

**Funktionelle Charakterisierung der  
Kinetochorproteine Ame1p und Iml3p sowie des  
Folsäurebiosyntheseproteins Fol1p  
in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae***

**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  
(Fachbereich Biologie)

vorgelegt von

**Gabriele Jenny Köhler**

aus Wuppertal

Düsseldorf

2005

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

1. Berichterstatter: Prof. Dr. J. H. Hegemann
2. Berichterstatter: Prof. Dr. P. Westhoff

Tag der mündlichen Prüfung: 11.07.2005

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>8</b>
1.1	Faktoren für die stabile Weitergabe der Erbinformation in <i>S. cerevisiae</i> .....	9
1.1.1	Die Weitergabe der genetischen Information an die Folgegenerationen.....	9
1.1.2	Der Zellzyklus der Hefe <i>S. cerevisiae</i> .....	10
1.1.3	Das Kinetochor der Hefe <i>S. cerevisiae</i> .....	12
1.1.3.1	Ein Überblick über das Kinetochor .....	12
1.1.3.2	Der Aufbau des Kinetochors der Hefe <i>S. cerevisiae</i> .....	13
1.1.4	Kontrollmechanismen bei der DNA-Verteilung.....	16
1.1.5	Die Proteine Ame1p und Iml3p.....	18
1.1.6	Zielsetzung.....	19
1.2	Filamentöses Wachstum der Hefe <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	20
1.2.1	Auslöser für die Ausbildung von Pseudohyphen in der Hefe <i>S. cerevisiae</i> .....	20
1.2.2	Makromolekulare Veränderungen bei filamentös wachsenden Zellen.....	21
1.2.3	Verschiedene Signalwege werden für die Induktion von filamentösem Wachstum benötigt .....	23
1.2.4	Der PKA Weg.....	23
1.2.5	Der MAPK Weg .....	24
1.2.6	Adhäsives und filamentöses Wachstum kann unabhängig von der MAPK- Kaskade und vom cAMP-Weg hervorgerufen werden.....	25
1.2.7	Das Fehlen von Foll1p induziert invasives und adhäsives Wachstum .....	26
1.2.8	Zielsetzung.....	28
<b>2</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>29</b>
2.1	Chemikalien .....	29
2.2	Enzyme .....	31
2.2.1	Restriktionsendonukleasen .....	31
2.2.2	Polymerasen, modifizierende Enzyme und rekombinante Peptide.....	31
2.3	Sonstige spezielle Materialien .....	31
2.4	Antikörper.....	32
2.5	DNA-Längenstandards: .....	32
2.6	Stämme, Medien und Anzucht.....	32
2.6.1	<i>Escherichia coli</i> .....	32
2.6.2	Hefestämme .....	33
2.6.3	Medien und Anzucht.....	35
2.6.3.1	Medien für <i>Escherichia coli</i> .....	35

## Inhaltsverzeichnis

---

2.6.3.2	Anzucht von <i>Escherichia coli</i> .....	35
2.6.3.3	Medien für <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	35
2.6.3.4	Anzucht von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	37
2.7	Synthetische Oligonukleotide .....	37
2.8	Plasmide.....	40
2.9	DNA-Klonierung .....	42
2.9.1	DNA Restriktionsanalysen .....	42
2.9.2	Elution von DNA aus einem Agarosegel.....	42
2.9.3	Fällung von DNA.....	42
2.9.4	Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten .....	43
2.9.5	DNA Ligation .....	43
2.9.6	Polymerase-Kettenreaktion zur Amplifikation von DNA .....	43
2.9.7	Sequenzierung von DNA-Fragmenten.....	44
2.10	DNA-Gewinnung aus <i>E. coli</i> .....	44
2.10.1	Herstellung DMSO-kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen.....	44
2.10.2	Herstellung von elektrokompetenten <i>E. coli</i> -Zellen .....	44
2.10.3	Ein-Minuten Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen .....	45
2.10.4	Elektroporation von <i>E. coli</i> -Zellen .....	45
2.10.5	Isolation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> -Zellen .....	45
2.11	Hefemethoden.....	46
2.11.1	Manipulation von Hefezellen.....	46
2.11.1.1	Transformation von <i>S. cerevisiae</i> (nach (Gietz and Woods, 2002)).....	46
2.11.1.2	Disruption und Epitop-Markierung chromosomaler Hefegene durch homologe Rekombination.....	47
2.11.1.3	Analyse von adhäsivem und filamentösem Wachstum .....	48
2.11.1.4	Sporulation und Tetradenanalyse von diploiden Hefestämmen .....	49
2.11.1.5	Induktion der MAPK-Kaskade abhängigen Proteine Kss1p und Fus3p durch $\alpha$ -Faktor .....	49
2.11.1.6	Induktion eines mitotischen Arrests mit Hilfe von Nocodazol.....	50
2.11.1.7	Präparation von genomischer und Plasmid-DNA aus Hefezellen .....	50
2.11.2	Proteinanalyse von Hefezellen.....	50
2.11.2.1	Herstellung von Protein-Rohextrakten aus Hefezellen.....	50
2.11.2.2	Western-Blot Analyse.....	51
2.11.2.3	LacZ / Overlay Assay .....	52
2.11.2.4	Quantifizierung der <i>FLO11</i> -Promotor Aktivität.....	52

## Inhaltsverzeichnis

---

2.11.3	Nachweis von Protein-Interaktionen .....	52
2.11.3.1	Ko-Immunopräzipitation .....	52
2.11.3.2	Zwei-Hybrid-Analyse .....	53
2.11.3.3	Ein-Hybrid-Analyse.....	54
2.11.3.4	Immunfluoreszenz .....	55
2.11.3.5	Bestimmung des Knospungsmusters von Hefen .....	56
2.11.3.6	Serielle Tropftests .....	56
2.11.3.7	Bestimmung der genetischen Stabilität.....	56
2.11.3.7.1	Bestimmung der genetischen Stabilität mit Hilfe des <i>ade2-101/SUP11</i> - Systems (Rot/Weiß-Selektion) .....	57
2.11.3.7.2	Bestimmung der genetischen Stabilität mittels FACS-Analyse .....	57
2.11.3.7.3	Bestimmung der Verlustrate von Chromosom III (Quantitativer Paarungsversuch).....	58
2.11.3.7.4	Bestimmung der Verlustrate von Chromosom V .....	60
2.11.3.8	DNA-Profil-Erstellung.....	61
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>63</b>
3.1	Untersuchung struktureller Komponenten des Kinetochors .....	63
3.1.1	Lokalisierung der Proteine Iml3p und Ame1p .....	63
3.1.2	Ame1p und Iml3p verhalten sich unterschiedlich in einer <i>CEN</i> -DNA-basierten Ein-Hybrid-Analyse.....	64
3.1.3	Untersuchungen zu Iml3p.....	65
3.1.3.1	Ein Ausfall von Iml3p verschlechtert nicht die Präzision der Verteilung endogener Chromosomen .....	65
3.1.3.2	Ein <i>iml3Δ</i> -Stamm zeigt einen normalen Spindelzyklus .....	68
3.1.3.3	Das Fehlen von Iml3p aktiviert den Spindelaufbau-Kontrollpunkt.....	69
3.1.3.4	Iml3p selbst hat keine Kontrollpunktfunktion.....	71
3.1.3.5	Das Fehlen von Iml3p führt zum Verlust von artifiziellen Minichromosomen .....	72
3.1.3.6	Der zentrale Teil und der C-Terminus des Iml3-Proteins werden für dessen Funktion benötigt.....	73
3.1.3.7	Iml3p zeigt genetische Interaktionen mit <i>CEN</i> -DNA assoziierten Kinetochorproteinen sowie mit Ame1p.....	76
3.1.3.8	Iml3p zeigt physikalische Interaktionen mit anderen Kinetochorproteinen in Ko-Immunopräzipitationen.....	78
3.1.3.9	Iml3p interagiert nicht direkt mit Ame1p und Nkp1p .....	79

## Inhaltsverzeichnis

---

3.1.3.10	Die Interaktion von Iml3p mit anderen Kinetochorproteinen ist abhängig von Chl4p.....	80
3.1.3.11	Der zentrale Teil und der C-Terminus von Iml3p werden für die Interaktion mit Ame1p und Ctf3p benötigt.....	81
3.1.4	Untersuchungen zu Ame1p.....	83
3.1.4.1	Deregulierte Expression von Ame1p führt zu einer Aktivierung des mitotischen Kontrollpunktes.....	83
3.1.4.2	Ame1p zeigt schwache genetischen Interaktionen mit verschiedenen Kinetochorproteinen .....	85
3.1.4.3	Ame1p interagiert mit weiteren Kinetochorproteinen in Ko-Immunopräzipitationen.....	86
3.1.4.4	Die Bindung von Ame1p ans Kinetochor ist abhängig von Ctf19p .....	87
3.2	Das trifunktionale Folsäuresynthese-Protein Foll1p.....	89
3.2.1	Die Abwesenheit des <i>FOLI</i> -Gens induziert filamentöses und adhäsives Wachstum .....	89
3.2.2	Durch <i>fol1Δ</i> induziertes filamentöses Wachstum führt zu einer Änderung des Knospungsmusters und der Aktinverteilung.....	92
3.2.3	Das filamentöse Wachstum eines <i>fol1Δ</i> -Stammes ist unabhängig von Tec1p und Phd1p .....	93
3.2.4	Die Fus3p und Kss1p MAP Kinasen werden in einer <i>fol1Δ</i> -Mutante nicht verstärkt phosphoryliert .....	96
3.2.5	Die Deletion von <i>FOLI</i> verursacht eine verstärkte Expression von Flo11p ....	97
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>99</b>
4.1	Ame1p und Iml3p sind neue Komponenten des Kinetochors .....	99
4.1.1	Ame1p und Iml3p lokalisieren am Kinetochor.....	99
4.1.2	Die durch das Fehlen von Iml3p vermittelte genetische Instabilität beschränkt sich auf artifizielle Minichromosomen .....	101
4.1.3	Das Fehlen von Iml3p aktiviert den Spindelaufbau-Kontrollpunkt.....	103
4.1.4	Das Fehlen von Iml3p führt ausschließlich zum Chromosomenverlust .....	104
4.1.5	Iml3p wird über Chl4p an weitere Kinetochorproteine gebunden.....	104
4.1.6	Ame1p interagiert Ctf19p-abhängig mit Proteinen des zentralen Kinetochors .....	106
4.1.7	Modell für das Kinetochor .....	107
4.2	Die Regulation von adhäsivem und filamentösem Wachstum in einer <i>fol1Δ</i> -Mutante .....	109

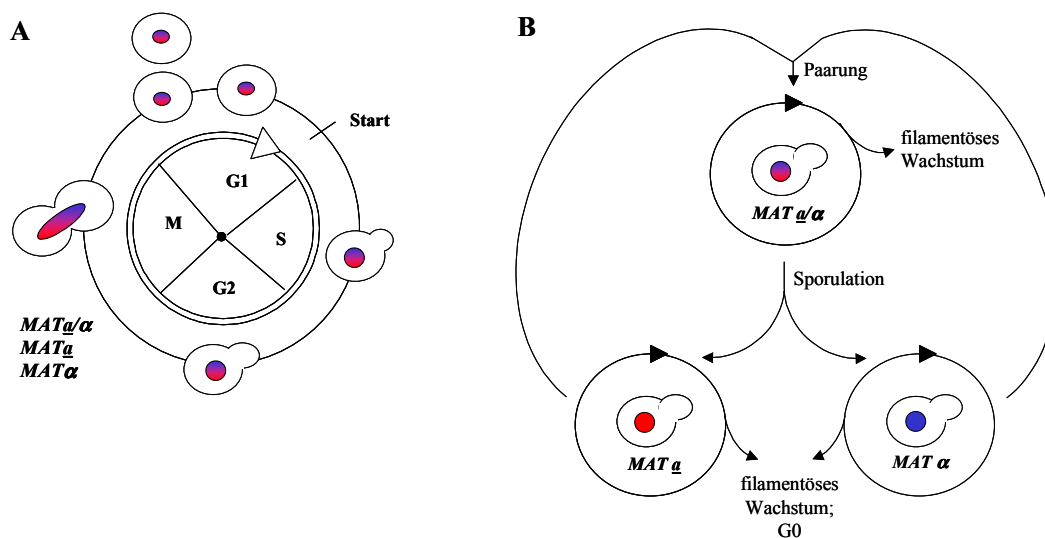
## Inhaltsverzeichnis

---

4.2.1	Das Fehlen des Folat-Koenzyms induziert pseudohyphales und adhäsives Wachstum .....	109
4.2.2	Das adhäsive Wachstum einer <i>fol1Δ</i> -Mutante ist abhängig von Ste12p und Flo11p .....	111
4.2.3	Das filamentierungs- und adhäsionsspezifische Signal wird nicht über die MAPK-Kaskade weitergeleitet .....	114
4.2.4	Die Expression von <i>FLO11</i> wird durch <i>fol1Δ</i> reguliert .....	114
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>116</b>
	<b>Veröffentlichungen .....</b>	<b>117</b>
	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>118</b>
	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>119</b>
	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>126</b>
	<b>Danksagung .....</b>	<b>128</b>
	<b>Eidesstattliche Erklärung .....</b>	<b>130</b>

# 1 Einleitung

Der Modellorganismus *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) wird für die Untersuchung verschiedenster grundlegender molekularer und zellbiologischer Prozesse verwendet. Dieser Organismus eignet sich für die Untersuchung komplexer Regulationsmechanismen besonders wegen seiner sehr kurzen Generationszeit, einer leichten Anzucht, exzellenter molekulargenetischer Handhabbarkeit und des kompakten Genoms, welches sehr viele Homologien zu höheren Organismen aufweist. Sowohl haploide als auch diploide Hefen vermehren sich vegetativ asexuell durch Knospung, wobei eine leicht ovale Mutterzelle eine ebenfalls leicht ovale Tochterzelle ausbildet und abschnürt (Abbildung 1A).



**Abbildung 1: Vegetativer Lebenszyklus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae***

(A) Haploide  $a$  und  $\alpha$  Zellen vermehren sich ebenso wie diploide  $a/\alpha$  Zellen asexuell durch Knospung. Hierzu durchlaufen sie einen Zellzyklus bestehend aus G1, S, G2 und M-Phase. Zu Beginn der G1-Phase, vor Durchschreiten des Startpunktes, können sowohl haploide als auch diploide Zellen aus dem Zellzyklus austreten und (B) abhängig vom Nährstoffangebot filamentieren, in eine Ruhephase  $G_0$  eintreten (haploide Hefen), paaren (haploide Hefen) oder sporulieren (diploide Hefen).

Haploide Hefestämme kommen in den beiden Paarungstypen  $a$  und  $\alpha$  ( $MAT_a$  und  $MAT_\alpha$ ) vor. Diese können untereinander paaren und es entstehen diploide Zellen mit dem Paarungstyp  $a/\alpha$  ( $MAT_{a/\alpha}$ ) (Abbildung 1B). Wildtyphefen können bei jeder Teilung, mit Ausnahme der allerersten, ihren Paarungstyp wechseln, so dass Hefen beider Paarungstypen nebeneinander vorliegen und zur Paarung bereitstehen (Cosma, 2004; Haber, 1998). Die meisten Laborstämme können aufgrund einer Mutation im *HO*-Gen keinen Paarungstypwechsel mehr vollziehen. Dies ermöglicht die Forschung an stabil haploiden Hefezellen.

Haploide Hefezellen entstehen durch Sporulation aus diploiden Hefezellen (Abbildung 1B). Der Mangel an verwertbaren Kohlenstoff- und Stickstoffquellen induziert in diploiden Zellen die Meiose und die Sporulation, aus der je zwei haploide Sporen mit dem Paarungstyp  $a$  und



$\alpha$  hervorgehen (Honigberg and Purnapatre, 2003). Aus diesen können wieder stabil haploide Hefestämme heranwachsen. Spezifische Veränderungen im Nährstoffangebot, die später näher erläutert werden, können sowohl in haploiden als auch in diploiden Zellen filamentöses, auch pseudohyphal genanntes Wachstum induzieren. Hierbei bilden sich anstelle der leicht ovalen Knospen elongierte Knospen aus, die nicht mehr komplett von der Mutterzelle abgeschnürt werden (Abbildung 6). Das filamentöse Wachstum dient vor allem der Suche nach Nährstoffen, da Hefezellen wie viele andere Mikroorganismen keine Fortbewegungsmöglichkeit besitzen, um die Nährstoffe zu erreichen. Neben der Ausbildung von Filamenten haben haploide Zellen zudem die Möglichkeit, bei fehlenden Nährstoffen in die Ruhephase G<sub>0</sub> einzutreten (Herman, 2002). Sobald das Nährstoffangebot wieder ausreichend ist, können sie wieder in die G<sub>1</sub>-Phase des Zellzyklus eintreten.

### **1.1 Faktoren für die stabile Weitergabe der Erbinformation in *S. cerevisiae***

Die vegetative Vermehrung der Hefe *S. cerevisiae* erfolgt durch Knospung. Hierbei entstehen aus einer Zelle zwei genetisch gleiche Folgezellen. Essentiell ist dabei die korrekte Verteilung des Erbmaterials auf die Mutter- und die Tochterzelle.

#### **1.1.1 Die Weitergabe der genetischen Information an die Folgegenerationen**

Für eine korrekte Verteilung des Erbmaterials auf die Folgegenerationen müssen alle hieran beteiligten Schritte fehlerfrei erfolgen. Dies schließt eine korrekte Replikation des Genoms sowie die korrekte Verteilung der DNA auf die Folgegenerationen in der Mitose ein. Die Überwachung der einzelnen Schritte erfolgt über verschiedene Kontrollpunkte, die bei Fehlern eine Verzögerung im Zellzyklus auslösen können. Fehler, die nicht behoben werden können, führen häufig zu schwerwiegenden Problemen oder sind letal. Chromosomenbrüche und DNA-Mutationen können beispielsweise die Entwicklung von Tumoren auslösen (Pierce, et al., 2001). Dies kann z. B. als Folge von Fehlern bei der Replikation von Tumorsuppressorgenen erfolgen, aber auch durch die Translokation von Chromosomen, wodurch es zur Entstehung neuer Genprodukte kommt, die tumorentwicklungsfördernd wirken können (Lengauer, et al., 1998).

Eine Fehlverteilung der Chromosomen während der Mitose führt zu Aneuploidien in den betreffenden Zellen (Pihan and Doxsey, 1999). Fehlt einer haploiden Zelle ein Chromosom, führt dies unweigerlich zum Tod. Erhält eine Zelle hingegen ein Chromosom zu viel, können Gendosiseffekte verschiedenste Auswirkungen ebenfalls bis hin zum Tod der Zelle bewirken.

Auch in diploiden Organismen kann die falsche Verteilung der Chromosomen bei der Zellteilung schwerwiegende Folgen haben. Ein Beispiel im Menschen für eine in der Meiose auftretende Fehlsegregation ist das Down-Syndrom, welches durch eine Trisomie des Chromosoms 21 entsteht (Sinet, et al., 1979). Des Weiteren sind Aneuploidien eng mit der Entstehung von Krebs verknüpft (Dey, 2004). Beispielsweise treten bei der Entstehung vieler Dickdarntumore häufig Aneuploidien auf, welche durch eine Manifestierung einer erhöhten Chromosomen-Instabilität während der Mitose hervorgerufen werden (Duesberg, et al., 1998) (Lengauer, et al., 1997). Ein wichtiger Auslöser für Krebserkrankungen, einhergehend mit Aneuploidien, kann unter anderem die Inaktivierung der mitotischen Kontrollpunkte sein (Kienitz, et al., 2005).

Im folgenden werden einige der Mechanismen, die zum Erhalt der genetischen Stabilität beitragen, näher vorgestellt.

### **1.1.2 Der Zellzyklus der Hefe *S. cerevisiae***

Für die korrekte Weitergabe der Erbinformation an die Folgegenerationen ist es wichtig, dass die Zellen jeden Zellzyklus korrekt durchlaufen. Dieser beginnt in der sogenannten G1-Phase. In dieser Phase besitzen die Hefezellen einen einfachen Chromosomensatz. Nur zu Beginn dieser Phase haben die Hefezellen die Möglichkeit, abhängig von den Umweltbedingungen, dem Nahrungsangebot und der Zellgröße aus dem Zellzyklus auszutreten (Abbildung 1B) (Bartlett and Nurse, 1990). Sie können entweder in eine Ruhephase eintreten (G0) (Herman, 2002), paaren (haploide Zellen) (Oehlen, et al., 1998) oder sporulieren (diploide Zellen) (Popolo, et al., 1993). Haben die Zellen den Startpunkt überschritten, müssen sie einen gesamten Zellzyklus durchlaufen, bevor sie erneut die Möglichkeit zum Austritt erhalten.

Beim Übergang von der G1- in die S-Phase beginnen die Hefezellen mit der DNA-Synthese und die Spindelpolkörper (engl. spindle pole body, SPB) werden verdoppelt. Die Kinetochore sind im gesamten Zellzyklus mit Ausnahme der Metaphase mit den SPB assoziiert (Goh and Kilmartin, 1993; Guacci, et al., 1997; Jin, et al., 2000).

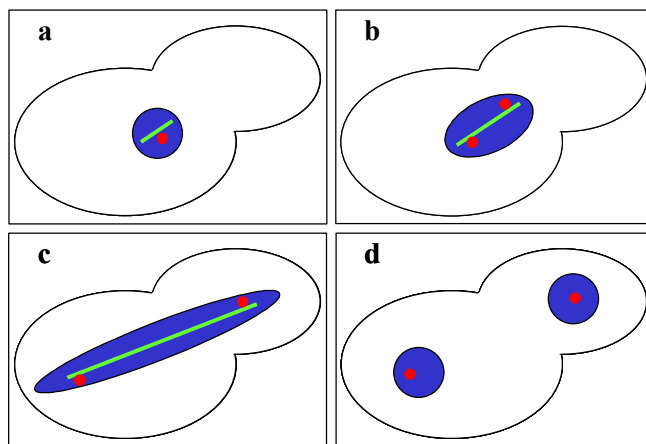
Die S-Phase ist die erste Phase im Zellzyklus, die für den Erhalt der genetischen Stabilität von grundlegender Bedeutung ist. Es muss sichergestellt werden, dass während der Synthese möglichst wenige Replikationsfehler im Genom etabliert werden und dass die Replikation vollständig abgeschlossen wurde, bevor die Zelle in die Mitose eintritt. Am sogenannten G2-M-Kontrollpunkt erfolgt die Kontrolle der DNA-Integrität über verschiedene Kontrollpunktproteine wie z. B. Rad24p oder Rad9p. Fehler führen zu einer Aktivierung von Rad53p (Kondo, et al., 1999; Weinert and Hartwell, 1989). Zudem erfolgt eine Größenkontrolle der Knospe. Nur Zellen, deren DNA-Synthese vollständig beendet wurde

## Einleitung

und deren zukünftige Tochterzellen eine bestimmte Größe erreicht haben, treten in die Mitose ein. Falls die DNA-Synthese nicht abgeschlossen wurde, können die Kontrollpunktproteine einen Zellzyklusarrest einleiten, so dass die Zellen mehr Zeit für die DNA-Synthese erhalten (O'Connell, et al., 2000).

Die Mitose ist der zweite essentielle Schritt zur Aufrechterhaltung der genetischen Stabilität. Hier erfolgt die Verteilung der DNA auf die Mutter- und die Tochterzelle. Auch in dieser Phase erkennen Kontrollpunktproteine Fehler und können einen Zellzyklusarrest einleiten, um der Zelle Zeit zu geben, diese zu beheben (Lew and Burke, 2003).

Die Mitose wird in verschiedene Unterphasen eingeteilt. Beim Eintritt in die Prophase kondensieren die Chromosomen. In *S. cerevisiae* erfolgt allerdings nur eine zwei- bis dreifache Kondensation des genetischen Materials. In der Prometaphase werden die Chromosomen über die Kinetochore mit den Mikrotubuli, die von den Spindelpolkörperchen aus entstehen, verbunden (Abbildung 2) (Helfant, 2002). Diese Bindungen werden in der Metaphase überprüft. Der APC (Anaphase Promoting Complex) inhibiert bis zur bipolaren Anheftung aller Chromosomen an die mitotische Spindel die Trennung der Geschwisterchromatiden (Tinker-Kulberg and Morgan, 1999) (s. Kap. 1.1.4). In der Anaphase



**Abbildung 2: Wichtige Phasen der Mitose**

(a) In der Prometaphase wird eine kurze, bipolare Spindel (grün) ausgebildet, an die die Kinetochore (rot) gebunden werden. Die Geschwister-Kinetochore haben sich noch nicht getrennt und liegen in der Mitte der Spindel zwischen den beiden Spindelpolen, die sich am Ende der Spindel befinden. Die Überprüfung dieser Verbindung erfolgt in der Metaphase.

(b) In der frühen Anaphase werden die Geschwisterchromatiden geteilt und mit der elongierenden Spindel auseinander gezogen.

(c) In der späten Anaphase werden die Geschwisterchromatiden komplett separiert und über die elongierte Spindel wird ein Chromosomensatz in die Tochterzelle transportiert.

(d) In der Telophase kommt es zur Auflösung der Teilungsspindel, zur Kernteilung und zur Dekondensation der DNA (blau).

Abbildung verändert nach (Straight and Murray, 1997)

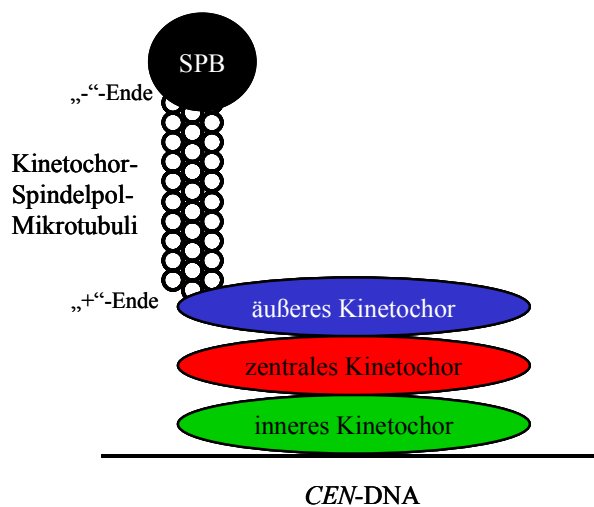
werden die Geschwisterchromatiden über die Teilungsspindel zu den entgegengesetzten SPBs gezogen (Dewar, et al., 2004). *S. cerevisiae* zeigt im Gegensatz zu den meisten anderen Organismen eine geschlossene Mitose, bei der es nicht zur Auflösung der Kernmembran kommt. Nach der vollständigen Verteilung der DNA erfolgt die Telophase mit der Kernteilung und Dekondensation der DNA sowie die Beendigung der Zytokinese und damit die vollständige Abschnürung der Tochter- von der Mutterzelle. Beide können nun in einen neuen Zellzyklus eintreten (Walther and Wendland, 2003).

### 1.1.3 Das Kinetochor der Hefe *S. cerevisiae*

Der Kinetochorkomplex ist ein Multiproteinkomplex, der die Verbindung zwischen der Zentromer- (*CEN*-) DNA und der Teilungsspindel darstellt. Die mitotische Teilungsspindel besteht aus zwei Organisationstypen von Mikrotubuli. Die Kinetochor-Mikrotubuli verbinden die Kinetochore mit den SPBs, während die interpolaren Mikrotubuli von den Polen ausgehend bis weit über die Äquatorialebene hinausreichen können und überlappen, so dass es so aussieht, als ob sie von Pol zu Pol reichen (De Antoni and Gallwitz, 2000). Die Minus-Enden sind mit den SPBs verbunden, während die dynamischen Plus-Enden entweder an die Kinetochore angebunden werden, oder, bei den interpolaren Mikrotubuli, überlappen.

#### 1.1.3.1 Ein Überblick über das Kinetochor

Der Kinetochorkomplex setzt sich aus einem inneren, einem zentralen und einem äußeren Kinetochor zusammen (Cheeseman, et al., 2002b). Als inneres Kinetochor werden hierbei die DNA-bindenden Proteine, als äußeres die mit der Teilungsspindel assoziierten Proteine bezeichnet. Das zentrale Kinetochor wird von Proteinen gebildet, die die Verbindung zwischen den DNA-bindenden und den Mikrotubuli-bindenden Proteinen gewährleisten. Die



**Abbildung 3: Übersicht über das Kinetochor der Hefe *S. cerevisiae***

Das Kinetochor der Hefe *S. cerevisiae* besteht aus einem inneren, einem zentralen und einem äußeren Bereich. Als inneres Kinetochor werden die Zentromer (*CEN*)-DNA-bindenden Proteine (grün), als äußeres die Mikrotubuli (MT)-assoziierten Proteine (blau) bezeichnet. Das zentrale Kinetochor (rot) verbindet die MT- und DNA-bindenden Proteine miteinander. Die Minus-Enden („-“) der Mikrotubuli sind an die SPBs (Spindelpolkörper), die dynamischen Plus-Enden („+“) an das Kinetochor gebunden.

einzelnen Bereiche beinhalten verschiedene postulierte Protein-Subkomplexe, die im folgenden näher beschrieben werden. Etliche der Proteine finden sich auch in den Kinetochorkomplexen höherer Eukaryoten. Besonders die Proteine, die in die mitotischen Kontrollpunkte involviert sind, sowie Proteine des äußeren Kinetochors, die die Verbindung mit der Teilungsspindel darstellen, sind bis zum Menschen hoch konserviert (Cheeseman, et al., 2002b; Lew and Burke, 2003; Jones, et al., 1999). Im Gegensatz hierzu fehlt bisher der Nachweis für Homologe zu den meisten Proteinen des zentralen und inneren Kinetochors.

### 1.1.3.2 Der Aufbau des Kinetochors der Hefe *S. cerevisiae*

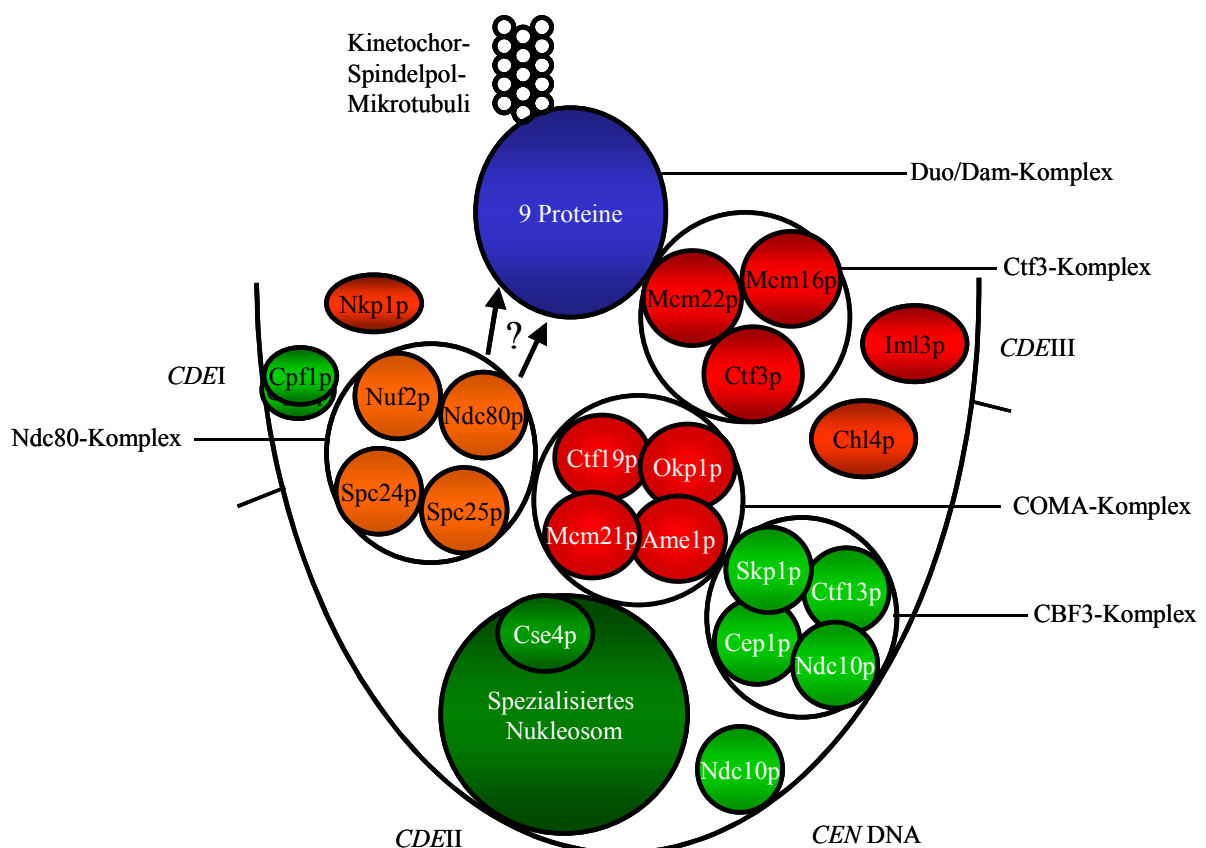
Das Kinetochor der Hefe *S. cerevisiae* besteht gegenwärtig aus mindestens 60 Proteinen (Kline-Smith, et al., 2005), die zu einzelnen Subkomplexen zusammengefasst werden. Viele dieser Proteine konnten erst in jüngster Zeit dem Kinetochor zugeordnet werden. Eine besonders wichtige Rolle hat hierbei die Methode der Immunpräzipitation einzelner Epitopmarkierter bekannter Kinetochorproteine mit anschließender massenspektroskopischer Identifikation der Interaktionspartner gespielt (z. B. (Cheeseman, et al., 2002a)). Die Einordnung der Proteine in kleinere Subkomplexe erfolgte aufgrund verschiedenster Methoden, wie Zwei-Hybrid-Analysen, Immunopräzipitationen und dadurch gewonnenen Einblicken in Bindungsabhängigkeiten, sowie genetischen Interaktionen. Sechs verschiedene Subkomplexe konnten während der Anfertigung dieser Arbeit auf diese Art und Weise bereits näher charakterisiert werden (Abbildung 4), wobei die Funktionen der einzelnen Proteine häufig nur teilweise oder gar nicht verstanden sind (Janke, et al., 2001; Meluh, et al., 1998; Goh and Kilmartin, 1993; Lechner and Carbon, 1991; De Wulf, et al., 2003; Measday, et al., 2002; Ortiz, et al., 1999; Cheeseman, et al., 2001; Janke, et al., 2002). Ob diese postulierten Subkomplexe auch real existieren, muss allerdings durch weiterführende Experimente geklärt werden.

Die Zentromer-DNA der Hefe *S. cerevisiae* ist im Gegensatz zu den meisten anderen höheren Organismen sehr kompakt und einfach aufgebaut (Abbildung 4). Sie umfasst nur ca. 125 Basenpaare (bp) und wird in drei Abschnitte eingeteilt (Hegemann and Fleig, 1993). *CDEI* besteht aus 8 konservierten Basenpaaren, an die das Protein Cpf1p als Homodimer bindet und dadurch eine DNA-Krümmung induziert. Wenn die Bindung von Cpf1p an *CDEI* durch Mutationen in der DNA-Sequenz oder in dem Protein nicht mehr erfolgen kann, kommt es zu einer zehnfach schlechteren Chromosomenverteilung in den betroffenen Zellen (Cai and Davis, 1990; Niedenthal, et al., 1993). Der *CDEII* Bereich besteht aus ca. 78-86 bp, die nicht konserviert sind, jedoch zu 90 % und mehr aus A/T Basenpaaren bestehen (Gaudet and Fitzgerald Hayes, 1987). Die *CDEII* Sequenz alleine vermittelt eine intrinsische Krümmung der DNA, deren Relevanz für die Funktion des Kinetochors noch unbekannt ist (Bechert, et al., 1999). Bisher konnte nur für das essentielle Protein Ndc10p eine Bindung an diese DNA-Sequenz *in vitro* nachgewiesen werden (Espelin, et al., 2003).

## Einleitung

Eine weitere Bindung dieses Proteins erfolgt an die in den 16 Chromosomen hochkonservierte, 26 bp lange, palindromische *CDEIII*-Sequenz. Hierzu bildet Ndc10p mit den essentiellen Proteinen Ctf13p, Cep3p und Skp1p den CBF3-Komplex (Abbildung 4). Mutationen in dieser DNA-Sequenz sowie das Fehlen eines der genannten Proteine führen zu einem kompletten Verlust der Zentromerfunktion (Hegemann and Fleig, 1993; Lechner and Carbon, 1991; Sorger, et al., 1994; Kilmartin, et al., 1993).

Das innere Kinetochor fasst die DNA-bindenden Proteine zusammen. Es besteht aus dem CBF3-Komplex, einem spezialisierten Nukleosom sowie dem Protein Cpf1p. Der funktionelle CBF3-Komplex ist essentiell für den Aufbau des Kinetochors. Allerdings ist die Bindung dieses Subkomplexes an die Zentromer-DNA *in vitro* nicht ausreichend für die Anbindung von Mikrotubuli (Hyman, et al., 1992; Sorger, et al., 1995; Sorger, et al., 1994). Ohne die Bindung des CBF3-Komplexes an die *CEN*-DNA können auch die anderen Kinetochorproteine nicht am Kinetochor assemblieren (Sorger, et al., 1994; Lechner and Carbon, 1991; Kilmartin, et al., 1993). Auch die Bindung von Cse4p, einem nur im



**Abbildung 4: Kinetochormodell**

Das Kinetochor der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* ist sehr kompakt. Es besteht aus mehreren postulierten Subkomplexen, die verschiedene Funktionen beim Aufbau des Gesamtkomplexes übernehmen. Proteine eines Subkomplexes wurden mit derselben Farbe gekennzeichnet und in den Kreisen zusammengefasst.

Proteine des inneren Kinetochors sind grün, die des zentralen rot und die des äußeren blau gefärbt.

*CEN* DNA: Zentromer DNA

Modell verändert nach (Measday, et al., 2002; Pot, et al., 2003)

## Einleitung

---

Kinetochor vorkommenden Homolog des Histons H3 (Meluh and Koshland, 1995), ist abhängig von einem funktionellen CBF3-Komplex (Measday, et al., 2002; Ortiz, et al., 1999). Cse4p bildet mit Histon H2A, H2B und H4 ein spezialisiertes Nukleosom am Kinetochor (Meluh, et al., 1998), an welches auch das CENP-C-Homolog Mif2p assoziiert (Westermann, et al., 2003).

Der CBF3-Komplex und das spezielle Nukleosom mit der Histon H3-Variante Cse4p bilden wahrscheinlich gemeinsam die Plattform für den COMA-Komplex des zentralen Kinetochors (Abbildung 4). Dieser besteht aus den nicht-essentiellen Proteinen Ctf19p und Mcm21p sowie den beiden essentiellen Proteinen Okp1p und Ame1p und wurde 2003 beschrieben (De Wulf, et al., 2003). Die Einordnung der Proteine in diesen Subkomplex erfolgte mittels Ko-Immunopräzipitationsanalysen und zusätzlichen hydrodynamischen Untersuchungen (De Wulf, et al., 2003). Der COMA-Komplex ermöglicht wahrscheinlich die Anbindung des bisher wenig untersuchten Ctf3-Komplexes an das Kinetochor, da die Bindung von Ctf3p an die *CEN*-DNA abhängig ist von Ctf19p (Pot, et al., 2003). Der Ctf3-Komplex besteht wahrscheinlich aus den nicht-essentiellen Proteinen Ctf3p, Mcm16p und Mcm22p (Measday, et al., 2002). Die Zusammensetzung ergibt sich aufgrund von Daten, die in Zwei-Hybrid-Analysen und Ko-Immunopräzipitationen erhalten wurden. Es kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass weitere Proteine in dem Komplex enthalten sind. Dies ist vor allem deswegen möglich, da in ersten Immunpräzipitationsexperimenten mit anschließender massenspektroskopischer Identifikation der Interaktionspartner von Mcm16p neben weiteren Proteinen auch die Proteine des COMA-Komplexes identifiziert werden konnten (Cheeseman, et al., 2002a).

Der COMA-Komplex wie auch der Ctf3-Komplex sind Bestandteil des zentralen Kinetochors und werden für die Interaktion des Kinetochors mit dem Mikrotubuli-bindenden Duo-Dam-Komplex benötigt (Hyland, et al., 1999; Measday, et al., 2002; Ortiz, et al., 1999; Pot, et al., 2003). Die Zusammensetzung dieses Subkomplexes ergibt sich ebenfalls aus Immunpräzipitationen und anschließender massenspektrometrischer Identifikation der gebundenen Proteine. Viele der Proteine im zentralen und äußeren Kinetochor scheinen allerdings im Gegensatz zu den direkt an die *CDEIII*-Region bindenden Proteinen teilweise redundante Funktionen zu besitzen. So führt das Fehlen einzelner Proteine häufig zu genetischer Instabilität, jedoch sind viele der Kinetochorproteine nicht essentiell für das Überleben der Zellen.

Der am besten untersuchte Komplex im zentralen Kinetochor, der ebenfalls für die Bindung der Mikrotubuli an das Kinetochor benötigt wird und der Einfluss nimmt auf die Signalweiterleitung an die Kontrollpunkte, ist der Ndc80-Komplex. Er enthält die vier

## Einleitung

---

essentiellen Proteine Ndc80p, Nuf2p, Spc24p und Spc25p (He, et al., 2001; Janke, et al., 2001; McClelland, et al., 2003; Wigge and Kilmartin, 2001), deren Nachweis ebenfalls über Ko-Immunopräzipitationsexperimente erfolgte. Das Fehlen dieses Komplexes führt dazu, dass der *in vivo* sowohl an das Kinetochor als auch an die Mikrotubuli direkt bindende und aus 9 essentiellen Proteinen bestehende Duo1p/Dam1p-enthaltende Komplex nicht mehr an das Kinetochor angebunden werden kann (He, et al., 2001; Janke, et al., 2001; Janke, et al., 2002; Wigge and Kilmartin, 2001; Cheeseman, et al., 2001). Eine weitere wichtige Funktion übernehmen die in diesem Subkomplex angeordneten Proteine bei der Aktivierung des Spindelaufbau-Kontrollpunktes (McClelland, et al., 2003). Eine Inaktivierung von Spc24p oder Spc25p sowie die gemeinsame Inaktivierung der Proteine Nuf2p und Ndc80p verhindert die Aktivierung des Spindelaufbau-Kontrollpunktes.

Schließlich konnten weitere, bisher nicht in Unterkomplexe eingeordnete Proteine identifiziert werden, die ebenfalls für die Funktion des Kinetochors benötigt werden. Viele dieser Proteine werden hier allerdings nicht aufgeführt, da die Übersicht ansonsten zu komplex würde (Cheeseman, et al., 2002b).

Für die korrekte Segregation der DNA ist es wichtig, dass die Chromosomen bipolar an die Spindel angebunden werden. Hierbei spielt die hochkonservierte Aurora-B-Kinase Ipl1p eine entscheidende Rolle. Durch Phosphorylierung bestimmter Kinetochorproteine, welche durch Glc7p dephosphoryliert werden können, überwacht sie die korrekte bipolare Anheftung der Spindeln an die Kinetochore (Biggins, et al., 1999; Cheeseman, et al., 2002a; Cheeseman, et al., 2002b). Als ein Signal für die Phosphorylierung durch Ipl1p dient wahrscheinlich die fehlende Spannung der Mikrotubuli bei der Nichtanheftung eines oder beider Kinetochore an die Spindel.

### **1.1.4 Kontrollmechanismen bei der DNA-Verteilung**

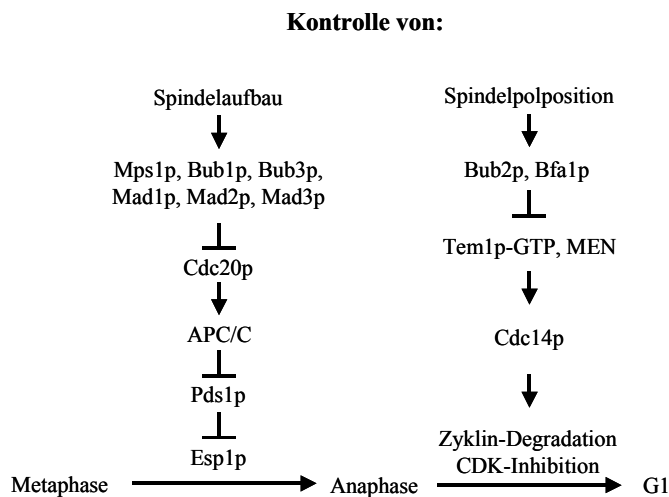
Für die exakte Verteilung des Erbmaterials müssen die Kinetochore korrekt an die Teilungsspindel angebunden werden. Der Spindelaufbau erfolgt ausgehend von den Spindelpolkörpern (SPB), nachdem diese beim Übergang von der G1 in die S-Phase verdoppelt wurden und zu Beginn der Mitose zu den entgegengesetzten Seiten in der Kernmembran gewandert sind (Helfant, 2002). Die Kinetochore liegen während des gesamten Zellzyklus mit den SPB assoziiert vor. Eine Ausnahme bildet der Zeitraum vom Beginn der Metaphase bis zur Initiation der Anaphase (Goh and Kilmartin, 1993; Guacci, et al., 1997; Jin, et al., 2000). Die Bindung der Kinetochore durch die Spindeln erfolgt über die dynamischen Plus-Enden der Mikrotubuli (Maddox, et al., 2000). Zu diesem Zeitpunkt sind die Geschwisterchromatiden über Kohäsine miteinander verbunden, was ein vorzeitiges



## Einleitung

Auseinanderweichen der Chromosomen verhindert. Diese Bindung darf erst gelöst werden, wenn alle Kinetochore korrekt an die Spindel angebunden wurden. Hierzu aktiviert das regulatorische Protein Cdc20p beim Übergang von der Metaphase in die Anaphase den APC (anaphase promoting complex). Der APC ist eine E3-Ubiquitinligase, die verantwortlich ist für den Abbau des Sekurins Pds1p, welches den Abbau der Kohäsine durch Esp1p verhindert (Tinker-Kulberg and Morgan, 1999).

Erfolgt die Bindung der Kinetochore an die Mikrotubuli nicht korrekt, kommt es zu einer Aktivierung des Spindelaufbau-Kontrollpunktes. Diese Aktivierung manifestiert sich als Arretierung des Zellzyklus beim Übergang von der Metaphase in die Anaphase (Gardner and Burke, 2000) (Abbildung 5). Durch die Aktivierung dieses Kontrollpunktes wird das regulatorische Protein Cdc20p inhibiert, wodurch der Abbau von Pds1p verhindert wird (Tinker-Kulberg and Morgan, 1999). Die Kontrollpunkt-Proteine Bub1p, Bub3p, Mad1p, Mad2p, Mad3p lokalisieren in der Prometaphase an Kinetochoren, die nicht mit dem Spindelapparat assoziiert sind. Später in der Mitose bzw. Meiose dissoziieren sie allerdings wieder von den Kinetochoren ab (Lew and Burke, 2003). Mps1p ist eine Proteinkinase, die ebenfalls Teil des Kontrollpunktes ist. Dieses Protein lokalisiert sowohl an den Kinetochoren als auch an den SPB (Castillo, et al., 2002). Die Aktivierung des Kontrollpunktes erfolgt



**Abbildung 5: Signalwege der Spindelkontrollpunkte**

Die Proteine des Spindelaufbau-Kontrollpunktes, der die Interaktion zwischen dem Kinetochor und den Mikrotubuli überwacht, sind bis auf Mps1p am Kinetochor lokalisiert. Eine Aktivierung des Kontrollpunktes führt zu einer Deaktivierung von Cdc20p, wodurch Pds1p aktiviert wird. Die Zellen können nicht aus der Metaphase in die Anaphase eintreten.

Die Proteine des Spindelpositions-Kontrollpunktes sind an einem SPB lokalisiert. Der Kontrollpunkt überwacht die Einwanderung eines SPB in die Tochterzelle. Bub2p und Bfa1p inaktivieren Tem1p-GTP, solange keiner der SPBs in die Knospe eingewandert ist und damit das MEN (mitotic exit network), welches für die Degradation der mitotischen Zykline und damit die Inhibition der CDK (Zyklin abhängige Kinase) verantwortlich ist. Die Zellen können nicht aus der Mitose austreten.

Erstellt nach Daniel Lew and Daniel Burke (Lew and Burke, 2003)

aufgrund ungebundener Kinetochore, bzw. einer fehlenden bipolaren Spannung zwischen den Geschwisterchromatiden. Unklar sind bisher die Mechanismen, nach denen diese Wahrnehmung erfolgt.

Zusätzlich zum Spindelaufbau-Kontrollpunkt existiert der Spindelpositions-Kontrollpunkt (Abbildung 5). Dieser überwacht die Einwanderung eines der SPB in die Knospe, unabhängig davon, ob dieser Pol mit der korrekten Anzahl an Chromosomen assoziiert ist, oder ob der andere Pol in der Mutter verbleibt (Lew and Burke, 2003). Wahrscheinlich

führt selbst eine transiente Einwanderung eines der Spindelpole in die Knospe zu einer Inaktivierung des Kontrollpunktes. Die wichtigsten Proteine dieses Kontrollpunktes sind Bub2p und Bfa1p (Bardin, et al., 2000; Bloecher, et al., 2000). Sie lokalisieren an dem Spindelpol, der der Knospe zugewandt ist (Lew and Burke, 2003). Die Aktivierung des Kontrollpunktes führt zu einer Inaktivierung des MEN (mitotic exit network), dessen Aktivität für den Austritt aus der Mitose benötigt wird. Der MEN-Regulationsweg führt zu einer Zerstörung der Aktivität des CDK/mitotischen Zyklin-Komplexes. Die Initiation des MEN-Signalweges für den Austritt aus der Mitose erfolgt durch die kleine GTPase Tem1p (Shirayama, et al., 1994). Diese wird durch einen GEF (Guanin Nukleotid Austausch Faktor) und ein GAP (GTPase aktivierendes Protein) reguliert. Bub2p und Bfa1p bilden gemeinsam das GAP-Protein. Nur GTP gebundenes Tem1p aktiviert eine Proteinkinase-Kaskade, die eine Degradation der mitotischen Zykline nach sich zieht und so den Austritt aus der Mitose ermöglicht (Lew and Burke, 2003).

### **1.1.5 Die Proteine Ame1p und Iml3p**

Die Proteine Iml3p und Ame1p, wurden in funktionellen Analysen in unserer Arbeitsgruppe identifiziert und sind für die Aufrechterhaltung der genetischen Stabilität bedeutsam. Iml3p (increased minichromosome loss, auch Mcm19p genannt), ist ein nicht-essentielles, 245 Aminosäuren (aa) langes Protein, welches für die genetische Stabilität in mitotisch teilenden Hefezellen benötigt wird (Entian, et al., 1999; Ghosh, et al., 2001; Güldener, 2000). Zellen, denen das Protein fehlt, zeigen sowohl eine erhöhte Fehlverteilung von *CEN*-Plasmiden als auch von artifiziellen Chromosomenfragmenten. Die Zellen zeigen keine erhöhte Sensitivität gegenüber der Chemikalie Hydroxylharnstoff, was darauf hinweist, dass das Protein wahrscheinlich nicht an der DNA-Synthese beteiligt ist (Güldener, 2000). Das Fehlen des Proteins führt zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber der Mikrotubuli-destabilisierenden Chemikalie Methyl-2-benzimidazolcarbamat (MBC) (Köhler, 2000). Dies deutet darauf hin, dass das Protein bei der Bindung des Kinetochors an die Spindel oder beim Aufbau der Spindel selbst eine Rolle spielen könnte. Zellen, denen z. B. eine Komponente der Mikrotubuli oder deren Stabilisatoren fehlen, wachsen auf Medien, die Mikrotubuli-destabilisierende Chemikalien enthalten schlechter als die entsprechenden Wildtypstämme (Davidse and Flach, 1978). Aber auch das Fehlen von Kinetochorkomponenten kann eine Sensitivität gegenüber diesen Chemikalien hervorrufen (Cai and Davis, 1990).

Von Ame1p (associated with microtubules and essential, auch Arp100p genannt) war zu Beginn dieser Arbeit nur bekannt, dass es sich um ein 324 aa langes, essentielles Protein

handelt, welches ebenfalls für den Erhalt der genetischen Stabilität benötigt wird (Güldener, 2000) (Ross-Macdonald, et al., 1997).

### **1.1.6 Zielsetzung**

Ziel der Arbeit war eine nähere Charakterisierung der Proteine Iml3p und Amel1p. In Lokalisationsstudien sollte deshalb die subzelluläre Lokalisation der beiden Proteine untersucht werden. Genetische sowie physikalische Interaktionen sollten im Anschluss an die Lokalisierung dazu dienen, zelluläre Strukturen zu identifizieren, mit denen die Proteine interagieren.

Im Laufe der Arbeit ergaben sich Hinweise auf eine mögliche Aktivierung der mitotischen Kontrollpunkte durch das Fehlen von Iml3p und die deregulierte Expression von Amel1p. Daher sollte untersucht werden, ob es zu einer Aktivierung des Spindelaufbau- oder des Spindelpositions-Kontrollpunktes kommt. Zudem war ungeklärt, ob das Iml3-Protein selbst Kontrollpunktfunktionen übernehmen kann.

Da eine *iml3Δ*-Mutante eine erhöhte Verlustrate zusätzlicher artifizieller Chromosomenfragmente zeigt, sollte die Funktion von Iml3p für die Verteilung endogener Chromosomen untersucht werden. Zusätzlich zur funktionellen Einordnung von Iml3p sollte eine Identifikation funktioneller Domänen des Proteins erfolgen. Da bisher keine homologen Proteine in anderen Organismen identifiziert werden konnten, sollte bestimmt werden, welche Domänen des Proteins für die Funktion von Iml3p benötigt werden.

## **1.2 Filamentöses Wachstum der Hefe *Saccharomyces cerevisiae***

Zellen der Hefe *S. cerevisiae* haben, wie alle einzelligen Pilze, die Fähigkeit entwickelt, sich an die gegebenen Umweltbedingungen adäquat anzupassen. Hierzu gehört unter anderem auch die Möglichkeit der Zellen zu einem dimorphen Wechsel. Hierunter versteht man den Übergang vom normalen vegetativen hefeartigen einzelligen Wachstum, zu sogenanntem pseudohyphalen bzw. haploid-invasivem Wachstum (Gancedo, 2001; Kron and Gow, 1995). Die Begriffe werden im folgenden synonym zu filamentösem Wachstum verwendet.

### **1.2.1 Auslöser für die Ausbildung von Pseudohyphen in der Hefe *S. cerevisiae***

Hefezellen vermehren sich vegetativ im allgemeinen durch Knospung. Hierbei schnürt eine fast runde Mutterzelle nach dem Durchlaufen eines Zellzyklus eine gleich große, ebenfalls fast runde Tochterzelle ab. Verschiedene Umweltfaktoren können dieses Wachstumsverhalten so verändern, dass die Knospen nicht mehr abgerundet werden, sondern zu elongierten Knospen werden, die nicht vollständig von der Mutter abgeschnürt werden. Dieses sogenannte pseudohyphale bzw. filamentöse Wachstum ist gekennzeichnet durch verschiedene Veränderungen innerhalb der Zelle, wie ein verändertes Knospungsmuster, eine elongierte Zellform, hervorgerufen durch eine veränderte Aktinverteilung, sowie ein simultanes Knospen der Mutter- und Tochterzellen.

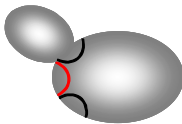
Einer der wichtigsten Auslöser des filamentösen Wachstums in diploiden Hefezellen ist Stickstoffmangel in Anwesenheit fermentierbarer Kohlenstoffquellen (Gimeno, et al., 1992). Aber auch Ethanol, Fuselalkohole wie Isoamylalkohol und 1-Butanol, sowie Amylopektin können in diploiden Hefezellen ein filamentöses Wachstum induzieren (Dickinson, 1996; Lorenz, et al., 2000a; Lambrechts, et al., 1996). Die Induktion von filamentösem Wachstum in haploiden Zellen hingegen kann nicht durch Stickstoffmangel erfolgen (Cullen and Sprague, 2000). Allerdings führt das Fehlen von fermentierbaren Kohlenstoffquellen zur Ausprägung von haploid-invasivem Wachstum, welches dem pseudohyphalen Wachstum diploider Hefezellen entspricht (Roberts and Fink, 1994). Weitere Faktoren, die ein filamentöses Wachstum in haploiden Zellen auch in flüssigem Medium hervorrufen, sind Fuselalkohole (Lorenz, et al., 2000a). Die beobachtete Filamentierung ist in haploiden Zellen sogar ausgeprägter als in entsprechenden diploiden Hefezellen. Auch geringe Mengen des  $\alpha$ -Pheromons in festen Medien können zur Ausprägung von haploid invasivem Wachstum führen (Erdman and Snyder, 2001; Roberts, et al., 2000). Als weitere Induktoren des pseudohyphalen Wachstums werden zudem sowohl Sauerstofflimitierung, Stress-induzierte Signale (Wright, et al., 1993), die Signalweiterleitung eines osmotischen Schocks über den

Sho1p Rezeptor (O'Rourke and Herskowitz, 1998), so wie Aminosäuremangel im Medium angesehen (Braus, et al., 2003).

