	/	+
CD-27	PCR-Positive <i>mal3</i> <sup>+</sup>	13	+++
CD-29	/	/	-
CD-33	/	/	-
CD-34	/	/	-
CD-40	/	/	-
CD-50	/	/	-

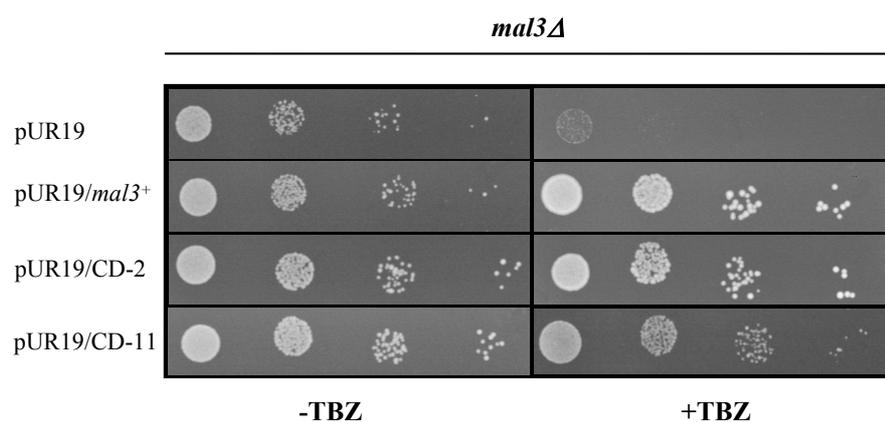
<i>mal3-1</i>	Suppressorgruppe	Anzahl der Mitglieder	Suppression des Mini-chromosomenverlustes
CD-69	/	/	-
CD-76	/	/	-
CD-78	/	/	-
CD-80	/	/	-

### 5.5 Komplementation der TBZ-Hypersensitivität des *mal3*<sup>+</sup> Deletionsstammes durch verschiedene Suppressorplasmide

Suppressorplasmide, die sowohl die TBZ-Hypersensitivität des *mal3-1* Stammes als auch den erhöhten Minichromosomenverlust dieses Stammes ausgleichen konnten, wurden auf die Fähigkeit untersucht, auch den TBZ-hypersensitiven Phänotyp eines *mal3*<sup>+</sup> Deletionsstammes (*mal3Δ*) ausgleichen zu können (Beinhauer et al., 1997). Die Suppression wurde in seriellen Tropftests auf Medium mit und ohne TBZ untersucht.

Abbildung 10 zeigt eine Zusammenstellung der Tropftestergebnisse für die Suppression der *mal3Δ* TBZ-Hypersensitivität ausgewählter Suppressorplasmide. Auf Platten ohne TBZ zeigen alle Stämme gutes Wachstum. Auf TBZ-haltigem Medium zeigt der *mal3Δ*, der mit dem Bankvektor pUR19 transformiert wurde, kein Wachstum, während er transformiert mit *mal3*<sup>+</sup> gutes Wachstum aufweist. Auch die Suppressoren CD-2 und CD-11 können die Hypersensitivität des *mal3Δ* Stammes gegenüber TBZ ausgleichen. Der Vergleich des Wachstums der Suppressoren untereinander läßt erkennen, daß geringfügige Unterschiede im Grad des Ausgleiches vorhanden sind.

Tabelle 7 stellt die Daten aller Suppressorplasmide noch einmal zusammen, die bei den



**Abbildung 10: Suppression der TBZ-Hypersensitivität des *mal3Δ* Stammes durch verschiedene Suppressoren**

Die Abbildung zeigt das Wachstumsverhalten des *mal3Δ* Stammes auf Selektivmedium (MM –Ura) ohne TBZ (-TBZ) und mit 7,5 µg/ml TBZ (+TBZ), der mit unterschiedlichen Plasmiden transformiert wurde. Gezeigt ist das Wachstum für pUR19, pUR19/*mal3*<sup>+</sup> und für die zwei Transformanten der genomischen Bankplasmide mit den Insertsequenzen CD-2 und CD-11. Die Platten wurden für 5 Tage bei 24 °C inkubiert.

seriellen Tropftestuntersuchungen für den *mal3Δ* erhalten wurden. Die Daten sind den Ergebnissen der TBZ-Suppression für den *mal3-1* Stamm vergleichend gegenübergestellt.

Tabelle 7: Wachstum des *mal3Δ* und des *mal3-1* Stammes transformiert mit unterschiedlichen Suppressoren

Das Wachstum des *mal3Δ* Stammes wurde nach Transformation mit verschiedenen Suppressoren auf Selektivmedium (MM –Ura) ohne TBZ (-TBZ) und mit 7,5 µg/ml TBZ (+TBZ) durch serielle Tropftests ermittelt. Für die Untersuchung des *mal3-1* Wachstums wurde dem Medium eine TBZ-Konzentration von 6,5 µg/ml TBZ zugefügt. Der Grad der Suppression ist in Abstufungen von „-“ = keine Suppression bis „+++“ = gute Suppression aufgeführt. Angegeben ist außerdem die zugehörige Suppressorgruppe.

Plasmid	-TBZ <i>mal3Δ</i> bzw. <i>mal3-1</i>	+TBZ		Suppressorgruppe
		<i>mal3Δ</i>	<i>mal3-1</i>	
pUR19	+++	-	-	/
<i>mal3</i> <sup>+</sup>	+++	+++	+++	/
CD-2	+++	+++	++	/
CD-6	+++	++	++	PCR-Positive <i>spc7</i> <sup>+</sup> /Restriktionsanalyse Gruppe 1
CD-11	+++	+	++	/
CD-13	+++	+	+	/
CD-14	+++	+	+	/
CD-15	+++	++	++	Restriktionsanalyse Gruppe 2
CD-17	+++	++	++	Restriktionsanalyse Gruppe 3
CD-18	+++	-	+	/
CD-19	+++	-	+	/
CD-20	+++	+	+	/
CD-21	+++	+	+	/
CD-27	+++	+++	+++	PCR-Positive <i>mal3</i> <sup>+</sup>

Beim Vergleich des Wachstumsverhaltens der Suppressorplasmide sind Unterschiede für den Ausgleich der TBZ-hypersensitiven Phänotypen erkennbar. Die Mehrzahl der Suppressorplasmide zeigt eine Suppression der TBZ-Hypersensitivität beider Stämme. Dabei variiert der Grad dieses Ausgleiches zwischen den einzelnen Plasmiden. Oft ist der Grad der Suppression für beide Stämme annähernd gleich. Ausnahmen bilden hier CD-11, der stärker die TBZ-Hypersensitivität des *mal3-1* Stammes ausgleicht bzw. CD-2, der eine deutlichere Suppression für den *mal3Δ* Stamm zeigt. Dagegen können die Insertsequenzen CD-18 und CD-19 nur die TBZ-Hypersensitivität des *mal3-1* Stammes supprimieren. Sie ermöglichen aber nicht das Wachstum des *mal3Δ* Stammes auf TBZ-haltigem Medium.

## 5.6 Weiterführende Analysen zu den offenen Leserahmen der genomischen *S. pombe* DNA-Banksequenzen

Die Inserts der genomischen *S. pombe* DNA-Bank, die sowohl die Hypersensitivität des *mal3-1* Stammes gegenüber TBZ als auch den erhöhten Minichromosomenverlust dieses Mutantenstammes komplementieren konnten, sollen zur Klärung der mitotischen Funktion des Mal3p Proteins helfen. Die Insertsequenzen verschiedener Bankplasmide wurden durch Sequenzierung ermittelt. Mit den erhaltenen DNA-Sequenzen erfolgte eine computergestützte Homologiesuche in der *Schizosaccharomyces pombe* Datenbank des Wellcome Trust Sanger Institute. Zur Ermittlung von homologen Proteinen wurden zusätzlich die Datenbank *Saccharomyces* Genome Database und die Datenbank Proteome Bioknowledge Library verwendet (siehe Kapitel 8.7).

Neben der DNA-Sequenz, die für das Mal3p kodiert, wurden insgesamt 13 verschiedene Suppressorinserts isoliert. Viele Inserts der genomischen *S. pombe* DNA-Bank enthalten Leserahmen, die bisher nur durch Sequenzierung des *S. pombe* Genoms und anschließende computergestützte Analyse bestimmt wurden. Ihre hypothetischen Proteine sind nicht experimentell charakterisiert.

Eine Detailanalyse aller neu identifizierten Suppressorsequenzen konnte im Rahmen dieser Doktorarbeit nicht durchgeführt werden. Diese neuen Suppressorsequenzen, die zum Teil für eine Gruppe mehrfach isolierter Insertsequenzen stehen, werden hier näher erläutert. Die Suppressorsequenzen CD-1, CD-6 und CD-14 wurden für die detailliertere Bearbeitung ausgewählt. Durch parallel durchgeführte Arbeiten in unserem Labor wurde jedoch damit begonnen, die Funktion weiterer ORFs der Suppressorinserts CD-2 (*dam1*<sup>+</sup>), CD-20 (*stu1*<sup>+</sup>) und CD-21 (*pic1*<sup>+</sup>) im Hinblick auf Mal3p zu analysieren. In den folgenden Ausführungen werden die einzelnen Insertsequenzen beschrieben. Es wird versucht, die für die Suppression verantwortlichen ORFs zu ermitteln und nicht charakterisierten ORFs anhand von Sequenzvergleichen und Literaturrecherchen eine mögliche Funktion zuzuordnen. In Kapitel 5.6.1 sind alle Suppressoren zusammengefaßt, die nur den TBZ hypersensitiven Phänotyp des *mal3-1* Stammes ausgleichen können und daher nicht in direktem Zusammenhang mit der mitotischen Funktion von Mal3p stehen. In Kapitel 5.6.2 werden die Suppressoren beschrieben, die zusätzlich auch den erhöhten Minichromosomenverlust des *mal3-1* Stammes supprimieren. Einige der hier erläuterten Suppressorinserts stehen für die Gruppen, die im Rahmen der systematischen Restriktions- bzw. PCR-Analyse gebildet wurden (siehe Kapitel

5.3.1 und Kapitel 5.3.2). Informationen zu den Größen aller Insertsequenzen sind im Anhang aufgeführt (siehe Tabelle 13).

### **5.6.1 Charakterisierung der Suppressorinserts, die die TBZ-Hypersensitivität des *mal3-1* Stammes supprimieren**

Alle Suppressorinserts, die in diesem Kapitel beschrieben werden, können nur die TBZ-Hypersensitivität des *mal3-1* und *mal3Δ* Stammes supprimieren. Dabei variiert der Grad des Ausgleiches zwischen den verschiedenen Suppressorinserts. Keines der Suppressorinserts kann jedoch den *mal3-1* Minichromosomenverlust supprimieren (siehe Kapitel 5.4). Die Transformantenkolonien sind hochsektoriert und besitzen ein rötliches Erscheinungsbild. Das Kriterium für die Auswahl der Suppressoren war jedoch die Komplementation beider *mal3-1* Phänotypen.

Dennoch werden die ORFs dieser Suppressoren hier kurz beschrieben. Auch weitere Versuche, die den Ausschluß dieser Suppressorinserts bestätigt haben, sind hier aufgeführt (siehe Kapitel 5.6.1.1).

#### **5.6.1.1 Das Suppressorinsert CD-1 enthält drei offene Leserahmen, von denen das *pad1*<sup>+</sup> Gen die Hypersensitivität des *mal3-1* Stammes gegenüber TBZ supprimiert**

Stellvertretend für die Gruppe von 11 genomischen Bankplasmiden, bei denen durch PCR-Analyse der *pad1*<sup>+</sup> ORF nachgewiesen wurde (siehe Kapitel 5.3.2), ist hier die Insertsequenz CD-1 beschrieben. Für CD-1 wurde eine 100%ige Übereinstimmung mit einem 3221 Bp großen Sequenzbereich auf Chromosom 1 von *S. pombe* gefunden, der nach Angaben der Datenbank Teile der putativen ORFs SPAC31G5.12c (*n150*<sup>+</sup>) und SPAC31G5.13 (*pad1*<sup>+</sup>), sowie den putativen ORF SPAC31G5.21 umfaßt (siehe Abbildung 11).

Vom ORF SPAC31G5.12c sind 71 % der DNA-Sequenz, die für den N-terminalen Proteinbereich kodiert, in der Insertsequenz enthalten. Er kodiert für ein hypothetisches 24,5 kDa Protein, welches eine Identität von 44 % zum Protein Maf1 aus *Saccharomyces cerevisiae* besitzt. Maf1 ist ein putativer negativer Effektor der RNA-Polymerase III. Er reprimiert die RNA-Polymerase III abhängige Transkription (Pluta et al., 2001).

Das Insert enthält außerdem die vollständige DNA-Sequenz des ORFs SPAC31G5.21. Dieser ORF kodiert für ein hypothetisches Protein von 13,7 kDa, das keine signifikante Homologie zu anderen Proteinen der Datenbank aufweist und bisher nicht untersucht wurde.

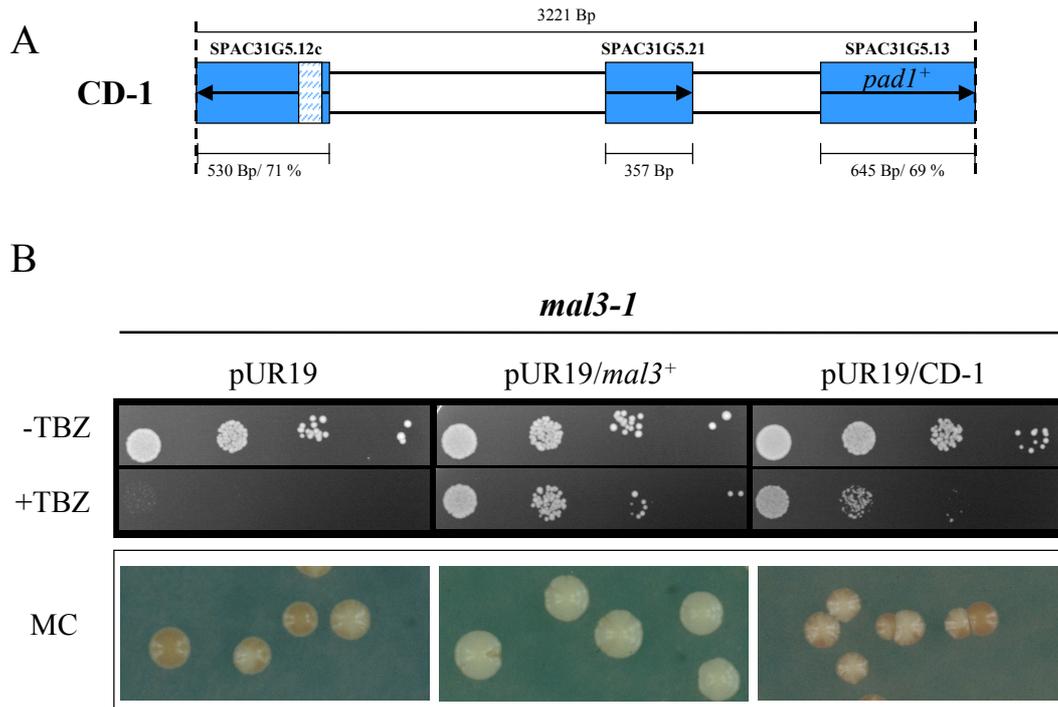
Ebenfalls 69 % der DNA-Sequenz des ORFs SPAC31G5.13 sind auf dem Insert enthalten, die für den N-terminalen Teil des essentiellen Pad1p Proteins kodiert. Das Pad1p wurde als

Bestandteil der 19S regulatorischen Untereinheit des Proteasoms, einem Multiprotein-komplex, der bei der Proteindegradation eine wichtige Funktion spielt, charakterisiert (Wilkinson et al., 1999). Eine Mutation oder die Überexpression der Gensequenz, die für eine C-terminal um 29 Aminosäuren verkürzte Proteinvariante kodiert, führen zur Resistenz gegenüber Mikrotubuli-destabilisierenden Chemikalien (Shimanuki et al., 1995; Penney et al., 1998).

Vergleichbar mit dieser C-terminal verkürzten Proteinvariante ist das Protein, welches durch das DNA-Insert kodiert wird und im genomischen *S. pombe* Bankscreen mehrfach erhalten wurde. Es kodiert für den N-terminalen Bereich eines C-terminal um 93 Aminosäuren verkürzten Proteins. Die Überexpression dieses DNA-Fragmentes konnte die TBZ-Hypersensitivität des *mal3Δ* Stammes supprimieren.

Diese Suppression durch Pad1p ist jedoch nicht spezifisch für den Ausgleich im Zusammenhang mit Mal3p. Die Untersuchung des Minichromosomenverlustes hat gezeigt, daß das Suppressorinsert CD-1 den Verlust des nichtessentiellen Minichromosoms des *mal3-1* Stammes nicht komplementieren kann (siehe Kapitel 5.4 und Abbildung 11).

Um weiter zu prüfen, ob die erhaltene Suppression spezifisch für *mal3<sup>+</sup>* ist, oder ob es ein genereller Ausgleich der Hypersensitivität gegenüber der verwendeten Chemikalie TBZ ist, wurde durch Überexpression des Suppressorinserts CD-1 in einem anderen TBZ-hypersensitiven *S. pombe* Stamm getestet. Das *spil<sup>+</sup>* Gen des verwendeten *spil-25* Mutantenstammes kodiert für die *S. pombe* Ran-GTPase, die eine wichtige Funktion für den Kern-Zytoplasmatransport und den korrekten Aufbau des Mikrotubulizytoskeletts der Zelle besitzt (Fleig et al., 2000). Auch dieser Mutantenstamm zeigt eine Hypersensitivität gegenüber der Mikrotubuli-destabilisierenden Chemikalie TBZ. Die Transformation mit dem Suppressorplasmid pUR19/CD-1 ermöglicht eine partielle Suppression des *spil-25* TBZ-hypersensitiven Phänotyps (siehe Abbildung 11). Da das Suppressorinsert sowohl die TBZ-Hypersensitivität des *mal3-1* Stammes als auch des Kontrollstammes *spil-25* ausgleichen konnte, wird von einer generellen Suppression der TBZ-Hypersensitivität ausgegangen. CD-1 hat somit keine Bedeutung für die weitere Analyse des Mal3p Proteins der Spaltheife. Vermutlich ist die Überexpression der DNA-Sequenz, die für das C-terminal verkürzte Pad1p Protein kodiert, für die Suppression der TBZ-Hypersensitivität der Stämme verantwortlich (Shimanuki et al., 1995).



**Abbildung 11: Schematische Darstellung des Suppressorinserts CD-1 und Komplementation der *mal3-1* Phänotypen**

Teil A: Im Fall von pUR19/CD-1 enthält der 5,5 Kb große pUR19 Bankvektor das hier dargestellte 3221 Bp große genomische *S. pombe* DNA-Insert. Das Insert enthält nach Angaben der Datenbank vermutlich Teile von drei ORFs: 71 % des ORFs SPAC31G5.12c (530 Bp), den vollständigen ORF SPAC31G5.21 (357 Bp), sowie 69 % des ORFs SPAC31G5.13 (645 Bp). Die Richtung der Pfeile in den Boxen, welche die ORFs darstellen, gibt die Orientierung der offenen Leserahmen an. Die schraffierte Box stellt eine 97 Bp große Intronsequenz dar, die den Leserahmen unterbricht. Gestrichelte Linien am Ende der Insertsequenz verdeutlichen, daß ein Teil des jeweiligen ORFs nicht auf dem Suppressorplasmid vorhanden ist. Bei der graphischen Darstellung kodierender und nichtkodierender Bereiche des Inserts wurde das Größenverhältnis berücksichtigt.

Teil B: Suppression der TBZ-Hypersensitivität und des Minichromosomenverlustes des *mal3-1* Stammes, der mit unterschiedlichen Plasmiden transformiert wurde. Gezeigt sind Transformanten des Genbankvektors pUR19, pUR19/*mal3*<sup>+</sup> und pUR19/CD-1. Für die Tropftestuntersuchungen wurde das Selektivmedium mit 6,5 µg/ml TBZ (+TBZ) und ohne TBZ (-TBZ) für 5 Tage bei 24 °C inkubiert. Der Minichromosomenverlust wurde auf Selektivmedium mit einer Adeninkonzentration von 5 mg/ml durchgeführt. Die Platten wurden 10 Tage bei 24 °C inkubiert.

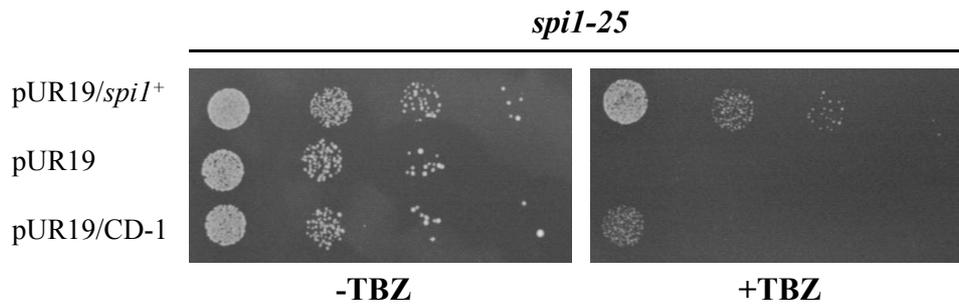
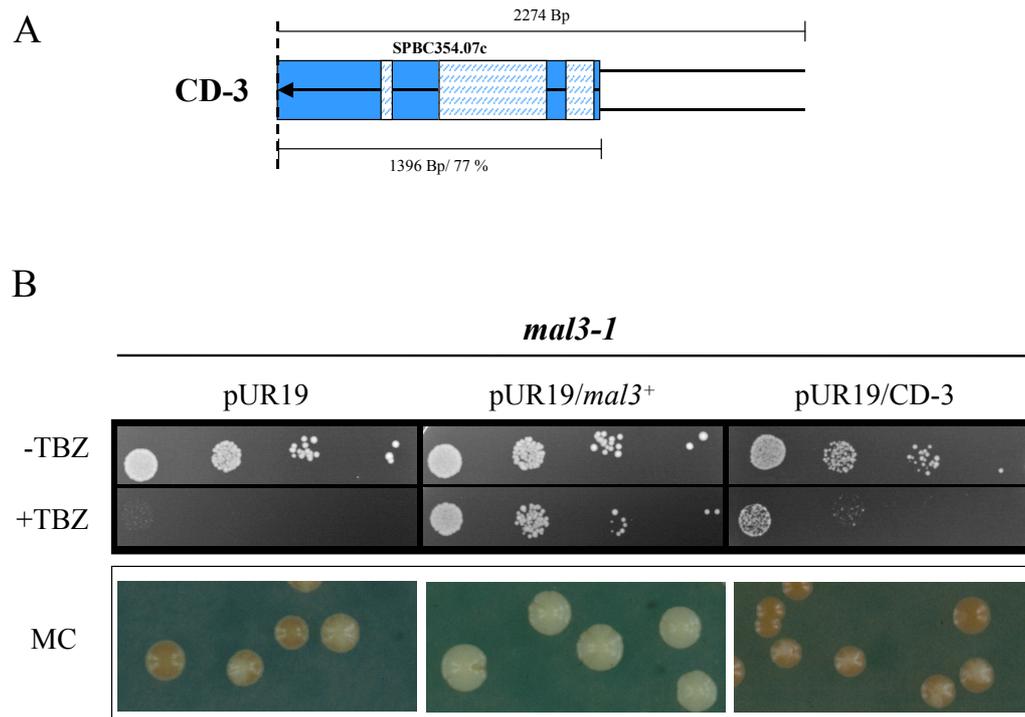


Abbildung 12: Komplementation der *spi1-25* TBZ-Hypersensitivität durch das Suppressorinsert CD-1  
 Suppression der TBZ-Hypersensitivität des *spi1-25* Stammes, der mit unterschiedlichen Plasmiden transformiert wurde. Gezeigt sind Transformanten des Genbankvektors pUR19 mit *spi1*<sup>+</sup> als DNA-Insert, pUR19 und pUR19 mit CD-1 als Insertsequenz. Für die Tropftestuntersuchungen wurde das Selektivmedium mit 6,5 µg/ml TBZ (+TBZ) und ohne TBZ (-TBZ) für 5 Tage bei 24 °C inkubiert.

### 5.6.1.2 CD-3 enthält einen ORF, der vermutlich für ein Protein der Ergosterolbiosynthese kodiert

Das Insert des Suppressors CD-3 enthält 77 % des ORFs SPBC354.07c, der für den N-terminalen Bereich eines putativen Proteins kodiert (siehe Abbildung 13). Nach Angaben der Datenbank besitzt dieses putative 45 kDa große Protein eine evolutionär konservierte Oxysterol-Bindedomäne und vermutlich 10 Transmembrandomänen. Für Mitglieder dieser Familie wurde eine Funktion in der Sterolbiosynthese ermittelt (Jiang et al., 1994; Beh, et al., 2001). Das Protein zeigt eine Identität von 38 % bzw. 37 % zu den *S. cerevisiae* Proteinen Kes1 und Hes1, für die eine Funktion im Rahmen der Ergosterolbiosynthese nachgewiesen wurde (Jiang et al., 1994; Li et al., 2002a).

Zu klären ist, ob die Überexpression des Suppressors möglicherweise eine Veränderung in der Zusammensetzung der Zellmembranen bewirkt. Durch eine Abschirmung gegenüber TBZ ließe sich zum Beispiel dieser Ausgleich der TBZ-Hypersensitivität erklären.



**Abbildung 13: Schematische Darstellung des Suppressorplasmids pUR19/CD-3 und Komplementation der *mal3-1* Phänotypen**

Teil A: Das Plasmid pUR19/CD-3 besteht aus dem 5,5 Kb großen pUR19 Bankvektoranteil und einem hier dargestellten 2274 Bp großen genomischen *S. pombe* DNA-Insert. Das Insert enthält 77% des ORFs SPBC354.07c (1396 Bp). Die DNA-Sequenz besitzt drei Intronsequenzen (48 Bp, 468 Bp und 123 Bp).

Teil B: Suppression der TBZ-Hypersensitivität und des Minichromosomenverlustes des *mal3-1* Stammes, der mit unterschiedlichen Plasmiden transformiert wurde. Gezeigt sind Transformanten des Genbankvektors pUR19, pUR19/*mal3*<sup>+</sup> und pUR19/CD-3. Weitere Details können Abbildung 11 entnommen werden.

### 5.6.1.3 CD-12 zeigt keine deutliche Übereinstimmungen mit DNA-Sequenzen des *S. pombe* Genoms

Für die ansequenzierten Teilsequenzen des Suppressorplasmids pUR19/CD-12 wurde im Rahmen der Datenbankrecherche keine 100 %ige Identität zu DNA-Sequenzen des *S. pombe* Genoms ermittelt. Die Teilsequenzen zeigen lediglich kurze Übereinstimmungen mit Bereichen verschiedener *E. coli* Vektoren. Durch Restriktionsanalyse konnte die Größe dieses Inserts auf etwa 1600 Bp eingegrenzt werden.

Die Suppressoren CD-1, CD-3 und CD-12 supprimieren nur den TBZ-hypersensitiven Phänotyp des *mal3-1* Stammes, nicht aber den erhöhten Minichromosomenverlust. Für die Komplementationsgruppe CD-1 wurde gezeigt, daß sie neben der TBZ-Hypersensitivität des *mal3-1* Stammes auch die TBZ-Hypersensitivität des *spi1-25* Stammes komplementieren konnte. Da als Auswahlkriterium die Komplementation beider *mal3-1* Phänotypen festgelegt wurde, sind diese Suppressoren nicht von Interesse für die weitere Analyse des genomisch Bankscreens.

## 5.6.2 Charakterisierung der Suppressorinserts, die erhöhten Minichromosomenverlust und die TBZ-Hypersensitivität des *mal3-1* Stammes supprimieren

### 5.6.2.1 Ein ORF auf CD-2/CD-15 kodiert für ein Protein mit Homologie zum Mikrotubuli-assoziierten *S. cerevisiae* Protein Dam1

Das Suppressorinsert CD-15 wurde dreimal im genomischen *S. pombe* Bankscreen isoliert und ist stellvertretend für die im Rahmen der systematischen Restriktionsanalyse gebildeten Gruppe 2 (siehe Kapitel 5.3.1). Das Insertfragment CD-15 ist 1662 Bp groß und umfaßt 82 % des ORFs SPAC589.08c (*dam1*<sup>+</sup>) und den vollständigen ORF SPAC589.09 von Chromosom 1 der Spaltheefe. Der ORF SPAC589.09 überlappt sich mit dem ORF SPAC589.08c um ein Basenpaar (siehe Abbildung 14).

Außerdem wurde ein 6219 Bp großes DNA-Insert isoliert, welches zusätzlich zur Insertsequenz des Suppressors CD-15 noch drei weitere Leserahmen enthält. Dies sind die vollständigen Leserahmen der ORFs SPAC589.10c (*ubi3*<sup>+</sup>), SPAC589.11 und 80 % des ORFs SPAC589.12. Die partiellen Leserahmen SPAC589.08c und SPAC589.12 kodieren hierbei für den N-terminalen Bereich der Proteine (siehe Abbildung 14).

Das verkürzte DNA-Fragment CD-15 ist vergleichbar mit einer partiellen Subklonierung der Insertsequenz CD-2. Da die Teilsequenz CD-2 für die Suppression ausreicht, ist es unwahrscheinlich, daß die Leserahmen SPAC589.10c, SPAC589.11 und SPAC589.12 des Suppressorinserts CD-15 für den Ausgleich der *mal3-1* Phänotypen verantwortlich sind. Dennoch werden hier auch diese ORFs kurz beschrieben.

Der ORF SPAC589.10c kodiert für ein putatives 17,2 kDa Protein. Er ist identisch mit dem ORF SPAC6G10.11c auf Chromosom 1, der für das ribosomale Spalthefefprotein Ubi3p kodiert (Tallada et al., 2002). Als Mitglied der Ubiquitinfamilie ist das Protein an der Proteindegradation beteiligt.

Der ORF SPAC589.11 enthält die Information für ein hypothetisches 21,4 kDa Protein mit Homologie zum nichtessentiellen 23 kDa *S. cerevisiae* Protein Yol114c (Iwanejko et al., 1999). Die Funktion dieses Protein wurde bisher nicht näher untersucht.

Der ORF SPAC589.12 kodiert für den N-terminalen Proteinbereich eines hypothetischen 110 kDa Proteins mit 20 Transmembrandomänen. Es besitzt eine Identität von 38 % zum Protein Ycr017c aus *S. cerevisiae*. Für dieses nichtessentielle Protein der Bäckerhefe wird eine Funktion als Sensor/Transportprotein in einer Signalkaskade, welche die Beschaffenheit der Zellwand kontrolliert, angenommen (Martin-Yken et al., 2001).

Der ORF SPAC589.08c, von dem 82 % auf dem Insert vorhanden sind, kodiert vermutlich für die ersten 128 Aminosäuren eines 17,4 kDa großen Proteins. Das putative Protein zeigt Identität von 30 % zum Mikrotubuli-bindenden Protein Dam1 der Bäckerhefen. Dam1 ist als Komponente eines Multiproteinkomplexes an der Regulation und Ausbildung von bipolaren Kinetochor-Mikrotubuli-Verknüpfungen während der Mitose beteiligt (Übersichtsartikel von Cheesemann et al., 2002b; Janke et al., 2002; Li et al., 2002b). Interaktionen dieses Komplexes mit den Zentromerkomplexen Ctf19 und Ndc80 wurden bereits beschrieben (Cheesemann et al., 2002a).

Der ORF SPAC589.09 kodiert nach Datenbankangaben für ein putatives 45,3 kDa Protein mit einem konservierten Motiv für eine CRAL/TRIO-Domäne (vom engl. cellular retinaldehyde-binding/triple function domain). Ein Protein mit dieser konservierten Lipidbindedomäne gibt es auch in der Bäckerhefe. Das Protein zeigt Identität von 32 % zum Protein Csr1 aus *S. cerevisiae*, welches eine Funktion im Rahmen des Phosphatidylinositol Metabolismus besitzt (Li et al., 2000; Regnacq et al., 2002).

Von beiden eventuell in Frage kommenden ORFs ist SPAC589.08c, der für das Dam1 Homolog der Spaltheefe kodiert, möglicherweise für die Suppression verantwortlich. Ein Protein, das wie sein Bäckerhefehomolog eine Funktion bei der Regulation und Ausbildung von Kinetochor-Mikrotubuli-Verknüpfungen besitzt, könnte eine Erklärung für den Rückgang des Minichromosomenverlustes des *mal3-1* Stammes sein. Ob dieser ORFs wirklich für den Ausgleich der *mal3-1* Phänotypen verantwortlich ist, muß jedoch noch durch Subklonierungen und weitere Analysen geklärt werden.

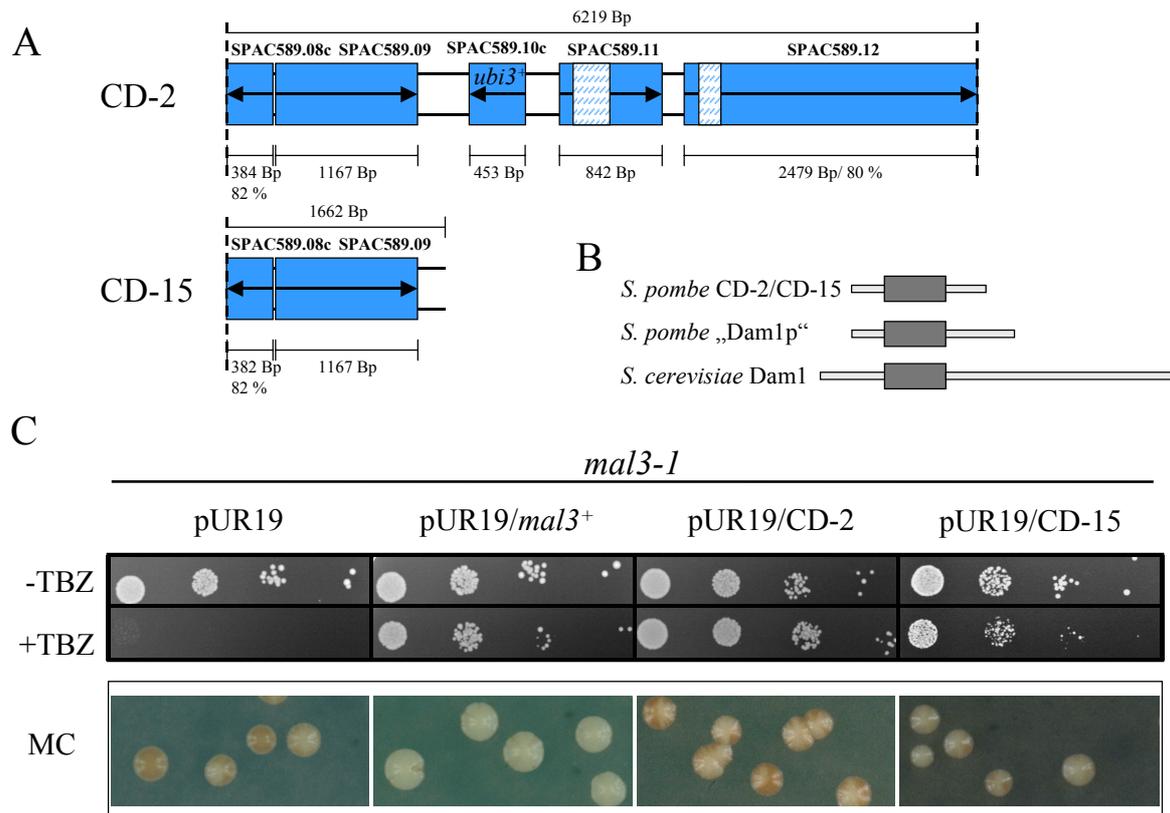


Abbildung 14: Schematische Darstellung der Suppressorplasmide pUR19/CD-2 und pUR19/CD-15 und die Komplementation der *mal3-1* Phänotypen

Teil A: Das Plasmid pUR19/CD-2 besteht aus dem 5,5 Kb großen pUR19 Bankvektor und dem hier dargestellten 6219 Bp großen genomischen *S. pombe* DNA-Insert. Das Plasmid pUR19/CD-15 besitzt nur eine 1662 Bp große genomische *S. pombe* DNA-Insertsequenz. Dargestellt sind fünf ORFs: 82 % des ORFs SPAC589.08c (382 Bp bzw. 384 Bp), die vollständigen ORFs SPAC589.09 (1167 Bp), SPAC589.10c (453 Bp), SPAC589.11 (842 Bp/293 Bp Intron), sowie 80 % des ORFs SPAC589.12 (2479 Bp/184 Bp Intron).

Teil B: Dargestellt ist schematisch der Bereich mit der größten Homologie mit 30% zwischen dem *S. pombe* Protein und dem homologen Protein aus *S. cerevisiae*. Dieser Bereich umfaßt 58 Aminosäuren und ist als Rechteck dargestellt. Zusätzlich dargestellt ist ein Protein, welches durch die DNA-Sequenz des Suppressorinserts kodiert wird.

Teil C: Suppression der TBZ-Hypersensitivität und des Minichromosomenverlustes des *mal3-1* Stammes, der mit unterschiedlichen Plasmiden transformiert wurde. Gezeigt sind Transformanten des Genbankvektors pUR19, pUR19/*mal3*<sup>+</sup>, pUR19/CD-2 und pUR19/CD-15. Kleinere Wachstumsunterschiede der Transformanten, die mit den Suppressorplasmiden transformiert wurden, sind durch abweichende Inkubationszeiten zu erklären.

### 5.6.2.2 CD-6 enthält den ORF SPCC10.20.02, der für ein neues Zentromerprotein in *S. pombe* kodiert

Das Suppressorinsert CD-6 wurde 26-mal als Suppressorfragment isoliert und steht für Mitglieder der Gruppe 1 bei der systematische Restriktionsanalyse (siehe Kapitel 5.3). Die Insertsequenz umfaßt 50 % der Information des ORFs SPCC1020.02 (*spc7*<sup>+</sup>) auf Chromosom 3 der Spaltheefe. Er kodiert für die C-terminale Hälfte eines bisher uncharakterisierten Proteins. Dieses wurde im Rahmen dieser Arbeit mit dem Namen Spc7p versehen und detaillierter untersucht (siehe Kapitel 5.7) und wird daher an dieser Stelle nur kurz behandelt.

2028 Bp von insgesamt 4095 Bp sind auf dem 2221 Bp großen Insert enthalten (siehe Abbildung 15). Der ORF kodiert für ein evolutionär konserviertes 154 kDa großes Protein mit 21 % Identität zum Protein Spc105 der Bäckerhefe (Wigge et al., 1998). Dieses Protein wurde ursprünglich als Spindelpolkkörperprotein identifiziert. Diese Arbeit zeigt jedoch, daß es sich bei beiden Proteinen um neue Komponenten des Zentromers in beiden Hefen handelt (siehe Kapitel 5.7 und Kapitel 5.8).

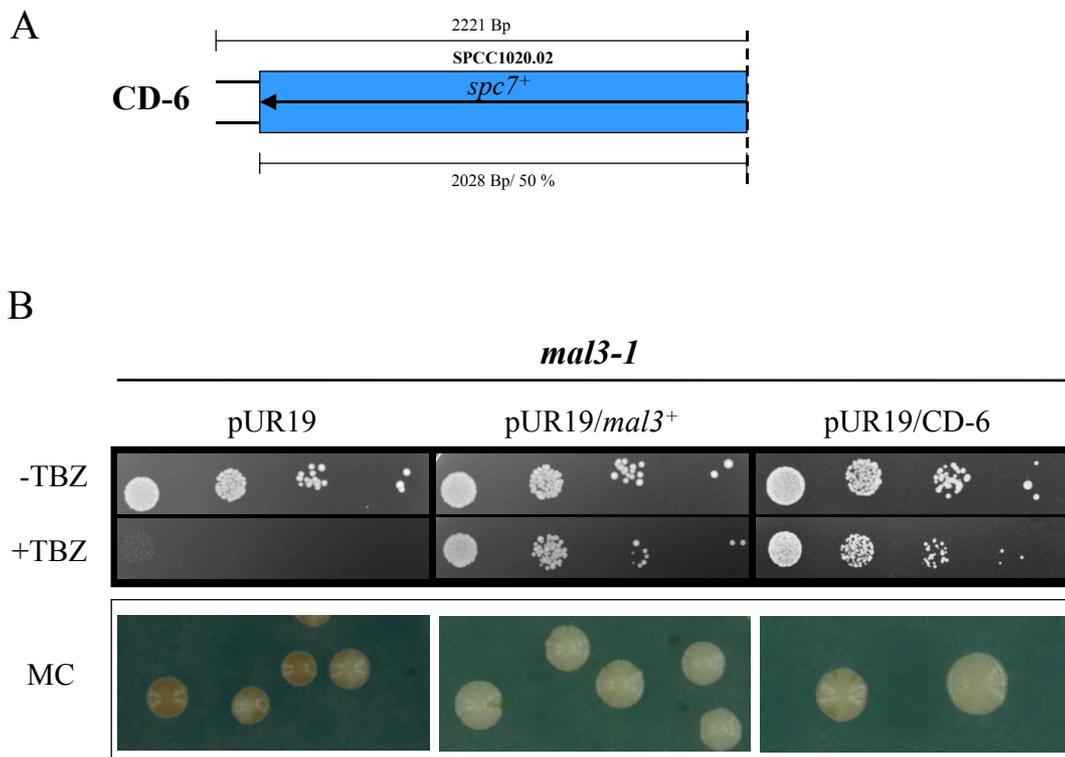


Abbildung 15: Schematische Darstellung des Suppressorplasmids pUR19/CD-6 und Komplementation der *mal3-1* Phänotypen

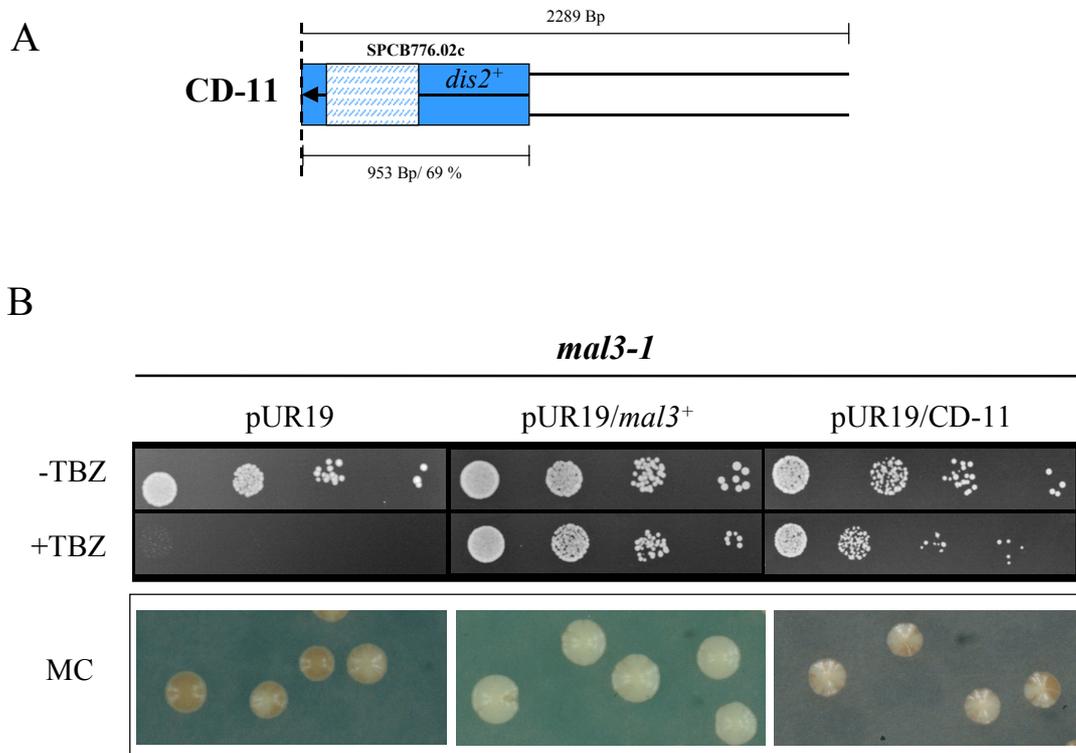
Teil A: Das Plasmid pUR19/CD-6 besteht aus dem 5,5 Kb großen pUR19 Bankvektoranteil und einem hier dargestellten 2221 Bp großen genomischen *S. pombe* DNA-Insert. Das Insert enthält 50 % des ORFs SPCC1020.02 (2028 Bp).

Teil B: Suppression der TBZ-Hypersensitivität und des Minichromosomenverlustes des *mal3-1* Stammes, der mit unterschiedlichen Plasmiden transformiert wurde. Gezeigt sind Transformanten des Genbankvektors pUR19, pUR19/*mal3*<sup>+</sup> und pUR19/CD-6.

### 5.6.2.3 CD-11 enthält den *dis2*<sup>+</sup> ORF, der für eine Serin/Threonin Proteinphosphatase kodiert und an der Regulation der Chromosomensegregation beteiligt ist

Die Insertsequenz umfaßt nur einen bereits charakterisierten ORF SPBC776.02c (*dis2*<sup>+</sup>) auf Chromosom 2. Das Suppressorinsert CD-11 enthält mit 953 Bp 69 % der Information für den N-terminalen Bereich des 38 kDa großen Proteins Dis2p (siehe Abbildung 16). Bei diesem Spaltheferprotein handelt es sich um eine katalytische Untereinheit einer Serin/Threonin Proteinphosphatase der PP1-Familie, die an der Schwesterchromatidtrennung während der

Mitose beteiligt ist (Ohkura et al., 1988). Betreffende Phosphatase Mutantenstämme zeigen keine Teilung der Schwesterchromatiden. Zum Protein Glc7 aus *S. cerevisiae* besitzt es eine Identität von 89 %. Mutationen in *GLC7* oder die Überexpression eines Gens, welches für einen Glc7 Inhibitor kodiert, supprimieren die Chromosomensegregationsdefekte des Aurora-Kinasehomologs Ipl1 (Francisco et al., 1994; Sassoon et al., 1999).



**Abbildung 16:** Schematische Darstellung des Suppressorplasmids pUR19/CD-11 und Komplementation der *mal3-1* Phänotypen

Teil A: Das Plasmid pUR19/CD-11 besteht aus dem 5,5 Kb großen pUR19 Bankvektoranteil und einem hier dargestellten 2289 Bp großen genomischen *S. pombe* DNA-Insert. Das Insert enthält 69 % des ORFs SPCB776.02 (953 Bp).

Teil B: Suppression der TBZ-Hypersensitivität und des Minichromosomenverlustes des *mal3-1* Stammes, der mit unterschiedlichen Plasmiden transformiert wurde. Gezeigt sind Transformanten des Genbankvektors pUR19, pUR19/*mal3*<sup>+</sup> und pUR19/CD-11.

#### 5.6.2.4 Im Suppressorinsert CD-13 sind DNA-Sequenzen von fünf verschiedenen ORFs enthalten

Das 6108 Bp große DNA-Insert CD-13 beinhaltet die vollständigen Leserahmen der ORFs SPATRNAMET.02, SPAC9.11 und SPAC9.12c, sowie Teile der ORFs SPAC9.10 und SPAC9.13c von Chromosom 1 der Spalthefe (siehe Abbildung 17).

Der ORF SPAC9.10 ist mit 1776 Bp zu 98 % auf der Insertsequenz vorhanden. Die ersten 27 Bp, die für den N-Terminus des putativen Proteins kodieren, fehlen der Insertsequenz. Aufgrund von computerunterstützten Berechnungen werden diesem putativen Protein von

65 kDa 12 Transmembranhelices zugeschrieben. Es besitzt eine Identität von 27 % zum Aminosäurepermeaseprotein Uga4 aus *S. cerevisiae* (Andre et al., 1993; Khamessan et al., 2001). Mit 9 bis 12 möglichen Transmembranbereichen ist dieses 62 kDa große Protein am selektiven Transport durch die biologische Membran beteiligt. Auch für das *S. pombe* Protein wird aufgrund der Homologie eine Funktion als Aminosäurepermease vermutet.

Der ORF SPATRNAMET.02 ist mit 83 Bp vollständig auf dem DNA-Insert vorhanden und kodiert für eine tRNA Methionin Sequenz. Transfer-RNAs spielen eine wichtige Funktion bei der Proteinbiosynthese.

Ein weiteres hypothetisches Protein wird vom ORF SPAC9.11 kodiert. Die 1045 Bp lange DNA-Sequenz kodiert für ein putatives 36,9 kDa großes Protein, welches bisher nicht charakterisiert wurde. Überexpression des ORFs kann die Sensitivität gegenüber hohen Osmolaritäten der Deletionsmutante *hos2Δ* supprimieren (Nakamichi et al., 2000). Die Funktion des Hos2p Proteins ist nicht weiter bekannt.

Der ORF SPAC9.12c steht ebenfalls für ein hypothetisches 33 kDa Protein. Es zeigt eine Identität von 29 % zum mitochondrialen F1 ATPase Chaperon Atp12 aus *S. cerevisiae*, welches an der Zusammensetzung der mitochondrialen F1-F0 ATPase beteiligt ist (Ackerman et al., 1990; Ackerman et al., 2002).

Der letzte ORF des DNA-Inserts, SPAC9.13c, ist nur zu 25 % auf dem Suppressorplasmid vorhanden. 613 Bp des 813 Bp großen Leserahmens fehlen. Der Bereich, der für den N-Terminus des Proteins kodiert, fehlt. Das bereits experimentell charakterisierte 32 kDa große Protein Cwf16p ist evolutionär konserviert und besitzt eine Funktion beim m-RNA-Spleißen (Ohi et al., 2002). Sein 33 kDa Homolog Cwc16 in *S. cerevisiae* wurde entsprechend als pre-m-RNA-Spleißfaktor charakterisiert (Forrova et al., 1992). Nach bisherigem Wissensstand über die Funktion von Mal3p in der Mitose können keine sicheren Rückschlüsse gemacht werden, welcher dieser putativen ORFs für die Suppression der *mal3-1* Phänotypen verantwortlich ist. Dies muß durch Subklonierung und weitere Analysen gezeigt werden.

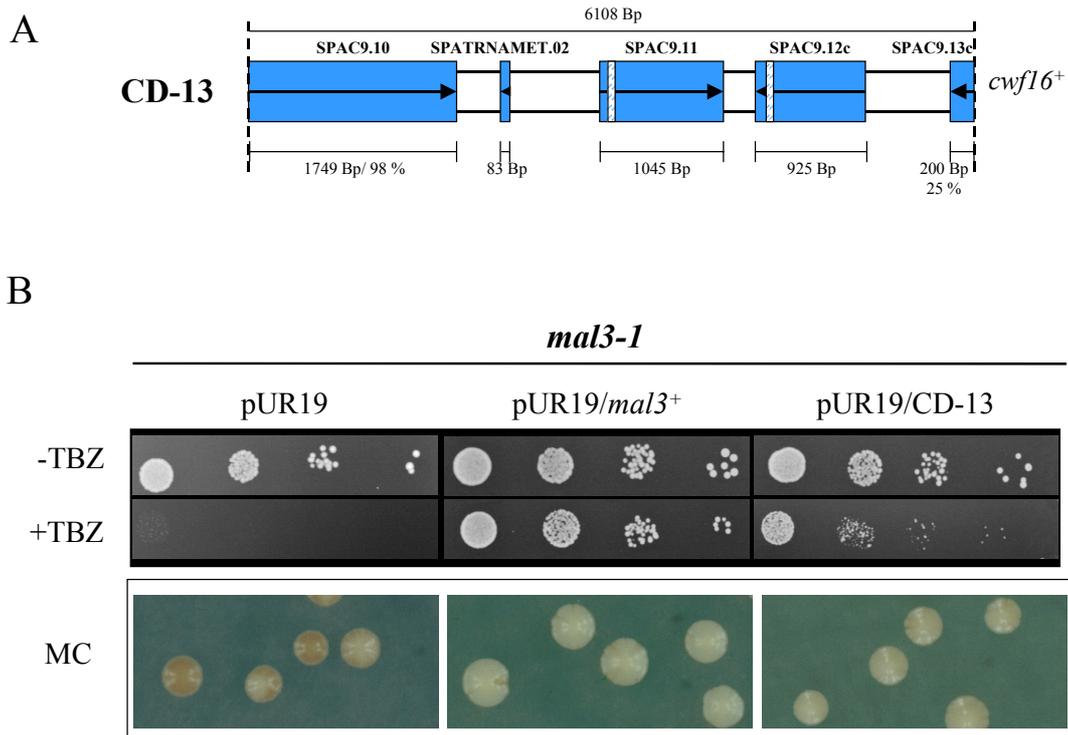


Abbildung 17: Schematische Darstellung des Suppressorplasmids pUR19/CD-13 und Komplementation der *mal3-1* Phänotypen

Teil A: Das Plasmid pUR19/CD-13 besteht aus dem 5,5 Kb großen pUR19 Bankvektoranteil und einem hier dargestellten 6108 Bp großen genomischen *S. pombe* DNA-Insert. Das Insert enthält nach Angaben der Datenbank vermutlich Teile von fünf ORFs: 98 % des ORFs SPAC9.10 (1749 Bp), die vollständigen ORFs SPATRNAME.02 (83 Bp), SPAC9.11 (1045 Bp/69 Bp Intron), SPAC9.12c (925 Bp/61 Bp Intron) und 25 % des ORFs SPAC9.13c (200 Bp).

Teil B: Suppression der TBZ-Hypersensitivität und des Minichromosomenverlustes des *mal3-1* Stammes, der mit unterschiedlichen Plasmiden transformiert wurde. Gezeigt sind Transformanten des Genbankvektors pUR19, pUR19/*mal3*<sup>+</sup> und pUR19/CD-13.

### 5.6.2.5 Ein ORF auf CD-14 kodiert für das Protein Asp1p, welches eine wichtige Rolle für die Funktion des Aktinzytoskeletts besitzt

Das Suppressorplasmid pUR19/CD-14 umfaßt 86 % des ORFs SPCC1672.06c (*asp1*<sup>+</sup>) und mit 882 Bp lediglich 32 % des ORFs SPCC1672.07 von Chromosom 1 der Spaltheffe (siehe Abbildung 18). Beide DNA-Sequenzen kodieren für den N-terminalen Bereich der Proteine.

