

**Funktionelle Charakterisierung des
Mal3 Proteins bei der Organisation des
Mikrotubuli-Zytoskeletts der Spaltheife
*Schizosaccharomyces pombe***

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

zur

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

vorgelegt von

Christoph Beuter

aus Düsseldorf

Düsseldorf

2006

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

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

Referent: Prof. Dr. J.H. Hegemann

Koreferent: Prof. Dr. R. Wagner

Tag der mündlichen Prüfung: 26.04.2006

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	3
1 Abkürzungsverzeichnis.....	9
2 Zusammenfassung.....	11
3 Einleitung.....	12
3.1 Organisation und Funktion des Mikrotubuli-Zytoskeletts	12
3.1.1 Aufbau und Eigenschaften von Mikrotubuli	12
3.1.2 Stabile, undynamische Mikrotubuli	15
3.1.3 Organisationsformen des Mikrotubuli-Zytoskeletts während des Zellzyklus.....	15
3.1.4 Regulation von Mikrotubuli durch Mikrotubuli assoziierte Proteine	16
3.2 Das Mikrotubuli-Zytoskelett von <i>S. pombe</i> beim polaren Wachstum und der Mitose.....	18
3.2.1 Polares Wachstum von <i>S. pombe</i>	19
3.2.2 Das Aktin-Zytoskelett von <i>S. pombe</i>	20
3.2.3 Das Interphasen-Mikrotubuli-Zytoskelett von <i>S. pombe</i>	20
3.2.4 Die mitotische Spindel und der Kinetochoraufbau von <i>S. pombe</i>	23
3.3 Das <i>S. pombe</i> Mal3 Protein ist ein Mitglied der evolutionär konservierten EB1-Protein-Familie	24
3.4 Zielsetzung dieser Arbeit.....	28
4 Material und Methoden.....	30
4.1 Chemikalien.....	30
4.2 Enzyme	30
4.2.1 Restriktionsendonukleasen.....	30
4.2.2 Sonstige Enzyme	30
4.3 Sonstige Materialien.....	31
4.4 Stämme	31
4.4.1 Bakterienstämme	31
4.4.2 <i>S. cerevisiae</i> Stämme.....	31
4.4.3 <i>S. pombe</i> Stämme	31
4.5 Plasmide	34
4.6 Oligonukleotide	35
4.7 Medien und Wachstumsbedingungen.....	37
4.7.1 Nährmedien und Wachstumsbedingungen für <i>E. coli</i> Stämme.....	37

4.7.2 Nährmedien und Wachstumsbedingungen für <i>Schizosaccharomyces pombe</i> Stämme	38
4.7.3 Nährmedien und Wachstumsbedingungen für <i>S. cerevisiae</i> Stämme	39
4.8 Transformation	39
4.8.1 Transformation von <i>E. coli</i> Stämmen	39
4.8.2 Transformation von <i>S. pombe</i> Stämmen	40
4.8.3 Transformation von <i>S. cerevisiae</i> Stämmen	40
4.8.4 Das 5-Fluoroorotsäure Selektionssystem für die Gegenselektion auf Uracil auxotrophe Zellen	40
4.9 Präparation von Nukleinsäuren	41
4.10 DNA- und molekularbiologische Methoden	41
4.10.1 Allgemeine Methoden	41
4.10.2 Klonierung mittels homologer Rekombination in <i>S. cerevisiae</i>	42
4.10.3 Herstellung der pBSK/ <i>mal3-mut</i> Vektoren	42
4.10.4 Herstellung des Plasmids pBSK/ <i>mal3Δ::ura4⁺</i>	43
4.10.5 Southern Blot Analyse zur Verifizierung der korrekten Integration des <i>ura4⁺</i> Marker-Fragments im genomischen <i>mal3</i> Locus	43
4.10.6 Detektion von Protein-Protein Interaktionen mit dem Hefe-Zwei-Hybrid-System	44
4.11 Genetische Methoden	45
4.11.1 Paarung haploider <i>S. pombe</i> Hefestämme	45
4.11.2 Herstellung diploider <i>S. pombe</i> Hefestämme	45
4.11.3 Tetradenanalyse	46
4.11.4 „Random spore“-Analyse	46
4.11.5 „Random spore“-Analyse zur Herstellung von <i>mal3</i> -Mutanten-Stämmen, die GFP-Fusionsproteine exprimieren	47
4.12 Herstellung von <i>S. pombe</i> Stämmen, die endogen mit dem pk-GFP Epitop fusionierte Proteine exprimieren	47
4.12.1 Fusion von mutierten <i>mal3</i> ORFs mit der pk-GFP-Kassette	48
4.12.2 Fusion der endogenen <i>teal⁺</i> und <i>tip1⁺</i> ORFs mit der pk-GFP-Kassette	49
4.12.3 Fusion des endogenen <i>asp1⁺</i> ORFs mit der pk-GFP-Kassette	49
4.13 Mikroskopie	50
4.13.1 Lokalisierung von Aktin mittels Rhodamin-Phalloidin Färbung	51
4.13.2 Fixierung von <i>S. pombe</i> Zellen mittels Sorbit gepuffertem Para-Formaldehyd....	52

4.13.3 Lebend-Fluoreszenz Mikroskopie	53
4.14 Protein-Methoden	54
4.14.1 Herstellung von <i>S. pombe</i> Proteinextrakten für Co-Immuno-präzipitationen und Western-Blot-Analysen	54
4.14.2 Co-Immunopräzipitationen	55
4.14.3 Auftrennung von Proteinen auf SDS-Polyacrylamidgelen	56
4.14.3.1 Herstellung von SDS-Polyacrylamidgelen	56
4.14.3.2 Auftrennung von Proteinextrakten auf SDS-Polyacrylamidgelen	57
4.14.3.3 Coomassie-Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen	57
4.14.3.4 Western-Blot-Analysen	58
5 Ergebnisse	59
5.1 Funktionelle Charakterisierung der konservierten CH- und EB1-Domänen des Mal3 Proteins aus <i>S. pombe</i>	59
5.1.1 Herstellung von Mutantenstämmen, die Mal3-Varianten mit je einer spezifischen Aminosäure-Substitution exprimieren	59
5.1.1.1 Auswahl und Herstellung spezifischer Mal3-Varianten	59
5.1.1.2 Herstellung eines <i>S. pombe</i> Stammes mit einer partiellen Deletion des <i>mal3</i> ⁺ ORFs durch den <i>ura4</i> ⁺ Marker	63
5.1.1.3 Integration der mutierten <i>mal3</i> Varianten im genomischen <i>mal3</i> Locus von <i>S. pombe</i>	65
5.1.2 Werden die hergestellten Mal3-Varianten exprimiert und assoziieren sie noch mit Mikrotubuli?	67
5.1.2.1 Die Mal3-Varianten werden ähnlich zum Wildtyp exprimiert	68
5.1.2.2 Die hergestellten Mal3-Varianten assoziieren unterschiedlich effizient mit Mikrotubuli	70
5.1.3 Die verschiedenen Mal3-Varianten haben unterschiedlich stark ausgeprägte Effekte auf die Integrität der mitotischen Spindel	74
5.1.3.1 Die Thiabendazol-Hypersensitivität von <i>mal3</i> -Mutanten-Stämmen korreliert mit den Lokalisierungsdefekten der jeweils exprimierten Mal3-Variante	74
5.1.3.2 Die Mutation <i>mal3-004S/E</i> ist „semidominant“	75
5.1.3.3 Die <i>mal3</i> -Mutanten-Stämme weisen unterschiedlich stark ausgeprägte Spindel-Defekte auf	76
5.1.3.4 Der Spindel-Kontrollpunkt ist in <i>mal3-004S/E</i> aktiviert	79

5.1.3.5	Die TBZ-Hypersensitivität von <i>mal3</i> -Mutanten kann durch <i>spc7</i> ⁺ , und <i>pic1</i> ⁺ , unterschiedlich gut supprimiert werden	81
5.1.3.6	Mal3 wird für die korrekte Gruppierung von Spc7, jedoch nicht für die Gruppierung von Nuf2 und Mal2 am SPK benötigt	83
5.1.4	Die verschiedenen Mal3-Varianten haben unterschiedlich stark ausgeprägte Effekte auf die Integrität des Interphasen-Mikrotubuli-Zytoskeletts und das polare Wachstum von <i>S. pombe</i>	86
5.1.4.1	Die Zellform von <i>S. pombe</i> wird durch die Mal3-Varianten negativ beeinflusst	86
5.1.4.2	Die aberrante Zellform von <i>mal3</i> -Mutanten korreliert mit Aberrationen des Interphasen-Mikrotubuli-Zytoskeletts	87
5.1.4.3	Warum sind die Interphasen-Mikrotubuli in <i>mal3Δ</i> und <i>mal3</i> -Mutanten Zellen verkürzt?	90
5.1.4.4	Lokalisierung von Proteinen, die für korrektes polares Wachstum von <i>S. pombe</i> benötigt werden in <i>mal3</i> -Mutanten	91
5.1.4.4.1	Die Lokalisierung von Tea1-GFP an Zellenden ist in den <i>mal3</i> -Mutanten reduziert	92
5.1.4.4.2	Die Lokalisierung von Tip1 an den Zellenden und Plus-Enden von Interphasen-Mikrotubuli ist in den <i>mal3</i> -Mutanten reduziert	95
5.1.5	Die Funktionen von Mal3 in der Mitose und der Interphase lassen sich nicht trennen	96
5.2	Charakterisierung der Suppression von <i>mal3</i> -Mutanten durch <i>asp1</i> ⁺	97
5.2.1	Die TBZ-Hypersensitivität aller <i>mal3</i> -Mutanten kann durch Überexpression von <i>asp1</i> ⁺ supprimiert werden	97
5.2.2	Asp1 hat einen Einfluss auf die Lokalisierung von Mal3-004S/A an Mikrotubuli	98
5.2.3	Asp1 und Mal3 sind hypersensitiv gegenüber TBZ und Latrunculin B	100
5.2.3.1	Der <i>asp1Δ</i> Stamm ist TBZ-Hypersensitiv	100
5.2.3.2	Defektes Mal3 führt zu Latrunculin B Sensitivität	101
5.2.3.3	Die Deletion von <i>asp1</i> ⁺ zeigt additive Effekte mit <i>mal3Δ</i> und <i>mal3-005R/G</i> in der Mitose	101
5.2.3.4	Die Deletion von <i>asp1</i> ⁺ zeigt nur zum Teil additive Effekte mit <i>mal3Δ</i> und <i>mal3-005R/G</i> in der Interphase	103
5.3	Charakterisierung der genetischen Interaktion von <i>mal3</i> ⁺ und <i>peg1</i> ⁺	106

5.3.1	Mal3 und Peg1 haben antagonistische Funktionen	107
5.3.1.1	Die Deletion von <i>mal3</i> ⁺ supprimiert die Temperatursensitivität von <i>peg1.1</i> Zellen und <i>peg1.1</i> supprimiert die TBZ-Hypersensitivität	107
5.3.1.2	Die Länge von Interphasen-Mikrotubuli von <i>peg1.1/ mal3Δ</i> Doppelmutanten liegt zwischen den Längen von Interphasen-Mikrotubuli der beiden Einzelmутanten	110
6	Diskussion	113
6.1	Die Rolle der konservierten CH- und EB1-Domänen bei der Funktion von Mal3	113
6.1.1	Die CH-Domäne wird für die Bindung an Mikrotubuli benötigt.....	113
6.1.1.1	Funktion einzelner Aminosäuren bei der Bindung der CH-Domäne an Mikrotubuli	114
6.1.1.1.1	Serin 004 und Arginin 005 liegen in einer CKI/ CKII Phosphorylierungs-Konsensus- Sequenz	116
6.1.1.1.2	Lysin 047 ist Oberflächen exponiert und könnte eine Rolle bei der Interaktion mit Mikrotubuli spielen, während Tryptophan 097 in einer hydrophoben Region liegt und nicht für die Assoziation mit Mikrotubuli benötigt wird	119
6.1.2	Die Aminosäure-Substitutionen in der EB1-Domäne haben einen schwachen Einfluss auf die Mikrotubuli-Bindung von Mal3	120
6.1.2.1	Auswirkungen einzelner Aminosäure-Substitutionen auf mögliche Binde-Motive für andere Proteine in der EB1-Domäne von Mal3.....	122
6.1.3	Der C-Terminus von Mal3 wird für die effiziente Bindung an Mikrotubuli benötigt.....	125
6.1.4	Die Funktionen von Mal3 in der Mitose und der Interphase lassen sich nicht trennen.....	126
6.1.4.1	Die Mal3-Varianten Mal3-004S/E und Mal3-005R/G bewirken stärkere Phänotypen als die komplette Abwesenheit von Mal3	127
6.1.4.2	Wieso haben die verschiedenen <i>mal3</i> -Mutanten Probleme beim Aufbau einer bipolaren Spindel?	127
6.1.4.3	Abwesenheit und Defekte von Mal3 bewirken Probleme bei der Interaktion der mitotischen Spindel mit Kinetochoren und aktivieren den Spindel Kontrollpunkt.....	129
6.1.4.4	Die konservierten CH- und EB1-Domänen wirken auf unterschiedliche Weise auf die Mikrotubuli-Dynamik ein	130

6.1.4.5	Die Lokalisierung von Tea1 an Mikrotubuli und Zellenden ist von Mal3 abhängig.....	132
6.1.5	Zusammenfassung für die Mal3-Varianten.....	133
6.2	Mal3 und Asp1 haben Funktionen bei der Organisation des Mikrotubuli und des Aktin-Zytoskeletts	134
6.2.1	Wie supprimiert Asp1 die Phänotypen von <i>mal3</i> -Mutanten?	134
6.2.2	Mal3 und Asp1 haben gemeinsame Funktionen während der Mitose und beim polaren Wachstum.....	135
6.2.3	Eine mögliche Funktion von Asp1 beim polaren Wachstum.....	136
6.3	Mal3 und Peg1 haben antagonistische Funktionen	137
6.3.1	Peg1 ist ein Interphasen-Mikrotubuli-Wachstum inhibierendes Protein	137
6.3.2	Mal3 und Peg1 sind Antagonisten und haben voneinander unabhängige Funktionen.....	139
6.3.3	Mal3 und Peg1 haben unterschiedliche Effekte auf das polare Wachstum	140
6.4	Allgemeine Zusammenfassung der Diskussion.....	142
7	Literaturverzeichnis.....	144
8	Anhang	156
8.1	Für die Mutagenese von <i>mal3</i> ⁺ verwendete und hergestellte Plasmide	156
8.2	Publikationen.....	158
9	Danksagung	159

1 Abkürzungsverzeichnis

+TIP	Plus-Ende assoziiertes Protein
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
dd H ₂ O	zweifach destilliertes Wasser
Bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
ca.	cirka
CH-Domäne	Calponin-Homologie-Domäne
C-Terminus	Carboxy-Terminus
Δ	Deletion
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EGFP	„enhanced green fluorescent protein“
5-FOA	5-Fluoroorotsäure
g	Gramm
G418	Geneticin-Disulfat
GDP	Guanosin-Diphosphat
GFP	green fluorescent protein
GTP	Guanosin-Triphosphat
Kap.	Kapitel
Kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
L	Liter
LatB	Latrunculin B
M	Molar

mA	Milliampere
<i>Mal</i>	„minichromosome altered loss“
MAP	Mikrotubuli-assoziiertes Protein
Min	Minute/ n
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MM	Minimalmedium
MTOC	Mikrotubuli Organisationszentrum
Ng	Nanogramm
Nmol	Nanomol
N-Terminus	Amino-Terminus
ORF	Offener Leserahmen
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
Pmol	Picomol
Rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>S. pombe</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
Sek	Sekunde/ n
Sequ.	Sequenzierung
SPK	Spindel-Pol-Körper
Std./ n	Stunde/ n
Tab.	Tabelle
TBZ	Thiabendazol
Thia	Thiamin
Ü/N	über Nacht
usw.	und so weiter
w/v	Gewicht pro Volumen
V	Volt
z.B.	zum Beispiel

2 Zusammenfassung

Mikrotubuli sind hoch dynamische Filamente, die mit ihrem Plus-Ende das gesamte Zellvolumen nach Ziel-Strukturen „durchsuchen“, mit denen Interaktionen etabliert und nach kurzzeitiger Stabilisierung wieder gelöst werden können. Mikrotubuli interagieren unter anderem mit dem Zellkortex und den Kinetochoren auf den Chromosomen. So übernehmen sie wichtige Funktionen bei der Polarisierung von Interphase Zellen und bei der Chromosomen-Separation während der Mitose. Die Dynamik und die Interaktion von Mikrotubuli mit anderen zellulären Strukturen werden maßgeblich von Plus-Ende-assoziierten Proteinen (+TIPs) beeinflusst. Die Mechanismen, wie +TIPs Mikrotubuli beeinflussen, sind noch weitgehend unbekannt.

Das Mal3 Protein von *S. pombe* gehört zur konservierten EB1-Protein-Familie der +TIPs. Diese Studie sollte die Funktion von Mal3 bei der Regulation des Mikrotubuli-Zytoskeletts beim polaren Wachstum und während der Mitose weiter aufklären. Dazu wurde eine funktionelle Analyse von Mal3-Varianten mit spezifischen Aminosäure-Substitutionen sowie partiellen Deletionen in den konservierten CH- und EB1-Domänen unter physiologischen Bedingungen durchgeführt. Dabei wurde bestätigt, dass Mal3 Funktionen bei der Regulation von Mikrotubuli sowohl beim polaren Wachstum als auch in der Mitose ausführt. Diese liegen unter anderem in der Förderung von Mikrotubuli-Wachstum, der Rekrutierung anderer +TIPs an Mikrotubuli, dem Transport von Zellendfaktoren an die Zellenden und der Interaktion von Mikrotubuli-Plus-Enden und den Kinetochoren. Dabei konnte eine Rolle der CH-Domäne bei der Bindung an Mikrotubuli bestätigt werden. Diese Interaktion wird sehr wahrscheinlich durch elektrostatische Wechselwirkungen vermittelt und durch Phosphorylierung reguliert. Außerdem wurden starke Hinweise dafür gefunden, dass der EB1-Domäne eine Funktion bei der Interaktion mit anderen Proteinen als Tubulin zukommt.

In genetischen und zytologischen Analysen wurde außerdem die Funktion des +TIPs Peg1 untersucht. Peg1 gehört zur konservierten CLASP-Protein-Familie. Hier konnte zum ersten Mal der Beweis erbracht werden, dass EB1-Proteine und CLASP-Proteine miteinander interagieren und trotzdem funktionell voneinander unabhängig sind und als Antagonisten bei der Regulation des Interphasen-Mikrotubuli-Zytoskeletts wirken.

Weitere Analysen von Asp1, einem Aktin-Regulator, der als extragener Suppressor von *mal3*-Mutanten isoliert wurde, deuten auf eine Rolle von Mal3 und Asp1 bei der Interaktion des Aktin- und des Mikrotubuli-Zytoskeletts hin. Dies bestätigt andere Studien, die eine Funktion von EB1-Proteinen bei der Vermittlung von Aktin-Mikrotubuli Interaktionen postulieren.

3 Einleitung

Mikrotubuli bilden zusammen mit Aktin und bei höheren Eukaryoten auch Intermediär-Filamenten das Zytoskelett von eukaryotischen Zellen. Mikrotubuli sind Filamente, die das gesamte Zell-Volumen durchspannen und in vielen zellulären Prozessen wichtige Funktionen übernehmen (Übersichtsartikel: Kirschner und Mitchison 1986; Hagan und Hyams 1988). So dienen sie beim gerichteten Transport (z.B. von Vesikeln) als „Transportschienen“ für Motorproteine und werden damit für grundlegende Eigenschaften bzw. Funktionen wie Polarität und Migration von eukaryotischen Zellen benötigt (Übersichtsartikel: Kirschner und Mitchison 1986; Übersichtsartikel: Hirokawa 1998; Übersichtsartikel: Etienne-Manneville 2004). Außerdem ist die mitotische Spindel, welche für die Chromosomen-Separation während der Mitose benötigt wird, aus Mikrotubuli aufgebaut.

3.1 Organisation und Funktion des Mikrotubuli-Zytoskeletts

3.1.1 Aufbau und Eigenschaften von Mikrotubuli

Mikrotubuli sind hohle, zylindrische Polymere, welche in der Regel aus 13 helical angeordneten Protofilamenten von α -/ β -Tubulin Dimeren aufgebaut sind (Übersichtsartikel: Kirschner 1978; Übersichtsartikel: Purich und Kristofferson 1984; Übersichtsartikel: Hirokawa 1998). Mikrotubuli werden durch eine γ -Tubulin Ring-Struktur in Mikrotubuli-Organisationszentren (MTOCs) neu gebildet und wachsen durch den Einbau von freien α -/ β -Tubulin Dimeren (Mitchison und Kirschner 1984; Meads und Schroer 1995; Übersichtsartikel: Schiebel 2000; Vinh, Kern et al. 2002; Übersichtsartikel: Howard und Hyman 2003). Dabei wird das α -Tubulin eines freien Dimers direkt vor das β -Tubulin eines bereits eingebauten Dimers gesetzt (Übersichtsartikel: Howard und Hyman 2003). Dadurch haben Mikrotubuli eine polare Orientierung mit zwei unterschiedlichen Enden. α -Tubulin ist immer in Richtung des sogenannten Minus-Endes orientiert, während β -Tubulin immer zum sogenannten Plus-Ende hinzeigt. Einbau neuer Tubulin-Dimere erfolgt nahezu ausschließlich am Plus-Ende (Mitchison 1993; Übersichtsartikel: Howard und Hyman 2003). Das Minus-Ende verbleibt am MTOC, während das Plus-Ende vom MTOC weg polymerisiert (Mitchison und Kirschner 1984; Übersichtsartikel: Howard und Hyman 2003). Sowohl α -Tubulin als auch β -Tubulin eines Tubulin-Dimers sind an Guanosin-Triphosphat (GTP) gebunden (Übersichtsartikel: Desai und Mitchison 1997). Das an α -Tubulin gebundene GTP liegt

geschützt im Dimer vor, während das an β -Tubulin gebundene GTP exponiert ist und gegen Guanosin-Diphosphat (GDP) ausgetauscht werden kann (Übersichtsartikel: Howard und Hyman 2003). Mikrotubuli können nur durch den Einbau von Tubulin Dimeren, deren β -Tubulin GTP (von hier an als GTP-Tubulin Dimere bezeichnet) gebunden hat, wachsen (Mitchison 1993; Übersichtsartikel: Desai und Mitchison 1997). Das GTP von polymerisierten GTP-Tubulin Dimeren wird zu GDP hydrolysiert, so dass GTP-Tubulin Dimere nur direkt am Plus-Ende von Mikrotubuli vorkommen (Übersichtsartikel: Caplow 1992; Mitchison 1993; Nogales, Whittaker et al. 1999; Übersichtsartikel: Howard und Hyman 2003). Die dadurch entstehende Struktur wird als GTP-Kappe bezeichnet und spielt vermutlich eine wichtige Rolle bei der Stabilität von Mikrotubuli (Mitchison und Kirschner 1984). Durch Verlust der GTP-Kappe werden Mikrotubuli instabil und depolymerisieren, da Tubulin Dimere mit GDP an ihrem β -Tubulin eine Konformation einnehmen, die Mikrotubuli destabilisiert (Mandelkow, Mandelkow et al. 1991; Hyman, Chretien et al. 1995; Muller-Reichert, Chretien et al. 1998; Arnal, Karsenti et al. 2000). Diese Eigenschaften führen dazu, dass Mikrotubuli hoch dynamische Strukturen sind. Sie wachsen an ihrem Plus-Ende für eine variable Zeitspanne mit einer spezifischen Geschwindigkeit (Abb.3-1), die abhängig von der Menge freier GTP-Tubulin Dimere im Zytoplasma ist (Mitchison und Kirschner 1984; Cassimeris, Pryer et al. 1988; Sammak und Borisy 1988; Belmont, Hyman et al. 1990). Schließlich kommt es zum sogenannten „Katastrophe“ Ereignis (Abb.3-1), bei dem die GTP-Kappe verloren geht, und Mikrotubuli depolymerisieren (Mitchison und Kirschner 1984; Cassimeris, Pryer et al. 1988; Sammak und Borisy 1988; Belmont, Hyman et al. 1990; Übersichtsartikel: Howard und Hyman 2003). Die Depolymerisierung ist dabei schneller als die Polymerisierung von Mikrotubuli und erfolgt so lange, bis es zum so genannten „Neu-Wachstum“ Ereignis (Abb.3-1) kommt (Mitchison und Kirschner 1984; Cassimeris, Pryer et al. 1988; Sammak und Borisy 1988; Belmont, Hyman et al. 1990). Von diesem Zeitpunkt an erfolgt wieder Wachstum durch Einbau von GTP-Tubulin Dimeren bis zum nächsten „Katastrophe“ Ereignis. Wichtig hierbei ist, dass alle Mikrotubuli einer Zelle sich individuell verhalten. So koexistieren Mikrotubuli, die polymerisieren mit Mikrotubuli, die depolymerisieren (Sammak, Gorbisky et al. 1987). Das dynamische Verhalten von Mikrotubuli wird als „dynamische Instabilität“ bezeichnet und macht Mikrotubuli sehr flexibel (Mitchison und Kirschner 1984). Mikrotubuli „durchsuchen“ das gesamte Zellvolumen nach Ziel-Strukturen (z.B. Membranen, Zellkortex, Organellen oder Chromosomen), mit denen Interaktionen etabliert und nach kurzzeitiger Stabilisierung wieder