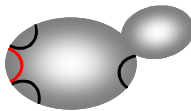
### 1.2.2 Makromolekulare Veränderungen bei filamentös wachsenden Zellen

Beim Übergang zum pseudohyphalen Wachstum ändert sich zuerst das Knospungsverhalten der Hefezellen. Haploide Zellen zeigen normalerweise ein axiales Knospungsmuster, bei dem eine neue Knospe immer direkt angrenzend an eine alte Knospungsnarbe ausgebildet wird

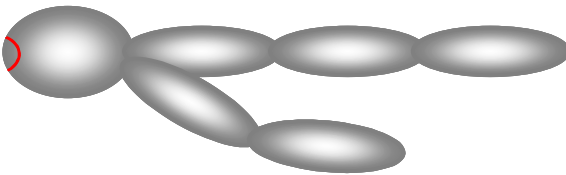
**Knospende haploide Hefezelle**



**Knospende diploide Hefezelle**



**Filamentös wachsende haploide oder diploide Hefezelle**



**Abbildung 6: Knospungsmuster verschiedener Hefezelltypen**

Während bei haploiden Zellen neue Knospen immer neben der Geburtsnarbe (rot) gebildet werden, können in diploiden Zellen neue Knospen sowohl neben der Geburtsnarbe als auch am gegenüberliegenden Pol der Zelle entstehen. Bei filamentös wachsenden Zellen entstehen neue Knospen immer am gegenüberliegenden Pol zur Geburtsnarbe. Zudem sind die Zellen elongiert.

Glukoselimitierung das Erscheinen der neuen Knospe am distalen Pol, was zur Ausbildung des für filamentös wachsende Zellen typischen distalen Knospungsmusters führt. Bud8p wird hierbei sowohl für die Rekrutierung des Markers für die neue Knospungsstelle, Bud2p, als auch für die Rekrutierung des Aktins benötigt (Cullen and Sprague, 2002).

Neue Knospungsstellen sind sowohl in hefeartig als auch in filamentös wachsenden Hefezellen durch einen prominenten Ring filamentösen Aktins gekennzeichnet. Auch in vielen weiteren Hauptstrukturen des Aktins unterscheiden sich hefeartig und filamentös wachsende Hefezellen nicht. Neben dem Aktinring an der Knospungsstelle finden sich punktförmige Akkumulationen filamentösen Aktins hauptsächlich in der Nähe der Zytoplasmamembran an der Periphärie der neu entstandenen Tochterzelle, während sie in der

(Abbildung 6) (Chant and Pringle, 1991).

Diploide Zellen hingegen können wählen, ob neue Knospen entweder direkt angrenzend an eine alte Knospungsnarbe

oder am gegenüberliegenden Zellpol entstehen (bipolares Knospungsmuster) (Chant and Pringle, 1991).

Bei der Entstehung von Pseudohyphen entstehen sowohl bei haploiden als auch bei diploiden

Zellen neue Knospen fast ausschließlich am gegenüberliegenden, d. h. am distalen Pol

zur Geburtsnarbe (Abbildung 6) (Gimeno, et al., 1992; Kron, et al., 1994).

Eines der Proteine, das für die Determinierung der Lage der neuen Knospe wichtig ist, ist das

Protein Bud8p. Es lokalisiert immer am distalen Pol zur letzten Knospe.

In haploiden Hefezellen dirigiert Bud8p bei

## Einleitung

---

Mutterzelle nur selten zu finden sind. In der Mutterzelle findet man das Aktin meist als Kabel entlang der Mutter-Tochter-Zellachse an der Zellperipherie. Teilweise finden sich diese Kabel in derselben Orientierung auch in der Tochterzelle. Sie stellen wahrscheinlich Verbindungen zwischen den Aktinflecken dar (Amberg, 1998).

Die punktförmigen Aktin-Akkumulationen sind sehr mobil und befinden sich während des gesamten Zellzyklus an Bereichen, an denen Zellwachstum stattfindet (Doyle and Botstein, 1996; Waddle, et al., 1996). Sie repolarisieren kurz vor der Zytokinese zur Seite der Septierung (Kron, et al., 1994; Lew and Reed, 1993). Unterschiede finden sich vor allem in der Verteilung der punktförmigen Aktin-Akkumulationen, die die Wachstumszonen charakterisieren. Während in hefeartig wachsenden Zellen die Aktinflecken während einer distinkten Zeit zwischen dem Erscheinen der Knospe und der Zytokinese, der isotropischen Wachstumsphase, um den gesamten Zellkortex der Tochterzelle verteilt sind (Lew and Reed, 1993), finden sie sich bei pseudohyphal wachsenden Zellen nur am distalen Ende der Tochterzelle während des Knospenswachstums (Kron, et al., 1994). Zudem zeigen filamentös wachsenden Zellen deutlichere Aktinkabel. Die Lokalisierung des Aktins in filamentös wachsenden Zellen am distalen Ende der Knospe führt zu einem stark polarisierten Wachstum. Hierdurch kommt es zu einer Verlängerung der Zellen, wobei diese im Durchmesser dünner werden (Kron and Gow, 1995). Da bei pseudohyphal wachsenden Zellen nach der Zytokinese keine vollständigen Abschnürung der Tochter- von der Mutterzelle erfolgt, kommt es zur Ausbildung filamentöser Ketten.

Gewährleistet wird dieses verlängerte Knospungswachstum durch eine Cdc28p-gesteuerte veränderte Regulation des Zellzyklus (Edgington, et al., 1999; Oehlen, et al., 1998). Während in hefeartig wachsenden Zellen die Hauptkontrolle der Zellgröße in der G1-Phase stattfindet, erfolgt diese in filamentös wachsenden Zellen in der G2-Phase. In hefeartig wachsenden Zellen erfolgt vor der Knospung in der G1-Phase ein isotropisches Wachstum der neuen Mutterzelle, bevor eine neue Knospe gebildet werden kann. Nach der Überschreitung einer kritischen Größe übertritt die Zelle den Start-Punkt und kann in die Mitose eintreten und unabhängig von der Knospengröße die Zellteilung vervollständigen. Dies führt dazu, dass Mutterzellen meist eher als ihre Tochterzellen in einen neuen Zellzyklus eintreten (Pringle and Hartwell, 1981). Filamentös wachsende Zellen hingegen zeigen keine intervenierende G1-Phase. Sie zeigen eine verlängerte G2-Phase, in der die Tochterzellen auf die Größe der Mutterzelle heranwachsen. Hierdurch können die jeweiligen Mutter- und Tochterzellen sehr schnell nach der Zytokinese, bei der es nicht zur vollständigen Abschnürung der Knospe von der Mutterzelle kommt, simultan knospen (Kron, et al., 1994).

### **1.2.3 Verschiedene Signalwege werden für die Induktion von filamentösem Wachstum benötigt**

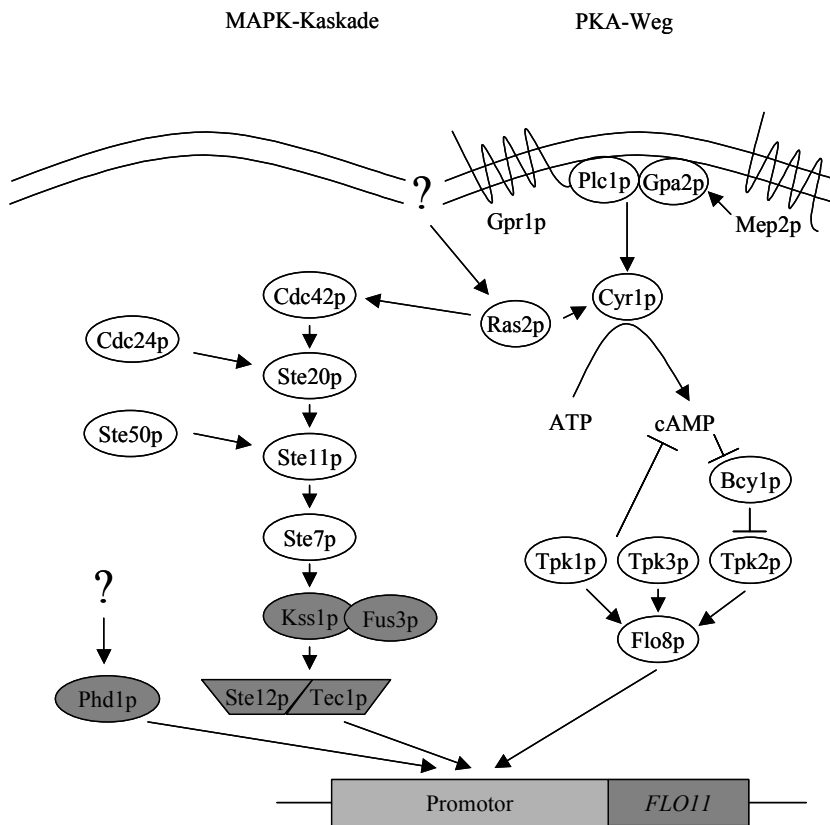
Die Regulation des filamentösen Wachstums ist sehr komplex. Verschiedene Signalwege, die untereinander über gemeinsam regulierte Proteine und Rückkopplungsmechanismen miteinander verbunden sind, werden für die Induktion und Aufrechterhaltung des filamentösen Wachstums benötigt. Während bisher noch wenig über die Sensoren und Effektoren bekannt ist, sind die Signalwege bereits besser charakterisiert. Die am besten untersuchten Signalwege, die für die Regulation der Filamentierung verantwortlich sind, sind der cAMP abhängige Proteinkinase A (PKA)-Weg und die auch für die Paarung wichtige MAPK-Kaskade (Mitogen aktivierte Proteinkinase) (Borges-Walmsley, 2000; D'Souza and Heitman, 2001; Lengeler, et al., 2000; Pan, et al., 2000; Posas, et al., 1998).

### **1.2.4 Der PKA Weg**

Die Regulation der PKA-Aktivität ist ein wichtiger Faktor bei der Entstehung von adhäsivem Wachstum. Die Aktivierung erfolgt durch hohe cAMP-Konzentrationen. Dabei wird die cAMP-Menge über die Adenylatzyklase (Cyr1p) reguliert. Diese wird sowohl von Ras2p als auch von dem rezeptorengerkoppelten G-Protein Gpa2p, welches auch durch Mep2p, einem Rezeptor für geringe Stickstoffkonzentrationen in der Umgebung angesteuert wird, kontrolliert (Abbildung 7). Außerdem erfolgt die Kontrolle über den Glukose-Sensor Gpr1p, welcher mit der phosphoinositidspezifischen Phospholipase C Plc1p sowie auch mit dem G-Protein Gpa2p interagiert. Die PKA besteht aus vier Untereinheiten. Tpk1-3p bilden die katalytische Untereinheit während Bcy1p die cAMP-bindende regulatorische Untereinheit darstellt. Für die Ausprägung von filamentösem Wachstum wird nur Tpk2p benötigt (Robertson, et al., 2000; Robertson and Fink, 1998), während Tpk1p und Tpk3p als negative Regulatoren angesehen werden. Ein direktes Zielprotein ist der Transkriptionsaktivator Flo8p. Dieser aktiviert die Transkription verschiedener filamentierungsspezifischer Gene (Abbildung 7), unter anderem *FLO11* und *FLO1* (Kobayashi, et al., 1999; Rupp, et al., 1999). Hierbei handelt es sich um für die pseudohyphale Entwicklung wichtige Zelloberflächenproteine, sogenannte Flokkuline. Diese vermitteln sowohl Zell-Zell- als auch Zell-Oberflächenadhäsion während des adhäsiven Wachstums sowohl in haploiden als auch in diploiden Hefestämmen.

### 1.2.5 Der MAPK Weg

Ein weiterer Regulationsweg, der bei der Entstehung von invasivem Wachstum eine Rolle spielt, ist der MAPK Weg. Auch hier ist eines der angesteuerten Zielgene *FLO11*. Die Stimulation der MAPK-Kaskade erfolgt wie auch beim PKA-Weg über Ras2p (Mosch, et al., 1999). An der Signalweiterleitung für das filamentöse Wachstum sind die Proteinkinasen Ste20p (PAK (p21-activated kinase)), Ste11p (MAPKKK), Ste7p (MAPKK), Kss1p (MAPK), welches mit der MAPK Fus3p ein Dimer bildet, sowie die Transkriptionsfaktoren Ste12p und Tec1p beteiligt (Abbildung 7) (Posas, et al., 1998). Die Weiterleitung der Pheromonwahrnehmung zur Einleitung der Paarung erfolgt Ras2p-unabhängig ebenfalls über Ste20p, Ste11p, Ste7p, Kss1p, Fus3p, sowie über Ste12p. Kss1p und Fus3p sind die entscheidenden Faktoren, für die Induktion des filamentösen Wachstums oder aber der Paarung. Das Protein Kss1p kann filamentöses Wachstum sowohl induzieren als auch reprimieren. Während nicht phosphoryliertes Kss1p wahrscheinlich durch Bindung an den



**Abbildung 7: Regulation der Expression von filamentierungsspezifischen Genen**

Die Expression filamentierungsspezifischer Gene, z. B. von *FLO11* oder *TEC1* erfolgt unter anderem über die auch für die Paarung verwendete MAPK-Kaskade als auch über den cAMP abhängigen PKA-Weg. Angesteuert werden von beiden Wegen, sowie auch von dem Transkriptionsfaktor Phd1p, Promotoren von filamentierungsspezifischen Genen.

MAPK: Mitogen aktivierte Proteinkinase  
 PKA: Proteinkinase A

Dunkelgrau hinterlegte Felder zeigen Proteine, die im Verlauf der Arbeit untersucht wurden (Abbildung verändert nach (Palecek, et al., 2002)).



## Einleitung

---

Transkriptionsfaktor Ste12p dessen Aktivität reprimiert, führt die Phosphorylierung von Kss1p zu einer schwächeren Bindung und somit einer Aufhebung der Repression von Ste12p (Bardwell, et al., 1998; Cook, et al., 1997). Ein weiteres Protein, welches ebenfalls eine Rolle spielt bei der Entwicklung von adhäsivem und pseudohyphalem Wachstum ist die ebenfalls durch Ste7p regulierte MAPK Fus3p. Eine Aktivierung von Fus3p wird für die Weiterleitung von Pheromonsignalen zur Einleitung der Paarung benötigt. Durch die Aktivierung von Fus3p wird der Eintritt in das durch Kss1p-Aktivierung vermittelte invasive Wachstum blockiert (Sabbagh, et al., 2001).

Bei der Einleitung des adhäsiven Wachstums bildet aktives Ste12p gemeinsam mit Tec1p ein Heterodimer. Dieses bindet unabhängig von Flo8p an *FRE*-Elemente (filamentation responsive elements) in Promotoren von Genen, die für das pseudohyphale Wachstum benötigt werden. Diese *FRE*-Elemente setzen sich zusammen aus einer *TCS*-Sequenz (TEA/ATTS consensus sequences), der Bindesequenz von Tec1p, und einer *PRE*-Sequenz (pheromone response element), an die Ste12p kooperativ bindet (Madhani and Fink, 1997). Im *FLO11*-Promotor, einem der wichtigsten Gene für die Induktion des adhäsiven Wachstums, findet sich neben mehreren *TCS*- und *PRE*-Elementen auch ein solches *FRE*-Element, welches durch Tec1p und Ste12p angesteuert wird (Kohler, et al., 2002). Auch der *TEC1* Promotor selbst trägt ein solches Fragment (Madhani and Fink, 1997). Hierdurch kommt es wahrscheinlich zu einer positiven Rückkopplung der *TEC1*-Expression, welche zu einer Verstärkung des Signals für das pseudohyphale Wachstum führt.

### **1.2.6 Adhäsives und filamentöses Wachstum kann unabhängig von der MAPK-Kaskade und vom cAMP-Weg hervorgerufen werden**

Neben den bekannten Signaltransduktionskaskaden sind weitere Proteine bekannt, die wahrscheinlich unabhängig von diesen einen Einfluss auf das filamentöse Wachstum von *S. cerevisiae* Zellen haben. Eines der wichtigsten Zielgene ist auch hierbei *FLO11*. Angesteuert wird der Promotor neben den zuvor aufgezählten Proteinen auch von dem regulativen Protein Phd1p. Es handelt sich um einen Transkriptionsfaktor, dessen Überexpression zu einer verstärkten Pseudohyphenbildung in diploiden Hefestämmen führt, während in haploiden Stämmen kein Einfluss zu beobachten ist (Gimeno and Fink, 1994). Die Expression von *PHD1* wird sowohl durch die Zugabe von geringen Mengen an Paarungspheromonen in das Medium als auch durch Stickstoffmangel induziert (Erdman, et al., 1998), welche beide als Induktor für das filamentöse Wachstum dienen. Eine Deletion von *PHD1* zeigte keinen vom Wildtyp abweichenden Phänotyp, was darauf hindeutet, dass das Fehlen von Phd1p das filamentöse Wachstum von Hefestämmen nicht direkt beeinflusst. Die

Expression von *PHD1* wird negativ durch den Transkriptionsfaktor Sok2p reguliert, welcher die Ausbildung von Pseudohyphen negativ reguliert. (Pan and Heitman, 2000). Beide Proteine, Phd1p und Sok2p, regulieren die Expression von *FLO11* unabhängig vom PKA-Weg (Pan and Heitman, 2000). Phd1p muss allerdings neben *FLO11* weitere Zielgene ansteuern, die unabhängig von *FLO11* die Filamentierung beeinflussen, da durch die Überexpression von Phd1p in einem *flo11Δ/flo11Δ* Stamm, der kein pseudohyphales Wachstum mehr zeigt, dieses wieder hergestellt wird (Pan and Heitman, 2000).

Es konnte gezeigt werden, dass neben den zuvor aufgezeigten Proteinen der globale Transkriptionsfaktor Gcn4p, der die Expression der Gene der Aminosäurebiosynthese als Antwort auf Aminosäuremangel reguliert, auch eine Rolle bei der Induktion des filamentösen Wachstums spielt. Auch hier erfolgt eine Regulation der *FLO11* Genexpression. Auslöser für diese Signaltransduktion ist die Wahrnehmung von Aminosäuremangel in der Umgebung (Braus, et al., 2003). Dies verdeutlicht, dass Flo11p eine wichtige Rolle für das filamentöse und adhäsive Wachstum spielt und dass die Regulation der Expression über verschiedenste Regulationswege erfolgt.

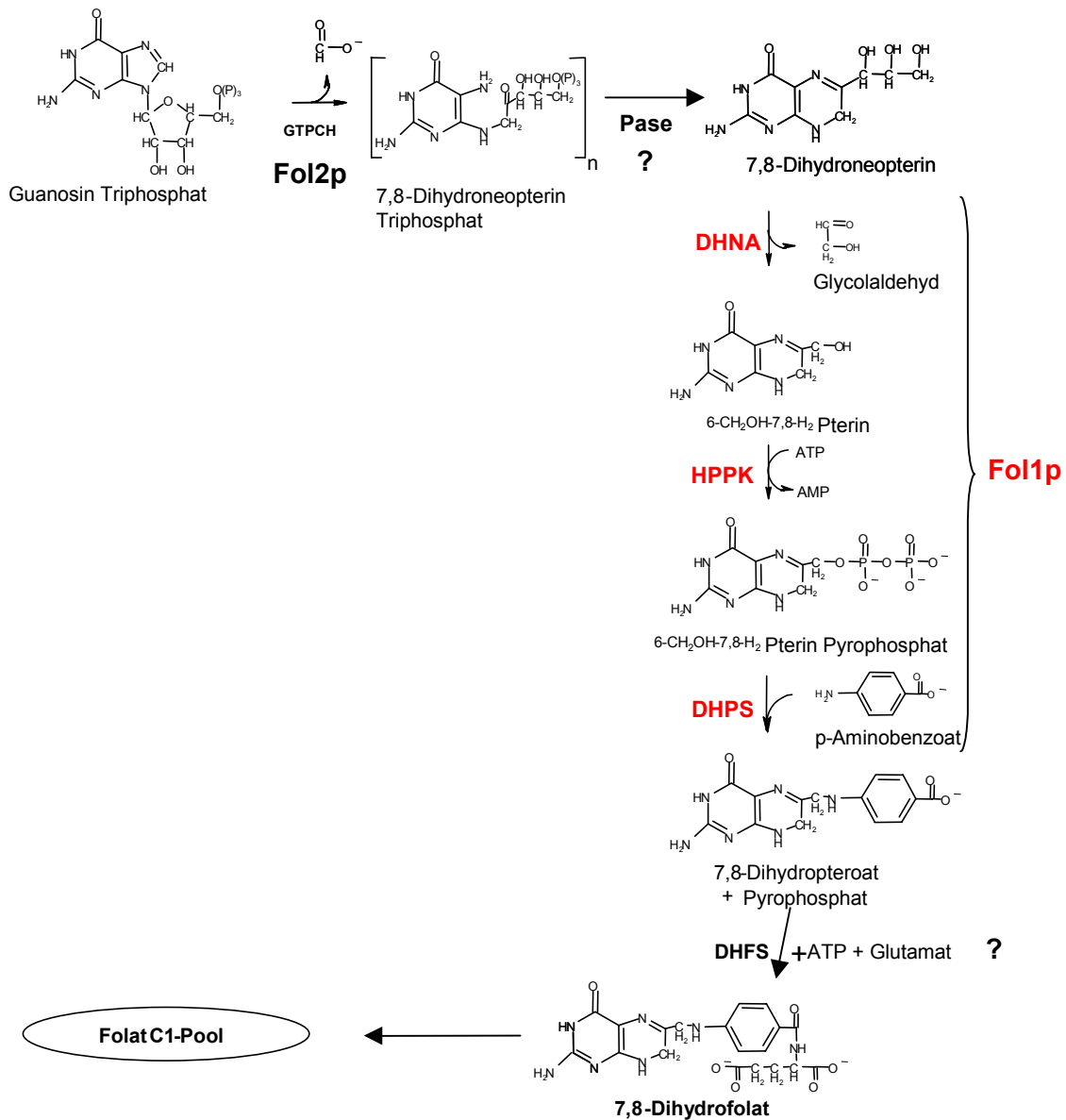
### **1.2.7 Das Fehlen von Flo11p induziert invasives und adhäsives Wachstum**

Neben den bislang bekannten Induktoren für das adhäsive und filamentöse Wachstum konnte von unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass das Fehlen von Flo11p ebenfalls filamentöses und adhäsives Wachstum induziert (Güldener, 2000). Flo11p ist ein trifunktionales, in der mitochondrialen Membran lokalisiertes Protein, welches die Enzymaktivitäten der Dihydroneopterin Aldolase (DHNA), der 7,8-Dihydro-6-Hydroxymethylpterin-Pyrophosphokinase (HPPK) und der Dihydropteroat Synthase (DHPS) in sich vereinigt (Güldener, 2000). Diese drei Enzymaktivitäten katalysieren drei aufeinanderfolgende Schritte bei der Herstellung von Folsäure (Vitamin B9), einem Kofaktor für die Übertragung von C1-Fragmenten (Abbildung 8). Diese Übertragung ist essentiell bei der Synthese von Purin- und Pyrimidinkörpern sowie für die Synthese von Thymidylaten, Glyzin, Methionin, Pantothenensäure und N-Formyl-Methionyl-tRNA in allen Organismen (Blakley and Benkovic, 1984; Appling, 1991). Daher spielt sie vor allem eine Rolle bei der Protein- sowie der Nucleinsäurebiosynthese. Folsäuremangel führt zudem zu einem verstärkten Einbau von Uracil in die DNA, was zu vermehrten Chromosomenbrüchen während der Reparatur durch die Uracil-DNA Glykosylase und der Apyrimidin Endonuklease führt (Blount, et al., 1997).

Die Disruption des *FOLI*-Gens führt dazu, dass Hefezellen nur noch nach Zugabe von Folsäure oder deren Derivaten ins Medium wachsen können (Güldener, 2000). Hierbei zeigen die *fol1Δ*-Zellen im Gegensatz zum Wildtyp auf Vollmedium mit Glukose und Ammonium

## Einleitung

filamentöses und adhäsives Wachstum (Güldener, 2000). Es konnte gezeigt werden, dass das adhäsive Wachstum von Ste12p und Flo11p abhängig ist, während das filamentöse Wachstum nicht durch diese Proteine beeinflusst wird (Güldener, 2000). Zudem konnte gezeigt werden, dass in einem *fol1Δ* Stamm die Expression von Flo11p in Abhängigkeit von Ste12p aktiviert wird.



**Abbildung 8: Der Biosyntheseweg zum Dihydrofolat**

Die aufeinander folgenden Reaktionen werden durch folgende Enzyme katalysiert: GTPCH, GTP-Cyclohydrolase; DHNA, Dihydroneopterin Aldolase; HPPK, 7,8-Dihydro-6-Hydroxymethylpterin-Pyrophosphokinase; DHFS, Dihydrofolat-Synthase (Folylpolyglutamat-Synthase). In *S. cerevisiae* kodiert *FOL2* für die GTPCH-Aktivität (Nardese, et al., 1996). Die Phosphatase(n), welche 7,8-Dihydroneopterin Triphosphat dephosphoryliert, wird wahrscheinlich von *PHO8* kodiert (Kaneko, et al., 1987). *FOL1* kodiert für die nächsten 3 Enzymaktivitäten (DHNA, HPPK, DHPS). Für den letzten Schritt (DHFS) existieren 3 ORFs mit Homologie zu Folylpolyglutamat-Synthase-Genen im Genom. Wahrscheinlich katalysieren die Enzyme die Reaktion unabhängig sowohl im Zytoplasma als auch in den Mitochondrien. 7,8 Dihydrofolat (DHF) wird durch die Dihydrofolat-Reduktase zu 5' Formyltetrahydrofolat (THF) umgewandelt und dient als C1-Einheiten-Überträger, welche in verschiedenen Biosynthesewegen benötigt werden (Blakley and Benkovic, 1984). verändert nach (Güldener, 2000)

### 1.2.8 Zielsetzung

*fol1Δ*-Zellen wachsen sowohl filamentös als auch adhäsiv. Es sollte daher untersucht werden, ob diese Phänotypen bei Wachstum auf folsäurehaltigen Medium von der zugegebenen 5'-Formyltetrahydrofolat (FA)-Menge abhängen. Für die Untersuchung der Veränderungen der filamentös wachsenden Zellen sollte sowohl das Knospungsmuster als auch die Aktinverteilung innerhalb der Zellen untersucht werden.

Da das adhäsive, nicht aber das filamentöse Wachstum einer *fol1*-Disruptionsmutante abhängig von Ste12p und Flo11p ist (Güldener, 2000), sollte auch der Einfluss weiterer Proteine, die das adhäsive und filamentöse Wachstum beeinflussen, auf die *fol1Δ*-Mutante untersucht werden. Von Interesse war hierbei vor allem Tec1p, da es mit Ste12p als Heterodimer gemeinsam an *FRE*-Sequenzen in Promotoren filamentierungsspezifischer Gene bindet. Es stellte sich die Frage, ob beide Interaktionspartner im gleichen Maß für das *fol1Δ*-induzierte filamentöse und adhäsive Wachstum benötigt werden. Ein weiterer Transkriptionsfaktor, dessen Einfluss auf das *fol1Δ*-induzierte filamentöse und adhäsive Wachstum untersucht werden sollte, war Phd1p.

Um zu überprüfen, ob es bei der *fol1Δ*-vermittelten Induktion des filamentösen und adhäsiven Wachstums zu einer Aktivierung der MAPK-Kaskade Kss1p kommt sollte die Phosphorylierung des Proteins untersucht werden. Zudem war es aufgrund der Ste12p-abhängigen Aktivierung des *FLO11*-Promotors interessant, ob alle durch Ste12p regulierten Promotorbereiche auch durch das Fehlen von Flo11p aktiviert werden können.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien

Chemikalie	Lieferant
Acrylamid (Rotiphorese Gel)	Roth (Karlsruhe)
Adenin	Roth (Karlsruhe)
Agar	Becton Dickinson (USA)
Agarose	FMC (Rockland, USA)
Agarose, niedrig schmelzend	FMC (Rockland, USA)
Alanin	Merck (Darmstadt)
3-Aminotriazol (3AT)	Sigma (Taufkirchen)
Ammoniumacetat	Roth (Karlsruhe)
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma (Taufkirchen)
Ammoniumsulfat	Roth (Karlsruhe)
Ampicillin	Grünenthal (Aachen)
Anti fade (Mounting Medium for Fluorescence)	Vectashield (USA)
Arginin	Roth (Karlsruhe)
Asparagin	Merck (Darmstadt)
Asparaginsäure	Merck (Darmstadt)
Bacto Agar	Becton Dickinson (USA)
Bacto Trypton	Becton Dickinson (USA)
Bacto yeast nitrogen base (YNB)	Becton Dickinson (USA)
3-Bromo-4 Chloro-3 Indolyl- $\beta$ -D-Galaktosid (X-Gal)	Serva (Heidelberg)
5-Bromo-4-Chloro-3 Indolyl Phosphat (BCIP)	Sigma (Taufkirchen)
Bromphenolblau	Fluka (Steinheim)
Borsäure	Roth (Karlsruhe)
Calciumchlorid	Roth (Karlsruhe)
Casein Hydrolysat	Gibco (Schottland)
Chloroform	Roth (Karlsruhe)
Complete Protease Inhibitoren Cocktail	Roche (Mannheim)
Coomassie (Brilliant Blue)	Serva (Heidelberg)
Cystein	Fluka (Steinheim)
D(+)-Glukose	Roth (Karlsruhe)
DAPI (4,6-Diamidino-2-Phenylindol)	Boehringer (Mannheim)
Desoxynukleosid-5'-Phosphate (dNTPs); einzeln als dATP, dTTP, dGTP und dCTP	Fermentas (Litauen)
di-Natriumhydrogenphosphat	Roth (Karlsruhe)
N,N-Dimethylformamid (DMF)	Roth (Karlsruhe)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma (Taufkirchen)
Doxyzyklin	Sigma (Taufkirchen)
Essigsäure	Roth (Karlsruhe)
Ethanol, technisch (96 %)	Roth (Karlsruhe)
Ethidumbromid	Roth (Karlsruhe)
5' Fluoroorotsäure (5' FOA)	PCR (USA)
5'-Formyltetrahydrofolat (folinische Säure) (FA)	Sigma (Taufkirchen)
Geneticinsulfat (G418)	Calbiochem (USA)
Glukose	Roth (Karlsruhe)
Glutamin	Roth (Karlsruhe)
Glutaminsäure	Roth (Karlsruhe)
Glycerin	Roth (Karlsruhe)
Glycin	Roth (Karlsruhe)
Hefeextrakt	Difco (USA)

## Material und Methoden

---

<b>Chemikalie</b>	<b>Lieferant</b>
HEPES	J.T.Baker (USA)
Hexamin Kobaltchlorid	Sigma (Taufkirchen)
Histidin	Roth (Karlsruhe)
Hydroxyharnstoff (HU)	Sigma (Taufkirchen)
Igepal CA-630	Sigma (Taufkirchen)
Inositol	Fluka (Steinheim)
Isoleucin	Roth (Karlsruhe)
Isopropanol	Roth (Karlsruhe)
Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalaktopyranosid (IPTG)	Stehelin (Basel)
Kaliumacetat	Merck (Darmstadt)
Kaliumchlorid	Roth (Karlsruhe)
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck (Darmstadt)
Leucin	Roth (Karlsruhe)
Lithiumacetat	Roth (Karlsruhe)
Lysin	Roth (Karlsruhe)
Magnesiumchlorid	Roth (Karlsruhe)
Magnesiumsulfat	Merck (Darmstadt)
$\beta$ Mercaptoethanol	Roth (Karlsruhe)
Methanol	Roth (Karlsruhe)
Methionin	Merck (Darmstadt)
Methyl 2-Benzimidazolcarbammat (MBC)	Wako (USA)
Milchpulver	Roth (Karlsruhe)
N-Lauroylsarcosin	Sigma (Taufkirchen)
Natriumacetat	Roth (Karlsruhe)
Natriumchlorid	Roth (Karlsruhe)
Natrium Deoxycholat	Sigma (Taufkirchen)
di-Natriumhydrogenphosphat	Roth (Karlsruhe)
Natriumdihydrogenphosphat	Roth (Karlsruhe)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth (Karlsruhe)
Natrium-Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Roth (Karlsruhe)
Natriumhydroxid	Roth (Karlsruhe)
Natriumsulfat	Sigma (Taufkirchen)
Nitrotetrazolium Blue Chlorid (NBT)	Sigma (Taufkirchen)
para-Aminobenzoesäure	Sigma (Taufkirchen)
Paraformaldehyd (PFA)	Fluka (Steinheim)
Phenol / Chloroform / Wasser	Applied Biosystems
Phenylalanin	Merck (Darmstadt)
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma (Taufkirchen)
Phleomycin	Cayla (Frankreich)
Polyethylenglycol 3350 (PEG)	Roth (Karlsruhe)
Polylysin	Sigma (Taufkirchen)
Prolin	Merck (Darmstadt)
Propidiumjodid	Sigma (Taufkirchen)
Salzsäure	Roth (Karlsruhe)
Serin	Roth (Karlsruhe)
Sorbitol	Roth (Karlsruhe)
N, N, N', N'-Tertramethylethylendiamin (TEMED)	Serva (Heidelberg)
Threonin	Merck (Darmstadt)
Tris-(hydroxymethyl) –aminomethan (Tris)	Roth (Karlsruhe)
Triton X-100	Sigma (Taufkirchen)
Tryptophan	Roth (Karlsruhe)
Thiabendazol (TBZ)	Sigma (Taufkirchen)
Tyrosin	Merck (Darmstadt)

Chemikalie	Lieferant
Tween 20	Sigma (Taufkirchen)
Uracil	Roth (Karlsruhe)
Valin	Roth (Karlsruhe)

## 2.2 Enzyme

### 2.2.1 Restriktionsendonukleasen

Enzym	Erkennungssequenz	Hersteller
<i>Bam</i> HI	G↓GATCC	Fermentas (Litauen)
<i>Bgl</i> II	A↓GATCT	Fermentas (Litauen)
<i>Bsp</i> 143I	↓GATC	Fermentas (Litauen)
<i>Eco</i> RI	G↓AATTC	Fermentas (Litauen)
<i>Eco</i> 32I	GAT↓ATC	Fermentas (Litauen)
<i>Hind</i> III	A↓AGCTT	Fermentas (Litauen)
<i>Not</i> I	GC↓GGCCGC	Fermentas (Litauen)
<i>Pvu</i> I	CGAT↓CG	Fermentas (Litauen)
<i>Pvu</i> II	CAG↓CTG	Fermentas (Litauen)
<i>Sma</i> I	CCC↓GGG	Fermentas (Litauen)
<i>Xba</i> I	T↓CTAGA	Fermentas (Litauen)
<i>Xho</i> I	C↓TCGAG	Fermentas (Litauen)

### 2.2.2 Polymerasen, modifizierende Enzyme und rekombinante Peptide

Enzym	Hersteller
α-Faktor	Sigma (Taufkirchen)
Pfx Polymerase	Invitrogen (Karlsruhe)
Proteinase K	Merck (Darmstadt)
RNase A	Sigma (Taufkirchen)
T4-DNA-Ligase	Fermentas (Litauen)
<i>Taq</i> -Polymerase	Eigene Herstellung (I. Volfson)
Zymolyase (20T und 100T)	Seikagaku (Japan)

## 2.3 Sonstige spezielle Materialien

Material	Firma
λ-Phagen DNA	Fermentas (Litauen)
Glasperlen (0,4-0,6 mm); vor der Verwendung werden die Glasperlen mindestens 3 Tage in konz. Salzsäure inkubiert. Zur Neutralisation werden die Glasperlen in einem Becherglas unter fließendem Wasser gewaschen, bis der pH-Wert neutral ist. Anschließend werden sie autoklaviert.	B.Braun (Melsungen)
Lachssperma-DNA	Sigma (Taufkirchen)

## 2.4 Antikörper

Antikörper	Firma/Bestellnummer	Eingesetzte Verdünnung
Anti cMyc (monoklonal/Maus)	Roche (Mannheim) #11667149001	Western-Blot (WB): 1:400 Immunfluoreszenz (IF): 1:50
Anti GFP (polyklonal/Kaninchen)	Molecular Probes (Karlsruhe) #A11122	IF: 1:200
Anti HA (monoklonal/Maus)	Roche (Mannheim) #11583816001	WB: 1:80
Anti Phospho-p44/42 MAP Kinase (Thr202/Tyr204) Antikörper (polyklonal/Kaninchen)	Cell Signaling Technology (USA) #9101	WB: 1:1000
WA3, Anti-β-Tubulin (monoklonal/Maus)	Gabe von Euteneuer- Schliewa, Adolf Butenandt Inst. München, Zellkulturüberstand	IF: 1:50
Anti Maus IgG AP konjugiert	Promega (USA) #S3721	WB: 1:15000
Anti Maus IgG CY3 konjugiert	Sigma (Taufkirchen) #C-2181	IF: 1:200
Peroxidase-konjugiert AffiniPure Goat Anti-Maus IgG (H+L)	Jackson Immuno Research Laboratories, Inc (USA) #115-035-003	WB: 1:30000
Anti Maus IgG FITC konjugiert	Sigma (Taufkirchen) #F-0257	IF: 1:200
Anti Kaninchen IgG AP konjugiert	Promega (USA) #S3731	WB: 1:7500
Anti Kaninchen IgG CY3 konjugiert	Sigma (Taufkirchen) #C-2306	IF: 1:200
Anti Kaninchen IgG, Peroxidase gekoppelter Species-spezifischer gesamt AK (aus dem Esel)	Amersham Pharmacia Biotech (USA) #NA934	WB: 1:10000
Anti Kaninchen IgG FITC konjugiert	Sigma (Taufkirchen) #F-9887	IF: 1:200

## 2.5 DNA-Längenstandards:

100 µg λ-DNA wird mit dem Enzym *HindIII* in einem 500 µl Ansatz geschnitten. 250 µl des Ansatzes werden zusätzlich mit *EcoRI* verdaut. Nach einer Hitzeinaktivierung der Enzyme werden die beiden Ansätze vereinigt und mit 375 µl Blaumarker versehen. Es ergeben sich folgende Fragmentgrößen (in kb):

23,1; 21,2; 9,42; 6,54; 5,15; 5,0; 4,37; 4,25; 3,54; 2,9; 2,32; 2,03; 1,91; 1,58; 1,38; 0,95; 0,83; 0,56

pUC19: *Bsp143I* geschnitten in folgende Fragmentgrößen (in bp):

955, 585, 341, 258, 141, 105, 78

## 2.6 Stämme, Medien und Anzucht

### 2.6.1 *Escherichia coli*

XL<sub>1</sub> – Blue: *supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi relA1 lac* [F' *proAB lacI<sup>q</sup> ZΔM15 Tn10(tet<sup>r</sup>)*]  
(Stratagene)



2.6.2 Hefestämme

Stammsname	Genotyp	Nummer in der labor-internen Stammsammlung	Herkunft
#6745	<i>MAT<math>\alpha</math> ade2-1 trp1-1 can1-100 his3-11 Gal psi<sup>+</sup> tetO</i> integriert in <i>URA3</i> (Chr. V), <i>tetR GFP</i> integriert in <i>LEU2</i> (Chr. II)	1371	(Michaelis, et al., 1997)
CEN.PK2-1C	<i>MAT<math>\alpha</math> leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3<math>\Delta</math>1 MAL2-8<sup>c</sup> SUC2</i>	473	(Entian and Kötter, 1998)
CGX31	<i>MAT<math>\alpha</math>/MAT<math>\alpha</math> ura3-52/ura3-52</i>	1097	Ramezani-Rad
CJY197-1	<i>MAT<math>\alpha</math> his3<math>\Delta</math>200 trp1<math>\Delta</math>63 pXH123:LEU2</i> (GFP-Plasmid wurde nach Verdau mit <i>EcoRV</i> in <i>leu2<math>\Delta</math>1</i> integriert) <i>pXH136:URA3</i> (Plasmid wurde nach Verdau mit <i>BamHI</i> ins Genom in <i>ura3-52</i> integriert) <i>tetO2x112</i> im Zentromer von Chr.V integriert, <i>MCM21-9Myc::TRP1</i>	1372	(Janke, et al., 2001)
FHEN009	<i>MAT<math>\alpha</math> ura3-52 leu2 ura3-52 trp1-63 trp1<math>\Delta</math>63 GAL2 LEU2-tTAYBR211c::loxP-kanMX-loxP-tetO<sub>7</sub></i>	EU 11018	(Güldener, 2000)
IML3-3	<i>MAT<math>\alpha</math> ura3-52 ade2-101 trp1<math>\Delta</math>1 lys2-801 cyh<sup>R2</sup> CF[CEN6 CYH<sup>2</sup> TRP1 SUP11] iml3-3</i>	1273	(Köhler, 2000)
IML3-4	<i>MAT<math>\alpha</math> ura3-52 ade2-101 trp1<math>\Delta</math>1 lys2-801 cyh<sup>R2</sup> CF[CEN6 CYH<sup>2</sup> TRP1 SUP11] iml3-4</i>	1274	(Köhler, 2000)
IML3-24	<i>MAT<math>\alpha</math> ura3-52 ade2-101 trp1<math>\Delta</math>1 lys2-801 cyh<sup>R2</sup> CF[CEN6 CYH<sup>2</sup> TRP1 SUP11] iml3-24</i>	1275	(Köhler, 2000)
IML3-25	<i>MAT<math>\alpha</math> ura3-52 ade2-101 trp1<math>\Delta</math>1 lys2-801 cyh<sup>R2</sup> CF[CEN6 CYH<sup>2</sup> TRP1 SUP11] iml3-25</i>	1276	(Köhler, 2000)
IML3-28	<i>MAT<math>\alpha</math> ura3-52 ade2-101 trp1<math>\Delta</math>1 lys2-801 cyh<sup>R2</sup> CF[CEN6 CYH<sup>2</sup> TRP1 SUP11] iml3-28</i>	1277	(Köhler, 2000)
IML3-30	<i>MAT<math>\alpha</math> ura3-52 ade2-101 trp1<math>\Delta</math>1 lys2-801 cyh<sup>R2</sup> CF[CEN6 CYH<sup>2</sup> TRP1 SUP11] iml3-30</i>	1278	(Köhler, 2000)
IML3-33	<i>MAT<math>\alpha</math> ura3-52 ade2-101 trp1<math>\Delta</math>1 lys2-801 cyh<sup>R2</sup> CF[CEN6 CYH<sup>2</sup> TRP1 SUP11] iml3-33</i>	1279	(Köhler, 2000)
JK418	<i>MAT<math>\alpha</math> ndc10-1 ura3-52 leu2-3,112 trp1<math>\Delta</math>63</i>	1355	(Goh and Kilmartin, 1993)
PJ-694a	<i>MAT<math>\alpha</math> trp1-901 leu2-3,112 ura3-52 his3-200 gal4<math>\Delta</math> gal80<math>\Delta</math> LYS2::GAL1-HIS3 GAL2-ADE2 met2::GAL7-lacZ</i>	1130	(James, et al., 1996)
YGK4	<i>MAT<math>\alpha</math> ura3-52 ade2-101 trp1<math>\Delta</math>63 leu2<math>\Delta</math>1 lys2-801 his3<math>\Delta</math>200 cyh<sup>R2</sup></i>	1294	diese Arbeit
YGK8	<i>MAT<math>\alpha</math> ura3-52 ade2-101 trp1<math>\Delta</math>63 leu2<math>\Delta</math>1 lys2-801 his3<math>\Delta</math>200 cyh<sup>R2</sup> iml3<math>\Delta</math>::loxP-his5-loxP</i>	1351	diese Arbeit
YGK23	<i>MAT<math>\alpha</math> leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3<math>\Delta</math>1 MAL2-8<sup>c</sup> SUC2 IML3-13Myc:kanMX AME1-3HA:TRP1</i>	1376	diese Arbeit
YGK24	<i>MAT<math>\alpha</math> leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3<math>\Delta</math>1 MAL2-8<sup>c</sup> SUC2 IML3-13Myc:kanMX CTF3-3HA:TRP1</i>	1379	diese Arbeit
YGK25	<i>MAT<math>\alpha</math> leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3<math>\Delta</math>1 MAL2-8<sup>c</sup> SUC2 IML3-13Myc:kanMX SCM3-3HA:TRP1</i>	1380	diese Arbeit
YGK26	<i>MAT<math>\alpha</math> leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3<math>\Delta</math>1 MAL2-8<sup>c</sup> SUC2 IML3-13Myc:kanMX</i>	1381	diese Arbeit
YGK29	<i>MAT<math>\alpha</math> leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3<math>\Delta</math>1 MAL2-8<sup>c</sup> SUC2 iml3<math>\Delta</math>::loxP-ble-loxP</i>	1395	diese Arbeit
YGK30	<i>MAT<math>\alpha</math> leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3<math>\Delta</math>1 MAL2-8<sup>c</sup> SUC2 iml3<math>\Delta</math>::loxP-ble-loxP</i>	1396	diese Arbeit
YGK31	<i>MAT<math>\alpha</math> leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3<math>\Delta</math>1 MAL2-8<sup>c</sup> SUC2 IML3-13Myc:kanMX MCM16-3HA:TRP1</i>	1411	diese Arbeit
YGK32	<i>MAT<math>\alpha</math> leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3<math>\Delta</math>1 MAL2-8<sup>c</sup> SUC2 IML3-13Myc:kanMX NKP1-3HA:TRP1</i>	1412	diese Arbeit
YGK33	<i>MAT<math>\alpha</math> leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3<math>\Delta</math>1 MAL2-8<sup>c</sup> SUC2 IML3-13Myc:kanMX CHL4-3HA:TRP1</i>	1413	diese Arbeit
YGK34	<i>MAT<math>\alpha</math> leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3<math>\Delta</math>1 MAL2-8<sup>c</sup> SUC2 IML3-13Myc:kanMX CTF19-3HA:TRP1</i>	1414	diese Arbeit
YGK35	<i>MAT<math>\alpha</math> ura3-52 phd1<math>\Delta</math>::loxP-ble-loxP</i> (Stammhintergrund: CGX31)	1415	diese Arbeit
YGK36	<i>MAT<math>\alpha</math> ura3-52 phd1<math>\Delta</math>::loxP-ble-loxP fol1<math>\Delta</math>::loxP-kanMX-loxP</i> (Stammhintergrund: CGX31)	1416	diese Arbeit

## Material und Methoden

Stammmname	Genotyp	Nummer in der labor-internen Stammsammlung	Herkunft
YGK37	<i>MAT<sub>a</sub> ura3-52 tec1Δ::loxP-ble-loxP</i> (Stammhintergrund: CGX31)	1417	diese Arbeit
YGK38	<i>MAT<sub>α</sub> ura3-52 tec1Δ::loxP-ble-loxP fol1Δ::loxP-kanMX-loxP</i> (Stammhintergrund: CGX31)	1418	diese Arbeit
YGK39	<i>MAT<sub>α</sub> ura3-52 ade2-101 trp1Δ63 his3Δ200 lys2-801 leu2Δ1 CTF13::ctf13-30 iml3Δ::loxP-kanMX::loxP CF[CEN6 URA3 SUP11 CEN3 left]</i>	1459	diese Arbeit
YGK40	<i>MAT<sub>a</sub> ndc10-1 ura3-52 leu2-3,112 trp1Δ63 iml3Δ::loxP-kanMX::loxP</i>	1462	diese Arbeit
YGK41	<i>MAT<sub>α</sub> leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3Δ1 MAL2-8<sup>c</sup> SUC2 bub2Δ::loxP-kanMX-loxP iml3Δ::loxP-ble-loxP</i>	1455	diese Arbeit
YGK42	<i>MAT<sub>α</sub> leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3Δ1 MAL2-8<sup>c</sup> SUC2 bub3Δ::loxP-kanMX-loxP iml3Δ::loxP-ble-loxP</i>	1456	diese Arbeit
YGK44	<i>MAT<sub>α</sub> leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3Δ1 MAL2-8<sup>c</sup> SUC2 bub2Δ::loxP-kanMX-loxP</i>	1457	diese Arbeit
YGK45	<i>MAT<sub>α</sub> leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3Δ1 MAL2-8<sup>c</sup> SUC2 bub3Δ::loxP-kanMX-loxP</i>	1458	diese Arbeit
YGK47	<i>MAT<sub>a</sub> ura3-52 leu2 ura3-52 trp1-63 trp1D63 GAL2 LEU2-tTAYBR211c::loxP-kanMX-loxP-tetO7 bub2Δ::loxP-ble-loxP</i>	1460	diese Arbeit
YIM1	<i>MAT<sub>a</sub> leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3Δ1 MAL2-8<sup>c</sup> SUC2 AME1-yEGFP::loxP-kanMX-loxP</i>	1409	(Mazur, 2003)
YJH12	<i>MAT<sub>α</sub> ura3-52 ade2-101 trp1Δ63 his3Δ200 lys2-801 leu2Δ1 cyh<sup>R</sup>2</i>	235	J. Hegemann
YJL148	<i>MAT<sub>a</sub> ade2-101 trp1-901 leu2-3,112 ura3-52 his3Δ200 lys2-801 can<sup>r</sup> gal4-542 gal80-538 URA3::GAL1-lacZ lys2::CEN3<sup>4GC</sup>:TATA-HIS3</i>	1377	(Ortiz, et al., 1999)
YJL128	<i>MAT<sub>a</sub> ade2-101 trp1-901 leu2-3,112 ura3-52 his3Δ200 lys2-801 can<sup>r</sup> gal4-542 gal80-538 URA3::GAL1-lacZ cen3::CEN3:TATA-HIS3</i>	1378	(Ortiz, et al., 1999)
YJL158	<i>MAT<sub>a</sub> ura3-52 ade2-101 trp1Δ63 leu2Δ1 lys2-801 his3Δ200 cyh<sup>R</sup>2 OKP1::okp1-5:TRP1 CF [CEN6 CYH<sup>2</sup> URA3 SUP11]</i>	1356	(Ortiz, et al., 1999)
YK33+CF	<i>MAT<sub>α</sub> ura3-52 ade2-101 trp1Δ63 his3Δ200 lys2-801 leu2Δ1 CTF13::ctf13-30 CF[CEN6 URA3 SUP11 CEN3 left]</i>	384	(Doheny, et al., 1993)
YRN212	<i>MAT<sub>α</sub> ura3-52 ade2-101 trp1Δ1 lys2-801 cyh<sup>R</sup>2 CF[CEN6 CYH<sup>2</sup> TRP1 SUP11]</i>	324	R. Niedenthal
YSH19	<i>MAT<sub>α</sub> ura3-52 ade2-101 trp1Δ63 his3Δ200 lys2-801 leu2Δ1 cyh<sup>R</sup>2 CF[CEN6 yEGFP3 CYH<sup>2</sup> URA3 SUP11]</i>	985	(Hegemann, et al., 1999)
YTF-3a	Isogen zu YJH12, <i>MAT<sub>a</sub></i>	1049	(Fiedler, 2000)
YUG1	<i>MAT<sub>a</sub> leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3Δ1 MAL2-8<sup>c</sup> SUC2 fol1Δ::kanMX</i>	570	(Güldener, 2000)
YUG37	<i>MAT<sub>a</sub> ura3-52 trp1-63 LEU2 pCM149 an leu2-Δ1 integriert</i>	995	(Güldener, 2000)
YUG43	Isogen zu YSH19, <i>iml3Δ::loxP-KanMX-loxP</i>	1021	(Güldener, 2000)
YUG94	<i>MAT<sub>a</sub> ura3-52</i> (Stammhintergrund: CGX31)	1149	(Güldener, 2000)
YUG96	<i>MAT<sub>a</sub> ura3-52 fol1Δ::loxP</i> (Stammhintergrund: CGX31)	1151	(Güldener, 2000)
YUG98	<i>MAT<sub>a</sub> ura3-52 ste12Δ::loxP-KanMX-loxP</i> (Stammhintergrund: CGX31)	1153	(Güldener, 2000)
YUG100	<i>MAT<sub>α</sub> ura3-52 flo11Δ::loxP-KanMX-loxP</i> (Stammhintergrund: CGX31)	1155	(Güldener, 2000)
YUG102	<i>MAT<sub>a</sub> ura3-52 fol1Δ::loxP ste12Δ::loxP-KanMX-loxP</i> (Stammhintergrund: CGX31)	1157	(Güldener, 2000)
YUG104	<i>MAT<sub>α</sub> ura3-52 fol1Δ::loxP flo11Δ::loxP-KanMX-loxP</i> (Stammhintergrund: CGX31)	1159	(Güldener, 2000)
YUG108	<i>MAT<sub>a</sub> leu2Δ1 lys2-801 ade2-101 ura3-52 trp1Δ63 his3Δ200 mad2Δ::HIS3 CF [yEGFP URA3 SUP11 cyh<sup>S</sup>]</i>	1457	diese Arbeit
YUG113	<i>MAT<sub>a</sub> leu2Δ1 lys2-801 ade2-101 ura3-52 trp1Δ63 his3Δ200 mad2Δ::HIS3 iml3Δ::loxP-kanMX-loxP</i>	1457	diese Arbeit

### 2.6.3 Medien und Anzucht

#### 2.6.3.1 Medien für *Escherichia coli*

**LB – Medium:** 10 g Bacto Trypton  
5 g Hefeextrakt  
5 g NaCl  
13,5 g Agar (Nur für Platten)  
auf 1000 ml mit ddH<sub>2</sub>O auffüllen, lösen und autoklavieren.

**LB + Amp:** Zugabe von Ampicillin, Endkonzentration 50 mg/l.

Für Blau/Weiß Selektion: 40 µl IPTG (20 mg/ml) und 40 µl X-Gal (20 mg/ml) je Platte.

**IPTG:** 0,2 g in 10 ml ddH<sub>2</sub>O lösen, bei –20 °C lagern.

**X-Gal:** 0,2 g in 10 ml N,N-Dimethylformamid lösen, bei –20 °C lagern.

**SOB:** 20 g Bacto Trypton  
5 g Hefeextrakt  
0,5 g NaCl  
auf 1000 ml mit ddH<sub>2</sub>O auffüllen, lösen und autoklavieren.

direkt vor der Verwendung werden 20 mM MgSO<sub>4</sub> aus einer 1 M Stocklösung zugegeben.

#### 2.6.3.2 Anzucht von *Escherichia coli*

*E. coli* wurde in LB-Medium in aeroben Schüttelkulturen bei 37 °C angezogen. Zur Selektion von Plasmid-Transformanten wurde dem Medium 50 µg/ml Ampicillin zugefügt.

#### 2.6.3.3 Medien für *Saccharomyces cerevisiae*

**YPD<sup>+</sup>:** 10 g Hefeextrakt  
20 g Casein Hydrolysat (Pepton)  
14 g Agar (bei Platten)  
2 ml Adeninstocklösung (2 mg/ml)  
4 ml Tryptophanstocklösung (5 mg/ml)  
auf 900 ml mit ddH<sub>2</sub>O auffüllen, lösen und autoklavieren.  
20 g Glukose  
auf 100 ml mit ddH<sub>2</sub>O auffüllen, lösen und autoklavieren.

Alles zusammengenommen (1000 ml), mischen und in 250 ml Flaschen portionieren bzw. Platten gießen.

**YPD<sup>+</sup> + G418:** Dem abgekühlten Medium (ca. 60 °C) werden 200 mg/l Geneticin (G418) zugegeben.

## Material und Methoden

---

<b>SC Minimalmedium:</b>	20	g	Glukose
	15	g	Agar (Nur für Platten)
	1,7	g	Yeast Nitrogen Base (YNB)
	5	g	Ammoniumsulfat
	2	g	Drop out Mix

auf 1000 ml mit ddH<sub>2</sub>O auffüllen, pH Wert mit 1 N NaOH auf 6,5-7,0 einstellen und autoklavieren.

### Drop out Mix

Der Drop out Mix besteht aus den folgenden Basen, Aminosäuren und Chemikalien, ausgenommen denen, die für die Selektion auf die Transformanten verwendet werden. Das Pulver sollte für mindestens 15 min. unter Zugabe von sterilen Metallkugeln ( $\varnothing \sim 5\text{mm}$ ) durch Schütteln durchgemischt werden.

Adenin	0,5 g	Leucin	10,0 g
Alanin	2,0 g	Lysin	2,0 g
Arginin	2,0 g	Methionin	2,0 g
Asparagin	2,0 g	para-Aminobenzoesäure	0,2 g
Asparaginsäure	2,0 g	Phenylalanin	2,0 g
Cystein	2,0 g	Prolin	2,0 g
Glutamin	2,0 g	Serin	2,0 g
Glutaminsäure	2,0 g	Threonin	2,0 g
Glycin	2,0 g	Tryptophan	2,0 g
Histidin	2,0 g	Tyrosin	2,0 g
Inositol	2,0 g	Uracil	2,0 g
Isoleucin	2,0 g	Valin	2,0 g

### YPD<sup>+</sup> / SD / + Thiabendazol:

Zu auf ca. 60 °C abgekühltem YPD<sup>+</sup>/ SC-Medium werden versuchsabhängig definierte Mengen an Thiabendazol (TBZ) zugegeben.