Das bereits experimentell charakterisierte 106 kDa große Protein Asp1p ist evolutionär konserviert und spielt eine wichtige Rolle für die Funktion der zellulären Aktinflecken. Asp1p interagiert mit dem Arp2p/3p Komplex, einer essentiellen Komponente des Aktinzytoskeletts (Übersichtsartikel Weaver et al., 2003; Feoktistova et al., 1999; Machesky et al., 1999). Der Arp2p/3p Komplex ist am Aufbau und der Umlagerung von Aktinstrukturen beteiligt (McCollum et al., 1996). Weder Asp1p noch das Protein Vip1 der Bäckerhefe, das 53 % Identität zu Asp1p ausweist, sind essentiell (Feoktistova et al., 1999).

Vom zweiten ORF SPCC1672.07 sind mit 882 Bp nur 32 % der DNA-Sequenz, die für den N-terminalen Proteinbereich kodiert, vorhanden. Für das putative 101 kDa große Protein wird aufgrund seiner Homologie eine Funktion bei der pre-m-RNA-Synthese vermutet. Es zeigt Homologie zum Protein Utp21, einem U3 snoRNP Protein aus *S. cerevisiae* mit einer Funktion bei der pre-m-RNA-Synthese (Dragon et al., 2002).

Durch weiterführende Analysen wurde untersucht, welcher der beiden ORFs des Suppressorinserts CD-14 für den Ausgleich der *mal3-1* Phänotypen verantwortlich ist. Hierfür wurde das plasmidkodierte *asp1<sup>+</sup>* Gen, kloniert hinter einen Thiamin-reprimierbaren *nmt1<sup>+</sup>*-Promotor (zur Verfügung gestellt von K. Gould), in einen Wildtypstamm bzw. den *mal3-1* Stamm und *mal3Δ* Stamm auf Medium mit und ohne TBZ unter verschiedenen Expressionsbedingungen getestet (siehe Abbildung 19 und Abbildung 20). Die Transformanten des Wildtypstammes zeigen unter allen Bedingungen gutes Wachstum (siehe Abbildung 19).

Transformanten des TBZ-hypersensitiven *mal3-1* Stammes, die mit der Vektorkontrolle transformiert wurden, zeigen nur gutes Wachstum auf Medium ohne TBZ. Auf TBZ-haltigem Medium ist unter Hoch- und Niedrigexpressionsbedingungen kein Wachstum erkennbar.

Unter Hochexpressionsbedingungen kann die Überexpression von *asp1<sup>+</sup>* die Hypersensitivität des *mal3-1* Stammes gegenüber TBZ partiell ausgleichen (Abbildung 20). Unter Niedrigexpressionsbedingungen zeigen die Transformanten auf TBZ-haltigem Medium kein Wachstum. Gleiche Ergebnisse zeigt die Überexpression von plasmidkodiertem *asp1<sup>+</sup>* im *mal3Δ* Stamm (siehe Abbildung 20). Die Überexpression von *asp1<sup>+</sup>* ist somit für den Ausgleich der TBZ-Hypersensitivität verantwortlich.

Nachdem *asp1<sup>+</sup>* als Suppressor identifiziert werden konnte, sollte getestet werden, ob Asp1p an der Chromosomensegregation beteiligt ist. Hierfür wurde das zusätzliche nichtessentielle Minichromosom in einen *asp1<sup>+</sup>* Deletionsstamm (*asp1Δ*) eingekreuzt. Der Verlust des Minichromosoms im *asp1Δ* Stamm wurde im Vergleich zum Verlust im Wildtypstamm ermittelt (siehe Abbildung 21). Der spezifische Funktionsverlust von Asp1p führt nicht zu einem erhöhten Verlust des Minichromosoms. Vermutlich hat Asp1p keinen direkten Einfluß auf die Segregation der Chromosomen. Die Überexpression des Suppressorinserts CD-14 konnte jedoch den Minichromosomenverlust des *mal3-1* Stammes supprimieren. Dies spricht für eine mögliche Interaktion der beiden Proteine in diesem Zusammenhang (siehe Abbildung 18).

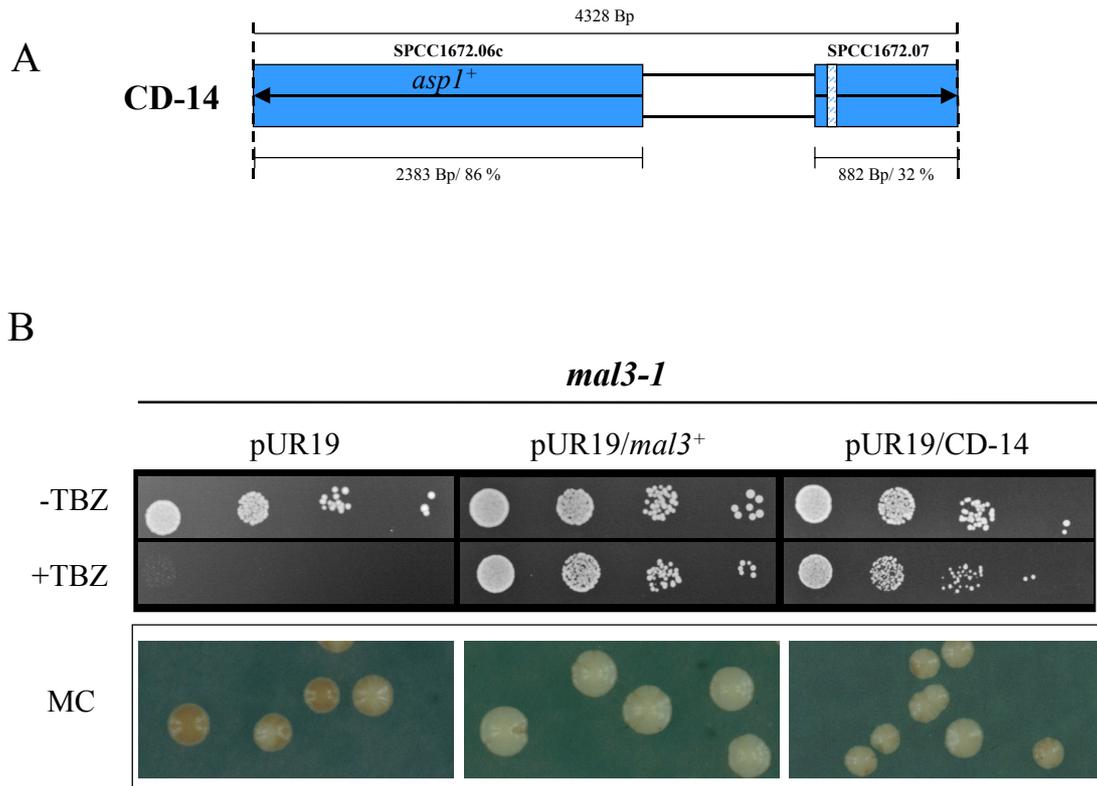


Abbildung 18: Schematische Darstellung des Suppressorplasmids pUR19/CD-14 und Komplementation der *mal3-1* Phänotypen

Teil A: Das Plasmid pUR19/CD-14 besteht aus dem 5,5 Kb großen pUR19 Bankvektoranteil und einem hier dargestellten 4328 Bp großen genomischen *S. pombe* DNA-Insert. Das Insert enthält nach Angaben der Datenbank vermutlich Teile von zwei ORFs: 86 % des ORFs SPCC1672.06c (2383 Bp) und 32 % des ORFs SPCC1672.07 (882 Bp/75 Bp Intron).

Teil B: Suppression der TBZ-Hypersensitivität und des Minichromosomenverlustes des *mal3-1* Stammes, der mit unterschiedlichen Plasmiden transformiert wurde. Gezeigt sind Transformanten des Genbankvektors pUR19, pUR19/*mal3*<sup>+</sup> und pUR19/CD-14.

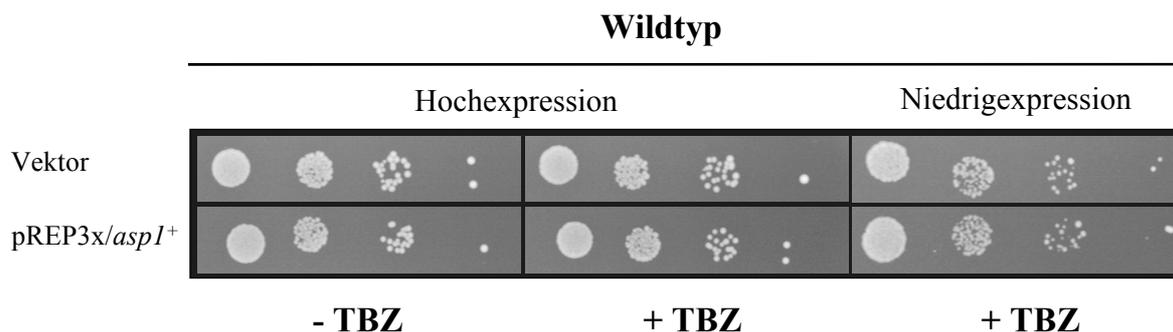


Abbildung 19: Überexpression von *asp1*<sup>+</sup> ist nicht letal

Serielle Tropftestuntersuchungen eines *S. pombe* Wildtypstammes, der mit unterschiedlichen Plasmiden transformiert wurde. Gezeigt ist das Wachstumsverhalten von Transformanten des Vektors pREP3x und pREP3x mit *asp1*<sup>+</sup> als Insert. Das Wachstum wurde unter Niedrig- und Hochexpressionsbedingungen auf Selektivmedium mit (+TBZ; 5,5 µg/ml TBZ) und ohne TBZ (-TBZ) untersucht. Die Platten wurden für 5 Tage bei 24 °C inkubiert.

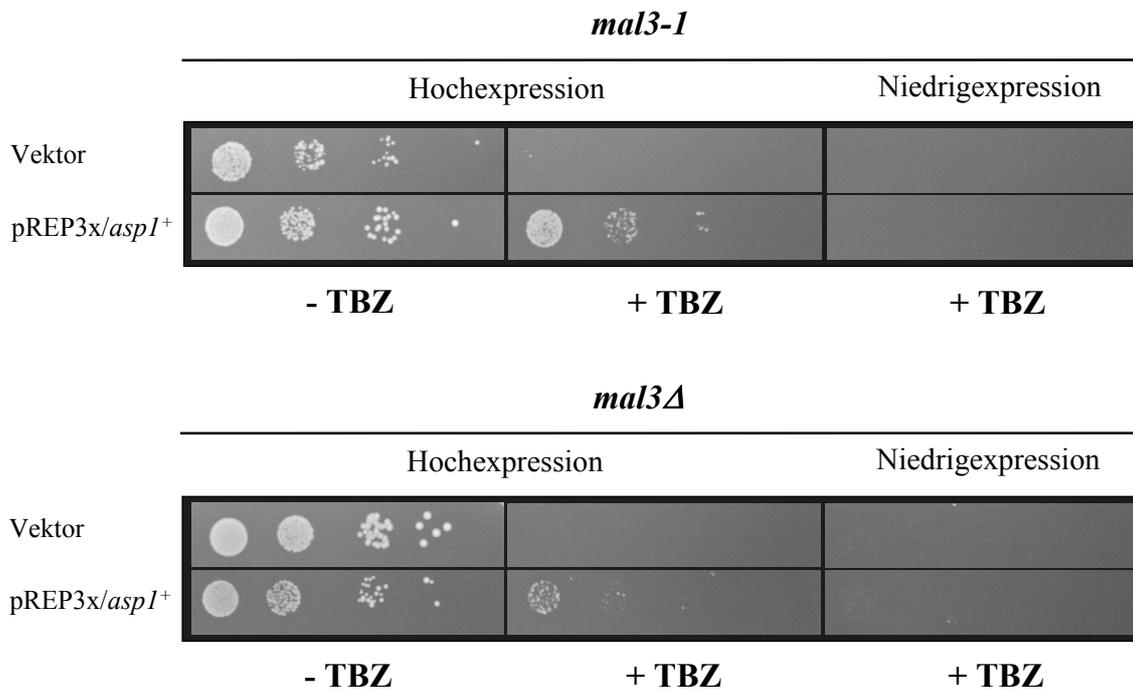


Abbildung 20: Komplementation der TBZ-Hypersensitivität des *mal3-1* bzw. *mal3Δ* Stammes durch Überexpression von *asp1*<sup>+</sup>

Gezeigt wird das Wachstumsverhalten von Transformanten beider Stämme, die mit unterschiedlichen Plasmiden transformiert wurden. Gezeigt ist das Wachstumsverhalten von Transformanten des Vektors pREP3x und pREP3x mit *asp1*<sup>+</sup>. Das Wachstum wurde unter Niedrig- und Hochexpressionsbedingungen auf Selektivmedium mit (+TBZ; 5,5 µg/ml TBZ) und ohne TBZ (-TBZ) untersucht. Die Platten wurden für 5 Tage bei 24 °C inkubiert.

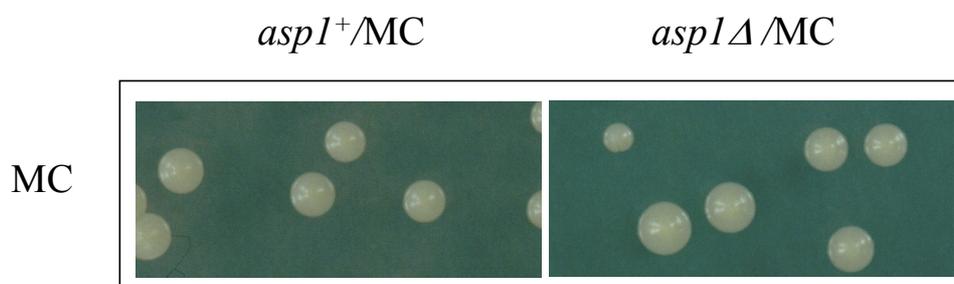


Abbildung 21: Verlust des Minichromosoms im *asp1Δ* Stamm

Gezeigt ist die Färbung und Sektorierung von Kolonien des Wildtyp- bzw. *asp1Δ* Stammes. Die Kolonien wurden für 10 Tage bei 24 °C unter limitierenden Adeninkonzentrationen [5 mg/ml] angezogen.

#### 5.6.2.6 CD-17 enthält drei ORFs, die vermutlich für Proteine mit einer Funktion bei der Proteinmodifikation, der Translation bzw. der Transkription kodieren

Das Suppressorinsert CD-17 wurde dreimal isoliert und steht für Mitglieder der Gruppe 3 bei der analytischen Restriktionsanalyse (siehe Kapitel 5.3). Das DNA-Insert CD-17 umfaßt drei offene Leserahmen auf Chromosom 3 der Spaltheife (siehe Abbildung 22).

Der erste ORF SPCC16C4.12 ist mit 542 Bp zu 90 % auf dem DNA-Fragment enthalten. Das Insert umfaßt nicht die DNA-Sequenz, die für den N-terminalen Bereich des putativen 21 kDa großen Proteins kodiert. Es zeigt 45 % Identität zum 30 kDa großen *S. cerevisiae* Nat3 Protein (Kimura et al., 2000; Plevoda et al., 2003). Als N-Acetyltransferaseuntereinheit spielt dieses Protein eine wichtige Rolle bei der posttranslationalen Modifikation von Proteinen, die eine häufige Veränderung eukaryontischer Proteine darstellt.

Der ORF SPCC16C4.13c (*rpl1201<sup>+</sup>*) ist mit 498 Bp vollständig in der Insertsequenz enthalten. Das 17,6 kDa große Rpl1201p Protein weist eine Homologie von jeweils 74 % zu den *S. cerevisiae* Proteinen Rpl12A und Rpl12B auf, die als wichtige Komponenten der 60 S Ribosomen beschrieben wurden (Briones et al., 1998).

Der Leserahmen SPCC16C4.14c (*sfc4<sup>+</sup>*) ist mit 2358 Bp zu 78 % auf dem DNA-Insert vorhanden. Dieser Teil des eigentlich 3021 Bp großen ORFs kodiert für den C-terminalen Bereich des 116 kDa Proteins. Für Sfc4p wird eine Funktion als Untereinheit des Transkriptionsfaktorkomplexes TFIIC der RNA-Polymerase III vermutet (Liao et al., 2003). Das Protein besitzt eine Identität von 28 % zum Bäckerhefeprotein Tfc4. Auch dieses Protein wurde als Untereinheit des TFIIC-Komplexes charakterisiert. Es hat eine Bedeutung im Rahmen der Bindung der RNA-Polymerase III an die DNA-Sequenzen, die für t-RNAs kodieren (Joazeiro et al., 1996). Welcher dieser ORFs für den Ausgleich der *mal3-1* Phänotypen verantwortlich ist, muß durch weitere Untersuchungen geklärt werden.

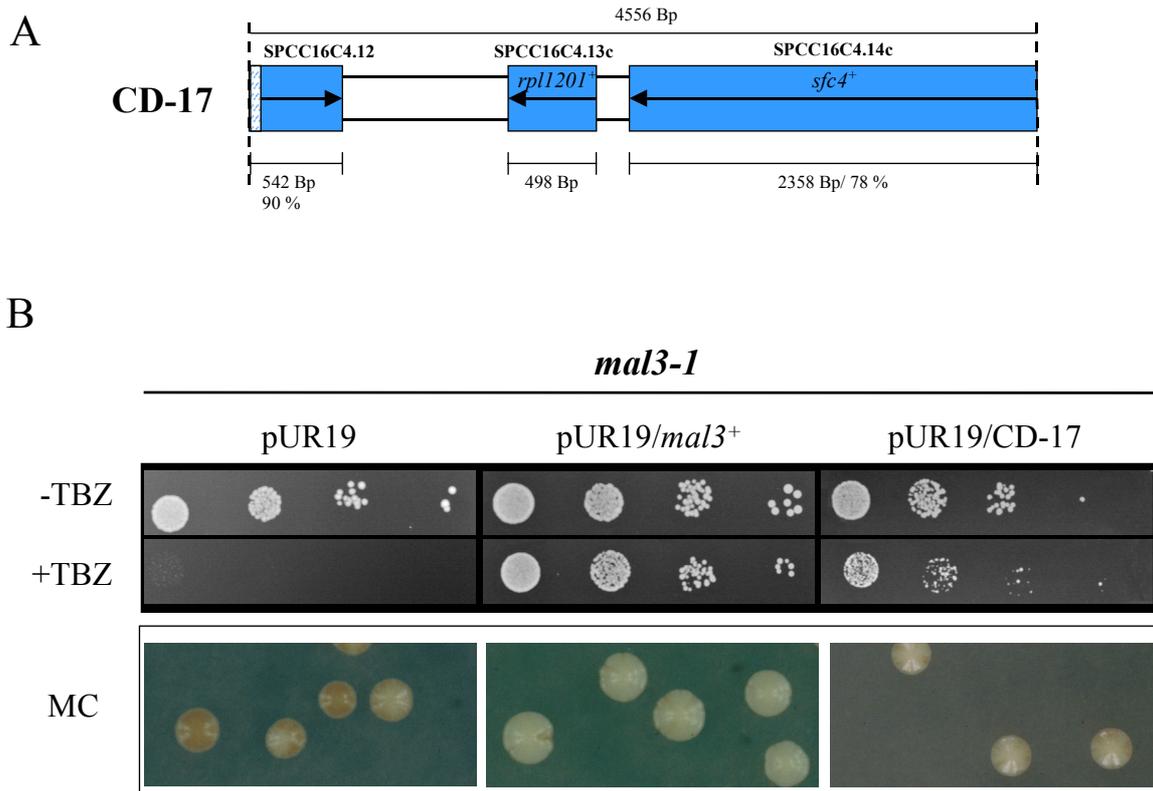


Abbildung 22: Schematische Darstellung des Suppressorplasmids pUR19/CD-17 und Komplementation der *mal3-1* Phänotypen

Teil A: Das Plasmid pUR19/CD-17 besteht aus dem 5,5 Kb großen pUR19 Bankvektoranteil und einem hier dargestellten 4556 Bp großen genomischen *S. pombe* DNA-Insert. Das Insert enthält nach Angaben der Datenbank vermutlich Teile von drei ORFs: 90 % des ORFs SPCC16C4.12 (542 Bp/57 Bp Intron), den vollständigen ORF SPCC16C4.13c (498 Bp) und 78 % des ORFs SPCC16C4.14c (2358 Bp).

Teil B: Suppression der TBZ-Hypersensitivität und des Minichromosomenverlustes des *mal3-1* Stammes, der mit unterschiedlichen Plasmiden transformiert wurde. Gezeigt sind Transformanten des Genbankvektors pUR19, pUR19/*mal3*<sup>+</sup> und pUR19/CD-17.

### 5.6.2.7 CD-18 enthält ORFs, die für ein Protein mit einem RNA-Bindemotiv und eine spezifische t-RNA-Synthetase des Zytoplasmas kodieren

Das Suppressorplasmid pUR19/CD-18 besitzt eine Gesamtgröße von 5496 Bp und zeigt Homologie zu zwei ORFs auf Chromosom 1 der Spaltheife (siehe Abbildung 23).

Es umfaßt die 1590 Bp des offenen Leserahmens SPAC2F7.11 (*nrd1*<sup>+</sup>) vollständig. Bei diesem bereits experimentell charakterisierten 58 kDa großen Protein handelt es sich um ein RNA-Bindeprotein (Yamamoto et al., 1999; Tsukahara et al., 1998). Es wird vermutet, daß dieses Protein den Beginn der sexuellen Differenzierung durch eine Beteiligung an der Reprimierung der Expression spezifischer Meiosegene kontrolliert. Es besitzt eine 43 % Identität zum hypothetischen Protein Ypl84 aus *S. cerevisiae*.

Der ORF SPAC2F7.13c ist zu 25 % in der Insertsequenz enthalten. Lediglich 298 Bp des putativen 1188 Bp großen Leserahmens sind auf dem Suppressorplasmid vorhanden und kodieren für den C-terminalen Bereich eines putativen 45 kDa Proteins. Es zeigt eine Identität von 65 % zum Protein Wrs1 der Bäckerhefe. Diese zytoplasmatische Tryptophan-tRNA Synthetase spielt eine Rolle bei der Proteinbiosynthese (John et al., 1997; Johnson et al., 2002).

Welches dieser Proteine für die Suppression der *mal3-1* Phänotypen steht, muß durch weitere Analysen geklärt werden. Da jedoch der vollständige ORF, der für das Protein Nrd1p kodiert, auf der Insertsequenz enthalten ist, gilt dieser als wahrscheinlicher.

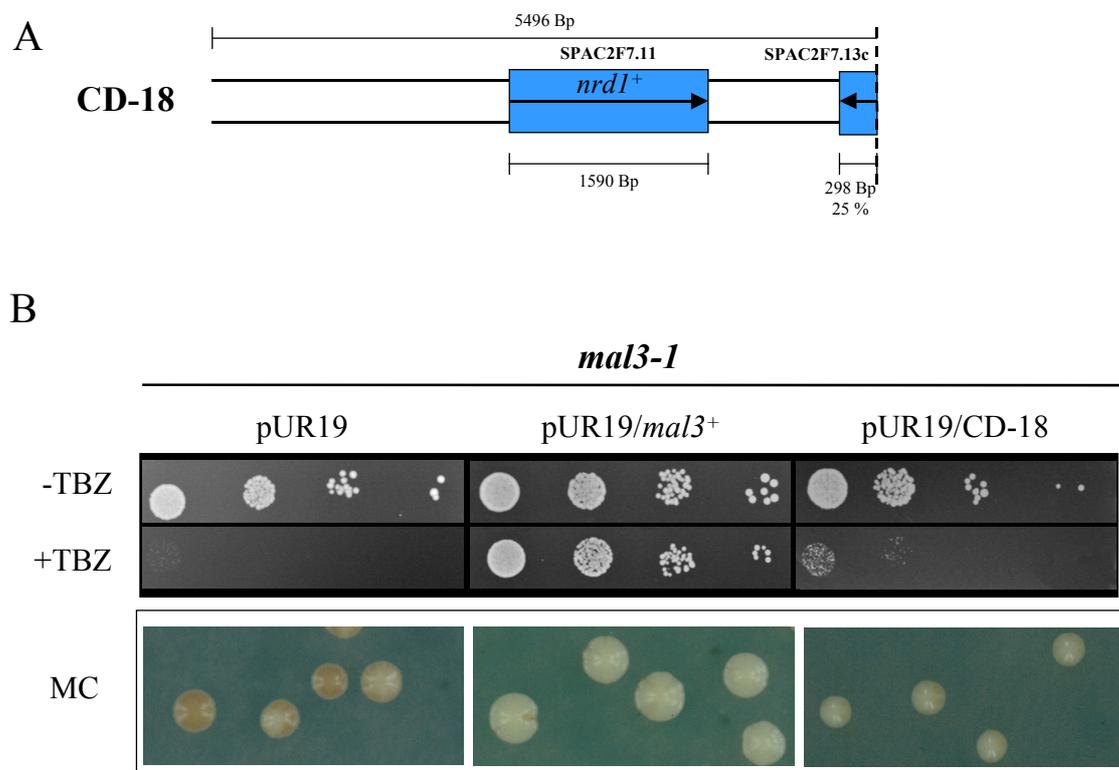


Abbildung 23: Schematische Darstellung des Suppressorplasmids pUR19/CD-18 und Komplementation der *mal3-1* Phänotypen

Teil A: Das Plasmid pUR19/CD-18 besteht aus dem 5,5 Kb großen pUR19 Bankvektoranteil und einem hier dargestellten 5496 Bp großen genomischen *S. pombe* DNA-Insert. Das Insert enthält vermutlich Teile von zwei ORFs: die vollständige DNA-Sequenz von SPACF7.11 (1590 Bp) und 25 % von SPAC2F7.13c (298 Bp).

Teil B: Suppression der TBZ-Hypersensitivität und des Minichromosomenverlustes des *mal3-1* Stammes, der mit unterschiedlichen Plasmiden transformiert wurde. Gezeigt sind Transformanten des Genbankvektors pUR19, pUR19/*mal3*<sup>+</sup> und pUR19/CD-18.

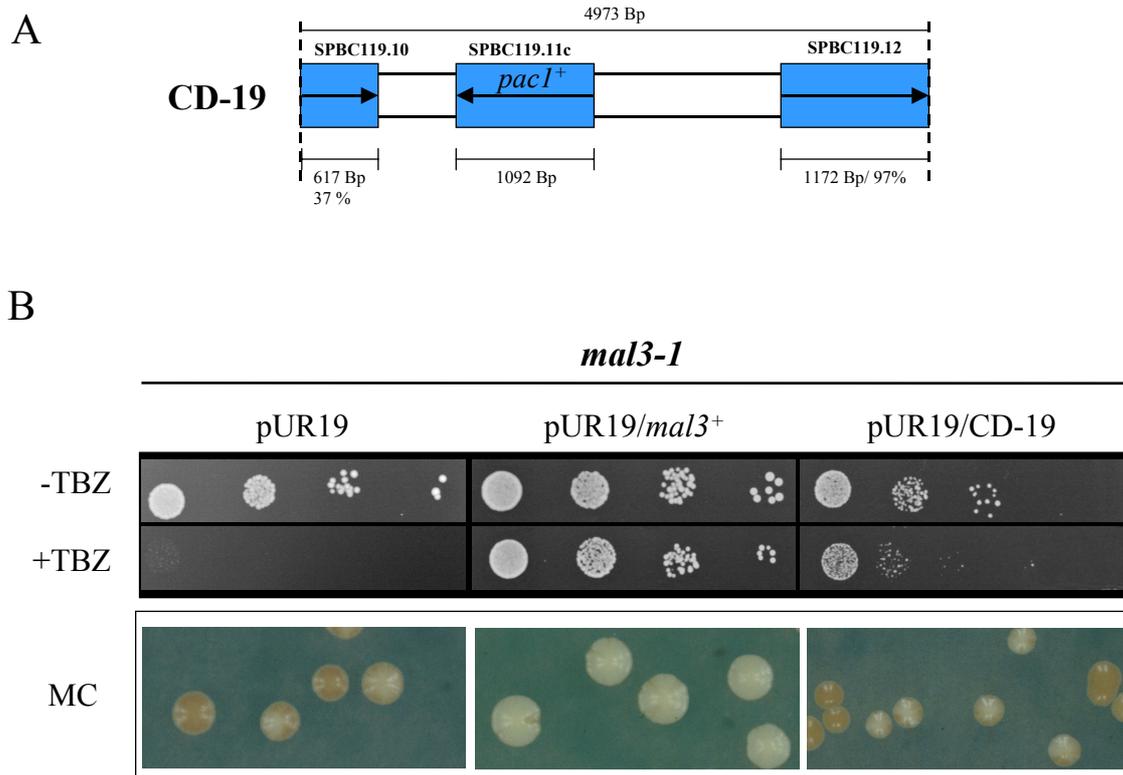
### 5.6.2.8 CD-19 enthält ORFs, die für eine Aminosäuresynthetase, eine Doppelstrang-spezifische Ribonuklease und ein ER-Golgi Transportprotein kodieren

Das 4973 Bp große Suppressorplasmid pUR19/CD-19 umfaßt drei Leserahmen auf Chromosom 2 (siehe Abbildung 24).

Der ORF SPBC119.10 ist mit 617 Bp zu 37 % auf der Insertsequenz vorhanden. Diese kodieren für den C-terminalen Bereich des hypothetischen 63,2 kDa Proteins. Es besitzt eine Identität von 68 % bzw. 69 % zu Asn1 und Asn2 aus *S. cerevisiae* (Dang et al., 1996). Die simultane Deletion der Proteine führt zur Asparagin-Auxotrophie. Eine Funktion als Asparaginsynthetase wird daher angenommen.

Der 1092 Bp große ORF SPBC119.11c (*pac1*<sup>+</sup>) wurde nach Literaturangaben bereits experimentell untersucht. Er kodiert für das 42 kDa große Protein Pac1p, das vermutlich als Doppelstrang-spezifische Ribonuklease fungiert (Rotondo et al., 1996).

Der putative ORF SPBC119.12 ist mit 1172 Bp zu 97 % auf der Insertsequenz vorhanden. Nur 34 Bp der Leserahmensequenz am 3'-Ende fehlen. Der vermutete Leserahmen kodiert für ein hypothetisches 46 kDa Protein. Es zeigt Ähnlichkeit zum Protein Rud3 der Bäckerhefe (Kim, 2003). Dieses Protein lokalisiert an der cis-Seite des Golgi-Apparates und ist in den ER-Golgi-Transport involviert. Welcher dieser ORFs für die Suppression in Frage kommt, kann nicht ohne weitere Untersuchungen bestimmt werden.



**Abbildung 24:** Schematische Darstellung des Suppressorplasmids pUR19/CD-19 und Komplementation der *mal3-1* Phänotypen

Teil A: Das Plasmid pUR19/CD-19 besteht aus dem 5,5 Kb großen pUR19 Bankvektoranteil und einem hier dargestellten 4973 Bp großen genomischen *S. pombe* DNA-Insert. Das Insert enthält Teile von drei ORFs: 37 % des ORFs SPBC119.10 (617 Bp), die vollständige DNA-Sequenz des ORFs SPBC119.11c (1092 Bp) und 97 % des ORFs SPBC119.12 (1172 Bp).

Teil B: Suppression der TBZ-Hypersensitivität und des Minichromosomenverlustes des *mal3-1* Stammes, der mit unterschiedlichen Plasmiden transformiert wurde. Gezeigt sind Transformanten des Genbankvektors pUR19, pUR19/*mal3*<sup>+</sup> und pUR19/CD-19.

### 5.6.2.9 Ein ORF der Insertsequenz von CD-20 zeigt Homologie zu einem evolutionär konservierten Mikrotubuli-bindenden Protein

Das DNA-Insert des Suppressorplasmid pUR19/CD-20 besitzt eine Gesamtgröße von 4768 Bp und zeigt Homologie zu drei ORFs auf Chromosom 1 (siehe Abbildung 25).

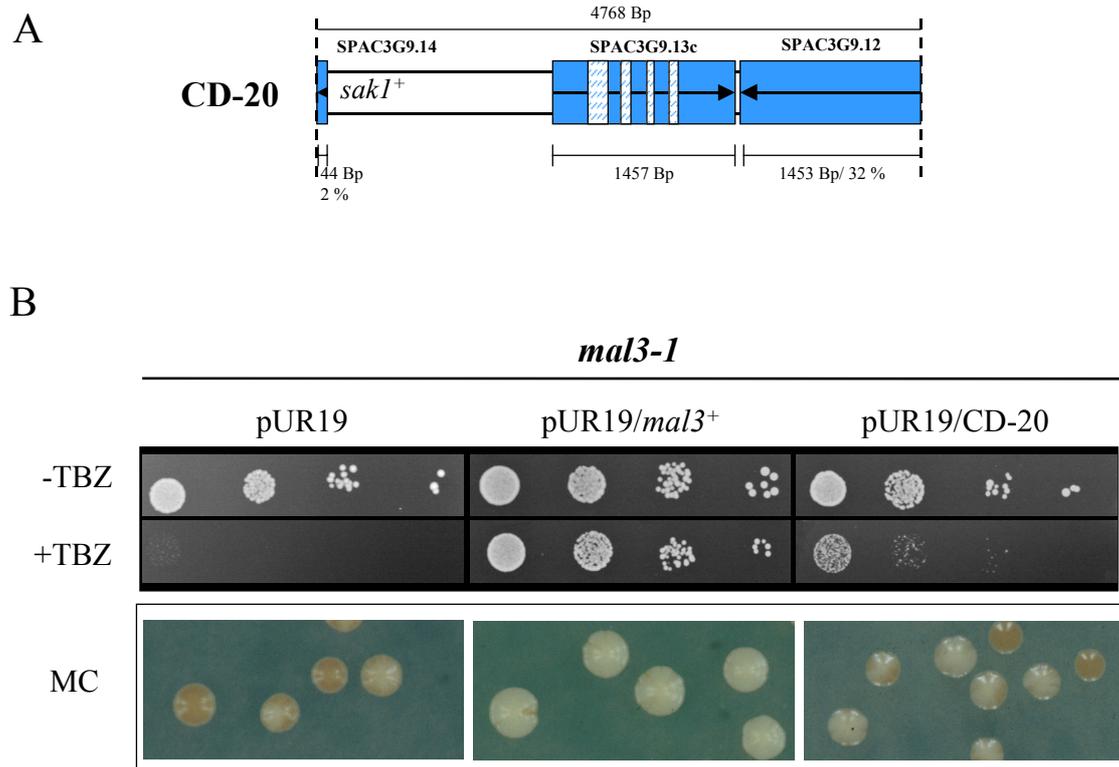
Die Insertsequenz enthält mit 44 Bp nur 2 % des ORFs SPAC3G9.14 (*sak1*<sup>+</sup>). Der eigentlich 2301 Bp große Leserahmen kodiert für das 87 kDa große Protein Sak1p, einem Mitglied der evolutionär konservierten Familie der RFX-DNA-Bindeproteine (Wu et al., 1995; Durand et al., 2000). Sak1p wurde als Komponente der zyklischen AMP-abhängigen Proteinkinasekaskade charakterisiert (Wu et al., 1995; DeVoti et al., 1991). Das Protein fördert vermutlich den Eintritt der Zellen aus dem vegetativen mitotischen Zyklus in den meiotischen Zyklus und hat zusätzlich Einfluß auf die Expression von Genen, die fundamentale Bedeutung für das

Wachstum besitzen. Da die Insertsequenz nur einen Bruchteil dieses Leserahmens enthält, ist eine Sak1p abhängige Suppression der *mal3-1* Phänotypen unwahrscheinlich.

Der putative 1457 Bp große Leserahmen SPAC3G9.13c kodiert für ein hypothetisches 39,8 kDa großes Protein. Es besitzt eine Identität von 43 % zum Protein Msw1 der Bäckerhefe (Myers et al., 1985). Das Gen *MSW1* kodiert für eine 43 kDa große mitochondriale Tryptophanyl-tRNA-Synthetase, eine Komponente der mitochondrialen Proteinsynthesemaschinerie. Diese ist an der Beladung der t-RNA mit Aminosäuren beteiligt. Deletion oder Mutationen in diesem Bäckerhefegen sind nicht letal, führen jedoch zu respiratorischen Defekten aufgrund einer gestörten mitochondrialen Proteinsynthese. Aufgrund der Homologie der beiden Hefeproteine wird auch für das Spaltheferprotein eine Funktion als mitochondriale Tryptophanyl-tRNA-Synthetase vermutet. Über einen möglichen Zusammenhang mit der Chromosomensegregation wird in der Literatur nicht berichtet.

Der letzte putative Leserahmen SPAC3G9.12 ist mit 1453 Bp zu 32 % auf dem DNA-Insert von CD-20 vorhanden. Der eigentliche Leserahmen besitzt eine Größe von 4510 Bp. Das hypothetische 164 kDa Protein ist Mitglied der evolutionär konservierten Proteinfamilie von Mikrotubuli-assoziierten Proteinen (Inoue et al., 2000; Pasqualone et al., 1994; Akhmanova et al., 2001). Das Humanhomolog CLASP1 lokalisiert an den Plusenden der Mikrotubuli und wurde auch als Komponente des Zentromers charakterisiert (Maiato et al., 2003). Für die entsprechenden homologen Proteine MAST/Orbit in *D. melanogaster* und Stu1 in *S. cerevisiae* konnte bereits eine essentielle Bedeutung für die Organisation und Funktion der bipolaren Mitosespindel gezeigt werden (Lemos et al., 2000; Inoue et al., 2000; Yin et al., 2002; Mathe et al., 2003). Stu1 bindet an die interpolaren Mikrotubulstrukturen der Spindel und ist notwendig für die Erzeugung der Spindelspannung (Yin et al., 2002). Eine Konzentrierung des Proteins an den Enden der antiparallelen Mikrotubuli der Anaphasenspindel wurde dabei beobachtet. Beide Hefeproteine zeigen eine Identität von 26 %.

Ein Protein mit vergleichbarer Funktion in *S. pombe* macht im Zusammenhang mit der mitotischen Bedeutung von Mal3p Sinn. Auch die Suppression des Minichromosomverlustes des *mal3-1* Mutantenstammes kann durch Überexpression des Suppressorinserts supprimiert werden. Es ist denkbar, daß die Spindelstrukturen durch die Überexpression des Spalthefergens *stu1*<sup>+</sup> im *mal3-1* Mutantenstamm stabilisiert werden und die Funktion des Mal3p Proteins dadurch partiell ausgeglichen wird. Ob dieser ORF wirklich den Ausgleich bewirkt, muß durch Subklonierung gezeigt werden.



**Abbildung 25:** Schematische Darstellung des Suppressorplasmids pUR19/CD-20 und Komplementation der *mal3-1* Phänotypen

Teil A: Das Plasmid pUR19/CD-20 besteht aus dem 5,5 Kb großen pUR19 Bankvektoranteil und einem hier dargestellten 4768 Bp großen genomischen *S. pombe* DNA-Insert. Das Insert enthält vermutlich Teile von drei ORFs: 2 % des ORFs SPAC3G9.14 (44 Bp), die vollständige DNA-Sequenz des ORFs SPAC3G9.13c (1457 Bp/davon 371 Bp Intronsequenz: 163 Bp, 82 Bp, 54 Bp und 72 Bp), sowie 32 % des ORFs SPAC3G9.12 (1453 Bp). Zwischen SPAC3G9.12 und SPAC3G9.13c liegen nur 3 Bp, jedoch sind die beiden Leserahmen auf den komplementären DNA-Strängen kodiert.

Teil B: Suppression der TBZ-Hypersensitivität und des Minichromosomenverlustes des *mal3-1* Stammes, der mit unterschiedlichen Plasmiden transformiert wurde. Gezeigt sind Transformanten des Genbankvektors pUR19, pUR19/*mal3*<sup>+</sup> und pUR19/CD-20.

#### 5.6.2.10 CD-21 kodiert für ein evolutionär konserviertes Protein, welches an der Regulation der Kinetochoraktivität beteiligt ist

Abbildung 26 zeigt die Insertsequenz CD-21. Nur ein offener Leserahmen ist auf diesem Insert kodiert, der für die Suppression der *mal3-1* Phänotypen verantwortlich ist. Der systematische Name für diesen 3100 Bp großen Leserahmen auf Chromosom 2 ist SPBC336.15 (*pic1*<sup>+</sup>). Er kodiert für das bereits experimentell charakterisierte 114,4 kDa Protein Pic1p. Dieses INCENP Homolog Protein interagiert mit der einzigen Aurora-Kinase der Spaltheefe Ark1p (Leverson et al., 2002; Petersen et al., 2001). Beide Proteine zählen zu einer evolutionär konservierten Gruppe von Proteinen, deren Lokalisierung sich im Laufe des Zellzyklus spezifisch ändert (Cooke et al., 1987; Earnshaw et al., 1991; Giet et al., 1999; Adams et al., 2001a). Die Proteine dieser Gruppe assoziieren während der Mitose mit

Chromatin und liegen in der Metaphase stark konzentriert am Zentromer vor. In späteren Phasen der Mitose ändert sich diese Verteilung und sie sind entlang der mitotischen Spindel lokalisiert, besonders aber im mittleren Bereich der Spindel. Eine wichtige Bedeutung dieser Proteine für die Chromosomensegregation und die Beendigung der Zytokinese wird vermutet (Mackay et al., 1998).

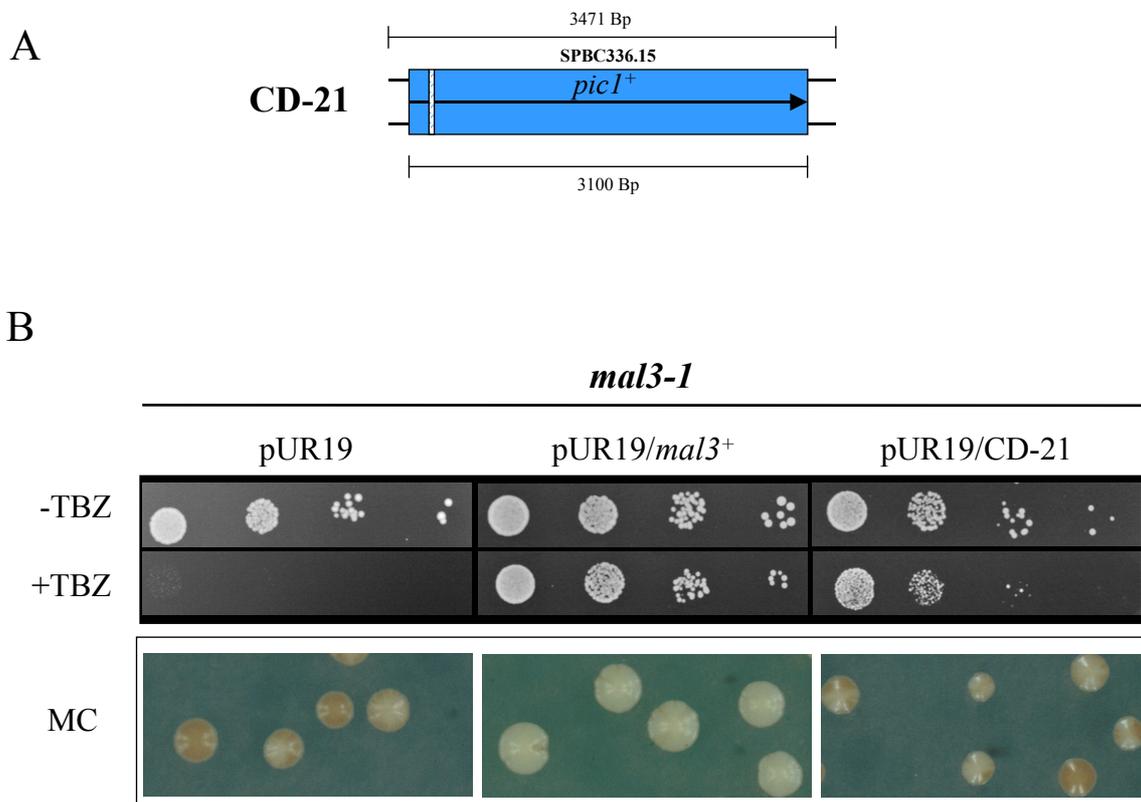


Abbildung 26: Schematische Darstellung des Suppressorplasmids pUR19/CD-21 und Komplementation der *mal3-1* Phänotypen

Teil A: Das Plasmid pUR19/CD-21 besteht aus dem 5,5 Kb großen pUR19 Bankvektoranteil und einem hier dargestellten 3471 Bp großen genomischen *S. pombe* DNA-Insert. Das Insert enthält nur den ORF SPBC336.15 (3100 Bp/43 Bp Intron).

Teil B: Suppression der TBZ-Hypersensitivität und des Minichromosomenverlustes des *mal3-1* Stammes, der mit unterschiedlichen Plasmiden transformiert wurde. Gezeigt sind Transformanten des Genbankvektors pUR19, pUR19/*mal3*<sup>+</sup> und pUR19/CD-21.

In Tabelle 8 sind die Ergebnisse der Sequenzierung aller Suppressorplasmide, die beim genomischen *S. pombe* DNA-Bankscreen erhalten wurden, noch einmal zusammengestellt. Suppressorplasmide, die mehrfach isoliert wurden, sind nur einfach unter den Plasmiden CD-1 bis CD-27 aufgelistet. Wiederholte Isolierung einzelner Suppressoren ist anhand der Häufigkeit ihrer Isolierung ersichtlich. Einschließlich des Wildtypgens *mal3*<sup>+</sup> wurden 14 Komplementationsgruppen isoliert. CD-2 und CD-15 werden dabei als eine Gruppe gezählt. Drei der Suppressorsequenzen können nur die TBZ-Hypersensitivität des *mal3-1* Stammes

ausgleichen, nicht aber den Minichromosomenverlust supprimieren. Ihr Ausgleich gilt daher als unspezifisch in Bezug auf die Funktion von Mal3p (siehe Kapitel 5.6.1). Aus den übrigen 10 Komplementationsgruppen lassen sich neue Erkenntnisse zur mitotischen Funktion von Mal3p gewinnen (siehe Kapitel 5.6.2). Für einige der Suppressoren konnte durch weiterführende Untersuchungen bereits der Nachweis erbracht werden, welcher ORF für die Suppression verantwortlich ist. Aufgrund von Literaturangaben zur experimentellen Untersuchung der Proteine oder durch den Homologievergleich mit Proteinen anderer Organismen konnte die Funktion der Suppressoren abgeleitet werden. Fünf der Suppressorinserts umfassen ORFs, die für Proteine kodieren, welche eine Bedeutung bei der Chromosomensegregation haben bzw. offensichtlich Komponenten des Spindelapparates oder des Zentromers sind (siehe Ausführungen zu CD-2/CD-15; CD-6, CD-11, CD-20 und CD-21). Ein weiterer Suppressor spielt eine wichtige Bedeutung für die Funktion des Aktinzytoskeletts (siehe Ausführungen zu CD-14). Für die übrigen Suppressoren konnte ein direkter Funktionszusammenhang mit Mal3p bisher nicht abgeleitet werden. Da die Suppressorsequenzen jedoch den Minichromosomenverlust des *mal3-1* Stammes supprimieren, wird eine Bedeutung für die Chromosomensegregation angenommen.

Somit konnten durch diesen extrem umfangreichen genomischen Bankscreen erfolgreich neue Proteine identifiziert werden, die vermutlich in Zusammenhang mit der mitotischen Funktion des Mal3p Proteins stehen. Die anfängliche Zahl von 85 Suppressoren konnte mittels unterschiedlicher Analysen auf 10 neue Komplementationsgruppen reduziert werden. Auch ihre Bedeutung im Rahmen der Mitose konnte für einige Komponenten bereits ermittelt werden.

Tabelle 8: Übersicht ausgewählter Suppressoren des *mal3-1* genomischen *S. pombe* DNA Bankscreens

Die Tabelle zeigt eine Zusammenstellung der Daten der Suppressorgruppen CD-1 bis CD-27. Angegeben sind der Name des Suppressorplasmids, die Größe des DNA-Inserts in Bp, der Name des entsprechenden Cosmides und der ORF-Bezeichnung und die entsprechenden Positionsangaben auf dem Cosmid. Die Größenangaben zu allen isolierten Suppressoren können dem Anhang entnommen werden. Neben der Bezeichnung mit dem in der Literatur verzeichneten Gennamen, ist bei einigen Suppressoren das Symbol „/“ vermerkt. Bei diesen ORFs handelt es sich um hypothetische ORFs. ORFs, bei denen der Name des *S. cerevisiae* Homologs angegeben ist, sind ebenfalls durch Anführungszeichen eingefaßt. Zusätzlich sind in der Tabelle Angaben zum Ausgleich des Minichromosomenverlustes und zum Ausgleich der TBZ-hypersensitiven Phänotypen der *mal3-1* und *mal3Δ* Stämme bei den seriellen Tropftestuntersuchungen aufgeführt. Einteilung : „-“ = kein Ausgleich, „+“ = schwacher Ausgleich, „++“ = mittlerer Ausgleich, „+++“ = sehr guter Ausgleich, „+/-“ = Restwachstum). Die letzte Spalte gibt an, wie oft das entsprechende Plasmid isoliert wurde.

Name	Insert	Cosmid	Chr.	ORF-Sequenz	ORF-Name	Gennamen	Ausgleich Minichromosomenverlust	Ausgleich TBZ-Hypersensitivität		Häufigkeit der Isolierung
								<i>mal3-1</i>	<i>mal3Δ</i>	
CD-27		SPAC18G6	1	2213873-2214859	SPAC18G6.15	<i>mal3<sup>+</sup></i>	++	+++	+++	13
CD-1	2978637-2981858	c977	1	2978422-2979166	SPAC31G5.12c	<i>n150<sup>+</sup></i>	-	++	++	11
				2980325-2980681	SPAC31G5.21	/				
				2981217-2982143	SPAC31G5.13	<i>pad1<sup>+</sup></i>				
CD-2	3076698-3082917	c977	1	(3076612-3077079)	SPAC589.08c	“DAMI”	+	+++	+++	1
				3077078-3078244	SPAC589.09	“CSRI”				
				3078666-3079118	SPAC589.10c	<i>ubi3</i>				
				3079412-3080253	SPAC589.11	/				
				3080439-3083538	SPAC589.12	/				
CD-3	478474-480746	pB10D8	2	478034-479869	SPBC354.07c	“HESI” “KESI”	-	++	+	1
CD-6	786326-788547	p20C8	3	786520-790614	SPCC1020.02	<i>spc7<sup>+</sup></i> “SPC105”	+	++	++	26
CD-11	1557476-1559765	pJ5566	2	1557049-1558428	SPBC776.02c	<i>dis2<sup>+</sup></i> “GLC7”	+	++	+	1
CD-12	keine Homologie			keine Homologie			-	+	++	1
CD-13	1453098-1459206	c977	1	1453071-1454846	SPAC9.10	“UGA4”	++	+	+	1
				1455216-1455298	SPATRNAMET.02	/				
				1456055-1457099	SPAC9.11	/				
				1457368-1458292	SPAC9.12c	“ATP12”				
				1459007-1459819	SPAC9.13c	<i>cwf16<sup>+</sup></i>				
CD-14	572090-576418	p20C8	3	571710-574472	SPCC1672.06c	<i>asp1<sup>+</sup></i> “VIP1”	++	+	+	1
				575537-578304	SPCC1672.07	/				
CD-15	3076698-3078360	p977	1	3076612-3077079	SPAC589.08c	“DAMI”	+	++	++	3
				3077078-3078244	SPAC589.09	“CSRI”				
CD-17	689626-694182	p20C8	3	689568-690167	SPCC16C4.12	“NAT3”	+	++	+	3
				691135-691632	SPAC16C4.13c	<i>rpl1201<sup>+</sup></i>				
				691825-694845	SPCC16C4.14c	<i>sfc4<sup>+</sup></i>				
CD-18	524355-529851	c977	1	526868-528457	SPAC2F7.11	<i>nrd1<sup>+</sup></i>	+	+	+/-	1
				529554-530741	SPAC2F7.13c	“WRS1”				
CD-19	656172-661145	pB10D8	2	655115-656788	SPBC119.10	“ASN1” “ASN2”	+	+	+/-	1
				657403-658494	SPBC119.11c	<i>pac1<sup>+</sup></i>				
				659974-6611179	SPBC119.12	“RUD3”				
CD-20	3119702-3124470	c977	1	3117445-3119745	SPAC3G9.14	<i>sak1<sup>+</sup></i>	+	+	+	1
				3121564-3123020	SPAC3G9.13c	“MSW1”				
				3123017-3127526	SPAC3G9.12	“STU1”				
CD-21	1152448-1155919	pJ5566	2	1152601-1155700	SPBC336.15	<i>pic1<sup>+</sup></i>	+	+	+	1

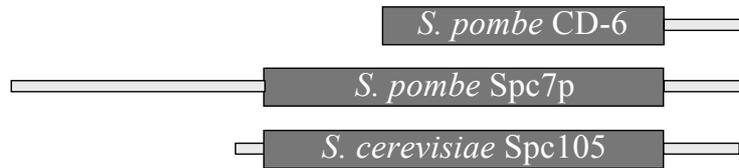
## 5.7 Identifizierung und Charakterisierung von Spc7p als neues *S. pombe* Zentromerprotein

Das DNA-Insert, welches beim genomischen Bankscreen am häufigsten als Bestandteil der Suppressorplasmide erhalten wurde, ist eine Teilsequenz des *spc7<sup>+</sup>* Gens. Der offene Leserahmen wurde bisher nur durch Sequenzierung des Spalthefergenoms identifiziert. Das bis dahin nicht experimentell untersuchte hypothetische Spc7p Protein wird in diesem Teil der Arbeit durch die Bearbeitung unterschiedlicher Aspekte weiter charakterisiert. Es wird untersucht, ob Spc7p ein funktionell evolutionär konserviertes Protein ist (siehe Kapitel 5.7.1). Durch Deletionsexperimente soll ermittelt werden, ob es sich bei *spc7<sup>+</sup>* um ein essentielles Gen handelt (siehe Kapitel 5.7.2) und wie sich der Effekt der Überexpression einer DNA-Sequenz, die für ein N-terminal verkürztes Spc7p Protein kodiert, auswirkt (siehe Kapitel 5.7.4). Da der *spc7<sup>+</sup>* Leserahmen in dieser Arbeit trotz Einsatz unterschiedlicher Transformationskassetten nicht deletiert werden konnte, sollte er unabhängig durch die Analyse von zwei c-DNA Genbanken und durch die von Gesamt-RNA verifiziert werden (siehe Kapitel 5.7.3). Auch die Lokalisierung des Proteins innerhalb der Hefezellen wird analysiert und auf die mögliche Funktion näher eingegangen (siehe Kapitel 5.7.5).