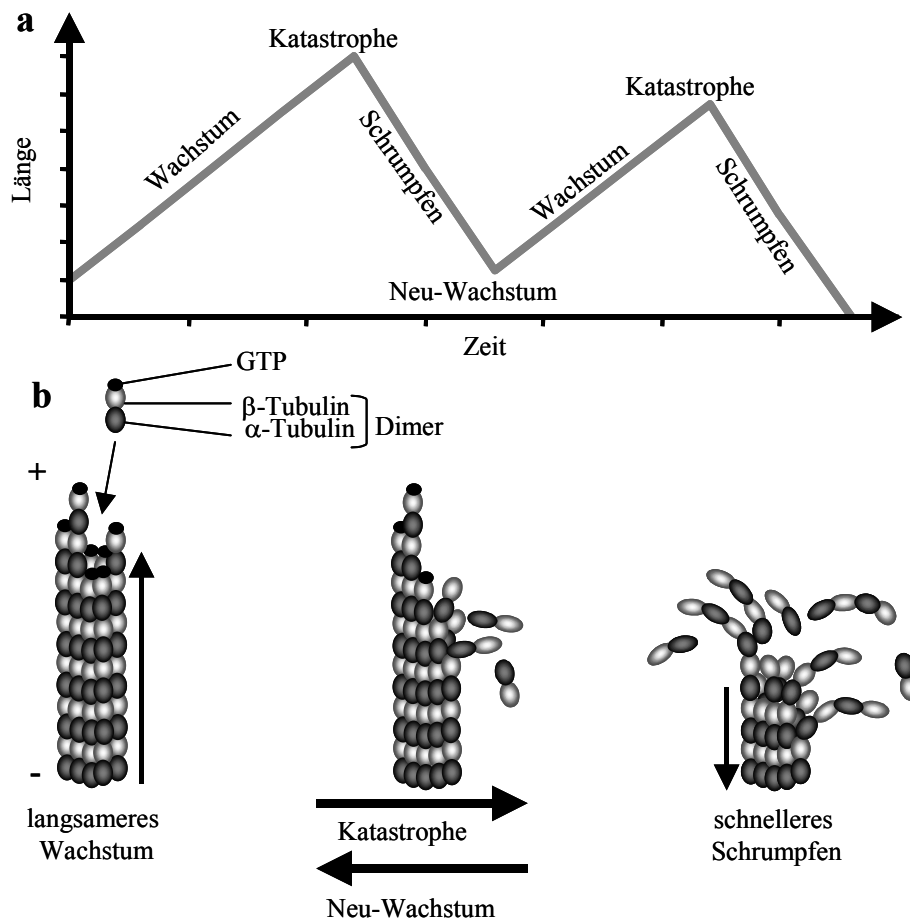


Abb.3-1: Dynamisches Wachstum von Mikrotubuli.

a: Graphische Darstellung von Wachstums- und Schrumpfungsphasen von Mikrotubuli. Dargestellt ist die Längenzunahme von Mikrotubuli in Zeitintervallen. „Katastrophe“ bezeichnet den Wechsel von Längenzunahme zu Längenabnahme. „Neu-Wachstum“ bezeichnet den Wechsel von Längenabnahme zu Längenzunahme. Mikrotubuli wachsen mit einer spezifischen Geschwindigkeit in einem Zeitintervall, bis zum „Katastrophe“-Ereignis. Dann schrumpfen Mikrotubuli mit einer spezifischen Geschwindigkeit bis zum „Neu-Wachstum“-Ereignis.

b: Wechsel zwischen Wachstum und Schrumpfung von Mikrotubuli. Mikrotubuli wachsen durch die Einlagerung von GTP-Tubulin Dimeren am Plus-Ende (links). Verlust von GTP-Tubulin Dimeren am Plus-Ende führt zum „Katastrophe“-Ereignis (Mitte), woraufhin Mikrotubuli durch den Verlust von GDP-Tubulin Dimeren am Plus-Ende schrumpfen (rechts). Erneute Einlagerung von GTP-Tubulin am Plus-Ende bewirkt das „Neu-Wachstum“-Ereignis (Mitte), woraufhin Mikrotubuli wieder wachsen.

gelöst werden können (Übersichtsartikel: Kirschner und Mitchison 1986; Übersichtsartikel: Mimori-Kiyosue und Tsukita 2003). Z.B. ist die dynamische Instabilität von Kinetochor-Mikrotubuli der mitotischen Spindel wichtig für das „Finden“ und die korrekte Verknüpfung mit den Kinetochor-Komplexen auf den Chromosomen (Gorbsky, Sammak et al. 1987; Hayden, Bowser et al. 1990; Merdes und De Mey 1990; Holy und Leibler 1994; Übersichtsartikel: Mimori-Kiyosue und Tsukita 2003; Übersichtsartikel: Pinsky und Biggins 2005). Sind die beiden Kinetochor-Komplexe eines Chromosoms korrekt mit Mikrotubuli verknüpft, so werden diese Mikrotubuli so lange stabilisiert, bis alle Kinetochore mit

Mikrotubuli assoziiert sind, während Mikrotubuli, welche nicht korrekt verknüpft sind, dynamisch bleiben (Hayden, Bowser et al. 1990).

3.1.2 Stabile, undynamische Mikrotubuli

Bei höheren Eukaryoten kommen in nicht mitotischen Zellen neben den dynamischen Mikrotubuli noch hoch stabile, undynamische Mikrotubuli vor (Schulze, Asai et al. 1987). Dabei handelt es sich um Mikrotubuli, deren Tubulin Dimere nach Polymerisierung durch Abspaltung des C-terminalen Tyrosin-Rests und/ oder Acetylierung modifiziert werden (Übersichtsartikel: Bulinski und Gundersen 1991). Hoch stabile, undynamische Mikrotubuli weisen eine Halbwertszeit von einer Stunde im Gegensatz zu 10 Minuten bei dynamischen Mikrotubuli auf (Schulze, Asai et al. 1987; Webster, Gundersen et al. 1987). Allerdings ist die Modifikation dieser Mikrotubuli nicht die Ursache für die Stabilisierung, sondern vermutlich eine Folge der Stabilisierung (Gundersen, Khawaja et al. 1987; Khawaja, Gundersen et al. 1988). Die Stabilisierung wird vermutlich durch eine ATP-sensitive Kappen-Struktur am Plus-Ende bewirkt (Infante, Stein et al. 2000). Stabile, undynamische Mikrotubuli kommen gehäuft in differenzierten Zellen vor, können jedoch auch während der Zell-Migration z.B. von Mäuse-Fibroblasten detektiert werden (Gundersen und Bulinski 1986; Übersichtsartikel: Bulinski und Gundersen 1991; Wen, Eng et al. 2004). Vermutlich spielen stabile Mikrotubuli eine Rolle beim gerichteten Transport von Komponenten zu spezifischen Positionen in der jeweiligen Zelle (Gurland und Gundersen 1995; Kreitzer, Liao et al. 1999).

3.1.3 Organisationsformen des Mikrotubuli-Zytoskeletts während des Zellzyklus

Das Mikrotubuli-Zytoskelett kommt während des eukaryotischen Zellzyklus in zwei distinkten Formen vor (Belmont, Hyman et al. 1990). Während der Interphase sind Mikrotubuli als lange Filamente organisiert, die die gesamte Zelle durchspannen (Übersichtsartikel: Dogterom, Kerssemakers et al. 2005). Mit Eintritt in die Mitose werden die Interphasen-Mikrotubuli abgebaut und in der mitotischen Spindel zwischen zwei MTOCs, den Zentrosomen (bei Pilzen Spindelpolkörper), reorganisiert. Dabei können drei verschiedene Mikrotubuli-Gruppen unterschieden werden. Zum einen erstrecken sich Mikrotubuli von einem Zentrosom in Richtung des anderen Zentrosoms und überlappen dabei mit Mikrotubuli, die aus entgegengesetzter Richtung vom anderen Zentrosom kommen (McDonald, Edwards et al. 1979; Tippit, Pillus et al. 1983; McIntosh, Roos et al. 1985; Ding, McDonald et al. 1993; Mastronarde, McDonald et al. 1993). Die zweite Gruppe umfasst die

sogenannten Kinetochor-Mikrotubuli (Mitchison und Kirschner 1985; Rieder 1990; Rieder und Alexander 1990; Übersichtsartikel: Maiato, DeLuca et al. 2004). Dabei handelt es sich um Mikrotubuli, die sich zwischen Zentrosom und Kinetochor, einem Multi-Protein-Komplex, der als Interaktions-Plattform von mitotischer Spindel und Chromosom dient, erstrecken (Mitchison und Kirschner 1985; Übersichtsartikel: Kirschner und Mitchison 1986; Übersichtsartikel: Biggins und Walczak 2003; Übersichtsartikel: Maiato, DeLuca et al. 2004). Wichtig hierbei ist, dass ein Chromosom aus zwei identischen Schwester-Chromatiden aufgebaut ist, von denen jedes einen eigenen Kinetochor-Komplex besitzt. Durch Verknüpfung beider Schwester-Kinetochore wird gewährleistet, dass Schwester-Chromatiden korrekt auf die beiden Folgezellen aufgeteilt werden können (Übersichtsartikel: Pinsky und Biggins 2005). Bei der dritten Gruppe handelt es sich um die Astral-Mikrotubuli, welche nicht mehr zur eigentlichen mitotischen Spindel gezählt werden und sich vom Zentrosom aus zum Zellkortex hin erstrecken (Rosenblatt, Cramer et al. 2004; Übersichtsartikel: Dogterom, Kerssemakers et al. 2005). Astral-Mikrotubuli werden für die Orientierung der Spindel benötigt (Rosenblatt, Cramer et al. 2004). Durch Verkürzung der Kinetochor-Mikrotubuli (Übersichtsartikel: Dogterom, Kerssemakers et al. 2005) und Elongation der Spindel-Mikrotubuli zwischen den beiden Zentrosomen werden die Chromosomen auf die beiden Folgezellen aufgeteilt (Tippit, Schulz et al. 1978; McIntosh, McDonald et al. 1979; Masuda, McDonald et al. 1988; Cande und Hogan 1989; Masuda, Hirano et al. 1990; Nislow, Lombillo et al. 1992).

3.1.4 Regulation von Mikrotubuli durch Mikrotubuli assoziierte Proteine

Die Dynamik und die Interaktion von Mikrotubuli mit anderen zellulären Strukturen werden maßgeblich durch eine Gruppe von Proteinen beeinflusst, die mit den Plus-Enden von Mikrotubuli assoziiert sind. Diese Proteine werden als Plus-End bindende Proteine (englisch: plus end tracking proteins; Abkürzung: +TIPs) bezeichnet und sind bei allen Eukaryoten konserviert (Übersichtsartikel: Schuyler und Pellman 2001). +TIPs kolokalisieren mit den Plus-Enden von Mikrotubuli entweder dadurch, dass sie mit Tubulin-Dimeren kopolymerisieren oder dass sie durch gerichteten Transport entlang von Mikrotubuli mittels Kinesin-Motor-Proteinen zu den Plus-Enden gelangen (Übersichtsartikel: Mimori-Kiyosue und Tsukita 2003; Übersichtsartikel: Galjart 2005). Dabei regulieren +TIPs die Dynamik von Mikrotubuli dadurch, dass sie „Katastrophe“- oder „Neu-Wachstum“-Ereignisse verhindern bzw. herbeiführen, wodurch entweder das Wachstum oder das Schrumpfen von Mikrotubuli bewirkt wird (Übersichtsartikel: Mimori-Kiyosue und Tsukita 2003; Übersichtsartikel: Galjart

2005). +TIPs aus einer Protein-Familie wirken sich in der Regel einheitlich spezifisch positiv oder negativ auf eines oder beide Ereignisse aus. Zwischen den meisten +TIPs bestehen Wechselwirkungen und es kann davon ausgegangen werden, dass sie alle in einem „großen“ Plus-End-Komplex vorliegen, wobei abhängig von der benötigten Funktion zu unterschiedlichen Zeitpunkten verschiedene Interaktionen zwischen den jeweiligen Proteinen stattfinden (Übersichtsartikel: Mimori-Kiyosue und Tsukita 2003).

Zu den +TIPs gehören unter anderem die Proteine der hoch konservierten CLIP-, CLASP-, und EB1-Protein-Familien. Die EB1-Proteine werden später ausführlicher eingeführt. Die CLIP-Proteine weisen alle dieselbe konservierte Domänen-Struktur auf, liegen vermutlich als Homodimere vor und lokalisieren an Plus-Enden wachsender Mikrotubuli (Pierre, Scheel et al. 1992; Übersichtsartikel: Galjart 2005). CLIP-Proteine binden an Mikrotubuli durch N-terminal gelegene CAP-Gly-Motive und beeinflussen die Dynamik von Mikrotubuli am Plus-Ende (Brunner und Nurse 2000; Komarova, Akhmanova et al. 2002; Übersichtsartikel: Galjart 2005). Je nach Organismus bewirken CLIP-Proteine „Neu-Wachstum“-Ereignisse (Komarova, Akhmanova et al. 2002) oder verhindern „Katastrophe-Ereignisse“ (Brunner und Nurse 2000), wirken also als pro-„Neu-Wachstum“-Faktoren oder anti-„Katastrophe“-Faktoren. Außerdem spielen CLIP-Proteine eine Rolle bei der Interaktion von Mikrotubuli-Plus-Enden mit anderen zellulären Strukturen, wie z.B. den Kinetochor-Komplexen der Chromosomen und dem Zellkortex (Dujardin, Wacker et al. 1998; Übersichtsartikel: Mimori-Kiyosue und Tsukita 2003; Übersichtsartikel: Schliwa und Woehlke 2003). Dabei spielt die Interaktion von CLIP-Proteinen mit dem Mikrotubuli-Minus-Ende gerichteten Dynein/Dynactin Motor-Protein-Komplex eine Rolle, welche über C-terminal gelegene Metall-Binde-Motive von CLIP-Proteinen vermittelt wird. Dynein/Dynactin assoziiert sowohl mit Kinetochoren, welche nicht mit Spindel-Mikrotubuli assoziiert sind, als auch mit Aktin am Zellkortex und dient dabei als Interaktionsplattform für CLIP-Proteine (Dujardin, Wacker et al. 1998; Übersichtsartikel: Schliwa und Woehlke 2003). Außerdem konnte gezeigt werden, dass CLIP170 direkt mit Komponenten interagiert, welche für die Organisation des Aktin-Zytoskeletts am Zellkortex benötigt werden (Fukata, Watanabe et al. 2002). Aufgrund dessen wird postuliert, dass CLIP-Proteine Interaktionen von Mikrotubuli mit „Aktin-reichen“ Zell-Kortex-Regionen vermitteln und so zur Polarisierung von Mikrotubuli zu spezifischen Zell-Kortex-Regionen hin benötigt werden (Fukata, Watanabe et al. 2002).

Die CLASP-Proteine interagieren mit den CLIP-Proteinen und wurden unter anderem aufgrund dieser Tatsache identifiziert (Inoue, do Carmo Avides et al. 2000; Lemos, Sampaio et al. 2000; Akhmanova, Hoogenraad et al. 2001). Bei Säugern wurden zwei, bei *C. elegans*

drei CLASP-Familien-Mitglieder identifiziert, während *D. melanogaster* und Hefen jeweils nur ein CLASP-Protein besitzen (Übersichtsartikel: Galjart 2005). CLASP-Proteine binden an Mikrotubuli, CLIP-Proteine und EB1-Proteine (einer weiteren +TIP-Protein-Familie) und werden für die Integrität des Mikrotubuli-Zytoskeletts benötigt (Inoue, do Carmo Avides et al. 2000; Lemos, Sampaio et al. 2000; Akhmanova, Hoogenraad et al. 2001; Inoue, Savoian et al. 2004; Übersichtsartikel: Galjart 2005; Mimori-Kiyosue, Grigoriev et al. 2005). So werden CLASP-Proteine in sich differenzierenden Säuger Zellen für die Ausbildung von stabilen, nicht dynamischen Mikrotubuli benötigt, welche zu Zellkortex-Regionen orientiert sind, die wachsen und Ausstülpungen bilden (Akhmanova, Hoogenraad et al. 2001; Mimori-Kiyosue, Grigoriev et al. 2005). Außerdem interagieren CLASP-Proteine mit Kinetochoren und dem Zellkortex und werden benötigt, um dynamische Mikrotubuli mit diesen Strukturen zu verknüpfen (Maiato, Fairley et al. 2003; Maiato, Khodjakov et al. 2005; Mimori-Kiyosue, Grigoriev et al. 2005). Passend dazu lokalisieren CLASP-Proteine in sich differenzierenden Säuger Zellen fast ausschließlich an den Plus-Enden von dynamischen sowie stabilen, undynamischen Mikrotubuli, die sich in Zellkortexnähe befinden (Akhmanova, Hoogenraad et al. 2001; Mimori-Kiyosue, Grigoriev et al. 2005; Wittmann und Waterman-Storer 2005). An Plus-Enden von dynamischen Mikrotubuli, die sich nicht in Zellkortexnähe befinden, sind -abhängig vom untersuchten Zelltyp- seltener CLASP-Proteine lokalisiert (Akhmanova, Hoogenraad et al. 2001; Mimori-Kiyosue, Grigoriev et al. 2005; Wittmann und Waterman-Storer 2005).

In dieser Arbeit wurden die Funktionen von +TIPs bei der Organisation des Mikrotubuli-Zytoskeletts am Modellorganismus *Schizosaccharomyces pombe* (*S. pombe*) untersucht. Das Interphasen-Mikrotubuli-Zytoskelett der einzelligen Spaltheife *S. pombe* ist in seinem Aufbau und seiner Funktion identisch zu dem Interphasen-Mikrotubuli-Zytoskelett höherer Eukaryoten. Auch der Ablauf der Mitose, sowie die Organisation und Funktion der mitotischen Spindel und der Kinetochor-Komplexe ist vergleichbar mit höheren Eukaryoten. Zusätzlich sind sämtliche +TIP-Familien bei *S. pombe* konserviert.

3.2 Das Mikrotubuli-Zytoskelett von *S. pombe* beim polaren Wachstum und der Mitose

Das Mikrotubuli-Zytoskelett von *S. pombe* kommt wie das Mikrotubuli-Zytoskelett höherer Eukaryoten in zwei distinkten Organisationsformen vor. Während der Interphase treten Mikrotubuli als lange Filamente auf, die das gesamte Zellvolumen durchspannen (Hagan und Hyams 1988). Dabei werden Interphasen-Mikrotubuli für die korrekte Lokalisierung der

Wachstumszonen von *S. pombe* benötigt (Mata und Nurse 1997; Sawin und Snaith 2004). Mit Eintritt in die Mitose werden Interphasen-Mikrotubuli abgebaut und in der mitotischen Spindel reorganisiert, welche die korrekte Chromosomen-Aufteilung auf die beiden Folgezellen sicherstellt (Hagan und Hyams 1988).

3.2.1 Polares Wachstum von *S. pombe*

Die Spalthefe *S. pombe* gehört zu den Ascomyceten und besitzt eine zylindrische Zellform (Abb.3-2). Wie alle anderen Hefen besitzt *S. pombe* eine Zellwand, und Wachstum erfolgt durch Einlagerung neuen Zellwandmaterials. Dabei wachsen *S. pombe* Zellen polar entlang der Zelllängsachse, dadurch dass die Wachstumszonen an den beiden entgegengesetzten Zellenden lokalisiert werden (Mitchison 1957; May 1962; Mitchison und Nurse 1985; Übersichtsartikel: Hayles und Nurse 2001 und Abb.3-2). So wird sichergestellt, dass die zylindrische Zellform beibehalten wird. Bei *S. pombe* Zellen, die die Mitose durchlaufen haben, trennen sich die beiden Folgezellen, indem ein Septum in der Zellmitte gebildet und die Verbindung zwischen den beiden Folgezellen aufgelöst wird (Mitchison und Nurse 1985; Übersichtsartikel: Hayles und Nurse 2001). Dadurch können bei *S. pombe* zwei Zellenden unterschieden werden. Das alte Zellende ist das Zellende, welches bereits vor der Zellteilung existierte (Mitchison und Nurse 1985 und Abb.3-2). Das neue Zellende ist das Zellende, welches durch die gerade abgeschlossene Zellteilung entstanden ist (Mitchison und Nurse 1985 und Abb.3-2). Direkt nach der Zellteilung wächst die *S. pombe* Zelle solange monopolar nur am alten Zellende, bis das sogenannte NETO Ereignis (NETO: englisch, New End Take

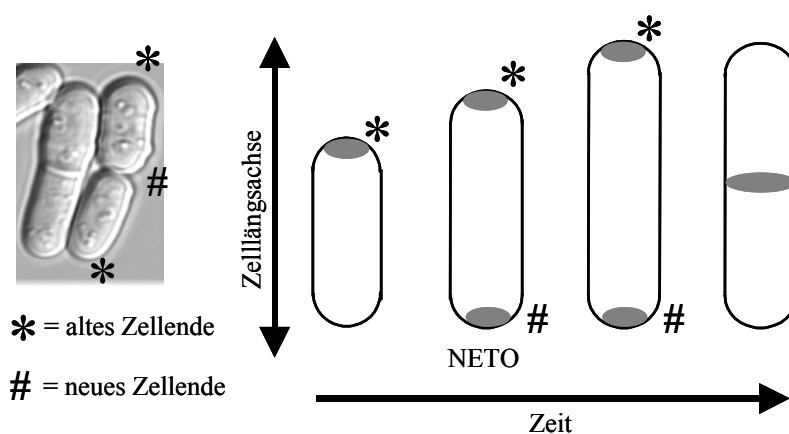


Abb.3-2: Polares Wachstum von *S. pombe*.

Dargestellt ist das Wachstum von *S. pombe* Zellen entlang der Längsachse über Zeit (von links nach rechts). Dabei lokalisieren *S. pombe* Zellen ihre Wachstumszonen an den Zellenden (graue Elipsen). Nach der Zellteilung wachsen *S. pombe* Zellen nur am alten Zellende (*), welches bereits vor der Zellteilung existierte. Nach dem NETO Ereignis (new end take off) wachsen *S. pombe* Zellen auch am neuen Zellende (#), welches durch die Zellteilung entsteht. Wachstum erfolgt bis zum Eintritt in die Mitose, dann werden die Wachstumszonen in der Zellmitte reorganisiert, wo die beiden Folgezellen später getrennt werden.

Off) eintritt (Mitchison und Nurse 1985; Übersichtsartikel: Hayles und Nurse 2001 und Abb.3-2). Von diesem Zeitpunkt an erfolgt bipolares Wachstum an beiden Zellenden, bis die Zelle eine ausreichende Größe für die nächste Mitose erreicht hat (Mitchison 1957; May 1962; Mitchison und Nurse 1985 und Abb.3-2). Dann stoppt das Zellendwachstum und die Wachstumszonen werden in der Zellmitte relokalisiert, wo später die Septierung erfolgt und der gesamte Prozess von vorne abläuft.

Für korrektes polares Wachstum werden sowohl das Aktin als auch das Mikrotubuli-Zytoskelett benötigt (Übersichtsartikel: Hayles und Nurse 2001).

3.2.2 Das Aktin-Zytoskelett von *S. pombe*

Das Interphasen-Aktin-Zytoskelett von *S. pombe* besteht aus zwei unterschiedlichen Aktin Strukturen (Marks und Hyams 1985). Zum einen ist Aktin in den sogenannten Aktin-Flecken organisiert, die an Zellenden lokalisiert sind. Außerdem sind auch Aktin-Kabel vorhanden, die sich zwischen dem Zellmittelpunkt und den Zellenden erstrecken. Dabei assoziieren beide Strukturen ausschließlich mit wachsenden Zellenden und eine Fehllokalisierung von Aktin im gesamten Zytoplasma geht mit einem kompletten Polaritätsverlust der betroffenen Zelle einher (Verde, Mata et al. 1995).

3.2.3 Das Interphasen-Mikrotubuli-Zytoskelett von *S. pombe*

Interphasen-Mikrotubuli von *S. pombe* sind in bis zu acht Bündeln pro Zelle, mit bis zu sieben Mikrotubuli pro Bündel organisiert (Übersichtsartikel: Hagan 1998; Sagolla, Uzawa et al. 2003). Diese werden von nahe dem Zellkern in der Zellmitte gelegenen Interphasen-MTOCs (I-MTOCs) und dem Spindelpolkörper (SPK) neu gebildet (Übersichtsartikel: Hagan 1998; Sagolla, Uzawa et al. 2003). Die Mikrotubuli dieser Bündel polymerisieren dann mit ihren Plus-Enden von der Zellmitte aus entlang der Zell-Längsachse auf die Zellenden zu, bis sie diese erreichen, verweilen für eine kurze Zeitspanne an den Zellenden und depolymerisieren dann wieder (Übersichtsartikel: Hagan 1998; Drummond und Cross 2000; Sagolla, Uzawa et al. 2003 und Abb.3-3a). Wichtig hierbei ist, dass Mikrotubuli innerhalb eines Bündels asynchron polymerisieren, so dass innerhalb eines Bündels Mikrotubuli mit unterschiedlichen Längen vorkommen können (Sagolla, Uzawa et al. 2003; Busch und Brunner 2004; Busch, Hayles et al. 2004). Zwei Mikrotubuli-Bündel, die jeweils zu den entgegengesetzten Zellenden polymerisieren, überlappen dabei mit ihren Minus-Enden in der Zellmitte nahe dem Zellkern (Drummond und Cross 2000 und Abb.3-3a). So wird sichergestellt, dass das gesamte Zellvolumen von Interphasen-Mikrotubuli-Bündeln durchspannt wird und ständig

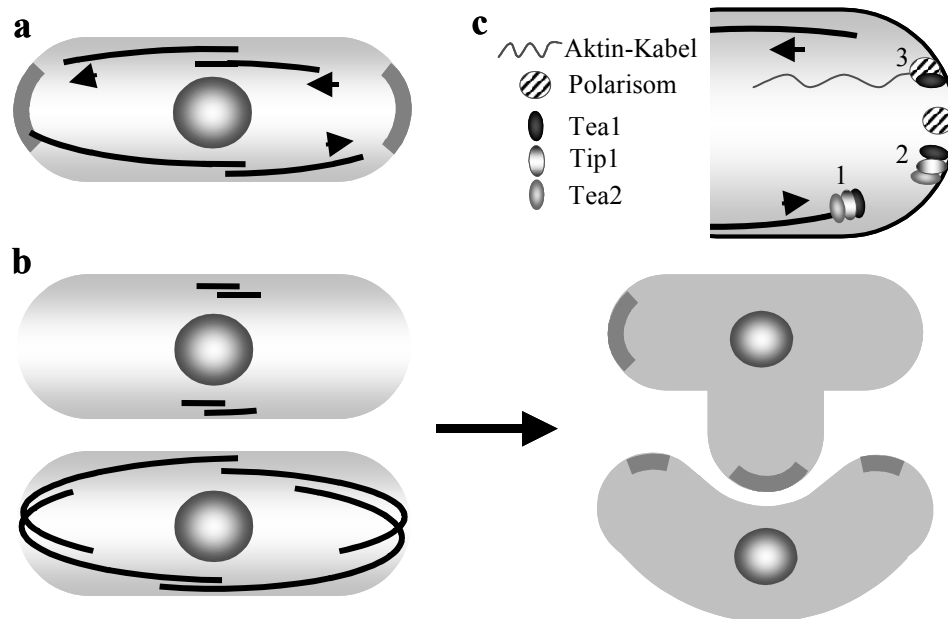


Abb.3-3: Das Interphasen-Mikrotubuli-Zytoskelett beim polaren Wachstum von *S. pombe*.

a: Mikrotubuli (schwarze Balken) sind als antiparallele Bündel organisiert und wachsen aus der Zellemitte auf die Wachstumszonen (graue Fläche) an den Zellenden von *S. pombe* zu oder schrumpfen wieder zurück (symbolisiert durch die Pfeilrichtung). Dabei überlappen zwei Bündel in der Zellemitte.

b: Aberrationen der Interphasen-Mikrotubuli. Verkürzte oder verlängerte Mikrotubuli führen zu einer Fehllokalisierung von Wachstumszonen und verursachen so aberrante Zellformen.

c: Mikrotubuli werden benötigt, um den Zellendfaktor Tea1 an die Zellenden zu transportieren. Tea1 wird durch die Proteine Tea2 und Tip1 an den Plus-Enden von Mikrotubuli lokalisiert. Am Zellende wird Tea1 abgeladen und Mikrotubuli schrumpfen wieder zurück. Tea1 wird benötigt, um andere Proteine an die Zellende zu rekrutieren und assoziiert mit dem Polarisom, welches Aktin-Kabel polymerisiert. Aktin wird für das Wachstum an den Zellenden benötigt.

