

**Funktionelle Analyse mitotischer  
Komponenten in der Spaltheife  
*Schizosaccharomyces pombe***

**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

**Inga Eliane Karig**

aus Ludwigsburg

Düsseldorf

2004

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen

Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. J. H. Hegemann

Koreferent: Prof. Dr. R. Wagner

Tag der mündlichen Prüfung: 09.12.2004

---

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>9</b>
<b>2</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>12</b>
<b>3</b>	<b>Einleitung</b>	<b>13</b>
3.1	Der Modellorganismus <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	14
3.2	Der mitotische Spindel-Apparat in <i>S. pombe</i>	15
3.2.1	Aufbau und Struktur der mitotischen Spindel	15
3.2.2	Komponenten des mitotischen Spindel-Apparates	16
3.3	Das <i>S. pombe</i> Zentromer	19
3.3.1	Aufbau der Zentromer-DNA	20
3.4	Identifizierung neuer mitotischer Komponenten in <i>S. pombe</i>	22
3.4.1	Der <i>mal25-1</i> Mutantenstamm	23
3.4.2	Der <i>mal3-1</i> Mutantenstamm	24
3.5	Zielsetzung dieser Arbeit	25
<b>4</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>27</b>
4.1	Chemikalien	27
4.2	Enzyme	27
4.2.1	Restriktionsendonukleasen	27
4.2.2	Sonstige Enzyme	27
4.3	Sonstige Materialien	28
4.4	Medien und Wachstumsbedingungen	28
4.4.1	<i>E. coli</i> Stämme	28
4.4.2	<i>S. pombe</i> Stämme	28
4.5	Oligonukleotide	29
4.6	Plasmide	30
4.7	Transformation	31
4.8	Präparation von Nucleinsäuren	31
4.9	DNA-Grundtechniken	32
4.9.1	Subklonierung des Genbank-Plasmids IK-H	32
4.10	Methoden zur Kreuzung von <i>S. pombe</i>	32
4.10.1	Paarung haploider <i>S. pombe</i> Hefestämme	32
4.10.2	Generierung diploider <i>S. pombe</i> Hefestämme	32
4.10.3	„Random spore“-Analyse	33

---

4.10.4 Tetradenanalyse .....	33
4.11 Ermittlung der Minichromosomenstabilität .....	33
4.12 Komplementation mutanter Phänotypen .....	34
4.12.1 Komplementation der Temperatursensitivität des <i>mal16-1</i> bzw. <i>mal16-1 mal2-1</i> Mutantenstammes .....	34
4.12.2 Komplementation der TBZ-Hypersensitivität der <i>spi1-25</i> Mutante .....	34
4.13 Kartierung von <i>mal16</i> <sup>+</sup> .....	34
4.14 Untersuchungen auf genetische Interaktionen in <i>S. pombe</i> .....	35
4.15 Fusion endogener ORFs mit einem GFP-Epitop .....	36
4.16 Fusion des <i>peg1</i> <sup>+</sup> -ORFs mit einem Pk1-EGFP-Epitop .....	37
4.17 Deletion des <i>peg1</i> <sup>+</sup> -ORFs .....	38
4.18 Analyse des DNA-Profiles von <i>S. pombe</i> Zellen mittels Durchflußzytometrie-Analyse .....	38
4.19 Mikroskopie .....	39
4.20 FISH (“Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung”) .....	40
4.20.1 Fixierung und Zellwand-Behandlung von <i>S. pombe</i> Zellen .....	40
4.20.2 Markierung von DNA-Proben mittels „Nick Translation“ .....	41
4.20.3 FISH-Analyse von <i>S. pombe</i> Zellen .....	41
4.21 ChIP (“Chromatin-Immunopräzipitation”) .....	43
<b>5 Ergebnisse .....</b>	<b>49</b>
5.1 Identifikation einer neuen Komponente mit Einfluß auf die Chromosomen-Segregation in <i>S. pombe</i> .....	49
5.1.1 Primärcharakterisierung des <i>mal16-1</i> Mutantenstammes .....	49
5.1.2 Sind die <i>mal16-1</i> Phänotypen auf den Defekt eines Gen-Lokus zurückzuführen ? .....	53
5.1.3 Nähere Charakterisierung des <i>mal16-1</i> Mutantenstammes .....	54
5.1.3.1 Der <i>mal16-1</i> Mutantenstamm weist während der Mitose eine Fehlverteilung des chromosomalen Materials auf .....	54
5.1.3.2 Kann die abnorme Chromosomen-Segregation in <i>mal16-1</i> Zellen auf eine fehlende Trennung der Schwesterchromatiden zurückgeführt werden ? .....	55
5.1.3.3 Beinächtigt die <i>mal16-1</i> Mutation den Aufbau bzw. die Struktur der mitotischen Spindel ? .....	56
5.1.3.4 Ist in <i>mal16-1</i> Zellen der mitotische Spindel-Kontrollpunkt aktiviert ? .....	58

---

5.1.3.5	Ist in dem <i>mal16-1</i> Mutantenstamm die Anheftung der Spindel-Mikrotubuli an das Kinetochor möglicherweise beeinträchtigt ?	59
5.1.3.6	Untersuchung auf genetische Interaktion zwischen <i>mal16-1</i> und Komponenten, die eine Funktion am Kinetochor bzw. bei der Spindel-Kinetochor-Verknüpfung besitzen	60
5.1.3.7	Der Mutantenstamm <i>mal16-1</i> weist eine abnorme Chromatin-Struktur während Mitose und Interphase auf	62
5.1.4	Isolation des <i>mal16<sup>+</sup></i> -Gens	63
5.1.4.1	Die <i>mal16-1</i> Mutation ist rezessiv	64
5.1.4.2	Komplementationsversuche zur Identifizierung des <i>mal16<sup>+</sup></i> -Wildtyp-Gens	64
5.1.4.3	Genkartierung	67
5.1.4.3.1	Generelle Vorgehensweise bei der Kartierung eines <i>S. pombe</i> Gens	67
5.1.4.3.2	Untersuchung auf Zentromer-Kopplung	68
5.1.4.3.3	Auf welchem Chromosom ist das <i>mal16<sup>+</sup></i> -Gen lokalisiert ?	70
5.1.4.3.4	In welcher Region auf Chromosom I ist <i>mal16<sup>+</sup></i> lokalisiert ?	71
5.2	Analyse der Funktion der SpRan GTPase während der Mitose	77
5.2.1	Untersuchung auf genetische Interaktion zwischen <i>spi1-25</i> und Genen, die für mitotische Motorproteine in <i>S. pombe</i> kodieren	77
5.2.1.1	Die <i>spi1-25</i> Mutation kann die Temperatur-Sensitivität unterschiedlicher <i>cut7<sup>ts</sup></i> Mutanten supprimieren	78
5.2.1.2	Beeinflußt SpRan möglicherweise die Funktion von Minus-Endgerichteten Motorproteinen ?	79
5.2.1.2.1	Besteht zwischen <i>spi1<sup>+</sup></i> und <i>pkl1<sup>+</sup></i> eine genetische Interaktion ?	80
5.2.1.2.2	Können <i>spi1-25</i> Phänotypen durch eine Überexpression von <i>pkl1<sup>+</sup></i> supprimiert werden ?	81
5.2.1.2.3	Interagieren die Gene <i>spi1<sup>+</sup></i> und <i>kpl2<sup>+</sup></i> genetisch miteinander ?	82
5.2.2	Analyse der extragenen <i>spi1-25</i> Multikopie-Suppressoren	83
5.2.2.1	IK-A enthält das <i>mal3<sup>+</sup></i> -Gen, das für ein Mikrotubuli-assoziiertes Protein kodiert	84
5.2.2.2	Das DNA-Insert in IK-M kodiert für das Kinetochorprotein Spc7p in <i>S. pombe</i>	84
5.2.2.2.1	Mit welcher Zentromer-Region ist Spc7p assoziiert ?	85

---

5.2.2.2.2	Ist das Spc7p-Protein in dem <i>spil-25</i> Mutantenstamm noch am Zentromer lokalisiert ? .....	87
5.2.2.3	Der SPAC589.08c-ORF auf IK-H kodiert für ein Protein mit Homologie zum Mikrotubuli-assoziierten <i>S. cerevisiae</i> Protein Dam1p.....	88
5.2.2.3.1	Der SPAC589.08c-ORF ist für die Suppression der TBZ-Hypersensitivität des <i>spil-25</i> Mutantenstammes verantwortlich.....	89
5.2.2.3.2	Nähere Charakterisierung des SPAC589.08c-Genproduktes SpDam1p.....	91
5.2.2.3.2.1	SpDam1p zeigt Assoziation mit der mitotischen Spindel .....	91
5.2.2.3.2.2	Überexpression von <i>spdaml</i> <sup>+</sup> bewirkt einen Wachstumsdefekt bei Wildtyp-Zellen.....	93
5.2.2.3.3	Die Expression von <i>spdaml</i> <sup>+</sup> supprimiert zusätzlich die TBZ-Sensitivität von <i>mal3</i> Mutantenstämmen .....	94
5.2.2.3.4	Ist die Lokalisierung von SpDam1p in dem <i>spil-25</i> bzw. <i>mal3Δ</i> Mutantenstamm verändert ? .....	95
5.3	Identifizierung und Charakterisierung von Peg1p als neues Mikrotubuli-assoziiertes <i>S. pombe</i> Protein .....	96
5.3.1	Identifizierung eines neuen Mitglieds der evolutionär konservierten CLASP/MAST/ Stu1-Proteinfamilie .....	96
5.3.1.1	Die Expression des partiellen SPAC3G9.12-ORFs kann die TBZ-Hypersensitivität des <i>mal3Δ</i> Mutantenstammes supprimieren.....	97
5.3.1.2	Das identifizierte Genprodukt weist Homologie zu den Mitgliedern der CLASP/ MAST/ Stu1-Proteinfamilie auf.....	99
5.3.2	Funktionelle Analyse des Peg1p-Proteins.....	100
5.3.2.1	Ist <i>peg1</i> <sup>+</sup> ein essentielles Gen ?.....	100
5.3.2.2	Peg1p zeigt Assoziation mit der mitotischen Spindel und dem Zentromer.....	102
5.3.2.3	Charakterisierung der <i>peg1-1</i> Mutation.....	105
5.3.2.3.1	Der <i>peg1-1</i> Mutantenstamm weist während der Mitose eine Fehlverteilung des chromosomalen Materials auf .....	106
5.3.2.3.2	Zellen des <i>peg1-1</i> Mutantenstammes zeigen einen Defekt im Aufbau und in der Aufrechterhaltung einer bipolaren mitotischen Spindel .....	106

5.3.2.3.3	Ist die Lokalisierung von Mal3p in dem <i>peg1-1</i> Mutantenstamm als auch die von Peg1p in der <i>mal3Δ</i> Mutante möglicherweise verändert ? .....	107
5.3.2.3.4	Ist in dem <i>peg1-1</i> Mutantenstamm möglicherweise die Funktion des Kinetochors beeinträchtigt ? .....	108
5.3.3	Inwieweit sind die Funktionen von Mal3p und Peg1p während der Mitose miteinander verknüpft ? .....	109
5.3.3.1	Die Expression des <i>peg1<sup>+</sup></i> -Vollängen-Gens führt zu einem verschlechterten Wachstum von <i>mal3</i> Mutanten .....	109
5.3.3.2	Die <i>peg1-1mal3Δ</i> Doppelmutanten zeigen einen Rückgang der mitotischen Anomalien .....	111
5.3.3.3	Untersuchung auf genetische Interaktion zwischen <i>peg1<sup>+</sup></i> und <i>alp14<sup>+</sup></i> , einem Gen, das für ein weiteres Mikrotubuli-Plus-End-bindendes Protein kodiert .....	112
<b>6</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>115</b>
6.1	Welche Rolle übernimmt das Mal16p-Protein während der Mitose ? .....	115
6.2	Funktionelle Analyse der SpRan GTPase während der Mitose .....	119
6.2.1	Die SpRan GTPase beeinflusst die Funktion des Minus-End-gerichteten Motorproteins Klp2p .....	119
6.2.2	Die SpRan GTPase wird für die Interaktion zwischen Spindel-Mikrotubuli und Kinetochor benötigt .....	121
6.2.2.1	SpRan spielt eine Rolle bei der Interaktion zwischen dem Kinetochorprotein Spc7p und dem Mikrotubuli-assoziierten Mal3p-Protein .....	122
6.2.2.2	Die Funktion des neuen Mikrotubuli-assoziierten <i>S. pombe</i> Proteins SpDam1p wird durch SpRan reguliert .....	123
6.2.3	Die mögliche Funktion der SpRan GTPase während der Mitose .....	125
6.3	Das <i>S. pombe</i> Protein Peg1p ist ein neues Mitglied der evolutionär konservierten CLASP/ MAST/ Stu1-Familie Mikrotubuli-Plus-End-bindender Proteine .....	128
6.3.1	Peg1p ist ein Mikrotubuli-assoziiertes Protein, das ebenfalls Assoziation mit dem Kinetochor aufweist .....	129
6.3.2	Peg1p reguliert die Dynamik von Mikrotubuli und hat eine Funktion bei der Anheftung von Spindel-Mikrotubuli an das Kinetochor .....	131
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>134</b>

---

<b>8</b>	<b>Anhang</b> .....	<b>152</b>
8.1	Stämme .....	152
8.1.1	Bakterienstämme .....	152
8.1.2	<i>S. pombe</i> Stämme .....	152
8.1.2.1	Ausgangsstämme .....	152
8.1.2.2	Hergestellte Stämme .....	153
8.1.2.3	Stämme des <i>mal16</i> <sup>+</sup> -Kartierungsversuchs .....	155
8.2	Publikationen .....	155
<b>9</b>	<b>Danksagung</b> .....	<b>156</b>

# 1 Abkürzungsverzeichnis

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
A	Adenosin
Abb.	Abbildung
Ade	Adenin
AK	Antikörper
bidest. H <sub>2</sub> O	zweifach destilliertes Wasser
Bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	cirka
C-Terminus	Carboxy-Terminus
Δ	Deletion
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EGFP	„enhanced green fluorescence protein“
g	Gramm
G	Guanosin
G418	Geneticin-Disulfat
G1	Gap 1-Phase des Zellzyklus
G2	Gap 2-Phase des Zellzyklus
GAP	„GTPase-activating protein“
GDP	Guanosin-Diphosphat
GEF	„guanine nucleotide exchange factor“
GFP	„green fluorescence protein“
GTP	Guanosin-Triphosphat
h	Stunde/n
His	Histidin

---

Kbp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
KLP	„kinesin like protein“
l	Liter
Leu	Leucin
Lys	Lysin
M	Molar
mA	Milliampere
<i>mal</i>	„minichromosome altered loss“
MAP	Mikrotubuli-assoziiertes Protein
Mbp	Megabasenpaare
min	Minute/n
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MM	Minimalmedium
M-Phase	Teilungsphase
ng	Nanogramm
nmol	Nanomol
N-Terminus	Amino-Terminus
ORF	„open reading frame“
PCR	„polymerase chain reaction“
pmol	Picomol
rpm	„revolutions per minute“
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde/n
S-Phase	Synthese-Phase des Zellzyklus
SPK	Spindel-Pol-Körper
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>S. pombe</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TBZ	Thiabendazol

---

Thia	Thiamin
U	„unit/s“
Ü/N	über Nacht
Ura	Uracil
UV-Licht	ultraviolettes Licht
w/v	Gewicht pro Volumen
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
z.B.	zum Beispiel

## 2 Zusammenfassung

Die präzise Verteilung des duplizierten chromosomalen Materials auf die zwei Folgezellen ist für das Überleben eines jeden eukaryotischen Organismus von essentieller Bedeutung.

Zur Aufrechterhaltung der Genomstabilität werden zahlreiche Genprodukte benötigt, die im Zusammenspiel den hochregulierten Ablauf aufeinander folgender Teilprozesse der Mitose gewährleisten. Aufgrund der Komplexität dieser Teilprozesse, wie z.B. der Aufbau eines funktionsfähigen Spindel-Apparates oder die Verknüpfung von Spindel-Mikrotubuli mit den Chromosomen, sind bislang erst wenige mitotische Komponenten identifiziert worden und die molekularen Mechanismen der Mitose sind größtenteils noch unverstanden.

Ziel dieser Arbeit war es, mittels Isolation neuer mitotischer Komponenten sowie durch funktionelle Analyse bereits charakterisierter Genprodukte bei der Aufklärung der molekularen Prozesse der Mitose mitzuwirken. Mit dieser Arbeit gelang die Identifizierung von Peg1p und Mal16p, zweier bislang unbekannter mitotischer Komponenten. Das Peg1p-Protein wurde auf der Suche nach Interaktionspartnern des Mikrotubuli-Plus-End-bindenden Mal3p-Proteins als Suppressor mutanter *mal3-1* Phänotypen isoliert. Bei Peg1p handelt es sich um einen neuen Vertreter einer evolutionär konservierten Familie Mikrotubuli-Plus-End-bindender Proteine, dem eine Rolle bei der Regulation der Mikrotubuli-Dynamik an der Verknüpfungsstelle von Spindel-Mikrotubuli und Kinetochor nachgewiesen werden konnte. Die Identifizierung der zweiten mitotischen Komponente, Mal16p, erfolgte durch die Charakterisierung eines Mutantenstammes, der erhöhte genetische Instabilität aufweist. Die Daten implizieren, daß Mal16p als ein weiteres Protein eine Rolle bei Spindel-Kinetochor-Interaktionen übernimmt.

Des weiteren sollte eine Fortsetzung der Charakterisierung des *spi1-25* Mutantenstammes herausstellen, welche mitotischen Teilprozesse durch Spi1p, der Ran GTPase in *S. pombe*, reguliert werden. Mit der Identifizierung genetischer Interaktionen zwischen *spi1*<sup>+</sup> und Genen, die für mitotische Motorproteine kodieren, wie auch durch die funktionelle Analyse extragener *spi1-25* Suppressoren konnte für SpRan neben einer Funktion beim Aufbau bzw. Aufrechterhaltung der Bipolarität der mitotischen Spindel eine neue Rolle während der Mitose aufgedeckt werden. Aufgrund der Tatsache, daß es sich bei allen isolierten extragenen *spi1-25* Suppressoren um mitotische Komponenten handelt, die für die Anheftung von Spindel-Mikrotubuli an das Kinetochor verantwortlich sind, konnte zum ersten Mal der *in vivo* Beweis für eine Funktion von SpRan bei Spindel-Kinetochor-Interaktionen erbracht werden.

### 3 Einleitung

Zur Aufrechterhaltung der genetischen Stabilität eukaryotischer Zellen muß -neben der präzisen Duplikation des chromosomalen Materials während der S-Phase- auch die akkurate Segregation der zwei Schwesterchromatiden auf die beiden Folgezellen während der Mitose gewährleistet sein. Im Falle einer ungleichmäßigen Verteilung des genetischen Materials führt dies zu einer Veränderung der Chromosomenanzahl (Aneuploidie) und kann somit dramatische Konsequenzen für den Organismus haben (Übersichtsartikel: Cahill et al., 1999). Aufgrund der Tatsache, daß Aneuploidie eine weit verbreitete Form der genetischen Instabilität in menschlichen Krebs-Zellen darstellt, wird bereits seit längerer Zeit der Chromosomen-Instabilität (CIN) eine Rolle bei der Tumorentstehung zugeschrieben (Sato et al., 2001; Übersichtsartikel: Holliday et al., 1989; Übersichtsartikel: Cahill et al., 1999).

In einer Vielzahl von Studien konnte an verschiedenen Krebs-Zelllinien, die CIN aufwiesen, Verbindungen zwischen mitotischen Defekten und der Entstehung von malignen Tumoren hergestellt werden. Eine Beobachtung wurde unter anderem an Prostata- bzw. Brustkrebs-Tumoren gemacht, die signifikante Veränderungen in der Struktur von Zentrosomen, den Mikrotubuli-Organisationszentren von Säugetier-Zellen, zeigten und die abnorme Zentrosomen-Struktur mit Defekten im Aufbau der Bipolarität der mitotischen Spindel einherging (Lingle und Salisbury, 1999; Sato et al., 2001; Pihan et al., 2003). Des weiteren werden Defekte in Proteinen des mitotischen Spindel-Kontrollpunkts als ein weiterer möglicher Auslöser für die Entstehung von Krebs beschrieben (Michel et al., 2001; Tsukasaki et al., 2001; Lee, 2003; Gupta et al., 2003). Der mitotische Spindel-Kontrollpunkt erkennt eine fehlende bzw. defekte Anheftung der mitotischen Spindel an die Schwesterchromatiden und führt zu einem transienten Zell-Arrest, um zu gewährleisten, daß der Defekt behoben wird. Bei einer Studie an Mäusen, die eine Deletion eines *mad2*<sup>+</sup>-Allels aufwiesen, ein Gen das für ein solches Protein des mitotischen Spindel-Kontrollpunktes kodiert, führte nach einem längeren Zeitraum zu Lungen-Tumoren (Michel et al., 2001).

Aneuploide Genomkonstitutionen werden ebenso in Verbindung mit der Trisomie 13 (Down-Syndrom), der Alzheimer-Krankheit und dem Alterungsprozeß beschrieben (Übersichtsartikel: Peterson und Mikkelsen, 2000; Migliore et al., 1999; Schatten et al., 1999; Ly et al., 2000).

Somit wird ersichtlich, welche große Aufmerksamkeit in Hinblick auf zukünftige Behandlungsmethoden der Aufklärung der molekularen Prozesse geschenkt wird, die für die Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität benötigt werden.

Da nicht nur die molekularen Prozesse, sondern auch die Komponenten des eukaryotischen Zellzyklus evolutionär konserviert sind und für eine Reihe mitotischer Proteine im Menschen funktionell Homologe in der Hefe identifiziert wurden, ist es von Vorteil, die komplexen molekularen Abläufe der Mitose an einem einfach organisierten Modellorganismus, wie z.B. der Spaltheife *Schizosaccharomyces pombe*, zu studieren.

### 3.1 Der Modellorganismus *Schizosaccharomyces pombe*

Dieser einfach strukturierte einzellige Ascomycet *Schizosaccharomyces pombe* zeigt im Vergleich zu höheren Eukaryoten eine Vielzahl an Ähnlichkeiten in den Komponenten, Strukturen und Regulationsmechanismen des eukaryotischen Zellzyklus.

Ebenso wie in multizellulären Organismen findet beim Übergang von der G2- in die M-Phase eine drastische Umorganisation des Mikrotubuli-Zytoskeletts sowie eine starke Kondensation der drei *S. pombe* Chromosomen während der Metaphase und Ausrichtung dieser in der Äquatorialebene statt (Hagan und Hyams, 1988; Hagan, 1998; Toda et al., 1981). Auch die *S. pombe* Zentromere ähneln in der Struktur und Komplexität denen höherer Eukaryoten (Appelgren et al., 2003). Ein nennenswerter Unterschied im Vergleich zu höheren Eukaryoten ist die Tatsache, daß Pilze, somit auch *S. pombe* Zellen, eine geschlossene Mitose aufweisen, d.h. der Zellkern wird beim Eintritt in die Mitose nicht aufgelöst.

Die Konserviertheit des eukaryotischen Zellzyklus bzw. der Mitose führte dazu, daß sich die Spaltheife *S. pombe* in den letzten Jahrzehnten zu einem exzellenten Modellorganismus in der wissenschaftlichen Grundlagenforschung entwickelte. Die Tatsache, daß im Jahre 2001 Sir Paul Nurse für seine Arbeit an diesem Organismus, die der Aufklärung der molekularen Prozesse des eukaryotischen Zellzyklus gewidmet war, den Nobel-Preis für Medizin erhielt, läßt erkennen, welch einzigartiges Potential die Spaltheife für die Erforschung dieser Abläufe besitzt (Nurse, 2002).

Um an die oben genannten Vorteile weiter anzuknüpfen, sollte an dieser Stelle aufgeführt werden, daß das komplette *S. pombe* Genom im Jahre 2002 veröffentlicht wurde und somit auf alle Gene in der *S. pombe* Datenbank (Sanger Center, Hinxton) zugegriffen werden kann (Wood et al., 2002). Das Genom der Spaltheife ist auf drei Chromosomen verteilt und ist mit 13,8 Megabasenpaare (Mbp) im Vergleich zu dem des Menschen (3000 Mbp) sehr klein (Craig, 1994). Dabei kann das Genom von *S. pombe* Zellen aufgrund von homologer Rekombination einfach, aber sehr effizient verändert werden. Des weiteren bieten *S. pombe* Zellen mit ihrer mühelosen Kultivierung und kurzen Generationszeit von ca. 130 min optimale Bedingungen als Studienobjekt. Leicht durchführbare Paarungstechniken und die

Anwesenheit einer konventionellen Meiose eröffnen die Möglichkeit, an Zellen der Spaltheefe -neben molekular-genetischen- auch klassisch-genetische Analysen durchzuführen.

Die genetisch leichte Handhabung von *S. pombe* Zellen als auch die evolutionäre Konserviertheit des mitotischen Prozesses ermöglicht es, neue mitotische Komponenten in der Spaltheefe zu isolieren und mittels funktioneller Analyse dieser, mehr Aufschluß über die mitotische Rolle entsprechender Komponenten in höheren Eukaryoten, wie z.B. im Menschen, zu erhalten.

## **3.2 Der mitotische Spindel-Apparat in *S. pombe***

Beim Eintritt in die Mitose vollzieht sich während der Umorganisation des Mikrotubuli-Zytoskeletts der Abbau der zytoplasmatischen Interphasen-Mikrotubuli zeitgleich mit dem Aufbau der bipolaren mitotischen Spindel in der Prophase (Hagan, 1998; Übersichtsartikel: Hagan und Petersen, 2000). Noch während die Spindel elongiert und somit durch den gesamten Zellkern reicht, dringen Astral-Mikrotubuli tangential von den Enden der mitotischen Spindel in das Zytoplasma, bis diese die Zellkortex erreichen. Im Anschluß daran kondensieren die drei *S. pombe* Chromosomen und ordnen sich auf der Mitte der mitotischen Spindel, der Metaphasenplatte, an (Toda et al., 1981). Nach der Anheftung der Spindel-Mikrotubuli an die Kinetochore, den Zentromer aufgelagerten Multiprotein-Komplexen, werden zuallererst die Zentromere der Schwesterchromatiden in Richtung Spindel-Pol-Körper (SPK) gezogen (Anaphase A), während in der Anaphase B die zwei Schwesterchromatiden durch Verlängerung der mitotischen Spindel allmählich auseinanderweichen und im weiteren Verlauf dieser mitotischen Phase die entgegengesetzten Pole erreichen. Beim Austritt aus der Mitose erfolgt der Abbau der mitotischen Spindel und entsprechend der Wiederaufbau des Interphasen-Mikrotubuli-Zytoskeletts (Hagan, 1998; Übersichtsartikel: Hagan und Petersen, 2000).

Im Verlauf der Mitose nimmt der mitotische Spindel-Apparat eine zentrale Rolle ein, und der Aufbau sowie die Aufrechterhaltung der Bipolarität wird für eine präzise Segregation des chromosomalen Materials benötigt.

### **3.2.1 Aufbau und Struktur der mitotischen Spindel**

Der Aufbau von Spindel-Mikrotubuli erfolgt an den SPKs, den Mikrotubuli-Organisationszentren in *S. pombe*, durch Polymerisation von Heterodimeren aus  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin-Untereinheiten in lange hohle Filamente (Adachi et al., 1986; Übersichtsartikel: Yanagida et al., 1987). Dabei sind die Mikrotubuli-Enden zu unterscheiden. Während die

Plus-Enden der Mikrotubuli, die sich auf der SPK abgewandten Seite befinden, hoch dynamisch sind und bei Wachstum diesen neue Tubulin-Untereinheiten angehängt werden bzw. bei Verkürzung Untereinheiten verloren gehen, sind die an den SPKs verankerten Minus-Enden weitaus weniger dynamisch (Mitchison und Kirschner, 1984). Der mitotische Spindel-Apparat in *S. pombe* Zellen besteht aus weniger als 50 Mikrotubuli und ist somit im Vergleich zu dem höherer Eukaryoten relativ einfach strukturiert (Übersichtsartikel: Page und Snyder, 1993). Dabei trennt der intakte Zellkern in Pilzen die zytoplasmatischen Astral-Mikrotubuli von den zentralen Spindel-Mikrotubuli. Letztere können hierbei in drei unterschiedliche Kategorien eingeteilt werden (Hagan, 1998). Pol-zu-Pol-Mikrotubuli erstrecken sich von einem SPK in Richtung des gegenüberliegenden SPKs, wobei diese mit den Pol-zu-Pol-Mikrotubuli des anderen interagieren. Die zweite Kategorie beinhaltet Mikrotubuli, die sich ebenfalls in Richtung des entgegengesetzten SPKs orientieren, aber innerhalb der mitotischen Spindel „blind“ enden. Zu der dritten und letzten Kategorie gehören die Kinetochor-Mikrotubuli, die in Richtung des chromosomalen Materials aufgebaut werden und sich an die Kinetochore der Schwesterchromatiden anheften (Ding et al., 1993; Funabiki et al., 1993; Saitoh et al., 1997). Neben der Herstellung der Spindel-Mikrotubuli durch die SPKs ist des weiteren der Aufbau und die Aufrechterhaltung der Bipolarität der mitotischen Spindel essentiell (Horio et al., 1991; Horio und Oakley, 1994; Masuda und Shibata, 1996). Hierzu werden eine Vielzahl an Proteinen benötigt, die mit den Spindel-Mikrotubuli interagieren und somit die Bipolarität der mitotischen Spindel gewährleisten.

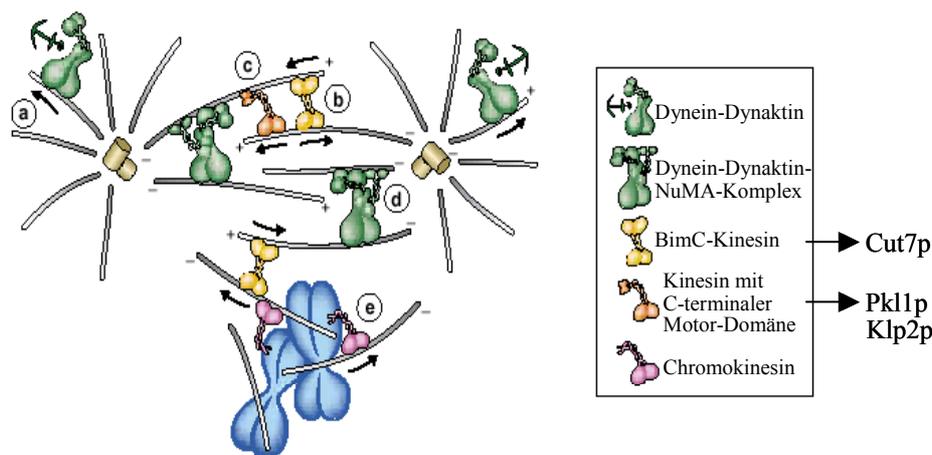
### **3.2.2 Komponenten des mitotischen Spindel-Apparates**

Die Einteilung dieser Komponenten der mitotischen Spindel erfolgt in zwei Gruppen:

Zum einen in die Proteine, die eine Motor-Domäne besitzen und aus diesem Grund als mitotische Motorproteine betitelt werden, zum anderen in solche, die keine Motor-Domäne aufweisen und Mikrotubuli-assoziierte Proteine, kurz MAPs, genannt werden. Obwohl die Funktionen der mitotischen Motorproteine und der MAPs teilweise überlappen bzw. nicht klar getrennt werden können, zeigen MAPs eine hoch dynamische Bindung an Mikrotubuli und als Hauptfunktion wird diesen die Regulation der Dynamik der Tubulin-Dimere zugeordnet (Vasquez et al., 1994; Beinbauer et al., 1997; Tournebise et al., 2000; Übersichtsartikel: Mimori-Kiyosue und Tsukita, 2003; Übersichtsartikel: Carvalho et al., 2003).

Mitotische Motorproteine zeichnen sich dadurch aus, daß diese durch Hydrolyse von ATP für Bewegungen entlang der mitotischen Spindel verantwortlich sind (Übersichtsartikel:

Wittmann et al., 2001). Das bedeutet, diese Proteine benutzen die Energie, um Substrate entlang der Mikrotubuli zu transportieren. Dieser Transport entlang der Spindel-Mikrotubuli wird sowohl für die Bipolarität als auch für die Elongation der mitotischen Spindel benötigt (Übersichtsartikel: Wittmann et al., 2001). Es gibt verschiedene mitotische Motorprotein-Familien, die entsprechend ihrer Funktion bzw. ihrer Bewegung in Richtung Mikrotubuli-Plus-Enden oder Minus-Enden zu unterscheiden sind. Zum einen existiert die sogenannte „Kinesin-Familie“, der Plus-End-gerichtete und Minus-End-gerichtete Motorproteine zugeteilt werden, zum anderen das zytoplasmatische Dynein, das zusammen mit dessen Aktivator Dynaktin einen Proteinkomplex bildet und sich in Richtung Mikrotubuli-Minus-Enden bewegt (Übersichtsartikel: Wittmann et al., 2001). Weitere Gruppen werden von den Chromosomen-assoziierten Chromokinesinen und den Kinesinen der KinI-Familie gebildet. Da an dieser Stelle nicht auf alle Motorproteine im Detail eingegangen werden kann, werden im folgenden ausschließlich die Funktionen der Mitglieder der „Kinesin-Familie“ beschrieben, die im weiteren Verlauf dieser Arbeit eine Rolle spielen.



**Abb.3-1: Mechanismen für den Aufbau und die Aufrechterhaltung der Bipolarität**

Abbildung entnommen aus dem Übersichtsartikel: Wittmann et al., 2001. Die Separation der Zentrosomen (gelbe Zylinder) wird unter anderem durch die Aktion der Plus-End-gerichteten Kinesine der BimC-Familie (b) hervorgerufen. Dabei bewirken BimC-KLPs das Auseinandergleiten der antiparallel verlaufenden Spindel-Mikrotubuli in entgegengesetzte Richtungen und sind zusätzlich für die Bündelung der Spindel-Mikrotubuli verantwortlich. Minus-End-gerichtete Kinesine (c) wirken der Separation der Zentrosomen entgegen und sind vermutlich für die Regulation der Geschwindigkeit der Spindel-Elongation zuständig. Die entsprechenden Homologen in *S. pombe* sind eingezeichnet. Die Funktion der anderen dargestellten mitotischen Motorproteine wird nicht behandelt.

Dabei ist das Cut7p-Protein in *S. pombe* ein Kinesin der konservierten BimC-Familie (Hagan und Yanagida, 1990). Bei allen Mitgliedern der BimC-Familie handelt es sich um Plus-End-gerichtete Motorproteine, weil diese Substrate in Richtung Mikrotubuli-Plus-Enden

transportieren. Bei den BimC-KLPs („kinesin like proteins“) befindet sich die Motor-Domäne im N-Terminus und die jeweiligen Proteine agieren als Homotetramere in der Mitte der Spindel. Neben einer Funktion bei der Verknüpfung der Mikrotubuli in der Mitte der Spindel bewirken Vertreter dieser Familie das Auseinandergleiten der antiparallel verlaufenden Spindel-Mikrotubuli in entgegengesetzte Richtungen und somit das Auseinanderweichen der SPKs bzw. der Schwesterchromatiden (Abb.3-1; Übersichtsartikel: Wittmann et al., 2001).

Als Antagonisten zu den Plus-End-gerichteten Motorproteinen wirken Minus-End-gerichtete Spindel-Kinesine der Kar3/Ncd-Familie (Pidoux et al., 1996; Troxell et al., 2001). Mitglieder dieser Familie, wie Pkl1p und Klp2p aus *S. pombe*, besitzen eine C-terminale Motor-Domäne und bewirken, daß die SPKs aufeinander zu gezogen werden. Auf diese Weise wird die Geschwindigkeit, mit der die SPKs auseinanderweichen, durch diese reguliert (Abb.3-1; Übersichtsartikel: Wittmann et al., 2001). Obwohl Pkl1p und Klp2p derselben Familie Minus-End-gerichteter Motorproteine angehören, besitzen beide Proteine unterschiedliche Funktionen. Während Pkl1p vermutlich für die Stabilisierung von Mikrotubuli zuständig ist, bewirkt Klp2p eine Destabilisierung (Troxell et al., 2001).

Im Anschluß an die Beschreibung der unterschiedlichen Funktionen von Motorproteinen soll hier auf die Gruppe der MAPs eingegangen werden. Für eine Vielzahl von MAPs konnte gezeigt werden, daß diese sowohl entlang der Mikrotubuli-Struktur als auch durch präferentielle Bindung an den Plus-Enden von Mikrotubuli die Dynamik und Stabilität dieser beeinflussen. Als Beispiele hierfür können die gut charakterisierten Mitglieder der TOG/XMAP215-Proteinfamilie Alp14p und Dis1p genannt werden, die eine stabilisierende Funktion auf die Spindel-Mikrotubuli ausüben (Nabeshima et al., 1995; Wang und Huffaker, 1997; Cullen et al., 1999; Nakaseko et al., 2001). Beide Proteine weisen eine präferentielle Bindung an Mikrotubuli-Plus-Enden sowie eine Lokalisierung am Kinetochor während der Metaphase auf und dienen als eine Art „Brücke“ zwischen den Kinetochoren und den Plus-Enden der Spindel-Mikrotubuli (Gard und Kirschner, 1987; Vasquez et al., 1994; Garcia et al., 2001; Garcia et al., 2002).

In einer Vielzahl von Studien wurden weitere Mikrotubuli-Plus-End-bindende Proteine isoliert, wie z.B. die Mitglieder der EB1-Familie, zu denen das *S. pombe* Mal3p-Protein gehört (Beinhauer et al., 1997). Die Mitglieder dieser Familie lokalisieren entlang der Mikrotubuli, dabei präferentiell mit den Plus-Enden, regulieren die Mikrotubuli-Dynamik und spielen eine wichtige Rolle bei der Interaktion des Mikrotubuli-Zytoskeletts mit anderen zellulären Strukturen (Übersichtsartikel: Tirnauer und Bierer, 2000; Schuyler und Pellman, 2001; Gundersen und Bretscher, 2003; Übersichtsartikel: Mimori-Kiyosue und Tsukita,

2003). Aufgrund der Tatsache, daß für das menschliche EB1-Protein eine Lokalisierung am Kinetochor gezeigt wurde, wird diesem ebenso wie den anderen Mitgliedern eine Funktion bei der Anheftung von Chromosomen an die mitotische Spindel zugeordnet (Fodde et al., 2001; Kaplan et al., 2001; Tirnauer et al., 2002a; Kerres et al., 2004). Die letzte Gruppe, die an dieser Stelle genannt werden soll, ist die CLASP/MAST/Stu1-Familie Mikrotubuli-Plus-End-bindender Proteine, deren menschliche Vertreter, CLASP1 und CLASP2, als Interaktionspartner von Mitgliedern einer weiteren Mikrotubuli-Plus-End-bindenden Familie, der CLIP170-Familie, isoliert wurden (Akhmanova et al., 2001; Maiato et al., 2003, Übersichtsartikel: Mimori-Kiyosue und Tsukita, 2003). Neben einer Funktion im Aufbau und der Aufrechterhaltung der mitotischen Spindel wurde für das menschliche CLASP1, als auch für das Homolog MAST/ORBIT in *D. melanogaster* eine Rolle bei der Modulation von Mikrotubuli-Dynamik an der Verküpfungstelle zwischen Mikrotubuli und Kinetochor zugesagt (Akhmanova et al., 2001; Maiato et al., 2003).

Da das Kinetochor eine zentrale Rolle bei der Verteilung des chromosomalen Materials übernimmt, wird in dem folgenden Kapitel der Aufbau des Zentromers bzw. des Kinetochors näher beschrieben.

### **3.3 Das *S. pombe* Zentromer**

Das Zentromer ist die chromosomale Region, in der das Kinetochor, ein aktiver Multiprotein-Komplex, eingelagert ist. Ähnlich höheren Eukaryoten sind *S. pombe* Zentromere komplexe Strukturen, und die Anwesenheit von *cis*-wirkenden DNA-Sequenzen wird für die Organisation einer heterochromatischen Struktur sowie für den Aufbau des Kinetochors benötigt (Übersichtsartikel: Pidoux und Allshire, 2000). Das *S. pombe* Kinetochor weist mehrere Mikrotubuli-Bindestellen auf. Dabei ist es äußerst wichtig, daß die Anheftung der Spindel-Mikrotubuli von den jeweils entgegengesetzten SPKs beidseitig erfolgt und somit eine Biorientierung der zwei Schwesterchromatiden ermöglicht. Die Kohäsion zwischen den Schwesterzentromeren wird hier solange aufrechterhalten, bis eine bilaterale Anheftung der Spindel-Mikrotubuli an die Schwesterkinetochore erfolgreich stattgefunden hat. Im Falle einer monopolen Anheftung, d.h. durch die Spindel-Mikrotubuli von nur einem SPK ausgehend, wird diese durch den mitotischen Spindel-Kontrollpunkt erkannt. Dieser sorgt dafür, daß die Kohäsion bestehen bleibt, damit der Defekt behoben werden kann (Yanagida et al., 1995; Funabiki et al., 1996; Chen et al., 1996; Taylor et al., 1998; Tomonaga et al., 2000; Bernard et al., 2001). Nach Auflösen der Kohäsion beim Übergang von Metaphase zur

Anaphase wird die Trennung der zwei Schwesterchromatiden unter anderem durch die Aktion von mitotischen Motorproteinen und MAPs an den Kinetochoren gewährleistet.

An dieser Stelle wird zunächst Bezug auf den Aufbau der Zentromer-DNA und ihrer Struktur genommen, bevor auf einen Teil der bisher identifizierten Kinetochor-Komponenten eingegangen wird.

### 3.3.1 Aufbau der Zentromer-DNA

Die drei *S. pombe* Zentromere sind in ihrem Aufbau und der Anordnung der DNA-Elemente sehr ähnlich. Im Vergleich zu den Zentromeren in *S. cerevisiae*, die einen Umfang von nur ca. 125 Bp aufweisen, sind die in *S. pombe* größer (Übersichtsartikel: Pidoux und Allshire, 2000). Die drei *S. pombe* Zentromere variieren in einem Größenbereich von 40-110 Kbp, wobei sich die Größe der DNA-Sequenzen umgekehrt proportional zur der der drei Chromosomen verhält (Wood et al., 2002). Jedes Zentromer enthält einen zentralen Kern, die sogenannte *cnt*-Region, die von langen invertierten Sequenz-Wiederholungen umgeben ist (Abb.3-2).

Diese flankierenden Sequenz-Wiederholungen werden in die inneren „Repeats“, auch als *imr*-Region bezeichnet, und in die äußeren „Repeats“, der *otr*-Region, eingeteilt. Die *imr*-Region liegt unmittelbar links und rechts (*imrL* und *imrR*) von dem zentralen Kern, und die entsprechende Sequenz-Wiederholung ist dabei für das jeweilige Zentromer spezifisch. Die äußeren „Repeats“ (*otrL* und *otrR*) sind aus Unterelementen, den sogenannten *dg*- bzw. *dh*-„Repeats“, zusammengesetzt und ihre Anordnung in Bezug zueinander bzw. zu der *cnt*-Region ist bei den entsprechenden Zentromeren zu unterscheiden.

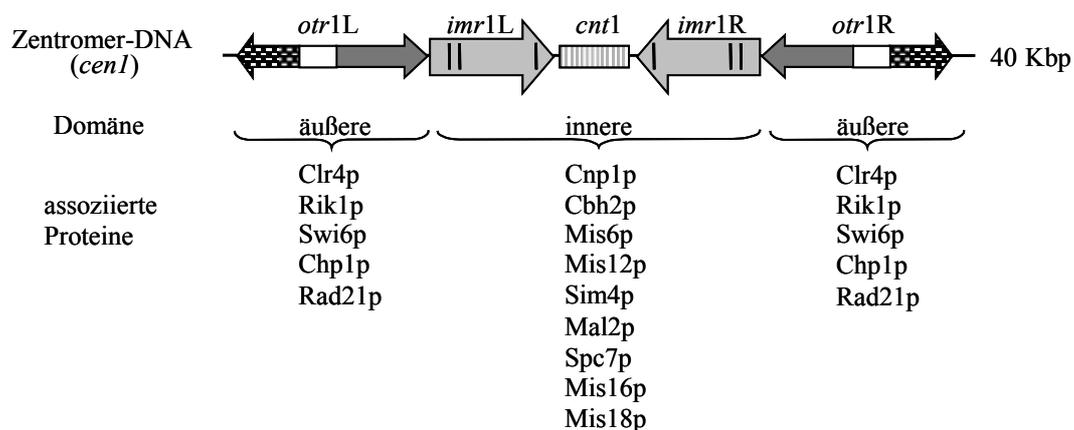


Abb.3-2: Schematische Darstellung des *S. pombe* Zentromers

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

Der Unterschied zwischen den Zentromeren der drei Chromosomen besteht lediglich in der Größe und Anzahl der DNA-Elemente sowie in der Anordnung der repetitiven Sequenzen, die die zentrale Domäne flankieren. Während die *cnt*- und *imr*-Regionen die innere Domäne des Zentromers repräsentieren, wird die *otr*-Region als äußere Zentromer-Domäne bezeichnet. Dabei ist die innere Domäne aufgrund seiner speziellen Chromatin-Struktur von der äußeren Domäne, die als Heterochromatin vorliegt, abzugrenzen (Polizzi und Clarke, 1991; Takahashi et al., 1992; Marschall und Clarke, 1995). Eine Eigenschaft von Heterochromatin ist die Anwesenheit von Nukleosomen, die zum einen an den Lysin-Resten der N-terminalen Enden der Histone H3 und H4 unteracetyliert sind, zum anderen eine Methylierung des Histon-H3 Lysin-9 aufweisen (Ekwall et al., 1997; Nakayama et al., 2001; Jenuwein und Allis, 2001). Diese zwei Merkmale führen unter anderem zu einer Stilllegung der Transkription in dem entsprechenden Bereich und sind für die uneingeschränkte Funktion der Zentromere notwendig. Die Stilllegung der Transkription in der äußeren Zentromer-Domäne ist des Weiteren von der Bindung spezieller Kinetochorproteine an die *otr*-Region des Zentromers abhängig. Zu diesen Proteinen, die mit der äußeren repetitiven Zentromer-Region (*otr*-Region) assoziieren, gehören das *S. pombe* HP 1 („Heterochromatin Protein 1“) Homolog Swi6p sowie die Proteine Chp1p, Rik1p und Clr4p (Übersichtsartikel: Pidoux und Allshire, 2000; Ekwall et al., 1995; Rea et al., 2000). Dabei ist die Assoziation von Swi6p und Chp1p abhängig von der Funktion der Proteine Clr4p und Rik1p (Ekwall et al., 1996; Rea et al., 2000; Bannister et al., 2001). Bei Clr4p handelt es sich um eine Histon-Methyltransferase, die die Methylierung des Lysin-9 von Histon-H3 bewirkt. Erst durch diese Methylierung und die gleichzeitige Funktion des Rik1p-Proteins sind die Proteine Swi6p und Chp1p befähigt, an das Histon-H3 und somit an die *otr*-Region zu binden. Eine weitere Untereinheit des Kinetochor-Komplexes, das Rad21p-Protein, das für die Aufrechterhaltung der Kohäsion der zwei Schwesterchromatiden bis zu Beginn der Anaphase verantwortlich ist, assoziiert in Abhängigkeit von Swi6p mit dieser Region des Zentromers (Tomonaga et al., 2000; Bernard et al., 2001; Nonaka et al., 2002). Neben Kinetochorproteinen, die ausschließlich an die *otr*-Region des Zentromers binden, existieren Proteine, die mit der inneren Zentromer-Domäne (*cnt* und *imr*-Region) assoziieren und sowohl für die spezielle Chromatin-Struktur als auch für die transkriptionelle Stilllegung dieses Bereiches verantwortlich sind. Zu diesen Proteinen gehört unter anderem die Histon-H3 Variante Cnp1p von *S. pombe* und Cbh2p, eines der CENP-B homologen Proteine der Spalthefe (Baum et al., 2000; Takahashi et al., 2000; Irelan et al., 2001). Des Weiteren wurden die Proteine Mis6p, Mis12p, Sim4p und Mal2p als innere Zentromerproteine identifiziert, wobei gezeigt wurde, daß die Lokalisierung

von Cnp1p und Sim4p abhängig von Mis6p ist. Dabei handelt es sich bei allen um essentielle Proteine (Saitoh et al., 1997; Goshima et al., 1999; Jin et al., 2002; Takahashi et al., 2000; Pidoux et al., 2003).

Die Tatsache, daß Zentromerproteine entweder eine Assoziation mit der inneren oder mit der äußeren Domäne zeigen, weist darauf hin, daß das *S. pombe* Zentromer aus zwei funktionell zu unterscheidenden Domänen aufgebaut ist (Übersichtsartikel: Pidoux und Allshire, 2000). Während die heterochromatischen äußeren Sequenz-Wiederholungen für die Zentromer-Kohäsion gebraucht werden, wird die innere Domäne für den Aufbau des Kinetochors *per se* benötigt (Übersichtsartikel: Bernard und Allshire, 2002; Saitoh et al., 1997; Goshima et al., 1999; Jin et al., 2002; Pidoux et al., 2003). Obwohl bereits mehrere Studien mit verschiedenen *S. pombe* Kinetochor-Mutanten implizierten, daß die Anheftung der Spindel-Mikrotubuli an der zentralen Zentromer-Region erfolgt, wurde in unserer Arbeitsgruppe unter anderem durch diese Arbeit der Beweis für diese Annahme erbracht (Saitoh et al., 1997; Goshima et al., 1999; Jin et al., 2002; Pidoux et al., 2003; Kerres et al., 2004).

### **3.4 Identifizierung neuer mitotischer Komponenten in *S. pombe***

Zur Identifizierung neuer mitotischer Komponenten wurde von Frau Dr. Ursula Fleig eine genetische Studie durchgeführt, in der 25 Mutantenstämme isoliert wurden, die einen erhöhten Verlust eines nicht-essentiellen Minichromosoms aufwiesen und aus diesem Grunde *mal* Mutanten („minichromosome altered loss“) genannt wurden (Fleig et al., 1996).

Für diese Studie wurde ein *S. pombe* Stamm, der neben den drei Chromosomen ein weiteres 550 Kbp großes, nicht-essentielles Minichromosom besaß, mit Ethylmethansulfonat (EMS) chemisch mutagenisiert (Niwa et al., 1986). Im Anschluß an die Mutagenese war es mit einem Farbsystem möglich, die genetische Stabilität des nicht-essentiellen Minichromosoms zu verfolgen. Für die Detektion des Minichromosom-Verlustes diente die Anwesenheit zweier unterschiedlicher, defekter *ade6*-Allele, wobei sich eines dieser auf Chromosom III der Spalthefe, das zweite auf dem Minichromosom befand. Die gleichzeitige Anwesenheit beider *ade6*-Allele führte aufgrund von intragener Komplementation zu Adenin-Prototrophie, während der Verlust des Minichromosoms, und somit eines *ade6*-Allels, dagegen Adenin-Auxotrophie hervorrief. Adenin-Auxotrophie ging mit einer Anreicherung eines roten Farbstoffs, einem Zwischenprodukt der Adeninbiosynthese, einher und Stämme, die einen Verlust des Minichromosoms aufwiesen, waren an einer zunehmenden Rot-Sektorierung der sonst weißen Kolonien erkennbar. Alle 25 isolierten *mal* Mutantenstämme zeigten unterschiedlich starke Frequenzen, mit denen das nicht-essentielle Minichromosom verloren

ging. Durch vergangene Arbeiten in unserem Labor, die der näheren Charakterisierung einiger auserwählter *mal* Mutantenstämme gewidmet waren, konnten neue mitotische Komponenten in *S. pombe* identifiziert werden (Fleig et al., 1996; Beinhauer et al., 1997; Fleig et al., 2000; Jin et al., 2002; Kerres et al., 2004).

Neben der Primärcharakterisierung einer neuen *mal* Mutante, der *mal16-1* Mutante, wird in dieser Arbeit des weiteren mit der funktionellen Analyse des bereits charakterisierten *mal25-1* bzw. *mal3-1* Mutantenstammes fortgefahren. Aus diesem Grunde sollen im folgenden Kapitel einige Informationen über den heutigen Wissensstand bezüglich der Funktion der entsprechenden Genprodukte gegeben werden.

### 3.4.1 Der *mal25-1* Mutantenstamm

Der *mal25-1* Mutantenstamm ist einer der 25 Mutantenstämme, die in der oben beschriebenen genetischen Studie isoliert wurden. Dieser zeigte im Vergleich zum Ausgangsstamm eine ca. 400-fach erhöhte Häufigkeit beim Verlust des nicht-essentiellen Minichromosoms. Bereits während meiner Diplomarbeit erfolgte die Charakterisierung des *mal25-1* Mutantenstammes und es konnte unter anderem festgestellt werden, daß dieser Hypersensitivität gegenüber der Mikrotubuli-destabilisierenden Chemikalie Thiabendazol (TBZ) aufweist, ein Phänotyp der spezifisch für Mutanten mit Defekten in der Mitose ist (Karig, 2000; Fleig et al., 2000).

Eine Suppressoranalyse identifizierte das bereits bekannte *spi1*<sup>+</sup>-Gen als Wildtyp-Gen von *mal25-1*. Somit erfolgte die Umbenennung der Mutante in *spi1-25* (Karig, 2000; Fleig et al., 2000).

Das *S. pombe spi1*<sup>+</sup>-Gen kodiert für Ran, eine kleine evolutionär konservierte GTPase der Ras-Familie, die essentiell für das Überleben eines jeden eukaryotischen Organismus ist (Matsumoto und Beach, 1991; Bischoff und Ponstingl, 1991a; Bischoff und Ponstingl, 1991b; Übersichtsartikel: Sazer und Dasso, 2000). Obwohl als primäre Funktion des Ran GTPase-Systems der nukleozytoplasmatische Transport angenommen wurde, gab es aufgrund von *in vitro* Untersuchungen immer mehr Beweise, daß das Ran GTPase-System auch eine vom Kerntransport unabhängige Rolle in der Mikrotubuli-Regulation und im Aufbau einer mitotischen Spindel spielt (Izaurrealde und Adam, 1998; Mattaj und Englmeier, 1998; Nakamura et al., 1998; Carazo-Salas et al., 1999; Kalab et al., 1999; Ohba et al., 1999; Wilde und Zheng, 1999). Mit der Isolation des *spi1-25* Mutantenstammes gelang es zum ersten Mal ein mutiertes Allel des *spi1*<sup>+</sup>-Gens zu identifizieren, das *in vivo* ohne Beeinträchtigung des nukleozytoplasmatischen Transport zu einem Defekt im Aufbau einer mitotischen Spindel führt (Fleig et al., 2000; Karig, 2000).

Untersuchungen, die während meiner Diplomarbeit durchgeführt wurden, deuten daraufhin, daß Spi1p, die SpRan GTPase, unter anderem eine Funktion bei der Organisation bzw. Stabilisierung von Mikrotubuli ausübt (Karig, 2000). Es wird davon ausgegangen, daß Ran bzw. Spi1p nicht direkt in der Mikrotubuli-Integrität involviert ist, sondern vermutlich über Interaktion mit regulatorischen bzw. mitotischen Proteinen die Stabilität von Mikrotubuli reguliert (Fleig et al., 2000; Karig, 2000; Gruss et al., 2001; Nachury et al., 2001; Wiese et al., 2001). Da die Möglichkeiten der genauen Rolle von Spi1p bzw. Ran in der Mikrotubuli-Integrität vielseitig erscheinen, kann erst nach Identifizierung aller regulatorischen bzw. mitotischen Proteine, über die Ran reguliert, auf die genaue Funktion geschlossen werden.

### 3.4.2 Der *mal3-1* Mutantenstamm

Das *mal3*<sup>+</sup>-Gen wurde als Wildtyp-Gen des *mal3-1* Mutantenstammes isoliert. Durch die nähere Charakterisierung der Funktion des Mal3p-Proteins konnte gezeigt werden, daß es sich bei diesem Protein um ein Mitglied der EB1-Familie handelt (Beinhauer et al., 1997). Die EB1-Familie repräsentiert eine evolutionär konservierte Gruppe von Proteinen, die sowohl mit zytoplasmatischen als auch mitotischen Mikrotubuli assoziieren (Übersichtsartikel Tirnauer und Bierer, 2000; Su et al., 1995; Rehberg und Graf, 2002; Tirnauer et al., 2002b). Die Identifizierung des humanen EB1-Proteins erfolgte aufgrund seiner Interaktion mit dem C-Terminus des Adenomatous Polyposis Coli (APC) Tumorsuppressorproteins (Su et al., 1995). Als Folge somatischer oder germinaler Mutationen im menschlichen APC-Gen, insbesondere im C-Terminus, wurde die Entwicklung von Dickdarmkarzinomen beschrieben (Grodin et al., 1991; Nishisho et al., 1991; Polakis et al., 1997). Für die Mitglieder der EB1-Familie, somit auch für das Mal3p-Protein, konnte eine präferentielle Bindung an Mikrotubuli-Plus-Enden nachgewiesen werden. Aufgrunddessen wurde diese Familie der Gruppe Mikrotubuli-Plus-End-bindender Proteine zugeordnet (Tirnauer et al., 1999; Berrueta et al., 1998; Juwana et al., 1999; Mimori-Kiyosue et al., 2000; Rehberg und Graf, 2002; Browning et al., 2003; Busch und Brunner, 2004).

Für die Proteine der EB1-Familie -ebenso wie für andere Mikrotubuli-Plus-End-bindenden Proteine- konnte gezeigt werden, daß diese eine Funktion bei der Modulation der Mikrotubuli-Dynamik besitzen (Dujardin et al., 1998; Lin et al., 2001; Übersichtsartikel: Mimori-Kiyosue und Tsukita, 2003). Die Tatsache, daß für das menschliche EB1-Protein eine Lokalisierung am Kinetochor gezeigt wurde und diese Assoziation von polymerisierenden Mikrotubuli abhängig ist, führte zu der Annahme, daß EB1 eine Rolle bei der Regulation der Mikrotubuli-Dynamik an der Verknüpfungsstelle von Spindel-Mikrotubuli und Kinetochor

übernimmt (Tirnauer et al., 2002a). Obwohl für das Mal3p-Protein bisher keine Kinetochor-Assoziation nachgewiesen werden konnte, wurde in unserem Labor eine direkte Interaktion von Mal3p und dem inneren Zentromer-Protein Spc7p nachgewiesen, was zu der Vermutung führt, daß Mal3p mit dem Kinetochor -zumindest transient- assoziiert (Kerres et al., 2004). Die Nachweise, daß Mal3p als Mikrotubuli-Plus-End-bindendes Protein die Dynamik von Mikrotubuli reguliert und mit dem inneren Zentromerprotein Spc7p interagiert, deuten daraufhin, daß Mal3p eine Funktion bei der Anheftung von Spindel-Mikrotubuli und Kinetochor ausübt (Browning et al., 2003; Busch und Brunner, 2004; Kerres et al., 2004).

### 3.5 Zielsetzung dieser Arbeit

Unsere Arbeitsgruppe ist an der Aufklärung der molekularen Prozesse interessiert, die die präzise Verteilung des chromosomalen Materials während der Mitose gewährleisten.

Ziel dieser Arbeit war es, durch Isolation und Charakterisierung einer neuen mitotischen Komponente der Spaltheefe *S. pombe* sowie durch Fortsetzung der funktionellen Analyse bereits charakterisierter mitotischer Proteine, den Prozess der Chromosomen-Segregation weiter zu entschlüsseln.

Zur Isolation einer unbekanntenen Komponente des Mitose-Apparates sollte zunächst durch einen ersten funktionellen Test ein neuer *mal* Mutantenstamm, der eine erhöhte genetische Instabilität aufweist, für eine nähere Charakterisierung ausgesucht werden. Nach Auswahl des *mal16-1* Mutantenstammes war es meine Aufgabe, das Gen bzw. das Genprodukt zu identifizieren, dessen Defekt den mitotischen Prozess der Chromosomen-Segregation in *mal16-1* Zellen beeinflusst, und im Anschluß daran erste Hinweise auf die Funktion des Mal16p-Proteins während der Mitose zu ermitteln.