### 5.7.1 Spc7p ist ein funktionell evolutionär konserviertes Protein

Durch einen computergestützten Vergleich der Aminosäuresequenz von Spc7p mit anderen Proteinen der Proteome-Datenbank wurde das 917 Aminosäuren große Spc105 Protein aus *S. cerevisiae* ermittelt. Nach Datenbankangaben zeigt der Aminosäurevergleich beider Proteine zu 21 % identische und zu 41 % ähnliche Aminosäuren. Diese erstrecken sich mit 766 Aminosäuren fast über die gesamte Länge des Spc105 Proteins (siehe Abbildung 27). Die Ausnahme bilden die ersten 55 Aminosäuren am N-Terminus und die letzten 156 Aminosäuren des C-terminalen Proteinbereiches. Der Homologiebereich der Proteine betrifft nicht den N-terminalen Bereich des Spc7p Proteins, sondern beschränkt sich auf seinen zentralen und C-terminalen Sequenzbereich. Das DNA-Insert, welches im genomischen Bankscreen erhalten wurde, wird durch diesen Homologiebereich vollständig abgedeckt. Zusätzlich erstreckt sich die Übereinstimmung beider Proteine noch um 219 Aminosäuren in N-terminale Richtung, die in der Insertsequenz nicht vorhanden sind.

A



B

469 **DLNQFTSNISSSSKPRKDNNK**TANS**SKFIPDSEDFMDITRPFN**-**ILSPSKEAL**SEEQ**PM** 527  
 55 **DGSNTTSRINTSNLQSMVKRRV**--**SFAPDVTLHSEFTFVPEQNNELKEPRRRTK**STNS**ETK** 112

528 **LTSTVFP**CEN**STSHLEVEEAAMDETVAFQ**IRGN**VELP**-**SADKENA**REE**IPSYSDKSEN** 586  
 113 **ISSQEEPLV**T**ST---**Q**IDDARTE**E**KTA**AE**-----**ED**PD**TS**GMELTE**PIVAT**PD**SN**KASQ** 163

587 **FNTTSFTNH**ERS**P**NGNN**NLKF**SK**DPN**SS**SPSR**HVVAT**P**T**DKL**G**TRKRR**LY**ST--**SS**FDQ** 644  
 164 **HD**PT**SM**EMTE**EV**FP**R---**S**IR**-**Q**KN**P**D**VEGE**S**IESS**Q**QID**D**VEAV**RE**ETMEL**TA**IH**N**VH**D**Y** 219

645 **ST**LR**R**N**RLA**T**I**R**N**ARKS**IS**T**L**ND**REL**LP**VN**FF**E**KK**VN**S**GLYK**S**VER**SE**NY**RLGAT**PLT**-**A** 703  
 220 **DS**ISK**D---**T**VE**GE**PID**L**TEY**ES**KPY**V**NS**V**SR**ST**GK**SS**DY**-**S**VER**SND**----**KSD**L**S**K**S** 271

704 **E**K**P**FT**TE**K**PL**SS**LPE**EV**S**R**Q**PT**DD**K**G**EQ**V**S**N**AD**V**DS**GL**SK**TER**L**T**I**Q**OT**N---**E**IK**H**V**PT 760  
 272 **E**N**K**T**N**SS**Q**PM**E-**I**T**D**I**F**H**AD**P**Q**N**PM**S**L**H**SD**N**-**N**IN**N**D**G**NE**M**E**-**L**T**Q**I**Q**T**N**F**DR**N**H**I**D**E** 328

761 **N**T**T**SS**V**KL**P**Q**Q**PS**NE**DE**K**ER**IT**T**A**D**Y**AD**ST**S**L**ER**LES**Q**----**E**P**N**R**NE**L**V**Q**V**G**SS**N**AG**N**T 816  
 329 **S**P**S**E**K**H**A**F**----**S**S**N**K**R**R**KL**D**T**V**S**D**Y**A**AS**V**I**T**P**V**KE**A**K**D**T**S**GE**D**N**D**G**L**E**M**ME**K**M**S**P**I**T**F** 384

817 **T**S**V**GM**NE**HE**K**S**P**V**K**L**S**KG**V**SN**V**D**T**S**L**G**A**ST**I**N**T**N**I**-**L**N**Q**D**S**GP**NE**E**L**P**V**GN**E**PE**F**D**T**MP**-** 874  
 385 **S**D**V**DN**K**IG**T**R**S**ND**V**FT**I**EP**G**T**ED**T**G**M**Q**T**AT**D**D**E**E**D**G**EN**V**D**D**NG**N**K**I**VE**K**TR**L**PE**I**D**K**EQ**Q** 444

875 ---**T**LP**N**VE**P**IS**L**S**D**FL**K**MT**G**IE**F**LD**N**L**T**I**A**K**R**-**R**ET**LL**P**---**NA**E**N**K**K**C**S**T**Q**E**L**L**E**S** 926  
 445 **S**G**I**AL**P**T**Q**D**Y**TL**R**E**F**INE**V**GV**G**FL**D**TK**L**I**D**DL**D**K**K**V**N**F**L**NS**F**N**F**V**E**N**O**R**--**I**D**N**V**F**S**A 501

927 **F**Y**I**Q**F**PL**L**E**L**Y**K**F**S**CO**OL**Q**D**Y**I**A**E**G**K**D**F**V**T**K**I**E**E**TL**K**EN**P**-**L**L**F**Y**E**Y**R**K**A**SS**D**M**R**V**L**M**D** 985  
 502 **F**Y**I**D**I**P**I**L**E**VE**A**F**R**CK**E**L**W**R**S**I**N**E**S**K**D**K**F**K**D**F**E**A**Q**I**D**K**S**H**E**P**L**L**L**O**E**Y**F**S**S**DE**K**M**K**Q**L**M**R** 561

986 **S**Q**F**L**M**M**K**T**F**AR**L**Q**A**K**G**D**W**Y**E**W**R**E**G**L**M**Q**I**K**H**E**L**N**L**N**L**T**G**M**Q**R**S**L**T**H**I**M**D**V**A**N**V**I**H**P**Y**A**Q**E 1045  
 562 **D**Q**L**Q**L**V**K**G**Y**S**K**L**E**A**A**M**E**W**Y**E**W**R**K**K**Q**L**N**G**L**E**L**I**L**A**E**N**L**N**L**T**L**K**R**E**Y**E**K**L**N**E**V**E**K**V**N**S**I**R**G**K 621

1046 **I**Q**E**R**Y**NG**S**I**T**T**V**Q**T**L**K**K**Q**K**E**F**A**N**Q**Y**D**S**T**L**L**A**Q**A**Q**E**K**L**E**K**L**K**V**E**V**E**R**R**R**R**L**L**S**E**K**E**R**R**K**E 1105  
 622 **I**R**K**L**N**E**A**I**K**E**E****I**R**S**L**K**N**L**P**--**S**D**S**Y**K**P**T**L**M**N**R**I**--**K**I**E**A**F**K**Q**E**L**M**E**H**S**I**S**L**S**S**N**D**F**T**Q**E 677

1106 **L**-**A**I**K**I**E**Q**V**T**N**S**C**S**D**L**E**L**R**T**N**-**A**E**Q**D**F**-**Y**A**K**N**Q**D**E**F**D**E**I**K**R**Y**E**E**Q**L**N**L**K**N**E**L**G**W**T**I**V**S 1162  
 678 **M**R**S**L**K**L**A**I**A**K**S**N**D**I**L**T**L**R**S**E**V**A**S**I**D**K**K**I**E**K**R**K**L**E**T**R**F**D**L**P**K**L**R**D**T**L**K**I**L**E**S**L**T**C**V**R**F**L**K** 737

1163 **L**T**A**G**G**I**K**L**A**T**N**N**T**A**L**S**P**Y**S**A**E**V**I**V**E**I**L**R**Q**N**F**Q**V**N**V**D**I**A**C**K**F**P**N**E**S**N 1208  
 738 **F**S**K**A**T**L**S**I**A**F**--**L**Q**L**D**----**D**L**R**V**D**I**N**L**A**N**F**K**N**N**P**L**S**S**M**K**V**M**D**S**N** 777

#### Abbildung 27: Darstellung des homologen Bereiches der Proteine Spc7p und Spc105

Teil A der Abbildung zeigt den Bereich der Homologie als Rechteck für die Vollängenproteine Spc7p (*S. pombe*) und Spc105 (*S. cerevisiae*), sowie des Proteinfragmentes, welches durch die Insertsequenz CD-6 kodiert wird. Das computerberechnete Vollängenprotein von *S. pombe* besitzt eine Länge von 1364 Aminosäuren, das entsprechende *S. cerevisiae* Protein 917 Aminosäuren. Die Insertsequenz von CD-6 kodiert für die letzten 676 Aminosäuren des Spc7p Proteins. Teil B der Abbildung stellt diesen Homologiebereich der Proteine, der 766 Aminosäuren umfaßt, zusätzlich im Detail dar. Die obere Aminosäuresequenz steht für das Spc7p Protein, die untere für das homologe Protein der Bäckerhefe. Identische Aminosäuren sind durch schwarze Markierungen gekennzeichnet, ähnliche Aminosäuren durch graue Markierungen.

Versuche, die zeigen, daß nicht nur eine Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz vorliegt, sondern es sich auch um funktionell homologe Proteine handelt, sind in Kapitel 5.8.1 beschrieben. Das Bäckerhefemolog Spc105 wurde im Rahmen dieser Arbeit als neues *S. cerevisiae* Zentromerprotein identifiziert (siehe Kapitel 5.8.2).

### **5.7.2 Deletion des offenen Leserahmens durch homologe Rekombination**

Da es sich bei Spc7p um ein vorher nicht untersuchtes Protein handelt und sein Leserahmen durch die Sequenzierung des *S. pombe* Genoms identifiziert wurde, gibt es keine Angaben in der Datenbank oder aus der Literatur, ob es sich um ein essentielles Gen handelt bzw. ob seine Funktion entbehrlich ist. Durch gezielte Deletion des in der Datenbank angegebenen Leserahmens sollte dies geklärt werden.

Für die gezielte Deletion des *spc7<sup>+</sup>* Gens durch homologe Rekombination wurden sechs verschiedene Deletionskassetten generiert. Die Kassetten unterscheiden sich sowohl durch den gewählten Genmarker als auch durch den Homologiebereich, der für die Deletion durch homologe Rekombination ausgewählt wurde (siehe Abbildung 28 und Kapitel 4.14). Zunächst wurden Kassetten mit 80 Bp Homologiebereichen zum *spc7<sup>+</sup>* ORF eingesetzt, jedoch zeigte von 314 getesteten Transformanten keine die korrekte Integration der Transformationskassetten. Auch für 201 Transformanten der *his3<sup>+</sup>*-Kassetten mit Homologiebereichen zwischen 300 und 600 Bp wurde kein positives Ergebnis erhalten. Schließlich wurde die Homologie zur genomischen DNA-Sequenz auf Längen zwischen 2 Kb und 3,7 Kb erhöht. Sowohl haploide als auch diploide Stämme wurden für die Transformation verwendet.

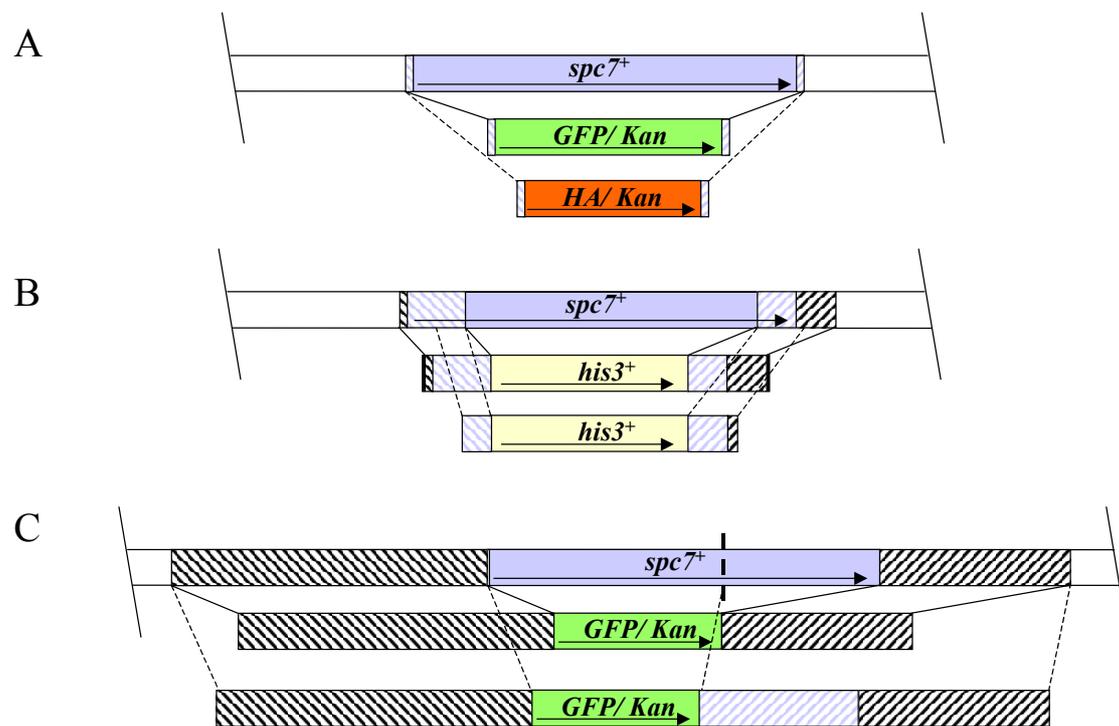


Abbildung 28: Prinzip der *spc7<sup>+</sup>* Deletion durch sechs verschiedene Transformationskassetten

Dargestellt ist jeweils der 4095 Bp große *spc7<sup>+</sup>* ORF mit seinen flankierenden genomischen DNA-Sequenzen auf Chromosom 3 der Spaltheefe sowie die sechs generierten Transformationskassetten. Durch die Pfeilrichtung im Rechteck ist die Orientierung des Leserasters angegeben. Die blau schraffierten Rechtecke stellen die homologen Sequenzbereiche zum *spc7<sup>+</sup>* ORF dar. Schwarz schraffierte Rechtecke verdeutlichen die Homologie zu den flankierenden Regionen des ORFs. Schwarz gefüllte Rechtecke stehen für die Übereinstimmungen mit DNA-Sequenzen der Klonierungsvektoren. Teil A zeigt die *GFP*- bzw. *HA*-Transformationskassetten, Teil B und Teil C stellen die generierten *his3<sup>+</sup>*- bzw. *GFP-Kan*-Transformationskassetten mit langen Homologiebereichen dar. Weitere Details zur Homologie können Kapitel 4.14 entnommen werden.

Eine Übersicht über die Transformationen mit den eingesetzten Kassetten verdeutlicht Tabelle 9. Alle Transformanten wurden zunächst mittels PCR-Analyse untersucht. Ausgewählte Transformanten wurden im Verlauf der Untersuchung zusätzlich durch Tetraden- bzw. Southern-Analyse überprüft. Die Deletion des *spc7<sup>+</sup>* Gens konnte jedoch während der eigenen experimentellen Arbeit nicht erreicht werden.

Später wurde jedoch mit den im Rahmen dieser Arbeit generierten Deletionskassetten im Labor weitergearbeitet. Durch Verwendung der *AatII/SpeI* isolierten *his3<sup>+</sup>* Deletionskassette (siehe Kapitel 4.14) konnte der *spc7<sup>+</sup>* ORF deletiert werden (persönliche Mitteilung von PD Dr. Ursula Fleig). Es wurde gezeigt, daß es sich bei *spc7<sup>+</sup>* um ein essentielles Gen der Spaltheefe handelt.

Tabelle 9: Ergebnisübersicht der Transformationen mit unterschiedlichen Insertionskassetten

Die Tabelle stellt die Einzeldaten zusammen, die bei den Transformationen haploider bzw. diploider *S. pombe* Stämme mit den unterschiedlichen Deletionskassetten erhalten wurden. Die verwendeten Stämme sind durch die Nummern der Stammsammlung (*S. pombe*) definiert. Diploide Stämme sind durch ein „x“ und die Ausgangsstämme der Kreuzung gekennzeichnet. Alle verwendeten Kassetten sind in Abbildung 28 erläutert. Zuordnung der Kassetten: GFP-Kan/HA-Kan mit kurzem Homologiebereich = DNA-Kassetten mit Kanamycinrestistenzgen und kurzen Homologiebereichen (siehe Abbildung 28 A); his = DNA-Kassetten mit *his3<sup>+</sup>* Gen nach Restriktion mit *PauI* bzw. *AatII/SpeI* (siehe Abbildung 28 B); GFP-Kan mit längeren Homologiebereichen = DNA-Kassetten mit Kanamycinrestistenzgen und langen Homologiebereichen zur Deletion des gesamten bzw. partiellen *spc7<sup>+</sup>* Leserahmens (siehe Abbildung 28 C).

Aufgeführt sind die Größen der Transformationskassetten, die verwendeten Selektionsmarker der Deletionskassetten und die Länge des Homologiebereiches zur genomischen *S. pombe* DNA-Sequenz. Die Anzahl der untersuchten Transformanten der einzelnen Stämme und die Gesamtzahlen der Transformanten für die getesteten Transformationskassetten sind aufgelistet. Darunter ist zusätzlich die Anzahl der Transformanten angegeben, die durch eine Tetradenanalyse bzw. eine Southern-Blotanalyse überprüft wurden.

Transformationskassetten mit					
	kurzem Homologiebereich	längerem Homologiebereich			
Bezeichnung	GFP-Kan bzw. HA-Kan	his		GFP-Kan	
Herkunft	PCR-Fragment	CD-K14		CD-K7	CD-K8
Restriktion	/	<i>PauI</i>	<i>AatII/SpeI</i>	<i>StuI/BamHI</i>	
Größe der DNA-Kassette	2460 Bp bzw. 1853 Bp	3510 Bp	2895 Bp	6973 Bp	8637 Bp
Selektionsmarker	<i>Kan<sup>r</sup></i>	<i>his3<sup>+</sup></i>	<i>his3<sup>+</sup></i>	<i>Kan<sup>r</sup></i>	<i>Kan<sup>r</sup></i>
Homologie im 5'-Bereich	84 Bp	701 Bp	309 Bp	3295 Bp	3295 Bp
Homologie im 3'-Bereich	79 Bp	609 Bp	518 Bp	1999 Bp	3663 Bp
diploide Stämme					
129x132	41	134		/	
130x131	141	47		/	
39x40	/	/		85	
haploide Stämme					
103	6	/		/	
129	32	10		/	
130	94	10		/	
131	/	/		/	
132	/	/		/	
39	/	/		/	
40	/	/		/	
getestet insgesamt	314	201		85	
Tetradenanalyse	8	25		8	
Southern-Analyse	13	40		/	

### 5.7.3 Verifizierung des *spc7<sup>+</sup>* ORFs durch die Analyse von *S. pombe* Gesamt-RNA und von zwei c-DNA Genbanken

Der offene Leserahmen, der für das Spc7p Protein kodiert, wurde durch Sequenzierung des Spalthefergenoms identifiziert. Durch die Analyse der *S. pombe* Gesamt-RNA (siehe Kapitel 5.7.3.1) und zweier c-DNA Genbanken (siehe Kapitel 5.7.3.2) sollte die computerermittelte Größe des *spc7<sup>+</sup>* Leserahmens von 4095 Bp experimentell überprüft werden. Nach Angaben der Datenbank besitzt der *spc7<sup>+</sup>* ORF keine Intronsequenzen.

### 5.7.3.1 Ermittlung der Größe von *spc7<sup>+</sup>* messenger-RNA durch Northern-Blotanalyse

Durch Northern-Hybridisierung der Filtermembranen sollte die Sonden-homologe *m*-RNA von *spc7<sup>+</sup>* in der übertragenen Gesamt-RNA sichtbar gemacht werden. Die Hybridisierungsmuster für die verwendeten Sonden, die homolog zu verschiedenen 5'- bzw. 3'-Sequenzbereichen des 4095 Bp großen *spc7<sup>+</sup>* ORFs sind, zeigen mehrere Banden unterschiedlicher Größe (siehe Abbildung 29 und Abbildung 30). Trotz Verwendung von drei spezifischen Sonden, konnte kein 4 Kb großes *spc7<sup>+</sup>* *m*-RNA-Fragment durch Northern-Blotanalyse sichtbar gemacht werden. Möglicherweise wurden die Fragmente dieser Größe nicht stabil in ausreichender Menge auf die Membranen transferiert bzw. ihre Größe wurde posttranslational modifiziert.

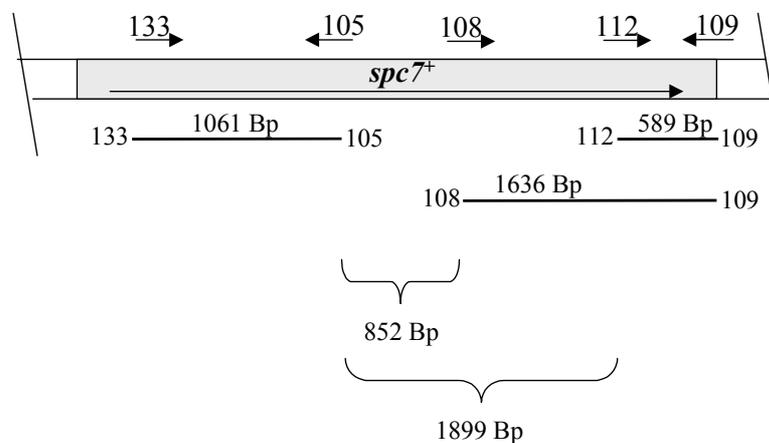


Abbildung 29: Hybridisierungsschema der verwendeten Sonden und der *spc7<sup>+</sup>* Sequenz

Der 4095 Bp große *spc7<sup>+</sup>* ORF mit seinen flankierenden genomischen Sequenzen ist dargestellt. Durch PCR-Reaktionen wurden spezifische Sonden für die Northern-Blotanalyse erzeugt. Die Bindung der verwendeten Oligonukleotide innerhalb der *spc7<sup>+</sup>* Sequenz ist durch Pfeile veranschaulicht. Die 1061 Bp große Sonde 133/105 ist homolog zur 5'-Sequenz des offenen Leserahmens (+547 bis +1677). Die 589 Bp große Sonde 112/109 bzw. die 1636 Bp große Sonde 108/109 zeigen Homologie zum 3'-Bereich der *spc7<sup>+</sup>* Sequenz (+2461 bis +4095 bzw. +3506 bis +4095). Der Abstand zwischen den Sonden wird durch Klammern verdeutlicht.

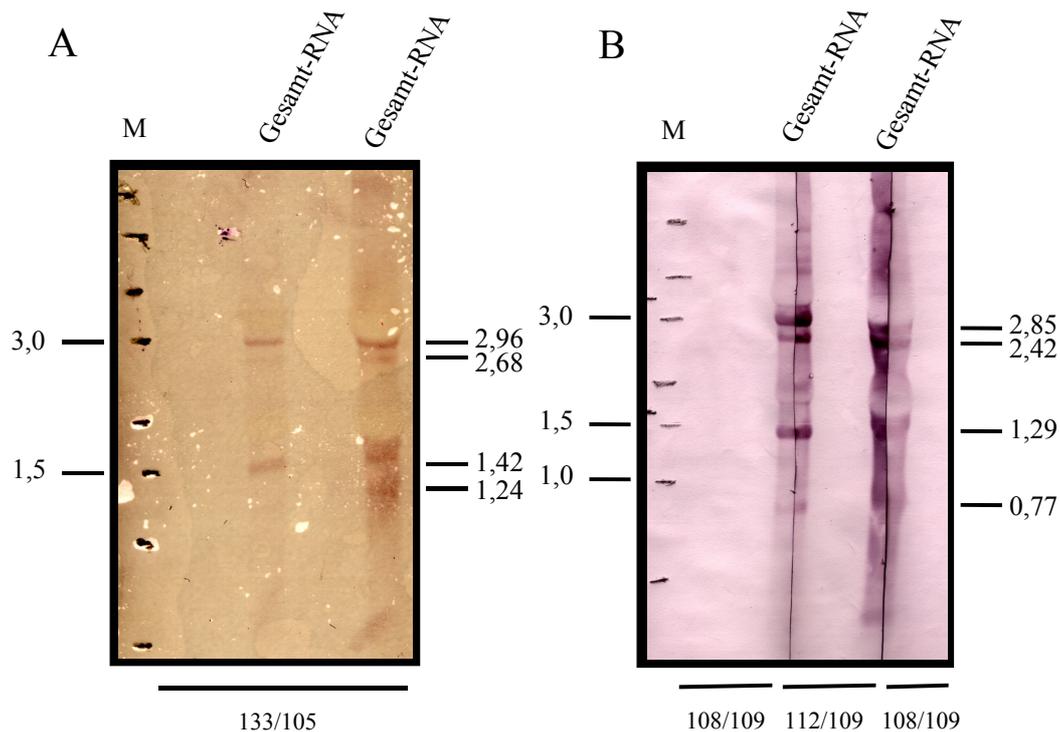


Abbildung 30: erhaltende Hybridisierungsmuster der Sonden bei der Northern-Blotanalyse

Die Analyse von Gesamt-RNA Proben mit verschiedenen Sonden ist gezeigt. Teil A zeigt das Hybridisierungsmuster der Sonde 133/105, die homolog zur 5'-Sequenz des *spc7<sup>+</sup>* ORFs ist, Teil B das Muster für die Sonden 108/109 und 112/109, die homolog zur 3'-Sequenz des ORFs sind. Die Analyse von zwei Gesamt-RNA Proben ist jeweils dargestellt. Das unter Teil B gezeigte Membranstück wurde in drei Teile zerschnitten und die Teilstücke wurden mit unterschiedlichen Sonden behandelt. Unter „M“ sind die Größen des Standardmarkers aufgeführt.

### 5.7.3.2 Analyse von zwei *S. pombe* c-DNA Genbanken

Durch die Analyse von zwei c-DNA Genbanken, welche die *S. pombe* m-RNA Sequenzen in Form von doppelsträngigen DNA-Klonen enthalten, sollte die kodierende DNA-Sequenz des *spc7<sup>+</sup>* Gens spezifisch identifiziert werden. Die Analyse erfolgte sowohl durch ein aufwendiges Screening-Verfahren (siehe Kapitel 5.7.3.2.1), als auch durch spezifische PCR-Analyse der DNA-Insertsequenzen (siehe Kapitel 5.7.3.2.2).

#### 5.7.3.2.1 Screening einer c-DNA Bank durch Southern-Blotanalyse und PCR-Analyse

Eine c-DNA Genbank (bereitgestellt von C. Norbury) wurde mittels einer Sonde, die homolog zu einer DNA-Sequenz im 3'-Bereich des *spc7<sup>+</sup>* Gens ist, spezifisch analysiert (siehe Kapitel 4.17). Von anfänglich über 1,35 Millionen Transformanten der c-DNA Genbank wurde durch Southern-Blotanalyse die Anzahl auf 306 putativ positive Kolonien reduziert. Durch PCR-Analyse und weitere Koloniehybridisierung konnte die Anzahl der Signale schließlich auf 17 vermindert und Einzelklone isoliert werden.

Die DNA-Insertsequenzen von vier unterschiedlichen Klonen wurden durch Ansequenzierung bestimmt (siehe Abbildung 31 sowie Tabelle 14 und Abbildung 66 im Anhang). Bei allen DNA-Insertsequenzen folgt auf die Sequenz des Vektors eine 19 Nukleotide-lange Poly-T Sequenz. Direkt daran schließt sich eine DNA-Sequenz an, die den gesamten ORF SPCC16C4.13c und 9 Bp seiner 5'- bzw. 44 Bp der 3'-flankierenden DNA-Sequenz enthält. Der ORF SPCC16C4.13c (*rpl1201*<sup>+</sup>) wurde bereits als Bestandteil der Insertsequenz CD-17 beschrieben (siehe Kapitel 5.6.2.6). Der ORF kodiert für das 17,6 kDa große 60S ribosomale Protein Rpl1201p. Auf diesen ORF folgt eine partielle *spc7*<sup>+</sup> Sequenz ab Nukleotidposition 2534 des Leserahmens (+2534). Durch PCR-Analyse mit den Oligonukleotiden 112 und 109 konnte gezeigt werden, daß die Insertsequenz den vollständigen 3'-Bereich des *spc7*<sup>+</sup> ORF umfaßt (siehe Abbildung 32 C). Dieser Aufbau der DNA-Insertsequenzen ist bei allen ansequenzierten c-DNA Bankplasmiden identisch (siehe Tabelle 14 und Abbildung 66 im Anhang).

Durch Sequenzierung wurde nachgewiesen, daß die durch Southern-Blotanalyse untersuchte c-DNA Genbank fehlerhaft klonierte Insertsequenzen aufweist. Einige der doppelsträngigen DNA-Inserts der Genbankplasmide beruhen auf verschiedenen *m*-RNA Sequenzen, die genomisch an entfernten Genloci synthetisiert wurden.

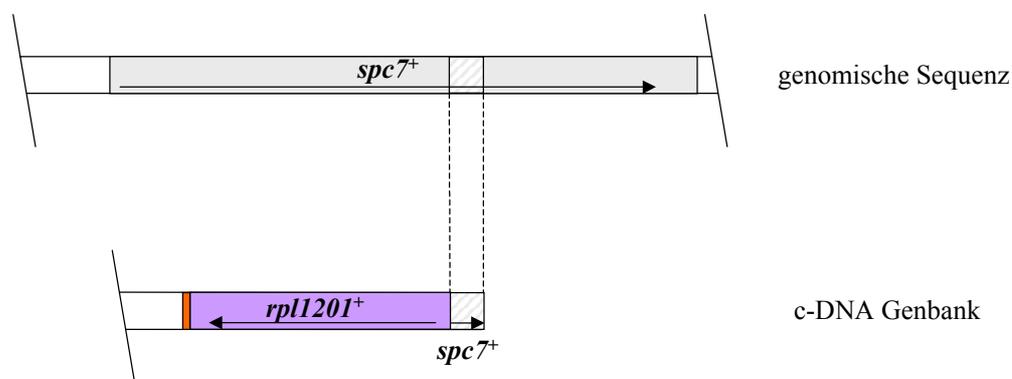


Abbildung 31: Sequenzierung der c-DNA Genbankplasmide

Die genomische *spc7*<sup>+</sup> Sequenz mit den flankierenden Bereichen und das Ergebnis der Sequenzierung für die Insertsequenzen der c-DNA Genbankplasmide ist schematisch dargestellt. An das rote Rechteck, welches eine Poly-T-Nukleotidwiederholung kennzeichnet, schließt sich der ORF *rpl1201*<sup>+</sup> an. Das schraffierte Rechteck zeigt die durch Sequenzierung nachgewiesene Homologie des DNA-Inserts zur *spc7*<sup>+</sup> Sequenz.

### 5.7.3.2.2 Screening von zwei c-DNA Genbanken durch PCR-Analyse

Die DNA-Insertsequenzen der durch Southern-Blotanalyse untersuchten c-DNA Genbank (bereitgestellt von C. Norbury) und einer weiteren c-DNA Genbank (Contech) wurden durch spezifische PCR-Reaktionen mit verschiedenen Oligonukleotidkombinationen ermittelt (siehe Abbildung 32 und Abbildung 33). Für die durch Southern-Blotanalyse untersuchte c-DNA Genbank konnten nur fehlerhaft klonierte *spc7<sup>+</sup>* Insertsequenzen nachgewiesen werden.

Dagegen zeigt die zweite getestete c-DNA Genbank (Clontech) identische PCR-Fragmente, wie sie auch in Reaktionen mit genomischer DNA als Template erhalten werden (siehe Abbildung 33). Für die Kontrollreaktion mit den Oligonukleotiden 85 und 86 wird das 909 Bp große DNA-Fragment erhalten. Die Reaktion mit den Oligonukleotiden 207 und 208 ergibt in beiden Fällen ein 790 Bp großes PCR-Produkt. Die DNA-Insertfragmente dieser c-DNA Genbank unterscheiden sich somit von denen der fehlerhaft klonierten c-DNA Bank. Kein PCR-Produkt wurde für die Reaktion mit den Oligonukleotiden 210 und 208 erhalten, die spezifisch diese fehlerhafte Insertsequenz nachweist. Durch weitere PCR-Reaktionen mit dem Oligonukleotid 263 und unterschiedlichen Oligonukleotiden mit gegenläufiger Orientierung, die homolog zum 3'-Bereich der *spc7<sup>+</sup>* Sequenz sind, konnte der in der Datenbank angegebene *spc7<sup>+</sup>* bis auf 226 Basenpaare (+1 bis +226) vollständig nachgewiesen werden. Es wird jedoch angenommen, daß auch diese in der c-DNA Sequenz vorhanden sind. Somit konnten durch Analyse der c-DNA Genbank die computerermittelten Angaben der Datenbank für den *spc7<sup>+</sup>* ORF bestätigt werden.

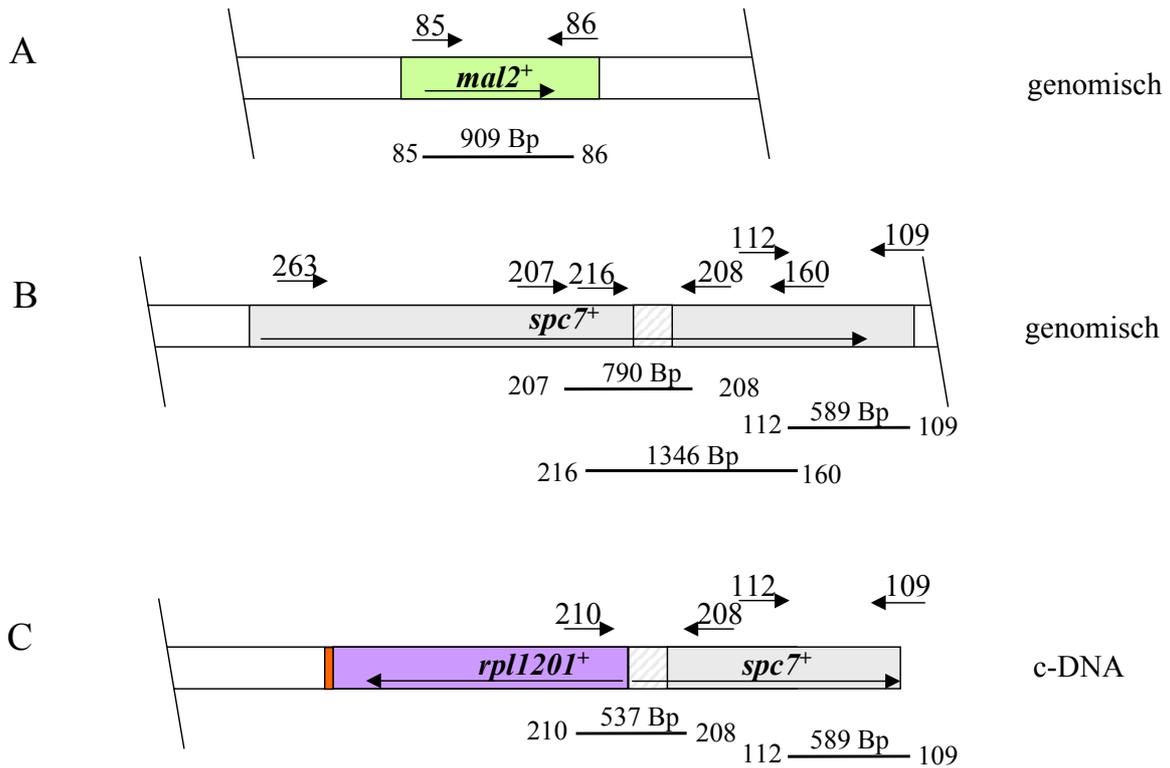


Abbildung 32: Schema der durchgeführten PCR-Reaktionen zur Untersuchung der c-DNA Genbank

Die genomische DNA-Sequenz der Gene *mal2*<sup>+</sup> und *spc7*<sup>+</sup> mit ihren flankierenden Bereichen, sowie die durch Sequenzierung und PCR-Analyse ermittelte Insertsequenz der c-DNA Genbankplasmide ist schematisch dargestellt. Die spezifische Bindung verschiedener Oligonukleotide und die Größe der erwarteten PCR-Fragmente wird dargestellt.

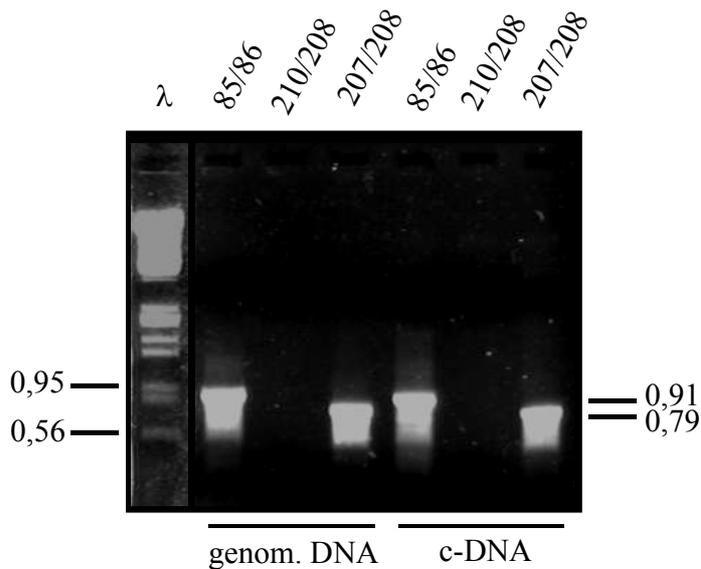


Abbildung 33: PCR-Analyse der Clontech c-DNA Genbankinserts

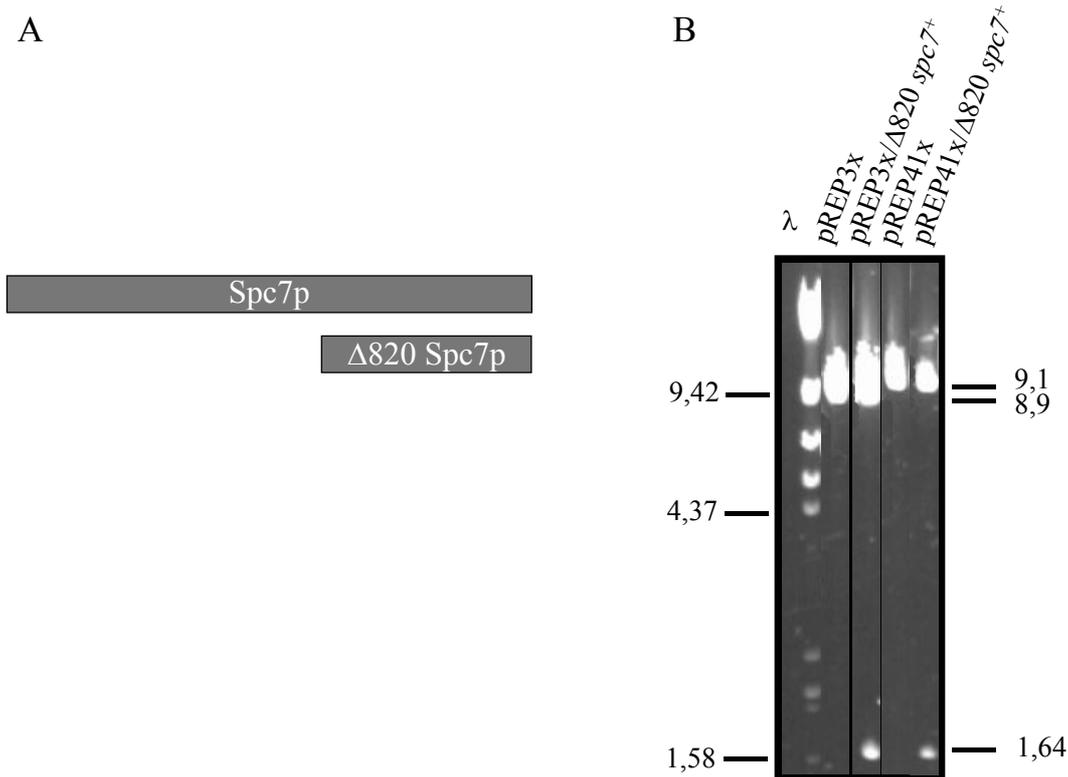
Die Auftrennung der PCR-Reaktionen zur Analyse der c-DNA Genbankinserts ist gezeigt. Die Überprüfung der genomischen DNA-Sequenz der Gene *mal2*<sup>+</sup> (85/86), *spc7*<sup>+</sup> (nach Datenbankangaben mit den Oligonukleotiden 207/208) und die Kombination 208/210 zum Nachweis der erhaltenen c-DNA Genbankinsertsequenzen ist abgebildet. Verdünnungen genomischer DNA und einer c-DNA Genbank (Clontech) wurden getestet.

#### **5.7.4 Überexpression einer DNA-Sequenz, die für ein verkürztes Spc7p Protein kodiert, kann die Thiabendazol-Hypersensitivität des *mal3-1* und *mal3Δ* Stammes supprimieren**

Durch Klonierung wurde die DNA-Sequenz, die für ein verkürztes Spc7p Protein kodiert, generiert. Der verkürzte ORF ( $\Delta 820$  *spc7<sup>+</sup>*) kodiert nicht mehr für die ersten 820 Aminosäuren des Proteins. Als Startmethionin wurde das erste ATG innerhalb der Insertsequenz des *spc7<sup>+</sup>* Leserahmens gewählt, die beim genomischen DNA-Bankscreen isoliert wurde (siehe Kapitel 5.7.4.1). Die Auswirkung des verkürzten Spc7p Proteins für die Zelle wurde durch serielle Tropfpestuntersuchungen ermittelt (siehe Kapitel 5.7.4.2).

##### **5.7.4.1 Klonierung eines verkürzten *spc7<sup>+</sup>* Leserahmens in *S. pombe* Expressionsvektoren**

Der Leserahmen der für ein N-terminal um 820 Aminosäuren verkürztes Spc7p Protein kodiert, wurde durch Klonierung hinter die Thiamin-regulierbaren Promotoren von zwei unterschiedlichen *S. pombe* Expressionsvektoren gebracht (siehe Abbildung 34 und Kapitel 4.13). Neben dem Längenstandard sind die Banden aufgetrennt, die bei einer Kontrollrestriktion mit *SmaI/BamHI* erhalten wurden. Daß die Klonierung erfolgreich durchgeführt wurde, konnte auch durch weitere Restriktionen verifiziert werden.



**Abbildung 34: Klonierung eines verkürzten *spc7<sup>+</sup>* Leserahmens in zwei *S. pombe* Expressionsvektoren**

Teil A: Schematische Darstellung eines Spc7p Vollängenproteins und einer N-terminal um 820 Bp verkürzten Proteinvariante. Dieses verkürzte Protein umfaßt nur noch 544 der ursprünglich 1364 Aminosäuren. Teil B: Das Agarosegelfoto zeigt die DNA-Fragmente, die bei einer *SmaI/BamHI* Restriktion für die Ausgangsvektoren pREP3x bzw. pREP41x, sowie für positive Klonierungsplasmide erhalten wurden. Die Restriktion führt zur Linearisierung der Vektoren und es wird ein 8,9 Kb bzw. 9,1 Kb großes DNA-Fragment erhalten. Für die positiven Klonierungsplasmide, die zusätzlich den partiellen *spc7<sup>+</sup>* Leserahmen tragen, ergibt sich ein 1636 Bp und ein 8,9 Kb großes DNA-Fragment für die Klonierung in pREP3x bzw. ein 1636 Bp und 9,1 Kb großes DNA-Fragment für die Klonierung in pREP41x. Plasmidauftragung: pREP3x, pREP3x/ $\Delta$ 820*spc7<sup>+</sup>*, pREP41x, pREP41x/ $\Delta$ 820*spc7<sup>+</sup>*

#### 5.7.4.2 Das partielle Spc7p supprimiert die TBZ-Hypersensitivität des *mal3-1*

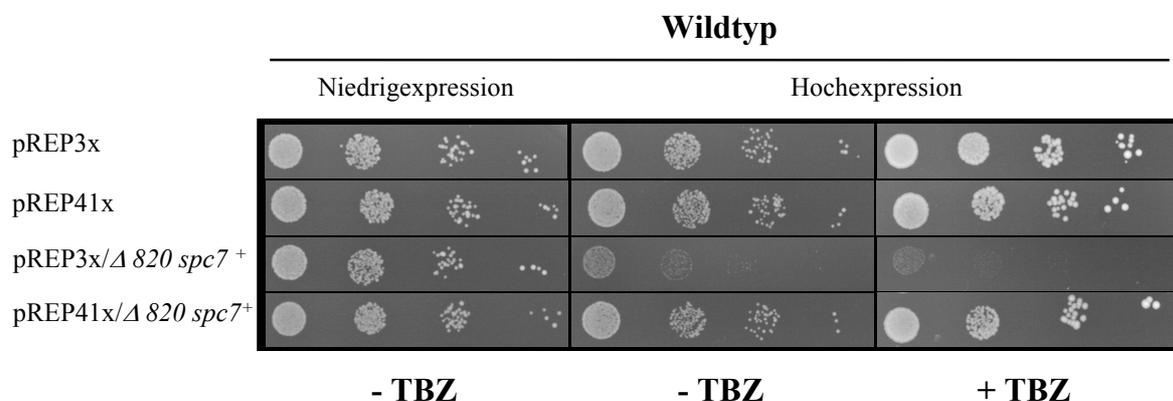
##### Stammes und des *mal3A* Stammes

Eine verkürzte Variante des Spc7p Proteins, dem die ersten 820 Aminosäuren fehlen, wurde in seriellen Tropftestuntersuchungen analysiert. Die betreffenden kodierenden Sequenzen wurden in Abhängigkeit von zwei Thiamin-reprimierbaren Promotoren exprimiert. Die Expression für induzierte bzw. reprimierte Bedingungen beträgt 25-fach für den Vektor pREP41x bzw. 300-fach für den Vektor pREP3x (Moreno et al., 2000). Abbildung 35 zeigt Zellen des Wildtypstammes, die mit den Vektorkontrollen transformiert wurden. Unter Niedrig- und Hochexpressionsbedingungen zeigen die Zellen der Vektorkontrolle auch auf Medium mit TBZ gutes Wachstum.

Während die moderate Expression der DNA-Sequenz, die für ein verkürztes Spc7p Protein kodiert, in Abhängigkeit des Thiamin-regulierbaren Promotors des Vektors pREP3x noch ein

gutes Wachstum des Wildtypstammes ermöglicht, wirkt sich die starke Überexpression negativ auf das Wachstum des Wildtypstammes aus. Auf Platten mit und ohne TBZ ist bei den Zellen nur noch ein Restwachstum erkennbar. Der Effekt der Überexpression der partiellen Gensequenz wurde in Zellen des Wildtypstammes mikroskopisch betrachtet. In mitotischen Zellen nimmt die Fehlverteilung der DNA im Vergleich zum Wildtyp deutlich zu. Wie später genauer gezeigt wurde, resultiert der letale Phänotyp auf einer fehlerhaften Verknüpfung der DNA mit der mitotischen Spindel (persönliche Mitteilung von PD Dr. Ursula Fleig).

Die Thiamin-abhängige Expression der verkürzten Gensequenz vom Vektor pREP41x wirkt sich dagegen sowohl unter Niedrig- als auch unter Hochexpressionsbedingungen nicht negativ auf das Zellwachstum aus.

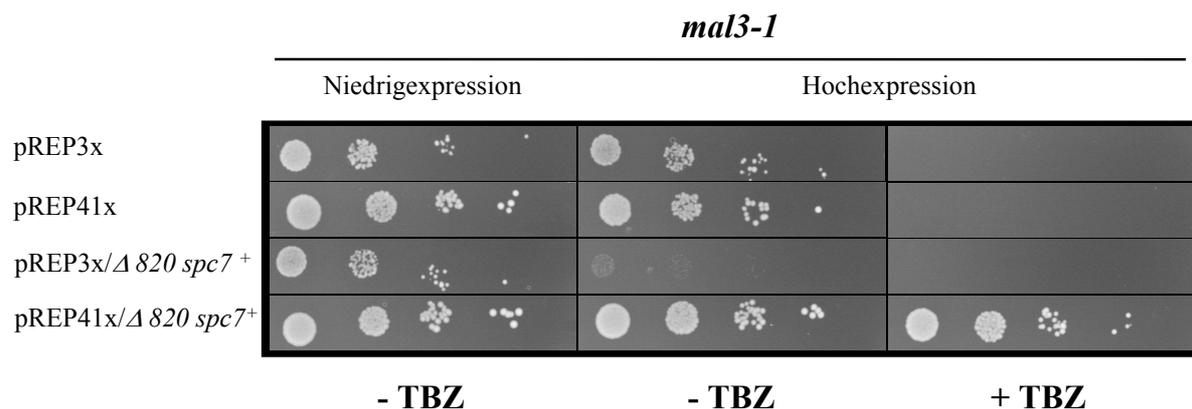


**Abbildung 35:** Serielle Tropftestuntersuchungen des Wildtypstammes und des partiell verkürzten Spc7p Proteins. Das Wachstum von Zellen des Wildtypstammes 103, transformiert mit verschiedenen Plasmiden, ist gezeigt. Die Stämme wurden mit den Kontrollvektoren pREP3x, pREP41x bzw. pREP3x/ $\Delta 820$  *spc7*<sup>+</sup> und pREP41x/ $\Delta 820$  *spc7*<sup>+</sup> transformiert. Die Abbildung stellt das Wachstum zusammen, das bei Niedrig- und Hochexpressionsbedingungen mit (+6,5  $\mu$ g/ml TBZ) und ohne TBZ erhalten wurde. Bei allen Platten betrug die Inkubationszeit 5 Tage bei 24 °C.

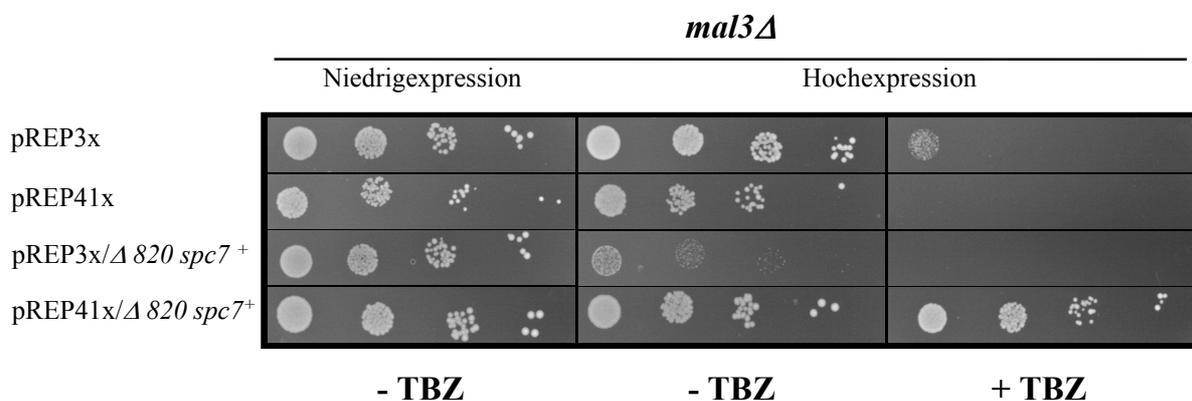
Die Ergebnisse der Expression dieser Plasmide in den Stämmen *mal3-1* und *mal3 $\Delta$*  sind in Abbildung 36 und Abbildung 37 zusammengestellt. Die Hypersensitivität der Stämme gegenüber der Mikrotubuli-destabilisierenden Chemikalie TBZ kann durch Transformation der Vektorkontrollen unter Niedrig- und Hochexpressionsbedingungen nicht supprimiert werden. Dagegen ist bei Niedrigexpressionsbedingungen der Gensequenzen, die für die verkürzten Spc7p Proteine kodieren, in Abhängigkeit der Thiamin-regulierbaren Promotoren der Vektoren pREP3x und pREP41x für beide Stämme gutes Wachstum erkennbar. Die Überexpression der verkürzten Gensequenz in Abhängigkeit vom Thiamin-regulierbaren Promotor des Vektors pREP3x führt in beiden Stämmen zu einer starken Reduzierung des Wachstums. Unter diesen Bedingungen ist auch kein Wachstum auf TBZ-haltigem Medium erkennbar. Für den im Vergleich zum *mal3-1* Stamm geringfügig weniger TBZ-

hypersensitiven *mal3Δ* Stamm ist sogar noch eine Verschlechterung des Restwachstums im Vergleich zur insertfreien Vektorkontrolle ersichtlich.

Die moderatere Überexpression der Gensequenz, die für ein verkürztes Spc7p Protein kodiert, in Abhängigkeit vom Thiamin-regulierbaren Promotor des Vektors pREP41x führt nicht zu einer Einschränkung des Wachstums. Transformanten beider Stämme zeigen deutliches Wachstum auf Platten ohne TBZ. Interessanterweise kann auch diese moderate Expression die Hypersensitivität beider Stämme gegenüber TBZ supprimieren. Der *mal3-1* Stamm und der *mal3Δ* Stamm zeigen unter diesen Bedingungen ein gutes Wachstum.



**Abbildung 36:** Serielle Tropftestuntersuchungen des *mal3-1* Stammes und des partiell verkürzten Spc7p Proteins. Die Abbildung stellt das Wachstum verschiedener *mal3-1* Transformanten zusammen. Gezeigt ist das Wachstum unter Niedrig- und Hochoexpressionsbedingungen. Nähere Details können dem Abbildungstext zu Abbildung 35 entnommen werden.



**Abbildung 37:** Serielle Tropftestuntersuchungen des *mal3Δ* Stammes und des partiell verkürzten Spc7p Proteins. Gezeigt ist das Wachstum verschiedener Transformanten des *mal3Δ* Stammes unter Niedrig- und Hochoexpressionsbedingungen. Zusätzliche Informationen sind im Abbildungstext zu Abbildung 35 aufgeführt.

Aus den Daten der Tropftestuntersuchungen läßt sich zusammenfassend feststellen, daß die moderate Überexpression eines DNA-Fragmentes, welches für ein verkürztes Spc7p Protein kodiert, ein Wachstum aller untersuchten Stämme ermöglicht. Dies führt zur Suppression des TBZ-hypersensitiven Phänotyps des *mal3-1* und des *mal3Δ* Stammes. Starke Überexpression

durch den Thiamin-regulierbaren Promotor von pREP3x wirkt sich dagegen deutlich negativ auf das Wachstum aus. Die Zellen zeigen nur noch Restwachstum. Es sind somit deutliche Unterschiede der Wirkung des verkürzten Spc7p Proteins auf das Wachstum in Abhängigkeit von der Expressionsstärke des DNA-Fragmentes festzustellen.