Mikrotubuli-Plus-Enden die Zellenden erreichen. Im Rest dieser Arbeit werden die Interphasen-Mikrotubuli-Bündel kollektiv als Interphasen-Mikrotubuli bezeichnet.

Interphasen-Mikrotubuli werden benötigt, um die Wachstumszonen korrekt an den Zellenden zu lokalisieren (Übersichtsartikel: Hayles und Nurse 2001; Sawin und Snaith 2004). Defekte des Interphasen-Mikrotubuli-Zytoskeletts haben keinen kompletten Polaritätsverlust zur Folge, sondern führen zu einer falschen Polarisierung der Zelle (Verde, Mata et al. 1995; Übersichtsartikel: Hayles und Nurse 2001). Dabei werden Wachstumszonen fehllokalisiert, was zur Ausbildung aberranter Zellformen, in Form gekrümmter und verzweigter Zellen, führt (Abb.3-3a und b).

Aberrationen des Interphasen-Mikrotubuli-Zytoskeletts können durch Defekte in verschiedenen Gruppen von Proteinen hervorgerufen werden, die eine direkte Funktion bei der Organisation des Interphasen-Mikrotubuli-Zytoskeletts haben. Die erste Gruppe stellen die Tubuline und Komponenten, welche für die korrekte Faltung von Tubulinen benötigt werden, dar. Defekte in dieser Gruppe führen zu stark verkürzten Mikrotubuli oder sogar zur kompletten Abwesenheit von Interphasen-Mikrotubuli und damit zu aberranten Zellformen (Radcliffe, Hirata et al. 1998; Radcliffe, Garcia et al. 2000; Radcliffe und Toda 2000). Die

zweite Gruppe stellen Komponenten der I-MTOCs dar. Defekte von Komponenten der I-MTOCs führen zu stark elongierten Interphasen-Mikrotubuli, die sich um die Zellenden herumbiegen, und damit zu aberranten Zellformen (Verde, Mata et al. 1995; Vardy und Toda 2000; Fujita, Vardy et al. 2002; Venkatram, Tasto et al. 2004). Die dritte Gruppe stellen Proteine dar, die am Plus-Ende von Interphasen-Mikrotubuli die Dynamik von Mikrotubuli und/ oder die Interaktion von Mikrotubuli mit dem Zellkortex beeinflussen. Zu dieser Gruppe zählen die +TIPs.

Das +TIP Tip1 (CLIP-Familie) stellt z.B. als anti-„Katastrophe“-Faktor sicher, dass Interphasen-Mikrotubuli die Zellenden erreichen (Brunner und Nurse 2000; Garcia, Vardy et al. 2001; Busch und Brunner 2004; Busch, Hayles et al. 2004). Auch das Kinesin-Motorprotein Tea2 spielt hierbei eine Rolle, indem es Tip1 an die Plus-Enden von Interphasen-Mikrotubuli transportiert (Browning, Hackney et al. 2003; Busch, Hayles et al. 2004). Defekte in einem dieser beiden Proteine führen zu verkürzten Interphasen-Mikrotubuli und aberranten Zellformen (Browning, Hayles et al. 2000; Brunner und Nurse 2000; Garcia, Vardy et al. 2001). Außerdem werden Tip1 und Tea2 für die Lokalisierung von Tea1 an Interphasen-Mikrotubuli-Plus-Enden benötigt (Mata und Nurse 1997; Browning, Hayles et al. 2000; Brunner und Nurse 2000 und Abb.3-3c). Tea1 ist ein Zellendfaktor, der Wachstumszonen definiert und Homologie zur ERM-Protein-Familie (Ezrin-Radixin-Moesin) aufweist, die eine Funktion bei der Verknüpfung von Zellmembranen mit dem Aktin-Zytoskelett hat (Mata und Nurse 1997; Übersichtsartikel: Bretscher, Edwards et al. 2002; Snaith, Samejima et al. 2005). Tea1 wird auf Mikrotubuli-Plus-Enden zu den Zellenden transportiert, wo es abgeladen wird, und der Mikrotubulus nach kurzer Zeit zurückschrumpft (Behrens und Nurse 2002). Dort definiert Tea1 Wachstumszonen dadurch, dass es Tip1, Tea2 und andere Proteine, die für polarisiertes Wachstum benötigt werden, ans Zellende rekrutiert (Mata und Nurse 1997; Behrens und Nurse 2002; Snaith und Sawin 2003; Tatebe, Shimada et al. 2005). Zu diesen Proteinen zählen auch Komponenten, die zum sogenannten Polarisom gehören. Tea1 assoziiert mit dem Polarisom, das am Zellende für die Polymerisierung von Aktin-Kabeln benötigt wird (Feierbach und Chang 2001; Glynn, Lustig et al. 2001; Übersichtsartikel: Chang und Peter 2003; Feierbach, Verde et al. 2004). Die Generierung von Aktin-Kabeln wiederum geht mit der Etablierung von Wachstum einher, und es wird spekuliert, dass die Tea1 Polarisom Assoziation für das NETO Ereignis benötigt wird (Übersichtsartikel: Chang und Peter 2003; Übersichtsartikel: Snaith und Sawin 2005). Die Lokalisierung von Tea1 an Zellenden hängt von Mikrotubuli ab, so dass bei Aberrationen des Mikrotubuli-Zytoskeletts Tea1 nicht mehr korrekt lokalisiert werden kann und es so zu falsch

lokalisierten Wachstumszonen kommen kann (Browning, Hayles et al. 2000; Brunner und Nurse 2000; Sawin und Snaith 2004). Die Interphasen-Mikrotubuli von *S. pombe* spielen also beim polaren Wachstum eine Rolle durch die lokale Organisation des Aktin-Zytoskeletts.

3.2.4 Die mitotische Spindel und der Kinetochoraufbau von *S. pombe*

Die Mitose von Spalthefen unterscheidet sich von der Mitose höherer Eukaryoten lediglich dadurch, dass Spalthefen eine geschlossene Mitose vollziehen. Dabei wird die Kernhülle nicht abgebaut und eine intranukleäre Spindel aufgebaut (Übersichtsartikel: Hagan 1998). Mit dem Eintritt in die Mitose wird zeitgleich mit dem Abbau des Interphasen-Mikrotubuli-Zytoskeletts die bipolare mitotische Spindel zwischen den beiden SPKs aufgebaut (Ding, McDonald et al. 1993; Hagan und Yanagida 1995). Zeitgleich beginnen die drei *S. pombe* Chromosomen zu kondensieren und sich auf der Metaphaseplatte anzuordnen (Toda, Yamamoto et al. 1981; Funabiki, Hagan et al. 1993; Ekwall, Javerzat et al. 1995). Die Metaphase-Spindel von *S. pombe* durchspannt den gesamten Zellkern und ist ähnlich der Spindel höherer Eukaryoten aufgebaut (Kap.3.1.3 und Ding, McDonald et al. 1993). Die Metaphase wird beendet, sobald alle Schwester-Kinetochore mit Kinetochor-Mikrotubuli verknüpft sind. Dann wird die Anaphase eingeleitet. Dabei beginnen alle Spindel-Mikrotubuli mit Ausnahme der Kinetochor-Mikrotubuli zu elongieren (Ding, McDonald et al. 1993; Übersichtsartikel: Hagan 1998). Gleichzeitig werden die Kinetochor-Mikrotubuli verkürzt und so die Schwester-Chromatiden zu den entgegengesetzten SPKs hingezogen. Die übrigen Spindel-Mikrotubuli elongieren solange, bis die Folge-Zellkerne die beiden entgegengesetzten Zellenden erreichen (Ding, McDonald et al. 1993). Dann wird die Spindel abgebaut und von in der Zellmitte gelegenen MTOCs ein neues Interphasen-Mikrotubuli-Zytoskelett aufgebaut (Hagan und Hyams 1988; Übersichtsartikel: Hagan 1998). Gleichzeitig wird in der Zellmitte ein Septum eingezogen und die Verbindung zwischen den beiden Folgezellen aufgelöst, so dass zwei eigenständige Zellen entstehen.

Die Funktion und strukturelle Integrität der Spindel wird maßgeblich von mit der Spindel assoziierten Proteinen beeinflusst. Dabei kommen vor allem Motor-Proteinen der Kinesin-Familie und +TIPs wichtige Funktionen bei der Integrität und der Elongation der Spindel sowie der Interaktion mit Kinetochor-Komplexen zu (Hagan und Yanagida 1992; Nabeshima, Kurooka et al. 1995; Nakaseko, Nabeshima et al. 1996; Garcia, Vardy et al. 2001; Nakaseko, Goshima et al. 2001; Troxell, Sweezy et al. 2001; Übersichtsartikel: Wittmann, Hyman et al. 2001; Garcia, Koonrugs et al. 2002).

Kinetochor-Komplexe sind mit einer spezifischen DNA-Sequenz assoziiert, dem Zentromer. Dabei sind bei allen *S. pombe* Zentromeren zwei Domänen vorhanden, die sich durch unterschiedliche repetetive und nicht repetetive Blöcke von DNA-Sequenzen und ihrer Chromatin Struktur unterscheiden (Clarke, Amstutz et al. 1986; Übersichtsartikel: Partridge, Borgstrom et al. 2000; Übersichtsartikel: Pidoux und Allshire 2000; Takahashi, Chen et al. 2000). Die zentrale Zentromer Domäne weist eine spezielle Chromatin Struktur auf und ist in die äußere Domäne eingebettet, welche heterochromatisiert ist (Ekwall, Nimmo et al. 1996; Übersichtsartikel: Pidoux und Allshire 2000; Rea, Eisenhaber et al. 2000; Bannister, Zegerman et al. 2001). Es konnten vier Kinetochor-Sub-Komplexe identifiziert werden, die spezifisch mit der inneren Zentromer Domäne assoziiert sind (Liu, McLeod et al. 2005). Diese dienen vermutlich als strukturelle und funktionelle Untereinheiten, die unter anderem mit an den Plus-Enden von Kinetochor-Mikrotubuli lokalisierten Proteinen interagieren, so dass Kinetochor-Mikrotubuli mit den Kinetochoren verknüpft werden können (Saitoh, Takahashi et al. 1997; Goshima, Saitoh et al. 1999; Takahashi, Chen et al. 2000; Garcia, Koonrugsa et al. 2002; Jin, Pidoux et al. 2002; Pidoux, Richardson et al. 2003; Hayashi, Fujita et al. 2004; Kerres, Vietmeier-Decker et al. 2004; Saitoh, Ishii et al. 2005). Bei diesem Prozess spielen +TIPs, wie z.B. Mal3 eine Rolle (Nakaseko, Goshima et al. 2001; Kerres, Vietmeier-Decker et al. 2004; Asakawa, Toya et al. 2005).

3.3 Das *S. pombe* Mal3 Protein ist ein Mitglied der evolutionär konservierten EB1-Protein-Familie

Der *mal3*⁺ ORF (minichromosome altered loss) aus *S. pombe* wurde ursprünglich in einer Mutanten-Analyse, die darauf ausgerichtet war, neue für die Chromosomen-Separation benötigte Proteine zu isolieren, identifiziert (Fleig, Sen-Gupta et al. 1996; Beinhauer, Hagan et al. 1997). Defektes oder abwesendes Mal3 Protein führt zu einem erhöhten Verlust eines zusätzlichen, nicht essentiellen Mini-Chromosoms (Niwa, Matsumoto et al. 1986), Hypersensitivität gegenüber Mikrotubuli destabilisierenden Chemikalien und zur Ausbildung aberranter Zellformen (Beinhauer, Hagan et al. 1997). Mal3 wird somit sowohl für die korrekte Chromosomen-Separation als auch für korrektes polares Wachstum von *S. pombe* Zellen benötigt. Mal3 gehört zur konservierten EB1-Protein-Familie (Beinhauer, Hagan et al. 1997), die nach dem zuerst identifizierten Mitglied End Binding Protein 1 (EB1) des Menschen benannt ist (Su, Burrell et al. 1995). Dabei variiert die Anzahl der verschiedenen bei einem Organismus vorhandenen Familien-Mitglieder von einem bei Hefen, bis zu drei bei Säugern. Humanes EB1 kann bei heterologer Expression in *S. pombe* die Abwesenheit von

Mal3 kompensieren (Beinhauer, Hagan et al. 1997). Ähnliche Resultate wurden auch für *S. cerevisiae* Bim1 und EB1 erhalten (Nakamura, Zhou et al. 2001). Die EB1-Familien-Mitglieder sind also auch funktionell homolog, weshalb nahe liegt, dass sie gleiche Funktionen in der Zelle übernehmen. Die EB1-Proteine sind mit Mikrotubuli assoziiert und gehören den +TIPs an. Dabei sind EB1-Proteine zwar entlang von Mikrotubuli lokalisiert, assoziieren jedoch hauptsächlich mit den wachsenden Plus-Enden von Mikrotubuli (Schwartz, Richards et al. 1997; Morrison, Wardleworth et al. 1998; Mimori-Kiyosue, Shiina et al. 2000; Browning, Hackney et al. 2003; Übersichtsartikel: Mimori-Kiyosue und Tsukita 2003; Busch und Brunner 2004). In *Xenopus* Ei-Extrakten konnte ferner gezeigt werden, dass die Affinität von *Xenopus* EB1 für Mikrotubuli an Plus-Enden höher ist als entlang des Mikrotubulus (Tirnauer, Grego et al. 2002). Vermutlich wird EB1 mit dem wachsenden Plus-Ende kopolymerisiert und dissoziiert sehr schnell, so dass nur am Plus-Ende große Mengen von EB1 vorhanden sind. Außerdem sind EB1-Familien-Mitglieder mit den Zentrosomen bzw. bei Hefen den SPKs assoziiert (Rehberg und Graf 2002; Louie, Bahmanyar et al. 2004).

Alle EB1-Familien-Mitglieder weisen die gleiche Pfam-Domänen-Struktur auf (Abb.3-4). Direkt am N-Terminus ist die Calponin Homologie-Domäne (CH-Domäne) lokalisiert. CH-Domänen sind in vielen unterschiedlichen Protein-Familien konserviert und kommen in verschiedenen Subtypen vor, die alle einige spezifische konservierte Aminosäuren und eine ähnliche globuläre räumliche Struktur aufweisen (Übersichtsartikel: Gimona, Djinovic-Carugo et al. 2002). Dabei sind die Funktionen, die von CH-Domänen übernommen werden, sehr unterschiedlich (Übersichtsartikel: Gimona, Djinovic-Carugo et al. 2002). So dienen CH-Domänen häufig als Aktin-Binde-Domänen, dienen jedoch auch (z.B. bei Signalmolekülen)

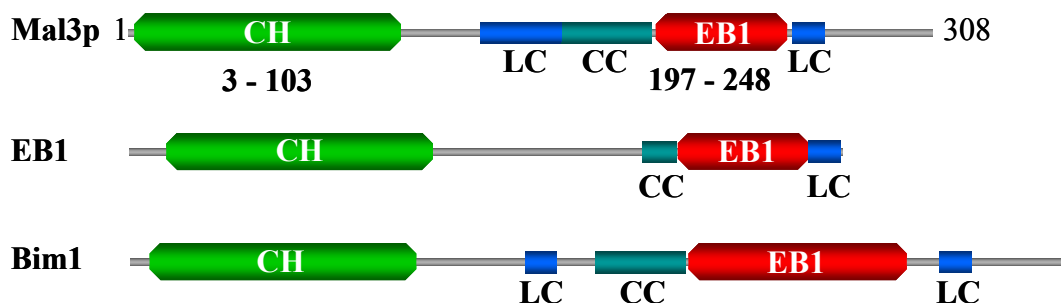


Abb.3-4: Pfam-Domänen Struktur von EB1-Proteinen.

Die Anordnung der verschiedenen Pfam-Domänen bei *S. pombe* Mal3, *S. cerevisiae* Bim1 und humanem EB1 sind schematische dargestellt. Calponin Homologie-Domäne (CH): grün, EB1-Domäne: rot, low complexity (lc): blau und coiled coil (CC): türkis. Quelle: Sanger Centre, Groß-Britannien (www.sanger-centre.ac.uk).

der Protein-Protein-Interaktion mit anderen Proteinen (Matsudaira 1991; Gimona und Mital 1998; Gimona und Winder 1998; Abe, Whitehead et al. 1999; Billadeau, Mackie et al. 2000; Groysman, Russek et al. 2000). Bei der EB1-Familie bindet die CH-Domäne an Mikrotubuli (Askham, Vaughan et al. 2002; Bu und Su 2003; Hayashi und Ikura 2003). Des weiteren besitzen alle EB1-Familien-Mitglieder die für diese Protein-Familie spezifische EB1-Domäne nahe dem C-Terminus (Abb.3-4). Für humanes EB1 konnte gezeigt werden, dass diese Domäne für die Homodimerisierung von EB1 benötigt wird (Honnappa, John et al. 2005; Slep, Rogers et al. 2005). Außerdem wird die EB1-Domäne bei allen bisher untersuchten EB1-Proteinen für die Interaktion mit anderen Proteinen benötigt (Berrueta, Tirnauer et al. 1999; Miller, Cheng et al. 2000; Askham, Vaughan et al. 2002; Bu und Su 2003; Busch und Brunner 2004; Mimori-Kiyosue, Grigoriev et al. 2005; Slep, Rogers et al. 2005). Des weiteren weisen EB1-Proteine eine „coiled coil“ Region direkt N-terminal vor der EB1-Domäne auf, die vermutlich ebenfalls eine Rolle bei der Interaktion mit anderen Proteinen spielt. Außerdem können noch „low complexity“ Regionen mit einer geringen Konservierung identifiziert werden. Dabei ist jedoch nicht bekannt, ob „low complexity“ Regionen wichtig für die Funktionen von EB1-Proteinen sind.

Bis heute wurden drei verschiedene Funktionen von EB1-Proteinen bei der Aufrechterhaltung der Integrität des Mikrotubuli-Zytoskeletts sowohl während der Interphase als auch während der Mitose identifiziert. Zum einen regulieren EB1-Proteine die Dynamik von Mikrotubuli (Tirnauer, O'Toole et al. 1999; Rogers, Rogers et al. 2002; Tirnauer, Grego et al. 2002; Busch und Brunner 2004). So unterstützten humanes EB1 und *S. pombe* Mal3 Mikrotubuli-Wachstum, indem sie die Dynamik von Mikrotubuli als Anti-„Katastrophe“-Faktoren beeinflussen (Tirnauer, Grego et al. 2002; Busch und Brunner 2004). Folglich sind die Interphasen-Mikrotubuli von *S. pombe* Zellen bei Abwesenheit von Mal3 stark verkürzt (Beinhauer, Hagan et al. 1997). Allerdings scheinen EB1-Proteine dabei von anderen Proteinen abhängig zu sein, da humanes EB1 nur in der Gegenwart des C-Terminus von APC, einem Interaktionspartner von EB1, Mikrotubuli-Polymerisation bewirken kann (Nakamura, Zhou et al. 2001).

Die zweite Funktion von EB1-Proteinen besteht darin, andere Proteine entweder generell zu Mikrotubuli oder zu Mikrotubuli-Plus-Enden zu rekrutieren. Mal3 bindet z.B. an das CLIP-Protein Tip1 aus *S. pombe* und wird benötigt, damit sowohl Tip1 als auch das Kinesin Tea2 mit Mikrotubuli assoziieren können (Browning, Hackney et al. 2003; Busch und Brunner 2004; Busch, Hayles et al. 2004). Außerdem werden Säuger EB1-Proteine für die stabile

Assoziation von CLIP-170 und APC mit Mikrotubuli-Plus-Enden benötigt (Askham, Moncur et al. 2000; Mimori-Kiyosue, Shiina et al. 2000; Komarova, Lansbergen et al. 2005).

Die dritte Funktion von EB1-Proteinen liegt in der Vermittlung von Interaktionen von Mikrotubuli-Plus-Enden mit anderen zellulären Strukturen, sowohl in der Mitose als auch während der Interphase. So spielt humanes EB1 bei der Interaktion von Kinetochor-Mikrotubuli mit den Kinetochoren eine Rolle, indem es APC an den Plus-Enden von Kinetochor-Mikrotubuli lokalisiert (Fodde, Kuipers et al. 2001; Kaplan, Burds et al. 2001; Green, Wollman et al. 2005). EB1 gebundenes APC assoziiert dann mit dem Kinetochor, so dass eine Verbindung zwischen Mikrotubulus und Kinetochor entsteht (Übersichtsartikel: Pellman 2001). Für *S. pombe* Mal3 ist eine ähnliche Funktion sehr wahrscheinlich, da Mal3 mit dem Kinetochor-Protein Spc7 assoziiert ist und Defekte von *mal3*-Mutanten durch zusätzliches Spc7 aufgehoben werden können (Kerres, Vietmeier-Decker et al. 2004). Für mehrere EB1-Proteine aus höheren Eukaryoten und *S. cerevisiae* Bim1 wurde gezeigt, dass sie eine Funktion bei der Interaktion von Mikrotubuli-Plus-Enden mit dem Zellkortex haben (Yin, Pruyne et al. 2000; Sun, Leung et al. 2001; Hwang, Kusch et al. 2003; Kodama, Karakesisoglou et al. 2003; Liakopoulos, Kusch et al. 2003; Maekawa, Usui et al. 2003; Übersichtsartikel: Mimori-Kiyosue und Tsukita 2003; Wen, Eng et al. 2004; Slep, Rogers et al. 2005). Z.B. assoziiert Bim1 mit dem Kortex-Protein Kar9 an den Plus-Enden von Mikrotubuli und Kar9 wird durch Mikrotubuli-Plus-Enden zum Zellkortex transportiert (Korinek, Copeland et al. 2000; Yin, Pruyne et al. 2000; Liakopoulos, Kusch et al. 2003; Maekawa, Usui et al. 2003). Dort interagiert Kar9 mit Myosin-Aktin-Motorproteinen (Hwang, Kusch et al. 2003). Diese Interaktion wird für die gerichtete Bewegung von Mikrotubuli-Plus-Enden entlang von Aktin-Kabeln in die Knospen-Spitze benötigt (Hwang, Kusch et al. 2003). Hier werden Mikrotubuli-Plus-Enden durch Kar9 verankert (Yin, Pruyne et al. 2000; Hwang, Kusch et al. 2003; Liakopoulos, Kusch et al. 2003; Maekawa, Usui et al. 2003). Auf diese Weise wird die mitotische Spindel von *S. cerevisiae* entlang der Längsachse orientiert. EB1-Proteine aus höheren Eukaryoten interagieren mit mehreren Kortex assoziierten Proteinen und werden für die Interaktion dieser Proteine mit Mikrotubuli-Plus-Enden benötigt. So interagieren EB1-Proteine mit CLASP-Proteinen und APC, welche sowohl mit Mikrotubuli als auch dem Zellkortex assoziieren (Nathke, Adams et al. 1996; Barth, Siemers et al. 2002; Fukata, Watanabe et al. 2002; Mimori-Kiyosue, Grigoriev et al. 2005). Es wird postuliert, dass diese Interaktionen für die Verknüpfung dynamischer Mikrotubuli mit wachsenden Zellkortex-Regionen benötigt werden (Mimori-Kiyosue, Grigoriev et al. 2005). Außerdem interagieren EB1-Proteine mit einem Formin (Aktin

polymerisierendes Protein), sowie Spektraplakinen, einer Gruppe von Proteinen, welche abhängig von EB1-Proteinen Mikrotubuli-Plus-Enden mit dem Aktin-Zytoskelett verknüpfen (Bernier, Mathieu et al. 1996; Bernier, De Repentigny et al. 1998; Gregory und Brown 1998; Übersichtsartikel: Fuchs und Karakesisoglou 2001; Sun, Leung et al. 2001; Übersichtsartikel: Roper, Gregory et al. 2002; Kodama, Karakesisoglou et al. 2003). Diese Interaktionen werden benötigt um stabile, nicht dynamische Mikrotubuli-Plus-Enden mit wachsenden Zellkortex-Regionen zu verknüpfen (Kodama, Karakesisoglou et al. 2003; Wen, Eng et al. 2004). Entlang dieser stabilisierten Mikrotubuli können dann Komponenten transportiert werden, die spezifisch an wachsenden Zellkortex-Regionen benötigt werden.