Thiabendazol: 20 mg/ml Stocklösung in N,N-Dimethylformamid.

### YPD<sup>+</sup> + Phleomycin

Zu auf ca. 60 °C abgekühltem YPD-Medium werden 7,5 mg/ml Phleomycin zugegeben.

## Material und Methoden

---

<b>Praesporulationsplatten</b>	100	g	Glukose
	14	g	Agar
	3	g	Pepton
	8	g	Hefeextrakt

auf 1000 ml mit ddH<sub>2</sub>O auffüllen und autoklavieren.

<b>Sporulationsplatten</b>	10	g	Kaliumacetat
	13	g	Agar
	0,5	g	Glukose
	1	g	Hefeextrakt
	0,1	g	Adenin
	0,1	g	Uracil

auf 1000 ml mit ddH<sub>2</sub>O auffüllen und autoklavieren.

### 2.6.3.4 Anzucht von *Saccharomyces cerevisiae*

Die Anzucht der Hefen erfolgte bei 30 °C in Vollmedium oder Minimalmedium. Dem synthetischen Medium wurde Glukose (SD: 2 % (w/v) Glukose) als Kohlenstoffquelle zugegeben. Zur Selektion auf plasmidhaltige Zellen wurde die entsprechende Base bzw. Aminosäure weggelassen, oder aber Chemikalien, gegen die eine Resistenz vorlag, wurden zugegeben. Hefe-Kulturen wurden zur Lagerung über längere Zeiträume bei -80 °C im Verhältnis 3:1 mit Glycerin versetzt.

## 2.7 Synthetische Oligonukleotide

Die Oligonukleotidbezeichnung entspricht der Nummerierung in der internen Labor-Oligonukleotidsammlung. Klein geschriebene Nukleotide stellen Homologien dar. Die Oligonukleotide wurden von Sigma ARK bezogen.

Name	Sequenz	Nummer in der laborinternen Oligonukleotidsammlung
KanMX reverse	CCTCGACATCATCTGCC	335
KanMX forward	GGATGTATGGGCTAAATG	363
Mat a	ACTCCACTTCAAGTAAGAGTTTG	568
Mat $\alpha$	GCACGGAATATGGGACTACTTCG	569
MAT Gen	AGTCACATCAAGATCGTTTATGG	570
YBR107c Start	TTGATTGTCTATAGGTATCAACGTA CTTCTTTGGATGGAcagctgaagcttcgtacgc	610
YBR107c Stop	GTGGTTTTTTATTGTATCTTGGTGAATATTCTTTATAGTGgcatagggcactagtgatc	611
Bub2 Start	GCGATGTTACGTGTGGACGGTGCTCTCTCAAACCTTCTATGcagctgaagcttcgta cgc	616

## Material und Methoden

Bub2 Stop	GTAGAATTAACGATAAAAATATAATATTTCTTCACATAGAgcatagggccactagt ggatc	617
MAD2 Start	GTATTGAAAACCACTTCAAAGGGGCCAATAGCACATTTAcagctgaagcttctg acgc	620
MAD2 Stop	ATCTCTTTACTATTGGAGTCTGCCATTCTAACGGAAGTTgcatagggccactagt gatc	621
MAD2 ver Start	GCCATGCTGTTAATGTGGC	626
Bub2 ver Start	ACCGTTTACGTACGCCAAGC	627
YBR107c ver Start	TTATCCATATATGTATACAC	628
YBR107ce	TCTAGCAGTTGTACTCCAATCGATTTCAGTTTACCAGCGAGgctgctgctatgctaa aggtgaagaattattcac	829
YBR107cek	TACTGATAATGACGATGATTCATGAAGGTCTTCAGGTTCAgcatagggccactagt ggatctg	830
YBR107cev	GACTTCCGTCATATTGGC	831
YBR107cekv	AAATTGTAATGTCTCTGG	832
YBR107c-TAG5	TCTAGCAGTTGTACTCCAATCGATTTCAGTTTACCAGCGAGcggatccccgggtaa ttaac	1107
YBR107c-TAG3	GATGATTCATGAAGGTCTTCAGGTTTCATATGTACAAAAAgaattcgagctggtt aac	1108
MAD2 VER Stop	CAAGGTTCTTAAACAGAGGC	1117
MAD2 VER Start unten	TCTTCTGCTGGGTATACGCC	1118
YBR107cA	AAGTGATGGAATCTTTGTTG	1132
YBR107cD	CTCTATTTGTTTTTCATTTTG	1133
IML3-seq-s	TGGTCGACTGCATGGTTG	1155
IML3-seq-o	TTCATGAAGGTCTTCAGG	1156
IML3seqiv	GTTCAAATTTTATCGGCCAC	1229
IML3seqih	GAGAACATCGAACAATTAC	1230
PACTII-5'-insert	CCAGATTACGCTAGCTTG	1231
PACTII-3'-insert	GTGCACGATGCACAGTTG	1232
YDR383cdis5	TATATTGCTTTGTTCAAAGGTGATATAAAAACGATGACGCcagctgaagcttcgta cgc	1235
YDR383cdis3	TTTTTTATTTTTTCTCTCTTTTCCGGAGAATTGCCAAATGgcatagggccactagtgg atctg	1236
YDR383cTH5	ATTACGCTAGCTTGGGTGGTCATATGGCCATGGAGGCCCCgatgtgcacagaaac taaage	1237
YDR383cTH3	CTACGATTCATAGATCTCTCGAGCTCGAATTCGGATCCCCCcttacttcttaact cgctt	1238
CHL4TH5	ATTACGCTAGCTTGGGTGGTCATATGGCCATGGAGGCCCCgatgtctaacgaatta eggct	1239
CHL4TH3	CTACGATTCATAGATCTCTCGAGCTCGAATTCGGATCCCCCcttacagtaaacc accttag	1240
YDR383cver5	GCCAAATGCTCCTTAAAGGG	1258
YDR383cver3	ATCAACGAATTGTTGCCTC	1259
YDR383c Tag5	AAGAGAGAAAAAATAAAAAAATCCTAAGCGAGTTAAAGAAGcggatcccc gggtaattaac	1260
YDR383c Tag3	AAAATCTGGTGTAATCCTCGATTCCATTGTGATTTAAAgaattcgagctcgttta aac	1261
CTF3 Tag5	ATATTTGAAGAGTCTCTCAAAGTATAGCGTTCAAATTTCTcggatccccgggtaa ttaac	1262

## Material und Methoden

CTF3 Tag3	CCTTATAGATATAAAATTGTCCAATCTCCTTTTTGGAAGTTgaattcgagctcgttaa ac	1263
AME1 Tag5	AATTAATGAAAATCTTTCTAACGAATTACAACCAAGTCTAcggatccccgggta attaac	1264
AME1 Tag3	TCCTTAGTATGGAAGTAATACATATATACATATATACATAgattcgagctcgttaa aac	1265
SCM3 Tag5	GAAGTACGAGGCCAAACTCTCGAAAAGGATATTACGAGATcggatccccgggt aattaac	1266
SCM3 Tag3	GTCCGGGTACCCTATGATAGTCCCTAATATAGACTCATAgaattcgagctcgttaa aac	1267
HATrp1 Start	GCTCAATAGTCACCAATGCC	1270
HATrp1 Stop	GGTTGGAAGGCAAGAGAGCC	1271
AME1 HA5	GGATATTGCACATTTTCGTAG	1272
AME1 HA3	TTCAGAAAATTGGGTAGATG	1273
SCM3 HA5	GTGGATGCTGACAACGACAC	1274
SCM3 HA3	TATGATACCTCTGTGAGAGC	1275
CTF3 HA5	TAAAGATTTTAATGCATTTG	1276
CTF3 HA3	AATTCATGTACACGGCTGAC	1277
YDR383c HA5	TGCGTTGGAAGAAATGAAGC	1278
YDR383c HA3	AGAAATCATCGCTGAAGGTC	1279
PACT2seq1	GATGATGAAGATACCCCACC	1287
PACT2seq2	TGGTGCACGATGCACAGTTG	1288
AME1 TH5	ATTACGCTAGCTTGGGTGGTCATATGGCCATGGAGGCCCCgatgatagagacac taaatt	1304
AME1 TH3	CTACGATTCATAGATCTCTCGAGCTCGAATTCGGATCCCCCctatagacttggt gtaatt	1305
AME1 seqih	AAATGGGTTGAACAGGAG	1310
MCM16Tag5	ACAGATACTCCGGATATACAAACATATCCTACACAATTcggatccccgggta attaac	1311
MCM16Tag3	AAGATTCAAACCTTAATTAAGTAACTATTATTATTAGCGTTGgaattcgagctcg tftaaac	1312
Chl4Tag5	ATTTTCAGCGAGAGCAGGTTGCTAAAGGTGGTTTACTGcggatccccgggtaatta ac	1313
Chl4Tag3	TTCGTTTTGTTATGCTTTGACTGAAATTTTTGCATAGGTTgaattcgagctcgttaa ac	1314
CHL4 HA5	TCCTGGGTGGTTGGCTGGAG	1315
CHL4 HA3	TGCCATTTGATGTCAAGTTACC	1316
MCM16 HA5	TGCTGGAAAACAGGTTGAGG	1317
MCM16 HA3	ATTGGTAGTCTGTGGGTCCG	1318
PAS2-Gal4BD3	TTTAAAATTTGTATACAC	1319
CHL4seq5a	GCTTTACGGGGAGATGGG	1320
CHL4seq3a	TGGCTCACCAGAATCTTC	1321
YDR383c seq3a	TTCATTTGGTAATTCGCC	1322
BUB1dis5	TGACGGTTCCTATTGTTTGAATGTTAACGCTGACCAGGAacagctgaagcttcgta cgc	1351
BUB1dis3	AAAAAGCTACCTATGCGGGAGATGAAGGCATATTTATTCagcatagggcactagt ggatctg	1352
BUB3dis5	CTATCTGATATCTGCAACACGAAAACACAACAGTCGCGGCcagctgaagcttcgt acgc	1353
BUB3dis3	TGCCATCAGAGCCAGCCGTGTATAGGAACTTATGACGGGGgcatagggcactagt ggatctg	1354

## Material und Methoden

BUB1verStart	AAATAGTTCAAGGTAATGTC	1355
BUB1verStop	TGTTTTCCATAAGTGACAG	1356
BUB3verStart	GAAGAGGAAAAC TTGGATAC	1357
BUB2verStop	ACTCCGCAATGTTGCATGC	1358
BUB3verStop	GTTTGTATTCATCGGCTGTC	1359
IML3pACT2Start	ATTACGCTAGCTTGGGTGGTCATATGGCCATGGAGGCCCCGatgccttatactgg aagtt	1360
IML3pACT2Stop	CTACGATTCATAGATCTCTCGAGCTCGAATTCGGATCCCCCttactcgtggt aaactgaa	1361
Seq cycT	GAATGTAAGCGTGACATAAC	1381
Seq Met25	GTGTAATACAGGGTCGTCAG	1382
CHL4dis5	GTGGATACTATCTTTGACTAGTATATTTGAGTAGCAATTAcagctgaagcttcgta cgc	1394
CHL4dis3	GTAATCCCCCAAAAATATCATTACCATTA AATTTCAATTTgcatagggcactagt gatctg	1395
Mcm21 Tag5	GGAATTA AAAATTA AACCATTC TTTTCGCGACAATATTCAAGcggatccccgggta attaac	1404
Mcm21 Tag3	CCCAAAATTGGGATACTACACAATTACTTATATCTATGATgaattcgagctcggtta aac	1405
CTF19 Tag5	GATCTGCAACGTTTGCCTATTC CCGGACATGTACGCCAGGcggatccccgggta attaac	1406
Ctf19 Tag3	GCCCATGATGTCTGTAAAGTACCGTTCCTCATCCGAGCTgaattcgagctcggtta aac	1407
Mcm21 C	GAAGATAATCCACGACTTAG	1408
MCM21 D	GGTAGTAAAACGACATCAGC	1409
Ctf19 C	AAGGCCAAGCAATTACTGGC	1410
Ctf19 D	CCTCATATTAACCCATAGG	1411
Phd1 dis Start	CTGGAATTCATAATTCATTAAGCAGAAAATATGTACCATGcagctgaagcttcgta cgc	1425
Phd1 dis Stop	TTGTTTCATAGAGCAAAGAGTTAACGGATTATGTTATGTGCgcatagggcactagt ggatc	1426
Tec1 dis Start	ATAATCCACCTATTTCAACAATTCTGATACCTGTTTAACcagctgaagcttcgtac gc	1427
Tec1 dis Stop	TGCGTATTTATGTACGAGATGTATGTATGTATGTAGACATgcatagggcactagt gatc	1428
TEC1 ver5	GCTGGAGTTTCTCTCGATGG	1429
TEC1 ver3	TACTCGTTCTGGCGCGTCAG	1430
PHD1 ver5	ATATAGGAAGA ACTCTACAG	1431
PHD1 ver3	TCTAACGAATTGCGCAATAG	1432

## 2.8 Plasmide

Plasmid	Wesentliche genetische Marker, Konstruktion, Referenz	Nummer in laborinterner Plasmidsammlung
pAS2-1	Clontech matchmarker 2-Hybrid System 2, <i>TRP1</i> , Amp <sup>r</sup> <i>GAL4-DNA BD</i>	900
pACT2	Clontech matchmarker 2-Hybrid System 2, <i>LEU2</i> , Amp <sup>r</sup> <i>GAL4-DNA AD</i>	901
pBIISK+	STRATAGENE	13



## Material und Methoden

Plasmid	Wesentliche genetische Marker, Konstruktion, Referenz	Nummer in laborinterner Plasmidsammlung
pFA6a-13Myc-kanMX6	PCR-Vorlageplasmid zur C-terminalen cMyc-Epitopmarkierung von Genen (Longtine, et al., 1998)	10a
pFA6a-13Myc-TRP1	PCR-Vorlageplasmid zur C-terminalen cMyc-Epitopmarkierung von Genen (Longtine, et al., 1998)	11a
pFA6a-GFP(S65T)-kanMX6	PCR-Vorlageplasmid zur C-terminalen GFP-Markierung von Genen (Longtine, et al., 1998)	6a
pFA6a-3HA-TRP1	PCR-Vorlageplasmid zur C-terminalen HA-Epitopmarkierung von Genen (Longtine, et al., 1998)	8a
pGK4	Clontech matchmarker 2-Hybrid System 2, <i>IML3</i> in pACT2	1192
pGK5	Clontech matchmarker 2-Hybrid System 2, <i>AME1</i> in pACT2	1193
pGK6	Clontech matchmarker 2-Hybrid System 2, <i>CHL4</i> in pACT2	1194
pGK7	Clontech matchmarker 2-Hybrid System 2, <i>NKPI</i> in pACT2	1195
pTD1-1	Clontech matchmarker 2-Hybrid System 2, SV40 großes T-Antigen <sub>(84-708)</sub> in pACT2	904
pQW1	Clontech matchmarker 2-Hybrid System 2, <i>IML3</i> in pAS2-1	956
pVA3-1	Clontech matchmarker 2-Hybrid System 2, Maus p53 <sub>(72-390)</sub> in pAS2-1	903
BES168	LacZ-Expressionsvektor; keine Regulation; <i>URA3</i> -Marker (Rupp, et al., 1999)	1159
pB3782	LacZ-Expressionsvektor; LacZ reguliert durch den gesamten <i>FLO11</i> -Promotor (2,8 kb), <i>URA3</i> -Marker ((Rupp, et al., 1999))	966
BHUM212	LacZ-Expressionsvektor; LacZ reguliert durch ein <i>FRE</i> -Fragment, <i>URA3</i> -Marker (Rupp, et al., 1999)	1188
pFLO11-2/1	LacZ-Expressionsvektor; LacZ reguliert durch ein <i>FLO11</i> -Promotorfragment (-1 bis -400), <i>URA3</i> -Marker (Rupp, et al., 1999)	1145
pFLO11-4/3	LacZ-Expressionsvektor; LacZ reguliert durch ein <i>FLO11</i> -Promotorfragment (-400 bis -800), <i>URA3</i> -Marker (Rupp, et al., 1999)	1147
pFLO11-6/5	LacZ-Expressionsvektor; LacZ reguliert durch ein <i>FLO11</i> -Promotorfragment (-800 bis -1200), <i>URA3</i> -Marker (Rupp, et al., 1999)	1149
pFLO11-8/7	LacZ-Expressionsvektor; LacZ reguliert durch ein <i>FLO11</i> -Promotorfragment (-1200 bis -1600), <i>URA3</i> -Marker (Rupp, et al., 1999)	1151
pFLO11-10/9	LacZ-Expressionsvektor; LacZ reguliert durch ein <i>FLO11</i> -Promotorfragment (-1600 bis -2000), <i>URA3</i> -Marker (Rupp, et al., 1999)	1153
pFLO11-12/11	LacZ-Expressionsvektor; LacZ reguliert durch ein <i>FLO11</i> -Promotorfragment (-2000 bis -2400), <i>URA3</i> -Marker (Rupp, et al., 1999)	1155
pFLO11-14/13	LacZ-Expressionsvektor; LacZ reguliert durch ein <i>FLO11</i> -Promotorfragment (-2400 bis -2800), <i>URA3</i> -Marker (Rupp, et al., 1999)	1157
pIV1	<i>SPC24</i> -Überexpressionsvektor; <i>SPC24</i> reguliert durch <i>MET25</i> -Promotor; <i>URA3</i> -Marker	1174

## Material und Methoden

Plasmid	Wesentliche genetische Marker, Konstruktion, Referenz	Nummer in laborinterner Plasmidsammlung
pIV2	<i>SPC34</i> -Überexpressionsvektor; <i>SPC34</i> reguliert durch <i>MET25</i> -Promotor; <i>URA3</i> -Marker	1175
pIV3	<i>IML3</i> -Überexpressionsvektor; <i>IML3</i> reguliert durch <i>MET25</i> -Promotor; <i>URA3</i> -Marker	1176
pIV4	<i>CTF19</i> -Überexpressionsvektor; <i>CTF19</i> reguliert durch <i>MET25</i> -Promotor; <i>URA3</i> -Marker	1177
pIV5	<i>CTF3</i> -Überexpressionsvektor; <i>CTF3</i> reguliert durch <i>MET25</i> -Promotor; <i>URA3</i> -Marker	1187
pKE6	Ein 1,4 kb <i>CYH2</i> <i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III Fragment und ein 1,16 kb <i>CEN6</i> wt <i>Bam</i> HI/ <i>Sac</i> I Fragment wurden in pKE5 kloniert (Jehn, et al., 1991)	72
pRS316	<i>URA3</i> , <i>CEN6</i> ; <i>ARSH4</i> (Sikorski and Hieter, 1989)	38
pRS426	<i>URA3</i> , 2 $\mu$	296
pUC19	(Yanisch-Perron, et al., 1985)	7
pUG6	PCR-Vorlage-Plasmid, <i>loxP-kanMX-loxP</i> ; (Güldener, et al., 1996)	457
pUG66	PCR-Vorlage-Plasmid, <i>ble</i> wurde als PCR-Fragment mit den Oligonukleotiden 1104 und 1106 auf pUT332 in <i>Nco</i> I/ <i>Sac</i> I geschnittenen pUG6 kloniert	973
pUG73	PCR-Vorlage-Plasmid, <i>K. lactis</i> PCR-Fragment von <i>LEU2</i> unter eigenem Promotor und Terminator wurde gegen das <i>Bg</i> III/ <i>Sac</i> I kanMX Fragment in pUG6 ausgetauscht	1013

## 2.9 DNA-Klonierung

### 2.9.1 DNA Restriktionsanalysen

Plasmide oder andere DNA-Fragmente wurden gemäß der Herstellerangaben mit den für die Enzyme beigelieferten Puffern verdaut. Als Richtwert gilt, dass eine Einheit Enzym 1  $\mu$ g  $\lambda$ -Phagen-DNA in einer Stunde spaltet. Restriktionsanalysen erfolgten im allgemeinen für 3 bis 4 Stunden bei der vom Hersteller angegebenen Temperatur. Restriktionsfragmente wurden über Agarosegele aufgetrennt und analysiert.

### 2.9.2 Elution von DNA aus einem Agarosegel

Für die Elution von DNA aus Agarosegelen wurde das Macherey & Nagel Nucleo Spin Extract 2 in 1 Kit verwendet. Die Elution der DNA erfolgte nach Herstellerangaben. Alle optionalen Schritte wurden ausgeführt.

### 2.9.3 Fällung von DNA

Um DNA aus einer Lösung zu fällen, wurde entweder 3 M Natriumacetat (1/10 des Volumens) oder 5 M Ammoniumacetat (gleiches Volumen) als Fällungssalz verwendet. Nach

Zugabe des Fällungssalzes wurde mit dem 2,5-3 fachen Volumen 96 %igem Ethanol die DNA gefällt, indem die Lösung für 30 min bei 13000 UpM (Heraeus Biofuge pico) zentrifugiert wurde und der Überstand verworfen wurde. Das Pellet wurde einmal in 70 %igem Ethanol gewaschen und anschließend im Vakuum-Konzentrator getrocknet. Die Aufnahme der DNA erfolgte im gewünschten Volumen ddH<sub>2</sub>O.

### **2.9.4 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten**

Für die Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten wurde die DNA gemäß Herstellerangaben mit alkalischer Phosphatase behandelt. Verdauung erfolgte im allgemeinen für 1 bis 2 Stunden bei 37 °C.

### **2.9.5 DNA Ligation**

Geschnittene DNA-Fragmente wurden mit einer Ligase bei den vom Hersteller vorgegebenen Bedingungen ligiert. Es wurde, wenn möglich, ein molares DNA-Verhältnis von Vektor zu Insert von 1:5 bis 1:10 gewählt.

### **2.9.6 Polymerase-Kettenreaktion zur Amplifikation von DNA**

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dient der Amplifikation von DNA-Fragmenten. Für die PCR-Reaktionen wurden die Thermocycler Gene Amp PCR System 9600 und 9700 (PE Applied Biosystems) und PTC 200 (MJ Research) verwendet. Jeder PCR-Zyklus besteht aus drei aufeinanderfolgenden Phasen, der DNA-Denaturierung, der Anlagerung der Oligonukleotide und der DNA-Synthese. Die DNA-Synthese erfolgt abhängig von der verwendeten Polymerase bei 68 °C (Pfx-Polymerase) oder bei 72 °C (Taq-Polymerase). Die Zeit richtet sich nach der Größe des zu amplifizierenden DNA-Fragments, wobei die Syntheserate der Polymerasen bei ca. 1000 Basenpaaren (bp) pro min liegt. Es wurden zwischen 30 und 35 Zyklen durchgeführt.

Als DNA-Vorlage wurden Hefezellen (eine gerade sichtbare Menge), Plasmide (bis zu 50 ng) oder genomische Hefe-DNA verwendet. Für PCR-Reaktionen, bei denen es wichtig war, dass möglichst wenig Fehler entstehen, wurde die Pfx-Polymerase verwendet, die eine Korrekturlese-Aktivität besitzt. Für andere Reaktionen, wie z. B. für die Verifikation von Transformanten wurde die Taq-Polymerase verwendet, die keine Korrekturlese-Aktivität besitzt.

Die Pfx-Polymerase wurde nach Herstellerangaben verwendet. Für PCR-Reaktionen mit der Taq-Polymerase wurden die Oligonukleotide in einer Konzentration von 1 µM, MgCl<sub>2</sub> in

einer Konzentration von 1,5 mM, dNTPs in einer Konzentration von 200  $\mu$ M und einfach konzentrierter Puffer verwendet. Die Konzentration der Taq-Polymerase liegt bei etwa 1 U/ $\mu$ l.

### 2.9.7 Sequenzierung von DNA-Fragmenten

Für die Überprüfung von Insertionen in das Hefegenom wurde der zu sequenzierende Bereich mit der Pfx-Polymerase amplifiziert und anschließend in den *Sma*I verdauten Vektor pBluescript ligiert. Die Sequenzierungsreaktionen wurden vom BMFZ durchgeführt.

## 2.10 DNA-Gewinnung aus *E. coli*

### 2.10.1 Herstellung DMSO-kompetenter *E. coli*-Zellen

1 ml einer 5 ml SOB über Nacht-Kultur von XL<sub>1</sub>-Blue-*E. coli*-Zellen wurde in 50 ml frisches SOB-Medium überführt und bei 37 °C bis zu einer OD<sub>600</sub> von ca. 0,5 inkubiert. Die Kultur wurde auf Eis abgekühlt und anschließend bei 5000 UpM (Heraeus Megafuge 1.0 R) und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 20 ml eiskaltem FSB-Puffer (10 mM KAc, pH 7,5, 45 mM MnCl<sub>2</sub>, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 100 mM KCl, 3 mM Hexaminkobaltchlorid, 10 % Glycerin) resuspendiert und anschließend für 10 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden nun für 10 min bei 5000 UpM (Heraeus Megafuge 1.0 R) und 4 °C zentrifugiert und das Pellet in 4 ml eiskaltem FSB-Puffer und 140  $\mu$ l DMSO aufgenommen und vorsichtig gemischt. Nach einer 10 minütigen Inkubation auf Eis wurden erneut 140  $\mu$ l Dimethyl Sulfoxid (DMSO) zu den Zellen gegeben und die Ansätze gut durchmischt. Die Zellen wurden daraufhin aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -70 °C.

### 2.10.2 Herstellung von elektrokompetenten *E. coli*-Zellen

Zwei 5 ml LB über Nacht-Kulturen eines *E. coli*-Stammes (XL<sub>1</sub>-Blue) wurden in 1 l LB Medium überführt und bei 37 °C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,7 – 0,8 angezogen. Daraufhin wurden die Zellen für 30 – 60 min auf Eis gekühlt und anschließend bei 4 °C und 4000 UpM für 15 min abzentrifugiert. Die Kultur wurde hierzu auf mehrere 250 ml Zentrifugenbecher verteilt. Die Pellets wurden zweimal in je 1 l eiskaltem, sterilem ddH<sub>2</sub>O gewaschen und anschließend in 20 ml eiskaltem, sterilem 10 % Glycerin pro Zentrifugenbecher resuspendiert und dann in einem Zentrifugenbecher vereinigt. Die Zellen wurden erneut für 15 min bei 4000 UpM bei 4 °C abzentrifugiert und das Zellpellet in 2,5 ml 10 % Glycerin resuspendiert. Daraufhin wurden die Zellen in 40  $\mu$ l, 80  $\mu$ l, 120  $\mu$ l und 160  $\mu$ l Portionen aliquotiert, für 1 min in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bis zum Gebrauch bei -70 °C gelagert.

### **2.10.3 Ein-Minuten Transformation von *E. coli*-Zellen**

3 µl DMSO-kompetente *E. coli*-Zellen wurden mit 1 µl Plasmid-DNA (1-100 ng) vermischt und bei 44 °C für eine Minute inkubiert. Sofort danach wurden 100 µl LB-Medium zugegeben und der gesamte Ansatz auf einer LB + Amp.-Platte ausplattiert.

### **2.10.4 Elektroporation von *E. coli*-Zellen**

40 µl elektrokompetente *E. coli*-Zellen wurden mit ca. 2 µl (0,01-10 ng) des zu transformierenden Plasmids vermischt und in eine auf Eis gekühlte Elektroporationsküvette pipettiert. Die Zellen wurden daraufhin einem Elektropuls (2,1 kV, 200 Ohm, 25 µF) ausgesetzt und anschließend zusammen mit 1 ml LB-Medium in frische Eppendorfreaktionsgefäße pipettiert. Nach einer 30 minütigen Inkubation bei 37 °C im Rad wurden die Zellen für 15 sec bei 13000 UpM (Heraeus Biofuge pico) abzentrifugiert, das Pellet in 100 µl ddH<sub>2</sub>O resuspendiert und die Zellen auf einer LB + Amp -Platte ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

### **2.10.5 Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli*-Zellen**

Kleinere Mengen DNA wurden nach der Methode der alkalischen Lyse (Birnboim and Doly, 1979) gewonnen. Die Pufferzusammensetzung entspricht der des Qiagen Plasmid Midi Kit.

1,5 ml einer 2 ml *E. coli* über Nacht-Kultur wurden für 15 sec bei 13000 UpM (Heraeus Biofuge pico) abzentrifugiert und das Pellet anschließend in 300 µl Puffer 1 mit 100 µg/ml RNase resuspendiert. Nach Zugabe von 300 µl Puffer 2 wurde der Ansatz vorsichtig durchmischt und anschließend für 5 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 300 µl Puffer 3 wurde der Ansatz vorsichtig durchmischt und anschließend für 15 min bei 13000 UpM (Heraeus Biofuge pico) abzentrifugiert. Der Überstand wurde in frische Reaktionsgefäße überführt, mit 500 µl 96 % Ethanol versetzt und für 30 min bei 13000 UpM (Heraeus Biofuge pico) abzentrifugiert. Das Pellet wurde einmal in 70 % Ethanol gewaschen und anschließend in einem Vakuum-Konzentrator getrocknet. Die Aufnahme der DNA erfolgte in 100 bis 200 µl ddH<sub>2</sub>O.

Für die Isolation größerer Mengen Plasmid-DNA wurde ein Qiagen Plasmid Midi Kit laut Herstellerangaben verwendet.

## 2.11 Hefemethoden

### 2.11.1 Manipulation von Hefezellen

#### 2.11.1.1 Transformation von *S. cerevisiae* (nach (Gietz and Woods, 2002))

Hefezellen wurden über Nacht bei 30 °C in 5 ml YPD<sup>+</sup> angezogen und morgens in 50 ml frisches YPD<sup>+</sup> Medium auf eine Zellzahl von ca.  $5 \times 10^6$  Zellen/ml überimpft. Die weitere Anzucht erfolgte bei 30 °C bis zu einer Zellzahl von ca.  $2 \times 10^7$  Zellen/ml. Die Zellen wurden bei 3500 UpM (Heraeus Megafuge 1.0 R) für 5 min pelletiert, in 25 ml ddH<sub>2</sub>O gewaschen, in 1 ml 0,1 M Litiumacetat (LiAc) resuspendiert und in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden erneut pelletiert und anschließend wurde das Zellpellet in 0,1 M LiAc resuspendiert, so dass die Zellzahl im Ansatz ca.  $1 \times 10^9$  Zellen/ml entsprach. 50 µl der Zellsuspension wurden pro Transformationsansatz in ein neues Eppendorfreaktionsgefäß überführt und pelletiert. Nach der Entfernung des gesamten Überstandes wurden 240 µl Polyethylenglycol 3350 (PEG) (50 % w/v), 36 µl 1 M LiAc, 50 µl bei 100 °C denaturierte Lachssperma-DNA und 34 µl mit ddH<sub>2</sub>O verdünnte zu transformierende DNA (bei Plasmid-DNA 0,1 – 0,4 µg) zugefügt und der Ansatz gut durchmischt. Die Zellen wurden daraufhin für 30 min bei 30 °C und für weitere 30 min bei 42 °C im Heizblock inkubiert und anschließend bei 13000 UpM für 5 sec (Heraeus Biofuge pico) abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 200 µl ddH<sub>2</sub>O resuspendiert und auf Selektionsplatten ausgestrichen. Wurde zur Selektion Phleomycin oder G418 verwendet, so wurden die Zellen anstatt in 200 µl ddH<sub>2</sub>O in 1 ml YPD<sup>+</sup> resuspendiert und für mindestens 1 h bei 30 °C im Rad inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen erneut pelletiert, in 200 µl ddH<sub>2</sub>O resuspendiert und auf die Selektionsmedien ausplattiert.

#### Verwendete Lösungen:

PEG: 50 g PEG werden in 35 ml ddH<sub>2</sub>O gelöst und anschließend wird die Lösung auf 100 ml mit ddH<sub>2</sub>O aufgefüllt. Die Lösung wird steril filtriert und anschließend in 2 ml Aliquots abgefüllt und bei –20 °C bis zum Gebrauch eingefroren. Die Aliquots sollten nicht häufiger als zweimal aufgetaut werden.

Lachssperma-DNA: 200 mg hochmolekulargewichtige Lachssperma-DNA werden in 100 ml TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA) durch wiederholtes Auf- und Abpipettieren mit einer 10 ml Glaspipette in Lösung gebracht. Anschließend wird die Lösung über Nacht bei 4 °C auf einem Magnetrührer durchmischt. 1 ml Aliquots werden bei –20 °C bis zum Gebrauch eingefroren. Vor der Verwendung werden die Aliquots für mindestens

5 min bei 100 °C gekocht und anschließend auf Eis abgekühlt. Jedes Aliquot sollte nicht häufiger als dreimal gekocht und wieder abgekühlt werden.

### 2.11.1.2 Disruption und Epitop-Markierung chromosomaler Hefegene durch homologe Rekombination

Die Disruption und die Epitop-Markierung von Genen in der Hefe erfolgte unter Verwendung PCR-generierter plasmidbasierender DNA-Kassetten. Verwendet wurden hierfür Oligonukleotide, die am 5'-Ende 40 Nukleotide Homologie zum Insertionsort tragen, gefolgt von 18 – 22 Nukleotiden Homologie zu je einer Seite des auf dem Plasmid liegenden zu amplifizierenden Fragments (OL5'/OL3'). Durch die PCR auf dem Vorlage-Plasmid wurde ein PCR-Fragment mit endständigen Homologien zum Integrationsort am 5' und 3'-Ende generiert, welches in die gewünschten Hefestämme transformiert wurde und über homologe Rekombination in das Hefegenom integrieren konnte (Abbildung 9). Bei der Deletion von Genen dienen die 40 Basenpaare (bp) vor dem ATG und die 40 bp hinter dem Stoppkodon als Homologien für die Insertion der Kasette in das Genom. Zu beachten ist aber, dass keine weiteren Gene in ihrer Funktion beeinträchtigt werden. Daher sollten bei der Deletion von

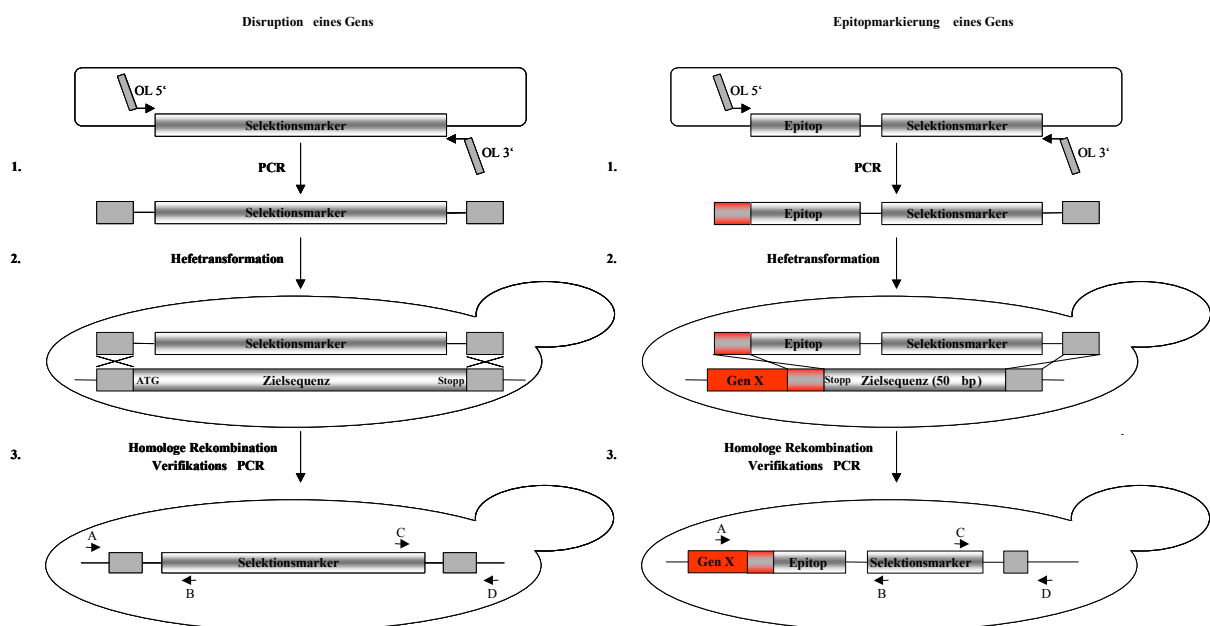


Abbildung 9: Disruption oder Epitopmarkierung im Hefegenom

1. Mit den Oligonukleotiden OL5' und OL3', die beide ca. 40 Basenpaare (bp) Homologie zur Zielsequenz im Genom und ca. 20 bp Homologie zu einem zu amplifizierenden Plasmidabschnitt tragen, wird eine PCR auf einem Plasmid durchgeführt, welches entweder nur einen Selektionsmarker (für Disruptionen) oder eine Sequenz für eine Epitopmarkierung sowie einen Selektionsmarker trägt.

2. Das PCR-Fragment wird in einen Hefestamm transformiert und inseriert über homologe Rekombination in die Zielsequenz im Genom.

3. Transformanten werden über PCR mit den Oligonukleotiden A/B und C/D auf die Integration der PCR-Kasette überprüft. Bei Wildtypstämmen dürfen keine PCR-Produkte entstehen.

Verändert nach (Gueldener, et al., 2002)

Genen mindestens 500 bp der Promotor- und 200 bp der Terminatorsequenz des nächsten Gens erhalten bleiben. Kann dies nicht gewährleistet werden, müssen unvollständige Deletionen durchgeführt werden.

Bei der Epitopmarkierung von Genen werden als Homologien 40 bp direkt vor dem Stoppkodon und 40 bp ca. 50 bp hinter dem Stoppkodon gewählt. Hierdurch kommt es zur Deletion eines kurzen DNA-Fragments, dessen Fehlen über PCR nachgewiesen werden kann. Die Verifikation genomischer Deletionen oder Integrationen in das Genom erfolgte mittels PCR. Das Gesamtvolumen eines PCR-Ansatzes für die Verifikation einer Veränderung des Genoms betrug 25 µl (Oligonukleotide je 25 pmol; MgCl<sub>2</sub>: 1,5 mM; dNTPs je 200 mM; Puffer: einfach konzentriert; Taq-Polymerase: 1 U; Vorlage DNA: eine auf einer gelben Pipettenspitze gerade sichtbare Menge Hefezellen). Die als Vorlage dienenden Hefezellen sollten nicht gekühlt werden.

Um die Transformanten zu testen, wurden die Übergänge zwischen integrierter DNA und dem Genom überprüft, um sicherzustellen, dass die Integrationskassette an den richtigen Ort im Genom inseriert wurde. Verwendet wurden hierzu Oligonukleotide die auf der einen Seite spezifisch im Integrationslokus (A oder D) und auf der anderen Seite spezifisch im Integrationsmarker binden (B oder C) (Abbildung 9). Als Negativkontrolle wurde dieselbe PCR-Reaktion auf Zellen, die nicht mit der Integrationskassette transformiert wurden, durchgeführt. Zusätzlich kann bei der Deletion eines Gens in einem haploiden Stamm eine PCR-Reaktion mit den Oligonukleotiden A/D durchgeführt werden, da so sichergestellt werden kann, dass das zu deletierende Genomstück nicht mehr im Genom vorhanden ist.

### **2.11.1.3 Analyse von adhäsivem und filamentösem Wachstum**

Die Analyse von adhäsivem und filamentösem Wachstum erfolgte in Hefestämmen mit einem CEN.PK2- und mit einem CGX31-Hintergrund. Für die Untersuchungen wurden die zu untersuchenden Hefezellen flächig auf den Medien ausgestrichen, auf denen die weiteren Versuche durchgeführt wurden, und für 24 h bei 30 °C inkubiert.

Für die Untersuchung des adhäsiven Wachstums der Hefestämme mit dem CEN.PK2-Hintergrund erfolgte die Inkubation auf YPD<sup>+</sup>-Platten mit verschiedenen Mengen 5'Formyltetrahydrofolat (FA). Nach der 24-stündigen Inkubation wurden die Zellen erneut auf YPD<sup>+</sup>-Platten mit derselben Konzentration an FA ausgestrichen und für 48 h bei 30 °C inkubiert. Nachdem das Wachstum dokumentiert wurde, wurden die Zellen unter einem Wasserstrahl vorsichtig abgewaschen. Hiernach wurden die Platten erneut eingescannt, um das adhäsive Wachstum zu dokumentieren.



## Material und Methoden

---

Für die Untersuchung des adhäsiven Wachstums der Hefestämme mit dem CGX31-Hintergrund erfolgte die Inkubation auf SC-Medium ohne Aminosäuren und Basen mit Uracil und 50 mg/ml FA. Nach der 24-stündigen Inkubation wurden die Zellen erneut auf SC-Medium ohne Aminosäuren und Basen mit Uracil und derselben Konzentration an FA ausgestrichen und für 24 h bei 30 °C inkubiert. Nachdem das Wachstum dokumentiert wurde, wurden die Zellen unter einem Wasserstrahl vorsichtig abgewaschen. Hiernach wurden die Platten erneut eingescannt, um das adhäsive Wachstum zu dokumentieren.

Für die Untersuchung des filamentösen Wachstums der Hefestämme erfolgte die Inkubation der Hefezellen auf YPD<sup>+</sup>-Platten mit verschiedenen Mengen FA bei 30 °C. Einige Hefezellen wurden nach der ersten Inkubation für 24 h in ddH<sub>2</sub>O resuspendiert und so verdünnt, dass ca. 500 Zellen/Platte ausplattiert wurden. Nach verschiedenen Zeiten wurden die Zellen bzw. Einzelkolonien mikroskopisch analysiert und photographiert.

### **2.11.1.4 Sporulation und Tetradenanalyse von diploiden Hefestämmen**

Vegetativ wachsende diploide Hefestämme können durch das Ausstreichen auf Mangelmedium zur Sporulation angeregt werden. Verwendet wurde hierzu ein Kaliumacetat (KAc)-Medium. Um die Effizienz der Sporulation zu erhöhen, können die Zellen vor dem Ausstreichen auf dem KAc-Medium für 24 h auf einem sog. Präsporulationsmedium ausgestrichen werden. Dieses enthält eine im Gegensatz zum normalerweise verwendeten Nährmedium erhöhte Glukosekonzentration.

Für die Tetradenanalyse wurden ca. 50.000 Zellen von gut sporulierten Ausstrichen des zu untersuchenden Hefestammes in 50 µl 1 M Sorbitol resuspendiert und mit 1 µl Zymolyase (20T) (20 mg/ml) vermischt. Nach 10 minütiger Inkubation bei 37 °C wurde die Reaktion mit 450 µl 1 M Sorbitol gestoppt und einige Tropfen der Zellsuspension wurden in einem Strich auf einer Agarplatte aufgetragen. Die Tetraden und die darin enthaltenden Sporen können mit Hilfe eines Mikromanipulators vereinzelt und anschließend analysiert werden. Hierzu wurden die Tetraden aus dem Ausstrich isoliert und anschließend wurden die einzelnen Sporen auf definierte Punkte auf der Agarplatte vereinzelt. Die Inkubation der Platten erfolgte bei 30 °C.

### **2.11.1.5 Induktion der MAPK-Kaskade abhängigen Proteine Kss1p und Fus3p durch $\alpha$ -Faktor**

Zur Induktion der Mitogen aktivierten Protein Kinase-(MAPK)-Kaskade abhängigen Proteine Kss1p und Fus3p durch  $\alpha$ -Faktor wurden Hefezellen über Nacht in YPD<sup>+</sup>-Medium angezogen. Morgens wurden die Kulturen auf eine OD<sub>600</sub> = 0,1 in frischem YPD<sup>+</sup>-Medium verdünnt und erneut bei 30 °C inkubiert. Diese logarithmisch wachsenden Kulturen wurden

bis zu einer  $OD_{600}$  von 0,6-0,8 angezogen. Anschließend wurden die Zellen für 15 min bei 30 °C mit 0,15  $\mu$ M  $\alpha$ -Faktor inkubiert.

### **2.11.1.6 Induktion eines mitotischen Arrests mit Hilfe von Nocodazol**

Zur Induktion eines mitotischen Zellzyklusarrests wurden Hefezellen über Nacht in YPD<sup>+</sup>-Medium angezogen. Morgens wurden die Kulturen auf eine  $OD_{600} = 0,1$  in frischem YPD<sup>+</sup>-Medium verdünnt und erneut bei 30 °C bis zu einer  $OD_{600} = 0,6$  inkubiert. Die logarithmisch wachsenden Hefezellen wurden für zwei Stunden mit 15  $\mu$ g/ml Nocodazol, einer Mikrotubulidestabilisierenden Chemikalie, bei 30 °C auf einem Rotator inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für weitere Untersuchungen weiterverwendet.

### **2.11.1.7 Präparation von genomischer und Plasmid-DNA aus Hefezellen**

Die DNA-Präparation erfolgte nach einem modifizierten Protokoll der alkalischen Lyse (Birnboim and Doly, 1979)

Hefezellen wurden über Nacht in 5 ml Selektivmedium angezogen und anschließend bei 3500 UpM (Heraeus Megafuge 1.0 R) für 5 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde einmal in 5 ml ddH<sub>2</sub>O gewaschen und anschließend in 1 ml P1 (50 mM Tris, 10 mM EDTA, 100  $\mu$ g/ml RNase A, pH 8,0) resuspendiert. Nach der Zugabe von 1 ml P2 (0,2 M NaOH, 1 % SDS) und ca. 2/3 des Volumens an Glasperlen (0,4 -0,6 mm) erfolgte der Zellaufschluss auf dem Vibrax (IKA Vibrax VXR basic) bei 4 °C und maximaler Geschwindigkeit für 10 min. 1 ml der Überstandes wurde in ein frisches Eppendorfreaktionsgefäß überführt und anschließend wurden 0,5 ml P3 (3 M KAc, pH 5,5) zugegeben und der Ansatz vorsichtig durchmischt. Nach 15 min Zentrifugation bei 13000 UpM (Heraeus Biofuge pico) zur Entfernung der Zelltrümmer wurden zweimal 750  $\mu$ l des klaren Überstandes in frische Reaktionsgefäße überführt und mit je 750  $\mu$ l Isopropanol versetzt. Bei einer erneuten Zentrifugation für 30 min bei 13000 UpM (Heraeus Biofuge pico) wurde die DNA gefällt. Das Pellet wurde einmal mit 500  $\mu$ l 70 % Ethanol gewaschen und anschließend im Vakuum Konzentrator getrocknet. Das Pellet wurde zur weiteren Verwendung in 20  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O resuspendiert.

## **2.11.2 Proteinanalyse von Hefezellen**

### **2.11.2.1 Herstellung von Protein-Rohextrakten aus Hefezellen**

Für die Herstellung von Protein-Rohextrakten wurde ein verändertes Protokoll der Firma Miltenyi (Bergisch-Gladbach) verwendet. Die Hefezellen wurden über Nacht bei 30 °C in 5 ml YPD<sup>+</sup>-Medium angezogen. Morgens wurden die Zellen auf eine  $OD_{600}$  von 0,1 in 50 ml Medium verdünnt und bis zu einer  $OD_{600}$  von 0,6-0,8 bei 30 °C inkubiert. Die Zellen wurden

## Material und Methoden

---

bei 3000 UpM (Heraeus Megafuge 1.0 R) für 5 min abzentrifugiert und anschließend wurde das Pellet einmal in 40 ml kaltem TBS-Puffer (140 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 3,5 mM Tris HCl, pH 7,4) gewaschen. Die Zellen wurden in Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und bei max. Geschwindigkeit und 4 °C kurz abzentrifugiert. Nach der Entfernung des gesamten Überstandes wurden die Zellen auf Trockeneis oder in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -70 °C aufbewahrt.

Für die Zelllyse wurden die Zellen in 700 µl kaltem Lysepuffer (50 mM HEPES-KOH, pH 7,5, 140 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 % Triton X-100, 0,1 % Natrium-Deoxycholat, 1 mM PMSF und Complete Protease Inhibitoren Cocktail nach Herstellerangaben) resuspendiert. Anschließend wurden ca. 0,7 g Glasperlen (0,4 – 0,6 mm) zugegeben und für 1 h bei maximaler Geschwindigkeit und 4 °C gevortext (IKA Vibrax VXR basic). Der Überstand wurde auf Eis in ein neues Eppendorfreaktionsgefäß überführt und bei 15000 UpM (Heraeus Biofuge primo R) und 4 °C für 15 min zentrifugiert. Der klare Überstand, der Proteinrohextrakt, wurde erneut in ein frisches Eppendorfreaktionsgefäß überführt und bei -20 °C bis zum Gebrauch gelagert.

### **2.11.2.2 Western-Blot Analyse**

Proteinproben wurden mittels Natriumdodecylsulfat (SDS)-PAGE in 10 %igen oder 12 %igen Polyacrylamid-Gelen (Rotiphorese Gel) in einem Hoefer Mighty Small Gel-System aufgetrennt. Hierfür wurden die Proteinrohextrakte mit 4-fach SDS-Probenpuffer (250 mM Tris HCl, pH 8,0, 8 % SDS, 0,1 % Bromphenolblau, 20 % Glycerin) und 100 mM DTT versetzt und zum Denaturieren der Proteine für 30 min bei 96 °C erhitzt. Zur Herstellung der Gele wurden für das Trenngel 10 % bzw. 12 % Acrylamid, 1 x SDS-Trenngelpuffer (4 x: 1,5 M Tris HCl, pH 8,8, 0,4 % SDS), 0,05 % APS, 0,125 % N, N, N', N'-Tertramethylethylendiamin (TEMED) und für das Sammelgel 15 % Acrylamid, 1 x Sammelgelpuffer (4x: 0,5 M Tris HCl, pH 6,8, 0,4 % SDS), 0,1 % APS, 0,3 % TEMED verwendet. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei 100 V in 0,05 M Tris HCl, pH 8,3, 0,2 M Glycin und 0,2 % SDS. Zur Quantifizierung der Proteinmengen wurden die Gele mit Coomassie gefärbt. Für die Immundetektion von Proteinen erfolgte ein Transfer der Proteine aus dem Gel auf eine PVDF-Membran (Millipore) bei 300 mA für 60 min (Whatman Biometra Fastblot B 33) unter Verwendung von 39 mM Glycin, 48 mM Tris, 0,037 % SDS und 20 % Methanol. Die Membran wurde anschließend für mindestens eine Stunde in TBST/Block-Puffer (140 mM NaCl; 20 mM Tris HCl, pH 7,6; 0,1 % (w/v) Tween 20 / 2 % (w/v)) Blockierungspulver, ECL Advance Western-Blotting Detection Kit (Amersham Biosciences) oder in 3 % Magermilchpulver und 0,05 % Tween 20 in einfach PBS (8 g NaCl;

## Material und Methoden

0,2 g KCl; 1,44 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,24 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 7,4 in 1 l ddH<sub>2</sub>O) blockiert. Die Inkubation mit dem ersten Antikörper erfolgte über Nacht bei 4 °C oder für 2-3 Stunden bei Raumtemperatur im für das Blockieren verwendeten Puffer. Abhängig vom Puffer in der Blockierungslösung wurde die Membran dreimal für 10 min in TBS oder PBS gewaschen und anschließend im Blockierungspuffer für mindestens 2 Stunden mit dem sekundären Antikörper inkubiert. Hierauf erfolgte erneut ein dreimaliges Waschen im bereits zuvor verwendeten Puffer bei 4 °C oder bei Raumtemperatur. Abhängig vom verwendeten Zweitantikörper erfolgte die Entwicklung der Banden mit dem Amersham ECL Kit, was zu einer Lichtreaktion führt, die im LAS 1000 Spektrometer (Phosphoimager) nachgewiesen wurde oder unter Verwendung von Nitrotetrazolium Blue Chlorid (NBT) und 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl Phosphat (BCIP) als direkte Farbreaktion.

### **2.11.2.3 LacZ / Overlay Assay**

Zur Bestimmung der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität in Hefezellen wurde ein LacZ / Overlay Assay durchgeführt. Hierfür wurden die SC-Platten mit 10 ml 70 °C heißer Agarose (0,5 % Agarose, 0,5 M Natrium-Phosphat-Puffer, pH 7,0, 0,2 % SDS und 0,4 mg/ml 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- $\beta$ -D-Galaktopyranosid (X-Gal) überschichtet und für 24 h bei 37 °C inkubiert (Suckow and Hollenberg, 1998).

### **2.11.2.4 Quantifizierung der *FLO11*-Promotor Aktivität**

*FOL1*-und *fol1A*-Hefezellen, die mit den Plasmiden p*FLO11*-2/1, p*FLO11*-4/3, p*FLO11*-6/5, p*FLO11*-8/7, p*FLO11*-10/9, p*FLO11*-12/11, p*FLO11*-14/13, p*FLO11::LacZ* und dem leeren Vektor transformiert waren (Rupp, et al., 1999), wurden bei 30 °C über Nacht in 200  $\mu$ g/ml FA-haltigem SC-Ura-Medium angezogen. Vom Wildtyp (wt) wurden ca.  $1 \times 10^6$ , von der *fol1A*-Mutante ca.  $28 \times 10^6$  Zellen auf 50  $\mu$ g/ml FA-haltige SC-Platten ohne Aminosäuren und Basen getropft und für 25 h bei 30 °C inkubiert. Nach dieser Inkubation beinhalteten alle Tropfen ca.  $4 \times 10^7$  Zellen.

Zur quantitativen Bestimmung der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität wurde ein LacZ / Overlay Assay durchgeführt.

## **2.11.3 Nachweis von Protein-Interaktionen**

### **2.11.3.1 Ko-Immunopräzipitation**

Die Ko-Immunopräzipitation dient dazu, Interaktionen zwischen Proteinen nachzuweisen. Diese Interaktionen können direkt zwischen den Proteinen vorliegen, es können aber auch

Komplexe nachgewiesen werden, in denen die zu untersuchenden Proteine nicht direkt aneinander gebunden sein müssen, sondern über andere Proteine miteinander verbunden sind. Der Nachweis dieser Interaktionen erfolgte über eine Anreicherung der zu untersuchenden Proteine. Hierzu wurden diese mit einem Epitop markiert und anschließend aus Ganzzell-Proteinrohextrakten isoliert. Dies erfolgte über spezifische, an paramagnetische Mikrokugeln gebundene Antikörper, die nach der Bindung der Epitop-markierten Proteine in einem Separationssäulchen immobilisiert wurden. Durch Waschschriffe wurden anschließend die nicht gebundenen Proteine entfernt, während die mit dem Epitop-markierten Protein interagierenden Proteine, die z. B. mit dem zu untersuchenden Protein in einem Komplex vorliegen, an die Matrix gebunden bleiben. Nach der Remobilisierung kann untersucht werden, welche Proteine im Eluat enthalten sind.

Zu 100 µl der Proteinrohextrakte (s. Kapitel 1.11.2.1) wurden 50 µl der Antikörper gebundenen Kügelchen (Miltonyi, (Bergisch-Gladbach)) gegeben, gut durchmischt und für eine Stunde auf Eis inkubiert. Die Säulchen mit den Magnetkügelchen wurden mit 200 µl Lysispuffer (50 mM HEPES-KOH, pH 7,5; 140 mM NaCl; 1mM EDTA; 1 % Triton X-100; 0,1 % Natrium-Deoxycholat) äquibriert. Anschließend wurden die mit den Antikörper gebundenen Kügelchen inkubierten Rohextrakte auf die Säulchen gegeben und der Durchfluss wurde verworfen. Es folgte ein viermaliges Waschen mit 200 µl Waschpuffer 1 (150 mM NaCl, 1 % Igepal CA-630, 0,5 % Natrium-Deoxycholat, 0,1 % SDS, 50 mM Tris HCl, pH 8,0) und anschließend ein einmaliges Waschen mit 200 µl Waschpuffer 2 (20 mM Tris HCl, pH 7,5). Zur Elution der an die Antikörper gebundenen Proteine wurden die Säulchen zuerst für 5 min mit 20 µl 96 °C warmem Elutionspuffer (50 mM Tris HCl, pH 6,8, 50 mM DTT, 1 % SDS, 1 mM EDTA, 0,005 % Bromphenolblau, 10 % Glycerin) inkubiert. Daraufhin wurden erneut 50 µl des warmen Elutionspuffers auf die Säulchen gegeben und das Eluat wurde in frischen Eppendorfreaktionsgefäßen aufgefangen. Nachdem die Proben zum Denaturieren und Beladen der Proteine mit SDS für 30 min bei 96 °C aufgeköcht worden waren, wurden zwischen 10 und 20 µl auf ein denaturierendes (Natrium Dodecylsulfat-) SDS-Gel aufgetragen, elektrophoretisch aufgetrennt und in einem Western-Blot analysiert.