### **5.7.5 Identifizierung von Spc7p als neues *S. pombe* Zentromerprotein**

Dieser Teil der Arbeit umfaßt die intrazelluläre Lokalisierung des Spc7p Proteins im Rahmen von immunfluoreszenz-mikroskopischen Untersuchungen (siehe Kapitel 5.7.5.2). Die Lokalisierung des Proteins sollte Aufschluß über die mögliche Funktion des Proteins geben. Um das Spc7p intrazellulär lokalisieren zu können, wurde der ORF, der für das Spc7p Protein kodiert, genomisch mit der DNA-Sequenz für das grün fluoreszierende Protein (GFP) bzw. das Hämagglutininprotein (HA) fusioniert (siehe Kapitel 5.7.5.1).

#### **5.7.5.1 Generierung von Spc7-GFP- bzw. HA-Fusionsproteinstämmen**

Zur Bestimmung der intrazellulären Lokalisierung des *S. pombe* Proteins Spc7p wurde eine DNA-Sequenz, die für ein GFP- bzw. HA-Epitop kodiert, an das 3'-Ende des *spc7<sup>+</sup>* ORFs genomisch fusioniert. Durch homologe Rekombination konnten so zusammenhängende Leserahmen ohne zwischengeschaltetes Stop-Codon generiert werden (Bahler et al., 1998).

Abbildung 38 zeigt das Prinzip dieser Leserahmenfusion. Die korrekte Fusion der Insertionskassetten an das 3'-Ende des *spc7<sup>+</sup>* ORFs wurde mittels PCR-Analyse verifiziert. Eine Fusion mit den Kassettensequenzen hatte keinen sichtbaren Einfluß auf das Wachstum der Zellen in seriellen Tropftestuntersuchungen oder auf den Verlust eines eingekreuzten Minichromosoms. Die Fusionsstämme verhielten sich wie der entsprechende Ausgangsstamm der Transformation (Daten nicht aufgeführt).

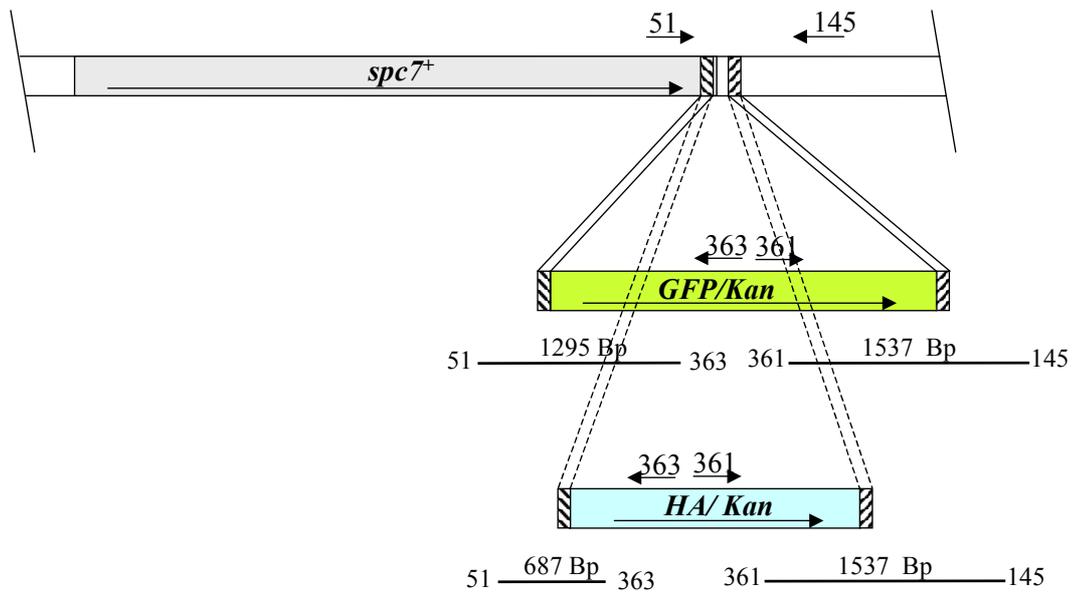


Abbildung 38: C-terminale Fusion des *spc7<sup>+</sup>* ORFs an eine GFP- bzw. HA-Sequenz

Die Abbildung verdeutlicht schematisch das Prinzip der Integration einer *GFP-Kan*- bzw. *HA-Kan*-Transformationskassette durch homologe Rekombination direkt hinter den *spc7<sup>+</sup>* ORF. Die Pfeilrichtung in den Rechtecken gibt die Orientierung des Leserahmens an. Durch die schraffierten Rechtecke sind homologe Sequenzbereiche zum *spc7<sup>+</sup>* ORF dargestellt. Außerdem sind zur Überprüfung der korrekten Integration die Bindestellen der Oligonukleotide und die Größen der erwarteten PCR-Produkte aufgeführt.

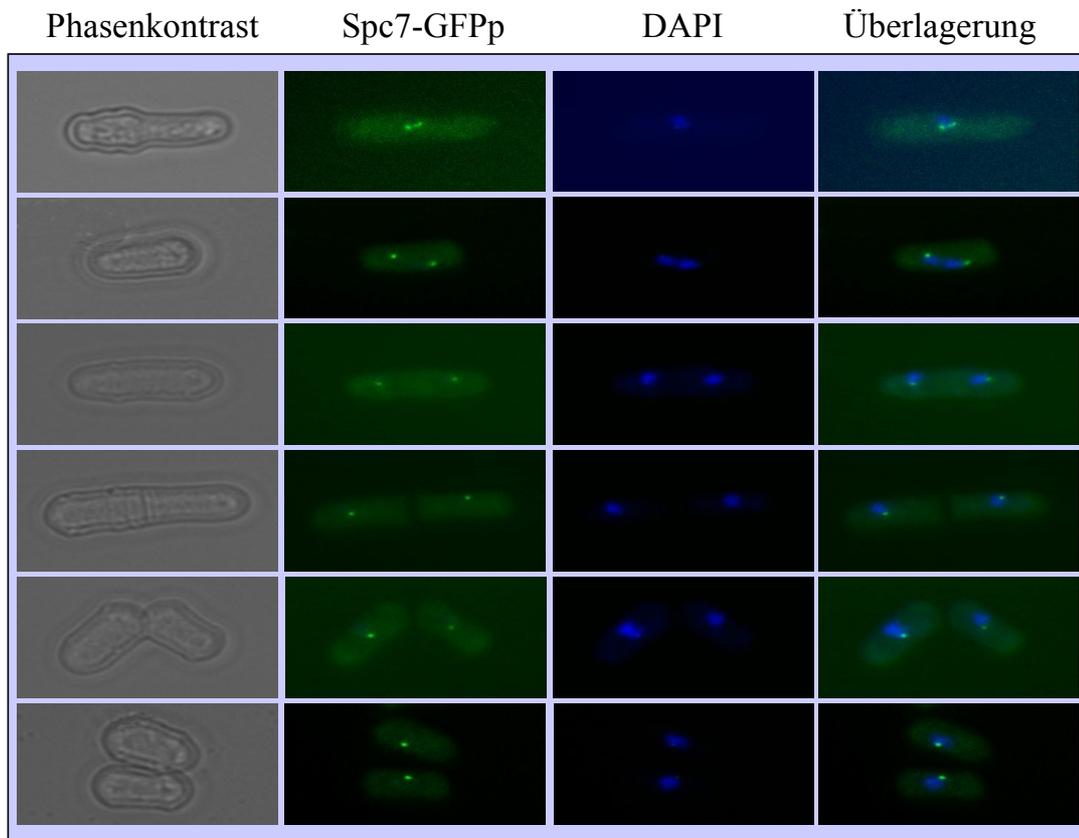
### **5.7.5.2 Lokalisierung von Spc7p in *S. pombe* Zellen**

In diesem Teil der Arbeit wird durch immunfluoreszenz-mikroskopische Untersuchungen die intrazelluläre Lokalisierung verschiedener Spc7p Fusionsproteine bestimmt. Kapitel 5.7.5.2.1 verdeutlicht die Lokalisierung eines GFP-Fusionsproteins im Verlauf des Zellzyklus. In Kapitel 5.7.5.2.2 sind Daten zusammengestellt, die für die Colokalisierung eines Spc7-HAp-Fusionsproteins mit dem Zentromerprotein Mal2p (Jin et al., 2002) erhalten wurden.

#### **5.7.5.2.1 Lokalisierung des Spc7-GFPp-Fusionsproteins im Verlauf des Zellzyklus**

Durch immunfluoreszenz-mikroskopische Untersuchungen einer logarithmisch wachsenden *S. pombe* Kultur wurde die intrazelluläre Lokalisierung des Spc7-GFPp-Fusionsproteins in verschiedenen Phasen des Zellzyklus bestimmt (siehe Kapitel 4.16 und Abbildung 39). In der Interphase ist ein punktförmiges GFP-Signal an der Peripherie des Kerns erkennbar. In Zellen, die sich in der Mitose befinden, lassen sich zwei punktförmige Signale erkennen. Auch diese Signale sind eng mit dem angefärbten Chromatin assoziiert. Für Komponenten des Spindelpolkörpers und des Zentromers wurde dieses Lokalisierungsmuster beschrieben (Ekwall et al., 1995; Hagan et al., 1995). Dies beruht darauf, daß in Hefezellen die Spindelpolkörper und Zentromere fast während des gesamten Zellzyklus eng beieinander liegen (Funabiki et al., 1993). Eine Übersicht hierzu ist in den schematischen Zeichnungen der Abbildung 39 und Abbildung 40 dargestellt. Nur während der Metaphase, in der sich die Chromosomen in der Spindelmitte anordnen, lassen sich die Signale voneinander unterscheiden. In Zellen, die in der Metaphase arretiert wurden, sind sechs punktförmige Signale erkennbar (siehe Abbildung 40). Zum Teil sind diese Signale sehr dicht zusammen. Alle Signale sind auch hier in unmittelbarer Nähe zu den Signalen der angefärbten Chromatinstrukturen. Diese Signale sind vermutlich Teile der sechs Schwesterzentromere der Spalthechromosomen. Für das Spc7p Protein wird daher eine Zentromerlokalisierung vermutet.

A



B

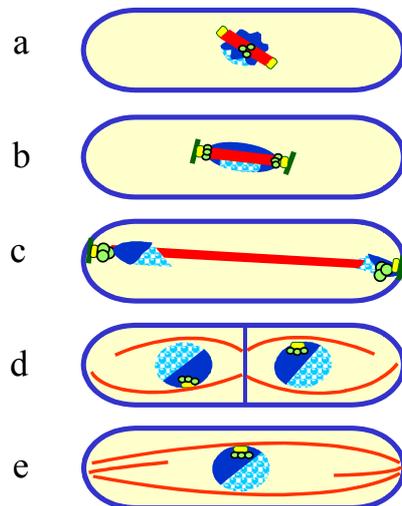


Abbildung 39: Lokalisierung des C-terminalen Spc7-GFPp-Fusionsproteins innerhalb der Zelle

Teil A: Gezeigt ist die Lokalisierung des Spc7-GFPp-Fusionsproteins in mitotischen (a-c) und postmitotischen (d-f) *S. pombe* Zellen. Die erste Spalte zeigt eine Phasenkontrastaufnahme der Zellen. In der zweiten Spalte ist das Signal für das Fusionsprotein erkennbar und in der dritten Spalte wurde das Chromatin durch DAPI-Färbung sichtbar gemacht. In der letzten Spalte sind die Überlagerungsbilder der Einzelbilder einer Reihe aufgeführt.

Teil B: Die Abbildungen stellen die entsprechenden mitotischen (a-c) und postmitotischen (d-e) Zellzyklusphasen schematisch dar. Farbgebung: blau = Chromatin, rot = Tubulin, grün = GFP-Signal des Fusionsproteins, gelb = Spindelpolkörper

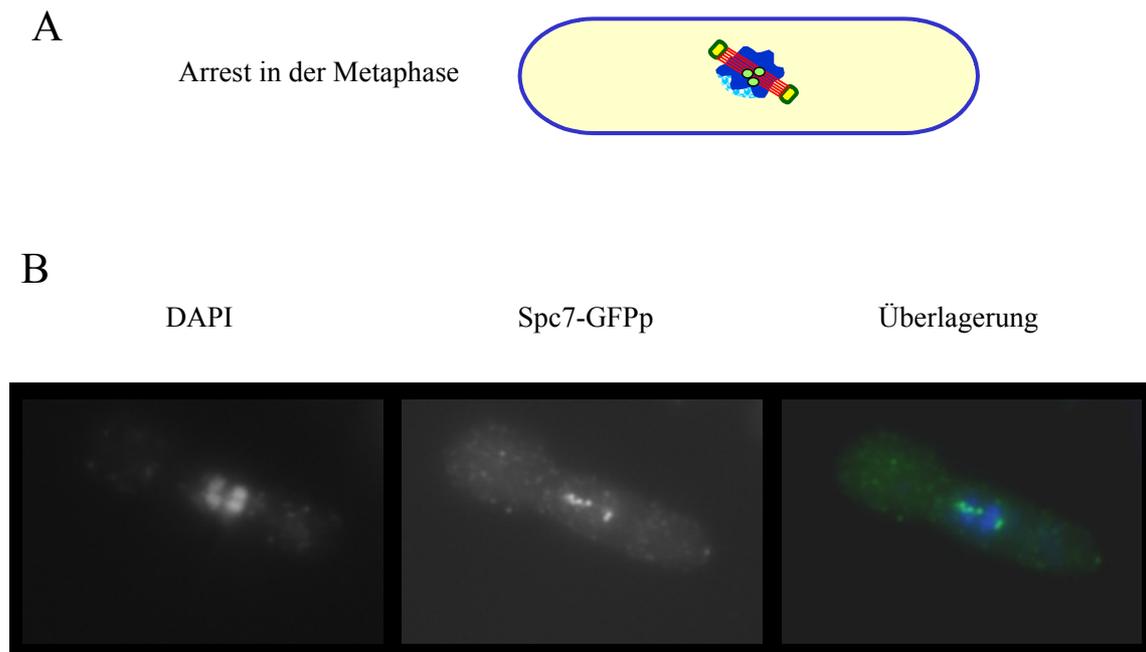


Abbildung 40: Lokalisierung des C-terminalen Spc7-GFPp-Fusionsproteins in Metaphasenzellen

Teil A zeigt die schematische Zeichnung einer *S. pombe* Zelle in der Metaphase. Nähere Details können den Erläuterungen zu Abbildung 39 entnommen werden. Teil B zeigt die Aufnahmen einer Zelle in dieser Phase des Zellzyklus. Das erste Bild zeigt das Chromatin, welches durch DAPI-Färbung sichtbar gemacht wurde, Bild zwei das Signal für das Fusionsprotein und Bild drei die Überlagerungsbilder der Einzelbilder. Farbgebung im Überlagerungsbild: blau = Chromatin, grün = Spc7-GFPp-Signal

#### 5.7.5.2.2 Colokalisierung von Spc7p und dem Zentromerprotein Mal2p

Um zu verifizieren, daß es sich bei Spc7p um ein Zentromerprotein handelt, wurden Colokalisierungsexperimente mit einem bekannten Zentromerprotein durchgeführt. Dafür wurde ein Stamm, der die Fusionsproteine Spc7-HAp und Mal2-GFPp gleichzeitig synthetisiert, generiert und immunfluoreszenz-mikroskopisch untersucht (siehe Kapitel 4.16). Das Zentromer der Spaltheefe ist vielschichtig aufgebaut. Die spezifische Assoziation von Proteinen mit unterschiedlichen Teilregionen des Zentromers konnte bereits gezeigt werden (Übersichtsartikel Bjierling et al., 2002; Kniola et al., 2001). Das Lokalisierungsmuster des inneren Zentromerproteins Mal2-GFPp (Jin et al., 2002) wurde mit den Signalen eines Spc7-HAp-Proteins überlagert. In der Metaphase arretierte Zellen weisen für beide Proteine sechs punktförmige Signale auf, die eng mit den Chromatinstrukturen der Zellen assoziiert sind (siehe Abbildung 41). Das Überlagerungsbild der Zelle zeigt ein übereinstimmendes Lokalisierungsmuster der beiden Fusionsproteine.

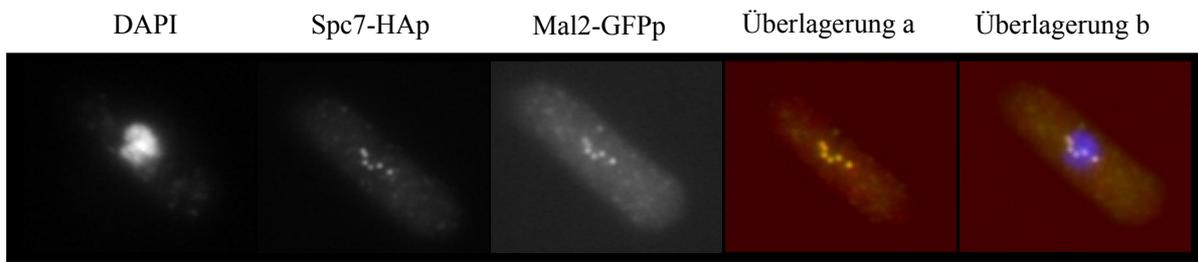
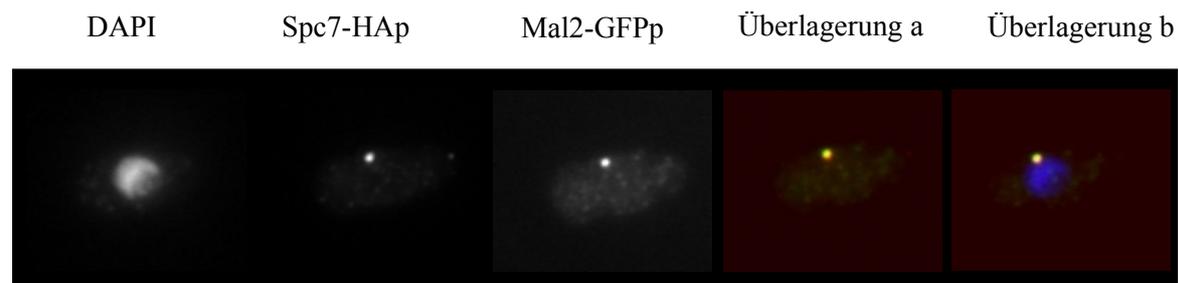


Abbildung 41: Colokalisierung von Spc7-HAp und Mal2-GFPp

Die Abbildung zeigt die Einzelbilder und zwei Kompositionsbilder einer in der Metaphase des Zellzyklus arretierten *S. pombe* Zelle. Das erste Bild zeigt die Chromatinstrukturen der Zelle. Im zweiten Bild sind die Signale für das Spc7-HAp-Fusionsprotein dargestellt, Bild drei zeigt diese für ein Mal2-GFPp-Fusionsprotein. In der Überlagerung a werden die Signale der Fusionsproteine dargestellt. Überlagerung b zeigt zusätzlich eine Überlagerung dieser Signale mit den Signalen für das Chromatin. Farbgebung: blau = Chromatin, grün = Mal2-GFPp-Signal, rot = Spc7-HAp-Signal, gelb = Überschneidung der Signale der Fusionsproteine

Die Überlagerung der Proteinsignale in Interphasenzellen mit einem bzw. zwei Einzelsignalen wurde statistisch ausgewertet und die relative Lage der Signale zum Chromatin wurde bestimmt (siehe Abbildung 42). Obwohl die Signale für beide Proteine immer in unmittelbarer Nähe zu den Chromatinstrukturen lagen, war in 78 % aller Fälle das erhaltene Mal2-GFPp-Signal noch etwas näher zu den Chromatinstrukturen orientiert als das Spc7-HAp-Signal. Der Teil der Zellen, die nicht septiert waren und nur ein Signal zeigten, überwog bei diesen ausgezählten Zellen. Nur in 12 % der Fälle lag das Spc7-HAp-Signal näher zum Chromatin orientiert. Bei 11 % der Zellen lagen beide Signale parallel, so daß keine Distanzordnung möglich war. Diese deutlich festgestellte Colokalisierung von Spc7p mit dem Zentromerprotein Mal2p bestätigt die vermutete Zentromerlokalisierung.



ohne Septum			mit Septum		
					nicht auswertbare Signale
Mal2p innen	Spc7p innen	Signale parallel	Mal2p innen	Spc7p innen	
54 71,05 %	8 10,52 %	8 10,52 %	5 6,58 %	1 1,32 %	182 Zellen

- Spc7-HAp
- Colokalisierung
- Mal2-GFPp
- Chromatin

#### Abbildung 42: Auszählung der Colokalisierung von Spc7-HAp und Mal2-GFPp

Die Abbildung zeigt die Einzelbilder und ein Kompositionsbild einer *S. pombe* Zelle in der Interphase. Das erste Bild zeigt die angefärbten DNA-Strukturen der Zelle. Im zweiten Bild sind die Signale des Spc7-HAp-Fusionsproteins dargestellt, Bild drei zeigt die Signale für das Mal2-GFPp-Fusionsprotein. Das Überlagerungsbild a zeigt die Signale der Fusionsproteine, Überlagerung b nimmt zusätzlich die Signale für die DNA-Strukturen mit in das Kompositionsbild auf. Die Tabelle faßt die verschiedenen Lokalisierungsmöglichkeiten der Fusionsproteine im Verhältnis zum Chromatin zusammen und verdeutlicht diese noch einmal schematisch. Die Bezeichnung „innen“ steht für die scheinbar nähere Lokalisierung der beiden untersuchten Fusionsproteine zu den angefärbten Chromatinstrukturen. Weitere Details zur Farbgebung sind in der Abbildung erklärt. Farbgebung: blau = Chromatin, rot = Mal2-GFPp-Signal, grün = Spc7-HAp-Signal, gelb = Überschneidung der Signale der Fusionsproteine

Daß es sich bei dem Spc7p Protein um ein neu identifiziertes Zentromerprotein handelt, konnte auch durch die Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) weiter gefestigt werden (persönliche Mitteilung von Inga Karig). Die Voraussetzungen hierfür wurden durch die vorliegende Arbeit geschaffen. Für Spc7p wurde eine Assoziation mit den cnt- und imr-Sequenzen der inneren Zentromerregionen nachgewiesen. Auch eine Assoziation des Zentromerprotein Mal2p mit diesen spezifischen Bereichen des Zentromers wurde gezeigt (Jin et al., 2002).

## 5.8 Identifizierung und Charakterisierung von Spc105 als neues *S. cerevisiae* Zentromerprotein

Ein DNA-Insert, welches im genomischen Bankscreen mit dem *mal3-1* Stamm 26-mal als Bestandteil der Suppressorplasmide erhalten wurde, ist eine Teilsequenz des *spc7<sup>+</sup>* Gens (siehe Tabelle 8). Diese Insertsequenz konnte sowohl die Hypersensitivität des *mal3-1* und des *mal3Δ* Stammes supprimieren als auch den erhöhten Minichromosomenverlust des *mal3-1* Stammes. Durch eine Datenbanksuche wurde Spc105 als sein *S. cerevisiae* Homolog identifiziert (siehe Kapitel 5.8.1).

Ich habe daher untersucht, ob auch die Funktion der beiden Proteine evolutionär konserviert ist. Um zu klären, wie austauschbar die beiden Hefeproteine sind, wurde das *S. cerevisiae* Gen *SPC105* in der Spaltheefe exprimiert und auf die Suppression der TBZ-Hypersensitivität verschiedener *mal3<sup>+</sup>* Mutantenstämme untersucht (siehe Kapitel 5.8.1.2.2). Auch die organismenspezifische Funktion des Bäckerhefeproteins Spc105 wird hier näher erarbeitet (siehe Kapitel 5.8.2 bis Kapitel 5.8.5).

### 5.8.1 *S. pombe* Spc7p und *S. cerevisiae* Spc105 sind funktionell homologe Proteine

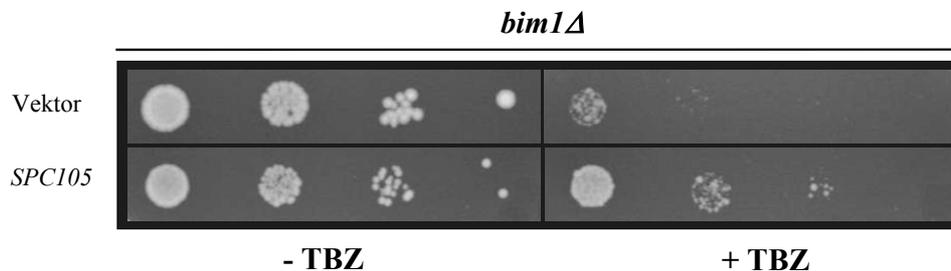
Durch serielle Tropftestuntersuchungen wurde analysiert, ob die homologen Proteine Spc7p der Spaltheefe und Spc105 der Bäckerhefe Übereinstimmungen in der Suppression ausgewählter Phänotypen zeigen. Dies könnte ein Hinweis für einen ähnlichen Funktionszusammenhang in der Zelle sein.

#### 5.8.1.1 Suppression der TBZ-Hypersensitivität des *BIMI* Deletionsstammes durch *SPC105*

Das *S. pombe spc7<sup>+</sup>* Gen kann bei Überexpression die Hypersensitivität des *mal3-1* und des *mal3Δ* Stammes gegenüber TBZ supprimieren (siehe Kapitel 5.2 und Kapitel 5.5). Interessant ist in diesem Zusammenhang, ob auch das homologe Protein der Bäckerhefe Spc105 diese Funktion übernehmen kann. Das homologe Protein der Bäckerhefe zum Mal3p Protein ist Bim1 (Schwartz et al., 1997; Beinhauer et al., 1997; Miller et al., 2000). Auch ein Deletionsstamm für dieses Gen (*bim1Δ*) zeigt Hypersensitivität gegenüber TBZ. Durch einen Methionin-reprimierbaren 2μ Plasmidpromotor wurde *SPC105* im *BIMI* Deletionsstamm überexprimiert (durchgeführt von Anne Kerres).

Abbildung 43 zeigt das Wachstum des *bim1Δ* Stammes, transformiert mit der Vektorkontrolle und einem *SPC105* exprimierenden Plasmid. Auf Platten ohne TBZ zeigt der Stamm gutes

Wachstum. Auf Platten mit TBZ zeigt die Kontrolle nur noch Restwachstum. Bei gleichen TBZ-Bedingungen kann *SPC105* als Plasmidinsertsequenz diese Hypersensitivität gegenüber TBZ partiell supprimieren. Diese Suppression spricht für eine ähnliche Funktion der evolutionär konservierten Proteine Spc7p und Spc105.



**Abbildung 43: Suppression der TBZ-Hypersensitivität des *BIM1* Deletionsstammes durch *SPC105* in seriellen Tropftests**

Der *bim1Δ* Stamm wurde mit dem 2μ Plasmidvektor bzw. 2μ/*SPC105* transformiert und auf das Wachstum von Transformanten auf Selektivmedium ohne TBZ (-TBZ) und mit 75 μg/ml TBZ (+TBZ) untersucht (durchgeführt von Anne Kerres). Die Inkubationszeit der Platten betrug 3 Tage bei 30 °C.

### 5.8.1.2 Suppression der TBZ-Hypersensitivität des *mal3-1* und *mal3Δ* Stammes durch *SPC105*

Ein weiterer Nachweis für funktionelle Homologie ist die Suppression des TBZ-hypersensitiven Phänotyps des *mal3-1* bzw. des *mal3Δ* Stammes durch das Bäckerhefe *SPC105* Gen. Hierfür wurde die DNA-Sequenz für das Spc105 Vollängenprotein der Bäckerhefe in Thiamin-reprimierbare *S. pombe* Expressionsvektoren kloniert (siehe Kapitel 5.8.1.2.1) und auf Suppression der entsprechenden Phänotypen getestet (siehe Kapitel 5.8.1.2.2).

#### 5.8.1.2.1 Klonierung von *SPC105* in *S. pombe* Expressionsvektoren

Die DNA-Sequenz, die für das Spc105 Protein der Bäckerhefe kodiert, wurde in zwei *S. pombe* Expressionsvektoren kloniert (siehe Kapitel 4.22). Abbildung 44 zeigt neben dem Längenstandard die Größen der Banden eines *Pst*I-Restriktionsverdau zur Überprüfung des korrekten Klonierungsergebnisses. Unterschiedliche Restriktionsverdau haben gezeigt, daß die Klonierungen erfolgreich durchgeführt wurden.

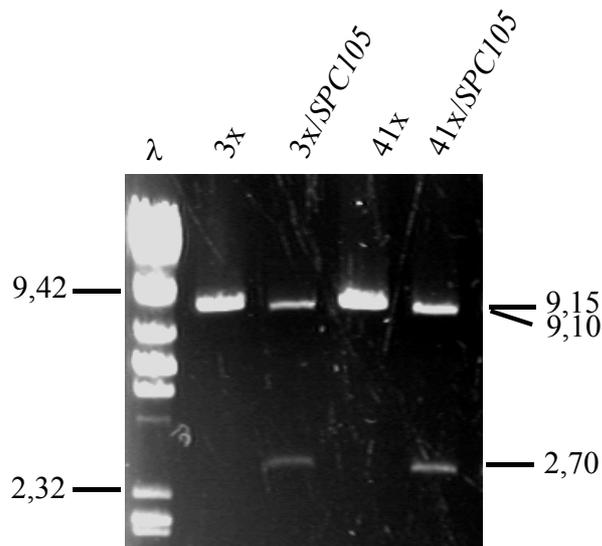


Abbildung 44: Klonierung von *SPC105* in *S. pombe* Expressionsvektoren

Das Gelfoto zeigt die Banden einer *Pst*I-Kontrollrestriktion für die Vektoren und positiver Klonierungsplasmide. Die linearisierten Vektoren laufen auf der Höhe eines 9,1 Kb großen DNA-Fragmentes. Bei positiver Klonierung wird zusätzlich zu einem etwas kleineren Vektorfragment ein 2,7 Kb großes Insertfragment erhalten. Die Größen des Längenstandards sind auf der linken Seite des Fotos angegeben, die der Probenfragmente auf der rechten Bildseite. Plasmidauftragung: pREP3x, pREP3x/*SPC105*, pREP41x, pREP41x/*SPC105*

#### 5.8.1.2.2 Suppression der Hypersensitivität des *mal3-1* und *mal3 $\Delta$* Stammes gegenüber TBZ durch Überexpression von *SPC105*

Durch serielle Tropfstuntersuchungen wurde untersucht, ob das *S. cerevisiae SPC105* auch die Hypersensitivität der *S. pombe mal3-1* und *mal3 $\Delta$*  Stämme gegenüber TBZ supprimieren kann. Hierfür wurde *SPC105* in Abhängigkeit von Thiamin-reprimierbaren Plasmidpromotoren in Transformanten des *mal3-1* Stammes bzw. des *mal3 $\Delta$*  Stammes überexprimiert und das Wachstum auf Medium mit und ohne TBZ untersucht. Auf Platten ohne TBZ zeigen alle Transformanten gutes Wachstum (siehe Abbildung 45 A). Auf Platten mit TBZ zeigt der *mal3-1* Stamm, transformiert mit dem leeren Vektor, kein Wachstum mehr. Mit *mal3<sup>+</sup>* als Plasmidinsert kann dieser Nichtwachstumsphänotyp supprimiert werden und der Stamm zeigt ein gutes Wachstum auf TBZ-haltigem Medium. Interessanterweise kann auch *SPC105* als Plasmidinsert die Hypersensitivität des *mal3-1* Stammes gegenüber TBZ partiell ausgleichen. Die erhaltene Suppression des *mal3-1* TBZ-hypersensitiven Phänotyps ist jedoch sichtbar schwächer als mit *mal3<sup>+</sup>* als Plasmidinsert oder die Suppression, die mit der *spc7<sup>+</sup>* Insertsequenz des genomischen Bankscreens erhalten wurde. Das gleiche Ergebnis wurde für die Suppression der Hypersensitivität des *mal3 $\Delta$*  Stammes gegenüber TBZ erhalten (siehe Abbildung 45 B).

Das *S. cerevisiae* Homolog Spc105 konnte sowohl die Hypersensitivität des *BIMI* Deletionsstammes gegenüber TBZ supprimieren als auch die der Spalthestämme *mal3-1* und *mal3 $\Delta$* . Die erhaltenen Suppressionen waren zwar nur partiell, d. h. sie ermöglichten kein uneingeschränktes Wachstum auf TBZ-haltigem Medium, jedoch spricht der Ausgleich für eine

funktionelle Homologie des *S. pombe* Spc7p Proteins und des Spc105 Proteins aus *S. cerevisiae*. Bei der heterologen Expression von *SPC105* in *S. pombe* kann die partielle Suppression der TBZ-Phänotypen auch zum Beispiel durch eine veränderte Proteinexpression aufgrund des organismenspezifischen Codon-Gebrauchs oder der Promotor-abhängigen Expressionsstärke des *SPC105* Gens begründet sein.

Abschließend läßt sich festhalten, daß das Spc7p Protein der Spaltheefe und das Spc105 Protein der Bäckerhefe nicht nur konservierte Proteinsequenzen aufweisen, sondern auch die Funktion der beiden Proteine evolutionär konserviert ist.

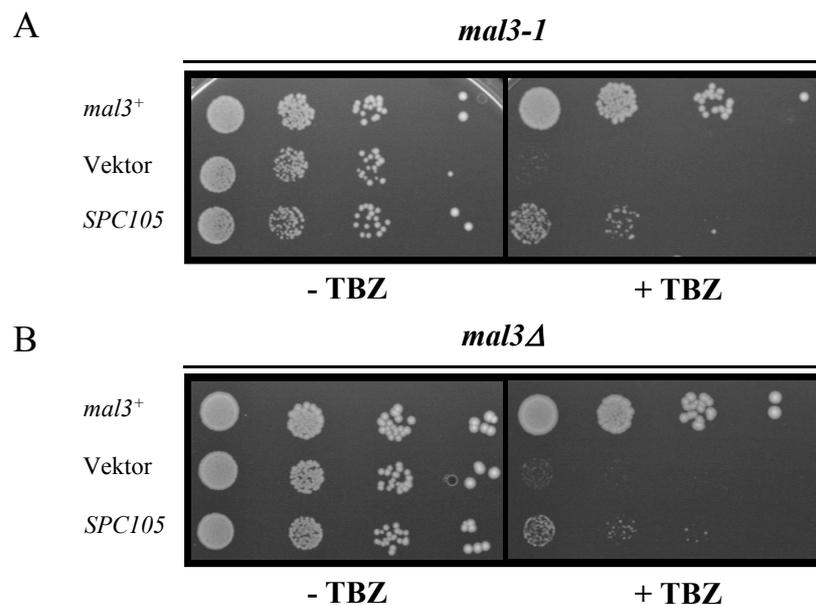


Abbildung 45: Suppression der TBZ-Hypersensitivität des *mal3-1* und des *mal3Δ* Stammes durch *SPC105* in seriellen Tropftestuntersuchungen

Die Abbildung zeigt das Wachstumsverhalten des *mal3-1* (Teil A) und des *mal3Δ* Stammes (Teil B) auf Selektivmedium ohne Thiamin und mit 5,5 µg/ml für *mal3-1* Stamm bzw. 7,5 µg/ml TBZ für *mal3Δ* Stamm (+TBZ) und ohne TBZ (-TBZ). Die Stämme wurden mit unterschiedlichen Plasmiden transformiert. Gezeigt ist jeweils das Wachstum für Transformanten mit dem pUR19/*mal3<sup>+</sup>*, pREP41x und pREP41x/*SPC105*. Die Inkubation der Platten erfolgte für 5 Tage bei 24 °C.

### 5.8.2 Identifizierung von Spc105 als neues *S. cerevisiae* Zentromerprotein

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Übereinstimmungen in der Proteinsequenz (siehe Kapitel 5.7.1), sowie eine funktionelle Homologie zwischen Spc7p und dem Bäckerhefeprotein Spc105 (siehe Kapitel 5.8.1) nachgewiesen. Das Spc7p Protein wurde als neues Zentromerprotein der Spaltheefe identifiziert (siehe Kapitel 5.7.5). Es wurde untersucht, ob Spc105 ebenfalls ein neues und noch nicht identifiziertes Zentromerprotein in der Bäckerhefe ist.

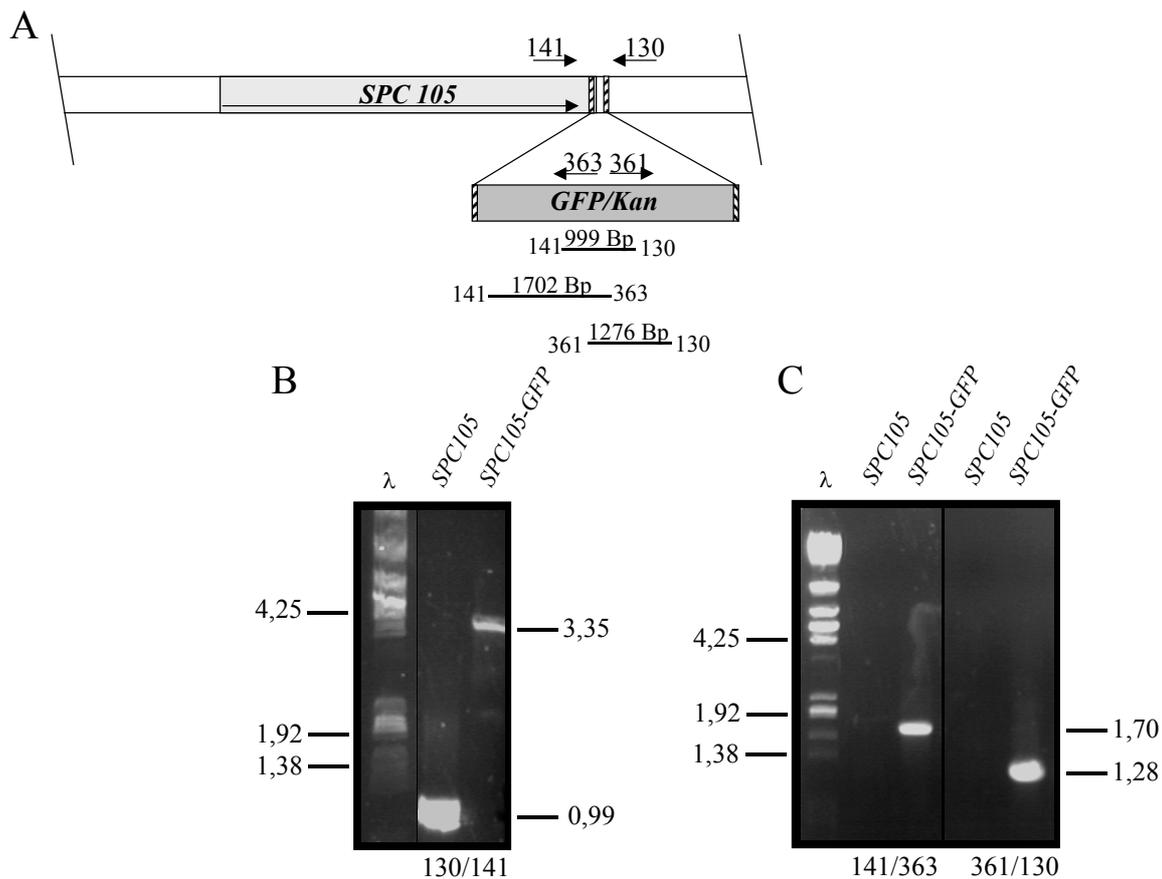
Das Spc105 Protein aus *S. cerevisiae* wurde durch Matrix-unterstützte Laserdesorption/Ionisations-Massenspektrometrie (MALDI-MS) in Spindelpolkörperanreicherungs-extrakten identifiziert (Wigge et al., 1998). Durch Immunelektronen-Mikroskopie wurde eine

Lokalisierung von Spc105 auf der dem Kern zugewandten Seite des Spindelpolkörpers ermittelt und daher das Protein als neue Komponente des Spindelpolkörpers beschrieben (Wigge et al., 1998). Da in Hefezellen die Spindelpolkörper und Zentromere der Chromosomen jedoch fast während des gesamten Zellzyklus eng beieinander liegen, ist es auch möglich, daß es sich bei Spc105 um ein Zentromerprotein handelt (Goh et al., 1993; Jin et al., 2000; Janke et al., 2001). In diesem Teil der Arbeit wurde die intrazelluläre Lokalisierung des Spc105 Proteins im Rahmen von immunfluoreszenz-mikroskopischen Untersuchungen überprüft (siehe Kapitel 5.8.2.2). Die Lokalisierung sollte Aufschluß über einen möglichen Funktionszusammenhang des Proteins geben. Für die Untersuchungen wurde die DNA-Sequenz für das Spc105 Protein genomisch mit der DNA-Sequenz des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) fusioniert (siehe Kapitel 5.8.2.1).

#### **5.8.2.1 Herstellung eines Spc105-GFP-Fusionsproteinestammes**

Zur Bestimmung der intrazellulären Lokalisierung des Spc105 Proteins in der Bäckerhefe wurde die DNA-Sequenz einer GFP-Variante, die für das grün fluoreszierende Protein (GFP; Übersichtsartikel Prasher et al., 1995) kodiert, genomisch an das 3'-Ende des *SPC105* ORFs integriert. Durch homologe Rekombination wurde so ein zusammenhängender Leserahmen ohne zwischengeschaltetes Stop-Codon gebildet (siehe Kapitel 4.21; Bahler et al., 1998).

Abbildung 46 zeigt das Prinzip dieser offenen Leserahmenfusion. Die korrekte Fusion der GFP-Transformationskassette an das 3'-Ende des *SPC105* ORFs konnte durch die PCR-Analyse nachgewiesen werden.



**Abbildung 46: C-terminale Fusion des *SPC105* ORFs an eine GFP-DNA-Sequenz**

In Teil A ist die Integration der *GFP-Kan*-Transformationskassette durch homologe Rekombination direkt hinter den *SPC105* ORF schematisch dargestellt. Die Pfeilrichtung im Rechteck gibt die Orientierung des Leserahmens an. Zusätzlich dargestellt sind die Bindestellen der Oligonukleotide und die erwarteten PCR-Produkte mit ihren entsprechenden Größen. Die Pfeilrichtung zeigt auch hier ihre Orientierung. Die Ziffern geben die Labornummern der verwendeten Oligonukleotide an. Die schraffierten Rechtecke stellen die homologen Sequenzbereiche für die Integration der Transformationskassette dar. Die Agarosegelfotos in Teil B zeigen die PCR-Banden für den Wildtyp *SPC105* und den *SPC105-GFP*-Fusionsstamm bei unterschiedlichen Oligonukleotidkombinationen. Bei der PCR-Reaktion, die den Sequenzbereich der Integration einschließt, zeigt der Wildtyp ein 999 Bp großes PCR-Produkt. Bei korrekter Integration der GFP-Transformationskassette ergibt sich ein 3,3 Kb großes DNA-Fragment. Die PCR-Reaktionen, die den Übergang zwischen *S. pombe* DNA-Sequenz und GFP-Kassettensequenz überprüfen, zeigen nur für positive Transformanten ein 1702 Bp großes DNA-Fragment für den 5'-Übergang und ein 1276 Bp großes DNA-Fragment für den 3'-Übergang.

### 5.8.2.2 Lokalisierung des Spc105-GFP-Fusionsproteins in der Zelle

Durch immunfluoreszenz-mikroskopische Untersuchungen einer logarithmisch wachsenden *S. cerevisiae* Kultur wurde die intrazelluläre Lokalisierung des Spc105-GFP-Fusionsproteins in verschiedenen Phasen des Zellzyklus bestimmt (siehe Kapitel 4.21). Abbildung 47 zeigt Beispiele der Aufnahmen für Zellen der Interphase und der frühen und späten Anaphase. In der Interphase wird ein punktförmiges GFP-Signal an der Peripherie des Kerns gefunden. Dieses überlagert sich zum Teil mit den Signalen, die bei der Anfärbung der Spindelstrukturen in diesen Zellen erhalten werden. In mitotischen Zellen werden zwei punktförmige

Signale erhalten, die sich an den den Zellpolen zugewandten Seiten des angefärbten Chromatins befinden. Diese überlagern sich zum Teil mit den Endbereichen der länger werdenden mitotischen Spindel. Dieses Muster der Lokalisierung ist aus der Literatur für Proteine des Spindelpolkörpers und des Zentromers bekannt (Goh et al., 1993; Jin et al., 2000; Janke et al., 2001). Da in Hefezellen die Spindelpolkörper und Zentromere fast während des gesamten Zellzyklus eng beieinander liegen, war es nicht möglich in den logarithmisch wachsenden Kulturen zwischen diesen Lokalisierungen zu unterscheiden.

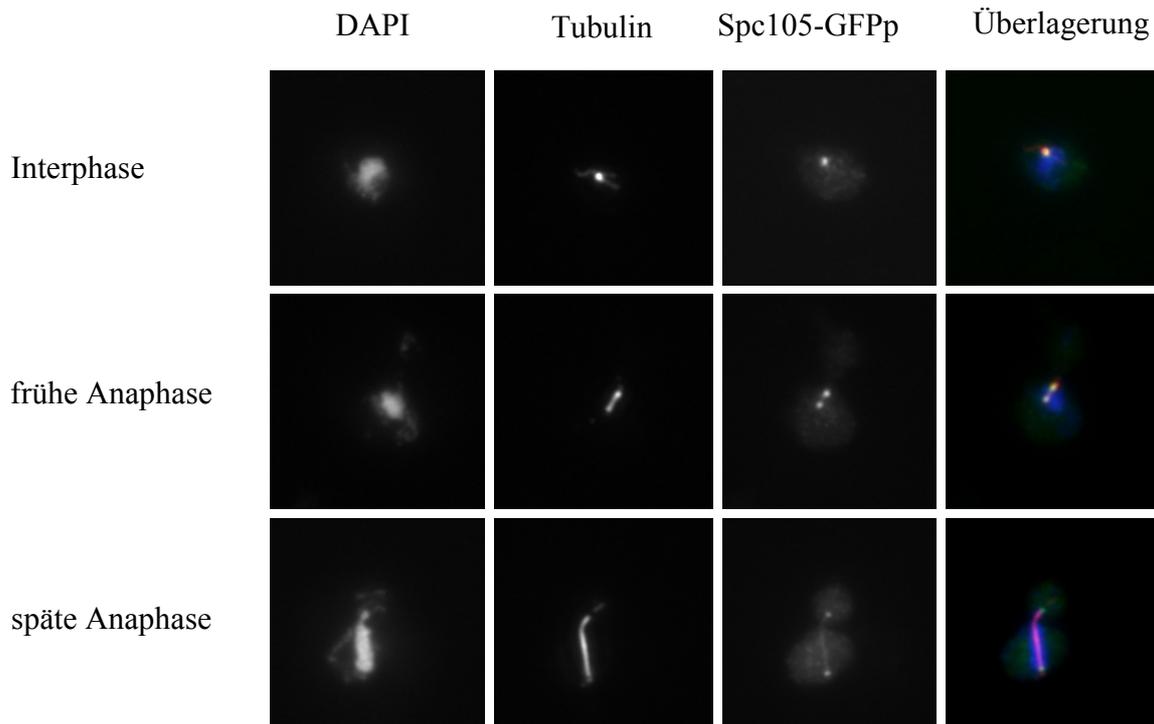


Abbildung 47: Lokalisierung des C-terminalen Spc105-GFP-Proteins in der Zelle

Gezeigt ist die Lokalisierung des Spc105 Fusionsproteins in Interphasenzellen (obere Reihe) und in mitotischen *S. cerevisiae* Zellen (übrige Reihen). In der ersten Spalte wurde das Chromatin durch DAPI-Färbung sichtbar gemacht. In der zweiten Spalte wird die Anfärbung von Tubulinstrukturen durch Immunfluoreszenz dargestellt. Die dritte Spalte zeigt die Signale für das Fusionsprotein. In der letzten Spalte sind die Überlagerungsbilder der Einzelbilder einer Reihe aufgeführt. Farbgebung im Überlagerungsbild: blau = Chromatin, rot = Tubulin, grün = GFP-Signal des Spc105-GFP Fusionsproteins

Durch die hier geleistete Vorarbeit konnte jedoch im Rahmen einer Kooperation mit dem Labor von PD Dr. Lechner (Universität Heidelberg) das Spc105-GFP-Protein in ChIP-Experimenten als Zentromerprotein identifiziert werden (Kommunikation über unveröffentlichte Daten). Somit konnte Spc105 entgegen in der Literatur vertretenen Meinung als neue Komponente des *S. cerevisiae* Zentromers identifiziert werden. Eigene Vorarbeiten haben hierfür die Voraussetzungen geschaffen.

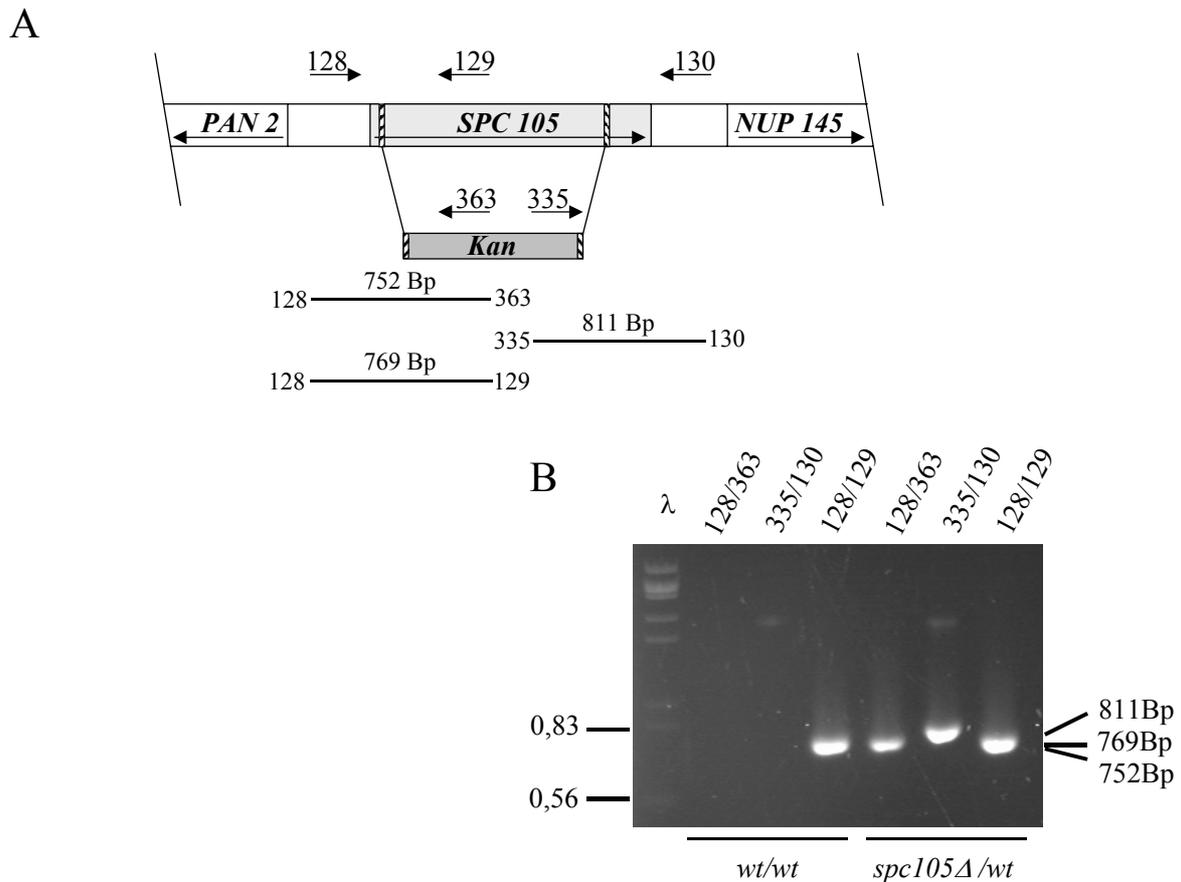
### 5.8.3 Eine partielle Deletion des *SPC105* offenen Leserahmens ist bedingt lebensfähig

In der Literatur sind widersprüchliche Angaben zu finden, ob es sich beim *SPC105* ORF um ein essentielles bzw. nichtessentielles Gen der Bäckerhefe handelt (Giaever et al., 2002; Wigge et al., 1998). Diese Angaben beruhen auf den Daten, die durch eine systematische Deletionsstudie des *S. cerevisiae* Genoms erhalten wurden (Giaever et al., 2002). Bei der hier gewählten Art der Deletion wurde nach einem festgelegten Schema in einem haploiden Stamm deletiert, ohne die spezifische flankierende Region des jeweiligen ORFs zu berücksichtigen. Ist die intergene Region sehr klein, so kann der Promotorbereich flankierender Gene zerstört werden. Zusätzliche Veränderungen können sich dadurch negativ auf das Wachstum auswirken. Vermutlich wurde bei der *SPC105* Deletion zusätzlich der Promotorbereich des 3'-flankierenden essentiellen Gens *NUP145*, welches für ein Protein des Kernporenkomplexes kodiert, auf diese Weise beschädigt. Im Rahmen einer weiteren Studie wurde für eine *SPC105* Deletion zwar ein extrem reduziertes Wachstum erhalten, jedoch wurde bei dem verwendeten Stamm eine zusätzliche Mutation im Stammhintergrund vermutet (Wigge et al., 1998).

Aufgrund dieser widersprüchlichen Daten, die für die *SPC105* Deletionen in der Literatur aufgeführt sind, sollte im Rahmen dieser Arbeit durch eine eigene Deletion des *SPC105* ORFs ermittelt werden, ob es sich wirklich um ein essentielles Gen handelt (siehe Kapitel 5.8.3). Gegebenenfalls sollte der Phänotyp des Deletionsstammes untersucht werden (siehe Kapitel 5.8.4).

#### 5.8.3.1 Deletion des *SPC105* offenen Leserahmens durch homologe Rekombination

Durch homologe Rekombination wurden 90 % des offenen Leserahmens eines der beiden *SPC105* ORFs in den diploiden *S. cerevisiae* Stämmen FY1679 bzw. CENPK2 deletiert. Die Deletion wurde in zwei verschiedenen diploiden Stämmen durchgeführt, da nicht klar war, ob es sich um ein essentielles Gen handelt und welchen Einfluß der Stammhintergrund hat, der in *S. cerevisiae* Stämmen sehr unterschiedlich sein kann. Abbildung 48 verdeutlicht schematisch das Prinzip der gewählten Deletion und zeigt die Verifikation mittels PCR-Analyse. Es konnte durch die PCR-Analyse gezeigt werden, daß einer der *SPC105* ORFs in den diploiden Stämmen durch die Integration der Transformationskassette partiell deletiert wurde (siehe Abbildung 48). Von insgesamt 17 positiv getesteten heterozygoten Deletionen wurde für jeden der zwei Stämme eine positive Transformante für die anschließende Tetradenanalyse ausgewählt (siehe Kapitel 5.8.3.2).