Zusammenfassend spielen EB1-Proteine also eine wichtige Rolle bei der Organisation des Mikrotubuli-Zytoskeletts und stellen sicher, dass Mikrotubuli-Plus-Enden ihre Ziel-Positionen erreichen, wo die Interaktion von Mikrotubuli mit anderen Zell-Kompartimenten ebenfalls durch EB1-Proteine beeinflusst wird. Damit haben EB1-Proteine Einflüsse auf viele zelluläre Prozesse, wie z.B. die Chromosomen-Separation, gerichteten Transport, Polarisierung und Migration von Zellen.

3.4 Zielsetzung dieser Arbeit

Unsere Arbeitsgruppe untersucht die molekularen Mechanismen, mittels derer die korrekte Aufteilung der Chromosomen während der Mitose und die Beibehaltung der korrekten Zellform beim polaren Wachstum während der Interphase von *S. pombe* erreicht wird. Dabei liegt ein Schwerpunkt auf der Analyse von Proteinen, welche für die Integrität des Mikrotubuli-Zytoskeletts während der Mitose und während der Interphase benötigt werden. Ziel dieser Arbeit war es, durch funktionelle Analyse solcher Proteine Aufschluss über deren Funktionen bei der Organisation des Mikrotubuli-Zytoskeletts während der Mitose und der Interphase zu erhalten. Dabei liegt der Fokus dieser Arbeit hauptsächlich auf der Funktion dieser Proteine beim polaren Wachstum von *S. pombe* während der Interphase.

Zum Beginn dieser Arbeit waren die Funktionen der konservierten CH- und EB1-Domänen der EB1-Proteine noch weitgehend unbekannt. Ein Ziel dieser Arbeit war aufzuklären, wie die CH- und EB1-Domänen bei den Funktionen von Mal3 in der Mitose sowie der Interphase mitwirken. Dafür wurden zunächst *mal3* Mutanten-Stämme hergestellt, welche endogen Mal3-Varianten mit spezifischen Aminosäure-Substitutionen exprimieren. Dabei unterscheidet sich jede Mal3-Variante von Wildtyp Mal3 lediglich dadurch, dass eine einzelne konservierte Aminosäure in der CH- oder EB1-Domäne gegen eine Aminosäure mit unterschiedlichem biochemischem Charakter ausgetauscht ist. Anschließend sollte die

subzelluläre Lokalisierung der verschiedenen Mal3-Varianten aufgeklärt werden. Außerdem sollte untersucht werden, wie sich die verschiedenen Mal3-Varianten auf das Mikrotubuli-Zytoskelett, die Mitose und das polare Wachstum bei Zellen auswirken, die diese Mal3-Varianten exprimieren. Dadurch sollten Rückschlüsse auf die Rollen der CH- und EB1-Domänen bei den Funktionen von Mal3 ermöglicht werden.

Außerdem sollten zwei extragene Suppressoren von *mal3*-Mutanten untersucht werden, die *asp1*⁺ und *peg1*⁺ ORFs. Asp1 wird für die Integrität des Aktin-Zytoskeletts benötigt. Deshalb sollte zunächst überprüft werden, wie Asp1 als Regulator des Aktin-Zytoskeletts Mutanten des Mikrotubuli-Regulators Mal3 supprimieren kann. Anschließend sollten die Auswirkungen von *mal3*-, *asp1*-Einzel- und Doppelmutanten auf das Aktin- und Mikrotubuli-Zytoskelett, sowie die Mitose und das polare Wachstum von *S. pombe* Zellen untersucht werden. So sollte Aufschluss darüber erhalten werden, ob bzw. wie Mal3 und Asp1 eine gemeinsame Funktion haben könnten.

Für Peg1 und Mal3 sollte durch Analyse von Einzel- und Doppelmutanten überprüft werden, wie sie bei der Regulation des Interphasen-Mikrotubuli-Zytoskeletts beim polaren Wachstum von *S. pombe* Zellen zusammenwirken.

4 Material und Methoden

4.1 Chemikalien

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurden Chemikalien von den Firmen Calbiochem (USA), Difco (USA), Fluka (Buchs), Invitrogen (Karlsruhe), Melford (England), Merck (Darmstadt), Roche (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma (Deisenhofen) verwendet. Der Reinheitsgrad der Chemikalien war dabei p.A. (per Analysis).

4.2 Enzyme

4.2.1 Restriktionsendonukleasen

Enzym	Erkennungsequenz	Hersteller
<i>Acc65I</i>	G↓GTACC	Fermentas (Litauen)
<i>Bsu15I</i>	AT↓CGAT	Fermentas (Litauen)
<i>DpnI</i>	GA↓TC	Stratagene (USA)
<i>BclI</i>	T↓GATCA	Fermentas (Litauen)
<i>EcoRI</i>	G↓AATTC	Fermentas (Litauen)
<i>EcoRV</i>	GAT↓ATC	Fermentas (Litauen)
<i>HincII</i>	GTPy↓PuAC**	Fermentas (Litauen)
<i>HindIII</i>	A↓AGCTT	Fermentas (Litauen)
<i>PstI</i>	CTGCA↓G	Fermentas (Litauen)
<i>PvuI</i>	CGAT↓CG	Fermentas (Litauen)
<i>SacI</i>	GAGCT↓C	Fermentas (Litauen)
<i>SmaI</i>	CCC↓GGG	Fermentas (Litauen)
<i>SmiI</i>	ATTT↓AAAT	Fermentas (Litauen)
<i>XhoI</i>	C↓TCGAG	Fermentas (Litauen)

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

** Py=Pyrimidin; Pu=Purin

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

4.2.2 Sonstige Enzyme

Enzym	Hersteller
β-Glucuronidase	Sigma (Deisenhofen)
<i>Pfu</i> TurboR DNA Polymerase	Stratagene (USA)
<i>Pfx</i> -Polymerase	Invitrogen (Karlsruhe)
alkalische Phosphatase	Boehringer (Mannheim)
Proteinase K	Roche (Mannheim)
RNaseA	Sigma (Deisenhofen)
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	Eigene Herstellung
<i>T4</i> -DNA-Ligase	Fermentas (Litauen)
<i>T4</i> -DNA-Polymerase	Fermentas (Litauen)
Zymolyase	Seikagaku (Japan)

4.3 Sonstige Materialien

Material	Hersteller
λ-Phagen-DNA	Fermentas (Litauen)
Complete™ Proteinase Inhibitor Cocktail	Roche (Mannheim)
Deckgläschen	Diagonal (Münster)
DIG DNA Labeling and Detection Kit	Roche (Mannheim)
ECL Advance™ Western Blotting Detection Kit	Amersham (England)
ECL™ Blocking Agent	Amersham (England)
Eppendorf-Reaktionsgefäße	Eppendorf (Kromburg)
Glasperlen	B. Braun (Melsungen)
Heringssamen-DNA	Sigma (Deisenhofen)
Immobilon-P PVDF Membran	Millipore (USA)
Klenow-Polymerase	Invitrogen (Karlsruhe)
Lachssamen-DNA	Sigma (Deisenhofen)
MACS Separation Columns	Miltenyi (Köln)
μMACS HA Tagged Protein Isolation Kit	Miltenyi (Köln)
μMACS GFP Tagged Protein Isolation Kit	Miltenyi (Köln)
Nucleo Spin Extraktions-Kit	Macherey & Nagel (Düren)
Objektträger	Diagonal (Münster)
Qiagen Plasmid Midi-Kit	Qiagen (Hilden)
QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene (USA)
SeeBlue Plus2 Prestained Standard	Invitrogen (Karlsruhe)
Vectashield Mounting Medium	Vector Laboratories (Kanada)
Whatman Papier (3MM)	Schleicher & Schüll (Daßel)

4.4 Stämme

4.4.1 Bakterienstämme

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

4.4.2 *S. cerevisiae* Stämme

Stamm	Genotyp	Herkunft
AH109	<i>MATa; trp1-901; leu2-3; 112; ura3-52; his3-200; gal4Δ; gal80Δ; LYS2::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3; GAL2_{UAS}-GAL2_{TATA}-ADE2; URA3::MEL1_{UAS}-MEL1_{TATA}-lacZ</i>	Becton Dickinson (USA)

4.4.3 *S. pombe* Stämme

Stamm-nummer	Herstellung/ Herkunft	Genotyp
UFY 135	-	<i>mal3Δ::his3⁺; ade6-M210; leu1-32; ura4-D18; his3Δ; h⁺</i>
UFY 138	S. Sazer	<i>mph1Δ::ura4⁺; ade6-M216; leu1-32; ura4-D18; h⁻</i>
UFY 196	-	<i>mal3Δ::his3⁺; mph1Δ::ura4⁺; ade6-M21x; leu1-32; ura4-D18; h⁻</i>
UFY 190	K. Gould	<i>asp1Δ::ura4⁺; ade6-M210; leu1-32; ura4-D18; his3Δ; h⁻</i>

Stamm-nummer	Herstellung/ Herkunft	Genotyp
UFY 210	-	<i>spc7-GFP/ Kan^r; ade6-M210; ura4-D6; h⁺; [ade6-M216]</i>
UFY 496	-	<i>spc7-GFP/ Kan^r; mal3Δ::his3⁺; ade6-M210; leu1-32; ura4-Dx</i>
UFY 561	UFY 1126x UFY 605	<i>mal3Δ::ura4⁺; ade6-M210; ura4-D18; leu1-32; his3Δ; h⁺</i>
UFY 562	UFY 1126x UFY 605	<i>mal3Δ::ura4⁺; ade6-M210; ura4-D18; leu1-32; his3Δ; h⁻</i>
UFY 596	H. Browning	<i>mal3-pk-GFP/ ura4⁺; ade6-M210; leu1-32; ura4-D18; his3Δ; h⁻</i>
UFY 597	-	<i>mal2-GFP/ kan^r; ade6-M210; leu1-32; ura4-D6; h⁺</i>
UFY 605	K. Gould	<i>ade6-M210; ura4-D18; leu1-32; his3Δ; h⁻</i>
UFY 606	K. Gould	<i>ade6-M216; ura4-D18; leu1-32; his3Δ; h⁺</i>
UFY 607	I. Hagan	<i>peg1.1; leu1-32; ura4-D18; h⁻</i>
UFY 608	I. Hagan	<i>peg1.1; leu1-32; ura4-D18; his2; h⁺</i>
UFY 641	UFY 561 x UFY 607	<i>mal3Δ::ura4⁺; ade6-M210; ura4-D18; leu1-32; his3Δ; h⁺</i>
UFY 642		<i>ura4-D18; leu1-32; h⁺</i>
UFY 643		<i>peg1.1; ura4-D18; leu1-32; his3Δ; h⁻</i>
UFY 644		<i>peg1.1; mal3Δ::ura4⁺; ade6-M210; ura4-D18; leu1-32; h⁻</i>
UFY 653	-	<i>mal3-005R/G; ade6-M210; ura4-D18; leu1-32; his3Δ; h⁺</i>
UFY 654	-	<i>mal3-206-pst; ade6-M210; ura4-D18; leu1-32; his3Δ; h⁺</i>
UFY 668	UFY 654 x UFY 607	<i>ade6-M210; ura4-D18; leu1-32; his3Δ; h⁺</i>
UFY 669		<i>mal3-206-pst; ura4-D18; leu1-32; his3Δ; h⁻</i>
UFY 670		<i>peg1.1; ura4-D18; leu1-32; h⁻</i>
UFY 671		<i>peg1.1; mal3-206-pst; ade6-M210; ura4-D18; leu1-32; h⁺</i>
UFY 676	UFY 653 x UFY 607	<i>peg1.1; mal3-005R/G; ade6-M210; ura4-D18; leu1-32; his3Δ; h⁺</i>
UFY 677		<i>peg1.1; ura4-D18; leu1-32; h⁻</i>
UFY 678		<i>ade6-M210; ura4-D18; leu1-32; his3Δ; h⁺</i>
UFY 679		<i>mal3-005R/G; ura4-D18; leu1-32; h⁻</i>
UFY 726	-	<i>peg1.1; tea1-pk-GFP/ ura4⁺; ura4-D18; leu1-32; h⁻</i>
UFY 735	UFY 726 x UFY 605	<i>tea1-pk-GFP/ ura4⁺; ura4-D18; leu1-32; h⁺</i>
UFY 736	UFY 135 x UFY 735	<i>mal3Δ::his3⁺; tea1-pk-GFP/ ura4⁺; ura4-D18; leu1-32; his3Δ; h⁺</i>
UFY 737	UFY 644 x UFY 726	<i>peg1.1; mal3Δ::ura4⁺; tea1-pk-GFP/ ura4⁺; ura4-D18; leu1-32; h⁻</i>
UFY 738	-	<i>mal3-209L/F; ade6-M210; ura4-D18; leu1-32; his3Δ; h⁺</i>
UFY 741	-	<i>tip1-pk-GFP/ ura4⁺; ade6-M210; ura4-D18; leu1-32; his3Δ; h⁻</i>
UFY 746	-	<i>mal2-GFP/ kan^r; mal3Δ::ura4⁺; ade6-M210; ura4-DX; leu1-32; his3Δ; h⁺</i>
UFY 749	UFY 646 x UFY 741	<i>peg1.1; tip1-pk-GFP/ ura4⁺; ura4-D18; leu1-32; his3Δ; h⁺</i>
UFY 759	UFY 605 x UFY 736	<i>mal3Δ::his3⁺; tea1-pk-GFP/ ura4⁺; ade6-M210; ura4-D18; leu1-32; his3Δ; h⁻</i>
UFY 761	UFY 135 x UFY 741	<i>mal3Δ::his3⁺; tip1-pk-GFP/ ura4⁺; ade6-M210; ura4-D18; leu1-32; his3Δ; h⁻</i>
UFY 765	UFY 655 x UFY 736	<i>mal3-206-pst; tea1-pk-GFP/ ura4⁺; ade6-M210; ura4-D18; leu1-32; his3Δ; h⁺</i>
UFY 768	UFY 653 x UFY 736	<i>mal3-005R/G; tea1-pk-GFP/ ura4⁺; ade6-M210; ura4-D18; leu1-32; his3Δ; h⁺</i>
UFY 771	-	<i>asp1-pk-GFP/ ura4⁺; ade6-M210; ura4-D18; leu1-32; his3Δ; h⁻</i>
UFY 779	UFY 1108 x UFY 736	<i>mal3-201E/A; tea1-pk-GFP/ ura4⁺; ade6-M210; ura4-D18; leu1-32; his3Δ; h⁹⁰</i>
UFY 781	UFY 738 x UFY 736	<i>mal3-209L/F; tea1-pk-GFP/ ura4⁺; ade6-M210; ura4-D18; leu1-32; his3Δ; h⁻</i>

Stamm-nummer	Herstellung/ Herkunft	Genotyp
UFY 782	UFY 738 x UFY 761	<i>mal3-209L/F; tip1-pk-GFP/ura4⁺; ade6-M210; ura4-D18; leu1-32; his3Δ; h⁻</i>
UFY 784	UFY 1108 x UFY 761	<i>mal3-201E/A; tip1-pk-GFP/ura4⁺; ade6-M210; ura4-D18; leu1-32; his3Δ; h⁻</i>
UFY 792	UFY 738 x UFY 607	<i>mal3-209L/F; ura4-D18; leu1-32; h⁺</i>
UFY 793		<i>peg1.1 ; mal3-209L/F; ade6-M210; ura4-D18; leu1-32; his3Δ; h⁻</i>
UFY 794		<i>ade6-M210; ura4-D18; leu1-32; h⁻</i>
UFY 795		<i>peg1.1; ura4-D18; leu1-32; his3Δ; h⁺</i>
UFY 796	-	<i>mal3-201E/A-pk-GFP/ura4⁺; ade6-M210; ura4-D18; leu1-32; his3Δ; h⁺</i>
UFY 799	-	<i>mal3-209L/F-pk-GFP/ura4⁺; ade6-M210; ura4-D18; leu1-32; his3Δ; h⁺</i>
UFY 802	UFY 761x UFY 653	<i>mal3-005R/G; tip1-pk-GFP/ura4⁺; ade6-M210; ura4-D18; leu1-32; his3Δ; h⁻</i>
UFY 803	UFY 736x UFY 1110	<i>mal3-238L/F; teal-pk-GFP/ura4⁺; ura4-D18; leu1-32; his3Δ; h⁺</i>
UFY 805	UFY 761x UFY 1110	<i>mal3-238L/F; tip1-pk-GFP/ura4⁺; ade6-M210; ura4-D18; leu1-32; his3Δ; h⁻</i>
UFY 806	-	<i>mal3-005R/G-pk-GFP/ura4⁺; ade6-M210; ura4-D18; leu1-32; his3Δ; h⁺</i>
UFY 810	-	<i>mal3-238L/F-pk-GFP/ura4⁺; ade6-M210; ura4-D18; leu1-32; his3Δ; h⁺</i>
UFY 820	UFY 608 x UFY 190	<i>peg1.1; ura4-D18; leu1-32; his2; h⁺</i>
UFY 821		<i>peg1.1; asplΔ::ura4⁺; ura4-D18; leu1-32; his2; h⁻</i>
UFY 822		<i>asplΔ::ura4⁺; ade6-M216; ura4-D18; leu1-32; h⁻</i>
UFY 823		<i>ade6-M216; ura4-D18; leu1-32; h⁺</i>
UFY 857	I. Hagan	<i>nmt81-GFP-atb2/ kann^r; leu1-32; h⁻</i>
UFY 861	-	<i>mal3-047K/A; ade6-M210; ura4-D18; leu1-32; his3Δ; h⁺</i>
UFY 863	-	<i>mal3-097W/R; ade6-M210; ura4-D18; leu1-32; his3Δ; h⁺</i>
UFY 867	-	<i>mal3-047K/A-pk-GFP/ura4⁺; ade6-M210; ura4-D18; leu1-32; his3Δ; h⁺</i>
UFY 869	-	<i>mal3-097W/R-pk-GFP/ura4⁺; ade6-M210; ura4-D18; leu1-32; his3Δ; h⁺</i>
UFY 872	-	<i>mal3-208K/E-pk-GFP/ura4⁺; ade6-M210; ura4-D18; leu1-32; his3Δ; h⁺</i>
UFY 880	UFY 857x UFY 561	<i>nmt81-GFP-atb2/ kan^R; mal3Δ::ura4⁺; ade6-M210; ura4-D18; leu1-32; his3Δ; h⁻</i>
UFY 918	-	<i>mal3-209L/R; ade6-M210; ura4-D18; leu1-32; his3Δ; h⁺</i>
UFY 921	UFY 880x UFY 653	<i>mal3-005R/G; nmt81-GFP-atb2/ kan^R; mal3Δ::ura4⁺; ade6-M210; ura4-D18; leu1-32; his3Δ; h⁺</i>
UFY 923	UFY 880x UFY 1108	<i>mal3-201E/A; nmt81-GFP-atb2/ kan^R; mal3Δ::ura4⁺; ade6-M210; ura4-D18; leu1-32; his3Δ; h⁻</i>
UFY 931	-	<i>mal3-209L/R-pk-GFP/ura4⁺; ade6-M210; ura4-D18; leu1-32; his3Δ; h⁺</i>
UFY 933	-	<i>mal3-004S/A-pk-GFP/ura4⁺; ade6-M210; ura4-D18; leu1-32; his3Δ; h⁺</i>
UFY 934	-	<i>mal3-047K/A-pk-GFP/ura4⁺; ade6-M210; ura4-D18; leu1-32; his3Δ; h⁺</i>
UFY 958	-	<i>mal3-004S/E; ade6-M210; ura4-D18; leu1-32; his3Δ; h⁺</i>
UFY 969	-	<i>mal3-004S/E-pk-GFP/ura4⁺; ade6-M210; ura4-D18; leu1-32; his3Δ; h⁺</i>
UFY 975	-	<i>mal3-206-pst-pk-GFP/ura4⁺; ade6-M210; ura4-D18; leu1-32; his3Δ; h⁻</i>
UFY 994	UFY 806x UFY 627	<i>mal3-005R/G-pk-GFP/ura4⁺; spc7-HA/ Kan^r; ade6-M210; ura4-DX; leu1-32; h⁺</i>
UFY 995	UFY 1109x UFY 627	<i>mal3-208K/R-pk-GFP/ura4⁺; spc7-HA/ Kan^r; ade6-M210; ura4-DX; leu1-32; h⁻</i>
UFY 996	UFY 931x UFY 627	<i>mal3-209L/R-pk-GFP/ura4⁺; spc7-HA/ Kan^r; ade6-M210; ura4-DX; leu1-32; his3Δ; h⁺</i>
UFY 997	UFY 958x UFY 880	<i>mal3-004S/E; nmt81-GFP-atb2/ kan^r; ade6-M210; ura4-D18; leu1-32; his3Δ; h⁻</i>
UFY 999	UFY 933x UFY 627	<i>mal3-004S/A-pk-GFP/ura4⁺; spc7⁺-HA/ kan^r; ade6-M210; ura4-DX; leu1-32; h⁺</i>

Stamm-nummer	Herstellung/ Herkunft	Genotyp
UFY 1015	UFY 918x UFY 880	<i>mal3-209S/R; nmt81-GFP-atb2/ kan^r; ade6-M210;ura4-D18; leu1-32; his3Δ; h⁻</i>
UFY 1016	UFY 1036x UFY 880	<i>mal3-004S/E; nmt81-GFP-atb2/ kan^r; ade6-M210;ura4-D18; leu1-32; his3Δ; h⁻</i>
UFY 1017	UFY 969x UFY 627	<i>mal3-004S/E-pk-GFP/ ura4⁺; spc7⁺-HA/ kan^r; ade6-M210;ura4-DX; leu1-32; h⁺</i>
UFY 1036	-	<i>mal3-004S/A; ade6-M210;ura4-D18; leu1-32; his3Δ; h⁺</i>
UFY 1041	UFY 562 x UFY 746	<i>mal2-GFP/ kan^r; mal3Δ::ura4⁺; ade6-M210; ura4-DX; leu1-32; his3Δ; h⁻</i>
UFY 1042	UFY 1041x UFY 1036	<i>mal2-GFP/ kan^r; mal3-004S/A; ade6-M210; ura4-DX; leu1-32; his3Δ; h⁻</i>
UFY 1043	UFY 1041x UFY 958	<i>mal2-GFP/ kan^r; mal3-004S/E; ade6-M210; ura4-DX; leu1-32; his3Δ; h⁻</i>
UFY 1091	UFY 135x UFY 190	<i>asp1Δ::ura4⁺; mal3Δ::his3⁺; ade6-M210; ura4-D18; leu1-32; h⁺</i>
UFY1101	UFY 190x UFY 653	<i>asp1Δ::ura4⁺; mal3-005R/G; ade6-M216; ura4-D18; leu1-32; h⁺</i>
UFY 1108	-	<i>mal3-201E/A; ade6-M210;ura4-D18; leu1-32; his3Δ; h⁺</i>
UFY 1109	-	<i>mal3-208K/E; ade6-M210;ura4-D18; leu1-32; his3Δ; h⁺</i>
UFY 1110	-	<i>mal3-238L/F; ade6-M210;ura4-D18; leu1-32; his3Δ; h⁺</i>
UFY 1112	UFY 210x UFY 562	<i>spc7-GFP/ kan^r; mal3Δ::ura4⁺; ade6-M210; ura4-DX; his3Δ; h⁻</i>
UFY 1113	UFY 1112x UFY 958	<i>spc7-GFP/ kan^r; mal3-004S/E; ade6-M210; ura4-DX; his3Δ; h⁻</i>
UFY 1114	UFY 1112x UFY 1036	<i>spc7-GFP/ kan^r; mal3-004S/A; ade6-M210; ura4-DX; his3Δ; h⁺</i>
UFY 1115	UFY 1112x UFY 918	<i>spc7-GFP/ kan^r; mal3-209L/R; ade6-M210; ura4-DX; leu1-32; his3Δ; h⁺</i>
UFY 1126	-	<i>mal3Δ::ura4⁺; ade6-M210; ura4-D18; leu1-32; his3Δ; h⁺</i>
UFY 1149	UFY 1001x UFY 606	<i>nuf2-GFP/ ura4⁺; ade6-M216; ura4-D18; leu1-32; his3Δ; h⁻</i>
UFY 1173	UFY 135x UFY 1149	<i>nuf2-GFP/ ura4⁺; mal3Δ::his3⁺; ade6-MX; ura4-D18; leu1-32; his3Δ; h⁺</i>
UFY 1206	UFY 138x UFY 958	<i>mal3-004S/E; mph1Δ::ura4⁺; ade6-M210; ura4-D18; leu1-32; his3Δ; h⁺</i>

4.5 Plasmide

Bezeichnung	Genetische Marker, Konstruktion, Beschreibung	Nummer
pUR19	<i>ura4⁺, Amp^r</i>	222
pREP3X	<i>LEU2, Amp^r, Thiamin-reprimierbarer nmt1-Promotor</i>	147
pJR2-41XU	<i>ura4⁺, Amp^r, Thiamin-reprimierbarer nmt41-Promotor</i>	286
pJR2-81XU	<i>ura4⁺, Amp^r, Thiamin-reprimierbarer nmt81-Promotor</i>	290
pBSK	<i>Amp^r</i>	
pGADT7	<i>LEU2, Amp^r</i>	537
pGBKT7	<i>Trp1⁺, Kan^r</i>	538
pBSK/ <i>mal3⁺</i>	<i>Amp^r, genomisches mal3⁺ Fragment, 2450 BP XbaI/ HincII in MCS kloniert, enthält 987 Bp mal3⁺ ORF + 861 Bp 5'Bereich + 602 Bp 3'Bereich</i>	187
pBSK/ <i>ura4⁺</i>	<i>Amp^r, 1,8 Kb ura4⁺ DNA-Fragment mit PstI Schnittstelle am 5'Ende und BclI Schnittstelle am 3'Ende SmaI in pBSK MCS kloniert</i>	522
pBSK/ <i>mal3Δ::ura4⁺</i>	<i>Amp^r, pBSK/ mal3⁺ mit ura4⁺ Marker PstI/ BclI in mal3⁺ ORF kloniert</i>	524
pBSK/ <i>mal3-004S/A</i>	<i>Amp^r, Plasmid 187 mit Mutation tct > gct, Ser-004 > Ala</i>	525