Zudem sollten die Untersuchungen, die bereits während meiner Diplomarbeit zur Aufklärung der exakten Funktion der SpRan GTPase, Spi1p, begonnen wurden, weiter fortgesetzt werden. Hierbei war es von Interesse, inwieweit Spi1p neben dem Aufbau einer bipolaren Spindel weitere mitotische Teilprozesse reguliert. Da funktionelle Beeinträchtigungen von Spi1p als auch von mitotischen Motorproteinen zu ähnlichen Defekten während der Mitose führen, sollten Untersuchungen auf mögliche genetische Interaktionen zwischen SpRan und Vertretern der genannten Proteingruppe durchgeführt werden. Mittels dieser Untersuchungen wie auch durch die funktionelle Analyse der bereits isolierten extragenen *spi1-25* Suppressoren sollten Komponenten, über die Ran mitotische Prozesse reguliert, identifiziert werden.

---

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, auf einem bereits isolierten genomischen *S. pombe* DNA-Bank-Plasmid das Gen zu identifizieren, dessen Expression für die Suppression mutanter *mal3-1* Phänotypen verantwortlich ist. Im Anschluß daran sollte durch eine nähere Charakterisierung des entsprechenden Genproduktes dessen Funktion ermittelt werden.

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden in „per Analyse“ (p.A.) Reinheit von den Firmen Calbiochem (USA), Difco (USA), Fermentas (Litauen), Fluka (Buchs), Invitrogen (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Roche (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma (Deisenhofen) bezogen.

### 4.2 Enzyme

#### 4.2.1 Restriktionsendonukleasen

Enzym	Erkennungsequenz	Hersteller
<i>Acc65I</i>	G↓GTACC	Fermentas (Litauen)
<i>AccI</i>	GT↓MKAC*	Fermentas (Litauen)
<i>BamHI</i>	G↓GATCC	Fermentas (Litauen)
<i>BclI</i>	T↓GATCA	Fermentas (Litauen)
<i>EcoRI</i>	G↓AATTC	Fermentas (Litauen)
<i>EcoRV</i>	GAT↓ATC	Fermentas (Litauen)
<i>HincII</i>	GTPy↓PuAC**	Fermentas (Litauen)
<i>HindIII</i>	A↓AGCTT	Fermentas (Litauen)
<i>NcoI</i>	C↓CATGG	Fermentas (Litauen)
<i>NdeI</i>	CA↓TATG	Biolabs (USA)
<i>PstI</i>	CTGCA↓G	Fermentas (Litauen)
<i>SacI</i>	GAGCT↓C	Fermentas (Litauen)
<i>Sall</i>	G↓TCGAC	Fermentas (Litauen)
<i>SmaI</i>	CCC↓GGG	Fermentas (Litauen)
<i>XbaI</i>	T↓CTAGA	Fermentas (Litauen)
<i>XhoI</i>	C↓TCGAG	Fermentas (Litauen)
<i>XmnI</i>	GAANN↓NNTTC***	Biolabs (USA)

\* M=A oder C; K=G oder T

\*\* Py=Pyrimidin; Pu=Purin

\*\*\* N=A, T, G oder C

#### 4.2.2 Sonstige Enzyme

Enzym	Hersteller
β-Glucuronidase	Sigma (Deisenhofen)
<i>Pfu</i> -Polymerase	Promega (USA)
<i>Pfx</i> -Polymerase	Invitrogen (Karlsruhe)
Phosphatase, alkalische	Boehringer (Mannheim)
Proteinase K	Roche (Mannheim)

Enzym	Hersteller
Klenow-Polymerase	Invitrogen (Karlsruhe)
RNaseA	Sigma (Deisenhofen)
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	Eigene Herstellung/ Roche (Mannheim)
<i>T4</i> -DNA-Ligase	Fermentas (Litauen)
<i>T4</i> -DNA-Polymerase	Fermentas (Litauen)
Zymolyase	Seikagaku (Japan)

### 4.3 Sonstige Materialien

Material	Hersteller
$\lambda$ -Phagen-DNA	Fermentas (Litauen)
Eppendorf-Reaktionsgefäße	Eppendorf (Kromburg)
GeneClean-Kit	Bio 101 (USA)
Glasperlen	B. Braun (Melsungen)
Heringssamen-DNA	Sigma (Deisenhofen)
Nick Translation-Kit	Invitrogen (Karlsruhe)
Nucleo Spin Extraktions-Kit	Macherey & Nagel (Düren)
Qiagen Plasmid Midi-Kit	Qiagen (Hilden)
Whatman Papier (3MM)	Schleicher & Schüll (Daßel)

### 4.4 Medien und Wachstumsbedingungen

#### 4.4.1 *E. coli* Stämme

*E. coli* Zellen wurden als Schüttelkulturen in LB-Medium unter aeroben Bedingungen bei 37 °C angezogen. Zur Selektion von Plasmid-Transformanten wurde dem Medium 50 µg/ ml Ampicillin zugefügt. Festem Nährboden wurde Agar zugesetzt.

#### 4.4.2 *S. pombe* Stämme

Die Anzucht der *S. pombe* Stämme erfolgte in Vollmedium (YE5S) oder in Minimalmedium, dem die entsprechenden Supplementlösungen bis zu einer Endkonzentration von 75 mg/ l zugesetzt wurden (Moreno et al., 1991). Dabei unterschieden sich die verwendeten Minimalmedien in der Art der Stickstoffquelle. Während dem Standard-Minimalmedium (MM) Glutaminsäure als Stickstoffquelle diente, wurde dem Edinburgh-Minimalmedium (EMM) Ammoniumchlorid zugefügt. Festem Nährboden wurden 20 g Agar pro Liter zugesetzt. Die *S. pombe* Kulturen wurden Ü/N bei 30 °C angezogen, mit Ausnahme der temperatursensitiven Stämme, deren Anzucht bei 24 °C bzw. 28 °C erfolgte. Um die Auswirkungen verschiedener Parameter auf das Kolonien-Wachstum von *S. pombe* zu untersuchen, wurden Tropfstests durchgeführt. Dabei wurde mit Zellen einer logarithmisch wachsenden Kultur eine

Verdünnungsreihe in bidest. H<sub>2</sub>O angesetzt und zwischen 10<sup>4</sup> und 10<sup>1</sup> Zellen auf entsprechende Agarplatten getropft. Um Auswirkungen der Temperatur auf das Wachstum zu analysieren, wurden *S. pombe* Stämme bei Temperaturen zwischen 24 °C und 37 °C inkubiert. Die Hypersensitivität gegenüber Thiabendazol (TBZ) wurde mittels serieller Tropftests bei 24°C untersucht. Hierfür wurde pro Milliliter Medium in der Regel zwischen 5,5 und 7,5 µg TBZ verwendet. Bei Genexpressions-Studien wurde zur Reprimierung des *nmt1*<sup>+</sup>-Promotors dem entsprechenden Medium 5 µg/ ml Thiamin zugefügt, während eine Dereprimierung des Promotors durch Anzucht der Zellen in thiaminfreien Medium erzielt wurde. Die Induktionszeiten waren zum einen abhängig von der gewählten Inkubationstemperatur zum anderen von der experimentellen Verwendung. Für die Durchführung serieller Tropftests wurden die Kulturen entweder bei 30 °C für 18 h oder bei 24 °C für 20 h angezogen. Eine Verwendung in immunofluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen setzte eine Inkubation bei 30 °C für 22 h bzw. bei 24 °C für 24 h voraus. Zur Selektion kanamycinresistenter Zellen wurden YE5S-Platten benutzt, die Geneticin-Disulfat (G418) in einer Konzentration von 100 mg/ l enthielten.

## 4.5 Oligonukleotide

Nummer	Bezeichnung	Sequenz (5'-3')	Verwendungszweck
58	M13rev	GGAAACAGCTATGACCATG	Sequenzierung
79	mal3amprev	AAT TAGACGGCTCAAACACT	Verifikation
103	Dam1-f	ATGGAGAAATACCAGAAAGC	Klonierung
104	Dam1rev	TTATCTGGAAGCGGAATAGG	Klonierung
106	Dam1-GFP-f	ATTTGCAACTGCAGACGAAACATTTGCTACAAATG ACACTTCTTTCATTGAACGGCCAGAAACCTATTCCG CTTCCAGACGGATCCCCGGGTTAATTA	Homologe Rekombination
110	Dam1-KanMx	TGATATGCTAGGTTATTTCC	Verifikation
131	his3a	GAGCCTCTTTGCGAAGGAGCATTG	Verifikation
142	KanMxStartver primer	ATTCCAACATGGATGCTG	Verifikation
163	ura4-v-3'-f	GAGAAGCTGGTTGGAAGG	Verifikation
217	cnt1	AACAATAAACACGAATGCCTC	ChIP
218	cnt2	ATAGTACCATGCGATTGTCTG	ChIP
219	imr1	GGCTACCAGCATTGTTATTCATAACC	ChIP
221	otr1	CACATCATCGTCGTACTACAT	ChIP
222	otr2	GATATCATCTATATTTAATGACTACT	ChIP
223	fbp1-1	AATGACAATTTCCCACTAGCC	ChIP
224	fbp1-2	ACTTCAGCTAGGATTCACCTGG	ChIP
228	imr3	GGATATATGTATTCTTGCCTC	ChIP
241	Stu1-GFP-f.	TTTCAATATTGGGAGGATTAATGAAGGACAAAGG CTTCTTTTCATGCATTATTTAAAGATGAAGTCTGAT GAAAAGAATCGGATCCCCGGGTTAATTA	Homologe Rekombination

Nummer	Bezeichnung	Sequenz (5'-3')	Verwendungszweck
242	Stu1-GFP-r.	AAGGAGCAGAGGAGGCAGTAGCGGAAGCTTCTTCT TGCATGCATAAGTTGAAGACATTAACAGGTTTGAG CGTATACTAAGAATTCGAGCTCGTTTAAAC	Homologe Rekombination
246	Stu1-ver-5'	TGAACCAGTCATATTGGC	Verifikation
247	Stu1-ver-3'	TGTTTCAGGTATTGAGCC	Verifikation
248	Dam1-GFP- rev-2	CAACCTGATATGCTAGGTTATTCCCTTCGACTATTA TAATAATAAATGAAAAAGAAAAAACTTCAACCAGT CTCCCTTGCGAATTCGAGCTCGTTTAAAC	Homologe Rekombination
261	GFP-Seq.5'	ACGTGTCTTGTAGTTCCC	Verifikation
301	Stu-Del.5ver	TACCACTGCATCACATGCCC	Verifikation
302	kanMxreversep rimer	CCTCGACATCATCTGCCC	Verifikation
304	kanMxforward	GGATGTATGGGCTAAATG	Verifikation
305	Stu-Del.5'	GCGAGTTTTTAATATTCTCTTCGCAAACAACGCTTC ACGTTTCTCTTGTTCGCTCGTTTCATCAATATATTT GTAATTGGAATTCGAGCTCGTTTAAAC	Homologe Rekombination
317	c16E8-GFP-f.	GCCAATCCGTCAGCTTAATTAAGCACATTCATGTTT TCATACGCTTGCTTGGCACCTCTGGTTCTTTTAAAG ATACAAAACGGATCCCCGGGTAAATTA	Homologe Rekombination
318	c16E8-GFP-r.	ATATGATTCCAAGAACCGCATATTTTATAATATAAT AACAATTTATGTTGTATTCTGTTTCTGCCCTTTTCTT CCCGTCGGAATTCGAGCTCGTTTAAAC	Homologe Rekombination
321	c16E8-5' ver	GCATACATTGCAATGTGG	Verifikation
322	c16E8-3' ver	GAAGAATCAGAGCTCTCC	Verifikation
332	Stu1-GFP-f.2	TTTCAATATTGGGAGGATTAATGAAGGACAAAGG CTTCTTTTCATGCATTATTTAAAGATGAAGTCTGAT GAAAAGAATGGTGCAGGAGCTGAGCTCATGGGTAT TCC	Homologe Rekombination
333	Stu1-GFP-r.2	AAGGAGCAGAGGAGGCAGTAGCGGAAGCTTCTTCT TGCATGCATAAGTTGAAGACATTAACAGGTTTGAG CGTATACTAACTGTTCCAACACCAATG	Homologe Rekombination
342	Stu1-Del-3'-2	GCTAAAAAAGGAGCAGAGGAGGCAGTAGCGGAAG CTTCTTCTTGCATGCATAAGTTGAAGACATTAACAG GTTTGAGCGTATACTAACGGATCCCCGGGTAAATTA A	Homologe Rekombination
344	StuDel-ver3'-2	ATCTTCATGATCATGACG	Verifikation
349	p32A8-GFP-f.	ATAGAATTAAGCGTAGCTTAGACATCATTTGAACTT GCACGCTTGTATGATTATCCTTTTTCCTTCGATCGTT CGTTTACGAATTCGAGCTCGTTTAAAC	Homologe Rekombination
350	p32A8-GFP-r.	GCACCATTTAGTTGTAGTAGACTTTCGTTTGTATT ACCTAAACGAATGCAATAAACTAGCTCTCGAAGT TTGTGAATCGGATCCCCGGGTAAATTA	Homologe Rekombination
351	p32A8-5' ver	AAGCATCATTTTTACAGC	Verifikation
352	p32A8-3' ver	ACTTGGAGCTCACATGCC	Verifikation

## 4.6 Plasmide

Bezeichnung	Genetische Marker, Konstruktion, Beschreibung	Nummer
pREP3X	<i>LEU2</i> , <i>Amp<sup>r</sup></i> , Thiamin-reprimierbarer <i>nmt1<sup>+</sup></i> -Promotor	147
pUR19- <i>mal2<sup>+</sup></i>	<i>ura4<sup>+</sup></i> , <i>Amp<sup>r</sup></i> , genomischer <i>mal2<sup>+</sup></i> -ORF in pUR19	159
	<i>pFA6-GFP(S65T)-kanMx6'</i>	177
	<i>pFA6a-3HA-kanMx6'</i>	179
pUR19- <i>spi1<sup>+</sup></i>	<i>ura4<sup>+</sup></i> , <i>Amp<sup>r</sup></i> , genomischer <i>spi1<sup>+</sup></i> -ORF in pUR19	219

Bezeichnung	Genetische Marker, Konstruktion, Beschreibung	Nummer
pUR19	<i>ura4<sup>+</sup>, Amp<sup>r</sup></i>	222
pJR2-41XU	<i>ura4<sup>+</sup>, Amp<sup>r</sup></i> , Thiamin-reprimierbarer <i>nmt1<sup>+</sup></i> Promotor	286
pJR2-81XU	<i>ura4<sup>+</sup>, Amp<sup>r</sup></i> , Thiamin-reprimierbarer <i>nmt1<sup>+</sup></i> Promotor	290
pREP3X- <i>pkll<sup>+</sup></i>	<i>LEU2, Amp<sup>r</sup>, pkll<sup>+</sup></i> -ORF in pREP3X	309
pREP81X- <i>pkll<sup>+</sup></i>	<i>LEU2, Amp<sup>r</sup>, pkll<sup>+</sup></i> -ORF in pREP81X	310
CD-20	<i>ura4<sup>+</sup>, Amp<sup>r</sup></i> , C-Terminus des genomischen <i>peg1<sup>+</sup></i> -ORFs in pUR19	350
pcs2 intSGp	<i>Pk1-EGFP-ura4<sup>+</sup></i>	432
CD-20v	<i>ura4<sup>+</sup>, Amp<sup>r</sup></i> , gesamter genomischer <i>peg1<sup>+</sup></i> -ORF in pUR19	435
CD-20p	CD-20 subkloniert; <i>HindIII</i>	445
CD-20n	CD-20 subkloniert, <i>HincII/ BamHI</i>	446
IK-A	<i>ura4<sup>+</sup>, Amp<sup>r</sup></i> , genomischer <i>mal3<sup>+</sup></i> -ORF in pUR19	450
IK-H	<i>ura4<sup>+</sup>, Amp<sup>r</sup></i> , genomischer <i>spdaml<sup>+</sup></i> -ORF in pUR19	457
IK-M	<i>ura4<sup>+</sup>, Amp<sup>r</sup></i> , genomischer <i>spc7<sup>+</sup></i> -ORF in pUR19	458
IK-Hs	IK-H subkloniert; <i>HindIII/ BclI</i>	468
pREP3X- <i>spdaml<sup>+</sup></i>	<i>LEU2, Amp<sup>r</sup>, spdaml<sup>+</sup></i> -ORF in pREP3X	470
IK-Hv bzw. pJR41X- <i>spdaml<sup>+</sup></i>	<i>ura4<sup>+</sup>, Amp<sup>r</sup>, spdaml<sup>+</sup></i> -ORF in pJR2-41XU	471
pJR81X- <i>spdaml<sup>+</sup></i>	<i>ura4<sup>+</sup>, Amp<sup>r</sup>, spdaml<sup>+</sup></i> -ORF in pJR2-81XU	473

## 4.7 Transformation

Die Transformation von *S. pombe* Zellen erfolgte nach der von Okazaki beschriebenen Lithiumacetatmethode (Okazaki et al., 1990). Zur Transformation -PCR generierter- linearer DNA-Fragmente (Integrations- und Deletionskassetten) wurde der zu transformierenden linearen DNA 10 µg Heringssperma-DNA beigemischt.

Zur Plasmid-Amplifizierung in *E. coli* Zellen wurden -abhängig von der Konzentration der Ausgangs-DNA- unterschiedliche Transformationsmethoden verwendet. Dabei zeichnet sich die „One minute“-Transformation DMSO-kompetenter *E. coli* Zellen durch ihre Schnelligkeit aus, wurde jedoch aufgrund niedrigerer Effizienz nur mit Plasmid-DNA in ausreichender Konzentration durchgeführt. Ligationsansätze mit sehr niedriger DNA-Konzentration wurden hingegen durch Elektroporation in hochkompetente *E. coli* Zellen transformiert.

## 4.8 Präparation von Nukleinsäuren

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *S. pombe* erfolgte mit Hilfe des „GeneClean-Kit“ der Firma Bio101 (USA) gemäß Herstellerangaben. Zur Gewinnung genomischer *S. pombe* DNA wurde ein von Hoffmann erstelltes Protokoll verwendet (Hoffmann und Winston, 1987).

Zur Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* Zellen wurde entweder die alkalische-Methode nach Ish Horowicz und Burke (Ish Horowicz und Burke, 1982) angewandt oder zur Isolierung größerer DNA-Mengen das Qiagen Plasmid Midi-Kits (Qiagen, Hilden) gemäß Herstellerangaben verwendet.

## 4.9 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 nach Maniatis (Maniatis et al., 1989) durchgeführt. Die in Kapitel 4.2 aufgeführten Enzyme wurden hierbei entsprechend den Standardprotokollen und in Übereinstimmung mit den Herstellerangaben eingesetzt. Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte mit Hilfe des „Nucleo Spin Extraktions-Kit“ (Macherey & Nagel, Düren).

### 4.9.1 Subklonierung des Genbank-Plasmids IK-H

Die Vorgehensweise für die Subklonierung des Genbank-Plasmids IK-H soll an dieser Stelle kurz beschrieben werden. Das Plasmid IK-H (Kapitel 4.6) wurde zuerst in dem *dam<sup>-</sup>* *E. coli*-Stamm GM48 amplifiziert (Kapitel 8.1.1), da die Restriktionsendonuklease *BclI* nur in der Lage ist, nicht *dam*-methylierte DNA zu schneiden. Nach Plasmid-Isolation (Kapitel 4.8) und Restriktion mit *BclI*/*HindIII* (Kapitel 4.2.1) wurden die überhängenden Enden der geschnittenen DNA mit der *T4*-DNA-Polymerase aufgefüllt und das Plasmid religiert (Kapitel 4.2.2).

## 4.10 Methoden zur Kreuzung von *S. pombe*

### 4.10.1 Paarung haploider *S. pombe* Hefestämme

Haploide *S. pombe* Stämme ( $h^+$  bzw.  $h^-$ ) wurden in einem geringem Volumen bidest.  $H_2O$  (5-10 $\mu$ l) in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß vermengt und der „Zellmix“ auf Minimalmediums-Platten (oder Malzextrakt-Platten) pipettiert. Die Platten wurden in der Regel bei Raumtemperatur (RT) für ca. 24-48 h inkubiert.

### 4.10.2 Generierung diploider *S. pombe* Hefestämme

Haploide *S. pombe* Stämme (*ade6-M210* bzw. *ade6-M216*) wurden, wie in Kapitel 4.10.1 beschrieben, gepaart, anschließend auf Selektivmedium (MM-ade) ausplattiert und für ca. 6-7 Tage bei der entsprechenden Temperatur inkubiert. Dabei waren diploide Hefestämme aufgrund der erhaltenen Adenin-Prototrophie an der weißen Kolonienfarbe zu erkennen.

### 4.10.3 „Random spore“-Analyse

In der „Random spore“-Analyse wurden durch  $\beta$ -Glucuronidase-Behandlung die Zellwände vegetativer Zellen und Asciwände, jedoch nicht die der Sporen, aufgebrochen, wobei ausschließlich Sporen überlebensfähig blieben. Dazu wurden die Asci mit einer Pipettenspitze von der Minimalmediums-Platte aufgenommen und in 1 ml bidest. H<sub>2</sub>O inklusive 20  $\mu$ l einer 1:10 verdünnten  $\beta$ -Glucuronidase Lösung resuspendiert. Der Ansatz wurde in der Regel Ü/N bei RT inkubiert. Daraufhin wurde nach zweimaligem Waschen der Sporen mit 1 ml bidest. H<sub>2</sub>O die Sporenzahl pro Milliliter ermittelt und 100-200 Sporen auf selektive Minimalmediums-Platten ausplattiert. Nach Inkubation für ca. 2-8 Tage bei geeigneter Temperatur wurden Kolonien ermittelt, deren Zellen den gewünschten Genotyp besaßen.

### 4.10.4 Tetradenanalyse

Zur Tetradenanalyse wurde die entsprechende Tetraden-Suspension auf eine Vollmediums-Platte pipettiert. Anschließend wurden einzelne Tetraden mit einer Glasfasernadel unter dem Tetradenmikroskop mit Hilfe eines Mikromanipulators in einem Abstand von ca. 5 mm voneinander auf den Agar abgelegt. Die Tetraden-Platte wurde bei geeigneter Temperatur so lange inkubiert, bis sich die Asciwände der separierten Tetraden auflösten. Daraufhin wurden die Sporen der einzelnen Tetraden erneut mit der Glasfasernadel vereinzelt und in einem Abstand von ca. 5 mm untereinander angeordnet. Nach Inkubation bei geeigneter Temperatur wurde die Verteilung der genetischen Marker der Sporen überprüft.

## 4.11 Ermittlung der Minichromosomenstabilität

Das Einbringen eines nicht-essentiellen Minichromosoms in den *mal16-1* Mutantenstamm erfolgte durch Paarung der Stämme UFY 416 und UFY 103 (Kapitel 4.10.1). Nach anschließender Tetradenanalyse wurden Zellen der resultierenden Stämme auf Selektivmedium (MM-ade) ausgestrichen und für 4 Tage bei 24°C inkubiert. Die Bestimmung des Minichromosom-Verlustes erfolgte durch Anzucht der Zellen in flüssigem Selektivmedium (MM-ade) bei 24 °C und anschließendes Ausplattieren auf MM-Platten mit limitierender Adeninkonzentration (5  $\mu$ g/ ml). Nach 10 Tagen Inkubation bei 24 °C waren adeninprototrophe Kolonien an ihrer weißen Kolonienfarbe zu erkennen, während adeninauxotrophe durch ihre rote Färbung auffielen.

## 4.12 Komplementation mutanter Phänotypen

### 4.12.1 Komplementation der Temperatursensitivität des *mal16-1* bzw. *mal16-1 mal2-1* Mutantenstammes

Zur Identifizierung des *mal16*<sup>+</sup>-Wildtyp-Gens wurde eine genomische *S. pombe* DNA-Bank in den *mal16-1* Mutantenstamm transformiert und bei 36°C für 2-3 Tage auf Ura<sup>+</sup>-Transformanten selektioniert. Anschließend wurden die Transformanten auf Selektivmedium replikaplatziert und für weitere 3-4 Tage bei 36 °C inkubiert. Putativ positive Transformanten wurden auf Komplementation des elongierten Zell-Phänotyps hin untersucht.

Bei der verwendeten Genbank handelt es sich um genomische *S. pombe* DNA, die partiell mit dem Restriktionsenzym *Sau3A* geschnitten und mittels der *Sall*-Erkennungsschnittstelle der „Multiple cloning site“ (MCS) in den Vektor pUR19 kloniert wurde. Dabei beträgt die durchschnittliche Insertgröße der genomische *S. pombe* DNA ca. 4 Kbp.

Beim Komplementationsversuch mit dem Mutantenstamm *mal16-1mal2-1* wurde wie oben verfahren, mit dem Unterschied, daß die Inkubation bei 28 °C erfolgte. Um zu überprüfen, ob die isolierten Bank-Plasmide ein *mal2*<sup>+</sup>-Insert besaßen, wurden eine Restriktionsanalyse mit *HindIII* durchgeführt. Die Plasmide, die das *mal2*<sup>+</sup>-Gen enthielten, konnten an einem charakteristischen DNA-Fragment von 655 Bp identifiziert werden. Insertsequenzen wurden mit den Oligonukleotid 58 ansequenziert (Seqlab, Göttingen bzw. BMFZ, Düsseldorf). Die Identifizierung der isolierten Suppressoren erfolgte durch den Abgleich der Sequenzierungsergebnisse mit der *S. pombe* Datenbank (Sanger Center, Hinxton, England).

### 4.12.2 Komplementation der TBZ-Hypersensitivität der *spi1-25* Mutante

Die Identifizierung extragener *spi1-25* Multikopie-Suppressoren erfolgte während der Diplomarbeit, der die genaue Vorgehensweise zu entnehmen ist (Karig, 2000; Fleig et al., 2000).

## 4.13 Kartierung von *mal16*<sup>+</sup>

Die Kartierung des *mal16*<sup>+</sup>-Gens erfolgte mittels Paarung entsprechender *S. pombe* Stämme (Kapitel 4.10.1) und anschließender Tetradenanalyse (Kapitel 4.10.4). Die Genotypen der in dieser Kartierungsstudie verwendeten Stämme sind in Kapitel 8.1.2.3 aufgeführt. Ausgangsstämme, die zur Herstellung neuer Stämme benutzt wurden (Kapitel 4.10), sind ebenfalls dem Kapitel 8.1.2.3 zu entnehmen. Die Integration von G418-Resistenz-Markern

erfolgte in dem Wildtypstamm UFY 103 und UFY 605. Hierfür wurden die *HA-kanMx6*-DNA-Kassetten mittels PCR mit den für den jeweilige Integrationsort spezifischen Oligonukleotiden (Oligonukleotid 317 und 318 für *c16E8*, Oligonukleotid 349 und 350 für *p32A8*) auf dem Plasmid 179 generiert (Bähler et al., 1998) und anschließend in die *S. pombe* Wildtypstämme transformiert. Genaue Informationen zur Vorgehensweise sind den Kapiteln 4.15 bzw. 4.17 zu entnehmen. Bei den putativ positiven Transformanten wurde die korrekte Integration der DNA-Kassetten mittels PCR überprüft (Oligonukleotid 321 und 322 für *c16E8*, Oligonukleotid 351 und 352 für *p32A8*). Bei den jeweiligen Kreuzungen (Kapitel 5.1.4.3) wurde die Segregation unterschiedlicher genetischer Marker untersucht. Dabei erfolgte die Identifizierung der genetischen Marker nach den in Tab. 4-1 aufgelisteten Kriterien. Die UV-Sensitivitätsuntersuchungen zum Nachweis der *swi5-39* Mutation wurden mittels einem „UV-Stratalinker 2400“ der Firma Stratagene nach Schmidt durchgeführt (Schmidt et al., 1989).

Genetischer Marker	Identifizierungskriterium
<i>mal16-1</i>	Elongationsphänotyp bei 36 °C
<i>lys1-131</i>	Kein Wachstum auf MM-Lys
<i>swi5-39</i>	UV-Sensitivität
<i>ura3-34</i>	Kein Wachstum auf MM-Ura
<i>ade6-M210</i>	Kein Wachstum auf MM-Ade
<i>leu1-32</i>	Kein Wachstum auf MM-Leu
<i>ura1-171</i>	Kein Wachstum auf MM-Ura
<i>his6-365</i>	Kein Wachstum auf MM-His
<i>mal2-1</i>	Kein Wachstum bei 30 °C
<i>ura4-D18</i>	Kein Wachstum auf MM-Ura
<i>pk11D12</i>	Wachstum auf MM-Ura
<i>kan<sup>r</sup></i>	G418-Resistenz

Tab. 4-1: Kriterien zur Identifizierung genetischer Marker

#### 4.14 Untersuchungen auf genetische Interaktionen in *S. pombe*

Um auf genetische Interaktionen in *S. pombe* zu testen, wurden entsprechende Doppel- bzw. Dreifachmutanten -wie in Kapitel 4.10 beschrieben- hergestellt. Dabei erfolgte die Identifizierung dieser nach den in Tab. 4-2 aufgeführten mutanten Phänotypen bzw. Kriterien. Der Nachweis der *mal3*-Deletion wurde durch PCR-Analyse mit den Oligonukleotiden 79 und 131 erbracht (Kapitel 4.5).

Bei der jeweiligen Untersuchung auf genetische Interaktion wurde mit den Sporen von jeweils drei unabhängigen Tetraden und den entsprechenden Parentalstämmen serielle Tropftests durchgeführt (Kapitel 4.4.2). Abhängig von den Phänotypen der Parentalstämme

(Temperatur-Sensitivität, TBZ-Hypersensitivität) wurden hierbei unterschiedliche Bedingungen gewählt (Kapitel 4.4.2).

Doppel-/ Dreifachmutante	Mutation/ Deletion	Phänotyp/ Identifizierungskriterium
<i>mal16-1 mal2-1</i>	<i>mal16-1</i> <i>mal2-1</i>	Elongationsphänotyp bei 37 °C Wachstumsdefekt bei 30 °C
<i>mal16-1 mal3Δ</i>	<i>mal3Δ</i>	PCR-Analyse
<i>mal16-1 mph1Δ</i>	<i>mph1Δ</i>	Wachstum auf MM-Ura
<i>mal16-1 mad2Δ</i>	<i>mad2Δ</i>	Wachstum auf MM-Ura
<i>spi1-25 cut7<sup>ts</sup></i>	<i>spi1-25</i> <i>cut7<sup>ts</sup></i>	Elongationsphänotyp bei 24 °C Wachstumsdefekt bei 36 °C
<i>spi1-25 pkl1Δ</i>	<i>pkl1Δ</i>	Wachstum auf MM-His
<i>spi1-25 pkl1D12</i>	<i>pkl1D12</i>	Wachstum auf MM-Ura
<i>spi1-25 klp2Δ</i>	<i>klp2Δ</i>	Wachstum auf MM-Ura
<i>peg1-1 alp14Δ</i>	<i>peg1-1</i> <i>alp14Δ</i>	Wachstumsdefekt bei 35 °C G418-Resistenz
<i>peg1-1 alp14Δ mal3Δ</i>	s. oben	s. oben

Tab.4-2: Mutante Phänotypen bzw. Kriterien zur Identifizierung von Doppel- und Dreifachmutanten

## 4.15 Fusion endogener ORFs mit einem GFP-Epitop

Durch homologe Rekombination wurde an die entsprechenden genomischen ORFs -jeweils an das letzte Basenpaar-Triplett vor dem Stopcodon- eine DNA-Sequenz, die für ein GFP-Epitop kodiert, fusioniert. Diese DNA-Kassette wurde mittels PCR mit den für den jeweiligen ORF spezifischen Oligonukleotiden (Oligonukleotid 106 und 248 für den *spdam1*<sup>+</sup>-ORF, Oligonukleotid 241 und 242 für den *peg1*<sup>+</sup>-ORF) auf dem Plasmid 177 generiert und anschließend in den *S. pombe* Stamm UFY 103 transformiert (Bähler et al., 1998).

Die verwendeten „Vorwärts“-Oligonukleotide 106 bzw. 241 besitzen dabei einen 80 Nukleotid langen Homologiebereich zur Sequenz vor dem Stopcodon, gefolgt von 20 Nukleotiden mit Homologie zur DNA-Sequenz des *GFP-kanMx6*-Moduls auf Plasmid 177. Das für den *spdam1*<sup>+</sup>-ORF spezifische 100 Nukleotid lange „Rückwärts“-Oligonukleotid 248 ist mit 80 Nukleotiden homolog zu einer Sequenz, die 10 Bp hinter dem Stopcodon -in der 3'-flankierenden Region- des *spdam1*<sup>+</sup>-ORFs liegt und zusätzlich besitzt dieses einen Homologiebereich von 20 Nukleotiden zum Plasmid 177.

Bei der Wahl der Sequenz des für den *peg1*<sup>+</sup>-ORF spezifischen „Rückwärts“-Oligonukleotids 242 mußte beachtet werden, daß das Stopcodon des *peg1*<sup>+</sup>-ORFs mit dem des benachbarten gegenläufigen SPAC3G9.13c-ORFs teilweise überlappt. Um das Stopcodon des benachbarten Gens nicht zu zerstören, wurde diese Sequenz mitberücksichtigt. Aus diesem Grunde weist das Oligonukleotid 242 80 Nukleotide Homologie zu den letzten 80 Bp des SPAC3G9.13c-

ORFs -einschließlich dessen Stopcodon- auf (bzw. zu den letzten 4 Bp des *pegI*<sup>+</sup>-ORFs zuzüglich der 76 Bp der hinter dem Stopcodon angrenzenden 3'flankierenden Region des *pegI*<sup>+</sup>-ORFs), erneut gefolgt von 20 Nukleotiden mit Homologie zu Plasmid 177.

Die mittels PCR generierten DNA-Kassetten enthalten eine *kanMx6*-Modulsequenz, die positiven Transformanten das Wachstum auf Geneticin-Disulfat-haltigen Platten (G418) ermöglicht. Bei den putativ positiven Transformanten wurde die korrekte Integration der Fusionskassette durch PCR überprüft. Während bei den Transformanten, bei denen das GFP-Epitop an den *spdamI*<sup>+</sup>-ORF fusioniert werden sollte, die PCR-Reaktion mit den Oligonukleotide 103 und 304 bzw. 110 und 142 durchgeführt wurde, wurde die Fusion an den *pegI*<sup>+</sup>-ORF mit den Oligonukleotiden 246 und 304 bzw. 247 und 302 verifiziert. Um sicherzustellen, daß die Fusion mit dem GFP-Epitop sich nicht negativ auf die Funktion des entsprechenden Proteins auswirkt, wurden positive Transformanten auf Hypersensitivität gegenüber TBZ (5,5–7 µg/ml) getestet.

#### 4.16 Fusion des *pegI*<sup>+</sup>-ORFs mit einem Pk1-EGFP-Epitop

Die Fusion des *pegI*<sup>+</sup>-ORFs mit einem Pk1-EGFP-Epitop erfolgte durch homologe Rekombination nach der von West beschriebenen Methode (West et al., 2001). Im Unterschied zu Kapitel 4.15 wurde an das letzte Basenpaar-Triplett vor dem Stop-Codon des *pegI*<sup>+</sup>-ORFs eine DNA-Sequenz, die zum einen für einen Glycin-Alanin-„Spacer“, zum anderen für ein Pk1-EGFP-Epitop kodiert, fusioniert. Die Generierung der DNA-Kassette erfolgte mittels PCR auf dem Plasmid 432 mit den Oligonukleotiden 332 bzw. 333 und wurde anschließend in den Stamm UFY 605 transformiert. Das verwendete „Vorwärts“-Oligonukleotid 332 besitzt dabei denselben 80 Nukleotid langen Homologiebereich zur Sequenz vor dem *pegI*<sup>+</sup> Stop-Codon, der bereits in Kapitel 4.15 beschrieben wurde, gefolgt von 12 Nukleotiden, die für den Glycin-Alanin- „Spacer“ kodieren und 17 Nukleotide mit Homologie zur DNA-Sequenz des *Pk1-EGFP-ura4*<sup>+</sup>-Moduls auf Plasmid 432. Auch bei der Wahl des „Rückwärts“-Oligonukleotids wurde auf die bereits in Kapitel 4.15 verwendete DNA-Sequenz -mit 80 Nukleotiden Homologie zu den letzten 80 Bp des SPAC3G9.13c-ORFs- zurückgegriffen und durch 17 Nukleotide mit Homologie zu Plasmid 432 erweitert.

Im Anschluß an die Transformation erfolgte die Selektion von *ura*<sup>+</sup>-Transformanten bei 30 °C für 4 Tage. Mittels PCR wurde bei den putativ positiven Transformanten die korrekte Integration der Fusionskassette mit den Oligonukleotiden 261 und 246 bzw. 163 und 247 überprüft.

## 4.17 Deletion des *peg1*<sup>+</sup>-ORFs

Zur Deletion des 4510 Bp großen *peg1*<sup>+</sup>-ORFs wurde mittels PCR eine DNA-Kassette generiert, die neben einer *HA*-Sequenz auch eine *kanMx6*-Modulsequenz trägt (Kapitel 4.6). Diese 1985 Bp große Deletionskassette wurde mit den Oligonukleotiden 305 und 342 auf dem Plasmid 179 als DNA-Template in einer PCR-Reaktion amplifiziert (Kapitel 4.9). Das verwendete Oligonukleotid 305 besitzt dabei einen 80 Nukleotid langen Homologiebereich zur Sequenz vor dem Startcodon des *peg1*<sup>+</sup>-ORFs, gefolgt von 20 Nukleotiden mit Homologie zur DNA-Sequenz des *HA-kanMx6*-Moduls auf Plasmid 179. Wie in Kapitel 4.15 mußte auch hier bei der Wahl der Sequenz des Oligonukleotids 342 darauf geachtet werden, das Stopcodon des benachbarten gegenläufigen SPAC3G9.13c-ORFs nicht zu zerstören. Aus diesem Grunde weist das Oligonukleotid 342 87 Nukleotide Homologie zu den letzten 87 Bp des SPAC3G9.13c -einschließlich dessen Stopcodons- auf (bzw. zu den letzten 4 Bp des *peg1*<sup>+</sup>-ORFs zuzüglich der 83 Bp der hinter dem Stopcodon angrenzenden 3'-flankierenden Region des *peg1*<sup>+</sup>-ORFs), erneut gefolgt von 20 Nukleotiden mit Homologie zu Plasmid 179. Für die Transformation der Deletionskassette wurden diploide *S. pombe* Stämme, die sich durch Kreuzung der Stämme UFY 605 und UFY 606 ergaben, verwendet (Kapitel 4.7 bzw. 4.10). Die Selektion erfolgte auf Vollmediums-Platten mit Zusatz von 100 mg/ml Geneticin-Disulfat bei 30 °C für 2 Tage. Nach erneutem Replikaplattieren und Ausstreichen putativ positiver Transformanten auf dem entsprechenden Selektivmedium wurden bei diesen die korrekte Integration und somit Deletion des *peg1*<sup>+</sup>-ORFs mittels PCR mit den Oligonukleotiden 301 und 142 bzw. 304 und 344 verifiziert. Im Anschluß wurden positive diploide Transformanten, bei denen eine Kopie des *peg1*<sup>+</sup>-Gens deletiert war, zum Sporulieren auf EMM-Medium ausgestrichen und die Tetraden einer Tetradenanalyse unterzogen (Kapitel 4.10.4).

## 4.18 Analyse des DNA-Profiles von *S. pombe* Zellen mittels

### Durchflußzytometrie-Analyse

DNA-Profile von *S. pombe* Zellen wurden mittels Durchflußzytometrie-Analyse erstellt. Dabei wird der DNA-Gehalt jeder Hefezelle anhand der Intensität der Fluoreszenzfärbung mit Propidiumiodid gemessen.

Zur Vorbereitung für die Durchflußzytometrie-Analyse wurden  $1 \times 10^7$  Zellen einer logarithmisch wachsenden Hefekultur nach einmaligem Waschen mit Tris-Puffer (0,2 M, pH 7,5) in 70 % Ethanol/ 0,2 M Tris pH 7,5 aufgenommen und für 2 h bei RT fixiert. Im

Anschluß an einen weiteren Waschschrift wurden die Zellen erneut in 1 ml Tris-Puffer resuspendiert. 100 µl dieser Zellsuspension (ca.  $1 \times 10^6$  Zellen) wurden daraufhin 1 min in einem Ultraschallwasserbad sonifiziert und nach Zugabe von 12 µl RNase A (10mg/ ml) Ü/N bei 37 °C inkubiert. Dieser Inkubationszeit folgte ein erneuter Waschschrift mit Tris-Puffer. Anschließend wurden die Zellen mit 50 µg/ ml Propidiumiodid angefärbt und mittels einem Becton-Dickinson FACSsort Gerätes analysiert. Die Messung der Proben wurde von Irina Volfson durchgeführt.

## 4.19 Mikroskopie

Die Durchführung mikroskopischer Untersuchungen von *S. pombe* Zellen erfolgte an den Zeiss-Axioskop Fluoreszenz-Mikroskopen mit entsprechender Kamera-Ausrüstung. Bilder, aufgenommen mit dem SensiCam Kamera-System (PCO Computer Optic GmbH), wurden mit der Image-Pro-Plus Software bearbeitet, während dementsprechend für Aufnahmen mit einer Hamamatsu-Kamera die Open-Lab Software verwendet wurde.

Die Immunfluoreszenz in *S. pombe* wurde basierend auf der Methode von Hagan und Hyams (Hagan und Hyams, 1988) und entsprechenden Standardprotokollen nach Allan (Allan, 1999) durchgeführt.

Dabei wurde zur Lokalisierung der unterschiedlichen GFP-Fusionsproteine als primärer Antikörper ein polyklonaler Kaninchen Anti-GFP Antikörper (Molecular Probes, Göttingen), als sekundärer ein Cy3-gekoppelter Anti-Kaninchen Antikörper verwendet.

Die Anfärbung von Mikrotubuli erfolgte mit dem primären monoklonalen Anti-Tubulin Antikörper TAT1. Bei Einzelfärbung wurde als sekundärer Antikörper ein Cy3-gekoppelter Anti-Maus Antikörper benutzt, während bei Doppelfärbung, d.h. paralleles Anfärben eines GFP-Fusionsproteins, ein FITC-gekoppelter Anti-Maus Antikörper benutzt wurde. Für die Kollokalisierungsstudie in Kapitel 5.3.2.2 wurde für die Anfärbung des Peg1p-Proteins als primärer Antikörper ein monoklonaler Maus Anti-GFP Antikörper (Molecular Probes, Göttingen), als sekundärer ein FITC-gekoppelter Anti-Maus Antikörper verwendet und für die Lokalisierung des Spc7p-HA-Fusionsproteins als primärer ein polyklonaler Kaninchen Anti-HA Antikörper (Clontech) und als sekundärer ein Cy3-gekoppelten Anti-Kaninchen Antikörper benutzt.

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

## 4.20 FISH (“Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung”)

Bei der Durchführung der FISH-Analyse wurde das unten beschriebene Protokoll erstellt, das der Methodik von Eckwall und Partridge (Eckwall und Partridge, 1999) angepasst wurde.

### 4.20.1 Fixierung und Zellwand-Behandlung von *S. pombe* Zellen

- Eine 20 ml Kultur wurde bei gewünschter Temperatur bis zu einer Zellzahl von  $5 \times 10^6$  Zellen/ ml in Vollmedium bzw. Minimalmedium Ü/N angezogen.
- Vor Ende der Inkubationszeit (ca. 30 min) wurde eine 38 %-ige Paraformaldehyd-Lösung in PEM-Puffer angesetzt (3,8 g Paraformaldehyd in einem Gesamtvolumen von 10 ml PEM-Puffer und unter Zugabe von 70  $\mu$ l 10 M NaOH bei 65 °C lösen lassen!), im Anschluß auf Eis gestellt und auf RT runtergekühlt.
- Nun erfolgte die Zugabe von 1/10 Volumen der 38 %-igen Paraformaldehyd-Lösung zu der Kultur und anschließendes Mischen. Die Zellen der Kultur wurden daraufhin für 60 min bei entsprechender Temperatur fixiert.
- Nach Zentrifugation der Zellsuspension bei 4000 rpm wurde das Zellpellet (in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß) dreimal mit 500  $\mu$ l PEM-Puffer gewaschen und anschließend wurden die Zellen in 500  $\mu$ l PEMS-Puffer + 50  $\mu$ l Zymolyase (20T, 25 mg/ ml Stocklösung) + 40  $\mu$ l einer 1:10 verdünnten  $\beta$ -Glucuronidase-Lösung + 5  $\mu$ l einer unverdünnten  $\beta$ -Mercaptoethanol-Lösung so resuspendiert, daß die Zellzahl  $5 \times 10^7$  Zellen/ ml betrug. Daraufhin erfolgte die Inkubation auf einem Schüttler bei 37 °C für 60 min.
- Im Anschluß an diese Inkubation wurden die Zellen bei 4000 rpm runterzentrifugiert und mit 500  $\mu$ l PEMS-Puffer + 5  $\mu$ l einer unverdünnten Triton-Lösung (oder 25  $\mu$ l einer 20%-igen Triton-Lösung) für 5 min bei RT lysiert.
- Die Zellen wurden erneut dreimal mit PEM-Puffer gewaschen und daraufhin in 50-100  $\mu$ l PEM-Puffer aufgenommen.
- Auf einem Objektträger wurden 20  $\mu$ l dieser Zellsuspension mit 40  $\mu$ l einer 1%-igen Lipsol-Lösung (Geschenk von Prof. Dr. Josef Loidl, Universität Wien) und 80  $\mu$ l einer Paraformaldehyd/ Sucrose-Lösung (4% Paraformaldehyd/ 3,4% Sucrose) mit einer gelben Spitze gemischt und mit einem Glasstab auf ca. 1/3 der Objektträger-Fläche gleichmäßig ausgestrichen (Glasstab dabei nur auf die Oberfläche der Zell/Lösung-Suspension auflegen und vorsichtig diese durch mehrfaches Hin- und Herstreichen

verteilen!). Anschließend wurde der Objektträger Ü/N erschütterungsfrei trocken gelassen.

- Am nächsten Tag wurde der Objektträger in einem für diesen speziellen Behälter zweimal für 5 min (Dauer abhängig von der Zellzahl!) in bidest. H<sub>2</sub>O gestellt und daraufhin erneut luftgetrocknet. An dieser Stelle war es möglich -anhand eines parallel präparierten Objektträgers- die erfolgreiche Behandlung der Zellen, unter Zugabe von 10 µl einer DAPI-Lösung (1 µg/ ml) zu überprüfen.

#### 4.20.2 Markierung von DNA-Proben mittels „Nick Translation“

Die Markierung der DNA-Proben erfolgte mit Hilfe des „Nick Translation-Kit“ der Firma Invitrogen (Karlsruhe). Die zu markierende DNA (Plasmid pYIP10.4) war rDNA vom *S. pombe* Chromosom III (Toda et al., 1984). Für die Durchführung der Markierung wurde folgendes Pipettierschema erstellt:

DNA	1-2 µg
dNTP-Mix (ohne dTTP)	5 µl
dUTP-Cy3 (1 mM)	1 µl
Polymerase I/ DNase I-Mix	5 µl
DNaseI (1:400 Verdünnung von 1 mg/ ml)	2-6 µl
bidest. H <sub>2</sub> O	auf 50 µl auffüllen

- Im Anschluß wurde der Ansatz (alle Komponenten stets auf Eis halten!) vorsichtig gemischt und für 90-120 min bei 15 °C inkubiert.
- Zur Überprüfung der Fragmentgröße wurden 3 µl der markierten DNA-Probe auf ein 0,7 %-iges Agarosegel geladen und für 90 min gelelektrophoretisch aufgetrennt.
- Nach Fällung der markierten DNA (es wird kein Waschritt mit 70 % Ethanol durchgeführt!) (Kapitel 4.9) wird diese in 50-100 µl Hybridisierungs-Puffer aufgenommen.

#### 4.20.3 FISH-Analyse von *S. pombe* Zellen

- Zur Denaturierung der markierten DNA-Probe wurde diese für 5 min bei 95 °C inkubiert und anschließend auf Eis abgekühlt.
- Nun wurden 5 µl der denaturierten DNA-Probe auf den in Kapitel 4.20.1 präparierten Objektträger pipettiert, Deckgläschen aufgelegt und dieses mit einem Spezialkleber versiegelt. Nach Antrocknen des Spezialklebers (Objektträger dunkel halten!) wurde der Objektträger mit der oberen Seite nach unten (Deckgläschen nach unten!) für

10 min auf einen auf 90 °C vorgewärmten Heizblock gelegt. Zur Hybridisierung der markierten DNA-Probe an die entsprechende genomische DNA-Region wurde nach gleicher Vorgehensweise der Objektträger Ü/N oder für 48 h auf einem auf 37 °C vorgewärmten Heizblock inkubiert.

- Nach Ende der Inkubationszeit wurde das Deckgläschen entfernt und der Objektträger in einem für diesen speziellen Behälter (abgedunkelt!) dreimal für 10-30 min in 2x SSC-Lösung stehen gelassen. Im Anschluß an diese Waschschrte wurde der Objektträger aus dem Behälter genommen und die restliche Flüssigkeit vorsichtig mit Papiertüchern entfernt (nicht lufttrocknen lassen!).
- Zuletzt wurden 5 µl eines DAPI/ Mounting-Reagenz Gemisches (0,01 mg/ ml DAPI – Lösung wird mit dem Mounting-Reagenz 1:5 verdünnt) auf den Objektträger pipettiert, Deckgläschen aufgelegt und dieses mit dem Spezialkleber versiegelt.

Lösungen:

---

PEM-Puffer:

---

100 mM PIPES  
1 mM EGTA  
1 mM MgSO<sub>4</sub>

---

Vor dem Autoklavieren wurde der pH-Wert mit Essigsäure auf pH 6,9 eingestellt.

---

PEMS-Puffer:

---

100 mM PIPES  
1 mM EGTA  
1 mM MgSO<sub>2</sub>  
1,2 M Sorbitol

---



---

20 x SSC-Puffer:

---

3 M NaCl  
0,3 M Na<sub>3</sub>Citrat x 2 H<sub>2</sub>O

---

Vor dem Autoklavieren wurde der pH-Wert mit Salzsäure auf pH 7,0 eingestellt.

---

Hybridisierungs-Puffer:

---

10 % Dextran-Sulfat  
50 % Formamid (deionisiert)  
2 x SSC

---

## 4.21 ChIP (“Chromatin-Immunopräzipitation”)

Nach Aneignung der ChIP-Methode bei Alison Pidoux in Edinburgh (Schottland) wurde diese Technik in unserem Labor von mir etabliert.

Dabei wurde folgendes Protokoll verwendet:

- Für jeden ChIP-Ansatz wurde bei gewünschter Temperatur eine 50 ml Kultur bis zu einer Zellzahl von  $5 \times 10^6$  Zellen/ ml angezogen. Um eine möglichst gute Chromatin-Assoziation des zu analysierenden Proteins zu erhalten, konnte die Kultur unmittelbar vor der Fixierung für ca. 2 h bei 18 °C inkubiert werden.
- Ca. 30 min vor Ende der Inkubationszeit wurde eine 30 %-ige Paraformaldehyd-Lösung in YE5S-Medium (3 g Paraformaldehyd in einem Gesamtvolumen von 10 ml YE5S und unter Zugabe von 0,3 ml 10 M NaOH bei 65 °C lösen lassen!) angesetzt. Anschließend wurde die Lösung auf Eis auf RT runtergekühlt.
- Nun erfolgte die Zugabe von 1/10 Volumen der 30 %-igen Paraformaldehyd-Lösung zu der Kultur und anschließendes Mischen durch rotierende Bewegung. Die Zellen der Kultur wurden daraufhin für 30 min entweder bei RT oder -falls erwünscht- bei 18 °C auf einem Schüttler fixiert. Die Fixierung konnte durch Zugabe von 1/20 Volumen einer 2,5 M Glycin-Lösung gestoppt werden (nicht zwingend!).
- Die fixierten Zellen wurden in ein Falcon-Reaktionsgefäß überführt und bei 4000 rpm in einer auf 4 °C vorgekühlten Zentrifuge runterzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet zweimal mit jeweils 20 ml eiskaltem 1x PBS-Puffer gewaschen.
- Anschließend wurden die Zellen (in dem Falcon-Reaktionsgefäß) in PEMS-Puffer + 0,4 mg/ ml Zymolyase (100T, 10 mg/ ml Stocklösung) so resuspendiert, daß die Zellzahl  $1 \times 10^8$  Zellen/ ml betrug (bei mehreren ChIP-Ansätzen sollte ein „Master-Mix“ erstellt werden!). Daraufhin erfolgte die Inkubation auf einem Schüttler bei 37 °C für 30 min.
- Die mit Zymolyase behandelten Zellen wurden zweimal mit jeweils 10 ml PEMS-Puffer gewaschen.
- Im Anschluß wurden die Zellen in 1 ml PEMS-Puffer resuspendiert, in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und bei 4000 rpm erneut zentrifugiert. An dieser Stelle konnte das Zellpellet (Überstand gut abziehen!) bei -20°C gelagert werden (empfehlenswert!).

- Das Zellpellet wurde in 400 µl eiskalten Lysis-Puffer einschließlich Protease-Inhibitor-Cocktail (1:100 Verdünnung) und 2mM PMSF resuspendiert. Hier empfahl es sich erneut, einen „Master-Mix“ anzusetzen (z.B. 5 ml Lysis-Buffer + 50 µl Protease-Inhibitor-Cocktail + 100 µl PMSF (100 mM)). Die Zellen mußten auf Eis gehalten werden.
- Mit der darauffolgenden Ultraschall-Behandlung wurde die DNA in durchschnittlich 600 Bp große Fragmente zerkleinert. Hierfür wurde das/die Reaktions-Eppendorfgefäße in einem mit Eis befüllten Becherglas in einem „Schwimmer“ auf dem Eis fixiert und dreimal 20 s bei entsprechender Ultraschallgerät-Einstellung sonifiziert. Hierbei war zu beachten, daß die Position des Stabes des Ultraschallgerätes in der Zellsuspension ca. 0,5 cm über dem Boden des Eppendorf-Reaktionsgefäßes betragen sollte und diese sollte während der Ultraschall-Behandlung beibehalten werden (ansonsten wird ein „Schäumen“ hervorgerufen!). Waren mehrere ChIP-Ansätze zu sonifizieren, so wurden diese nacheinander mit Ultraschall behandelt, und man begann beim nächsten Durchgang erneut beim ersten Ansatz (dies verhindert ein zu starkes Erwärmen der Proben!). Dabei war ein guter Zellaufschluß an einer Rotfärbung der Zellsuspension zu erkennen. Die weitere Durchführung zur Bestimmung der DNA-Fragmentgröße wird am Ende dieses Protokolls beschrieben.
- Anschließend wurde die Probe bei 15000 rpm für 5 min in einer auf 4 °C vorgekühlten Zentrifuge zentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Es folgte eine weitere Zentrifugation für 15 min (15000 rpm, 4 °C) und eine erneute Überführung des Überstandes in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß. Dabei war zu beachten, daß die Überstände stets auf Eis gehalten wurden.
- In das Roh-Lysat wurden zur Aufreinigung 25 µl ProteinA-Agarose „Beads“ („Beads“ können vor Benutzung mit Lyse-Puffer gereinigt werden!) mit einer gelben Spitze (Spitzenöffnung sollte durch Abschneiden des vorderen Teils vergrößert werden!) pipettiert, kurz gevortext und für 1-2 h bei 4 °C auf einem rotierenden Rad inkubiert (dies dient dem Abfangen unspezifischer Proteinbindungen an den „Beads“!).
- Im Anschluß an diese Vorinkubation wurden die „Beads“ bei 4 °C runterzentrifugiert und das Lysat in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert. Hierzu wurden spezielle Spitzen verwendet („Multi-Ecoflex“-Spitzen (langhalsige Spitzen mit sehr kleiner Öffnung)), um möglichst keine „Beads“ mitzuüberführen. An dieser Stelle wurden 40 µl des Lysat als „Rohextrakt-Kontrolle“ entnommen und bei -20 °C weggefroren.

- Dem Lysat wurden 2 µl Anti-GFP Antikörper (auch 1 µl möglich!) und erneut 25 µl Protein A-Agarose „Beads“ zugegeben. Das Lysat wurde Ü/N (nicht zwingend, sollte aber mindestens 3 h betragen!) bei 4 °C auf einem rotierenden Rad inkubiert.
- Die „Beads“ wurden bei 8000 rpm für 2 min in einer Eppendorf-Zentrifuge (es ist nicht nötig, die Zentrifuge auf 4 °C vorzukühlen!) pelletiert und der Überstand verworfen. Daraufhin wurden die „Beads“ mit jeweils 1 ml der folgenden Puffer gewaschen.
  - Lyse-Puffer
  - Lyse-Puffer mit 0,5 M NaCl
  - Wasch-Puffer
  - TE-Puffer (pH 8)

Bei jedem Waschschrift wurde die Probe jeweils für 5 min auf einem rotierenden Rad befestigt, anschließend erneut für 2 min zentrifugiert (8000 rpm) und der Überstand verworfen. Nach dem letzten Waschschrift war es wichtig, den gesamten Überstand vorsichtig mit der speziellen „Multi-Ecoflex“-Spitze abzuziehen.

- Nun wurden die „Beads“ in 250 µl TES-Puffer resuspendiert (Mischen durch Hochziehen mit gelber Spitze oder vorsichtiges Vortexen!). Parallel wurde das bei -20 °C weggefrorene „Roh-Lysat“ aufgetaut und mit 210 µl TES-Puffer versetzt. Alle Proben wurden Ü/N (nicht zwingend, sollte aber mindestens 6 h betragen!) in einem 65°C-Wasserbad inkubiert (spezifische Bindung der Proteine an die „Beads“ wird aufgehoben!)
- Die „Beads“ enthaltende Probe wurde für 1 min bei 8000 rpm zentrifugiert (es ist nicht nötig, die Zentrifuge auf 4 °C vorzukühlen!) und der Überstand in neues Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert. Hierfür wurde erneut eine „Multi-Ecoflex“-Spitze benutzt, um den gesamten Überstand aufzunehmen, ohne „Beads“ mitzuüberführen. Die „Beads“ konnten anschließend verworfen werden.
- Im Anschluß wurde in alle Proben (also auch in das „Roh“-Lysat!) 450 µl TE-Puffer und 30 µl einer 10 mg/ ml ProteinaseK-Lösung (frisch angesetzt!) pipettiert. Die Proben wurden für 2 h (bis zu 4 h möglich!) bei 37 °C auf einem Schüttler bewegt.
- Danach erfolgte eine Phenol/ Chloroform-Extraktion. Dafür wurden die gesamten Proben mit jeweils 600 µl Phenol/ Chloroform versetzt, gevortext und anschließend bei 13000 rpm für 8 min zentrifugiert. Die obere Phase wurde abgenommen und in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die gleiche Prozedur wurde mit

Chloroform wiederholt. Nach den oben beschriebenen Extraktionen sollte das Probe-Volumen ca. 500-600  $\mu\text{l}$  betragen.