**Abbildung 48: Deletion des *SPC105* ORFs**

Teil A stellt schematisch die Deletion des *SPC105* ORFs durch Integration einer *Kan*-Transformationskassette durch homologe Rekombination dar. Durch die Deletion entfallen 2475 Bp der kodierenden DNA-Sequenz. Nur am 5'-Ende des ORFs bleiben 44 Bp bzw. am 3'-Ende 234 Bp erhalten. Weitere Details zum Schema sind dem Abbildungstext der Abbildung 28 zu entnehmen. Teil B zeigt die PCR-Banden für den diploiden Wildtyp und einen diploiden heterozygoten *SPC105* Deletionsstamm bei unterschiedlichen Oligonukleotidkombinationen. Der diploide Wildtyp zeigt kein PCR-Fragment für den 3'- bzw. 5'-Übergang zwischen der genomischen DNA-Sequenz und der Transformationskassette. Beim Nachweis der genomischen Wildtypsequenz wird ein 769 Bp PCR-Produkt für den Wildtyp und für die diploide heterozygote Deletion erhalten. Der Deletionsstamm zeigt zusätzlich das 752 Bp große PCR-Fragment für den 5'-Übergang zwischen genomischer DNA-Sequenz und Integrationskassette und das erwartete 811 Bp DNA-Fragment für den 3'-Übergang.

### 5.8.3.2 Die Tetradenanalyse zeigt, daß die partielle Deletion des *SPC105* offenen Leserahmens nur bedingt lebensfähig ist

Jeweils ein heterozygot diploider *SPC105* Deletionsstamm des FY1679 bzw. CENPK2 Stammes, sowie ihre isogenen Wildtypstämme wurden durch die Tetradenanalyse näher untersucht. Die vier Sporen einer Tetrade werden mit Hilfe des Mikromanipulators vereinzelt und die Segregation des Kanamycinresistenzgens, der für die Deletion des *SPC105* Gens steht, beobachtet. Für ein essentielles Gen wird erwartet, daß immer nur zwei haploide Sporen zu einer Kolonie heranwachsen. Die anderen Sporen bilden keine Kolonie aus. Keine der heranwachsenden Kolonien dürfte somit eine Resistenz gegenüber Kanamycin besitzen.

Tabelle 10 zeigt die Daten, die bei der Tetradenanalyse ermittelt wurden. Für die isogenen Wildtypstämme wird ein gutes Sporenwachstum erhalten, d. h. fast alle Sporen germinieren und es werden durch Teilung Kolonien ausgebildet. In 91 % aller Fälle bilden sich aus drei bzw. vier Sporen einer Tetrade Kolonien aus.

Dagegen zeigte der FY1679/*SPC105* Deletionsstamm im Vergleich zu den isogenen Wildtypstämmen zwei Tetraden, deren Sporen zu drei bzw. vier Kolonien heranwuchsen. Von den übrigen 45 Tetraden der heterozygoten Deletionsstämmen konnten zwei oder mehr Sporen keine lebensfähigen Kolonien ausbilden. Durch die Überprüfung der Germination der Sporen konnte ein Ausbleiben dieser als Grund für mangelndes Ausbilden von Kolonien ausgeschlossen werden. Alle untersuchten Sporen zeigten Germination und die Ausbildung von Kolonien im Bereich zwischen 50 und 100 Zellen. Diese Sporen, bei denen der *SPC105* ORF deletiert wurde, konnten jedoch nur kleine Kolonien ausbilden, die bei gleicher Wachstumszeit etwa ein Drittel der Größe der isogenen Wildtypkolonien erreichten. Die Tetrade des FY1679/*SPC105* Deletionsstammes, bei der alle vier Sporen Kolonien ausgebildet haben, wurde für die weiteren Untersuchungen (siehe Kapitel 5.8.4 bis Kapitel 5.8.5) ausgewählt.

Tabelle 10: Ergebnisse der *SPC105* Tetradenanalyse

Zusammengefaßt sind die Daten der Tetradenanalyse im Rahmen der *SPC105* Deletion. Neben der Spalte für den jeweiligen Stamm gibt die Tabelle Aufschluß über Zahl der zu Kolonien herangewachsenen Sporen der Tetraden und in wie vielen Fällen sie erhalten wurden. Zusätzlich ist die Anzahl der Stämme aufgeführt, die auf G418-haltigem Medium wachsen konnten, sowie in der letzten Spalte die Gesamtanzahl der gezogenen Tetraden.

Stamm	Anzahl der wachsenden Kolonien einer Tetrade					davon Stämme mit Kanamycinresistenz	Gesamtzahl der Tetraden
	0	1	2	3	4		
FY1679	/	/	1	2	16	/	19
CENPK2	/	/	1	4	15	/	20
FY1679/ <i>spc105</i> Δ	13	11	21	1	1	5	47
CENPK2/ <i>spc105</i> Δ	18	10	14	/	/	12	42

Die Anzahl der Sporen, die zu lebensfähigen Kolonien heranwachsen, ist somit extrem stark reduziert. Stämme, in denen das *SPC105* Gen deletiert ist, können nur kleine Kolonien ausbilden. Somit ist das *SPC105* Gen streng genommen nichtessentiell, es besitzt als Zentromerprotein jedoch eine wichtige Funktion für die Zelle. Die Definition "essentielles" Gen bzw. "nichtessentielles" Gen kommt hier jedoch an einen Grenzbereich. Beim Arbeiten mit den Deletionsstämmen fiel zusätzlich auf, daß diese bei anhaltender Inkubation nach einiger Zeit ihr Wachstumsdefizit ausgleichen konnten und deutlich besseres Wachstum zeigten. Vermutlich wurde der Effekt der Deletion durch Akkumulation weiterer Mutationen im

Stammhintergrund supprimiert. Um die Auswirkung zusätzlicher Veränderungen auszuschließen, wurden alle weiteren Untersuchungen stets mit Stämmen durchgeführt, die frisch der Stammsammlung entnommen und angezogen wurden.

#### **5.8.4 Phänotypische Charakterisierung des *SPC105* Deletionsstammes**

In diesem Teil der Arbeit wird der Phänotyp der *SPC105* Deletion näher analysiert. Die Gründe für das extrem reduzierte Wachstum dieser Zentromermutante und die Bedeutung für die DNA-Verteilung wurden erarbeitet. Hierfür wurde das Wachstum des Deletionsstammes in seriellen Tropftestuntersuchungen getestet und der Effekt auf die Zellmorphologie durch mikroskopische Untersuchungen näher bestimmt (siehe Kapitel 5.8.4.1). Probleme bei der DNA-Verteilung wurden durch Erstellung eines DNA-Profiles ermittelt (siehe Kapitel 5.8.4.2). Stellvertretend für den Wildtyp und den Deletionsstamm wurde mit den vier wachsenden Kolonien der Tetrade des FY1679/*SPC105* Deletionsstammes gearbeitet (siehe Kapitel 5.8.3.2).

##### **5.8.4.1 Die Deletion des *SPC105* Gens führt zu stark reduziertem Wachstum und zu veränderter Zellmorphologie**

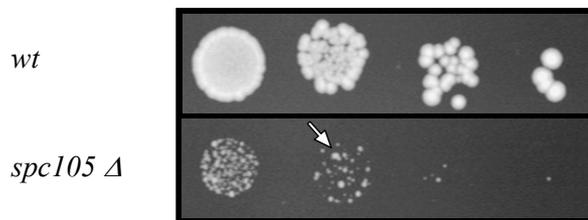
Das Wachstumsverhalten der *SPC105* Deletion im Vergleich zum Wildtyp wurde durch serielle Tropftestuntersuchungen ermittelt. In Abbildung 49 A ist das Wachstum auf Vollmedium dargestellt. Während der Wildtyp gutes Wachstum aufweist, ist dieses beim Deletionsstamm stark reduziert. Es kommt innerhalb der Tropfen zur Ausbildung von größeren Kolonien, so genannten Foci, die vermutlich für Kolonien mit zusätzlichen Hintergrundmutationen stehen.

Auch auf TBZ-haltigem Medium und bei unterschiedlichen Temperaturen wurde das Wachstum des *SPC105* Deletionsstammes ermittelt (siehe Kapitel 4.20). Aufgrund des stark reduzierten Wachstums des *SPC105* Deletionsstammes ließen sich hierdurch jedoch keine weiteren Wachstumsphänotypen ermitteln. Zusammenfassend haben jedoch die Untersuchungen gezeigt, daß durch die *SPC105* Deletion nur noch ein extrem reduziertes Wachstum möglich ist. Die Deletion wirkt sich also negativ auf die Lebensfähigkeit des Stammes aus. Dies stimmt mit den Beobachtungen überein, die im Rahmen der in der Literatur veröffentlichten Untersuchungen zum *SPC105* ORF gemacht wurden (Wigge et al., 1998).

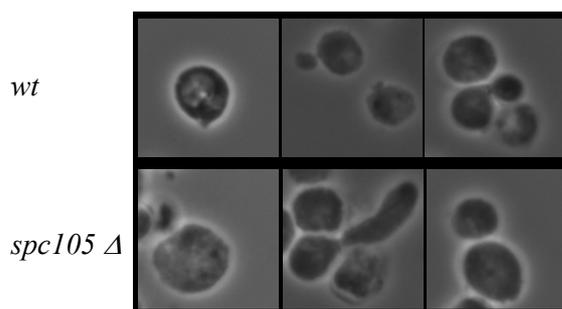
Das reduzierte Wachstum des *SPC105* Deletionsstammes sollte auch in Hinsicht auf die Morphologie der Zellen mikroskopisch untersucht werden. Dafür mußte der Deletionsstamm für einige Generationen in Flüssigmedium angezogen werden. Mit zunehmender Inkubationszeit akkumulierten in den Stämmen jedoch zusätzliche Mutationen. Dadurch war es

schwierig, reproduzierbare Zahlen über die morphologischen Phänotypen zu erhalten. Abbildung 49 B zeigt Phasenkontrastaufnahmen von Wildtyp und *SPC105* Deletionszellen, Tabelle 11 faßt die Daten vergleichend zusammen. Der Wildtyp zeigt Zellen in verschiedenen Phasen des Zellzyklus. 88 % der Zellen zeigten eine Knospe unterschiedlicher Größe und 12 % der Zellen waren ohne Knospe. Auch für die Deletionszellen werden diese Morphologien erhalten. Während 20 % der Zellen ohne Knospe waren, wurde bei 49 % der Zellen eine Knospe mit variierender Größe beobachtet. Die Größe der Zellen war vergleichbar mit der Größe bei den Wildtypzellen. Zusätzlich kamen aber auch abweichende Zellmorphologien vor. Bei 29 % der Zellen war die Knospen- bzw. Mutterzelle größer als der Wildtyp. Zusätzlich wurde bei 4 % der Zellen die Ausbildung von schlauchförmigen Knospen beobachtet.

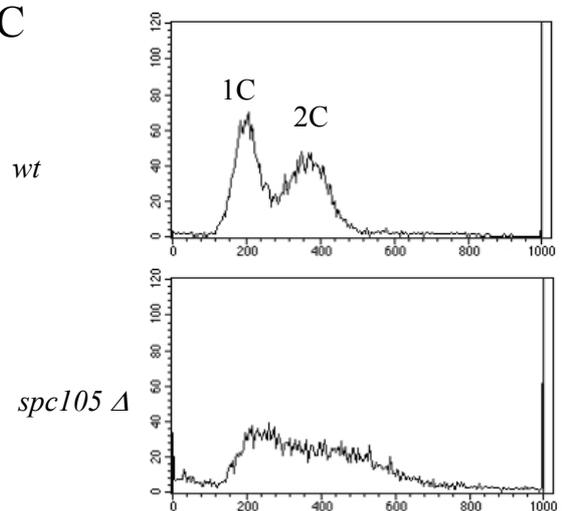
A



B



C



#### Abbildung 49: Phänotypen des *SPC105* Deletionsstammes

Teil A zeigt das Wachstum der *SPC105* Deletion und seines isogenen Wildtypstammes auf Vollmedium. Der Pfeil kennzeichnet das Auftreten von Foci innerhalb des Tropfens. In den verschiedenen Verdünnungsstufen wurden jeweils  $10^4$ - $10^1$  Zellen pro Tropfen aufgetragen.

Teil B zeigt Phasenkontrastaufnahmen beider Stämme. Teil C zeigt die DNA-Profile, die bei der Durchflußcytometrie-Analyse erhalten wurden. Die x-Achse steht für die Fluoreszenz des DNA-Gehaltes der Zellen, die y-Achse für die erhaltene Häufigkeit (Zellzahl).

Tabelle 11: Morphologische Abweichungen des *SPC105* Deletionsstammes

Gegenübergestellt sind die Daten der morphologischen Auszählung eines Wildtyp-bzw. *SPC105* Deletionsstammes. Die Tabelle zeigt die Prozentzahlen von Zellen ohne Knospe, Knospen und Mutterzellen mit Wildtypgröße, sowie Zellen mit abweichender Größe oder Knospenform. Die Auszählung umfaßt 574 Zellen für den Wildtypstamm bzw. 583 Zellen für den *SPC105* Deletionsstamm.

	ohne Knospe	Knospe und Mutterzelle mit Wildtypgröße	Knospe bzw. Mutterzelle vergrößert	Knospe schlauchförmig
<b>Wildtyp</b>	12,37	87,63	/	/
<i>spc105Δ</i>	19,55	48,54	28,82	3,09

#### 5.8.4.2 Die Deletion des *SPC105* Gens führt zu Fehlern bei der DNA-Verteilung

Mit Hilfe der Durchflußcytometrie-Analyse wurde für den Wildtyp und den *SPC105* Deletionsstamm ein DNA-Profil erstellt. Dieses Profil zeigt, wie groß der Anteil der Zellpopulation ist, die sich in der G1-Phase (1C DNA-Gehalt), der S-Phase (zwischen 1C und 2C DNA-Gehalt) oder in der G2 und M-Phase (2C DNA-Gehalt) befinden (siehe Kapitel 4.27). Abbildung 49 C stellt die erhaltenen DNA-Profile vergleichend gegenüber. Die Wildtypkultur zeigt die erwarteten Kurven für den 1C (einfacher DNA-Gehalt) und 2C DNA-Gehalt (nach Verdopplung der DNA). Beide Kurven sind deutlich voneinander abgegrenzt durch Zellen, die sich in der S-Phase befinden. Ein Großteil der Kultur, wie bei der vegetativ wachsenden *S. cerevisiae* Population üblich, besitzt einen 1C DNA-Gehalt.

Für den *SPC105* Deletionsstamm ergibt sich ein verändertes DNA-Profil, was auf Fehler bei der DNA-Verteilung hinweist. Das Profil ermöglicht keine deutliche Abgrenzung zwischen den Kurven der Populationen mit 1C bzw. 2C DNA-Gehalt. Außerdem wurden DNA-Gehalte ermittelt, die niedriger als der 1C bzw. höher als der 2C-Gehalt sind, wodurch das Kurvenprofil verbreitert wird.

Die wichtige Bedeutung des Spc105 Proteins für die Chromosomensegregation konnte zusätzlich durch mikroskopische Betrachtung der chromosomalen DNA und der Mikrotubulistrukturen bestätigt werden. Im Vergleich zum Wildtyp wurden beim Deletionsstamm abnormale DNA-Auftrennung, wie zum Beispiel Mitose in der Mutterzelle ohne Knospenbildung oder ungleiche DNA-Verteilung, festgestellt. Auch fehlerhafte Positionierungen und Ausrichtungen der Spindel in mitotischen Zellen wurden gefunden. Aufgrund der Akkumulation zusätzlicher Hintergrundmutationen bei zunehmender Inkubationszeit konnten keine reproduzierbaren Zahlen für diese Phänotypen bestimmt werden.

Es konnte gezeigt werden, daß die Deletion von *SPC105* zu Fehlern bei der DNA-Verteilung führt. Zusätzliche Untersuchungen zur Verteilung eines Chromosomenfragmentes (siehe

Kapitel 5.8.5) sollten weitere Erkenntnisse über die Beteiligung von Spc105 an der Chromosomensegregation der Bäckerhefe liefern.

### **5.8.5 *SPC105* hat einen Einfluß auf die korrekte Verteilung eines Chromosomenfragmentes**

Der Einfluß von *SPC105* auf die Chromosomensegregation sollte weitere Ergebnisse über die Beteiligung dieses Zentromerproteins an der korrekten DNA-Verteilung liefern. Da beim *SPC105* Deletionsstamm mit zunehmender Inkubationszeit Hintergrundmutationen akkumulieren, wurde ein Parallelansatz gewählt. Ein Stamm, der das endogene *SPC105* in Abhängigkeit eines Doxyzyklin-regulierbaren Fremdpromotors exprimiert, wurde für die Untersuchungen verwendet. Durch homologe Rekombination wurde eine *tetO*-Fremdpromotorkassette basenpaargenau in den flankierenden 5'-Bereich vor den genomischen *SPC105* Leserahmen integriert (siehe Kapitel 4.23 und Kapitel 5.8.5.1, Abbildung 50 und Abbildung 51). Durch diese Integration blieb der gesamte *SPC105* ORF intakt, jedoch wurden 50 Basenpaare des flankierenden 5'-Bereiches deletiert. Der Fremdpromotor-bewirkte Wechsel zwischen Hoch- und Niedrigexpressionsbedingungen (Gossen et al., 1992) für das *SPC105* Gen wurde durch die Zugabe von Doxyzyklin reguliert. Die verwendeten Stämme besaßen ein lineares zusätzliches Chromosomenfragment, welches einen GFP-ORF trägt und wie ein endogenes Chromosom segregiert (Hegemann et al., 1999).

Bei unterschiedlichen Fremdpromotor-abhängigen Expressionsbedingungen wurde der Einfluß von Spc105 auf die Chromosomensegregation anhand des nichtessentiellen Chromosomenfragmentes, dessen Anwesenheit durch die Durchflußcytometrie-Analyse bestimmt werden konnte, ermittelt (siehe Kapitel 5.9.5.2).

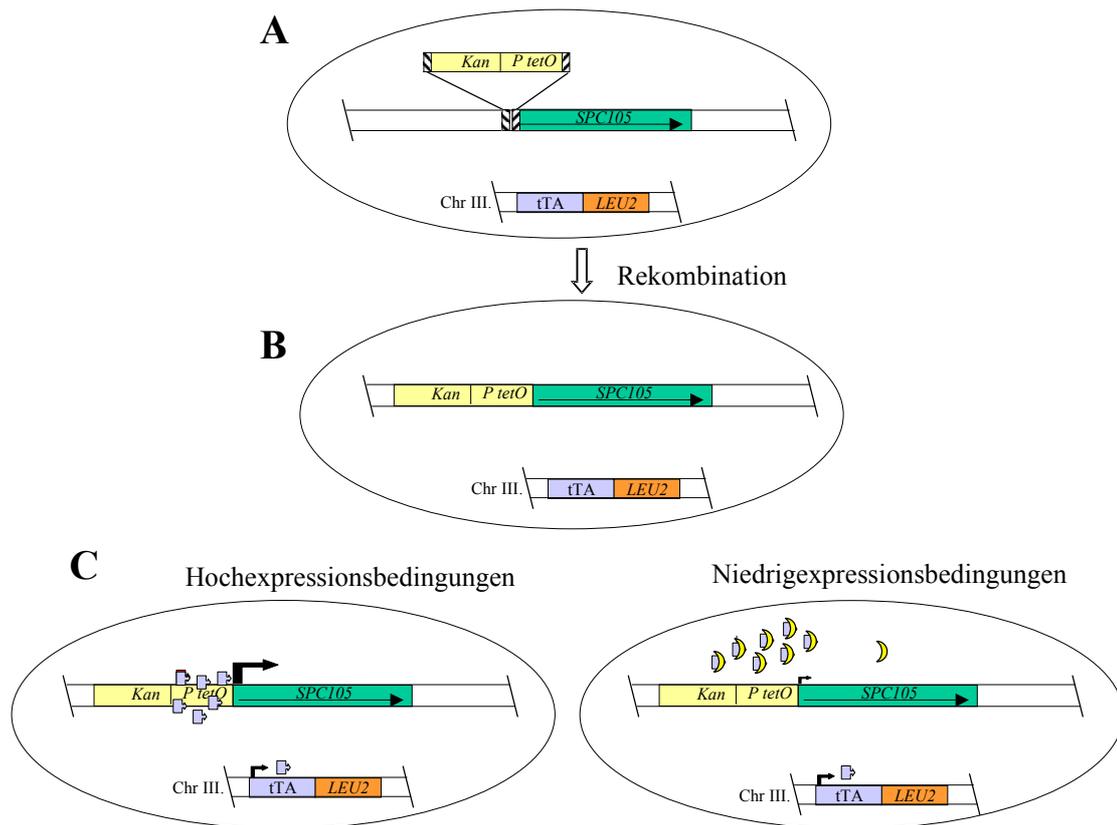


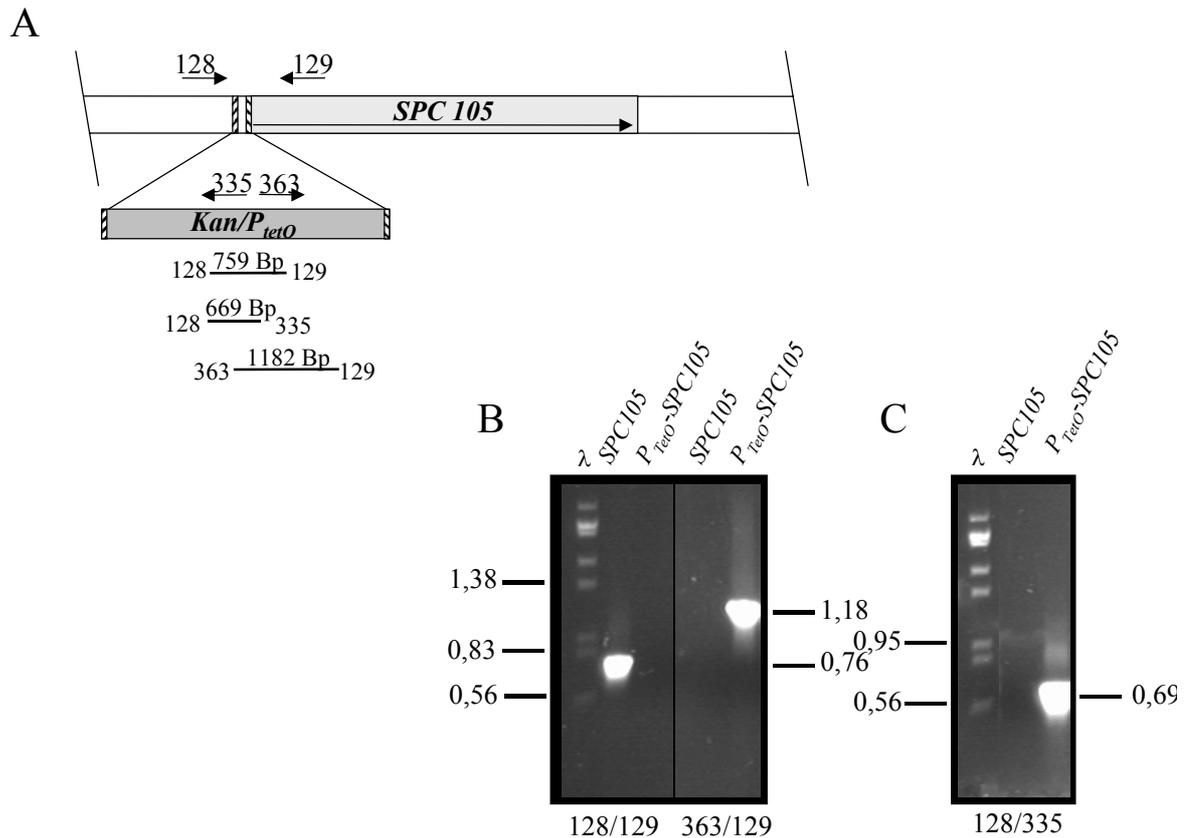
Abbildung 50: Prinzip des *tetO*-Promotorsystems

Schematisch dargestellt ist die Vorgehensweise zur Erzeugung von  $p_{tetO}$ -*SPC105* Fusionsstämmen durch homologe Rekombination. Teil A und Teil B): Darstellung der homologen Rekombination nach Transformation in einen haploiden Hefestamm (#1903), *Kan* = Kanamycinresistenzgen; *P<sub>tetO</sub>* = Tetracyclin-regulierbarer Fremdpromotor; *tTA* = Transaktivator am *LEU2* Locus von Chromosom 3; Teil C) ohne Doxzyklin ist der heterologe Fremdpromotor vermutlich dereprimiert (= bei vielen Genen entspricht dies einer hohen Expression), mit Doxzyklin werden die Transaktivatormoleküle von den Bindestellen gelöst (= entspricht bei den vielen Genen einer niedrigen Expression)

### 5.8.5.1 Integration des heterologen *tetO*-Promotors vor den *SPC105* offenen

#### Leserahmen

Durch homologe Rekombination wurden Stämme erzeugt, die *SPC105* in Abhängigkeit eines heterologen Fremdpromotors exprimieren. Die korrekte Integration der *tetO*-Fusionskassette innerhalb der endogenen Promotorregion des *SPC105* ORFs wurde durch verschiedene PCR-Reaktionen bestätigt. Abbildung 51 stellt das Prinzip der Kassettenintegration in den flankierenden 5'-Bereich des *SPC105* ORFs und die PCR-Reaktionen zur Überprüfung der Integration dar. Mehrere der generierten  $p_{tetO}$ -*SPC105* Fusionsstämmen wurden für die Durchflußcytometrie-Analyse ausgewählt.



**Abbildung 51: Herstellung von  $p_{tetO}$ -*SPC105* Fusionsstämmen**

Teil A stellt schematisch die Fusion des heterologen *tetO*-Fremdpromotors vor den *SPC105* ORF dar. Die Transformationskassette ist integriert durch homologe Rekombination basenpaargenau in den flankierenden 5'-Bereich des endogenen *SPC105* ORFs. 50 Bp vor dem ATG entfallen durch die Integration der 2,3 Kb Kassetten. Teil B und Teil C zeigen die PCR-Banden der getesteten Oligonukleotidkombinationen für den Wildtypstamm und einen  $p_{tetO}$ -*SPC105* Fusionsstamm. Bei einer PCR-Reaktion, die den Sequenzbereich der Integration einschließt, ergibt sich nur für den Wildtyp ein 759 Bp großes PCR-Produkt. Für die Überprüfung der korrekten Integration von genomischer *S. pombe* DNA-Sequenz und der Kassettensequenz zeigt nur die positive Transformante ein 669 Bp DNA-Fragment für den 5'-Übergang und ein 1182 Bp DNA-Fragment für den 3'-Übergang.

### 5.8.5.2 Die Expression von *SPC105* durch einen Fremdpromotor führt zum erhöhten Verlust eines zusätzlichen Chromosomenfragmentes

Die generierten  $p_{tetO}$ -*SPC105* Fusionsstämme (siehe Kapitel 5.8.5.1) besitzen ein zusätzliches lineares Chromosomenfragment, das einen *yEGFP*-ORF hinter einem Methionin-reprimierbaren Promotor trägt (siehe Kapitel 4.23; Jehn et al., 1991). Diese GFP-Variante zeigt eine erhöhte Fluoreszenzintensität in Hefen (Cormack, et al., 1997). Die An- und Abwesenheit des Chromosomenfragmentes in den Hefezellen ist so anhand der Grünfluoreszenz bei der Durchflußcytometrie-Analyse feststellbar (siehe Abbildung 52; Hegemann et al., 1999).

Der Verlust des Chromosomenfragmentes wurde mit und ohne Zugabe von Doxyzyklin in den  $p_{tetO}\text{-}SPC105$  Fusionsstämmen ermittelt. Ob eine Expression, die nicht den physiologischen Bedingungen entspricht, Einfluß auf die Funktion von *SPC105* hat, konnte so geklärt werden. Das verwendete bakterielle *tetO* Promotorsystem wird durch die Zugabe von Tetrazyklin bzw. seines synthetischen Derivates Doxyzyklin (Dox) reguliert (Gossen et al., 1992; siehe Abbildung 50). Ohne Doxyzyklin liegt der *tetO*-Promotor dereprimiert vor. Die Zugabe von Doxyzyklin löst die Transaktivatormoleküle von ihren Bindestellen und der Promotor ist reprimiert.

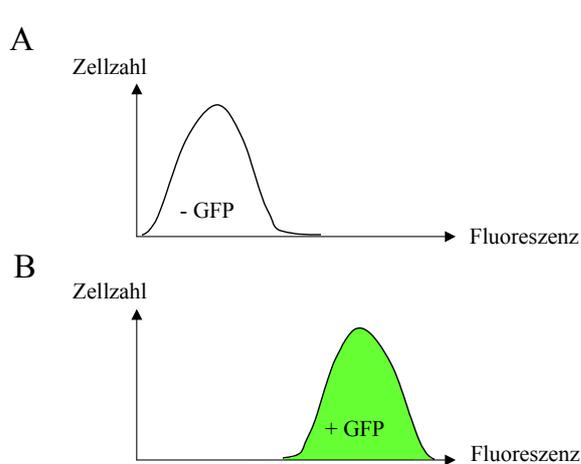


Abbildung 52: Prinzip der Chromosomenfragmentmessung

Dargestellt sind schematisch die Kurven, die bei der Durchflußzytometrie-Analyse von Hefepopulationen mit und ohne Expression der GFP-Proteinvariante erhalten werden. Die *yEGFP*-Sequenz ist Teil des zusätzlichen Chromosomenfragmentes. Die x-Achse zeigt die Fluoreszenz der Zellen, die y-Achse zeigt die erhaltene Häufigkeit (Zellzahl). Teil A zeigt die Hintergrundeigenfluoreszenz des Hefestammes ohne Chromosomenfragment, Teil B verdeutlicht die Anwesenheit des Chromosomenfragmentes in der Population durch die Zunahme der Fluoreszenz. Diese erhöhte Fluoreszenz beruht auf der Expression des *yEGFP*-Epitops in diesen Zellen.

Abbildung 53 zeigt die Ergebnisse, die für die Messungen von Kontrollstämmen mit endogenem *SPC105* Promotor und verschiedenen  $p_{tetO}\text{-}SPC105$  Fusionsstämmen erhalten wurden. Für die Messungen wurden die Hefekulturen bis zu 38 Generationen mit und ohne Zugabe von Doxyzyklin angezogen und zu vier Zeitpunkten die Verlustrate des Chromosomenfragmentes, bei zunehmender Zahl der Generationen, anhand der Fluoreszenzintensität bestimmt (siehe Kapitel 4.23 und Tabelle 15 im Anhang).

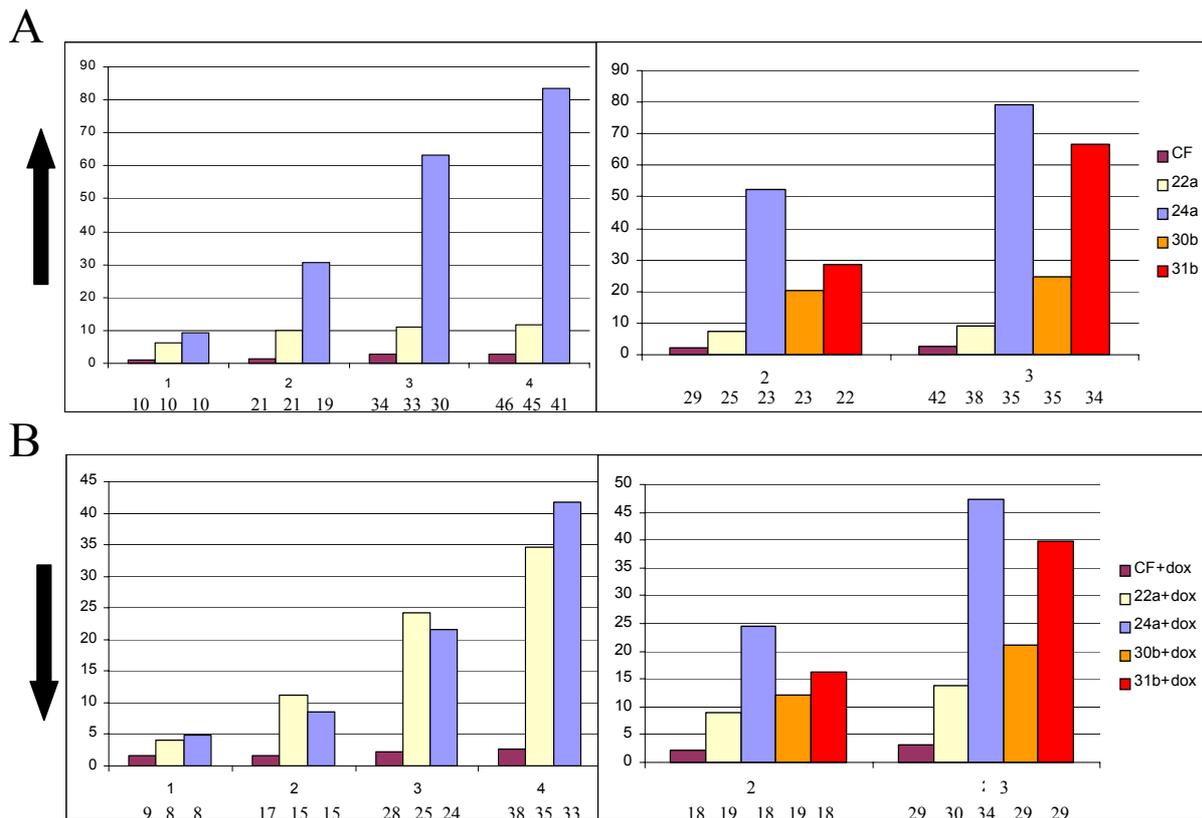
Unter Hoch- und Niedrigexpressionsbedingungen zeigen die  $p_{tetO}\text{-}SPC105$  Fusionsstämme einen erhöhten Verlust des Chromosomenfragmentes im Vergleich zum Wildtyp-Kontrollstamm. Mit zunehmender Generationszeit wird dieser Verlust stärker. Unter Hochexpressionsbedingungen zeigt der Wildtyp-Kontrollstamm auch nach 38 Generationen Verlustraten für das Chromosomenfragment unter 3 %. Das Chromosomenfragment segregiert somit sehr stabil bei der Mitose. Die Verlustraten für die  $p_{tetO}\text{-}SPC105$  Fusionsstämme sind unter diesen Bedingungen höher. Sie steigen für den Stamm 22a nach 35 Generationen bis auf einen Wert von 35 % an, der Stamm 24a erreicht nach 33 Generationen einen Wert von 42 %. Die Verlustraten des Chromosomenfragmentes unter Hochexpressions-

bedingungen sind ähnlich für die beiden Transformanten. Der höchste gemessene Wert ist deutlich niedriger als bei der Messung unter Niedrigexpressionsbedingungen.

Bei Anzucht unter Niedrigexpressionsbedingungen zeigt der Kontrollstamm auch nach 46 Generationen eine Verlustrate von weniger als 3 %. Die  $p_{tetO}$ -*SPC105* Fusionsstämme 22a und 24a zeigen bereits nach zehn Generationen eine Chromosomenverlustrate von über 6 % und übertreffen damit den höchsten gemessenen Wert des Kontrollstammes um das Doppelte. Auch bei den weiteren Messungen ist eine stetige Zunahme der Verlustrate für das Chromosomenfragment bei den Fusionsstämmen zu beobachten. Während die Rate beim Stamm 22a mit zunehmender Generationszeit nur langsam bis auf 12 % nach fast 45 Generationen ansteigt, zeigt die Rate des Stammes 24a einen drastischeren Anstieg. Der höchste gemessene Wert für den Verlust des Chromosomenfragmentes liegt nach 41 Generationen bei 84 %. Ein großer Teil dieser Population hat somit das Chromosomenfragment nicht stabil vererbt.

Der Chromosomenverlust wurde auch für weitere Fusionsstämme bestimmt. Die Diagramme auf der rechten Seite zeigen die erhaltenen Daten. Die massiven Verlustraten bei Expression von *SPC105* in Abhängigkeit des Fremdpromotors lassen sich sowohl für die bereits gemessenen Fusionsstämme 22a und 24a als auch für die neuen Stämme 30b und 31b bestätigen.

Obwohl alle Fusionsstämme aus einem Transformationsansatz isoliert wurden, gibt es dennoch Unterschiede. Die Werte der einzelnen Fusionsstämme für den Chromosomenverlust sind reproduzierbar hoch. Die Unterschiede der Chromosomenverlustraten zwischen verschiedenen Transformanten beruhen daher nicht auf der experimentellen Durchführung. Die genaue Ursache dieser Unterschiede ist ungeklärt.



**Abbildung 53: Chromosomenfragmentverlust verschiedener  $p_{tetO}$ - $SPC105$  Fusionsstämme**

Die Verlustrate eines Chromosomenfragmentes wurde durch die Durchflußcytometrie-Analyse bestimmt. Die Kulturen wurden unter Hoch- ( $\uparrow$ ) und Niedrigexpressionsbedingungen ( $\downarrow$ ) angezogen. Die erhaltenen Daten sind in diesem Diagramm als Balken umgesetzt. Die x-Achse zeigt die unterschiedlichen Meßzeitpunkte 1 bis 4 bei zunehmenden Generationszahlen an. Die Nummern unter den Meßzeitpunkten geben die Anzahl der Generationen der Kultur an. Die y-Achse gibt die Verlustrate des Chromosomenfragmentes in Prozent an. Die Fluoreszenz von 10000 Zellen wurde gemessen. Jeweils das rechte Diagramm stellt die Ergebnisse für den zweiten und dritten Messzeitpunkt einer Zusatzmessung mit weiteren  $p_{tetO}$ - $SPC105$  Fusionsstämmen dar.

Das System der  $p_{tetO}$ - $SPC105$  Fusionsstämme konnte erfolgreich zur Analyse der genetischen Stabilität eingesetzt werden. Die regulierbare Expression von  $SPC105$  in Abhängigkeit von einem heterologen Fremdpromotor in den Fusionsstämmen wirkt sich unter Hoch- und Niedrigexpressionsbedingungen negativ auf die stabile Vererbung des Chromosomenfragmentes aus. Vermutlich sind auch die endogenen Chromosomen von der Fehlsegregation betroffen. Das Zentromerprotein Spc105 besitzt somit eine wichtige Funktion bei der stabilen Vererbung des Genoms. Änderungen der physiologischen  $SPC105$  Expressionsbedingungen führen zu einer stark erhöhten Chromosomenfehlsegregation.

Durch diese Arbeit konnte gezeigt werden, daß Spc7p aus *S. pombe* und Spc105 aus *S. cerevisiae* funktionell homologe Proteine sind. Die Hypersensitivität der *bim1Δ*, *mal3Δ* und *mal3-1* Hefestämme gegenüber TBZ konnte durch Expression des Bäckerhefegens  $SPC105$  ausgeglichen werden (siehe Kapitel 5.8.1.2). Entgegen der in der Literatur vertretenen Meinung wurde dieses Protein von mir als neues Zentromerprotein identifiziert (siehe Kapitel

5.8.2). Die wichtige Funktion von Spc105 für die Chromosomensegregation konnte gezeigt werden. Die partielle Deletion von Spc105 ist nur bedingt lebensfähig (siehe Kapitel 5.8.4). Die Expression von *SPC105* in Abhängigkeit von einem heterologen Fremdpromotor wirkt sich negativ auf die stabile Vererbung eines Chromosomenfragmentes aus (siehe Kapitel 5.8.5). Die wichtige Bedeutung des Zentromerproteins Spc105 der Bäckerhefe für die Chromosomensegregation wurde gezeigt.

## 5.9 Weiterführende Analysen zur Bestimmung der Funktion des *Schizosaccharomyces pombe* Proteins Mal3p

In diesem Teil der Arbeit wird die Funktion des nichtessentiellen 35 kDa großen Mal3p Proteins, einem Mitglied der evolutionär konservierten EB-1 Proteinfamilie (Beinhauer et al., 1997), durch unterschiedliche weiterführende Experimente näher untersucht und charakterisiert.

Durch eine funktionelle Analyse wurden Hinweise für die Unterteilung des Mal3p Proteins in funktionelle Domänen erhalten. Dafür wurden zwei N-terminal verkürzte Mal3p Proteine generiert und ihre Funktionalität überprüft (siehe Kapitel 5.9.1). Der Effekt dieser plasmid-kodierten Mal3p Proteinvarianten auf das Zellwachstum im Vergleich zum Wildtypprotein wurde unter verschiedenen Expressionsbedingungen analysiert. Auch die Fähigkeit der verkürzten Proteine an Mikrotubulstrukturen zu binden, wurde durch mikroskopische Untersuchungen überprüft (siehe Kapitel 5.9.1.2).

Das menschliche Homolog EB-1 wurde als Komponente des Mikrotubuli-Plusendkomplexes charakterisiert, einem Komplex, der vermutlich bei der Verknüpfung zwischen Mikrotubulstrukturen und den Kinetochoren von großer Bedeutung ist (Gard et al., 1987; Garcia et al., 2001). Neue Erkenntnisse zur mitotischen Mal3p Funktion konnten durch Untersuchungen der genetischen Interaktion von *mal3Δ* mit Mutantenallelen ausgewählter Komponenten des Zentromers, des Spindelkontrollpunktes und des Mikrotubuli-Plusendkomplexes ermittelt werden (siehe Kapitel 5.9.2).

Die Stämme *mal3-1* und *mal3Δ* weisen eine Reihe von Defekten auf, welche die Mikrotubulstrukturen der Zellen betreffen. Beide Stämme sind hypersensitiv gegenüber der Mikrotubuli-destabilisierenden Chemikalie Thiabendazol. Verglichen mit dem Wildtyp zeigt der *mal3Δ* Stamm schwach anfärbbare mitotische Spindelstrukturen, die vermutlich weniger Mikrotubuli-Bündel enthalten (Beinhauer et al., 1997). Auch der Verlust des zusätzlichen Minichromosoms ist bei diesem Stamm deutlich erhöht. Durch immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchungen konnte beim *mal3Δ* Stamm die fehlerhafte Verknüpfung des Chromatins mit der mitotischen Spindel beobachtet werden (siehe Abbildung 54). Teile des Chromatins der mitotischen *S. pombe* Zelle sind scheinbar nicht korrekt mit der mitotischen Spindel verknüpft und segregieren fehlerhaft. Dieser Fehler bei der Segregation der Chromosomen kann ein Hinweis auf Defekte bei der Kinetochor-Mikrotubuli-Verknüpfung sein (Pidoux et al., 2000b; Ekwall et al., 1994).

Der Spindelkontrollpunkt ist ein evolutionär konserviertes Kontrollsystem, welches bei Defekten im Aufbau des mitotischen Spindelapparates oder beim Ausbleiben der bipolaren Kinetochor-Mikrotubuli-Verknüpfung aktiviert wird. Die Aktivierung des Kontrollpunktes führt zu einem transienten Arrest in der Metaphase des Zellzyklus (Übersichtsartikel Amon, 1999).

Aufgrund der hier aufgeführten mitotischen Defekte des *mal3-1* und des *mal3Δ* Stammes wurde untersucht, ob der Spindelkontrollpunkt im *mal3Δ* Stamm aktiviert ist. Auch hier wurde auf genetische Interaktion von *mal3Δ* mit Mutationen in Genen verschiedener Komponenten dieses Kontrollpunktes getestet (siehe Kapitel 5.9.2.1).

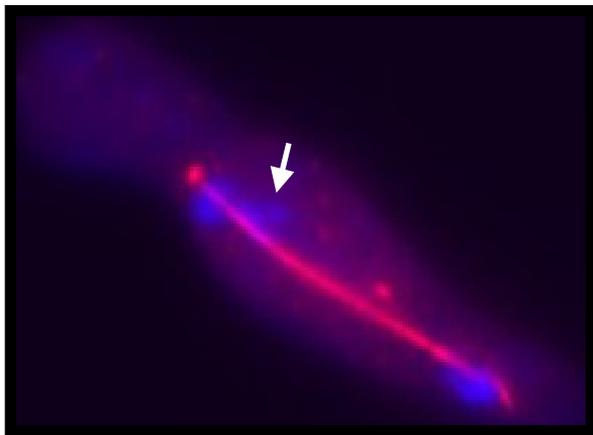


Abbildung 54: Der *mal3Δ* Stamm zeigt Fehler bei der DNA-Verteilung

Gezeigt ist die immunfluoreszenz-mikroskopische Aufnahme einer mitotischen *S. pombe* Zelle. Das Wachstum der *mal3Δ* Zellen erfolgte bei 20 °C. Die Chromatinstrukturen der Zelle sind blau gefärbt, die Tubulinstrukturen der Spindel rot. Der Pfeil kennzeichnet Chromatin, welches nicht gleichmäßig mit dem übrigen Chromatinstrukturen der Zelle aufgeteilt wird. Es besitzt scheinbar keine Verknüpfung zur mitotischen Spindel.

## 5.9.1 Generierung und Analyse zweier unterschiedlich N-terminal verkürzter Mal3p Proteine

Der N-terminale Bereich des EB-1 Proteins, der die Calponin-Homologiedomäne umfaßt, ist für die Bindung an die Mikrotubuli verantwortlich (Bu et al., 2003; Hayashi et al., 2003). Um zu überprüfen, ob dieser konservierte Bereich auch beim Spaltheferprotein Mal3p eine wichtige Bedeutung hat, wurde eine funktionelle Analyse durchgeführt. Durch die gezielte Herstellung partiell verkürzter Mal3p Proteine konnte auf die Bedeutung dieser Domänen für die Funktion des Mal3p Proteins geschlossen werden. Zwei N-terminal verkürzte Mal3p Proteine wurden erzeugt (siehe Kapitel 5.9.1.1) und die Funktion dieser verkürzten Proteinvarianten in seriellen Tropftestuntersuchungen und mikroskopischen Untersuchungen ermittelt (siehe Kapitel 5.9.1.2).

### 5.9.1.1 Generierung von N-terminal verkürzten Mal3p Proteinvarianten

Mittels PCR-Reaktion und anschließender Restriktionsanalyse wurden zwei PCR-Fragmente generiert, die für partielle Mal3p Proteine kodieren (siehe Abbildung 55). Die DNA-Fragmente kodieren für den N-terminalen Bereich eines um 7 bzw. 127 Aminosäuren

verkürzten Proteins. Die DNA-Sequenzen, die für N-terminal verkürzte Proteinvarianten von Mal3p mit und ohne C-terminaler GFP-Fusion kodieren, wurden in Abhängigkeit von Thiamin-regulierbaren Promotoren exprimiert (siehe Abbildung 56 und Abbildung 57). Abbildung 58 verdeutlicht schematisch, welcher Bereich des Proteins von der Verkürzung betroffen ist.

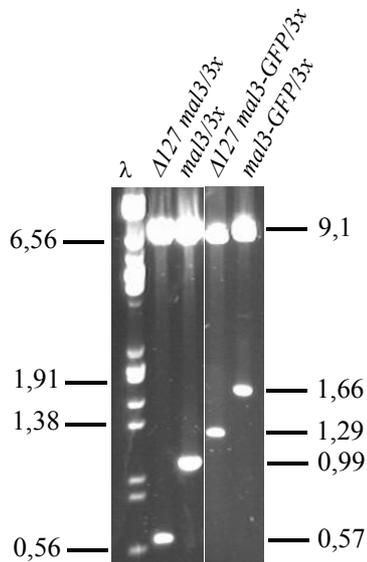


Abbildung 55 : Klonierung verkürzter *mal3*<sup>+</sup> Sequenzen in *S. pombe* Expressionsvektoren

Die Abbildung zeigt die erhaltenen DNA-Fragmente einer *BclI/XhoI* Kontrollrestriktion für die Ausgangsvektoren und für positive Klonierungsplasmide pREP3x/ $\Delta$ 127 *mal3*<sup>+</sup>. Die Plasmide kodieren für N-terminal um 127 Aminosäuren verkürzte Mal3p Proteinvarianten mit und ohne C-terminale GFP-Fusion. Probenauftragung: pREP3x/ $\Delta$ 127*mal3*<sup>+</sup>, pREP3x/*mal3*<sup>+</sup>, pREP3x/ $\Delta$ 127*mal3*<sup>+</sup>-yEGFP, pREP3x/*mal3*<sup>+</sup>-yEGFP

### 5.9.1.2 Funktionelle Analyse der verkürzten Mal3p Proteinvarianten

Durch Klonierung wurden die Leserahmen, die für verkürzte Mal3p Proteine kodieren, generiert (siehe Kapitel 5.9.1.1). Der Effekt eines um 7 bzw. 127 Aminosäuren verkürzten plasmidkodierten Mal3p Proteins auf das Wachstum eines Wildtyp- und *mal3*<sup>+</sup> Deletionsstammes (*mal3* $\Delta$ ) wurde in seriellen Tropftestuntersuchungen unter Niedrig- und Hochexpressionsbedingungen ermittelt (siehe Abbildung 56 und Abbildung 57).

Während der Vektor bei Überexpressionsbedingungen gutes Wachstum für Transformanten des Wildtyps zeigt, wirkt sich die Überexpression von *mal3*<sup>+</sup> auf diesem Medium negativ aus. Man erhält nur ein Restwachstum. Auch die Überexpression der Gensequenz, die für ein N-terminal um 127 Aminosäuren verkürztes Mal3p Protein kodiert ( $\Delta$ 127*mal3*<sup>+</sup>) führt zu einem reduzierten Wachstumsverhalten der Wildtyptransformanten, das vergleichbar mit dem für das Vollängenprotein ist.

Dagegen hat die N-terminale Verkürzung um 7 Aminosäuren ( $\Delta$ 7*mal3*<sup>+</sup>) keinen Effekt auf das Wachstumsverhalten der Wildtyptransformanten. Transformanten mit diesem Plasmid verhalten sich ähnlich wie die Vektorkontrolle.

Auch die Überexpression von *mal3*<sup>+</sup>, fusioniert mit GFP, wirkt sich negativ auf das Wachstum des Wildtypstammes aus. Im Vergleich zum Vollängenprotein ohne GFP ist unter

Hochexpressionsbedingungen kein Wachstum erkennbar. Vielleicht wird die Struktur bzw. die Funktion des Proteins negativ durch das GFP-Epitop beeinflusst. Interessanterweise zeigt das um 127 Aminosäuren verkürzte Protein, fusioniert mit GFP, unter Hochexpressionsbedingungen Wachstum. Dieses Wachstum ist verglichen zum Wachstum bei Niedrigexpressionsbedingungen jedoch reduziert. Experimentell bedingte Schwankungen der Expressionsstärke in dieser Kultur sind vermutlich hierfür verantwortlich. Vielleicht liegt das um 127 Aminosäuren verkürzte GFP-Fusionsprotein in geringerer Konzentration vor als die verkürzte Version ohne GFP-Fusion.

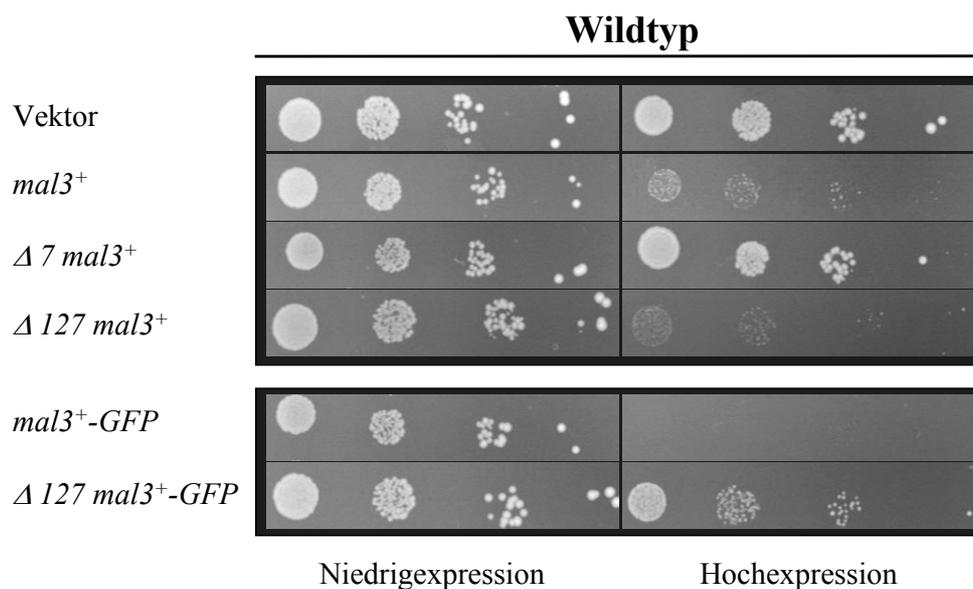
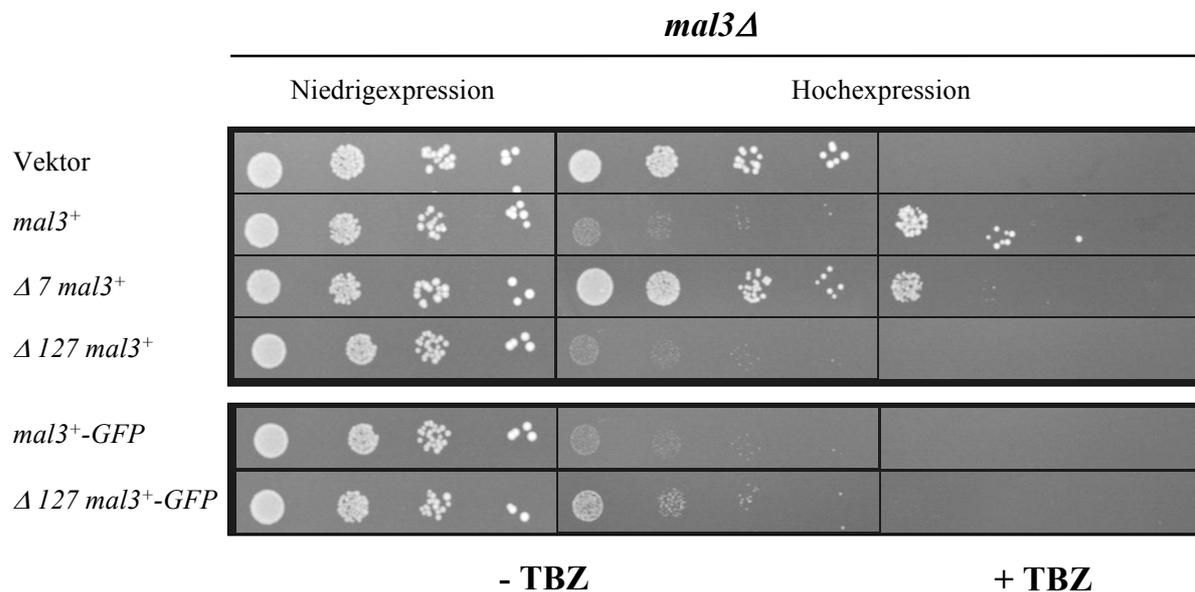


Abbildung 56: Effekt verkürzter Mal3p Proteine auf des Wachstumsverhalten eines Wildtypstammes in seriellen Tropftestuntersuchungen

Die Abbildung zeigt das Wachstumsverhalten eines *S. pombe* Wildtypstammes, der mit verschiedenen Thiamin-regulierbaren Plasmiden transformiert wurde. Das Wachstum unter Niedrigexpressionsbedingungen (+Thiamin) und Hochexpressionsbedingungen (-Thiamin) ist dargestellt. Der obere Teil der Abbildung zeigt das Wachstum für transformierte Zellen mit dem leeren Vektor pREP3x, pREP3x/*mal3*<sup>+</sup>, pREP3x/ $\Delta 7mal3$ <sup>+</sup>, pREP3x/ $\Delta 127mal3$ <sup>+</sup>. Der untere Teil der Abbildung zeigt das Wachstum für Zellen, die mit pREP3x/*mal3*<sup>+</sup>-yEGFP bzw. pREP3x/ $\Delta 127mal3$ <sup>+</sup>-yEGFP transformiert wurden. Die Inkubation der Platten erfolgte für vier Tage bei 24 °C.