Bezeichnung	Genetische Marker, Konstruktion, Beschreibung	Nummer
pBSK/ <i>mal3-004S/E</i>	<i>Amp^r</i> , Plasmid 187 mit Mutation tct > gag, Ser-004 > Glu	526
pBSK/ <i>mal3-005R/G</i>	<i>Amp^r</i> , Plasmid 187 mit Mutation cgg > ccg, Arg-004 > Gly	527
pBSK/ <i>mal3-047K/A</i>	<i>Amp^r</i> , Plasmid 187 mit Mutation aag > gcg Lys-047 > Ala	528
pBSK/ <i>mal3-097W/R</i>	<i>Amp^r</i> , Plasmid 187 mit Mutation tgg > cgg Trp-097 > Arg	529
pBSK/ <i>mal3-201E/A</i>	<i>Amp^r</i> , Plasmid 187 mit Mutation gaa > gca Glu-201 > Ala	530
pBSK/ <i>mal3-208K/E</i>	<i>Amp^r</i> , Plasmid 187 mit Mutation aag > gag Lys-208 > Glu	531
pBSK/ <i>mal3-209L/F</i>	<i>Amp^r</i> , Plasmid 187 mit Mutation ctt > ttt Leu-209 > Phe	533
pBSK/ <i>mal3-209L/R</i>	<i>Amp^r</i> , Plasmid 187 mit Mutation ctt > cgt Leu-209 > Arg	534
pBSK/ <i>mal3-238L/F</i>	<i>Amp^r</i> , Plasmid 187 mit Mutation ctt > ttt Leu-238 > Phe	535
pBSK/ <i>mal3-206-pst</i>	<i>Amp^r</i> , Plasmid 187 mit Mutation ttg > gtt Phe-206 > Val + frameshift der nach Aminosäure 211 12 veränderte Aminosäuren kodiert und dann ein verfrühtes Stop-Kodon aufweist.	532
pGADT7/ <i>asp1⁺</i>	<i>asp1⁺ ORF</i> mittels PCR mit den Oligonukleotiden 256 und 257 amplifiziert und mittels homologer Rekombination in <i>NdeI/ XhoI</i> hydrolysierten pGADT7 kloniert	539
pGBKT7/ <i>mal3Δ7</i>	<i>mal3Δ7</i> mittels PCR mit den Oligonukleotiden 254 und 255 amplifiziert und mittels homologer Rekombination in <i>EcoRI/ SalI</i> hydrolysierten pGBKT7 kloniert	540
pREP3X/ <i>mal3Δ7</i>	PCR-Produkt <i>mal3Δ7</i> mit den Oligonukleotiden 39 und 42 amplifiziert und <i>BamHI/ SmaI</i> in pREP3X kloniert	234
pREP3X/ <i>asp1⁺</i>	<i>asp1⁺</i> in pREP3x (erhalten von K.Gould)	262
pUR19/ genomisches DNA-Fragment mit <i>spc7⁺</i> ORF	Genomisches DNA Insert, Chromosom 3, Bereich 786326 – 788547	336
pUR19/ genomisches DNA-Fragment mit <i>asp1⁺</i> ORF	Genomisches DNA Insert, Chromosom 3, Bereich 572090 - 576418	344
pUR19/ genomisches DNA-Fragment mit <i>pic1⁺</i> ORF	Genomisches DNA Insert, Chromosom 2, Bereich 152448 - 1155919	351

4.6 Oligonukleotide

Nummer	Sequenz	Verwendung
78	agggcatcacatagtgcatct	Sequ. von mutierten <i>mal3</i> -ORFs
79	aattagacggctcaaacact	Sequ. von mutierten <i>mal3</i> -ORFs
80	ctgaatctccgcaagagctc	Mutagenese von <i>mal3-005R/G</i>
87	gagctcttgcggagattcag	Mutagenese von <i>mal3-005R/G</i>
92	atcgctgcagtagctacaaatccactg	Klonierung von <i>ura4⁺</i> in P187
93	atcgcgatgatcatgtgatattgacgaaact	Klonierung von <i>ura4⁺</i> in P187
102	agttgtagaccctgagag	Sequ von mutierten <i>mal3</i> -ORFs
131	gagcctctttgcgaaggagcattg	Verifikation von <i>mal3Δ::his3⁺</i>
161	tgaagatgcctacaatcg	Verifikation 5'Übergang <i>mal3Δ::ura4⁺</i>
162	cagctctagctgaatagc	Verifikation von <i>mal3Δ::his3⁺</i>

Nummer	Sequenz	Verwendung
163	gagaagctgggtggaagg	Verifikation 3' Übergang <i>mal3Δ::ura4⁺</i>
164	tcgagtagatatttcagc	Verifikation 3' Übergang <i>mal3Δ::ura4⁺</i>
165	ggagagagaacgtgatttctatgtaacaagcttcgag	Mutagenese von <i>mal3-206-pst</i>
166	ctcgaagcttgtaacatagaaatcacgttctctctcc	Mutagenese von <i>mal3-206-pst</i>
167	ggagagagaacgtgatttctatttaacaagttcgagaaattg	Mutagenese von <i>mal3-209L/F</i>
168	caatttctcgaaactgttaaaatagaaatcacgttctctctcc	Mutagenese von <i>mal3-209L/F</i>
187	gtttggttggagagagcacgtgatttctatttaacaagc	Mutagenese von <i>mal3-201E/A</i>
188	gcttgtaaaatagaaatcacgtgctctctccaaaccaaac	Mutagenese von <i>mal3-201E/A</i>
191	ggagagagaacgtgatttctatttaacgagcttcgagaaattg	Mutagenese von <i>mal3-208K/E</i>
192	caatttctcgaagctcgtaaaatagaaatcacgttctctctcc	Mutagenese von <i>mal3-208K/E</i>
193	gttgagcgtattcaagcaatattttactactgaggatgg	Mutagenese von <i>mal3-238L/F</i>
194	ccatcctcagtagaataaaatattgcttgaatacgcctcaac	Mutagenese von <i>mal3-238L/F</i>
197	gatgcctacaatcgaatttcaaagc	Sequ. von mutierten <i>mal3</i> -ORFs
198	tcgagtagatatttcagcatcattg	Sequ. von mutierten <i>mal3</i> -ORFs
213	gtcttttaggtcagtcatttgagc	Sequ. von mutierten <i>mal3</i> -ORFs
254	cagaagctgatctcagaggaggacctgcatatgctcttagcttgatcaacc	Klonierung von <i>mal3Δ7</i> in pGBKT7
255	cccaaggggttatgctagtatgcggccgctaaacgtgatattctcatcgtc	Klonierung von <i>mal3Δ7</i> in pGBKT7
256	gagtaccatacagcgtaccagattacgctcatatgattcaaaatgcaagtcatttac	Klonierung von <i>asp1⁺</i> in pGADT7
257	ttttcagtatctacgattcatctgcagctcgagttaattaatgtaacaggaataaac	Klonierung von <i>asp1⁺</i> in pGADT7
282	ccacacaacatgtctgaagctcggcaagagctcttagc	Mutagenese von <i>mal3-004S/A</i>
283	gctaagagctcttgccgagcttcagacatgttgtgtgg	Mutagenese von <i>mal3-004S/A</i>
284	ctccatatatcaagacataccactaaaagcggtaatttcgaatgc	Mutagenese von <i>mal3-047K/A</i>
285	gcattcgaaattcaccgcttttagtggtatgtcttctatatggag	Mutagenese von <i>mal3-047K/A</i>
286	gcaagataatctggagttcgttcaacgggccaacgttttggg	Mutagenese von <i>mal3-097W/R</i>
287	cccaaaaacgtttgcccggtgaacgaactccagattatcttgc	Mutagenese von <i>mal3-097W/R</i>
292	gctatttaaagtgatatagttcgag	Sequ. von mutierten <i>mal3</i> -ORFs
324	agacggatttcatgaagttattgggttaaagcggcctctcaaatctccagctaaagaaccagtcctatgac aacgaaaatgggtgcaggagctgagctcatgggtattcc	Herstellung von <i>teal⁺-pk-GFP</i> ORF
325	taaatagcatagagattgagggtaccagtttaaaatgtaatttattatagatgtcatcgtcgaatatttaca ctatgtacactgttccaacaccaatg	Herstellung von <i>teal⁺-pk-GFP</i> ORF
326	aaacttggtgtgaggtgtgtgaaacaaataatcattcattgcaggaatgtccactgtatttggcagcacag acgaagctgggtcaggagctgagctcatgggtattcc	Herstellung von <i>tip1⁺-pk-GFP</i> ORF

Nummer	Sequenz	Verwendung
327	aacatgcaagggaacattcaaatgaggataacagattagcatttagtcattactactattgtaaactaat	Herstellung von <i>tip1⁺-pk-GFP</i> ORF
328	tataaagcatctgttccaacaccaatg cggtatccgactctgttatg	Verifikation <i>tea1⁺-pk-GFP</i> ORF
329	attggtttggaacgtgtag	Verifikation <i>tea1⁺-pk-GFP</i> ORF
330	gataatgaaaggatgtcgc	Verifikation <i>tip1⁺-pk-GFP</i> ORF
331	caaaggaaggcaaatcgc	Verifikation <i>tip1⁺-pk-GFP</i> ORF
345	ttcagcagttataacgaaaaccgaggacctctgcaactcagttcatcttccaaaagggtttattctgttaacatt	Herstellung von <i>asp1⁺-pk-GFP</i> ORF
346	aatggtgcaggagctgagctcatgggtattcc	Herstellung von <i>asp1⁺-pk-GFP</i> ORF
347	gtttaattatgtgcaattactaataaaatcgtttaaaaaatgtttatgttatcaaacattcgtaaaaagggtaaaa	Verifikation <i>asp1⁺-pk-GFP</i> ORF
348	gcggctgttccaacaccaatg tagatgattctaattgctgcc	Verifikation <i>asp1⁺-pk-GFP</i> ORF
354	ataaccacaatgaggacgg	Verifikation <i>asp1⁺-pk-GFP</i> ORF
389	aacgcgttccctctgcaccagatttcgtacatgctaggctacaaagtttagaggttgatgacgatgagaatat cacgtttggtgcaggagctgagctcatgggtattcc	Herstellung von <i>mal3-pk-GFP</i> ORF
390	ggagagagaacgtgatttctattttaacaagcgtcgagaaattg	Mutagenese von <i>mal3-209L/R</i>
391	caatttctcgacgcttgtaaaatagaaatcacgttctctctcc	Mutagenese von <i>mal3-209L/R</i>
392	ccacacaacatgtctgaagagcggcaagagctcttagcttg	Mutagenese von <i>mal3-004S/E</i>
402	ccaagctaagagctcttgccgctcttcagacatgttgtgtgg	Mutagenese von <i>mal3-004S/E</i>
425	ttgaaacacagttgtacgaagttaatgagacgatgttggttgagagagaacgtgatttctattttaacaagc	Herstellung von <i>mal3-206-pst⁺-pk-GFP</i> ORF
426	ttcaggtgcaggagctgagctcatgggtattcc	Southern Sonde <i>mal3Δ::ura4⁺</i>
427	tcacgggtcaaacgagcttg	Southern Sonde <i>mal3Δ::ura4⁺</i>
428	caaatggcatacataattcc	Southern Sonde <i>mal3Δ::ura4⁺</i>
429	tcagccaacatcaccatcaacg	Southern Sonde <i>mal3Δ::ura4⁺</i>
429	gtcatggataagggtatgtcgt	Southern Sonde <i>mal3Δ::ura4⁺</i>
429	aaatatttcggttcttatttacgtgtgttacagtgaataatgaagaatttgcacaaaaaaactttaacttagtac tttctgttccaacaccaatg	Herstellung von <i>mal3-pk-GFP</i> ORF

4.7 Medien und Wachstumsbedingungen

4.7.1 Nährmedien und Wachstumsbedingungen für *E. coli* Stämme

E. coli Stämme wurden in Luria-Bertani (LB) Medium unter aeroben Bedingungen bei 37°C inkubiert. Festen Nährböden wurde Agar in einer Konzentration von 20 g/ L zugesetzt. Zur Selektion auf Plasmid-Transformanten wurden dem Medium entweder 50 µg/ ml Ampicillin oder 12,5 µg/ ml Kanamycin zugefügt.

4.7.2 Nährmedien und Wachstumsbedingungen für *Schizosaccharomyces pombe* Stämme

S. pombe Stämme wurden entweder in Vollmedium (YE5S) oder in Minimalmedium kultiviert. Minimalmedium enthielt entsprechende Supplementlösungen in einer Konzentration von 75 mg/ L (Moreno, Klar et al. 1991). Bei Standardminimalmedium (MM) diente Glutaminsäure als Stickstoffquelle, während bei Edinburgh Minimalmedium Ammoniumchlorid als Stickstoffquelle zugefügt wurde. Festem Nährboden wurden immer 20 g/ L Agar zugefügt. Flüssigkulturen wurden geschüttelt um aerobes Wachstum zu gewährleisten. *S. pombe* Zellen wurden in der Regel Ü/N (16Stdn.) bei 30°C oder, falls temperatursensitive Stämme kultiviert wurden, bei 25°C inkubiert.

Um die Auswirkungen verschiedener Temperaturen, 5-Fluoroorotsäure, Thiabendazol, Latrunculin A oder B auf das Wachstum von *S. pombe* Stämmen zu testen, wurden serielle Tropftests durchgeführt. Dafür wurden die Zellen logarithmisch wachsender Kulturen in sterilem Wasser verdünnt und 10^4 , 10^3 , 10^2 und 10 Zellen auf entsprechende Agarplatten getropft. Um auf Wachstum bei verschiedenen Temperaturen zu testen, wurden die Zellen anschließend bei Temperaturen zwischen 20°C und 37°C inkubiert. Für Wachstumstests in der Gegenwart von 5-Fluoroorotsäure wurden dem Medium 2 g/ L 5-Fluoroorotsäure zugesetzt und die Zellen bei 30°C inkubiert. Thiabendazol wurde dem Medium in Konzentrationen zwischen 5,5 und 7,5 µg/ ml zugesetzt. Inkubation erfolgte bei 24°C, 28°C und 30°C. Für Wachstumstests in der Gegenwart von Latrunculin, wurde Latrunculin A in Konzentrationen zwischen 0,25 und 2 µmolar eingesetzt, während Latrunculin B in Konzentrationen zwischen 1 und 4 µmolar verwendet wurde. Mit Latrunculin versetzte Medien wurden immer bei 24°C inkubiert.

Für die Lebend-Zellzahl Bestimmung von temperatursensitiven Mutanten bei restriktiver Temperatur (34°C und 36°C) wurden diese in 100 ml YE5S Schüttelkulturen inkubiert. Über einen Zeitraum von bis zu 24 Stdn. wurden alle 120 Minuten Proben genommen und die Zellzahl bestimmt. Anschließend wurden die Zellen so verdünnt, dass in einem Volumen von 100 µl 200 Zellen enthalten waren. Dann wurden pro Zeitpunkt und untersuchtem Stamm je 200 Zellen auf je 3 YE5S Agarplatten ausplattiert und bei permissiver Temperatur (24°C) so lange inkubiert, bis Kolonien sichtbar waren. Durch Auszählen der gewachsenen Kolonien konnte dann der Anteil lebender Zellen in einer Kultur bestimmt werden. Für jede Mutante wurde dieses Experiment mit mindestens zwei unabhängigen Kulturen durchgeführt.

Für die Selektion kanamycinresistenter *S. pombe* Zellen auf festen Nährböden wurde dem jeweiligen Nährmedium Geneticin-Sulfat (G-418) in einer Konzentration von 100 mg/ L beigelegt.

Für heterologe Gen-Expression in *S. pombe* wurde der *nmt1* (no message in thiamine) Promotor aus *S. pombe* sowie die schwächeren Derivate *nmt41* und *nmt81* dieses Promotors verwendet (Maundrell 1990; Basi, Schmid et al. 1993; Maundrell 1993; Moreno, Duran et al. 2000). Der wildtypische *nmt1*-Promotor dient der Regulation der Thiamin Biosynthese Gene und wird durch die Anwesenheit von Thiamin im Nährmedium reprimiert. Darüber hinaus ist der *nmt1*-Promotor einer der stärksten bislang bekannten Promotoren in *S. pombe*, so dass es zu einer starken Überexpression heterolog exprimierter Gene kommt. Durch die beiden Derivate *nmt41* bzw. *nmt81* kommt es zu einer 6fach bzw. 80fach schwächeren Expression. Sollte der *nmt*-Promotor reprimiert werden, wurden dem Medium 5 µg/ ml Thiamin zugesetzt. Für die Expression von Genen durch den *nmt1*-Promotor oder seine Derivate wurden *S. pombe* Zellen in Thiamin freiem Medium inkubiert, um den jeweiligen *nmt*-Promotor zu dereprimieren. Die Inkubationszeiten waren dabei abhängig von der gewählten Inkubationstemperatur und von der experimentellen Verwendung. Für die Durchführung serieller Tropftests wurden die Kulturen in der Regel entweder bei 30°C für 18 Stdn. oder bei 24°C für 20 Stdn. angezogen. Für immunofluoreszenzmikroskopische Analysen wurden *S. pombe* Zellen bei 30°C für 22 Stdn. oder bei 24°C für 24 Stdn. inkubiert. Bei lebend Fluoreszenz Studien von *nmt81*-GFP-Tubulin Stämmen wurden diese für 48 Stdn. bei 24°C inkubiert.

4.7.3 Nährmedien und Wachstumsbedingungen für *S. cerevisiae* Stämme

S. cerevisiae Stämme wurden entweder nicht selektiv in Vollmedium (YPD) oder selektiv in Minimalmedium (SD+13) bei 30°C angezogen. Flüssigkulturen wurden geschüttelt um aerobes Wachstum zu gewährleisten, festem Medium wurden 20 g/ L Agar beigelegt.

4.8 Transformation

4.8.1 Transformation von *E. coli* Stämmen

Die Amplifizierung von Plasmid-DNA erfolgte in *E. coli* Zellen. Dabei wurden zwei unterschiedliche Transformationsmethoden verwendet. Ligationsansätze wurden aufgrund der geringen DNA-Konzentration mittels Elektroporation in elektrokompente Zellen eingebracht, da diese Methode sich durch eine hohe Transformationseffizienz auszeichnet. Waren ausreichende Mengen an Plasmid-DNA vorhanden (mehr als 100 ng/ µl), wurde die

schnelle „One Minute“ Transformation verwendet, bei der die DNA mittels eines einminütigen Hitzeschocks in die Zellen eingebracht wird.

4.8.2 Transformation von *S. pombe* Stämmen

Die Transformation von *S. pombe* Stämmen mit linearen DNA-Fragmenten zur spezifischen Integration in das Hefegenom mittels homologer Rekombination und mit Plasmid-DNA erfolgte nach einem Protokoll von Okazaki (Okazaki, Okazaki et al. 1990). Dabei wurden die Hefe Zellen mit Hilfe von Lithium-Acetat kompetent gemacht. Die DNA wurde dann mittels eines 15 minütigen Hitzeschocks in die Zellen eingebracht. Bei der Transformation linearer DNA-Fragmente wurde den Ansätzen 10 µg lineare Lachssperma-DNA beigemischt, um einem Abbau der zu integrierenden DNA-Fragmente durch zelleigene Exonukleasen entgegen zu wirken.

4.8.3 Transformation von *S. cerevisiae* Stämmen

Die Transformation von linearen DNA-Fragmenten und Plasmid-DNA in *S. cerevisiae* Stämme erfolgte mit Hilfe eines von Agatep etablierten Protokolls, welches auf demselben Prinzip wie das *S. pombe* Transformationsprotokoll basiert.

4.8.4 Das 5-Fluoroorotsäure Selektionssystem für die Gegenselektion auf Uracil auxotrophe Zellen

Das *ura4⁺* Gen von Spalthehezellen kodiert für die Orotidylat-Decarboxylase (Grimm, Kohli et al. 1988). Dieses Enzym hat eine Funktion bei der Katalyse von Pyrimidinbasen, indem es Orotidylat (OMP) zu Uridylat (UMP) umsetzt. Uridylat wird dann in Folgereaktionen zu Deoxythymidin, Deoxycytosin, Uracil bzw. Cytosin umgesetzt, welche dann in DNA bzw. RNA eingebaut werden. Bei Hefezellen, die in Gegenwart von 5-Fluoroorotsäure (5-FOA), einem fluorierten Orotidylat-Derivat inkubiert werden, wird dieses durch die Orotidylat-Decarboxylase ebenfalls umgesetzt (Boeke, Trueheart et al. 1987). Dadurch kommt es vermutlich zur Akkumulation von fluorierten Ribonukleotiden und Deoxyribonukleotiden in der Zelle. Diese könnten dann in RNA bzw. DNA eingebaut werden und dann zu einem Transkriptions- bzw. Replikationsblock führen. Obwohl die genaue Wirkungsweise noch unklar ist, ist die Anwesenheit von 5-FOA im Nährmedium letal für Spalthehezellen mit einem funktionellen *ura4⁺* Gen.

In dieser Arbeit wurde das 5-FOA System verwendet, um den *ura4⁺* Marker eines *mal3Δ::ura4⁺* Stammes (UFY1126) im Genom mittels homologer Rekombination gegen

mutierte *mal3* DNA-Fragmente auszutauschen. Dabei erfolgte die Durchführung nach einem modifizierten Protokoll von Grimm (Grimm, Kohli et al. 1988). Zunächst wurden die entsprechenden Zellen wie in Kapitel 4.8.2 beschrieben mit linearen mutierten *mal3* DNA-Fragmenten transformiert. Nach erfolgter Transformation wurden die transformierten Zellen nicht selektiv für 12-14 Stunden bei 30°C in einem Liter YE5S inkubiert, so dass diese sich in etwa drei bis viermal teilen konnten. Dieser Schritt wurde durchgeführt, um restliches *ura4⁺* Gen-Produkt bei positiven Transformanten zu eliminieren. Nach erfolgter Inkubation wurden die Zellen in einem Liter sterilem dd H₂O gewaschen und alle Zellen auf Minimalmedium Agarplatten plattiert. Das Medium enthielt die Zusätze Adenin, Leucin und Histidin in den üblichen Konzentrationen (Kap.4.7.2), während nur eine limitierende Menge von Uracil (50 mg/ L) zugesetzt wurde, um positiven Uracil auxotrophen Transformanten Wachstum zu ermöglichen. Darüber hinaus enthielt das Medium 2 g/ L 5-FOA. Es wurden 3x10⁷ Zellen pro Agarplatte ausplattiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation bei 30°C für sechs bis sieben Tage, bis sich Kolonien gebildet hatten. Dabei bildeten Transformanten mit korrekt integriertem mutiertem *mal3* DNA-Fragment zumeist größere Kolonien als Transformanten, bei denen keine korrekte Integration erfolgt war.

4.9 Präparation von Nukleinsäuren

Plasmide wurden aus *E. coli* Zellen im kleinen Maßstab mittels alkalischer Lyse nach Ish Horowicz und Burke aufgereinigt (Ish Horowicz und Burke 1981). Für die Präparation größerer Mengen wurde das Plasmid-Midi-Kit der Firma Qiagen gemäß Herstellerangaben verwendet.

Genomische *S. pombe* DNA wurde mit Hilfe eines von Durkacz et. al. erstellten Protokolls isoliert (Durkacz, Beach et al. 1985).

Plasmid-DNA wurde mit Hilfe eines Protokolls von Fink (Fink, Hicks et al. 1983) aus *S. cerevisiae* Zellen isoliert.

4.10 DNA- und molekularbiologische Methoden

4.10.1 Allgemeine Methoden

Klonierung, Fällung, Aufreinigung und Gel-Elektrophorese von DNA-Fragmenten sowie die Amplifizierung von DNA mittels der Polymerase-Kettenreaktionen (PCR) wurden nach Standardprotokollen nach Maniatis et. al. durchgeführt (Maniatis, Fritsch et al. 1982; Maniatis, Fritsch et al. 1989). Die Hydrolyse von DNA mit Restriktionsendonukleasen (Kap.

4.2.1) wurde gemäß den Herstellerangaben mit den vom Hersteller gestellten Reaktionspuffern durchgeführt. Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte mit Hilfe des Nucleo Spin Extraktions-Kits der Firma Macherey & Nagel (Kap.4.3). DNA-Sequenzierungen wurden durch das Biologisch Medizinische Forschungszentrum der Heinrich Heine Universität durchgeführt.

4.10.2 Klonierung mittels homologer Rekombination in *S. cerevisiae*

Die zu klonierenden ORFs wurden mittels PCR amplifiziert, wobei die verwendeten Oligonukleotide neben ihrer Homologie zum amplifizierten ORF auch 30 Nukleotide Homologie zu der Multiple Cloning Site eines *S. cerevisiae* Vektors aufwiesen. Dieser Vektor wurde durch Hydrolyse mit einem spezifisch in der Multiple Cloning Site schneidenden Restriktionsenzym linearisiert. Nach Fällung des Vektors und des PCR-Produkts wurden beide DNA-Fragmente in einen *S. cerevisiae* Stamm transformiert. Mittels homologer Rekombination wurde das PCR-Produkt dann in den Vektor eingebaut, so daß ein zirkuläres Produkt entstand, welches stabil in der Hefe vorlag. Durch Selektion auf den in der Vektorsequenz enthaltenen Selektionsmarker (*ura3⁺* oder *leu2⁺*) konnte dann auf solche Transformanten selektioniert werden, die einen Vektor mit integriertem ORF enthielten.