- Um nun die DNA zu fällen, wurde den Ansätzen 1/10 Volumen einer 3M Natriumacetat-Lösung (pH 5,5) sowie 1,5  $\mu\text{l}$  einer 10 mg/ml Glykogen-Lösung zugegeben. Die Proben wurden daraufhin mit einer 96 %-igen Ethanol-Lösung (oder 100 %) auf ein Volumen von 1,5 ml aufgefüllt, gevortext und für 30min-1h auf Trockeneis inkubiert.
- Im Anschluß an diese Inkubation wurden die Ansätze in einer auf 4 °C vorgekühlten Zentrifuge bei 15000 rpm für 30 min zentrifugiert.
- Die Überstände mußten sehr vorsichtig abgenommen werden (es empfiehlt sich, eine „Multi-Ecoflex“-Spitze hierbei zu verwenden!). Dabei war es möglich, noch restliche, an den Wänden haftende Flüssigkeit mit einem Papiertuch zu entfernen und anschließend die DNA unter dem Abzug zu trocknen (keine Vakuum-Trocknung!).
- Während die DNA der ChIP-Proben in 30  $\mu\text{l}$  TE (pH 8) resuspendiert wurden, wurde die der Rohextrakt-Proben in 300  $\mu\text{l}$  TE (pH 8) aufgenommen. Anschließend war die DNA bei -20 °C wegzufrieren. Es war sehr wichtig, die DNA zu aliquotieren (5  $\mu\text{l}$  Aliquots bei ChIP-Ansätzen, 50  $\mu\text{l}$  Aliquots bei Rohextrakt-Proben), da häufiges Auftauen und Einfrieren die DNA schädigt.
- Für die darauffolgende „Multiplex“-PCR-Reaktion wurden jeweils 2  $\mu\text{l}$  DNA eingesetzt.
- Um die Effektivität der am Anfang beschriebenen Ultraschall-Behandlung zu überprüfen und somit die Größe der DNA-Fragmente zu bestimmen, wurden 25  $\mu\text{l}$  der Rohextrakt-Probe mit RNaseA (ca. 10  $\mu\text{g}$ ) versetzt und 3-4 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz mit 5  $\mu\text{l}$  OrangeG-Marker versetzt, zusammen mit einem 100Bp-DNA-Längenmarker auf ein 1,5 %-iges Agarosegel geladen und bei 120V für 1-1,5 h gelelektrophoretisch aufgetrennt.

## „Multiplex“-PCR:

Um gleiche Reaktionsbedingungen für die unterschiedlichen ChIP-Ansätze in der „Multiplex“-PCR zu erzielen, mußte für diese ein „Master-Mix“ angesetzt werden. Das untere Pipettierschema gibt die einzusetzenden Mengen pro ChIP-Ansatz an.

DNA	2 µl
10 x PCR-Puffer (+Mg)	2 µl
25 mM MgCl <sub>2</sub>	1 µl
2.5 mM dNTPs	2 µl
cnt1 Primer (10 pmol/ µl)	1 µl
cnt2 Primer (10 pmol/ µl)	1 µl
imr1 Primer (5 pmol/ µl)	1 µl
imr3 Primer (5 pmol/ µl)	1 µl
otr1 Primer (30 pmol/ µl)	1 µl
otr2 Primer (30 pmol/ µl)	1 µl
fbp1 Primer (5 pmol/ µl)	1 µl
fbp2 Primer (5 pmol/ µl)	1 µl
<i>Taq</i> -Polymerase (5 U/ µl )	0.1 µl
ddH <sub>2</sub> O	7 µl

Schritt	Temperatur (°C)	Zeit (s)	Anzahl der Zyklen
	94	240	1
Denaturierung	94	30	30
Annealing	55	30	
Extension	72	60	
	72	300	1
	4	∞	

## Puffer:

## 10x PBS (pro Liter):

80 g NaCl
18,05 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O
2,4 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
2,0 g KCl

Vor dem Autoklavieren wurde der pH-Wert mit Salzsäure auf pH 7,4 eingestellt.

## PEMS-Puffer:

100 mM PIPES pH 7
1 mM MgCl <sub>2</sub>
1 mM EDTA
1,2 M Sorbitol

---

**Lyse-Puffer:**

---

50 mM Hepes-KOH pH 7,5  
 140 mM NaCl  
 1 mM EDTA  
 1 %(v/v) Triton X-100  
 0,1 % (w/v) Sodium Deoxycholat

---



---

**Lyse-Puffer mit 0,5 M NaCl:**

---

50 mM Hepes-KOH pH 7,5  
 500 mM NaCl  
 1 mM EDTA  
 1 %(v/v) Triton X-100  
 0,1 % (w/v) Sodium Deoxycholat

---



---

**Wasch-Puffer:**

---

10 mM Tris-HCl pH 8  
 250 mM LiCl  
 0,5 % NP-40  
 0,5 % (w/v) Sodium Deoxycholat  
 1 mM EDTA

---



---

**TE-Puffer:**

---

10 mM Tris-HCl pH 8  
 1 mM EDTA

---



---

**TES-Puffer:**

---

50 mM Tris-HCl pH 8  
 10 mM EDTA  
 1 % SDS

---

**Sonstige Materialien:**

Material	Hersteller/ Bestellnummer
Zymolyase 100T	Seikagaku (Japan)
Protease Inhibitor Cocktail	Sigma/ (P 8215)
PMSF	Sigma
Protein A-Agarose	Roche/ (1719408)
Anti-GFP-Antikörper	Molecular Probes/ (A-11122)
„Multi-Ecoflex“ Spitzen	Roth/ (N466.1)
Proteinase K	Roche/ (85948734)
Glykogen for mol. biol.	Roche/ (901393)
Taq-DNA-Polymerase	Roche/ (1146173)
100 Base Pair DNA ladder	Biolabs/ (N3231L)

---

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Identifikation einer neuen Komponente mit Einfluß auf die Chromosomen-Segregation in *S. pombe*

Zur Identifikation neuer Komponenten, die eine Rolle bei der Chromosomen-Segregation in *S. pombe* spielen, wurden die *mal* Mutantenstämme isoliert, die einen erhöhten Verlust eines nicht-essentiellen Minichromosoms zeigten (Kapitel 3.4).

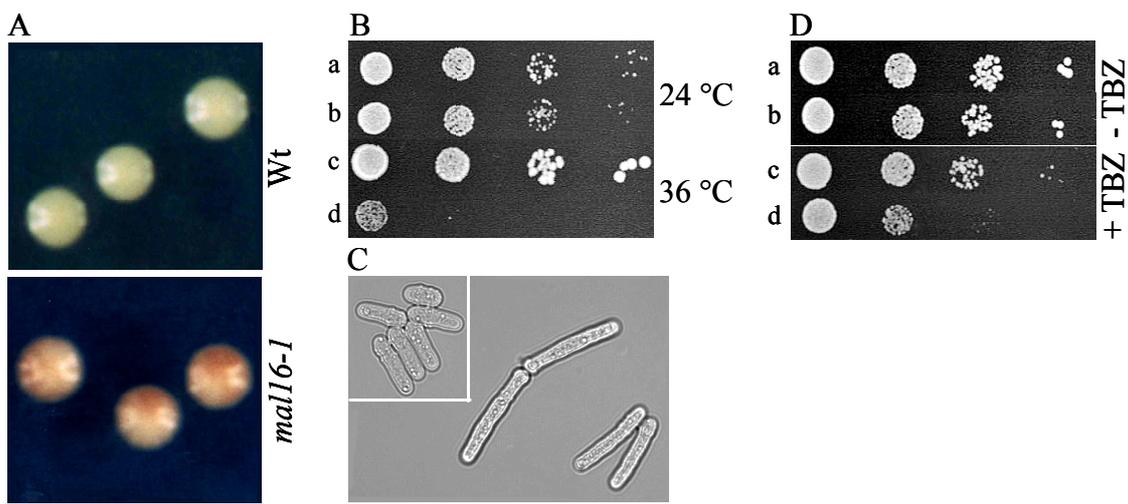
Meine Aufgabe war es, aus einer Kollektion von 6 *mal* Mutantenstämmen einen Stamm auszuwählen, der im Verlauf dieser Arbeit näher charakterisiert werden sollte. Dabei mußte berücksichtigt werden, daß der erhöhte Minichromosomen-Verlust der *mal* Mutantenstämme als alleiniger Phänotyp für eine spätere Isolation des entsprechenden Wildtyp-Gens durch z.B. Komplementation mit einer Genbank ungeeignet ist. Der Grund hierfür sind die äußerst großen Schwierigkeiten, mit denen leichte Veränderungen in der Sektorenanzahl einzelner Kolonien festzustellen sind. Für die Auswahl einer *mal* Mutante aus der oben genannten Kollektion wurde zunächst mit allen Stämmen eine Primärcharakterisierung durchgeführt. Dabei war es das Ziel, einen konditional-letalen Phänotyp zu identifizieren, der eine spätere Isolation des entsprechenden Wildtyp-Gens ermöglichen sollte. Ein konditional-letal Phänotyp eines Mutantenstammes könnte die erhöhte Sensitivität gegenüber Kälte bzw. Hitze sein sowie Hypersensitivität gegenüber einer Mikrotubuli-destabilisierenden Chemikalie. Nach entsprechenden Untersuchungen der 6 ausgewählten *mal* Mutantenstämme wurde der *mal16-1* Mutantenstamm für eine nähere Charakterisierung ausgewählt, da dieser im Vergleich zu allen anderen mit seiner Temperatur-Hypersensitivität den stärksten konditionalen Phänotyp aufwies. Im folgenden Kapitel 5.1.1 wird ausschließlich auf die Ergebnisse der Primärcharakterisierung des *mal16-1* Mutantenstammes eingegangen.

#### 5.1.1 Primärcharakterisierung des *mal16-1* Mutantenstammes

Aufgrund der Tatsache, daß alle *mal* Mutantenstämme einen erhöhten Verlust des nicht-essentiellen Minichromosoms aufweisen, wurde bereits nach der Isolation der *mal* Mutanten das Minichromosom von diesen verloren. Aus diesem Grunde mußte das nicht-essentielle Minichromosom erneut in die *mal16-1* Mutante eingebracht und im Anschluß der Verlust des Minichromosoms untersucht werden (Kapitel 4.11). Dabei wurde ein isogener Wildtypstamm, der ebenfalls das nicht-essentielle Minichromosom besitzt, als Positiv-Kontrolle verwendet.

In Abb.5-1 A sind einzelne Kolonien sowohl des Wildtypstammes als auch des *mal16-1* Mutantenstammes dargestellt. Während der Wildtypstamm aufgrund niedrigen Minichromosom-Verlustes weiße Kolonien ausbildete (Abb.5-1 A), wurde im Vergleich zu diesem in dem *mal16-1* Mutantenstamm das Minichromosom sehr häufig verloren. Dies war an den nahezu vollständig roten Kolonien der *mal16-1* Mutante zu erkennen (Abb.5-1 A).

Auf der Suche nach einem konditional-letalen Phänotyp wurde mittels serieller Tropftests das Kolonienwachstum des *mal16-1* Mutantenstammes im Vergleich zu dem des isogenen Wildtypstammes bei Temperaturen zwischen 20 °C und 36 °C untersucht (Kapitel 4.4.2). Während sowohl bei dem Wildtypstamm als auch bei dem Mutantenstamm zwischen 20 °C bis 32 °C gleich gutes Wachstum zu beobachten war (repräsentativ für alle Temperaturen: Wachstum bei 24 °C, Abb.5-1 B), konnte bei 36 °C ein sehr starker Wachstumsdefekt des *mal16-1* Mutantenstammes im Vergleich zum Wildtyp festgestellt werden (Abb.5-1 B).



**Abb.5-1: Phänotypen des *mal16-1* Mutantenstammes**

(A) Sektorierungs-Phänotypen des Wildtypstammes (Wt) und des *mal16-1* Mutantenstammes bei 24 °C auf entsprechenden Indikator-Platten (Inkubationsdauer: 10 Tage). (B) Serielle Tropftests des Wildtypstammes (a und c) und der *mal16-1* Mutante (b und d) auf Vollmediums-Platten bei 24 °C bzw. 36 °C (Inkubationsdauer: 5 Tage). (C) Mikroskopie-Aufnahmen des Wildtyps (kleines Foto) und des *mal16-1* Mutantenstammes (großes Foto). Die Anzucht erfolgte in flüssigem Vollmedium Ü/N bei 36 °C. Angegebenes Längenmaß (schwarzer Balken): 5 µm. (D) Serielle Tropftests des Wildtyps (a und c) und des *mal16-1* Mutantenstammes (b und d) auf Vollmediums-Platten bei 24 °C ohne bzw. mit TBZ (6,5 µg/ml) (Inkubationsdauer: 5 Tage).

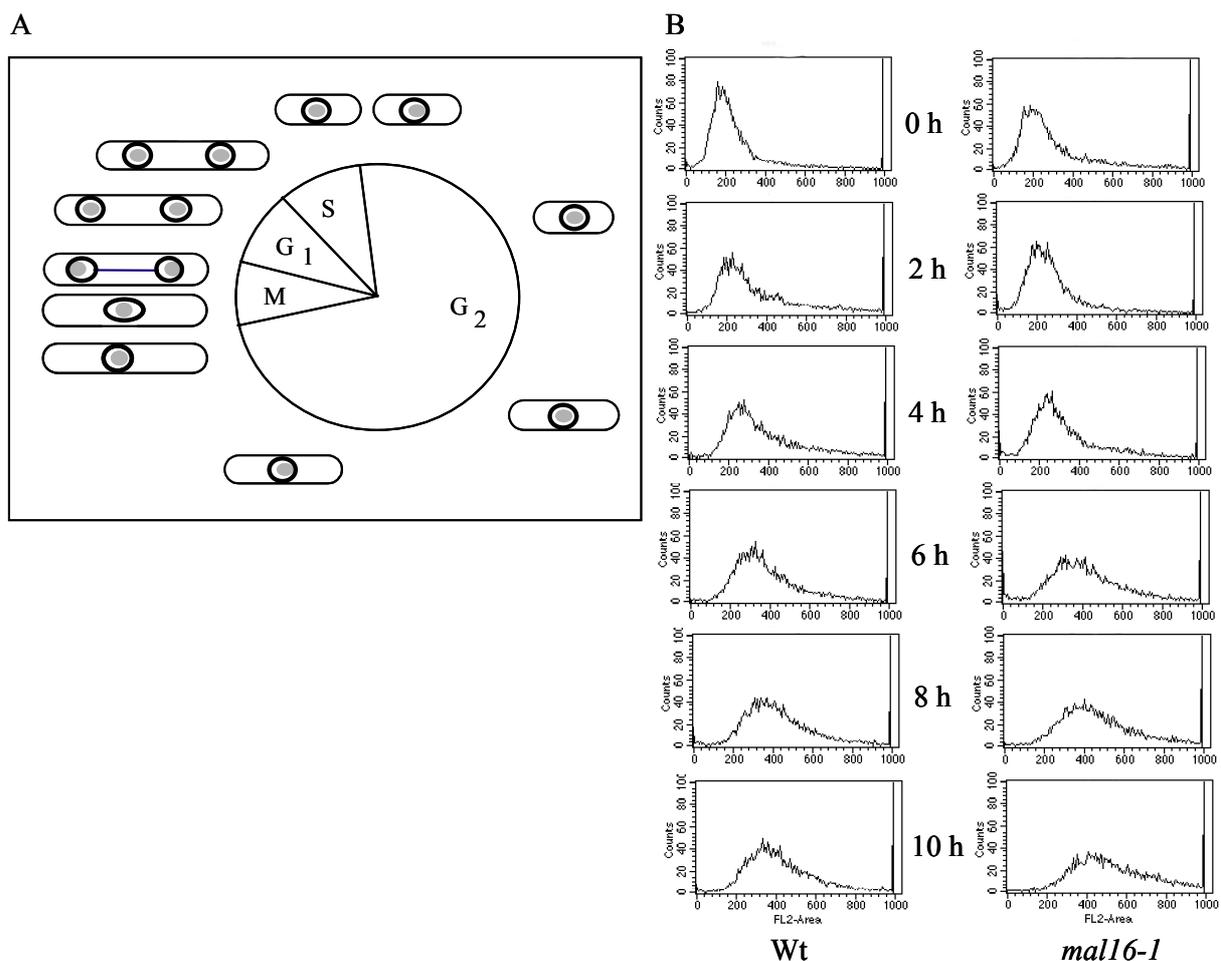
Um zu untersuchen, ob die beobachtete Temperatur-Hypersensitivität des *mal16-1* Mutantenstammes mit einer möglichen Veränderung der Zellmorphologie einhergeht, wurden Zellen des Mutantenstammes sowie des Wildtypstammes bei 36 °C Ü/N (über Nacht) inkubiert und mittels Mikroskopie miteinander verglichen. Dabei stellte sich heraus, daß nach Inkubation bei der restriktiven Temperatur Zellen des *mal16-1* Mutantenstammes eine abnorme Zellmorphologie aufwiesen (Abb.5-1C). Während beim Wildtyp eine

durchschnittliche Zelllänge von ca. 5  $\mu\text{m}$  festgestellt werden konnte, waren Zellen des *mall6-1* Mutantenstammes mit ca. 10  $\mu\text{m}$  im Vergleich dazu etwa doppelt so lang und somit stark elongiert (Abb.5-1 C). Da in *S. pombe* Chromosomen- und Wachstumszyklus voneinander unabhängig sind, könnte dieser Elongations-Phänotyp darauf hindeuten, daß durch den Gendefekt in diesen Zellen der Ablauf des Chromosomen-, jedoch nicht der des Wachstumszyklus beeinträchtigt ist (Fantès, 1977; Fantès und Nurse, 1977; Fantès, 1981).

Der erhöhte Verlust des Minichromosoms in der *mall6-1* Mutante kann unterschiedliche Ursachen haben, da DNA-Replikations-Mutanten ebenso einen erhöhten Minichromosom-Verlust aufweisen können wie Mutanten, bei denen Komponenten der Zellzyklus-Kontrolle oder des Mitose-Apparates funktionell beeinträchtigt sind. Um herauszufinden, in welcher Zellzyklusphase *mall6*<sup>+</sup> benötigt wird, wurde der *mall6-1* Mutantenstamm auf Sensitivität gegenüber der Mikrotubuli-destabilisierenden Chemikalie Thiabendazol (TBZ) hin untersucht. Dabei wurden sowohl mit dem Wildtypstamm als auch mit dem *mall6-1* Mutantenstamm serielle Tropftests auf TBZ-haltigen Platten durchgeführt (Kapitel 4.4.2). Wie der Abb.5-1 D zu entnehmen ist, zeigte die *mall6-1* Mutante im Vergleich zum Wildtyp schwächeres Wachstum auf Platten mit TBZ.

Die TBZ-Sensitivität des *mall6-1* Mutantenstammes deutet darauf hin, daß das defekte Genprodukt in dieser Mutante einen Einfluß auf die Mitose in *S. pombe* ausübt. Trotzdem sollte mittels einer weiteren experimentellen Durchführung diese Vermutung unterstützt werden. Da für viele Replikations-Mutanten eine Veränderung des DNA-Profiles im Vergleich zum Wildtyp beschrieben wurde, wurde mittels Durchflußzytometrie ein DNA-Profil von Zellen des *mall6-1* Mutantenstammes unter restriktiven Bedingungen erstellt (Grallert und Nurse, 1996; Carlson et al., 1997; Feng et al., 2003). Für die spätere Versuchsaussage ist es von Nutzen, anhand einer schematischen Darstellung den vegetativen Zellzyklus von *S. pombe* kurz zu erläutern, der sich wie bei höheren Eukaryoten aus der Teilungsphase (M-Phase) und der Interphase zusammensetzt (Abb.5-2 A). In der M-Phase findet die Mitose statt, gefolgt von der Zytokinese, während die Interphase in die Phasen G1, S und G2 untergliedert ist. Der erste Abschnitt der Interphase wird als G1-Phase bezeichnet, die eine der Wachstumsphasen des Zellzyklus darstellt. Im Anschluß an diese Phase tritt die Zelle in die S-Phase ein, in der das genetische Material repliziert wird. Der S-Phase schließt sich eine weitere Wachstumsphase, die G2-Phase, an, gefolgt von der M-Phase, in der die präzise Segregation der zwei Schwesterchromatiden auf die zwei Folgezellen stattfindet. Aufgrund der Tatsache, daß in ca. 90 % der Zellen einer *S. pombe* Population die G1 und S-Phase bereits vor dem vollständigen Abschluß der Zytokinese beginnt und die restlichen 10 % der

Zellen für eine Detektion mittels Durchflußzytometrie nicht ausreichen, bedeutet dies, daß unabhängig in welcher Zellzyklus-Phase sich *S. pombe* Zellen befinden, diese ausschließlich einen 2C DNA-Gehalt bei der entsprechenden Analyse aufweisen. Im Gegensatz dazu wurde für Replikations-Mutanten neben dem erwarteten 2C DNA-Gehalt ein zunehmender Anteil an Zellen mit einem niedrigeren DNA-Gehalt beobachtet, da in diesen Zellen aufgrund des Defekts bei der Duplikation des chromosomalen Materials die Zytokinese bereits abgeschlossen ist (Carr et al., 1995; Synnes et al., 2002).



**Abb.5-2: Analyse des DNA-Profiles von *mal16-1* Zellen**

(A) Schematische Darstellung des vegetativen *S. pombe* Zellzyklus, der in die Phasen G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub> und M-Phase untergliedert ist. Abgebildet sind *S. pombe* Zellen, bei denen der Zellkern (schwarzer Kreis) und das chromosomale Material (grauer Punkt) zu erkennen sind. (B) Wildtyp (Wt) und *mal16-1* Zellen wurden für 0 h bis 10 h bei 36 °C inkubiert. Nach Fixierung und Anfärbung mit Propidiumiodid wurde das DNA-Profil mittels Durchflußzytometrie-Analyse untersucht.

Der *mal16-1* Mutantenstamm wurde für insgesamt 10 h bei der restriktiven Temperatur (36 °C) inkubiert und von diesem alle 2 h ein DNA-Profil mittels Durchflußzytometrie erstellt. Parallel wurde als Kontrolle ein Wildtypstamm den gleichen Bedingungen ausgesetzt. In Abb. 5-2 B sind die Ergebnisse der Durchflußzytometrie-Analyse aufgeführt. Anhand dieser Abbildung ist festzustellen, daß der *mal16-1* Mutantenstamm -ebenso wie der

Wildtypstamm- zu keinem Zeitpunkt einen niedrigeren DNA-Gehalt als 2C aufwies. Vor Inkubation der Kulturen bei 36 °C, d.h. zum Zeitpunkt 0 h, zeigte der größte Anteil an Wildtyp- und an *mal16-1* Zellen den erwarteten 2C DNA-Gehalt, während bei späteren Zeitpunkten sich das Zell-Maximum beider Stämme in Richtung zunehmender Fluoreszenzintensitäten verschob. Diese Beobachtung entspricht einer früheren Studie, in der gezeigt wurde, daß in *S. pombe* Zellen die Synthese mitochondrialer DNA bei hohen Temperaturen verstärkt ist. Je länger Zellen hohen Temperaturen ausgesetzt sind, umso größer ist die Mitochondrien-Anreicherung (Sazer und Sherwood, 1990). Dabei spiegelte sich diese Anreicherung mitochondrialer DNA in einer Zunahme der Fluoreszenzintensität in der Durchflußzytometrie-Analyse wider. Im Vergleich zum Wildtypstamm ließ sich bei dem *mal16-1* Mutantenstamm ab dem Zeitpunkt 6 h eine stärkere Verschiebung in Richtung zunehmender Fluoreszenzintensität feststellen. Wie zu Beginn des Kapitels 5.1.1 geschildert, wiesen Zellen des *mal16-1* Mutantenstammes nach Inkubation bei restriktiver Temperatur einen starken Elongations-Phänotyp auf, der darauf hinweist, daß in diesen Zellen der Ablauf des Chromosomenzyklus beeinträchtigt ist, nicht aber der des Wachstumszyklus. Da der Chromosomenzyklus und die Replikation mitochondrialer DNA unabhängig voneinander ablaufen, fand mit Verlängerung der Wachstumsphase und Zunahme des Zellvolumens der *mal16-1* Mutante eine stärkere Mitochondrien-Anreicherung im Vergleich zum Wildtyp statt (Sazer und Sherwood, 1990).

Dadurch, daß in dem *mal16-1* Mutantenstamm keine Zell-Population mit einem niedrigeren DNA-Gehalt als 2C nachgewiesen werden konnte, wird die Hypothese, die von der Beobachtung der Sensitivität gegenüber TBZ herrührt, weiter erhärtet, daß der *mal16-1* Mutantenstamm keinen DNA-Replikationsdefekt, sondern einen Mitosedefekt aufweist.

### **5.1.2 Sind die *mal16-1* Phänotypen auf den Defekt eines Gen-Lokus zurückzuführen ?**

Die *mal* Mutantenstämme wurden durch Behandlung mit EMS chemisch mutagenisiert (Fleig et al., 1996). EMS gehört zu den alkylierenden Chemikalien, die DNA-Nukleotide an allen Positionen, die einer chemischen Methylierung oder Ethylierung zugänglich sind, verändern. Im Falle einer Modifizierung von Basen haben diese veränderte Paarungseigenschaften und dies führt somit zu Mutationen.

Um nun sicherzustellen, daß alle in Kapitel 5.1.1 beobachteten mutanten Phänotypen durch den Defekt eines einzelnen Gens-Lokus hervorgerufen wurden, wurde der *mal16-1* Mutantenstamm viermal gegen einen isogenen Wildtypstamm zurückgekreuzt, um -im Falle

von „stillen“ Mutationen im Hintergrund- diese rauszukreuzen. Mit der daraus resultierenden *mal16-1* Mutante wurden die in Kapitel 5.1.1 durchgeführten Experimente wiederholt, und es konnte auch nach Rückkreuzung keine freie Segregation der zuvor beobachteten Phänotypen festgestellt werden.

Somit kann davon ausgegangen werden, daß alle beschriebenen *mal16-1* Phänotypen an den Defekt in einem einzelnen Gen-Lokus gekoppelt sind.

### 5.1.3 Nähere Charakterisierung des *mal16-1* Mutantenstammes

#### 5.1.3.1 Der *mal16-1* Mutantenstamm weist während der Mitose eine Fehlverteilung des chromosomalen Materials auf

Aufgrund der Ergebnisse der Primärcharakterisierung (Kapitel 5.1.1), die auf einen Mitosedefekt in dem *mal16-1* Mutantenstamm hindeuten, wurde die Verteilung des chromosomalen Materials während der Mitose in diesem Mutantenstamm mikroskopisch untersucht. Da die *mal16-1* Mutante einen erhöhten Minichromosom-Verlust bei 24 °C zeigt, schien es als wahrscheinlich, daß der Wachstumsdefekt der Mutante bei 36 °C durch abnorme Segregation der Chromosomen in der Mitose hervorgerufen wird. Aus diesem Grunde wurde

		
24 °C	92	8
36 °C	21,3	78,7

Tab.5-1: Fehlverteilung des chromosomalen Materials in *mal16-1* Zellen  
Schematische Darstellung der Chromatin-Verteilung. Der prozentuale Anteil an Anaphasen-Zellen der *mal16-1* Mutante mit normaler (links) bzw. abnormer (rechts) DNA-Verteilung wurde bestimmt. *mal16-1* Zellen wurden in flüssigem Vollmedium asynchron bei 24 °C bzw. 36 °C für 6 h inkubiert, fixiert und das Chromatin mit DAPI angefärbt.

eine Flüssigkultur des *mal16-1* Mutantenstammes Ü/N bei 24 °C angezogen und anschließend für 6 h bei der restriktiven Temperatur inkubiert. Als Kontrolle diente ein Teil der bei 24 °C angezogenen Ausgangskultur. Durch Anfärbung des Chromatins mittels DAPI wurden ausschließlich Zellen untersucht, die sich in der Anaphase befanden und somit bei diesen die DNA bereits getrennt vorlag (Kapitel 4.19). Während nur 8 % der *mal16-1* Zellen chromosomale Missegregation bei 24°C zeigten, erhöhte sich nach Inkubation bei der restriktiven Temperatur der Anteil an *mal16-1* Zellen mit ungleichmäßig verteiltem Chromatin um ca. das 10-fache auf 78,7 % (Tab.5-1).

Somit konnte gezeigt werden, daß in Zellen des *mal16-1* Mutantenstammes das chromosomale Material während der Mitose nicht korrekt verteilt werden kann und der bei 36°C beobachtete Wachstumsdefekt auf diese abnorme Chromosomen-Segregation zurückzuführen ist.

### 5.1.3.2 Kann die abnorme Chromosomen-Segregation in *mal16-1* Zellen auf eine fehlende Trennung der Schwesterchromatiden zurückgeführt werden ?

Um den Grund für die stark erhöhte Fehlverteilung endogener Chromosomen bei der restriktiven Temperatur zu ermitteln, war es von Interesse, ob in dem *mal16-1* Mutantenstamm die Schwesterchromatiden während der Mitose korrekt getrennt werden. Aus diesem Grunde wurde die Trennung der Schwesterchromatiden während der Anaphase mittels „Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung“ (FISH) analysiert (Kapitel 4.20). Die FISH-Analyse ermöglicht die Erkennung spezieller DNA-Sequenzen im Zellkern von fixierten Zellen. Durch Hybridisierung entsprechender Fluorochrom-markierter DNA-Proben an die speziellen DNA-Sequenzen im Kern ist es möglich, mit Hilfe der Fluoreszenz-Mikroskopie diese speziellen DNA-Sequenzen zu erkennen (Eckwall und Partridge, 1999).

In dieser Untersuchung wurden Zellen des *mal16-1* Mutantenstammes sowohl bei 24 °C als auch für 6 h bzw. 10 h bei der restriktiven Temperatur inkubiert und mittels FISH analysiert. Als Kontrolle diente ein Wildtypstamm, der für 10 h bei 36 °C angezogen wurde. Die in diesem Versuch verwendete DNA-Probe war rDNA, die an die mehrfach wiederholenden rDNA-Sequenzen auf Chromosom III bindet (Toda et al., 1984). Die Anfärbung des Chromatins erfolgte mittels DAPI-Färbung (Kapitel 4.20.3). In Abb.5-3 sind die Ergebnisse der FISH-Analyse aufgeführt, wobei ausschließlich Zellen mit bereits separiertem Chromatin von Interesse waren.

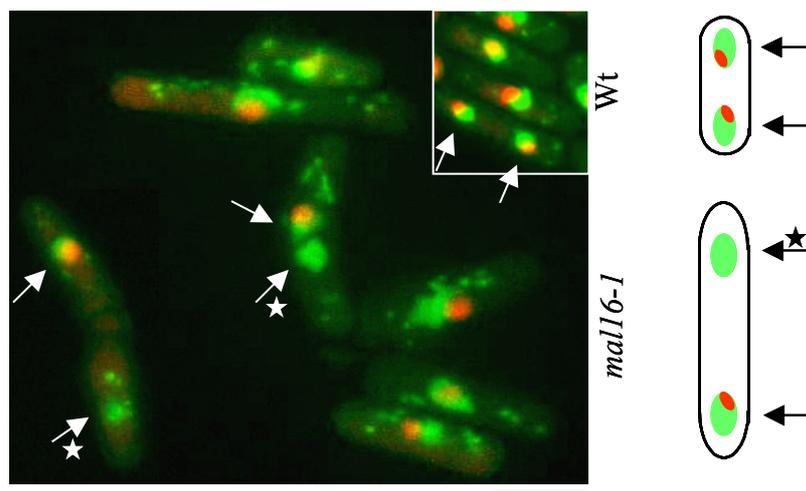


Abb.5-3: *mal16-1* Zellen zeigen eine fehlerhafte Trennung der Schwesterchromatiden während der Anaphase

Wildtyp (Wt) und *mal16-1* Zellen wurden bei 36°C für 10h in flüssigem Vollmedium inkubiert und mittels FISH analysiert. Die verwendete FISH Probe war rDNA (YIP10.4), die sich auf Chromosom III befindet. Überlagerte Mikroskopie-Aufnahmen sowie entsprechende schematische Darstellungen des Wildtyps (Wt) und des *mal16-1* Mutantenstammes werden gezeigt (grün: DAPI; rot: rDNA). Während Pfeile separiertes Chromatin kennzeichnen, weisen Sterne auf die Fehlverteilung des Chromosom III hin.

Wt	36°C/ 10h	0,7 %
<i>mall6-1</i>	24°C	1,0 %
<i>mall6-1</i>	36°C/ 6 h	7,7 %
<i>mall6-1</i>	36°C/ 10 h	26,3 %

Tab.5-2: Ein erhöhter Anteil an *mall6-1* Zellen zeigt Nicht-Trennung der Schwesterchromatiden

Der prozentuale Anteil an *mall6-1* Zellen mit separiertem Chromatin, der eine Nicht-Trennung der Schwesterchromatiden (Chromosom III) zeigt, ist tabellarisch dargestellt. *mall6-1* Zellen wurden entweder bei 24 °C oder bei 36 °C für 6 h bzw. 10 h in flüssigem Vollmedium inkubiert und mittels FISH analysiert. Als Kontrolle dienten Wildtyp-Zellen, die ausschließlich bei 36 °C für 10 h angezogen wurden.

Während in Wildtyp-Zellen eine korrekte Trennung der Schwesterchromatiden des Chromosom III zu beobachten war, zeigten Zellen des *mall6-1* Mutantenstammes des öfteren eine fehlende Trennung dieser zwei Schwesterchromatiden. Tab.5-2 gibt den prozentualen Anteil an Wildtyp- und *mall6-1*-Zellen mit separierten Chromatin wieder, die bei entsprechenden Inkubationsbedingungen eine fehlende Trennung der Schwesterchromatiden des Chromosom III zeigten. Dieser Tabelle ist zu entnehmen, daß mit zunehmender Inkubationsdauer bei der restriktiven Temperatur der Anteil

an *mall6-1* Zellen, die eine fehlerhafte Trennung der Schwesterchromatiden aufwiesen, zunahm. Während nach 10 h bei 36 °C 0,7 % der Wildtyp-Zellen eine Nicht-Trennung zeigten, lag der prozentuale Anteil der *mall6-1* Zellen bereits bei 26,3 %.

Diese Daten implizieren, daß die fehlende Trennung von Schwesterchromatiden während der Anaphase eine Grund für die ungleiche Chromatin-Verteilung in *mall6-1* Zellen ist.

### **5.1.3.3 Beeinträchtigt die *mall6-1* Mutation den Aufbau bzw. die Struktur der mitotischen Spindel ?**

Es gibt eine Vielzahl an möglichen Ursachen, die zu einer fehlenden Trennung der Schwesterchromatiden und somit zu einer abnormen Chromosomen-Segregation in dem *mall6-1* Mutantenstamm führen können. Dabei kann eine Beeinträchtigung bei der Auflösung der Kohäsion zwischen den zwei Schwesterchromatiden beim Übergang von Metaphase zur Anaphase als eine Möglichkeit angeführt werden (Furuya et al., 1998; Tomonaga et al., 2000; Toyoda et al., 2002). Auch Defekte im Aufbau der mitotischen Spindel oder in der Anheftung von Spindel-Mikrotubuli an das Kinetochor können eine Fehlverteilung des chromosomalen Materials während der Mitose hervorrufen (Okhura et al., 1988; Nakaseko et al., 2001; Garcia et al., 2002).

Im folgenden Versuch wurden mittels Immunofluoreszenz-Mikroskopie Zellen des *mall6-1* Mutantenstammes auf mögliche Beeinträchtigungen im Aufbau bzw. in der Aufrechterhaltung der Struktur der mitotischen Spindel hin untersucht (Kapitel 4.19). Dafür wurde in *mall6-1* Zellen, die bei der permissiven bzw. für 6 h bei der restriktiven Temperatur inkubiert wurden,

sowohl das Mikrotubuli-Zytoskelett als auch das Chromatin angefärbt (Kapitel 4.19). In der darauffolgenden Untersuchung von Metaphasen-Zellen konnte ein Defekt festgestellt werden, der sich auf die Struktur der Metaphasenspindeln auswirkte. In Tab.5-3 sind die Ergebnisse dieser Untersuchung schematisch dargestellt. Die Anomalie der Metaphasenspindel bestand

		
24 °C	88,9	11,1
36 °C	33,3	66,7

Tab.5-3: Abnorme Struktur der Metaphasenspindel in *mall6-1* Zellen

Schematische Darstellung der Ergebnisse der Immunofluoreszenz-Mikroskopie. Der prozentuale Anteil an Metaphasen-Zellen des *mall6-1* Mutantenstammes mit normaler (links) bzw. abnormer (rechts) Spindelstruktur wurde bestimmt. Ausschließlich der Zellkern mit Metaphasenspindel wird gezeigt. *mall6-1* Zellen wurden in flüssigem Vollmedium asynchron bei 24 °C bzw. 36 °C für 6 h inkubiert und fixiert. Anfärbung der Tubulinstrukturen erfolgte mittels Immunofluoreszenz, Anfärbung des Chromatin durch DAPI-Behandlung.

darin, daß zum einen diese im Vergleich zu einer normalen Metaphasenspindel nur sehr schwach angefärbt war, was möglicherweise auf eine niedrigere Anzahl von Mikrotubulibündeln innerhalb dieser Spindel zurückzuführen ist, zum anderen besaß diese keine normale geradlinige, sondern eine gebogene Struktur. Während bei Inkubation bei der permissiven Temperatur 11,1 % der *mall6-1* Zellen diesen abnormen Metaphasenspindel-Phänotyp aufwiesen, stieg der Anteil der Zellen nach Inkubation bei der restriktiven

Temperatur um das ca. 6-fache auf 66,7 %. Im Gegensatz dazu konnten bei Anaphasenspindeln beider Kulturen keine Beeinträchtigung im Aufbau bzw. der Struktur nachgewiesen werden (Daten werden nicht gezeigt), was impliziert, daß der Metaphasen-Defekt während der Anaphase scheinbar revidiert wird. Dennoch konnte eine leichte Anreicherung an Anaphasen-Zellen festgestellt werden (Daten werden nicht gezeigt). Dabei betrug der prozentuale Anteil an Anaphasen-Zellen in beiden *mall6-1* Kulturen ca. 75 % im Vergleich zu 69 % in Wildtyp-Zellen (Hagan und Hyams, 1988). Diese leichte Erhöhung des prozentualen Anteils an Anaphasen-Zellen könnte möglicherweise durch kleinste Spindel-Defekte während der Anaphase hervorgerufen worden sein, die jedoch mittels Immunofluoreszenz-Mikroskopie nicht detektiert werden konnten.

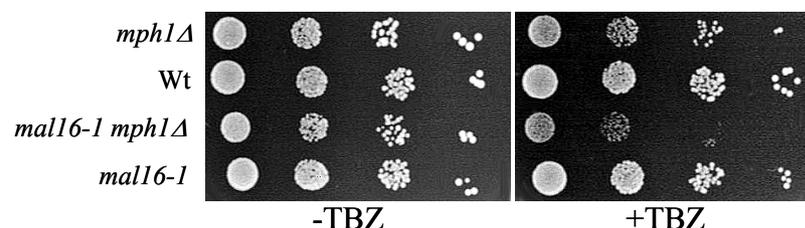
Anhand dieser Ergebnisse konnte festgestellt werden, daß zum einen *mall6-1* Zellen bereits bei 24 °C einen leicht erhöhten Anteil an Anaphasen-Zellen aufweisen, zum anderen, daß bei diesen der Aufbau der Struktur der Metaphasenspindel beeinträchtigt ist.

### 5.1.3.4 Ist in *mal16-1* Zellen der mitotische Spindel-Kontrollpunkt aktiviert ?

Da der *mal16-1* Mutantenstamm einen abnormen Spindel-Phänotyp aufweist, war es von Interesse, ob in diesen Zellen der mitotische Spindel-Kontrollpunkt aktiviert ist. Dieser Kontrollpunkt inhibiert als Antwort auf Defekte in der Anheftung von Spindel-Mikrotubuli an das Kinetochor den Übergang von Metaphase zur Anaphase und ermöglicht somit der Zelle, den Defekt zu beheben (He et al., 1998).

Aus diesem Grunde wurden Doppelmutanten hergestellt, in denen neben der *mal16-1* Mutation zusätzlich Gene, die für evolutionär konservierte Komponenten des Spindel-Kontrollpunkts kodieren, deletiert waren. Dazu wurden die Deletionsstämme *mph1Δ* und *mad2Δ* verwendet und durch Kreuzung dieser gegen die *mal16-1* Mutante Doppelmutanten hergestellt (Kapitel 4.10 bzw. 4.14). Nach Durchführung serieller Tropftests wurde das Wachstum der jeweiligen Doppelmutanten im Vergleich zu den Einzelmutanten bzw. des Wildtyp-Stammes bei Temperaturen zwischen 24 °C und 36 °C und auch auf TBZ-haltigen Platten untersucht (Kapitel 4.4.2). Dabei konnten keine Wachstumsunterschiede sowohl bei unterschiedlichen Temperaturen als auch auf TBZ-haltigen Platten zwischen der *mal16-1 mad2Δ* Doppelmutante und *mal16-1* Einzelmutante festgestellt werden (Daten werden nicht gezeigt).

Die gleiche Beobachtung konnte für die *mal16-1mph1Δ* Doppelmutante bei unterschiedlichen Temperaturen gemacht werden, jedoch im Gegensatz dazu konnte auf Platten mit niedrigen Konzentrationen an TBZ ein schwächeres Wachstum der *mal16-1 mph1Δ* Doppelmutante im Vergleich zu den Einzelmutanten festgestellt werden (Abb.5-4). Diese genetische Interaktion zwischen *mal16*<sup>+</sup> und *mph1*<sup>+</sup> läßt vermuten, daß in den Zellen des *mal16-1* Mutantenstamm der mitotische Spindel-Kontrollpunkt aktiviert ist.

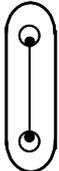


**Abb.5-4: Der mitotische Spindel-Kontrollpunkt ist in *mal16-1* Zellen aktiviert**  
Die seriellen Tropftests zeigen das Wachstum des Wildtyps (Wt), der *mal16-1* bzw. *mph1Δ* Einzelmutanten und der *mal16-1 mph1Δ* Doppelmutante auf Vollmedium ohne und mit TBZ (2µg/ ml) bei 24 °C (Inkubationsdauer: 5 Tage).

### 5.1.3.5 Ist in dem *mal16-1* Mutantenstamm die Anheftung der Spindel-Mikrotubuli an das Kinetochor möglicherweise beeinträchtigt ?

Wie bereits in Kapitel 5.1.3.3 erwähnt, kann -neben einem fehlerhaften Aufbau der mitotischen Spindel- auch ein Defekt bei der Verknüpfung von mitotischer Spindel und Kinetochor eine mögliche Ursache für eine abnorme Chromosomen-Segregation sein.

Von einer Vielzahl an *S. pombe* Mutanten, in denen diese Spindel-Kinetochor-Verknüpfung z.B. durch einen fehlerhaften Kinetochoraufbau defekt ist, ist der sogenannte „Lagging“-Chromosom-Phänotyp bekannt (Pidoux et al., 2000). Bei diesem Phänotyp bleiben einzelne Schwesterchromatiden während der späten Anaphase auf der mitotischen Spindel liegen und können in den meisten Fällen auch im weiteren Verlauf der Anaphase nicht bis zu den Polen gezogen werden (Pidoux et al., 2000).

		
24 °C	92	8
36 °C	77,3	22,7

Tab.5-4: *mal16-1* Zellen zeigen den „Lagging“-Chromosom Phänotyp

Schematische Darstellung der Anaphasen-Zellen ohne bzw. mit „Lagging“-Chromosom Phänotyp. Dabei werden Zellen mit getrenntem Chromatin (weißer Kreis; Fehlverteilung wird in der Abbildung nicht berücksichtigt) und entsprechenden Mal2p-Signalen (schwarzer Punkt) gezeigt. Der prozentuale Anteil an Anaphasen-Zellen ohne (links) bzw. mit (rechts) „Lagging“-Chromosomen wurde bestimmt. *mal16-1* Zellen wurden in flüssigem Vollmedium asynchron bei 24 °C bzw. 36 °C für 6 h inkubiert und fixiert. Mittels Immunofluoreszenz erfolgte die Anfärbung des Tubulins und des Mal2p-GFP-Fusionsproteins, Chromatin wurde mit DAPI behandelt.

Um nun zu überprüfen, ob *mal16-1* Zellen möglicherweise „Lagging“-Chromosomen aufweisen, wurde für diesen Versuch ein *mal16-1* Mutantenstamm verwendet, in dem an den endogenen *mal2<sup>+</sup>*-ORF, der für ein Kinetochorprotein kodiert, ein GFP-Epitop fusioniert ist (Fleig et al., 1996; Jin et al., 2002). Nach

Inkubation des Mutantenstammes sowohl bei 24 °C als auch bei 36 °C für 6 h erfolgte mittels Immunofluoreszenz die Anfärbung des Mikrotubuli-Zytoskeletts und des Mal2p-Proteins (Kapitel 4.19). Anhand des Mal2p-GFP-Signals konnte das Verhalten der Kinetochore während der Mitose analysiert werden. Bevor auf die Ereignisse während der Anaphase eingegangen wird, wird zuerst Bezug auf die Beobachtungen während der Metaphase genommen. Da Studien

belegen, daß in *S. pombe* Zellen -im Anschluß an die Anheftung der Spindel-Mikrotubuli an die Kinetochore- die Zentromere der zwei Schwesterchromatiden oszillierend auseinanderweichen bis die zwei Schwesterchromatiden endgültig getrennt werden, war es von Interesse, ob diese Bewegung in *mal16-1* Zellen weiterhin stattfindet (Nabeshima et al., 1998). Diese oszillierende Bewegung der Kinetochore kann dabei an der Anwesenheit von vier bis zu sechs Mal2p-GFP-Signalen im Zellkern festgestellt werden. Dabei repräsentieren die Mal2p-Signale

die auseinandergewichenen Kinetochore der drei *S. pombe* Chromosomen. Bei der Untersuchung beider Kulturen konnten in ca. 50 % aller Metaphasen-Zellen zwischen vier bis sechs Mal2p-Signale beobachtet werden (Daten werden nicht gezeigt), was beweist, daß in Zellen des *mal16-1* Mutantenstammes diese oszillierende Bewegung der Zentromere weiterhin bestehen bleibt. Im weiteren Versuchsverlauf wurden *mal16-1* Zellen auf den „Lagging“-Chromosom-Phänotyp hin untersucht. Hierbei wurden Anaphasen-Zellen analysiert, bei denen das Chromatin bereits separiert an den Zellpolen vorlag. An dieser Stelle sollte für ein besseres Verständnis erwähnt werden, daß in *S. pombe* die Zentromere während der Interphase gruppiert an dem Spindelpol-Körper (SPK) anliegen und diese bei Verwendung eines Zentromer-Markers als eine Masse wahrgenommen werden (Funabiki et al., 1993). Gleiches gilt für die Anaphase. Auch hier werden die Kinetochore der bereits getrennten Schwesterchromatiden als Gruppe zu den entgegengesetzten Polen gezogen, was bedeutet, daß die separierten Chromatin-Massen jeweils ein Mal2p-Signal besitzen. Im Falle der „Lagging“-Chromosomen werden ein -oder auch mehrere- Schwesterchromatiden nicht oder erst verspätet zu den Polen gezogen, und somit weisen diese Zellen zusätzliche Zentromer-Signale auf der Anaphasen-Spindel auf (Pidoux et al., 2000). In Tab.5-4 sind die Ergebnisse der Untersuchung schematisch dargestellt. Bei 24 °C zeigten 8 % der untersuchten *mal16-1* Zellen den „Lagging“-Chromosom-Phänotyp, während nach Erhöhung der Inkubationstemperatur der prozentuale Anteil auf 22,7 % anstieg.

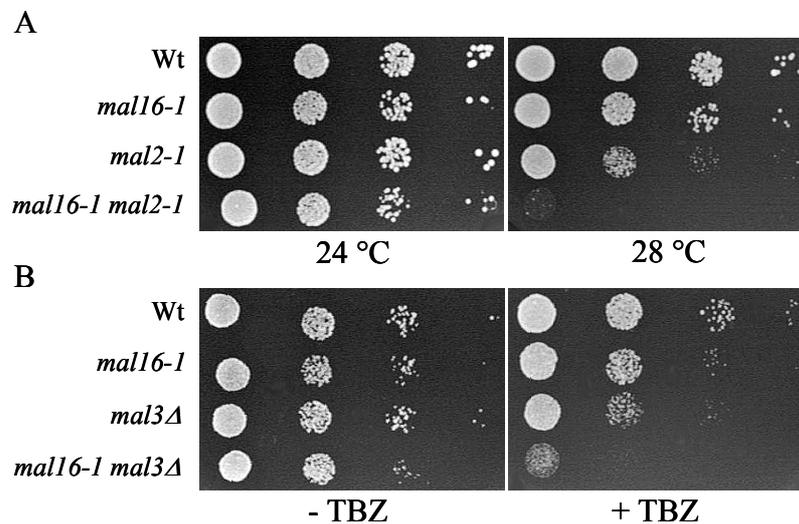
Dieses Versuchsergebnis zeigt, daß in Zellen der *mal16-1* Mutante die Verknüpfung zwischen Kinetochor und Spindel-Mikrotubuli beeinträchtigt ist.

#### **5.1.3.6 Untersuchung auf genetische Interaktion zwischen *mal16-1* und Komponenten, die eine Funktion am Kinetochor bzw. bei der Spindel-Kinetochor-Verknüpfung besitzen**

Des weiteren war es von Interesse, ob möglicherweise genetische Interaktionen zwischen *mal16-1* und Komponenten, die eine Rolle am Kinetochor bzw. bei der Spindel-Mikrotubuli-Verknüpfung haben, festgestellt werden können. Als Komponenten wurden zum einen das Kinetochorprotein Mal2p, zum anderen das evolutionär konservierte, Mikrotubuli-assoziierte Protein Mal3p ausgewählt, das in seiner mitotischen Rolle eine entscheidene Funktion bei der Anheftung von Spindel-Mikrotubuli an das Kinetochor ausübt (Fleig et al., 1996; Jin et al., 2002; Beinhauer et al., 1997; Kerres et al., 2004).

Für diese Untersuchung wurden die Mutanten *mal2-1* und *mal3Δ* verwendet und durch die jeweilige Kreuzung dieser gegen die *mal16-1* Einzelmutante Doppelmutanten hergestellt

(Kapitel 4.10 bzw. 4.14). Bei der Durchführung serieller Tropftests wurden abhängig von den Ausgangstämmen entsprechende Bedingungen gewählt (Kapitel 4.4.2). Die Untersuchung auf genetische Interaktion zwischen *mal16*<sup>+</sup> und *mal2*<sup>+</sup> erfolgte bei Temperaturen zwischen 24 °C und 36 °C.



**Abb.5-5: *mal16*<sup>+</sup> zeigt genetische Interaktion mit *mal2*<sup>+</sup> und *mal3*<sup>+</sup>**

(A) Der Tropftest zeigt das Wachstum des Wildtyps (Wt), der *mal16-1* und *mal2-1* Einzelmutanten sowie das der *mal2-1mal16-1* Doppelmutante bei 24 °C und 28 °C auf Vollmedium (Inkubationsdauer: 5 Tage). In (B) ist der Tropftest mit dem Wachstum des Wildtyps, der *mal16-1* und *mal3Δ* Einzelmutanten sowie das der *mal16-1 mal3Δ* Doppelmutante bei 24 °C auf Vollmediums-Platten ohne und mit TBZ (4 µg/ ml) abgebildet (Inkubationsdauer: 5 Tage).

In Abb.5-5 A wird das Wachstum der *mal16-1mal2-1* Doppelmutante im Vergleich zu den Einzelmutanten und des Wildtyps bei 24 °C und 28 °C dargestellt. Wie der Abbildung zu entnehmen ist, konnte bei 24 °C bei allen Stämmen gleich gutes Wachstum beobachtet werden. Im Gegensatz dazu zeigte die *mal16-1mal2-1* Doppelmutante bei 28 °C kein Kolonien-Wachstum, obwohl die Einzelmutanten noch in der Lage waren, zu wachsen.

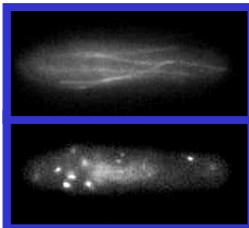
Eine ähnliche Beobachtung konnte bei dem Wachstum der *mal16-1mal3Δ* Doppelmutante auf TBZ-haltigen Platten gemacht werden (Abb.5-5 B). Bei Platten ohne TBZ zeigten alle Stämme gutes Wachstum, während auf Platten mit Zusatz von TBZ die Doppelmutante im Vergleich zu den Einzelmutanten stark eingeschränktes Wachstum aufwies.

Mit diesen Versuchsergebnissen konnten starke genetische Interaktionen zwischen *mal16-1* und Komponenten, die eine Rolle am Kinetochor bzw. bei der Spindel-Kinetochor-Verknüpfung haben, nachgewiesen werden.

### 5.1.3.7 Der Mutantenstamm *mal16-1* weist eine abnorme Chromatin-Struktur während Mitose und Interphase auf

Da für bisherige immunofluoreszenzmikroskopische Untersuchungen *mal16-1* Zellen lediglich für 6 h bei der restriktiven Temperatur inkubiert wurden, war es von Interesse, ob eine verlängerte Inkubationszeit bei der restriktiven Temperatur zu weiteren Phänotypen führt. Hierfür wurden Zellen des *mal16-1* Mutantenstammes für 10 h bei 36 °C inkubiert und im Anschluß daran das Mikrotubuli-Zytoskelett sowie das Chromatin angefärbt (Abb.5-6) (Kapitel 4.19). Tatsächlich konnte nach verlängerter Inkubationszeit bei der restriktiven Temperatur ein weiterer neuer Phänotyp festgestellt werden. In Abb.5-6 A ist als Beispiel eine Interphasen-Zelle der *mal16-1* Kultur abgebildet, wobei die Phase des Zellzyklus an den zytoplasmatischen Mikrotubuli erkennbar war (Abb.5-6 A, oben). Bei Betrachtung des Chromatins fällt auf, daß dieses nicht die elipsoide kompakte Form eines Interphasen-Kerns besaß, sondern dekontensiert vorlag und aufgrund der abnormen Chromatin-Struktur ein stark vergrößertes Volumen aufwies (Abb.5-6 A, unten).

A



B

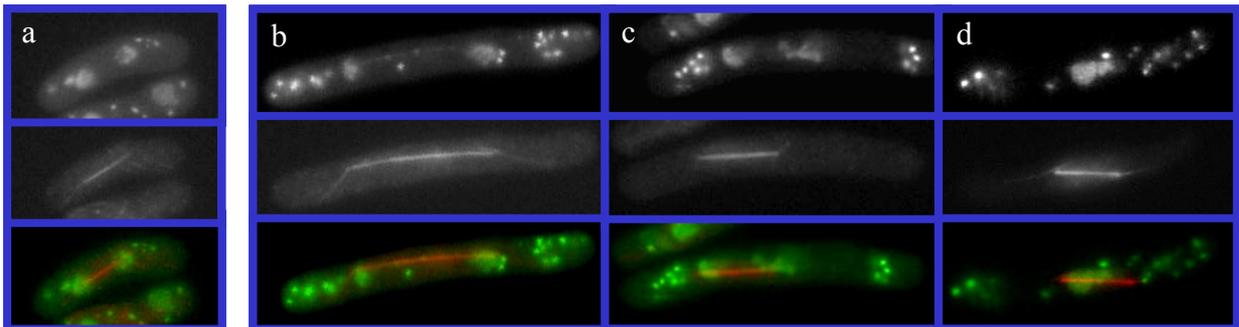


Abb.5-6: *mal16-1* Zellen zeigen abnorme Chromatin-Struktur während Interphase und Mitose

Zur Entdeckung weiterer Phänotypen wurden Wildtyp (Wt) und *mal16-1* Zellen bei 36 °C für 10 h angezogen und mittels Immunofluoreszenz-Mikroskopie untersucht. (A) Interphasen -Zelle des *mal16-1* Stammes: obere Mikroskopie-Aufnahme zeigt Immunofluoreszenz von Tubulin und die untere die Chromatin-Anfärbung mittels DAPI. (B) Mitotische Wildtyp (Wt) (a) und *mal16-1* Zellen (b-d): jede Teilabbildung zeigt drei unterschiedliche Aufnahmen einer Zelle: die obere die Chromatin-Färbung mittels DAPI, die mittlere und die untere zeigen zum einen die Immunofluoreszenz von Tubulin, zum anderen die überlagerte Aufnahme (grün: DAPI; rot: Tubulin).

Auch bei der Untersuchung von mitotischen Zellen konnte dieser Phänotyp nachgewiesen werden. In Abb.5-6 B sind als Beispiele Anaphasen-Zellen des *mal16-1* Mutantenstammes (Teilbilder b, c, d) im Vergleich zu der eines Wildtypstammes (Teilbild a) dargestellt. Während im Wildtypstamm die getrennten Chromatin-Massen eine kondensierte Form aufwiesen, konnte bei der *mal16-1* Mutante diese Kompaktheit nicht mehr beobachtet werden. Bei genauer Betrachtung der Chromatin-Struktur der ersten abgebildeten *mal16-1* Zelle (Abb.5-6 B, Teilbild b, oben) ließ sich zusätzlich ein Chromatin-Faden, der sich entlang der mitotischen Spindel zog, erkennen. Vermutlich wurde aufgrund der fehlenden Chromatin-Kompaktierung die DNA nachgezogen. Auch in den beiden anderen dargestellten mitotischen *mal16-1* Zellen (Abb.5-6 B, Teilbilder c, d) konnten Defekte im Aufbau der Chromatin-Struktur festgestellt werden. Während in Teilbild c einer der separierten Kerne keinerlei Struktur mehr aufwies, lagen in Teilbild d zwei in Ansätzen getrennte Chromatin-Massen in der Mitte der elongierten Anaphasen-Spindel. Eine dieser Chromatin-Massen hatte dabei die Form eines „aufgeblasenen Ballons“.

Das bedeutet, daß eine verlängerte Inkubation bei der restriktiven Temperatur sowohl in mitotischen als auch in Interphasen-Zellen zu einem Defekt in der Chromosomen-Kompaktierung führt.

#### 5.1.4 Isolation des *mal16*<sup>+</sup>-Gens

Die Isolation bzw. Identifizierung eines Wildtyp-Gens kann entweder durch Komplementation eines mutanten Phänotyps mit Hilfe einer Genbank oder mittels Genkartierung erfolgen. Dabei stellt die Isolation eines Gens über Komplementation des mutanten Phänotyps die einfachste Möglichkeit dar. Falls jedoch die Mutation eines Gens einen nur schwachen Phänotyp hervorruft, oder die Überexpression des plasmidkodierten Wildtyp-Gens letal ist, kann die Identifizierung des Gens auf diese Weise schwierig bzw. unmöglich werden. In diesem Falle kann mit einer „Grob“-Kartierung des Gens begonnen werden, um die chromosomale Region, in der sich das Gen befindet, einzugrenzen. Anschließend werden entsprechende Cosmide, die diesen Bereich abdecken, benutzt, um die Fehlfunktion zu supprimieren und somit die exakte Lokalisierung des Gens festzustellen.

Für die Identifizierung des Wildtyp-Gens ist es von großer Wichtigkeit, daß die Mutation dabei rezessiv ist. Im Falle einer dominanten Mutation ist es unmöglich, über Suppression des mutanten Phänotyps mit Hilfe einer Genbank das Wildtyp-Gen zu isolieren. Aus diesem Grunde wurde die *mal16-1* Mutation auf Rezessivität hin untersucht.

#### 5.1.4.1 Die *mal16-1* Mutation ist rezessiv

Für die Untersuchung auf Rezessivität wurden heterozygot diploide *mal16-1/ mal16<sup>+</sup>* Stämme und homozygot diploide *mal16<sup>+</sup>/ mal16<sup>+</sup>* Stämme hergestellt (Kapitel 4.10.1 bzw. 4.10.2) und nach Inkubation dieser bei der restriktiven Temperatur wurde anhand der Zellmorphologie überprüft, ob der heterozygot diploide *mal16-1/ mal16<sup>+</sup>* Stamm den für den *mal16-1* Mutantenstamm spezifischen Elongations-Phänotyp aufwies. Bei Rezessivität der *mal16-1* Mutation war zu erwarten, daß beide Stämme die gleichen Phänotypen, und zwar die des Wildtypstammes, zeigten. Als weitere Kontrollen wurden sowohl der haploide *mal16-1* Mutantenstamm als auch ein haploider Wildtypstamm verwendet. In Tab.5-5 sind die Ergebnisse der Untersuchung zusammengefasst.

	haploid <i>mal16<sup>+</sup></i>	<i>mal16-1</i>	diploid <i>mal16<sup>+</sup>/ mal16<sup>+</sup></i>	<i>mal16-1/ mal16<sup>+</sup></i>
Elongierte Zellform	nein	ja	nein	nein

Tab.5-5: Untersuchung auf Rezessivität mittels Analyse der Zellform

Die Analyse der Zellform erfolgte durch Ausstriche der Stämme auf Vollmediums-Platten, Inkubation bei 36 °C Ü/N und anschließender Mikroskopie.