### **2.11.3.2 Zwei-Hybrid-Analyse**

Die Zwei-Hybrid-Analyse dient der Identifizierung direkter Interaktionen zwischen zwei Proteinen *in vivo*. Als Grundlage dient der Transkriptionsfaktor Gal4p der Hefe *S. cerevisiae*. Dieser besteht aus zwei funktionellen Domänen, der DNA-Bindedomäne (BD), die an die GAL UAS (GAL Upstream-Aktivatorsequenz) bindet, und einer Aktivator-domäne (AD), die mit der basalen Transkriptionsmaschinerie interagiert und so die Transkription aktiviert. Zum

## Material und Methoden

Nachweis bestehender Interaktionen zwischen zwei Proteinen wird das eine zu testende Gen mit der *GAL4*-Aktivator-domäne und das andere zu testende Gen mit der *GAL4*-DNA-Bindedomäne in je einem Expressionsvektor fusioniert. Der Nachweis der Interaktion zwischen zwei Proteinen erfolgt mit Hilfe von Reporterproteinen. Bei einer bestehenden Interaktion zwischen den zu testenden Proteinen kommen die DNA-Bindedomäne und die Aktivator-domäne in räumliche Nähe und es kommt zu Transkription der Reportergene, die in das Genom integriert wurden. Verwendet wurden die Reporterproteine Ade2p, His3p und lacZ (Hefestamm: PJ-694a).

### 2.11.3.3 Ein-Hybrid-Analyse

Die Ein-Hybrid-Analyse dient dem Nachweis der Bindung eines Proteins an eine bestimmte DNA-Sequenz *in vivo*. Wie bei der Zwei-Hybrid-Analyse dient der Transkriptionsfaktor Gal4p der Hefe *S. cerevisiae* als Grundlage. Das zu untersuchende Gen wird an die Aktivator-domäne von *GAL4* fusioniert. Die direkte oder durch andere Proteine vermittelte Bindung des zu untersuchenden Proteins an den zu testenden DNA-Abschnitt führt zur Transkription eines Reportergens, welches zusammen mit einem Minimalpromotor direkt hinter den zu untersuchenden DNA-Abschnitt kloniert wurde. Für die Untersuchung einer Interaktion von Proteinen mit dem Kinetochor wird eine Ein-Hybrid-Analyse durchgeführt, bei der ein Reporter-gen direkt hinter die Zentromerregion von Chromosom III kloniert wurde

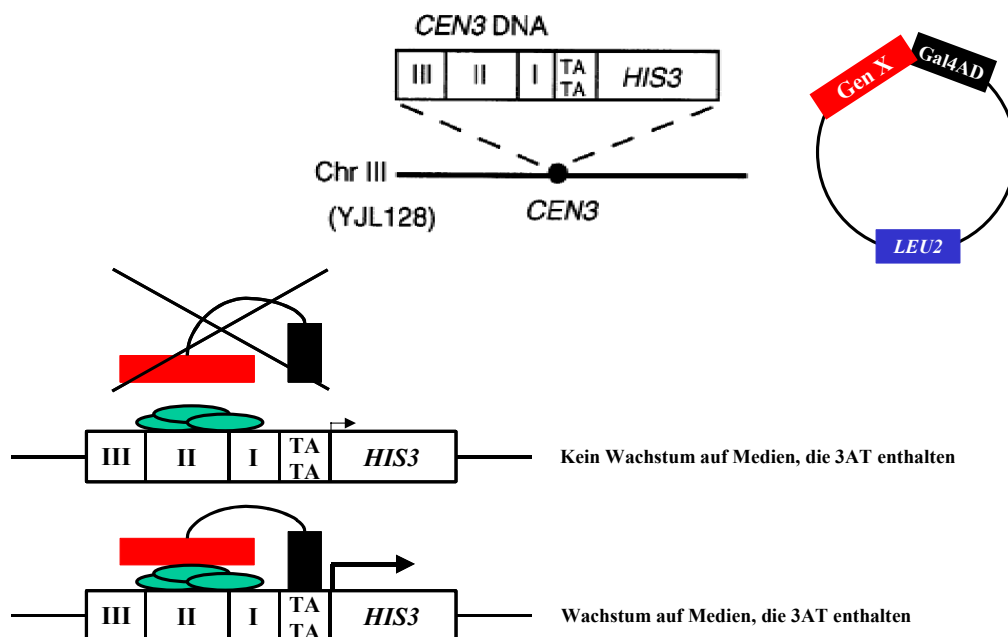


Abbildung 10: Ein-Hybrid Analyse

In einem Hefestamm, dessen endogene *CEN3* Region gegen eine *CEN3*-Kassette oberhalb eines *HIS3*-Reportergens ersetzt wurde, wird ein Plasmid exprimiert, welches das zu testende Gen (Gen X) fusioniert an die *GAL4*-Aktivator-domäne (*GALAD*) trägt (Ortiz, et al., 1999). Kann das Genprodukt direkt oder indirekt über andere Proteine an die *CEN3*-DNA binden, kommt es zur Expression des Reportergens *HIS3* und die Hefezellen können auf 3-Aminotriazol (3AT)-haltigen Medien ohne Histidin wachsen.

(Abbildung 6) (Ortiz, et al., 1999).

### 2.11.3.4 Immunfluoreszenz

(<http://www.upstate.edu/biochem/amberg/index.html>)

5 ml einer logarithmisch wachsenden Hefekultur wurden für 3 min bei 3000 UpM (Heraeus Megafuge 1.0 R) abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 5 ml 40 mM KPO<sub>4</sub>, pH 6,5, 500 µM MgCl<sub>2</sub> und 3,7 % Paraformaldehyd (PFA; 37 % Stocklösung in ddH<sub>2</sub>O) resuspendiert und für 10 min bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal in 5 ml des zuvor verwendeten Puffers ohne PFA und einmal in 5 ml des gleichen Puffers ohne PFA mit 1,2 M Sorbitol gewaschen. Dann wurden die Zellen in 1 ml des Sorbitol-haltigen Puffers ohne PFA aufgenommen und falls gewünscht über Nacht bei 4 °C aufbewahrt. Durch die Zugabe von 10 µl 1 mg/ml Zymolyase (100T) und 1,4 µl β-Mercaptoethanol und anschließender Inkubation bei Raumtemperatur für mindestens 5 Minuten wurden die Zellwände verdaut. Nach ausreichendem Verdau, der unter dem Mikroskop verfolgt wurde, wurden die Zellen einmal in dem Sorbitolpuffer gewaschen und anschließend in 100 -500 µl (abhängig von der Größe des Zellpellets) des Sorbitol-haltigen Puffers ohne PFA aufgenommen. Die Zellen müssen nun auf Eis gelagert werden. Die Objektträger wurden mit 0,5 mg/ml Polylysin beschichtet, indem 20 µl Polylysin auf die Objektträger getropft wurde und diese für 10 min bei RT inkubiert wurden. Anschließend wurden die Objektträger mit 1 ml ddH<sub>2</sub>O gewaschen und anschließend gut bei RT getrocknet. Alle weiteren Schritte erfolgten in einer feuchten Kammer. Hierzu wurden Metallboxen mit feuchten Tüchern ausgelegt und anschließend mit einem Deckel verschlossen. 20 µl der Zellsuspension wurden in je eine Vertiefung der Objektträger gegeben und für 10 min bei RT inkubiert. Der Überstand wurde mit einer gelben Pipette entfernt und die Zellen mit PBS (8 g NaCl; 0,2 g KCl; 1,44 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,24 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 7,4 in 1 l ddH<sub>2</sub>O); 1 % BSA und 0,5 % Tween 20 (Blockierungslösung) für mindestens eine Stunde bei RT blockiert. Die Inkubation mit dem ersten AK erfolgte in der Blockierungslösung über Nacht bei 4 °C. Die Verdünnung richtete sich nach dem verwendeten AK. Anschließend erfolgte ein viermaliges Waschen für jeweils mindestens 5 min mit der Blockierungslösung. Durch längere Inkubationszeiten kann der Hintergrund verringert werden. Die Inkubation mit dem sekundären AK, resuspendiert in der Blockierungslösung, erfolgte für 1-2 Stunden bei RT. Durch erneutes viermaliges Waschen mit der Blockierungslösung wurde der nichtgebundene AK aus den Zellen ausgewaschen. Falls gewünscht erfolgte eine 10-minütige Inkubation der Zellen mit 1 µg/ml DAPI in PBS mit anschließendem viermaligen Waschen in PBS. Um ein Ausbleichen der Zellen zu verhindern, wurden sie auf den Objektträgern getrocknet und anschließend mit „Anti fade“

bedeckt. Zuletzt wurden die Zellen mit einem Deckglas abgedeckt, welches mit Nagellack versiegelt wurde.

Die Mikroskopiebilder wurden als Tif-Dateien abgespeichert und anschließend in Adobe Photoshop importiert und dort coloriert. Daraufhin wurden die Bilder in eine Power Point Datei eingebunden und unspezifische Hintergrundsignale wurden über die Veränderung der Kontraste sowie der Helligkeit der Bilder minimiert.

### **2.11.3.5 Bestimmung des Knospungsmusters von Hefen**

Haploide Hefezellen zeigen normalerweise ein bipolares Knospungsmuster (s. Kapitel 1.2.2), welches sich zu einem unipolaren verändert, wenn die Zellen beginnen, pseudohyphal zu wachsen. Um das Knospungsmuster von Hefezellen zu bestimmen, kann man die Zellwände mit dem Chitin-spezifischen Farbstoff Calcofluor White anfärben und so die Knospungsnarben sichtbar machen. Hierzu wurden haploide Hefezellen auf YPD<sup>+</sup>-Platten, denen 50 µg/ml 5' Formyltetrahydrofolat zugesetzt wurde, angezogen und ca. 50.000 Zellen wurden in 1 ml einfach PBS resuspendiert und mit Calcofluor White (4 µg/ml) angefärbt. Anschließend wurden die Zellen auf Polylysin-beschichtete Objektträger gegeben und mit einem Zeiss Axioskop-Mikroskop ausgewertet. Zellen, die insgesamt zwei oder mehr Knospungsnarben trugen, wurden wie folgt klassifiziert: unipolar (alle Knospungsnarben befinden sich an einem Ende der Zelle), bipolar (die Knospungsnarben befinden sich an beiden Polen der Zelle) und zufällig (die Knospungsnarben befinden sich nicht ausschließlich an den Zellpolen, sondern sind auch zufällig über die Zelloberfläche verteilt). Mindestens 100 Zellen wurden ausgewertet.

### **2.11.3.6 Serielle Tropftests**

Bei der Durchführung serieller Tropftests wurden jeweils 10.000, 1.000, 100 und 10 Zellen eines zu untersuchenden Stammes auf entsprechende feste Nährböden getropft. Die Stämme wurden hierzu über Nacht in Flüssigmedium angezogen.

### **2.11.3.7 Bestimmung der genetischen Stabilität**

Für alle Organismen ist es wichtig, dass die DNA während der Mitose korrekt auf die Mutter und die Tochterzelle verteilt wird. Um Gene zu identifizieren, die für die genetische Stabilität benötigt werden, kann man die Verlustrate von Zentromer- (*CEN*-) Plasmiden, artifiziellen Chromosomenfragmenten (CF) oder endogenen Chromosomen bestimmen. *CEN*-Plasmide zeigen die geringste genetische Stabilität mit einer Verlustrate von  $10^{-2}$  bis  $10^{-3}$ . CF zeigen im Gegensatz zu endogenen Chromosomen ebenfalls eine erhöhte Verlustrate mit  $10^{-3}$  bis  $10^{-4}$ .



Sie werden aufgrund der zusätzlich zum Zentromer enthaltenen Telomere allerdings stabiler vererbt, als *CEN*-Plasmide. Endogene Chromosomen zeigen die höchste genetische Stabilität bei einer Verlustrate von ca.  $10^{-5}$ .

### **2.11.3.7.1 Bestimmung der genetischen Stabilität mit Hilfe des *ade2-101/SUP11*-Systems (Rot/Weiß-Selektion)**

Die Bestimmung der genetischen Stabilität mit Hilfe des Rot/Weiß-Systems beruht auf *SUP11*-tragenden Chromosomenfragmentierungsvektoren, die von dem Vektor pKE6 abstammen (Jehn, et al., 1991). Diese Vektoren werden verwendet, um in Hefestämmen, welche das *ade2-101*-Allel tragen, Chromosomenfragmente (CF) zu etablieren. In diesen Stämmen trägt das defekte *ade2*-Gen ein ochre-Stoppkodon an Position 101 (Hieter, et al., 1985). Diese Mutation führt dazu, dass sich in den Hefezellen ein Stoffwechselprodukt der Adeninbiosynthese ansammelt, welches durch die Oxidation mit dem Luftsauerstoff rot wird. Das auf dem CF liegende *SUP11*-Gen kodiert für eine Suppressor-tRNA, die in der Zelle zur Überschreibung des Stoppkodons führt und damit eine Anhäufung des roten Stoffwechselproduktes verhindert. Während haploide Zellen, die ein CF tragen, weiße und ohne CF rote Kolonien bilden, sind Kolonien aus diploiden Zellen, die nur ein CF tragen, rosa. Erst bei Anwesenheit von zwei CF und damit 2 Kopien von *SUP11* erscheinen auch diploide Zellen weiß, während Zellen ohne CF wie im haploiden Stamm rot sind.

Um die Verlustrate einer Mutante zu bestimmen, wurden die zu untersuchenden Hefestämme über Nacht in Selektivmedium angezogen und jeweils ca. 200 Zellen auf Vollmedium ausplattiert. Der Nachweis des Verlustes erfolgt über die Färbung der Kolonien. Verliert eine Hefezelle in der Kolonie das CF, entsteht durch die folgenden Zellteilungen ein roter Sektor in einer rosa (diploide Zellen) (1:0-Segregation) oder weißen (haploide Zellen) Kolonie. Ebenso führt die Fehlverteilung von zwei CF in einer diploiden Hefezelle zu weißen und roten Sektoren (2:0-Segregation) in einer rosa Kolonie. Je früher das Verlustereignis stattfindet, desto größer sind die zu beobachtenden Sektoren. Über die Anzahl an halbsektorierten Kolonien erfolgt die Berechnung der Verlustfrequenz, da nur in halbsektorierten Kolonien das Verlustereignis bei der ersten Zellteilung stattfand.

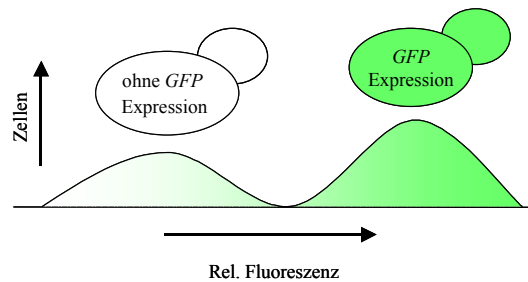
### **2.11.3.7.2 Bestimmung der genetischen Stabilität mittels FACS-Analyse**

Mit Hilfe des FACS kann die genetische Stabilität von Hefezellen quantitativ bestimmt werden. Zum einen kann die Verlustrate von GFP-exprimierenden *CEN*-Plasmiden, zum anderen die von GFP-exprimierenden Chromosomenfragmenten (CF) in Hefestämmen

bestimmt werden. Zellen, die GFP exprimieren, können durch Anregung der Fluoreszenz, welche mit einem Laser bei 488 nm erfolgt, im FACS von Zellen, die kein GFP exprimieren unterschieden werden, da sie eine stärkere Fluoreszenz zeigen, als Zellen, die kein GFP exprimieren und somit das *CEN*-Plasmid oder CF verloren haben (Abbildung 11).

Da die Regulation der GFP-Expression durch den *MET25*-Promotor erfolgt, wurden die Hefezellen für die Bestimmung der Verlustrate

über Nacht in Selektivmedium ohne Methionin bei 30 °C angezogen und morgens in 5 ml frisches Medium auf eine  $OD_{600} = 0,1$  überimpft. Die Zellen wurden bis zu einer  $OD_{600} = 0,5-0,6$  bei 30 °C angezogen und für die Messung auf eine  $OD_{600} = 0,06$  in 1 ml 10 mM Tris/HCl, pH 5,0 verdünnt. Gezählt wurden jeweils 10.000 Zellen. Die Anzahl der Zellen, die keine Fluoreszenz mehr zeigten im Verhältnis zur Anzahl der Zellen, die Fluoreszenz zeigten, ist ein quantitatives Maß für die Verlustrate des *CEN*-Plasmids oder des CF. Alle Messungen wurden von Irina Volfson am FACSsort der Firma Becton Dickinson durchgeführt.

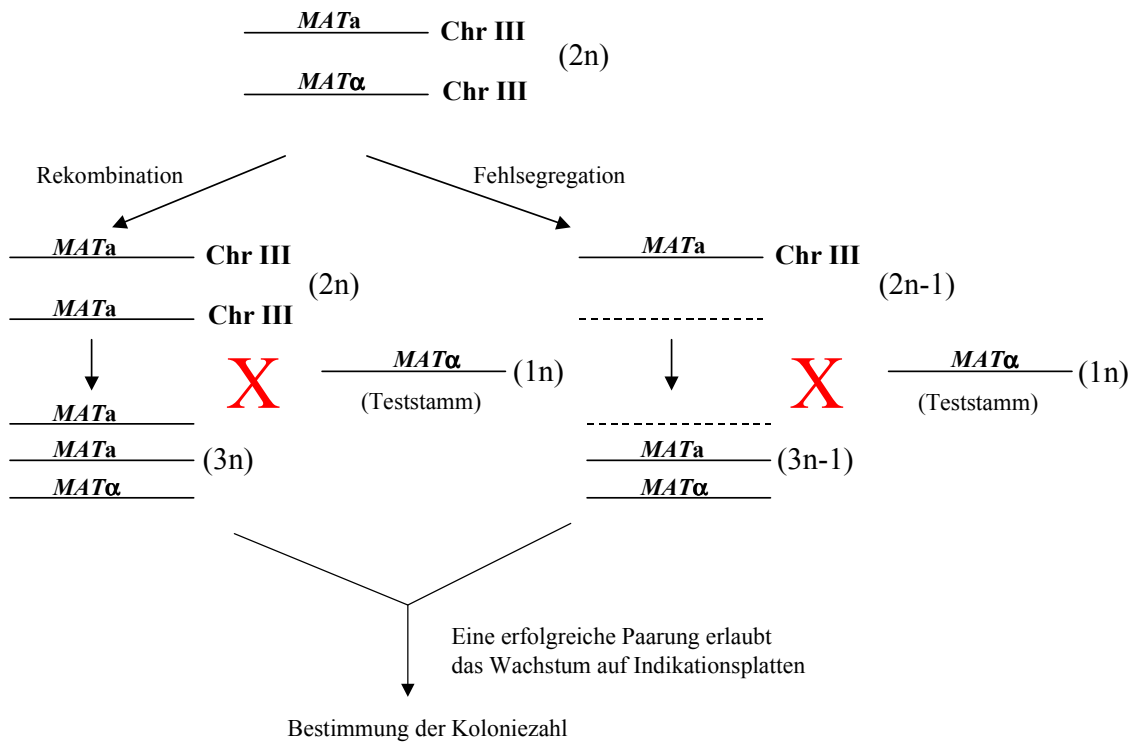


**Abbildung 11: Schema einer FACS-Messung**

Mit Hilfe der FACS-Analyse kann die relative Fluoreszenz von Hefezellen bestimmt werden. Zellen, die GFP exprimieren, erscheinen bei einer höheren Fluoreszenz als Zellen, die kein GFP exprimieren. Aufgetragen wird die Zellzahl gegen die relative Fluoreszenz.

### 2.11.3.7.3 Bestimmung der Verlustrate von Chromosom III (Quantitativer Paarungsversuch)

Um die Verlustrate endogener Chromosomen zu bestimmen, kann man unter anderem den Verlust von Chromosom III bestimmen. Hierzu wurde ein verändertes Protokoll nach (Spencer, et al., 1990) verwendet. Auf Chromosom III der Hefe liegt die kodierende Sequenz für den Paarungstyp der Hefe, der *MAT*-Lokus. Während haploide Hefen entweder *MAT $\alpha$*  oder *MAT $\alpha$*  sind, exprimieren diploide Hefen beide Loci und sind daher *MAT $\alpha/\alpha$* . Diploide Stämme können im Gegensatz zu haploiden Hefen, die mit dem jeweils entgegengesetzten Paarungstyp paaren können, nicht mehr paaren. Der Verlust eines der beiden Chromosome III in einem diploiden Hefestamm führt zur Aneuploidie ( $2n-1$ ) und damit zum Verlust eines der beiden *MAT*-Allele, die den Paarungstyp in den diploiden Stämmen determinieren. Hierdurch kommt es zur Expression haploid-spezifischer Gene und die Hefezelle kann nun mit einer anderen Hefezelle des gegengesetzten Paarungstyp paaren, obwohl alle anderen Chromosomen in zweifacher Ausführung vorliegen. Aus einer solchen Paarung entstehen Hefezellen mit dem Genotyp  $3n-1$  (Abbildung 12). Auch Zellen, die durch ein



**Abbildung 12: Chromosom III Verlustanalyse**

Ein diploider Hefestamm wird mit einem haploiden Hefestamm (Teststamm) gekreuzt. Kommt es zu einer Rekombination am *MAT*-Lokus oder zu einem Verlust von einem Chromosom III, welches für denselben Paarungstyp kodiert wie der Teststamm, kann der diploide Ausgangsstamm mit dem Teststamm paaren. Zellen, die miteinander gepaart haben, können auf Indikationsplatten zu Kolonien hochwachsen. Verändert nach (Gerring, et al., 1990).

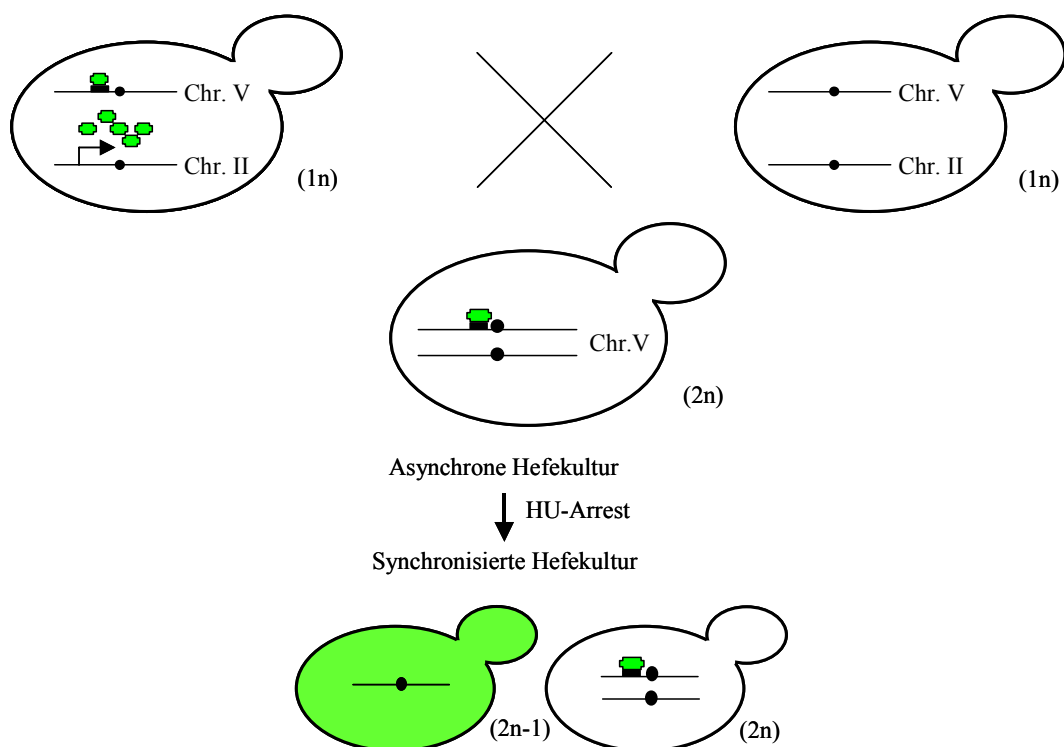
Rekombinationsereignis am *MAT*-Lokus auf beiden Chromosomen denselben *MAT*-Lokus exprimieren, können paaren, wodurch Hefezellen mit dem Genotyp 3n entstehen (Abbildung 12).

Zur Bestimmung der Verlustrate von Chromosom III wurden diploide Wildtyp- oder *IML3*-Deletions-Hefestämme und ein haploider Hefestamm zur Überprüfung der Paarungsfähigkeit der diploiden Hefestämme über Nacht in YPD<sup>+</sup>-Medium bei 30 °C angezogen (OD<sub>600</sub> ~ 1). Nach Bestimmung der Zellzahl wurden 2.000.000 Zellen des haploiden Hefestammes und 500.000 Zellen der diploiden Stämme den Kulturen entnommen, miteinander vermischt, abzentrifugiert und anschließend in 10 µl 75 % YPD aufgenommen und gut resuspendiert. Danach wurden die Zellen für 6 Stunden bei 24 °C stehend inkubiert und anschließend auf SC-Platten ohne Aminosäuren und Basen getropft. Auf diesen Platten können nur die Zellen zu Kolonien heranwachsen, die zuvor gepaart haben.

### 2.11.3.7.4 Bestimmung der Verlustrate von Chromosom V

Eine weitere Möglichkeit, die Verlustrate eines endogenen Chromosoms zu bestimmen, ist die GFP-Markierung eines Chromosoms. Verwendet wurde hierfür ein haploider Hefestamm von Kim Nasmyth, in dem dreimal 112 Wiederholungen des *tetO*-Operators am chromosomalen *URA3*-Lokus, auf dem linken Arm von Chromosom V, 35 kbp vom Zentromer entfernt, integriert worden waren. Zusätzlich war ein GFP-markierter tet Repressor (*tetR-GFP*), welcher an die Operatorsequenzen binden kann, in den *LEU2*-Lokus auf Chromosom II integriert worden (Michaelis, et al., 1997). Durch die Bindung des GFP-markierten tet Repressors an die Operatorsequenzen kommt es zu einer punktförmigen GFP-Markierung von Chromosom V. Der Verlust des GFP-markierten Chromosom V führt zu einer Expression des GFP im gesamten Cytoplasma, während durch den Verlust von Chromosom II keine grüne Fluoreszenz mehr beobachtbar ist (Abbildung 13).

Um die Verlustrate eines Chromosoms zu bestimmen werden diploide Stämme benötigt, da



- tetR-GFP = GFP-konjugierter tetO-Repressor
- *CEN* = Zentromer
- tetO = Bindestelle für tetR-GFP; zentromergekoppelt

**Abbildung 13: Chromosom V Verlustanalyse**

Über Kreuzung wurde ein diploider Hefestamm konstruiert, in dem auf einem der beiden Chromosome V eine zentromergekoppelte Bindestelle für den tetO-Repressor vorlag. Auf einem der beiden Chromosome II wurde zudem ein GFP-konjugierter tetO-Repressor kodiert. Dieser Repressor bindet an die tetO-Bindestelle, wodurch das Chromosom V GFP-markiert wird und als grüner Punkt im Zellkern sichtbar wird. Zellen, in denen es zu einer Missegregation von Chromosom V gekommen ist, zeigen kein punktförmiges GFP-Signal. Das Cytoplasma ist grün angefärbt.

HU = Hydroxyharnstoff

der Verlust eines Chromosoms in einem haploiden Hefestamm letal ist. Hierzu wurden durch Kreuzung diploide Hefestämme konstruiert, die auf einem Chromosom V die *tetO*-Operatorsequenz tragen, auf dem anderen Chromosom V jedoch nicht. Für die Bestimmung der Verlustrate von Chromosom V wurden diploide Wildtyp- und *iml3Δ*-Zellen über Nacht in YPD<sup>+</sup>-Medium bei 30 °C angezogen und morgens in 5 ml frisches YPD-Medium auf eine OD<sub>600</sub> von 0,2 umgeimpft. Die Zellen wurden bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5-0,6 bei 30 °C angezogen und anschließend mit 38 mg/5 ml Hydroxyharnstoff (HU) für 2 h bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 3 min bei 3000 UpM (Heraeus Megafuge 1.0 R) abzentrifugiert und in 5 ml frischem YPD<sup>+</sup> aufgenommen. Nach 68 min Inkubation bei 30 °C wurden die Zellen mit Paraformaldehyd (3,7 % (PFA; 37 % Stocklösung in ddH<sub>2</sub>O)) für 30 min bei 30 °C fixiert und anschließend einmal in einfach PBS (8 g NaCl; 0,2 g KCl; 1,44 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,24 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 7,4 in 1 l ddH<sub>2</sub>O) gewaschen. Die Zellen wurden anschließend auf Polylysin beschichtete Objektträger gegeben und mit DAPI für 5 min inkubiert. Nach zweimaligem Waschen wurden die Zellen mit „Antifade“ überschichtet, mit Deckgläschen abgedeckt und anschließend mit Nagellack versiegelt.

### 2.11.3.8 DNA-Profil-Erstellung

Mit Hilfe der FACS-Analyse kann man ein DNA-Profil von Zellen aufnehmen. Hierzu werden die Zellen mit Propidiumjodid behandelt, welches in die DNA interkaliert. Die gemessene Fluoreszenzintensität zeigt, welche der Zellen sich in der G1-Phase (1C-DNA-Gehalt), der DNA-Synthesephase (Tal zwischen den beiden „Peaks“) und der G2/M-Phase (2C-DNA-Gehalt) befinden. Veränderungen der prozentualen Anteile der Zellen in diesen Phasen durch die Einführung von Mutationen oder Deletionen können im FACS identifiziert und quantifiziert werden.

Für die FACS-Analyse wurden Zellen im gewünschten Medium über Nacht angezogen und anschließend in 5 ml frisches Medium auf eine OD<sub>600</sub> = 0,1 überimpft. Die Zellen wurden bis zu einer OD<sub>600</sub> = 0,5-0,6 bei 30 °C inkubiert. 1 ml dieser Kulturen wurde bei 8000 UpM (Heraeus Biofuge pico) für 5 min abzentrifugiert und anschließend wurden die Zellen einmal in 1 ml 0,2 M Tris/HCl, pH 7,5 gewaschen. Die Fixierung der Zellen erfolgte in 1 ml 70 % Ethanol/0,2 M Tris/HCl, pH 7,5 für mindestens 4 Stunden bei 4 °C. Anschließend wurden die Zellen einmal in 1 ml 0,2 M Tris/HCl, pH 7,5 gewaschen und dann in 1 ml 0,2 M Tris/HCl, pH 7,5 aufgenommen. 100 µl der Zellsuspension (ca. 10<sup>6</sup> Zellen) wurden für 5 min im Wasserbad sonifiziert und danach mit 100 µg RNase (Stocklösung: 25 mg/ml) für mindestens 2 Stunden bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von 1 ml 0,2 M Tris/HCl, pH 7,5 wurden die Zellen abzentrifugiert und anschließend in 1 ml 0,2 M Tris/HCl, pH 7,5 mit 50 µg/ml

## Material und Methoden

---

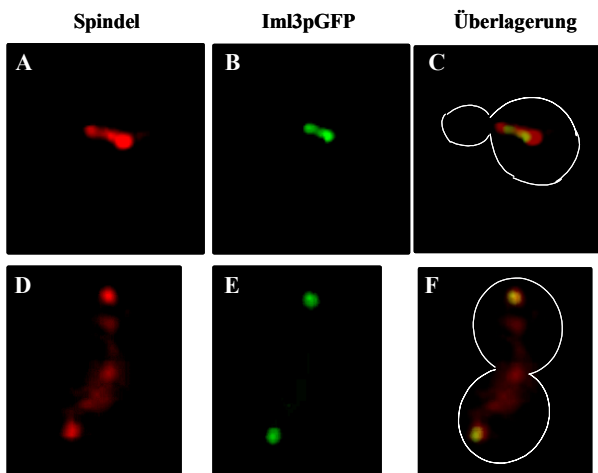
Propidiumjodid aufgenommen und im FACS quantifiziert, indem der DNA-Gehalt von 10.000 Zellen bestimmt wurde. Alle Messungen wurden von Irina Volfson am FACSsort der Firma Becton Dickinson durchgeführt.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Untersuchung struktureller Komponenten des Kinetochors

##### 3.1.1 Lokalisierung der Proteine Iml3p und Ame1p

Iml3p ist ein nicht-essentielles Protein der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, das keine signifikanten Homologien zu anderen Proteinen aufweist. Ein Verlust der Genfunktion von *IML3* führt zu genetischer Instabilität in den betreffenden Zellen (Entian, et al., 1999;



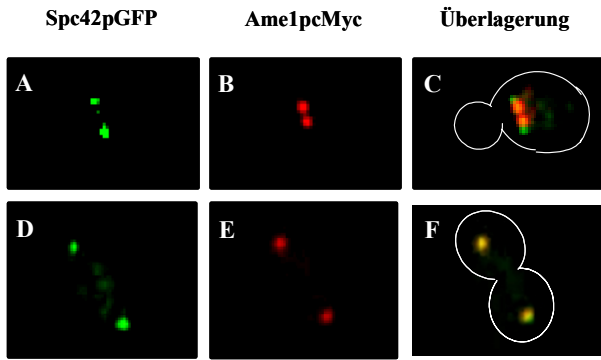
**Abbildung 14: Iml3p lokalisiert am Kinetochor**

Iml3p wurde C-terminal mit GFP markiert und die relative Lokalisation zur mitotischen Spindel wurde über Immunofluoreszenz nachgewiesen. A, B, C) zeigen dieselbe Metaphasezelle mit kurzer Spindel, D, E, F) eine Zelle in der späten Anaphase mit langer Spindel. A und D) zeigen die Spindel, B und E) die Iml3pGFP-Signale und in C und F) wurden die Signale übereinandergelegt. Iml3pGFP wurde grün eingefärbt, die Spindel rot und überlagernde Signale erscheinen gelb.

Güldener, 2000; Köhler, 2000). Ame1p ist ein essentielles Protein der Hefe *S. cerevisiae*, dessen Funktion ebenfalls für die korrekter Verteilung der Chromosomen benötigt wird (Güldener, 2000).

Zur weiteren funktionellen Charakterisierung der Proteine sollte daher mittels indirekter Immunfluoreszenz die Lokalisierung eines endogen C-terminal GFP-markierten Iml3-Proteins in Relation zur mitotischen Teilungsspindel (Abbildung 14) sowie die Lokalisation eines endogen C-terminal cMyc-markierten Ame1-Proteins (Abbildung 15 B und E) relativ zur Lokalisierung des C-terminal GFP-markierten Spindelpolkörperproteins Spc42p (Abbildung 15 A und D) bestimmt werden. Beide Proteine waren auch nach der Epitopmarkierung funktionell.

Iml3pGFP zeigt sowohl in der Metaphasezelle als auch in der Anaphasezelle zwei Signale (Abbildung 14B und E). In Metaphasezellen mit kurzen Spindeln lokalisiert Iml3pGFP auf der Spindel zwischen den Spindelpolkörpern (SPB) am Ende der Spindel, die aufgrund der



**Abbildung 15 Ko-Lokalisation von Spc42p und Ame1p**

Mittels Immunofluoreszenz wurde die Lokalisation von Ame1p in Hefezellen, in denen das Spindelpolprotein Spc42p C-terminal mit GFP und Ame1p C-terminal mit cMyc markiert wurden, nachgewiesen. A, B, C) zeigen dieselbe Metaphasezellen, D, E, F) eine Zelle in der späten Anaphase. A und D) zeigen die Spc42pGFP-Signale, B und E) die Ame1pcMyc-Signale und in C und F) wurden die Signale übereinandergelegt. Spc42pGFP wurde grün eingefärbt, die Ame1pcMyc rot und überlagernde Signale erscheinen gelb.

Verdichtung des Tubulins stärker gefärbt werden als die restliche Spindel (Abbildung 14C). In Zellen mit langer Spindel kolokalisiert Iml3pGFP mit den SPB am Ende der Spindel (Abbildung 14F). Während des gesamten Zellzyklus mit Ausnahme der Metaphase und zu Beginn der Anaphase liegen die Kinetochore mit den SPB assoziiert vor. Während der Metaphase und zu Beginn der Anaphase, d. h. in Zellen mit kurzer Spindel, sind die Kinetochore in der Mitte der Spindel lokalisiert (Goh and Kilmartin, 1993; Guacci, et al., 1997; Jin,

et al., 2000). Die Lokalisierung des Iml3-Proteins ist demnach konsistent mit der eines Kinetochorproteins. Eine Lokalisierung am SPB kann ausgeschlossen werden.

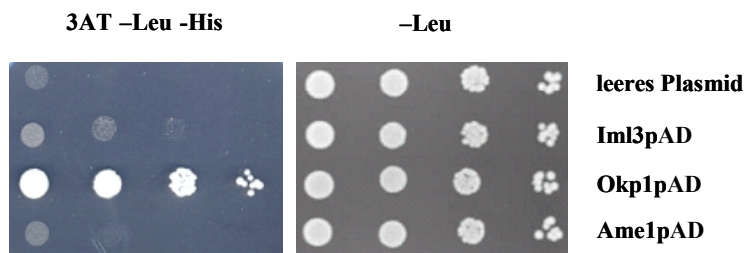
Das Signal von Ame1p lag in Metaphasezellen zwischen den Signalen des SPB-Proteins (Abbildung 15 C), während es in Anaphasezellen mit dem SPB-Protein kolokalisierte (Abbildung 15 F). Auch die Lokalisation von Ame1p ist konsistent für die eines Kinetochorproteins, so dass eine Lokalisation am SPB ausgeschlossen werden kann.

### 3.1.2 Ame1p und Iml3p verhalten sich unterschiedlich in einer *CEN*-DNA-basierten Ein-Hybrid-Analyse

Nachdem gezeigt werden konnte, dass Iml3p und Ame1p eine für Kinetochorproteine typische subzelluläre Lokalisierung zeigen, stellte sich die Frage, ob und gegebenenfalls wie stark sie mit dem Kinetochor interagieren. Hierzu wurde eine Ein-Hybrid-Analyse durchgeführt. Die zu untersuchenden Proteine wurden an die Gal4p Aktivator-domäne (AD) fusioniert. Als Reporter wurde *HIS3* verwendet, welches direkt neben der *CEN*-DNA auf Chromosom III integriert worden war (Ortiz, et al., 1999). Als Kontrolle diente das Kinetochorprotein Okp1p, welches fusioniert an die AD stark mit dem Kinetochor interagiert und die *HIS3*-Transkription aktiviert (Ortiz, et al., 1999), obwohl es wahrscheinlich nicht direkt mit der *CEN*-DNA assoziiert (De Wulf, et al., 2003). In seriellen Tropftests zeigten Hefezellen, die Okp1pAD exprimierten, starkes Wachstum auf 3AT-haltigen Medien, (Abbildung 16, Okp1pAD), während Zellen, die mit dem AD-exprimierenden Kontrollplasmid transformiert wurden, kein Wachstum auf diesen Medien aufwiesen



(Abbildung 16, leerer Vektor). Zellen, in denen Iml3p fusioniert an die AD exprimiert wurde,



**Abbildung 16: Ein-Hybrid-Analyse**

Hefezellen wurden über Nacht bei 30 °C in Leucin-freiem Medium angezogen, um auf die enthaltenen Plasmide zu selektionieren. Jeweils 10, 100, 1.000 und 10.000 Zellen wurden auf Leucin freie Platten (-Leu) und auf 5 mM 3-Aminotriazol-haltige (3AT), Leucin- und Histidin-freie (3AT -Leu -His) Platten getropft und für 3 Tage (-Leu) bzw. 4 Tage (3AT -Leu -His) bei 28 °C inkubiert.

leeres Plasmid: Zellen, in denen nur die Gal4p Aktivierungsdomäne (AD) exprimiert wird,

Iml3pAD, Okp1pAD, Ame1pAD: Zellen, in denen Iml3p, Okp1p oder Ame1p fusioniert an die AD exprimiert wird.

Reporterproteins hervorruft und somit eine Affinität zum Kinetochorkomplex aufweist. Aufgrund der beobachteten schwachen Aktivierung handelt es sich wahrscheinlich nicht um eine direkte Bindung an die *CEN*-DNA.

Zellen, in denen Ame1p fusioniert an die AD exprimiert wurde, zeigten kein Wachstum auf den 3AT-Indikatorplatten (Abbildung 16, Ame1pAD). Es kommt somit zu keiner Aktivierung des Reporterproteins, was zeigt, dass die an Ame1p fusionierte AD nicht mit der DNA interagieren kann. Die erhaltenen Daten zeigen, dass die an Iml3p fusionierte AD die Expression des Reporters besser aktivieren kann, als die an Ame1p fusionierte AD.

### 3.1.3 Untersuchungen zu Iml3p

#### 3.1.3.1 Ein Ausfall von Iml3p verschlechtert nicht die Präzision der Verteilung endogener Chromosomen

Der Verlust von Iml3p führt zu einer erhöhten genetischen Instabilität zusätzlicher artifizierender zirkulärer wie linearer Chromosomen (Entian, et al., 1999; Güldener, 2000). Unklar war, ob sich der Ausfall von Iml3p auch nachweislich auf die Verteilung endogener Chromosomen auswirkt. Hierzu wurde die genetische Stabilität von Chromosom III und von Chromosom V in *iml3Δ*-Stämmen bestimmt.

Um die Stabilität von Chromosom III zu bestimmen, wurde ein quantitativer Paarungsversuch mit diploiden Hefestämmen durchgeführt. Diploide Zellen, die aufgrund eines Verlustereignisses nur noch eines der beiden Allele von Chromosom III tragen oder bei denen durch ein Rekombinationsereignis im *MAT*-Lokus beide Kopien von Chromosom III denselben *MAT*-Lokus exprimieren, können mit haploiden Zellen des entgegengesetzten Paarungstyp paaren und darauffolgend detektiert werden (Details in Kapitel 2.11.3.7.3). Nach

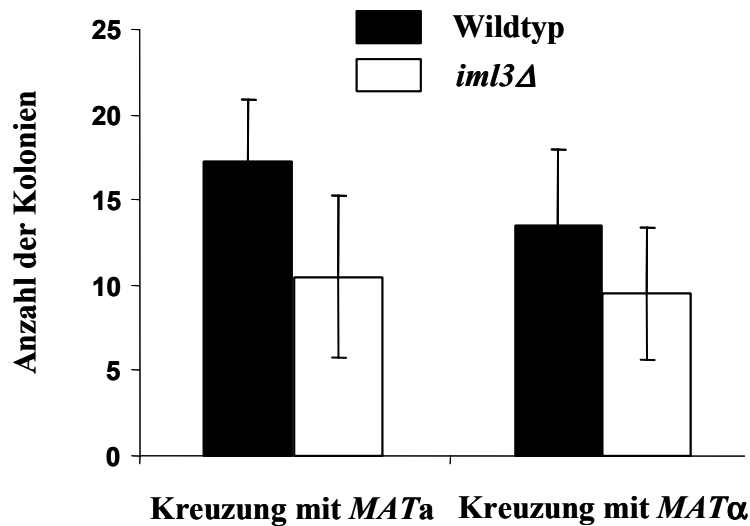


Abbildung 17: Verlustrate von Chromosom III

Diploide Wildtyp und *iml3Δ*-Zellen sowie haploide Zellen eines *MATa*- und eines *MATα*-Stammes wurden über Nacht in YPD-Medium angezogen. Jeweils 500.000 Zellen der diploiden Hefestämme wurden mit 2.000.000 Zellen des *MATa*- oder des *MATα*-Stammes für 8 Stunden bei 24 °C in 10 µl 75 % YPD inkubiert und anschließend auf SD-Platten ohne Aminosäuren aufgetropft. Diese erlauben es nur Zellen zu Kolonien heranzuwachsen, die zuvor gepaart haben. Bestimmt wurde die Anzahl der Kolonien pro Kreuzung. Ausgewertet wurden mindestens 5 unabhängige Experimente. Die Standardabweichung wird durch die Striche innerhalb der Säulen dargestellt.

Verlustfrequenz von  $1,9 \times 10^{-5}$  entspricht (Abbildung 17). Dies zeigt, dass die Verlustfrequenz in der *iml3Δ*-Mutante tendenziell geringer war als im Wildtyp. Die Unterschiede sind aufgrund der hohen überlappenden Standardabweichung allerdings nicht signifikant. Ein ähnliches Ergebnis zeigte sich auch nach einem Paarungsversuch mit einem haploiden *MATα*-Hefestamm. Auch hier war zu beobachten, dass beim Wildtyp tendenziell mehr Kolonien heranwuchsen (17,25; Verlustfrequenz:  $3,5 \times 10^{-5}$ ) als in der *iml3Δ*-Mutante (10,5; Verlustfrequenz:  $2,1 \times 10^{-5}$ ) (Abbildung 17). Dies ist ein Hinweis darauf, dass Iml3p unter diesen experimentellen Bedingungen nicht für die Verteilung endogener Chromosomen benötigt wird.

Um weiterhin zu überprüfen, ob auch die genetische Stabilität anderer endogener Chromosomen unabhängig von Iml3p vermittelt wird, sollte in einem zweiten genetischen Ansatz die Iml3p-abhängige genetische Stabilität von Chromosom V untersucht werden. Dies erfolgte in einem diploiden Hefestamm unter Verwendung von GFP als Marker für den Verlust von Chromosom V (s. Kapitel 2.11.3.7.4). In den diploiden Wildtyp- und *iml3Δ*-Hefestämmen war je ein Chromosom V mit GFP markiert. Nach einem Hydroxyharnstoff-(HU-) Arrest, bei dem ca. 95 % der Zellen mit großen Knospen in der S-Phase arretiert vorlagen, wurden die Zellen in frisches Medium überführt und die jetzt erfolgende Zellteilung anhand der DNA- und GFP-Signal-Verteilung nach dem Arrest verfolgt. Die Wildtyp-Zellen konnten schneller wieder in den Zellzyklus eintreten als die *iml3Δ*-Mutanten-Zellen, da

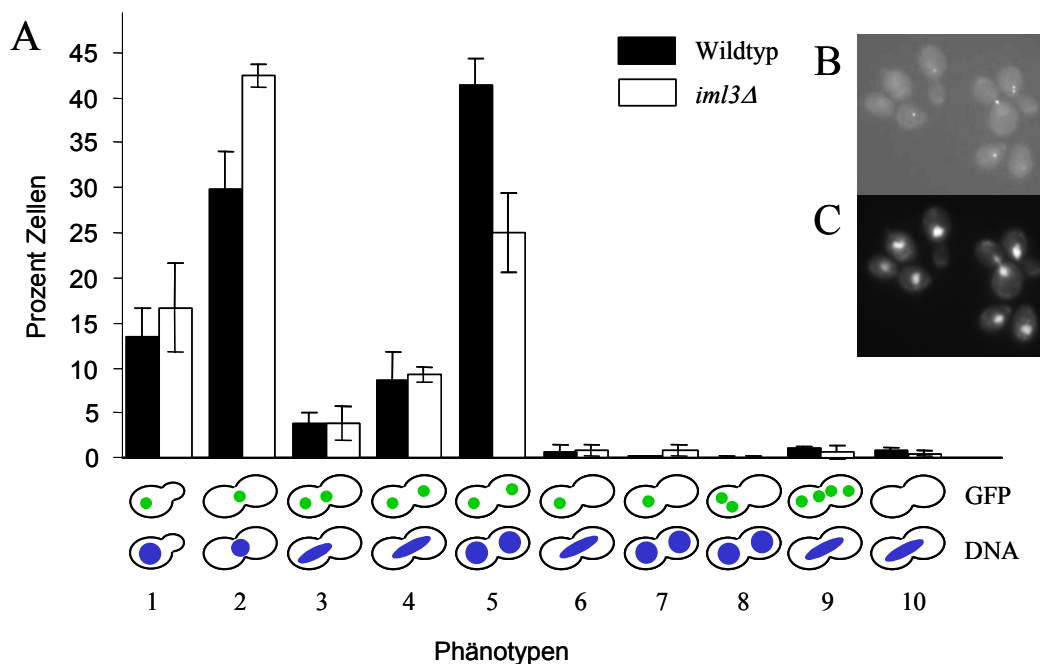
der Paarung mit einem haploiden *MATa*-Hefestamm wuchsen beim Wildtyp im Durchschnitt 13,5 Zellen der 500.000 zur Paarung eingesetzten Zellen auf entsprechenden Medien zu Kolonien heran. Dies entspricht einer Verlustfrequenz von  $2,7 \times 10^{-5}$  für Chromosom III im Wildtyp.

Bei der *iml3Δ*-Mutante wuchsen durchschnittlich 9,5 der zur Paarung eingesetzten Zellen zu Kolonien heran, was einer

## Ergebnisse

67 min nach Beendigung des HU-Arrestes nur noch ca. 29 % der Wildtypzellen Mutterzellen mit großen Knospen, nichtverteilter DNA oder gerade begonnener DNA-Verteilung und einem grünen Punkt am Knospenhals vorlagen, während derselbe Phänotyp in der *iml3Δ*-Mutante mit ca. 43 % wesentlich häufiger auftrat (Abbildung 18A, Reihe 2).

Im weiteren Verlauf der Mitose werden die Chromosomen mit Hilfe der Spindeln sowohl in die Mutterzelle als auch in die Tochterzelle der Hefe gezogen. Solange noch keine vollständige Verteilung der Chromosomen stattgefunden hat, kann man eine DNA-Masse, die immer weiter in die Tochterzelle einwandert, beobachten. Die Kinetochore befinden sich an den Enden der DNA-Masse und man erkennt an jedem Ende je einen GFP-Punkt. Die Anzahl der Zellen in der frühen Anaphase, in denen das Chromosom V gerade in die Tochterzelle hineingezogen wird, unterschied sich im Wildtyp und in der *iml3Δ*-Mutante mit ca. 3 % nicht (Abbildung 18A, Reihe 3). Ebenso befanden sich mit ca. 9 % der Zellen für den Wildtyp wie auch für die *iml3Δ*-Mutante ähnlich viele Zellen in der späten Anaphase, in dem die Kinetochore bereits separiert, die DNA aber noch nicht vollständig aufgetrennt war (Abbildung 18A, Reihe 4). Ein Unterschied wurde erst wieder in der Telophase deutlich.



**Abbildung 18: Bestimmung der Verlustrate von Chromosom V**

Diploide Wildtyp-(wt) und *iml3Δ*-Stämme, in denen je ein Chromosom V mit GFP markiert wurde, wurden in YPD-Medium angezogen. Zu logarithmisch wachsenden Kulturen wurde für 2 Stunden bei 30 °C 7,6 µg/ml HU (Hydroxyharnstoff) gegeben, um die Zellen in der S-Phase zu arretieren. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert und in frisches YPD Medium überführt. Nach 67 min wurden die Zellen fixiert, die DNA mit DAPI markiert und anschließend mikroskopisch analysiert. Es wurden 4 unabhängige Experimente ausgewertet. Die Standardabweichung wird durch die Striche innerhalb der Säulen dargestellt.

A) Quantitative graphische Darstellung der Phänotypen

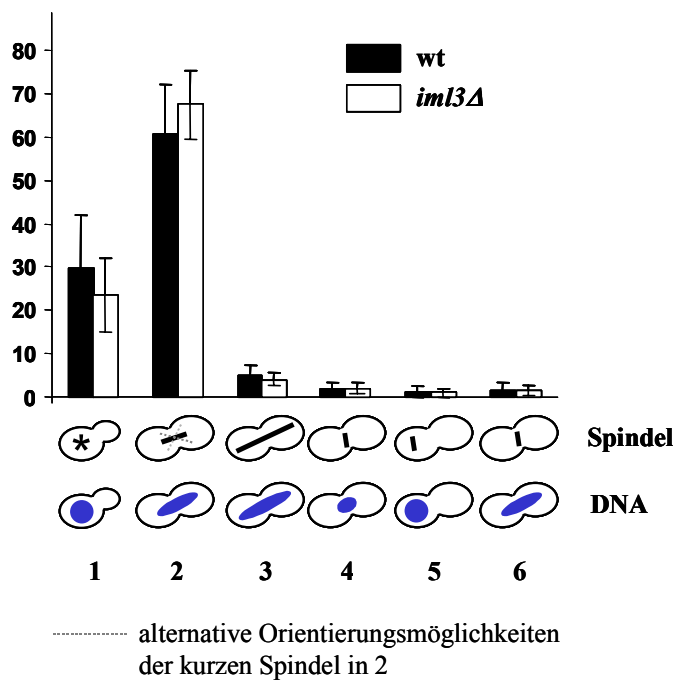
B) Mikroskopisches Bild der GFP-Verteilung in Zellen in verschiedenen Stadien des Zellzyklus.

C) Mikroskopisches Bild der DAPI-Verteilung der Zellen aus B.

Während im Wildtyp bereits ca. 43 % der Zellen die Anaphase beendet hatten und getrennte DNA-Massen mit je einem GFP-Punkt in der Mutter- und Tochterzelle vorlagen, hatten erst ca. 25 % der *iml3Δ*-Mutanten-Zellen die Anaphase beendet (Abbildung 18A, Reihe 5). Diese Verzögerung der *iml3Δ*-Zellen wird vor der nächsten G1/S-Phase scheinbar wieder aufgeholt, da sowohl im Wildtyp als auch in der *iml3Δ*-Mutante zwischen 13 und 17 % der Zellen den Zellzyklus beendet hatten und bereits eine neue Knospe ausbildeten (Abbildung 18A, Reihe 1). Die Lokalisierung von Chromosom V war in diesen Phasen des Zellzyklus sowohl in der *iml3Δ*-Mutante als auch im Wildtyp gleich. In der *iml3Δ*-Mutante konnte keine erhöhte Verlustrate oder eine andere Fehlverteilung von Chromosom V beobachtet werden. Die Anzahl an teilenden Zellen, in denen nur eine der beiden Zellen oder keine eine GFP-Markierung zeigte, unterschied sich nicht. Auch in der Fehlverteilung, bei der eine Zelle zwei oder mehr GFP-markierte Chromosomen V erhalten hatte, unterschieden sich der Wildtyp und die *iml3Δ*-Mutante nicht signifikant. Die Werte für diese Ereignisse lagen jeweils bei ca. 1 % oder weniger (Abbildung 18A, Reihen 7-10). Anhand dieser Ergebnisse kann man erkennen, dass Iml3p nicht für die Verteilung von Chromosom III und Chromosom V benötigt wird, und somit wahrscheinlich auch nicht für die Verteilung anderer endogener Chromosomen. Aufgrund der Verzögerung der *iml3Δ*-Mutante im Zellzyklus wurde in weiteren Experimenten die Beteiligung der mitotischen Kontrollpunkte an der DNA-Verteilung untersucht (Kapitel 3.1.3.3).

### 3.1.3.2 Ein *iml3Δ*-Stamm zeigt einen normalen Spindelzyklus

Nachdem gezeigt werden konnte, dass eine *iml3Δ*-Mutante nach einem Zellzyklus-Arrest mehr Zeit als der Wildtypstamm benötigt, um wieder in den Zellzyklus einzutreten, stellte sich die Frage, ob das Protein eine Rolle bei der Orientierung der Teilungsspindel spielt. Es wurden daher die Spindeln von Zellen nach einem HU-Arrest untersucht. Sowohl Wildtyp als auch *iml3Δ*-Zellen zeigten zu gleichen Teilen fehlorientierte kurze Spindeln (ca. 4 %) (Abbildung 19, Reihen 4, 5, 6). Allerdings konnte auch in diesem Experiment beobachtet werden, dass die Zellen der *iml3Δ*-Mutante tendenziell etwas länger brauchen, um nach dem Arrest in die Mitose einzutreten. Mehr *iml3Δ*- als Wildtyp-Zellen trugen kurze Spindeln mit ungeteilter DNA (Abbildung 19, Reihe 2), während gleich viele Zellen lange Spindeln ausgebildet hatten und sich in der späten Anaphase oder der Telophase befanden (Abbildung 19, Reihe 3). Im Gegensatz dazu bildeten zum gleichen Zeitpunkt bereits tendenziell mehr Wildtypzellen eine neue Knospe aus als die *iml3Δ*-Mutante (Abbildung 19, Reihe 1). Aufgrund der hohen und überlappenden Standardabweichungen können aber keine genaueren



**Abbildung 19: Spindelorientierung**

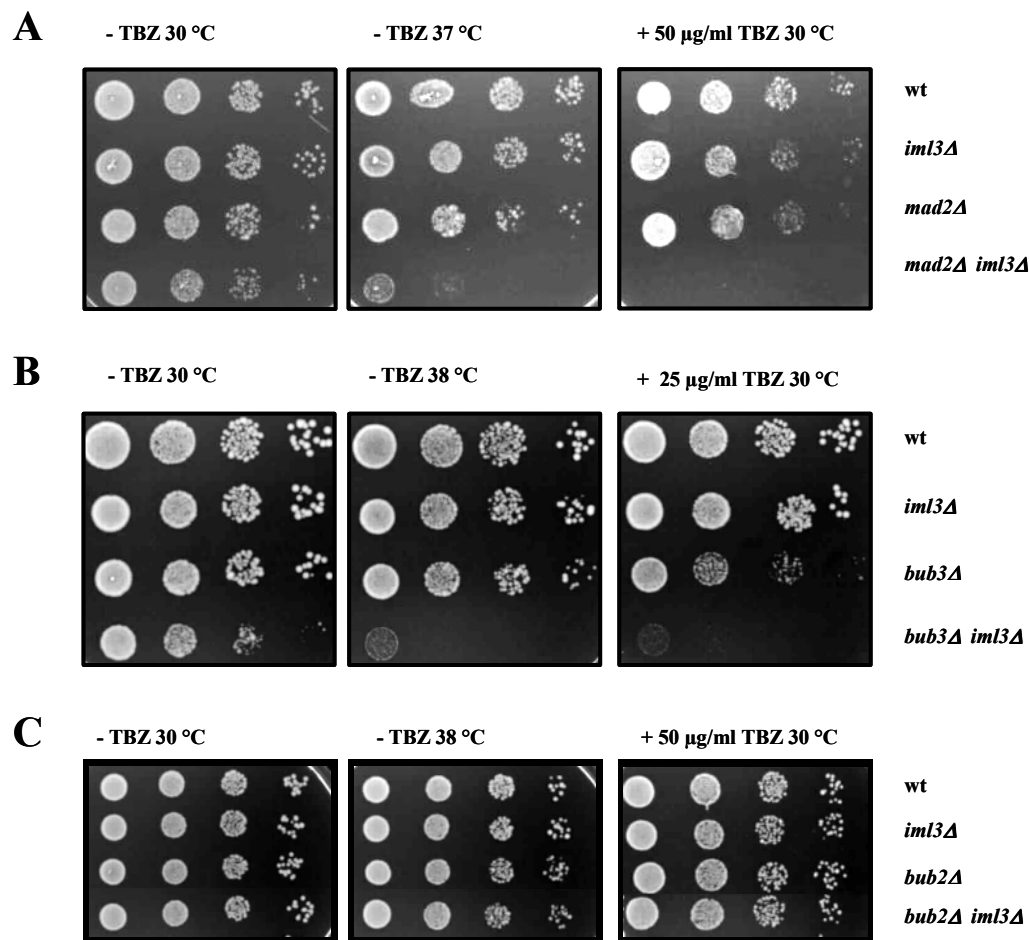
Die Spindeln von Wildtyp (wt)- und *iml3Δ*-Zellen wurden 67 min nach dem Austritt aus einem Hydroxyharnstoff-Arrest (7,6 µg/ml) mittels Immunofluoreszenz mikroskopisch untersucht. Bestimmt wurde der Anteil an Zellen mit kleiner Knospe und astralen Mikrotubuli (1), Zellen mit kurzer Teilungsspindel (2), Zellen mit langer Teilungsspindel (3) und Zellen mit fehlpositionierter kurzer Teilungsspindel (4, 5, 6). Die Standardabweichung wird durch die Striche innerhalb der Säulen dargestellt.