Transformiert man diese Plasmide in den *mal3* $\Delta$  Stamm, so erhält man für alle Transformanten unter Niedrigexpressionsbedingungen ein gutes Wachstum (siehe Abbildung 57). Unter Hochexpressionsbedingungen zeigen nur Zellen, die mit dem Klonierungsvektor transformiert wurden bzw. das um 7 Aminosäuren verkürzte Protein exprimieren, gutes Wachstum auf Medium ohne TBZ. Transformanten, die das Mal3p Vollängenprotein oder die um 127 Aminosäuren verkürzte Proteinvariante exprimieren, zeigen unter diesen Bedingungen nur ein stark reduziertes Wachstum. Auch das Wachstum von Zellen, welche die GFP-Fusionsproteine exprimieren, ist unter Hochexpressionsbedingungen stark reduziert. Unter Hochexpressionsbedingungen auf TBZ-haltigem Medium ist nur für Transformanten,

die das Mal3p Vollängenprotein oder die um 7 Aminosäuren verkürzte Proteinvariante exprimieren, ein deutliches Wachstum erkennbar. Im Vergleich zum Wachstum unter Niedrigexpressionsbedingungen ist dieses jedoch reduziert.



**Abbildung 57: Effekt verkürzter Mal3p Proteine auf des Wachstumsverhalten des *mal3Δ* Stammes in seriellen Tropftestuntersuchungen**

Die Abbildung zeigt das Wachstumsverhalten eines *S. pombe mal3Δ* Stammes, der mit verschiedenen Thiamin-regulierbaren Plasmiden transformiert wurde. Das Wachstum ist unter Niedrigexpressionsbedingungen (+Thiamin) und Hochexpressionsbedingungen (+7,5 µg/ml TBZ) und ohne TBZ dargestellt. Die Inkubation der Platten erfolgte für vier bzw. fünf Tage bei 24 °C. Weitere Details können dem Abbildungstext der Abbildung 56 entnommen werden.

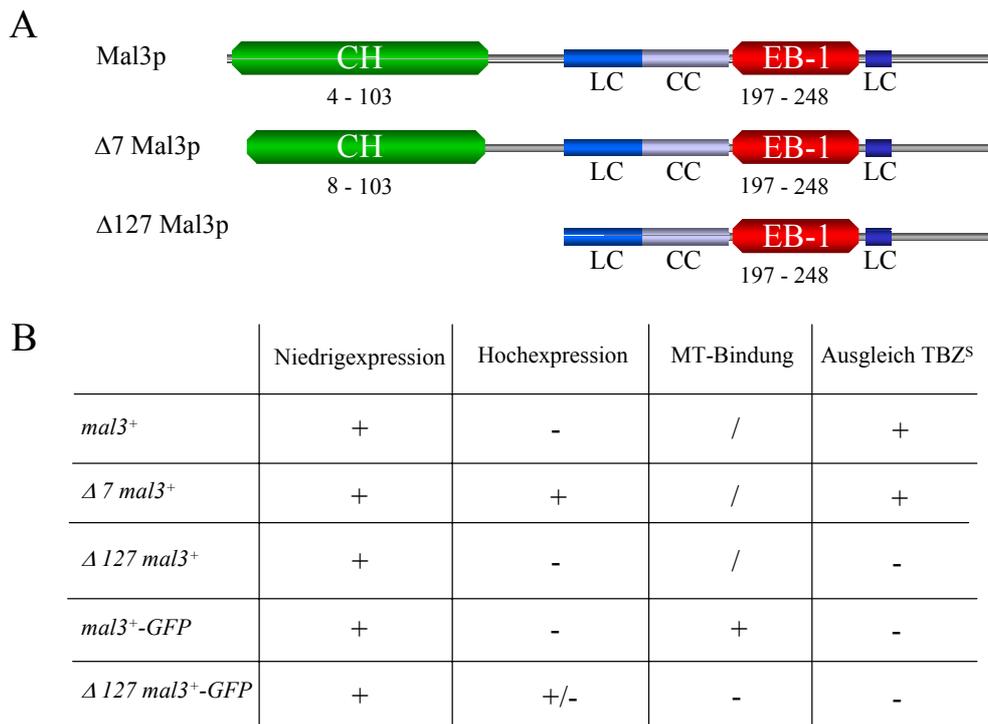
Beim menschlichen Homolog EB-1 überschneidet sich die Mikrotubuli-Binderegion mit der konservierten Calponin-Homologiedomäne. Der N-terminale Bereich dieser konservierten Domäne bzw. ein Bereich, der die ganze Calponin-Homologiedomäne einschließt, wurde bei den verkürzten Mal3p Proteinvarianten entfernt (siehe Abbildung 58 und Kapitel 4.18).

Durch fluoreszenz-mikroskopische Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß das um 127 Aminosäuren verkürzte Mal3p-yEGFP-Fusionsprotein eine veränderte Lokalisierung innerhalb der Zellen zeigt. Das Protein bindet nicht mehr entlang der zellulären Mikrotubulistrukturen, sondern wird überwiegend im Bereich des Kerns akkumuliert (Daten nicht gezeigt). Vermutlich bewirkt auch dieser Bereich des EB-1 homologen Mal3p Proteins die Interaktion mit den Mikrotubulistrukturen.

Auch im Rahmen der seriellen Tropftestuntersuchungen mit dem *mal3Δ* Stamm konnte die TBZ Hypersensitivität nicht durch die um 127 Aminosäuren verkürzten Mal3p Varianten ausgeglichen werden. Nur Transformanten mit Plasmiden, die das Vollängenprotein bzw. das um 7 Aminosäuren verkürzte Protein exprimieren, wird das Wachstum auf TBZ-haltigem

Medium ermöglicht. Das um 7 Aminosäuren verkürzte Protein kann vermutlich im Gegensatz zu dem um 127 Aminosäuren verkürzten Protein noch partiell die Funktionen des Mal3p Vollängenproteins übernehmen.

Abbildung 58 stellt die erhaltenen Daten noch einmal zusammenfassend dar. Unter Niedrigexpressionsbedingungen ermöglichen alle Proteine das Wachstum der Zellen. Die Überexpression der DNA-Sequenzen, die für das Vollängenprotein bzw. ein um 127 Aminosäuren verkürztes Mal3p Protein kodieren, wirkt sich dagegen negativ auf das Wachstum aus. Dagegen ermöglicht die um 7 Aminosäuren verkürzte Proteinvariante unter Hochexpressionsbedingungen das Zellwachstum. Vielleicht ist die Wirkweise des verkürzten Proteins durch den Wegfall der ersten 7 Aminosäuren im Vergleich zum Wildtypprotein verändert. Auf Medium mit TBZ kann unter Hochexpressionsbedingungen nur das Vollängenprotein und die um 7 Aminosäuren verkürzte Variante die TBZ-Hypersensitivität des *mal3Δ* ausgleichen. Das um 127 Aminosäuren verkürzte Protein ermöglicht diesen Ausgleich nicht. Durch mikroskopische Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß die um 127 Aminosäuren verkürzte Proteinvariante nicht mehr entlang der Mikrotubulstrukturen bindet, sondern zum größten Teil im Kern akkumuliert wird.



**Abbildung 58: Auswirkung verschiedenen Mal3p Proteinvarianten**

Teil A der Abbildung verdeutlicht schematisch, welche Proteinbereiche jeweils von der Verkürzung betroffen sind. Weitere Details können dem Text zur Abbildung 3 entnommen werden. Teil B stellt die Daten, die im Rahmen der seriellen Tropftestuntersuchungen und mikroskopischen Betrachtung gewonnen wurden, tabellarisch zusammen. Das Wachstum der verschiedenen Proteinvarianten unter Hoch- und Niedrigexpressionsbedingungen ist aufgeführt. Auch die Fähigkeit Mikrotubuli zu binden, wodurch diese als Strukturen in der Zelle sichtbar werden, wurde untersucht. Die letzte Spalte zeigt die Ergebnisse, die für den Ausgleich der TBZ-Hypersensitivität des *mal3* $\Delta$  erhalten wurden. Symbolbedeutung: „+“ = Wachstum; „-“ = reduziertes bis kein Wachstum; „+/-“ = reduziertes Wachstum; „/“ = nicht bestimmt

### 5.9.2 Untersuchung der genetischen Interaktion von *mal3*<sup>+</sup> mit Mutanten des Spindelkontrollpunktes, des Zentromers und des Mikrotubuli-Plusendkomplexes

In diesem Teil der Arbeit sind die Daten zusammengestellt, die im Rahmen von genetischen Interaktionsuntersuchungen erhalten wurden und zur weiteren Klärung der Mal3p Funktionszusammenhänge beigetragen haben.

Da der *mal3-1* Stamm und der *mal3* $\Delta$  Stamm in Tropftestuntersuchungen erhöhte Sensitivität gegenüber TBZ zeigt und durch die immunfluoreszenz-mikroskopische Untersuchung Fehler bei der mitotischen Chromatinaufteilung festgestellt wurden (siehe Kapitel 5.9.1.2), sollte überprüft werden, ob die Abwesenheit von Mal3p zur Aktivierung des Spindelkontrollpunktes führt (siehe Kapitel 5.9.2.1). Der Spindelkontrollpunkt wird bei auftretenden Defekten des Spindelapparates oder Spannungsabweichungen zwischen den Schwesterkinetochoren aktiviert und führt zu einem vorübergehenden Arrest in der Metaphase des Zellzyklus (Ikui et al., 2002; Kitazono et al., 2003).

Zusätzlich wurde geklärt, ob Mal3p als Mikrotubuli-Plusende-assoziiertes Protein mit ausgewählten Komponenten des Zentromers interagiert (siehe Kapitel 5.9.2.2). Neben den Zentromerkomponenten spielen Proteinkomplexe an den Plusenden der Mikrotubulistrukturen eine essentielle Rolle bei der Ausbildung der Kinetochor-Mikrotubuli-Verknüpfung (Gard et al., 1987; Tournebize et al., 2000; Vasquez et al., 1994). In Kapitel 5.9.2.3 wird daher auf Interaktionen mit Mutanten in ausgewählten Mikrotubuli-Plusendproteinen geprüft.

Zur Untersuchung der genetischen Interaktionen wurden durch Kreuzung und anschließende Tetradenanalyse Doppelmutanten des *mal3Δ* Stammes mit jeweils einer dieser Komponenten erzeugt. Die Doppelmutanten wurden in seriellen Tropfstuntersuchungen auf Unterschiede im Wachstumsverhalten gegenüber den Einzelmutanten untersucht (siehe Kapitel 4.19).

### 5.9.2.1 Der Spindelkontrollpunkt liegt im *mal3Δ* Stamm aktiviert vor

Um zu untersuchen, ob der Spindelkontrollpunkt in *mal3Δ* aktiviert ist, wurden Deletionsstämme der Kontrollkomponenten Mph1p und Mad2p mit dem *mal3Δ* Stamm gekreuzt. Bei diesen nichtessentiellen Proteinen handelt es sich um zwei Komponenten der Signalkaskade des Spindelkontrollpunktes in *S. pombe* (He et al., 1997; He et al., 1998). Homologe Proteine dieses evolutionär konservierten Systems wurden in verschiedenen anderen Eukaryonten, einschließlich des Menschen, identifiziert (Li et al., 1991; Basu et al., 1998; Cleveland et al., 2003). Die Aktivierung des Spindelkontrollpunktes führt zu einem vorübergehenden Arrest in der Metaphase des Zellzyklus und soll dadurch Fehlern bei der Chromosomensegregation entgegenwirken (Übersichtsartikel von Amon, 1999; Ikui et al., 2002; Kitazono et al., 2003). In Abbildung 59 wird dieser Zusammenhang schematisch dargestellt.

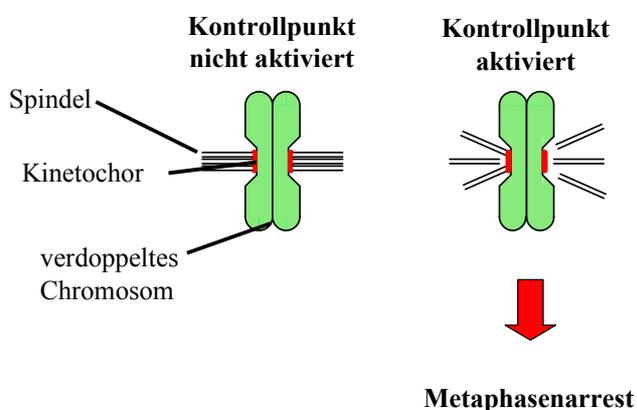


Abbildung 59: Der mitotische Spindelkontrollpunkt

Der Spindelkontrollpunkt ist dargestellt. Bei intakter Spindel und bipolarer Verknüpfung der Kinetochore liegt der Kontrollpunkt inaktiv vor. Die Zellen durchlaufen ohne Verzögerung die Mitose. Werden die Kinetochore nicht bipolar verknüpft bzw. die Spindel besitzt Defekte, liegt der Spindelkontrollpunkt aktiviert vor. Dies führt zu einem transienten Arrest in der Metaphase des Zellzyklus. Weitere Details werden in der Abbildung definiert.

Die Proteinkinase Mph1p agiert als wichtiges Schlüsselprotein oberhalb von Mad2p in dieser Signalkaskade. An fehlerhaft verknüpfte Kinetochore binden eine Reihe von mitotischen Spindelkontrollpunktproteinen (Garcia et al., 2001). Defekte führen zu einem vorübergehenden Arrest im Zellzyklus (Ikui et al., 2002).

Die Kombination der Deletionen *mal3Δ* mit *mad2Δ* zeigt keinen Einfluß auf das Wachstum der Doppelmutanten. Das Wachstum der Doppelmutanten ist vergleichbar mit dem der jeweiligen Einzelmutanten in den seriellen Tropftestuntersuchungen (siehe Abbildung 60).

Dagegen zeigt die Kombination von *mal3Δ* mit *mph1Δ* ein deutlich reduziertes Wachstum verglichen mit dem der Einzelmutanten bei den gezeigten Wachstumstemperaturen von 32 °C und 24 °C (siehe Abbildung 60).

In diesem Zusammenhang wurde auch die Chromatinverteilung in *mal3Δ* und *mph1Δ* Einzel- und Doppelmutanten untersucht und die Abweichungen durch mikroskopische Untersuchung ermittelt (siehe Tabelle 16 im Anhang). Dabei wurde bei den Doppelmutanten eine Zunahme von Zellen mit fragmentierten oder gezerrten Chromatinstrukturen nachgewiesen. Der Wert lag für die Doppelmutanten bei 19 % im Vergleich zu einem Wert von etwa 8 % bzw 9 % für die Einzelmutanten. Zusätzlich formten die Doppelmutanten durch mehrfache Verzweigungen und wahrscheinlich durch Ausbleiben von Trennung einzelner Zellen in 4 % der Fälle scheinbar mehrzellige Gebilde aus. Der Wegfall der Mph1p Funktion wirkt sich somit negativ auf die DNA-Verteilung der Doppelmutanten aus. Diese Kinase Mph1p besitzt im Vergleich zu Mad2p eine wichtige Funktion für die Aktivierung des Spindelkontrollpunktes in Zellen des *mal3Δ* Stammes. Diese Kinase wirkt oberhalb von Mad2p in einem komplexen Netzwerk verschiedener Spindelkontrollpunktproteine und übernimmt vermutlich eine übergeordnete Funktion.

Der additive Effekt der Deletionen verdeutlicht, daß der Spindelkontrollpunkt im *mal3Δ* Stamm aktiviert vorliegt. Der Wegfall dieses Kontrollpunktes und des transienten Arrestes in der Metaphase wirkt sich deutlich negativ auf das Wachstum der Doppelmutanten aus. Die Arretierung kann die Zelle nicht mehr zur Behebung der Schäden nutzen und vorliegende Defekte wirken sich bei der Verteilung der Chromosomen aus.

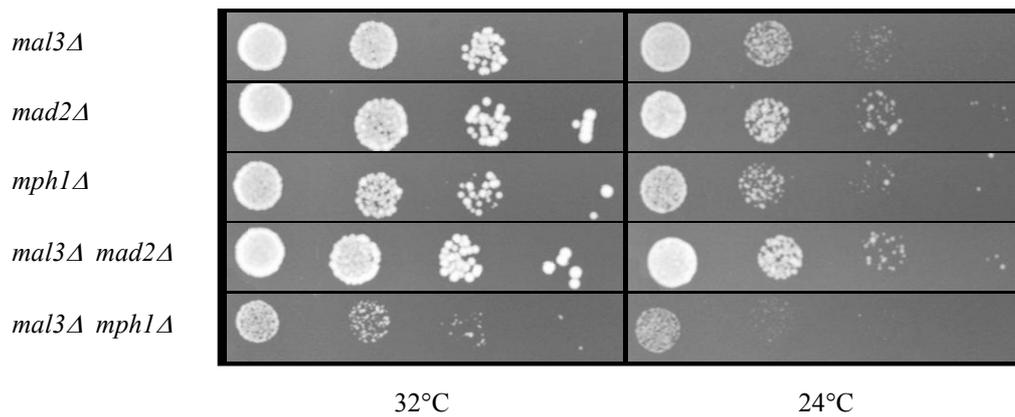


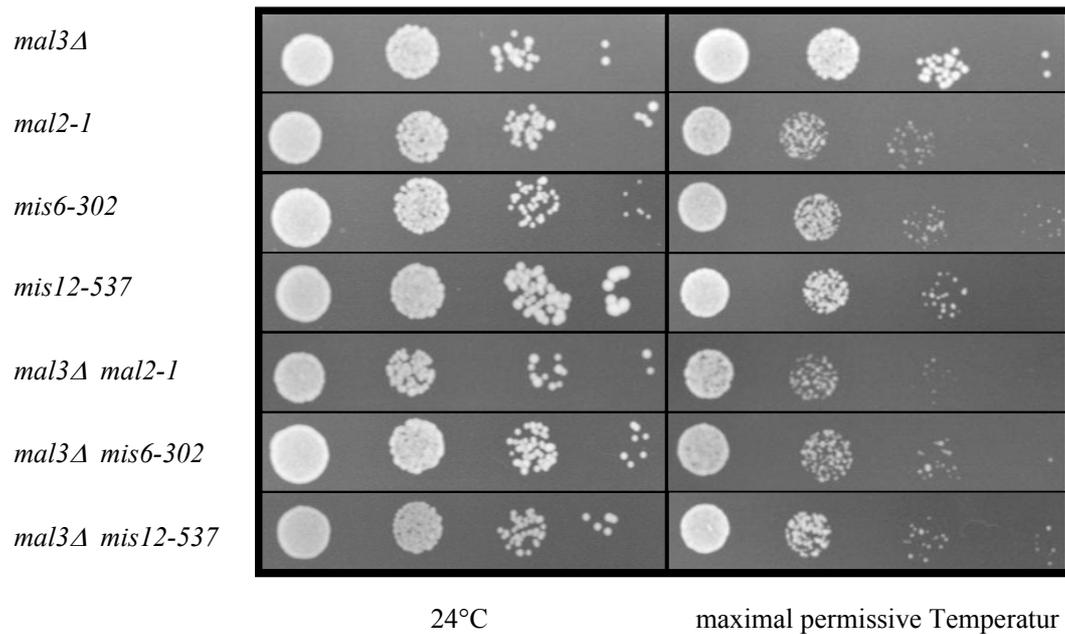
Abbildung 60: Untersuchung der genetischen Interaktion von *mal3Δ* mit Komponenten des Spindelkontrollpunktes

Dargestellt ist das Wachstumsverhalten von Einzel- und Doppelmutanten des *mal3Δ* und der Spindelkontrollpunktmutanten *mad2Δ* und *mph1Δ*. Die Abbildung zeigt das Wachstumsverhalten der Stämme bei 32 °C und 24 °C. Die Inkubation der Platten erfolgte für drei Tage.

### 5.9.2.2 *mal3<sup>+</sup>* zeigt keine genetische Interaktion mit Mutanten des Zentromers

Interaktionen zwischen Komponenten der Spindel und Proteinkomplexen der Zentromere haben eine wichtige Bedeutung für die Ausbildung der Kinetochor-Mikrotubuli-Verknüpfung (Gard et al., 1987; Tournebize et al., 2000). Um zu testen, ob das Mikrotubuli-assoziierte Protein Mal3p mit ausgewählten Komponenten des Zentromers interagiert, wird daher gezielt auf Interaktionen mit Mutanten einiger Zentromerproteine untersucht. Die Proteine Mal2p, Mis6p und Mis12p wurden als Komponenten des Zentromers der Spaltheefe charakterisiert (Jin et al., 2002; Saitoh et al., 1997; Goshima et al., 2000). Die Proteine besitzen eine essentielle Bedeutung für die Struktur und die Funktion des Zentromers. Sie sind innerhalb der zentralen Region des Zentromers lokalisiert.

Abbildung 61 zeigt das Wachstum des *mal3Δ* Stammes und das der temperatursensitiven inneren Zentromermutanten *mal2-1*, *mis6-302* und *mis12-537* der Spaltheefe. Auch das Wachstum für Doppelmutanten von *mal3Δ* und jeweils einer dieser Komponenten ist dargestellt. Bei permissiven Temperaturen zeigen alle getesteten Stämme gutes Wachstum. Bei der für die Mutanten maximal permissiven Temperatur reduziert sich das Wachstum, jedoch lassen sich keine Unterschiede im Wachstum zwischen Einzel- und Doppelmutanten erkennen. Für die hier getesteten Mutantenallemole der Zentromerproteine lässt sich somit keine genetische Interaktion mit dem *mal3Δ* Allel nachweisen.



**Abbildung 61: Untersuchung der genetischen Interaktion von *mal3Δ* mit Mutanten der inneren Zentromerregion**  
 Das Wachstumsverhalten der Einzel- und Doppelmutanten von *mal3Δ* und den Zentromermutanten *mal2-1*, *mis6-302* und *mis12-537* ist dargestellt. Die Abbildung zeigt das Wachstumsverhalten der Stämme bei 24 °C und den maximal permissiven Temperaturen (28 °C für *mal2-1*, 31°C für *mis6-302* und 32°C für *mis12-537*) auf YE5S-Medium. Die Inkubation der Platten erfolgte für drei Tage bei den angegebenen Temperaturen.

### 5.9.2.3 *mal3<sup>+</sup>* zeigt eine starke genetische Interaktion mit einer Mutante des Mikrotubuli-Plusendkomplexes

Die Proteinkomplexe an den Plusenden der Mikrotubulistrukturen besitzen eine essentielle Funktion für die Ausbildung der Kinetochor-Mikrotubuli-Verknüpfung (Vasquez et al., 1994). Alp14p und Dis1p sind Mitglieder der evolutionär konservierten TOG/XMAP215-Familie, deren Mitglieder eine Rolle für die Stabilität und Dynamik der Plusenden der Mikrotubuli besitzen. Eine Beteiligung von Alp14p am polaren Wachstum der Zellen und einen Einfluß auf die Dynamik der zytoplasmatischen Mikrotubulistrukturen wurde gezeigt (Radcliffe et al., 1998). Da Alp14p und Dis1p während der Metaphase an den Zentromeren lokalisiert sind, wird eine mögliche Funktion im Zusammenhang mit der Kinetochor-Mikrotubuli-Verknüpfung vermutet (Garcia et al., 2001). Alp14p besitzt vermutlich auch eine regulatorische Funktion im Rahmen des Spindelkontrollpunktes (Garcia et al., 2001). Für Alp14p wurde eine übergeordnete Rolle für das Zellwachstum bei hohen Temperaturen gezeigt, während sein funktionelles Homolog Dis1p für das Wachstum bei niedrigen Temperaturen wichtig ist (Garcia et al., 2001). Um auf genetische Interaktionen zwischen Mal3p und ausgewählten Mutantallelenn von Mikrotubuli-Plusendkomponenten zu prüfen, wurden Doppelmutanten von *mal3Δ* mit *dis1-288* und *alp14Δ* erzeugt (Nabeshima et al.,

1995; Nakaseko et al., 2001; Garcia et al., 2001). Einzel- und Doppelmutanten wurden in seriellen Tropftestuntersuchungen oder durch Mikroskopie analysiert.

Abbildung 62 A zeigt deutliches Wachstum der Zellen von Einzel- und Doppelmutanten des *dis1-288* Allels in seriellen Tropftestuntersuchungen bei der permissiven Temperatur von 32°C. Bei 26°C ist dagegen das Wachstum der Einzel- und Doppelmutanten des *dis1-288* Allels reduziert. Das Zellwachstum der Einzel- und Doppelmutanten ist vergleichbar, daher ist für das untersuchte *dis1-288* Allel keine genetische Interaktion mit *mal3Δ* nachweisbar.

Dagegen lassen sich deutliche Unterschiede für die Einzel- und Doppelmutanten für Alp14p und Mal3p erkennen. Im Rahmen der Tetradenanalyse wurde nur eine lebensfähige *mal3Δ alp14Δ* Doppelmutante erhalten. Die Genotypen der wachsenden Zellen wurden bestimmt und auf die der nichtwachsenden Sporen durch Verfolgung der Segregation der Marker geschlossen. Insgesamt wurden jedoch bei der Analyse von 14 Tetraden 10 Doppelmutanten vorausgesagt. Da die einzige erhaltene Doppelmutante *mal3Δ alp14Δ* jedoch kaum lebensfähig war, konnte eine Analyse durch serielle Tropftestuntersuchungen nicht erfolgen. Die Zellen der einzigen lebensfähigen Doppelmutante konnten nur kurzzeitig in Flüssigmedium angezogen und mikroskopisch analysiert werden. Bei der mikroskopischen Betrachtung der Zellen dieser Kultur zeigten sich, im Vergleich zu den leicht gebogenen oder T-förmigen Zellen der Parentalstämmen, auffällige Veränderungen in der Zellmorphologie. Durch vielfache Verzweigungen und vermutlich Ausbleiben der Trennung einzelner Zellen wurden scheinbar mehrzellige Gebilde ausgeformt (siehe Abbildung 62 B). Die morphologischen Abnormitäten und auch die reduzierte Überlebensfähigkeit der Doppelmutanten im Vergleich zu den Einzelmutanten, lassen auf einen additiven Effekt durch genetische Interaktion schließen.

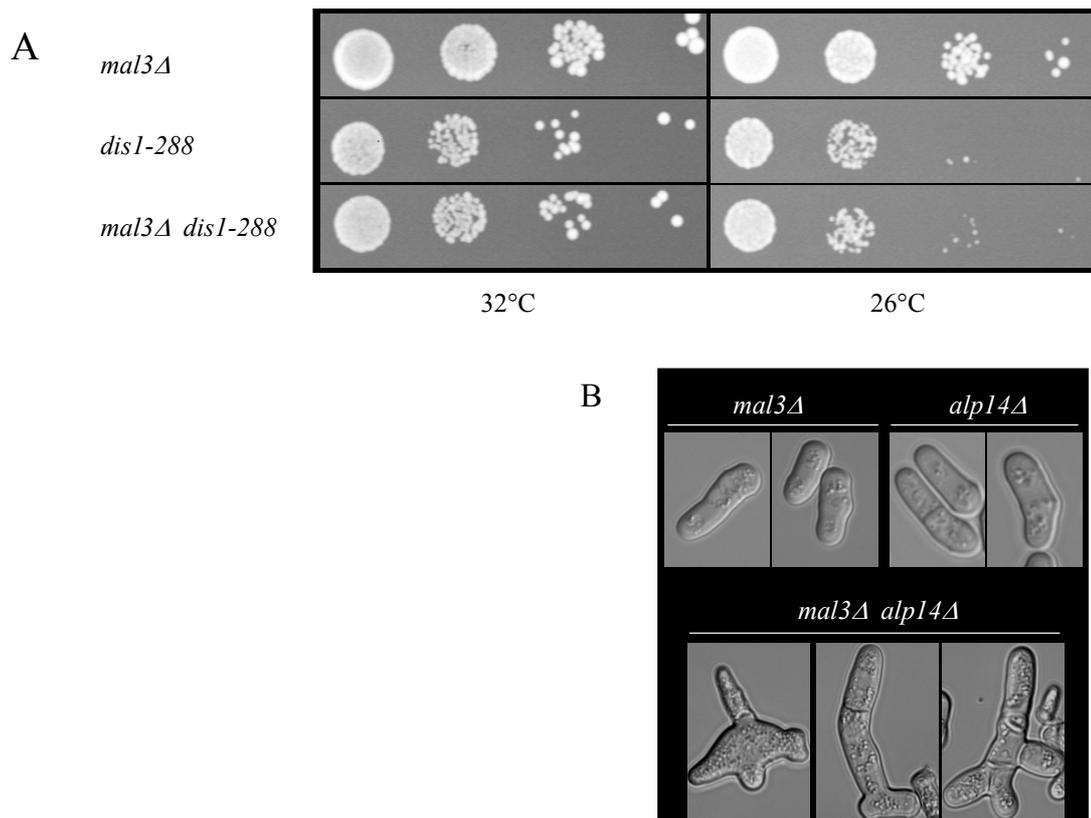


Abbildung 62: Untersuchung der genetischen Interaktion von *mal3Δ* mit Komponenten des Mikrotubuli-Plusendkomplexes

In Teil A ist das Wachstumsverhalten von Einzel- und Doppelmutanten des *mal3Δ* und dem Mutantenstamm des Mikrotubuli-Plusendkomplexes *dis1-288* dargestellt. Die Inkubation der Platten erfolgte für zwei bzw. drei Tage bei 32 °C bzw. 26 °C. Teil B zeigt die Zellmorphologie in Phasenkontrastaufnahmen einer *mal3Δ alp14Δ* Doppelmutante im Vergleich zu den Einzelmutanten.

Tabelle 12 faßt die Daten zusammen, die bei der Untersuchung der genetischen Interaktion von *mal3Δ* mit ausgewählten Mutantenallelen von Komponenten des Spindelkontrollpunktes, des Zentromers und des Mikrotubuli-Plusendkomplexes erhalten wurden. Durch die Kreuzung von *mal3Δ* mit zwei unterschiedlichen Komponenten des Spindelkontrollpunktes wurde gezeigt, daß der Spindelkontrollpunkt im *mal3Δ* Stamm aktiviert ist. Eine genetische Interaktion konnte jedoch nur für *mph1Δ* gezeigt werden. Vermutlich besitzt Mph1p im Vergleich zu Mad2p eine zentralere Funktion im Spindelkontrollpunkt. Durch die Defekte des *mal3Δ* Stammes wird der Kontrollpunkt aktiviert. Während des transienten Arrestes in der Metaphase können mitotische Spindeldefekte des *mal3Δ* Stammes ausgeglichen werden. Fällt dieser Kontrollpunkt weg, beginnen die Zellen trotz Defekte mit der Anaphase. Bei der Segregation der Chromosomen und der anschließenden Zellteilung wirken sich die Defekte aus. Die Doppelmutanten zeigen reduziertes Wachstum.

Zusätzlich konnte eine genetische Interaktion für *mal3Δ* und *alp14Δ* gezeigt werden. Eine mögliche Interaktion zwischen dem Mikrotubuli-assoziierten Protein Mal3p und einem Protein des Mikrotubuli-Plusendkomplexes wäre durchaus denkbar. Die Interaktion der Proteine könnte eine Bedeutung bei der Verknüpfung zwischen Spindel und Zentromer haben. Beim *mal3Δ* Stamm wurden Defekte bei der Verknüpfung von Chromatin mit der Spindel festgestellt. Die *mal3Δ alp14Δ* Doppelmutante war im Vergleich zu den jeweiligen Einzelmutanten kaum lebensfähig und zeigte extreme morphologische Abweichungen. Bei den übrigen getesteten Mutantenallelen des Zentromers und des Mikrotubuli-Plusendkomplexes wurde keine genetische Interaktion festgestellt. Vielleicht ist eine genetische Interaktion bei der Auswahl anderer Mutantenallele dieser Komponenten oder neuer Komponenten nachweisbar.

Tabelle 12: Untersuchungen zur genetischen Interaktion von *mal3Δ*

Zusammengefaßt sind hier die Ergebnisse, die für die Untersuchung der genetischen Interaktion von *mal3Δ* mit Komponenten des Spindelkontrollpunktes, des Zentromers und des Mikrotubuli-Plusendkomplexes, erhalten wurden. Die Symbole „++“ bis „-“ stehen für den Grad der genetischen Interaktion.

	<i>mad2Δ</i>	<i>mph1Δ</i>	<i>mal2-1</i>	<i>mis6-302</i>	<i>mis12-537</i>	<i>dis1-288</i>	<i>alp14Δ</i>
<i>mal3Δ</i>	-	+	-	-	-	-	++

## 6 Diskussion

Für eine präzise Segregation der Schwesterchromatiden während der Mitose müssen die kondensierten Chromosomen bipolar mit den Mikrotubulistrukturen der mitotischen Spindel verknüpft werden. Dieser Prozeß erfordert den korrekten Aufbau dynamischer Spindelstrukturen und eine gezielte Verknüpfung zwischen den Kinetochoren der Chromosomen und den Plusenden der Kinetochor-Mikrotubuli der Spindel. Die röhrenförmigen Mikrotubulistrukturen verlängern sich durch Anlagerung von GTP-tragenden Tubulindimeren bevorzugt am Plusende bzw. verkürzen sich durch die Dissoziation von Tubulindimeren. Der Wechsel zwischen Phasen des Wachstums und der Verkürzung dieser Strukturen wird als dynamische Instabilität bezeichnet (Mitchison et al., 1984; Desai et al., 1997). Eine Vielzahl von Mikrotubuli-assoziierten Proteinen beeinflusst die Dynamik und den geordneten Aufbau der bipolaren mitotischen Spindelstrukturen. Einige der Proteine befinden sich an den Plusenden spezifischer Mikrotubulistrukturen und wirken regulierend auf die Dynamik dieser polaren Enden und auf ihre Interaktion mit verschiedenen Komponenten der Zelle. Wichtige Plusendproteine gehören zur CLIP-170 Familie bzw. zur EB-1 Familie, die in unterschiedlichen eukaryontischen Organismen evolutionär konserviert sind (Übersichtsartikel von Schuyler et al., 2001; Tirnauer et al., 1999; Mimori-Kiyosue et al., 2000; Rehberg et al., 2002).

Neben der Bedeutung der EB-1 Familienmitglieder für die Dynamik der Mikrotubulistrukturen und deren Interaktion mit verschiedenen zellulären Strukturen wurde für das menschliche EB-1 Protein, welches mit den Plusenden dynamischer Mikrotubuli assoziiert und für das Adenomatous Polyposis Coli (APC) Tumorsuppressorprotein eine Beteiligung an der Ausbildung und der Stabilisierung von Kinetochor-Mikrotubuli-Verknüpfungen gezeigt (Fodde et al., 2001; Kaplan et al., 2001; Tirnauer et al., 2002a). Das EB-1 Familienmitglied der Spalthefe *S. pombe* ist das Mal3p Protein (Beinhauer et al. 1997). Die funktionelle Konservierung innerhalb der EB-1 Familie wurde bereits gezeigt. Es stellen sich die Fragen, ob auch das *S. pombe* Protein Mal3p als Bestandteil des Plusendkomplexes eine Funktion für die Verknüpfung der Chromosomen mit der mitotischen Spindel besitzt bzw. mit welchen Proteinen Mal3p interagiert. Obwohl das Mal3p nicht essentiell ist, besitzt es eine wichtige Bedeutung für den Aufbau und für die Dynamik der bipolaren mitotischen Spindel, die verglichen mit Wildtypspindeln in den *mal3Δ* Zellen deutlich schwächer angefärbt werden (Beinhauer et al., 1997). Die Überexpression des Gens führt zu Defekten im Aufbau der bipolaren Spindelstrukturen und zu einem stark reduzierten Wachstum. Der *mal3-1* Stamm und *mal3Δ* Stamm sind hypersensitiv gegenüber der Mikrotubuli-destabilisierenden

Chemikalie Thiabendazol. Der Verlust der Proteinfunktion führt zu einer erhöhten genomischen Instabilität (Beinhauer et al., 1997).

Die mitotische Funktion des Mal3p Proteins in der Spalthefe wurde in dieser Arbeit näher analysiert. Neben der Funktion des Mal3p Proteins für den Aufbau einer korrekten Spindel wurden durch die vorliegenden Daten wichtige Hinweise für eine Beteiligung des Proteins bei der Ausbildung der Verknüpfungen zwischen dem Kinetochor und den Plusenden der Mikrotubuli erhalten. Eine starke genetische Interaktion zwischen einem *mal3<sup>+</sup>* Mutantenstamm und einer Komponente des Mikrotubuli-Plusendkomplexes, die auf eine Rolle der beiden Proteine im gleichen Funktionszusammenhang deutet, wurde festgestellt. Weitere Daten, die für eine Beteiligung des Mal3p Proteins an der Ausbildung und Stabilisierung von Kinetochor-Mikrotubuli-Verknüpfungen stehen, wurden durch einen Multikopie-Suppressorscreen mit einer genomischen *S. pombe* Genbank erhalten. Neben dem *mal3<sup>+</sup>* Gen wurden zehn weitere Komplementationsgruppen identifiziert, die sowohl die TBZ-Hypersensitivität des *mal3-1* Stammes, als auch den erhöhten Minichromosomenverlust ausgleichen konnten. Anhand eigener Daten und beruhend auf Literatur- und Datenbankrecherchen konnte für sechs der Suppressorgruppen ein Zusammenhang mit der Funktion des Mal3p Proteins abgeleitet werden. Ein Suppressor ist an der korrekten Lokalisierung der Aktinflecken beteiligt, die übrigen wurden als Komponenten des Spindelapparates bzw. des Kinetochors charakterisiert. Eines dieser Zentromerproteine ist das evolutionär konservierte Spc7p Protein. Die Bedeutung dieser Daten für die Beteiligung des Mal3p Proteins bei der Kinetochor-Mikrotubuli-Verknüpfung werden hier diskutiert.

### **6.1 Genetische Interaktion von *mal3<sup>+</sup>* mit Mutanten des Mikrotubuli-Plusendkomplexes und des Spindelkontrollpunktes**

Die genetische Interaktion zwischen *mal3Δ* und Mutanten des Spindelkontrollpunktes konnte nur für *mal3Δ* und *mph1Δ* gezeigt werden. Eine genetische Interaktion zwischen *mal3Δ* und *mad2Δ* wurde nicht erhalten. Der korrekte Aufbau der mitotischen Spindelstrukturen und die bipolare Verknüpfung der Kinetochore mit den Plusenden der Mikrotubuli werden durch den evolutionär konservierten Spindelkontrollpunkt überprüft (Übersichtsartikel Amon, 1999; Gardner et al., 2000). Die nichtessentiellen Proteine Mph1p und Mad2p der Spalthefe sind Komponenten dieser komplexen Signalkaskade, die bei Defekten zu einem transienten Arrest der Zellen in der Metaphase des Zellzyklus führt (He et al., 1997; He et al., 1998).

Für *mal3Δ* wurde eine genetische Interaktion mit *mph1Δ* festgestellt. Doppelmutanten zeigen im Vergleich zu den Einzelmutanten ein deutlich reduziertes Wachstum. Obwohl die Deletion

von *mal3<sup>+</sup>* zum Aufbau morphologisch unveränderter Spindelstrukturen führt, zeigen diese funktionelle Defekte. Fehler bei der DNA-Verteilung wurden für Zellen des *mal3Δ* Stammes nachgewiesen. Die Abwesenheit von Mal3p führt zur Aktivierung des Spindelkontrollpunktes und damit zu einem vorübergehenden Arrest in der Metaphase. Die Aktivierung des Spindelkontrollpunktes in *mal3Δ* Zellen ist abhängig von der Anwesenheit des funktionellen Mph1p Proteins, jedoch scheinbar nicht von der des Mad2p Proteins. Eine genetische Interaktion zwischen *mal3Δ* und *mad2Δ* wurde nicht festgestellt. Vergleichbare Unterschiede bei Untersuchungen der genetischen Interaktion mit diesen Kontrollpunkt-komponenten wurden auch für andere *mal*-Mutantenstämme in unserem Labor erhalten (Fleig et al., 2000; Jin et al., 2002). Der beobachtete Effekt beruht auf den spezifischen Funktionen der Proteine in den sehr komplexen und bisher nicht vollständig aufgeklärten Spindelkontrollpunkt-kaskaden. Mph1p Kinase besitzt wahrscheinlich eine übergeordnete Funktion verglichen mit Mad2p. Die Deletion von *mph1<sup>+</sup>* führt zu einer stärkeren Hypersensitivität gegenüber Thiabendazol als die Deletion von *mad2<sup>+</sup>*. Das Spaltheferprotein Mph1p besitzt jedoch anders als die essentielle Mps1 aus *S. cerevisiae* keine Funktion für die Verdopplung der Spindelpolkörper (Weiss et al., 1996; He et al., 1998).

Eine genetische Interaktion von *mal3Δ* und *alp14Δ* wurde gezeigt. Keine genetische Interaktion konnte dagegen für die untersuchte *dis1-288* Mutante nachgewiesen werden. Die Spaltheferproteine Alp14p und Dis1p sind Mitglieder der evolutionär konservierten TOG/XMAP215-Familie, deren Mitglieder eine wichtige Bedeutung für die Stabilität und für die Dynamik der Plusenden der Mikrotubuli besitzen (Übersichtsartikel von Andersen et al., 2000; Gard et al., 1987; Vasquez et al., 1994; Tournebize et al., 2000). Aufgrund ihrer Kinetochorlokalisierung in der Metaphase des Zellzyklus wird zusätzlich eine Funktion im Zusammenhang mit der Kinetochor-Mikrotubuli-Verknüpfung angenommen (Garcia et al., 2001; Nakaseko et al., 2001).

Da eine genetische Interaktion nur für *mal3Δ* und *alp14Δ* nachgewiesen wurde, ist nicht auszuschließen, daß Alp14p und Dis1p Bestandteil verschiedener Proteinkomplexe an den Plusenden der Mikrotubuli sind und Mal3p nur mit dem Alp14p-Komplex wechselwirkt. Obwohl Alp14p und Dis1p der gleichen Proteinfamilie angehören und sich in ihrer mitotischen Funktion ergänzen, weisen die Mutantenstämme deutliche Unterschiede in den Phänotypen auf (Ohkura et al., 1988; Garcia et al., 2001). Die beiden Proteine besitzen eine übergeordnete Funktion für das Wachstum der Zellen innerhalb unterschiedlicher Temperaturbereiche. Die gleichzeitige Deletion der beiden Komponenten ist letal für die Zellen (Garcia et al., 2002). Die Lokalisation von Alp14p mit dem Kinetochor ist abhängig

von der Anwesenheit einer intakten mitotischen Spindel. Die Deletion des Gens führt zur Hypersensitivität gegenüber der Mikrotubuli-destabilisierenden Chemikalie Thiabendazol (Garcia et al., 2001). Für Alp14p konnte eine Interaktion mit Alp7p, die wichtig ist für die Organisation der bipolaren Spindel, gezeigt werden (Sato et al., 2004). Eine Interaktion mit Dis1p wurde nicht festgestellt.

Neben dieser Bedeutung ist in der Literatur zusätzlich eine regulatorische Funktion für Alp14p beschrieben (Garcia et al., 2001). Es wird angenommen, daß Alp14p Teil des Spindelkontrollpunktes ist und in der Kaskade oberhalb von Mad2p agiert. Durch eigene Untersuchungen konnte jedoch keine genetische Interaktion zwischen *mal3Δ* und *mad2Δ* festgestellt werden. Möglicherweise steht der beobachtete Effekt der *mal3Δ alp14Δ* Doppelmutante nicht im Zusammenhang mit der regulatorischen Funktion von Alp14p bzw. Alp14p besitzt noch weitere Mad2p-unabhängige Funktionen für den Spindelkontrollpunkt, die in der Doppelmutante betroffen sind.

Wie das Mal3p Protein besitzt Alp14p zusätzlich eine wichtige Bedeutung für das polare Wachstum der Spalthefezellen (Radcliffe et al., 1998). Auch *alp14<sup>+</sup>* Mutantenstämme zeigen stark verkürzte Mikrotubulistrukturen. Vielleicht wirken sich diese Effekte in den Doppelmutanten zusätzlich negativ auf das Wachstum und die Überlebensfähigkeit der Zellen aus.

## **6.2 Bedeutung der Suppressoren der verbleibenden Insertsequenzen für die mitotische Funktion von Mal3p**

Durch die Suppressoranalyse mit dem *mal3-1* Stamm wurden vier genomische *S. pombe* DNAInsertsequenzen identifiziert, die verschiedene ORFs enthalten. Meist handelt es sich um Proteine, deren Leserahmen im Zusammenhang mit der Sequenzierung des *S. pombe* Genoms identifiziert und bisher nicht experimentell charakterisiert wurden. Eine Homologie zu Proteinen, die an der Chromosomensegregation beteiligt sind, wurde nicht festgestellt. Da durch die Analyse der übrigen Suppressoren des genomischen Bankscreens jedoch bereits erfolgreich neue Komponenten des Kinetochors und der mitotischen Spindel identifiziert wurden, ist auch die Bearbeitung der Suppressorinsertsequenzen CD-13, CD-17, CD-18 und CD-19 von großem Interesse. Durch zukünftige Analysen der Gene können noch unbekannte Aspekte für die Funktion von Mal3p ermittelt werden.

### 6.3 Ein Regulator des Aktinzytoskeletts supprimiert die mitotischen *mal3-1* Mutantenphänotypen

Interessanterweise konnte gezeigt werden, daß der *asp1*<sup>+</sup> ORF des Suppressorinserts CD-14 für den Ausgleich der mitotischen *mal3-1* Mutantenphänotypen verantwortlich ist. Die Deletion von *asp1*<sup>+</sup> zeigt keinen unmittelbaren Einfluß auf die Segregation des Mini-chromosoms.

Das nichtessentielle Asp1p Protein besitzt eine evolutionär konservierte Bedeutung für die Funktion des Aktinzytoskeletts der Zelle (Feoktistova et al., 1999; Pelevoda et al., 1999). Das Protein zeigt eine genetische Interaktion mit Mutanten des Arp2p/3p Komplexes, der eine essentielle Bedeutung für den Aufbau und für die zyklischen Umlagerungen der zellulären Aktinflecken besitzt (Übersichtsartikel von Machesky et al., 1999 und Weaver et al., 2003; McCollum et al., 1996; Arai et al., 1998). Die genaue Wechselwirkung der Proteine ist nicht geklärt. Die Deletion von *asp1*<sup>+</sup> führt jedoch zu einer Mislokalisierung der zellulären Aktinflecken (Feoktistova et al., 1999).

Es gibt keine Hinweise dafür, daß Asp1p als Regulator des Aktinzytoskeletts die Funktion des Mal3p Proteins bei der Kinetochor-Mikrotubuli-Verknüpfung beeinflusst. Jedoch die wichtige Bedeutung der Aktinstrukturen für die korrekte Orientierung der mitotischen Spindelstrukturen wurde bereits gezeigt (Gachet et al., 2001; Oliferenko et al., 2002). Eine Interaktion der Astral-Mikrotubuli mit den Strukturen der Zellcortex ist in der Literatur auch für Homologe des Mal3p Proteins beschrieben. Die EB-1 Familienmitglieder aus *S. cerevisiae* und *D. melanogaster* sind an der korrekten Positionierung der mitotischen Spindel beteiligt (Schwarz et al., 1997; Hwang et al., 2003; Lu et al., 2001; Rogers et al., 2002). Auch für das Mal3p Protein konnte eine Assoziation mit den Plusenden der Astralmikrotubuli der Spalthefe gezeigt werden (persönliche Mitteilung von Christoph Beuter). Denkbar ist, daß an den Plusenden der Astral-Mikrotubuli-assoziiertes Mal3p Protein zur korrekten Orientierung der mitotischen Spindel mit den zellulären Aktinstrukturen interagiert.

Defekte der zellulären Aktinstrukturen oder Fehlorientierungen der mitotischen Spindel führen zur Aktivierung des Aktinkontrollpunktes, eines weiteren Kontrollpunktes der Zelle und zu einer transienten Arretierung im Zellzyklus (Gachet et al., 2001; Nakaseko et al., 2001). Denkbar ist, daß auch die Überexpression von *asp1*<sup>+</sup> in den *mal3-1* Mutantenzellen zu einer Mislokalisierung der zellulären Aktinflecken und damit zur Aktivierung des Aktinkontrollpunktes führt.

#### 6.4 Interaktion von Mal3p mit dem Mikrotubuli-assoziierten Protein Stu1p

Durch eine Suppressoranalyse mit dem *mal3-1* Stamm wurde der 3'-Bereich des ORFs SPAC3G9.12 isoliert, der für den Ausgleich der *mal3-1* Phänotypen verantwortlich ist. Dieser ORF wurde durch diese Arbeit aufgrund von Sequenzhomologien der evolutionär konservierten CLASP/MAST/Stu1-Proteinfamilie zugeordnet (Akhmanova et al., 2001; Inoue et al., 2000; Pasqualone et al., 1994; Lemos et al., 2000). Die Mikrotubuli-assoziierten Mitglieder dieser Proteinfamilie ohne molekulare Motorfunktion besitzen eine essentielle Bedeutung für die Funktion und Organisation der bipolaren mitotischen Spindel in verschiedenen Organismen (Pasqualone et al., 1994; Lemos et al., 2000; Inoue et al., 2000). Das Stu1 der Bäckerhefe ist an der Vernetzung antiparalleler interpolärer Spindelmikrotubuli beteiligt und ist wichtig für die Erzeugung der Spindelspannung (Yin et al., 2002; Hoyt et al., 1992). Für die homologen Proteine MAST/Orbit in *Drosophila melanogaster* und für das CLIP-170 interagierende CLASP1 Humanprotein wurde, neben ihrer Bedeutung für den Aufbau der Spindel, zusätzlich eine Funktion für die Regulation der Dynamik spezifischer Mikrotubulienden bei der Ausbildung einer funktionellen Kinetochor-Mikrotubuli Verknüpfung gezeigt (Übersichtsartikel von Sharp et al., 2002; Akhmanova et al., 2001; Maiato et al., 2003).

Auch das Spaltheffehomolog Stu1p ist essentiell für den Aufbau der bipolaren Spindelstrukturen (persönliche Mitteilung von Dr. Iain Hagan). Der Funktionsverlust des Proteins führt zur Ausbildung monopolarer Spindelstrukturen. Ein Stu1-GFP Fusionprotein assoziiert entlang mitotischer Spindelstrukturen und kann während der Anaphase in der zentralen Spindelregion nachgewiesen werden (persönliche Mitteilung von Inga Karig).

Ob das Stu1p Protein neben seiner Bedeutung für den Aufbau der mitotischen Spindel zusätzlich an der Ausbildung funktioneller Kinetochor-Mikrotubuli Verknüpfungen beteiligt ist, wurde bisher nicht geklärt. Interessanterweise wurde jedoch durch den durchgeführten genomischen Bankscreen eine neue Verbindung zwischen Stu1p und der Plusendkomponente Mal3p hergestellt. Möglicherweise ist auch Stu1p an der Regulation der Dynamik der Mikrotubuli-Plusenden und deren Interaktion mit dem Kinetochor beteiligt. Während die Überexpression der Gensequenz, die für den C-terminalen Bereich des Stu1p Proteins kodiert, die Hypersensitivität der *mal3*<sup>+</sup> Mutantenstämme gegenüber TBZ ausgleicht, kann dies die Expression der *stu1*<sup>+</sup> Vollängensequenz nicht (Karig et al., unveröffentlicht). Eine antagonistische Wirkung von Stu1p und Mal3p in Bezug auf die Regulation der Mikrotubulidynamik wurde gezeigt (persönliche Mitteilungen von Christoph Beuter und Inga Karig).

Die verkürzte Proteinvariante stört wahrscheinlich die Funktion des Stu1p Vollängenproteins durch direkte Interaktion oder über Wechselwirkung mit putativen Interaktionspartnern/Regulatoren. Der Ausgleich der *mal3<sup>+</sup>* Phänotypen erfolgt somit über die Beeinflussung der antagonistischen Stu1p Funktion.