Wie der Tabelle zu entnehmen ist, konnten bei den heterozygot diploiden *mal16-1/ mal16<sup>+</sup>* Stämme -ebenso wie bei den diploiden *mal16<sup>+</sup>/ mal16<sup>+</sup>* Wildtypstämmen- keine elongierte Zellform bei 36 °C festgestellt werden. Dies deutet auf eine Rezessivität der *mal16-1* Mutation hin, da sich bei Dominanz der Mutation der Elongations-Phänotyp in den heterozygot diploiden *mal16-1/ mal16<sup>+</sup>* Stämmen hätte auswirken müssen.

#### 5.1.4.2 Komplementationsversuche zur Identifizierung des *mal16<sup>+</sup>*-Wildtyp-Gens

Zur Isolation des *mal16<sup>+</sup>*-Gens über Komplementation der Temperatur-Hypersensitivität des *mal16-1* Mutantenstammes (Kapitel 5.1.1) wurde in den *mal16-1* Mutantenstamm eine genomische *S. pombe*-Genbank transformiert und die entsprechenden Transformanten bei 36°C inkubiert (Kapitel 4.12.1). Transformanten, die Kolonien-Wachstum bei der restriktiven Temperatur zeigten und somit bei diesen eine plasmidkodierte Suppression der *mal16-1* Temperatur-Sensitivität zu beobachten war, wurden näher untersucht. Dabei konnte davon ausgegangen werden, daß im Falle einer positiven Transformante, d.h. in der das Wildtyp-Gen exprimiert wird, bei dieser zusätzlich eine Komplementation des elongierten Zell-Phänotyps bei 36°C festgestellt werden konnte (Kapitel 5.1.1). In Tab.5-6 A sind die Ergebnisse dieser Genbank-Transformation aufgeführt. Von den insgesamt 17250 Transformanten (ca. 5-faches Abdecken des *S. pombe* Genoms) konnte bei 1040 ein besseres

Wachstum festgestellt werden. Da es sich bei dieser hohen Anzahl an Transformanten nicht ausschließlich um Positive handeln konnte, wurden diese nach Koloniengröße gruppiert und ausschließlich Transformanten, die große Kolonien bildeten, auf Suppression des elongierten Zell-Phänotyps hin untersucht. Schließlich sollte die Expression des Wildtyp-Gens -im Vergleich zu der extragenen *mal16-1* Suppressoren- einen Wachstumsvorteil bewirken. Von diesen 208 analysierten Transformanten zeigte hingegen keine eine Komplementation des Elongations-Phänotyps (Daten werden nicht gezeigt) und auch nach wiederholten Transformationsversuchen war es nicht möglich, das Wildtyp-Gen zu identifizieren. Aus diesem Grunde wurde auf einem anderen Wege versucht, daß *mal16<sup>+</sup>*-Gen über Komplementation zu isolieren. Wie in Kapitel 5.1.3.6 festgestellt werden konnte, zeigten *mal16-1mal2-1* Doppelmutanten eine genetische Interaktion, was sich durch einen Wachstumsdefekt bei 28 °C bemerkbar machte. Dieser Wachstumsdefekt der Doppelmutante war dabei noch stärker, als der der *mal16-1* Einzelmutante bei 36 °C. Aufgründessen wurde mit der *mal16-1mal2-1* Doppelmutante wie oben vorgegangen, mit dem Unterschied, daß die Untersuchung auf Suppression der Temperatur-Sensitivität bei 28 °C erfolgte.

Koloniengröße	A	B	C	Suppression	Anzahl der Suppressoren
groß	208	55		keine	10
mittel	458	273		schwach	9
klein	374	92		gut	6
Σ	1040	420		Σ	25
Gesamtzahl aller Transformanten	17250	56160			

Tab.5-6: Ergebnisse der Komplementationsversuche

Aufgeführt ist die Anzahl der *mal16-1* (A) bzw. *mal16-1mal2-1* (B) Transformanten nach Koloniengröße eingeteilt, die Suppression der Temperatur-Sensitivität bei (A) 36 °C bzw. (B) 28 °C zeigten. Zusätzlich ist die Gesamtzahl der Transformanten des entsprechenden Komplementationsversuchs der Abbildung zu entnehmen. Bank-Plasmide ohne *mal2<sup>+</sup>*-Insert sind in (C) abgebildet. Dabei erfolgte die Einteilung in Gruppen abhängig von der Stärke der plasmidkodierten Suppression der Temperatur-Sensitivität des *mal16-1* Mutantenstammes bei 36°C.

Mittels dieser Transformation konnten von insgesamt 56160 Transformanten (ca. 16-faches Abdecken des Genoms) bei 420 eine Komplementation der Temperatur-Sensitivität beobachtet werden, wobei 55 putativ Positive große Kolonien bildeten (Tab.5-6 B). Um die Transformanten zu erkennen, die Bank-Plasmide mit einem *mal2<sup>+</sup>*-Insert trugen, wurde das Wachstum aller 55 putativ Positiven bei 35 °C geprüft. Ausschließlich Transformanten, in

denen das *mal2*<sup>+</sup>-Gen exprimiert wurde, konnten bei dieser Temperatur wachsen. Der Grund hierfür liegt in früheren Studien, in denen der Versuch unternommen wurde, extragene *mal2-1* Suppressoren bei dieser Temperatur zu identifizieren, jedoch nur das Wildtyp-Gen *mal2*<sup>+</sup> isoliert werden konnte (Beuter, unpublizierte Daten). 13 dieser 55 Transformanten waren in der Lage, bei 35 °C zu wachsen. Nach Plasmid-Isolation konnte durch eine weitere Verifikation mittels Restriktionsanalyse die Annahme, daß es sich um *mal2*<sup>+</sup> handeln musste, bestätigt werden (Kapitel 4.12.1). Von den 42 unidentifizierten Bank-Plasmiden konnte nur die DNA von 25 isoliert werden, wobei nach Durchführung einer weiteren Restriktionsanalyse keines dieser ein *mal2*<sup>+</sup>-Insert enthielt (Kapitel 4.12.1). Aufgrund der oben genannten Studie konnte bei diesen davon ausgegangen werden, daß es sich um Suppressoren der *mal16-1* Mutation -und nicht um welche der *mal2-1* Mutation- handeln musste. Alle 25 Bank-Plasmide wurden daraufhin in den *mal16-1* Mutantenstamm zurücktransformiert und erneut serielle Tropftests mit den entsprechenden Transformanten -diesmal bei 36°C- durchgeführt, um eine plasmidkodierte Suppression zu bestätigen (Kapitel 4.4.2). Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Tab.5-6 C aufgeführt. Während bei 10 Bank-Plasmiden eine plasmidkodierte Suppression nicht bestätigt werden konnte, zeigten 9 eine nur schwache und 6 Plasmide eine gute Komplementation der Temperatur-Sensitivität. Obwohl auch hier die Expression der genomischen Bank-DNA zu keiner Suppression des elongierten Zell-Phänotyps führte (Daten werden nicht gezeigt), wurden die 6 Bank-Plasmide, bei denen eine gute Komplementation der Temperatur-Sensitivität beobachtet werden konnte, ansequenziert. Dabei stellte sich nach Ansequenzierung dieser 6 extragenen *mal16-1* Suppressoren und anschließender Datenbanksuche heraus (Kapitel 4.12.1), daß 3 dieser Suppressoren mitochondriale DNA enthielten, die jeweils für mehrere unterschiedliche tRNAs kodierten. Eine weitere Ansequenzierung eines Bank-Plasmids ergab, daß das Insert zum einen den N-terminus (+1 bis +319) des chromosomalen *rsm23*<sup>+</sup>-Gens (SPBC29A3.15c) trägt, das für ein mitochondriales ribosomales Protein der kleinen s23 Untereinheit kodiert und dieses Ähnlichkeit zu Apoptose-Mediator-Proteinen in Säugetieren aufweist. Zum anderen wurde ein Gen (SPBC29A3.16) identifiziert, dessen Funktion in der Ribosomen-Synthese vermutlich eine Rolle spielt. Bei den beiden letzten Suppressoren war entweder die Ansequenzierung nicht auswertbar oder es konnte keine Homologie zu den zugänglichen genomischen bzw. mitochondrialen *S. pombe* DNA-Sequenzen in den Datenbanken gefunden werden. Da die Expression der jeweiligen isolierten DNA-Inserts ausschließlich den Wachstumsdefekt des *mal16-1* Mutantenstammes bei 36 °C supprimieren konnte und Gene bzw. Genprodukte isoliert wurden, für die bisher keine Rolle

im mitotischen Prozeß beschrieben wurden, konnte davon ausgegangen werden, daß es sich bei diesen um unspezifische Suppressoren handelte.

Aufgrund der Tatsache, daß es auch mittels dieses Komplementationsversuches unmöglich war, daß *mall6<sup>+</sup>*-Gen zu identifizieren, musste die Isolation des *mall6<sup>+</sup>*-Gens mittels Genkartierung durchgeführt werden.

### 5.1.4.3 Genkartierung

#### 5.1.4.3.1 Generelle Vorgehensweise bei der Kartierung eines *S. pombe* Gens

An dieser Stelle sollte eine generelle Beschreibung der Vorgehensweise bei der Genkartierung erfolgen. Zur Kartierung eines Gens muß als erstes das entsprechende Gen einem der drei *S. pombe* Chromosomen (Genomgröße: 13,8 Mbp; gesamte Genanzahl: ~ 4800; Chr. I: 5,7 Mbp, Chr. II: 4,6 Mbp, Chr. III: 3,5 Mbp) zugeordnet werden. Dazu wird ein Stamm benutzt, der im *swi5<sup>+</sup>*-Gen eine Mutation trägt. Diese *swi5-39* Mutante hat eine ca. 10-fach reduzierte Rekombinationsfrequenz, sodaß es mit Hilfe dieser Mutation möglich ist, die Kopplung zweier sehr weit voneinander liegender Gene festzustellen bzw. deren Lokalisierung auf demselben Chromosom (Schmidt et al., 1989; Schmidt, 1993). In Stämmen, die diese Mutation nicht tragen, können weit voneinander liegende Gene, die auf demselben Chromosom lokalisiert sind, aufgrund von Rekombinations-Ereignissen zwischen diesen Genen nicht als gekoppelt erkannt werden. Um nun festzustellen, auf welchem Chromosom das entsprechende Gen liegt, wird ein mutiertes Allel des zu lokalisierenden Gens (Gen  $x^-$ ) in die *swi5-39* Mutante mittels Kreuzung und anschließender Tetradenanalyse eingebracht (Kapitel 4.10). Der resultierende Stamm  $x^- swi5-39$  wird nun mit einem *swi5-39* Stamm, der unterschiedliche genetische Marker auf allen drei Chromosomen besitzt, gekreuzt und mittels Tetradenanalyse die resultierenden Sporen auf die Anwesenheit der unterschiedlichen Marker bzw. der Mutation hin untersucht. Da die *swi5-39* Mutation rezessiv ist, ist es wichtig, daß die beiden zu kreuzenden Stämme die *swi5-39* Mutation tragen, da ansonsten keine reduzierte Rekombinationsfrequenz zu erzielen ist. Mit der oben beschriebenen Kreuzung ist es möglich, die Kopplung des gewünschten Gens mit einem der drei Marker zu beobachten und somit das Gen einem Chromosom zuzuordnen (Kapitel 5.1.4.3.3). Anschließend ist das Gen gegen unterschiedliche Marker auf dem entsprechenden Chromosom zu kartieren und dies gibt darüber Auskunft, in welcher Region das Gen auf diesem Chromosom lokalisiert ist (Kapitel 5.1.4.3.4). Ist diese Region bekannt, so werden Cosmide mit entsprechenden genomischen DNA-Sequenzen des chromosomalen Bereiches in den Ausgangsmutantenstamm transformiert. Diese DNA-Sequenz wird durch homologe Rekombination ins Genom

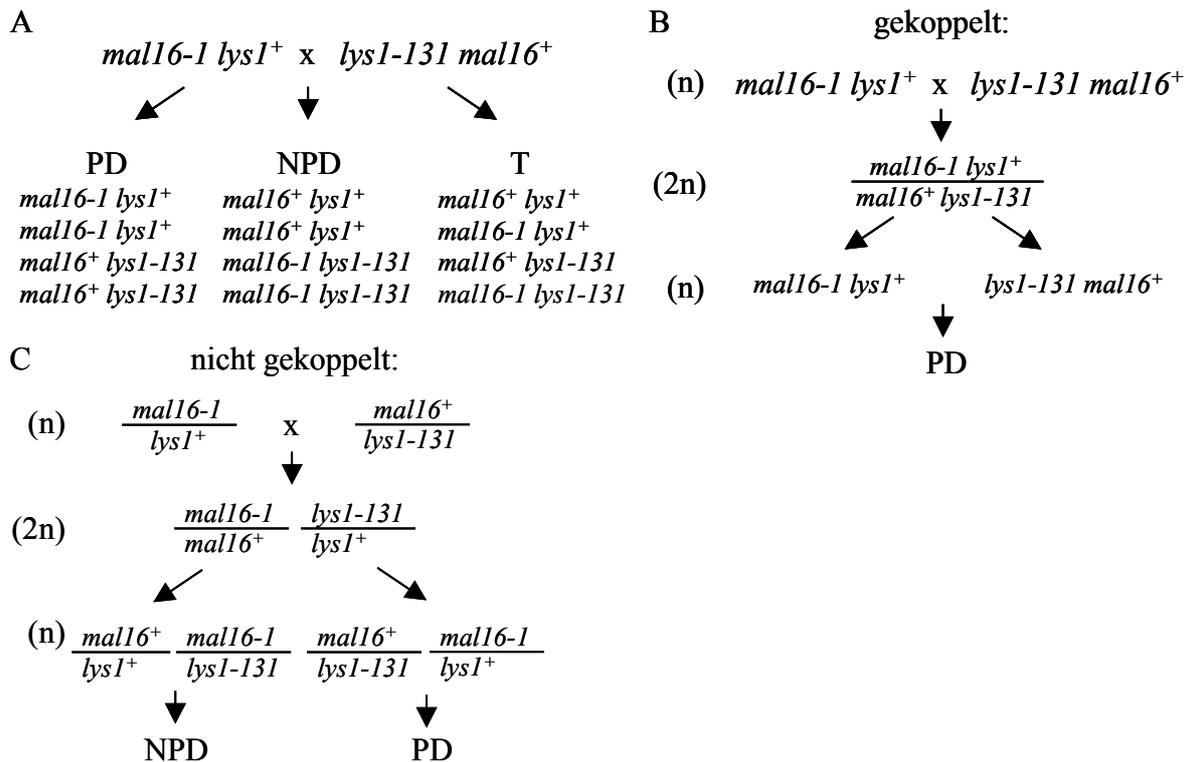
eingebaut und somit die mutierte gegen die Wildtyp-Sequenz ausgetauscht. Bei der Beobachtung einer Suppression des mutanten Phänotyps ist davon auszugehen, daß das transformierte Cosmid das zu lokalisierende Gen enthält. Da Cosmide zum Teil sehr lange DNA-Sequenzen (bis zu ~ 45 Kbp) beinhalten und somit auch sehr viele Gene, muß zuletzt das gewünschte Gen unter diesen gefunden werden. Dies erfolgt mittels Subklonierung der einzelnen Gene, Transformation dieser und der Beobachtung einer Suppression des mutanten Phänotyps.

Bevor mit der Kartierung des *mal16*<sup>+</sup>-Gens nach der oben beschriebenen Vorgehensweise begonnen wurde, musste zunächst überprüft werden, ob das *mal16*<sup>+</sup>-Gen mit einem Zentromer gekoppelt ist.

#### 5.1.4.3.2 Untersuchung auf Zentromer-Kopplung

Falls ein Gen, wie z.B. das *lys1*<sup>+</sup>-Gen, mit einem Zentromer gekoppelt ist, d.h. in unmittelbarer Nähe lokalisiert ist, fällt dieses in eine spezielle Klasse. Aufgrund der Kopplung mit dem Zentromer ist die Wahrscheinlichkeit eines „Crossing-Overs“ zwischen Gen und Zentromer äußerst gering. Das bedeutet, daß das Chromosom mit dem entsprechenden Gen während der Meiose I immer mit seinem Homologen getrennt segregiert.

Zu Beginn werden für das weitere Verständnis in Abb.5-7 A alle möglichen Tetradentypen -nach Kreuzung des *lys1-131* und des *mal16-1* Stammes- aufgeführt. Während die Beobachtung eines parental Dityps (PD) im Allgemeinen bedeutet, daß in der Meiose kein Rekombinations-Ereignis eingetreten ist, so wird das Auftreten eines Tetratyps (T) meistens durch ein bzw. beim nicht-parentalen Dityp (NPD) gleich durch zwei Rekombinations-Ereignisse hervorgerufen. In Abb.5-7 B bzw. C wird anhand des Beispiel von *mal16-1*, im Falle einer Lokalisierung am Zentromer und dem mit dem Zentromer gekoppelten Marker *lys1-131*, die Situation vereinfacht dargestellt. Dabei wird zwischen der Lokalisierung beider Gene auf demselben (Abb.5-7 B) bzw. auf verschiedenen Chromosomen unterschieden (Abb.5-7 C). Wie der Abbildung zu entnehmen ist, können nach einer Kreuzung eines *lys1-131* Stammes mit dem *mal16-1* Stamm und anschließendem Durchlaufen der Meiose entweder nur der parentale Dityp -im Falle gleicher Chromosom-Lokalisierung- oder sowohl der parentale als auch der nicht-parentale Dityp bei Lokalisierung auf unterschiedlichen Chromosomen auftreten. Im Gegensatz hierzu ist die Beobachtung eines Tetratyps, für dessen Auftreten ein „Crossing-Over“ benötigt würde, unmöglich.



**Abb.5-7: Modell zur Erläuterung der Untersuchung auf Zentromer-Kopplung**

(A) Erklärung der möglichen Tetradentypen anhand des Genpaares *mal16/lys1* (PD: parentaler Dityp; NPD: nicht-parentaler Dityp; T: Tetratyp). (B) In diesem Modell wird eine Kopplung von *mal16*<sup>+</sup> mit dem Zentromer vorausgesetzt. Die entsprechenden haploiden (n) Stämme wurden gekreuzt, bildeten Zygoten (2n) und durchliefen anschließend die Meiose (n) (aufgrund der Übersicht nur Meiose I dargestellt). In Abhängigkeit von der Lokalisierung der beiden Gene ((B): dasselbe bzw. Gene gekoppelt; (C): unterschiedliche Chromosomen bzw. Gene nicht gekoppelt) sind die zu erwartenden Tetradentypen angegeben. Bruchstriche kennzeichnen eine Lokalisierung auf demselben Chromosomen.

Um nun zu überprüfen, ob bei *mal16-1* eine Zentromer-Kopplung festzustellen ist, wurde der *lys1-131* Stamm gegen den *mal16-1* Mutantenstamm gekreuzt und die Sporen-Genotypen mittels Tetradenanalyse untersucht (Kapitel 4.10 bzw. 4.13). Die Ergebnisse der Tetradenanalyse sind der Tab.5-7 zu entnehmen.

	PD	NPD	T	Σ	$d_p^1$
Anzahl der Tetraden	15	3	15	33	50

$$^1 d_p: \text{genetische Distanz in cM} = \frac{T + 6 \text{ NPD}}{(PD + NPD + T)} \times 50 \quad (\text{Perkins, 1949})$$

**Tab.5-7: *mal16*<sup>+</sup> ist nicht mit dem Zentromer gekoppelt**

Analyse der Tetradentypen nach Kreuzung des Stammes *lys1-131* mit dem *mal16-1* Mutantenstamm (PD: parentaler Dityp; NPD: nicht-parentaler; T: Tetratyp). Zusätzlich wird die genetische Distanz ( $d_p$ ) in cM für die Entfernung von *mal16*<sup>+</sup> vom eigenen Zentromer -mittels Perkins-Formel berechnet- angegeben.

Von 33 vereinzelt Tetraden zeigten 15 den parentalen, 3 den nicht-parentalen Dityp und 15 den Tetratyp. Durch die Beobachtung von Tetratypen konnte nachgewiesen werden, daß *mal16*<sup>+</sup> nicht mit dem Zentromer gekoppelt ist. Es bestand mittels dieser Kreuzung nun zusätzlich die Möglichkeit, die Distanz des *mal16*<sup>+</sup>-Gens von dem eigenen Zentromer zu berechnen, auch wenn bisher das Chromosom, auf dem *mal16*<sup>+</sup> lokalisiert ist, noch unbekannt war. Hierfür wurde eine von Perkins -im Jahre 1949- entwickelte Formel verwendet, die eine Kalkulation der genetischen Distanz ( $d_p$ ) in centi-Morgan (cM) ermöglichte (Tab.5-7). Mit Hilfe dieser Formel stellte sich heraus, daß *mal16*<sup>+</sup> ca. 50 cM von dem eigenen Zentromer entfernt liegt. Als Definition dieser Maßeinheit kann 1 cM als 5,5-6 Kbp angenommen werden (persönliche Kommunikation mit Prof. Dr. Jürg Kohli, Bern), was bedeutet, daß die Entfernung ca. 275-300 Kbp vom Zentromer beträgt.

#### 5.1.4.3.3 Auf welchem Chromosom ist das *mal16*<sup>+</sup>-Gen lokalisiert ?

Um das *mal16*<sup>+</sup>-Gen einem Chromosom zuordnen zu können, wurde der *mal16-1ade6-M210 leu1-32swi5-39* Stamm gegen den *ura3-34swi5-39* Stamm gekreuzt (Kapitel 4.10 bzw. 4.13). Wie in Kapitel 5.1.4.3.1 beschrieben, war es für diesen Versuch essentiell, genetische Marker (*ura3*, *leu1*, *ade6*) zu verwenden, die auf allen drei *S. pombe* Chromosomen lokalisiert waren. Während *ura3* auf Chromosom I liegt, sind die genetischen Marker *leu1* bzw. *ade6* entsprechend den Chromosomen II bzw. III zuzuordnen. Im Anschluß an die Tetradenanalyse wurden die resultierenden Sporen auf die Anwesenheit der unterschiedlichen Marker bzw. der *mal16-1* Mutation hin untersucht und die Tetrudentypen in Bezug auf die verschiedenen Genpaare bestimmt (Tab.5-8).

	(PD)	(NPD)	(T)	Σ
Chr. I <i>mal16-1/ ura3-34</i>	23	0	16	39
Chr. II <i>mal16-1/ leu1-32</i>	15	14	10	39
Chr. III <i>mal16-1/ ade6-M210</i>	13	16	10	39

Tab.5-8: *mal16*<sup>+</sup> ist auf Chromosom I lokalisiert

Analyse der Tetrudentypen nach Kreuzung der Stämme *mal16-1ade6-M210 leu1-32swi5-39* und *ura3-34swi5-39*. Die Anzahl der Tetraden, die den parentalen (PD), den nicht-parentalen (NPD) oder den Tetratyp (T) in Bezug auf das entsprechende Genpaar aufweisen, sind dabei angegeben.

Sind zwei Gene auf unterschiedlichen Chromosomen lokalisiert, so segregieren diese frei voneinander, während bei Genen, die sich auf demselben Chromosom befinden -je nach Entfernung voneinander- dies selten bzw. nicht zu beobachten ist. Das bedeutet, befindet sich *mal16*<sup>+</sup> auf demselben Chromosom wie ein entsprechender Marker, so sollte beim direkten Vergleich anhand des entsprechenden Genpaares selten bzw. kein Nicht-parentaler Dityp

gefunden werden, da das Auftreten dieses Tetradentyps durch mindestens zwei Rekombinations-Ereignisse hervorgerufen wird.

Wie der Tab.5-8 zu entnehmen ist, konnte bei nur einem Genpaar kein Nicht-parentaler Dityp entdeckt werden, während die anderen eine große Anzahl an diesem Tetradentyp aufwiesen. Somit konnte *mal16*<sup>+</sup> einem der drei *S. pombe* Chromosomen zugeordnet und eine Lokalisierung dieses Gens auf Chromosom I nachgewiesen werden.

#### 5.1.4.3.4 In welcher Region auf Chromosom I ist *mal16*<sup>+</sup> lokalisiert ?

Um herauszufinden, in welcher Region auf Chromosom I das *mal16*<sup>+</sup>-Gen lokalisiert ist, wurden jeweils verschiedene genetische Marker, die in unterschiedlichen Bereichen auf Chromosom I liegen (Abb.5-8), in eine *swi5-39* Mutante gekreuzt und erneut mit einem *mal16-1swi5-39* Mutantenstamm gepaart (Kapitel 4.10 bzw. 4.13). Ausgangsstämme, die zur Herstellung der entsprechenden Stämme verwendet wurden, sind dabei in Kapitel 8.1.2.3 aufgeführt. Im Anschluß an die Tetradenanalyse wurden die Genotypen der resultierenden Sporen in Bezug auf das zu untersuchende Genpaar bestimmt und die entsprechenden Tetradentypen ermittelt. Die Ergebnisse dieser Genkartierungsstudie sind in Tab.5-9 bzw. Abb.5-8 zusammengefaßt.

Genpaar	PD	NPD	T	Σ	d <sub>p</sub>
<i>mal16-1/ura1-171</i>	16	1	7	24	27,1
<i>mal16-1/ura3-34</i>	23	0	16	39	20,5
<i>mal16-1/his6-365</i>	22	1	1	24	14,6
<i>mal16-1/pkl1D12</i>	23	0	1	24	2,1
<i>mal16-1/lys1-131</i>	20	0	6	26	11,5
<i>mal16-1/mal2-1</i>	24	1	9	34	22,1

Tab.5-9 : *mal16*<sup>+</sup> ist in der Region um den *pkl1*<sup>+</sup>-ORF lokalisiert

Für das jeweilige Genpaar ist die Anzahl der entsprechenden Tetradentypen (PD: parentaler, NPD: nicht-parentaler Dityp, T: Tetratyp) in der *swi5-39* Mutante bestimmt und mittels der Perkins-Formel die genetische Distanz d<sub>p</sub> in cM (1cM = 5,5 – 6 Kbp) berechnet worden (Kapitel 5.1.4.3.2; Tab.5-7). Die entsprechenden chromosomalen Bereiche, in denen die oben aufgeführten Gene lokalisiert sind, sind dabei Abb.5-8 zu entnehmen.

Dabei sind für jedes Genpaar die ermittelten Tetradentypen und die daraus -mittels der Perkins-Formel- berechneten genetischen Distanzen angegeben. Zur Interpretation der Ergebnisse sind in Abb.5-8 die verwendeten genetischen Marker entsprechend ihrer Lokalisierung auf Chromosom I eingezeichnet und die ermittelte genetische Distanz zwischen Marker und *mal16-1* Mutation eingetragen. Wie Tab.5-9 bzw. Abb.5-8 zu entnehmen ist, konnte ein Genpaar ermittelt werden, daß eine sehr niedrige Rekombinationsfrequenz aufwies. Für das Genpaar *mal16-1* und *pkl1D12* wurde eine genetische Distanz von nur 2,1 cM berechnet, was bedeutet, daß das *mal16*<sup>+</sup>-Gen in der Region um den *pkl1*<sup>+</sup>-ORF lokalisiert sein muss. Da in einem Wildtypstamm 1 cM ca. 5,5–6 Kbp (persönliche Kommunikation mit

Prof. Dr. Jürg Kohli, Bern) beträgt, muß in der *swi5-39* Mutante wegen ihrer ca. 10-fach reduzierten Rekombinationsfrequenz 1 cM als ca. 55–60 Kbp definiert werden. Somit muß das *mal16*<sup>+</sup>-Gen aufgrund der Berechnung von einer genetischen Distanz von 2,1 cM ca. 115,5–126 Kbp links oder rechts vom *pk11*<sup>+</sup>-ORF entfernt sein.

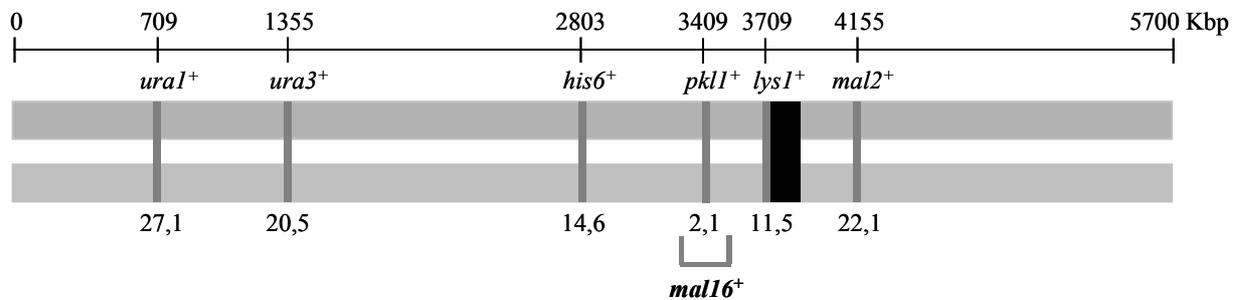


Abb.5-8: Schematische Darstellung des *S. pombe* Chromosom I

In Abb.5-8 sind die genetischen Marker entsprechend ihrer Lokalisierung auf Chromosom I (Gesamtgröße: 5700 Kbp) eingezeichnet. Zusätzlich ist die berechnete genetische Distanz (nach Perkins) zwischen dem jeweiligen genetischen Marker und *mal16*<sup>+</sup> (in der *swi5-39* Mutante) in cM angegeben. Die Lage des Zentromers ist durch einen schwarzen Balken gekennzeichnet.

Um nun die genaue *mal16*<sup>+</sup>-Lokalisierung feststellen zu können, wurde *mal16*<sup>+</sup> gegen Marker, die sich in dieser eingegrenzten Region befinden, kartiert. Für diese Untersuchung wurde die *swi5-39* Mutante nicht mehr verwendet, da eine genauere *mal16*<sup>+</sup>-Lokalisierung nur mittels Berechnung der natürlichen Rekombinationsfrequenz erfolgen konnte. Aufgrund der Tatsache, daß sich wenige genetische Marker in dieser bereits eingegrenzten Region befinden, wurden in Wildtypstämmen zusätzlich G418-Resistenz-Marker in unterschiedliche nicht-kodierende Regionen des Chromosom I integriert (Tab.5-10; Kapitel 4.13). Die entsprechenden Stämme wurden anschließend mit dem *mal16-lpk11D12* Mutantenstamm gekreuzt und eine sogenannte „Random spore“-Analyse durchgeführt. Bei der „Random spore“-Analyse werden alle vegetativen Zellen durch Behandlung mit  $\beta$ -Glucuronidase verdaut, während Sporen überlebensfähig bleiben (Kapitel 4.10.3). Diese Änderung der Versuchsdurchführung führt dazu, daß eine Einteilung der Tetrudentypen in PD, NPD und T unmöglich ist, da die Asciwände zerstört werden und die einzelnen Sporen nicht mehr einer Tetrade zuzuordnen sind. Der Grund für diese Vorgehensweise ist die Tatsache, daß die Durchführung einer Tetradenanalyse sehr zeitaufwendig ist und somit nur eine relativ niedrige Anzahl an Tetraden untersucht werden konnte. Im Gegensatz dazu bestand mit Hilfe der „Random spore“-Analyse die Möglichkeit, eine viel größere Anzahl von Sporen zu analysieren und aufgrundessen konnte das erhaltene Ergebnis statistisch besser abgesichert werden. Die Berechnung der genetischen Distanz konnte bei dieser Änderung der

Versuchsdurchführung nicht mit der bisher verwendeten Perkins-Formel berechnet werden, sondern mittels der Haldane-Formel (Grishchuk und Kohli, 2003). Für die Verwendung der Haldane-Formel erfolgte, nach Bestimmung der Genotypen der aus den Sporen heranwachsenden Kolonien, die Einteilung in parentale (P) bzw. rekombinante (R) Kolonien. Wie bereits oben erwähnt, wurde der *mal16-1pk11D12* Mutantenstamm gegen entsprechende Wildtypstämme, in denen jeweils an unterschiedlichen Positionen (z.B. *c16E8*) ein Kanamycin-Resistenz-Marker (*kan<sup>r</sup>*) integriert ist, gekreuzt. Der Grund für die Wahl dieses Stammes war, daß durch Anwesenheit des *pk11D12* Allels überprüft werden konnte, ob die für das Genpaar *pk11D12* und *c16E8-kan<sup>r</sup>* ermittelte Distanz mit der reellen bekannten Distanz übereinstimmt und somit eine interne Kontrolle darstellte. Während in Tab.5-10 die Ergebnisse der Lokalisierungsstudie aufgeführt sind, ist in Abb.5-9 die chromosomale Region um den *pk11<sup>+</sup>*-ORF mit den Integrationsorten der Kanamycin-Marker und entsprechenden reellen und mittels Haldane-Formel berechneten Distanzen zueinander abgebildet.

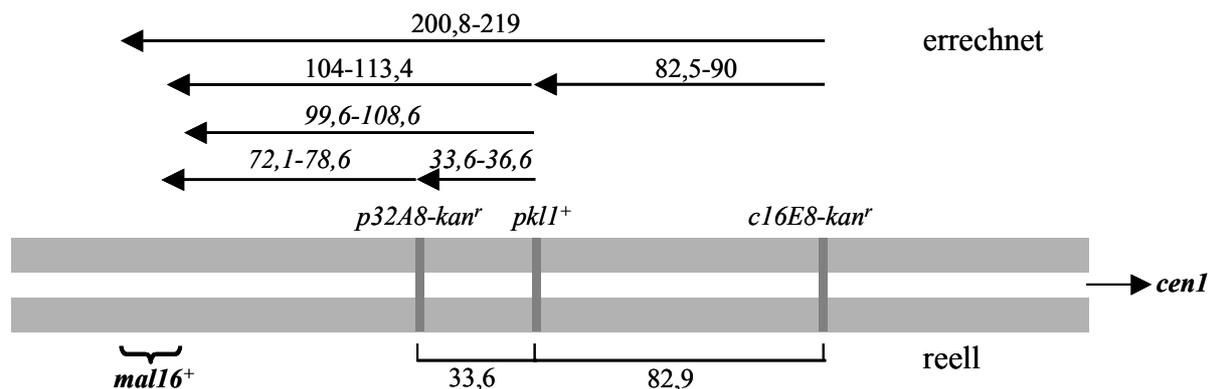
Genpaar	Kreuzung	Integrationsort bzw. ORF des Markers	P	R	$\Sigma$	$d_H$	Distanz in Kbp
	<i>c16E8-kan<sup>r</sup></i> x <i>mal16-1pk11D12</i>						
<i>mal16-1/ c16E8-kan<sup>r</sup></i>		c16E8 (26941-27070)	80	28	108	36,5	200,8-219
<i>mal16-1/ pk11D12</i>		SPAC3H5.03c	91	17	108	18,9	104-113,4
<i>pk11D12/ c16E8-kan<sup>r</sup></i>			94	14	108	15,0	82,5-90
	<i>p32A8-kan<sup>r</sup></i> x <i>mal16-1pk11D12</i>						
<i>mal16-1/ p32A8-kan<sup>r</sup></i>		p32A8 (2952-3111)	169	22	191	13,1	72,1-78,6
<i>mal16-1/ pk11D12</i>		SPAC3H5.03c	162	29	191	18,1	99,6-108,6
<i>pk11D12/ p32A8-kan<sup>r</sup></i>			180	11	191	6,1	33,6-36,6

**Tab.5-10: Lokalisierung des *mal16<sup>+</sup>*-Gens in der chromosomalen Region um den *pk11<sup>+</sup>*-ORF**

Die Genotypen der aus der „Random spore“-Analyse erhaltenen Kolonien wurden in Bezug auf die jeweiligen Genpaare untersucht und in die entsprechenden Kategorien P (parentale Kolonien) und R (rekombinante Kolonien) eingeteilt. Die genetische Distanz ( $d_H$ ) in cM wurde mittels der Haldane-Formel berechnet ( $d_H = -50 \ln(1-2(R/R+P))$ ) und die daraus ermittelte Distanz der jeweiligen Gene in Kbp angegeben. Außerdem sind die systematischen Bezeichnungen (Sanger-Center, Hinxtion) des *pk11<sup>+</sup>*-ORFs und der Integrationsorte der Kanamycin-Marker auf den entsprechenden Cosmiden in der Tabelle aufgeführt.

Zunächst wurde ein Kanamycin-Marker an die Position *c16E8* 82,9 Kbp rechts von dem *pk11<sup>+</sup>*-ORF in Richtung Zentromer integriert (Abb.5-9). Der daraus resultierende Stamm wurde mit dem *mal16-1pk11D12* Mutantenstamm gekreuzt und wie oben beschrieben fortgeföhren. Dabei konnte mit Hilfe der genetische Distanz zwischen *mal16-1* und dem Kanamycin-Marker (*c16E8-kan<sup>r</sup>*), *mal16-1* und *pk11D12* sowie zwischen *pk11D12* und Kanamycin-Marker die Distanz der jeweiligen Gene voneinander in Kbp berechnet werden (1 cM entspricht ca. 5,5–6 Kbp). Als Kontrolle diente das Genpaar *pk11D12* und *c16E8-kan<sup>r</sup>*, für die eine Distanz von 82,5–90 Kbp kalkuliert wurde und diese Berechnung mit der reellen Distanz von 82,9 Kbp tatsächlich übereinstimmte (Tab.5-10 bzw. Abb.5-9). Für die Genpaare

*mal16-1/ pkl1D12* bzw. *mal16-1/ c16E8-kan<sup>r</sup>* wurde eine Distanz von 104–113,4 bzw. 200,8–219 Kbp berechnet, wobei sich die Frage stellte, auf welcher Seite von *pkl1D12* bzw. *c16E8-kan<sup>r</sup>* sich *mal16-1* befindet. Da *pkl1D12* und der davon rechts integrierte Kanamycin-Marker bereits 82,9 Kbp voneinander entfernt liegen (Abb.5-9), war es unmöglich, daß *mal16-1* 104–113,4 Kbp rechts vom *pkl1<sup>+</sup>*-ORF lokalisiert ist. Wäre dies der Fall, so würde *mal16-1* in unmittelbarer Nähe zu dem integrierten Kanamycin-Marker liegen, was mit einer berechneten Distanz von 200,8–219 Kbp zwischen diesen beiden nicht möglich sein konnte.



**Abb.5-9: Integrationsorte der Kanamycin-Marker auf Chromosom I**

Flankierende chromosomale Regionen des *pkl1<sup>+</sup>*-ORFs sind dargestellt. Die Integrationsorte der Kanamycin-Marker *c16E8-kan<sup>r</sup>* und *p32A8-kan<sup>r</sup>* sind mit den entsprechenden reellen Distanzen in Kbp zum *pkl1<sup>+</sup>*-ORF eingetragen (Sanger-Center, Hinxtion). Zusätzlich sind die mittels Haldane-Formel errechneten Distanzen (in Kbp) zwischen dem jeweiligen integrierten Kanamycin-Marker, dem *pkl1<sup>+</sup>*-ORF und *mal16<sup>+</sup>*-ORF angegeben. Während Pfeile mit Standard-Schriftart die Kreuzung mit dem Kanamycin-Marker *c16E8-kan<sup>r</sup>* repräsentieren, wurden die mit kursiver Schriftart für *p32A8-kan<sup>r</sup>* verwendet. Die Region, in der -den Berechnungen zufolge das *mal16<sup>+</sup>*-Gen lokalisiert sein soll, ist durch eine Klammer gekennzeichnet. Die Gene, die in dieser Region liegen, sind Tab.5-11 zu entnehmen. Außerdem ist die Lage des Zentromers *cen1* in der schematischen Abbildung eingezeichnet.

Das bedeutet, *mal16<sup>+</sup>* muß auf der Zentromer abgewandten Seite, d.h. links von *pkl1<sup>+</sup>* liegen. Aus diesem Grunde wurde ein weiterer Kanamycin-Marker (*p32A8-kan<sup>r</sup>*) 33,6 Kbp links von *pkl1<sup>+</sup>* integriert (Abb.5-9) und auf die gleiche Weise -wie oben beschrieben- vorgegangen. Nach Auswertung der einzelnen Sporentypen und anschließender Berechnung der Distanzen zwischen den unterschiedlichen Genpaaren wurde zuerst die interne Kontrolle -das Genpaar *pkl1D12* und *p32A8-kan<sup>r</sup>*- untersucht (Tab.5-10 bzw. Abb.5-9). Dabei stellte sich heraus, daß der mit der Haldane-Formel kalkulierte Wert von 33,6 Kbp exakt mit dem der reellen Distanz übereinstimmte. Auf Grund dessen konnte davon ausgegangen werden, daß die berechneten Distanzen für die beiden anderen Genpaare (*mal16-1* und *pkl1D12* bzw. *mal16-1* und *p32A8-kan<sup>r</sup>*) ebenfalls sehr nahe am reellen Wert liegen mussten. In der vorherigen Kreuzung wurde bereits die Entfernung von *pkl1<sup>+</sup>* zu *mal16<sup>+</sup>* bestimmt, und auch das Ergebnis dieser neuen Kreuzung lag mit 99,6-108,6 Kbp sehr nahe am vorherigen Wert von 104–113,4 Kbp. Insbesondere die Distanz zwischen *mal16<sup>+</sup>* und dem Kanamycin-Marker (*p32A8-kan<sup>r</sup>*) war

von großem Interesse, da bei der Integration dieses Markers gehofft wurde, näher an die Position von *mal16*<sup>+</sup> auf dem Chromosom I zu gelangen. Tatsächlich wurde die Distanz mit 72,1–78,6 Kbp kleiner, was bedeutete, daß der neue Integrationsort näher am *mal16*<sup>+</sup>-Gen liegen musste. Aufgrund der Tatsache, daß alle bisher erhaltenen Ergebnisse auf denselben chromosomalen Bereich hinwiesen, wurde in der *S. pombe* Datenbank (Sanger Center, Hinxtion) recherchiert, welche Gene in dieser Region des Chromosom I lokalisiert sind (Abb.5-9) und welches von diesen das *mal16*<sup>+</sup>-Wildtyp-Gen sein könnte. Dabei liegen in der entsprechenden chromosomalen Region zehn Gene, die mit ihren jeweiligen Funktionen bzw. den Funktionen ähnlicher Proteine in *S. cerevisiae*, in Tab.5-11 aufgelistet sind.

Systematische Bezeichnung	Genname	Genprodukt/ publizierte Funktion	Homologes Genprodukt/ Mögliche Funktion aufgrund von Homologie
SPAC26A3.05	<i>chc1</i> <sup>+</sup>		CHC1 in <i>S. cerevisiae</i> kodiert für das Protein der schweren Kette des Clathrins/ Funktion im intrazellulären Proteintransport
SPAC26A3.04	<i>rpl2002</i> <sup>+</sup>		RPL20A in <i>S. cerevisiae</i> kodiert für das 60S ribosomale Protein L20/ Funktion als Ribosomen-Komponente in der Translation
SPAC26A3.03c			NCE4 in <i>S. cerevisiae</i> kodiert für einen negativen Regulator der Expression von CTS1 (Chitinase)/ Funktion in Zellseparation
SPAC26A3.02	<i>myh1</i> <sup>+</sup>	<i>myh1</i> <sup>+</sup> als MutY Homolog kodiert für eine Adenin-DNA-Glykosylase/ Funktion in der Mismatch-Reparatur	
SPAC26A3.01	<i>sxa1</i> <sup>+</sup>	<i>sxa1</i> <sup>+</sup> kodiert für eine Peptidase/ Funktion in der Degradation und Prozessierung von Paarungs-Pheromonen	
SPAC2E1P5.05			RRP9 in <i>S. cerevisiae</i> kodiert für ein U3snoRNP-Protein/ Funktion in der Prozessierung von Pre-rRNA bzw. in der Synthese von der 18SrRNA
SPAC2E1P5.04c	<i>cwg2</i> <sup>+</sup>	<i>cwg2</i> <sup>+</sup> kodiert für die $\beta$ -Untereinheit der Geranylgeranyl-Transferase/ Funktion in der $\beta$ -Glucan-Synthese	
SPAC2E1P5.03			DNAJ-Protein kodiert für ein Hitzeschock-Protein/ Funktion als Chaperon in der nativen Faltung von Polypeptiden
SPAC2E1P5.02c		SPAC2E1P5.02c-ORF kodiert für ein hypothetisches Protein mit drei möglichen Transmembran-Helices	
SPAC2E1P5.01c			MNS1 in <i>S. cerevisiae</i> kodiert für eine $\alpha$ -Mannosidase/ Funktion in der N-Glykosylierung bzw. Glykoprotein-Biosynthese

Tab.5-11: Zehn Gene kommen als *mal16*<sup>+</sup>-Wildtyp-Gen in Frage

Aufgelistet sind die zehn Gene mit der systematischen Bezeichnung bzw. dem Gennamen sowie der bereits publizierten Funktion oder der Funktion des entsprechenden Homologs aus der *S. pombe*/ *S. cerevisiae* Datenbank (Sanger Center, Hinxtion).

Während 3 der 10 Gene bereits bekannt sind und diese eine Funktion bei der DNA-Reparatur, bei der Degradation und Prozessierung von Paarungspheromenen bzw. im Zellwand-Aufbau besitzen, handelt es sich bei den übrigen 7 um bislang uncharakterisierte Gene, wobei viele dieser putativen Gene bzw. Genprodukte Ähnlichkeit zu Proteinen in *S. cerevisiae* aufweisen (Tab.5-11). Im Anschluß daran wurde mittels Literatur-Recherche nach möglichen Verbindungen zwischen den *S. pombe* bzw. *S. cerevisiae* Genprodukten und dem mitotischen Prozeß gesucht. Dabei konnte für keines dieser ein Bezug zur Mitose hergestellt werden, was impliziert, daß es sich bei dem Mall6p-Protein um eine neue mitotische Komponente handelt. Welches dieser zehn Gene das *mall6*<sup>+</sup>-Wildtyp-Gen ist, müssen zukünftige Arbeiten herausstellen. Hierfür müssen zunächst die Cosmide c26A3 und c2E1P5 subkloniert werden und im Anschluß untersucht werden, welches der jeweiligen Gene nach Expression alle *mall6-1* mutanten Phänotypen supprimieren kann.

Auf der Suche nach einer neuen mitotischen Komponente erfolgte die nähere Charakterisierung des *mall6-1* Mutantenstammes, die darauf hindeutet, daß das entsprechende Genprodukt, Mall6p, eine Funktion bei der Anheftung von Spindel-Mikrotubuli an das Kinetochor besitzt. Bei dem Versuch das *mall6*<sup>+</sup>-Wildtyp-Gen zu isolieren, konnte die entsprechende chromosomale Region, in der *mall6*<sup>+</sup> lokalisiert ist, eingegrenzt werden. Da für diese 10 Gene, die in diesem Bereich liegen, bis dato kein Bezug zur Mitose hergestellt werden konnte, bedeutet dies, daß es sich bei Mall6p um eine neue mitotische Komponente handelt.

## 5.2 Analyse der Funktion der SpRan GTPase während der Mitose

Bereits während meiner Diplomarbeit erfolgte die Charakterisierung des *spi1-25* Mutantenstammes, der neben dem erhöhten Verlust des nicht-essentiellen Minichromosoms Hypersensitivität gegenüber TBZ aufweist (Kapitel 3.4.1) (Karig, 2000). Durch Komplementation der TBZ-Hypersensitivität dieses Mutantenstammes konnte das Wildtyp-Gen *spi1*<sup>+</sup> isoliert werden, das für Ran, eine kleine, evolutionär konservierte GTPase der Ras-Familie kodiert (Matsumoto und Beach, 1991; Übersichtsartikel: Sazer und Dasso, 2000). Mit der Isolation der *spi1-25* Mutante konnte zum allerersten Mal ein mutiertes Allel des *spi1*<sup>+</sup>-Gens identifiziert werden, das zu einem Defekt im Aufbau einer mitotischen Spindel führt (Fleig et al., 2000).

In Anlehnung an die Diplomarbeit war es meine Aufgabe, mit der funktionellen Analyse der SpRan GTPase fortzufahren und somit mehr Aufschluß über die mitotische Rolle von SpRan zu erhalten.

### 5.2.1 Untersuchung auf genetische Interaktion zwischen *spi1-25* und Genen, die für mitotische Motorproteine in *S. pombe* kodieren

Das Mikrotubuli-Zytoskelett des *spi1-25* Mutantenstammes zeigt zwei Hauptdefekte im Aufbau einer mitotischen Spindel (Fleig et al., 2000). Zum einen zeigen *spi1-25* Zellen einen stark erhöhten Anteil an kurzen bipolaren Prämetaphasen-Spindeln zwischen zwei kaum separierten Spindel-Pol-Körpern (SPKs), den Mikrotubuli-Organisationszentren in *S. pombe*, zum anderen weist ein Teil der Zellen nur eine monopolare Spindel auf. Da defekte Komponenten der SPKs oder mitotische Motorproteine zu den gleichen Problemen im Aufbau einer bipolaren Spindel führen, war es von Interesse, ob möglicherweise Interaktionen zwischen SpRan und den entsprechenden Komponenten bestehen (Hagan und Yanagida, 1995; Bridge et al., 1998; Hagan und Yanagida, 1990). Während bereits in der Diplomarbeit eine genetische Interaktion zwischen *spi1*<sup>+</sup> und *cut11*<sup>+</sup>, einem Gen, das für eine SPK-Komponente kodiert, nachgewiesen werden konnte, sollte in dieser Arbeit mit der Überprüfung von Interaktionen zwischen SpRan und mitotischen Motorproteinen fortgefahren werden (Fleig et al., 2000; West et al., 1998). Dabei sind mitotische Motorproteine entsprechend ihrer Funktion unterschiedlichen Klassen zugeordnet. Eine dieser Klassen wird allein von dem Plus-End-gerichteten Motorprotein Cut7p, einem Kinesin der BimC-Familie gebildet, während eine weitere Gruppe, die der Minus-End-gerichteten Motorproteine von den

Proteinen Pkl1p und Klp2p repräsentiert werden (Hagan und Yanagida, 1990; Hagan und Yanagida, 1992; Pidoux et al., 1996; Paluh et al., 2000; Troxell et al., 2001). Da Zellen von *cut7<sup>ts</sup>* Mutanten denselben Defekt im Aufbau einer bipolaren Spindel wie *spi1-25* Zellen zeigen, wurde zuallererst untersucht, ob *spi1<sup>+</sup>* und *cut7<sup>+</sup>* genetisch miteinander interagieren (Hagan und Yanagida; 1992).

### 5.2.1.1 Die *spi1-25* Mutation kann die Temperatur-Sensitivität unterschiedlicher *cut7<sup>ts</sup>* Mutanten supprimieren

Hierfür wurden vier unterschiedliche *cut7<sup>ts</sup>*-Allele in den *spi1-25* Mutantenstamm gekreuzt und mit den resultierenden Stämmen serielle Tropftests bei Temperaturen zwischen 24 °C und 36 °C durchgeführt (Tab.5-12) (Kapitel 4.10 bzw. 4.4.2). Als ein Beispiel wird das Wachstum der Stämme gezeigt, die durch Kreuzung des *spi1-25* Mutantenstammes mit der *cut7-22* Einzelmutante generiert wurden (Abb.5-10). Als Kontrolle diente der Wildtypstamm, der erwartungsgemäß bei allen Temperaturen gleich gutes Wachstum zeigte (repräsentativ für alle Temperaturen: Wachstum bei 24 °C und 32 °C, Abb.5-10).

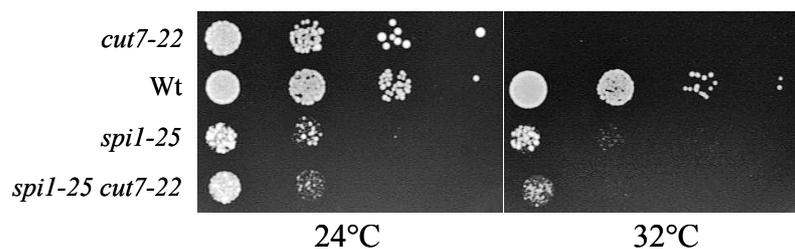


Abb.5-10: Genetische Interaktion zwischen *spi1<sup>+</sup>* und *cut7<sup>+</sup>*  
Der Tropftest zeigt das Wachstum des Wildtyps (Wt), der *spi1-25* und *cut7-22* Einzelmutanten sowie das der *spi1-25cut7-22* Doppelmutante bei 24 °C und 32 °C auf Vollmediums-Platten (Inkubationsdauer: 5 Tage).

Beim Vergleich des Wachstums der *cut7-22* Einzelmutante mit dem der Doppelmutante konnte hingegen ein Unterschied festgestellt werden. Während die *cut7-22* Einzelmutante bei 32 °C nicht mehr in der Lage war, zu wachsen, zeigte die Doppelmutante bei dieser Temperatur noch ein sehr schwaches Kolonien-Wachstum. Ähnliche Beobachtungen wurden auch bei den Doppelmutanten mit anderen *cut7<sup>ts</sup>*-Allelen (*cut7-23*, *cut7-21*) gemacht, wobei die Temperaturen, bei denen eine Suppression festgestellt werden konnte, bei den einzelnen *cut7<sup>ts</sup>* Mutanten aufgrund verschiedener restriktiver Temperaturen unterschiedlich waren (Tab.5-12). Zusätzlich konnte bei den *spi1-25cut7.446* bzw. *spi1-25cut7-21* Doppelmutanten eine weitere Entdeckung gemacht werden. Während Zellen des *spi1-25* Mutantenstammes bei 24 °C ein stark verlangsamtes Wachstum zeigten, konnte im Vergleich dazu sowohl bei der *spi1-25cut7.446*, als auch bei der *spi1-25cut7-21* Doppelmutante ein sehr schwach bzw.

schwach verbessertes Wachstum im Vergleich zur *spi1-25* Einzelmutante entdeckt werden (Tab.5-12). Die gesamten Ergebnisse der seriellen Tropftests im Hinblick auf die unterschiedlichen *cut7<sup>ts</sup>*-Allele sind in Tab.5-12 zusammengefaßt. Auch die Stärke der einzelnen Suppressionen kann dieser entnommen werden.

<i>cut7<sup>ts</sup></i> -Allel	Restriktive Temperatur für die <i>cut7<sup>ts</sup></i> Mutante	Suppression der Temperatur-Sensitivität der <i>cut7<sup>ts</sup></i> Mutante durch <i>spi1-25</i>			Verbessertes <i>spi1-25</i> Wachstum durch <i>cut7<sup>ts</sup></i>			
		30 °C	32 °C	36 °C	24 °C	28 °C	30 °C	32 °C
<i>cut7.446</i>	30 °C	/	/	n.d.	+	/	/	/
<i>cut7-23</i>	32 °C	/	++	+	/	/	/	/
<i>cut7-21</i>	36 °C	/	/	++	++	++	++	++
<i>cut7-22</i>	32 °C	/	+	+	/	/	/	/

Tab.5-12: Zusammenfassung der allelspezifischen Ausprägungen der Suppression

Das Wachstum der einzelnen Doppelmутanten mit unterschiedlichen *cut7<sup>ts</sup>*-Allelen wurde mit dem der *cut7<sup>ts</sup>* bzw. *spi1-25* Einzelmutanten verglichen. Dabei sind die Temperaturen, bei denen entweder eine Komplementation der Temperatur-Sensitivität der *cut7<sup>ts</sup>* Mutante oder eine Suppression des verlangsamten Wachstums-Phänotyps der *spi1-25* Mutante beobachtet wurde, angegeben. Zusätzlich kann der Tabelle die Stärke der Suppression entnommen werden (++: schwach; +: sehr schwach; /: keine Suppression; n.d.: nicht durchgeführt).

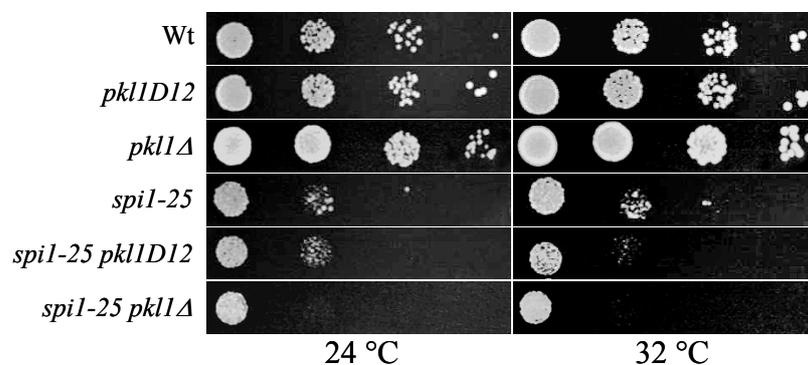
Dieses Experiment zeigt, daß sowohl ein defektes Cut7p-Protein in dem *spi1-25* Mutantenstamm, als auch eine funktionell beeinträchtigte SpRan GTPase in den *cut7<sup>ts</sup>* Mutantenstämmen den Zellen ein verbessertes Wachstum ermöglicht. Diese allelspezifischen Ausprägungen der Suppressionen weisen nicht nur auf eine genetische Interaktion zwischen diesen beiden Genen hin, sondern implizieren zusätzlich eine mögliche entgegengesetzte Funktion von Cut7p und SpRan im gleichen Prozeß.

### 5.2.1.2 Beeinflußt SpRan möglicherweise die Funktion von Minus-End-gerichteten Motorproteinen ?

Als antagonistische Kraft zu dem Plus-End-gerichteten Motorprotein Cut7p wirken die Minus-End-gerichteten Spindel-Kinesine Pkl1p und Klp2p, und ein Gleichgewicht zwischen diesen entgegengesetzten Kräften wird für den Aufbau und die Aufrechterhaltung der Bipolarität der mitotischen Spindel benötigt (Übersichtsartikel: Wittmann et al., 2001). Untersuchungen zur funktionellen Analyse der beiden Minus-End-gerichteten Motorproteine Pkl1p und Klp2p stellten heraus, daß auch eine Deletion des *pkl1<sup>+</sup>*-Gens bzw. des *klp2<sup>+</sup>*-Gens die Temperatur-Sensitivität unterschiedlicher *cut7<sup>ts</sup>* Mutantenstämme supprimieren kann und aus diesem Grunde war es von Interesse, ob zwischen *spi1<sup>+</sup>* und den zwei Genen, die für Minus-End-gerichtete Motorproteine kodieren, genetische Interaktionen bestehen (Pidoux et al., 1996; Troxell et al., 2001).

### 5.2.1.2.1 Besteht zwischen *spi1*<sup>+</sup> und *pkll*<sup>+</sup> eine genetische Interaktion ?

Für diesen Versuch wurden unterschiedliche Doppelmutanten mittels Kreuzung und anschließender Tetradenanalyse generiert, und zwar zum einen *spi1-25pkllD12*, zum anderen *spi1-25pkllΔ* Doppelmutanten (Kapitel 4.10). Während bei den letzteren der gesamte *pkll*<sup>+</sup>-ORF deletiert ist, sind bei dem *spi1-25pkllD12* Doppelmutantenstamm 50 % des *pkll*<sup>+</sup>-ORFs, einschließlich eines Teils der Motordomäne, disruptiert (Pidoux et al., 1996). Mit den jeweiligen Stämmen einer Tetrade wurden bei Temperaturen zwischen 24 °C und 36 °C serielle Tropftests durchgeführt. In Abb.5-11 sind die Tropftests der beiden unterschiedlichen Doppelmutanten bei 24 °C und 32 °C dargestellt.