4.10.3 Herstellung der pBSK/ *mal3-mut* Vektoren

Für die Herstellung von *mal3*-Mutanten wurde das QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit verwendet. Als Template diente hierbei das Plasmid pBSK/ *mal3⁺* (Plasmid 187/ Kap.4.5). Die Sequenzen der für die Mutagenese verwendeten spezifischen Oligonukleotide (Tab.4-1) sind in Kap.4.6 mit aufgeführt.

mutiertes Plasmid	Oligonukleotide (Nr. in Oligonukleotidsammlung)	Verifikation der Mutation
pBSK/ <i>mal3-004S/A</i>	282 und 283	Sequenzierung
pBSK/ <i>mal3-004S/E</i>	391 und 392	<i>Eco57I</i> Hydrolyse
pBSK/ <i>mal3-005R/G</i>	80 und 87	Sequenzierung
pBSK/ <i>mal3-047K/A</i>	284 und 285	Sequenzierung
pBSK/ <i>mal3-097W/R</i>	286 und 287	Sequenzierung
pBSK/ <i>mal3-201E/A</i>	187 und 188	<i>Eco72I</i> Hydrolyse
pBSK/ <i>mal3-208K/E</i>	191 und 192	<i>HindIII</i> Hydrolyse
pBSK/ <i>mal3-209L/F</i>	167 und 168	<i>HindIII</i> Hydrolyse
pBSK/ <i>mal3-209L/R</i>	389 und 390	<i>HindIII</i> Hydrolyse
pBSK/ <i>mal3-238L/F</i>	193 und 194	Sequenzierung
pBSK/ <i>mal3-206-pst</i>	165 und 166	<i>HincII</i> Hydrolyse

Tab.4-1: Verwendete Mutagenese-Oligonukleotide und Verifikation des Mutagenese-Erfolgs

Dabei erfolgte die Durchführung nach Herstellerangaben. Allerdings wurden die mutierten Plasmide nicht zur Amplifizierung in die mitgelieferten kompetenten Zellen transformiert.

Stattdessen wurden die laboreigenen elektrokompetenten Zellen für die Transformation verwendet (Kap.4.8.1). Der Mutagenese-Erfolg wurde entweder durch Sequenzierung oder, falls eine Schnittstelle für eine Restriktionsendonuklease generiert worden war, durch Hydrolyse mit dem entsprechenden Restriktionsenzym überprüft. Bei Sequenzierung von pBSK/ *mal3-004S/A* wurde eine Zweitmutation im 5' Bereich des *mal3-004S/A* ORFs 143 Bp vor der eigentlichen Mutation gefunden. Aus diesem Grund wurde mittels Hydrolyse mit *PstI* und anschließender Aufreinigung ein 498 Bp großes DNA Fragment, welches die *mal3-004S/A* Mutation enthielt, isoliert. Der für die Mutagenese verwendete Ausgangsvektor pBSK/ *mal3*⁺ wurde ebenfalls mit *PstI* hydrolysiert. Anschließend wurde das *mal3-004S/A* DNA-Fragment in pBSK/ *mal3*⁺ kloniert. Sequenzierung des Produkts ergab, dass nun das gewünschte Mutagenese-Produkt vorlag.

4.10.4 Herstellung des Plasmids pBSK/ *mal3Δ::ura4*⁺

An dieser Stelle soll kurz auf die Herstellung des Plasmids pBSK/ *mal3Δ::ura4*⁺ eingegangen werden. Mittels PCR mit den Oligonukleotiden 92 und 93 auf dem Plasmid pUR19 wurde das 1,8 Kb große *ura4*⁺-DNA-Fragment amplifiziert. Dieses DNA-Fragment enthält den 795 Bp langen *ura4*⁺ ORF zusammen mit Promotor- und Terminator-Sequenzen. Durch die PCR wurden über die beiden Oligonukleotide die Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen *PstI* bzw. *BclI* am 5' bzw. 3' Ende des PCR-Produkts eingebracht. Das gefällte PCR-Produkt wurde in den mit *SmaI* hydrolysierten Vektor pBSK subkloniert (Kap.4.5). Anschließend wurde das *ura4*⁺ DNA-Fragment mittels Hydrolyse mit *PstI* und *BclI* aus dem Vektor pBSK isoliert und in den ebenfalls mit *PstI* und *BclI* hydrolysierten Vektor pBSK/ *mal3*⁺ (Plasmid 187 der laboreigenen Plasmidsammlung) kloniert. pBSK/ *mal3*⁺ enthält ein 2450 Bp langes genomisches DNA-Fragment aus *S. pombe*, welches aus dem 987 Bp langen *mal3*⁺ ORF sowie 861 Bp des 5' Bereichs bzw. 602 Bp des 3' Bereichs von *mal3*⁺ besteht. Durch die Klonierung des *ura4*⁺ DNA-Fragments in pBSK/ *mal3*⁺ wurde ein 853 Bp DNA-Fragment deletiert, welches die ersten 807 Bp des *mal3*⁺ ORFs sowie 46 Bp des 5' Bereichs von *mal3*⁺ enthält.

4.10.5 Southern Blot Analyse zur Verifizierung der korrekten Integration des *ura4*⁺ Marker-Fragments im genomischen *mal3* Locus

Durch Transformation des *mal3Δ::ura4*⁺ DNA-Fragments (Kap.4.8.2) und anschließender homologer Rekombination wurde der *his3*⁺ Marker eines *mal3Δ::his3*⁺ Stammes gegen den *ura4*⁺ Marker ausgetauscht.

Zur Verifikation der korrekten Integration des *ura4*⁺ Marker Fragments im genomischen *mal3* Locus wurde eine genomische Southern-Blot-Analyse durchgeführt.

Der Austausch des *his3*⁺ Markers im genomischen *mal3* Locus gegen den *ura4*⁺ Marker führt zu einer Veränderung des Restriktionsmusters im Genom. Für die Southern-Blotanalyse wurde aus putativ positiven Transformanten genomische DNA isoliert (Kap.4.9) und mit den Restriktionsendonukleasen *Xho*I und *Eco*RV hydrolysiert. Als Kontrolle wurde ebenfalls genomische DNA des *mal3Δ::his3*⁺ Ausgangsstammes hydrolysiert. Die DNA-Fragmente wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt, zusammen mit dem λ-Größenstandard auf eine Nylon-Membran (NENTM, USA) transferiert und durch UV-Bestrahlung fixiert. Mittels PCR auf Wildtyp genomischer *S. pombe* DNA wurden zwei Digoxigenin markierte DNA-Sonden hergestellt. Die erste 499 Bp lange Sonde wurde mit Hilfe der Oligonukleotide 425 und 426 hergestellt und wies Homologie zum 5' Bereich des *mal3* Locus auf. Die zweite 298 Bp lange Sonde wurde mit Hilfe der Oligonukleotide 427 und 428 hergestellt und wies Homologie zum 3' Bereich des *mal3* Locus auf. Dabei wurde das „DIG DNA Labeling und Detection Kit“ zur Markierung der Sonden mit Digoxigenin verwendet. Beide Sonden hybridisierten an DNA-Bereiche, die nicht von der homologen Rekombination betroffen waren. λ-Größenstandard wurde mittels Nick Translation durch die Klenow-DNA-Polymerase ebenfalls mit Digoxigenin markiert. Durch spezifische Hybridisierung der DNA-Sonden sowie Digoxigenin markiertem λ-Größenstandard und anschließendem Farbnachweis mittels alkalischer Phosphatase konnten für *mal3Δ::ura4*⁺ und *mal3Δ::his3*⁺ spezifische DNA-Fragmente sowie der mit transferierte λ-Größenstandard detektiert werden.

Bei der Durchführung des Southern-Blots wurde die SSC-Pufferkonzentration auf die 10-fache Konzentration gesenkt und dadurch den Anforderungen der verwendeten Nylon-membran angepaßt.

4.10.6 Detektion von Protein-Protein Interaktionen mit dem Hefe-Zwei-Hybrid-System

Um zu überprüfen, ob Mal3 und Asp1 direkt miteinander interagieren, wurde das Matchmaker-two-Hybrid-System der Firma Becton Dickinson verwendet. Der *asp1*⁺ ORF wurde mittels homologer Rekombination in den Vektor pGADT7 (Kap.4.10.2) kloniert. Da die Überexpression von *mal3*⁺ letal für *S. cerevisiae* Zellen ist, wurde bei dieser Analyse ein *mal3*-Fragment verwendet, welches um die N-terminalen sieben Aminosäuren verkürzt ist (Mal3Δ7). Das *mal3Δ7* DNA-Fragment wurde in den Vektor pGBKT7 ebenfalls mittels homologer Rekombination kloniert. Beide Konstrukte wurden dann parallel in den *S.*

cerevisiae Stamm AH109 transformiert. Als Kontrollen wurden zusätzlich je eins der beiden Konstrukte sowie der leere, für das andere Konstrukt verwendete Vektor (pGADT7 oder pGBKT7) transformiert. Eine etwaige Interaktion kann beim Matchmaker System durch Adenin und Histidin Prototrophie sowie β -Galaktosidase Aktivität nachgewiesen werden. Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

4.11 Genetische Methoden

Um Diploide und Doppelmutanten herzustellen oder im Genom mit einem Epitop fusionierte Proteine in einem spezifischen Stammhintergrund zu exprimieren, wurden haploide *S. pombe* Stämme mit einander gekreuzt. Je nach experimenteller Verwendung wurde dann mit den gekreuzten Stämmen weitergearbeitet. Um die Dominanz von mutierten Allelen gegenüber dem Wildtyp Allel zu testen, wurden diploide *S. pombe* Stämme hergestellt. Sollten Doppelmutanten hergestellt werden, um eine genetische Interaktion von zwei Genen zu testen, wurde eine Tetradenanalyse durchgeführt. Anschließend wurden die vier aus einer Tetrade hervorgehenden Stämme zusammen mit den beiden Ausgangstämmen weiter analysiert. Für die Analyse von diploiden Stämmen sowie Doppelmutanten aus einer Tetrade wurden serielle Tropftests (Kap.4.7.2) durchgeführt. Abhängig von den Phänotypen der Parentalstämme (Temperatursensitivität, TBZ-Hypersensitivität) wurden dabei unterschiedliche Bedingungen gewählt (Kap.4.7.2). Es wurden mindestens zwei unabhängige diploide Stämme bzw. Tetraden für eine Untersuchung verwendet. Für Lokalisierungsstudien von Epitop markierten Proteinen in einem spezifischen Stammhintergrund wurden die entsprechenden Stämme mittels einer „Random Spore“-Analyse hergestellt.

4.11.1 Paarung haploider *S. pombe* Hefestämme

Haploide *S. pombe* Stämme (Paarungstyp h^+ bzw. h^-) wurden in 12 μ l dd H_2O in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß gemischt und die Suspension anschließend auf Minimalmediums-Platten (oder Malzextrakt-Platten) getropft. Die Platten wurden bei 24°C abhängig von der experimentellen Verwendung zwischen 18 und 72 Stdn. inkubiert.

4.11.2 Herstellung diploider *S. pombe* Hefestämme

Haploide *S. pombe* Stämme (*ade6-M210* bzw. *ade6-M216*) wurden, wie in Kapitel 4.11.1 beschrieben, gepaart und für 18 Stdn. inkubiert. Anschließend wurde ein Teil der gepaarten Zellen auf Selektivmedium (MM ohne Adenin) ausplattiert und für ca. 6-7 Tage bei

permissiver Temperatur inkubiert. Dabei waren diploide Hefestämme aufgrund der erhaltenen Adenin Prototrophie an der weißen Kolonienfarbe sowie der größeren Zellen zu erkennen.

4.11.3 Tetradenanalyse

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

Die Verifikation der Genotypen erfolgte für die entsprechenden mutierten Gene gemäß den Angaben in Tab. 4-1.

Mutiertes Gen	Phänotyp/ Identifizierungskriterium
<i>mal3Δ::ura4⁺</i>	Wachstum auf MM-Ura
<i>mal3Δ::his3⁺</i>	Wachstum auf MM-His
<i>asp1Δ::ura4⁺</i>	Wachstum auf MM-Ura
<i>mal3-004S/E</i>	PCR mit anschließender <i>Eco57I</i> Hydrolyse
<i>mal3-005R/G</i>	Wachstumsdefekt auf TBZ
<i>mal3-206-pst</i>	Wachstumsdefekt auf TBZ
<i>mal3-209L/F</i>	Wachstumsdefekt auf TBZ
<i>mph1Δ::ura4⁺</i>	Wachstum auf MM-Ura
<i>peg1.1</i>	Wachstumsdefekt bei 36 °C

Tab.4-2: Mutante Phänotypen bzw. Kriterien zur Identifizierung der angegebenen mutierten Gene

4.11.4 „Random spore“-Analyse

In der „Random spore“-Analyse wurden durch β -Glucuronidase-Behandlung die Zellwände vegetativer Zellen und Asciwände, jedoch nicht die der Sporen, zerstört, wobei ausschließlich Sporen überlebensfähig blieben. Dazu wurden die Asci mit einer Pipettenspitze von der Minimalmediums-Platte aufgenommen und in 1 ml dd H₂O inklusive 20 μ l einer 1:10 verdünnten β -Glucuronidase-Lösung resuspendiert. Der Ansatz wurde Ü/N bei RT inkubiert. Daraufhin wurde nach zweimaligem Waschen der Sporen mit einem Milliliter dd H₂O die Sporenzahl pro Milliliter ermittelt und 200-500 Sporen auf selektive Minimalmediums-Platten ausplattiert. Nach Inkubation für 2-8 Tage bei permissiver Temperatur wurden Kolonien ermittelt, deren Zellen den gewünschten Genotyp besaßen. Dies geschah entweder durch

Inkubation der Zellen auf Selektivmedium oder, falls es sich um temperatursensitive Mutanten handelte, durch Inkubation bei der restriktiven Temperatur.

4.11.5, „Random spore“-Analyse zur Herstellung von *mal3*-Mutanten-Stämmen, die GFP-Fusionsproteine exprimieren

Die *mal3*-Mutantenstämme besitzen keinen genetischen Marker, mit dem auf die Anwesenheit einer *mal3*-Mutation nachgewiesen werden kann. Deshalb wurden *mal3*-Mutantenstämme, die ein Tea1-pk-GFP, ein Tip1-pk-GFP, Mal2-GFP oder Spc7-GFP Fusionsprotein exprimieren, hergestellt, indem der jeweilige Mutantenstamm entweder gegen einen *mal3Δ::his3⁺* oder einen *mal3Δ::ura4⁺* Stamm gekreuzt wurde, welcher das entsprechende Fusionsprotein exprimierte. Durch Inkubation auf Selektivmedium ohne Histidin bzw. Uracil konnte dann verifiziert werden, ob der jeweils generierte Stamm neben dem exprimierten Fusionsprotein auch die spezifische *mal3*-Mutation oder die *mal3*-Deletion aufwies.

4.12 Herstellung von *S. pombe* Stämmen, die endogen mit dem pk-GFP Epitop fusionierte Proteine exprimieren

Für die subzelluläre Lokalisierung von Proteinen mittels Immunofluoreszenz und lebend-Fluoreszenz-Mikroskopie wurde in dieser Arbeit das green fluorescent protein (GFP) verwendet. Dabei wurde die von West (West, Malmstrom et al. 2001) beschriebene pk-GFP-Kassette verwendet. Diese Kassette enthält zum einen die DNA Sequenz für das pk Epitop (aus Paramyxovirus), zum anderen den GFP-ORF. Des weiteren ist auch der *nmt1*-Terminator sowie der *ura4⁺* Marker enthalten. Die Kassette lag in Plasmid 432 der laboreigenen Plasmidsammlung kloniert vor. Die pk-GFP-Kassette wurde mittels PCR auf Plasmid P432 amplifiziert. Dabei hatte das verwendete 5' Oligonukleotid an seinem 5' Ende 80 Nukleotide Homologie zum 3' Ende vor dem Stop-Kodon des Ziel-ORFs, gefolgt von 12 Nukleotiden, die für eine zweifache Wiederholung eines Glycin-Alanin „Spacers“ kodieren und schließlich am 3' Ende 17 Nukleotide Homologie zum 5' Ende der Kassette. Das verwendete 3' Oligonukleotid hatte an seinem 5' Ende 83 Nukleotide mit Homologie zum 3' Bereich des Ziel-ORFs und an seinem 3' Ende 17 Nukleotide mit Homologie zur Kassette.

Mittels homologer Rekombination wurde die pk-GFP-Kassette dann direkt hinter dem letzten Basenpaar des Ziel-ORFs vor dem Stop-Kodon im Genom integriert, so dass ein Fusions-ORF entstand. Dabei wurde auf positive Transformanten mittels Wachstum auf

Selektivmedium ohne Uracil selektioniert. In den folgenden Kapiteln wird detailliert auf die jeweilige Durchführung für die jeweils markierten ORFs eingegangen.

4.12.1 Fusion von mutierten *mal3* ORFs mit der pk-GFP-Kassette

Die mutierten *mal3* ORFs wurden mit Ausnahme von *mal3-206-pst* alle auf dieselbe Weise wie der *mal3*⁺ ORF (Browning, Hackney et al. 2003) mit der pk-GFP Kassette fusioniert. Dafür wurde die Kassette mittels PCR mit den Oligonukleotiden 354 und 429 auf Plasmid 432 amplifiziert und nach Fällung in den jeweiligen Mutantenstamm transformiert. Die Homologie Bereiche der verwendeten Oligonukleotide waren so gewählt, dass bei der Integration der Kassette hinter dem mutierten *mal3* ORF lediglich das Stop-Kodon deletiert wurde. Die Transformanten wurden bei 30°C inkubiert, bis Kolonien sichtbar wurden. Die korrekte Integration der Kassette wurde mittels PCR überprüft. Zum einen wurde der 5' Übergang zwischen Kassette und mutiertem *mal3* ORF unter Verwendung der Oligonukleotide 102 und 261 amplifiziert. Dabei musste bei korrekter Integration spezifisch ein 1195 Bp langes PCR Produkt entstehen. Zum anderen wurde der 3' Übergang von Kassette zum 3' Bereich der mutierten *mal3* ORFs mit den Oligonukleotiden 163 und 164 amplifiziert, wobei spezifisch ein 873 Bp langes PCR Produkt entstehen musste.

Für die Fusion von *mal3-206-pst* mit der pk-GFP-Kassette wurden die Oligonukleotide 402 und 429 verwendet. Allerdings erfolgte die Integration der Kassette nicht im *mal3-206-pst* Locus, sondern im *mal3*⁺ Locus. Dabei hatte das 5' Oligonukleotid 402 Homologie zu den letzten 80 Bp (bis Bp 690) der verkürzten Variante, die noch der Wildtyp DNA-Sequenz glichen. Dadurch wurde bei *mal3-206-pst*-pk-GFP nicht die Mutation bei Bp 678 eingeführt. Außerdem fehlte auch das Kodon für den Glutaminsäurerest, welcher beim Original *mal3-206-pst* direkt vor den heterologen Aminosäuren liegt. Bei Integration des pk-GFP-Kassetten PCR Produkts in den Wildtyp Stamm 605 wurden folglich die letzten 309 Bp des *mal3*⁺ ORFs deletiert. Diese beiden Änderungen wurden eingeführt, da für eine effiziente homologe Rekombination absolut identische Sequenzen benötigt werden. Die Verifikation der 5' und 3' Übergänge erfolgte wie bei den übrigen *mal3* Mutanten. Allerdings war das Produkt für den 5' Übergang nur 886 Bp lang.

Das Mikrotubuli-Zytoskelett von Zellen, die das Mal3-206-pst-pk-GFP Fusionsprotein exprimieren, unterscheidet sich nicht vom Mikrotubuli-Zytoskelett von Zellen, die Mal3-206-pst exprimieren.

4.12.2 Fusion der endogenen *teal*⁺ und *tip1*⁺ ORFs mit der pk-GFP-Kassette

Für die Fusion der *teal* und *tip1* ORFs mit der pk-GFP-Kassette im Genom von *S. pombe* wurde die pk-GFP-Kassette jeweils in einer PCR auf Plasmid 432 amplifiziert. Für den *teal* ORF wurden dabei die Oligonukleotide 324 und 325, für den *tip1* ORF die Oligonukleotide 326 und 327 verwendet. Die gefällten PCR-Produkte wurden in den *S. pombe* Stamm 607 für die Fusion von *teal* mit der pk-GFP-Kassette, bzw. in den Stamm 605 für die Fusion des *tip1* ORFs mit der pk-GFP-Kassette transformiert. Mittels homologer Rekombination im Genom wurde die pk-GFP-Kassette dann direkt hinter dem *teal* bzw. *tip1* ORF integriert. Dabei wurde das Stop-Kodon sowie die direkt 3' zu beiden ORFs liegenden 47 Bp deletiert, da die verwendeten PCR-Produkte, neben der Homologie zum 3' Ende der beiden ORFs, Homologie zu Bereichen aufwies, welche 47 Bp hinter dem Stop-Kodon der ORFs liegen. Nach erfolgter Transformation wurden die Zellen bei 24°C inkubiert, bis Kolonien sichtbar wurden. Die korrekte Integration der Kassetten wurde mittels PCR verifiziert. Dabei wurde der 5' Übergang von *teal* mit der pk-GFP-Kassette mit den Oligonukleotiden 328 und 261 überprüft, wobei ein 692 Bp langes PCR-Produkt entstehen musste, falls die Kassette korrekt im *S. pombe* Genom integriert war. Der 3' Übergang von *teal* mit der pk-GFP-Kassette wurde mit den Oligonukleotiden 163 und 329 überprüft. Bei dieser PCR musste bei korrekter Integration der Kassette ein 760 Bp langes Produkt entstehen. Der 5' Übergang von *tip1* und pk-GFP-Kassette wurde mit den Oligonukleotiden 330 und 261 überprüft, während der 3' Übergang mit den Oligonukleotiden 163 und 331 überprüft wurde. Dabei mussten ein 662 Bp langes PCR-Produkt für den 5' Übergang bzw. ein 549 Bp langes PCR-Produkt für den 3' Übergang entstehen.

Zur Verifikation, ob die Fusion von Teal bzw. Tip1 Auswirkungen auf die Funktion der beiden Proteine hat, wurde zum einen die Zellmorphologie und zum anderen das Mikrotubulizytoskelett der erhaltenen Stämme mit Wildtyp *S. pombe* Stämmen verglichen. Es wurden keine Unterschiede zwischen Stämmen, die Teal-pk-GFP bzw. Tip1-pk-GFP exprimieren, im Vergleich zum Wildtyp Stamm 605 gefunden.

4.12.3 Fusion des endogenen *asp1*⁺ ORFs mit der pk-GFP-Kassette

Die pk-GFP-Kassette wurde mittels PCR mit den Oligonukleotiden 345 und 346 amplifiziert. Das gefällte PCR-Produkt wurde in den Stamm 605 transformiert. Die Homologie Bereiche der verwendeten Oligonukleotide waren so gewählt, dass bei korrekter Integration der Kassette hinter dem *asp1*⁺ ORF lediglich das Stop-Kodon deletiert wurde. Die Transformanten wurden bei 30°C inkubiert, bis Kolonien sichtbar wurden. Die korrekte

Integration der Kassette wurde mittels PCR mit den Oligonukleotiden 348 und 261 für den 5' Übergang bzw. 163 und 349 für den 3' Übergang überprüft. Dabei musste bei korrekter Integration ein 1559 Bp langes PCR Produkt für den 5' Übergang entstehen, während für den 3' Übergang ein 852 Bp langes PCR-Produkt entstehen musste.

4.13 Mikroskopie

Zellmorphologische Untersuchungen sowie die Bestimmung der Zellzahl von *S. pombe* Flüssigkulturen wurden mit dem ICS Standard 25 Mikroskop der Firma Zeiss durchgeführt. Nomarsky-Mikroskopie und Fluoreszenz-Mikroskopie wurden mit dem Zeiss Axiovert Weitfeld-Fluoreszenz-Mikroskop, ausgestattet mit einer Hamamatsu Kamera, durchgeführt. Aufnahmen von Zellen wurden dabei mit der Openlab Software der Firma Improvision (England) gemacht und bearbeitet. Längenmessungen wurden ebenfalls mit der Openlab Software durchgeführt.

Die Präparation von Zellen für Immunofluoreszenz-Mikroskopie erfolgte nach verschiedenen Protokollen, welche sich lediglich in der Fixierungsmethode unterschieden (Hagan und Hyams 1988; Alfa, Gallagher et al. 1993; Bridge, Morphew et al. 1998). Dabei wurde entsprechend der experimentellen Fragestellung jeweils das Protokoll verwendet, welches die zu untersuchenden Strukturen am besten konservierte und am wenigsten Hintergrund-Fluoreszenz produzierte (Tab.4-3). Bei allen Protokollen werden die Zellen nach der Fixierung mit Zymolyase und Triton behandelt, um sie für die verwendeten Antikörper permeabel zu machen. Zur Lokalisierung der unterschiedlichen GFP-Fusionsproteine wurde ein polyklonaler Kaninchen Anti-GFP Antikörper (Molecular Probes, Göttingen) als primärer Antikörper, als sekundärer ein Cy3-konjugierter Anti-Kaninchen Antikörper (Sigma) verwendet.

Die Anfärbung von Mikrotubuli erfolgte mit dem monoklonalen Anti-Tubulin Antikörper TAT1 (Geschenk von Professor Keith Gull). Bei Einzelfärbung wurde als sekundärer Antikörper ein Cy3-konjugierter Anti-Maus Antikörper (Sigma) benutzt, während bei Doppelfärbung, d.h. paralleles Anfärben eines GFP-Fusionsproteins, ein FITC-konjugierter Anti-Maus Antikörper (Sigma) benutzt wurde. Aktin wurde sowohl bei Einzelfärbungen als auch bei Doppelfärbungen mit Rhodamin konjugiertem Phalloidin (Sigma) nachgewiesen. Bei Doppelfärbungen mit GFP-Fusionsproteinen wurden diese dann mit einem FITC-konjugiertem Anti-Kaninchen Antikörper (Sigma) als sekundärem Antikörper nachgewiesen. Chromatin wurde durch Zugabe von 0,01 µg/ ml 4,6 Diamidino-2-Phenylindol (DAPI) nachgewiesen.

Untersuchte Struktur/ untersuchtes Protein	Protokoll/ Fixierung
Mikrotubuli	Para-Formaldehyd/ Sorbit oder gemischte Aldehyd Fixierung
Aktin	Para-Formaldehyd
Mikrotubuli mit Mal3-GFP	Methanol
Mikrotubuli mit Tea1-GFP	Para-Formaldehyd/ Sorbit
Mikrotubuli mit Tip1-GFP	Methanol
Aktin mit Tea1-GFP	Para-Formaldehyd
Mitotische Spindeln	Para-Formaldehyd
Mitotische Spindeln mit Spc7-GFP	Para-Formaldehyd/ Methanol
Mitotische Spindeln mit Mal2-GFP	Para-Formaldehyd
Asp1-GFP	Para-Formaldehyd/ Sorbit oder Para-Formaldehyd

Tab.4-3: Verwendete Immunofluoreszenz-Protokolle

Im Folgenden soll detailliert auf zwei neu in der Arbeitsgruppe etablierte Fixierungsmethoden eingegangen werden.