### **6.5 Interaktionen von Mal3p mit Proteinen, die eine evolutionär konservierte Bedeutung für die bipolare Verknüpfung des Zentromers mit der Spindel besitzen**

Der ORF SPAC589.08c auf den Suppressorinsertsequenzen CD-2/CD-15 zeigt Homologie zum Dam1 Protein der Bäckerhefe. Dam1 ist Bestandteil eines Multiproteinkomplexes, der mit dem Kinetochor und entlang mitotischer Spindelstrukturen assoziiert und an der bipolaren Verknüpfung der Plusenden der Mikrotubuli mit dem Kinetochor beteiligt ist (Übersichtsartikel von Cheeseman et al., 2002b; Cheeseman et al., 2001a; Janke et al., 2002; Li et al., 2002b; Shang et al., 2003). Die Assoziation des Dam1-Komplexes mit dem Kinetochor ist abhängig von der Anwesenheit mitotischer Spindelmikrotubuli und wird über die reversible Phosphorylierung beeinflusst (Enquister-Newman et al., 2001; Cheeseman et al., 2001b; Cheeseman et al., 2002b; Tanaka et al., 2002). Die Phosphorylierung des Dam1 Proteins erfolgt durch die Kinase Ipl1, eine antagonistische Dephosphorylierung durch die katalytische Serin/Threonin-Phosphataseuntereinheit Glc7 (Biggins et al., 2001; Kang et al., 2001; Francisco et al., 1994; Sassoon et al., 1999; Courtwright et al., 2002). Es wird angenommen, daß sich eine Phosphorylierung negativ auf die Interaktion des Dam1-Komplexes am Kinetochor auswirkt, wodurch eine bipolare Kinetochor-Mikrotubuliverknüpfung gefördert wird. Homologe zu den Proteinen dieses Systems, einschließlich der Ipl1 Kinase bzw. Glc7 Phosphatase, wurden auch in *S. pombe* beschrieben (Ohkura et al., 1988; Leveson et al., 2002; Petersen et al. 2001). Interessanterweise konnte das Glc7 Homolog Dis2p und der evolutionär konservierte Regulator Pic1p der *S. pombe* Aurora-Kinase Ark1p als Suppressoren der mitotischen *mal3-1* und *mal3Δ* Mutantenphänotypen in dieser Arbeit identifiziert werden. In Anlehnung an die Bäckerhefe könnte es auch in *S. pombe* ein vergleichbares System zur Förderung einer bipolaren Verknüpfung der Chromosomen mit der mitotischen Spindel geben. In Mutanten von *dis2<sup>+</sup>* bzw. *ark1<sup>+</sup>* trennen sich die verdoppelten Schwesterchromatiden nicht und assoziieren mit einem der beiden Spindelpole (Ohkura et al., 1988; Petersen et al., 2001).

Parallel zur erhaltenen Suppression durch *dam1<sup>+</sup>* in der vorliegenden Arbeit ist in der Literatur eine *in vitro* Proteininteraktion zwischen dem homologen Mikrotubuli-assoziierten

Bim1 Protein und dem Dam1 Protein der Bäckerhefe beschrieben (Shang et al., 2003). Ob die Interaktion in *S. cerevisiae* entlang der Spindel stattfindet oder spezifisch an den Plusenden der Mikrotubuli erfolgt, ist ungeklärt.

Die Lokalisation der Proteine in *S. pombe* ist vergleichbar mit der in anderen Eukaryonten. Eine Assoziation des Dam1p Proteins entlang der mitotischen Spindelstrukturen konnte gezeigt werden (persönliche Mitteilung von Inga Karig). Die *S. pombe* Proteine Ark1p und Pic1p assoziieren zellzyklusspezifisch mit dem Kinetochor und den Strukturen der mitotischen Spindel (Petersen et al., 2001; persönliche Mitteilung von Anne Kerres). Aufgrund dieser Lokalisierung und beruhend auf seiner Homologie handelt es sich bei Pic1p vermutlich um ein Homolog zum INCENP Protein der höheren Eukaryonten (Leverson et al., 2002). Die evolutionär konservierte Interaktion zwischen diesen Proteinen dient zur spezifischen Substraterkennung und Aktivierung der Kinase (Übersichtsartikel von Giet et al., 1999; Kim et al., 1999; Leverson et al., 2002; Adams et al., 2001b; Kaitna et al., 2000). Die evolutionär konservierte Gruppe der Aurora-Serin/Threoninproteinkinasen besitzt eine wichtige Bedeutung für die Regulation unterschiedlicher mitotischer Teilfunktionen (Übersichtsartikel von Bischoff et al., 1999 und von Shannon et al., 2002; Giet et al., 1999). Veränderte Expressionsstärken der Aurora-Kinasen in menschlichen Krebszellen oder auch durch den Funktionsverlust der Kinase bedingte Defekte bei der Chromosomensegregation verdeutlichen ihren Einfluß für die Erhaltung der Genomstabilität (Adams et al., 2001b; Giet et al., 1999; Petersen et al., 2001).

Die Identifizierung der Proteine Dam1p, Pic1p und Dis2p als Suppressoren der *mal3*<sup>+</sup> Mutantenphänotypen ist ein weiterer Hinweis auf eine Funktion des Mal3p Proteins bei der Verknüpfung von Kinetochor und den Plusenden der Mikrotubuli. In Anlehnung an das System in *S. cerevisiae* wirkt sich zusätzliches Dam1p möglicherweise stabilisierend auf die Spindelstrukturen aus bzw. stabilisiert die Verknüpfung zwischen dem Kinetochor und den Plusenden der Mikrotubuli. Dabei reicht die Überexpression von *dam1*<sup>+</sup> bereits für einen Ausgleich der Phänotypen der *mal3*<sup>+</sup> Mutantenstämme aus.

Zusätzlich wird ein entsprechender Effekt erhalten, wenn die Gene, welche für Proteine der dynamischen Phosphorylierungsregulation des Dam1 Bäckerhefe Proteins kodieren, überexprimiert werden. Die Überexpression von *dis2*<sup>+</sup> bzw. *pic1*<sup>+</sup> verschiebt das Phosphorylierungsgleichgewicht möglicherweise zugunsten einer Stabilisierung der bipolaren Verknüpfung. Denkbar in diesem Zusammenhang ist eine negative Beeinflussung der antagonistischen Ark1p Funktion durch erhöhte Mengen des Pic1p Proteins.

## 6.6 Interaktion von Mal3p mit den neuen Zentromerproteinen Spc7p aus *S. pombe* und Spc105 aus *S. cerevisiae*

Am häufigsten wurde als Suppressor im genomischen Bankscreen mit dem *mal3-1* Stamm der ORF SPCC1020.02 (*spc7<sup>+</sup>*) isoliert, der für das Spc7p Protein kodiert. Es besitzt Homologie zum Protein Spc105 der Bäckerhefe. Spc105 kann die Hypersensitivität gegenüber der Mikrotubuli-destabilisierenden Chemikalie TBZ in einem *BIMI* Deletionsstamm, dem *mal3-1* Stamm und dem *mal3Δ* Stamm ausgleichen. Für beide Proteine wurde somit neben der Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz auch eine funktionelle Homologie nachgewiesen.

Obwohl sich die Zentromer-DNA-Sequenzen der Hefen in ihrem strukturellen Aufbau unterscheiden, können sowohl Spc7p als auch Spc105 mit dem Kinetochor assoziieren. Dies konnte durch mikroskopische Untersuchungen und ChIP-Analysen gezeigt werden (eigene Untersuchungen und persönliche Mitteilungen von Inga Karig und PD Dr. J. Lechner). Hierbei stimmt die Lokalisation der Proteine mit den Mustern überein, die auch für andere bereits charakterisierte Zentromerproteine der beiden Hefen erhalten wurden (Goh et al., 1993; Hyland et al., 1999; Jin et al., 2002; Pot et al., 2003; Measday et al., 2002).

Auch die Assoziation von Spc7p mit der *cnt*- und *imr*-Region der Zentromer-DNA entspricht der, die für das Zentromerprotein Mal2p beschrieben wurde (Jin et al., 2002). Das Kinetochor der Spaltheefe ist vielschichtig aufgebaut (Kniola et al., 2001). Die Auswertung der Colokalisierung von Spc7p- und Mal2p-Signale hat gezeigt, daß das Spc7p-Signal in den meisten Zellen weiter von den anfärbaren Chromatinstrukturen entfernt liegt als das Mal2p-Signal. Spc7p konnte somit als neue Komponente des Kinetochors der Spaltheefe charakterisiert werden, die während des gesamten Zellzyklus mit dem Kinetochor assoziiert vorliegt. Durch die Identifizierung des Kinetochorproteins Spc7p wurde ein weiterer Hinweis für die Beteiligung des Mikrotubuli-assoziierten Mal3p Proteins an der Ausbildung der Kinetochor-Mikrotubuli-Verknüpfung erhalten. Es ist denkbar, daß Mal3p wie sein menschliches Homolog EB-1 an der Regulation der Dynamik von Kinetochor-Mikrotubulstrukturen beteiligt ist (Fodde et al., 2001; Kaplan et al., 2001; Tirnauer et al., 2002a). Die innere Domäne der Zentromer-DNA scheint dabei eine wichtige Bedeutung für die Assoziation der Plusenden der Mikrotubulstrukturen mit dem Kinetochor zu besitzen.

Spc7p und Spc105 besitzen eine essentielle Bedeutung für die Segregation der Chromosomen in der Mitose. Der Einfluß von *SPC105* auf die Verteilung eines zusätzlichen Chromosomenfragmentes wurde gezeigt. Die Expression des *SPC105* Gens in Abhängigkeit von einem Doxyzyklin regulierbaren Promotor führt zur einer erhöhten genomischen Instabilität.

Unabhängig von den eigenen Daten wurde der Effekt auf die Chromosomensegregation und die Assoziation von Spc105 mit dem Zentromer durch eine während der schriftlichen Zusammenstellung dieser Arbeit erschienene Veröffentlichung bestätigt. Temperatursensitive *SPC105* Mutanten zeigen einen deutlich erhöhten Chromosomenverlust im Vergleich zum Wildtyp (Nekrasov et al., 2003). Zusätzlich wurden synthetisch letale Interaktionen für temperatursensitive Mutanten von *SPC105* mit verschiedenen Komponenten der Zentromer-komplexe Ndc80 und Mtw1 erhalten. Der Ndc80-Komplex ist essentiell für die Assoziation des Kinetochors mit den Mikrotubulstrukturen (He et al., 2001; Wigge et al., 2001; McClelland et al., 2004). Auch die Kombination von Mutantallelern des *SPC105* Gens mit Komponenten des Kinetochor- und Mikrotubuli-assoziierten Dam1-Komplexes führt zu synthetischen Wachstumsdefekten bei 30 °C (Nekrasov et al., 2003). Ob Spc7p auch in *S. pombe* mit den Homologen des Dam1p-Komplexes interagiert, muß durch zukünftige Arbeiten geklärt werden. Das Dam1p Protein wurde als ein Suppressor der *mal3*<sup>+</sup> Mutantenphänotypen bereits diskutiert.

Spc7p besitzt eine wichtige Bedeutung für die Segregation der Chromosomen. Die moderate Überexpression der Gensequenz, die für die C-terminale Proteinhälfte kodiert, kann den erhöhten Chromosomenverlust des *mal3-1* Stammes und die Hypersensitivität des *mal3-1* Stammes und des *mal3Δ* Stammes gegenüber Thiabendazol ausgleichen. Eine starke Überexpression der Sequenz, die für das partielle Proteins kodiert, führt dagegen zu extremen Wachstumsdefekten. Durch weitere Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß die Ursache hierfür auf einer fehlerhaften Verknüpfung der DNA mit der mitotischen Spindel beruht (persönliche Mitteilung von PD Dr. Ursula Fleig).

Während die Überexpression der DNA-Sequenz, die für die C-terminale Proteinhälfte kodiert, in Zellen des Wildtyps zur Hypersensitivität gegenüber der Mikrotubuli-destabilisierenden Chemikalie Thiabendazol führt, wird durch die Überexpression der *spc7*<sup>+</sup> Vollängensequenz eine erhöhte Resistenz der Zellen gegenüber dieser Chemikalie bewirkt (persönliche Mitteilung von Anne Kerres). Die Mikrotubulstrukturen werden durch die Überexpression von *spc7*<sup>+</sup> stabilisiert. Das Zentromerprotein Spc7p und das Mikrotubuli-assoziierte Mal3p Protein wechselwirken im gleichen mitotischen Funktionszusammenhang. Denkbar ist, daß Spc7p die Dynamik der Kinetochor-Mikrotubuli im Rahmen der Kinetochor-Mikrotubuli Verknüpfung beeinflusst.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Daten ermittelt, die für eine Beteiligung des Mikrotubuli-assoziierten Mal3p Proteins an der Ausbildung von Kinetochor-Mikrotubuli Verknüpfung

sprechen. Durch einen Multikopie-Suppressorscreen wurden zehn neue Suppressoren der *mal3<sup>+</sup>* Mutantenphänotypen identifiziert. Der Einfluß dieser Suppressoren auf die Chromosomensegregation wurde gezeigt und ein Zusammenhang mit der Mal3p Proteinfunktion erarbeitet. Fünf der Suppressoren konnten dabei als Komponenten der mitotischen Spindel und des Kinetochors der Spaltheife charakterisiert werden. Durch die genetische Interaktion von *mal3Δ* mit einer Mutante des Mikrotubuli-Plusendkomplexes, welcher wichtig für die Ausbildung der Kinetochor-Mikrotubuli-Verknüpfung ist, wurden zusätzliche Hinweise für eine Funktion des Mal3p Proteins an den Plusenden der Mikrotubulistrukturen erhalten.

## 7 Literaturverzeichnis

- Ackerman, S. H. (2002). Atp11p and Atp12p are chaperones for F(1)-ATPase biogenesis in mitochondria. *Biochim Biophys Acta* **1555**, 101-5.
- Ackerman, S. H. and Tzagoloff, A. (1990). Identification of two nuclear genes (ATP11, ATP12) required for assembly of the yeast F1-ATPase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 4986-90.
- Adachi, Y., Toda, T., Niwa, O. and Yanagida, M. (1986). Differential expressions of essential and nonessential alpha-tubulin genes in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Cell Biol* **6**, 2168-78.
- Adams, R. R., Eckley, D. M., Vagnarelli, P., Wheatley, S. P., Gerloff, D. L., Mackay, A. M., Svingen, P. A., Kaufmann, S. H. and Earnshaw, W. C. (2001a). Human INCENP colocalizes with the Aurora-B/AIRK2 kinase on chromosomes and is overexpressed in tumour cells. *Chromosoma* **110**, 65-74.
- Adams, R. R., Maiato, H., Earnshaw, W. C. and Carmena, M. (2001b). Essential roles of *Drosophila* inner centromere protein (INCENP) and aurora B in histone H3 phosphorylation, metaphase chromosome alignment, kinetochore disjunction, and chromosome segregation. *J Cell Biol* **153**, 865-80.
- Akhmanova, A., Hoogenraad, C. C., Drabek, K., Stepanova, T., Dortland, B., Verkerk, T., Vermeulen, W., Burgering, B. M., De Zeeuw, C. I., Grosveld, F. and Galjart, N. (2001). Clasps are CLIP-115 and -170 associating proteins involved in the regional regulation of microtubule dynamics in motile fibroblasts. *Cell* **104**, 923-35.
- Alfa, C. E. and Hyams, J. S. (1990). Distribution of tubulin and actin through the cell division cycle of the fission yeast *Schizosaccharomyces japonicus* var. *versatilis*: a comparison with *Schizosaccharomyces pombe*. *J Cell Sci* **96 ( Pt 1)**, 71-7.
- Amon, A. (1999). The spindle checkpoint. *Curr Opin Genet Dev* **9**, 69-75.
- Andersen, S. S. (2000). Spindle assembly and the art of regulating microtubule dynamics by MAPs and Stathmin/Op18 [In Process Citation]. *Trends Cell Biol* **10**, 261-7.
- Andre, B., Hein, C., Grenson, M. and Jauniaux, J. C. (1993). Cloning and expression of the UGA4 gene coding for the inducible GABA-specific transport protein of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* **237**, 17-25.
- Appelgren, H., Kniola, B. and Ekwall, K. (2003). Distinct centromere domain structures with separate functions demonstrated in live fission yeast cells. *J Cell Sci* **116**, 4035-42.
- Arai, R., Nakano, K. and Mabuchi, I. (1998). Subcellular localization and possible function of actin, tropomyosin and actin-related protein 3 (Arp3) in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Eur J Cell Biol* **76**, 288-95.
- Askham, J. M., Vaughan, K. T., Goodson, H. V. and Morrison, E. E. (2002). Evidence that an interaction between EB1 and p150(Glued) is required for the formation and maintenance of a radial microtubule array anchored at the centrosome. *Mol Biol Cell* **13**, 3627-45.
- Bahler, J., Wu, J. Q., Longtine, M. S., Shah, N. G., McKenzie, A., 3rd, Steever, A. B., Wach, A., Philippsen, P. and Pringle, J. R. (1998). Heterologous modules for efficient and versatile PCR-based gene targeting in *Schizosaccharomyces pombe* [In Process Citation]. *Yeast* **14**, 943-51.
- Balczon, R. (1996). The centrosome in animal cells and its functional homologs in plant and yeast cells. *Int Rev Cytol* **169**, 25-82.
- Bannister, A. J., Zegerman, P., Partridge, J. F., Miska, E. A., Thomas, J. O., Allshire, R. C. and Kouzarides, T. (2001). Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. *Nature* **410**, 120-4.
- Barbet, N., Muriel, W. J. and Carr, A. M. (1992). Versatile shuttle vectors and genomic libraries for use with *Schizosaccharomyces pombe*. *Gene* **114**, 59-66.
- Barton, N. R. and Goldstein, L. S. (1996). Going mobile: microtubule motors and chromosome segregation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 1735-42.

- Basu, J., Logarinho, E., Herrmann, S., Bousbaa, H., Li, Z., Chan, G. K., Yen, T. J., Sunkel, C. E. and Goldberg, M. L. (1998). Localization of the Drosophila checkpoint control protein Bub3 to the kinetochore requires Bub1 but not Zw10 or Rod. *Chromosoma* **107**, 376-85.
- Baum, M. and Clarke, L. (2000). Fission yeast homologs of human CENP-B have redundant functions affecting cell growth and chromosome segregation. *Mol Cell Biol* **20**, 2852-64.
- Beh, C. T., Cool, L., Phillips, J. and Rine, J. (2001). Overlapping functions of the yeast oxysterol-binding protein homologues. *Genetics* **157**, 1117-40.
- Beinhauer, J. D., Hagan, I. M., Hegemann, J. H. and 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**, 717-28.
- Bernard, P., Maure, J. F., Partridge, J. F., Genier, S., Javerzat, J. P. and Allshire, R. C. (2001). Requirement of heterochromatin for cohesion at centromeres. *Science* **294**, 2539-42.
- Berrueta, L., Kraeft, S. K., Tirnauer, J. S., Schuyler, S. C., Chen, L. B., Hill, D. E., Pellman, D. and Bierer, B. E. (1998). The adenomatous polyposis coli-binding protein EB1 is associated with cytoplasmic and spindle microtubules. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 10596-601.
- Biggins, S., Bhalla, N., Chang, A., Smith, D. L. and Murray, A. W. (2001). Genes involved in sister chromatid separation and segregation in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **159**, 453-70.
- Bischoff, J. R. and Plowman, G. D. (1999). The Aurora/Ipl1p kinase family: regulators of chromosome segregation and cytokinesis. *Trends Cell Biol* **9**, 454-9.
- Bjerling, P. and Ekwall, K. (2002). Centromere domain organization and histone modifications. *Braz J Med Biol Res* **35**, 499-507.
- Bridge, A. J., Morphew, M., Bartlett, R. and Hagan, I. M. (1998). The fission yeast SPB component Cut12 links bipolar spindle formation to mitotic control. *Genes&Development* **12**, 927-942.
- Briones, E., Briones, C., Remacha, M. and Ballesta, J. P. (1998). The GTPase center protein L12 is required for correct ribosomal stalk assembly but not for *Saccharomyces cerevisiae* viability. *J Biol Chem* **273**, 31956-61.
- Browning, H., Hackney, D. D. and Nurse, P. (2003). Targeted movement of cell end factors in fission yeast. *Nat Cell Biol* **5**, 812-8.
- Brunner, D. and Nurse, P. (2000). CLIP170-like tip1p spatially organizes microtubular dynamics in fission yeast. *Cell* **102**, 695-704.
- Bu, W. and Su, L. K. (2001). Regulation of microtubule assembly by human EB1 family proteins. *Oncogene* **20**, 3185-92.
- Bu, W. and Su, L. K. (2003). Characterization of functional domains of human EB1 family proteins. *J Biol Chem*.
- Cahill, D. P., Kinzler, K. W., Vogelstein, B. and Lengauer, C. (1999). Genetic instability and darwinian selection in tumours. *Trends Cell Biol* **9**, 57-60.
- Charrasse, S., Schroeder, M., Gauthier-Rouviere, C., Ango, F., Cassimeris, L., Gard, D. L. and Larroque, C. (1998). The TOGp protein is a new human microtubule-associated protein homologous to the *Xenopus* XMAP215. *J Cell Sci* **111 ( Pt 10)**, 1371-83.
- Cheeseman, I. M., Anderson, S., Jwa, M., Green, E. M., Kang, J., Yates, J. R., 3rd, Chan, C. S., Drubin, D. G. and Barnes, G. (2002a). Phospho-regulation of kinetochore-microtubule attachments by the Aurora kinase Ipl1p. *Cell* **111**, 163-72.
- Cheeseman, I. M., Brew, C., Wolyniak, M., Desai, A., Anderson, S., Muster, N., Yates, J. R., Huffaker, T. C., Drubin, D. G. and Barnes, G. (2001a). Implication of a novel multiprotein Dam1p complex in outer kinetochore function. *J Cell Biol* **155**, 1137-45.
- Cheeseman, I. M., Drubin, D. G. and Barnes, G. (2002b). Simple centromere, complex kinetochore: linking spindle microtubules and centromeric DNA in budding yeast. *J Cell Biol* **157**, 199-203.
- Cheeseman, I. M., Enquist-Newman, M., Muller-Reichert, T., Drubin, D. G. and Barnes, G. (2001b). Mitotic spindle integrity and kinetochore function linked by the Duo1p/Dam1p complex. *J Cell Biol* **152**, 197-212.

- Chen, R. H., Waters, J. C., Salmon, E. D. and Murray, A. W. (1996). Association of spindle assembly checkpoint component XMAD2 with unattached kinetochores. *Science* **274**, 242-6.
- Chikashige, Y., Kinoshita, N., Nakaseko, Y., Matsumoto, T., Murakami, S., Niwa, O. and Yanagida, M. (1989). Composite motifs and repeat symmetry in *S. pombe* centromeres: direct analysis by integration of NotI restriction sites. *Cell* **57**, 739-51.
- Clarke, L. (1998). Centromeres: proteins, protein complexes, and repeated domains at centromeres of simple eukaryotes. *Curr Opin Genet Dev* **8**, 212-8.
- Clarke, L. and Baum, M. P. (1990). Functional analysis of a centromere from fission yeast: a role for centromere-specific repeated DNA sequences. *Mol Cell Biol* **10**, 1863-72.
- Cleveland, D. W., Mao, Y. and Sullivan, K. F. (2003). Centromeres and kinetochores: from epigenetics to mitotic checkpoint signaling. *Cell* **112**, 407-21.
- Cooke, C. A., Heck, M. M. and Earnshaw, W. C. (1987). The inner centromere protein (INCENP) antigens: movement from inner centromere to midbody during mitosis. *J Cell Biol* **105**, 2053-67.
- Cormack, B. P., Bertram, G., Egerton, M., Gow, N. A., Falkow, S. and Brown, A. J. (1997). Yeast-enhanced green fluorescent protein (yEGFP) a reporter of gene expression in *Candida albicans*. *Microbiology* **143**, 303-11.
- Courtwright, A. M. and He, X. (2002). Dam1 is the right one: phosphoregulation of kinetochore biorientation. *Dev Cell* **3**, 610-1.
- Cullen, C. F., Deak, P., Glover, D. M. and Ohkura, H. (1999). mini spindles: A gene encoding a conserved microtubule-associated protein required for the integrity of the mitotic spindle in *Drosophila*. *J Cell Biol* **146**, 1005-18.
- Dang, V. D., Valens, M., Bolotin-Fukuhara, M. and Daignan-Fornier, B. (1996). Cloning of the ASN1 and ASN2 genes encoding asparagine synthetases in *Saccharomyces cerevisiae*: differential regulation by the CCAAT-box-binding factor. *Mol Microbiol* **22**, 681-92.
- Desai, A. and Mitchison, T. J. (1997). Microtubule polymerization dynamics. *Annu Rev Cell Dev Biol* **13**, 83-117.
- DeVoti, J., Seydoux, G., Beach, D. and McLeod, M. (1991). Interaction between ran1+ protein kinase and cAMP dependent protein kinase as negative regulators of fission yeast meiosis. *Embo J* **10**, 3759-68.
- Ding, R., McDonald, K. L. and McIntosh, J. R. (1993). Three-dimensional reconstruction and analysis of mitotic spindles from the yeast, *Schizosaccharomyces pombe*. *J Cell Biol* **120**, 141-51.
- Ding, R., West, R. R., Morphew, D. M., Oakley, B. R. and McIntosh, J. R. (1997). The spindle pole body of *Schizosaccharomyces pombe* enters and leaves the nuclear envelope as the cell cycle proceeds. *Mol Biol Cell* **8**, 1461-79.
- Dragon, F., Gallagher, J. E., Compagnone-Post, P. A., Mitchell, B. M., Porwancher, K. A., Wehner, K. A., Wormsley, S., Settlege, R. E., Shabanowitz, J., Osheim, Y., Beyers, A. L., Hunt, D. F. and Baserga, S. J. (2002). A large nucleolar U3 ribonucleoprotein required for 18S ribosomal RNA biogenesis. *Nature* **417**, 967-70.
- Dujardin, D., Wacker, U. I., Moreau, A., Schroer, T. A., Rickard, J. E. and De Mey, J. R. (1998). Evidence for a role of CLIP-170 in the establishment of metaphase chromosome alignment. *J Cell Biol* **141**, 849-62.
- Durand, B., Vandaele, C., Spencer, D., Pantalacci, S. and Couble, P. (2000). Cloning and characterization of dRFX, the *Drosophila* member of the RFX family of transcription factors. *Gene* **246**, 285-93.
- Earnshaw, W. C. and Cooke, C. A. (1991). Analysis of the distribution of the INCENPs throughout mitosis reveals the existence of a pathway of structural changes in the chromosomes during metaphase and early events in cleavage furrow formation. *J Cell Sci* **98 ( Pt 4)**, 443-61.
- Ekwall, K., Javerzat, J. P., Lorentz, A., Schmidt, H., Cranston, G. and Allshire, R. (1995). The chromodomain protein Swi6: a key component at fission yeast centromeres. *Science* **269**, 1429-31.
- Ekwall, K., Nimmo, E. R., Javerzat, J. P., Borgstrom, B., Egel, R., Cranston, G. and Allshire, R. (1996). Mutations in the fission yeast silencing factors clr4+ and rik1+ disrupt the localisation of the chromo domain protein Swi6p and impair centromere function. *J Cell Sci* **109**, 2637-48.

- Ekwall, K. and Ruusala, T. (1994). Mutations in *rik1*, *clr2*, *clr3* and *clr4* genes asymmetrically derepress the silent mating-type loci in fission yeast. *Genetics* **136**, 53-64.
- Enquist-Newman, M., Cheeseman, I. M., Van Goor, D., Drubin, D. G., Meluh, P. B. and Barnes, G. (2001). Dad1p, third component of the Duo1p/Dam1p complex involved in kinetochore function and mitotic spindle integrity. *Mol Biol Cell* **12**, 2601-13.
- Entrup, R., Langgut, W., Lisowsky, T. and Schweizer, E. (1992). An yeast nuclear mutation conferring temperature-sensitivity to the mitochondrial tryptophanyl-tRNA synthetase. *Curr Genet* **21**, 281-3.
- Feoktistova, A., McCollum, D., Ohi, R. and Gould, K. L. (1999). Identification and characterization of *Schizosaccharomyces pombe* *asp1(+)*, a gene that interacts with mutations in the Arp2/3 complex and actin. *Genetics* **152**, 895-908.
- Fleig, U., Salus, S. S., Karig, I. and Sazer, S. (2000). The Fission Yeast Ran GTPase Is Required for Microtubule Integrity. *J Cell Biol* **151**, 1101-1112.
- Fodde, R., Kuipers, J., Rosenberg, C., Smits, R., Kielman, M., Gaspar, C., Van es, J. H., Breukel, C., Wiegant, J. G., R. H. and Clevers, H. (2001). Mutations in the APC tumour suppressor gene cause chromosomal instability. *Nature Cell Biology* **3**, 433-438.
- Forrova, H., Kolarov, J., Ghislain, M. and Goffeau, A. (1992). Sequence of the novel essential gene YJU2 and two flanking reading frames located within a 3.2 kb EcoRI fragment from chromosome X of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **8**, 419-22.
- Francisco, L., Wang, W. and Chan, C. S. (1994). Type 1 protein phosphatase acts in opposition to IpL1 protein kinase in regulating yeast chromosome segregation. *Mol Cell Biol* **14**, 4731-40.
- Funabiki, H., Hagan, I., Uzawa, S. and Yanagida, M. (1993). Cell cycle-dependent specific positioning and clustering of centromeres and telomeres in fission yeast. *J Cell Biol* **121**, 961-76.
- Funabiki, H., Yamano, H., Kumada, K., Nagao, K., Hunt, T. and Yanagida, M. (1996). Cut2 proteolysis required for sister-chromatid separation in fission yeast. *Nature* **381**, 438-41.
- Gachet, Y., Tournier, S., Millar, J. B. and Hyams, J. S. (2001). A MAP kinase-dependent actin checkpoint ensures proper spindle orientation in fission yeast. *Nature* **412**, 352-5.
- Garcia, M. A., Koonrugsa, N. and Toda, T. (2002). Spindle-kinetochore attachment requires the combined action of Kin I-like Klp5/6 and Alp14/Dis1-MAPs in fission yeast. *Embo J* **21**, 6015-24.
- Garcia, M. A., Vardy, L., Koonrugsa, N. and 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**, 3389-401.
- Gard, D. L. and Kirschner, M. W. (1987). A microtubule-associated protein from *Xenopus* eggs that specifically promotes assembly at the plus-end. *J Cell Biol* **105**, 2203-15.
- Gardner, R. D. and Burke, D. J. (2000). The spindle checkpoint: two transitions, two pathways. *trends in Cell Biology* **10**, 154-158.
- Giaever, G., Chu, A. M., Ni, L., Connelly, C., Riles, L., Veronneau, S., Dow, S., Lucau-Danila, A., Anderson, K., Andre, B., Arkin, A. P., Astromoff, A., El-Bakkoury, M., Bangham, R., Benito, R., Brachat, S., Campanaro, S., Curtiss, M., Davis, K., Deutschbauer, A., Entian, K. D., Flaherty, P., Foury, F., Garfinkel, D. J., Gerstein, M., Gotte, D., Guldener, U., Hegemann, J. H., Hempel, S., Herman, Z., Jaramillo, D. F., Kelly, D. E., Kelly, S. L., Kotter, P., LaBonte, D., Lamb, D. C., Lan, N., Liang, H., Liao, H., Liu, L., Luo, C., Lussier, M., Mao, R., Menard, P., Ooi, S. L., Revuelta, J. L., Roberts, C. J., Rose, M., Ross-Macdonald, P., Scherens, B., Schimmack, G., Shafer, B., Shoemaker, D. D., Sookhai-Mahadeo, S., Storms, R. K., Strathern, J. N., Valle, G., Voet, M., Volckaert, G., Wang, C. Y., Ward, T. R., Wilhelmy, J., Winzeler, E. A., Yang, Y., Yen, G., Youngman, E., Yu, K., Bussey, H., Boeke, J. D., Snyder, M., Philippsen, P., Davis, R. W. and Johnston, M. (2002). Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nature* **418**, 387-91.
- Giet, R. and Prigent, C. (1999). Aurora/Ipl1p-related kinases, a new oncogenic family of mitotic serine-threonine kinases. *J Cell Sci* **112 ( Pt 21)**, 3591-601.

- Gietz, D., St. Jean, A., Woods, R. A. and Schiestl, R. H. (1992). Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acids Res* **20**, 1425.
- Goh, P. Y. and Kilmartin, J. V. (1993). NDC10: a gene involved in chromosome segregation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* **121**, 503-12.
- Goldstein, L. S. (1993). Functional redundancy in mitotic force generation. *J Cell Biol* **120**, 1-3.
- Goshima, G., Saitoh, S. and 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.
- Goshima, G. and Yanagida, M. (2000). Establishing biorientation occurs with precocious separation of the sister kinetochores, but not the arms, in the early spindle of budding yeast. *Cell* **100**, 619-33.
- Gossen, M. and Bujard, H. (1992). Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 5547-51.
- Groden, J., Thliveris, A., Samowitz, W., Carlson, M., Gelbert, L., Albertsen, H., Joslyn, G., Stevens, J., Spirio, L., Robertson, M. and et al. (1991). Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene. *Cell* **66**, 589-600.
- Gunawardane, R. N., Lizarraga, S. B., Wiese, C., Wilde, A. and Zheng, Y. (2000). gamma-Tubulin complexes and their role in microtubule nucleation. *Curr Top Dev Biol* **49**, 55-73.
- Hagan, I. and Yanagida, M. (1990). Novel potential mitotic motor protein encoded by the fission yeast *cut7+* gene. *Nature* **347**, 563-6.
- Hagan, I. and Yanagida, M. (1992). Kinesin-related *cut7* protein associates with mitotic and meiotic spindles in fission yeast. *Nature* **356**, 74-6.
- Hagan, I. and 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**, 1033-47.
- Hagan, I. M. (1998). The fission yeast microtubule cytoskeleton. *J Cell Sci* **111**, 1603-12.
- Hagan, I. M. and Hyams, J. S. (1988). The use of cell division cycle mutants to investigate the control of microtubule distribution in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J Cell Sci* **89 ( Pt 3)**, 343-57.
- Hagan, I. M. and Hyams, J. S. (1996). Forces acting on the fission yeast anaphase spindle. *Cell Motil Cytoskeleton* **34**, 69-75.
- Hagan, I. M. and Petersen, J. (2000). The microtubule organizing centers of *Schizosaccharomyces pombe*. *Curr Top Dev Biol* **49**, 133-59.
- Hahnenberger, K. M., Carbon, J. and Clarke, L. (1991). Identification of DNA regions required for mitotic and meiotic functions within the centromere of *Schizosaccharomyces pombe* chromosome I. *Mol Cell Biol* **11**, 2206-15.
- Hayashi, I. and Ikura, M. (2003). Crystal structure of the amino-terminal microtubule-binding domain of end-binding protein 1 (EB1). *J Biol Chem* **278**, 36430-4.
- Hayles, J. and Nurse, P. (2001). A journey into space. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 647-56.
- He, X., Jones, M. H., Winey, M. and 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**, 1635-47.
- He, X., Patterson, T. E. and Sazer, S. (1997). The *Schizosaccharomyces pombe* spindle checkpoint protein *mad2p* blocks anaphase and genetically interacts with the anaphase-promoting complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 7965-70.
- He, X., Rines, D. R., Espelin, C. W. and Sorger, P. K. (2001). Molecular analysis of kinetochore-microtubule attachment in budding yeast. *Cell* **106**, 195-206.
- Hegemann, J. H., Klein, S., Heck, S., Guldener, U., Niedenthal, R. K. and Fleig, U. (1999). A fast method to diagnose chromosome and plasmid loss in *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Yeast* **15**, 1009-19.
- Hoffman, C. S. and Winston, F. (1987). A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene* **57**, 267-72.
- Horio, T. and Oakley, B. R. (1994). Human gamma-tubulin functions in fission yeast. *J Cell Biol* **126**, 1465-73.
- Horio, T., Uzawa, S., Jung, M. K., Oakley, B. R., Tanaka, K. and Yanagida, M. (1991). The fission yeast gamma-tubulin is essential for mitosis and is localized at microtubule organizing centers. *J Cell Sci* **99 ( Pt 4)**, 693-700.

- Hoyt, M. A., He, L., Loo, K. K. and Saunders, W. S. (1992). Two *Saccharomyces cerevisiae* kinesin-related gene products required for mitotic spindle assembly. *J Cell Biol* **118**, 109-20.
- Hwang, E., Kusch, J., Barral, Y. and Huffaker, T. C. (2003). Spindle orientation in *Saccharomyces cerevisiae* depends on the transport of microtubule ends along polarized actin cables. *J Cell Biol* **161**, 483-8.
- Hyland, K. M., Kingsbury, J., Koshland, D. and Hieter, P. (1999). Ctf19p: A novel kinetochore protein in *Saccharomyces cerevisiae* and a potential link between the kinetochore and mitotic spindle. *J Cell Biol* **145**, 15-28.
- Ichii, S., Horii, A., Nakatsuru, S., Furuyama, J., Utsunomiya, J. and Nakamura, Y. (1992). Inactivation of both APC alleles in an early stage of colon adenomas in a patient with familial adenomatous polyposis (FAP). *Hum Mol Genet* **1**, 387-90.
- Ikui, A. E., Furuya, K., Yanagida, M. and Matsumoto, T. (2002). Control of localization of a spindle checkpoint protein, Mad2, in fission yeast. *J Cell Sci* **115**, 1603-10.
- Inoue, Y. H., do Carmo Avides, M., Shiraki, M., Deak, P., Yamaguchi, M., Nishimoto, Y., Matsukage, A. and Glover, D. M. (2000). Orbit, a novel microtubule-associated protein essential for mitosis in *Drosophila melanogaster*. *J Cell Biol* **149**, 153-66.
- Irelan, J. T., Gutkin, G. I. and Clarke, L. (2001). Functional redundancies, distinct localizations and interactions among three fission yeast homologs of centromere protein-B. *Genetics* **157**, 1191-203.
- Ish Horowicz, D. and Burke, J. F. (1981). Rapid and efficient cosmid cloning. *Nucleic Acids Res* **9**, 2989-98.
- Iwanejko, L., Smith, K. N., Loeillet, S., Nicolas, A. and Fabre, F. (1999). Disruption and functional analysis of six ORFs on chromosome XV: YOL117w, YOL115w (TRF4), YOL114c, YOL112w (MSB4), YOL111c and YOL072w. *Yeast* **15**, 1529-39.
- Janke, C., Ortiz, J., Lechner, J., Shevchenko, A., Shevchenko, A., Magiera, M. M., Schramm, C. and Schiebel, E. (2001). The budding yeast proteins Spc24p and Spc25p interact with Ndc80p and Nuf2p at the kinetochore and are important for kinetochore clustering and checkpoint control. *EMBO Journal* **20**, 777-791.
- Janke, C., Ortiz, J., Tanaka, T. U., Lechner, J. and Schiebel, E. (2002). Four new subunits of the Dam1-Duo1 complex reveal novel functions in sister kinetochore biorientation. *Embo J* **21**, 181-93.
- Jehn, B., Niedenthal, R. and Hegemann, J. H. (1991). In vivo analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* centromere CDEIII sequence: requirements for mitotic chromosome segregation. *Mol Cell Biol* **11**, 5212-21.
- Jeong, J. W., Rhee, D. K., Cho, S. Y., Hae, K. L., Kim, D. U., Won, M. and Kim, H. B. (2002). Cloning and characterization of the kinesin-related protein, Krp1p, in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Cells* **13**, 389-98.
- Jiang, B., Brown, J. L., Sheraton, J., Fortin, N. and Bussey, H. (1994). A new family of yeast genes implicated in ergosterol synthesis is related to the human oxysterol binding protein. *Yeast* **10**, 341-53.
- Jin, Q. W., Fuchs, J. and Loidl, J. (2000). Centromere clustering is a major determinant of yeast interphase nuclear organization. *J Cell Sci* **113** ( Pt 11), 1903-12.
- Jin, Q. W., Pidoux, A. L., Decker, C., Allshire, R. C. and Fleig, U. (2002). The mal2p protein is an essential component of the fission yeast centromere. *Mol Cell Biol* **22**, 7168-83.
- Joazeiro, C. A., Kassavetis, G. A. and Geiduschek, E. P. (1996). Alternative outcomes in assembly of promoter complexes: the roles of TBP and a flexible linker in placing TFIIIB on tRNA genes. *Genes Dev* **10**, 725-39.
- John, T. R., Ghosh, M. and Johnson, J. D. (1997). Identification and expression of the *Saccharomyces cerevisiae* cytoplasmic tryptophanyl-tRNA synthetase gene. *Yeast* **13**, 37-41.
- Johnson, J. D., Spellman, J. M., White, K. H., Barr, K. K. and John, T. R. (2002). Human tryptophanyl-tRNA synthetase can efficiently complement the *Saccharomyces cerevisiae* homologue, Wrs1P. *FEMS Microbiol Lett* **216**, 111-5.
- Juwana, J. P., Henderikx, P., Mischo, A., Wadle, A., Fadle, N., Gerlach, K., Arends, J. W., Hoogenboom, H., Freudschuh, M. and Renner, C. (1999). EB/RP gene family encodes tubulin binding proteins. *International Journal of Cancer* **81**, 275-284.
- Kaiser, C., Michaelis, S. and Mitchell, A. (1994). *Methods in Yeast Genetics*, 1994 edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- Kaitna, S., Mendoza, M., Jantsch-Plunger, V. and Glotzer, M. (2000). Incenp and an aurora-like kinase form a complex essential for chromosome segregation and efficient completion of cytokinesis. *Curr Biol* **10**, 1172-81.
- Kang, J., Cheeseman, I. M., Kallstrom, G., Velmurugan, S., Barnes, G. and Chan, C. S. (2001). Functional cooperation of Dam1, Ipl1, and the inner centromere protein (INCENP)-related protein Sli15 during chromosome segregation. *J Cell Biol* **155**, 763-74.
- Kaplan, K. B., Burds, A. A., Swedlow, J. R., Bekir, S. S., Sorger, P. K. and Nathke, I. S. (2001). A role for the Adenomatous Polyposis Coli protein in chromosome segregation. *Nat Cell Biol* **3**, 429-32.
- Khamessan, A., Naghibalhossaini, F., Vedadi, M. and Johnstone, R. M. (2001). Mutated-gamma-actin restores growth to a yeast amino acid transport defective mutant. *J Cell Physiol* **186**, 124-35.
- Kim, D. W. (2003). Characterization of Grp1p, a novel cis-Golgi matrix protein. *Biochem Biophys Res Commun* **303**, 370-8.
- Kimura, Y., Takaoka, M., Tanaka, S., Sassa, H., Tanaka, K., Polevoda, B., Sherman, F. and Hirano, H. (2000). N(alpha)-acetylation and proteolytic activity of the yeast 20 S proteasome. *J Biol Chem* **275**, 4635-9.
- Kinzler, K. W. and Vogelstein, B. (1996). Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* **87**, 159-70.
- Kitazono, A. A., Garza, D. A. and Kron, S. J. (2003). Mutations in the yeast cyclin-dependent kinase Cdc28 reveal a role in the spindle assembly checkpoint. *Mol Genet Genomics* **269**, 672-84.
- Kniola, B., O'Toole, E., McIntosh, J. R., Mellone, B., Allshire, R., Mengarelli, S., Hultenby, K. and Ekwall, K. (2001). The domain structure of centromeres is conserved from fission yeast to humans. *Mol Biol Cell* **12**, 2767-75.
- Lachner, M., O'Carroll, D., Rea, S., Mechtler, K. and Jenuwein, T. (2001). Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature* **410**, 116-20.
- Lemos, C. L., Sampaio, P., Maiato, H., Costa, M., Omel'yanchuk, L. V., Liberal, V. and Sunkel, C. E. (2000). Mast, a conserved microtubule-associated protein required for bipolar mitotic spindle organization. *Embo J* **19**, 3668-82.
- Lengauer, C., Kinzler, K. W. and Vogelstein, B. (1998). Genetic instabilities in human cancers. *Nature* **396**, 643-9.
- Leveson, J. D., Huang, H. K., Forsburg, S. L. and Hunter, T. (2002). The Schizosaccharomyces pombe aurora-related kinase Ark1 interacts with the inner centromere protein Pic1 and mediates chromosome segregation and cytokinesis. *Mol Biol Cell* **13**, 1132-43.
- Li, R. and Murray, A. W. (1991). Feedback control of mitosis in budding yeast [published erratum appears in Cell 1994 Oct 21;79(2):following 388]. *Cell* **66**, 519-31.
- Li, X., Rivas, M. P., Fang, M., Marchena, J., Mehrotra, B., Chaudhary, A., Feng, L., Prestwich, G. D. and Bankaitis, V. A. (2002a). Analysis of oxysterol binding protein homologue Kes1p function in regulation of Sec14p-dependent protein transport from the yeast Golgi complex. *J Cell Biol* **157**, 63-77.
- Li, X., Routt, S. M., Xie, Z., Cui, X., Fang, M., Kearns, M. A., Bard, M., Kirsch, D. R. and Bankaitis, V. A. (2000). Identification of a novel family of nonclassic yeast phosphatidylinositol transfer proteins whose function modulates phospholipase D activity and Sec14p-independent cell growth. *Mol Biol Cell* **11**, 1989-2005.
- Li, Y., Bachant, J., Alcasabas, A. A., Wang, Y., Qin, J. and Elledge, S. J. (2002b). The mitotic spindle is required for loading of the DASH complex onto the kinetochore. *Genes Dev* **16**, 183-97.
- Li, Y. and Benezra, R. (1996). Identification of a human mitotic checkpoint gene: hsMAD2. *Science* **274**, 246-8.
- Liao, Y., Willis, I. M. and Moir, R. D. (2003). The Brf1 and Bdp1 subunits of transcription factor TFIIIB bind to overlapping sites in the tetratricopeptide repeats of Tfc4. *J Biol Chem* **278**, 44467-74.
- Lin, H., de Carvalho, P., Kho, D., Tai, C. Y., Pierre, P., Fink, G. R. and Pellman, D. (2001). Polyploids require Bik1 for kinetochore-microtubule attachment. *J Cell Biol* **155**, 1173-84.
- Litt, M. D., Simpson, M., Gaszner, M., Allis, C. D. and Felsenfeld, G. (2001). Correlation between histone lysine methylation and developmental changes at the chicken beta-globin locus. *Science* **293**, 2453-5.
- Longtine, M. S., McKenzie, A., 3rd, Demarini, D. J., Shah, N. G., Wach, A., Brachat, A., Philippsen, P. and Pringle, J. R. (1998). Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **14**, 953-61.

- Lu, B., Roegiers, F., Jan, L. Y. and Jan, Y. N. (2001). Adherens junctions inhibit asymmetric division in the *Drosophila* epithelium. *Nature* **409**, 522-5.
- Machesky, L. M. and Gould, K. L. (1999). The Arp2/3 complex: a multifunctional actin organizer. *Curr Opin Cell Biol* **11**, 117-21.
- Mackay, A. M., Ainsztein, A. M., Eckley, D. M. and Earnshaw, W. C. (1998). A dominant mutant of inner centromere protein (INCENP), a chromosomal protein, disrupts prometaphase congression and cytokinesis. *J Cell Biol* **140**, 991-1002.
- Maiato, H., Fairley, E. A., Rieder, C. L., Swedlow, J. R., Sunkel, C. E. and Earnshaw, W. C. (2003). Human CLASP1 is an outer kinetochore component that regulates spindle microtubule dynamics. *Cell* **113**, 891-904.
- Maiato, H., Sampaio, P., Lemos, C. L., Findlay, J., Carmena, M., Earnshaw, W. C. and Sunkel, C. E. (2002). MAST/Orbit has a role in microtubule-kinetochore attachment and is essential for chromosome alignment and maintenance of spindle bipolarity. *J Cell Biol* **157**, 749-60.
- Maniatis, T., Fritsch, E. F. and Sambrook, J. (1989). "Molecular cloning. A laboratory manual." Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Manning, B. D. and Snyder, M. (2000). Drivers and passengers wanted! the role of kinesin-associated proteins. *Trends Cell Biol* **10**, 281-9.
- Martin-Yken, H., Dagkessamanskaia, A., De Groot, P., Ram, A., Klis, F. and Francois, J. (2001). *Saccharomyces cerevisiae* YCRO17c/CWH43 encodes a putative sensor/transporter protein upstream of the BCK2 branch of the PKC1-dependent cell wall integrity pathway. *Yeast* **18**, 827-40.
- Mastronarde, D. N., McDonald, K. L., Ding, R. and McIntosh, J. R. (1993). Interpolar spindle microtubules in PTK cells. *J Cell Biol* **123**, 1475-89.
- Masuda, H., Sevik, M. and Cande, W. Z. (1992). In vitro microtubule-nucleating activity of spindle pole bodies in fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*: cell cycle-dependent activation in xenopus cell-free extracts. *J Cell Biol* **117**, 1055-66.
- Mata, J. and Nurse, P. (1997). *tea1* and the microtubular cytoskeleton are important for generating global spatial order within the fission yeast cell. *Cell* **89**, 939-49.
- Mathe, E., Inoue, Y. H., Palframan, W., Brown, G. and Glover, D. M. (2003). Orbit/Mast, the CLASP orthologue of *Drosophila*, is required for asymmetric stem cell and cystocyte divisions and development of the polarised microtubule network that interconnects oocyte and nurse cells during oogenesis. *Development* **130**, 901-15.
- McClelland, M. L., Kallio, M. J., Barrett-Wilt, G. A., Kestner, C. A., Shabanowitz, J., Hunt, D. F., Gorbisky, G. J. and Stukenberg, P. T. (2004). The vertebrate Ndc80 complex contains Spc24 and Spc25 homologs, which are required to establish and maintain kinetochore-microtubule attachment. *Curr Biol* **14**, 131-7.
- McCollum, D., Feoktistova, A., Morphew, M., Balasubramanian, M. and Gould, K. L. (1996). The *Schizosaccharomyces pombe* actin-related protein, Arp3, is a component of the cortical actin cytoskeleton and interacts with profilin. *Embo J* **15**, 6438-46.
- McDonald, K. L., O'Toole, E. T., Mastronarde, D. N. and McIntosh, J. R. (1992). Kinetochore microtubules in PTK cells. *J Cell Biol* **118**, 369-83.
- McEwen, B. F., Heagle, A. B., Cassels, G. O., Buttle, K. F. and Rieder, C. L. (1997). Kinetochore fiber maturation in PtK1 cells and its implications for the mechanisms of chromosome congression and anaphase onset. *J Cell Biol* **137**, 1567-80.
- Measday, V., Hailey, D. W., Pot, I., Givan, S. A., Hyland, K. M., Cagney, G., Fields, S., Davis, T. N. and Hieter, P. (2002). Ctf3p, the Mis6 budding yeast homolog, interacts with Mcm22p and Mcm16p at the yeast outer kinetochore. *Genes Dev* **16**, 101-13.
- Meluh, P. B., Yang, P., Glowczewski, L., Koshland, D. and Smith, M. M. (1998). Cse4p is a component of the core centromere of *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell* **94**, 607-13.

- Miller, R. K., Cheng, S. C. and Rose, M. D. (2000). Bim1p/Yeb1p mediates the Kar9p-dependent cortical attachment of cytoplasmic microtubules. *Mol Biol Cell* **11**, 2949-59.
- Mimori-Kiyosue, Y., Shiina, N. and Tsukita, S. (2000). The dynamic behavior of the APC-binding protein EB1 on the distal ends of microtubules. *Curr Biol* **10**, 865-8.
- Mimori-Kiyosue, Y. and Tsukita, S. (2003). "Search-and-Capture" of Microtubules through Plus-End-Binding Proteins (+TIPs). *J Biochem (Tokyo)* **134**, 321-6.
- Mitchison, T. J. and Kirschner, M. W. (1984). Dynamic instability of microtubule growth. *Nature* **312**, 237-242.
- Moreno, M. B., Duran, A. and Ribas, J. C. (2000). A family of multifunctional thiamine-repressible expression vectors for fission yeast. *Yeast* **16**, 861-72.
- Moreno, S., Klar, A. and Nurse, P. (1991). Molecular genetic analysis of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Methods Enzymol* **194**, 795-823.
- Murakami, S., Matsumoto, T., Niwa, O. and Yanagida, M. (1991). Structure of the fission yeast centromere cen3: direct analysis of the reiterated inverted region. *Chromosoma* **101**, 214-21.
- Myers, A. M. and Tzagoloff, A. (1985). MSW, a yeast gene coding for mitochondrial tryptophanyl-tRNA synthetase. *J Biol Chem* **260**, 15371-7.
- Nabeshima, K., Kurooka, H., Takeuchi, M., Kinoshita, K., Nakaseko, Y. and Yanagida, M. (1995). p93dis1, which is required for sister chromatid separation, is a novel microtubule and spindle pole body-associating protein phosphorylated at the Cdc2 target sites. *Genes Dev* **9**, 1572-85.
- Nakagawa, H., Lee, J. K., Hurwitz, J., Allshire, R. C., Nakayama, J., Grewal, S. I., Tanaka, K. and Murakami, Y. (2002). Fission yeast CENP-B homologs nucleate centromeric heterochromatin by promoting heterochromatin-specific histone tail modifications. *Genes Dev* **16**, 1766-78.
- Nakamichi, N., Yamamoto, E., Yamada, H., Aiba, H. and Mizuno, T. (2000). Identification and characterization of a novel gene, *hos2+*, the function of which is necessary for growth under high osmotic stress in fission yeast. *Biosci Biotechnol Biochem* **64**, 2493-6.
- Nakaseko, Y., Goshima, G., Morishita, J. and Yanagida, M. (2001). M phase-specific kinetochore proteins in fission yeast. Microtubule- associating Dis1 and Mtc1 display rapid separation and segregation during anaphase. *Curr Biol* **11**, 537-49.
- Nakaseko, Y., Nabeshima, K., Kinoshita, K. and Yanagida, M. (1996). Dissection of fission yeast microtubule associating protein p93Dis1: regions implicated in regulated localization and microtubule interaction. *Genes Cells* **1**, 633-44.
- Nakayama, J., Rice, J. C., Strahl, B. D., Allis, C. D. and Grewal, S. I. (2001). Role of histone H3 lysine 9 methylation in epigenetic control of heterochromatin assembly. *Science* **292**, 110-3.
- Nekrasov, V. S., Smith, M. A., Peak-Chew, S. and Kilmartin, J. V. (2003). Interactions between centromere complexes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **14**, 4931-46.
- Nishisho, I., Nakamura, Y., Miyoshi, Y., Miki, Y., Ando, H., Horii, A., Koyama, K., Utsunomiya, J., Baba, S. and Hedge, P. (1991). Mutations of chromosome 5q21 genes in FAP and colorectal cancer patients. *Science* **253**, 665-9.
- Niwa, O., Matsumoto, T. and Yanagida, M. (1986). Construction of a mini-chromosome by deletion and its mitotic and meiotic behaviour in fission yeast. *Mol Gen Genet* **203**, 397-405.
- Noma, K., Allis, C. D. and Grewal, S. I. (2001). Transitions in distinct histone H3 methylation patterns at the heterochromatin domain boundaries. *Science* **293**, 1150-5.
- Nonaka, N., Kitajima, T., Yokobayashi, S., Xiao, G., Yamamoto, M., Grewal, S. I. and Watanabe, Y. (2002). Recruitment of cohesin to heterochromatic regions by Swi6/HP1 in fission yeast. *Nat Cell Biol* **4**, 89-93.
- Ohi, M. D., Link, A. J., Ren, L., Jennings, J. L., McDonald, W. H. and Gould, K. L. (2002). Proteomics analysis reveals stable multiprotein complexes in both fission and budding yeasts containing Myb-related Cdc5p/Cef1p, novel pre-mRNA splicing factors, and snRNAs. *Mol Cell Biol* **22**, 2011-24.