**Abb.5-11: Genetische Interaktion zwischen *spi1*<sup>+</sup> und *pkll*<sup>+</sup>**

Der Tropftest zeigt das Wachstum des Wildtyps (Wt), der *spi1-25*, der *pkllD12* und *pkllΔ* Einzelmutanten sowie das der *spi1-25 pkllD12* und *spi1-25 pkllΔ* Doppelmutanten bei 24 °C und 32 °C auf Vollmediums-Platten (Inkubationsdauer: 5 Tage).

Während der Wildtypstamm und die *pkll* Einzelmutanten bei allen untersuchten Temperaturen (repräsentativ für alle Temperaturen: Wachstum bei 24 °C bzw. 32 °C, Abb.5-11) gleich gutes Wachstum zeigten, so konnte bei den beiden Doppelmutanten im Vergleich zur *spi1-25* Einzelmutante ein etwas schwächeres Wachstum festgestellt werden. Während bei der *spi1-25pkllD12* Doppelmutante ein Wachstumsdefekt erst bei einer Temperatur von 32 °C beobachtet werden konnte, zeigte die *spi1-25pkllΔ* Doppelmutante bereits bei 24 °C eine leichte Verschlechterung des Wachstums im Vergleich zur *spi1-25* Einzelmutante (Abb.5-11). Die Beobachtung eines additiven Effekts, und zwar eine Verschlechterung des Wachstums der Doppelmutanten, deutet darauf hin, daß die SpRan GTPase und das Pkl1p-Protein vermutlich in parallelen Reaktionskaskaden Einfluß auf den Aufbau einer bipolaren mitotischen Spindel nehmen.

### 5.2.1.2.2 Können *spi1-25* Phänotypen durch eine Überexpression von *pkll*<sup>+</sup> supprimiert werden ?

Aufgrund der Tatsache, daß die Abwesenheit des Pkl1p-Proteins in dem *spi1-25* Mutantenstamm zu einem schwächeren Wachstum im Vergleich zur Einzelmutante führt (Kapitel 5.2.1.2.1), wurde überprüft, ob die Überexpression von *pkll*<sup>+</sup> eine Suppression der *spi1-25* mutanten Phänotypen bewirken kann. Hierzu wurden die Plasmide pREP3X-*pkll*<sup>+</sup>, pREP81X-*pkll*<sup>+</sup> und eine Vektorkontrolle in den *spi1-25* Mutantenstamm transformiert und mit den entsprechenden Transformanten serielle Tropftests durchgeführt. Während den Literaturangaben zufolge die Expression des  $\beta$ -Galaktosidase-Gens im pREP3X zu einer Anreicherung um das 300-fache führt, beträgt die Kopienzahl bei pREP81X nur ca. das 7-fache (Maundrell, 1993; Moreno et al., 2000). Dabei sind dies nur Richtwerte, die bei der Expression anderer Gene durchaus von den oben genannten Werten abweichen können. Zunächst wurde untersucht, ob die TBZ-Sensitivität der *spi1-25* Mutante durch zusätzliche Pkl1p-Kopien komplementiert werden kann, wobei anzumerken ist, daß in Wildtyp-Zellen eine starke Überexpression von *pkll*<sup>+</sup> letal ist (Pidoux et al., 1996). Wie Abb.5-12 zu entnehmen ist, zeigten bereits *spi1-25* Zellen, die mit dem Plasmid pREP3X-*pkll*<sup>+</sup> transformiert waren, auf Thiamin-haltigen Platten ohne TBZ einen sehr starken Wachstumsdefekt, der darauf zurückzuführen ist, daß der *nmt1*<sup>+</sup>-Promotor trotz Thiamin-Zugabe nie vollkommen reprimiert werden kann. Auch bei schwacher Überexpression (pREP81X-*pkll*<sup>+</sup>) konnte bei *spi1-25* Zellen ein starker Wachstumsdefekt auf Platten ohne Thiamin beobachtet werden. Bei Betrachtung der TBZ-haltigen Platten zeigten *spi1-25*

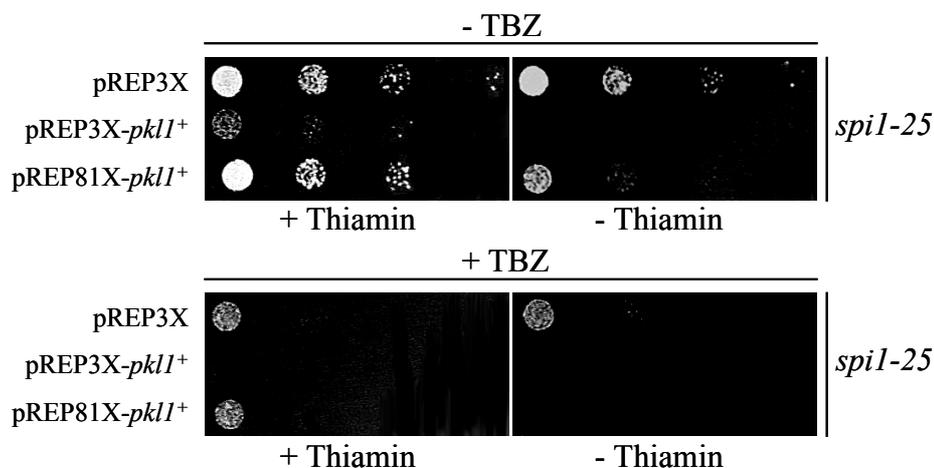


Abb.5-12: Überexpression von *pkll*<sup>+</sup> in *spi1-25* Zellen

Die abgebildeten seriellen Tropftests zeigen das Wachstum des *spi1-25* Mutantenstammes, der jeweils mit dem Vektor pREP3X, pREP3X-*pkll*<sup>+</sup> bzw. pREP81X-*pkll*<sup>+</sup> transformiert wurde, auf MM (-leu) mit und ohne Thiamin (5  $\mu$ g/ ml) bzw. ohne und mit TBZ (6,5 $\mu$ g/ ml) bei 24 °C (Inkubationsdauer: 6 Tage).

Zellen, die das Plasmid pREP3X-*pkll*<sup>+</sup> enthielten, ebenfalls kein Wachstum unabhängig von der Zugabe bzw. dem Weglassen von Thiamin im Medium. Während die Vektorkontrolle auf den TBZ-haltigen Platten sehr schwaches Wachstum aufwies, konnte auch bei schwacher Überexpression von *pkll*<sup>+</sup> (pREP81X-*pkll*<sup>+</sup>) -hervorgerufen durch die Abwesenheit von Thiamin- keine Suppression der TBZ-Sensitivität des *spi1-25* Mutantenstammes festgestellt werden, sondern bewirkte das Gegenteil. Diese schwache Überexpression führte zur Letalität bei *spi1-25* Zellen. In einem weiteren Experiment konnte gezeigt werden, daß auch die Temperatur-Sensitivität des *spi1-25* Mutantenstammes durch Überexpression von *pkll*<sup>+</sup> nicht supprimiert (Daten werden nicht gezeigt) und somit keiner der *spi1-25* Phänotypen durch zusätzliche Pkl1p-Kopien komplementiert werden konnte. Aufgrund der bisherigen Ergebnisse kann davon ausgegangen werden, daß SpRan und Pkl1p unabhängig voneinander agieren, aber dabei vermutlich eine Funktion in demselben Prozeß ausüben. Um nun zu überprüfen, ob möglicherweise SpRan und das andere Minus-End-gerichtete Motorprotein Klp2p, in Abhängigkeit voneinander, d.h. derselben Reaktionskaskade angehörend, den Aufbau der mitotischen Spindel beeinflussen, erfolgte eine Untersuchung auf genetische Interaktion zwischen diesen beiden Genen.

### 5.2.1.2.3 Interagieren die Gene *spi1*<sup>+</sup> und *klp2*<sup>+</sup> genetisch miteinander ?

Für diesen Versuch wurden *spi1-25klp2Δ* Doppelmutanten hergestellt und mit den entsprechenden Stämmen einer Tetrade serielle Tropftests bei Temperaturen von 24 °C bis 36 °C durchgeführt. In Abb.5-13 ist das Wachstum der Stämme bei 32 °C dargestellt, das jedoch repräsentativ für alle untersuchten Temperaturen ist. Während sowohl der Wildtypstamm als auch der *klp2Δ* Mutantenstamm gutes Wachstum bei allen Temperaturen

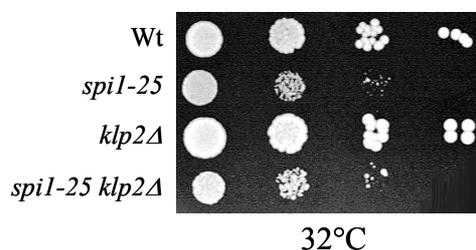


Abb.5-13: *spi1*<sup>+</sup> und *klp2*<sup>+</sup> zeigen keine genetische Interaktion

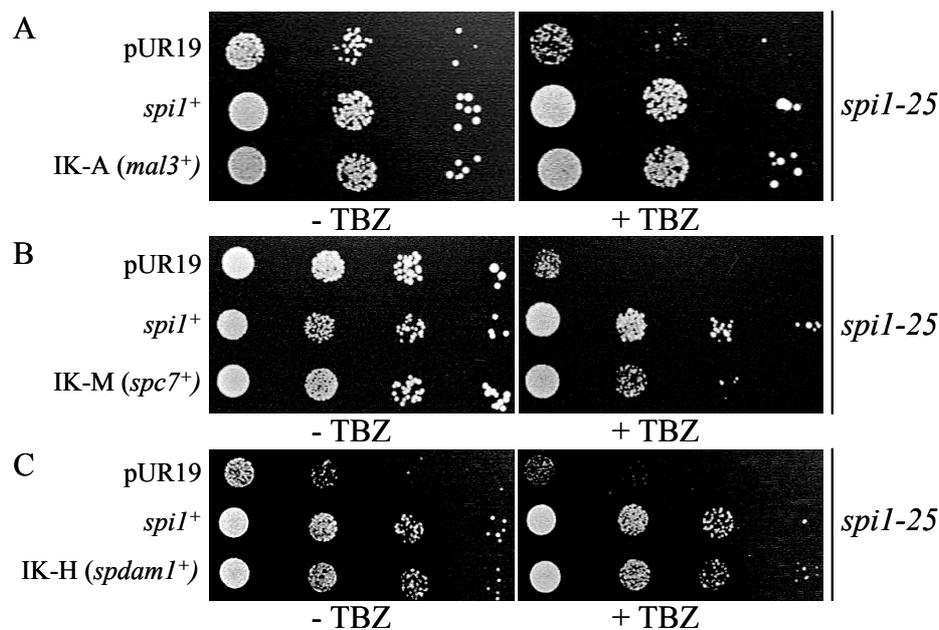
Der Tropftest zeigt das Wachstum des Wildtyps (Wt), der *spi1-25* und *klp2Δ* Einzelmutanten sowie das der *spi1-25 klp2Δ* Doppelmutante bei 32 °C auf einer Vollmediums-Platte (Inkubationsdauer: 5 Tage).

aufwiesen, zeigte die *spi1-25klp2Δ* Doppelmutante schwächeres Wachstum, das jedoch bei allen Temperaturen identisch zu dem der *spi1-25* Einzelmutante war. Die Tatsache, daß die Doppelmutante ein identisches Wachstum im Vergleich zu der *spi1-25* Einzelmutante aufwies und kein additiver Effekt festgestellt werden konnte, führt zu der Vermutung, daß die SpRan GTPase und Klp2p derselben Reaktionskaskade angehören und in Abhängigkeit voneinander den Aufbau der bipolaren mitotischen Spindel steuern.

## 5.2.2 Analyse der extragenen *spi1-25* Multikopie-Suppressoren

Ich habe im Rahmen meiner Diplomarbeit Genbank-Plasmide als extragene *spi1-25* Multikopie-Suppressoren isoliert, deren Expression eine Komplementation der TBZ-Hypersensitivität des *spi1-25* Mutantenstammes bewirkten (Karig, 2000) (Kapitel 4.12.2). Abgesehen von den Genbank-Plasmiden, die das Wildtyp-Gen *spi1*<sup>+</sup> enthielten, wurden drei weitere identifiziert, die in der Lage waren, den *spi1-25* Phänotyp zu supprimieren. Die entsprechenden seriellen Tropftests sind in Abb.5-14 dargestellt, die das Wachstum des *spi1-25* Mutantenstammes nach Transformation mit der Vektorkontrolle pUR19, der Positiv-Kontrolle pUR19-*spi1*<sup>+</sup> und den 3 Genbank-Plasmiden IK-A (Abb.5-14 A), IK-M (Abb.5-14 B) und IK-H (Abb.5-14 C) auf Platten ohne und mit TBZ zeigen.

In den folgenden Kapiteln wird dabei näher auf die drei extragenen *spi1-25* Multikopie-Suppressoren und deren Funktionen im mitotischen Prozeß eingegangen.



**Abb.5-14: Komplementation der TBZ-Hypersensitivität des *spi1-25* Mutantenstammes**  
 Den seriellen Tropftests ist das Wachstum des *spi1-25* Mutantenstammes zu entnehmen, der jeweils mit dem Vektor pUR19, pUR19-*spi1*<sup>+</sup> bzw. IK-A (A), IK-M (B) und IK-H (C) transformiert wurde, auf MM (-ura) ohne und mit TBZ ((A): 7 µg/ ml; (B): 5,5 µg/ ml; (C): 7 µg/ ml) bei 24 °C (Inkubationsdauer: (A): 6 Tage (-TBZ) bzw. 8 Tage (+TBZ); (B): 6 Tage; (C): 5 Tage). In (A) werden nur drei Zell-Verdünnungsreihen (10<sup>4</sup>, 10<sup>3</sup>, 10<sup>2</sup>) gezeigt.

### 5.2.2.1 IK-A enthält das *mal3*<sup>+</sup>-Gen, das für ein Mikrotubuli-assoziiertes Protein kodiert

Noch während meiner Diplomarbeit stellte sich bei der Ansequenzierung des genomischen DNA-Inserts heraus, daß das Suppressor-Plasmid IK-A den genomischen *mal3*<sup>+</sup>-ORF enthält. Bei dem Mal3p-Protein handelt es sich um ein evolutionär konserviertes Protein der sogenannten EB1-Familie, das sowohl entlang der gesamten mitotischen Spindel als auch auf zytoplasmatischen Mikrotubuli lokalisiert ist (Beinhauer et al., 1997). Durch seine präferentielle Lokalisierung an Mikrotubuli-Plus-Enden wird diesem unter anderem eine Funktion bei der Regulation der Mikrotubuli-Dynamik an den Kinetochoren zugeschrieben (Kerres et al., 2004). Aufgrund der Tatsache, daß die zusätzliche Expression von *mal3*<sup>+</sup> die TBZ-Hypersensitivität sowie partiell die Temperatur-Sensitivität des *spil-25* Mutantenstammes komplementieren kann (Daten werden nicht gezeigt), wurde überprüft, ob die Lokalisierung von Mal3p in diesem Mutantenstamm möglicherweise verändert ist. Für das entsprechende Experiment wurde ein *spil-25* Mutantenstamm, in dem an den *mal3*<sup>+</sup>-ORF ein Pk1-EGFP-Epitop fusioniert ist, verwendet. Nach Inkubation bei der permissiven bzw. für 6 h bei der restriktiven Temperatur (36 °C) wurde mittels Immunofluoreszenz-Mikroskopie die Mal3p-Lokalisierung in diesem untersucht (Kapitel 4.19). Dabei konnte beobachtet werden, daß sowohl bei der permissiven als auch bei der restriktiven Temperatur Mal3p in dem *spil-25* Mutantenstamm wie in Wildtyp-Zellen entlang der Spindel-Mikrotubuli lokalisiert war, jedoch die starke Anreicherung an den Mikrotubuli-Plus-Enden zum Teil verringert war bzw. fehlte (Daten werden nicht gezeigt). Das deutet darauf hin, daß in Zellen des *spil-25* Mutantenstammes die präferentielle Lokalisierung von Mal3p an den Mikrotubuli-Plus-Enden beeinträchtigt ist und dies unter anderem für die Ausprägung der *spil-25* Phänotypen verantwortlich sein könnte.

### 5.2.2.2 Das DNA-Insert in IK-M kodiert für das Kinetochorprotein Spc7p in *S. pombe*

Die Sequenzanalyse des genomischen DNA-Inserts des Genbank-Plasmids IK-M identifizierte den ORF SPCC1020.02 auf Chromosom III der Spalthefe. Dabei befinden sich auf dem 2221 Bp langen genomischen DNA-Fragment 2027 Bp des insgesamt 4095 Bp großen SPCC1020.02-ORFs und dies entspricht einem prozentualen Anteil von 49 % der ORF-Gesamtlänge. Wie der Abb.5-15 zu entnehmen ist, handelt es sich hierbei ausschließlich um den C-terminalen Teil des SPCC1020.02-ORFs.

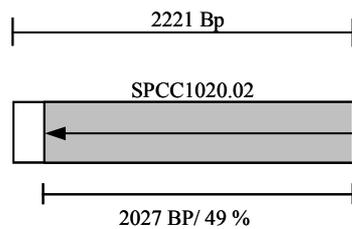


Abb.5-15: Schematische Darstellung des genomischen DNA-Inserts des Suppressor-Plasmids IK-M

Das 2221 Bp lange DNA-Insert enthält 49 % des 4095 Bp großen SPCC1020.02-ORFs (grau-schattierter Bereich). Der Pfeil weist in Transkriptionsrichtung.

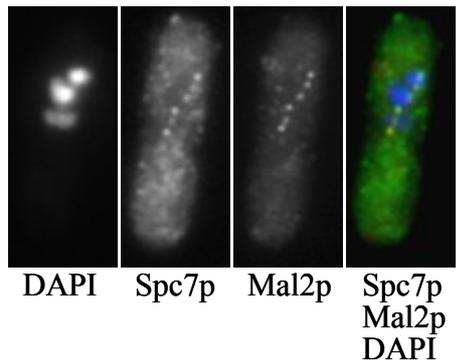


Abb.5-16: Spc7p kolokalisiert mit dem inneren Kinetochorprotein Mal2p

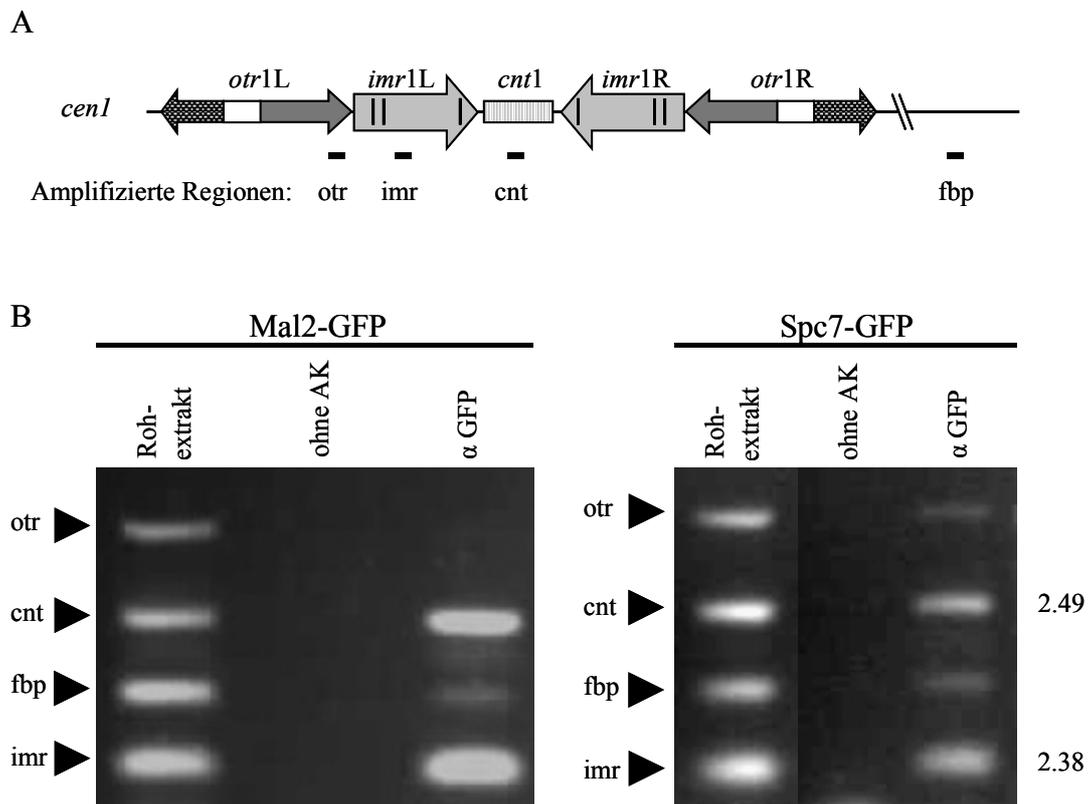
Abbildung entnommen aus Kerres et al., 2004. Die Abbildung zeigt die Einzelbilder und ein Kompositionsbild einer in der Metaphase des Zellzyklus arretierten *S. pombe* Zelle. Von links nach rechts: Chromatin-Färbung mittels DAPI, Immunofluoreszenz von Spc7p-HA und Mal2p-GFP, überlagerte Aufnahmen von Spc7p-HA, Mal2p-GFP und Chromatin. Farbgebung: blau = Chromatin, grün = Spc7p-HA-Signal, rot = Mal2p-GFP-Signal, gelb = Überschneidung der Signale der Fusionsproteine. Längenmaß (schwarzer Balken): 5 µm.

Zum Zeitpunkt der Isolation dieses ORFs war dieser bisher uncharakterisiert und kodierte für ein hypothetisches Protein. Kurze Zeit später, zu Beginn dieser Arbeit wurde der SPCC1020.02-ORF als Suppressor der TBZ-Hypersensitivität des *mal3-1* Mutantenstammes von Dr. Corina Vietmeier-Decker identifiziert und in *spc7<sup>+</sup>* umbenannt. Bei der näheren Charakterisierung des Spc7p-Proteins durch Dr. Corina Vietmeier-Decker wurde unter anderem die Lokalisierung von diesem untersucht. Dabei konnte mittels Immunofluoreszenz-Mikroskopie eine für Kinetochorproteine charakteristische Lokalisierung festgestellt werden (Kerres et al., 2004). Für die Vermutung, daß es sich bei dem Spc7p-Protein um ein Kinetochorprotein handeln könnte, wurde durch einen weiteren Versuch, in dem eine Kolokalisierung von Spc7p mit dem Zentromerprotein Mal2p nachgewiesen werden konnte, der Beweis erbracht (Abb.5-16) (Jin et al., 2002). Aufgrund der Tatsache, daß das *S. pombe* Zentromer aus unterschiedlichen Regionen aufgebaut ist, und Kinetochorproteine darin zu unterscheiden sind, an welchen dieser Bereiche diese binden, war es von Interesse, mit welchem das Spc7p-Protein assoziiert.

### 5.2.2.2.1 Mit welcher Zentromer-Region ist Spc7p assoziiert ?

Die Zentromer-DNA von *S. pombe* erstreckt sich je nach Chromosom über 40-110 Kbp und besteht aus der zentralen Region, der *cnt*-Region, die von den sogenannten inneren „Repeats“, der *imr*-Region, und den äußeren „Repeats“, der *otr*-Region, umgeben ist (Abb.5-17 A). Dabei werden die Regionen, *cnt* und *imr*, als innere und die *otr* als äußere Zentromer-Region bezeichnet (Partridge et al., 2000). Meine Aufgabe war es nun, mittels Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) die Zentromer-Region zu identifizieren, mit der Spc7p assoziiert ist. Hierfür wurde an Stämmen, in denen entweder als Kontrolle Mal2p-GFP oder Spc7p-GFP exprimiert wurde, die ChIP-Analyse unter Verwendung von Anti-GFP-Antikörpern

durchgeführt und im Anschluß jeweils ein Aliquot der DNA des Rohextraktes und der Immunpräzipitate in eine Multiplex-PCR eingesetzt (Kapitel 4.21). Hierfür wurden 4 Oligonukleotid-Paare für die Amplifizierung sowohl der *cnt*-, der *imr*- und der *otr*-Regionen des Zentromers von Chromosom I als auch eines euchromatischen Kontroll-Bereiches, der *fbp*-Region, verwendet (Abb.5-17 A).



**Abb.5-17: Spc7p ist mit der inneren Zentromer-Region assoziiert**

Zellen, in denen Spc7p-GFP oder Mal2p-GFP exprimiert wird, wurden fixiert und mit Anti-GFP-Antikörper ChIP-Analyse durchgeführt. Das Chromatin in den Immunpräzipitaten bzw. Rohextrakten wurde mittels „Multiplex“-PCR analysiert. Dafür wurden Oligonukleotide benutzt, die verschiedene Regionen des Zentromer I (*cen1*) amplifizieren: *cnt*, *imr*, *otr* und als Negativ-Kontrolle für eine euchromatische Region *fbp*. Eine Anreicherung der *cnt*- und *imr*-Sequenzen wurde in den ChIP-Proben des Mal2p-GFP und Spc7p-GFP-Fusionsproteins beobachtet. Der Anreicherungsfaktor für Spc7p-GFP ist angegeben. Die Anzucht der Kulturen erfolgte bei 30 °C Ü/N und im Anschluß daran wurden diese für 2 h bei 18 °C inkubiert, bevor die ChIP-Analyse durchgeführt wurde (Bezeichnung: keine Zugabe eines Antikörpers (ohne AK), Zugabe von Antikörper (α GFP)).

Wie in Abb.5-17 B zu beobachten ist, konnten bei der Positiv-Kontrolle, den Rohextrakt-Proben, alle 4 Regionen amplifiziert werden, während bei der Negativ-Kontrolle, den Proben, denen kein Anti-GFP-Antikörper zugegeben wurde, keine Amplifizierung stattfand. Wie bereits für das Mal2p-Protein beschrieben wurde, assoziiert dieses mit der inneren Zentromer-Region (Jin et al., 2002). Somit konnte eine Anreicherung von *cnt*- und *imr*-Sequenzen in dem ChIP-Ansatz festgestellt werden, in dem durch Zugabe des Anti-GFP-Antikörpers spezifisch

das Mal2p-GFP präzipitiert wurde. Auch nach Präzipitation des Spc7p-GFP-Fusionsproteins wurden ebenfalls die *cnt*- und *imr*-Sequenzen in dem ChIP-Ansatz angereichert. Dabei konnte eine Anreicherung der DNA-Sequenzen um das ca. 2,5 bzw. 2,4-fache, relativ zur *fbp*-DNA in Spc7p-GFP ChIP-Ansätzen und Vergleich dieser mit der Rohextrakt-Kontrolle festgestellt werden. Eine Anreicherung der *otr*-Sequenz konnte nicht entdeckt werden. Mit diesen Daten konnte eine Bindung des Spc7p-GFP-Fusionsproteins an die innere Zentromer-Region nachgewiesen werden.

#### **5.2.2.2.2 Ist das Spc7p-Protein in dem *spi1-25* Mutantenstamm noch am Zentromer lokalisiert ?**

Aufgrund der Tatsache, daß zusätzliche Kopien von *spc7<sup>+</sup>* die TBZ-Hypersensitivität und partiell auch die Temperatur-Sensitivität des *spi1-25* Mutantenstammes supprimieren können, war es naheliegend zu überprüfen, ob Spc7p in dem Mutantenstamm noch Zentromer-Lokalisierung zeigt. Der Nachweis hierfür konnte entweder durch Immunfluoreszenz-Mikroskopie oder ChIP-Analyse erfolgen. Da es bereits problematisch war, bei der in Kapitel 5.2.2.2.1 beschriebenen ChIP-Analyse Spc7p-GFP zu präzipitieren, und ein Anreicherungs-faktor von nur ca. 2,5 bei den entsprechenden Sequenzen erzielt werden konnte, wurde die Grenze der Detektion für dieses Protein bereits in einem Wildtypstamm erreicht. Im Falle einer verminderten Spc7p-Lokalisierung am Zentromer wäre es schwierig zu unterscheiden, ob es sich bei dem Ergebnis um ein methodisches Problem oder tatsächlich um eine Verringerung handelt. Somit war es sinnvoller, die Lokalisierung von Spc7p in der *spi1-25* Mutante mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie zu überprüfen. In diesem Versuch wurde ein *spi1-25* Mutantenstamm, in dem an den *spc7<sup>+</sup>*-ORF ein GFP-Epitop fusioniert ist, bei der permissiven bzw. für 6 h bei der restriktiven Temperatur inkubiert und mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie analysiert. In beiden *spi1-25*-Kulturen zeigte Spc7p-GFP zwar Zentromer-Assoziation, aber in der Kultur, die bei der restriktiven Temperatur angezogen wurde, erschien das Signal am Zentromer zum Teil schwächer (Daten werden nicht gezeigt). Ein Grund für diese Beobachtung, könnte eine veränderter Aufbau des Kinetochor-Komplexes in dem *spi1-25* Mutantenstamm sein, der dazu führt, daß Spc7p-GFP schlechter zugänglich für den Anti-GFP-Antikörper war. Obwohl es ratsam wäre, dieses Experiment in zukünftiger Arbeit ein weiteres Mal zu wiederholen, um ein methodisches Problem auszuschließen, kann davon ausgegangen werden, daß in Zellen des *spi1-25* Mutantenstammes die Zentromer-Lokalisierung von Spc7p vermindert ist.

### 5.2.2.3 Der SPAC589.08c-ORF auf IK-H kodiert für ein Protein mit Homologie zum Mikrotubuli-assoziierten *S. cerevisiae* Protein Dam1p

Nach Ansequenzierung des dritten und letzten genomischen DNA-Inserts, dem des Suppressor-Plasmids IK-H, wurde eine 100%ige Übereinstimmung mit einem 1661 Bp großen Sequenzbereich auf Chromosom I von *S. pombe* gefunden, der nach Angaben der Datenbank die putativen ORFs SPAC589.08c und SPAC589.09 umfaßt (Abb.5-18). Der ORF SPAC589.09 ist mit 1167 Bp vollständig auf dem DNA-Insert vorhanden und kodiert nach

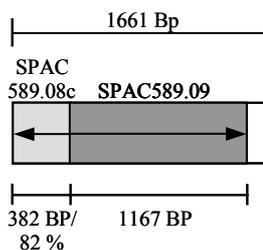


Abb.5-18: Schematische Darstellung des genomischen DNA-Inserts des Suppressor-Plasmids IK-H

Das 1661 Bp lange DNA-Insert enthält den gesamten SPAC589.09-ORF (Gesamtgröße: 1167 Bp; dunkelgrauer Bereich) und 82 % des 468 Bp großen SPAC589.08c-ORFs (hellgrauer Bereich). Der Pfeil weist in Transkriptionsrichtung des jeweiligen ORFs.

Datenbankangaben (Sanger Center, Hinxton) für ein 45,3 kDa großes Protein. Dieses Protein, das eine konservierte Lipidbindedomäne, die CRAL/TRIO-Domäne, besitzt, weist Ähnlichkeit zu dem *S. cerevisiae* Protein Csr1p auf, welches eine Rolle beim Phosphatidylinositol-Metabolismus spielt (Li et al., 2000; Regnacq et al., 2002).

Von dem zweiten ORF, SPAC589.08c, dessen Startcodon mit dem des SPAC589.09 überlappt, sind hingegen nur 382 Bp von insgesamt 468 Bp enthalten, was einem prozentualen Anteil von 82 % der ORF-Gesamtlänge entspricht. Dem Eintrag in der *S. pombe* Datenbank zufolge kodiert dieser für die ersten 127 Aminosäuren eines 17,4 kDa großen Proteins, das Ähnlichkeit zu dem Mikrotubuli-assoziierten Dam1p-Proteins in *S. cerevisiae*

aufweist. Dam1p wurde zuallererst als ein mitotisches Spindelprotein identifiziert, das für die Aufrechterhaltung der Spindel-Integrität benötigt wird (Hofmann et al., 1998; Cheeseman et al., 2001). In darauffolgenden Studien konnte weiterhin gezeigt werden, daß Dam1p als Komponente eines Multiproteinkomplexes des Kinetochors an der Regulation und Ausbildung von bipolaren Kinetochor-Mikrotubuli-Verknüpfungen während der Mitose beteiligt ist (Enquist-Newman et al., 2001; Kang et al., 2001; Li et al., 2002; Cheeseman et al., 2002; Shang et al., 2003).

Die Frage, die sich stellte, war, welcher dieser zwei ORFs für die Suppression der TBZ-Sensitivität des *spil-25* Mutantenstammes verantwortlich ist. Da in diesem Multikopie-Suppressorscreen bereits zwei Proteine identifiziert wurden, die eine Funktion bei der Kinetochor-Mikrotubuli-Verknüpfung besitzen (Kapitel 5.2.2.1 bzw. 5.2.2.2), war es naheliegend, daß der uncharakterisierte SPAC589.08c-ORF, der für ein Protein mit Ähnlichkeit zum Dam1p-Protein in *S. cerevisiae* kodiert, die Komplementation bewirkt.

### 5.2.2.3.1 Der SPAC589.08c-ORF ist für die Suppression der TBZ-Hypersensitivität des *spi1-25* Mutantenstammes verantwortlich

Um die Vermutung zu erhärten, daß die Suppression der TBZ-Hypersensitivität des *spi1-25* Mutantenstammes auf die Expression des SPAC589.08c-ORF zurückzuführen ist, wurden 780 Bp des C-Terminus des SPAC589.09-ORFs auf dem Genbank-Plasmid IK-H durch Restriktion mit *BclI*/*HindIII* entfernt (Abb.5-19 A). Somit enthält das generierte Plasmid IK-Hs die 82 % des SPAC589.08c und die restlichen 382 Bp des N-Terminus von SPAC589.09 (Abb.5-19 A). Im Anschluß wurde die Vektorkontrolle pUR19, als Positiv-Kontrolle pUR19-*spi1*<sup>+</sup> und die Plasmide IK-H sowie IK-Hs in den *spi1-25* Mutantenstamm transformiert. In Abb.5-19 B sind die seriellen Tropftests dargestellt. Wie dieser zu entnehmen ist, zeigten die *spi1-25* Zellen, die mit dem Plasmid IK-Hs transformiert waren und in denen die verkürzte Version des genomischen DNA-Insert exprimiert wurde, gleich gute Suppression der TBZ-Hypersensitivität im Vergleich zum Original-Plasmid IK-H.

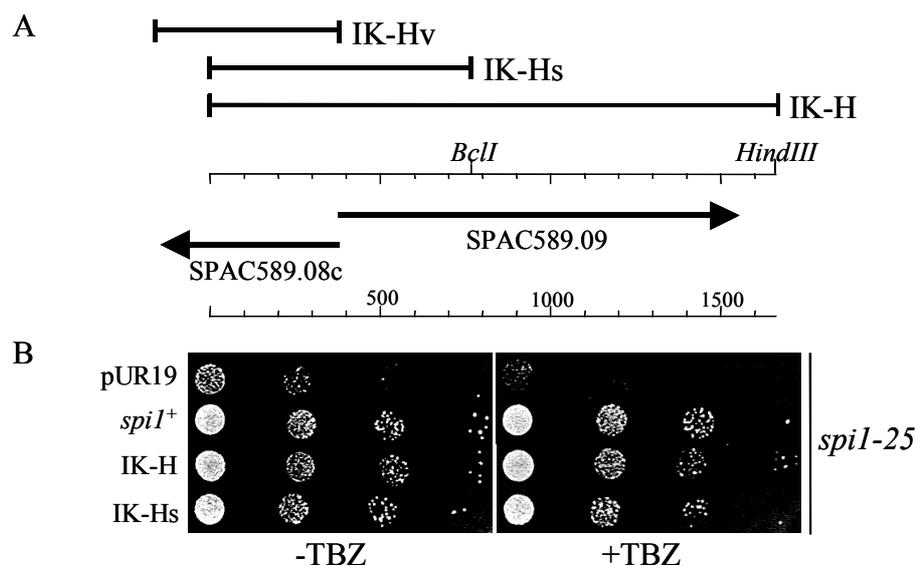


Abb.5-19: Die Expression des verkürzten genomischen DNA-Inserts des Genbank-Plasmids IK-H supprimiert die TBZ-Sensitivität von *spi1-25* Zellen

In (A) ist das genomische DNA-Insert von IK-H mit den Schnittstellen der Restriktionsendonukleasen *BclI* und *HindIII* schematisch dargestellt. Mittels Restriktion wurden 780 Bp (ca. 67 %) des SPAC589.09-ORFs aus IK-H deletiert und das Konstrukt IK-Hs genannt. Zusätzlich ist das 468 Bp große Vollängen-Konstrukt IK-Hv abgebildet, das die 82 Bp des C-Terminus des SPAC589.08c-ORFs enthält. (B) Die seriellen Tropftests zeigen das Wachstum des *spi1-25* Mutantenstammes, der jeweils mit dem Vektor pUR19, pUR19-*spi1*<sup>+</sup>, IK-H und IK-Hs transformiert wurde, auf MM (-ura) ohne und mit TBZ (7 µg/ml) bei 24 °C (Inkubationsdauer: 5 Tage).

Das bedeutet, daß die Deletion von ca. 67% des SPAC589.09-ORFs zu keiner Beeinträchtigung der Suppression führt und die Komplementation vermutlich auf den SPAC589.08c zurückzuführen ist.

Zum abschließenden Beweis wurde der vollständige 468 Bp große SPAC589.08c-ORF in einer PCR-Reaktion amplifiziert, in unterschiedlichen Expressionsvektoren kloniert und IK-Hv genannt (Abb.5-19 A) (Kapitel 4.9). Nach Transformation des *spil-25* Mutantenstammes mit den entsprechenden Kontrollvektoren bzw. generierten Plasmiden wurde erneut überprüft, ob das Vollängen-Konstrukt tatsächlich die TBZ-Sensitivität der Mutante komplementieren kann. In Abb.5-20 wird das Wachstum der *spil-25* Zellen gezeigt, die mit dem mittelstarken Expressionsvektor pJR41X bzw. IK-Hv transformiert waren.

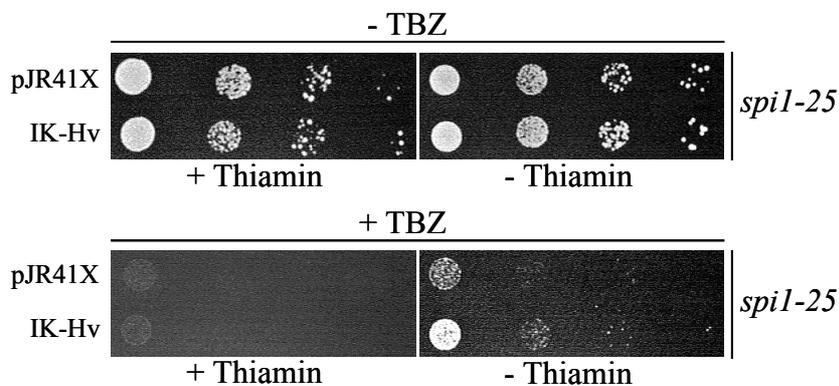


Abb.5-20: Moderate Expression des Vollängen-Konstrukts supprimiert die TBZ-Sensitivität des *spil-25* Mutantenstammes

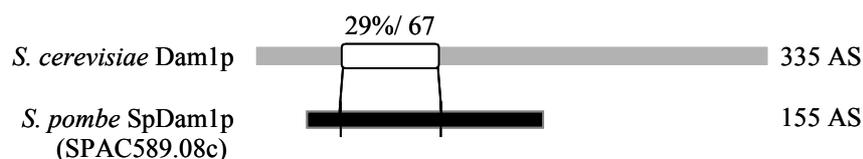
Der Tropfstest zeigt das Wachstum des *spil-25* Mutantenstammes, der jeweils mit dem Vektor pJR41X bzw. IK-Hv transformiert wurde, auf MM (-ura) mit und ohne Thiamin (5 µg/ ml) bzw. ohne und mit TBZ (6,5µg/ ml) bei 24 °C (Inkubationsdauer: 6 Tage).

Der Literatur zufolge führt die Induktion des *nmt1*<sup>+</sup>-Promotors in pJR41X zu einer 25-fach erhöhten Transkriptions-Frequenz, wobei anzumerken ist, daß es sich um einen Richtwert handelt (Kapitel 5.2.1.2.2) (Maundrell, 1993; Moreno et al., 2000). Auf Platten ohne TBZ konnte bei allen Transformanten gleich gutes Wachstum festgestellt werden, während auf TBZ-haltigen Platten in Anwesenheit von Thiamin, welches zu einer Reprimierung des *nmt1*<sup>+</sup>-Promotors führt, kaum ein Wachstum zu beobachten war. Nach moderater Expression des Vollängen-Konstrukts, d.h. auf Platten ohne Thiamin, zeigten die entsprechenden *spil-25* Transformanten im Vergleich zur Vektorkontrolle wieder ein leicht verbessertes Kolonien-Wachstum. Gleiches konnte bei starker Expression festgestellt werden, während eine schwache Expression für eine Komplementation nicht ausreichend war (Daten werden nicht gezeigt). Das bedeutet, die Komplementation der TBZ-Hypersensitivität des *spil-25*

Mutantenstammes durch das Genbank-Plasmid IK-H ist -wie bereits vermutet- auf die Expression des SPAC589.08c-ORFs zurückzuführen. Dabei konnte beobachtet werden, daß die Expression des verkürzten SPAC589.08c-ORFs im Vergleich zu der des Vollängen-Konstrukts eine bessere Suppression der TBZ-Sensitivität bewirkte.

### 5.2.2.3.2 Nähere Charakterisierung des SPAC589.08c-Genproduktes SpDam1p

Aufgrundessen, daß der SPAC589.08c-ORF den *S. pombe* Datenbankangaben (Sanger Center, Hinxtion) zufolge Ähnlichkeit zu dem Dam1p-Protein aus *S. cerevisiae* zeigen sollte (Kapitel 5.2.2.3), wurde zunächst überprüft, inwieweit die Aminosäuresequenzen der beiden Proteine Homologiebereiche zueinander aufweisen. Dabei stellte sich bei der Homologiesuche in der NCBI Protein-Datenbank heraus, daß die Sequenz des SPAC589.08c-Genproduktes über eine Länge von 67 Aminosäuren zu 29 % mit der Proteinsequenz des *S. cerevisiae* Proteins Dam1p identisch ist (Altschul et al., 1997). Der schematischen Darstellung in Abb.5-21 ist zu entnehmen, daß der Homologiebereich des *S. pombe* Proteins zu Dam1p in *S. cerevisiae* auf die N-terminalen Bereiche der Proteine beschränkt ist. Werden sich ähnelnde Aminosäuren mit in den Proteinsequenzvergleich einbezogen, so sind sich das SPAC589.08c-Genprodukt und Dam1p nach Datenbankangaben zu 47,8 % in diesem entsprechenden Homologiebereich ähnlich. Aufgrundessen, daß das *S. pombe* Protein und Dam1p aus *S. cerevisiae* Homologie zueinander aufweisen und Daten, die im Anschluß beschrieben werden, auf weitere Ähnlichkeiten beider Proteine hindeuten, wurde das SPAC589.08c-Genprodukt SpDam1p („*S. pombe* Dam1“) genannt.

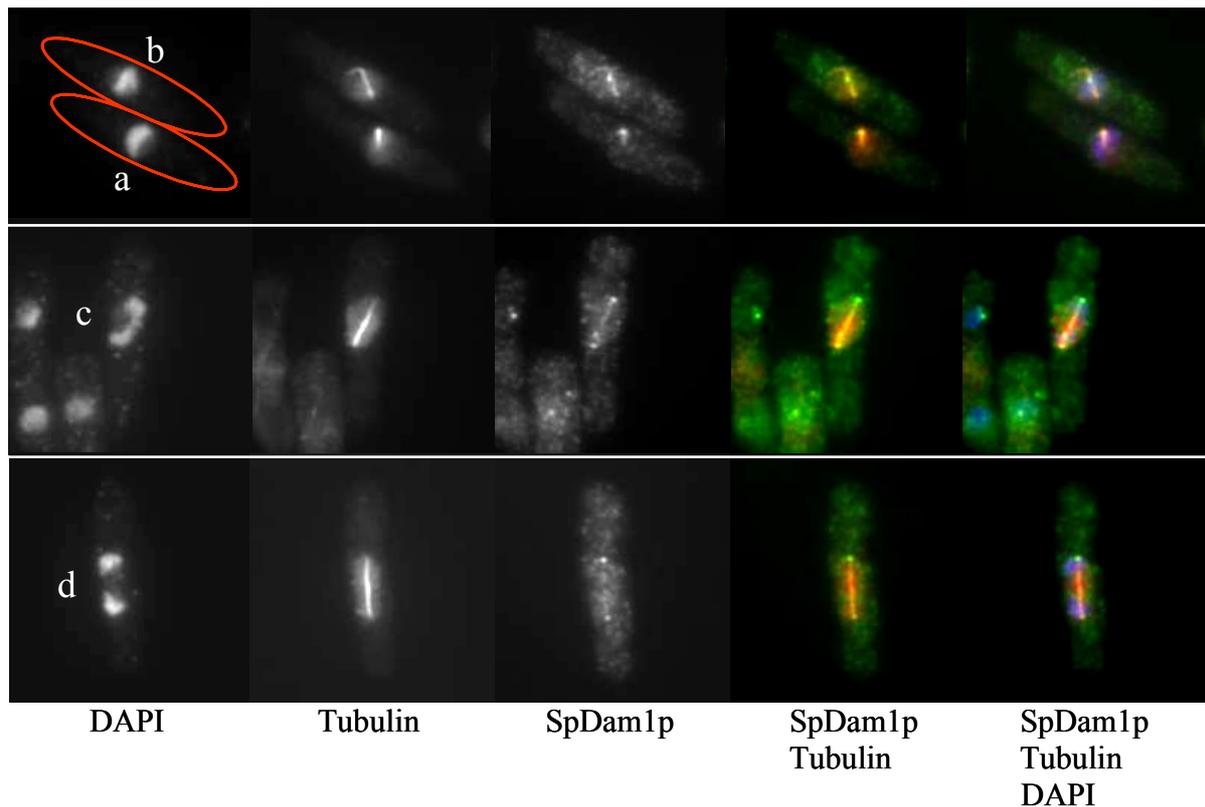


**Abb.5-21: SpDam1p weist Homologie zu Dam1p in *S. cerevisiae* auf**  
Schematische Darstellung der Homologiebereiche von SpDam1p (Gesamtlänge: 155 Aminosäuren) in *S. pombe* und Dam1p (Gesamtlänge: 335 Aminosäuren) in *S.cerevisiae*. Die Homologie bezieht sich auf einen Bereich von 67 Aminosäuren bei SpDam1p (Nr. 22-88) bzw. 64 Aminosäuren bei Dam1p (Nr. 55-118) und weist eine Identität von 29 % bzw. Ähnlichkeit von 47,8 % auf.

#### 5.2.2.3.2.1 SpDam1p zeigt Assoziation mit der mitotischen Spindel

Für eine nähere Charakterisierung des SpDam1p-Proteins war es unerlässlich, die Lokalisierung dieses Proteins zu untersuchen. Hierfür wurde in einem Wildtypstamm an den endogenen *spdaml*<sup>+</sup>-ORF ein GFP-Epitop fusioniert (Kapitel 4.15). Nach Anzucht des resultierenden Stammes wurde in diesem mittels Immunofluoreszenz das Mikrotubuli-

Zytoskelett sowie das SpDam1p-Protein angefärbt und zusätzlich das Chromatin durch DAPI-Behandlung sichtbar gemacht (Kapitel 4.19). Die entsprechenden Mikroskopie-Aufnahmen in Abb.5-22 zeigen Wildtypzellen, die sich in unterschiedlichen mitotischen Phasen befanden. Dabei konnte beobachtet werden, daß bereits zu Anfang der Mitose, der Prophase, in der der Aufbau der mitotischen Spindel erfolgt, SpDam1p bereits entlang dieser lokalisiert war (Abb.5-22, (a): Prophasen-Zelle). Die Assoziation mit der mitotischen Spindel blieb während



**Abb.5-22: SpDam1p zeigt Assoziation mit der mitotischen Spindel**

Die Abbildung zeigt Einzelbilder und jeweils zwei Kompositionsbilder unterschiedlicher mitotischer *S. pombe* Zellen (Zelle a: Prophasen-Zelle, Zelle b: Metaphasen-Zelle; Zelle c: frühe Anaphasen B-Zelle; Zelle d: Anaphasen B-Zelle). Von links nach rechts: Chromatin-Färbung mittels DAPI, Immunofluoreszenz von Tubulin und SpDam1p-GFP, überlagerte Aufnahmen von SpDam1p-GFP und Tubulin bzw. SpDam1p-GFP, Tubulin und Chromatin. Farbgebung: blau = Chromatin, grün= SpDam1p-GFP-Signal, rot = Tubulin, gelb = Überschneidung der Signale von Tubulin und SpDam1p-GFP. Längenmaß (schwarzer Balken): 5 µm.

der folgenden mitotischen Phasen ((b): Metaphasen-Zelle; (c): frühe Anaphasen B-Zelle; (d): Anaphasen B-Zelle) bestehen und erst in der späten Anaphase B, in der die separierte chromosomale DNA die Pole der Zelle erreicht hatte, war das SpDam1p-Signal in der Mitte der mitotischen Spindel zu beobachten, was vermutlich auf den Abbau der Spindel zurückzuführen war (entsprechende Mikroskopie-Aufnahme wird nicht gezeigt). Zusätzlich konnte ein starkes SpDam1p-Signal jeweils an den Enden der mitotischen Spindel entdeckt werden (Abb.5-22, (a)-(d)), wobei Signale dieser Art charakteristisch für Proteine sind, die mit den SPKs und/ oder Zentromeren assoziieren. Da für das Dam1p-Protein in *S. cerevisiae*

neben der Lokalisierung entlang der mitotischen Spindel auch die Assoziation mit den SPKs und den Zentromeren nachgewiesen wurde, ist es möglich, daß SpDam1p ebenfalls dort lokalisiert ist (Cheeseman et al., 2001; Kang et al., 2001). Dabei war ein Hinweis auf eine mögliche Kinetochor-Lokalisierung von SpDam1p anhand der AnaphasenB-Zelle in Teilbild (c) der Abb.5-22 zu finden. Bei Beobachtung der SpDam1p Einzelfärbung fiel auf, daß neben den beiden intensiven SpDam1p-Signalen an den Enden der mitotischen Spindel ein weiteres starkes Signal auf der mitotischen Spindel zu finden war. Da es in Organismen nur zwei SPKs gibt, konnte das dritte Signal kein weiterer SPK sein, sondern vermutlich ein nachgezogenes Zentromer. Obwohl diese Ergebnisse der Immunfluoreszenz-Mikroskopie nicht dazu ausreichen, eine definitive Aussage über eine SPK und/oder Kinetochor-Lokalisierung von SpDam1p zu machen, konnte eindeutig eine Assoziation von SpDam1p mit der mitotischen Spindel nachgewiesen werden.

5.2.2.3.2.2 Überexpression von *spdaml*<sup>+</sup> bewirkt einen Wachstumsdefekt bei Wildtyp-Zellen  
Um zu überprüfen, ob eine Überexpression von *spdaml*<sup>+</sup> einen Effekt auf das Wachstum von *S. pombe* Zellen hat, wurde in einen Wildtypstamm der Überexpressionvektor pREP3X bzw. pREP3X-*spdaml*<sup>+</sup> (IK-Hv) transformiert und mit den entsprechenden Transformanten serielle Tropftests durchgeführt (Kapitel 5.2.2.3.1). Auf Platten ohne TBZ zeigten alle Transformanten bei Reprimierung des *nmt1*<sup>+</sup>-Promotors gutes Wachstum, während bei Überexpression von *spdaml*<sup>+</sup> -im Vergleich zur Vektorkontrolle- ein starker Wachstumsdefekt festgestellt werden konnte (Abb.5-23). Zusätzlich wurden serielle Tropftests auf TBZ-haltigen Platten durchgeführt und dabei zeigten die Transformanten, bei denen *spdaml*<sup>+</sup> überexprimiert wurde, ein leicht verbessertes Kolonien-Wachstum im Vergleich zur Vektorkontrolle.

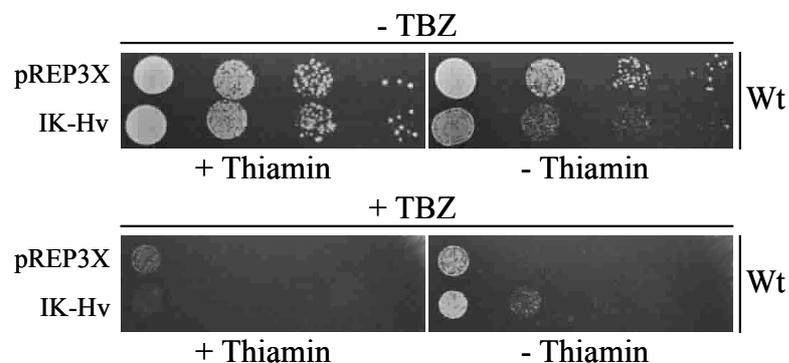


Abb.5-23: Überexpression von *spdaml*<sup>+</sup> in Wildtyp-Zellen  
Abgebildet ist das Wachstum eines Wildtypstammes, der jeweils mit dem Vektor pREP3X bzw. IK-Hv (pREP3X-*spdaml*<sup>+</sup>) transformiert wurde, auf MM (-leu) mit und ohne Thiamin (5µg/ ml) bzw. ohne und mit TBZ (6,5 µg/ ml) bei 24 °C (Inkubationsdauer: 7 Tage (-TBZ) bzw. 10 Tage (+TBZ)).

Diese Ergebnisse zeigen, daß die Überexpression von *spdam1*<sup>+</sup> zu einem Wachstumsdefekt bei den entsprechenden Wildtyp-Zellen führt, und daß zusätzliche Kopien an SpDam1p den Zellen eine erhöhte Resistenz gegenüber TBZ verleihen. Letztere Beobachtung führt zu der Vermutung, daß SpDam1p möglicherweise eine Funktion bei der Stabilisierung von Mikrotubuli hat.

### 5.2.2.3.3 Die Expression von *spdam1*<sup>+</sup> supprimiert zusätzlich die TBZ-Sensitivität von *mal3* Mutantenstämmen

Parallel zu dieser Arbeit wurde in dem von Dr. Corina Vietmeier-Decker durchgeführten Multikopie-Suppressorscreen *spdam1*<sup>+</sup> auch als ein Suppressor der TBZ-Hypersensitivität des *mal3-1* Mutantenstammes isoliert (Vietmeier-Decker, 2004). Dabei sollte -wie im Falle des *spi1-25* Mutantenstammes- überprüft werden, ob die Suppression auf *spdam1*<sup>+</sup> und nicht auf die Expression des SPAC589.09-ORFs zurückzuführen ist. Aus diesem Grunde wurde zunächst das Genbank-Plasmid IK-Hs (Abb.5-19) (Kapitel 5.2.2.3.1) in den TBZ-sensitiven *mal3Δ* Mutantenstamm transformiert. Mittels serieller Tropftests konnte gezeigt werden, daß die Expression des verkürzten DNA-Inserts und somit die Expression von *spdam1*<sup>+</sup> durch den endogenen Promotor den Wachstumsdefekt des *mal3Δ* Mutantenstammes auf TBZ-haltigen Platten sehr gut supprimieren konnte (Abb.5-24).

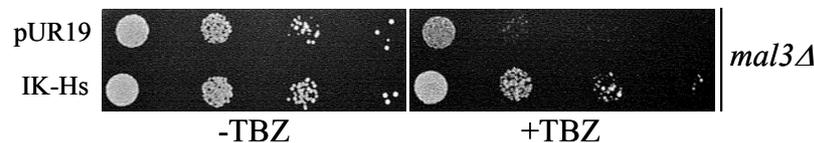


Abb.5-24: Die Expression des verkürzten genomischen DNA-Inserts des Genbank-Plasmids IK-Hs supprimiert auch die TBZ-Sensitivität von *mal3Δ* Zellen  
Der Tropftest zeigt das Wachstum des *mal3Δ* Mutantenstammes, der jeweils mit dem Vektor pUR19 bzw. IK-Hs transformiert wurde, auf MM (-ura) ohne und mit TBZ (5,5µg/ ml) bei 24 °C (Inkubationsdauer: 5 Tage (-TBZ) bzw. 6 Tage (+TBZ)).

Das gleiche Experiment wurde mit *spdam1*<sup>+</sup> in dem moderaten pJR41X bzw. dem starken Expressionsvektor pREP3X durchgeführt. In diesem Versuch konnte bei einem Teil der Zellen, in denen *spdam1*<sup>+</sup> überexprimiert wurde, eine Suppression festgestellt werden, bei dem anderen Teil jedoch nicht (Daten werden nicht gezeigt). Obwohl aufgrund dieser unterschiedlichen Versuchsergebnisse keine Aussage über eine Komplementation durch Überexpression von *spdam1*<sup>+</sup> gemacht werden konnte, konnte dennoch gezeigt werden, daß die Expression von *spdam1*<sup>+</sup> durch den endogenen Promotor die TBZ-Hypersensitivität des *mal3Δ* Mutantenstammes supprimieren konnte.

#### **5.2.2.3.4 Ist die Lokalisierung von SpDam1p in dem *spi1-25* bzw. *mal3Δ* Mutantenstamm verändert ?**

Als letztes wurde untersucht, ob eine veränderte Lokalisierung von SpDam1p in dem *spi1-25* bzw. *mal3Δ* Mutantenstamm für die jeweiligen mutanten Phänotypen verantwortlich ist. Da die Expression von *spdaml*<sup>+</sup> neben der Komplementation der TBZ-Hypersensitivität auch partiell die Temperatur-Sensitivität des *spi1-25* Mutantenstammes supprimieren kann (Daten werden nicht gezeigt), wurde ein *spi1-25* Mutantenstammes, der Spdam1p-GFP exprimiert, bei der permissiven bzw. für 6 h bei der restriktiven Temperatur angezogen. Mittels Immunofluoreszenz wurde die SpDam1p-Lokalisierung in den beiden unterschiedlichen *spi1-25* Kulturen untersucht und es stellte sich heraus, daß weder bei der permissiven noch bei der restriktiven Temperatur eine veränderte Lokalisierung vorlag (Daten werden nicht gezeigt). Bei der Lokalisierungsstudie in einem *mal3Δ* Mutantenstamm, in dem an den endogenen *spdaml*<sup>+</sup>-ORF ein GFP-Epitop fusioniert ist, war hingegen das SpDam1p-GFP-Signal entlang der mitotischen Spindel schwächer (Daten werden nicht gezeigt). Dies ist darauf zurückzuführen, daß in der Deletionsmutante bereits eine schwächere Anfärbung der mitotischen Spindel im Vergleich zu einem Wildtypstamm beschrieben wurde (Beinhauer et al., 1997). Trotz der Tatsache, daß kleinste Veränderungen mittels Immunofluoreszenz nicht nachzuweisen sind und aufgrunddessen nicht vollkommen ausgeschlossen werden können, deuten die erhaltenen Versuchsergebnisse darauf hin, daß die Lokalisierung von SpDam1p sowohl in dem *spi1-25* als auch in dem *mal3Δ* Mutantenstamm unverändert ist.

Da mit der Isolation der extragenen *spi1-25* Multikopie-Suppressoren drei Proteine identifiziert wurden, denen alle eine Funktion bei der Anheftung der Spindel-Mikrotubuli an die Kinetochore zugeordnet wird, kann davon ausgegangen werden, daß die SpRan GTPase ebenfalls eine Rolle in diesem mitotischen Prozeß spielt.

## 5.3 Identifizierung und Charakterisierung von Peg1p als neues Mikrotubuli-assoziiertes *S. pombe* Protein

Um Interaktionspartner des Mikrotubuli-assoziierten Mal3p-Proteins zu identifizieren, wurde ein Multikopie-Suppressorscreen durchgeführt (Vietmeier-Decker, 2004). Dieser war darauf ausgerichtet, Suppressoren zu identifizieren, die in der Lage waren, die TBZ-Hypersensitivität des *mal3-1* Mutantenstammes zu komplementieren. Hierbei wurde das Genbank-Plasmid CD-20 isoliert, das neben der TBZ-Hypersensitivität auch den erhöhten Minichromosom-Verlust des *mal3-1* Mutantenstammes supprimieren konnte (Vietmeier-Decker, 2004).