4.13.1 Lokalisierung von Aktin mittels Rhodamin-Phalloidin Färbung

Diese Methode wurde nach modifizierten Protokollen von Marks und Hyams (Marks und Hyams 1985) durchgeführt. Dabei wurde wie folgt vorgegangen:

1. Fixierungslösung herstellen. 3 g Para-Formaldehyd in 10 ml PEM + 60 µl 10 M NaOH bei 65°C im Wasserbad lösen, bis sämtliches Para-Formaldehyd in Lösung gegangen ist. Die Lösung sollte dann leicht gräulich verfärbt sein. Die Fixierungslösung bei Raumtemperatur abkühlen lassen, bis sie in etwa die Temperatur der zu fixierenden Kultur hat. Anschließend die Fixierungslösung bei 3000 rpm für 2 Min. zentrifugieren, um etwaiges nicht gelöstes Para-Formaldehyd zu sedimentieren. Dann sofort mit der Fixierung der Zellen beginnen.
2. $7,5 \times 10^7$ Zellen einer logarithmisch wachsenden Kultur abnehmen und auf ein Volumen von 10 ml YE5S bringen (gegebenenfalls mit frischem vorgewärmten YE5S verdünnen).
3. 1,25ml der Para-Formaldehyd Lösung zu der Zellsuspension pipettieren (Endkonzentration 3%), kurz invertieren und für 30 Min. bei RT auf dem Rad fixieren.
4. Zellen durch Zentrifugation bei 3000 rpm für 2 Min. ernten.
5. Das Zellpellet in einem Milliliter PEM durch mehrfaches pipettieren (auf keinen Fall vortexen) resuspendieren und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführen. Bei 4000 rpm für eine Minute zentrifugieren und Überstand abnehmen (falls kein stabiles Pellet entsteht, Eppendorf-Reaktionsgefäß um 180° drehen und eine weitere Minute zentrifugieren). Diesen Waschschrift noch zweimal wiederholen.
6. Die Zellen in einem Milliliter PEMS mit 10% Triton resuspendieren und für 30sek. inkubieren.

7. Anschließend wie unter 5. beschrieben dreimal mit PEM waschen.
8. Zellen in einem Milliliter PEM aufnehmen.
9. 50 µl Zellsuspension in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß mit einem bis fünf Mikroliter (je nach Dichte der Zellsuspension) Rhodamin-Phalloidin (Sigma; 100 µg/ml in PEM) mischen. Dunkel für 30 Minuten bei RT inkubieren.
10. Zellen abzentrifugieren und in 50 µl PEM lösen.
11. Zellen auf einem Deckgläschen im dunkeln eintrocknen.
12. Mounten mit vier Mikrolitern einer 1:10 in PEM verdünnten DAPI/ Antifade Lösung. Mit Nagellack versiegeln.

DAPI/ Antifade Lösung: 1 µg/ ml DAPI 1:100 in 10 mg/ ml Antifade (Sigma) gelöst.

Die Präparate können nicht eingefroren und über einen längeren Zeitraum aufbewahrt werden.

4.13.2 Fixierung von *S. pombe* Zellen mittels Sorbit gepuffertem Para-Formaldehyd

Bei der Fixierung von Zellen mit Para-Formaldehyd werden die Zellen Osmostress ausgesetzt, was zu einem Strukturverlust führt. Bei dem Protokoll von Bridge (Bridge, Morpew et al. 1998) wird dieses Problem durch die Anwesenheit von 1,2 M Sorbit während der Fixierung gelöst. Das restliche Protokoll entspricht den Aldehyd Fixierungs-Standardprotokollen und wird hier deshalb nicht weiter aufgeführt.

1. YE5S/ 2,4 M Sorbit herstellen. Dazu wird eine 4,8 M Sorbit Stocklösung mit einer zweifach konzentrierten YE5S Stocklösung 1:2 verdünnt.
2. YE5S/ 2,4 M Sorbit mit YE5S 1:2 verdünnen, um YE5S/ 1,2 M Sorbit zu erhalten.
3. Fixierungslösung herstellen. Dazu 3 g Paraformaldehyd in 7,5 ml YE5S/ 1,2 M Sorbit + 60 µl 10 M NaOH bei 65°C im Wasserbad lösen. Kurz bevor alles Para-Formaldehyd gelöst ist, das Volumen der Lösung auf genau 10 ml einstellen und weiter inkubieren, bis das Para-Formaldehyd komplett gelöst ist. Die Fixierungslösung bei Raumtemperatur abkühlen lassen, bis sie in etwa die Temperatur der zu fixierenden Kultur hat. Anschließend die Fixierungslösung bei 3000 rpm für 2 Min. zentrifugieren, um etwaiges nicht gelöstes Para-Formaldehyd zu sedimentieren. Dann sofort mit der Fixierung der Zellen beginnen.
4. Fünf Minuten bevor die Fixierung gestartet wird, 13 ml einer logarithmisch wachsenden *S. pombe* Kultur mit 13 ml auf die Kultur-Inkubations-Temperatur vorgewärmtem YE5S/ 2,4 M Sorbit mischen und fünf Minuten bei der Kultur-Inkubations-Temperatur inkubieren.

5. 4ml Para-Formaldehyd Lösung zu den Zellen pipettieren (Endkonzentration 4% Para-Formaldehyd) und für 30 Minuten bei RT fixieren.
6. Der Rest des Protokolls gleicht dem von Allan (Allan, 1999) beschriebenen Protokoll.

4.13.3 Lebend-Fluoreszenz Mikroskopie

In dieser Arbeit wurde die Zeit bestimmt, in der die Plus-Enden von Mikrotubuli-Bündeln (Mikrotubuli-Wachstumzeit) sich in verschiedenen *mal3* Mutanten und dem Wildtyp in Richtung der Zellenden bewegen. Zu diesem Zweck wurden *S. pombe* Stämme verwendet, die ein am N-Terminus mit GFP fusioniertes α -Tubulin (GFP-Atb2) unter der Kontrolle des *nmt81*-Promotors (Kap.4.7.2) vom endogenen *atb2* Locus aus exprimieren (*Kan^R::nmt81-GFP-atb2*). In diesen Stämmen kann „lebend“ das Verhalten von Mikrotubuli im Fluoreszenz Mikroskop verfolgt werden. Dafür wurden die entsprechenden Stämme Ü/N bei 24°C auf EMM-Platten, die alle Zusätze und Thiamin zur Repression des *nmt81*-Promotors (Kap.4.7.2) enthielten, angezogen und dann in Flüssig EMM-Medium ohne Thiamin (Tab.4-4) für 48 Stunden als Schüttelkultur bei 24°C inkubiert, ohne einer Lichtquelle ausgesetzt zu werden. Dabei wurde sichergestellt, dass die Zellen permanent in der logarithmischen Wachstumsphase waren. Für die mikroskopische Analyse wurden 5 μ l der Kultur mit 10 μ l 1 mg/ ml Concanavalin-A-Lectin (Sigma) gemischt und dunkel auf ein Deckgläschen aufgetrocknet, ohne die Zellen komplett austrocknen zu lassen. Dabei bindet das Concanavalin-A an die Hefezellwand und bewirkt, dass alle Hefezellen in einer Ebene an das Deckgläschen gebunden werden. Zwei Streifen doppelseitiges Klebeband wurden auf einen Objektträger geklebt. Dabei sollte der Abstand der beiden Klebestreifen den Maßen eines Deckgläschens entsprechen. Nachdem alle Zellen auf das Deckgläschen aufgetrocknet waren, wurde das Deckgläschen invertiert und mit der Zell-Seite nach unten auf den Objektträger geklebt. Die hierbei entstehende Kammer wurde sofort mit EMM-Minimalmedium (Tab.4-4) gefüllt.

Die mikroskopische Analyse erfolgte bei 24°C unter Verwendung eines Zeiss 63x Plan-Apochromat Objektivs mit Hilfe der Openlab Timelapse-Funktion. Dabei wurden über einen Zeitraum von 150 Sek. in 10-Sek.-Intervallen Aufnahmen gemacht. Zwischen den einzelnen Aufnahmen wurde die Einstrahlung von Licht auf das Präparat unterbrochen. Es wurde verfolgt, über wie viele Zeitintervalle sich die Plus-Enden von Mikrotubuli-Bündeln auf die Zellenden zubewegten. Es wurden nur Mikrotubuli-Bündel analysiert, die in einer fokalen Ebene auf die Zellenden zu polymerisierten. Außerdem wurden nur solche Mikrotubuli-Bündel ausgewertet, welche innerhalb der Meßzeit wieder depolymerisierten. Durch Addition

aufeinanderfolgender Zeitintervalle, in denen sich ein Plus-Ende auf ein Zellende zubewegte, konnte die Länge der Wachstumsphase eines Mikrotubuli-Bündels errechnet werden. Für jeden analysierten Hefestamm wurden mindestens 20 Mikrotubuli-Enden ausgewertet und für diese der Mittelwert gebildet.

Menge	Stocklösung
20ml	Prämix: 5,5 g Dinatriumhydrogenphosphat/ 6 g Kaliumhydrogenphosphat/ 10 g Ammoniumchlorid. In 100 ml dd H ₂ O gelöst und sterilfiltriert, um Hintergrundfluoreszenz zu minimieren
20ml	40 g Glucose in 100 ml dd H ₂ O gelöst und sterilfiltriert, um Hintergrundfluoreszenz zu minimieren
16ml	Salzstock: Standard-Salzstock, autoklaviert
0,8ml	Vitaminstock: Standard-Vitaminstock, sterilfiltriert
0,08ml	Mineralstock: Standard-Mineralstock, sterilfiltriert
15ml	Adenin, 2,7 mg/ ml, autoklaviert
15ml	Uracil, 2,0 mg/ ml, autoklaviert
4ml	Leucin 7,5 mg/ ml, autoklaviert
4ml	Histidin 7,5 mg/ ml, sterilfiltriert
ad 400ml	Steriles dd H ₂ O

Tab.4-4: Herstellung von 400ml EMM für die Lebend-Fluoreszenz-Mikroskopie

4.14 Protein-Methoden

4.14.1 Herstellung von *S. pombe* Proteinextrakten für Co-Immuno-präzipitationen und Western-Blot-Analysen

Für die Herstellung von Ganzzell-Proteinextrakten wurden *S. pombe* Zellen aus logarithmisch wachsenden Kulturen mit Zelldichten zwischen 5×10^6 und 1×10^7 Zellen pro ml verwendet. Es wurden 1×10^9 Zellen pro herzustellenden Proteinextrakt geerntet. Dafür wurde das entsprechende Kulturvolumen für drei Min. bei 4°C und 3000 rpm zentrifugiert. Ab hier wurden alle Schritte auf Eis oder bei 4°C durchgeführt. Sämtliche verwendeten Puffer wurden auf Eis gekühlt. Die Zellpellets wurden in 5 ml Stop-Puffer resuspendiert und anschließend erneut für drei Min. bei 3000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde so abgekippt, dass ein kleines Restvolumen übrigblieb, in dem das Zellpellet resuspendiert wurde. Die Zellsuspension wurde dann in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und für 5 Min. bei 10000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde das Zellpellet durch rühren mit einer 1 ml Pipettenspitze in 80 µl Hepes-Lysis-Puffer resuspendiert und 0,7 ml Glasperlen (0,4 – 0,6 mm; Säure behandelt) zugefügt. Für den Zellaufschluss wurden die Proben 12 x 30 Sek. gevortext. Dabei wurden die Ansätze immer mindestens 30 Sek. auf Eis gelagert, bevor erneut gevortext wurde. Nun wurden den Proben 450 µl Hepes-Lysis-Puffer zugegeben und durch kurzes Vortexen gemischt. Dann wurden die Ansätze für 30 Min. bei 13000 rpm zentrifugiert, der Überstand in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und erneut für 30 Min. bei

13000 rpm zentrifugiert. Nach diesem Schritt wurde der Überstand entweder bei -20°C weggefroren oder direkt für Co-Immunopräzipitationen verwendet.

Stocklösung	Endkonzentration	
NaCl (1M)	150 mM	
NaF (1M)	50 mM	Sämtliche Stocklösungen Ü/N bei 4°C lagern. Nach Herstellung von Stop-Puffer pH-Wert auf 8,0 mit NaOH einstellen und Puffer auf Eis lagern.
EDTA (100mM)	10 mM	
NaN ₃ (100mM)	1 mM	
Mit dd H ₂ O das gewünschte Volumen einstellen		

Tab.4-5: Stop-Puffer

Stocklösung	Endkonzentration	
Hepes-KOH (1M/ pH 7,5)	50 mM	
NaCl (5M)	140 mM	
EDTA (100mM)	1 mM	Sämtliche Stocklösungen mit Ausnahme von TritonX-100 und Na-Deoxycholate Ü/N bei 4°C lagern. Nach Herstellung Hepes-Lysis-Puffer auf Eis lagern.
TritonX-100 (20%)	1%	
Na-Deoxycholate (5%)	0,1%	
PMSF (250mM)	1 mM	
Complete Proteinase-Inhibitor Mix (Roche)	4%	
Mit dd H_2O das gewünschte Volumen einstellen		

Tab.4-6: Hepes-Lysis-Puffer

4.14.2 Co-Immunopräzipitationen

Um nachzuweisen, dass verschiedene Mal3-Varianten noch mit dem Spc7-Komplex assoziiert sind, wurden in dieser Arbeit Co-Immunopräzipitationen durchgeführt. Dafür wurden Stämme verwendet, die mit dem GFP Epitop fusionierte Mal3-Varianten und mit dem HA Epitop markiertes Spc7 exprimieren. Es wurden von den entsprechenden Stämmen Proteinextrakte wie in Kap. 4.14.1 beschrieben hergestellt. Die Anreicherung der zu untersuchenden Proteine erfolgte durch für GFP oder HA spezifische, an magnetische Mikrokugeln gekoppelte, Antikörper, die nach Bindung an das jeweilige Epitop auf magnetischen Mikrosäulen immobilisiert wurden. Durch waschen der Säulen konnten nicht assoziierte Proteine eliminiert werden, so dass nur Proteine, welche mit dem immunopräzipitierten Protein assoziiert sind, an der Matrix gebunden bleiben. Nach Elution wurde überprüft, ob die Mal3-Varianten und Spc7 co-immunopräzipitiert werden konnten.

Zu 100 μl Proteinextrakt wurden 50 μl der Antikörper gebundenen magnetischen Mikrokugeln (μMACS gekoppelt an anti GFP oder anti HA Antikörper; Miltenyi) gegeben, gevortext und die Ansätze für 60 Min. auf Eis im 4°C Raum inkubiert. Pro Ansatz wurde eine magnetische Mikrosäule (MACS Säule; Miltenyi) in der dafür vorgesehenen Halterung an

einem Magneten befestigt und mit 200 µl Hepes-Lysis Puffer (Kap.4.14.1) ohne PMSF und Proteinase-Inhibitoren äquilibriert. Das Proteinextrakt/ Antikörper-Gemisch wurde auf der Mikrosäule immobilisiert. Anschließend wurden die Säulen je einmal mit 200 µl Waschpuffer 1 (150 mM NaCl, 1% Igepal CA-630, 0,5% Na-Deoxycholat, 0,1% SDS; 50 mM Tris/ HCl (pH: 8,0)) und anschließend mit 200 µl Waschpuffer 2 (20 mM Tris/ HCl (pH: 7,5)) gewaschen. Dann wurden 20 µl auf 100°C vorgewärmter Elutionspuffer (50 mM Tris/ HCL (pH: 6,8), 50 mM DTT, 1% SDS, 1 mM EDTA, 0,005% Bromphenol Blau, 10% Glycerin) auf die Mikrosäulen gegeben und für fünf Min. inkubiert. Die Elution der Proteine erfolgte anschließend durch Zugabe von 50 µl 100°C warmen Elutionspuffers. Das Eluat wurde in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß aufgefangen und in zwei 25 µl Aliquots bei -20°C weggefroren.

4.14.3 Auftrennung von Proteinen auf SDS-Polyacrylamidgelen

Für Western-Blot-Analysen und Coomassie-Färbungen verschiedener Proteinextrakte wurden SDS-Gelelektrophoresen durchgeführt. Dabei wurde ein Gelherstellungs- und Laufsystem der Firma Amersham verwendet.

4.14.3.1 Herstellung von SDS-Polyacrylamidgelen

In dieser Arbeit wurden 0,75 mm dicke Polyacrylamidgele mit den Abmessungen 5 x 9 cm nach einem modifizierten Protokoll von Maniatis hergestellt. Die Gele setzten sich dabei aus einem 7%igen Trenngel und einem 5%igen Sammelgel zusammen, welche zwischen zwei Glasplatten in einer Hoefer Dual Gel Caster Vorrichtung gegossen wurden. Während das Trenngel polymerisierte, wurde dieses mit Isopropanol überschichtet, um eine gerade Oberfläche des Trenngels zu gewährleisten.

Zusammensetzung des Trenngels:

Puffer	Volumen
Acrylamid (AA:BA = 37,5%:1%)	4,66 ml
Trenngelpuffer (4x)	5,0 ml
dd H ₂ O	10,2 ml
Ammoniumpersulfat (10%)	0,2 ml
Tetramethylethyldiamin	0,02 ml

Tab.4-7: Herstellung von Trenngelen (7%) für die SDS-Gelelektrophorese

Nach Polymerisation des Trenngels wurde das Isopropanol abgekippt und Reste von Isopropanol mit dd H₂O weggespült. Anschließend wurde das Sammelgel über das Trenngel gegossen und zur Ausbildung von Ladetaschen ein Kamm zwischen die beiden Glasplatten gesteckt.

Zusammensetzung des Sammelgels:

Puffer	Volumen
Acrylamid (AA:BA = 37,5%:1%)	1,5 ml
Sammelgelpuffer (4x)	5,0 ml
dd H ₂ O	6,0 ml
Ammoniumpersulfat (10%)	0,1 ml
Tetramethylethyldiamin	0,015 ml

Tab.4-8: Herstellung von Sammelgelen (5%) für die SDS-Gelelektrophorese

Verwendete Puffer:

4x Trenngelpuffer:	1,5 M Tris/ HCl (pH8,8)
	0,4% SDS
4x Sammelgelpuffer:	0,5 M Tris/ HCl (pH6,8)
	0,4% SDS

4.14.3.2 Auftrennung von Proteinextrakten auf SDS-Polyacrylamidgelen

Proteinextrakte wurden mit Probenpuffer und 100 mM DTT versetzt, für 10 Min. bei 100°C erhitzt und kurz bei 13000 rpm abzentrifugiert. IP-Eluate waren bereits mit Probenpuffer eluiert worden und wurden deshalb direkt erhitzt und abzentrifugiert. Anschließend wurden zwischen 2 und 25 µl Proteinextrakt bzw. 25µl IP-Eluat auf SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt.

Lösung	Volumen
Proteinextrakt	32,5 µl
Probenpuffer (5x)	12,5 µl
DTT (1M)	5,0 µl

Tab.4-9: Versetzen von Proteinextrakten mit Blaumarker und DTT

SDS-Polyacrylamidgele wurden in einer Hoefer SE260 Kammer unter Verwendung von Tris/ Glycin Laufpuffer (0,05 M Tris/ HCL (pH: 8,8), 0,2 M Glycin, 0,1% SDS) bei 85 V gefahren.

4.14.3.3 Coomassie-Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen

Um Proteinmengen in verschiedenen Proteinextrakten zu vergleichen, wurden SDS-Polyacrylamidgele mit einer Coomassie-Lösung (0,25 mg/ ml Coomassie in 10% Essigsäure, 45% Methanol, 45% H₂O) Ü/N unter leichtem Schütteln gefärbt.

Die Entfärbung erfolgte ebenfalls unter leichtem Schütteln in Entfärberlösung (10% Essigsäure, 45% Methanol, 45% H₂O) für vier bis acht Stunden.

4.14.3.4 Western-Blot-Analysen

Für Western-Blot-Analysen wurden nach abgeschlossenem SDS-Polyacrylamidgellauf die Proteine mittels Elektrotransfer auf eine PVDF-Membran (Millipore) übertragen. Dazu wurden drei auf Gelgröße zurechtgeschnittene Whatman-Filter in Transfer-Puffer (39 mM Glycin, 48 mM Tris, 0,037% SDS und 20% Methanol) getränkt und auf die Anode gelegt. Die ebenfalls auf Gel-Größe zurechtgeschnittene PVDF-Membran wurde mit Methanol äquilibriert, in dd H₂O gewaschen, mit Transferpuffer getränkt und dann luftblasenfrei auf die Whatman-Filter aufgelegt. Nun wurde das SDS-Polyacrylamidgel ebenfalls luftblasenfrei auf die Membran gelegt und mit drei weiteren in Transfer-Puffer getränkten Whatman-Filtern abgedeckt. Zum Schluss wurde die Kathode aufgelegt und mit zwei Liter-Flaschen dd H₂O beschwert. Der Elektrotransfer erfolgte in einer Whatman Biometra Fastblot B33 Kammer bei 300 mA in 60 Minuten.

Nach erfolgtem Transfer wurde die Membran für zwei Stunden in Blockierungslösung (140 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 8,0 mM Na₂HPO₄, 1,25 mM KH₂PO₄, 0,1% Tween und 2% Blockingreagenz von Amersham) inkubiert. Anschließend wurde die Membran mit dem ersten Antikörper Ü/N bei 4°C inkubiert. Dabei wurde für den Nachweis von Mal3-Varianten-GFP ein polyklonaler Kaninchen anti-GFP Antikörper (Molecular Probes) 1:5000 in Blockierungslösung verdünnt verwendet. Spc7-Ha wurde mittels eines 1:250 in Blockierungslösung verdünnten monoklonalen anti-HA Antikörpers (Roche) nachgewiesen. Nach erfolgter Antikörper-Reaktion wurde die Membran einmal für 15 Min, dreimal für je fünf Min. in PBS/ Tween gewaschen und dann mit dem zweiten Antikörper für sechs Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Dabei wurden Peroxidase gekoppelte Antikörper von Amersham (anti-Kaninchen) und Jackson Immuno Research Laboratories (anti-Maus) verwendet. Nach der Zweit-Antikörper Inkubation wurde die Membran wieder einmal für 15 Min und dreimal für je fünf Min. in PBS/ Tween gewaschen. Dann erfolgte die Entwicklung der Signale mit Hilfe des ECL-Kits (Amersham) nach Hersteller-Angaben. Die Detektion der Signale erfolgte im LAS 1000 Spektrometer mit Hilfe des Image Reader Programms. Die Quantifizierung der Signale wurde mit Hilfe des Programms Image-Gauge durchgeführt.

5 Ergebnisse

5.1 Funktionelle Charakterisierung der konservierten CH- und EB1-Domänen des Mal3 Proteins aus *S. pombe*

Alle bisher identifizierten Mitglieder der EB1 Proteinfamilie weisen zwei hoch konservierte Domänen auf, die CH- und die EB1-Domäne (Kap.3.3/ Abb.5-1). Des weiteren wurde gezeigt, dass beide Domänen wichtig für die Funktion von EB1 Proteinen sind (Nakamura, Zhou et al. 2001; Askham, Vaughan et al. 2002; Bu und Su 2003; Wen, Eng et al. 2004). Für das humane Familienmitglied EB1 wurde in *in vitro* und Überexpressionsstudien gezeigt, dass die CH-Domäne für die Bindung an Mikrotubuli benötigt wird. Überexpressionsstudien von mutierten EB1-Domänen belegen eine Funktion bei der Dimerisierung und der Interaktion mit anderen Proteinen (Kap.3.3).

Ein Ziel dieser Arbeit war es, eine funktionelle Analyse der CH- und EB1-Domänen des *S. pombe* Mal3 Proteins unter endogenen Bedingungen durchzuführen, um Aussagen über die Funktion der beiden Domänen *in vivo* machen zu können. Dazu wurden Mutantenstämme hergestellt, welche -statt des Wildtyp Mal3 Proteins- endogen Mal3-Varianten mit einzelnen spezifischen Aminosäure-Substitutionen exprimieren. Durch *in vivo* Analysen der mutanten Phänotypen konnten dann Aussagen über die Funktionen der CH- und EB1-Domänen getroffen werden.

Im Folgenden soll auf die Generierung der Mutanten-Stämme und die analysierten Phänotypen eingegangen werden.