- Ohkura, H., Adachi, Y., Kinoshita, N., Niwa, O., Toda, T. and Yanagida, M. (1988). Cold-sensitive and caffeine-supersensitive mutants of the *Schizosaccharomyces pombe* dis genes implicated in sister chromatid separation during mitosis. *Embo J* **7**, 1465-73.
- Okazaki, K., Okazaki, N., Kume, K., Jinno, S., Tanaka, K. and Okayama, H. (1990). High-frequency transformation method and library transducing vectors for cloning mammalian cDNAs by trans-complementation of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nucleic Acids Res* **18**, 6485-9.
- Oliferenko, S. and Balasubramanian, M. K. (2002). Astral microtubules monitor metaphase spindle alignment in fission yeast. *Nat Cell Biol* **4**, 816-20.
- Partridge, J. F., Borgstrom, B. and Allshire, R. C. (2000). Distinct protein interaction domains and protein spreading in a complex centromere. *Genes and Development* **14**, 783-791.
- Pasqualone, D. and Huffaker, T. C. (1994). STU1, a suppressor of a beta-tubulin mutation, encodes a novel and essential component of the yeast mitotic spindle. *J Cell Biol* **127**, 1973-84.
- Penney, M., Wilkinson, C., Wallace, M., Javerzat, J. P., Ferrell, K., Seeger, M., Dubiel, W., McKay, S., Allshire, R. and Gordon, C. (1998). The Pad1+ gene encodes a subunit of the 26 S proteasome in fission yeast. *J Biol Chem* **273**, 23938-45.
- Perez, F., Diamantopoulos, G. S., Stalder, R. and Kreis, T. E. (1999). CLIP-170 highlights growing microtubule ends in vivo. *Cell* **96**, 517-27.
- Petersen, J., Paris, J., Willer, M., Philippe, M. and Hagan, I. M. (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**, 4371-84.
- Pidoux, A. L. and C., A. R. (2000a). Centromeres: getting a grip of chromosomes. *Current Opinion in Cell Biology* **12**, 308-319.
- Pidoux, A. L., LeDizet, M. and Cande, W. Z. (1996). Fission yeast pkl1 is a kinesin-related protein involved in mitotic spindle function. *Molecular Biology of the Cell* **7**, 1639-1655.
- Pidoux, A. L., Richardson, W. and Allshire, R. C. (2003). Sim4: a novel fission yeast kinetochore protein required for centromeric silencing and chromosome segregation. *J Cell Biol* **161**, 295-307.
- Pidoux, A. L., Uzawa, S., Perry, P. E., Cande, W. Z. and Allshire, R. C. (2000b). Live analysis of lagging chromosomes during anaphase and their effect on spindle elongation rate in fission yeast. *J Cell Sci* **113 Pt 23**, 4177-91.
- Pluta, A. F., Cooke, C. A. and Earnshaw, W. C. (1990). Structure of the human centromere at metaphase. *Trends Biochem Sci* **15**, 181-5.
- Pluta, A. F., Mackay, A. M., Ainsztein, A. M., Goldberg, I. G. and Earnshaw, W. C. (1995). The centromere: hub of chromosomal activities. *Science* **270**, 1591-4.
- Pluta, K., Lefebvre, O., Martin, N. C., Smagowicz, W. J., Stanford, D. R., Ellis, S. R., Hopper, A. K., Sentenac, A. and Boguta, M. (2001). Maf1p, a negative effector of RNA polymerase III in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **21**, 5031-40.
- Polakis, P. (1997). The adenomatous polyposis coli (APC) tumor suppressor. *Biochim Biophys Acta* **1332**, F127-47.
- Polevoda, B., Cardillo, T. S., Doyle, T. C., Bedi, G. S. and Sherman, F. (2003). Nat3p and Mdm20p are required for function of yeast NatB Nalpha-terminal acetyltransferase and of actin and tropomyosin. *J Biol Chem* **278**, 30686-97.
- Pot, I., Measday, V., Snysman, B., Cagney, G., Fields, S., Davis, T. N., Muller, E. G. and Hieter, P. (2003). Chl4p and iml3p are two new members of the budding yeast outer kinetochore. *Mol Biol Cell* **14**, 460-76.
- Prasher, D. C. (1995). Using GFP to see the light. *Trends Genet* **11**, 320-3.
- Radcliffe, P., Hirata, D., Childs, D., Vardy, L. and Toda, T. (1998). Identification of novel temperature-sensitive lethal alleles in essential beta-tubulin and nonessential alpha 2-tubulin genes as fission yeast polarity mutants. *Mol Biol Cell* **9**, 1757-71.

- Rea, S., Eisenhaber, F., O'Carroll, D., Strahl, B. D., Sun, Z. W., Schmid, M., Opravil, S., Mechtler, K., Ponting, C. P., Allis, C. D. and Jenuwein, T. (2000). Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature* **406**, 593-9.
- Regnacq, M., Ferreira, T., Puard, J. and Berges, T. (2002). SUT1 suppresses sec14-1 through upregulation of CSR1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Lett* **216**, 165-70.
- Rehberg, M. and Graf, R. (2002). Dictyostelium EB1 is a genuine centrosomal component required for proper spindle formation. *Mol Biol Cell* **13**, 2301-10.
- Renner, C., Pfitzenmeier, J. P., Gerlach, K., Held, G., Ohnesorge, S., Sahin, U., Bauer, S. and Pfreundschuh, M. (1997). RP1, a new member of the adenomatous polyposis coli-binding EB1-like gene family, is differentially expressed in activated T cells. *J Immunol* **159**, 1276-83.
- Rogers, S. L., Rogers, G. C., Sharp, D. J. and Vale, R. D. (2002). Drosophila EB1 is important for proper assembly, dynamics, and positioning of the mitotic spindle. *J Cell Biol* **158**, 873-84.
- Rotondo, G. and Frendewey, D. (2001). Pac1 ribonuclease of *Schizosaccharomyces pombe*. *Methods Enzymol* **342**, 168-93.
- Saitoh, S., Takahashi, K. and Yanagida, M. (1997). Mis6, a fission yeast inner centromere protein, acts during G1/S and forms specialized chromatin required for equal segregation. *Cell* **90**, 131-43.
- Sassoon, I., Severin, F. F., Andrews, P. D., Taba, M. R., Kaplan, K. B., Ashford, A. J., Stark, M. J., Sorger, P. K. and Hyman, A. A. (1999). Regulation of *Saccharomyces cerevisiae* kinetochores by the type 1 phosphatase Glc7p. *Genes Dev* **13**, 545-55.
- Sato, M., Vardy, L., Angel Garcia, M., Koonruga, N. and Toda, T. (2004). Interdependency of Fission Yeast Alp14/TOG and Coiled Coil Protein Alp7 in Microtubule Localization and Bipolar Spindle Formation. *Mol Biol Cell* **15**, 1609-22.
- Scharfenberger, M., Ortiz, J., Grau, N., Janke, C., Schiebel, E. and Lechner, J. (2003). Nsl1p is essential for the establishment of bipolarity and the localization of the Dam-Duo complex. *Embo J* **22**, 6584-97.
- Schuyler, S. C. and Pellman, D. (2001). Microtubule "plus-end-tracking proteins": The end is just the beginning. *Cell* **105**, 421-4.
- Schwartz, K., Richards, K. and Botstein, D. (1997). BIM1 Encodes a Microtubule-binding Protein in Yeast. *Mol Biol Cell* **8**, 2677-91.
- Shang, C., Hazbun, T. R., Cheeseman, I. M., Aranda, J., Fields, S., Drubin, D. G. and Barnes, G. (2003). Kinetochores protein interactions and their regulation by the Aurora kinase Ipl1p. *Mol Biol Cell* **14**, 3342-55.
- Shannon, K. B. and Salmon, E. D. (2002). Chromosome dynamics: new light on Aurora B kinase function. *Curr Biol* **12**, R458-60.
- Sharp, D. J. (2002). Cell division: MAST sails through mitosis. *Curr Biol* **12**, R585-7.
- Shimanuki, M., Saka, Y., Yanagida, M. and Toda, T. (1995). A novel essential fission yeast gene *pad1+* positively regulates *pap1(+)*-dependent transcription and is implicated in the maintenance of chromosome structure. *J Cell Sci* **108 ( Pt 2)**, 569-79.
- Stearns, T. (1997). Motoring to the finish: kinesin and dynein work together to orient the yeast mitotic spindle. *J Cell Biol* **138**, 957-60.
- Steinberg, G. (2000). The cellular roles of molecular motors in fungi. *Trends Microbiol* **8**, 162-8.
- Su, L. K., Burrell, M., Hill, D. E., Gyuris, J., Brent, R., Wiltshire, R., Trent, J., Vogelstein, B. and Kinzler, K. W. (1995). APC binds to the novel protein EB1. *Cancer Res* **55**, 2972-7.
- Su, S. Y. and Yanagida, M. (1997). The molecular and cellular biology of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, p. 765-826
- Takahashi, K., Chen, E. S. and Yanagida, M. (2000). Requirement of Mis6 centromere connector for localizing a CENP-A - like protein in fission yeast. *Science* **288**, 2215-2219.

- Takahashi, K., Murakami, S., Chikashige, Y., Funabiki, H., Niwa, O. and Yanagida, M. (1992). A low copy number central sequence with strict symmetry and unusual chromatin structure in fission yeast centromere. *Mol Biol Cell* **3**, 819-35.
- Tallada, V. A., Daga, R. R., Palomeque, C., Garzon, A. and Jimenez, J. (2002). Genome-wide search of *Schizosaccharomyces pombe* genes causing overexpression-mediated cell cycle defects. *Yeast* **19**, 1139-51.
- Tanaka, K. and Kanbe, T. (1986). Mitosis in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* as revealed by freeze-substitution electron microscopy. *J Cell Sci* **80**, 253-68.
- Tanaka, T. U., Rachidi, N., Janke, C., Pereira, G., Galova, M., Schiebel, E., Stark, M. J. and Nasmyth, K. (2002). Evidence that the Ipl1-Sli15 (Aurora kinase-INCENP) complex promotes chromosome bi-orientation by altering kinetochore-spindle pole connections. *Cell* **108**, 317-29.
- Taylor, S. S., Ha, E. and McKeon, F. (1998). The human homologue of Bub3 is required for kinetochore localization of Bub1 and a Mad3/Bub1-related protein kinase. *J Cell Biol* **142**, 1-11.
- Tirnauer, J. S. and Bierer, B. E. (2000). EB1 Proteins Regulate Microtubule Dynamics, Cell Polarity, and Chromosome Stability. *J Cell Biol* **149**, 761-766.
- Tirnauer, J. S., Canman, J. C., Salmon, E. D. and Mitchison, T. J. (2002a). EB1 targets to kinetochores with attached, polymerizing microtubules. *Mol Biol Cell* **13**, 4308-16.
- Tirnauer, J. S., Grego, S., Salmon, E. D. and Mitchison, T. J. (2002b). EB1-microtubule interactions in *Xenopus* egg extracts: role of EB1 in microtubule stabilization and mechanisms of targeting to microtubules. *Mol Biol Cell* **13**, 3614-26.
- Tirnauer, J. S., O'Toole, E., Berrueta, L., Bierer, B. E. and Pellman, D. (1999). Yeast Bim1p promotes the G1-specific dynamics of microtubules. *J Cell Biol* **145**, 993-1007.
- Tomonaga, T., Nagao, K., Kawasaki, Y., Furuya, K., Murakami, A., Morishita, J., Sutani, T., Kearsy, S. E., Uhlmann, F., Nasmyth, K. and Yanagida, M. (2000). Characterization of fission yeast cohesion: essential anaphase proteolysis of Rad21 phosphorylated in the S phase. *Genes and Development* **21**, 2757-2770.
- Tournebize, R., Popov, A., Kinoshita, K., Ashford, A. J., Rybina, S., Pozniakovsky, A., Mayer, T. U., Walczak, C. E., Karsenti, E. and Hyman, A. A. (2000). Control of microtubule dynamics by the antagonistic activities of XMAP215 and XKCM1 in *Xenopus* egg extracts. *Nat Cell Biol* **2**, 13-9.
- Tsukahara, K., Yamamoto, H. and Okayama, H. (1998). An RNA binding protein negatively controlling differentiation in fission yeast. *Mol Cell Biol* **18**, 4488-98.
- Umesono, K., Toda, T., Hayashi, S. and Yanagida, M. (1983). Cell division cycle genes *nda2* and *nda3* of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* control microtubular organization and sensitivity to anti-mitotic benzimidazole compounds. *J Mol Biol* **168**, 271-84.
- Vasquez, R. J., Gard, D. L. and Cassimeris, L. (1994). XMAP from *Xenopus* eggs promotes rapid plus end assembly of microtubules and rapid microtubule polymer turnover. *J Cell Biol* **127**, 985-93.
- Walczak, C. E. (2000). Microtubule dynamics and tubulin interacting proteins. *Curr Opin Cell Biol* **12**, 52-6.
- Wang, P. J. and Huffaker, T. C. (1997). Stu2p: A microtubule-binding protein that is an essential component of the yeast spindle pole body. *J Cell Biol* **139**, 1271-80.
- Weaver, A. M., Young, M. E., Lee, W. L. and Cooper, J. A. (2003). Integration of signals to the Arp2/3 complex. *Curr Opin Cell Biol* **15**, 23-30.
- Weiss, E. and Winey, M. (1996). The *Saccharomyces cerevisiae* spindle pole body duplication gene *MPS1* is part of a mitotic checkpoint. *J Cell Biol* **132**, 111-23.
- Wigge, P. A., Jensen, O. N., Holmes, S., Soues, S., Mann, M. and Kilmartin, J. V. (1998). Analysis of the *Saccharomyces* spindle pole by matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) mass spectrometry. *J Cell Biol* **141**, 967-77.
- Wigge, P. A. and Kilmartin, J. V. (2001). The Ndc80p complex from *Saccharomyces cerevisiae* contains conserved centromere component and has a function in chromosome segregation. *Journal of Cell Biology* **152**, 349-360.
- Wilkinson, C. R., Penney, M., McGurk, G., Wallace, M. and Gordon, C. (1999). The 26S proteasome of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **354**, 1523-32.

- Wood, V., Gwilliam, R., Rajandream, M. A., 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, E. J., 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, M. A., 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, R. G., 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, T. M., Eger, P., Zimmermann, W., Wedler, H., Wambutt, R., Purnelle, B., Goffeau, A., Cadieu, E., Dreano, S., Gloux, S., et al. (2002). The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature* **415**, 871-80.
- Wu, S. Y. and McLeod, M. (1995). The *sak1+* gene of *Schizosaccharomyces pombe* encodes an RFX family DNA-binding protein that positively regulates cyclic AMP-dependent protein kinase-mediated exit from the mitotic cell cycle. *Mol Cell Biol* **15**, 1479-88.
- Yamamoto, H., Tsukahara, K., Kanaoka, Y., Jinno, S. and Okayama, H. (1999). Isolation of a mammalian homologue of a fission yeast differentiation regulator. *Mol Cell Biol* **19**, 3829-41.
- Yanagida, M. (1987). Yeast tubulin genes. *Microbiol Sci* **4**, 115-8.
- Yanagida, M. (1995). Frontier questions about sister chromatid separation in anaphase. *Bioessays* **17**, 519-26.
- Yin, H., You, L., Pasqualone, D., Kopski, K. M. and Huffaker, T. C. (2002). Stu1p is physically associated with beta-tubulin and is required for structural integrity of the mitotic spindle. *Mol Biol Cell* **13**, 1881-92.

## 8 Anhang

### 8.1 Tabellen

Tabelle 13: Insertfragmentgrößen der Suppressorplasmide des genomischen DNA-Bankscreens

Aufgeführt sind die ermittelten Größen der DNA-Fragmente, die durch Restriktion (*Bam*HI und *Hind*III) und Gelelektrophorese der isolierten Genbankplasmide erhalten wurden. Neben den aufgeführten Fragmenten zeigten alle Plasmide ein 5,5 Kb großes Vektorfragment.

Genbankinsert	Größe der Fragmente	Genbankinsert	Größe der Fragmente	Genbankinsert	Größe der Fragmente
CD-1	2,1 Kb, 0,9 Kb	CD-31	1,0 Kb, 1,4 Kb, 2,4 Kb	CD-61	0,9 Kb, 1,3 Kb
CD-2	0,8 Kb, 1,4 Kb, 1,9 Kb, 2,0 Kb	CD-32	2,4 Kb	CD-62	2,4 Kb
CD-3	1,9 Kb, 0,4 Kb	CD-33	2,4 Kb	CD-63	1,0 Kb, 1,1 Kb, 2,9 Kb
CD-4	2,1 Kb, 0,9 Kb	CD-34	2,4 Kb	CD-64	0,9 Kb, 1,3 Kb
CD-5	2,1 Kb, 0,9 Kb	CD-35	2,5 Kb	CD-65	0,9 Kb, 1,3 Kb
CD-6	0,9 Kb, 1,3 Kb	CD-36	0,9 Kb, 1,3 Kb	CD-66	0,9 Kb, 1,3 Kb
CD-7	1,6 Kb, 2,9 Kb	CD-37	0,8 Kb, 1,1 Kb, 1,2 Kb, 2,4 Kb	CD-67	0,7 Kb, 2,2 Kb
CD-8	0,9 Kb, 1,3 Kb	CD-38	1,0 Kb, 1,3 Kb, 2,4 Kb	CD-68	0,9 Kb, 1,3 Kb
CD-9	0,9 Kb, 1,3 Kb	CD-39	0,8 Kb, 1,1 Kb, 1,2 Kb, 2,4 Kb	CD-69	0,5 Kb, 0,6 Kb, 1,6 Kb, 2,4 Kb
CD-10	0,9 Kb, 1,3 Kb	CD-40	3,5 Kb	CD-70	4,4 Kb
CD-11	0,8 Kb, 1,4 Kb	CD-41	2,3 Kb	CD-71	0,9 Kb, 1,7 Kb
CD-12	1,6 Kb	CD-42	1,1 Kb, 1,4 Kb, 2,5 Kb	CD-72	0,9 Kb, 1,1 Kb
CD-13	1,0 Kb, 2,2 Kb, 2,8 Kb	CD-43	0,9 Kb, 1,3 Kb	CD-73	0,9 Kb, 2,7 Kb
CD-14	0,5 Kb, 0,8 Kb, 1,8 Kb, 2,0 Kb	CD-44	1,0 Kb, 2,5 Kb	CD-74	1,3 Kb
CD-15	1,6 Kb	CD-45	1,0 Kb, 2,0 Kb, 2,5 Kb	CD-75	0,9 Kb, 1,3 Kb
CD-16	1,6 Kb	CD-46	0,9 Kb, 1,3 Kb	CD-76	1,1 Kb, 1,3 Kb
CD-17	1,6 Kb, 2,9 Kb	CD-47	1,1 Kb	CD-77	2,9 Kb
CD-18	0,8 Kb, 0,9 Kb, 1,2 Kb, 2,3 Kb	CD-48	3,9 Kb	CD-78	0,7 Kb, 3,0 Kb
CD-19	0,9 Kb, 3,5 Kb	CD-49	1,6 Kb	CD-79	0,9 Kb, 1,3 Kb
CD-20	0,9 Kb, 1,0 Kb, 1,2 Kb, 1,6 Kb	CD-50	2,0 Kb	CD-80	2,8 Kb
CD-21	0,8 Kb, 0,9 Kb, 1,7 Kb	CD-51	0,9 Kb, 1,3 Kb	CD-81	1,3 Kb, 3,5 Kb
CD-22	0,9 Kb, 1,3 Kb	CD-52	1,6 Kb, 2,9 Kb	CD-82	1,6 Kb, 1,9 Kb
CD-23	1,6 Kb	CD-53	1,7 Kb	CD-83	0,9 Kb, 1,3 Kb
CD-24	0,9 Kb, 1,3 Kb	CD-54	0,9 Kb, 1,3 Kb	CD-84	0,9 Kb, 1,3 Kb
CD-25	2,3 Kb, 5,0 Kb	CD-55	1,2 Kb, 1,6 Kb	CD-85	0,9 Kb, 1,3 Kb
CD-26	0,9 Kb, 1,3 Kb	CD-56	0,8 Kb, 1,3 Kb		
CD-27	1,5 Kb, 2,3 Kb, 2,9 Kb	CD-57	0,9 Kb, 1,3 Kb		
CD-28	0,9 Kb, 1,3 Kb	CD-58	0,9 Kb, 1,3 Kb		
CD-29	1,5 Kb	CD-59	2,2 Kb		
CD-30	1,0 Kb, 1,6 Kb	CD-60	0,9 Kb, 1,3 Kb		

Tabelle 14: Ansequenzierung isolierter c-DNA Genbankinserts

Zusammengestellt sind die Daten, die bei der Ansequenzierung von vier c-DNA Genbankinsertsequenzen erhalten wurden. Die genomische Position der ORFs *rpl1102<sup>+</sup>* und *spc7<sup>+</sup>* auf Chromosom 3 der Spaltheefe, sowie die Homologie der sequenzierten Insertsequenzen zu dieser Region ist angegeben. Für alle DNA-Insertsequenzen ist die Homologie zum Genbankvektor und das Vorhandensein einer T-Nukleotidwiederholung aufgeführt.

	Homologie zur Vektorsequenz	Anzahl der T-Nukleotide	Homologie mit der <i>rpl1102<sup>+</sup></i> Region	Homologie mit der <i>spc7<sup>+</sup></i> Region
<i>spc7<sup>+</sup></i>	\	\	\	786520-790614
<i>rpl1102<sup>+</sup></i>	\	\	691135-691632	\
<b>c-DNA Genbankplasmide</b>				
<b>242.1.1</b>	vorhanden	19	691091-691641	788081-787987
<b>138.2</b>	vorhanden	19	691091-691641	788081-788017
<b>63.3</b>	vorhanden	19	691091-691508	\
<b>67.2</b>	vorhanden	19	691091-691641	788081-788020

Tabelle 15: Verlust des Chromosomenfragmentes verschiedener *p<sub>tetO</sub>-SPC105* Fusionsstämme

Aufgeführt sind die Verlustraten des Chromosomenfragmentes in Prozent von unterschiedlichen Transformanten einer *p<sub>tetO</sub>-SPC105* Fusion. Die Daten (Angaben in Prozent) von vier unterschiedlichen Messungen mit und ohne Zugabe von Doxzyklin bei zunehmender Anzahl der Generationen sind aufgeführt.

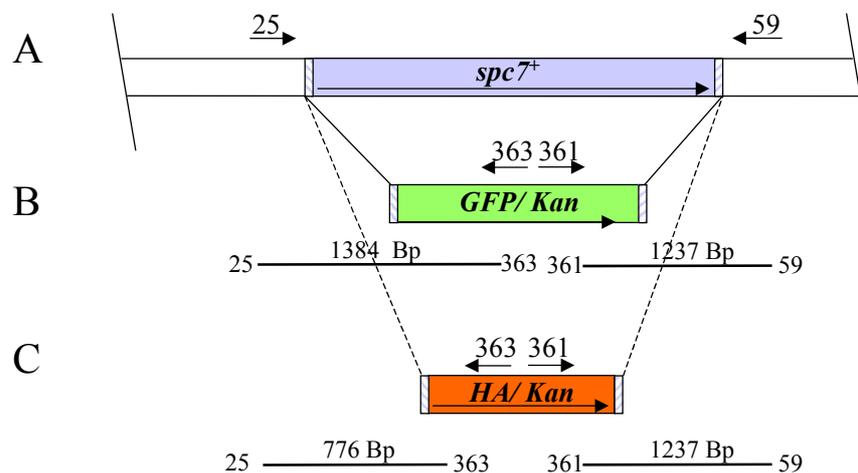
Messung ohne Zugabe von Doxzyklin								
Bezeichnung	Messung 1		Messung 2		Messung 3		Messung 4	
	Generation	Verlust	Generation	Verlust	Generation	Verlust	Generation	Verlust
CF	10	0,86	21	1,5	34	2,59	46	2,84
22a	10	6,04	21	9,86	33	10,91	45	11,57
24a	10	9,15	19	30,71	30	63,22	41	83,5
Daten der Zusatzmessung ohne Zugabe von Doxzyklin								
Bezeichnung	Messung 2		Messung 3					
	Generation	Verlust	Generation	Verlust				
CF	29	2,22	42	2,53				
22a	25	7,19	38	9,16				
24a	23	52,55	35	79,22				
30b	23	20,52	35	24,84				
31b	22	28,64	34	63,43				
Messung mit Zugabe von Doxzyklin								
Bezeichnung	Messung 1		Messung 2		Messung 3		Messung 4	
	Generation	Verlust	Generation	Verlust	Generation	Verlust	Generation	Verlust
CF	9	1,53	17	1,61	28	2,17	38	2,62
22a	8	3,99	15	11,2	25	24,24	35	34,63
24a	8	4,93	15	8,6	24	21,55	33	41,7
Daten der Zusatzmessung mit Zugabe von Doxzyklin								
Bezeichnung	Messung 2		Messung 3					
	Generation	Verlust	Generation	Verlust				
CF	18	2,2	29	3,23				
22a	19	8,94	30	13,85				
24a	18	24,53	34	47,42				
30b	19	12,22	29	21,03				
31b	18	16,22	29	37,77				

Tabelle 16: DNA-Fehlverteilung von *mal3Δ* und *mph1Δ* Einzel- und Doppelmutanten

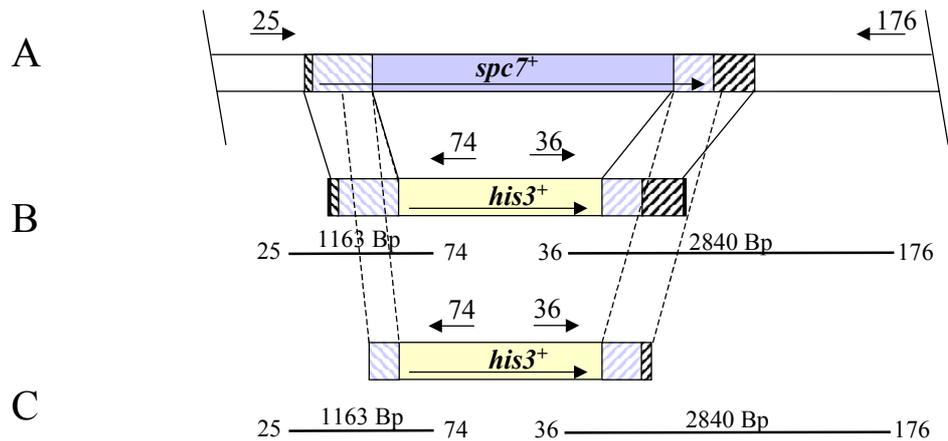
Die DNA-Fehlverteilung von Einzel- und Doppelmutanten wurde mikroskopisch bestimmt. Angegeben ist jeweils die Anzahl der Zellen und der entsprechende Wert in Prozent. Zusätzlich aufgeführt ist die Anzahl der Zellen, die eine veränderte Septierung/Trennung aufwiesen.

	<i>mal3Δ</i>		<i>mph1Δ</i>		<i>mal3Δ mph1Δ</i>	
	Anzahl	Wert [%]	Anzahl	Wert [%]	Anzahl	Wert [%]
normale DNA-Struktur	359	92,05	377	90,84	464	76,82
fragmentierte/gezerrte DNA-Struktur	31	7,95	38	9,16	116	19,21
veränderte Septierung/Trennung der Zellen	0	0	0	0	24	3,97
Zellen insgesamt	390		415		604	

## 8.2 Verwendete Transformationskassetten zur Deletion des *spc7<sup>+</sup>* ORFs

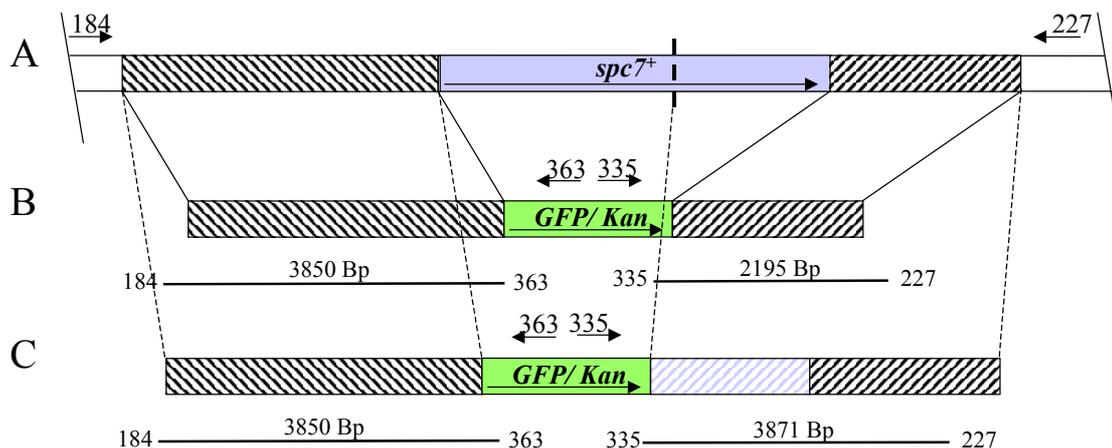
Abbildung 63: Prinzip der *spc7<sup>+</sup>* Deletion mittels Transformationskassetten mit kurzen Homologiebereichen

Teil A stellt schematisch den 4095 Bp großen *spc7<sup>+</sup>* ORF und die flankierenden genomischen Sequenzbereiche auf Chromosom 1 der Spaltheife dar. Durch die Pfeilrichtung im Rechteck ist die Orientierung des Leserahmens angegeben. Die schraffierten Rechtecke stellen die homologen Sequenzbereiche zum *spc7<sup>+</sup>* ORF dar. Diese betragen für beide Kassetten am 5'-Bereich 84 Bp (+1 bis +84) bzw. 79 Bp für den 3'-Bereich (+4010 bis +4089). Die Zahlen in Klammern geben die Nukleotidposition in Bezug auf den ORF an. Die Kassetten tragen neben einer *GFP*- bzw. *HA*-Sequenz ein Gen für die Kanamycinresistenz. Die korrekte Integration ins *S. pombe* Genom wird durch PCR-Reaktionen verifiziert. Die Bindestellen der Oligonukleotide und die erwarteten PCR-Produkte mit ihren entsprechenden Größen sind dargestellt. Die Pfeilrichtung zeigt auch hier die Orientierung. Die Ziffern über den Pfeilen geben die Labornummern der verwendeten Oligonukleotide an.



**Abbildung 64: Prinzip der *spc7<sup>+</sup>* Deletion durch Kassetten mit Homologiebereichen von über 0,3 Kb**

Die Abbildung stellt die generierten *his3<sup>+</sup>*-Integrationskassetten zur Deletion des *spc7<sup>+</sup>* ORFs dar. Die unter B dargestellte Kasette besitzt eine Homologie von 617 Bp zum 5'-Bereich des *spc7<sup>+</sup>* ORFs und weiteren 84 Bp von denen der ORF flankiert wird (-84 bis +617). Für den 3'-Bereich des ORFs sind dies 609 Bp, wovon 415 Bp auf den *spc7<sup>+</sup>* ORF entfallen (+3679 bis +4095/einschließlich 194 Bp der 3'-flankierenden DNA-Sequenz). Die schwarz gefüllten Boxen stellen die Homologie zum Klonierungsvektor dar. Die unter C abgebildete Transformationskasette besitzt eine Homologie von 309 Bp zum 5'-Bereich des ORFs (+308 bis +617) bzw. 518 Bp zum 3'-Bereich des ORFs (+3679 bis +4095 einschließlich 103 Bp der 3'-flankierenden DNA-Sequenz). Weitere Details zum Schema sind dem Abbildungstext der Abbildung 63 zu entnehmen.



**Abbildung 65: Prinzip der *spc7<sup>+</sup>* Deletion durch Kassetten mit einem Homologiebereich von über 2 Kb**

Die Abbildung stellt die generierten Integrationskassetten mit den längsten Homologiebereichen zur Deletion des *spc7<sup>+</sup>* ORFs dar. Die Kassetten tragen neben einer *GFP*-Teilsequenz ein Gen für die Kanamycinresistenz. Beide Kassetten besitzen eine Homologie von 3295 Bp zur 5'-flankierenden genomischen DNA-Sequenz des *spc7<sup>+</sup>* ORFs. Sie unterscheiden sich lediglich im 3'-Bereich. Während Kasette B nur Homologie zu der 1999 Bp des flankierenden 3'-Bereiches zeigt, besitzt die Kasette C zusätzlich Homologie zu den letzten 1664 Bp des *spc7<sup>+</sup>* ORFs. Die homologen Bereiche sind durch Schraffierungen dargestellt. Weitere Details zum Schema sind dem Abbildungstext der Abbildung 63 zu entnehmen.

### 8.3 Ansequenzierung der c-DNA-Bankplasmide

#### c-DNA Genbankplasmid 242.1.1

AATGANNTATAAAGNTTGGGGGAATCCCCN CATATCATCAATTGAATAAGTTGAATTAATTATTTCAATCTCAT  
 TCTCACTTTCTGACTTATAGTCGCTTTGTAAATTTGGCCTCGAGGTCGACGTTAATTAAGCCGC TTTTTTTTTT  
 TTTTTT GAGAAGGTCACAAATGAGTTATTTATATCAAATTACGATTGATTACTCTTGGGGGATCTCAATTT  
 GCCATTGTCGATCTCCTTTTGAACGTCGTGAGGGTTCTTGCCGTCAACGGTGCAACCAACAGAGAAGGCAGTAC  
 CGAGAATCTCCTTAACGGTACCAGAAAGCTCCTTAGCAAGAGACTTGAAGCGCATAGTACGGGCGACCTCAAT  
 GATTTTCGTCAAGAGAGACATTGCCAGAGTGAGCGACGTTCTTGTCTTCTTTCTGTCACGAGCAGGCTCCTTCA  
 AAGCCTTAATGACCAAAGCAGAGGCAGAGGGAACAACCGAGACAGCGGCTTGACGGTTTTGAATAGTCAACT  
 TGACGGTCACACGGAGACCCTTCCAATCTTTGGTAGCCTTGGCAATATCTTCACCAACCTTCTTGGGGGACAAA  
 CCAAGGGACCAATCTTGGGAGCAAGGGGGGAGCCACCGGCGACTTCACCACCGACGGCTCTCATAAAGAT  
 GGTCTTTACTTNCATTGGGATCGAATTTAGGAGGCATCTTGGGTTG CGACTATTAACACGAACATTTTGAATCA  
 AGACTCTGGTCCAAATGAAGAAATACCTGTTGGTAATGAGCCAGAATTTGATACGATGCCAACTCTA

#### c-DNA Genbankplasmid 138.2

TTGANCCATATAAAGGAAGTAGGAATCCTGG CATATCATCAATTGAATAAGTTGAATTAATTATTTCAATCTCA  
 TTCTCACTTTCTGACTTATAGTCGCTTTGTAAATTTGGCCTCGAGGTCGACGTTAATTAAGCCGC TTTTTTTTTT  
 TTTTTT GAGAAGGTCACAAATGAGTTATTTATATCAAATTACGATTGATTACTCTTGGGGGATCTCAATTT  
 CGCCATTGTCGATCTCCTTTTGAACGTCGTGAGGGTTCTTGCCGTCAACGGTGCAACCAACAGAGAAGGCAGTA  
 CCGAGAATCTCCTTAACGGTACCAGAAAGCTCCTTAGCAAGAGACTTGAAGCGCATAGTACGGGCGACCTCAA  
 TGATTTTCGTCAAGAGAGACATTGCCAGAGTGAGCGACGTTCTTGTCTTCTTTCTGTCACGAGCAGGCTCCTTC  
 AAAGCCTTAATGACCAAAGCAGAGGCAGAGGGAACAACCGAGACAGCGGCTTGACGGTTTTGAATAGTCAAC  
 TTGACGGTCACACGGAGACCCTTCCAATCTTTGGTAGCCTTGGCAATATCTTCACCAACCTTCTTGGGGACAA  
 ACCAAGGGACCAATCTTGGGAGCAAGGGTGGAGCCACCGGCGACTTCACCACCGACGGCTCTCATAAAGAT  
 GGTCTTTACTTNCATTGGGATCGAATTTAGGAGGCATCTTGGGTTG CGACTATTAACACGAACATTTTGAATCAA  
 GACTCTGGTCCAAAGGAAAAATACCTGGTGGAAT

#### c-DNA Genbankplasmid 63.3

TTGNACCATATAAAGGAAGAGGAATCCTGG CATATCATCAATTGAATAAGTTGAATTAATTATTTCAATCTCAT  
 TCTCACTTTCTGACTTATAGTCGCTTTGTAAATTTGGCCTCGAGGTCGACGTTAATTAAGCCGC TTTTTTTTTT  
 TTTTTT GAGAAGGTCACAAATGAGTTATTTATATCAAATTACGATTGATTACTCTTGGGGGATCTCAATTT  
 GCCATTGTCGATCTCCTTTTGAACGTCGTGAGGGTTCTTGCCGTCAACGGTGCAACCAACAGAGAAGGCAGTAC  
 CGAGAATCTCCTTAACGGTACCAGAAAGCTCCTTAGCAAGAGACTTGAAGCGCATAGTACGGGCGACCTCAAT  
 GATTTTCGTCAAGAGAGACATTGCCAGAGTGAGCGACGTTCTTGTCTTCTTTCTGTCACGAGCAGGCTCCTTCA  
 AAGCCTTAATGACCAAAGCAGAGGCAGAGGGAACAACCGAGACAGCGGCTTGACGGTTTTGAATAGTCAACT  
 TGACGGTCACACGGAGACCCTTCCAATCTTTGGTAGCCTTGGCAATATCTTCACCAACCTTTTNGGGGGAN  
 AANCCAGG

#### c-DNA Genbankplasmid 67.2

GANCCCTATAAAGGNAAGTGAATCCTGG CATATCATCAATTGAATAAGTTGAATTAATTATTTCAATCTCATT  
 CTCACCTTTCTGACTTATAGTCGCTTTGTAAATTTGGCCTCGAGGTCGACGTTAATTAAGCCGC TTTTTTTTTT  
 TTTTTT GAGAAGGTCACAAATGAGTTATTTATATCAAATTACGATTGATTACTCTTGGGGGATCTCAATTT  
 CCATTGTCGATCTCCTTTTGAACGTCGTGAGGGTTCTTGCCGTCAACGGTGCAACCAACAGAGAAGGCAGTACC  
 GAGAATCTCCTTAACGGTACCAGAAAGCTCCTTAGCAAGAGACTTGAAGCGCATAGTACGGGCGACCTCAATG  
 ATTTTCGTCAAGAGAGACATTGCCAGAGTGAGCGACGTTCTTGTCTTCTTTCTGTCACGAGCAGGCTCCTTCAA  
 AGCCTTAATGACCAAAGCAGAGGCAGAGGGAACAACCGAGACAGCGGCTTGACGGTTTTGAATAGTCAACT  
 GACGGTCACACGGAGACCCTTCCAATCTTTGGTAGCCTTGGCAATATCTTCACCAACCTTCTTGGGGGACAAAC  
 CCAAGGGACCAATCTTGGGAGCAAGGGTGGAGCCACCGGCGACTTCACCACCGACGGCTCTCATAAAGATGGT  
 CTTTACTTNCATTGGGATCGAATTTAGGAGGCATCTTGGGTTG CGACTATTAACNCGAANTTTTGAATCAAGACT  
 CTGGNCCAAAGNAAAAATACCTGTGGGA

#### Abbildung 66: Ansequenzierung unterschiedlicher c-DNA Genbankplasmide

Zusammengestellt sind die Daten der Sequenzierung der Insertsequenzen unterschiedlicher c-DNA Genbankplasmide mit Oligonukleotid 98. Durch farbige Markierungen innerhalb der Sequenz ist die Homologie zum Genbankvektor bzw. verschiedenen ORFs des *S. pombe* Chromosoms 3 herausgearbeitet. Markierung: grau = Homologie zur Vektorsequenz; grün = T-Nukleotidwiederholung; blau = Homologie zum ORF SPCC16C4.13c (*rpl201<sup>+</sup>*); gelb = Homologie zum ORF SPCC1020.02c (*spc7<sup>+</sup>*)

## 8.4 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Strukturelle Übersicht der Zentromer-DNA von <i>S. pombe</i> und damit assoziierter Proteine	14
Abbildung 2: Der mitotische Spindelapparat	16
Abbildung 3: Proteindomänenvergleich verschiedener Mal3p Homologe	20
Abbildung 4: Klonierung der <i>GFP-kanMx6</i> -Transformationskassetten	40
Abbildung 5: Suppression der TBZ-Hypersensitivität des <i>mal3-1</i> Stammes	50
Abbildung 6: Suppression der TBZ-Hypersensitivität des <i>mal3-1</i> Mutantenstammes durch verschiedene Plasmidsuppressoren in seriellen Tropftests	51
Abbildung 7: Analytische Spaltung mit den Restriktionsenzymen <i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III zur Bestimmung der Insertgrößen der Suppressorplasmide	53
Abbildung 8: Identifizierung von Suppressoren durch PCR-Analyse	55
Abbildung 9: Minichromosomenverlust des <i>mal3-1</i> Stammes transformiert mit verschiedenen Plasmiden	57
Abbildung 10: Suppression der TBZ-Hypersensitivität des <i>mal3Δ</i> Stammes durch verschiedene Suppressoren	59
Abbildung 11: Schematische Darstellung des Suppressorinserts CD-1 und Komplementation der <i>mal3-1</i> Phänotypen	64
Abbildung 12: Komplementation der <i>spi1-25</i> TBZ-Hypersensitivität durch das Suppressorinsert CD-1	65
Abbildung 13: Schematische Darstellung des Suppressorplasmids pUR19/CD-3 und Komplementation der <i>mal3-1</i> Phänotypen	66
Abbildung 14: Schematische Darstellung der Suppressorplasmide pUR19/CD-2 und pUR19/CD-15 und die Komplementation der <i>mal3-1</i> Phänotypen	69
Abbildung 15: Schematische Darstellung des Suppressorplasmids pUR19/CD-6 und Komplementation der <i>mal3-1</i> Phänotypen	70
Abbildung 16: Schematische Darstellung des Suppressorplasmids pUR19/CD-11 und Komplementation der <i>mal3-1</i> Phänotypen	71
Abbildung 17: Schematische Darstellung des Suppressorplasmids pUR19/CD-13 und Komplementation der <i>mal3-1</i> Phänotypen	73
Abbildung 18: Schematische Darstellung des Suppressorplasmids pUR19/CD-14 und Komplementation der <i>mal3-1</i> Phänotypen	75
Abbildung 19: Überexpression von <i>asp1<sup>+</sup></i> ist nicht letal	75
Abbildung 20: Komplementation der TBZ-Hypersensitivität des <i>mal3-1</i> bzw. <i>malΔ</i> Stammes durch Überexpression von <i>asp1<sup>+</sup></i>	76
Abbildung 21: Verlust des Minichromosoms im <i>asp1Δ</i> Stamm	76
Abbildung 22: Schematische Darstellung des Suppressorplasmids pUR19/CD-17 und Komplementation der <i>mal3-1</i> Phänotypen	78
Abbildung 23: Schematische Darstellung des Suppressorplasmids pUR19/CD-18 und Komplementation der <i>mal3-1</i> Phänotypen	79
Abbildung 24: Schematische Darstellung des Suppressorplasmids pUR19/CD-19 und Komplementation der <i>mal3-1</i> Phänotypen	81

Abbildung 25: Schematische Darstellung des Suppressorplasmids pUR19/CD-20 und Komplementation der <i>mal3-1</i> Phänotypen	83
Abbildung 26: Schematische Darstellung des Suppressorplasmids pUR19/CD-21 und Komplementation der <i>mal3-1</i> Phänotypen	84
Abbildung 27: Darstellung des homologen Bereiches der Proteine Spc7p und Spc105	89
Abbildung 28: Prinzip der <i>spc7<sup>+</sup></i> Deletion durch sechs verschiedene Transformationskassetten	90
Abbildung 29: Hybridisierungsschema der verwendeten Sonden und der <i>spc7<sup>+</sup></i> Sequenz	92
Abbildung 30: erhaltende Hybridisierungsmuster der Sonden bei der Northern-Blotanalyse	93
Abbildung 31: Sequenzierung der c-DNA Genbankplasmide	94
Abbildung 32: Schema der durchgeführten PCR-Reaktionen zur Untersuchung der c-DNA Genbank	96
Abbildung 33: PCR-Analyse der Clontech c-DNA Genbankinserts	96
Abbildung 34: Klonierung eines verkürzten <i>spc7<sup>+</sup></i> Leserahmens in zwei <i>S. pombe</i> Expressionsvektoren	98
Abbildung 35: Serielle Tropftestuntersuchungen des Wildtypstammes und des partiell verkürzten Spc7p Proteins	99
Abbildung 36: Serielle Tropftestuntersuchungen des <i>mal3-1</i> Stammes und des partiell verkürzten Spc7p Proteins	100
Abbildung 37: Serielle Tropftestuntersuchungen des <i>mal3Δ</i> Stammes und des partiell verkürzten Spc7p Proteins	100
Abbildung 38: C-terminale Fusion des <i>spc7<sup>+</sup></i> ORFs an eine GFP- bzw. HA-Sequenz	102
Abbildung 39: Lokalisierung des C-terminalen Spc7-GFPp-Fusionsproteins innerhalb der Zelle	104
Abbildung 40: Lokalisierung des C-terminalen Spc7-GFPp-Fusionsproteins in Metaphasenzellen	105
Abbildung 41: Colokalisierung von Spc7-HAp und Mal2-GFPp	106
Abbildung 42: Auszählung der Colokalisierung von Spc7-HAp und Mal2-GFPp	107
Abbildung 43: Suppression der TBZ-Hypersensitivität des <i>BIMI</i> Deletionsstammes durch <i>SPC105</i> in seriellen Tropftests	109
Abbildung 44: Klonierung von <i>SPC105</i> in <i>S. pombe</i> Expressionsvektoren	110
Abbildung 45: Suppression der TBZ-Hypersensitivität des <i>mal3-1</i> und des <i>mal3Δ</i> Stammes durch <i>SPC105</i> in seriellen Tropftestuntersuchungen	111
Abbildung 46: C-terminale Fusion des <i>SPC105</i> ORFs an eine GFP-DNA-Sequenz	113
Abbildung 47: Lokalisierung des C-terminalen Spc105-GFP-Proteins in der Zelle	114
Abbildung 48: Deletion des <i>SPC105</i> ORFs	116
Abbildung 49: Phänotypen des <i>SPC105</i> Deletionsstammes	119
Abbildung 50: Prinzip des <i>tetO</i> -Promotorsystems	122
Abbildung 51: Herstellung von <i>p<sub>tetO</sub>-SPC105</i> Fusionsstämmen	123
Abbildung 52: Prinzip der Chromosomenfragmentmessung	124
Abbildung 53: Chromosomenfragmentverlust verschiedener <i>p<sub>tetO</sub>-SPC105</i> Fusionsstämme	126
Abbildung 54: Der <i>mal3Δ</i> Stamm zeigt Fehler bei der DNA-Verteilung	129
Abbildung 55 : Klonierung verkürzter <i>mal3<sup>+</sup></i> Sequenzen in <i>S. pombe</i> Expressionsvektoren	130
Abbildung 56: Effekt verkürzter Mal3p Proteine auf des Wachstumsverhalten eines Wildtypstammes in seriellen Tropftestuntersuchungen	131

Abbildung 57: Effekt verkürzter Mal3p Proteine auf des Wachstumsverhalten des <i>mal3Δ</i> Stammes in seriellen Tropfestuntersuchungen	132
Abbildung 58: Auswirkung verschiedenen Mal3p Proteinvarianten	134
Abbildung 59: Der mitotische Spindelkontrollpunkt	135
Abbildung 60: Untersuchung der genetischen Interaktion von <i>mal3Δ</i> mit Komponenten des Spindelkontrollpunktes	137
Abbildung 61: Untersuchung der genetischen Interaktion von <i>mal3Δ</i> mit Mutanten der inneren Zentromerregion	138
Abbildung 62: Untersuchung der genetischen Interaktion von <i>mal3Δ</i> mit Komponenten des Mikrotubuli-Plusendkomplexes	140
Abbildung 63: Prinzip der <i>spc7<sup>+</sup></i> Deletion mittels Transformationskassetten mit kurzen Homologiebereichen	168
Abbildung 64: Prinzip der <i>spc7<sup>+</sup></i> Deletion durch Kassetten mit Homologiebereichen von über 0,3 Kb	169
Abbildung 65: Prinzip der <i>spc7<sup>+</sup></i> Deletion durch Kassetten mit einem Homologiebereich von über 2 Kb	169
Abbildung 66: Ansequenzierung unterschiedlicher c-DNA Genbankplasmide	170

## 8.5 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Wachstumsbedingungen zur Untersuchung der genetischen Interaktion	43
Tabelle 2: Wachstumsbedingungen zu Untersuchung der <i>spc105Δ</i> Deletionsstämme	44
Tabelle 3: Transformationen des <i>mal3-1</i> Stammes der genomischen <i>S. pombe</i> Bank	50
Tabelle 4: Gruppen der genomischen <i>S. pombe</i> DNA-Bankplasmide	54
Tabelle 5: Identifikation von spezifischen ORFs als Teilsequenz von Suppressorplasmiden durch Polymerasekettenreaktion	56
Tabelle 6: Minichromosomenverlust von <i>mal3-1</i> transformiert mit unterschiedlichen Suppressoren	58
Tabelle 7: Wachstum des <i>mal3Δ</i> und des <i>mal3-1</i> Stammes transformiert mit unterschiedlichen Suppressoren	60
Tabelle 8: Übersicht ausgewählter Suppressoren des <i>mal3-1</i> genomischen <i>S. pombe</i> DNA Bankscreens	85
Tabelle 9: Ergebnisübersicht der Transformationen mit unterschiedlichen Insertionskassetten	91
Tabelle 10: Ergebnisse der <i>SPC105</i> Tetradenanalyse	117
Tabelle 11: Morphologische Abweichungen des <i>SPC105</i> Deletionsstammes	120
Tabelle 12: Untersuchungen zur genetischen Interaktion von <i>mal3Δ</i>	141
Tabelle 13: Insertfragmentgrößen der Suppressorplasmide des genomischen DNA-Bankscreens	166
Tabelle 14: Ansequenzierung isolierter c-DNA Genbankinserts	167
Tabelle 15: Verlust des Chromosomenfragmentes verschiedener <i>p<sub>tetO</sub>-SPC105</i> Fusionsstämme	167
Tabelle 16: DNA-Fehlverteilung von <i>mal3Δ</i> und <i>mph1Δ</i> Einzel- und Doppelmutanten	168

## 8.6 Publikationen

Jin, Q. W., Pidoux, A. L., Decker, C., Allshire, R. C. and Fleig, U. (2002). The mal2p protein is an essential component of the fission yeast centromere. *Mol Cell Biol* **22**, 7168-83.

Trentmann, O., Decker, C., Winkler, H. H. and Neuhaus, H. E. (2000). Charged amino-acid residues in transmembrane domains of the plastidic ATP/ADP transporter from arabidopsis are important for transport efficiency, substrate specificity, and counter exchange properties. *Eur J Biochem* **267**, 4098-105.

In Vorbereitung:

Vietmeier-Decker, C., Kerres, A., Ortiz, J., Karig, I., Beuter, C., Hegemann, J., Lechner, J. and Fleig, U. (2004). The conserved yeast kinetochore components Spc7 and Spc105 are required for kinetochore-spindle association and rescue loss of members of the EB1 family. *In preparation*

## 8.7 Verwendete Internetseiten zur Daten- und Literaturrecherche

The Wellcome Trust Sanger Institute	<a href="http://www.sanger.ac.uk/projects/s_pombe">http://www.sanger.ac.uk/projects/s_pombe</a>
<i>Saccharomyces</i> Genome Database	<a href="http://www.yeastgenome.org/">http://www.yeastgenome.org/</a>
Proteome Bioknowledge Library	<a href="http://www.incyte.com/sequence/proteome/databases/YPD.shtml">http://www.incyte.com/sequence/proteome/databases/YPD.shtml</a>
National Center for Biotechnology Information	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/</a>

## 9 Danksagung

Diese Arbeit entstand während meiner Tätigkeit als wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Mikrobiologie der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf. An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich während dieser Zeit begleitet haben.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. J. H. Hegemann und PD. Dr. U. Fleig für die freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe, die Bereitstellung eines interessanten Arbeitsthemas und für die Möglichkeit zur Erstellung dieser Arbeit. Auch für die ständige Diskussionsbereitschaft und die engagierte Betreuung- ganz besonders von Ursula- sei an dieser Stelle gedankt.

Ebenfalls danke ich Prof. Dr. P. Westhoff für die kurzfristige Übernahme des Koreferates meiner Arbeit und für die Mitwirkung in der Prüfungskommission.

Ein großes Dankeschön geht an alle Mitarbeiter/-innen der Mikrobiologie. Aber auch keiner der Ehemaligen soll an dieser Stelle vergessen werden. Ein angenehmes Arbeitsklima mit guter Zusammenarbeit zeichnet dieses Institut aus. Eure Freundschaften werden mich sowohl zukünftig begleiten, als auch immer an die Zeit in Düsseldorf erinnern.

Ein herzlicher Dank gilt auch meinen Familienangehörigen und allen Freunden außerhalb der Arbeit. Eure Liebe und Fröhlichkeit haben mich fortwährend unterstützt. Hierfür sei vor allem Jörg gedankt.

Vielen Dank,

Corina

## Lebenslauf

### Persönliche Daten

---

Name: Corina Vietmeier-Decker, geb. Decker  
geboren am: 18.02.1974 in Lengerich (Westf)  
Familienstand: verheiratet

### Schulausbildung

---

1980 - 1984 Grundschule der Stadt Lengerich (Westf)  
1984 - 1993 Hannah-Arendt-Gymnasium, Lengerich (Westf)  
Abschluß: Allgemeine Hochschulreife

### Universitätsausbildung und Berufserfahrung:

---

10/1993-04/1999 Studiengang Biologie (Diplom)  
Fachbereich Biologie/Chemie der Universität Osnabrück  
Abschluß: Diplom-Biologin  
Diplomarbeit: Struktur-/Funktionsanalysen plastidärer  
ATP/ADP-Transporter  
seit 05/1999 wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Arbeitsgruppe von Prof.  
Dr. J. H. Hegemann/PD. Dr. U. Fleig, Institut für Mikrobiologie,  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Düsseldorf, den 31.03.2004

**Erklärung**

Hiermit versichere ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig verfaßt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Düsseldorf, den 31.03.2004

(Corina Vietmeier-Decker)