Meine Aufgabe war es, den ORF auf CD-20 zu identifizieren, dessen Expression für die Suppression der *mal3-1* Phänotypen verantwortlich ist und im Anschluß daran das entsprechende Genprodukt näher zu charakterisieren.

### 5.3.1 Identifizierung eines neuen Mitglieds der evolutionär konservierten CLASP/ MAST/ Stu1-Proteinfamilie

Die Sequenzanalyse des genomischen DNA-Inserts des Genbank-Plasmids CD-20 identifizierte drei ORFs auf Chromosom I von *S. pombe*. Datenbank-Angaben zufolge (Sanger Center, Hinxtion) handelt es sich bei diesen zum einen um das bereits bekannte *sak1*<sup>+</sup>-Gen (SPAC3G9.14), zum anderen um zwei putative ORFs, SPAC3G9.13c und SPAC3G9.12 (Abb.5-25). Dabei befinden sich auf dem 4767 Bp langen genomischen DNA-Fragment nur 44 Bp des insgesamt 2301 Bp großen *sak1*<sup>+</sup>-Gens und dies entspricht einem prozentualen Anteil von 2 % der ORF-Gesamtlänge. Sak1p gehört der evolutionär konservierten Familie der RFX-DNA-Bindeproteine an und wurde als Komponente der zyklischen AMP-abhängigen Proteinkinase-Kaskade identifiziert (Wu et al., 1995; Durand et al., 2000). Der zweite ORF, SPAC3G9.13c, dessen Stopcodon mit dem des benachbarten SPAC3G9.12-ORFs überlappt, ist mit 1457 Bp vollständig auf dem DNA-Insert vorhanden und kodiert nach Datenbankangaben (Sanger Center, Hinxtion) für ein 39,8 kDa großes Protein. Diesem hypothetischen Protein wird aufgrund der Ähnlichkeit zu Msw1p in *S.cerevisiae*, einer mitochondrialen Tryptophanyl-tRNA-Synthetase, eine Funktion bei der mitochondrialen Proteinsynthese zugeordnet (Myers und Tzagoloff, 1985). Als dritter ORF wurde SPAC3G9.12 identifiziert, von dem 1452 Bp auf dem genomischen DNA-Insert enthalten sind und dies bei einer ORF-Gesamtlänge von 4510 Bp einem prozentualen Anteil von 32 % entspricht. Wie der Abb.5-25 zu entnehmen ist, handelt es sich hierbei um den C-terminalen Teil des SPAC3G9.12-ORFs. Dem Eintrag in der *S. pombe* Datenbank zufolge kodiert der

SPAC3G9.12-ORF für ein 164 kDa großes hypothetisches Protein, das Ähnlichkeit zu dem Stu1p-Protein in *S. cerevisiae* aufweist. Stu1p gehört einer evolutionär konservierten Familie Mikrotubuli-assoziiierter Proteine an, der das MAST/ORBIT-Protein aus *D. melanogaster* und die CLASP-Proteine im Menschen zugeordnet werden (Lemos et al., 2000; Inoue et al., 2000; Akhmanova et al., 2001; Maiato et al., 2003).

Meine Aufgabe war es nun, den entsprechenden ORF zu identifizieren, der für die Suppression der TBZ-Sensitivität des *mal3-1* Mutantenstammes verantwortlich ist.

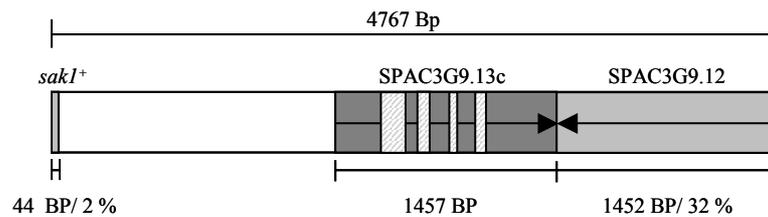


Abb.5-25: Schematische Darstellung des genomischen DNA-Inserts des Suppressorplasmids CD-20

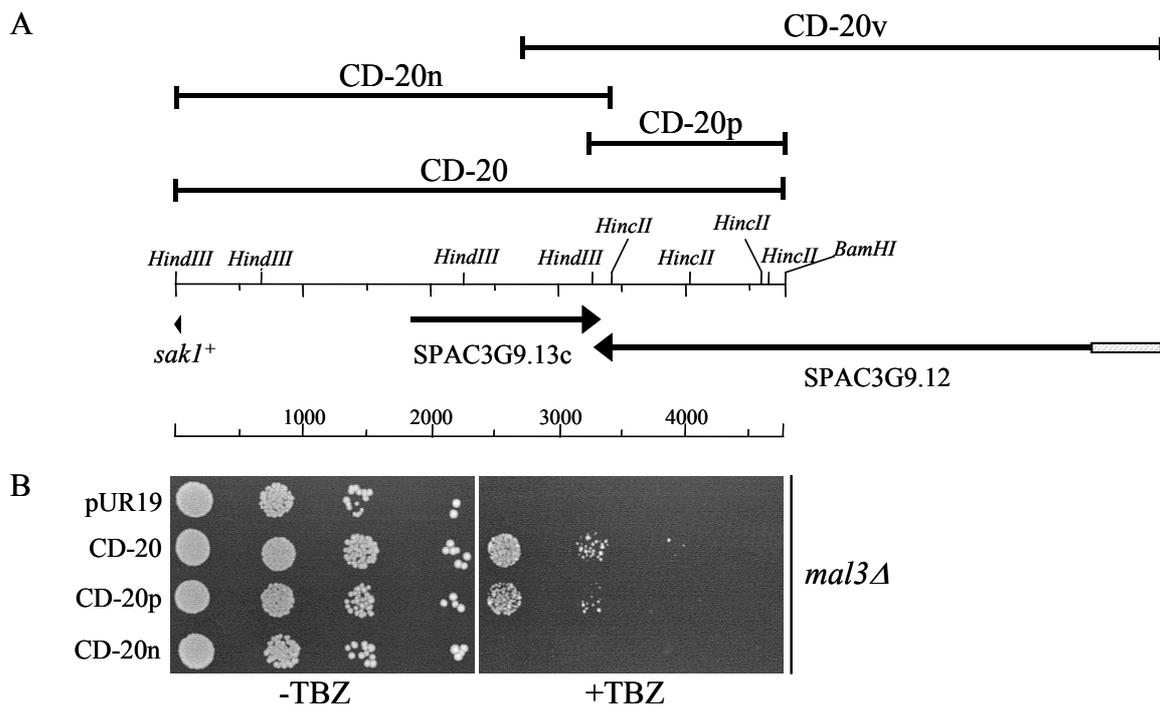
Das 4767 Bp lange DNA-Insert enthält 44 Bp des *sakI*<sup>+</sup>-Gens, den gesamten SPAC3G9.13c-ORF (Gesamtgröße: 1457 Bp; dunkelgrauer Bereich) und 32 % des 4510 Bp großen SPAC3G9.12-ORFs (hellgrauer Bereich). Der Pfeil weist in Transkriptionsrichtung des jeweiligen ORFs. Intronsequenzen sind durch grau gestreifte Bereiche kenntlich gemacht.

### 5.3.1.1 Die Expression des partiellen SPAC3G9.12-ORFs kann die TBZ-Hypersensitivität des *mal3Δ* Mutantenstammes supprimieren

Für diesen Versuch wurden 3264 Bp des genomischen DNA-Inserts des Genbank-Plasmids CD-20 durch Restriktion mit *HindIII* entfernt. Wie Abb.5-26 A zu entnehmen ist, wurden durch diese Vorgehensweise sowohl die gesamten 44 Bp des *sakI*<sup>+</sup>-Gens als auch 1402 Bp des N-Terminus des SPAC3G9.13c-ORFs und somit 96 % der SPAC3G9.13c-Gesamtlänge deletiert. Im Anschluß an die Restriktion mit *HindIII* wurde das Plasmid religiert. Somit enthält das generierte Plasmid CD20p die 32 % des SPAC3G9.12-ORFs und die restlichen 55 Bp des C-Terminus von SPAC3G9.13c. Zusätzlich zu diesem Konstrukt wurde eine weitere Klonierung vorgenommen, bei der ein Großteil des SPAC3G9.12-ORFs entfernt wurde. Dazu wurden 1350 Bp des N-Terminus des verkürzten SPAC3G9.12-ORFs durch Restriktion mit *HincIII*/*BamHI* deletiert, was bedeutet, daß lediglich 102 Bp des C-Terminus des SPAC3G9.12-ORFs erhalten bleiben. Nach Auffüllen der überhängenden Enden wurde das Plasmid religiert und CD-20n genannt. Daraufhin wurde als Negativ-Kontrolle der leere pUR19-Vektor, als Positiv-Kontrolle CD-20 und zusätzlich die Plasmide CD20p und CD-20n in den *mal3Δ* Mutantenstamm transformiert und mit den Transformanten serielle Tropftests

durchgeführt. Wie in Abb.5-26 B zu beobachten ist, zeigten die *mal3Δ* Zellen, die mit CD20p transformiert waren, nahezu gleich gute Suppression der TBZ-Hypersensitivität im Vergleich zum Original-Plasmid CD-20. Im Gegensatz dazu konnte auf TBZ-haltigen Platten bei den Zellen, in denen sowohl das *sak1*<sup>+</sup>-Gen, als auch der SPAC3G9.13c-ORF exprimiert wurde, kein Kolonien-Wachstum festgestellt werden.

Das bedeutet, daß die Komplementation der TBZ-Sensitivität auf den partiellen SPAC3G9.12-ORF zurückzuführen ist.



**Abb.5-26:** Der SPAC3G9.12-ORF des Genbank-Plasmids CD-20 supprimiert die TBZ-Sensitivität von *mal3Δ* Zellen

In (A) ist das genomische DNA-Insert von CD-20 mit den Schnittstellen der Restriktionsendonukleasen *HindIII* bzw. *BamHI* und *HincII* schematisch dargestellt. Durch Restriktion mit *HindIII* wurden 44 Bp des *sak1*<sup>+</sup>-Gens sowie 1402 Bp des SPAC3G9.13c-ORFs (ca. 96 %) aus CD-20 deletiert und das Konstrukt CD20p genannt. Desweiteren wurde das Plasmid CD-20n durch Restriktion mit *BamHI* / *HincII* generiert. Dabei wurden 1350 Bp des SPAC3G9.12-ORFs aus dem Plasmid CD-20 deletiert. Zusätzlich ist das Vollängen-Konstrukt CD-20v abgebildet, das den 4510 Bp großen SPAC3G9.12-ORF und 613 Bp der Promotor-Region (grau-straftierter Bereich) als auch 618 Bp der Terminator-Region enthält (Terminator-Region ist nicht flankierend zum SPAC3G9.12-ORF eingezeichnet). Pfeile weisen in Transkriptionsrichtung. (B) Der Tropftest zeigt das Wachstum des *mal3Δ* Mutantenstammes, der jeweils mit dem Vektor pUR19, CD-20, CD-20p und CD-20n transformiert wurde, auf MM (-ura) ohne und mit TBZ (5,5 µg/ ml) bei 24 °C (Inkubationsdauer: 7 Tage).

### 5.3.1.2 Das identifizierte Genprodukt weist Homologie zu den Mitgliedern der CLASP/ MAST/ Stu1-Proteinfamilie auf

Der SPAC3G9.12-ORF kodiert für ein Protein, das Ähnlichkeit zu den Mitgliedern der CLASP/MAST/Stu1-Proteinfamilie aufweist. Um zu untersuchen, inwieweit die Aminosäuresequenzen der entsprechenden Mitglieder dieser Proteinfamilie Homologiebereiche zu dem bisher uncharakterisierten *S. pombe* Protein aufweisen, wurde mittels Datenbankrecherche eine Homologiesuche durchgeführt. In Abb.5-27 sind die Ergebnisse der Proteinsequenzvergleiche dargestellt. Hierbei ist für den jeweiligen Homologiebereich der prozentuale Anteil an identischen Aminosäuren angegeben. Während sich die Homologiebereiche der beiden Hefe-Proteine fast über die gesamte Länge erstrecken, nimmt die Größe der Bereiche mit der Komplexität des Organismus ab. Trotzdem ist festzustellen, daß der prozentuale Anteil an identischen Aminosäuren bei den jeweiligen Homologiebereichen nicht weit voneinander abweicht und zwischen ca. 20 bis 28 % liegt. Während -den Literaturangaben zufolge- in *S. cerevisiae* als auch in *D. melanogaster* diese evolutionär konservierte Proteinfamilie durch jeweils ein Mitglied repräsentiert wird, wurden in menschlichen Zellen bisher zwei Vertreter, das CLASP1- und das CLASP2-Protein, identifiziert (Akhmanova et al., 2001; Übersichtsartikel: Mimori-Kiyosue und Tsukita, 2003). Dabei weist das CLASP2-Protein Homologie zu dem N-Terminus des SPAC3G9.12-Genproduktes auf, die des CLASP1 bezieht sich hingegen auf den C-Terminus des *S. pombe* Proteins, und zwar auf den Teil des Proteins, der auf dem Suppressorplasmid CD-20 enthalten ist (Abb.5-27).

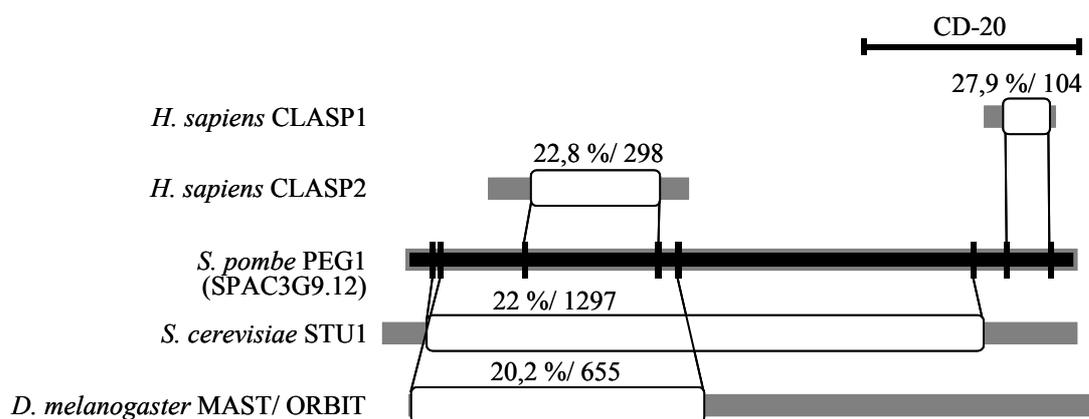


Abb.5-27: Peg1p weist Homologie zu den Mitgliedern der CLASP/ MAST/ Stu1-Familie auf

Schematische Darstellung der Homologiebereiche des Peg1p-Genproduktes (SPAC3G9.12) in *S. pombe* und der Homologen in *S. cerevisiae*, *D. melanogaster* und Mensch. Die Homologie bezieht sich auf die eingezeichneten Aminosäuren-Bereiche, für die jeweils der prozentuale Anteil an identischen Aminosäuren angegeben ist. Zusätzlich ist der Abbildung der entsprechende Protein-Bereich zu entnehmen, der von dem genomischen DNA-Insert auf CD20 kodiert wird. Erstellt durch Dr. Ulrich Güldener (MIPS, München).

Als Mitglieder der CLASP/MAST/Stu1-Proteinfamilie handelt es sich auch bei diesen beiden Vertretern um Mikrotubuli-Plus-End-bindende Proteine und ebenso wie es für eine Vielzahl an Plus-End-bindenden Proteinen gezeigt werden konnte, wird auch CLASP1 eine Funktion bei der Verknüpfung von Spindel-Mikrotubuli mit dem Kinetochor zugeordnet (Maiato et al., 2003). Die Tatsache, daß bei der Suche nach extragenen *mal3-1* Multikopie-Suppressoren ein bisher unbekanntes Protein identifiziert wurde, das Homologie zu den Mikrotubuli-Plus-End-bindenden CLASP-Proteinen aufweist, könnte bedeuten, daß das *S. pombe* Protein ein neues Mitglied der evolutionär konservierten Familie Mikrotubuli-assoziiierter Proteine repräsentiert. Da CLASP der englische Ausdruck für Klammer ist, wurde für die Bezeichnung dieses neu identifizierten *S. pombe* Proteins der synonyme Ausdruck Peg1p (englisch: Klammer) gewählt. Die Annahme, daß es sich bei Peg1p um einen neuen Vertreter der CLASP/MAST/Stu1-Proteinfamilie handeln könnte, wurde durch die nähere Charakterisierung dieses Proteins erhärtet.

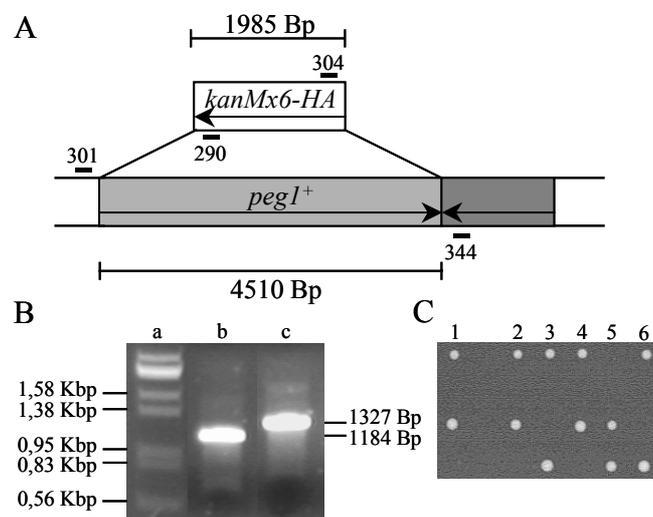
### 5.3.2 Funktionelle Analyse des Peg1p-Proteins

In dem Labor von Dr. Iain Hagan in Manchester wurde bereits vor einiger Zeit der temperatursensitive *peg1-1* Mutantenstamm isoliert, der starke mitotische Defekte aufweist. Im Rahmen einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Dr. Iain Hagan wurde unserem Labor -zur Charakterisierung des Peg1p-Proteins- der *peg1-1* Mutantenstamm zur Verfügung gestellt. Während meine Untersuchungen zunächst generellen Aspekten in Bezug auf das Peg1p-Protein gewidmet waren, wird im späteren Verlauf dieses Kapitels auf die Versuchsergebnisse eingegangen, die bei der experimentellen Analyse des *peg1-1* Mutantenstammes erhalten wurden.

#### 5.3.2.1 Ist *peg1*<sup>+</sup> ein essentielles Gen ?

Um zu überprüfen, ob es sich bei *peg1*<sup>+</sup> um ein essentielles Gen handelt, wurde in einem diploiden Wildtypstamm mittels homologer Rekombination eine Kopie des 4510 Bp großen *peg1*<sup>+</sup>-ORFs gegen eine 1985 Bp lange Deletionskassette ausgetauscht (Abb.5-28 A). Diese Deletionskassette, die eine *kanMx6*-Modulesequenz trägt und deren Expression Resistenz gegenüber Kanamycin (G418) verleiht, wurde in einer PCR-Reaktion generiert und in einen diploiden Wildtypstamm transformiert (Kapitel 4.17). Im Anschluß erfolgte die Selektion von Transformanten auf G418-haltigen Platten. Die korrekte Integration der Deletionskassette und somit die Deletion eines *peg1*<sup>+</sup>-Allels wurde in einer weiteren PCR-Reaktion verifiziert (Kapitel 4.17). Mittels dieser PCR-Reaktion wurde der 5'-Übergang und der 3'-Übergang der

integrierten Deletionskassette unter Verwendung von spezifischen Oligonukleotiden überprüft (Abb.5-28 A, B). Nach Sporulation eines positiven diploiden *peg1Δ/peg1<sup>+</sup>* Stammes wurden von 52 Tetraden die vier Sporen vereinzelt und dabei konnte festgestellt werden, daß jeweils zwei Sporen einer Tetrade in der Lage waren, zu wachsen (Abb.5-28 C). Daraufhin wurden die Genotypen der wachsenden Sporen durch Ausstriche auf G418-haltigen Platten untersucht und dabei stellte sich heraus, daß alle sensitiv gegenüber G418 waren. Das bedeutet, daß die zwei wachsenden Sporen der Tetrade das *peg1<sup>+</sup>*-Wildtyp-Allel besaßen, während die Sporen, bei denen das *peg1<sup>+</sup>*-Gen deletiert war, kein Kolonienwachstum aufwiesen. Dies zeigt, daß es sich bei *peg1<sup>+</sup>* um ein essentielles Gen handelt.



**Abb.5-28: Deletion des *peg1<sup>+</sup>*-ORFs mittels einer *HA-kanMx6*-Transformationskassette**  
 (A) Schematische Darstellung des 4510 Bp großen *peg1<sup>+</sup>*-ORFs (hellgrauer Bereich) mit flankierenden genomischen Sequenzbereichen, einschließlich eines Teils des benachbarten SPAC3G9.13c-ORFs (dunkelgrauer Bereich) und der 1985 Bp langen *HA-kanMx6*-Deletionskassette. Die Pfeile weisen in Transkriptionsrichtung des jeweiligen ORFs. Zusätzlich sind die Bindestellen der Oligonukleotide mit entsprechenden Labornummern eingezeichnet, die in der PCR-Reaktion für die Überprüfung der korrekten Integration der Deletionskassette verwendet wurden. (B) Auftrennung der Verifikations-PCR-Ansätze in einem 0,7 %igen Agarosegel. a:  $\lambda$ -Längenmarker (*EcoRI/Hind III*; Fragmentgrößen teilweise angegeben), b: Positive Transformante; verwendetes Oligonukleotidpaar 301/ 290 für Überprüfung der korrekten Integration am 5'-Übergang (erwartetes PCR-Fragment: 1184 Bp), c: Positive Transformante; verwendetes Oligonukleotidpaar 304/ 344 für Überprüfung der korrekten Integration am 3'-Übergang (erwartetes PCR-Fragment: 1327 Bp). (C) Nach Vereinzeln der 4 Sporen der hier gezeigten 6 Tetraden waren jeweils 2 Sporen in der Lage, Kolonien zu bilden.

### 5.3.2.2 Peg1p zeigt Assoziation mit der mitotischen Spindel und dem Zentromer

Bevor mit der Charakterisierung des *peg1-1* Mutantenstammes begonnen werden konnte, war es sinnvoll, zunächst zu untersuchen, welche Lokalisierung das Peg1p-Protein während der Mitose aufweist. Für die Lokalisierungsstudie wurde in einem Wildtypstamm an den endogenen *peg1*<sup>+</sup>-ORF ein GFP-Epitop fusioniert (Kapitel 4.15). Nach Anzucht des resultierenden Stammes wurde durch Immunofluoreszenz das Mikrotubuli-Zytoskelett sowie das Peg1p-Protein angefärbt und das Chromatin mittels DAPI-Behandlung sichtbar gemacht (Kapitel 4.19). In Abb.5-29 sind mitotische Wildtypzellen abgebildet.

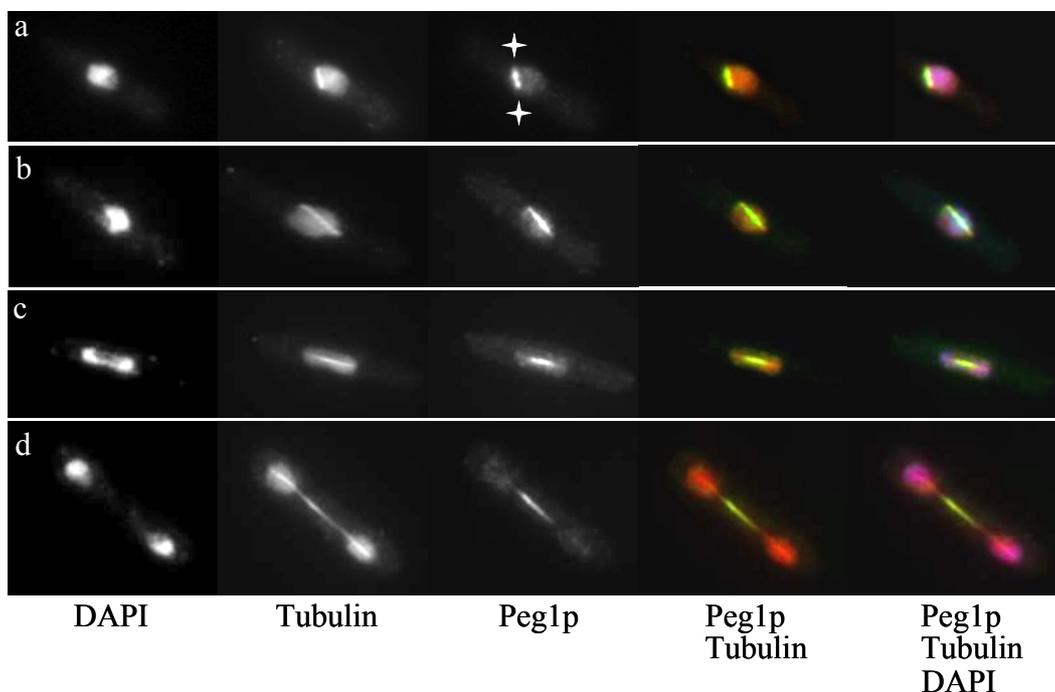


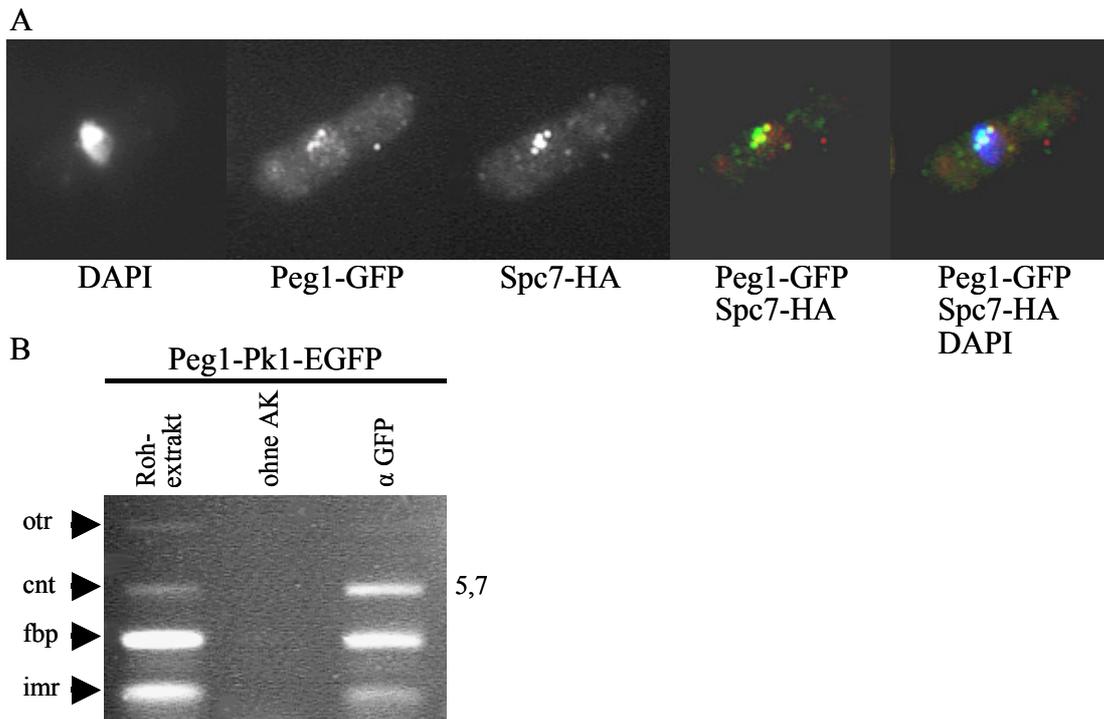
Abb.5-29: Peg1p zeigt Assoziation mit der mitotischen Spindel

Die Abbildung zeigt Einzelbilder und jeweils zwei Kompositionsbilder unterschiedlicher mitotischer *S. pombe* Zellen (Teilbild a: Prophasen-Zelle; Teilbild b: Metaphasen-Zelle; Teilbild c: frühe Anaphasen B-Zelle; Teilbild d: Anaphasen B-Zelle). Von links nach rechts: Chromatin-Färbung mittels DAPI, Immunofluoreszenz von Tubulin und Peg1p-GFP, überlagerte Aufnahmen von Tubulin und Peg1p-GFP bzw. Tubulin, Peg1p-GFP und Chromatin. Farbgebung: blau = Chromatin, grün = Peg1p-GFP-Signal, rot = Tubulin, gelb = Überschneidung der Signale von Tubulin und Peg1p-GFP. Die Sterne markieren das sehr starke Peg1p-GFP-Signal an den Enden der Prophasen-Spindel. Längenmaß (schwarzer Balken): 5  $\mu\text{m}$ .

Dabei ist zu beobachten, daß Peg1p-GFP bereits zu Anfang der Mitose, der Prophase, entlang der mitotischen Spindel lokalisiert war (Prophase: Teilbild a) und mit dieser auch in der darauffolgenden mitotischen Phase assoziiert blieb (Metaphase: Teilbild b). Bereits zu Beginn der Anaphase B und auch im weiteren Verlauf dieser mitotischen Phase konnte Peg1p-GFP nicht mehr entlang der gesamten mitotischen Spindel festgestellt werden, sondern befand sich

nur noch auf der Mitte der Spindel (frühe Anaphase B: Teilbild c; späte Anaphase B: Teilbild d). Diese Lokalisierung wurde ebenfalls für Stu1p in *S. cerevisiae*, MAST/ ORBIT in *D. melanogaster* und CLASP1 im Menschen beschrieben, wobei CLASP1 bereits beim Übergang von Metaphase zu Anaphase eine Lokalisierung auf der Spindel-Mitte aufweist (Yin et al., 2002; Maiato et al., 2002; Maiato et al., 2003). Bei Betrachtung der Einzelfärbung von Peg1p-GFP in Teilbild a fiel auf, daß jeweils an den Enden der sehr kurzen Prophasen-Spindel das Signal von Peg1p-GFP sehr stark war, was als Hinweis dafür diente, daß Peg1p-GFP während der frühen Mitose mit den SPKs und/ oder Zentromeren assoziiert.

Um diesen Hinweis auf eine mögliche Zentromer-Lokalisierung nachzugehen, wurde in Metaphase-arretierten *S. pombe* Zellen überprüft, ob Peg1p möglicherweise eine Kolokalisierung mit dem inneren Zentromer-Protein Spc7p aufweist (Kapitel 5.2.2.2.1). Dabei diente Spc7p als Kinetochormarker, der es ermöglichte, Zentromere visuell zu verfolgen. Für diesen Versuch wurde der temperatursensitive *cut9-665* Mutantenstamm verwendet, der einen Defekt im *cut9*<sup>+</sup>-Gen aufweist. Dieses Gen kodiert für eine Komponente des APCs, dem sogenannten „Anaphase promoting complex“, der den Übergang von Metaphase zur Anaphase kontrolliert (Yanagida et al., 1999; Übersichtsartikel: Zachariae und Nasmyth, 1999). Die Inkubation dieses Mutantenstammes bei der restriktiven Temperatur bewirkt einen temporären Arrest der Zellen in der Metaphase (Samejima und Yanagida, 1994). Mittels Kreuzung wurde ein *cut9-665* Stamm hergestellt, in dem der endogene *peg1*<sup>+</sup>-ORF mit einem GFP-Epitop und der endogene *spc7*<sup>+</sup>-ORF mit einem HA-Epitop fusioniert ist. Nach Anzucht der *cut9-665* Zellen bei der permissiven Temperatur wurden diese für 4 h bei 36 °C inkubiert, was dazu führte, daß ca. 16 % der *cut9-665* Zellen in der Metaphase arretierten (Samejima und Yanagida, 1994). Dabei erfolgte die Anfärbung des Peg1p-GFP- und des Spc7p-HA-Fusionsproteins mittels Immunfluoreszenz und durch Behandlung mit DAPI wurde das Chromatin in diesen sichtbar gemacht. Wie Abb.5-30 A zu entnehmen ist, zeigt die darauf abgebildete Metaphasen-Zelle teilweise überlappende Signale des Peg1p-GFP- und des Spc7p-HA-Fusionsproteins, was zumindest darauf hindeutet, daß Peg1p-GFP mit dem Kinetochor in *S. pombe* assoziiert ist. Um den endgültigen Beweis zu erbringen, musste mittels CHIP-Analyse untersucht werden, ob tatsächlich DNA-Sequenzen des Zentromers in dem Peg1p-GFP-Immunopräzipitat angereichert sind. Während zuerst eine Vielzahl unterschiedlichster Versuche fehlschlugen, wurde schließlich ein Wildtypstamm hergestellt, in dem an den endogenen *peg1*<sup>+</sup>-ORF ein Pk1-EGFP-Epitop fusioniert wurde (Kapitel 4.16). Nach Anzucht dieses Stammes wurde -wie in Kapitel 5.2.2.2.1 beschrieben- an diesem die CHIP-Analyse durchgeführt (Kapitel 4.21).



**Abb.5-30: Peg1p ist ein neues *S. pombe* Zentromerprotein**

(A) Peg1p kolokalisiert teilweise mit dem inneren Kinetochorprotein Spc7p. Die Abbildung zeigt die Einzelbilder und zwei Kompositionsbilder einer in der Metaphase des Zellzyklus arretierten *S. pombe* Zelle. Von links nach rechts: Chromatin-Färbung mittels DAPI, Immunofluoreszenz von Peg1p-GFP und Spc7p-HA, überlagerte Aufnahmen von Peg1p-GFP und Spc7p-HA bzw. Peg1p-GFP, Spc7p-HA und Chromatin. Farbgebung: blau = Chromatin, rot = Peg1p-GFP-Signal, grün = Spc7p-HA-Signal, gelb = Überschneidung der Signale der Fusionsproteine. Längenmaß (schwarzer Balken): 5 µm. (B) Peg1p ist mit der zentralen Zentromer-Region assoziiert. Zellen, in denen Peg1p-Pk1-EGFP exprimiert wird, wurden fixiert und mit Anti-GFP-Antikörper ChIP-Analyse durchgeführt. Das Chromatin in den Immunopräzipitaten bzw. Rohextrakten wurde mittels „Multiplex“-PCR analysiert. Dafür wurden Oligonukleotide benutzt, die verschiedene Regionen des Zentromer I (*cenI*) amplifizieren: *cnt*, *imr*, *otr* und als negative Kontrolle für eine euchromatische Region *fbp*. In der ChIP-Probe des Peg1p-Pk1-EGFP-Proteins wurde ausschließlich eine 5,7-fache Anreicherung der *cnt*-Sequenz beobachtet. Die Anzucht der entsprechenden Kultur erfolgte bei 30°C Ü/N und im Anschluß daran wurden die Zellen für 2 h bei 18 °C inkubiert, bevor die ChIP-Analyse durchgeführt wurde (Bezeichnung: keine Zugabe eines Antikörpers (ohne AK), Zugabe von Antikörper (α GFP)).

Wie in Abb.5-30 B zu beobachten ist, wurden bei der Positiv-Kontrolle, der Rohextrakt-Probe, alle 4 Regionen amplifiziert, auch wenn die *otr*- und *cnt*-Banden nur sehr schwach zu erkennen sind, während bei der Negativ-Kontrolle, die Probe, der kein Anti-GFP-Antikörper zugegeben wurde, wie erwartet keine Amplifizierung festzustellen war. Interessanterweise konnte nach Präzipitation des Peg1p-Pk1-EGFP-Fusionsproteins ausschließlich *cnt*-Sequenzen in dem ChIP-Ansatz um das 5,7-fache angereichert werden. Eine mehrfache Wiederholung der ChIP-Analyse bestätigte das Ergebnis. Diese Beobachtung ist sehr interessant, da bisher keine *S. pombe* Zentromerproteine bekannt sind, die ausschließlich mit der *cnt*-Region assoziieren. Das bedeutet, daß es sich bei dem Peg1p-Protein um ein neues

inneres Zentromerprotein handelt, das als erstes *S. pombe* Kinetochorprotein ausschließlich mit dem zentralen Kern des Zentromers assoziiert ist.

### 5.3.2.3 Charakterisierung der *peg1-1* Mutation

Durch die Charakterisierung des temperatursensitiven *peg1-1* Mutantenstammes sollte mehr Aufschluß über die mitotische Funktion des Peg1p-Proteins erlangt werden. Dabei war es für die weitere Vorgehensweise wichtig, zunächst die *peg1-1* Mutation auf Rezessivität hin zu untersuchen. Hierzu wurden heterozygot diploide *peg1-1/peg1<sup>+</sup>* Stämme, sowie homozygot diploide *peg1<sup>+</sup>/peg1<sup>+</sup>* Stämme hergestellt und auf Temperatur-Sensitivität hin untersucht. Als weitere Kontrollen wurde sowohl der haploide *peg1-1* Mutantenstamm als auch ein haploider Wildtypstamm verwendet. Abb.5-31 zeigt das Wachstum der entsprechend haploiden und diploiden Stämme bei 24 °C und 35 °C. Wie dieser zu entnehmen ist, konnte bei dem heterozygot diploiden *peg1-1/peg1<sup>+</sup>* Stamm -ebenso wie bei dem homozygot diploiden *peg1<sup>+</sup>/peg1<sup>+</sup>* Stamm- kein Wachstumsdefekt bei 35 °C festgestellt werden. Als einziger der hier untersuchten Stämme zeigte nur der haploide *peg1-1* Mutantenstamm kein Wachstum bei 35 °C. Diese Beobachtung beweist, daß *peg1-1* eine rezessive Mutation ist, da im Falle von Dominanz oder Semi-Dominanz der heterozygot diploide *peg1-1/peg1<sup>+</sup>* Stamm einen Wachstums-Phänotyp bei 35 °C hätte aufweisen müssen.

Aufgrund der Tatsache, daß das Peg1p-Protein Assoziation mit der mitotischen Spindel und dem Zentromer aufweist (Kapitel 5.3.2.2), war es von Interesse, ob die beobachtete Temperatur-Sensitivität möglicherweise mit einer abnormen Verteilung des chromosomalen Materials einhergeht.

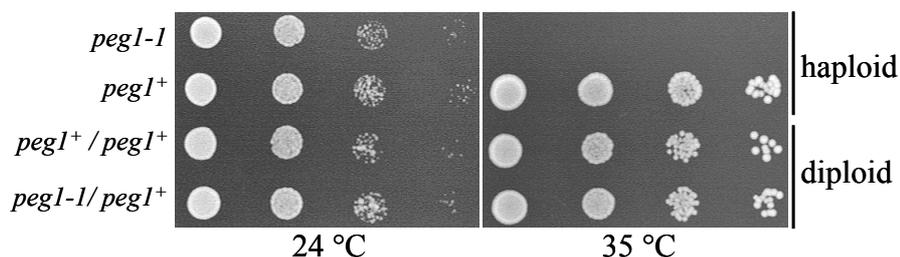


Abb.5-31: *peg1-1* ist eine rezessive Mutation

Der Tropftest zeigt das Wachstum des haploiden *peg1-1* Mutantenstammes, des haploiden Wildtyps (*peg1<sup>+</sup>*) sowie des homozygot diploiden *peg1<sup>+</sup>/peg1<sup>+</sup>* Stammes und heterozygot diploiden *peg1-1/peg1<sup>+</sup>* Stammes auf Vollmediums-Platten bei 24 °C und 35 °C (Inkubationsdauer: 5 Tage).

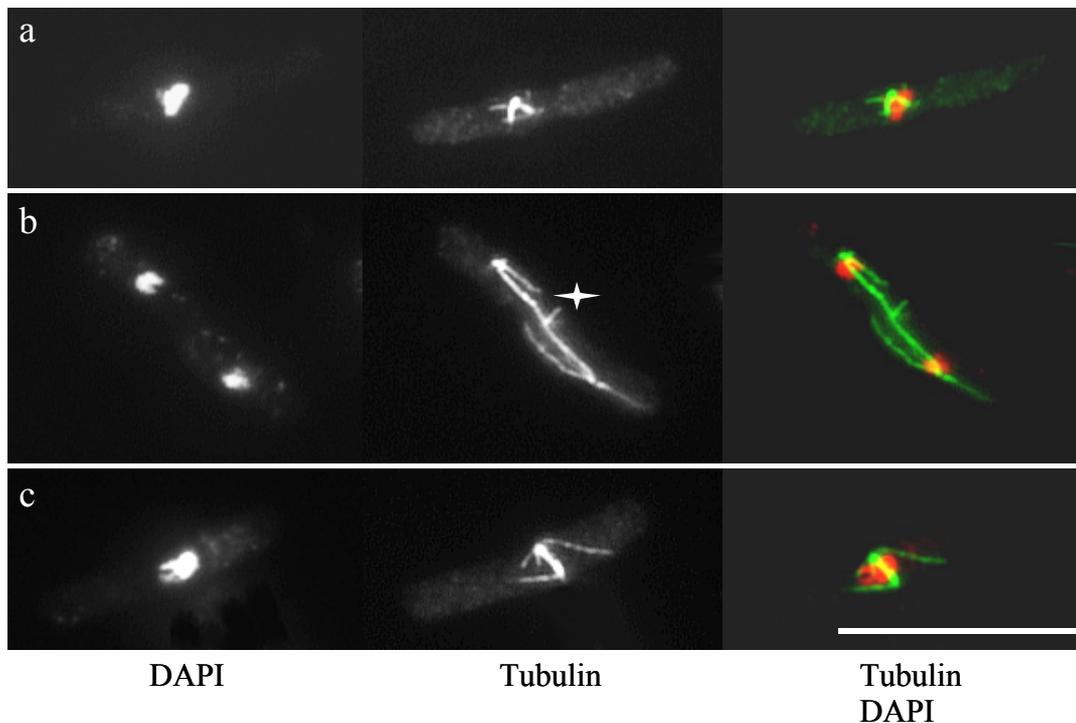
### **5.3.2.3.1 Der *peg1-1* Mutantenstamm weist während der Mitose eine Fehlverteilung des chromosomalen Materials auf**

Hierzu wurde die *peg1-1* Mutante für 6 h bei der restriktiven Temperatur inkubiert und nach Fixierung der Zellen das Chromatin mittels DAPI angefärbt. Im Anschluß wurden Anaphasen-Zellen auf abnorme Chromosomen-Segregation hin untersucht und hierbei stellte sich heraus, daß in 29,2 %, d.h. in ca. 1/3 aller Anaphasen-Zellen eine Fehlverteilung des Chromatins beobachtet werden konnte (Daten werden nicht gezeigt). Somit kann die beobachtete Temperatur-Sensitivität des *peg1-1* Mutantenstammes bei der restriktiven Temperatur auf diese abnorme Chromosomen-Segregation zurückgeführt werden.

### **5.3.2.3.2 Zellen des *peg1-1* Mutantenstammes zeigen einen Defekt im Aufbau und in der Aufrechterhaltung einer bipolaren mitotischen Spindel**

Um die Gründe für die beobachtete Chromatin-Fehlverteilung zu ermitteln, wurde der *peg1-1* Mutantenstamm erneut für 6 h bei der restriktiven Temperatur inkubiert und mittels Immunofluoreszenz das Mikrotubuli-Zytoskelett in diesem angefärbt sowie das Chromatin durch DAPI-Behandlung sichtbar gemacht. In der darauffolgenden mikroskopischen Untersuchung wurden insbesondere mitotische Zellen berücksichtigt und dabei stellte sich heraus, daß 74,3 % dieser einen Defekt zeigten. Aufgrund der Tatsache, daß die beobachteten Defekte sehr verschieden waren, wurden diese in drei unterschiedliche Kategorien eingeteilt. Die erste Kategorie wird von *peg1-1* Zellen gebildet, die nicht in der Lage waren, eine bipolare mitotische Spindel aufzubauen. Bei diesen konnte nur eine monopolare Spindel beobachtet werden, die an fächerförmigen Mikrotubulibündeln -von einem SPK ausgehend- zu erkennen war (Abb.5-32 Teilbild a). Repräsentativ für die zweite Kategorie sind Zellen, bei denen zwar eine bipolare Spindel aufgebaut wurde, aber Mikrotubulibündel aus der mitotischen Spindel seitlich herausragten (Abb.5-32 Teilbild b). Für eine Einteilung in die letzte Kategorie wurden Zellen gewählt, bei denen die Struktur der mitotischen Spindel bzw. der Astral-Mikrotubuli abnorm war. Dabei wurde öfter beobachtet, daß Astral-Mikrotubuli, die mitotischen Mikrotubuli, die ins Zytoplasma ragen und für die Spindel-Orientierung benötigt werden, sehr lang und äußerst stark ausgeprägt waren (Abb.5-32 Teilbild c) (Oliferenko und Balasubramanian, 2002; Rajagopalan et al., 2004). Während bei den *peg1-1* Zellen der ersten Kategorie ein Defekt im Aufbau der bipolaren Spindel vorliegt, sind Zellen der zweiten Kategorie zwar imstande eine bipolare Spindel aufzubauen, aber es scheint, als läge ihr Problem in der Aufrechterhaltung der Spindel-Struktur. Bei den Zellen der letzten Kategorie hingegen sind insbesondere die sehr langen und stark ausgeprägten

Astral-Mikrotubuli auffallend. Diese Beobachtungen implizieren, daß Peg1p neben einer Funktion beim Aufbau der bipolaren mitotischen Spindel auch für ihre Aufrechterhaltung benötigt wird. Die Beeinträchtigung des Peg1p-Proteins führt zu diesen Spindel-Defekten, die vermutlich unter anderem für die abnorme Chromosomen-Verteilung in dem Mutantenstamm verantwortlich sind.



**Abb.5-32: Die *peg1-1* Zellen zeigen mitotische Spindel-Defekte**

Die Abbildung zeigt Einzelbilder und jeweils ein Kompositionsbild von *peg1-1* Zellen mit unterschiedlichen mitotischen Spindel-Defekten (Spindel-Defekt der Kategorie 1: Teilbild a (monopolare Spindel); Kategorie 2: Teilbild b (Anaphasen-Spindel mit herausragenden Mikrotubulibündeln); Kategorie 3: Teilbild c (anderweitige Spindel- bzw. Astral-Mikrotubuli-Anomalien). Von links nach rechts: Chromatin-Färbung mittels DAPI, Immunofluoreszenz von Tubulin, überlagerte Aufnahmen von Tubulin und Chromatin. Farbgebung: rot = Chromatin, grün = Tubulin, gelb = Überschneidung der Signale von Tubulin und Chromatin. Der Stern in Teilbild b markiert herausragende Mikrotubulibündel. Längenmaß (weißer Balken): 5  $\mu\text{m}$ . Für diesen Versuch wurden Zellen des *peg1-1* Mutantenstammes in flüssigem Vollmedium für 6 h bei 34 °C inkubiert.

### 5.3.2.3.3 Ist die Lokalisierung von Mal3p in dem *peg1-1* Mutantenstamm als auch die von Peg1p in der *mal3Δ* Mutante möglicherweise verändert ?

Um zu überprüfen, ob die *peg1-1* mutanten Phänotypen möglicherweise durch eine veränderte Lokalisierung des Mal3p-Proteins hervorgerufen werden, wurde ein *peg1-1* Mutantenstamm hergestellt, in dem an den endogenen *mal3<sup>+</sup>*-ORF ein Pk1-EGFP-Epitop fusioniert ist. Nach Inkubation des *peg1-1* Mutantenstammes für 4 h bei der restriktiven Temperatur wurde mittels Immunofluoreszenz-Mikroskopie die Mal3p-Lokalisierung in diesem untersucht und

hierbei konnte keine Veränderung zu Wildtyp-Zellen festgestellt werden (Daten werden nicht gezeigt; Kapitel 5.3.2.2). Das gleiche Experiment wurde mit Zellen eines *mal3Δ* Mutantenstammes, der Peg1p-GFP exprimiert, durchgeführt. Auch hier war kein Unterschied in der Lokalisierung zu beobachten (Daten werden nicht gezeigt).

Das bedeutet, daß die mutanten Phänotypen des *peg1-1* bzw. *mal3Δ* Mutantenstammes zumindest nicht auf eine veränderte Lokalisierung des Mal3p- bzw. Peg1p-Proteins zurückzuführen sind.

#### **5.3.2.3.4 Ist in dem *peg1-1* Mutantenstamm möglicherweise die Funktion des Kinetochors beeinträchtigt ?**

Aufgrund der Tatsache, daß für Peg1p gezeigt wurde, daß dieses mit dem zentralen Kern der inneren Zentromer-Region assoziiert ist (Kapitel 5.3.2.2), war es von Interesse, ob in Zellen des *peg1-1* Mutantenstammes der Aufbau des Kinetochors und somit auch dessen Funktion möglicherweise beeinträchtigt ist. Mit Hilfe des Spc7p-Proteins -als Kinetochormarker- war es möglich, die Zentromere visuell zu verfolgen. Hierzu wurde ein *peg1-1* Mutantenstamm, der Spc7p-GFP exprimiert, hergestellt und dieser für 4 h bei der restriktiven Temperatur inkubiert. Nach Anfärbung des Spc7p-GFP-Proteins sowie des Mikrotubuli-Zytoskeletts mittels Immunofluoreszenz konnte in der darauffolgenden mikroskopischen Untersuchung hingegen keine Anomalien im Vergleich zu Wildtyp-Zellen festgestellt werden (Daten werden nicht gezeigt). Obwohl kleinste Veränderungen im Aufbau der Kinetochore, die mittels dieser Methode nicht detektiert werden können, nie vollkommen ausgeschlossen werden können, konnte in Zellen des *peg1-1* Mutantenstammes kein verändertes Verhalten der Kinetochore, wie es z.B. beim Auftreten von „Lagging“-Chromosomen der Fall ist, festgestellt werden.

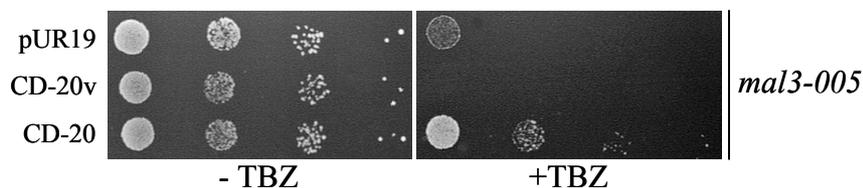
Während die bisher durchgeführten Untersuchungen allein der funktionellen Analyse des Peg1p-Proteins gewidmet waren, wurde bei den folgenden Experimenten versucht, mehr über die Verbindung zwischen Peg1p und Mal3p zu erfahren.

### 5.3.3 Inwieweit sind die Funktionen von Mal3p und Peg1p während der Mitose miteinander verknüpft ?

Bei dem *mal3-1* Multikopie-Suppressorscreen wurde das Genbank-Plasmid CD-20 isoliert, das nur den C-Terminus des *peg1*<sup>+</sup>-Gens enthielt. Da die Expression dieses verkürzten *peg1*<sup>+</sup>-Gens die TBZ-Sensitivität des *mal3-1* Mutantenstammes supprimieren konnte, war es von Interesse, ob die Expression des Vollängen-Gens auch eine Komplementation bewirkt. Bei dieser Untersuchung wurde eine unerwartete Beobachtung gemacht, die einen interessanten Aspekt in Bezug auf die Verbindung von Mal3p und Peg1p aufwarf.

#### 5.3.3.1 Die Expression des *peg1*<sup>+</sup>-Vollängen-Gens führt zu einem verschlechterten Wachstum von *mal3* Mutanten

Neben dem *peg1-1* Mutantenstamm wurde uns von Dr. Iain Hagan ein Plasmid zur Verfügung gestellt, in dem das 4510 Bp große *peg1*<sup>+</sup>-Gen unter Kontrolle des endogenen Promotors enthalten ist. Neben der 613 Bp langen Promotor-Region umfasst das Plasmid zusätzlich eine 618 Bp große Terminator-Region. In dem folgenden Experiment wurde die Vektorkontrolle pUR19, das Original-Genbank-Plasmid CD-20 und das zur Verfügung gestellte Plasmid CD-20v (Abb.5-26 A) in einen Wildtypstamm und in verschiedene *mal3* Mutantenstämme transformiert. Bei den verwendeten *mal3* Mutanten handelte es sich um den *mal3Δ*, *mal3-1*, *mal3-005* und *mal3-206* Mutantenstamm. Die Herstellung der beiden letzteren erfolgte durch Generierung von Punktmutationen in funktionell zu unterscheidende Domänen des *mal3*<sup>+</sup>-Gens (Christoph Beuter, unpublizierte Daten). Mit den entsprechenden Transformanten wurden serielle Tropftests durchgeführt, bei denen aufgrund der TBZ-Hypersensitivität der *mal3* Mutantenstämme das Wachstum auf TBZ-haltigen Platten untersucht wurde (Abb.5-33; Tab.5-13).



**Abb.5-33: Das Vollängen-Konstrukt erhöht in *mal3* Mutanten die Sensitivität gegenüber TBZ**

Der Tropftest zeigt das Wachstum des *mal3-005* Mutantenstammes, der jeweils mit dem Plasmid pUR19, CD-20v bzw. CD-20 transformiert wurde, auf MM (-ura) ohne bzw. mit TBZ (6,5 µg/ ml) bei 24 °C (Inkubationsdauer: 5 Tage).

Da an dieser Stelle nicht alle Daten gezeigt werden können, sind die Ergebnisse der seriellen Tropftests in Tab.5-13 zusammengefaßt.

	<i>mal3-005</i>		<i>mal3-1</i>		<i>mal3Δ</i>		<i>mal3-206</i>	
	TBZ		TBZ		TBZ		TBZ	
	5,5	6,5	5,5	6,5	5,5	6,5	5,5	6,5
CD-20v	--	--	---	---	-	-	---	---
CD-20	++	+++	++	+++	+++	++	++	+++

Tab.5-13: Auswirkungen der Expression des Vollängen-Konstrukts auf das Wachstum

Das Wachstum der unterschiedlichen *mal3* Mutantenstämme, die mit CD-20v und CD-20 transformiert waren, wurden bei 24 °C auf TBZ-haltigen Platten (5,5 bzw. 6,5 µg/ ml) untersucht (Inkubationsdauer: 5 Tage). Dabei wurde das Wachstum der Transformanten mit der entsprechenden Vektorkontrolle (nicht abgebildet) verglichen und die Ergebnisse tabellarisch zusammengefasst. Bei einem besseren Wachstum im Vergleich zur Vektorkontrolle wurden Plus-Zeichen (+: mittel; ++: stark), bei einem schlechteren Wachstum Minus-Zeichen verwendet (-: schwach; -: mittel; ---: stark).

In Abb.5-33 wird das Wachstum des *mal3-005* Mutantenstammes repräsentativ für alle *mal3* Mutanten gezeigt. Dabei konnte beobachtet werden, daß die Expression des Vollängen-Gens die Sensitivität gegenüber TBZ weiter verstärkte, während die verkürzte Version eine Suppression der TBZ-Sensitivität der *mal3* Mutantenstämme bewirkte (repräsentativ für das Wachstum aller *mal3* Mutanten auf TBZ-haltigen Platten: Abb.5-33, +TBZ). Des weiteren zeigten *mal3-1* Zellen, die mit dem Vollängen-Konstrukt transformiert waren, sogar schwächeres Wachstum auf Platten ohne TBZ im Vergleich zur Vektorkontrolle (Daten werden nicht gezeigt). Diese Beobachtung war sehr überraschend. Da die Expression des Vollängen-Konstrukts in keinsten Weise eine Auswirkung auf das Kolonien-Wachstum des Wildtypstammes hatte (Daten werden nicht gezeigt), konnte davon ausgegangen werden, daß diese Ausprägungen spezifisch für die hier untersuchten Mutantenstämme sind und somit das Mal3p und das Peg1p-Protein eine Rolle in demselben Prozeß spielen. Des weiteren deuten die Versuchsergebnisse darauf hin, daß das Vollängen-Genprodukt von dem verkürzten Genprodukt funktionell zu unterscheiden ist. Die Tatsache, daß das Vollängen-Genprodukt nicht supprimiert, sondern den gegenteiligen Effekt bewirkt, führt zu der Vermutung, daß das Vollängen-Peg1p und das Mal3p-Protein zwar eine Rolle im gleichen mitotischen Prozeß spielen, aber die Funktionen der beiden Proteinen entgegengesetzt zueinander sind. Diese Vermutung wurde durch eine Beobachtung, die von Christoph Beuter aus unserer Arbeitsgruppe gemacht wurde, erhärtet. Er konnte zeigen, daß *peg1-1mal3Δ* Doppelmutanten bei der jeweiligen restriktiven Bedingung besseres Wachstum aufwiesen, als die entsprechenden Einzelmутanten. Das bedeutet, während die Abwesenheit des Mal3p-Proteins die Temperatur-Sensitivität des *peg1-1* Mutantenstammes supprimieren konnte, bewirkte die Anwesenheit des defekten Peg1p-Proteins eine Komplementation der TBZ-Hypersensitivität

des *mal3Δ* Mutantenstammes. Aus diesem Grunde war es von Interesse, ob in Zellen der Doppelmutante auch ein Rückgang der Anomalien, die die Einzelmutanten während der Mitose aufweisen, festzustellen ist.

### 5.3.3.2 Die *peg1-1mal3Δ* Doppelmutanten zeigen einen Rückgang der mitotischen Anomalien

Hierzu wurden Zellen sowohl der *peg1-1* bzw. *mal3Δ* Einzelmutanten, als auch der *peg1-1 mal3Δ* Doppelmutante für 6 h bei 34 °C inkubiert und in diesen mittels Immunofluoreszenz das Mikrotubuli-Zytoskelett sowie durch DAPI-Behandlung das Chromatin angefärbt. Zunächst wurden generelle mitotische Defekte untersucht. Dabei wurde zum einen der prozentuale Anteil an Anaphasen-Zellen, bei denen eine Fehlverteilung des Chromatins beobachtet werden konnte, zum anderen der Anteil an mitotischen Zellen mit abnormen Mitosen bestimmt.

	<b>genereller Defekt:</b>	<b>genereller Defekt:</b>	<b><i>mal3-1</i> Anomalie:</b>	<b><i>peg1-1</i> Anomalie:</b>	<b><i>peg1-1</i> Anomalie:</b>	<b><i>peg1-1</i> Anomalie:</b>
	DNA-Fehlverteilung	abnorme Mitosen	Anteil an Metaphasen	Kategorie 1 monopolare Spindeln	Kategorie 2 Spindeln mit herausragenden Mikrotubuli-bündeln	Kategorie 3 Spindel-Anomalien
Wt	0	0	24,1	0	0	0
<i>mal3Δ</i>	12,5	33,3	37,5	0	0	(33,3)
<i>peg1-1</i>	29,2	74,3	27,3	6,1	25,8	42,4
<i>peg1-1 mal3Δ</i>	18,7	55,1	15,7	4,5	12,4	38,2

Tab.5-14: Analyse der *peg1-1mal3Δ* Phänotypen

Schematische Darstellung der Ergebnisse der Immunofluoreszenz-Mikroskopie. Die untersuchten Phänotypen wurden in generelle Defekte und in Defekte, die für den *mal3-1* bzw. *peg1-1* Mutantenstamm spezifisch sind, eingeteilt. Dabei wurde für die *mal3Δ* bzw. *peg1-1* Einzelmutante als auch für *peg1-1mal3Δ* Doppelmutante der prozentuale Anteil bestimmter Phänotypen an Anaphasen-Zellen (DNA-Fehlverteilung) bzw. an mitotischen Zellen (abnorme Mitosen, Metaphasen-Zellen, Zellen mit monopolarer Spindel, Zellen mit aus der Spindel herausragenden Mikrotubulibündeln sowie Zellen mit Spindel-Anomalien) bestimmt. Die Eintragung für Wildtypzellen stammt aus Literaturangaben und wurde nicht experimentell erhoben. Mitotische *mal3Δ* Zellen mit Spindel-Anomalien wurden in Kategorie 3 eingeteilt, obwohl die Art dieser Anomalien von denen des *peg1-1* bzw. *peg1-1mal3Δ* Mutantenstammes zu unterscheiden ist und aus diesem Grunde in Klammern steht. Die Anzucht der entsprechenden Stämme erfolgte in flüssigem Vollmedium für 6 h bei 34 °C. Anfärbung der Tubulinstrukturen erfolgte mittels Immunofluoreszenz, Anfärbung des Chromatin durch DAPI-Behandlung.