### 3.1.3.3 Das Fehlen von Iml3p aktiviert den Spindelaufbau-Kontrollpunkt

Die Deletion von Iml3p führt, wie zuvor gezeigt werden konnte, zu einer erhöhten Verlustrate artifizieller Minichromosomen, nicht aber zu einer verstärkten Fehlverteilung endogener Chromosomen im Vergleich zum Wildtyp. Allerdings gehen *iml3Δ*-Mutanten mit einer anderen Kinetik durch die Mitose als Wildtypzellen. Eine solche Verzögerung im Zellzyklus kann durch eine Aktivierung der mitotischen Kontrollpunkte erfolgen, wodurch die Zellen Zeit erhalten, die endogenen Chromosomen an die Spindel anzuknüpfen. Da eine direkte Überprüfung einer Aktivierung der Kontrollpunkte nicht möglich war, sollte unter zu Hilfenahme von Deletionsmutanten der Spindelaufbau-Kontrollpunktgene *MAD2* und *BUB3* und des Spindelpositions-Kontrollpunktgens *BUB2* über genetische Interaktionen untersucht werden, ob die Kontrollpunkte das Fehlen von Iml3p wahrnehmen und an die Zelle weiterleiten.

Die Untersuchung der genetischen Interaktionen erfolgte mittels serieller Tropftests der entsprechenden Einzel- und Doppelmutanten. Bei einer Inkubationstemperatur von 30 °C wuchsen alle Einzelmutanten sowie die *iml3Δ bub2Δ*-Doppelmutante genauso gut wie der Wildtyp (Abbildung 20 wt, *iml3Δ*, *mad2Δ*, *bub3Δ*, *bub2Δ*, *iml3Δ bub2Δ* 30 °C).

Aussagen getroffen werden. Die Daten deuten aber darauf hin, dass die Probleme beim Wiedereintritt in den Zellzyklus nach einem HU-Arrest unabhängig von der Orientierung der Spindel sind.



**Abbildung 20: Iml3p zeigt genetische Interaktionen mit Mad2p und Bub3p**

Hefezellen eines Wildtyp-(wt) Stammes, des isogenen *IML3*-Deletionsstammes (*iml3Δ*) sowie die zugehörigen A) *MAD2*-Deletionen (*mad2Δ*; *mad2Δ iml3Δ*), B) *BUB3*-Deletionen (*bub3Δ*; *bub3Δ iml3Δ*) und C) *BUB2*-Deletionen (*bub2Δ*; *bub2Δ iml3Δ*) wurden über Nacht bei 30 °C in YPD-Medium angezogen. Jeweils 10, 100, 1.000 und 10.000 Zellen wurden auf YPD-Platten mit Thiabendazol (+ TBZ) und ohne TBZ (-TBZ) getropft und für 48 Stunden bei 30 °C und 38 °C inkubiert.

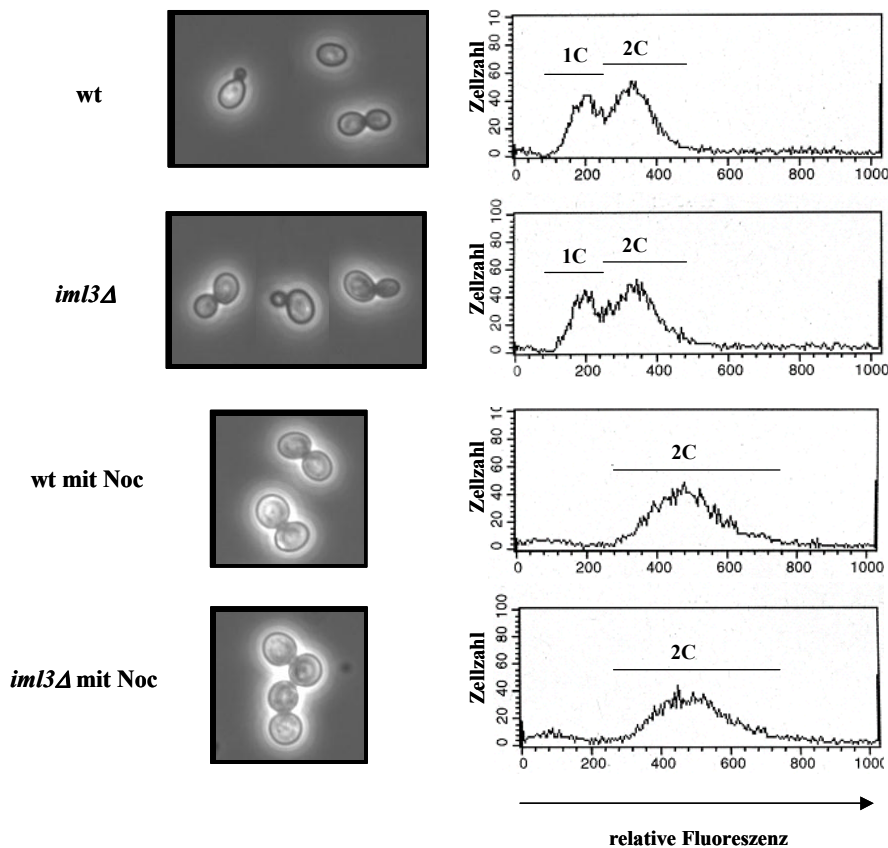
Die *iml3Δ mad2Δ* und die *iml3Δ bub3Δ*-Doppelmutanten wuchsen etwas langsamer als der Wildtyp und die jeweiligen Einzelmutanten, erkennbar an der kleineren Koloniegröße. Sowohl eine Erhöhung der Inkubationstemperatur als auch die Zugabe von Thiabendazol (TBZ), einer Mikrotubuli-destabilisierenden Chemikalie zu den Medien führte sowohl in der *iml3Δ mad2Δ* als auch in der *iml3Δ bub3Δ*-Doppelmutante zu synthetischer Lethalität (Abbildung 20A und B). Dies zeigt, dass durch die Abwesenheit von Iml3p eine Aktivierung des Mad2p-/Bub3p-abhängigen Spindelaufbau-Kontrollpunktes erfolgt.

Die *iml3Δ bub2Δ*-Doppelmutante hingegen zeigte weder bei einer erhöhten Inkubationstemperatur noch nach Zugabe von TBZ ins Medium einen Wachstumsdefekt im Vergleich zum Wildtyp oder den Einzelmutanten (Abbildung 20C). Das zeigt, dass durch das Fehlen von Iml3p der Bub2p-abhängige Spindelpositions-Kontrollpunkt nicht aktiviert wird.

### 3.1.3.4 Iml3p selbst hat keine Kontrollpunktfunktion

Aufgrund der gezeigten genetischen Interaktionen einer *iml3Δ*-Mutante mit den Kontrollpunktproteinen Bub3p und Mad2p stellte sich die Frage, ob Iml3p selbst Kontrollpunktfunktionen übernimmt. Hierzu sollte getestet werden, ob *iml3Δ*-Mutanten nach Zugabe von Nocodazol (Noc), einer Mikrotubuli-destabilisierenden Chemikalie, ins Medium, einen kontrollpunktabhängigen mitotischen Arrest zeigen oder nicht. Zellen, denen eines oder mehrere der Kontrollpunktproteine fehlen, sind nach Noc-Zugabe nicht länger in der Lage, als großknospige Zellen mit doppeltem DNA-Gehalt (2C) vor Beginn der Mitose im Zellzyklus zu arretieren.

Zellen einer *iml3Δ*-Mutante zeigten wie der Wildtyp nach Zugabe von Nocodazol zum Medium einen kontrollpunktabhängigen Zellzyklusarrest. Es fanden sich fast ausschließlich Zellen mit großen Knospen, während sich in Medium ohne Noc sowohl im Wildtyp als auch in der *iml3Δ*-Mutante unter dem Mikroskop Zellen aus allen Zellzyklusphasen fanden (Abbildung 21, wt und *iml3Δ*). Mit Hilfe einer FACS-Analyse konnte gezeigt werden, dass in



**Abbildung 21: *iml3Δ*-Mutanten zeigen einen mitotischen Arrest**

Logarithmisch wachsende Wildtyp-(wt) und *iml3Δ*-Zellen wurden mikroskopisch untersucht und der DNA-Gehalt wurde mittels FACS-Analyse bestimmt. Nach einer zweistündigen Behandlung bei 30 °C mit Nocodazol (15 µg/ml) (mit Noc), einer Mikrotubuli-destabilisierenden Chemikalie, erfolgte dieselbe Untersuchung. Für die FACS-Analyse wurde die relative Fluoreszenz von jeweils 10.000 mit Propidiumjodid behandelten Zellen bestimmt. Aufgetragen wurde die Zellzahl gegen die relative Fluoreszenz.

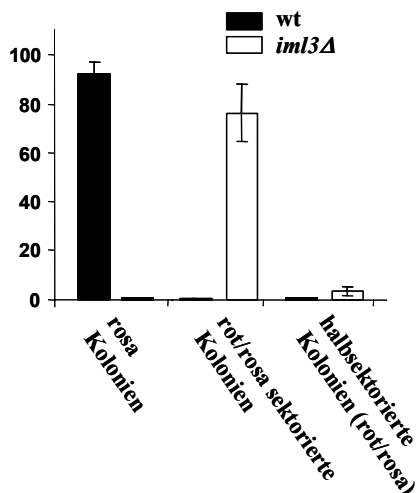
1C: einfacher DNA-Gehalt

2C: doppelter DNA-Gehalt.

logarithmisch wachsenden Kulturen die Anzahl der Zellen mit einfachem DNA-Gehalt (1C), in der Synthesephase und mit doppeltem DNA-Gehalt (2C) im Wildtyp und der *iml3Δ*-Mutante gleich war (Abbildung 21, wt und *iml3Δ*). Die Zugabe von Nocodazol ins Medium führte sowohl im Wildtyp als auch in der *iml3Δ*-Mutante dazu, dass im FACS hauptsächlich Zellen mit doppeltem DNA-Gehalt identifiziert wurden (Abbildung 21, wt mit Noc und *iml3Δ* mit Noc). Dies zeigt, dass durch das Fehlen von Iml3p der Kontrollpunkt nicht verloren geht und Iml3p demnach keine Kontrollpunktfunktionen übernimmt.

### 3.1.3.5 Das Fehlen von Iml3p führt zum Verlust von artifiziellen Minichromosomen

Nachdem bereits früher gezeigt werden konnte, dass der Verlust von Iml3p in der Hefezelle zu genetischer Instabilität führt, bei der sowohl die Verlustrate von *CEN*-Plasmiden als auch von artifiziellen Chromosomenfragmenten (CF) stark erhöht war (Güldener, 2000), stellte sich nun die Frage, welcher Art dieser Verlust war. Zum einen besteht die Möglichkeit, dass die Kohäsion der beiden Chromosomen nicht korrekt oder zu spät aufgelöst wird, so dass es



**Abbildung 22: Bestimmung der Verlustart eines Chromosomenfragments in einer *iml3Δ*-Mutante**

Diploide Zellen eines Wildtyp Hefestammes und eines isogenen *iml3Δ*-Stammes, die jeweils ein Chromosomenfragment tragen, wurden über Nacht bei 30 °C in Selektivmedium angezogen. Anschließend wurden jeweils etwa 200 Zellen auf mehrere YPD-Platten ausplattiert und bei 30 °C inkubiert. Die herangewachsenen Kolonien wurden hinsichtlich ihrer Sektorierung untersucht. Ausgewertet wurden insgesamt zwischen 1400 und 1900 Kolonien aus zwei unabhängigen Versuchen. Das Balkendiagramm zeigt den prozentualen Anteil an rosa Kolonien, Kolonien mit roten Sektoren bei einer rosa Grundfarbe und halb rot/rosa-sektorierten Kolonien (1:0). Als halbsektoriert wurden alle Kolonien gezählt, die mindestens zur Hälfte rot gefärbt waren.

zu einer Fehlverteilung während der Zellteilung kommt und beide Chromosomenfragmente an eine einzelne Zelle weitergegeben werden, während die andere Zelle kein CF erhält (2:0-Segregation). Zum anderen kann ein echtes Verlustereignis eintreten, wodurch nur ein Chromosomenfragment an die nachfolgende Generation weitervererbt wird (1:0-Segregation). Der Nachweis dieser Fehlverteilungen erfolgt über die Färbung der Kolonien.

Diploide Zellen, die ein CF tragen, führen zu rosa gefärbten Kolonien, während Kolonien mit Zellen, die kein CF tragen, rot werden. Kolonien bestehend aus Zellen, die zwei CF tragen sind hingegen weiß. Verliert eine Hefezelle in der Kolonie das CF, so entsteht durch die Teilung der Zelle und die folgenden Zellteilungen ein roter Sektor in einer rosa Kolonie. Ebenso führt eine 2:0-Segregation zu weißen und roten Sektoren in einer rosa Kolonie.

Im Wildtyp waren mehr als 90 % aller Kolonien einheitlich rosa gefärbt waren. Es traten so gut wie



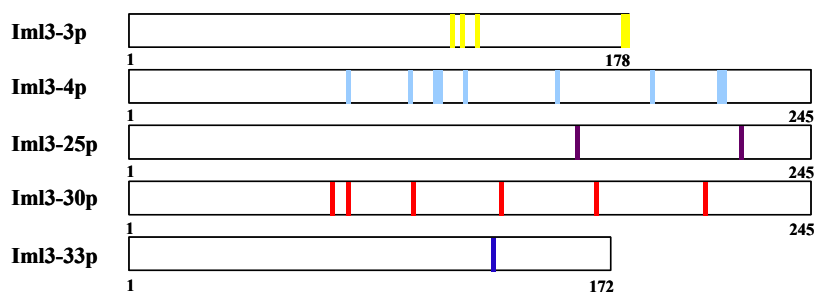
## Ergebnisse

keine Kolonien mit roten Sektoren auf. Dies zeigte sich auch bei den halbsektorierten Kolonien (rosa/rot), bei denen das CF während der ersten Zellteilung bei der Entstehung der Kolonie verloren wurde (Abbildung 22). Zudem findet sich keine eindeutige 2:0-Segregation (0,06 % +/- 0,15 % halbsektorierte Kolonien) (nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu zeigte der *iml3Δ*-Stamm einen deutlichen Verlust des CF. Mehr als 70 % der Kolonien enthielten rote Sektoren bei einer rosa Grundfarbe, was einer 1:0-Fehlseggregation entspricht. Im Gegensatz dazu waren keine rosa Kolonien zu finden. 3,5 % der Kolonien waren halbsektoriert (rot/rosa), während auch hier kaum eine 2:0 Segregation (rot/weiß) zu finden war (0,3 % +/- 0,6 % halbsektorierte Kolonien) (Abbildung 22) (nicht gezeigt).

Eine *iml3Δ*-Mutante zeigt demnach im Vergleich zum Wildtyp eine stark erhöhte 1:0 Fehlseggregation, was darauf hindeutet, dass eine *iml3Δ*-Mutante vermehrt Chromosomen verliert. Da die Standardabweichung für die 2:0-Segregation im Wildtyp und der *iml3Δ*-Mutante zu hoch war, kann nicht geklärt werden, ob eine *iml3Δ*-Mutante auch eine erhöhte 2:0-Segregation im Vergleich zum Wildtyp zeigt.

### 3.1.3.6 Der zentrale Teil und der C-Terminus des Iml3-Proteins werden für dessen Funktion benötigt

Da bisher keine homologen Proteine von Iml3p gefunden wurden und auch keine funktionellen Domänen über Sequenzvergleiche identifiziert werden konnten, sollten zur näheren funktionellen Charakterisierung des Proteins funktionelle Domänen identifiziert werden. Hierzu wurden über Zufallsmutagenese verschiedene Punktmutanten von Iml3p



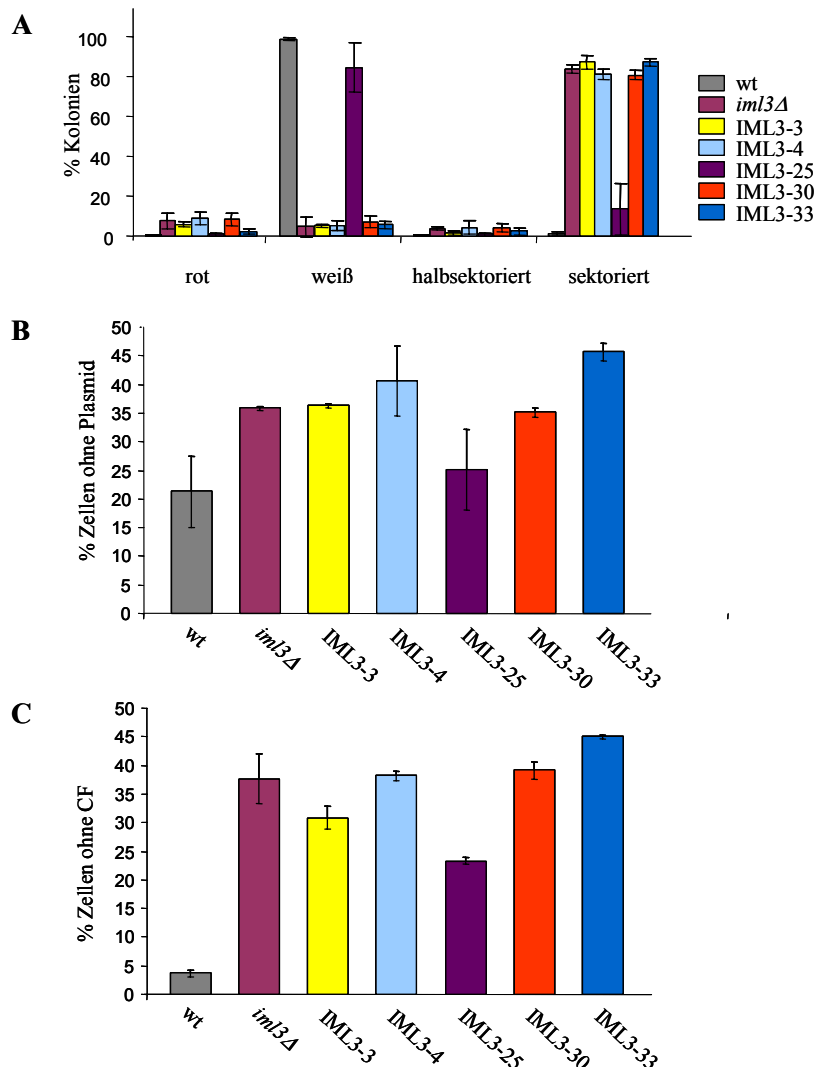
**Abbildung 23: Lokalisierung der Aminosäureaustausche in den Iml3p-Mutantenproteinen**

Die Graphik zeigt schematisch die relative Lage der Mutationen in den Iml3p-Mutantenproteinen Iml3-3p, Iml3-4p, Iml3-25p, Iml3-30p und Iml3-33p.

hergestellt. Selektioniert wurde hierbei auf haploide Hefezellen, die bei einer rot/weiß-Selektion in haploiden Zellen eine erhöhte Verlustrate eines artifiziellen Chromosomenfragments zeigten und somit vermehrt rote Sektoren in weißen Kolonien aufwiesen (Köhler, 2000).

## Ergebnisse

Eine Sequenzanalyse zeigte, dass alle Stämme, die in diesem Ansatz identifiziert wurden, mehr als eine Punktmutation trugen. Zwei Stämme (IML3-3 und IML3-33) konnten aufgrund von Mutationen, die zu einer Verschiebung im Leserahmen führten, nur noch etwas mehr als zwei Drittel des gesamten Proteins exprimieren. Zusätzlich trug IML3-3 noch 3 weitere



**Abbildung 24: Bestimmung der genetischen Instabilität der Iml3p-Mutanten**

A) Zellen der angegebenen haploiden Hefestämme (Wildtyp (wt), *iml3Δ*, IML3-3, IML3-4, IML3-25, IML3-30 und IML3-33), die ein *SUP11*-exprimierendes Chromosomenfragment trugen, wurden über Nacht bei 30 °C in Selektivmedium angezogen. Anschließend wurden jeweils etwa 200 Zellen auf mehrere YPD-Platten ausplattiert und bei 30 °C inkubiert. Die herangewachsenen Kolonien wurden hinsichtlich ihrer Sektorierung untersucht. Ausgewertet wurden jeweils ca. 2000 Kolonien. Bestimmt wurde der prozentuale Anteil an roten, weißen, halbsektorierten und anders rotsektorierten (sektoriert) Kolonien. Als halbsektorierte Kolonien wurden diejenigen gezählt, die mindestens zur Hälfte rot gefärbt waren.

B und C) Zellen der angegebenen Hefestämme (Wildtyp (wt), *iml3Δ*, IML3-3, IML3-4, IML3-25, IML3-30 und IML3-33), die B) ein GFP-exprimierendes *CEN*-Plasmid und C) ein GFP-exprimierendes Chromosomenfragment (CF) trugen, wurden über Nacht bei 30 °C in Selektivmedium angezogen. Morgens wurden die Zellen in frisches Selektivmedium überführt und für weitere zwei Generationen bei 30 °C inkubiert. Im FACS wurde die relative Fluoreszenz von jeweils 10.000 Zellen bestimmt. Das Balkendiagramm zeigt den prozentualen Anteil an Zellen ohne *CEN*-Plasmid (B) respektive ohne CF (C).

Aminosäureaustausche im mittleren Teil des Proteins, während IML3-33 eine zusätzliche Mutation ebenfalls im mittleren Teil des Proteins trug (Abbildung 23). IML3-4 wies 9 Aminosäureaustausche sowohl im mittleren als auch im C-terminalen Teil des Proteins auf. Für IML3-25 konnten 2 Mutationen im C-Terminus des Proteins nachgewiesen werden. Im Stamm IML3-30 fanden sich 6 veränderte Aminosäuren sowohl im mittleren Teil als auch im C-Terminus des Proteins (Abbildung 23). Es konnten keine Stämme mit erhöhter genetischer Instabilität identifiziert werden, die Mutationen im N-terminalen Bereich (Aminosäure 1-72) des Proteins trugen.

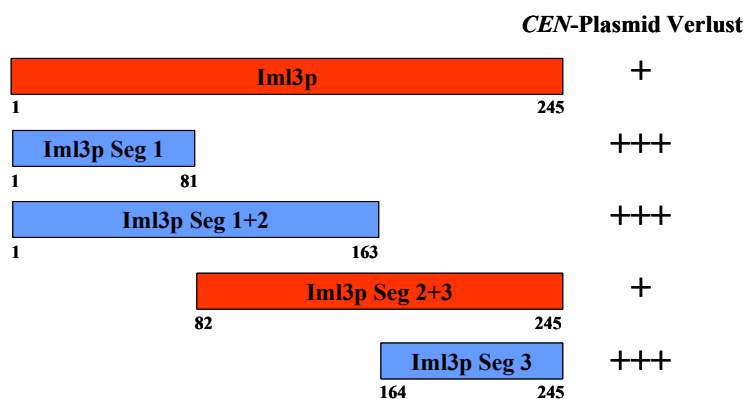
Die Analyse der Sektorierung ergab, dass der Wildtyp so gut wie

## Ergebnisse

keine roten oder rot sektorierten Kolonien ausbildete. IML3-25 zeigte im Vergleich zum Wildtyp eine leicht erhöhte genetische Instabilität (Abbildung 24 A). Die Mutantenstämme IML3-3, IML3-4, IML3-30 und IML3-33 verhielten sich ähnlich wie die *iml3*-Deletion und zeigten eine stark erhöhte CF-Verlustrate (> 80 % sektorierte Kolonien) (Abbildung 24 A).

Für alle Mutanten wurde außerdem die Verlustrate eines *CEN*-Plasmids und eines CF mittels FACS bestimmt (s. Kapitel 2.11.3.7.2). Im Wildtyp und der IML3-25-Mutante hatten ähnlich viele Zellen das *CEN*-Plasmid verloren (~22-25 %), während die Verlustrate des CF in der IML3-25-Mutante (~24 %) im Vergleich zum Wildtyp (~4 %) erhöht war. (Abbildung 24B und C). Die Deletion von *Iml3p* führt zu einer deutlich erhöhten Verlustrate sowohl des *CEN*-Plasmids als auch des CF (~37 %) im Vergleich zum Wildtyp. IML3-3, IML3-4 und IML3-30 verhielten sich ähnlich wie die *iml3*-Deletionsmutante (Verlustraten: *CEN*-Plasmid und CF je zwischen 35 %-39 %), während der Stamm IML3-33 eine im Vergleich zur Deletion etwas erhöhte Verlustrate zeigte (ca. 47 %). (Abbildung 24B und C). Die Daten lassen sich dahingehend interpretieren, dass für die Funktion von *Iml3p* nur der zentrale und der C-terminale Teil des Proteins essentiell sind.

Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden N- und C-terminal verkürzte *Iml3p*-Proteine endogen vom eigenen Promotor exprimiert und der *CEN*-Plasmid Verlust dieser Mutanten untersucht (Abbildung 25) (Otremba, 2004). Es zeigte sich, dass nur die Expression eines Fragments, welches den zentralen Teil und den C-Terminus von *Iml3p* umfasst (*Iml3p* Seg



**Abbildung 25: Genetische Stabilität von verkürzten *Iml3p*-Proteinen**

Verschiedene verkürzte *Iml3p*-Varianten wurden endogen exprimiert und die Verlustrate eines *CEN*-Plasmids wurde untersucht. Die Verlustrate des Hefestammes, der das Volllängen-Protein (*Iml3p*) exprimiert, wurde als Referenz gewählt

+: Verlustrate des Wildtyps

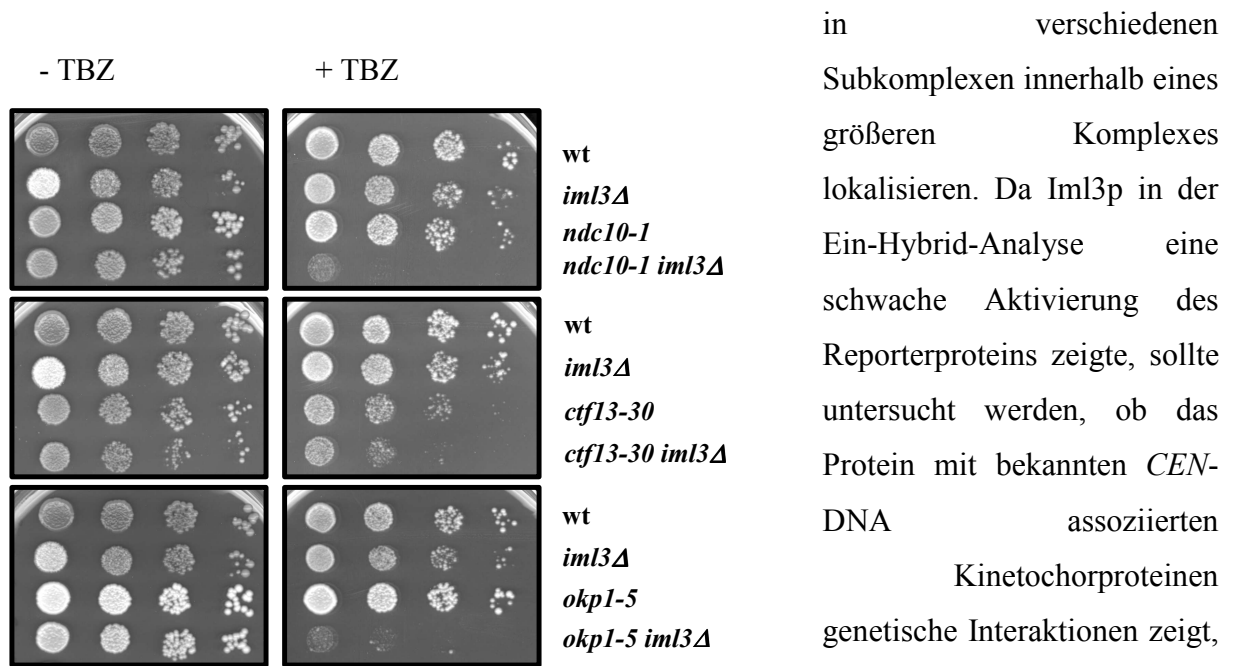
+++ : im Vergleich zum Wildtyp erhöhte Verlustrate.

Diese Experimente wurden von R. Otremba durchgeführt (Otremba, 2004)

2+3) sich hinsichtlich der genetischen Stabilität wie der Wildtyp verhielt. Das Fehlen des zentralen und/oder des C-terminalen Teils des Proteins führte zu einem Verlust der genetischen Stabilität (Abbildung 25 *Iml3p* Seg 1, *Iml3p* Seg 1+2, *Iml3p* Seg 3).

### 3.1.3.7 Iml3p zeigt genetische Interaktionen mit *CEN*-DNA assoziierten Kinetochorproteinen sowie mit Ame1p

Abschließend sollte die Lokalisation von Iml3p innerhalb des Kinetochorkomplexes näher untersucht werden. Die Eingrenzung von Lokalisationen einzelner Proteine innerhalb eines Multiprotein-Komplexes kann durch die Untersuchung genetischer Interaktionen unterstützt werden. Genetische Interaktionen sind zumeist stärker, wenn die zu untersuchenden Proteine



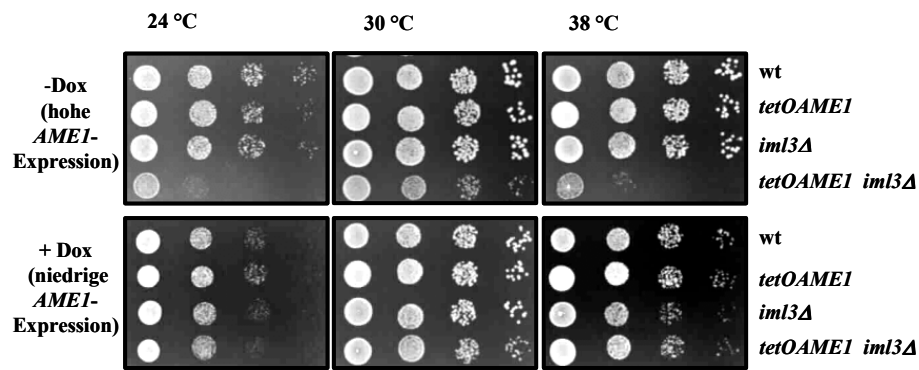
**Abbildung 26: Iml3p zeigt genetische Interaktionen mit anderen Kinetochorproteinen**

Hefestämme mit den angegebenen Genotypen wurden über Nacht bei 30 °C in YPD<sup>+</sup>-Medium angezogen. Jeweils 10, 100, 1.000 und 10.000 Zellen wurden auf YPD-Platten mit Thiabendazol (+ TBZ) (50 µg/ml) und ohne (-TBZ) getropft und für 72 Stunden bei 30 °C inkubiert. (wt = Wildtyp).

genetische Interaktionen von Iml3p mit den bekannten Kinetochorproteinen Ndc10p, Ctf13p und Okp1p. Während Ndc10p und Ctf13p im CBF3-Komplex im inneren Kinetochor liegen, ist Okp1 ein Bestandteil des COMA-Komplexes des zentralen Kinetochors, der aufgrund biochemischer Arbeiten 2003 (De Wulf, et al., 2003) beschrieben wurde.

Die *ndc10-1 iml3Δ* Doppelmutante war auf Medium mit Thiabendazol (TBZ) (50 µg/ml), einer Mikrotubuli-destabilisierenden Chemikalie, letal, wohingegen der Wildtyp und die Einzelmutanten gut wuchsen (Abbildung 26). In einem *ctf13-30* Hintergrund führte das Fehlen von Iml3p nur zu einem leicht verlangsamten Wachstum auf TBZ-haltigen Medien im Vergleich zum Wildtyp und den Einzelmutanten (Abbildung 26). Ebenfalls eine starke genetische Interaktion zeigte sich mit dem Kinetochorprotein Okp1p. Aufgrund verschiedener Stammhintergründe wachsen die *okp1-5* Mutante und die *okp1-5 iml3Δ* Doppelmutante bei 30 °C auf Vollmedium etwas besser als der Wildtyp und die *iml3Δ*-Einzelmutante. Auf Medien mit TBZ (50 µg/ml) wuchs die *okp1-5 iml3Δ* Doppelmutante deutlich schlechter als

in verschiedenen Subkomplexen innerhalb eines größeren Komplexes lokalisieren. Da Iml3p in der Ein-Hybrid-Analyse eine schwache Aktivierung des Reporterproteins zeigte, sollte untersucht werden, ob das Protein mit bekannten *CEN*-DNA assoziierten Kinetochorproteinen genetische Interaktionen zeigt, um so eventuell einen Einblick in seine Anordnung innerhalb des Komplexes zu erhalten. Untersucht wurden



**Abbildung 27: Iml3p zeigt genetische Interaktionen mit Ame1p**

Hefezellen eines Wildtyp-(wt) Stammes sowie Zellen, bei denen die Expression von *AME1* durch den tetO-Promotor reguliert wird (*tetOAME1*) und die jeweiligen *IML3*-Deletionsstämme (*iml3Δ*; *tetOAME1 iml3Δ*) wurden über Nacht bei 30 °C in YPD-Medium angezogen. Jeweils 10, 100, 1.000 und 10.000 Zellen wurden auf YPD-Platten mit (+ Dox) und ohne Doxycyclin (-Dox) (100 µg/ml) getropft und für 48 Stunden bei 24 °C, 30 °C und 38 °C inkubiert.

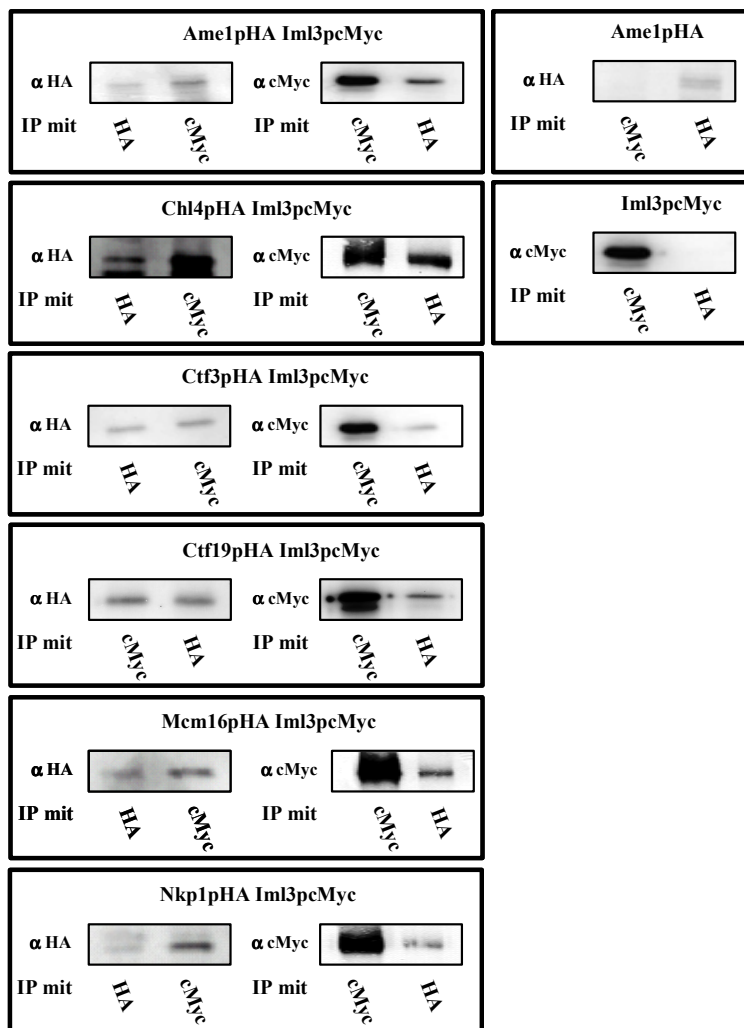
binden (Ctf3p, Ndc10p) oder in einen postulierten Subkomplex eingeordnet werden, welcher direkt mit den DNA-bindenden Proteinen interagiert (Okp1p), ergibt sich ein erster Hinweis, dass Iml3p dem zentralen oder äußeren Kinetochor zugeordnet werden kann.

Wie zu Beginn der Arbeit gezeigt werden konnte, zeigt das essentielle Protein Ame1p eine für Kinetochorproteine typische Lokalisierung (Abbildung 15). Es wird postuliert, dass das Protein wie Okp1p Bestandteil des COMA-Komplexes ist (De Wulf, et al., 2003). Daher wurde untersucht, ob Ame1p und Iml3p ebenfalls genetisch interagieren. Hierzu wurde die Ame1p-Expression in einem *iml3Δ* Stamm durch den Doxycyclin (Dox) regulierbaren *tetO*-Promotor eingestellt. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl bei einer geringen Wachstumstemperatur von 24 °C als auch bei einer erhöhten Temperatur von 38 °C und starker Ame1p-Expression auf Medium ohne Dox die *tetOAME1 iml3Δ* Doppelmutante deutlich langsamer wuchs als der Wildtyp und die Einzelmutanten, während bei 30 °C auf demselben Medium nur geringe Wachstumsunterschiede zu beobachten sind (Abbildung 27). Eine herunterregulierte Ame1p-Expression (100 µg/ml Dox) führte nicht zu einem verlangsamten Wachstum der *tetOAME1 iml3Δ* Doppelmutante im Vergleich zum Wildtyp und den Einzelmutanten (Abbildung 27). Eine Anhäufung von Ame1p in einer *IML3*-Deletion hat demnach einen stärkeren Einfluss auf das Wachstum eines Hefestammes als eine verringerte Menge des Proteins. Auch hier wird deutlich, dass aufgrund der starken genetischen Interaktionen die beiden Proteine wahrscheinlich nicht im selben Subkomplex des Kinetochors lokalisieren.

der Wildtyp und die Einzelmutanten (Abbildung 26). Aufgrund der teilweise starken genetischen Interaktionen mit den getesteten drei Proteinen, die entweder direkt an die *CEN*-DNA

### 3.1.3.8 Iml3p zeigt physikalische Interaktionen mit anderen Kinetochorproteinen in Ko-Immunopräzipitationen

Für die weitere Eingrenzung der Lokalisation von Iml3p innerhalb des Kinetochors sollten mit Hilfe von Ko-Immunopräzipitationen potentielle Interaktionspartner von Iml3p verifiziert werden. Aufgrund einer genomweiten Analyse konnten 2002 mehrere potentielle Interaktionspartner von Iml3p identifiziert werden (Cheeseman, et al., 2002a; Gavin, et al.,



**Abbildung 28: Iml3p zeigt physikalische Interaktionen mit weiteren Kinetochorproteinen**

Endogen cMyc-markiertes Iml3-Protein (Iml3pcMyc) wurde in Hefestämmen exprimiert, in denen je ein anderes Kinetochorprotein endogen HA-markiert war (Ame1pHA, Chl4pHA, Ctf3pHA, Ctf19pHA, Mcm16pHA und Nkp1pHA). Die physikalischen Interaktionen zwischen Iml3p und den anderen Proteinen wurde mittels Ko-Immunopräzipitation untersucht. Gezeigt werden jeweils in der vorderen Reihe der Western-Blot mit dem gegen das HA-Epitop gerichteten Antikörper ( $\alpha$  HA) und in der hinteren Reihe der Western-Blot mit dem gegen das cMyc-Epitop gerichteten Antikörper ( $\alpha$  cMyc). Unter den Blots ist angegeben, mit welchem Antikörper die Immunopräzipitation (IP) durchgeführt wurde. Iml3pcMyc und Ame1pHA wurden zusätzlich in Hefestämmen nachgewiesen, in denen kein zweites Epitop-markiertes Protein exprimiert wurde.

Mikrotubuli-assoziierten Proteinen angesehen wird (Hyland, et al., 1999; Ortiz, et al., 1999). Erst 2003 wurde auch Ame1p diesem Komplex zugeordnet (De Wulf, et al., 2003). Für Chl4p

2002). Hierzu gehörten unter anderem die Proteine Ame1p, Chl4p, Ctf3p, Ctf19p, Mcm16p, und Nkp1p, deren Interaktion mit Iml3p im folgenden verifiziert werden sollte. Die Auswahl dieser Proteine erfolgte zufällig, da eine Überprüfung aller potentieller Interaktionspartner zu aufwendig gewesen wäre.

Sowohl für Ame1p als auch Nkp1p war zu diesem Zeitpunkt noch keine nähere Charakterisierung erfolgt. Ctf3p und Mcm16p galten als Untereinheiten desselben Subkomplexes im zentralen Kinetochor (Measday, et al., 2002), wohingegen Ctf19p, welches wahrscheinlich einen Subkomplex mit Mcm21 und Okp1 bildet (Ortiz, et al., 1999), als Verbindung zwischen den DNA-bindenden Proteinen und den

war bekannt, dass es im Zwei-Hybrid-System mit Iml3p eine Interaktion zeigt (Ghosh, et al., 2001).

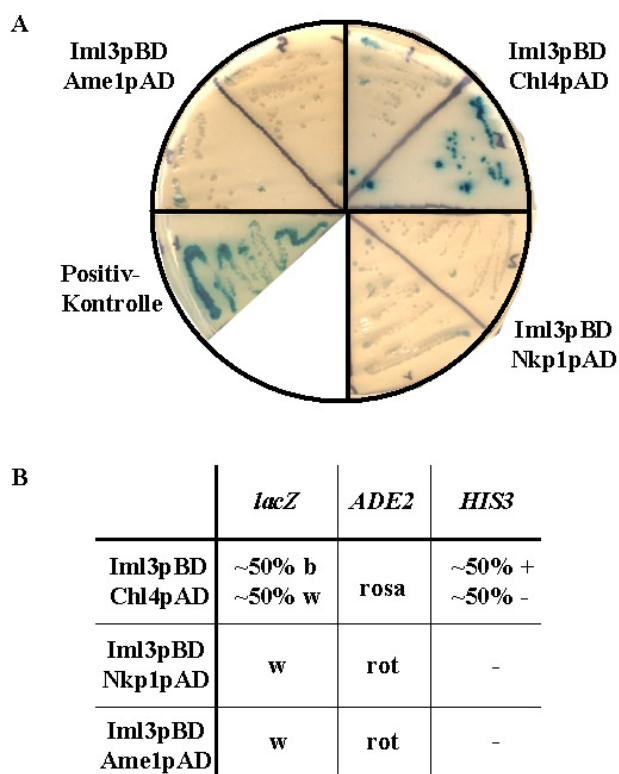
Für die Untersuchung der physikalischen Interaktionen zwischen Iml3p und den genannten Proteinen wurden Ko-Immunopräzipitationen durchgeführt. In einem Hefestamm, in dem nur Iml3p C-terminal mit cMyc markiert vorlag, konnte Iml3pcMyc nur mit anti-cMyc Antikörpern präzipitiert werden, nicht aber mit anti-HA Antikörpern (Abbildung 28). Ebenso war eine Präzipitation der HA-markierten Proteine in Hefestämmen, in denen Iml3p nicht cMyc markiert vorlag, nur mit anti-HA spezifischen Antikörpern möglich (Abbildung 28) (nicht gezeigt). In Hefestämmen, in denen Iml3p mit dem cMyc-Epitop markiert war und jeweils eines der anderen genannte Proteine mit dem HA-Epitop markiert war, wurde Iml3pcMyc sowohl im Präzipitat gefunden, wenn die Fällung mit anti-cMyc Antikörpern erfolgte, als auch nach der Präzipitation mit anti-HA Antikörpern (Abbildung 28). Ebenso konnten Ame1pHA, Nkp1pHA, Ctf3pHA, Mcm16pHA, Chl4pHA und Ctf19pHA sowohl mit anti-HA Antikörpern präzipitiert werden, als auch mit anti-cMyc Antikörpern (Abbildung 28). Bei den Doppelbanden, die auf einigen der Westernblots zu sehen sind (z.B. Abbildung 28, Nkp1pHA), handelt es sich möglicherweise um Modifikationen des betreffenden Proteins, die nicht weiter untersucht wurden.

Die Ko-Immunopräzipitationen zeigen, dass Iml3p in einem großen Proteinkomplex im Kinetochor zu finden ist und direkt oder indirekt mit anderen Kinetochorproteinen des zentralen Kinetochors interagiert.

### **3.1.3.9 Iml3p interagiert nicht direkt mit Ame1p und Nkp1p**

Nachdem gezeigt werden konnte, dass Iml3p in einem großen Kinetochorkomplex vorliegt und mit verschiedenen anderen Kinetochorproteinen interagiert, sollte für die beiden Proteine Ame1p und Nkp1p in einem Zwei-Hybrid-System untersucht werden, ob es sich um direkte oder indirekte Interaktionen zwischen den Proteinen handelt.

Es war bekannt, dass Iml3p mit dem Protein Chl4p eine Interaktion im Zwei-Hybrid-System zeigt (Ghosh, et al., 2001). Diese diente als Kontrolle für die weiteren zu überprüfenden Proteine.



**Abbildung 29: Zwei-Hybrid-Analyse**

A) In Zellen, in denen Iml3p fusioniert an die Gal4p DNA-Bindedomäne (Iml3pBD) und je ein weiteres Kinetochorprotein fusioniert an die Gal4p Aktivierungsdomäne (Ame1pAD, Chl4pAD und Nkp1pAD) exprimiert wurden, wurde die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität in einem X-Gal Überschichtungsversuch bestimmt. Als Positiv-Kontrolle diente p53<sub>(72-390)</sub> der Maus fusioniert an die Gal4p BD zusammen mit dem SV40 großen T-Antigen<sub>(84-708)</sub> fusioniert an die Gal4p AD.

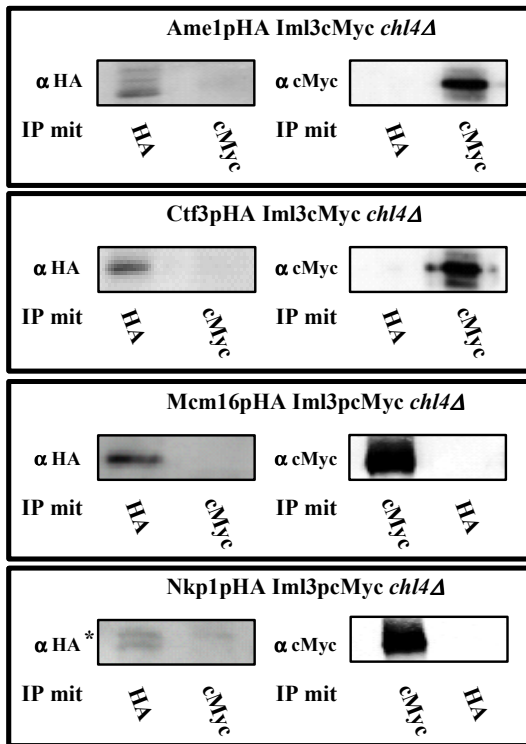
B) In der Tabelle wurden die Ergebnisse der Zwei-Hybrid-Analysen der untersuchten Proteine hinsichtlich der Aktivierung der verschiedenen Reportergene (*lacZ*, *HIS3*, *ADE2*) zusammengefasst. b = blaue, w = weiße Kolonien nach einem X-Gal Überschichtungsversuch, - = kein Wachstum, + = Wachstum auf 3AT-haltigen Platten, rot = rote und rosa = rosa Kolonien auf Adenin-armen Medien. Die Prozentzahlen spiegeln den prozentualen Anteil an Kolonien wider, die einen Phänotyp zeigten.

Es zeigte sich, dass etwa die Hälfte der in der Zwei-Hybrid-Analyse getesteten Transformanten, in denen Iml3p als Beuteprotein und Chl4p als Köderprotein exprimiert wurden, eine Aktivierung der Reporterproteine His3p und lacZ aufwies, während die andere Hälfte keine Aktivierung zeigte (Abbildung 29). Alle Transformanten zeigten allerdings eine schwache Aktivierung von Ade2p resultierend in rosa gefärbten Hefekolonien. Sowohl für Ame1p als auch für Nkp1p konnte keine direkte Interaktion mit Iml3p nachgewiesen werden, da es zu keiner Aktivierung der Reporterproteine kam (Abbildung 29). Obwohl über die Ko-Immunopräzipitation eine Interaktion von Iml3p mit beiden Proteinen gezeigt werden konnte, scheint diese Interaktion nicht zwischen den Proteinen direkt zu bestehen, sondern über andere Proteine vermittelt zu werden.

### 3.1.3.10 Die Interaktion von Iml3p mit anderen Kinetochorproteinen ist abhängig von Chl4p

Da die Bindung von Iml3p an die beiden Kinetochorproteine Ame1p und Nkp1p wohl nicht direkt erfolgt, stellte sich die Frage, über welches Protein die Interaktion vermittelt wird. Ein Kandidat war das Protein Chl4p. Zum einen konnte es im Zwei-Hybrid-System als direkter Interaktionspartner von Iml3p nachgewiesen werden, zum anderen war 2003 berichtet worden, dass das Protein für die Interaktion von Iml3p mit dem Protein Ctf19p verantwortlich ist, welches seinerseits für die Assoziation von Chl4p mit der *CEN*-DNA benötigt wird (Pot, et al., 2003).





**Abbildung 30: Physikalische Interaktionen von Iml3p mit weiteren Kinetochorproteinen sind abhängig von Chl4p**

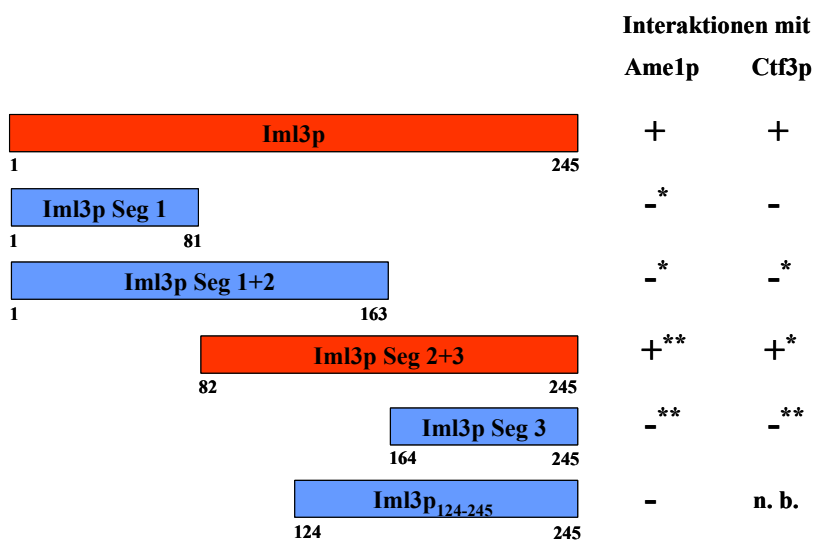
Endogen cMyc-markiertes Iml3-Protein (Iml3pcMyc) wurde in *CHL4*-deletierten Hefestämmen (*chl4Δ*) exprimiert, in denen je ein anderes Kinetochorprotein endogen HA-markiert war (Ame1pHA, Ctf3pHA, Mcm16pHA und Nkp1pHA). Die physikalischen Interaktionen zwischen Iml3p und den anderen Proteinen wurde mittels Ko-Immunopräzipitation untersucht. Gezeigt werden jeweils in der vorderen Reihe der Western-Blot mit dem gegen das HA-Epitop gerichteten Antikörper ( $\alpha$  HA) und in der hinteren Reihe der Western-Blot mit dem gegen das cMyc-Epitop gerichteten Antikörper ( $\alpha$  cMyc). Unter den Blots ist angegeben, mit welchem Antikörper die Immunopräzipitation (IP) durchgeführt wurde.

### 3.1.3.11 Der zentrale Teil und der C-Terminus von Iml3p werden für die Interaktion mit Ame1p und Ctf3p benötigt

Bereits zuvor wurde gezeigt, dass der zentrale Teil und der C-Terminus des Iml3-Proteins für den Erhalt der genetischen Stabilität benötigt werden. Um zu überprüfen, ob die verkürzten Varianten weiterhin im Kinetochor lokalisieren, wurden verkürzte cMyc markierte Varianten von Iml3p hergestellt und hinsichtlich ihrer Interaktionen mit den beiden endogen C-terminal HA-markierten Kinetochorproteinen Ame1p und Ctf3p untersucht (Otremba, 2004) (Abbildung 32).

Es konnte gezeigt werden, dass die Expression des Proteins Iml3Seg2+3pcMyc ausreichend war, um mit den Kinetochorproteinen Ctf3pHA und Ame1pHA in Ko-Immunopräzipitationen zu interagieren, während für das Protein Iml3Seg1+2pcMyc keine Interaktion nachgewiesen

Um die Rolle von Chl4p auf die Bindung von Iml3p an andere Kinetochorproteine zu überprüfen, wurden Ko-Immunopräzipitationen in Hefestämmen durchgeführt, in denen das Gen *CHL4* deletiert worden war. In den Präzipitaten konnte im Western-Blot jeweils nur das Protein nachgewiesen werden, welches mit den entsprechenden Antikörpern gefällt wurde. So wurde Iml3pcMyc nur im Präzipitat gefunden, wenn die Fällung mit anti-cMyc Antikörpern erfolgte, nicht aber nach der Präzipitation mit anti-HA Antikörpern (Abbildung 30). Ebenso konnten Ame1pHA, Nkp1pHA, Ctf3pHA und Mcm16pHA nur mit anti-HA Antikörpern präzipitiert werden, nicht aber mit anti-cMyc Antikörpern (Abbildung 30). Das bedeutet, dass die Bindung von Iml3p an die Kinetochorproteine Ame1p, Nkp1p, Ctf3p und Mcm16p durch Chl4p vermittelt wird.



**Abbildung 32: Interaktionen verkürzter Iml3-Proteine mit Ame1p und Ctf3p**

Verschiedene verkürzte C-terminal cMyc markierte Iml3p-Varianten wurden endogen exprimiert. Ihre Interaktion mit den C-terminal HA markierten Kinetochorproteinen Ame1p und Ctf3p wurde in Ko-Immunopräzipitations-Experimenten untersucht.

-: keine Interaktion

+: Interaktion

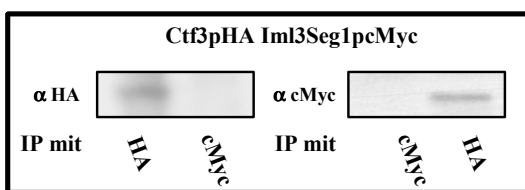
\* durchgeführt von R. Otremba, (Otremba, 2004)

\*\* durchgeführt von A. Pusole, unveröffentlichte Daten.

werden konnte (A. Pusole, unveröffentlichte Daten) (Otremba, 2004)). Auch Iml3pSeg1cMyc und Iml3pSeg3cMyc zeigten keine Interaktion mit Ame1HA und Ctf3pHA (Abbildung 31) (A. Pusole, unv. Daten) (Otremba, 2004).

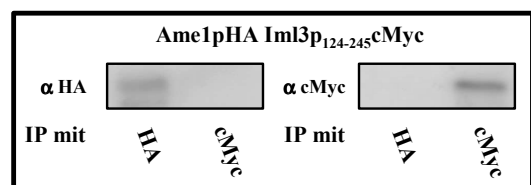
Für die weitere Eingrenzung der funktionellen Domäne des Iml3-Proteins wurden in einem Hefestamm, in dem das Protein Ame1p mit

dem HA-Epitop markiert war, die 42 N-terminalen Aminosäuren von Iml3Seg2+3pcMyc deltiert, so dass nur noch die C-terminalen 122 Aminosäuren des Iml3-Proteins gemeinsam mit dem cMyc-Epitop exprimiert wurden. In einer Ko-Immunopräzipitation zeigte sich, dass das cMyc-markierte Iml3p-Fragment nur mit anti-cMyc Antikörpern präzipitiert werden konnte, während das HA-markierte Ame1-Protein nur mit anti-HA Antikörpern gefällt werden konnte (Abbildung 33). Dies bedeutet, dass die C-terminale Hälfte des Iml3-Proteins



**Abbildung 31: Der N-Terminus von Iml3p interagiert nicht mit Ctf3p**

Die 82 N-terminalen Aminosäuren des Iml3-Proteins wurde endogen mit dem cMyc-Epitop markiert (Iml3Seq1pcMyc) und in einem Stamm, in dem Ctf3p mit einem HA-Epitop markiert war, exprimiert. Die physikalischen Interaktionen zwischen Iml3Seg1p und Ctf3p wurde mittels Ko-Immunopräzipitation untersucht. Gezeigt wird in der vorderen Reihe der Western-Blot mit dem gegen das HA-Epitop gerichteten Antikörper ( $\alpha$  HA) und in der hinteren Reihe der Western-Blot mit dem gegen das cMyc-Epitop gerichteten Antikörper ( $\alpha$  cMyc). Unter den Blots ist angegeben, mit welchem Antikörper die Immunopräzipitation (IP) durchgeführt wurde.



**Abbildung 33: Die Aminosäuren 124-245 von Iml3p sind nicht ausreichend für die Interaktion mit Ame1p**

Die 122 C-terminalen Aminosäuren des Iml3-Proteins wurde endogen mit dem cMyc-Epitop markiert (Iml3p<sub>124-245</sub>cMyc) und in einem Stamm, in dem Ame1p mit einem HA-Epitop markiert war, exprimiert. Die physikalischen Interaktionen zwischen Iml3p<sub>124-245</sub>cMyc und Ame1p wurde mittels Ko-Immunopräzipitation untersucht. Gezeigt wird in der vorderen Reihe der Western-Blot mit dem gegen das HA-Epitop gerichteten Antikörper ( $\alpha$  HA) und in der hinteren Reihe der Western-Blot mit dem gegen das cMyc-Epitop gerichteten Antikörper ( $\alpha$  cMyc). Unter den Blots ist angegeben, mit welchem Antikörper die Immunopräzipitation (IP) durchgeführt wurde.

nicht ausreichend für die Interaktion mit weiteren Kinetochorproteinen ist, und dass die 42 zusätzlich deletierten Aminosäuren einen essentiellen Beitrag zur Funktion des Iml3-Proteins beitragen (Abbildung 32).

### 3.1.4 Untersuchungen zu Ame1p

Ame1p zeigt mit Iml3p sowohl genetische als auch physikalische Interaktionen und eine Lokalisierung des Proteins erfolgt am Kinetochor. Es sollten daher weitere Untersuchungen zur Funktion des Ame1-Proteins erfolgen.

#### 3.1.4.1 Deregulierte Expression von Ame1p führt zu einer Aktivierung des mitotischen Kontrollpunktes

Da eine deregulierte Expression von Ame1p zu einer erhöhten Verlustrate artifizierender Chromosomen führt (Güldener, 2000), stellte sich unter anderem die Frage, ob die deregulierte Expression von Ame1p zur Aktivierung der mitotischen Kontrollpunkte führt. Zur Überprüfung der deregulierten Expression wurden die Mengen an Ame1p-Myc Protein, dessen Expression durch den Dox regulierbaren Promotor reguliert wurde, nach Zugabe von Dox ins Medium und ohne Dox im Vergleich zum Wildtyp bestimmt. In einem Westernblot zeigte sich, dass der Ame1p-Level ohne Dox-Zugabe im Vergleich zum Wildtyp stark erhöht ist, während nach Zugabe von Dox kein Ame1-Protein mehr nachgewiesen werden kann (Abbildung 35A).

Um zu untersuchen, ob die deregulierte Expression von Ame1p zu einer Aktivierung des Spindelpositions-Kontrollpunktes in der Zelle führt, wurden mit Hilfe serieller Tropftests genetische Interaktionen mit dem Spindelkontrollpunktprotein Bub2p untersucht.

Bei einer Wachstumstemperatur von 24 °C konnte man erkennen, dass eine schwache Expression von Ame1p in Verbindung mit dem Fehlen des Kontrollpunktgenes *BUB2* zu einem deutlich verschlechterten Wachstum im Vergleich zum Wildtyp und den

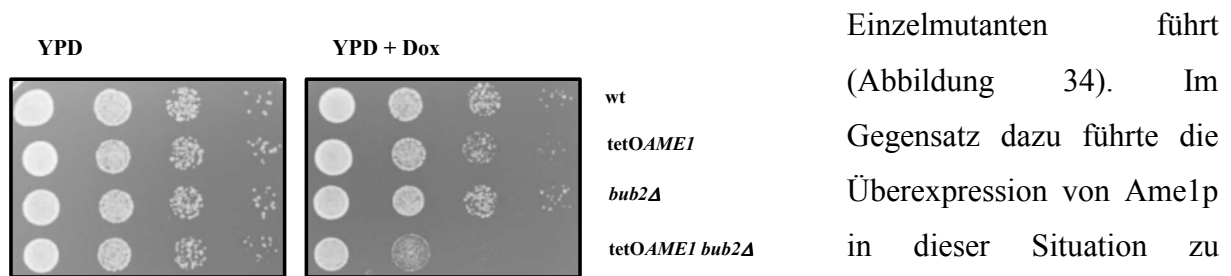
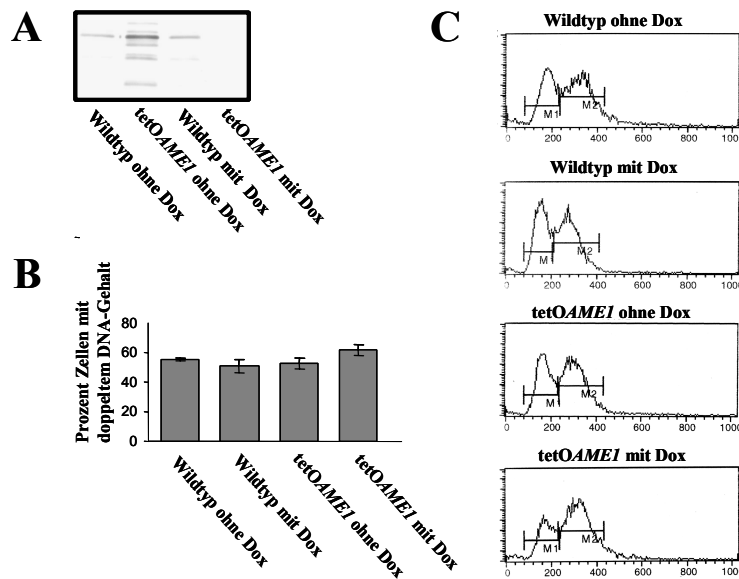


Abbildung 34: Ame1p zeigt genetische Interaktionen mit Bub2p

Hefezellen eines Wildtyp-(wt) Stammes sowie Zellen, bei denen die Expression von *AME1* durch den tetO-Promotor reguliert wird (*tetOAME1*) und die jeweiligen *BUB2*-Deletionsstämme (*bub2Δ*; *tetOAME1 bub2Δ*) wurden über Nacht bei 30 °C in YPD-Medium angezogen. Jeweils 10, 100, 1.000 und 10.000 Zellen wurden auf YPD-Platten mit und ohne Doxyzyclin (Dox) (100 µg/ml) getropft und für 48 Stunden bei 24 °C inkubiert.

Einzelmutanten führt (Abbildung 34). Im Gegensatz dazu führte die Überexpression von Ame1p in dieser Situation zu keinem eingeschränkten Wachstum im Vergleich zum Wildtyp und den Einzelmutanten (Abbildung



**Abbildung 35: Geringe Ame1p-Expression führt zu einer Verzögerung im Zellzyklus**

A) Hefezellen, in denen Ame1p mit dem cMyc Epitop markiert war, wurden für ca. 30 Generationen in YPD-Medium angezogen, welches kein (ohne Dox) oder 100 µg/ml Doxyzyklin (mit Dox) enthielt. Im Stamm tetOAME1 wurde die Expression von AME1 durch den tetO-Promotor reguliert. In einem Western-Blot wurde die Menge an Ame1pcMyc-Protein bestimmt.

B + C) Wildtyp Hefezellen und Zellen, in denen die Expression von AME1 durch den tetO-Promotor reguliert wurde, wurden für ca. 30 Generationen in YPD-Medium angezogen, welches kein (ohne Dox) oder 100 µg/ml Doxyzyklin (mit Dox) enthielt. Im FACS wurde der Anteil an Zellen mit einfachem und doppeltem DNA-Gehalt ermittelt. B) zeigt den prozentualen Anteil an Zellen mit doppeltem DNA-Gehalt, C) zeigt das Ergebnis repräsentativer FACS-Messungen.

Spindelaufbau-Kontrollpunktes sollten die genetischen Interaktionen mit Ame1p untersucht werden. Allerdings gelang es nicht, Doppelmutanten zu generieren. Wahrscheinlich führt eine deregulierte Expression von AME1 bei fehlender Kontrolle durch den Spindelaufbau-Kontrollpunkt zur Lethalität.

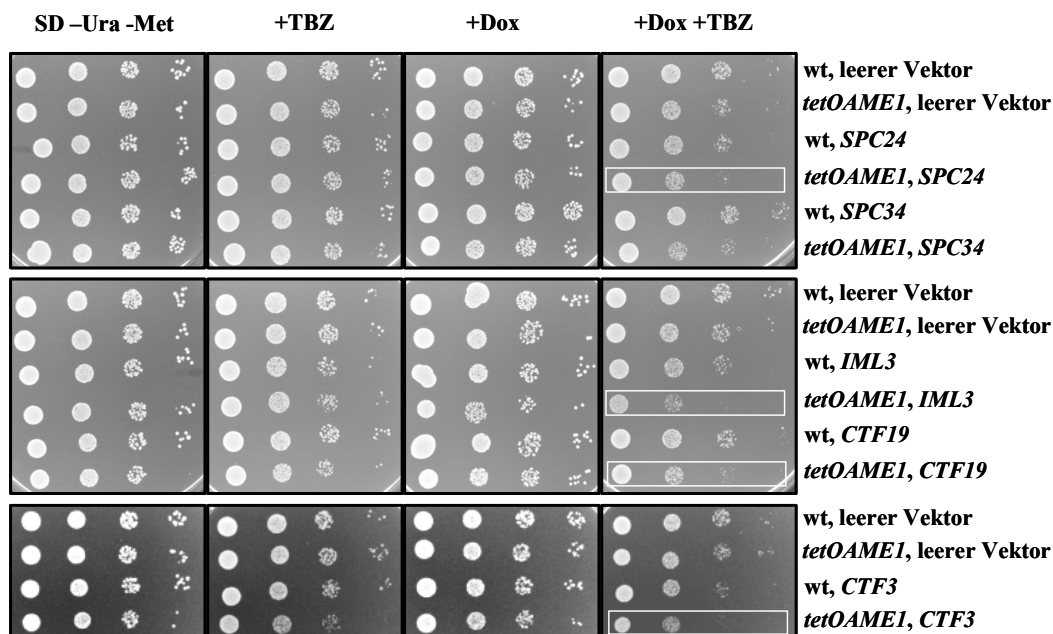
Um die Aktivierung des mitotischen Kontrollpunktes zu bestätigen, wurde der DNA-Gehalt von Zellen bestimmt, in denen Ame1p sowohl stark als auch gering exprimiert wurde. Bei einer geringen Ame1p-Expression fanden sich vermehrt Zellen mit einem doppelten DNA-Gehalt im Vergleich zum Wildtyp und im Vergleich zu Zellen mit erhöhter Ame1p-Expression (Abbildung 35). Während beim Wildtyp sowohl mit und ohne Doxyzyklin als auch bei erhöhter Ame1p-Expression etwa 52 % der Zellen einen doppelten DNA-Gehalt aufwiesen, waren es bei schwacher Expression etwa 62 % der Zellen. Dies deutet ebenfalls darauf hin, dass durch eine heruntergeregelte Ame1p-Expression eine Aktivierung der Spindelkontrollpunkte erfolgt.

34). Unabhängig von der Inkubations-temperatur zeigte sich kein Einfluss von TBZ, einer Mikrotubuli-destabilisierenden Chemikalie, auf das Wachstum der tetOAME1 bub2Δ Doppelmutante im Vergleich zum Wildtyp und den Einzelmutanten (nicht gezeigt). Dies deutet darauf hin, dass die deregulierte Expression von Ame1p zu einer Aktivierung des Spindelkontrollpunktes führt.

Auch für Proteine des

### 3.1.4.2 *Ame1p* zeigt schwache genetischen Interaktionen mit verschiedenen Kinetochorproteinen

Für eine mögliche Eingrenzung der Lokalisierung sowie eine funktionelle Eingrenzung von *Ame1p* innerhalb des Kinetochors sollten genetische Interaktionen mit anderen Kinetochorproteinen untersucht werden. Von Interesse waren nur Phänotypen, die aufgrund einer deregulierten Expression von *Ame1p* und gleichzeitiger Überexpression eines weiteren Kinetochorproteins auftraten (synthetische dosisabhängige Lethalität (SDL)) (Hyland, et al., 1999; Hartman, et al., 2001). Für die Untersuchungen wurden in einem Hefestamm, in dem *AME1* unter der Kontrolle des regulierbaren *tetO*-Promotors exprimiert wurde, verschiedene Kinetochorproteine überexprimiert. Ausgewählt wurden Proteine aus den verschiedenen postulierten Subkomplexen des zentralen und äußeren Kinetochors (*Iml3p*, *Spc24p*, *Spc34p*, *Ctf19p* und *Ctf3p*) (eigene Daten; Janke, et al., 2001; Janke, et al., 2002; Ortiz, et al., 1999; Measday, et al., 2002), da aufgrund der erhaltenen Daten der Ein-Hybrid-Analyse eine direkte Bindung von *Ame1p* an der *CEN*-DNA ausgeschlossen werden konnte. In seriellen Tropftests fand sich sowohl bei Überexpression als auch bei einer geringen Expression von *AME1* kein synthetischer Wachstumsdefekt bei gleichzeitiger Überexpression der anderen Kinetochorproteine (Abbildung 36, SD-Ura-Met, +Dox).

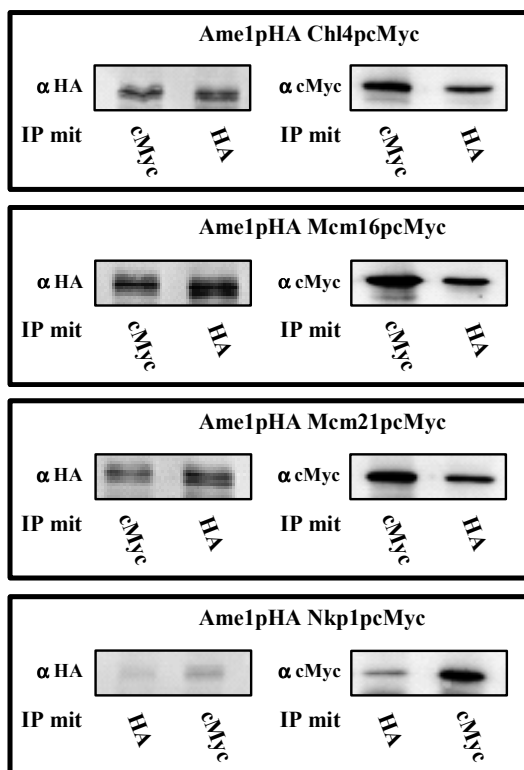


**Abbildung 36: Genetische Interaktionen von *AME1***

Wildtypzellen und Zellen, in denen die Expression von *AME1* durch den *tetO*-Promotor reguliert wurde, wurden mit einem Kontrollvektor (leerer Vektor) und Plasmiden transformiert, in denen verschiedene Kinetochorgene durch den *MET25*-Promotor reguliert exprimiert wurden (*SPC24*, *SPC34*, *IML3*, *CTF19*, *CTF3*). Die Zellen wurden für ca. 25 Generationen in SD-Ura-Met haltigem Medium angezogen, dem kein Doxozyklin (Dox) oder 100 µg/ml Doxozyklin zugesetzt wurde. Zellen, die in Medium ohne Dox angezogen wurden, wurden auf SD-Ura-Met Platten und auf SD+Ura-Met Platten mit 30 µg/ml Thiabendazol (+TBZ) getropft. Zellen, die in Medium mit Dox angezogen wurden, wurden auf SD-Ura-Met Platten mit 100 µg/ml Dox (+Dox) und auf SD+Ura-Met Platten mit 30 µg/ml TBZ und 100 µg/ml Dox (+Dox +TBZ) getropft. Es wurden jeweils 10, 100, 1.000 und 10.000 Zellen getropft. Die weißen Rahmen kennzeichnen Interaktionen.

## Ergebnisse

Durch die Zugabe von TBZ ins Medium konnten jedoch schwache genetische Interaktionen von *AME1* mit den Genen *SPC24*, *IML3*, *CTF19* und *CTF3* bei geringer Expression von *AME1* sichtbar gemacht werden (+Dox +TBZ). Alle Transformanten wuchsen im Vergleich zu den mit dem leeren Vektor transformierten Hefezellen geringfügig schlechter. Die Überexpression von *CTF3* führte zudem auch bei einer Überexpression von *AME1* zu einer leichten Einschränkung im Wachstum auf TBZ-haltigen Medien (+TBZ *tetOAME1*, *CTF3*). Die Daten unterstützen für Amel1p eine Funktion am Kinetochor und bestätigen die genetischen Interaktionen mit Iml3p, dessen Fehlen ebenfalls zu einem verschlechterten Wachstum bei deregulierter Expression von *AME1* führt (Kapitel 3.1.3.8). Die sehr schwachen genetischen Interaktionen deuten allerdings darauf hin, dass die getesteten Proteine möglicherweise teilweise redundante Funktionen im Kinetochor übernehmen.

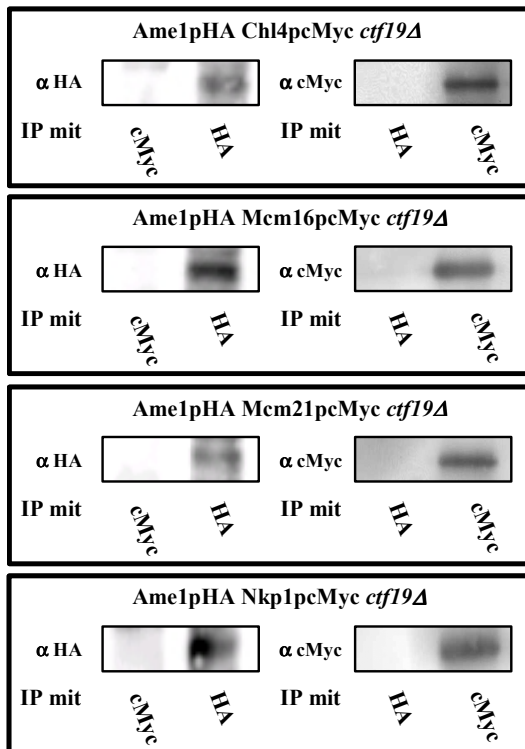


**Abbildung 37: Amel1p zeigt physikalische Interaktionen mit weiteren Kinetochorproteinen**

Endogen HA-markiertes Amel1-Protein (Amel1pHA) wurde in Hefestämmen exprimiert, in denen je ein anderes Kinetochorprotein endogen cMyc-markiert war (Chl4pcMyc, Mcm16pcMyc, Mcm21pcMyc und Nkp1pcMyc). Die physikalischen Interaktionen zwischen Amel1p und den anderen Proteinen wurde mittels Ko-Immunopräzipitation untersucht. Gezeigt werden jeweils in der vorderen Reihe der Western-Blot mit dem gegen das HA-Epitop gerichteten Antikörper ( $\alpha$  HA) und in der hinteren Reihe der Western-Blot mit dem gegen das cMyc-Epitop gerichteten Antikörper ( $\alpha$  cMyc). Unter den Blots ist angegeben, mit welchem Antikörper die Immunopräzipitation (IP) durchgeführt wurde.

### 3.1.4.3 Amel1p interagiert mit weiteren Kinetochorproteinen in Ko-Immunopräzipitationen

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Amel1p am Kinetochor lokalisiert und es mit Iml3p Chl4p abhängig interagiert. Im folgenden sollte daher untersucht werden, ob das Protein auch physikalische Interaktionen mit anderen Kinetochorproteinen zeigt, mit denen auch Iml3p interagiert. 2003 konnten mittels Ko-Immunopräzipitation und Massenspektrometrie zehn potentielle Interaktionspartner von Amel1p identifiziert werden. Mit Hilfe von hydrodynamischen Untersuchungen erfolgte eine Einordnung von Amel1p in einem Subkomplex mit den Proteinen Ctf19p, Okp1p und Mcm21p (COMA-Komplex) (De Wulf, et al., 2003). Unter zu Hilfenahme der Ko-Immunopräzipitation und anschließender Western-Blot Analysen wurden daher die Interaktionen von Amel1p mit den Iml3p-



**Abbildung 38: Physikalische Interaktionen von Ame1p mit anderen Kinetochorproteinen sind abhängig von Ctf19p**

Endogen HA-markiertes Ame1-Protein (Ame1pHA) wurde in Hefestämmen exprimiert, in denen je ein anderes Kinetochorprotein endogen cMyc-markiert war (Chl4pcMyc, Mcm16pcMyc, Mcm21pcMyc und Nkp1pcMyc). Zusätzlich exprimierten die Zellen kein Ctf19p (*ctf19Δ*). Die physikalischen Interaktionen zwischen Ame1p und den anderen Proteinen wurden mittels Ko-Immunopräzipitation untersucht. Gezeigt werden jeweils in der vorderen Reihe der Western-Blot mit dem gegen das HA-Epitop gerichteten Antikörper ( $\alpha$  HA) und in der hinteren Reihe der Western-Blot mit dem gegen das cMyc-Epitop gerichteten Antikörper ( $\alpha$  cMyc). Unter den Blots ist angegeben, mit welchem Antikörper die Immunopräzipitation (IP) durchgeführt wurde.

Interaktionspartnern Chl4p, Mcm16p, Nkp1p und zusätzlich zu Mcm21p untersucht.

Ame1pHA konnte in allen Präzipitaten sowohl nach der Präzipitation mit anti-HA- als auch mit anti-cMyc Antikörpern nachgewiesen werden (Abbildung 37). Ebenso wurden Chl4pcMyc, Mcm16pcMyc, Nkp1pcMyc und wie erwartet auch Mcm21pcMyc nach der Fällung mit beiden Antikörpern im Präzipitat gefunden (Abbildung 37). Dies zeigt, dass Ame1p mit der gleichen Gruppe von weiteren Kinetochorproteinen direkt oder indirekt interagiert wie Iml3p. Da alle getesteten Proteine mit Ame1p interagierten, wurde zusätzlich eine Ko-Immunopräzipitation mit cMyc markiertem Ndc10-Protein aus dem inneren Kinetochor durchgeführt. Für dieses Protein konnte keine Interaktion mit Ame1p nachgewiesen werden (A. Pusole, unveröffentlichte Daten). Dies zeigt, dass die Bindung von Ame1p an das Kinetochor wahrscheinlich nicht direkt über Ndc10 erfolgt.

#### 3.1.4.4 Die Bindung von Ame1p ans Kinetochor ist abhängig von Ctf19p

Nachdem in Ko-Immunopräzipitationsexperimenten gezeigt werden konnte, dass Ame1p neben den COMA-Proteinen mit weiteren Kinetochorproteinen aus dem Iml3p-Bereich interagiert, stellte sich die Frage, ob für diese Interaktionen die Interaktionspartner des COMA-Komplexes benötigt werden. Es wurden daher die Interaktionen von Ame1p mit Chl4p, Mcm16p, Mcm21p und Nkp1p in Abhängigkeit von Ctf19p untersucht. Die Auswahl von Ctf19p erfolgte willkürlich.

In *ctf19Δ*-Mutanten, in denen Ame1p mit dem HA-Epitop fusioniert vorlag und jeweils eines der genannten Proteine mit cMyc fusioniert exprimiert wurde, konnte mit anti-cMyc Antikörpern jeweils nur eine Präzipitation der cMyc-fusionierten Proteine erfolgen, während

## Ergebnisse

---

mit anti-HA Antikörpern nur Ame1pHA präzipitiert werden konnte (Abbildung 38). Dies zeigt, dass Ctf19p für die Bindung von Ame1p an die getesteten Proteine benötigt wird.



## 3.2 Das trifunktionale Folsäuresynthese-Protein Follp

Follp ist ein trifunktionales Protein der Hefe *S. cerevisiae*, welches die drei enzymatischen Aktivitäten Dihydroneopterin-Aldolase (DHNA), 7,8-Dihydro-6-Hydroxymethylpterin-Pyrophosphokinase (HPPK) und Dihydropteroat-Synthase (DHPS) beinhaltet (Güldener, 2000). Diese drei Enzymaktivitäten führen drei aufeinanderfolgende Schritte der Folsäure-Biosynthese durch (Güldener, 2000) (Abbildung 8). Zellen, denen das Foll1-Protein fehlt, können nur nach Zugabe von Folsäure oder ihren Derivaten, hier 5-Formyltetrahydrofolat (FA), wachsen. Das Zellwachstum korreliert dabei mit der zugegebenen Menge FA. Trotzdem weisen die Kolonien immer eine geringere Größe auf als die entsprechender Wildtypzellen (Güldener, 2000).

### 3.2.1 Die Abwesenheit des *FOLI*-Gens induziert filamentöses und adhäsives Wachstum

Hefezellen können als Antwort auf verschiedene Umweltbedingungen von der hefeartig wachsenden Form in eine filamentös wachsende Zellform wechseln. Dieser sogenannte dimorphe Wechsel geht einher mit einer erhöhten Adhäsivität sowohl der Zellen untereinander als auch der Zellen an den Untergrund (s. Kapitel 1.2.1). Zellen eines *fol1Δ*-Stammes wachsen im Gegensatz zu Wildtypzellen filamentös, bilden elongierte Zellen aus und zeigen eine vermehrte Adhäsivität an den Untergrund (Güldener, 2000).

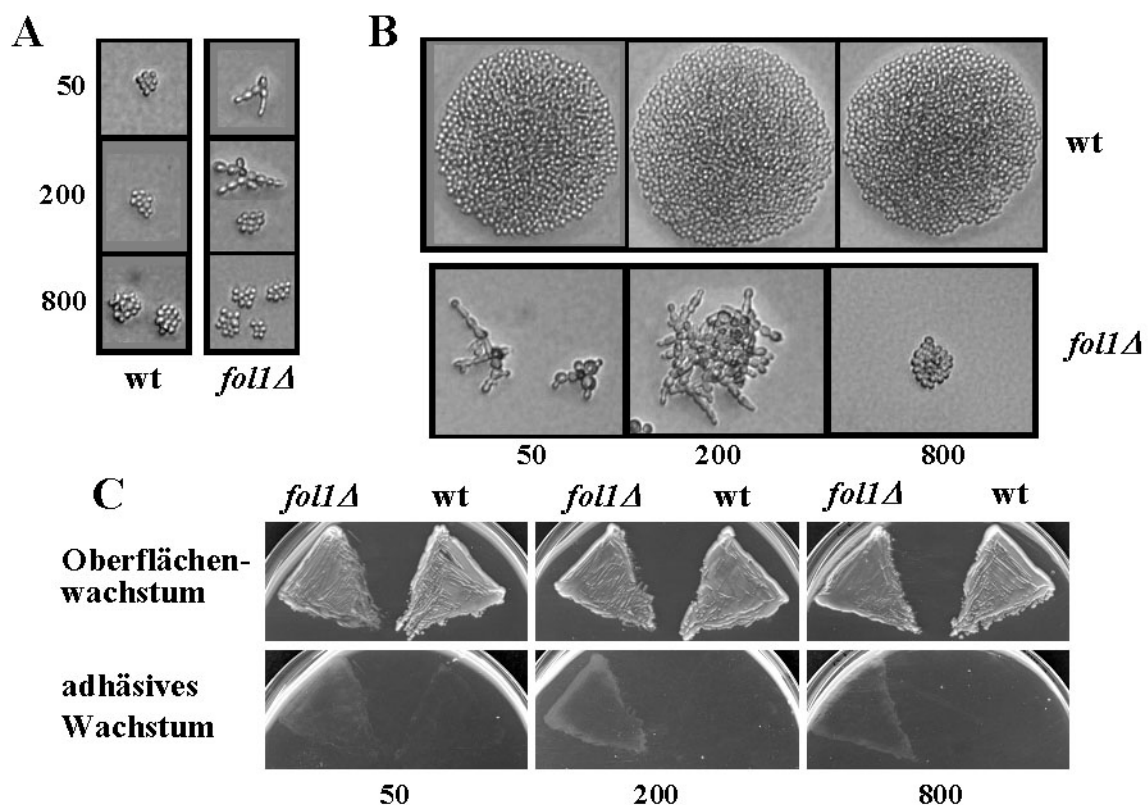
Nicht alle Laborstämme können diesen dimorphen Wechsel durchführen. Viele zeigen nur hefeartiges Wachstum, nicht aber filamentöses Wachstum. Möglicherweise beruht dies auf einer Nonsense-Mutationen im *FLO8*-Gen, die bereits im Laborstamm S288C nachgewiesen wurde (Liu et al., 1996). Auch Hefestämme mit CEN.PK2-Hintergrund zeigen im Gegensatz zu Hefestämmen mit CGX31-Hintergrund kein nährstoffabhängiges filamentöses Wachstum. Für Studien des filamentösen und adhäsiven Wachstums werden deshalb häufig Stämme mit CGX31-Hintergrund verwendet. Allerdings zeigen in diesem Stammhintergrund haploide Hefestämme nach 4 bis 6 Tagen Inkubation auf YPD-Medium invasives Wachstum (Braus, et al., 2003; Roberts and Fink, 1994; Rupp, et al., 1999).

Um herauszufinden, ob sowohl das filamentöse als auch das adhäsive Wachstum abhängig von der zugegebenen FA-Menge ist, wurden haploide Zellen mit einem genetischen CEN.PK2-Hintergrund auf YPD<sup>+</sup>-Medium angezogen, dem verschiedene Mengen FA zugesetzt wurden. Als Vorteil diene hierbei die Tatsache, dass die haploiden Wildtypzellen auch nach mehrtägiger Inkubation kein adhäsives Wachstum zeigen.

## Ergebnisse

Die mikroskopische Analyse von *fol1Δ*-Zellen nach 8-stündiger Inkubation bei 30 °C auf YPD<sup>+</sup>-Medien mit verschiedenen Mengen an FA zeigte, dass die Zellform in Abhängigkeit von der zugegebenen Menge FA variierte. Während Wildtypzellen unabhängig von der FA Konzentration eine reguläre abgerundete Hefeform zeigten (Abbildung 39A), bildeten die *fol1Δ*-Zellen elongierte, filamentös wachsende Zellketten. Das Ausmaß dieser Filamentierung war direkt abhängig von der zugegebenen FA Menge. Bei einer Konzentration von 50 µg/ml waren fast alle Zellen vergrößert und elongiert (Abbildung 39A), während auf 200 µg/ml nur noch zwischen 50 % und 80 % der Zellen diesen Phänotyp zeigten. Auf Medium mit 800 µg/ml FA wuchsen so gut wie alle Zellen als abgerundete Zellen in einer regelmäßigen Hefeform (Abbildung 39A).

Nach 24-stündiger Inkubation bei 30 °C wurden die Zellen erneut mikroskopisch untersucht. Auf 50 µg/ml FA sowie auf 200 µg/ml FA zeigten die *fol1Δ*-Zellen weiterhin filamentöses Wachstum mit elongierten Zellen (Abbildung 39B, *fol1Δ*). Auf 800 µg/ml hingegen hatten sich unregelmäßig geformte Mikrokolonien ausgebildet, deren Zellen eine reguläre Hefeform



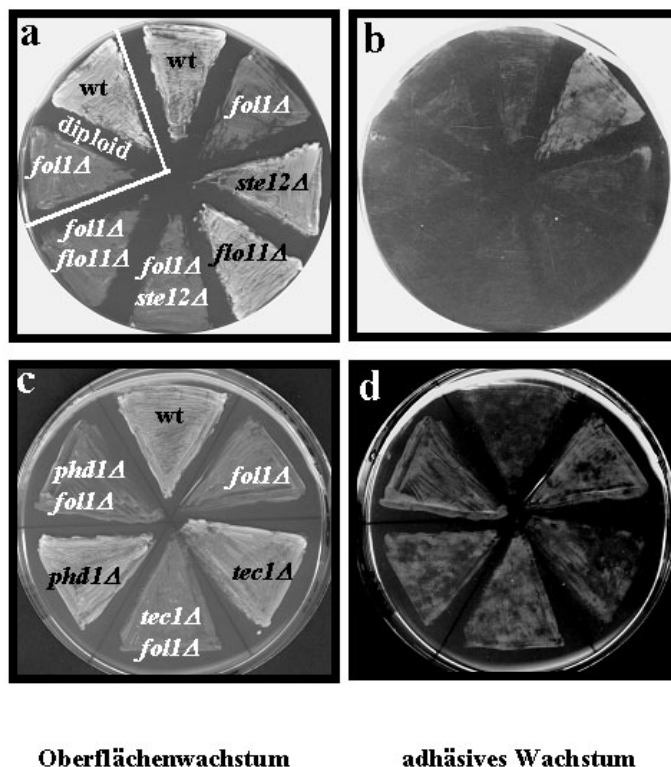
**Abbildung 39: Pseudohyphales und adhäsives Wachstum eines *fol1Δ*-Hefestammes**

A und B: Wildtyp (wt) und *fol1Δ*-Hefezellen wurden auf YPD-Platten mit unterschiedlichen Mengen 5' Formyltetrahydrofolat (FA) (50, 200 oder 800 µg/ml) für 24 h bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in Wasser resuspendiert und Aliquots auf frischen YPD-Platten mit denselben Mengen FA ausplattiert. Einzelne Kolonien wurden nach (A) 8 h und (B) 24 h Inkubation bei 30 °C photographiert. (C) Dieselben Hefestämme wurden auf YPD-Platten mit unterschiedlichen Mengen FA (50, 200 oder 800 µg/ml) ausgestrichen und für 24 h bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen erneut auf denselben Medien ausgestrichen und für 48 h bei 30 °C inkubiert. Die Platten wurden photographiert (Oberflächenwachstum) und anschließend mit Wasser abgewaschen. Hierauf wurden die Platten erneut photographiert (adhäsives Wachstum). Alle Stämme haben CEN.PK2-Hintergrund.

## Ergebnisse

aufwiesen. Der Wildtyp war zu regelmäßig geformten kleinen Kolonien herangewachsen (Abbildung 39B, wt). Diese Daten zeigen, dass das Fehlen von Flo1p zu einer Induktion des filamentösen Wachstums auf Nährmedien führt, auf denen haploide Hefezellen normalerweise kein filamentöses Wachstum zeigen. Die Ausprägung der Filamentierung ist dabei abhängig von der supplementierenden FA-Menge.

Da die Ausprägung von filamentösem Wachstum häufig mit adhäsivem bzw. invasivem Wachstum einhergeht, sollte untersucht werden, ob *fol1Δ*-Zellen abhängig von der FA-Konzentration im Medium verstärktes adhäsives Wachstum aufweisen. Hierzu wurden haploide Wildtyp- und *fol1Δ*-Zellen auf Vollmedium mit denselben FA-Mengen, die für die Untersuchung des adhäsiven Wachstums verwendet wurden, für 48h angezogen und anschließend auf adhäsives Wachstum hin untersucht. Während der Wildtyp unter keiner der gegebenen Bedingungen adhäsiv wuchs, zeigten die *fol1Δ*-Zellen vermehrtes adhäsives Wachstum unabhängig von der FA-Konzentration im Medium (Abbildung 39C). Dies zeigt, dass die *fol1Δ*-induzierte Filamentierung nicht für das adhäsive Wachstum benötigt wird, da



**Abbildung 40: Das adhäsive Wachstum eines *fol1Δ*-Stammes ist abhängig von Ste12p und Flo11p, aber unabhängig von Tec1p und Phd1p**

Einzel- und Doppeldisruptionsstämme wurden auf synthetischem Medium ohne Aminosäuren mit 50 µg/ml 5' Formyltetrahydrofolat (FA) ausgestrichen und für 24 h bei 30 °C inkubiert. Die Platten wurden fotografiert (Oberflächenwachstum) und anschließend mit Wasser abgewaschen. Dann wurden die Platten erneut fotografiert (adhäsives Wachstum). Alle Stämme haben einen CGX31 Hintergrund und sind mit Ausnahme der beiden markierten haploid mit

die *fol1Δ*-Zellen bei hohen FA-Konzentrationen hefeartiges Wachstum zeigten.

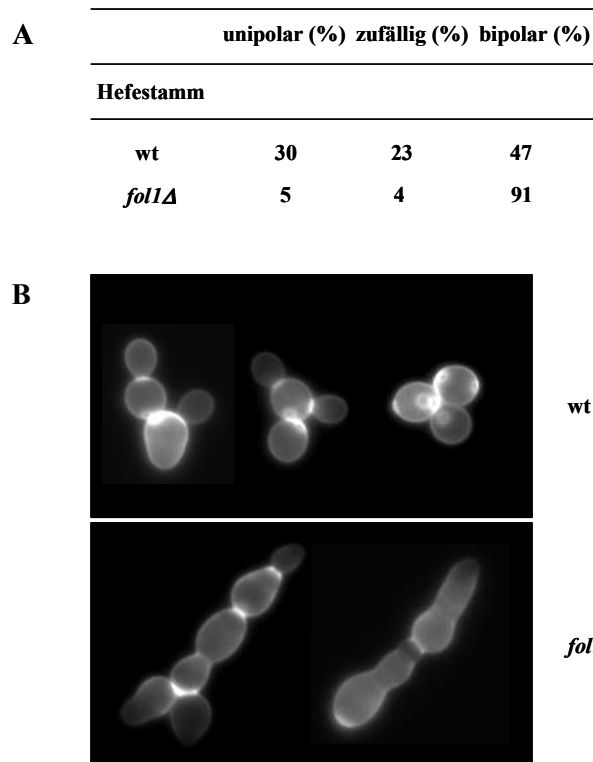
Bereits in früheren Experimenten konnte gezeigt werden, dass eine haploide *fol1Δ*-Mutante in einem CGX31-Stammhintergrund trotz schwächeren Wachstums auf YPD<sup>+</sup>-Medium mit 125 µg/ml FA nach fünftägiger Inkubation bei 30 °C genauso invasiv wuchs wie der haploide Wildtypstamm (Güldener, 2000). Da aufgrund des adhäsiven Wachstums des Wildtypstammes auf diesem Medium keine Differenzierung zwischen dem durch das Fehlen von Flo1p und dem durch den Stammhintergrund bedingten adhäsiven Wachstums zu bestimmen war, sollte untersucht werden, ob eine *fol1Δ*-

Mutante mit CGX31-Hintergrund auch auf einem synthetischen Minimalmedium ein vermehrtes adhäsives Wachstum im Vergleich zum Wildtyp zeigt. Hierzu wurden Zellen auf Minimalmedium mit Uracil und 50 µg/ml FA angezogen und nach 24 stündiger Inkubation bei 30 °C von diesen Platten abgewaschen. Während der haploide *fol1Δ*-Stamm unter den gegebenen Bedingungen adhäsives Wachstum zeigte, konnte dies für den haploiden Wildtypstamm nicht beobachtet werden (Abbildung 40b und d). Dies belegt, dass auch in diesem Stammhintergrund das Fehlen von Follp ein vermehrtes adhäsives Wachstum in haploiden Hefestämmen induziert.

Da auch diploide *fol1Δ*-Stämme mit einem CGX31-Hintergrund filamentöses Wachstum zeigen (Güldener, 2000), sollte auch für diese Stämme untersucht werden, ob sie unter diesen Bedingungen ein vermehrtes adhäsives Wachstum aufweisen. Diploide *fol1Δ*-Stämme zeigten nach 24-stündiger Inkubation auf synthetischem Minimalmedium mit Uracil und FA kein adhäsives Wachstum und verhielten sich damit wie der entsprechende Wildtypstamm (Abbildung 40a). Dies zeigt, dass filamentöses und adhäsives Wachstum nicht aneinander gekoppelt sind und unabhängig voneinander auftreten können.

### **3.2.2 Durch *fol1Δ* induziertes filamentöses Wachstum führt zu einer Änderung des Knospungsmusters und der Aktinverteilung**

Auch haploide *fol1Δ*-Zellen mit CGX31-Stammhintergrund zeigen filamentöses Wachstum (Abbildung 42c) (Güldener, 2000). Wie in Kapitel 1.2 beschrieben, geht filamentöses Wachstum, welches durch einen Nährstoffmangel hervorgerufen wird, einher mit einer Veränderung sowohl des Knospungsmusters als auch dem Aufbau des Zytoskeletts. Es war daher von Interesse, ob und wie sich das Knospungsmuster und der Aufbau des Aktin-Zytoskeletts der *fol1Δ*-Zellen im Vergleich zu den Wildtypzellen verändert. Während haploide Wildtypzellen normalerweise ein axiales (unipolares) Knospungsmuster aufweisen (Reviews: (Chant, 1999; Madden and Snyder, 1998)), zeigen filamentös wachsende Zellen hauptsächlich ein distales (bipolares) Knospungsverhalten. Der haploide CGX31 Wildtyp zeigte zu 30 % ein unipolares Knospungsmuster, während nur 47 % der Zellen bipolar wuchsen. Der *fol1Δ*-Stamm zeigte wie bei einem durch Glukosemangel induzierten filamentösen Wachstum hauptsächlich ein bipolares Knospungsmuster (91 %) mit Knospungsnarben am distalen Pol zur Geburtsnarbe (Abbildung 41).



**Abbildung 41: Knospungsmuster haploider Hefestämme**

A) Das Knospungsmuster wurde bestimmt, indem Zellen nach 24-stündiger Inkubation bei 30 °C von einer YPD<sup>+</sup>-Platte mit 50 µg/ml 5' Formyltetrahydrofolat abgekratzt wurden und in PBS mit Calcofluor White resuspendiert wurden. Nur Zellen mit mindestens 2 Knospungsnarben wurden bei 40-facher Vergrößerung identifiziert und gezählt (mindestens 100 Zellen). Unipolar: Knospungsnarben nur an einem Pol der Zelle; bipolar: Knospungsnarben an beiden Polen der Zelle; zufällig: Knospungsnarben nicht ausschließlich an den Polen der Zelle zu finden.

B) Calcofluor White gefärbte Zellen, die die unterschiedlichen Knospungsmuster des Wildtyps (wt) und der *fol1Δ*-Mutante (*fol1Δ*) zeigen, wurden bei 40-facher Vergrößerung photographiert.

Die Untersuchungen wurden in einem CGX31-Hintergrund durchgeführt.

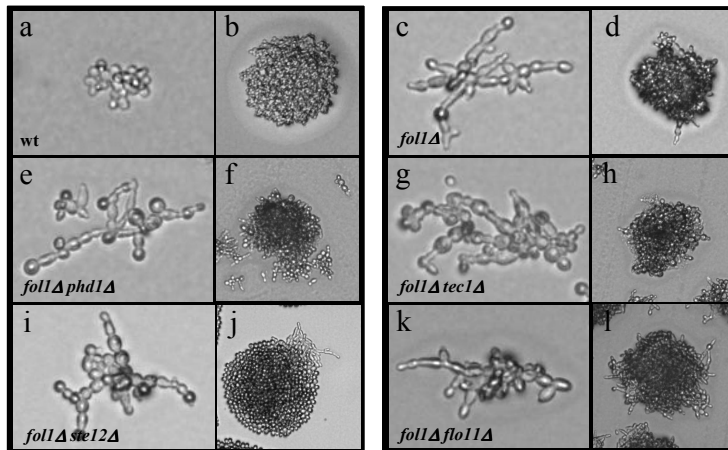
Erscheintens der Knospen, sowie stark leuchtende Aktinkabel (nicht gezeigt).

Dies zeigt, dass sich das durch das Fehlen von Follp induzierte filamentöse Wachstum morphologisch nicht von dem durch andere Nährstoffmangel induzierten filamentösen Wachstum unterscheidet.

### 3.2.3 Das filamentöse Wachstum eines *fol1Δ*-Stammes ist unabhängig von Tec1p und Phd1p

Für die Induktion des Nährstoff-abhängigen filamentösen und adhäsiven Wachstums spielen verschiedene Proteine eine Rolle. Einer der Hauptregulationswege ist eine Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK) Kaskade, an deren Ende die beiden Transkriptionsfaktoren Tec1p und Ste12p stehen (Kapitel 1.2.5). Zellen, denen diese beiden Proteine fehlen, weisen Defekte sowohl im adhäsiven als auch im filamentösen Wachstum auf (Liu, et al., 1993; Madhani and Fink, 1997; Palecek, et al., 2002; Gavrias, et al., 1996). Es stellte sich daher die Frage, ob die beiden Proteine auch für das *fol1Δ*-vermittelte adhäsive und filamentöse Wachstum benötigt

Es war ebenfalls von Interesse, ob auch das Aktin-Zytoskelett dieselben spezifischen Veränderungen im Vergleich zum Wildtyp aufwies. Für die Untersuchung des Aktins in Wildtyp und *fol1Δ*-Zellen wurden Zellen auf YPD<sup>+</sup>-Platten mit 50 µg/ml FA angezogen und anschließend wurde das Aktin mit Rhodamin konjugiertem Phalloidin sichtbar gemacht. Die *fol1Δ*-Zellen zeigten im Vergleich zum Wildtyp die für pseudohyphal wachsende Zellen typische verstärkte Polarität der Aktinflecken an den äußersten Enden der Tochterzellen während des



**Abbildung 42: Filamentöses Wachstum eines *follΔ*-Hefestammes ist unabhängig von *PHD1* und *TEC1***

Zellen eines haploiden Wildtyp-Stammes YUG94 (wt), die *follΔ*-Einzeldisruption (*follΔ*), die *follΔphd1Δ* (*follΔphd1Δ*) sowie die *follΔtec1Δ* (*follΔphd1Δ*) Doppeldisruptionsstämme wurden auf YPD-Platten mit 50 mg/ml 5' Formyltetrahydrofolat (FA) für 24 h bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in Wasser resuspendiert und Aliquots auf frischen YPD-Platten mit derselben Mengen FA ausplattiert. Einzelne Kolonien wurden nach 8 h (a) 24 h (b, c, e, g, i, k) und 72 h Inkubation (d, f, h, j, l) bei 30 °C photographiert. Alle *follΔ*-Stämme zeigten filamentöses Wachstum nach 24 h Inkubation und bildeten unregelmäßige Kolonien. Hintergrund aller Stämme ist CGX31.

werden. Für Ste12p konnte bereits in früheren Experimenten gezeigt werden, dass bei Folatmangel das adhäsive Wachstum einer *follΔ*-Mutante auf YPD<sup>+</sup>-Vollmedium von diesem Protein abhängig ist (Güldener, 2000), wohingegen das filamentöse Wachstum davon unabhängig ist (Abbildung 42k und l). Um besser zwischen einem *follΔ*-vermittelten adhäsiven Wachstum und dem in CGX31-Stämmen natürlicherweise auftretenden adhäsiven

Wachstum zu unterscheiden, wurde das adhäsive Wachstum ebenfalls auf synthetischem Minimalmedium untersucht. Die *ste12Δ*-Mutante zeigte noch eine leichte Restadhäsivität, während die *ste12ΔfollΔ*-Doppelmutante nicht mehr an den Agar adhärierte (Abbildung 40A und B). Dies zeigt, dass Ste12p auch auf diesem Medium für das *follΔ*-vermittelte adhäsive Wachstum benötigt wird. Anhand dieser Daten stellte sich die Frage, ob das *follΔ*-vermittelte invasive bzw. filamentöse Wachstum auch über Tec1p reguliert wird, da Tec1p bei Nahrungsmangel gemeinsam mit Ste12p für die Regulation filamentierungs- und adhäsionsspezifischer Gene benötigt wird. Hierzu wurde das adhäsive Wachstum einer *tec1Δ*-Mutante und einer *tec1ΔfollΔ*-Doppelmutante auf synthetischem Minimalmedium untersucht (Abbildung 40C und D). Das Fehlen von Tec1p führte zu einem vermehrten adhäsiven Wachstum im Vergleich zum Wildtyp. Im Vergleich zur *follΔ*-Einzelmutterante war es allerdings reduziert. Die *tec1ΔfollΔ*-Doppelmutante zeigte dasselbe Maß an Adhäsivität wie die *follΔ*-Einzelmutterante (Abbildung 40C und D). Hieraus kann man schließen, dass im Gegensatz zu Ste12p das invasive Wachstum unabhängig von Tec1p ist. Insgesamt lassen die Ste12p und Tec1p-Daten vermuten, dass Ste12p bei der *follΔ* vermittelten Adhäsion an das Medium eine wichtigere Rolle spielt als sein Interaktionspartner Tec1p.

Um zudem zu bestimmen, ob auch die *follΔ*-vermittelte Filamentierung durch Ste12p oder Tec1p reguliert wird, wurde für beide Doppeldeletionsstämme die Filamentierung auf YPD<sup>+</sup>-

## Ergebnisse

Medium mit 50 µg/ml FA untersucht. Beide Stämme zeigten, wie der *fol1Δ*-Stamm, filamentöses Wachstum und nach längerer Inkubation unregelmäßig geformte Kolonien (Abbildung 42g und f) (Güldener, 2000), während die beiden *ste12Δ* und *tec1Δ*-Einzelmutanten sich wie der Wildtyp verhielten (nicht gezeigt). Um einen Vergleich zum Filamentierungsgrad einer *fol1Δ*-Einzelmutante zu erhalten, wurde zusätzlich das Knospungsmuster der beiden Doppeldeletionsstämme bestimmt. Sowohl der *fol1Δ ste12Δ* als auch der *fol1Δ tec1Δ*-Stamm zeigten wie der *fol1Δ*-Stamm ein bipolares Knospungsmuster

Hefestamm	unipolar (%)	zufällig (%)	bipolar (%)
wt	30	23	47
<i>fol1Δ</i>	5	4	91
<i>fol1Δ ste12Δ</i>	6	21	73
<i>fol1Δ flo11Δ</i>	6	7	87
<i>fol1Δ phd1Δ</i>	4	8	88
<i>fol1Δ tec1Δ</i>	11	5	84

**Abbildung 43: Knospungsmuster verschiedener haploider Hefestämme**

Das Knospungsmuster wurde bestimmt, indem Zellen nach 24-stündiger Inkubation bei 30 °C von einer YPD<sup>+</sup>-Platte mit 50 µg/ml 5' Formyltetrahydrofolat abgekratzt wurden und in PBS mit Calcofluor White resuspendiert wurden. Nur Zellen mit mindestens 2 Knospungsnarben bei 40-facher Vergrößerung identifiziert und gezählt (mindestens 100 Zellen). Unipolar: Knospungsnarben nur an einem Pol der Zelle; bipolar: Knospungsnarben an beiden Polen der Zelle; zufällig: Knospungsnarben nicht ausschließlich an den Polen der Zelle zu finden.

auf Vollmedium, nicht aber für das filamentöse Wachstum benötigt wird (Güldener, 2000) (Abbildung 42). Auch auf synthetischem Minimalmedium zeigte weder die *flo11Δ*-Mutante noch die *fol1Δ flo11Δ*-Doppelmutante adhäsives Wachstum (Abbildung 40A und B). Auch für diese Mutante wurde das Knospungsmuster bestimmt. Die *fol1Δ flo11Δ*-Doppelmutante weist dasselbe bipolare Knospungsmuster wie die *fol1Δ*-Mutante auf (Abbildung 43). Das bedeutet, dass Flo11p für die Ausbildung der Pseudohyphen nicht gebraucht wird, aber wichtig ist für das adhäsive Wachstum einer *fol1Δ*-Mutante.

Da die untersuchten Proteine aus dem für das filamentöse und adhäsive Wachstum wichtigen MAPK-Weg keinen Einfluss auf das *fol1Δ*-induzierte filamentöse Wachstum zeigten, stellte sich die Frage, ob eventuell andere Proteine, die für das filamentöse und adhäsive Wachstum eine Rolle spielen, die Filamentierung beeinflussen. Eines der Proteine, welches das filamentöse Wachstum von Hefezellen unabhängig vom cAMP-Weg und der MAPK-

(Abbildung 43). Die *fol1Δ ste12Δ* Doppelmutante zeigte allerdings, ähnlich zum Wildtyp, auch einen hohen Anteil zufällig knospender Zellen. Aus den Daten kann man schließen, dass das filamentöse Wachstum eines *fol1Δ*-Stammes zum Großteil unabhängig von Tec1p und Ste12p ist.

Eines der wichtigen Gene, die für das adhäsive Wachstum eine Rolle spielen, ist das durch Ste12p und Tec1p regulierte *FLO11*-Gen, welches für ein Zelloberflächen-Flokkulin kodiert. Aufgrund des Einflusses von Ste12p auf das *fol1Δ*-induzierte adhäsive Wachstum, stellte sich die Frage, ob auch Flo11p hierbei eine Rolle spielt. Bereits in früheren Experimenten konnte gezeigt werden, dass Flo11p für das adhäsive Wachstum eines *fol1Δ*-Stammes

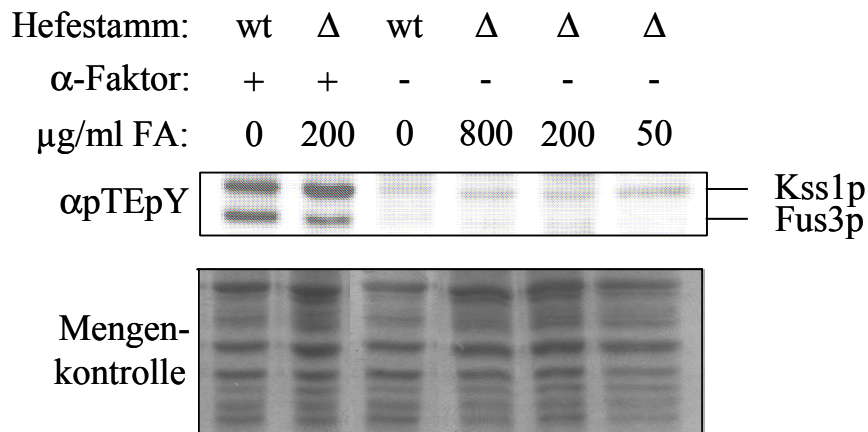
Kaskade reguliert, ist der Transkriptionsfaktor Phd1p, dessen Überexpression zu einer vermehrten Filamentierung in diploiden Hefezellen und zudem zu einer verstärkten Expression von *FLO11* führt (Gimeno and Fink, 1994; Palecek, et al., 2002). Es sollte daher auch für dieses Protein untersucht werden, ob es für das filamentöse und adhäsive Wachstum eines *fol1Δ*-Stammes benötigt wird. Die haploide *phd1Δ*-Mutante wie auch die *fol1Δ phd1Δ*-Doppelmutante zeigten ein starkes adhäsives Wachstum vergleichbar zu dem der *fol1Δ*-Einzelmutante (Abbildung 40C und D). Es war daher von Interesse, ob die Muntantenstämme auch eine verstärkte Filamentierung zeigten. Der haploide *phd1Δ*-Stamm verhielt sich wie der Wildtyp und zeigte keine vermehrte Filamentierung (nicht gezeigt). Der *fol1Δ phd1Δ*-Stamm jedoch zeigte, wie der haploide *fol1Δ*-Stamm, ein verstärktes filamentöses Wachstum (Abbildung 42e). Nach längerer Inkubation entstehen bei der Doppelmutante wie beim *fol1Δ*-Stamm unregelmäßig geformte Kolonien (Abbildung 42f). Das Ausmaß der Filamentierung wurde anhand des Knospungsmusters bestimmt. Auch dieses unterschied sich nicht signifikant von dem der *fol1Δ*-Mutante. Auch der *fol1Δ phd1Δ*-Stamm zeigte ein bipolares Knospungsmuster (Abbildung 43). Dies lässt darauf schließen, dass Phd1p wie Tec1p keinen Einfluss auf das Knospungs- und Adhäsionsverhalten eines *fol1Δ*-Stammes nimmt. Allerdings konnte in diesen Studien zum ersten Mal ein Einfluss von Phd1p auf das invasive Wachstum eines haploiden Hefestammes beobachtet werden.