Wie Tab.5-14 zu entnehmen ist, lag der prozentuale Anteil an *peg1-1mal3Δ* Zellen mit DNA-Fehlverteilung als auch mit abnormen Mitosen zwischen den jeweiligen Werten der Einzelmutanten. Das bedeutet, die Abwesenheit des Mal3p-Proteins in der *peg1-1mal3Δ* Doppelmutante führte zu einem niedrigeren Anteil an Zellen mit Chromosomen-Missegregation und abnormen Mitosen im Vergleich zu der *peg1-1* Einzelmutante. Des weiteren wurden Zellen der Doppelmutante auf die spezifischen Phänotypen der *peg1-1* bzw.

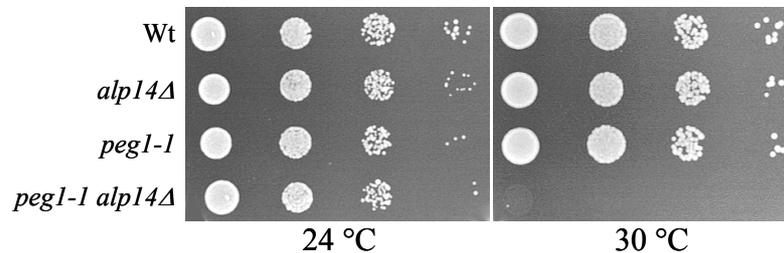
*mal3Δ* Einzelmutante hin untersucht. Da mitotische Zellen des *mal3Δ* Mutantenstammes eine Anreicherung an Metaphasen-Zellen aufweisen, wurde bei der *peg1-1mal3Δ* Doppelmutante der prozentuale Anteil an Metaphasen-Zellen bestimmt (Beinhauer et al., 1997). Hierbei konnte ebenfalls ein Rückgang beobachtet werden, der allerdings mit 15,7 % unter dem Wert lag, der für Wildtypzellen beschrieben wurde (Hagan und Hyams, 1988). Wie bereits in Kapitel 5.3.2.3.2 beschrieben wurde, konnten die mitotischen Defekte des *peg1-1* Mutantenstammes in drei unterschiedliche Kategorien eingeteilt werden. Zellen mit monopolarer Spindel wurden der ersten Kategorie zugewiesen, während die Zellen, bei denen Mikrotubulibündel aus der bipolaren Spindel herausragten, in die zweite Kategorie eingeteilt wurden. Als letzte Kategorie wurden Zellen gewählt, die generell Spindel- bzw. Astral-Mikrotubuli-Anomalien zeigten. Nach Untersuchung der *peg1-1mal3Δ* Doppelmutante bezüglich dieser drei *peg1-1* spezifischen Defekte konnte im Vergleich zu der *peg1-1* Einzelmutante auch hier ein verringerter prozentualer Anteil an Zellen der entsprechenden Kategorie festgestellt werden. Die resultierenden Daten zeigen zum einen, daß ein funktionell beeinträchtigtes Peg1p-Protein in dem *mal3Δ* Mutantenstamm den mitotischen *mal3Δ* Phänotyp komplementieren kann, zum anderen, daß die Abwesenheit des Mal3p-Proteins zu einer Suppression der mitotischen Defekte des *peg1-1* Mutantenstammes führt. Diese Beobachtung erhärtet die bereits in Kapitel 5.3.3.1 aufgestellte Vermutung, daß Peg1p und Mal3p Proteine mit entgegengesetzter Funktion sind. Dabei scheint es, daß die gleichzeitige Anwesenheit beider Proteine ein ausgewogenes Gleichgewicht in einem spezifischen mitotischen Prozeß bewirkt, und dieses Gleichgewicht verloren geht, sobald eines dieser beiden Proteine seine Funktion nicht bzw. eingeschränkt ausführen kann.

### **5.3.3.3 Untersuchung auf genetische Interaktion zwischen *peg1*<sup>+</sup> und *alp14*<sup>+</sup>, einem Gen, das für ein weiteres Mikrotubuli-Plus-End-bindendes Protein kodiert**

Im Rahmen der Doktorarbeit wurde von Dr. Corina Vietmeier-Decker untersucht, ob zwischen *mal3*<sup>+</sup> und *alp14*<sup>+</sup>, einem weiteren Gen, das für ein Mikrotubuli-Plus-End-bindendes Protein kodiert, eine genetische Interaktion besteht (Nakaseko et al., 2001; Garcia et al., 2001). Dabei stellte sich heraus, daß *mal3Δalp14Δ* Doppelmutanten nicht überlebensfähig waren (Vietmeier-Decker, 2004). Aufgrund dieser Beobachtung war es von Interesse, ob *peg1*<sup>+</sup> und *alp14*<sup>+</sup> auch miteinander genetisch interagieren.

Für diesen Versuch wurden *peg1-1alp14Δ* Doppelmutanten hergestellt und mit den entsprechenden Stämmen der Tetrade serielle Tropftests bei Temperaturen von 24 °C bis 35 °C durchgeführt. Während bei 24 °C und 28 °C bei allen Stämmen gleich gutes Wachstum

beobachtet werden konnte (repräsentativ für 28 °C: Wachstum bei 24 °C, Abb.5-34), zeigten die *peg1-1alp14Δ* Doppelmutanten bereits ab einer Temperatur von 30 °C kein bzw. ein nur sehr schwaches Wachstum (Abb.5-34: Beispiel für kein Wachstum).



**Abb.5-34: *peg1<sup>+</sup>* und *alp14<sup>+</sup>* zeigen genetische Interaktion**

Der Tropftest zeigt das Wachstum des Wildtyps (Wt), der *peg1-1* bzw. *alp14Δ* Einzelmutanten sowie der *peg1-1 alp14Δ* Doppelmutante auf Vollmediums-Platten bei 24 °C und 30 °C (Inkubationsdauer: 24 °C: 5 Tage; 30 °C: 4 Tage).

Das bedeutet, während die Abwesenheit des Mal3p-Proteins eine Suppression der Temperatur-Sensitivität des *peg1-1* Mutantenstammes bewirkt (nicht publizierte Daten, Beuter und Fleig), führt die Abwesenheit von Alp14p zu einer erhöhten Temperatur-Sensitivität in der *peg1-1* Mutante. Aufgrund dieser Daten war es von Interesse, das Wachstum von Stämmen zu untersuchen, bei denen gleich alle drei Genprodukte fehlten bzw. defekt waren. Hierfür wurden durch Kreuzung der Doppelmutante *peg1-1mal3Δ* bzw. *peg1-1alp14Δ* und anschließender Tetradenanalyse *peg1-1mal3Δalp14Δ* Dreifachmutanten hergestellt. Im Anschluß wurden mit den resultierenden Stämmen der jeweiligen Tetrade serielle Tropftests durchgeführt und die entsprechenden Ergebnisse in Tab.5-15 zusammengefasst.

	24 °C	28 °C	30 °C	32 °C	35 °C
<i>peg1-1</i>	+	++	++	++	--
<i>peg1-1mal3Δ</i>	++	++	++	++	++
<i>peg1-1alp14Δ</i>	+	+	-/ --	--	--
<i>peg1-1mal3Δalp14Δ</i>	-	+	+	-	--

**Tab.5-15 : Untersuchung des Wachstum des *peg1-1mal3Δalp14Δ* Dreifachmutantenstammes**

Das Wachstum der *peg1-1* Einzelmutante, der *peg1-1mal3Δ* bzw. *peg1-1alp14Δ* Doppelmutante sowie *peg1-1 mal3Δalp14Δ* Dreifachmutante wurde mittels serieller Tropftests auf Vollmediums-Platten bei 24 °C bis 35 °C untersucht (Inkubationsdauer: 4 Tage). Dabei wurde die Art des Wachstums der jeweiligen Stämme tabellarisch zusammengefasst (--: kein Wachstum; -: sehr schwach; +: gut; ++: sehr gut).

Dabei war das Wachstum der Dreifachmutante sehr unterschiedlich bei den untersuchten Temperaturen. Während Zellen der Dreifachmutante bei 28 °C und 30 °C gutes Wachstum zeigten, konnte hingegen bei einer Erniedrigung als auch Erhöhung der Inkubationstemperatur kein bzw. nur sehr schwaches Wachstum festgestellt werden. Beim direkten Vergleich des

Wachstums der Dreifachmutante mit dem der *peg1-1mal3Δ* Doppelmutante konnte festgestellt werden, daß die Dreifachmutante bei allen Temperaturen ein schlechteres Wachstum aufwies. Das bedeutet, die zusätzliche Abwesenheit von Alp14p hat einen negativen Einfluß auf das Wachstum.

Mit der Herstellung der *peg1-1alp14Δ* Doppelmutanten und der Beobachtung von synthetischer Letalität konnte, wie für *mal3<sup>+</sup>* und *alp14<sup>+</sup>*, eine genetische Interaktion zwischen *peg1<sup>+</sup>* und *alp14<sup>+</sup>* nachgewiesen werden (Vietmeier-Decker, 2004). Die Beobachtung von additiven Phänotypen impliziert, daß Alp14p im gleichen mitotischen Prozeß mitwirkt, in dem Peg1p und Mal3p eine Rolle spielen.

Mit der Isolation des Peg1p-Proteins wurde ein neues *S. pombe* Zentromer- bzw. Mikrotubuli-assoziiertes Protein entdeckt, daß eine Funktion im Aufbau und der Aufrechterhaltung der bipolaren mitotischen Spindel ausübt. Zusätzlich implizieren die erhaltenen Daten, daß es sich bei Peg1p vermutlich um einen funktionellen „Gegenspieler“ von Mal3p handelt.

## 6 Diskussion

Unsere Arbeitsgruppe ist an der Aufklärung der molekularen Prozesse interessiert, die eine präzise Verteilung des genetischen Materials während der Mitose gewährleisten. Im Rahmen meiner Doktorarbeit erfolgte zum einen die Isolation und Charakterisierung neuer mitotischer Komponenten der Spalthefe *S. pombe*, zum anderen wurde mit der funktionellen Analyse bereits charakterisierter mitotischer Proteine fortgefahren.

Dabei konnte mit dieser Arbeit gezeigt werden, daß alle hier behandelten Proteine, d.h. sowohl die neu identifizierten als auch die bereits charakterisierten mitotischen Komponenten Gemeinsamkeiten in ihrer Funktion aufweisen. Neben einer Rolle beim Aufbau der mitotischen Spindel agieren alle bei der Verknüpfung von Spindel-Mikrotubuli mit dem Kinetochor.

### 6.1 Welche Rolle übernimmt das Mal16p-Protein während der Mitose ?

Auf der Suche nach einer neuen Komponente der Chromosomen-Segregation in *S. pombe* erfolgte die nähere Charakterisierung des temperatursensitiven *mal16-1* Mutantenstammes, bei der sich herausstellte, daß das entsprechende Genprodukt, das Mal16p-Protein, eine Funktion in der Mitose ausübt.

Obwohl es mittels mehrerer Komplementationsversuche nicht möglich war, das *mal16<sup>+</sup>*-Wildtyp-Gen zu isolieren, konnte die chromosomale Region, in der das Wildtyp-Gen lokalisiert ist, mit Hilfe einer Genkartierung eingegrenzt, jedoch aus Zeitgründen noch nicht endgültig bestimmt werden. Ausgehend von einer *S. pombe* Genomgröße von 13,8 Mbp wurde der Bereich bereits auf 21 Kbp eingeschränkt. Somit steht fest, daß das *mal16<sup>+</sup>*-Wildtyp-Gen auf dem linken Arm des Chromosom I ca. 400 Kbp vom Zentromer entfernt liegt. In diesem eingegrenzten Bereich des Chromosom I sind 10 Gene lokalisiert, die als *mal16<sup>+</sup>*-Wildtyp-Gen in Frage kommen. Während es sich bei 7 dieser 10 um bislang uncharakterisierte Gene handelt, ist die Funktion von 3 Genen bzw. Genprodukten bereits bekannt. Dabei spielen letztere in Prozessen, wie DNA-Reparatur, Degradation bzw. Prozessierung von Paarungspheromonen und Zellwand-Aufbau eine Rolle, aber für keines dieser konnte bislang ein Bezug zur Mitose hergestellt werden (Lu und Fawcett, 1998; Chang und Lu, 2002; Imai und Yamamoto, 1992; Hughes und Davey, 1997; Ribas et al., 1991; Diaz et al., 1993). Da mit dieser Arbeit gezeigt werden konnte, daß Mal16p in den mitotischen

Prozess involviert ist, handelt es sich vermutlich bei dem Mal16p-Protein um eines der 7 bisher uncharakterisierten Genprodukte. Die Rolle, die Mal16p während der Mitose übernimmt, wird im folgenden diskutiert.

Zellen des *mal16-1* Mutantenstammes zeigen unterschiedliche Defekte während der Mitose, die auf mehr als nur eine mitotischen Rolle des Mal16p-Proteins schließen lassen. Neben einem Defekt im Aufbau der Struktur der Metaphasenspindel weisen *mal16-1* Anaphasen-Zellen bei der restriktiven Temperatur eine abnorme Chromatin-Verteilung auf, die unter anderem durch eine fehlende Trennung der Schwesterchromatiden hervorgerufen wird.

Dieser Defekt bei der Trennung der Schwesterchromatiden als auch der in *mal16-1* Zellen beobachtete „Lagging“-Chromosomen-Phänotyp kann verschiedene Ursachen haben. Dabei sind diese mutanten Phänotypen ein typisches Merkmal von Mutantenstämmen, in denen entweder Kinetochorproteine oder mitotische Komponenten, die eine Funktion bei Spindel-Kinetochor-Interaktionen besitzen, defekt sind (Ohkura et al., 1988; Fleig et al., 1996; Saitoh et al., 1997; Goshima et al., 1999; Nakaseko et al., 2001; Garcia et al., 2001; Jin et al., 2002; Pidoux et al., 2003).

So wurde für die Kohäsionsmutante *rad21-K1* ein Defekt bei der Trennung der Schwesterchromatiden beschrieben (Tatebayashi et al., 1998). Rad21p ist eine Komponente des Kohesin-Komplexes und als solche mit Chromatin, insbesondere mit der äußeren Zentromer-Region, assoziiert. Dabei wird die proteolytische Spaltung von Rad21p für die Trennung der Schwesterchromatiden während der Anaphase benötigt (Tomonaga et al., 2000; Toyoda et al., 2002; Partridge et al., 2002). Auch Mutationen in Genen, die für innere Zentromerproteine kodieren, führen zu einer fehlenden Trennung der Schwesterchromatiden und „Lagging“-Chromosomen, wie z.B. bei einer funktionellen Beeinträchtigung der inneren Zentromerproteine Mal2p und Sim4p (Fleig et al., 1996; Jin et al., 2002; Pidoux et al., 2003).

Obwohl die oben genannten *mal16-1* Phänotypen sowie die starke genetische Interaktion zwischen *mal16<sup>+</sup>* und *mal2<sup>+</sup>* die Funktion von Mal16p mit dem Kinetochor in Verbindung setzt, ist es unwahrscheinlich, daß es sich bei Mal16p um ein Kinetochorprotein *per se* handelt, da für alle bisherigen Kinetochormutanten keine morphologisch sichtbare Beeinträchtigung des Mikrotubuli-Zytoskeletts -wie es für den *mal16-1* Mutantenstamm der Fall ist- nachgewiesen werden konnte.

Die erhaltenen Daten deuten darauf hin, daß Mal16p in seiner Funktion den Komponenten zweier unterschiedlicher Proteingruppen ähnelt; zum einen den Mikrotubuli-assoziierten bzw. Mikrotubuli-Plus-End-bindenden Proteinen, wie z.B. Alp14p und Mal3p, zum anderen den

unter dem englischen Begriff bekannten „chromosomal passenger“ Proteinen, wie z.B. dem Ark1p-Protein. Funktionelle Beeinträchtigungen von Komponenten beider Proteingruppen führen sowohl zu einem Defekt bei der Trennung der Schwesterchromatiden als auch zu mitotischen Spindel-Anomalien (Beinhauer et al., 1997; Nakaseko et al., 2001; Garcia et al., 2001; Petersen et al., 2001). Dabei zeigen die Proteine beider Gruppen eine zellzyklusphasenabhängige Assoziation mit dem Kinetochor und Spindel-Mikrotubuli, jedoch ist die zeitliche Reihenfolge dieser Assoziation zu unterscheiden. Während Mikrotubuli-Plus-End-bindende Proteine Mikrotubuli zur Kinetochor-Lokalisierung benötigen und im Verlauf der Mitose bei diesen die Bewegung von den Spindel-Mikrotubuli zum Kinetochor erfolgt, wandern die sogenannten „chromosomal passenger“ Proteine -im Gegensatz dazu- von den Zentromeren auf die Spindel-Mitte.

So wurden für die *alp14* Mutanten neben einer abnormen Segregation der Schwesterchromatiden auch Defekte im Aufbau einer mitotischen Spindel festgestellt, die ebenso wie in Zellen des *mal16-1* Mutantenstammes zur Aktivierung des mitotischen Spindel-Kontrollpunktes führen (He et al., 1998; Garcia et al., 2001). Als Mitglied der evolutionär konservierten XMAP215/TOG-Familie wird Alp14p eine wichtige Bedeutung bei der Regulation der Dynamik an den Plus-Enden der Mikrotubuli zugesagt (Übersichtsartikel: Andersen, 2000; Tournebize et al., 2000; Spittle et al., 2000; Garcia et al., 2001; Kinoshita et al., 2002). Aufgrund der transienten Kinetochor-Lokalisierung wird davon ausgegangen, daß Alp14p eine Funktion bei der Verknüpfung von Spindel-Mikrotubuli und Kinetochor übernimmt (Nakaseko et al., 2001; Garcia et al., 2001; Garcia et al., 2002).

Die Anomalien der Metaphasen-Spindel in *mal16-1* Zellen bestehen zum einen in einer gebogenen Struktur, die möglicherweise auf eine fehlende Erzeugung der Spindel-Spannung zurückzuführen ist und diese für die Verknüpfung von Spindel und Kinetochor benötigt wird. Zum anderen zeigt diese nur eine sehr schwache Anfärbung, was vermutlich durch eine geringere Anzahl von Mikrotubuli-Bündeln innerhalb der Metaphasenspindel hervorgerufen wird. Letztere Beobachtung wurde ebenfalls in Zellen des *alp14Δ* als auch *mal3Δ* Mutantenstammes gemacht (Garcia et al., 2001; Beinhauer et al., 1997).

Mal3p weist als Mitglied der evolutionär konservierten EB1-Familie Mikrotubuli-assoziiierter Proteine eine präferentielle Assoziation mit Mikrotubuli-Plus-Enden auf und spielt eine Rolle bei der Anheftung der Mikrotubuli-Plus-Enden an das Kinetochor (Tirnauer et al., 1999; Berrueta et al., 1998; Morrison et al., 1998; Juwana et al., 1999; Mimori-Kiyosue et al., 2000; Rehberg und Graf, 2002; Browning et al., 2003; Busch und Brunner, 2004). Neben dem ähnlichen mitotischen Spindel-Defekt deutet des weiteren die bestehende genetische

Interaktion zwischen *mal16*<sup>+</sup> und *mal3*<sup>+</sup> auf eine Funktion von Mal16p im gleichen Prozeß wie Mal3p hin, was eine Rolle von Mal16p bei der Verknüpfung von Spindel-Mikrotubuli mit dem Kinetochor impliziert.

Dadurch, daß *mal16-1* Zellen bei der restriktiven Temperatur einen starken „Elongationsphänotyp“ aufweisen und dieser Phänotyp bei Mutanten auftritt, die als Regulatoren -wie z.B. die SpRan GTPase Spi1p- nicht nur mitotische, sondern weitere zelluläre Prozesse beeinflussen, wird davon ausgegangen, daß dies auch auf das Mal16p-Protein zutrifft (Übersichtsartikel: Sazer und Dasso, 2000; Fleig et al., 2000). Bei der Literaturrecherche nach Proteinen, die ähnliche Phänotypen im Vergleich zu dem *mal16-1* Mutantenstamm aufweisen, wurde Ark1p gefunden (Petersen et al., 2001; Leverson et al., 2002; Petersen und Hagan, 2003). Dem Ark1p-Protein, das homolog zu den Aurora Kinasen A und B höherer Eukaryoten ist, wird -wie allen „chromosomal passenger“- Proteinen- eine Regulation unterschiedlicher mitotischer Prozesse zugeordnet. Die Abwesenheit von Ark1p führt in Zellen zu verschiedenen Defekten, wie z.B. einer fehlenden Trennung der Schwesterchromatiden, dem „Lagging“-Chromosom-Phänotyp, stark elongierten Zellen und Defekten im Aufbau der mitotischen Spindel (Petersen et al., 2001). Des weiteren zeigen Zellen, denen Ark1p fehlt, einen Defekt in der Chromosomen-Kompaktierung, der dem in *mal16-1* Zellen sehr ähnelt (Petersen et al., 2001). Aufgrund der Tatsache, daß es sich bei Ark1p um einen Regulator unterschiedlicher mitotischer Prozesse handelt und die Phänotypen des *mal16-1* Mutantenstammes denen bei Abwesenheit von Ark1 gleichen, wird impliziert, daß Mal16p ebenfalls verschiedene Funktionen während der Mitose ausführt.

Abschließend kann festgehalten werden, daß durch die nähere Charakterisierung eines neuen *mal* Mutantenstammes das Mal16p-Protein als eine bislang unbekannte mitotische Komponente identifiziert werden konnte, die neben einer möglichen Funktion in anderweitigen zellulären Prozessen unterschiedliche Rollen während der Mitose ausübt. Dabei existieren zwei dieser Rollen sowohl bei dem strukturellen Aufbau der Metaphasenspindel als auch bei der Verknüpfung von Spindel-Mikrotubuli und Kinetochor.

## 6.2 Funktionelle Analyse der SpRan GTPase während der Mitose

Das *S. pombe* *spi1*<sup>+</sup>-Gen kodiert für Ran, eine kleine GTPase der evolutionär konservierten Ras-Familie (Übersichtsartikel: Sazer, 1996). Wie alle GTPasen tritt Ran entweder in einer GTP-gebundenen oder in einer GDP-gebundenen Form auf und in Abhängigkeit von dieser interagiert Ran mit unterschiedlichen regulatorischen Proteinen (Boguski und McCormick, 1993; Übersichtsartikel: Sazer, 1996). Aufgrund einer asymmetrischen zellulären Verteilung von Ran und seinen Regulatoren liegt Ran im Zellkern primär in der GTP-gebundenen, im Zytoplasma hingegen präferentiell in der GDP-gebundenen Form vor (Übersichtsartikel: Sazer, 1996; Übersichtsartikel: Sazer und Dasso, 2000). Dabei wird dieser „steile“ Ran-Gradient über der Kernmembran für die Funktion von Ran im nukleozytoplasmatischen Kerntransport benötigt (Übersichtsartikel: Görlich, 1998).

Seit langem wurde *in vitro* Untersuchungen zufolge für Ran -neben einer Rolle im Kerntransport- eine Funktion im Aufbau der mitotischen Spindel angenommen, wobei der *in vivo* Beweis hierfür in unserer Arbeitsgruppe erbracht wurde (Fleig et al., 2000). Mit der Isolation des *spi1-25* Mutantenstammes wurde zum allerersten Mal ein mutiertes Allel des *spi1*<sup>+</sup>-Gens identifiziert, das zu aberranter Mitose in Zellen des Mutantenstammes führt und diese mitotischen Anomalien unabhängig vom nukleozytoplasmatischen Kerntransport sind (Fleig et al., 2000).

Untersuchungen, die während meiner Diplomarbeit durchgeführt wurden, gaben unter anderem Hinweise auf eine Funktion von Spi1p bei der Organisation bzw. Stabilisierung von Mikrotubuli (Karig, 2000). Dabei wird davon ausgegangen, daß Spi1p bzw. Ran nicht direkt in der Mikrotubuli-Integrität involviert ist, sondern vermutlich über Interaktion mit regulatorischen bzw. mitotischen Proteinen die Stabilität von Mikrotubuli reguliert (Fleig et al., 2000; Karig, 2000). Um auf die genaue Funktion von Spi1p bzw. Ran schließen zu können, wurde versucht, die mitotischen Proteine, über die Ran diesen Prozeß reguliert, zu identifizieren.

### 6.2.1 Die SpRan GTPase beeinflusst die Funktion des Minus-Endgerichteten Motorproteins Klp2p

Einer der Hauptdefekte des *spi1-25* Mutantenstammes ist die Unfähigkeit, eine bipolare Spindel zu bilden, und somit weisen *spi1-25* Zellen nur eine monopolare Spindel auf (Fleig et al., 2000). Mutationen in dem Motorprotein Cut7p führen ebenfalls zu diesem Defekt (Hagan und Yanagida, 1990). Dabei handelt es sich bei Cut7p um ein Kinesin der konservierten BimC-Familie (Hagan und Yanagida, 1990; Hagan und Yanagida, 1992).

Entsprechend ihrer Funktionen werden Motorproteine unterschiedlichen Klassen zugeordnet, wobei eine dieser, die Klasse der Plus-End-gerichteten Motorproteine, allein durch Cut7p in *S. pombe* repräsentiert wird (Hagan und Yanagida, 1990; Hagan und Yanagida, 1992). Als antagonistische Kraft zu dem Plus-End-gerichteten Motorprotein wirken die Minus-End-gerichteten Spindel-Kinesine Pkl1p und Klp2p (Pidoux et al., 1996; Troxell et al., 2001).

Bei der Untersuchung nach genetischer Interaktion zwischen *spi1*<sup>+</sup> und *cut7*<sup>+</sup> stellte sich heraus, daß *spi1-25cut*<sup>ts</sup> Doppelmutanten ein leicht verbessertes Wachstum im Vergleich zu den Einzelmutanten aufweisen. Ebenso wie die Anwesenheit der *spi1-25* Mutation die Temperatur-Sensitivität der *cut7*<sup>ts</sup> Mutanten partiell supprimieren kann, bewirkt die *cut7*<sup>ts</sup> Mutation eine schwache Komplementation des verlangsamten Wachstums der *spi1-25* Mutante. Dabei handelt es sich um allelspezifische Suppressionen, die darauf hindeuten, daß Spi1p und Cut7p zueinander entgegengesetzte Funktionen in demselben Prozeß ausüben. Da die Abwesenheit des *pkl1*<sup>+</sup>-Gens bzw. des *klp2*<sup>+</sup>-Gens ebenfalls zu einer allelspezifischen Suppression der Temperatur-Sensitivität von *cut7*<sup>ts</sup> Mutantenstämme führt, wurde mittels Untersuchung nach genetischer Interaktion überprüft, ob Spi1p möglicherweise die Funktion von Pkl1p oder Klp2p beeinflusst (Pidoux et al., 1996; Troxell et al., 2001). Dabei konnte festgestellt werden, daß *pkl1Δspi1-25* Doppelmutanten ein verschlechtertes Wachstum im Vergleich zu den Einzelmutanten aufweisen, während das Wachstum der *klp2Δspi1-25* Doppelmutanten keinen Unterschied zu dem der *spi1-25* Einzelmutante zeigt.

Für den Aufbau und die Aufrechterhaltung der Bipolarität der mitotischen Spindel wird ein Gleichgewicht zwischen den entgegengesetzten Kräften von Plus-End-gerichteten und Minus-End-gerichteten Motorproteinen benötigt (Übersichtsartikel: Wittmann et al., 2001). Dabei führt eine Beeinträchtigung dieses Gleichgewichtes neben einem Verlust der Bipolarität auch zu einem Defekt in der Separation der SPKs in der Prophase (Übersichtsartikel: Sharp et al., 2000; Übersichtsartikel: Wittmann et al., 2001). Da Zellen des *spi1-25* Mutantenstammes zum einen einen Defekt im Aufbau einer bipolaren Spindel aufweisen, zum anderen eine Anreicherung von Prophasen-Zellen zeigen, bei denen öfteren kaum separierte SPKs zu beobachten sind, wird die Vermutung erhärtet, daß in *spi1-25* Zellen das Gleichgewicht zwischen den verschiedenen Motorproteinen beeinträchtigt ist (Fleig et al., 2000). Aufgrund der Beobachtung, daß die gleichzeitige Beeinträchtigung der SpRan GTPase und des Cut7p-Proteins zu einem verbesserten Wachstum führt, läßt darauf schließen, daß in den Doppelmutanten das Gleichgewicht zwischen den funktionell zu unterscheidenden Motorproteinen im Vergleich zu den Einzelmutanten besser eingestellt ist. Dabei scheint es, daß in dem *spi1-25* Mutantenstamm die Balance auf Seite der Minus-End-gerichteten

Motorproteine gestört ist, was durch die Feststellung des verschlechtertes Wachstum der *pk11Δspi1-25* Doppelmutanten im Vergleich zu den Einzelmutanten bestätigt wurde. Durch die Entdeckung, daß die *klp2Δspi1-25* Doppelmutanten unverändertes Wachstum im Vergleich zu der *spi1-25* Einzelmutante aufweisen, konnte gezeigt werden, daß die SpRan GTPase in derselben Reaktionskaskade wie Klp2p wirkt und die Funktion dieses Minus-End-gerichteten Motorproteins beeinflusst (Abb.6-1).

Da *klp2Δ* Einzelmutanten als auch *pk11Δklp2Δ* Doppelmutanten gleiches Wachstum wie Wildtypzellen aufweisen, bedeutet dies, daß andere Motorproteine oder mitotische Komponenten die Funktion dieser übernehmen können, und die Funktionen somit redundant sein müssen (Pidoux et al., 1996; Troxell et al., 2001). Aufgrunddessen, daß der *spi1-25* Mutantenstamm im Vergleich zur *klp2Δ* Einzelmutante unter anderem einen Wachstumsdefekt aufweist, kann davon ausgegangen werden, daß Spi1p -neben dem Spindel-Kinesin Klp2p- die Funktion zusätzlicher mitotischer Komponenten reguliert, die in der *spi1-25* Mutante gestört sind.

In Übereinstimmung mit den erhaltenen Ergebnissen konnte in einer neuesten *in vitro* Untersuchung gezeigt werden, daß die Aktivität zur Bündelung von Mikrotubuli durch das „Minus-End-gerichtete“ Motorprotein XCTK2 und ebenfalls die MT-Assoziation dieses Proteins durch die Ran GTPase und die Import-Faktoren Importin  $\alpha/\beta$  reguliert werden (Ems-McClung et al., 2004). Es wird angenommen, daß die Regulation von Ran zwar über die gleichen nukleären Transport-Faktoren erfolgt, die eine Rolle beim nukleozytoplasmatischen Kerntransport spielen, aber dennoch unabhängig von diesem agieren (Gruss et al., 2001; Nachury et al., 2001; Schatz et al., 2003).

### **6.2.2 Die SpRan GTPase wird für die Interaktion zwischen Spindel-Mikrotubuli und Kinetochor benötigt**

Neben einem Einfluß auf den Aufbau einer bipolaren Spindel wurde in *in vitro* Studien Hinweise auf weitere mögliche Funktionen von Ran während der Mitose erhalten. Dabei implizieren die Ergebnisse dieser Studien, daß das Ran GTPase System die Funktion des Kinetochors reguliert. Des weiteren werden Vermutungen geäußert, daß dieses ebenfalls für die Interaktion zwischen Spindel-Mikrotubuli und Kinetochor benötigt wird (Bamba et al., 2002; Joseph et al., 2002; Arnaoutov und Dasso, 2003; Joseph et al., 2004).

Mit der Isolation extragener *spi1-25* Multikopie-Suppressoren und der anschließenden näheren Charakterisierung der entsprechenden Genprodukte wurden das Mikrotubuli-assoziierte Mal3p-Protein, das Kinetochorprotein Spc7p und das bislang unbekannte

Mikrotubuli-assoziierte *S. pombe* Protein SpDam1p identifiziert (Karig, 2000). Wie im folgenden Kapitel beschrieben wird, handelt es sich bei diesen *sp1-25* Suppressoren um Proteine, die für die Verknüpfung von Spindel-Mikrotubuli und Kinetochor benötigt werden (Kerres et al., 2004).

#### **6.2.2.1 SpRan spielt eine Rolle bei der Interaktion zwischen dem Kinetochorprotein Spc7p und dem Mikrotubuli-assoziierten Mal3p-Protein**

Dem Mal3p-Protein wird als evolutionär konserviertes Mitglied der EB1-Familie und somit als Mikrotubuli-Plus-End-bindendes Protein eine Funktion bei der Regulation der Mikrotubuli-Dynamik an den Kinetochoren zugeschrieben (Beinhauer et al., 1997; Dujardin et al., 1998; Lin et al., 2001; Browning et al., 2003; Busch und Brunner, 2004; Kerres et al., 2004). Eine Vielzahl an Studien belegen, daß Mitglieder der EB1-Familie eine Assoziation mit dem Kinetochor aufweisen und diese eine Rolle bei der Ausbildung bzw. Stabilisierung von Kinetochor-Mikrotubuli-Verknüpfungen spielen (Juwana et al., 1999; Fodde et al., 2001; Kaplan et al., 2001; Rehberg und Graf, 2002; Tirnauer et al., 2002a). Während die Suche nach Interaktionspartnern am Zentromer für die jeweiligen Mitglieder bislang erfolglos blieb, konnte in unserem Labor ein Protein isoliert werden, das mit dem Mal3p-Protein am Kinetochor interagiert (Kerres et al., 2004).

Dieses Protein, Spc7p, wurde als Suppressor der *mal3-1* mutanten Phänotypen isoliert und in der darauffolgenden ChIP-Analyse konnte von mir gezeigt werden, daß es sich bei diesem um ein neues *S. pombe* Kinetochorprotein der inneren Zentromer-Domäne handelt (Vietmeier-Decker, 2004; Kerres et al., 2004). In Verbindung mit dem Nachweis einer direkten Interaktion zwischen Spc7p und Mal3p konnte zum ersten Mal für ein Mitglied der EB1-Familie ein Interaktionspartner am Kinetochor identifiziert werden (Kerres et al., 2004).

Die Identifizierung sowohl des Mal3p-Proteins als auch des Kinetochorproteins Spc7p als extragene *sp1-25* Suppressoren lässt vermuten, daß die SpRan GTPase ebenfalls eine Funktion bei der Verknüpfung von Spindel-Mikrotubuli und Kinetochor ausübt (Abb.6-1). Dabei wurde in immunofluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen nachgewiesen, daß in Zellen des *sp1-25* Mutantenstammes die Lokalisierung der jeweiligen Proteine beeinträchtigt ist.

In Übereinstimmung mit den hier präsentierten Ergebnissen konnte bereits *in vitro* gezeigt werden, daß das Ran GTPase System einen Einfluß auf die Funktion von Mikrotubuli-assoziierten Proteinen sowie auf die Kinetochor-Funktion ausübt. Für die Funktion der Mikrotubuli-assoziierten Proteine TPX2 und NuMA wurde eine Regulation durch Ran und

Importin  $\alpha/\beta$  nachgewiesen (Gruss et al., 2001; Nachury et al., 2001; Schatz et al., 2003). Während die Mikrotubuli-Bindung von TPX2 und dessen Aktivität zur Bündelung von Mikrotubuli nicht durch das Ran GTPase System gesteuert werden, konnte ein Einfluß auf den Aufbau der Mikrotubuli festgestellt werden (Schatz et al., 2003). Des weiteren wird Ran eine Rolle bei der Kinetochor-Funktion zugeordnet, da zum einen die Ran GTPase-aktivierenden Proteine, Ran GAP1 und Ran BP2, mit Metaphasen-Kinetochore assoziieren, zum anderen die Ran GTPase in *C. elegans* ebenfalls am Kinetochor lokalisiert ist und vermutlich eine Rolle bei der Anheftung der Spindel-Mikrotubuli an das Kinetochor spielt (Bamba et al., 2002; Joseph et al., 2002). Zusätzlich wurde in einer Studie gezeigt, daß der mitotische Spindel-Kontrollpunkt und die Kinetochor-Lokalisierung der Proteine dieses Kontrollpunkts durch den Level an Ran GTP reguliert werden (Arnaoutov und Dasso, 2003). Die in dieser Arbeit erhaltenen Daten führen zu der Annahme, daß SpRan über die Proteine Spc7p und Mal3p die Verknüpfung von Spindel-Mikrotubuli und Kinetochor reguliert.

#### **6.2.2.2 Die Funktion des neuen Mikrotubuli-assoziierten *S. pombe* Proteins SpDam1p wird durch SpRan reguliert**

Über Komplementation der TBZ-Hypersensitivität des *spi1-25* Mutantenstammes erfolgte die Identifizierung eines neuen *S. pombe* Proteins, das aufgrund seiner Ähnlichkeit zu dem Dam1p-Protein in *S. cerevisiae* SpDam1p genannt wurde.

Auf dem Original-Genbank-Plasmid war nicht das gesamte *spdaml*<sup>+</sup>-Gen enthalten, sondern lediglich 82 % des N-Terminus, und es stellte sich heraus, daß die Expression des verkürzten Fragmentes eine bessere Suppression der TBZ-Hypersensitivität bewirken konnte als die des Vollängen-Konstrukts. Da die Komplementation sowohl bei moderater als auch bei starker Überexpression des Vollängen-Gens im Vergleich zueinander gleich ist und somit nicht von der SpDam1p-Kopienzahl abhängig sein kann, wird davon ausgegangen, daß der C-Terminus von SpDam1p eine inhibitorische Auswirkung auf die Suppression hat. Obwohl diese Beobachtung zu der Vermutung führt, daß der C- und der N-Terminus des SpDam1p-Proteins funktionell zu unterscheiden sind, bleibt die genaue Ursache zu diesem Zeitpunkt unklar.

Dam1p in *S. cerevisiae* wurde zunächst als mitotisches Spindelprotein identifiziert (Hofmann et al., 1998). In den darauffolgenden Studien konnte gezeigt werden, daß es sich bei Dam1p um eine Komponente eines Multiproteinkomplexes des Kinetochors handelt, der als Dam1-Komplex bezeichnet wird und dieser in der Lage ist, direkt an Mikrotubuli zu binden (Cheeseman et al., 2001). Neben einer Funktion bei der Aufrechterhaltung der Spindel-Integrität wird dem Dam1p-Protein eine sehr wichtige Rolle in der Regulation und

Ausbildung von bipolaren Kinetochor-Mikrotubuli-Verknüpfungen während der Mitose zugeordnet (Jones et al., 1999; Enquist-Newman et al., 2001; Kang et al., 2001; Li et al., 2002; Cheeseman et al., 2002; Shang et al., 2003). Dabei erfolgt die Kontrolle einer intakten Verknüpfung über die Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung von Dam1p und weiteren Kinetochor-Komponenten (Cheeseman et al., 2002; Tanaka et al., 2002; Shang et al., 2003). Bei SpDam1p handelt es sich ebenfalls um ein Mikrotubuli-assoziiertes Protein und in der entsprechenden immunfluoreszenzmikroskopischen Untersuchung wurde ein Hinweis auf eine mögliche Kinetochor-Lokalisierung dieses Proteins erhalten (Abb.6-1).

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit konnte festgestellt werden, daß eine Überexpression des *spdaml*<sup>+</sup> Vollängen-Gens in Wildtyp-Zellen zu einer erhöhten Resistenz gegenüber der Mikrotubuli-destabilisierenden Chemikalie TBZ führt, was impliziert, daß SpDam1p vermutlich eine Funktion bei der Stabilisierung von Mikrotubuli hat. Die Beobachtung, daß zusätzliche Kopien an SpDam1p einen Wachstumsdefekt bei Zellen des Wildtyps bewirken, könnte auf eine Überstabilisierung von Mikrotubuli zurückgeführt werden. Eine ähnliche Beobachtung konnte ebenfalls bei Überexpression von *dam1*<sup>+</sup> in *S. cerevisiae* Zellen gemacht werden, die daraufhin aufgrund mitotischer Defekte nicht überlebensfähig sind (Hofmann et al., 1998).

Parallel zu dieser Arbeit wurde *spdaml*<sup>+</sup> auch als ein Suppressor *mal3-1* mutanter Phänotypen isoliert (Vietmeier-Decker, 2004). Da es sich bei SpDam1p entweder um das Homologe zu Dam1p in *S. cerevisiae* handelt oder zumindest um ein Protein mit einer ähnlichen Funktion, war es interessant, daß zusätzliche Kopien von SpDam1p mutante Phänotypen des *mal3-1* Mutantenstammes supprimieren können. Die Tatsache, daß neueste Studien darauf hindeuten, daß Mal3p unter anderem für die Anheftung der Spindel-Mikrotubuli an das Kinetochor verantwortlich ist und Dam1p in *S. cerevisiae* ebenfalls eine Rolle in diesem Prozeß zugeordnet wird, könnte dies ein weiterer Hinweis sein, daß SpDam1p das Dam1p-Homolog ist (Kerres et al., 2004; Cheeseman et al., 2002; Tanaka et al., 2002; Shang et al., 2003). Des weiteren wurde in einer Untersuchung nach direkten Dam1p-Interaktionspartnern das *S. cerevisiae* Protein Bim1p isoliert, das zu Mal3p homolog ist (Shang et al., 2003). Dies könnte bedeuten, daß SpDam1p möglicherweise an der Anheftungsstelle der Mikrotubuli-Plus-Enden und Kinetochor mit dem Mikrotubuli-Plus-End-bindenden Mal3p-Protein interagiert (Abb.6-1).

In einer letzten Untersuchung wurde überprüft, ob die Lokalisierung des SpDam1p-Proteins in Zellen des *spi1-25* bzw. *mal3Δ* Mutantenstammes verändert ist, aber hierbei konnte festgestellt werden, daß vermutlich Spi1p und Mal3p nicht für eine Mikrotubuli-Lokalisierung

von SpDam1p benötigt werden. Da sowohl der SpRan GTPase, als auch dem Mal3p-Protein eine Rolle bei der Stabilisierung von Mikrotubuli zugeordnet wird und in den entsprechenden Mutanten diese Funktion beeinträchtigt ist, können zusätzliche Kopien an SpDam1p diesen Defekt entgegenwirken, indem sie unter anderem die Stabilität der Mikrotubuli in den Zellen der Mutanten erhöhen (Abb.6-1).

Die Tatsache, daß das neue *S. pombe* Protein SpDam1p Homologie zu Dam1p in *S. cerevisiae* aufweist und letzteres neben einer Funktion bei der Aufrechterhaltung der Spindel-Integrität auch in der Regulation und Ausbildung von bipolaren Kinetochor-Mikrotubuli-Verknüpfungen involviert ist, impliziert, daß SpRan eine Rolle bei der bipolaren Anheftung des Kinetochors übernimmt.

Inwieweit die SpRan GTPase die Funktionen der entsprechenden mitotischen Komponenten beeinflusst und wie die bisher erhaltenen Ergebnisse miteinander in Verbindung stehen, wird anhand eines stark vereinfachten Modells in dem folgenden Kapitel beschrieben (Abb.6-1).

### **6.2.3 Die mögliche Funktion der SpRan GTPase während der Mitose**

Einige Studien deuten darauf hin, daß der Einfluß von Ran auf die Funktion verschiedener mitotischer Komponenten und somit auf die unterschiedlichen Abläufe während der Mitose durch einen dem Kerntransport ähnlichen Mechanismus erfolgt (Nachury et al., 2001; Gruss et al., 2001; Ems-McClung et al., 2004). Dabei wird davon ausgegangen, daß Ran durch die nukleären Transport-Rezeptoren Importin  $\alpha$  und/ oder Importin  $\beta$  die Verfügbarkeit der Proteine kontrolliert, die unter anderem für den Aufbau und die Aufrechterhaltung der mitotischen Spindel benötigt werden. Aufgrund der Chromatin-Lokalisierung von Ran GEF, dem Guanin-Nukleotid-Austausch-Faktor, der für den Austausch von GDP gegen GTP verantwortlich ist, wird eine hohe Ran GTP Konzentration im Bereich des Chromatins erreicht (Bischoff et al., 1991a; Bischoff et al., 1991b; Übersichtsartikel: Sazer und Dasso, 2000). Diese hohe Ran GTP Konzentration sorgt dafür, daß Proteine, die durch Bindung an Importin  $\alpha$  und/ oder Importin  $\beta$  ihre Funktion nicht ausführen können, in unmittelbarer Nähe des Chromatins durch Bindung von Ran-GTP an den entsprechenden Transport-Rezeptor entlassen werden (Nachury et al., 2001; Gruss et al., 2001; Schatz et al., 2003). Erst in ungebundenem Zustand sind die jeweiligen mitotischen Proteine in der Lage, entsprechend ihrer Funktion zu agieren.

Mit der Isolation des *spi1-25* Mutantenstammes wurde eine Mutante identifiziert, die aberrante Mitose aufweist (Fleig et al., 2000). Da gezeigt werden konnte, daß nur ca. 30 % der Spi1-25p-Proteine imstande sind, Nukleotide zu binden, wurde in einer darauffolgenden

Studie festgestellt, daß in Abhängigkeit von der Konzentration an aktivem Sp1p unterschiedliche -voneinander unabhängige- zelluläre Prozesse beeinträchtigt werden (Fleig et al., 2000; Salus et al., 2002). Während eine hohe Konzentration an funktionellen SpRan für den präzisen Ablauf der Mitose benötigt wird, ist der Bedarf an funktionellem SpRan für andere zelluläre Prozesse, wie z.B. dem Kerntransport, niedriger. Aufgrund der Tatsache, daß in dem *spi1-25* Mutantenstamm nur ca. 30 % der Spi1-25-Proteine Nukleotide binden können, wirkt sich dies auch auf den Level an SpRan GTP in diesen Zellen aus (Fleig et al., 2000; Salus et al., 2002). Das könnte bedeuten, daß mit einer Erniedrigung an SpRan GTP ebenfalls die Anzahl der mitotischen Proteine vermindert ist, die durch SpRan GTP von den Transport-Faktoren entlassen werden, während der nukleozytoplasmatische Kerntransport unbeeinträchtigt bleibt.

Da im Rahmen dieser Arbeit gezeigt wurde, daß SpRan Einfluß auf die Funktion des Minus-End-gerichteten Motorproteins Klp2p und die der Proteine Mal3p, Spc7p und SpDam1p nimmt, erscheint es durchaus möglich, daß in *spi1-25* Zellen ein Teil dieser an den Transport-Faktoren gebunden bleibt und somit nicht agieren kann. In einer Studie stellte sich heraus, daß die Mikrotubuli-Assoziation des Minus-End-gerichteten Motorproteins XCTK2p durch Bindung von Importin  $\alpha/\beta$  an die Mikrotubuli-Binde-Domäne inhibiert wird. Das könnte bedeuten, daß die fehlende bzw. verringerte Lokalisierung des Mikrotubuli-Plus-End-bindenden Mal3p-Proteins und des Kinetochorproteins Spc7p in Zellen des *spi1-25* Mutantenstammes ebenfalls auf die Bindung der Transport-Faktoren an die entsprechenden Domänen zurückzuführen ist (Ems-McClung et al., 2004). Obwohl die Lokalisierung des Motorproteins Klp2p nicht untersucht wurde, wäre dies auch für das Klp2p-Protein denkbar. In einer weiteren Untersuchung wurde beobachtet, daß das Ran GTPase System Teilfunktionen von mitotischen Proteinen regulieren kann. Als Beispiel dieser Studie kann das Mikrotubuli-assoziierte Protein TPX2p genommen werden. Für dieses wurde gezeigt, daß nukleäre Transport-Rezeptoren zwar nicht die Mikrotubuli-Bindung beeinträchtigen, aber dafür die Interaktion mit der Aurora A-Kinase inhibieren (Trieselmann et al., 2003). In Hinblick auf das SpDam1p-Protein könnte das bedeuten, obwohl dessen Lokalisierung in *spi1-25* Zellen nicht gestört ist, werden möglicherweise Protein-Interaktionen beeinträchtigt. Obwohl in bisherigen *in vitro* Untersuchungen Hinweise auf eine Funktion des Ran GTPase Systems in der Spindel-Kinetochor-Interaktion, als auch in der Kinetochorfunktion erhalten wurden, konnte mit dieser Arbeit zum allerersten Mal der *in vivo* Beweis hierfür erbracht werden. Dabei deuten die hier erhaltenen Ergebnisse nicht nur auf einen generellen Einfluß

von SpRan auf die Verknüpfung von Spindel-Mikrotubuli und Kinetochor hin, sondern insbesondere auf die bipolare Anheftung.

In dem folgenden Modell werden die hier präsentierten Ergebnisse schematisch dargestellt, die eine wichtige Rolle der SpRan GTPase bei dem Aufbau und der Aufrechterhaltung der mitotischen Spindel, bei der Kinetochorfunktion, sowie bei der Verknüpfung von Spindel-Mikrotubuli und Kinetochor implizieren (Abb.6-1).

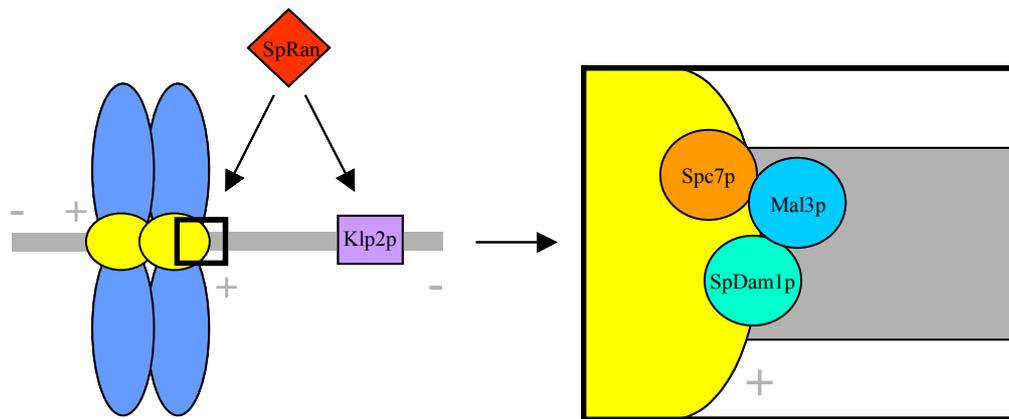


Abb.6-1: Modell über die Rolle der SpRan GTPase während der Mitose

Die SpRan GTPase nimmt Einfluß auf die Funktion des Minus-End-gerichteten Motorproteins Klp2p, der Mikrotubuli-assoziierten Proteine Mal3p bzw. SpDam1p und des Kinetochorproteins Spc7p (schwarzes Kästchen). Dargestellt sind die zwei Schwesterchromatiden (blau) mit aufgelagertem Kinetochor (gelb), die bipolar mit den Plus-Enden der Spindel-Mikrotubuli verknüpft sind. Dabei wird die Situation am Kinetochor (schwarzes Kästchen) rechts in der Abbildung vergrößert dargestellt. Die Größenverhältnisse sind nicht maßstabsgetreu. Nähere Erläuterung des Modells: s. Text.

### **6.3 Das *S. pombe* Protein Peg1p ist ein neues Mitglied der evolutionär konservierten CLASP/ MAST/ Stu1-Familie Mikrotubuli-Plus-End-bindender Proteine**

Proteine, die präferentiell an den hoch dynamischen Plus-Enden der Mikrotubuli lokalisiert sind, werden der Gruppe Mikrotubuli-Plus-End-bindender Proteine zugeordnet (Übersichtsartikel: Mimori-Kiyosue und Tsukita, 2003). Diese übernehmen eine Funktion bei der Regulation der Dynamik an den Mikrotubuli-Plus-Enden, die für die Anheftung des Mikrotubuli-Zytoskeletts an unterschiedliche zelluläre Strukturen benötigt wird. Dabei ist die dynamische Instabilität, d.h. der Wechsel zwischen Phasen des Wachstums und der Verkürzung von Mikrotubuli sowie deren Regulation sowohl für das polarisierte Zellwachstum als auch für die Verknüpfung von Spindel-Mikrotubuli mit dem Kinetochor während der Mitose von großer Wichtigkeit (Mitchison und Kirschner, 1984; Desai und Mitchison, 1997; Übersichtsartikel: Mimori-Kiyosue und Tsukita, 2003). Mikrotubuli-Plus-End-bindende Proteine sind entsprechend ihrer Funktion weiter zu unterteilen. Die Gruppe der stabilisierenden Faktoren wird dabei von Vertretern unterschiedlicher Protein-Familien repräsentiert (Übersichtsartikel: Wittmann et al., 2001; Übersichtsartikel: Mimori-Kiyosue und Tsukita, 2003).

Hierzu gehört unter anderem die evolutionär konservierte EB1-Familie, der das *S. pombe* Protein Mal3p zugehört, sowie die hoch konservierte CLIP170-Familie, der die Proteine CLIP170 bzw. CLIP115 von höheren Eukaryoten und das CLIP170-ähnliche *S. pombe* Protein Tip1p zugeordnet werden (Übersichtsartikel: Tirnauer und Bierer, 2000; Beinhauer et al., 1997; Übersichtsartikel: Mimori-Kiyosue und Tsukita, 2003; Brunner und Nurse, 2000). Die Mitglieder dieser beiden Familien übernehmen eine Rolle bei der Regulation der Dynamik an den Mikrotubuli-Plus-Enden. Des weiteren konnte für diese eine Funktion bei der Anheftung von Spindel-Mikrotubuli an das Kinetochor sowie beim polarisierten Zellwachstum nachgewiesen werden (Übersichtsartikel: Tirnauer und Bierer, 2000; Beinhauer et al., 1997; Kerres et al., 2004; Dujardin et al., 1998; Brunner und Nurse, 2000; Lin et al., 2001; Akhmanova et al., 2001). Vor einiger Zeit wurden im Menschen zwei weitere stabilisierende Faktoren, die CLASP-Proteine CLASP1 und CLASP2, als Interaktionspartner von CLIP170/CLIP115 isoliert (Akhmanova et al., 2001). Diese beiden Proteine sowie MAST/ORBIT aus *D. melanogaster* und Stu1p aus *S. cerevisiae* gehören der CLASP/ MAST/ Stu1-Familie an, eine weitere Gruppe Mikrotubuli-Plus-End-bindender Proteine, der ebenfalls eine Rolle bei der Regulation der Mikrotubuli-Dynamik sowie bei Mikrotubuli-Kinetochor-

Interaktionen zugeordnet wird (Akhmanova et al., 2001; Maiato et al., 2002; Maiato et al., 2003; Übersichtsartikel: Mimori-Kiyosue und Tsukita, 2003).

Auf der Suche nach Interaktionspartnern des Mikrotubuli-Plus-End-bindenden Mal3p-Proteins wurde ein bisher unbekanntes *S. pombe* Protein identifiziert (Vietmeier-Decker, 2004). Dieses Protein, das Peg1p genannt wurde, weist Homologie zu den Mitgliedern der evolutionär konservierten CLASP/ MAST/ Stu1-Familie auf. Im Verlauf dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß es sich bei Peg1p um einen neuen Vertreter der CLASP/ MAST/ Stu1-Proteinfamilie handelt.

### **6.3.1 Peg1p ist ein Mikrotubuli-assoziiertes Protein, das ebenfalls Assoziation mit dem Kinetochor aufweist**

Das Peg1p-Protein assoziiert während der Prophase entlang der mitotischen Spindel, wobei zu Beginn der Anaphase B und auch im weiteren Verlauf dieser mitotischen Phase Peg1p nur noch im Bereich der Spindel-Mitte zu beobachten ist. Diese Lokalisierung wurde ebenfalls für Stu1p in *S. cerevisiae*, MAST/ORBIT in *D. melanogaster* und CLASP1 im Menschen beschrieben, wobei CLASP1 bereits beim Übergang von Metaphase zu Anaphase eine Lokalisierung auf der Spindel-Mitte aufweist (Yin et al., 2002; Maiato et al., 2002; Maiato et al., 2003). Mittels CHIP-Analyse konnte gezeigt werden, daß Peg1p mit der *cnt*-Region, d.h. mit dem zentralen Kern, des *S. pombe* Zentromers assoziiert ist. In Übereinstimmung mit diesen Beobachtungen wurde für MAST/ORBIT in *D. melanogaster* und dem menschlichen CLASP1 eine Lokalisierung am Kinetochor nachgewiesen (Lemos et al., 2000; Maiato et al., 2002; Maiato et al., 2003).

Des weiteren zeigen Mutanten, in denen Stu1p bzw. MAST/ ORBIT funktionell beeinträchtigt sind, ebenso wie nach Mikroinjektion von CLASP1-spezifischen Antikörpern in HeLa-Zellen, Defekte während der Mitose (Yin et al., 2002; Inoue et al., 2000; Maiato et al., 2002; Maiato et al., 2003). Bei der näheren Charakterisierung des rezessiven *peg1-1* Mutantenstammes konnte bei der restriktiven Temperatur eine stark erhöhte Fehlverteilung des chromosomalen Materials festgestellt werden, die auf die mitotischen Anomalien in Zellen des *peg1-1* Mutantenstammes zurückzuführen ist. Dabei handelt es sich bei diesen Anomalien um Defekte im Aufbau und der Aufrechterhaltung der Bipolarität der mitotischen Spindel.

Funktionelle Beeinträchtigungen von anderen Mitgliedern der CLASP/ MAST/ Stu1-Familie führen ebenfalls zu denselben Problemen im Aufbau der mitotischen Spindel, die auch in Stämmen festgestellt wurden, in denen Kinesine der BimC-Familie defekt sind (Hagan und Yanagida, 1990; Hgan und Yanagida, 1992; Hoyt et al., 1992; Saunders und Hoyt, 1992; Yin

et al., 2002; Inoue et al., 2000; Maiato et al., 2002; Maiato et al., 2003). Die Tatsache, daß Mitglieder der CLASP/ MAST/ Stu1-Familie im Verlauf der Mitose die gleiche Lokalisierung auf der Spindel-Mitte wie die Plus-End-gerichteten mitotischen Motorproteine zeigen und in *S. cerevisiae* zusätzliche Kopien des BimC-Kinesins Cin8p eine *stu1* Mutation supprimieren können, deutet daraufhin, daß diese Proteine überlappende Funktionen beim Aufbau und der Aufrechterhaltung der mitotischen Spindel besitzen (Yin et al., 2002; Übersichtsartikel: Wittmann et al., 2001; Maiato et al., 2002; Maiato et al., 2003). Obwohl alle Vertreter der CLASP/ MAST/ Stu1-Familie keine Motordomäne aufweisen, wird davon ausgegangen, daß diese Proteine eine strukturelle Rolle in der Spindel durch Interaktion mit antiparallelen interpolaren Mikrotubuli spielen und somit die mitotische Spindel stabilisieren (Yin et al., 2002; Maiato et al., 2002). Im Falle von Stu1p in *S. cerevisiae* konnte gezeigt werden, daß dieses Protein in der Lage ist, Homodimere zu bilden und ähnlich den BimC-Kinesinen, die als Homotetramere wirken, wird diesem eine mögliche Funktion bei der Bündelung von Mikrotubuli in der Spindel-Mitte zugeordnet (Yin et al., 2002).

Aufgrund der Tatsache, daß Peg1p mit der zentralen Domäne des Kinetochors assoziiert, wurde in dem *peg1-1* Mutantenstamm untersucht, ob das innere Kinetochorprotein Spc7p, als eine Komponente des konservierten Ndc80/ HEC1 Kinetochor-Komplexes, noch Assoziation mit dem Zentromer aufweist (Wigge und Kilmartin, 2001; Bharadwaj et al., 2004; Mc Cleveland et al., 2004; Kerres et al., 2004; He, unpublizierte Daten). Dabei konnte kein Unterschied im Vergleich zu Wildtyp-Zellen entdeckt werden. Obwohl gezeigt werden konnte, daß Spc7p und somit vermutlich auch der Ndc80/HEC1 Kinetochor-Komplex in *peg1-1* Zellen imstande ist, mit Zentromer-DNA zu assoziieren und keine weiteren Veränderungen, wie z.B. das Auftreten eines „Lagging-Chromosom“-Phänotyps, festgestellt werden konnten, ist eine funktionelle Beeinträchtigung des Zentromers dennoch nicht auszuschließen (Pidoux et al., 2000). Da nicht überprüft wurde, ob in Zellen des *peg1-1* Mutantenstammes das Peg1p-Protein bzw. andere Zentromerproteine noch Kinetochor-Assoziation aufweisen, kann es möglich sein, daß die Lokalisierung dieser gestört ist.