### **3.2.4 Die Fus3p und Kss1p MAP Kinasen werden in einer *fol1Δ*-Mutante nicht verstärkt phosphoryliert**

Aufgrund der Abhängigkeit des adhäsiven Wachstums einer *fol1Δ*-Mutante von dem Transkriptionsfaktor Ste12p sollte untersucht werden, ob das filamentöse Wachstum einer *fol1Δ*-Mutante einhergeht mit einer Phosphorylierung der MAPK Kss1p.

Um nachzuweisen, dass eine Aktivierung von Kss1p in einer *fol1Δ*-Mutante grundsätzlich möglich ist, wurde in einem Kontrollexperiment die Phosphorylierung von Kss1p und Fus3p nach der Zugabe von  $\alpha$ -Pheromon sowohl im Wildtyp- als auch im *fol1Δ*-Stamm nachgewiesen (Abbildung 44). Sowohl Wildtyp als auch *fol1Δ*-Zellen zeigten unabhängig von der zugegebenen FA-Menge zum Medium ein ähnliches geringes Phosphorylierungsniveau von Fus3p und Kss1p (Abbildung 44), was gegen eine konstitutive Aktivierung von Kss1p bei der *fol1Δ*-vermittelten Induktion des filamentösen Wachstums spricht.





**Abbildung 44: Der Phosphorylierungsgrad von Kss1p und Fus3p wird in *fol1A*-Stämmen nicht verändert**

Haploide Zellen eines Wildtypstammes (wt) und einer *fol1A*-Mutante wurden für 24 h bei 30 °C in YPD<sup>+</sup>-Medium mit verschiedenen Mengen 5' Formyltetrahydrofolat (FA; 0, 50, 200 oder 800  $\mu$ g/ml) inkubiert. Logarithmisch wachsende Zellen beider Stämme wurden entweder für 15 min mit 0,15  $\mu$ M  $\alpha$ -Faktor (+) behandelt oder nicht (-). Der Phosphorylierungsgrad der MAPK wurde mittels Immunoblot mit einem Antikörper bestimmt, der spezifisch gegen die phosphorylierten MAPK gerichtet ist ( $\alpha$ pTEpY; (Sabbagh, et al., 2001)). Die Gesamtproteinmengen wurden über ein Coomassie-Gel bestimmt (Mengenkontrolle).

### 3.2.5 Die Deletion von *FOL1* verursacht eine verstärkte Expression von Flo11p

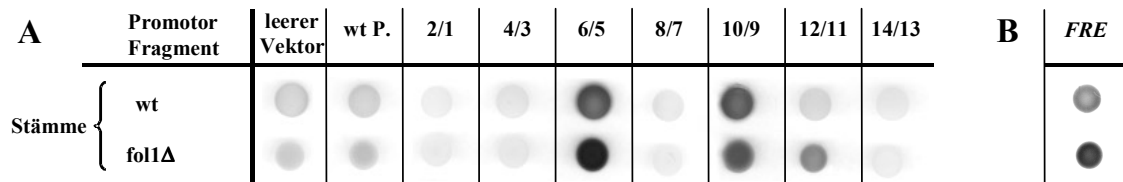
Die vorangehenden Studien konnten zeigen, dass das adhäsive Wachstum eines *fol1A*-Stammes abhängig ist von Ste12p und Flo11p. Wie in Kapitel 1.2.3 gezeigt, spielen viele Signalwege und Faktoren eine wichtige Rolle bei der nährstoffinduzierten Filamentierung und Adhäsivität von Hefestämmen. Eines der am besten regulierten Gene ist hierbei *FLO11*. Aufgrund des Einflusses von Flo11p und seinem direkten Transkriptionsaktivator Ste12p auf das *fol1A*-induzierte adhäsive Wachstum stellte sich daher die Frage, ob es auch in *fol1A*-Stämmen zu einer verstärkten Expression von Flo11p kommt. Anhand von Promotorstudien mit Hilfe des yEGFP-Reportergens konnte bereits gezeigt werden, dass es in einem *fol1A*-Stamm zu einer Aktivierung der *FLO11*-Promotor-Aktivität kommt, und dass diese abhängig ist von Ste12p (Güldener, 2000).

Um herauszufinden, welche Bereiche des Promotors für diese Aktivierung verantwortlich sind, wurde die Aktivierung von nichtüberlappenden 400 bp Fragmenten des *FLO11*-Promotors untersucht (Rupp, et al., 1999). Da *fol1A*-Zellen in Flüssigkulturen keine elongierten Zellen und auch keine filamentösen Ketten zeigten, wurden die Studien auf Medien durchgeführt, die es dem *fol1A*-Stamm erlaubten, adhäsiv zu wachsen, während der Wildtyp kein adhäsives Wachstum zeigte. Der Nachweis des verwendeten lacZ-Reporterproteins erfolgte über ein  $\beta$ -Gal-Überschichtungsexperiment.

## Ergebnisse

Für den Volllängenpromotor zeigte sich unter den gewählten Versuchsbedingungen im Vergleich zum leeren Plasmid sowohl für den Wildtyp als auch für die *fol1Δ*-Mutante keine deutliche Aktivierung der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität. Die Aktivität des Volllängenpromotors in der *fol1Δ*-Mutante war nur leicht erhöht im Vergleich zum Wildtyp. Es konnten allerdings zwei Abschnitte des Promotors identifiziert werden, die die Expression der  $\beta$ -Galaktosidase im *fol1Δ*-Stamm im Vergleich zum Wildtyp deutlich verstärkten (Abbildung 45A). Bei den Fragmenten handelt es sich um die Promotorabschnitte -2000 bis -2400 bp (FLO11-12/11) sowie den Abschnitt -800 bis -1200 bp (FLO11-6/5). Dies spricht dafür, dass diese Regionen durch die Abwesenheit von Follp aktiviert werden.

Um der Frage nachzugehen, ob es sich hier neben möglichen anderen Regulationsmöglichkeiten um eine Ste12p und/oder Ste12p/Tec1p-abhängige Regulation handelt, wurde zusätzlich die Aktivierung eines *FRE*-Elementes (filamentation responsive element) untersucht. *FRE* ist die Bindestelle für die beiden MAPK-abhängigen Proteine Ste12p und Tec1p. Auch hier konnte in der *fol1Δ*-Mutante eine verstärkte Expression des Reporterproteins im Vergleich zum Wildtypstamm beobachtet werden (Abbildung 45B). Die weiteren getesteten Fragmente zeigten keine signifikante Aktivierung der Expression in der *fol1Δ*-Mutante.



**Abbildung 45: FLO11-Promotor-Fragmente werden in *fol1Δ*-Stämmen anders aktiviert als in Wildtyp-Stämmen**

A) Wildtyp (wt) und *fol1Δ*-Zellen transformiert mit individuellen 400 bp *FLO11*-Promotor-Fragmenten, dem Volllängen *FLO11*-Promotor (wt P.) und einem Plasmid ohne Promotorsequenz (leerer Vektor), die in die UAS eines *CYC::lacZ*-Reporter Plasmids kloniert worden war (Rupp, et al., 1999), wurden auf synthetisches Medium ohne Aminosäuren mit 50  $\mu$ g/ml FA getropft und für 25 h bei 30 °C bis zu einer Zellzahl von ca.  $4 \cdot 10^7$  Zellen inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen mit Agarose überschichtet und ein  $\beta$ -Galaktosidase-Versuch durchgeführt. Alle Stämme sind haploid mit CGX31 Hintergrund.

B) Dieselben Hefestämme wurden mit einem *FRE*-regulierten *lacZ*-Reporter Plasmid transformiert und die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität wurde bestimmt.

## 4 Diskussion

### 4.1 Ame1p und Iml3p sind neue Komponenten des Kinetochors

Für den Erhalt der genetischen Stabilität ist es essentiell, dass alle an der DNA-Verteilung beteiligten Prozesse und die daran involvierten Proteine/Proteinkomplexe möglichst fehlerfrei funktionieren; dies umfasst auch die Kontrollmechanismen für den Zellzyklus. Einer dieser Proteinkomplexe, der für den Erhalt der genetischen Stabilität benötigt wird, ist der Kinetochorkomplex. Dieser besteht bei der Hefe *S. cerevisiae* aus verschiedenen Subkomplexen, deren Aufbau, Interaktionen und Funktionen bisher nicht vollständig geklärt werden konnte. Der Kinetochorkomplex vermittelt die Bindung der mitotischen und meiotischen Teilungsspindel an die Zentromer-DNA (*CEN*-DNA) der Chromosomen. Zwei der Proteine, die für den Erhalt der genetischen Stabilität eine Rolle spielen, sind die Proteine Iml3p und Ame1p.

#### 4.1.1 Ame1p und Iml3p lokalisieren am Kinetochor

Immunfluoreszenzanalysen ergaben, dass Ame1p und Iml3p eine für Kinetochorproteine typische Lokalisierung zeigen (Abbildung 14, Abbildung 15). Bestätigt wurde die Lokalisation der beiden Proteine am Kinetochor durch Arbeiten anderer Arbeitsgruppen, die während der Erstellung dieser Arbeit im Jahr 2003 veröffentlicht wurden (De Wulf, et al., 2003; Pot, et al., 2003).

Für die genauere Einordnung der Proteine Ame1p und Iml3p innerhalb des Kinetochors, sollten die Wechselwirkungen mit anderen Kinetochorproteinen über genetische Interaktionen untersucht werden. Genetische Interaktionen sind häufig ein Indiz für eine Beteiligung von Proteinen an gemeinsamen Prozessen in der Zelle, die auf verschiedene Weise reguliert werden. Additive Phänotypen entstehen nur dann, wenn es sich nicht um epistatische Proteine, sondern um Proteine mit teilweise auch ähnlichen Funktionen in parallelen Wegen oder unterschiedlichen Subkomplexen handelt. Aber auch, wenn die Funktion zweier teilweise redundanter Proteine gestört wird, kann es zur Ausprägung additiver Phänotypen kommen (Hartmann, et al., 2001).

Um zu untersuchen, ob die beiden Proteine Ame1p und Iml3p funktionell miteinander interagieren, wurde deren genetische Interaktion untersucht. Da keine temperatursensitiven Punktmutanten des *AME1*-Gens existieren, wurden die genetischen Interaktionen bei deregulierter Expression von Ame1p untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass bei einer Überexpression von Ame1p und Fehlen von Iml3p das Wachstum der untersuchten Hefestämme sowohl bei verringerten als auch bei erhöhten Inkubationstemperaturen im

Vergleich zum Wildtyp stark verringert war. Bei einer geringen Ame1p-Konzentration hingegen konnte nach eintägigem Wachstum eine schwache (nicht gezeigt) und nach zweitägigem Wachstum keine genetische Interaktion zwischen Ame1p und Iml3p beobachtet werden. Aufgrund früherer Daten wäre eine genetische Interaktion eher bei einer geringen Ame1p-Konzentration erwartet worden, da nur Zellen, in denen die Expression von Ame1p herunterreguliert ist, eine erhöhte Verlustrate artifizierender sowie endogener Chromosomen aufweisen (Otremba, 2004; Mazur, 2003). Die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse deuten daher auf eine antagonistische Funktion von Ame1p und Iml3p innerhalb des Kinetochorkomplexes hin, so dass durch das Fehlen von Iml3p bei einer Überexpression von Ame1p die Zellen in ihrem Wachstum eingeschränkt werden. Während für Iml3p in dieser Arbeit weitere starke genetische Interaktionen mit Kinetochorproteinen nachgewiesen werden konnten, die erste Hinweise auf die Funktion von Iml3p lieferten, konnte für Ame1p nur die starke genetische Interaktionen mit Iml3p, nicht aber mit weiteren Kinetochorproteinen identifiziert werden.

Eine *iml3Δ*-Mutante zeigte mit den essentiellen Kinetochorproteinen Ndc10p und Okp1p starke genetische Interaktionen. Ndc10p ist ein essentielles Protein des CBF3-Komplexes und ist an der Anbindung des Kinetochorkomplexes an die *CEN*-DNA beteiligt (Lechner and Carbon, 1991). Okp1p bildet gemeinsam mit Ame1p, Mcm21p und Ctf19p den sogenannten COMA-Komplex, der für den Aufbau des Kinetochorkomplexes von entscheidender Bedeutung ist und wahrscheinlich direkt an die DNA-bindenden Proteine assoziiert (De Wulf, et al., 2003). Die beobachteten genetischen Interaktionen zwischen Iml3p und den Proteinen Ndc10p und Okp1p zeigten sich nur auf TBZ-haltigen Medien bei der restriktiven Temperatur. Dies deutet darauf hin, dass die Zelle die eingeschränkte Funktion des Kinetochors auch in der Doppelmutante ausgleichen kann, aber nicht mehr in der Lage ist zu überleben, wenn es zu einer zusätzlichen Belastung für die Mikrotubuli kommt. Da das Fehlen von Iml3p zu einer Aktivierung des Spindelaufbau-Kontrollpunktes führt, sind die gefundenen genetischen Interaktionen ein Hinweis darauf, dass die Aktivierung des Kontrollpunktes im Falle einer doppelten Mutation nicht mehr ausreicht, um die Anheftung der Spindel zu ermöglichen. Anscheinend ist der Aufbau des Kinetochors so stark beeinträchtigt, dass die zusätzliche Destabilisierung der Mikrotubuli die korrekte DNA-Verteilung unterbindet. Dies spricht dafür, dass Iml3p eine Funktion am strukturellen Aufbau des Kinetochors übernimmt. Möglicherweise unterstützt das Iml3-Protein die Anheftung der Spindel an die Kinetochore. Hinweise darauf ergeben sich anhand von Daten, die in anderen Arbeitsgruppen gefunden wurden. Neuere Daten belegen, dass Ndc10p neben seiner Funktion der *CEN*-DNA Bindung auch für den Erhalt der Spindelstabilität während der Anaphase

benötigt wird (Bouck and Bloom, 2005). Außerdem konnte 2001 gezeigt werden, dass eine *iml3Δ/tub1-1*-Doppelmutante synthetisch lethal ist (Ghosh, et al., 2001). *TUB1* kodiert für  $\alpha$ -Tubulin und ist somit ein Bestandteil der mitotischen Spindel. Zusätzlich konnten in einer genomweiten Analyse 7 weitere genetische Interaktionen von Iml3p mit Proteinen identifiziert werden, die mit der Funktion der mitotischen Spindel in Verbindung gebracht werden (Tong, et al., 2004). Hierzu gehören neben 4 Ko-Chaperonen (Gim3p, Gim4p, Gim5p und Pac10p) (Siegers, et al., 1999), die für die Faltung des Tubulins benötigt werden auch Kar3p, ein Minus-End Motor der Mikrotubuli sowie Cin8p, ein Kinesin-Motorprotein. Kar3p und Cin8p sind gemeinsam mit Kip1p für die Elongation der mitotischen Spindel in der Mitose verantwortlich (Saunders, et al., 1997a; Saunders, et al., 1997b; Saunders and Hoyt, 1992). Außerdem wurden genetische Interaktionen mit Bim1p gezeigt, welches für die Befestigung der astralen Mikrotubuli an der Zellmembran und somit für die Spindelorientierung und die Einwanderung des Zellkerns in den Knospenhals während der Mitose benötigt wird (Miller, et al., 2000). All diese Interaktionen sprechen dafür, dass durch das Fehlen von Iml3p der Kinetochorkomplex so stark verändert wird, dass die Interaktion mit den Mikrotubuli geschwächt wird.

### **4.1.2 Die durch das Fehlen von Iml3p vermittelte genetische Instabilität beschränkt sich auf artifizielle Minichromosomen**

Es konnte bereits in früheren Studien gezeigt werden, dass das Fehlen des Proteins Iml3p zu einer erhöhten Verlustrate artifizieller zusätzlicher Minichromosomen im Vergleich zum Wildtyp führt (Entian, et al., 1999; Güldener, 2000). In dieser Arbeit konnte nun gezeigt werden, dass das Protein nicht für die Verteilung endogener Chromosomen während der Mitose benötigt wird. Sowohl Chromosom III als auch Chromosom V wurden in einer *iml3Δ*-Mutante nicht vermehrt verloren. Allerdings zeigte sich, dass *iml3Δ*-Mutanten im Gegensatz zu Wildtyphefen mehr Zeit benötigen, um nach einem Arrest in der DNA-Synthesephase wieder in den Zellzyklus einzutreten. Diese Verzögerung wird jedoch bis zum Eintritt in einen neuen Zellzyklus wieder kompensiert (Kapitel 3.1.3.1).

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass das Fehlen von Iml3p nur bei der Verteilung artifizieller zusätzlicher Chromosomen eine Rolle spielt, während Probleme bei der Verteilung endogener Chromosomen durch die Kontrollpunkte bemerkt werden. Dies würde die transiente Verzögerung während der Mitose erklären. Zellen können wahrscheinlich zwischen endogenen und artifiziellen Chromosomen „unterscheiden“. Hierfür spricht vor allem die unterschiedliche genetische Stabilität von artifiziellen und endogenen Chromosomen in Wildtypzellen. Die Verlustrate von *CEN*-Plasmiden liegt bei  $\sim 10^{-2}$ , die von

## Diskussion

---

CF bei  $\sim 10^{-4}$  und die endogener Chromosomen bei  $\sim 10^{-5}$ . Dies kann zum einen mit der geringeren Größe der *CEN*-Plasmide (zirkulär, bis zu 20 kb) und der CF (linear,  $\sim 125$  kb) im Vergleich zu den endogenen Chromosomen (kleinstes Chromosom:  $\sim 230$  kb) zusammenhängen, bei den *CEN*-Plasmiden aber zusätzlich auch mit den fehlenden Telomerstrukturen. Außerdem sind die Zentromere der artifiziellen Chromosomen nicht in ihrer natürlichen chromosomalen DNA-Umgebung eingebettet, da ausschließlich die 125 bp umfassende hochkonservierte *CEN*-DNA Sequenz in die Vektoren kloniert wurde. Hierdurch können die Bindungseigenschaften der Kinetochorproteine eventuell verändert sein, was in einer erhöhten genetischen Instabilität und/oder einer Beeinträchtigung der Kontrollpunktfunktion resultiert.

In der Hefe *S. cerevisiae* findet eine geschlossene Mitose statt, d. h., die Kernmembran bleibt während des gesamten Zellzyklus erhalten. Die Spindelpolkörper sind in die Kernmembran integriert. Sie verdoppeln sich zu Beginn der S-Phase. Während des gesamten Zellzyklus mit Ausnahme der Metaphase liegen die Kinetochore mit den SPB assoziiert vor (Tinker-Kulberg and Morgan, 1999). Eventuell erfolgt die Assoziation der artifiziellen Chromosomen an den SPB nicht so effizient wie die der endogenen Chromosomen, so dass Kontrollpunktaktivierung möglicherweise nicht erfolgt oder nicht ausreichend ist für den korrekten Aufbau des Kinetochors und die anschließende Interaktion mit der Teilungsspindel. Neben den Kinetochoren und SPB assoziieren während der Interphase auch die Telomere in mehreren Clustern an der Kernmembran in der Nähe von Kernporenkomplexen (Gotta, et al., 1996; Hediger, et al., 2003). Diese Assemblierung geht mit Eintritt in die Mitose verloren. Sie dient wahrscheinlich hauptsächlich dem transkriptionellen „Silencing“ (Hediger, et al., 2003; Lydall, 2003). Möglicherweise spielt diese Telomerassoziation an der Kernmembran zusätzlich zu den bekannten Mechanismen eine Rolle bei der Aktivierung der Spindelkontrollpunkte. Lineare Chromosomenfragmente sind eventuell zu klein, um ihre Telomere mit denen der endogenen Chromosomen zu assoziieren, während *CEN*-Plasmide keine Telomere tragen. Zusätzlich zu einer möglicherweise veränderten Kinetochorstruktur könnte dies dazu führen, dass keine ausreichende Überprüfung der artifiziellen Chromosomen durch die Spindelkontrollpunkte erfolgt.

Im Gegensatz zu den hier erhaltenen Ergebnissen konnte in einer früheren Veröffentlichung gezeigt werden, dass Iml3p auch für die Stabilität endogener Chromosomen benötigt wird (Ghosh, et al., 2001). Für diese Untersuchung wurde, wie in in dieser Arbeit auch, die genetische Stabilität von Chromosom III in einem quantitativen Paarungsversuch bestimmt. Aufgrund der Diskrepanz der Daten in der hier vorliegenden Arbeit und der Arbeit von (Ghosh, et al., 2001) und zur Verifikation der eigenen Daten wurde daher in einer zweiten

Analyse die Stabilität von Chromosom V untersucht. Aber auch dieses Chromosom wurde in der *iml3Δ*-Mutante stabil vererbt. Möglicherweise beruhen die gefundenen Unterschiede bezüglich der Stabilität von Chromosom III auf unterschiedlichen Stammhintergründen, in denen die Studien durchgeführt wurden.

### 4.1.3 Das Fehlen von Iml3p aktiviert den Spindelaufbau-Kontrollpunkt

Eine Aktivierung der mitotischen Kontrollpunkte erlaubt es der Zelle, länger in der Mitose zu verweilen. Dadurch gewinnt sie Zeit für den Aufbau des Kinetochors und die korrekte Anheftung der Teilungsspindel an das Kinetochor. Genetische Interaktionen zwischen Kontrollpunktmutanten und zu untersuchenden Genen weisen auf eine Aktivierung der Kontrollpunkte aufgrund der Mutation oder der Deletion des zu untersuchenden Gens hin.

Eine *iml3Δ*-Mutante zeigte mit Deletionsmutanten der Spindelaufbau-Kontrollpunktgene *MAD2* und *BUB3* synthetische Lethalität. Keine genetische Interaktion konnte hingegen mit einer Deletionsmutante des Spindellocalisations-Kontrollpunktgenes *BUB2* nachgewiesen werden. Dies bestätigt die Annahme, dass durch das Fehlen von Iml3p der Spindelaufbau-Kontrollpunkt aktiviert wird, so dass die Zellen während der Mitose mehr Zeit erhalten, die Mikrotubuli korrekt an die Kinetochore anzuknüpfen. Der Funktionsverlust von Iml3p kann somit trotzdem zu funktionsfähigen Kinetochoren führen, wenn die Zellen ausreichend Zeit erhalten, um die Kinetochore aufzubauen und diese an die Mikrotubuli anzuknüpfen.

In früheren Untersuchungen konnte mittels FACS-Analyse kein Hinweis für eine Kontrollpunktaktivierung durch das Fehlen von Iml3p gefunden werden (Güldener, 2000). Dies lässt sich dadurch erklären, dass die zeitliche Verzögerung nur innerhalb der Mitose beobachtet werden konnte. Der Eintritt in den neuen Zellzyklus erfolgte in der *iml3Δ*-Mutante bereits wieder genauso schnell wie im Wildtyp, so dass der prozentuale Anteil an Zellen mit einfachem und doppeltem DNA-Gehalt konstant bleibt.

Eine Deletion von *IML3* führt nicht zur Aktivierung des Spindelpositions-Kontrollpunktes, was sich auch darin zeigt, dass eine *iml3Δ*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp keine transient erhöhte Anzahl fehlorientierter Spindeln aufweist (s. Kapitel 3.1.3.2). Trotzdem kann nicht ausgeschlossen werden, dass Iml3p eine indirekte Rolle bei der Orientierung der Teilungsspindel spielt, da in einer *iml3Δ*-Mutante bei einer Überexpression von  $\alpha$ -Tubulin, einem Bestandteil der Mikrotubuli, vermehrt fehlorientierte kurze Spindeln auftreten (Güldener, 2000).

Das Iml3-Protein selbst übernimmt keine Kontrollpunktfunktion. Eine Deletion von Iml3p verhinderte nach der Behandlung der Zellen mit der Mikrotubuli destabilisierenden Chemikalie Nocodazol nicht den Eintritt in einen mitotischen Arrest, dessen Ausbleiben

charakteristisch für Zellen mit fehlender Kontrollpunktfunktion ist (Li and Murray, 1991; Hoyt, et al., 1991). Dies zeigt, dass Iml3p im Gegensatz zu Proteinen des Ndc80-Komplexes nicht für die Ausbildung eines mitotischen Arrestes benötigt wird (Lew and Burke, 2003).

### 4.1.4 Das Fehlen von Iml3p führt ausschließlich zum Chromosomenverlust

Um zu erfahren, ob das Fehlen von Iml3p zum Chromosomenfragmentverlust (1:0-Segregation) oder zu einer Fehlverteilung von Chromosomenfragmenten (CF) (2:0-Segregation) führt, wurden Segregationsanalysen durchgeführt. Eine *iml3Δ*-Mutante wies im Vergleich zum Wildtyp eine etwa 90-fach erhöhte 1:0-Fehlsegregation des CF auf. Leider wurden für den Wildtyp zu wenige Kolonien ausgewertet, so dass aufgrund der großen Varianz der Daten keine eindeutige Aussage bezüglich der CF-Verlustrate (0,04 % +/- 0,15 %) getroffen werden kann. Frühere Experimente einer anderen Arbeitsgruppe wiesen allerdings für den Wildtyp eine Verlustrate sowie eine Fehlverteilung des CF von 0,03 % nach (Gerring, et al., 1990), was den hier erhaltenen Daten entspricht. Eine vermehrte 1:0-Segregation tritt unter anderem bei Replikationsmutanten auf. Unabhängig von der DNA-Replikation kann es auch zu einem Verlust eines der beiden Chromosomen kommen (Gerring, et al., 1990), wobei nicht geklärt ist, durch welche Faktoren dies begünstigt wird, da aufgrund der geschlossenen Mitose kein Chromosom aus dem Kern verloren werden dürfte. Da *iml3Δ*-Zellen keine erhöhte Sensitivität gegenüber der Chemikalie Hydroxyharnstoff zeigen (Guldener, 2000), handelt es sich wahrscheinlich nicht um ein DNA-Synthese-Problem sondern um einen realen Verlust eines der beiden CF.

Eine Fehlverteilung, bei der beide Chromosomen an eine der beiden Zellen vererbt werden und die zweite Zelle kein Chromosom erhält, ist durch eine 2:0-Segregation gekennzeichnet. Eine 2:0-Segregation ist charakteristisch für eine fehlende oder zu späte Auflösung der Kohäsion zwischen den Chromosomen (Gerring, et al., 1990). Es kann keine eindeutige Aussage bezüglich der 2:0-Segregation des CF sowohl im Wildtyp als auch in der *iml3Δ*-Mutante getroffen werden, da die Varianz der Daten zu groß war (wt: 0,06 % +/- 0,15 %; *iml3Δ*: 0,3 % +/- 0,6 % halbsektorierte Kolonien (rot/weiß)). Es kann daher nicht bestimmt werden, ob Iml3p für die Lösung der Kohäsion der Geschwisterchromatiden eine Rolle spielt.

### 4.1.5 Iml3p wird über Chl4p an weitere Kinetochorproteine gebunden

Die strukturelle Aufklärung des Kinetochorkomplexes ist ein Ziel, welches in vielen Arbeitsgruppen verfolgt wird. Hilfreich ist hierfür die Identifikation direkter Interaktionspartner der Kinetochorproteine. Für die weitere Einordnung von Iml3p in den gesamten Kinetochorkomplex sollten deshalb mittels Ko-Immunopräzipitation potentielle



Interaktionspartner von Iml3p verifiziert werden, die aufgrund genomweiter Analysen als mögliche Bindungspartner angesehen wurden (Cheeseman, et al., 2002a; Gavin, et al., 2002). Iml3p zeigte mit Kinetochorproteinen des zentralen Kinetochors, unter anderem aus dem Ctf3-Subkomplex (Ctf3p, Mcm16p) (Measday, et al., 2003) und aus dem Ctf19-Subkomplex (Ctf19p, Ame1p) (Ortiz, et al., 1999; De Wulf, et al., 2003), physikalische Interaktionen. Zudem konnte eine Interaktion mit Nkp1p, einem weiteren Kinetochorprotein, welches aufgrund seiner potentiellen Interaktionen mit Proteinen des COMA-Komplexes, des Ctf3-Komplexes sowie mit Chl4p bisher noch keinem der Subkomplexe zugeordnet werden konnte (Cheeseman, et al., 2002a), nachgewiesen werden. Bestätigt wurde zudem eine Interaktion mit Chl4p (Pot, et al., 2003). Die fehlende Zwei-Hybrid Interaktion von Ame1p und Nkp1p mit Iml3p zeigte, dass diese Proteine wahrscheinlich nicht direkt miteinander interagieren.

In Chromatin Immunopräzipitationsanalysen (ChIP) konnte gezeigt werden, dass bei der Präzipitation von Iml3p auch die *CEN*-DNA präzipitiert wird, was zeigt, dass Iml3p ein Bestandteil des Kinetochorkomplexes ist. Diese Präzipitation sowie die Bindung an Ctf19p ist von Chl4p, einem Zwei-Hybrid-Interaktionspartner von Iml3p, abhängig (Pot, et al., 2003). Allerdings konnte in anderen Studien gezeigt werden, dass die Bindung von Iml3p an ein etabliertes Kinetochor unabhängig von Chl4p erfolgt, der *de novo* Aufbau eines Kinetochors allerdings von Chl4p abhängig ist (Mythreya and Bloom, 2003). Es sollte daher geklärt werden, ob Chl4p für die Interaktion von Iml3p mit den gefundenen Interaktionspartnern verantwortlich ist, oder ob Iml3p unabhängig von Chl4p mit einem oder mehreren der getesteten Proteine interagieren kann. In Ko-Immunopräzipitationsexperimenten zeigte sich, dass durch das Fehlen von Chl4p eine Bindung von Iml3p an die Proteine Ame1p, Ctf3p, Mcm16p und Nkp1p verhindert wird.

Die erhaltenen Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Bindung von Iml3p an das Kinetochor über Chl4p vermittelt wird. Es konnte bisher allerdings nicht geklärt werden, ob Iml3p unabhängig von Chl4p mit anderen Proteinen der Subkomplexe des Kinetochors interagieren kann, oder ob die Bindung an alle anderen Kinetochorproteine ausschließlich durch Chl4p vermittelt wird und Iml3p keinem der postulierten Subkomplexe zugeordnet werden kann. Es wäre zudem denkbar, dass Iml3p nur die unterstützende Funktion von Chl4p für die Interaktion mit weiteren Kinetochorproteinen benötigt. Hierfür spricht auch, dass Iml3p in etablierten Kinetochoren auch nach dem Ausfall von Chl4p identifiziert werden kann, nicht aber in neu etablierten Kinetochoren (Mythreya and Bloom, 2003). Ein weiterer Hinweis, der für eine Funktion von Chl4p für den *de novo* Aufbau des Kinetochors spricht, ist die Zwei-Hybrid Interaktion von Chl4p mit Mif2p (Hazbun, et al., 2003), einem CENP-C-Homolog, welches mit den Histonen H2A, H2B und H4 spezifisch am Zentromer interagiert

(Westermann, et al., 2003). Es müssen daher weitere Proteine hinsichtlich ihrer Chl4p-abhängigen Interaktion mit Iml3p untersucht werden, um mögliche weitere direkte Interaktionspartner von Iml3p zu identifizieren.

Neben der Identifikation von Interaktionspartnern von Iml3p sollten auch funktionsrelevante Domänen des Iml3-Proteins identifiziert werden. Dies erfolgte mittels genetisch instabiler Mutanten, die Aminosäureaustausche im zentralen und C-terminalen Bereich des Proteins trugen. Die Ergebnisse deuteten darauf hin, dass der N-Terminus des Proteins ohne Funktion für den Erhalt der genetischen Stabilität und somit für die Interaktion mit dem Kinetochor ist. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden N- und C-terminal verkürzte Versionen des Iml3-Proteins endogen exprimiert und hinsichtlich ihrer Interaktion mit Ame1p und Ctf3p untersucht. Für die Interaktion von Iml3p mit dem Kinetochor reicht die Expression der C-terminalen 164, nicht aber der C-terminalen 122 Aminosäuren des Iml3-Proteins (Gesamtlänge: 245 aa) aus. Auch eine Deletion des C-Terminus verhindert die Interaktion mit dem Kinetochor, was die zuvor aufgeworfene Hypothese bestätigt.

### **4.1.6 Ame1p interagiert Ctf19p-abhängig mit Proteinen des zentralen Kinetochors**

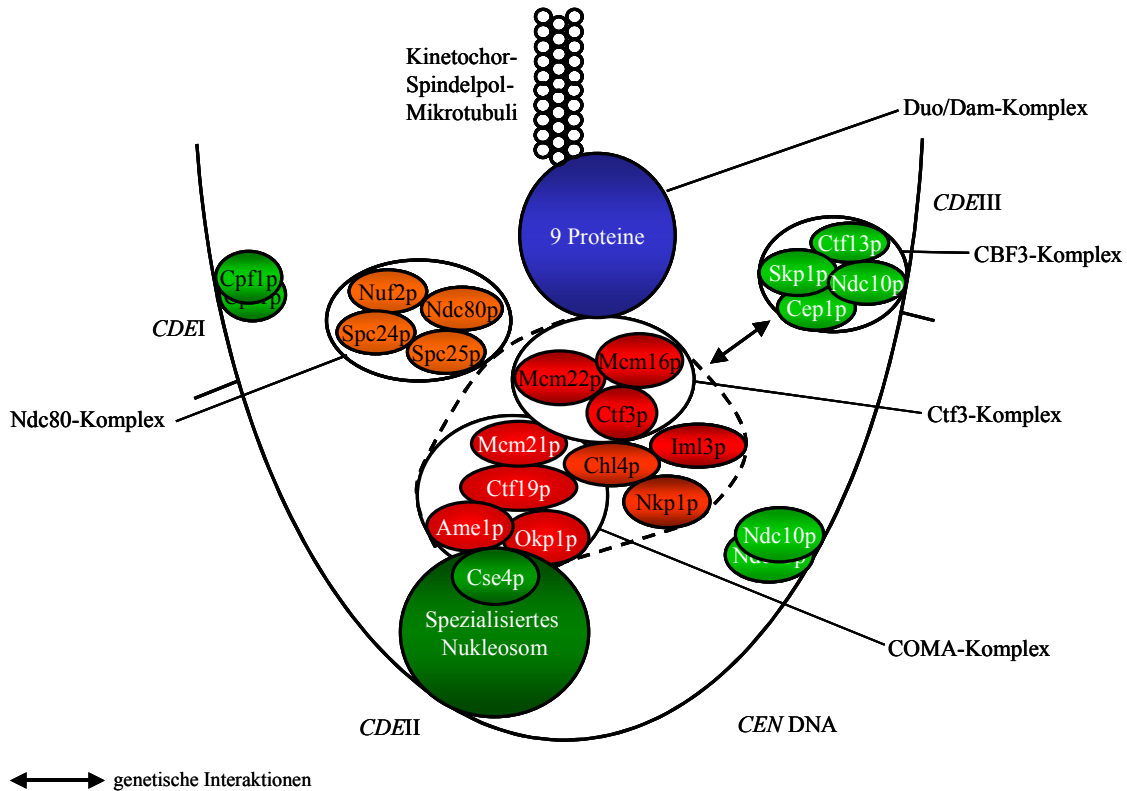
Für Ame1p, welches mit Iml3p sowohl physikalische als auch genetische Interaktionen zeigte, sollte ebenfalls eine weitere Einordnung innerhalb des Kinetochorkomplexes erfolgen. Anhand von genomweiten Analysen konnten für Ame1p 2003 mehrere potentielle Interaktionspartner, unter anderem auch Iml3p, identifiziert werden (De Wulf, et al., 2003). Zur Verifikation einiger dieser Interaktionen wurden deshalb Ko-Immunopräzipitationen mit Proteinen durchgeführt, für die bereits zuvor eine Interaktion mit Iml3p gezeigt wurde. Ame1p interagiert physikalisch mit den Proteinen Chl4p, Mcm16p und Nkp1p. Als Positivkontrolle diente Mcm21p, welches wahrscheinlich einen Komplex mit den Proteinen Ame1p, Ctf19p und Okp1p (COMA-Komplex) bildet (De Wulf, et al., 2003). Eine Interaktion mit Ndc10p, einem *CEN*-DNA-bindenden Protein des inneren Kinetochors, konnte nicht nachgewiesen werden (A. Pusole, unveröffentlichte Daten). Dies zeigt, dass Ame1p neben den COMA-Proteinen auch mit weiteren Proteinen aus dem zentralen Kinetochor interagieren kann, die Anbindung an das Zentromer aber wahrscheinlich nicht über Ndc10p vermittelt wird.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass Ame1p mit Proteinen des zentralen Kinetochors interagiert, sollte geklärt werden, ob Ame1p für die Bindung an diese Proteine die Proteine des COMA-Komplexes benötigt. Stellvertretend wurde Ctf19p gewählt. In einem *ctf19*-Deletionsstamm wurden die Interaktionen von Ame1p mit den Proteinen Chl4p, Mcm16p,

Mcm21p und Nkp1p untersucht. Mcm21p wurde als Vertreter des COMA-Komplexes gewählt, um zu überprüfen, ob die Proteine innerhalb des Komplexes unabhängig voneinander miteinander interagieren. Anhand der Ko-Immunopräzipitationsexperimente zeigte sich, dass Ame1p Ctf19p für die Bindung an die untersuchten Kinetochorproteine des zentralen Kinetochorkomplexes benötigt. Auch die Bindung an Mcm21p ist in einer *ctf19Δ*-Mutante unterbunden, was zeigt, dass auch für den Aufbau dieses Subkomplexes Ctf19p benötigt wird. Trotz der fehlenden Interaktionen mit den getesteten Proteinen des zentralen Kinetochors bleibt die Lokalisierung von Ame1p in Abwesenheit von Ctf19p am Kinetochor erhalten (De Wulf, et al., 2003). Auch andere neue Studien postulieren für Ctf19p eine unterstützende Rolle beim Aufbau des COMA-Komplexes (De Wulf, et al., 2003). Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten weisen allerdings darauf hin, dass der Aufbau des COMA-Komplexes in Abwesenheit von Ctf19p gar nicht erfolgt. Zusätzlich wird die Interaktion von Ame1p mit den untersuchten Proteinen unterbunden. Es bleibt zu testen, ob auch die anderen Proteine des COMA-Komplexes für dessen Aufbau sowie für die Interaktionen von Ame1p mit Proteinen des zentralen Kinetochors benötigt werden. Außerdem müssen die anderen möglichen Interaktionspartner hinsichtlich ihrer Interaktion mit Ame1p verifiziert werden.

### 4.1.7 Modell für das Kinetochor

Aufgrund der in dieser Arbeit erhaltenen und den zahlreichen in den letzten Jahren neu veröffentlichten Daten kann für das Kinetochor ein genauerer Aufbau postuliert werden (Abbildung 46). Ame1p interagiert nicht mit Ndc10p und damit wahrscheinlich nicht mit dem CBF3-Komplex. Wahrscheinlich wird die Ame1p-Bindung an das Zentromer durch Cse4p vermittelt (De Wulf, et al., 2003). Die Lokalisierung von Ame1p am Kinetochor erfolgt unabhängig von Ctf19p (De Wulf, et al., 2003). Ctf19p vermittelt aber die Interaktion von Ame1p mit verschiedenen anderen Proteinen des zentralen Kinetochors sowie auch mit Mcm21p, einem Bestandteil des COMA-Komplexes. Eventuell interagiert Ctf19p direkt mit Chl4p, welches wahrscheinlich eine zentrale Rolle bei der Assemblierung des zentralen Kinetochors spielt. Möglicherweise bildet es eine Art Brücke zwischen dem COMA-Komplex, dem Ctf3-Komplex und den anderen untersuchten Proteinen des zentralen Kinetochors. Dies ergibt sich daraus, dass Chl4p sowohl für die Interaktion von Ctf19p mit Ctf3p benötigt wird (Pot, et al., 2003), aber auch, dass alle untersuchten Interaktionen von Iml3p von Chl4p abhängig waren (Abbildung 46).



**Abbildung 46: Modell für den Aufbau des Kinetochors**

Gezeigt wird der anhand der in dieser Arbeit erhaltenen und durch andere Arbeiten ergänzten Ergebnisse postulierte Aufbau des Kinetochors. Proteine des inneren Kinetochors wurden grün, die des zentralen rot und die des äußeren blau gekennzeichnet.

Wahrscheinlich können die COMA-Proteine und die Proteine des Ctf3-Komplexes unabhängig voneinander miteinander assemblieren, um später in einem größeren Subkomplex innerhalb des zentralen Kinetochors mit weiteren Proteinen wie Chl4p, Nkp1p und Iml3p zu assemblieren (Abbildung 46; gestrichelte Linie). Dies erklärt auch, warum diese Proteine in genomweiten Analysen als potentielle Interaktionspartner identifiziert werden konnten (De Wulf, et al., 2003; Gavin, et al., 2002; Cheeseman, et al., 2002a). Die Ein-Hybrid-Daten deuten darauf hin, dass Iml3p möglicherweise an der Peripherie des Komplexes lokalisiert. Obwohl für den CBF3-Komplex eine essentielle Funktion für den Aufbau des Kinetochors nachgewiesen werden konnte (Sorger, et al., 1994; Lechner and Carbon, 1991; Kilmartin, et al., 1993), konnten bisher ausschließlich genetische, aber keine physikalischen Interaktionen mit anderen Kinetochorproteinen identifiziert werden, was darauf hindeutet, dass die Anbindung der Proteine an das Zentromer über das spezialisierte Nukleosom erfolgt. Möglicherweise stabilisiert der CBF3-Komplex die Assemblierung der anderen Proteine am Kinetochor.

## 4.2 Die Regulation von adhäsivem und filamentösem Wachstum in einer *fol1Δ*-Mutante

Die Übertragung von C1-Fragmenten durch Folsäurederivate spielt eine essenzielle Rolle für verschiedene Stoffwechselwege. Ähnlich zu Bakterien und Pflanzen kann *S. cerevisiae* Folsäure *de novo* aus Pterin, p-Aminobenzoat und Glutamat synthetisieren. Der Folsäure-Syntheseweg in Hefe ist bislang nur unvollständig aufgeklärt. Das Gen *FOL1* kodiert in diesem Biosyntheseweg für ein Protein mit drei aufeinanderfolgenden Enzymaktivitäten, die Dihydroneopterin Aldolase (DHNA), die 7,8-Dihydro-6-Hydroxymethylpterin-Pyrophosphatkinase (HPPK) und die Dihydropteroat Synthase (DHPS) (Güldener, 2000).

### 4.2.1 Das Fehlen des Folat-Koenzyms induziert pseudohyphales und adhäsives Wachstum

Die erhaltenen Ergebnisse zeigen, dass das Fehlen von Fol1p auf folsäurehaltigen (FA) Medien unabhängig vom Stammhintergrund sowohl filamentöses als auch adhäsives Wachstum induziert. Während das filamentöse Wachstum von der supplementierenden FA-Menge im Medium abhängig ist, ist das adhäsive Wachstum unabhängig hiervon. Dies deutet darauf hin, dass die Regulation des filamentösen und adhäsiven Wachstums zumindest teilweise über verschiedene Signalwege erfolgt. Für die Experimente zum adhäsiven Wachstum wurden allerdings relativ große Zellzahlen verwendet, so dass nicht ausgeschlossen werden kann, dass es durch die FA-Aufnahme der Zellen zu einer starken Verminderung der lokalen FA-Konzentration kommt, so dass das adhäsive Wachstum bei geringeren FA-Konzentrationen erfolgt als angegeben.

Die Untersuchungen zum *fol1Δ*-induzierten filamentösen und adhäsiven Wachstum wurden unter anderem in einem CEN.PK2-Hintergrund durchgeführt, für dessen Zellen kein Nährstoffmangel induziertes adhäsives und filamentöses Wachstum beschrieben worden ist. Dies deutet darauf hin, dass das Fehlen von Fol1p möglicherweise zur Aktivierung anderer Stoffwechselwege/Signalkaskaden innerhalb der Zelle führt als das Fehlen von spezifischen Nährstoffen im Medium. Es stellte sich daher die Frage, ob sich das filamentöse Wachstum einer *fol1Δ*-Mutante makromolekular von dem durch Glukosemangel induzierten unterscheidet.

Die *fol1Δ*-Zellen zeigten dieselben spezifischen Veränderungen, wie Zellen, die durch Glukosemangel induziertes filamentöses Wachstum durchführen. Die elongierten *fol1Δ*-Zellen wiesen das für filamentös wachsende Zellen typische distale/bipolare Knospungsmuster sowie deutliche Veränderungen im Aktinzytoskelett auf, obwohl es sich

wahrscheinlich um verschiedene Mechanismen der Induktion des filamentösen Wachstums handelt.

Für die weiteren Untersuchungen wurden Zellen eines CGX31-Hintergrundes verwendet, die auch in anderen Arbeitsgruppen zur Untersuchung von filamentösem und adhäsivem Wachstum verwendet werden (Braus, et al., 2003; Roberts and Fink, 1994; Rupp, et al., 1999). In diesem Stammhintergrund zeigt bereits der Wildtyp adhäsives Wachstum, was eine Unterscheidung zwischen *fol1Δ*-abhängigem und Wildtyp-typischem adhäsiven Wachstum erschwerter. Es war allerdings bekannt, dass das Fehlen von Aminosäuren in einem synthetischen Minimalmedium zu einer Gcn4p-abhängigen verstärkten Adhäsivität in diesem Stammhintergrund führt (Braus, et al., 2003). Daher sollte untersucht werden, ob auch das *fol1Δ*-abhängige adhäsive Wachstum in diesem Medium induziert werden kann. Tatsächlich führt das Wachstum auf diesem Minimalmedium zu einer verstärkten Invasivität einer *fol1Δ*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp. Wahrscheinlich führt das durch den Aminosäuremangel induzierte Signal für die Adhäsivität zu einer Verstärkung des *fol1Δ*-Signals, was für zwei voneinander unabhängige, parallele Signalwege spricht. Bisher konnte allerdings nicht geklärt werden, ob das *fol1Δ*-abhängige adhäsive Wachstum durch interne oder externe Signale induziert wird. Da Hefezellen selbst Folat synthetisieren können und bisher keine Rezeptoren/Transporter für C1-Überträgermoleküle identifiziert werden konnten, handelt es sich allerdings wahrscheinlich um ein internes Signal. Als ein mögliches Signal könnte eine verlangsamte DNA-Synthese aufgrund des Fehlens von Pyrimidinkörpern in den *fol1Δ*-Zellen dienen. Es konnte nämlich gezeigt werden, dass eine verlangsamte DNA-Synthese, unabhängig von dem cAMP-Weg und der MAPK-Kaskade, zu einer Induktion des filamentösen Wachstums führt (Jiang and Kang, 2003; Kang and Jiang, 2005). Um dies zu untersuchen, könnte man dem Medium TMP, welches *fol1Δ*-Zellen nicht selbst synthetisieren können, zugeben.

Zusätzlich zu der Induktion des adhäsiven und filamentösen Wachstums führte die Deletion von *FOL1* zu einem im Vergleich zum Wildtyp schlechten Wachstum selbst bei hohen Folat-Konzentrationen im Medium. Dies deutet darauf hin, dass den Zellen keine ausreichenden Mengen an C1-Überträgern zur Verfügung stehen. Dies wäre zum Beispiel der Fall, wenn den Zellen durch fehlende spezifische Transportsysteme die Aufnahme der Folsäure erschwert wird. Gestützt wird diese Hypothese dadurch, dass bisher keine Transportsysteme für die Aufnahme von Folsäure und ihren Derivaten identifiziert werden konnten.

Das Fehlen eines Überträgers von C1-Fragmenten spielt in verschiedensten Biosynthesewegen eine Rolle, wie z. B. bei der Synthese von Purin- und Pyrimidinkörpern sowie bei der Synthese von Thymidylaten, Glyzin, Methionin, Pantothenensäure und N-Formyl-

Methionyl-tRNA. Möglicherweise führt das Fehlen dieser Grundbausteine der Zelle direkt zu einem verlangsamten Wachstum. Es besteht allerdings auch die Möglichkeit, dass eine Anhäufung von Intermediärmetaboliten, die bei der Synthese der oben genannten Syntheseprodukte auftreten können, als Wachstumsrepressoren dienen.

#### **4.2.2 Das adhäsive Wachstum einer *fol1Δ*-Mutante ist abhängig von Ste12p und Flo11p**

Um zu testen, ob das Signal für das adhäsive und pseudohyphale Wachstum einer *fol1Δ*-Mutante durch bereits bekannte Signalwege weitergeleitet wird, wurden Doppelmutanten untersucht, in denen neben *FOLI* jeweils ein Gen aus einem für adhäsives und filamentöses Wachstum wichtigen Signalweg deletiert war. Es sollte die Funktion der beiden durch die MAPK-Kaskade regulierten Transkriptionsfaktoren Ste12p und Tec1p sowie des durch diese Transkriptionsfaktoren regulierten Gens *FLO11* für das *fol1Δ*-induzierte adhäsive und filamentöse Wachstum untersucht werden. Die Expression von *FLO11* ist wichtig für die Entstehung von adhäsivem und filamentösem Wachstum. Zusätzlich sollte der Einfluss von Phd1p, einem vom MAPK-Weg unabhängigen Regulator der *FLO11*-Expression (Palecek, et al., 2002; Pan and Heitman, 2000), auf das *fol1Δ*-induzierte adhäsive und filamentöse Wachstum untersucht werden.

Das *fol1Δ*-induzierte adhäsive Wachstum ist im Gegensatz zum filamentösen Wachstum von Ste12p und Flo11p abhängig (s. auch Güldener, 2000). Dies ist ein Hinweis darauf, dass die Regulation des adhäsiven und filamentösen Wachstums durch verschiedenen Signalwege erfolgt. Sowohl für Tec1p als auch für Phd1p konnte kein Einfluss auf das filamentöse wie auch auf das adhäsive Wachstum einer *fol1Δ*-Mutante beobachtet werden. Hieraus kann man schließen, dass das Signal, welches durch das Fehlen von Flo1p entsteht und für das filamentöse Wachstum verantwortlich ist, über keines der getesteten Proteine weitergeleitet wird. Es wird allerdings deutlich, dass Ste12p für die Induktion des adhäsiven Wachstums eine wichtigere Rolle spielt als sein Interaktionspartner Tec1p. Möglicherweise wird die MAPK-Kaskade nicht für die Induktion des filamentösen Wachstums benötigt, oder es existieren parallele Signalwege, die deren Funktion übernehmen. Eventuell haben aber auch die beiden Proteine Tec1p und Ste12p für das filamentöse Wachstum redundante Funktionen, so dass der Ausfall eines der Proteine keinen Einfluss auf das *fol1Δ*-induzierte filamentöse Wachstum nimmt.

Normalerweise binden die beiden Transkriptionsfaktoren Ste12p und Tec1p als Heterodimer an sogenannte *FRE*-Bindestellen (filamentation response elements) in Promotoren von Genen, die bei der Induktion des filamentösen und adhäsiven Wachstums eine Rolle spielen (Madhani and Fink, 1998), unter anderem auch im *FLO11*-Promotor (Lo and Dranginis, 1998). Außerdem finden sich im *FLO11*-Promotor Bereiche, die unabhängig von Tec1p durch Ste12p reguliert werden (Rupp, et al., 1999). Zudem kann Ste12p die Kontrolle der Expression adhäsivitätsspezifischer Gene durch eine direkte Aktivierung von *TECI* steuern (Oehlen and Cross, 1998), während in Abwesenheit von Ste12p für das adhäsive Wachstum wichtige Gene direkt *via* individuelle *TCS*-Elemente (Tec1p-binding site) aktiviert werden können (Kohler, et al., 2002), indem Tec1p an die Promotorsequenzen gebunden wird (Zeitlinger, et al., 2003). Da die Funktion von Ste12p im Gegensatz zu der von Tec1p essentiell für die Induktion des *fol1Δ*-induzierten adhäsiven Wachstums ist, wird deutlich, dass die beiden Proteine trotz der oben aufgezeigten möglichen unabhängigen Regulierung der Expression adhäsivitätsspezifischer Gene für die *fol1Δ*-induzierte Adhäsivität keine redundanten Funktionen besitzen.

Da bisher keine Proteine identifiziert werden konnten, die das filamentöse Wachstum einer *fol1Δ*-Mutante beeinflussen, kann man schließen, dass wahrscheinlich andere Signalwege als die hier untersuchten für das *fol1Δ*-abhängige filamentöse Wachstum, welches wahrscheinlich als Konsequenz aus dem Mangel von C1-Überträgermolekülen induziert wird, wichtig sind. Die Tatsache, dass Flo11p nicht am filamentösen Wachstum beteiligt ist, führt zu der Annahme, dass andere Mechanismen der Zell-Zell-Adäsion und/oder der Zytokinese für die Ausprägung von filamentösen Zellen in einem *fol1Δ*-Stamm wichtig sind. Es kann allerdings bisher nicht gesagt werden, ob es sich um eine direkte oder eine indirekte Antwort auf den Folsäuremangel handelt.

Auch in anderen Arbeitsgruppen konnte bereits gezeigt werden, dass die Induktion des filamentösen und adhäsiven Wachstums über verschiedene andere Signalwege erfolgen kann. Die Deletion von *RPN4*, einem Gen, welches im Wildtyp für die Ubiquitin-vermittelte Proteolyse von Proteinen, unter anderem von dem G1-Zyklus Cln1p, eine Rolle spielt, führt wie die Deletion von *FOL1* zu einer verstärkten Filamentierung und Adhäsivität der Hefezellen. Während sich für die Filamentierung eine Abhängigkeit von Cln1p nachweisen ließ, zeigte sich keine Abhängigkeit von Cln1p für die Adhäsivität (Prinz, et al., 2004). Auch hier müssen, wie bei *fol1Δ*, weitere bisher unbekannte Gene auf eine *rpn4Δ* reagieren, um das gesamte Spektrum der Phänotypen zu verursachen. Dies zeigt, dass die Filamentierung und die Adhäsivität unabhängig voneinander reguliert werden können und es neben den von



Nährstoffmangel abhängigen Signalwegen weitere Signale gibt, die sowohl filamentöses als auch adhäsives Wachstum regulieren können.

Neben Follp werden auch andere metabolische Enzyme direkt oder indirekt mit der Regulation der Filamentierung in Verbindung gebracht. Sowohl Mutationen in der Glutamat-Dehydrogenase *GDH3*, der Phosphoglucose Isomerase *PGII* als auch der Alkohol Dehydrogenase *ADHI* führen zu einem konstitutiven invasiven Wachstum in haploiden Zellen und zu pseudohyphalem Wachstum bei diploiden Zellen (Wilkinson, et al., 1996; Ghosh, et al., 2004; Palecek, et al., 2000). Auch hier sind die vermittelnden Signalwege unverstanden.

Ungeklärt bleibt bisher die Frage, welche Signale den dimorphen Wechsel eines *fol1Δ*-Stammes auslösen und von welchen Rezeptoren diese wahrgenommen und weitergeleitet werden. Für andere, bereits besser erforschte Induktoren des dimorphen Wechsels sind diese bereits bekannt. Die Mep2p Ammoniumpermease beispielsweise detektiert verwertbare Stickstoffe im Nährmedium, während Grp1p, ein an der Zelloberfläche befindliches, rezeptorgekoppeltes G-Protein, wahrscheinlich Glukosemangel detektieren kann. Mutationen in einem der beiden Proteine führen dazu, dass die Hefezellen als Antwort auf Stickstoff- oder Glukosemangel nicht länger filamentös (diploide Stämme) oder invasiv (haploide Stämme) wachsen können (Lorenz and Heitman, 1998; Lorenz, et al., 2000b). Wichtig hierbei ist allerdings, dass die Rezeptoren zwar bei haploiden und diploiden Zellen vorhanden sind, sie aber verschiedene Funktionen bezüglich der Induktion des filamentösen Wachstums aufweisen. Während Glukosemangel nur bei haploiden Hefezellen filamentöses Wachstum auslöst, kann der Mangel an verwertbaren Stickstoffen nur in diploiden Zellen filamentöses Wachstum induzieren. Ein ähnlicher Rezeptor, dessen Identifikation bisher allerdings nicht gelang, könnte auch für die Follp-vermittelte Filamentierung und Adhäsivität verantwortlich sein, da sich haploide und diploide Zellen hinsichtlich ihrer Adhäsivität an das Medium unterscheiden. Ähnlich zu dem Fehlen von Glukose oder verwertbaren Stickstoffen erzeugt auch das Fehlen von Aminosäuren ein Hungersignal, welches die *FLO11*-Genexpression induziert und zu einem Gcn4p-abhängigen adhäsiven Wachstum führt (Braus, et al., 2003).