In einer weiteren immunofluoreszenzmikroskopischen Analyse wurde untersucht, ob in Zellen des *mal3Δ* Mutantenstammes das Peg1p-Protein noch korrekt lokalisiert ist. Dabei konnte für Peg1p eine unveränderte Assoziation mit Mikrotubuli nachgewiesen werden, was darauf hindeutet, daß die Bindung von Peg1p an Mikrotubuli unabhängig von Mal3p erfolgt. Es muß -wie bereits oben- angemerkt werden, daß trotz dieser Beobachtung keine Aussage über eine möglicherweise veränderte Kinetochor-Lokalisierung von Peg1p in Zellen des *mal3Δ* Mutantenstammes gemacht werden kann, da es im Falle von Peg1p bereits schwierig

ist, mittels Immunofluoreszenz eine Assoziation mit dem Zentromer festzustellen. Nur eine zukünftige ChIP-Analyse kann einen Beweis für eine mögliche Veränderung erbringen.

### **6.3.2 Peg1p reguliert die Dynamik von Mikrotubuli und hat eine Funktion bei der Anheftung von Spindel-Mikrotubuli an das Kinetochor**

Bei der Isolation des *peg1*<sup>+</sup>-Gens war auf dem Original-Genbank-Plasmid lediglich der C-terminale Teil des Gens enthalten. Während in verschiedenen *mal3* Mutantenstämmen die Expression dieses verkürzten Fragmentes zu einem verbesserten Wachstum führt, bewirkt die Expression des Vollängen-Gens eine Verschlechterung.

Die Frage, warum die Expression des Vollängen-Konstrukts sich negativ auf das Wachstum der *mal3* Mutanten auswirkt, während eine Expression in Zellen des Wildtypstammes zu keiner Beeinträchtigung führt, konnte nach Untersuchungen an *peg1-1mal3Δ* Doppelmutanten beantwortet werden. Die Tatsache, daß *peg1-1mal3Δ* Doppelmutanten bei der entsprechenden restriktiven Bedingung besseres Wachstum als die Einzelmutanten aufweisen (Beuter, unpublizierte Daten) und dieses verbesserte Wachstum der Doppelmutanten mit einem Rückgang der mitotischen Anomalien im Vergleich zu den Einzelmutanten einhergeht, deutet darauf hin, daß Mal3p und Peg1p eine Rolle in demselben mitotischen Prozeß ausüben, die Funktionen jedoch vermutlich antagonistisch zueinander sind. Hier besteht die Möglichkeit, daß die gleichzeitige Anwesenheit beider Proteine ein ausgewogenes Gleichgewicht bewirkt und dieses Gleichgewicht verloren geht, sobald eines dieser beiden Proteine seine Funktion nicht bzw. eingeschränkt ausüben kann.

Die unterschiedlichen Auswirkungen, die durch Expression der verkürzten *peg1*<sup>+</sup>-Version bzw. des Vollängen-Konstruktes bewirkt werden, können verschiedene Gründe haben. Entweder beeinträchtigt die verkürzte Proteinvariante die Funktion des endogenen Peg1p-Vollängenproteins durch direkte Interaktion bzw. Wechselwirkungen mit entsprechenden Bindungspartnern bzw. Regulatoren oder die verkürzte Version wirkt sich stabilisierend auf die Spindel-Mikrotubuli aus. Somit könnte die verkürzte Proteinvariante möglicherweise dem Defekt bei der Stabilisierung von Mikrotubuli, der durch die funktionelle Beeinträchtigung des Mal3p-Proteins hervorgerufen wird, entgegenwirken. Diese Annahme wurde durch Untersuchungen, die in der Arbeitsgruppe von Dr. Iain Hagan durchgeführt wurden, erhärtet (persönliche Kommunikation mit Dr. Iain Hagan, Manchester). Es konnte gezeigt werden, daß die Expression des verkürzten Konstrukts in Wildtyp-Zellen wie auch in Zellen des *mal3Δ* Mutantenstammes zu einer Stabilisierung von Interphasen-Mikrotubuli führt, indem die

„Katastrophenrate“, d.h. die Häufigkeit des Wechsel von Mikrotubuli-Polymerisation in Depolymerisation, im Vergleich zu Wildtyp-Zellen auf die Hälfte reduziert wird.

Während bisherige Studien mit einigen Mitgliedern der CLASP/ MAST/ Stu1-Familie darauf hindeuten, daß diese eine stabilisierende Funktion sowohl auf mitotische als auch auf zytoplasmatische Mikrotubuli ausüben, konnten anhand der Charakterisierung des *peg1-1* Mutantenstammes Unterschiede in der Funktion des Proteins während der Interphase und der Mitose aufgedeckt werden (Akhmanova et al., 2001; Maiato et al., 2003). Dabei stimmen unsere Ergebnisse in Hinblick auf die Mitose mit den bisherigen Studien überein (Maiato et al., 2002; Maiato et al., 2003). Es konnte gezeigt werden, daß Peg1p für den Aufbau und die Aufrechterhaltung der mitotischen Spindel essentiell ist und dies auf eine stabilisierende Funktion während der Mitose hinweist. Die funktionelle Beeinträchtigung des Peg1p-Proteins und somit auch die der stabilisierenden Funktion führt zu einer Art „Spindel-Kollaps“ in Zellen des Mutantenstammes. Gleiches wurde in MAST/ ORBIT bzw. *stu1* Mutanten, als auch nach Mikroinjektion von CLASP1-spezifischen Antikörpern in HeLa-Zellen beobachtet (Yin et al., 2002; Inoue et al., 2000; Maiato et al., 2002; Maiato et al., 2003). Aufgrund der Kinetochor-Lokalisierung des Peg1p-Proteins und dem Nachweis eines Einflusses auf die Mikrotubuli-Dynamik kann davon ausgegangen werden, daß Peg1p wie das CLASP1-Protein im Menschen und MAST/ ORBIT in *D. melanogaster* eine Rolle bei der Anheftung der Spindel-Mikrotubuli an das Kinetochor besitzt, indem es die Dynamik an Mikrotubuli-Plus-Enden reguliert (Maiato et al., 2002; Maiato et al., 2003). Durch das Peg1p-Protein wird eine neue „Klasse“ von Zentromerproteinen repräsentiert, zumal bisher kein Kinetochorprotein identifiziert wurde, das ausschließlich mit dem zentralen Kern des Zentromers assoziiert. Da in unserer Arbeitsgruppe gezeigt wurde, daß die Verknüpfung von Mikrotubuli-Plus-Enden und Kinetochor an der inneren Zentromerdomäne, der *cnt*- und *imr*-Region, stattfindet und Peg1p mit der *cnt*-Region assoziiert, wird die Vermutung erhärtet, daß Peg1p an der Interaktion von Spindel-Mikrotubuli und Kinetochor mitwirkt (Kerres et al., 2004).

Wie bereits oben angedeutet, ist die Funktion von Peg1p in der Mitose von der während der Interphase zu unterscheiden. Die Arbeitsgruppe von Dr. Iain Hagan, die den Einfluß des Peg1p-Proteins auf das Wachstum von zytoplasmatischen Mikrotubuli untersuchte, stellte fest, daß in Zellen des *peg1-1* Mutantenstammes im Vergleich zum Wildtyp die „Katastrophenrate“ um die Hälfte reduziert ist, was bedeutet, daß die funktionelle Beeinträchtigung des Peg1p-Proteins zu einer Stabilisierung der zytoplasmatischen Mikrotubuli führt (Hagan, unpublizierte Daten). Somit weist diese Feststellung auf eine destabilisierende Funktion von Peg1p während der Interphase hin. Die Tatsache, daß in

bisherigen Studien den Mitgliedern der CLASP/MAST/Stu1-Familie eine stabilisierende Funktion in Bezug auf zytoplasmatische Mikrotubuli zugeordnet wird, könnte darauf zurückgeführt werden, daß dieser Aspekt an den menschlichen CLASP-Proteinen und somit *in vitro* untersucht wurde (Akhmanova et al., 2001; Maiato et al., 2003). Dabei handelt es sich bei dem *peg1-1* Mutantenstamm um ein *in vivo* System, das uns ermöglicht, die Funktion des Peg1p-Proteins in seiner natürlichen Umgebung zu studieren.

Mit der Isolation des Peg1p-Proteins gelang die Identifizierung eines weiteren Mitglieds der evolutionär konservierten CLASP/MAST/Stu1-Familie Mikrotubuli-assoziiierter Proteine. Dabei konnte gezeigt werden, daß Peg1p wie die entsprechenden Familien-Vertreter der höheren Eukaryoten, *D. melanogaster* und des Menschen, eine Funktion bei der Regulation der Mikrotubuli-Dynamik besitzt. Dieses neue *S. pombe* Protein wird neben einer neu definierten Rolle beim polarisierten Zellwachstum und einer Funktion bei der Anheftung von Spindel-Mikrotubuli an das Kinetochor, des weiteren für den Aufbau und die Aufrechterhaltung der bipolaren Spindel benötigt.

Mit der Identifizierung neuer Komponenten des Spindel-Apparates bzw. des Kinetochors sowie durch die Fortsetzung der funktionellen Analyse bereits charakterisierter mitotischer Proteine gelang es mit dieser Arbeit, die molekularen Prozesse, die für eine präzise Verteilung des genetischen Materials benötigt werden, wie der Aufbau und die Aufrechterhaltung der mitotischen Spindel oder die Verknüpfung von Spindel-Mikrotubuli mit dem Kinetochor, weiter aufzuklären.

## 7 Literaturverzeichnis

- 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.
- 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.
- Allan, V. J. (1999). Protein localization by fluorescence microscopy: A Practical Approach. *Oxford University Press*.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**, 3389-402.
- 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.
- 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.
- Arnautov, A. and Dasso, M. (2003). The Ran GTPase regulates kinetochore function. *Dev Cell* **5**, 99-111.
- Bähler, 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.
- Bamba, C., Bobiniec, Y., Fukuda, M. and Nishida, E. (2002). The GTPase Ran regulates chromosome positioning and nuclear envelope assembly in vivo. *Curr Biol* **12**, 503-7.
- 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.
- 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.

- 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. and Allshire, R. (2002). Centromeres become unstuck without heterochromatin. *Trends Cell Biol* **12**, 419-24.
- 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.
- Bharadwaj, R., Qi, W. and Yu, H. (2003). Identification of two novel components of the human Ndc80 kinetochore complex. *J Biol Chem*.
- Bischoff, F. R. and Ponstingl, H. (1991a). Catalysis of guanine nucleotide exchange on Ran by the mitotic regulator RCC1. *Nature* **354**, 80-2.
- Bischoff, F. R. and Ponstingl, H. (1991b). Mitotic regulator protein RCC1 is complexed with a nuclear ras-related polypeptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 10830-4.
- Boguski, M. S. and McCormick, F. (1993). Proteins regulating Ras and its relatives. *Nature* **366**, 643-54.
- Bridge, A. J., Morphey, 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.
- 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.
- Busch, K. E. and Brunner, D. (2004). The microtubule plus end-tracking proteins mal3p and tip1p cooperate for cell-end targeting of interphase microtubules. *Curr Biol* **14**, 548-59.
- 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.
- Carazo-Salas, R. E., Guarguaglini, G., Gruss, O. J., Segref, A., Karsenti, E. and Mattaj, I. W. (1999). Generation of GTP-bound Ran by RCC1 is required for chromatin-induced mitotic spindle formation. *Nature* **400**, 178-81.

- Carlson, C. R., Grallert, B., Bernander, R., Stokke, T. and Boye, E. (1997). Measurement of nuclear DNA content in fission yeast by flow cytometry. *Yeast* **13**, 1329-35.
- Carr, A. M., Moudjou, M., Bentley, N. J. and Hagan, I. M. (1995). The chk1 pathway is required to prevent mitosis following cell-cycle arrest at 'start'. *Curr Biol* **5**, 1179-90.
- Carvalho, P., Tirnauer, J. S. and Pellman, D. (2003). Surfing on microtubule ends. *Trends Cell Biol* **13**, 229-37.
- Chang, D. Y. and Lu, A. L. (2002). Functional interaction of MutY homolog with proliferating cell nuclear antigen in fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biol Chem* **277**, 11853-8.
- 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. (2001). 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.
- 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.
- Craig, I. W. (1994). Organization of the human genome. *J Inherit Metab Dis* **17**, 391-402.
- 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.
- Desai, A. and Mitchison, T. J. (1997). Microtubule polymerization dynamics. *Annu Rev Cell Dev Biol* **13**, 83-117.
- Diaz, M., Sanchez, Y., Bennett, T., Sun, C. R., Godoy, C., Tamanoi, F., Duran, A. and Perez, P. (1993). The *Schizosaccharomyces pombe* *cwg2+* gene codes for the beta subunit of a geranylgeranyltransferase type I required for beta-glucan synthesis. *Embo J* **12**, 5245-54.
- 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.

- 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.
- 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., Olsson, T., Turner, B. M., Cranston, G. and Allshire, R. C. (1997). Transient inhibition of histone deacetylation alters the structural and functional imprint at fission yeast centromeres. *Cell* **91**, 1021-32.
- Ekwall, K. and Partridge, J. F. (1999). Fission yeast chromosome analysis: Fluorescence in situ hybridization (FISH) and chromatin immunoprecipitation (CHIP). in Bickmore, W. A. (Ed), *Chromosome structure analysis, a practical approach.*, Oxford University Press, pp. 39-57.
- Ems-McClung, S. C., Zheng, Y. and Walczak, C. E. (2004). Importin alpha/beta and Ran-GTP regulate XCTK2 microtubule binding through a bipartite nuclear localization signal. *Mol Biol Cell* **15**, 46-57.
- 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.
- Fantes, P. and Nurse, P. (1977). Control of cell size at division in fission yeast by a growth-modulated size control over nuclear division. *Exp Cell Res* **107**, 377-86.
- Fantes, P. A. (1977). Control of cell size and cycle time in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Cell Sci* **24**, 51-67.
- Fantes, P. A. (1981). Isolation of cell size mutants of a fission yeast by a new selective method: characterization of mutants and implications for division control mechanisms. *J Bacteriol* **146**, 746-54.

- Feng, W., Rodriguez-Menocal, L., Tolun, G. and D'Urso, G. (2003). Schizosacchomyces pombe Dpb2 binds to origin DNA early in S phase and is required for chromosomal DNA replication. *Mol Biol Cell* **14**, 3427-36.
- 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.
- Fleig, U., Sen-Gupta, M. and Hegemann, J. H. (1996). Fission yeast mal2<sup>+</sup> is required for chromosome segregation. *Mol Cell Biol* **16**, 6169-77.
- 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.
- 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.
- Furuya, K., Takahashi, K. and Yanagida, M. (1998). Faithful anaphase is ensured by Mis4, a sister chromatid cohesion molecule required in S phase and not destroyed in G1 phase. *Genes Dev* **12**, 3408-18.
- 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.
- Görllich, D. (1998). Transport in and out of the cell nucleus. *Embo J* **17**, 2721-2727.
- 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.
- Grallert, B. and Nurse, P. (1996). The ORC1 homolog orp1 in fission yeast plays a key role in regulating onset of S phase. *Genes Dev* **10**, 2644-54.

- Grishchuk, A. L. and Kohli, J. (2003). Five RecA-like proteins of *Schizosaccharomyces pombe* are involved in meiotic recombination. *Genetics* **165**, 1031-43.
- Groden, J., Thliveris, A., Samowitz, W., Carlson, M., Gelbert, L., Albertsen, H., Joslyn, G., Stevens, J., Spirio, L. and Robertson, M. (1991). Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene. *Cell* **66**, 589-600.
- Gruss, O. J., Carazo-Salas, R. E., Schatz, C. A., Guarguaglini, G., Kast, J., Wilm, M., Le Bot, N., Vernos, I., Karsenti, E. and Mattaj, I. W. (2001). Ran induces spindle assembly by reversing the inhibitory effect of importin alpha on TPX2 activity. *Cell* **104**, 83-93.
- Gundersen, G. G. and Bretscher, A. (2003). Cell biology. Microtubule asymmetry. *Science* **300**, 2040-1.
- Gupta, A., Inaba, S., Wong, O. K., Fang, G. and Liu, J. (2003). Breast cancer-specific gene 1 interacts with the mitotic checkpoint kinase BubR1. *Oncogene* **22**, 7593-9.
- 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**, 343-57.
- Hagan, I. M. and Petersen, J. (2000). The microtubule organizing centers of *Schizosaccharomyces pombe*. *Curr Top Dev Biol* **49**, 133-59.
- 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.
- 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.
- Hofmann, C., Cheeseman, I. M., Goode, B. L., McDonald, K. L., Barnes, G. and Drubin, D. G. (1998). *Saccharomyces cerevisiae* Duo1p and Dam1p, novel proteins involved in mitotic spindle function. *J Cell Biol* **143**, 1029-40.

- Holliday, R. (1989). Chromosome error propagation and cancer. *Trends Genet* **5**, 42-5.
- 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.
- Hughes, M. and Davey, J. (1997). The role of Sxa1 in pheromone recovery in *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochem Soc Trans* **25**, 229S.
- Imai, Y. and Yamamoto, M. (1992). *Schizosaccharomyces pombe* sxa1+ and sxa2+ encode putative proteases involved in the mating response. *Mol Cell Biol* **12**, 1827-34.
- 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.
- Izaurrealde, E. and Adam, S. (1998). Transport of macromolecules between the nucleus and the cytoplasm. *Rna* **4**, 351-64.
- Jenuwein, T. and Allis, C. D. (2001). Translating the histone code. *Science* **293**, 1074-80.
- 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.
- Jones, M. H., Bachant, J. B., Castillo, A. R., Giddings, T. H., Jr. and Winey, M. (1999). Yeast Dam1p is required to maintain spindle integrity during mitosis and interacts with the Mps1p kinase. *Mol Biol Cell* **10**, 2377-91.
- Joseph, J., Liu, S. T., Jablonski, S. A., Yen, T. J. and Dasso, M. (2004). The RanGAP1-RanBP2 complex is essential for microtubule-kinetochore interactions in vivo. *Curr Biol* **14**, 611-7.
- Joseph, J., Tan, S. H., Karpova, T. S., McNally, J. G. and Dasso, M. (2002). SUMO-1 targets RanGAP1 to kinetochores and mitotic spindles. *J Cell Biol* **156**, 595-602.

- 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.
- Kalab, P., Pu, R. T. and Dasso, M. (1999). The ran GTPase regulates mitotic spindle assembly. *Curr Biol* **9**, 481-4.
- 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., Hyman, A. A. and Sorger, P. K. (1997). Regulating the yeast kinetochore by ubiquitin-dependent degradation and Skp1p-mediated phosphorylation. *Cell* **91**, 491-500.
- Karig, I. (2000). Charakterisierung des Mitose-relevanten *mal25<sup>+</sup>*-Genes aus *Schizosaccharomyces pombe*.
- Kerres, A., Vietmeier-Decker, C., Ortiz, J., Karig, I., Beuter, C., Hegemann, J., Lechner, J. and Fleig, U. (2004). The Fission Yeast Kinetochore Component Spc7 Associates with the EB1 Family Member Mal3 and Is Required for Kinetochore-Spindle Association. *Mol Biol Cell*.
- Kinoshita, K., Habermann, B. and Hyman, A. A. (2002). XMAP215: a key component of the dynamic microtubule cytoskeleton. *Trends Cell Biol* **12**, 267-73.
- Lee, H. (2003). Impaired phosphorylation and mis-localization of Bub1 and BubR1 are responsible for the defective mitotic checkpoint function in Brca2-mutant thymic lymphomas. *Exp Mol Med* **35**, 448-53.
- 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.
- Leverson, 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, 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. (2002). The mitotic spindle is required for loading of the DASH complex onto the kinetochore. *Genes Dev* **16**, 183-97.
- 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.
- Lingle, W. L. and Salisbury, J. L. (1999). Altered centrosome structure is associated with abnormal mitoses in human breast tumors. *Am J Pathol* **155**, 1941-51.
- Lu, A. L. and Fawcett, W. P. (1998). Characterization of the recombinant MutY homolog, an adenine DNA glycosylase, from yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biol Chem* **273**, 25098-105.
- Ly, D. H., Lockhart, D. J., Lerner, R. A. and Schultz, P. G. (2000). Mitotic misregulation and human aging [see comments]. *Science* **287**, 2486-92.
- 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.
- Marschall, L. G. and Clarke, L. (1995). A novel cis-acting centromeric DNA element affects *S. pombe* centromeric chromatin structure at a distance. *J Cell Biol* **128**, 445-54.
- Masuda, H. and Shibata, T. (1996). Role of gamma-tubulin in mitosis-specific microtubule nucleation from the *Schizosaccharomyces pombe* spindle pole body. *J Cell Sci* **109** ( Pt 1), 165-77.
- Matsumoto, T. and Beach, D. (1991). Premature initiation of mitosis in yeast lacking RCC1 or an interacting GTPase. *Cell* **66**, 347-60.
- Mattaj, I. W. and Englmeier, L. (1998). Nucleocytoplasmic transport: the soluble phase. *Annu Rev Biochem* **67**, 265-306.
- Maudrell, K. (1993). Thiamine-repressible expression vectors pREP and pRIP for fission yeast. *Gene* **123**, 127-30.

- McClelland, M. L., Kallio, M. J., Barrett-Wilt, G. A., Kestner, C. A., Shabanowitz, J., Hunt, D. F., Gorbsky, 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.
- Michel, L. S., Liberal, V., Chatterjee, A., Kirchwegger, R., Pasche, B., Gerald, W., Dobles, M., Sorger, P. K., Murty, V. V. and Benezra, R. (2001). MAD2 haplo-insufficiency causes premature anaphase and chromosome instability in mammalian cells. *Nature* **409**, 355-9.
- Migliore, L., Botto, N., Scarpato, R., Petrozzi, L., Cipriani, G. and Bonuccelli, U. (1999). Preferential occurrence of chromosome 21 malsegregation in peripheral blood lymphocytes of Alzheimer disease patients. *Cytogenet Cell Genet* **87**, 41-6.
- 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.
- Morrison, E. E., Wardleworth, B. N., Askham, J. M., Markham, A. F. and Meredith, D. M. (1998). EB1, a protein which interacts with the APC tumour suppressor, is associated with the microtubule cytoskeleton throughout the cell cycle. *Oncogene* **17**, 3471-7.
- 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.
- Nabeshima, K., Nakagawa, T., Straight, A. F., Murray, A., Chikashige, Y., Yamashita, Y. M., Hiraoka, Y. and Yanagida, M. (1998). Dynamics of centromeres during metaphase-anaphase transition in fission yeast: Dis1 is implicated in force balance in metaphase bipolar spindle. *Mol Biol Cell* **9**, 3211-25.

- Nachury, M. V., Maresca, T. J., Salmon, W. C., Waterman-Storer, C. M., Heald, R. and Weis, K. (2001). Importin beta is a mitotic target of the small GTPase Ran in spindle assembly. *Cell* **104**, 95-106.
- Nakamura, M., Masuda, H., Horii, J., Kuma, K., Yokoyama, N., Ohba, T., Nishitani, H., Miyata, T., Tanaka, M. and Nishimoto, T. (1998). When overexpressed, a novel centrosomal protein, RanBPM, causes ectopic microtubule nucleation similar to gamma-tubulin. *J Cell Biol* **143**, 1041-52.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Nurse, P. (2002). The Nobel Prize and beyond: an interview with Sir Paul Nurse. Interview by Susan R. Owens. *EMBO Rep* **3**, 204-6.
- Ohba, T., Nakamura, M., Nishitani, H. and Nishimoto, T. (1999). Self-organization of microtubule asters induced in *Xenopus* egg extracts by GTP-bound Ran [see comments]. *Science* **284**, 1356-8.
- 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.
- Page, B. D. and Snyder, M. (1993). Chromosome segregation in yeast. *Annu Rev Microbiol* **47**, 231-61.
- Paluh, J. L., Nogales, E., Oakley, B. R., McDonald, K., Pidoux, A. L. and Cande, W. Z. (2000). A mutation in gamma-tubulin alters microtubule dynamics and organization and is synthetically lethal with the kinesin-like protein pk11p. *Mol Biol Cell* **11**, 1225-39.
- 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.
- Partridge, J. F., Scott, K. S., Bannister, A. J., Kouzarides, T. and Allshire, R. C. (2002). cis-acting DNA from fission yeast centromeres mediates histone H3 methylation and recruitment of silencing factors and cohesin to an ectopic site. *Curr Biol* **12**, 1652-60.
- Petersen, J. and Hagan, I. M. (2003). S. pombe aurora kinase/survivin is required for chromosome condensation and the spindle checkpoint attachment response. *Curr Biol* **13**, 590-7.
- 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.
- Petersen, M. B. and Mikkelsen, M. (2000). Nondisjunction in trisomy 21: origin and mechanisms. *Cytogenet Cell Genet* **91**, 199-203.
- Pidoux, A. L. and C., A. R. (2000). 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 pk11 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. (2000). 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.

- Pihan, G. A., Wallace, J., Zhou, Y. and Doxsey, S. J. (2003). Centrosome abnormalities and chromosome instability occur together in pre-invasive carcinomas. *Cancer Res* **63**, 1398-404.
- Polakis, P. (1997). The adenomatous polyposis coli (APC) tumor suppressor. *Biochim Biophys Acta* **1332**, F127-47.
- Polizzi, C. and Clarke, L. (1991). The chromatin structure of centromeres from fission yeast: differentiation of the central core that correlates with function. *J Cell Biol* **112**, 191-201.
- Rajagopalan, S., Bimbo, A., Balasubramanian, M. K. and Oliferenko, S. (2004). A potential tension-sensing mechanism that ensures timely anaphase onset upon metaphase spindle orientation. *Curr Biol* **14**, 69-74.
- 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.
- Ribas, J. C., Diaz, M., Duran, A. and Perez, P. (1991). Isolation and characterization of *Schizosaccharomyces pombe* mutants defective in cell wall (1-3)beta-D-glucan. *J Bacteriol* **173**, 3456-62.
- 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.
- Salus, S. S., Demeter, J. and Sazer, S. (2002). The Ran GTPase system in fission yeast affects microtubules and cytokinesis in cells that are competent for nucleocytoplasmic protein transport. *Mol Cell Biol* **22**, 8491-505.
- Samejima, I. and Yanagida, M. (1994). Bypassing anaphase by fission yeast cut9 mutation: requirement of cut9+ to initiate anaphase. *J Cell Biol* **127**, 1655-70.
- Sato, N., Mizumoto, K., Nakamura, M., Maehara, N., Minamishima, Y. A., Nishio, S., Nagai, E. and Tanaka, M. (2001). Correlation between centrosome abnormalities and chromosomal instability in human pancreatic cancer cells. *Cancer Genet Cytogenet* **126**, 13-9.

- Saunders, W. S. and Hoyt, M. A. (1992). Kinesin-related proteins required for structural integrity of the mitotic spindle. *Cell* **70**, 451-8.
- Sazer, S. (1996). The search for the primary function of the Ran GTPase continues. *Trends Cell Biol.* **6**, 81-85.
- Sazer, S. and Dasso, M. (2000). The ran decathlon: multiple roles of Ran. *J Cell Sci* **113**, 1111-8.
- Sazer, S. and Sherwood, S. W. (1990). Mitochondrial growth and DNA synthesis occur in the absence of nuclear DNA replication in fission yeast. *J Cell Sci* **97 ( Pt 3)**, 509-16.
- Schatten, H., Chakrabarti, A. and Hedrick, J. (1999). Centrosome and microtubule instability in aging *Drosophila* cells. *J Cell Biochem* **74**, 229-41.
- Schatz, C. A., Santarella, R., Hoenger, A., Karsenti, E., Mattaj, I. W., Gruss, O. J. and Carazo-Salas, R. E. (2003). Importin alpha-regulated nucleation of microtubules by TPX2. *Embo J* **22**, 2060-70.
- Schmidt, H. (1993). Effective long range mapping in *Schizosaccharomyces pombe* with the help of *swi5*. *Curr Genet* **24**, 271-3.
- Schmidt, H., Kapitzka-Fecke, P., Stephen, E. R. and Gutz, H. (1989). Some of the *swi* genes of *Schizosaccharomyces pombe* also have a function in the repair of radiation damage. *Curr Genet* **16**, 89-94.
- Schuyler, S. C. and Pellman, D. (2001). Microtubule "plus-end-tracking proteins": The end is just the beginning. *Cell* **105**, 421-4.
- 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.
- Sharp, D. J., Rogers, G. C. and Scholey, J. M. (2000). Microtubule motors in mitosis. *Nature* **407**, 41-7.
- Spittle, C., Charrasse, S., Larroque, C. and Cassimeris, L. (2000). The interaction of TOGp with microtubules and tubulin. *J Biol Chem* **275**, 20748-53.
- 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.
- Synnes, M., Nilssen, E. A., Boye, E. and Grallert, B. (2002). A novel *chk1*-dependent G1/M checkpoint in fission yeast. *J Cell Sci* **115**, 3609-18.

- Takahashi K, Murakami S, Chikashige Y, Funabiki H, Niwa O and M., Y. (1992). A low copy number central sequence with strict symmetry and unusual chromatin structure in fission yeast centromere. *Mol Biol Cell*. **3**, 819-35.
- 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.
- 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.
- Tatebayashi, K., Kato, J. and Ikeda, H. (1998). Isolation of a *Schizosaccharomyces pombe* rad21ts mutant that is aberrant in chromosome segregation, microtubule function, DNA repair and sensitive to hydroxyurea: possible involvement of Rad21 in ubiquitin-mediated proteolysis. *Genetics* **148**, 49-57.
- 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.
- Toda, T., Nakaseko, Y., Niwa, O. and Yanagida, M. (1984). Mapping of rRNA genes by integration of hybrid plasmids in *Schizosaccharomyces pombe*. *Curr Genet* **8**, 93-97.
- Toda, T., Yamamoto, M. and Yanagida, M. (1981). Sequential alterations in the nuclear chromatin region during mitosis of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*: video fluorescence microscopy of synchronously growing wild-type and cold-sensitive *cdc* mutants by using a DNA-binding fluorescent probe. *J Cell Sci* **52**, 271-87.
- Tomonaga, T., Nagao, K., Kawasaki, Y., Furuya, K., Murakami, A., Morishita, J., Sutani, T., Kearsey, 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.
- Toyoda, Y., Furuya, K., Goshima, G., Nagao, K., Takahashi, K. and Yanagida, M. (2002). Requirement of chromatid cohesion proteins rad21/scc1 and mis4/scc2 for normal spindle-kinetochore interaction in fission yeast. *Curr Biol* **12**, 347-58.
- Trieselmann, N., Armstrong, S., Rauw, J. and Wilde, A. (2003). Ran modulates spindle assembly by regulating a subset of TPX2 and Kid activities including Aurora A activation. *J Cell Sci* **116**, 4791-8.
- Troxell, C. L., Sweezy, M. A., West, R. R., Reed, K. D., Carson, B. D., Pidoux, A. L., Cande, W. Z. and McIntosh, J. R. (2001). klp1(+) and klp2(+): Two kinesins of the Kar3 subfamily in fission yeast perform different functions in both mitosis and meiosis. *Mol Biol Cell* **12**, 3476-88.
- Tsukasaki, K., Miller, C. W., Greenspun, E., Eshaghian, S., Kawabata, H., Fujimoto, T., Tomonaga, M., Sawyers, C., Said, J. W. and Koeffler, H. P. (2001). Mutations in the mitotic check point gene, MAD1L1, in human cancers. *Oncogene* **20**, 3301-5.
- 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.
- Vietmeier-Decker, C. (2004). Die Funktion des Mikrotubuli-assoziierten *S. pombe* Proteins Mal3p in der Mitose.
- 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.
- West, R. R., Malmstrom, T., Troxell, C. L. and McIntosh, J. R. (2001). Two related kinesins, klp5+ and klp6+, foster microtubule disassembly and are required for meiosis in fission yeast. *Mol Biol Cell* **12**, 3919-32.
- West, R. R., Vaisberg, E. V., Ding, R., Nurse, P. and McIntosh, J. R. (1998). cut11(+): A gene required for cell cycle-dependent spindle pole body anchoring in the nuclear envelope and bipolar spindle formation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Biol Cell* **9**, 2839-55.

- Wiese, C., Wilde, A., Moore, M. S., Adam, S. A., Merdes, A. and Zheng, Y. (2001). Role of importin-beta in coupling Ran to downstream targets in microtubule assembly. *Science* **291**, 653-6.
- 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.
- Wilde, A. and Zheng, Y. (1999). Stimulation of microtubule aster formation and spindle assembly by the small GTPase Ran [see comments]. *Science* **284**, 1359-62.
- Wittmann, T., Hyman, A. and Desai, A. (2001). The spindle: a dynamic assembly of microtubules and motors. *Nature Cell Biology* **3**, 28-34.
- 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., Rabinowitsch, E., Rutherford, K., Rutter, S., Saunders, D., Seeger, K., Sharp, S., Skelton, J., Simmonds, M., Squares, R., Squares, S., Stevens, K., Taylor, K., Taylor, 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, J., Matunis, M. J., Kraemer, D., Blobel, G. and Coutavas, E. (1995). Nup358, a cytoplasmically exposed nucleoporin with peptide repeats, Ran- GTP binding sites, zinc fingers, a cyclophilin A homologous domain, and a leucine-rich region. *J Biol Chem* **270**, 14209-13.
- 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.

- 
- Yanagida, M., Yamashita, Y. M., Tatebe, H., Ishii, K., Kumada, K. and Nakaseko, Y. (1999). Control of metaphase-anaphase progression by proteolysis: cyclosome function regulated by the protein kinase A pathway, ubiquitination and localization. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **354**, 1559-69; discussion 1569-70.
- 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.
- Zachariae, W. and Nasmyth, K. (1999). Whose end is destruction: cell division and the anaphase-promoting complex. *Genes Dev* **13**, 2039-58.

## 8 Anhang

### 8.1 Stämme

#### 8.1.1 Bakterienstämme

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

#### 8.1.2 *S. pombe* Stämme

##### 8.1.2.1 Ausgangsstämme

Stamm	Genotyp	Herkunft
UFY 39	<i>ade6-M216, leu1-32, h<sup>+</sup></i>	P. Nurse
UFY 40	<i>ade6-M210, leu1-32, h<sup>-</sup></i>	P. Nurse
UFY 103	<i>ade6-M210, leu1-32, ura4-D6, Ch<sup>16</sup> [ade6-M216], h<sup>-</sup></i>	M. Yanagida
UFY 108	<i>ade6-M210, ura4-D6, Ch<sup>16</sup> [ade6-M216], h<sup>+</sup></i>	M. Yanagida
UFY 129	<i>ade6-M210, leu1-32, ura4-D18, his3Δ, h<sup>-</sup></i>	K. Gould
UFY 130	<i>ade6-M210, leu1-32, ura4-D18, his3Δ, h<sup>+</sup></i>	K. Gould
UFY 131	<i>ade6-M216, leu1-32, ura4-D18, his3Δ, h<sup>-</sup></i>	K. Gould
UFY 132	<i>ade6-M216, leu1-32, ura4-D18, his3Δ, h<sup>+</sup></i>	K. Gould
UFY 135	<i>mal3Δ::his3<sup>+</sup>, ade6-M210, leu1-32, ura4-D18, his3Δ, h<sup>+</sup></i>	U. Fleig
UFY 138	<i>mph1Δ::ura4<sup>+</sup>, ade6-M216, leu1-32, ura4-D18, h<sup>-</sup></i>	S. Sazer
UFY 139	<i>mad2Δ::ura4<sup>+</sup>, ade6-M210, leu1-32, ura4-D18, h<sup>-</sup></i>	S. Sazer
UFY 177	<i>mal2-GFP/kan<sup>r</sup>, ade6-M210, leu1-32, ura4-D6, Ch<sup>16</sup> [ade6-M216], h<sup>+</sup></i>	U. Fleig
UFY 209	<i>cut9-665, leu1, h<sup>-</sup></i>	M. Yanagida
UFY 210	<i>spc7-GFP/kan<sup>r</sup>, ade6-M210, ura4-D6, Ch<sup>16</sup> [ade6-M216], h<sup>+</sup></i>	U. Fleig
UFY 211	<i>spi1-25, ade6-M210, leu1-32, ura4-D6, h<sup>-</sup></i>	U. Fleig
UFY 212	<i>spi1-25, ade6-M210, leu1-32, ura4-D6, his3Δ, h<sup>+</sup></i>	U. Fleig
UFY 229	<i>cut7-446, leu1-32, h<sup>-</sup></i>	I.Hagan
UFY 231	<i>cut7-23, leu1-32, h<sup>-</sup></i>	I.Hagan
UFY 232	<i>cut7-21, leu1-32, h<sup>-</sup></i>	I.Hagan
UFY 233	<i>cut7-22, leu1-32, h<sup>-</sup></i>	I.Hagan
UFY 248	<i>pkl1D12::ura4<sup>+</sup>, ade6-M216, leu1-32, ura4-D18, h<sup>-</sup></i>	A. Pidoux
UFY 249	<i>pkl1Δ::his3<sup>+</sup>, ade6-M210, leu1-32, ura4-D18, his3-D1, h<sup>-</sup></i>	A. Pidoux
UFY 250	<i>mal16-1, ade6-M210, leu1-32, ura4-D6, h<sup>-</sup></i>	U. Fleig
UFY 336	<i>alp14Δ::kan<sup>r</sup>, ura4-Dx, h<sup>+</sup></i>	U. Fleig
UFY 416	<i>mal16-1, ade6-M210, leu1-32, ura4-D6, h<sup>+</sup></i>	Eigene Arbeit
UFY 423	<i>mal16-1, ade6-M210, leu1-32, ura4-D6, h<sup>-</sup></i>	Eigene Arbeit
UFY 437	<i>k1p2-D25::ura4<sup>+</sup>, ade6-M216, leu1-32, ura4-D18, his3-D1, h<sup>-</sup></i>	R. McIntosh
UFY 456	<i>mal2-1, ade6-M210, h<sup>-</sup></i>	U. Fleig
UFY 511	<i>lys1-131, h<sup>-</sup></i>	S. Forsburg

Stamm	Genotyp	Herkunft
UFY 513	<i>swi5-39, ura3-34, h<sup>+</sup></i>	H. Schmidt
UFY 514	<i>swi5-39, leu3-155, h<sup>-</sup></i>	H. Schmidt
UFY 537	<i>lys1-131, swi5-39, h<sup>+</sup></i>	H. Schmidt
UFY 538	<i>ura1-171, his6-365, swi5-39, h<sup>-</sup></i>	H. Schmidt
UFY 561	<i>mal3Δ::ura4<sup>+</sup>, ade6-M210, leu1-32, ura4-D18, his3Δ, h<sup>+</sup></i>	U. Fleig
UFY 596	<i>mal3pkGFP::ura4<sup>+</sup>, ade6-M210, leu1-32, ura4-D18, his3-D1, h<sup>-</sup></i>	H. Browning
UFY 597	<i>mal2-GFP/kan<sup>r</sup>, ade6-M210, leu1-32, ura4-D6, h<sup>+</sup></i>	U. Fleig
UFY 598	<i>peg1-GFP/kan<sup>r</sup>, ade6-M210, leu1-32, ura4-D6, Ch<sup>16</sup> [ade6-M216], h<sup>-</sup></i>	Eigene Arbeit
UFY 603	<i>spdml-GFP/kan<sup>r</sup>, ade6-M210, leu1-32, ura4-D6, h<sup>-</sup></i>	Eigene Arbeit
UFY 605	<i>ade6-M210, leu1-32, ura4-D18, his3-D1, h<sup>-</sup></i>	K. Gould
UFY 606	<i>ade6-M216, leu1-32, ura4-D18, his3-D1, h<sup>+</sup></i>	K. Gould
UFY 607	<i>peg1-1, leu1-32, ura4-D18, h<sup>-</sup></i>	I. Hagan
UFY 608	<i>peg1-1, leu1-32, ura4-D18, his2, h<sup>+</sup></i>	I. Hagan
UFY 617	<i>spc7-HA/kan<sup>r</sup>, ade6-M210, ura4-D6, Ch<sup>16</sup> [ade6-M216], h<sup>-</sup></i>	U. Fleig
UFY 644	<i>mal3Δ::ura4<sup>+</sup>, peg1-1, ade6-M210, leu1-32, ura4-D18, his3 Δ, h<sup>-</sup></i>	U. Fleig
UFY 653	<i>mal3-005, ade6-M210, leu1-32, ura4-D18, his3Δ, h<sup>+</sup></i>	U. Fleig
UFY 654	<i>mal3-206, ade6-M210, leu1-32, ura4-D18, his3Δ, h<sup>+</sup></i>	U. Fleig
UFY 660	<i>peg1-GFP/kan<sup>r</sup>, ade6-M210, ura4-D6, h<sup>+</sup></i>	Eigene Arbeit
UFY 661	<i>peg1-GFP/kan<sup>r</sup>, ade6-M210, leu1-32, ura4-D6, h<sup>+</sup></i>	Eigene Arbeit
UFY 698	<i>peg1-GFP/kan<sup>r</sup>, cut9-665, leu1, ura4-D6, h<sup>-</sup></i>	Eigene Arbeit
UFY 715	<i>peg1-1, ade6-M216, leu1-32, ura4-D18, his3-1, h<sup>+</sup></i>	Eigene Arbeit
UFY 717	<i>c16E8-HA/kan<sup>r</sup>, ade6-M210, leu1-32, ura4-D6, h<sup>-</sup></i>	Eigene Arbeit
UFY 738	<i>mal3-209, ade6-M210, leu1-32, ura4-D18, his3Δ, h<sup>+</sup></i>	U. Fleig
UFY 743	<i>peg1pkGFP::ura4<sup>+</sup>, ade6-M210, leu1-32, ura4-D18, his3-D1, h<sup>-</sup></i>	Eigene Arbeit
UFY 774	<i>p32A8-HA/kan<sup>r</sup>, ade6-M210, leu1-32, ura4-D18, his3Δ, h<sup>-</sup></i>	Eigene Arbeit

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

*ade6-Mx*: *ade6-M210* bzw. *ade6-M216*

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

*leu-x*: *leu1-32* bzw. *leu3-155*

### 8.1.2.2 Hergestellte Stämme

Stamm	Ausgangsstämme	Genotyp
UFY 237	UFX 212 x UFY 229	<i>cut7-446, spi1<sup>+</sup>, ade6-M210, leu1-32, his3Δ, h<sup>+</sup></i>
UFY 238		<i>spi1<sup>+</sup>, cut7<sup>+</sup>, leu1-32, h<sup>+</sup></i>
UFY 239		<i>spi1-25, cut7<sup>+</sup>, leu1-32, ura4-D6, h<sup>-</sup></i>
UFY 240		<i>spi1-25, cut7-446, ade6-M210, leu1-32, ura4-D6, his3Δ, h<sup>-</sup></i>
UFY 293	UFY 212 x UFY 231	<i>spi1<sup>+</sup>, cut7<sup>+</sup>, leu1-32, h<sup>-</sup></i>
UFY 294		<i>spi1<sup>+</sup>, cut7.23, ade6-M210, leu1-32, his3Δ, h<sup>+</sup></i>
UFY 295		<i>spi1-25, cut7.23, ade6-M210, leu1-32, ura4-D6, his3Δ, h<sup>+</sup></i>
UFY 296		<i>spi1-25, cut7<sup>+</sup>, leu1-32, ura4-D6, h<sup>-</sup></i>
UFY 305	UFY 212 x UFY 249	<i>spi1<sup>+</sup>, pkl1<sup>+</sup>, ade6-M210, leu1-32, ura4-Dx, his3Δ, h<sup>+</sup></i>
UFY 306		<i>spi1-25, pkl1<sup>+</sup>, ade6-M210, leu1-32, ura4-Dx, his3Δ, h<sup>+</sup></i>
UFY 307		<i>spi1-25, pkl1Δ::his3<sup>+</sup>, ade6-M210, leu1-32, ura4-Dx, his3Δ, h<sup>-</sup></i>
UFY 308		<i>spi1<sup>+</sup>, pkl1Δ::his3<sup>+</sup>, ade6-M210, leu1-32, ura4-Dx, his3Δ, h<sup>-</sup></i>
UFY 316	UFY 212 x UFY 248	<i>spi1<sup>+</sup>, pkl1D12::ura4<sup>+</sup>, ade6-Mx, leu1-32, ura4-Dx, his3Δ, h<sup>-</sup></i>
UFY 317		<i>spi1<sup>+</sup>, pkl1<sup>+</sup>, ade6-Mx, leu1-32, ura4-Dx, h<sup>+</sup></i>
UFY 318		<i>spi1-25, pkl1D12::ura4<sup>+</sup>, ade6-Mx, leu1-32, ura4-Dx, h<sup>-</sup></i>

Stamm	Ausgangsstämme	Genotyp
UFY 319		<i>spi1-25, pk11<sup>+</sup>, ade6-Mx, leu1-32, ura4-Dx, his3Δ, h<sup>+</sup></i>
UFY 443	UFY 416 x UFY 456	<i>mal16-1, mal2-1, ade6-M210, leu1-32, ura4-D6, h<sup>-</sup></i>
UFY 444		<i>mal16<sup>+</sup>, mal2<sup>+</sup>, ade6-M210, leu1-32, ura4-D6, h<sup>+</sup></i>
UFY 445		<i>mal16-1, mal2<sup>+</sup>, ade6-M210, leu1-32, ura4-D6, h<sup>+</sup></i>
UFY 446		<i>mal16<sup>+</sup>, mal2-1, ade6-M210, leu1-32, ura4-D6, h<sup>-</sup></i>
UFY 471	UFY 135 x UFY 423	<i>mal16<sup>+</sup>, mal3<sup>+</sup>, ade6-M210, leu1-32, ura4-Dx, his3Δ/his3, h<sup>+</sup></i>
UFY 472		<i>mal16-1, mal3<sup>+</sup>, ade6-M210, leu1-32, ura4-Dx, his3Δ/his3<sup>+</sup>, h<sup>+</sup></i>
UFY 473		<i>mal16<sup>+</sup>, mal3Δ::his3<sup>+</sup>, ade6-M210, leu1-32, ura4-Dx, his3Δ/his3<sup>+</sup>, h<sup>-</sup></i>
UFY 474		<i>mal16-1, mal3Δ::his3<sup>+</sup>, ade6-M210, leu1-32, ura4-Dx, his3Δ/his3<sup>+</sup>, h<sup>-</sup></i>
UFY 479	UFY 138 x UFY 416	<i>mal16<sup>+</sup>, mph1<sup>+</sup>, ade6-Mx, leu1-32, ura4-Dx, h<sup>-</sup></i>
UFY 480		<i>mal16-1, mph1<sup>+</sup>, ade6-Mx, leu1-32, ura4-Dx, h<sup>+</sup></i>
UFY 481		<i>mal16<sup>+</sup>, mph1Δ::ura4<sup>+</sup>, ade6-Mx, leu1-32, ura4-Dx, h<sup>-</sup></i>
UFY 482		<i>mal16-1, mph1Δ::ura4<sup>+</sup>, ade6-Mx, leu1-32, ura4-Dx, h<sup>+</sup></i>
UFY 487	UFY 212 x UFY 437	<i>spi1<sup>+</sup>, klp2<sup>+</sup>, ade6-Mx, leu1-32, ura4-Dx, his3-D1, h<sup>-</sup></i>
UFY 488		<i>spi1-25, klp2<sup>+</sup>, ade6-Mx, leu1-32, ura4-Dx, h<sup>+</sup></i>
UFY 489		<i>spi1<sup>+</sup>, klp2-D25::ura4<sup>+</sup>, ade6-Mx, leu1-32, ura4-Dx, h<sup>-</sup></i>
UFY 490		<i>spi1-25, klp2-D25::ura4<sup>+</sup>, ade6-Mx, leu1-32, ura4-Dx, his3-D1, h<sup>+</sup></i>
UFY 558	UFY 139 x UFY 416	<i>mal16-1, mad2Δ::ura4<sup>+</sup>, ade6-M210, leu1-32, ura4-Dx, h<sup>-</sup></i>
UFY 609	UFY 561 x UFY 598	<i>peg1-GFP/kan<sup>r</sup>, mal3Δ::ura4<sup>+</sup>, ade6-M210, leu1-32, ura4-Dx, his3Δ, Ch<sup>16</sup> [ade6-M216], h<sup>+</sup></i>
UFY 612	UFY 561 x UFY 603	<i>spdaml-GFP/kan<sup>r</sup>, mal3Δ::ura4<sup>+</sup>, ade6-M210, leu1-32, ura4-Dx, his3Δ, h<sup>-</sup></i>
UFY 656	UFY 212 x UFY 596	<i>mal3pkGFP::ura4<sup>+</sup>, spi1-25, ade6-M210, leu1-32, ura4-Dx, his3Δ, h<sup>-</sup></i>
UFY 657	UFY 212 x UFY 603	<i>spdaml-GFP/kan<sup>r</sup>, spi1-25, ade6-M210, leu1-32, ura4-D6, his3Δ, h<sup>-</sup></i>
UFY 662	UFY 596 x UFY 608	<i>mal3pkGFP::ura4<sup>+</sup>, peg1-1, ade6-M210, leu1-32, ura4-D18, his2/his3Δ, h<sup>-</sup></i>
UFY 693	UFY 210 x UFY 211	<i>spc7-GFP/kan<sup>r</sup>, spi1-25, ade6-M210, leu1-32, ura4-D6, h<sup>-</sup></i>
UFY 697	UFY 209 x UFY 660	<i>peg1-GFP/kan<sup>r</sup>, cut9-665, ura4-D6, h<sup>+</sup></i>
UFY 698		<i>peg1-GFP/kan<sup>r</sup>, cut9-665, leu1, ura4-D6, h<sup>-</sup></i>
UFY 706	UFY 336 x UFY 607	<i>alp14<sup>+</sup>, peg1-1, leu1-32, leu1-32, ura4-Dx, h<sup>-</sup></i>
UFY 707		<i>alp14Δ::kan<sup>r</sup>, peg1<sup>+</sup>, ura4-Dx, h<sup>-</sup></i>
UFY 708		<i>alp14Δ::kan<sup>r</sup>, peg1-1, ura4-Dx, h<sup>+</sup></i>
UFY 709		<i>alp14<sup>+</sup>, peg1<sup>+</sup>, leu1-32, ura4-Dx, h<sup>+</sup></i>
UFY 710	UFY 664 x UFY 708	<i>peg1-1, mal3Δ::ura4<sup>+</sup>, ade6-M210, ura4-Dx, h<sup>+</sup></i>
UFY 711		<i>peg1-1, alp14Δ::kan<sup>r</sup>, mal3Δ::ura4<sup>+</sup>, ura4-Dx, h<sup>-</sup></i>
UFY 712		<i>peg1-1, alp14Δ::kan<sup>r</sup>, leu1-32, ura4-Dx, h<sup>-</sup></i>
UFY 713		<i>peg1-1, ade6-M210, leu1-32, ura4-Dx, h<sup>+</sup></i>
UFY 718	UFY 211 x UFY 597	<i>mal2-GFP/kan<sup>r</sup>, spi1-25, ade6-M210, leu1-32, ura4-D6, h<sup>+</sup></i>
UFY 721	UFY 423 x UFY 597	<i>mal2-GFP/kan<sup>r</sup>, mal16-1, ade6-M210, leu1-32, ura4-D6, h<sup>-</sup></i>
UFY 734	UFY 210 x UFY 607	<i>spc7-GFP/kan<sup>r</sup>, peg1-1, ura4-Dx, h<sup>-</sup></i>
UFY 776	UFY 617 x UFY 698	<i>spc7-HA/kan<sup>r</sup>, peg1-GFP/kan<sup>r</sup>, cut9-665, ura4-D6, h<sup>-</sup></i>

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

*ade6-Mx*: *ade6-M210* bzw. *ade6-M216*

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

*leu-x*: *leu1-32* bzw. *leu3-155*

### 8.1.2.3 Stämme des *mal16*<sup>+</sup>-Kartierungsversuchs

Stamm	Ausgangsstämme	Genotyp
UFY 40		<i>ade6-M210, leu1-32, h<sup>-</sup></i>
UFY 132		<i>ade6-M216, leu1-32, ura4-D18, his3Δ, h<sup>+</sup></i>
UFY 248		<i>pk11D12::ura4<sup>+</sup>, ade6-M216, leu1-32, ura4-D18, h<sup>-</sup></i>
UFY 416		<i>mal16-1, ade6-M210, leu1-32, ura4-D6, h<sup>+</sup></i>
UFY 456		<i>mal2-1, ade6-M210, h<sup>-</sup></i>
UFY 511		<i>lys1-131, h<sup>-</sup></i>
UFY 513		<i>swi5-39, ura3-34, h<sup>+</sup></i>
UFY 514		<i>swi5-39, leu3-155, h<sup>-</sup></i>
UFY 517	((UFY 416 x UFY 511) x UFY 40)	<i>mal16-1, lys1-131, ade6-M210, leu1-32, h<sup>-</sup></i>
UFY 519	(UFY 517 x UFY 513)	<i>mal16-1, ade6-M210, leu1-32, swi5-39, h<sup>-</sup></i>
UFY 537		<i>lys1-131, swi5-39, h<sup>+</sup></i>
UFY 538		<i>ura1-171, his6-365, swi5-39, h<sup>-</sup></i>
UFY 539	(UFY 519 x UFY 513)	<i>mal16-1, swi5-39, h<sup>+</sup></i>
UFY 540	(UFY 519 x UFY 513)	<i>mal16-1, leu1-32, swi5-39, h<sup>-</sup></i>
UFY 541	(UFY 456 x UFY 514)	<i>mal2-1, swi5-39, ade6-M210, h<sup>-</sup></i>
UFY 542	(UFY 456 x UFY 514)	<i>mal2-1, swi5-39, leu3-155, h<sup>+</sup></i>
UFY 564	((UFY 132 x UFY 514) x UFY 248)	<i>pk11D12::ura4<sup>+</sup>, leu-x, ura4-D18, swi5-39, h<sup>-</sup></i>
UFY 567	(UFY 132 x UFY 540)	<i>mal16-1, ade6-M216, leu1-32, ura4-D18, swi5-39, h<sup>+</sup></i>
UFY 717	UFY 103	<i>c16E8-HA/kan<sup>r</sup>, ade6-M210, leu1-32, ura4-D6, h<sup>-</sup></i>
UFY 748	UFY 248 x UFY 416	<i>mal16-1, pk11D12::ura4<sup>+</sup>, ade6-Mx, leu1-32, ura4-Dx, h<sup>+</sup></i>
UFY 774	UFY 605	<i>p32A8-HA/kan<sup>r</sup>, ade6-M210, leu1-32, ura4-D18, his3Δ, h<sup>-</sup></i>

## 8.2 Publikationen

Kerres, A., Vietmeier-Decker, C., Ortiz, J., Karig, I., Beuter, C., Hegemann, J., Lechner, J. and Fleig, U. (2004). The fission yeast kinetochore component Spc7 associates with the EB1 family member Mal3 and is required for kinetochore-spindle association. *Mol Biol Cell*.

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.

### In Vorbereitung:

Grallert, A., Karig, I., Beuter, C., Fleig, U. and Hagan, I. (2004). Peg1, a fission yeast homologue of human CLASP-proteins, regulates microtubule dynamics and acts antagonistically to the EB1 family member Mal3. *In preparation*

## 9 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die mich in den letzten Jahren durch die Gänge des Instituts für Mikrobiologie begleitet haben und mich bei der Umsetzung und Erstellung dieser Arbeit unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gebührt Herrn Prof. Dr. Johannes H. Hegemann und Frau Dr. Ursula Fleig, die mir als studentische Hilfskraft bereits sehr früh die Möglichkeit gegeben haben, meine -damals noch begrenzten- wissenschaftlichen Fähigkeiten in ihren Arbeitsgruppen auszuleben und mir im Laufe der Jahre das Vertrauen schenkten, neben der Diplomarbeit auch meine Doktorarbeit in ihren Laboren anfertigen zu können. Ohne die wissenschaftliche Betreuung von Hans und insbesondere Ursula wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Ein ganz besonderer Dank gilt Ursula, die mir stets mit motivierenden Worten und kritischen Anregungen im richtigen Moment zur Seite stand. So manche ChIP-Analyse wäre ohne die Worte von Ursula aufgrund vorzeitigen „Frust“-Abbruchs nicht geglückt. Auch für die große Geduld, die sie mir in allen Situationen entgegengebracht hat, sei es beim Lesen aller Manuskriptvarianten, im Labor oder am Frankfurter Flughafen, möchte ich mich bedanken.

Ebenfalls danke ich Herrn Prof. Dr. Rolf Wagner für die Übernahme des Koreferates und die Begutachtung meiner Arbeit in kürzester Zeit.

Ein Dank geht auch an die Gesellschaft von Freunden und Förderern der Heinrich-Heine-Universität, die mir durch die Verleihung eines Doktorandenstipendiums der „Düsseldorf Entrepreneurs-Foundation“ diese Arbeit ermöglicht hat.

Natürlich möchte ich nicht vergessen, mich bei allen Labor-Kollegen im anliegenden Gebäudetrakt für die gute Zusammenarbeit zu bedanken, die trotz der täglichen Gefahr durch die Initialen F.W. „gebrandmarkt“ zu werden, stets gutgelaunt und hilfsbereit waren.

Ein ganz dickes „Danke schön“ und „Hello again“ an meine direkten Labor-Kollegen Corina, Christoph, Anne und Eva, mit denen die Arbeit Bank an Bank immer ein großer Spaß war (mit Anne meist erst ab elf Uhr!). Insbesondere die freundschaftliche Atmosphäre und der niveauvolle tägliche Gedankenaustausch macht die Zeit mit Euch unvergesslich!

Ein großer Dank gebührt meinen Eltern, die trotz der Salami-Brote zwischen meinen Schulheften in der Grundschule, immer an mich geglaubt haben und mich aufopfernd unterstützt haben. Vor allem Marcus gilt ein ganz liebes „Danke schön“, der meine Launen in der letzten Zeit sehr entspannt ertragen hat und alles Erdenkliche getan hat, um mich zu entlasten und aufzuheitern. Vielen Dank, Marcus!

Vielen Dank, Euch allen !

---

## Lebenslauf

### Persönliche Daten

---

Name:	Inga Eliane Karig
geboren am:	14.12.1975 in Ludwigsburg
Familienstand:	ledig

### Schulbildung

---

August 1982 – Juli 1986	Geschwister-Scholl-Schule Krefeld (Grundschule)
September 1986 – Juli 1992	Maria-Sibylla-Merian-Gymnasium Krefeld
August 1992 – Juni 1995	Ricarda-Huch-Gymnasium Krefeld

Abschluß: Allgemeine Hochschulreife

---

### Universitätsausbildung und Berufserfahrung:

---

Oktober 1995 – September 2000	Studiengang Biologie (Diplom) Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf Abschluß: Diplom-Biologin Diplomarbeit: Charakterisierung des Mitose-relevanten mal25 <sup>+</sup> -Genes aus Schizosaccharomyces pombe
seit November 2000	wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. J. H. Hegemann/ PD. Dr. U. Fleig, Institut für Mikrobiologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Düsseldorf, Oktober 2004

(Inga Karig)

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit versichere ich, daß die vorliegende Arbeit von mir selbst verfasst wurde und diese in der vorgelegten oder ähnlichen Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht wurde.

Es wurden keine anderen als die von mir angegebenen Hilfsmittel verwendet. Stellen, die aus anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn entsprechend übernommen wurden, habe ich mit Quellangaben kenntlich gemacht.

Düsseldorf, Oktober 2004

(Inga Karig)