Es ist wahrscheinlich, dass durch das Fehlen von Folsäure in den Hefezellen mehrere Signaltransduktionskaskaden aktiviert werden und dadurch eine unabhängige Regulation der beiden Wege stattfindet. Ein Hinweis ergibt sich daraus, dass, abhängig von der Folsäuremenge im Medium, ein haploider *fol1Δ*-Hefestamm zwar adhäsives Wachstum, nicht aber filamentöses Wachstum zeigt. Ebenso zeigt ein diploider Stamm zwar filamentöses, nicht aber adhäsives Wachstum. Mehrere ineinandergreifende oder auch unabhängig voneinander arbeitende Regulationswege würden auch erklären, warum das invasive

Wachstum von Ste12p und Flo11p abhängig ist, das filamentöse Wachstum durch diese Faktoren allerdings unbeeinflusst bleibt.

#### **4.2.3 Das filamentierungs- und adhäsionsspezifische Signal wird nicht über die MAPK-Kaskade weitergeleitet**

Die Aktivierung der beide Proteine Tec1p und Ste12p erfolgt normalerweise über die MAPK-Kaskade. Da nur für Ste12p ein Einfluss auf das adhäsive Wachstum einer *fol1Δ*-Mutante nachgewiesen werden konnte, stellte sich die Frage, ob die Regulation des *fol1Δ*-induzierten adhäsiven Wachstums unabhängig von der Aktivierung der MAPK-Kaskade erfolgt.

Eine *fol1Δ*-Mutante zeigte keine verstärkte Phosphorylierung der MAP Kinase Kss1p, welche normalerweise bei der Induktion von filamentösem Wachstum aktiviert wird (Sabbagh, et al., 2001). Dies deutet darauf hin, dass in *fol1Δ*-Zellen keine konstitutive Aktivierung der MAPK-Kaskade erfolgt. Trotz der erhaltenen Ergebnisse kann man einen Einfluss von Kss1p auf das adhäsive Wachstum nicht ausschließen, da der Phosphorylierungsgrad von Kss1p in flüssigem Medium untersucht wurde, in dem *fol1Δ*-Zellen weder filamentös noch adhäsiv wachsen können. Zudem wurden keine Kinetiken durchgeführt, um eine mögliche transiente Phosphorylierung von Kss1p zu untersuchen.

#### **4.2.4 Die Expression von *FLO11* wird durch *fol1Δ* reguliert**

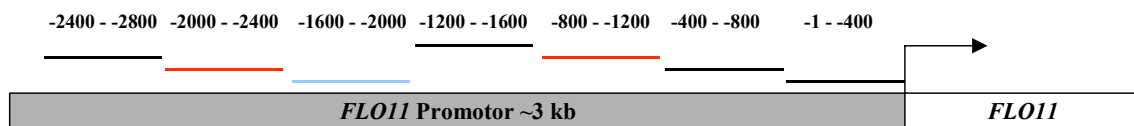
Im Gegensatz zur Entstehung der Pseudohyphen war in einer *fol1Δ*-Mutante das adhäsive Wachstum abhängig von Ste12p und Flo11p. Nachdem bereits in früheren Experimenten gezeigt werden konnte, dass in *fol1Δ*-Stämmen die *FLO11*-Promotor Aktivität Ste12p-abhängig reguliert wird (Güldener, 2000), stellte sich die Frage, wo im *FLO11*-Promotor die *fol1Δ*-abhängige Regulation erfolgt. Die Untersuchungen des *FLO11*-Promotors unter Bedingungen, bei denen die *fol1Δ*-Mutante im Gegensatz zum Wildtyp adhäsiv wächst, lassen darauf schließen, dass nur bestimmte Bereiche im Promotor für die Flo11p-abhängige Regulation angesteuert werden. Sowohl für den Bereich -2000 bis -2400 bp (*FLO11*-12/11) sowie den Abschnitt -800 bis -1200 bp (*FLO11*-6/5) konnte eine Hochregulation bei Abwesenheit von Flo11p beobachtet werden. In dem gewählten Testansatz kam es allerdings nicht zur Aktivierung des Volllängenpromotors. Wahrscheinlich ist die Sensitivität des gewählten Testsystems für den Nachweis geringer Expressionsunterschiede nicht ausreichend. Die Ergebnisse zeigen aber, dass das Hungersignal, welches durch den Mangel an C1-Überträgermolekülen in der Zelle ausgelöst wird, zur Aktivierung bestimmter

## Diskussion

Abschnitte des *FLO11*-Promotors führt, wodurch wahrscheinlich die Expression des für die Adhäsion sehr bedeutenden Flokkulins Flo11p aktiviert wird.

Die regulierten Fragmente von -2000 bis -2400 bp (*FLO11*-12/11) sowie von -800 bis -1200 bp (*FLO11*-6/5) werden auch Ste12p-abhängig reguliert. Allerdings konnte für Ste12p auch eine weitere regulative Einheit von -1600 bis -2000 bp (*FLO11*-10/9) determiniert werden, die in einer *fol1Δ*-Mutante nicht angesteuert wird (Rupp, et al., 1999) (Abbildung 47). Dies spricht dafür, dass, neben der Regulation des invasiven Wachstums einer *fol1Δ*-Mutante durch Ste12p, weitere Faktoren auch in diesem Regulationsweg eine Rolle spielen.

Neben diesen Ste12p abhängig regulierten Fragmenten konnte auch eine Regulation eines *FRE*-Elementes beobachtet werden, welches die Bindestelle für das Ste12p/Tec1p-Dimer darstellt. Dies zeigt, dass nicht ausschließlich Ste12p, sondern auch Tec1p für das adhäsive



**Abbildung 47: *fol1Δ*-abhängige Regulation des *FLO11*-Promotors**

Die Aktivierung von je 400 Basenpaar (bp)-Fragmenten des *FLO11*-Promotors (-1 --400; ...;-2400 --2800 bp) wurde in Abhängigkeit von Flo1p untersucht. Zwei Fragmente (rote Linien) zeigen eine Flo1p-abhängige Aktivierung. Beide Fragmente sind auch wichtig für die Ste12p abhängige Regulation der *FLO11*-Expression. Ein weiteres, zusätzliches Fragment (-1600 - -2000 bp) (blaue Linie) konnte in einer anderen Arbeitsgruppe für die Ste12p-abhängige Regulation identifiziert werden (Rupp, et al., 1999).

Wachstum einer *fol1Δ*-Mutante verantwortlich ist.

Die Regulation der *FLO11*-Expression, die auch in der *fol1Δ*-Mutante erfolgt, ist ein wichtiger Schritt bei der Kontrolle des invasiven Wachstums, die Hochregulation des Gens alleine ist aber nicht essentiell für das adhäsive Wachstum. Es wird die Möglichkeit mindestens eines weiteren *FLO11*-unabhängigen Mechanismus zur Induktion des adhäsiven Wachstums diskutiert (Palecek, et al., 2000; Rua, et al., 2001). Ähnlich dazu lassen die erhaltenen Daten darauf schließen, dass in der Zelle *FLO11*-unabhängige Mechanismen existieren, die das *fol1Δ*-induzierte pseudohyphale Wachstum hervorrufen.

## 5 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit zwei unterschiedlichen Aspekten der Zellteilung der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. Im ersten Teil der Arbeit wurden die beiden Kinetochorproteine Iml3p und Ame1p hinsichtlich ihrer Funktion bei der Segregation des genetischen Materials näher charakterisiert. Die beiden Proteine zeigen untereinander und mit weiteren Kinetochorproteinen genetische und physikalische Interaktionen. Die Bindung von Iml3p an Proteine der verschiedenen Kinetochor-Subkomplexe ist abhängig von Chl4p, während die Interaktion des essentiellen Proteins Ame1p mit den untersuchten Proteinen des zentralen Kinetochors von Ctf19p abhängt. Beide Proteine werden wahrscheinlich für den strukturellen Aufbau der Kinetochore benötigt, da sowohl das Fehlen von Iml3p als auch verringerte Mengen an Ame1p zu einer Aktivierung mitotischer Kontrollpunkte führen. Auch bei einer Deletion von Iml3p wird die Verteilung endogener Chromosomen sowie die Spindelpositionierung nicht beeinträchtigt, was dafür spricht, dass durch die Aktivierung des mitotischen Kontrollpunktes der Ausfall von Iml3p kompensiert werden kann. Mutations- und Deletionsanalysen definierten die C-terminalen 122 Aminosäuren (aa) des Iml3-Proteins (Gesamtlänge: 245 aa) als funktionsrelevant für die Mitose.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die Rolle von *FOLI*, welches für ein Protein mit drei bei der Folsäurebiosynthese aufeinanderfolgenden Enzymaktivitäten kodiert für das filamentöse und adhäsive Wachstum von Hefen untersucht. Die Deletion von *FOLI* induziert auf folsäurehaltigen Medien in Gegenwart von Glukose und Ammonium sowohl filamentöses als auch adhäsives Wachstum. Glukose und Ammonium unterdrücken normalerweise den dimorphen Wechsel bei der Hefe. Das adhäsive Wachstum eines *folI*-Deletionsstammes ist von dem MAP-Kinase abhängigen Transkriptionsfaktor Ste12p sowie dem durch Ste12p-regulierten Flokkulin Flo11p, nicht aber von Tec1p und Phd1p abhängig, während das *folIΔ*-induzierte filamentöse Wachstum von keinem der vier Proteine abhängig ist. In *folIΔ*-Zellen konnte keine Aktivierung der MAP-Kinase Kss1p, welche die Aktivität von Ste12p reguliert, nachgewiesen werden. Promotorstudien des *FLO11*-Promotors zeigten zudem, dass in einer *folIΔ*-Mutante nicht alle der durch Ste12p prinzipiell regulierbaren Promotorabschnitte auch tatsächlich reguliert werden. Hieraus ergibt sich, dass weitere Regulationswege für das *folIΔ*-induzierte filamentöse und adhäsive Wachstum bedeutsam sein müssen und dass die *folIΔ*-abhängige Regulation des filamentösen und adhäsiven Wachstums zumindest teilweise unabhängig von den bisher bekannten Signalwegen erfolgen kann.

## Veröffentlichungen

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

Characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* Foll1 protein: starvation for C1 carrier induces pseudohyphal growth.

Guldener U, Koehler GJ, Haussmann C, Bacher A, Kricke J, Becher D, Hegemann JH  
Mol Biol Cell. 2004 Aug;15(8):3811-28. Epub 2004 May 28

weitere Veröffentlichungen:

A second set of loxP marker cassettes for Cre-mediated multiple gene knockouts in budding yeast.

Guldener U, Heinisch J, Koehler GJ, Voss D, Hegemann JH  
Nucleic Acids Res. 2002 Mar 15;30(6):e23

in Druck:

Gene Disruption in the Budding Yeast *Saccharomyces cerevisiae*

Hegemann JH, Guldener U, Koehler GJ.

Methods Mol Biol. Yeast Protocols, 2nd Edition

## Abkürzungsverzeichnis

A	Adenosinmonophosphat (in Sequenzen)	l	Liter
AD	Aktivierungsdomäne	LB	Vollmedium L-Broth
Amp	Ampicillin	μ	Mikro
AS	Aminosäure	μl	Mikroliter
3AT	3-Aminotriazol	m	Milli
APS	Ammoniumpersulfat	M	Molar
β-Gal	β-Galaktosidase	M-Phase	Mitose-Phase des Zellzyklus
bp	Basenpaare	MAPK	Mitogen-aktivierte Protein Kinase
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3 Indolyl Phosphat	MBC	Methyl 2-Benzimidazolcarbamat
BD	Bindedomäne	min	Minute
C	Cytosin (in Sequenzen)	ml	Mililiter
cAMP	zyklisches AMP	MW	Molekulargewicht
<i>CEN</i>	Zentromer	NBT	Nitrotetrazolium Blue Chlorid
CF	Chromosomenfragment	Noc	Nocodazol
cMyc	Epitop des Transkriptionsfaktors cMyc	OL	Oligonukleotid
°C	Temperatur in Grad Celsius	OD	Optische Dichte
DAPI	4,6-Diamidino-2-Phenylindol	PCR	Polymerase Kettenreaktion
ddH <sub>2</sub> O	Doppelt deionisiertes Wasser	PEG	Polyethylenglykol
DMF	Dimethylformamid	PFA	Paraformaldehyd
DMSO	Dimethylsulfoxid	pH	„potentia Hydrogenii“, Säurestärke
DNA	Desoxyribonukleinsäure	PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
dNTP	Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat	<i>PRE</i>	„pheromone response element“
Dox	Doxyzyklin	RNA	Ribonukleinsäure
dsDNA	Doppelstrang-DNA	RT	Raumtemperatur
DTT	Dithiothreitol	S-Phase	DNA-Synthesephase des Zellzyklus
EDTA	Ethylendinitrilotetraacetat	sek	Sekunden
FA	Folinische Säure/ 5' Formyltetrahydrofolat	SD	synthetisches Medium mit Dextrose
FACS	Fluoreszenz-Aktivierter-Zellanalysator	SDS	Natriumdodecylsulfat
5' FOA	5' Fluoroorotsäure	T	Thymidin (in Sequenzen)
<i>FRE</i>	„filamentation responsive element“	TBE	Tris-Borat-EDTA
G	Guanosin (in Sequenzen)	TBZ	Thiabendazol
g	Erdbeschleunigung; Gramm	<i>TCS</i>	„TEA/ATTS consensus sequence“
G0-Phase	Lebensphase nach Austritt aus dem Zellzyklus	TEMED	N, N, N', N'- Tertramethylethylendiamin
G1-Phase	Gap 1-Phase des Zellzyklus	Tris	Tris(hydroxymethyl-)aminomethan
G2-Phase	Gap 2-Phase des Zellzyklus	U	„Unit“, Einheit der Enzymaktivität
G418	Geneticinsulfat	U/min	Umdrehungen pro Minute
GFP	Grün-fluoreszierendes-Protein	v/v	Volumina pro Volumen
h	Stunde	w/v	Massen (Weight) pro Volumen
HA	Epitop des Hämagglutinin	wt	Wildtyp
HU	Hydroxyharnstoff	X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-galactopyranosid
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalaktopyranosid	YNB	Yeast Nitrogen Base
<i>KIURA3</i>	<i>URA3</i> aus <i>Kleuyveromyces lactis</i>	YPD	Yeast Peptone Dextrose
kb	Kilobase(n)	z. B.	zum Beispiel

## Literaturverzeichnis

- Amberg, D. C. (1998). Three-dimensional imaging of the yeast actin cytoskeleton through the budding cell cycle. *Mol Biol Cell* **9**, 3259-62.
- Appling, D. R. (1991). Compartmentation of folate-mediated one-carbon metabolism in eukaryotes. *Faseb J* **5**, 2645-51.
- Bardin, A. J., Visintin, R. and Amon, A. (2000). A mechanism for coupling exit from mitosis to partitioning of the nucleus. *Cell* **102**, 21-31.
- Bardwell, L., Cook, J. G., Voora, D., Baggott, D. M., Martinez, A. R. and Thorner, J. (1998). Repression of yeast Ste12 transcription factor by direct binding of unphosphorylated Kss1 MAPK and its regulation by the Ste7 MEK. *Genes Dev* **12**, 2887-98.
- Bartlett, R. and Nurse, P. (1990). Yeast as a model system for understanding the control of DNA replication in Eukaryotes. *Bioessays* **12**, 457-63.
- Bechert, T., Heck, S., Fleig, U., Diekmann, S. and Hegemann, J. H. (1999). All 16 centromere DNAs from *Saccharomyces cerevisiae* show DNA curvature. *Nucleic Acids Res* **27**, 1444-1449.
- Biggins, S., Severin, F. F., Bhalla, N., Sassoon, I., Hyman, A. A. and Murray, A. W. (1999). The conserved protein kinase Ipl1 regulates microtubule binding to kinetochores in budding yeast. *Genes Dev* **13**, 532-44.
- Birnboim, H. C. and Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**, 1513-23.
- Blakley, R. L. and Benkovic, S. J. (1984). Folates and pterins. *Chemistry and biochemistry of folates* **1**, John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Bloecher, A., Venturi, G. M. and Tatchell, K. (2000). Anaphase spindle position is monitored by the BUB2 checkpoint. *Nat Cell Biol* **2**, 556-8.
- Blount, B. C., Mack, M. M., Wehr, C. M., MacGregor, J. T., Hiatt, R. A., Wang, G., Wickramasinghe, S. N., Everson, R. B. and Ames, B. N. (1997). Folate deficiency causes uracil misincorporation into human DNA and chromosome breakage: implications for cancer and neuronal damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 3290-5.
- Bouck, D. C. and Bloom, K. S. (2005). The kinetochore protein Ndc10p is required for spindle stability and cytokinesis in yeast. *PNAS* **102**, 5408-13.
- Braus, G. H., Grundmann, O., Bruckner, S. and Mosch, H. U. (2003). Amino acid starvation and Gcn4p regulate adhesive growth and FLO11 gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **14**, 4272-84.
- Cai, M. and Davis, R. W. (1990). Yeast centromere binding protein CBF1, of the helix-loop-helix protein family, is required for chromosome stability and methionine prototrophy. *Cell* **61**, 437-46.
- Castillo, A. R., Meehl, J. B., Morgan, G., Schutz-Geschwender, A. and Winey, M. (2002). The yeast protein kinase Mps1p is required for assembly of the integral spindle pole body component Spc42p. *J Cell Biol* **156**, 453-65.
- Chant, J. (1999). Cell polarity in yeast. *Annu Rev Cell Dev Biol* **15**, 365-91.
- Chant, J. and Pringle, J. R. (1991). Budding and cell polarity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Opin Genet Dev* **1**, 342-50.
- 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., Drubin, D. G. and Barnes, G. (2002b). Simple centromere, complex kinetochore: linking spindle microtubules and centromeric DNA in budding yeast. *J Cell Biol* **157**, 199-203.
- Cheeseman, I. M., Enquist-Newman, M., Muller-Reichert, T., Drubin, D. G. and Barnes, G. (2001). Mitotic spindle integrity and kinetochore function linked by the Duo1p/Dam1p complex. *J Cell Biol* **152**, 197-212.
- Cook, J. G., Bardwell, L. and Thorner, J. (1997). Inhibitory and activating functions for MAPK Kss1 in the *S. cerevisiae* filamentous-growth signalling pathway. *Nature* **390**, 85-8.
- Cosma, M. P. (2004). Daughter-specific repression of *Saccharomyces cerevisiae* HO: Ash1 is the commander. *EMBO Rep* **5**, 953-7.
- Cullen, P. J. and Sprague, G. F., Jr. (2000). Glucose depletion causes haploid invasive growth in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 13619-24.
- Cullen, P. J. and Sprague, G. F., Jr. (2002). The roles of bud-site-selection proteins during haploid invasive growth in yeast. *Mol Biol Cell* **13**, 2990-3004.
- Davidse, L. C. and Flach, W. (1978). Interaction of thiabendazole with fungal tubulin. *Biochim Biophys Acta* **543**, 82-90.
- De Antoni, A. and Gallwitz, D. (2000). A novel multi-purpose cassette for repeated integrative epitope tagging of genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* **246**, 179-85.

- De Wulf, P., McAinsh, A. D. and Sorger, P. K. (2003). Hierarchical assembly of the budding yeast kinetochore from multiple subcomplexes. *Genes Dev* **17**, 2902-21.
- Dewar, H., Tanaka, K., Nasmyth, K. and Tanaka, T. U. (2004). Tension between two kinetochores suffices for their bi-orientation on the mitotic spindle. *Nature* **428**, 93-7.
- Dey, P. (2004). Aneuploidy and malignancy: an unsolved equation. *J Clin Pathol* **57**, 1245-9.
- Dickinson, J. R. (1996). 'Fusel' alcohols induce hyphal-like extensions and pseudohyphal formation in yeasts. *Microbiology* **142**, 1391-7.
- Doheny, K. F., Sorger, P. K., Hyman, A. A., Tugendreich, S., Spencer, F. and Hieter, P. (1993). Identification of essential components of the *S. cerevisiae* kinetochore. *Cell* **73**, 761-74.
- Doyle, T. and Botstein, D. (1996). Movement of yeast cortical actin cytoskeleton visualized in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 3886-91.
- D'Souza, C. A. and Heitman, J. (2001). Conserved cAMP signaling cascades regulate fungal development and virulence. *FEMS Microbiol Rev* **25**, 349-64.
- Duesberg, P., Rausch, C., Rasnick, D. and Hehlmann, R. (1998). Genetic instability of cancer cells is proportional to their degree of aneuploidy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 13692-7.
- Edgington, N. P., Blacketer, M. J., Bierwagen, T. A. and Myers, A. M. (1999). Control of *Saccharomyces cerevisiae* filamentous growth by cyclin-dependent kinase Cdc28. *Mol Cell Biol* **19**, 1369-80.
- Entian, K.-D. and Kötter, P. (1998). Yeast mutant and plasmid collections in Brown, A. J. P., Tuite, M. (Ed), *Methods in Microbiology*, Academic Press, pp. 431-450.
- Entian, K.-D., Schuster, T., Hegemann, J. H., Becher, D., Feldmann, H., Güldener, U., Götz, R., Hansen, M., Hollenberg, C. P., Jansen, G., Kramer, W., Klein, S., Kötter, P., Kricke, J., Launhardt, H., Mannhaupt, G., Maierl, A., Meyer, P., Mewes, W., Munder, T., Niedenthal, R. K., Ramazani Rad, M., Röhmer, A., Römer, A., Rose, M., Schäfer, B., Siegler, M.-L., Vetter, J., Wilhelm, N., Wolf, K., Zimmermann, F. K., Zollner, A. and Hinnen, A. (1999). Functional analysis of 150 deletion mutants in *Saccharomyces cerevisiae* by a systematic approach. *Mol Gen Genet* **262**, 683-702.
- Erdman, S., Lin, L., Malczynski, M. and Snyder, M. (1998). Pheromone-regulated genes required for yeast mating differentiation. *J Cell Biol* **140**, 461-83.
- Erdman, S. and Snyder, M. (2001). A filamentous growth response mediated by the yeast mating pathway. *Genetics* **159**, 919-28.
- Espelin, C. W., Simons, K. T., Harrison, S. C. and Sorger, P. K. (2003). Binding of the essential *Saccharomyces cerevisiae* kinetochore protein Ndc10p to CDEII. *Mol Biol Cell* **14**, 4557-68.
- Fiedler, T. (2000). Identifizierung und Charakterisierung von CGP1, einem neuen genetischen Interaktionspartner des Zentromer- und Promotorfaktors CPF1 aus *Saccharomyces cerevisiae*, Justus-Liebig-Universität, pp. 143.
- Gancedo, J. M. (2001). Control of pseudohyphae formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev* **25**, 107-23.
- Gardner, R. D. and Burke, D. J. (2000). The spindle checkpoint: two transitions, two pathways. *Trends Cell Biol* **10**, 154-8.
- Gari, E., Piedrafita, L., Aldea, M. and Herrero, E. (1997). A set of vectors with a tetracycline-regulatable promoter system for modulated gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **13**, 837-48.
- Gaudet, A. and Fitzgerald Hayes, M. (1987). Alterations in the adenine-plus-thymine-rich region of CEN3 affect centromere function in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **7**, 68-75.
- Gavin, A. C., Bosche, M., Krause, R., Grandi, P., Marzioch, M., Bauer, A., Schultz, J., Rick, J. M., Michon, A. M., Cruciat, C. M., Remor, M., Hofert, C., Schelder, M., Brajenovic, M., Ruffner, H., Merino, A., Klein, K., Hudak, M., Dickson, D., Rudi, T., Gnau, V., Bauch, A., Bastuck, S., Huhse, B., Leutwein, C., Heurtier, M. A., Copley, R. R., Edelmann, A., Querfurth, E., Rybin, V., Drewes, G., Raida, M., Bouwmeester, T., Bork, P., Seraphin, B., Kuster, B., Neubauer, G. and Superti-Furga, G. (2002). Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. *Nature* **415**, 141-7.
- Gavrias, V., Andrianopoulos, A., Gimeno, C. J. and Timberlake, W. E. (1996). *Saccharomyces cerevisiae* TEC1 is required for pseudohyphal growth. *Mol Microbiol* **19**, 1255-63.
- Gerring, S. L., Spencer, F. and Hieter, P. (1990). The CHL 1 (CTF 1) gene product of *Saccharomyces cerevisiae* is important for chromosome transmission and normal cell cycle progression in G2/M. *Embo J* **9**, 4347-58.
- Ghosh, S. K., Poddar, A., Hajra, S., Sanyal, K. and Sinha, P. (2001). The IML3/MCM19 gene of *Saccharomyces cerevisiae* is required for a kinetochore-related process during chromosome segregation. *Mol Genet Genomics* **265**, 249-57.
- Ghosh, S. K., Sau, S., Lahiri, S., Lohia, A. and Sinha, P. (2004). The Iml3 protein of the budding yeast is required for the prevention of precocious sister chromatid separation in meiosis I and for sister chromatid disjunction in meiosis II. *Curr Genet* **46**, 82-91.
- Gimeno, C. J. and Fink, G. R. (1994). Induction of pseudohyphal growth by overexpression of PHD1, a *Saccharomyces cerevisiae* gene related to transcriptional regulators of fungal development. *Mol Cell Biol* **14**, 2100-12.



- Gimeno, C. J., Ljungdahl, P. O., Styles, C. A. and Fink, G. R. (1992). Unipolar cell divisions in the yeast *S. cerevisiae* lead to filamentous growth: regulation by starvation and RAS. *Cell* **68**, 1077-90.
- Goh, P. Y. and Kilmartin, J. V. (1993). NDC10: a gene involved in chromosome segregation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J-Cell-Biol* **121**, 503-12.
- Gotta, M., Laroche, T., Formenton, A., Maillet, L., Scherthan, H. and Gasser, S. M. (1996). The clustering of telomeres and colocalization with Rap1, Sir3, and Sir4 proteins in wild-type *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* **134**, 1349–1363.
- Guacci, V., Hogan, E. and Koshland, D. (1997). Centromere position in budding yeast: evidence for anaphase A. *Mol Biol Cell* **8**, 957-72.
- Gueldener, U., Heinisch, J., Koehler, G. J., Voss, D. and Hegemann, J. H. (2002). A second set of loxP marker cassettes for Cre-mediated multiple gene knockouts in budding yeast. *Nucleic Acids Res* **30**, e23.
- Güldener, U. (2000). Funktionelle Genomanalyse in *Saccharomyces cerevisiae*, *Institut für Mikro-und Molekularbiologie*, Justus-Liebig-Universität, pp. 147.
- Güldener, U., Heck, S., Fiedler, T., Beinbauer, J. D. and Hegemann, J. H. (1996). A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast. *Nucleic Acids Res* **24**, 2519-24.
- Haber, J. E. (1998). Mating-type gene switching in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu Rev Genet* **32**, 561-99.
- Hartman, J. L., Garvik B. and Hartwell L., (2001). Principles for the buffering of genetic variation. *Science* **291**, 1001-4.
- Hazbun, T. R., Malmstrom, L., Anderson, S., Graczyk, B. J., Fox, B., Riffle, M., Sundin, B. A., Aranda, J. D., McDonald, W. H., Chiu, C. H., Snyderman, B. E., Bradley, P., Muller, E. G., Fields, S., Baker, D., Yates, J. R., 3rd and Davis, T. N. (2003). Assigning function to yeast proteins by integration of technologies. *Mol Cell* **12**, 1353-65.
- He, X., Rines, D. R., Espelin, C. W. and Sorger, P. K. (2001). Molecular analysis of kinetochore-microtubule attachment in budding yeast. *Cell* **106**, 195-206.
- Hediger, F., Neumann, F. R., van Houwe, G., Dubrana, K. and Gasser, S. M. (2002). Live imaging of telomeres: yKu and Sir proteins define redundant telomere-anchoring pathways in yeast. *Curr Biol* **12**, 2076-89
- Hegemann, J. H. and Fleig, U. N. (1993). The centromere of budding yeast. *Bioessays* **15**, 451-60.
- Hegemann, J. H., Klein, S., Heck, S., Güldener, U., Niedenthal, R. K. and Fleig, U. (1999). A fast method to diagnose chromosome and plasmid loss in *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Yeast* **15**, 1009-1019.
- Helfant, A. H. (2002). Composition of the spindle pole body of *Saccharomyces cerevisiae* and the proteins involved in its duplication. *Curr Genet* **40**, 291-310.
- Herman, P. K. (2002). Stationary phase in yeast. *Curr Opin Microbiol* **5**, 602-7.
- Hieter, P., Mann, C., Snyder, M. and Davis, R. W. (1985). Mitotic stability of yeast chromosomes: a colony color assay that measures nondisjunction and chromosome loss. *Cell* **40**, 381-92.
- Honigberg, S. M. and Purnapatre, K. (2003). Signal pathway integration in the switch from the mitotic cell cycle to meiosis in yeast. *J Cell Sci* **116**, 2137-47.
- Hoyt, M. A., Totis, L. and Roberts, B. T. (1991). *S. cerevisiae* genes required for cell cycle arrest in response to loss of microtubule function. *Cell* **66**, 507-17.
- Hyland, K. M., Kingsbury, J., Koshland, D. and Hieter, P. (1999). Ctf19p: A novel kinetochore protein in *Saccharomyces cerevisiae* and a potential link between the kinetochore and mitotic spindle. *Journal Of Cell Biology* **145**, 15-28.
- Hyman, A. A., Middleton, K., Centola, M., Mitchison, T. J. and Carbon, J. (1992). Microtubule-motor activity of a yeast centromere-binding protein complex [see comments]. *Nature* **359**, 533-6.
- James, P., Halladay, J. and Craig, E. A. (1996). Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics* **144**, 1425-36.
- Janke, C., Ortiz, J., Lechner, J., Shevchenko, A., Magiera, M. M., Schramm, C. and Schiebel, E. (2001). The budding yeast proteins Spc24p and Spc25p interact with Ndc80p and Nuf2p at the kinetochore and are important for kinetochore clustering and checkpoint control. *Embo J* **20**, 777-91.
- Janke, C., Ortiz, J., Tanaka, T. U., Lechner, J. and Schiebel, E. (2002). Four new subunits of the Dam1-Duo1 complex reveal novel functions in sister kinetochore biorientation. *Embo J* **21**, 181-93.
- Jehn, B., Niedenthal, R. and Hegemann, J. H. (1991). In vivo analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* centromere CDEIII sequence: requirements for mitotic chromosome segregation. *Mol Cell Biol* **11**, 5212-21.
- Jiang, Y. W. and Kang, C. M. (2003). Induction of *S. cerevisiae* filamentous differentiation by slowed DNA synthesis involves Mec1, Rad53 and Swe1 checkpoint proteins. *Mol Biol Cell* **14**, 5116-24.
- Jin, Q. W., Fuchs, J. and Loidl, J. (2000). Centromere clustering is a major determinant of yeast interphase nuclear organization. *J Cell Sci* **113 (Pt 11)**, 1903-12.
- 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.
- Kaneko, Y., Hayashi, N., Toh-e, A., Banno, I. and Oshima, Y. (1987). Structural characteristics of the PHO8 gene encoding repressible alkaline phosphatase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* **58**, 137-48.

- Kang, C. M. and Jiang, Y. W. (2005). Genome-wide survey of non-essential genes required for slowed DNA synthesis-induced filamentous growth in yeast. *Yeast* **22**, 79-90.
- Kienitz, A., Vogel, C., Morales, I., Muller, R. and Bastians, H. (2005). Partial downregulation of MAD1 causes spindle checkpoint inactivation and aneuploidy, but does not confer resistance towards taxol. *Oncogene*.
- Kilmartin, J. V., Dyos, S. L., Kershaw, D. and Finch, J. T. (1993). A spacer protein in the *Saccharomyces cerevisiae* spindle poly body whose transcript is cell cycle-regulated. *J Cell Biol* **123**, 1175-84.
- Kline-Smith, S. L., Sandall, S. and Desai, A. (2005). Kinetochore-spindle microtubule interactions during mitosis. *Curr Opin Cell Biol* **17**, 35-46.
- Kobayashi, O., Yoshimoto, H. and Sone, H. (1999). Analysis of the genes activated by the FLO8 gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* **36**, 256-61.
- Köhler, G. J. (2000). Funktionelle Charakterisierung von Chromosomensegregationsmutanten in *Saccharomyces cerevisiae*, *Institut für Mikrobiologie*, Heinrich-Heine-Universität, pp. 93.
- Kohler, T., Wesche, S., Taheri, N., Braus, G. H. and Mosch, H. U. (2002). Dual role of the *Saccharomyces cerevisiae* TEA/ATTS family transcription factor Tec1p in regulation of gene expression and cellular development. *Eukaryot Cell* **1**, 673-86.
- Kondo, T., Matsumoto, K. and Sugimoto, K. (1999). Role of a complex containing Rad17, Mec3, and Ddc1 in the yeast DNA damage checkpoint pathway. *Mol Cell Biol* **19**, 1136-43.
- Kron, S. J. and Gow, N. A. (1995). Budding yeast morphogenesis: signalling, cytoskeleton and cell cycle. *Curr Opin Cell Biol* **7**, 845-55.
- Kron, S. J., Styles, C. A. and Fink, G. R. (1994). Symmetric cell division in pseudohyphae of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **5**, 1003-22.
- Lambrechts, M. G., Bauer, F. F., Marmur, J. and Pretorius, I. S. (1996). Muc1, a mucin-like protein that is regulated by Mss10, is critical for pseudohyphal differentiation in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 8419-24.
- Lechner, J. and Carbon, J. (1991). A 240 kd multisubunit protein complex, CBF3, is a major component of the budding yeast centromere. *Cell* **64**, 717-25.
- Lengauer, C., Kinzler, K. W. and Vogelstein, B. (1997). Genetic instability in colorectal cancers. *Nature* **386**, 623-7.
- Lengauer, C., Kinzler, K. W. and Vogelstein, B. (1998). Genetic instabilities in human cancers. *Nature* **396**, 643-9.
- Lengeler, K. B., Davidson, R. C., D'Souza, C., Harashima, T., Shen, W. C., Wang, P., Pan, X., Waugh, M. and Heitman, J. (2000). Signal transduction cascades regulating fungal development and virulence. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**, 746-85.
- Lew, D. J. and Burke, D. J. (2003). The spindle assembly and spindle position checkpoints. *Annu Rev Genet* **37**, 251-82.
- Lew, D. J. and Reed, S. I. (1993). Morphogenesis in the yeast cell cycle: regulation by Cdc28 and cyclins. *J Cell Biol* **120**, 1305-20.
- Li, R. and Murray, A. W. (1991). Feedback control of mitosis in budding yeast [published erratum appears in *Cell* 1994 Oct 21;79(2):following 388]. *Cell* **66**, 519-31.
- Liu, H., Styles, C. A. and Fink, G. R. (1993). Elements of the yeast pheromone response pathway required for filamentous growth of diploids. *Science* **262**, 1741-4.
- Liu, H., Styles, C. A. and Fink, G. R. (1996). *Saccharomyces cerevisiae* S288C has a mutation in FLO8, a gene required for filamentous growth. *Genetics* **144**, 967-78.
- Lo, W. S. and Dranginis, A. M. (1998). The cell surface flocculin Flo11 is required for pseudohyphae formation and invasion by *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **9**, 161-71.
- Longtine, M. S., McKenzie, A., 3rd, Demarini, D. J., Shah, N. G., Wach, A., Brachat, A., Philippsen, P. and Pringle, J. R. (1998). Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **14**, 953-61.
- Lorenz, M. C., Cutler, N. S. and Heitman, J. (2000a). Characterization of alcohol-induced filamentous growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **11**, 183-99.
- Lorenz, M. C. and Heitman, J. (1998). The MEP2 ammonium permease regulates pseudohyphal differentiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J* **17**, 1236-47.
- Lorenz, M. C., Pan, X., Harashima, T., Cardenas, M. E., Xue, Y., Hirsch, J. P. and Heitman, J. (2000b). The G protein-coupled receptor gpr1 is a nutrient sensor that regulates pseudohyphal differentiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **154**, 609-22.
- Lydall, D. (2003). Hiding at the ends of yeast chromosomes: telomeres, nucleases and checkpoint pathways. *J Cell Sci*, **116**, 4057-65.
- Madden, K. and Snyder, M. (1998). Cell polarity and morphogenesis in budding yeast. *Annu Rev Microbiol* **52**, 687-744.
- Maddox, P. S., Bloom, K. S. and Salmon, E. D. (2000). The polarity and dynamics of microtubule assembly in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat Cell Biol* **2**, 36-41.
- Madhani, H. D. and Fink, G. R. (1997). Combinatorial control required for the specificity of yeast MAPK signaling. *Science* **275**, 1314-7.

- Madhani, H. D. and Fink, G. R. (1998). The riddle of MAP kinase signaling specificity. *Trends Genet* **14**, 151-5.
- Madhani, H. D., Styles, C. A. and Fink, G. R. (1997). MAP kinases with distinct inhibitory functions impart signaling specificity during yeast differentiation. *Cell* **91**, 673-84.
- Mazur, I. (2003). Charakterisierung von putativen Kinetochorproteinen aus *Saccharomyces cerevisiae*, *Institut für Mikrobiologie*, Heinrich-Heine-Universität, pp. 108.
- McClelland, M. L., Gardner, R. D., Kallio, M. J., Daum, J. R., Gorbsky, G. J., Burke, D. J. and Stukenberg, P. T. (2003). The highly conserved Ndc80 complex is required for kinetochore assembly, chromosome congression, and spindle checkpoint activity. *Genes Dev* **17**, 101-14.
- Measday, V., Hailey, D. W., Pot, I., Givan, S. A., Hyland, K. M., Cagney, G., Fields, S., Davis, T. N. and Hieter, P. (2002). Ctf3p, the Mis6 budding yeast homolog, interacts with Mcm22p and Mcm16p at the yeast outer kinetochore. *Genes Dev* **16**, 101-13.
- Meluh, P. B. and Koshland, D. (1995). Evidence that the MIF2 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a centromere protein with homology to the mammalian centromere protein CENP-C. *Mol Biol Cell* **6**, 793-807.
- Meluh, P. B., Yang, P., Glowczewski, L., Koshland, D. and Smith, M. M. (1998). Cse4p is a component of the core centromere of *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell* **94**, 607-13.
- Michaelis, C., Ciosk, R. and Nasmyth, K. (1997). Cohesins: chromosomal proteins that prevent premature separation of sister chromatids. *Cell* **91**, 35-45.
- Miller, R. K., Cheng, S. C. and Rose, M. D. (2000). Bim1p/Yeb1p Mediates the Kar9p-dependent Cortical Attachment of Cytoplasmic Microtubules *Mol Biol Cell* **11**, 2949-59.
- Mosch, H. U., Kubler, E., Krappmann, S., Fink, G. R. and Braus, G. H. (1999). Crosstalk between the Ras2p-controlled mitogen-activated protein kinase and cAMP pathways during invasive growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **10**, 1325-35.
- Myhre, K. and Bloom, K. S. (2003). Differential kinetochore protein requirements for establishment versus propagation of centromere activity in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* **160**, 833-43.
- Nardese, V., Gütllich, M., Brambilla, A. and Carbone, M. L. (1996). Disruption of the GTP-cyclohydrolase I gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun* **218**, 273-9.
- Niedenthal, R. K., Sen-Gupta, M., Wilmen, A. and Hegemann, J. H. (1993). Cpf1 protein induced bending of yeast centromere DNA element I. *Nucleic Acids Res* **21**, 4726-33.
- O'Connell, M. J., Walworth, N. C. and Carr, A. M. (2000). The G2-phase DNA-damage checkpoint. *Trends Cell Biol* **10**, 296-303.
- Oehlen, L. and Cross, F. R. (1998). The mating factor response pathway regulates transcription of TEC1, a gene involved in pseudohyphal differentiation of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* **429**, 83-8.
- Oehlen, L. J., Jeoung, D. I. and Cross, F. R. (1998). Cyclin-specific START events and the G1-phase specificity of arrest by mating factor in budding yeast. *Mol Gen Genet* **258**, 183-98.
- O'Rourke, S. M. and Herskowitz, I. (1998). The Hog1 MAPK prevents cross talk between the HOG and pheromone response MAPK pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* **12**, 2874-86.
- Ortiz, J., Stemmann, O., Rank, S. and Lechner, J. (1999). A putative protein complex consisting of Ctf19, Mcm21, and Okp1 represents a missing link in the budding yeast kinetochore. *Genes Dev* **13**, 1140-55.
- Otremba, R. (2004). Funktionelle Charakterisierung potentieller Kinetochorproteine in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, *Institut für Mikrobiologie*, Heinrich-Heine-Universität, pp. 97.
- Palecek, S. P., Parikh, A. S. and Kron, S. J. (2000). Genetic analysis reveals that FLO11 upregulation and cell polarization independently regulate invasive growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **156**, 1005-23.
- Palecek, S. P., Parikh, A. S. and Kron, S. J. (2002). Sensing, signalling and integrating physical processes during *Saccharomyces cerevisiae* invasive and filamentous growth. *Microbiology* **148**, 893-907.
- Pan, X. and Heitman, J. (2000). Sok2 regulates yeast pseudohyphal differentiation via a transcription factor cascade that regulates cell-cell adhesion. *Mol Cell Biol* **20**, 8364-72.
- Pierce, A. J., Stark, J. M., Araujo, F. D., Moynahan, M. E., Berwick, M. and Jasin, M. (2001). Double-strand breaks and tumorigenesis. *Trends Cell Biol* **11**, S52-9.
- Pihan, G. A. and Doxsey, S. J. (1999). The mitotic machinery as a source of genetic instability in cancer. *Semin Cancer Biol* **9**, 289-302.
- Popolo, L., Cavadini, P., Vai, M. and Alberghina, L. (1993). Transcript accumulation of the GGP1 gene, encoding a yeast GPI-anchored glycoprotein, is inhibited during arrest in the G1 phase and during sporulation. *Curr Genet* **24**, 382-7.
- Posas, F., Takekawa, M. and Saito, H. (1998). Signal transduction by MAP kinase cascades in budding yeast. *Curr Opin Microbiol* **1**, 175-82.
- Pot, I., Measday, V., Snyderman, B., Cagney, G., Fields, S., Davis, T. N., Muller, E. G. and Hieter, P. (2003). Chl4p and iml3p are two new members of the budding yeast outer kinetochore. *Mol Biol Cell* **14**, 460-76.
- Pringle, J. R. and Hartwell, L. H. (1981). The *Saccharomyces cerevisiae* Cell Cycle in Strathern, J. N., Jones, E. W. and Broach, J. R. (Eds), *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces cerevisiae*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp. 751.

## Literaturverzeichnis

---

- Prinz, S., Avila-Campillo, I., Aldridge, C., Srinivasan, A., Dimitrov, K., Siegel, A. F. and Galitski, T. (2004). Control of yeast filamentous-form growth by modules in an integrated molecular network. *Genome Res* **14**, 380-90.
- Roberts, C. J., Nelson, B., Marton, M. J., Stoughton, R., Meyer, M. R., Bennett, H. A., He, Y. D., Dai, H., Walker, W. L., Hughes, T. R., Tyers, M., Boone, C. and Friend, S. H. (2000). Signaling and circuitry of multiple MAPK pathways revealed by a matrix of global gene expression profiles. *Science* **287**, 873-80.
- Roberts, R. L. and Fink, G. R. (1994). Elements of a single MAP kinase cascade in *Saccharomyces cerevisiae* mediate two developmental programs in the same cell type: mating and invasive growth. *Genes Dev* **8**, 2974-85.
- Robertson, L. S., Causton, H. C., Young, R. A. and Fink, G. R. (2000). The yeast A kinases differentially regulate iron uptake and respiratory function. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 5984-8.
- Robertson, L. S. and Fink, G. R. (1998). The three yeast A kinases have specific signaling functions in pseudohyphal growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 13783-7.
- Ross-Macdonald, P., Sheehan, A., Roeder, G. S. and Snyder, M. (1997). A multipurpose transposon system for analyzing protein production, localization, and function in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 190-5.
- Rua, D., Tobe, B. T. and Kron, S. J. (2001). Cell cycle control of yeast filamentous growth. *Curr Opin Microbiol* **4**, 720-7.
- Rupp, S., Summers, E., Lo, H. J., Madhani, H. and Fink, G. (1999). MAP kinase and cAMP filamentation signaling pathways converge on the unusually large promoter of the yeast FLO11 gene. *Embo J* **18**, 1257-69.
- Sabbagh, W., Jr., Flatauer, L. J., Bardwell, A. J. and Bardwell, L. (2001). Specificity of MAP kinase signaling in yeast differentiation involves transient versus sustained MAPK activation. *Mol Cell* **8**, 683-91.
- Saunders, W., Hornack, D., Lengyel, V. and Deng, C. (1997a). The *Saccharomyces cerevisiae* kinesin-related motor Kar3p acts at preanaphase spindle poles to limit the number and length of cytoplasmic microtubules. *J Cell Biol* **137**, 417-31.
- Saunders, W., Lengyel, V. and Hoyt, M. A. (1997b). Mitotic spindle function in *Saccharomyces cerevisiae* requires a balance between different types of kinesin-related motors. *Mol Biol Cell* **8**, 1025-33.
- Saunders, W. S. and Hoyt, M. A. (1992). Kinesin-related proteins required for structural integrity of the mitotic spindle. *Cell* **70**, 451-8.
- Shirayama, M., Matsui, Y. and Toh, E. A. (1994). The yeast TEM1 gene, which encodes a GTP-binding protein, is involved in termination of M phase. *Mol Cell Biol* **14**, 7476-82.
- Siegers K, *et al.* (1999) Compartmentation of protein folding in vivo: sequestration of non-native polypeptide by the chaperonin-GimC system. *EMBO J* **18**, 75-84
- Sikorski, R. S. and Hieter, P. (1989). A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **122**, 19-27.
- Sinet, P. M., Lejeune, J. and Jerome, H. (1979). Trisomy 21 (Down's syndrome). Glutathione peroxidase, hexose monophosphate shunt and I.Q. *Life Sci* **24**, 29-33.
- Sorger, P. K., Doheny, K. F., Hieter, P., Kopski, K. M., Huffaker, T. C. and Hyman, A. A. (1995). Two genes required for the binding of an essential *Saccharomyces cerevisiae* kinetochore complex to DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 12026-30.
- Sorger, P. K., Severin, F. F. and Hyman, A. A. (1994). Factors required for the binding of reassembled yeast kinetochores to microtubules in vitro. *J Cell Biol* **127**, 995-1008.
- Spencer, F., Gerring, S. L., Connelly, C. and Hieter, P. (1990). Mitotic chromosome transmission fidelity mutants in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **124**, 237-49.
- Straight, A. F. and Murray, A. W. (1997). The spindle assembly checkpoint in budding yeast. *Methods Enzymol* **283**, 425-40.
- Suckow, M. and Hollenberg, C. P. (1998). The activation specificities of wild-type and mutant Gcn4p in vivo can be different from the DNA binding specificities of the corresponding bZip peptides in vitro. *J Mol Biol* **276**, 887-902.
- Tinker-Kulberg, R. L. and Morgan, D. O. (1999). Pds1 and Esp1 control both anaphase and mitotic exit in normal cells and after DNA damage. *Genes Dev* **13**, 1936-49.
- Tong, A. H., Lesage, G., Bader, G. D., Ding, H., Xu, H., Xin, X., Young, J., Berriz, G. F., Brost, R. L., Chang, M., Chen, Y. Q., Cheng, X., Chua, G., Friesen, H., Goldberg, D. S., Haynes, J., Humphries, C., He, G., Hussein, S., Ke, L., Krogan, N., Li, Z., Levinson J. N., Lu, H., Ménard, P., Munyana, C., Parsons, A. B., Ryan, O., Tonikian, R., Roberts, T., Sdicu, A. M., Shapiro, J., Sheikh, B., Suter, B., Wong, S. L., Zhang, L. V., Zhu, H., Burd, C. G., Munro, S., Sander, C., Rine, J., Greenblatt, J., Peter, M., Bretscher, A., Bell, G., Roth, F. P., Brown, G. W., Andrews B., Bussey H. and Boone, C. (2004) Global mapping of the yeast genetic interaction network. *Science* **303**, 808-13
- Waddle, J. A., Karpova, T. S., Waterston, R. H. and Cooper, J. A. (1996). Movement of cortical actin patches in yeast. *J Cell Biol* **132**, 861-70.
- Walther, A. and Wendland, J. (2003). Septation and cytokinesis in fungi. *Fungal Genet Biol* **40**, 187-96.

## Literaturverzeichnis

---

- Wei, R. R., Sorger, P. K. and Harrison, S. C. (2005). Molecular organization of the Ndc80 complex, an essential kinetochore component. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 5363-7.
- Weinert, T. and Hartwell, L. (1989). Control of G2 delay by the rad9 gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Sci Suppl* **12**, 145-8.
- Westermann, S., Cheeseman, I. M., Anderson, S., Yates, J. R., Drubin, D. G. and Barnes, G. (2003). Architecture of the budding yeast kinetochore reveals a conserved molecular core. *J Cell Biol* **163**, 215-22
- Wigge, P. A. and Kilmartin, J. V. (2001). The Ndc80p complex from *Saccharomyces cerevisiae* contains conserved centromere components and has a function in chromosome segregation. *J Cell Biol* **152**, 349-60.
- Wilkinson, B. M., James, C. M. and Walmsley, R. M. (1996). Partial deletion of the *Saccharomyces cerevisiae* GDH3 gene results in novel starvation phenotypes. *Microbiology* **142 ( Pt 7)**, 1667-73.
- Wright, R. M., Repine, T. and Repine, J. E. (1993). Reversible pseudohyphal growth in haploid *Saccharomyces cerevisiae* is an aerobic process. *Curr Genet* **23**, 388-91.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J. and Messing, J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**, 103-19.
- Zeitlinger, J., Simon, I., Harbison, C. T., Hannett, N. M., Volkert, T. L., Fink, G. R. and Young, R. A. (2003). Program-specific distribution of a transcription factor dependent on partner transcription factor and MAPK signaling. *Cell* **113**, 395-404.

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Vegetativer Lebenszyklus der Hefe <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	8
Abbildung 2: Wichtige Phasen der Mitose .....	11
Abbildung 3: Übersicht über das Kinetochor der Hefe <i>S. cerevisiae</i> .....	12
Abbildung 4: Kinetochormodell .....	14
Abbildung 5: Signalwege der Spindelkontrollpunkte.....	17
Abbildung 6: Knospungsmuster verschiedener Hefezelltypen.....	21
Abbildung 7: Regulation der Expression von filamentierungsspezifischen Genen.....	24
Abbildung 8: Der Biosyntheseweg zum Dihydrofolat .....	27
Abbildung 9: Disruption oder Epitopmarkierung im Hefegenom .....	47
Abbildung 10: Ein-Hybrid Analyse .....	54
Abbildung 11: Schema einer FACS-Messung.....	58
Abbildung 12: Chromosom III Verlustanalyse.....	59
Abbildung 13: Chromosom V Verlustanalyse.....	60
Abbildung 14: Iml3p lokalisiert am Kinetochor .....	63
Abbildung 15 Ko-Lokalisation von Spc42p und Ame1p .....	64
Abbildung 16: Ein-Hybrid-Analyse.....	65
Abbildung 17: Verlustrate von Chromosom III.....	66
Abbildung 18: Bestimmung der Verlustrate von Chromosom V .....	67
Abbildung 19: Spindelorientierung .....	69
Abbildung 20: Iml3p zeigt genetische Interaktionen mit Mad2p und Bub3p .....	70
Abbildung 21: <i>iml3Δ</i> -Mutanten zeigen einen mitotischen Arrest .....	71
Abbildung 22: Bestimmung der Verlustart eines Chromosomenfragments in einer <i>iml3Δ</i> - Mutante .....	72
Abbildung 23: Lokalisierung der Aminosäureaustausche in den Iml3p-Mutantenproteinen...	73
Abbildung 24: Bestimmung der genetischen Instabilität der Iml3p-Mutanten .....	74
Abbildung 25: Genetische Stabilität von verkürzten Iml3-Proteinen.....	75
Abbildung 26: Iml3p zeigt genetische Interaktionen mit anderen Kinetochorproteinen.....	76
Abbildung 27: Iml3p zeigt genetische Interaktionen mit Ame1p.....	77
Abbildung 28: Iml3p zeigt physikalische Interaktionen mit weiteren Kinetochorproteinen....	78
Abbildung 29: Zwei-Hybrid-Analyse .....	80
Abbildung 30: Physikalische Interaktionen von Iml3p mit weiteren Kinetochorproteinen sind abhängig von Chl4p .....	81
Abbildung 31: Der N-Terminus von Iml3p interagiert nicht mit Ctf3p .....	82

## Abbildungsverzeichnis

---

Abbildung 32: Interaktionen verkürzter Iml3-Proteine mit Ame1p und Cf3p .....	82
Abbildung 33: Die Aminosäuren 124-245 von Iml3p sind nicht ausreichend für die Interaktion mit Ame1p.....	82
Abbildung 34: Ame1p zeigt genetische Interaktionen mit Bub2p.....	84
Abbildung 35: Geringe Ame1p-Expression führt zu einer Verzögerung im Zellzyklus .....	84
Abbildung 36: Genetische Interaktionen von <i>AME1</i> .....	85
Abbildung 37: Ame1p zeigt physikalische Interaktionen mit weiteren Kinetochorproteinen ..	86
Abbildung 38: Physikalische Interaktionen von Ame1p mit anderen Kinetochorproteinen sind abhängig von Ctf19p.....	87
Abbildung 39: Pseudohyphales und adhäsives Wachstum eines <i>fol1Δ</i> -Hefestammes.....	90
Abbildung 40: Das adhäsive Wachstum eines <i>fol1Δ</i> -Stammes ist abhängig von Ste12p und Flo11p, aber unabhängig von Tec1p und Phd1p .....	91
Abbildung 41: Knospungsmuster haploider Hefestämme .....	93
Abbildung 42: Filamentöses Wachstum eines <i>fol1Δ</i> -Hefestammes ist unabhängig von <i>PHD1</i> und <i>TEC1</i> .....	94
Abbildung 43: Knospungsmuster verschiedener haploider Hefestämme.....	95
Abbildung 44: Der Phosphorylierungsgrad von Kss1p und Fus3p wird in <i>fol1Δ</i> -Stämmen nicht verändert .....	97
Abbildung 45: <i>FLO11</i> -Promotor-Fragmente werden in <i>fol1Δ</i> -Stämmen anders aktiviert als in Wildtyp-Stämmen .....	98
Abbildung 46: Modell für den Aufbau des Kinetochors .....	108
Abbildung 47: <i>fol1Δ</i> -abhängige Regulation des <i>FLO11</i> -Promotors .....	115

---

## Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei allen bedanken, die mich bei der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Hegemann, der mich all die Jahre in seinen Laboren hat arbeiten lassen und mir bei Fragen immer offen zur Seite gestanden hat -auch wenn die Zusammenarbeit für beide Seiten nicht immer ganz einfach war -.

Vielen lieben Dank auch an Herrn Prof. Westhoff, der trotz seiner Aufgabe als Dekan die Zeit gefunden hat, für meine Arbeit das Korefferat zu übernehmen.

Danke auch an Frau Ursula Fleig für ihre Unterstützung und Diskussionsbereitschaft besonders auch während unserer Seminare. So manches überflüssiges Experiment konnte auf diese Weise verhindert werden.

Meinen Kollegen möchte ich für all die gemeinsamen Stunden, die wir sowohl im Labor als auch abseits der Arbeit zusammen verbracht haben, danken. Ich hatte Glück, in diesem Institut arbeiten zu dürfen.

Jens, auch wenn Du nicht in unserer Arbeitsgruppe bist; mit dir habe ich wohl die meiste Zeit verbracht. Du hast es immer verstanden mich wieder aufzubauen, wenn gerade mal gar nichts geklappt hat.

Freddy, Katja, Eleni, Rafat, ihr teilt mein „Schicksal“ nun auch schon länger. Auch wenn uns alle anderen verlassen haben, wir bleiben. Vielen Dank für die ständige Diskussionsbereitschaft und die Hilfe, die ich von Euch erhalten habe.

Danke auch an Irina, unsere TA. Du hast mir viele Arbeiten und Wege erspart.

Vielen Dank auch an meine Diplomanden Igor, Rötger und Toni. Eure Arbeiten haben mich häufig in meiner Forschung weitergebracht.



---

Vergessen darf ich natürlich niemals Steffi und Anna. Was ihr für uns tut, kann man nicht genug danken.

Danke auch an Philipp und Sven, die immer zur guten Stimmung beitragen.

Auch die „Pombes“ werden natürlich bedacht. Ihr gehört noch immer zu uns, auch wenn ihr nicht mit in den Keller gezogen seid. Danke für die Anregungen bezüglich der Arbeit, die ihr mir geliefert habt. Es war eine schöne Zeit.

Meinen Freunden danke ich für die Ablenkungen von der Arbeit, die sie mir immer wieder geliefert haben.

Nie vergessen werden darf natürlich meine Familie. Ohne euch hätte ich das alles niemals geschafft. Danke

---

## Eidesstattliche Erklärung

Düsseldorf, 13. Mai 2005

Hiermit versichere ich, dass die vorliegende Arbeit von mir selbst verfasst wurde und dass ich keine anderen als die von mir angegebenen Hilfsmittel verwendet habe. Alle Stellen, die aus anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn entsprechend übernommen wurden, habe ich mit Quellenangaben kenntlich gemacht.

Gabriele Köhler

Gabriele Köhler