5.1.1 Herstellung von Mutantenstämmen, die Mal3-Varianten mit je einer spezifischen Aminosäure-Substitution exprimieren

5.1.1.1 Auswahl und Herstellung spezifischer Mal3-Varianten

Bei den hergestellten Mal3-Varianten wurden nur hoch konservierte Aminosäuren für Substitutionen ausgewählt. Dabei wurde davon ausgegangen, dass vor allem konservierte Aminosäuren wichtig für die Funktion des Proteins sind. Bei allen EB1-Familien-Mitgliedern konservierte Aminosäuren sind vor allem in der CH- (28% homologe Aminosäuren) und der EB1-Domäne (29% homologe Aminosäuren) dieser Protein Familie zu finden. Dabei weisen

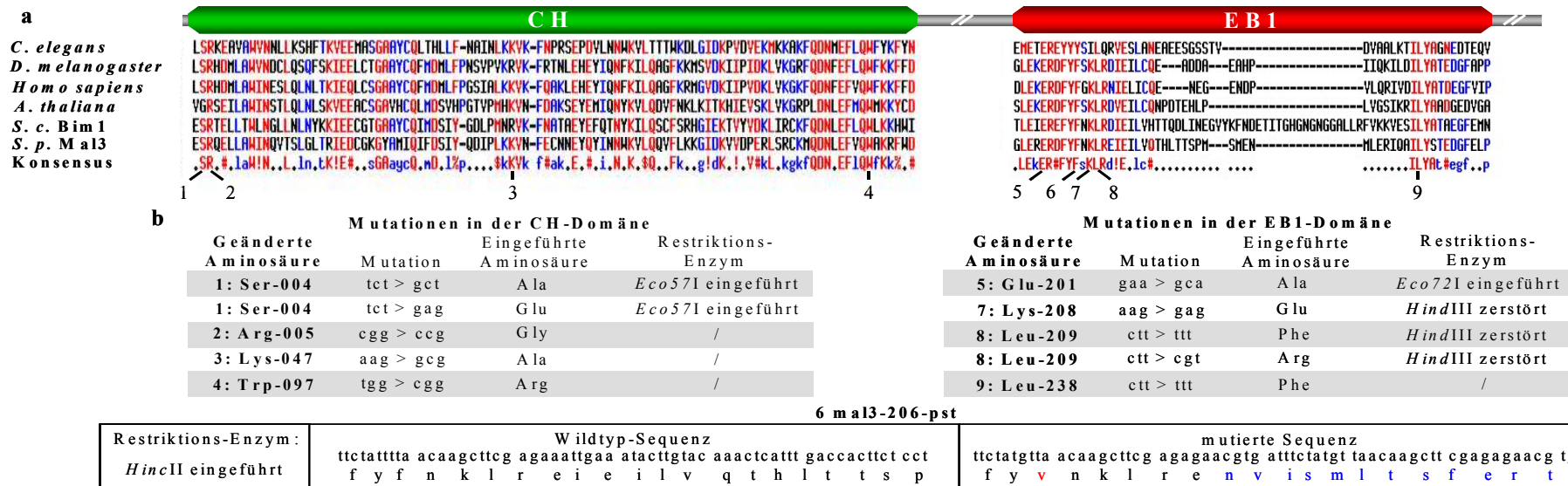


Abb.5-1: Herstellung von 11 spezifischen Mal3-Varianten in den konservierten CH- und EB1-Domänen.

a: Für die Auswahl konservierter Aminosäuren wurden Aminosäure-Sequenz-Vergleiche der CH- und EB1-Domänen aller bekannten EB1 Proteinfamilien Mitglieder durchgeführt. In **a** ist beispielhaft ein Vergleich von fünf Familien-Mitgliedern gezeigt. Die Aminosäure-Sequenz-Vergleiche wurden mit Hilfe des Programms Multalign (Corpet 1988) hergestellt. Die verwendeten Aminosäuresequenzen wurden von Gene-DB (www.genedb.org) heruntergeladen. Systematische Bezeichnungen der Proteine: *C.elegans*: Q9XXA2, *D. melanogaster* EB1: Q9XZ57, humanes EB1: Q15091, *A. thaliana*: Q9FGQ6, *S. c. Bim1*: *S. cerevisiae* Yer016W; Mal3: *S. pombe* Spac18G6.15. Aminosäuren, die bei über 80% aller EB1 Proteinfamilien Mitglieder konserviert sind wurden rot dargestellt und Aminosäuren, welche bei über 50% aller Familienmitglieder konserviert sind in blau dargestellt. das Symbol # in der Konsensussequenz gibt, dass entweder N, D, Q, E, B oder Z an der entsprechenden Position vorliegen. Das Symbol \$ steht für L oder M, % steht für F oder Y und ! für I oder V an der entsprechenden Position in der Aminosäuresequenz. Die Zahlen unter den Sequenzvergleichen markieren die Positionen der in **b** substituierten Aminosäuren.

b: Zusammenfassung der 11 hergestellten Mal3-Varianten. In den beiden oberen Tabellen geben die linken Spalten jeweils die konservierte Aminosäure an, die verändert wurde. Die Spalte „Mutation“ gibt an, welche Veränderung an dem entsprechenden Kodon vorgenommen wurde. In der jeweils dritten Spalte wird die jeweilige Aminosäure angegeben, die durch das veränderte Kodon kodiert wird. In der vierten Spalte ist angegeben, ob durch die jeweils eingeführte Mutation eine Restriktionsenzym-Schnittstelle eingeführt bzw. zerstört wurde. Die untere Tabelle fasst die Herstellung von *mal3-206-pst* zusammen. Durch die bei *mal3-206-pst* eingeführte Mutation wurde eine *HincII* Schnittstelle eingeführt (1.Spalte). Bei der Mutagenese trat jedoch ein verändertes Leseraster auf, das zu einer veränderten Aminosäuresequenz und einem verfrühten Stop-Kodon führt. In der zweiten und dritten Spalte sind deshalb die DNA- und Aminosäuresequenzen vom Wildtyp und von *mal3-206-pst* angegeben. Dabei ist die substituierte Aminosäure bei *mal3-206-pst* rot, die heterologen Aminosäuren sind blau hinterlegt.

beide Domänen Blöcke mit hoch konservierten Aminosäuren, die bei 90% der EB1 Familienmitglieder vorhanden sind, auf. Aus diesem Grund wurden Mal3-Varianten mit Substitutionen in konservierten Blöcken dieser beiden Domänen hergestellt. Dafür wurde je ein Aminosäure-Sequenz-Vergleich für die 100 Aminosäuren lange CH- und die 52 Aminosäuren lange EB1-Domäne von Mal3 mit den CH- und EB1-Domänen verschiedener anderer EB1 Proteine angefertigt (Abb.5-1a). Dabei stellte sich heraus, dass bei der CH-Domäne vor allem N-terminal und C-terminal kurze Blöcke mit hoch konservierten Aminosäuren vorhanden sind (Abb.5-1a). Darüber hinaus treten jedoch auch über die gesamte Länge der CH-Domäne einzelne hoch konservierte Aminosäuren auf. Aus diesem Grund wurden die direkt N-terminal an Position zwei und drei gelegenen Serin und Arginin Reste, sowie der C-terminal an Position 97 gelegene Tryptophan Rest für Substitutionen ausgewählt. Als Vertreter für eine einzeln gelegene hoch konservierte Aminosäure wurde darüber hinaus ebenfalls das zentral gelegene Lysin an Position 47 der Aminosäuresequenz von Mal3 ausgewählt.

Bei der EB1-Domäne hingegen gibt es zwei konservierte Blöcke, welche durch einen nicht konservierten Bereich getrennt werden (Abb.5-1a). Der erste N-terminal gelegene Block umfasst 16 Aminosäuren und kann in verschiedene Bereiche mit unterschiedlichem biochemischem Charakter unterteilt werden. So liegt in der Konsensus-Sequenz am Beginn dieses Blocks ein aus fünf geladenen Aminosäuren bestehendes Sequenzmotiv, bei dem die Sequenz **EKER#** (# steht für eine der Aminosäuren N, D, Q, E, B oder Z) hoch konserviert ist. Die fünfte Aminosäure ist variabel, jedoch immer geladen. Diesem Bereich folgt das aus drei aromatischen Aminosäuren bestehende **FYF** Sequenzmotiv. Diesem Bereich folgt ein sieben Aminosäuren langer Bereich alternierender Abfolge von aliphatischen und geladenen Aminosäuren. Dabei folgen immer ein bis zwei geladene Aminosäuren auf eine aliphatische Aminosäure. Der zweite konservierte Block in der EB1-Domäne besteht aus vier aliphatischen und einer aromatischen Aminosäure mit der Sequenzabfolge **ILYAT**. Auf Grund dieser speziellen Anordnung von Aminosäuresequenz-Bereichen wurde bei der Herstellung von Mal3-Varianten in der EB1-Domäne darauf geachtet, dass in jedem dieser Bereiche ein Aminosäureaustausch vorgenommen wurde. Dabei sollte bei allen Mal3-Varianten die Substitution durch eine Aminosäure erfolgen, welche in ihren biochemischen Eigenschaften wie Größe, Ladung, Polarität usw. unterschiedlich zu der substituierten Aminosäure ist. So wurde z.B. das aliphatische, hydrophobe Leucin 209 unter anderem gegen ein geladenes hydrophiles Arginin ausgetauscht. Abb.5-1b fasst die hergestellten Mal3-Varianten und die jeweils durchgeführten Substitutionen zusammen.

Die Mal3-Varianten wurden mittels einer Mutagenese-PCR hergestellt. Als Matrize diente dabei der Vektor pBSK/ *mal3*⁺, welcher ein 2,4 Kb großes genomisches *S. pombe* DNA-Fragment mit dem *mal3*⁺ ORF sowie 5' und 3' zu *mal3*⁺ gelegenen Sequenzen enthält (Kap.4.5). Dabei wurde das für die entsprechende Aminosäure kodierende Kodon mit Hilfe von spezifischen „mismatch“ Oligonukleotiden so verändert, dass es nun für die substituierende Aminosäure kodierte (Abb.5-1b). Der Erfolg der Mutagenese wurde entweder durch Sequenzierung oder, wenn durch die Anwesenheit der Mutation eine Restriktionsenzymstichstelle zerstört oder generiert wurde, durch Restriktionsanalysen verifiziert. Nach erfolgreicher Mutagenese-PCR lag ein mutierter *mal3*-Orf mit den 5' und 3' zum *mal3*⁺ ORF gelegenen Sequenzen (im Folgenden als *mal3-mut*-Fragment bezeichnet) im Vektor pBSK/ *mal3* (von hier an als pBSK/ *mal3-mut* bezeichnet) vor.

Die *mal3-mut*-Fragmente sollten mittels homologer Rekombination im endogenen *mal3*⁺ Locus integriert werden (Abb.5-2). Dabei war es wünschenswert eine direkte Selektion auf die erfolgreiche Integration durchzuführen, ohne die *mal3-mut*-Fragmente mit einem Selektionsmarker markieren zu müssen. Nur so konnte sichergestellt werden, dass die analysierten Phänotypen auf die jeweilige Mutation zurückzuführen sind und nicht auf zusätzliche Effekte, wie z.B. Einflüsse auf die Chromatinstruktur aufgrund der Anwesenheit

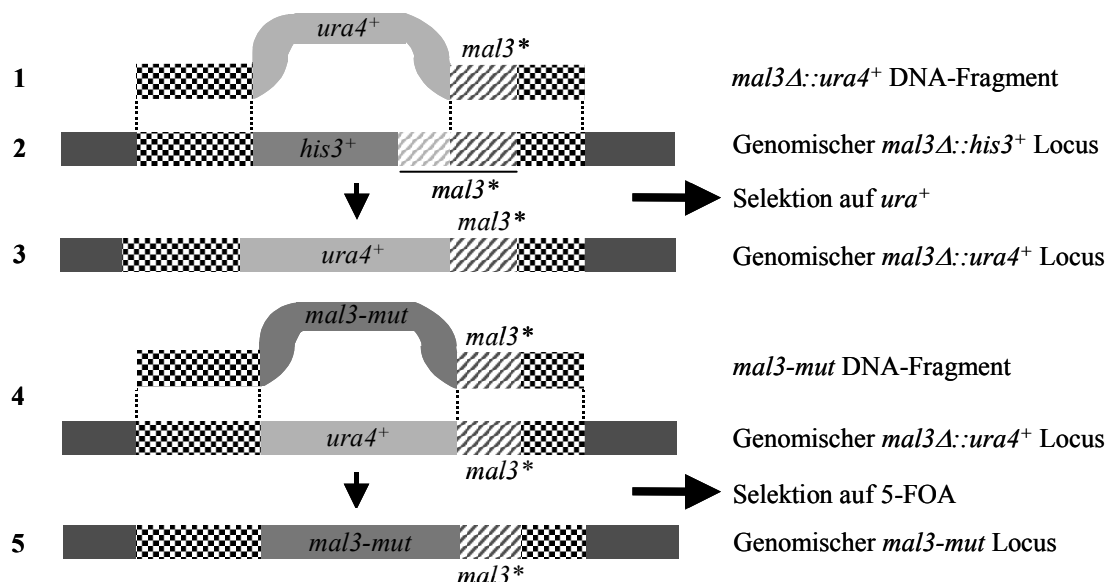


Abb.5-2: Schematische Darstellung der Integration mutierter *mal3* Gene im genomischen *mal3*⁺ Locus.

Ein DNA-Fragment bei dem das *mal3*⁺ Gen partiell durch den *ura4*⁺ Marker deletiert war (*mal3*Δ::*ura4*⁺) wurde konstruiert (1) und in einen *S. pombe* Stamm, bei dem das *mal3*⁺ Gen durch den *his3*⁺ Marker deletiert war (*mal3*Δ::*his3*⁺), transformiert (2). Mittels homologer Rekombination und Selektion auf Uracil Prototrophie wurde dann der *his3*⁺ Marker im genomischen *mal3* Locus gegen den *ura4*⁺ Marker ausgetauscht (3). Dieser Stamm wurde dann mit *mal3-mut*-Fragmenten transformiert und diese mittels homologer Rekombination und Gegenselektion auf 5-FOA im *mal3*Δ::*ura4*⁺ Locus integriert (4). Die resultierenden Stämme hatten nun ein mutiertes *mal3* Gen im endogenen *mal3* Locus integriert (5). Der einzige Unterschied zum wildtypischen *mal3*⁺ Locus bestand lediglich in der jeweils eingeführten Mutation. *mal3*^{*} steht für den nicht deletierten Rest des *mal3*⁺ ORFs.

eines Selektionsmarkers 5' oder 3' zum *mal3-mut* ORF. Ein solches direktes Selektionssystem stellt das 5-FOA (5-Fluoroorotsäure) System dar (Kap.4.8.4). Die Anwesenheit von 5-FOA im Nährmedium ist letal für *S. pombe* Zellen, welche den *ura4⁺* Marker besitzen. Deshalb wurde ein *S. pombe* Stamm, bei dem der nicht essentielle *mal3⁺* ORF durch den *ura4⁺* Marker ersetzt ist (im Folgenden als *mal3Δ::ura4⁺* bezeichnet) hergestellt (Abb.5-2). So konnte bei der Integration der *mal3-mut*-Fragmente im endogenen *mal3⁺* Locus und Gegenselektion auf 5-FOA Resistenz der *ura4⁺* Marker ersetzt werden (Abb.5-2). Transformanten mit einem im endogenen *mal3⁺* Locus integrierten *mal3-mut*-Fragment konnten dann durch selektives Wachstum in Gegenwart von 5-FOA isoliert werden (Kap.4.7.2).

5.1.1.2 Herstellung eines *S. pombe* Stammes mit einer partiellen Deletion des *mal3⁺* ORFs durch den *ura4⁺* Marker

Für die partielle Deletion von *mal3⁺* wurde das Plasmid pBSK/ *mal3Δ::ura4⁺* konstruiert (Kap.4.10.4 und Abb.5-3). Durch Hydrolyse von pBSK/ *mal3Δ::ura4⁺* mit *PvuI* und *SmiI* entstand ein 3,1 Kb großes DNA-Fragment, welches den *ura4⁺* Marker sowie 0,8 Kb

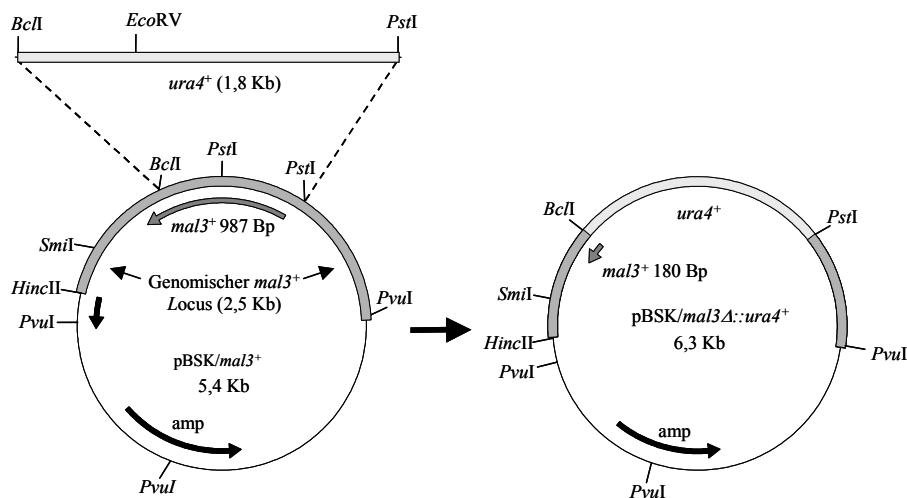


Abb.5-3: Partielle Deletion des *mal3⁺* ORFs durch den *ura4⁺* Marker.

Schematisierte Darstellung der Klonierung des *ura4⁺* DNA-Fragments (hellgrauer Balken), welches den 795 Bp großen *ura4⁺* ORF mit 5' und 3' dazu gelegenen Sequenzen enthält, in den Vektor pBSK/ *mal3⁺*. pBSK/ *mal3⁺* enthält ein genomisches DNA-Fragment (grauer Bereich) aus *S. pombe* mit dem *mal3⁺* ORF (dunkelgrauer Pfeil), sowie den 5' und 3' zum *mal3⁺* ORF gelegenen Sequenzen. Die Pfeilrichtung gibt die Transkriptionsrichtung von *mal3⁺* an. Für die partielle Deletion des *mal3⁺* ORFs wurde das 1,8 Kb große *ura4⁺* Marker Fragment *PstI*/ *BclI* in pBSK/ *mal3⁺* kloniert. Dabei wurden 807 Bp des *mal3⁺* ORFs, sowie 46 Bp direkt 5' zu *mal3⁺* deletiert. Das so entstandene Plasmid pBSK/ *mal3Δ::ura4⁺* enthielt nun ein Fragment, bei dem der *ura4⁺* Marker so im genomischen *mal3⁺* Fragment integriert war, dass der *mal3⁺* ORF bis auf die letzten 180 Bp deletiert war.

Homologie zum 5' und 0,5 Kb Homologie zum 3' Bereich von *mal3⁺* enthielt (Abb.5-4a). Dieses Fragment wurde in einen *S. pombe* Stamm, bei dem der *mal3⁺* ORF durch den *his3⁺* Marker deletiert war (*mal3Δ::his3⁺*), transformiert (Kap.4.8.2) und der *his3⁺* Marker im *mal3*-Locus mittels homologer Rekombination durch den *ura4⁺* Marker ersetzt (Abb.5-4a).

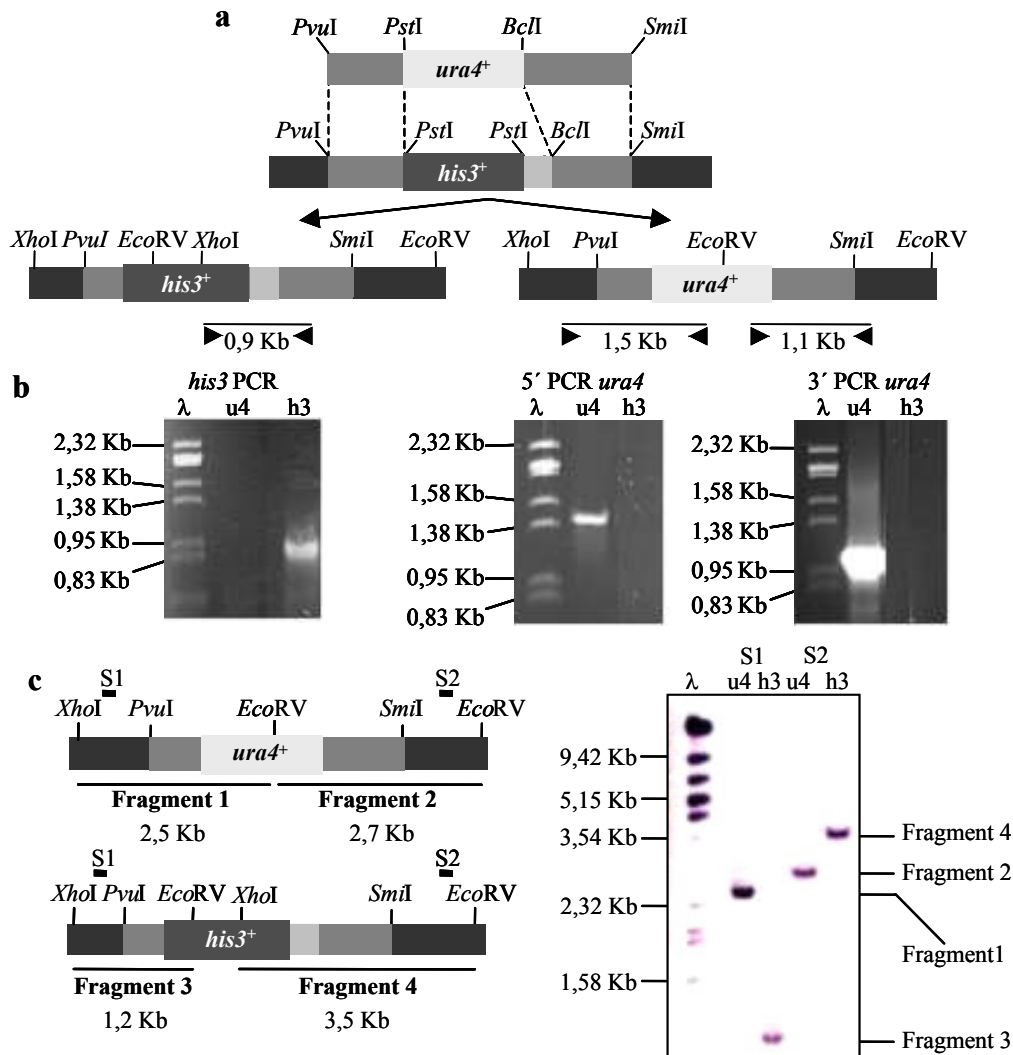


Abb.5-4: Herstellung eines *mal3Δ::ura4⁺* Stammes.

a: Austausch des *his3⁺* Markers durch den *ura4⁺* Marker. Der *mal3Δ::ura4⁺* sowie der genomische *mal3Δ::his3⁺* Locus sind schematisch dargestellt. Das 3,1 Kb große *mal3Δ::ura4⁺* Fragment wurde aus pBSK/*mal3Δ::ura4⁺* mittels Hydrolyse mit *PvuI* und *SmaI* isoliert. Die Bereiche zwischen *PvuI*/*PstI* und *BclI*/*SmaI* dienen der homologen Rekombination des Fragments in den *mal3Δ::his3⁺* Locus.

b: Verifikation putativ positiver Transformanten mittels PCR auf *S. pombe* Zellen. Die genomischen *mal3Δ::ura4⁺* und *mal3Δ::his3⁺* Loci sind schematisch dargestellt. Der *his3⁺* Marker wurde mit den Oligonukleotiden 36 und 42 (Kap.4.6) durch das Auftreten eines 0,9 Kb großen PCR-Produkts im genomischen *mal3* Locus nachgewiesen. Bei Transformanten, bei denen kein Produkt auftrat wurden die 5' bzw. 3' Übergänge zwischen genomischem *mal3* Locus und dem *ura4⁺* Marker überprüft. Hierzu wurden PCR-Analysen mit den Oligonukleotiden 161 und 162 bzw. 163 und 164 durchgeführt. Bei erfolgreicher Integration des *ura4⁺* Markers im *mal3* Locus musste für den 5' Übergang ein 1,5 Kb und für den 3' Übergang ein 1,1 Kb großes PCR-Produkt auftreten. Die PCR Produkte wurden auf 0,7% igen Agarose-Gelen aufgetrennt. Die gezeigten Gel-Bilder zeigen beispielhaft die Verifikation für die *mal3Δ::ura4⁺* Transformante T11 (u4). Als Kontrolle diente der *mal3Δ::his3⁺* (h3) Stamm. λ bezeichnet den λ -Größenstandard. Hierfür wurde λ -Phagen-DNA mit *HindIII* und *EcoRI* hydrolysiert.

c: Genomischer Southern-Blot (Kap.4.10.5) von Transformante T11 (u4) und dem *mal3Δ::his3⁺* Ausgangsstamm (h3). Der genomische *mal3Δ::ura4⁺* sowie der genomische *mal3Δ::his3⁺* Locus sind schematisch dargestellt. Aufgereinigte genomische DNA wurde mit *XhoI* und *EcoRV* hydrolysiert. Bei Zellen mit integriertem *ura4⁺* Marker musste ein 2,5 Kb (Fragment1) und ein 2,7 Kb (Fragment 2) großes Fragment entstehen. Bei Zellen mit integriertem *his3⁺* Marker mussten 1,2 Kb (Fragment 3) und 3,5 Kb (Fragment 4) große Fragmente entstehen. Sonde S1 diente zur Verifikation des 5' Übergangs, während Sonde S2 zur Verifikation des 3' Übergangs diente. Der abgebildete Southern-Blot zeigt beispielhaft die erhaltenen Ergebnisse für Transformante T11 (u4). Als Kontrolle diente der *mal3Δ::his3⁺* Ausgangsstamm (h3). λ bezeichnet den λ -Größenstandard (siehe b).

Zur Selektion auf Transformanten mit integriertem *ura4⁺* Marker wurden die Zellen auf Selektionsmedium ohne Uracil inkubiert (Kap.4.7.2). Die Verifikation positiver Transformanten erfolgte zum einen durch Inkubation der Transformanten auf Selektionsmedium ohne Histidin (His), zum anderen mittels PCR (Abb.5-4b). Dabei wurde zunächst mit Hilfe spezifischer Oligonukleotide überprüft, ob putativ positive Transformanten den *his3⁺* Marker wirklich verloren hatten (Abb.5-4b). Anschließend wurden mittels PCR die 5' und 3' Übergänge zwischen genomischem *mal3*-Locus und dem *ura4⁺* Marker überprüft (Abb.5-4b).

Bei der homologen Rekombination linearer DNA Fragmente in das Hefe-Genom kann es zu fehlerhaftem Einbau in den Ziel-Locus kommen. So kann z.B. ein Teil der zu substituierenden Sequenz im Ziellocus erhalten bleiben. Außerdem können auch unerwünschte Deletionen und Sequenz-Duplikationen im Ziellocus entstehen. Um auszuschließen, dass es zu größeren Deletionen, Duplikationen oder einem nicht korrekten Austausch des *his3⁺* Markers gegen den *ura4⁺* Marker gekommen war, wurde bei positiven Transformanten zusätzlich eine genomische Southern-Blot-Analyse durchgeführt (Kap.4.10.5 und Abb.5-4c). Hierbei konnte durch den Nachweis spezifischer DNA-Fragmente zum einen erneut gezeigt werden, ob der *his3⁺* Marker im *mal3*-Locus tatsächlich durch den *ura4⁺* Marker ersetzt worden war. Zum anderen konnte dadurch gezeigt werden, dass es nicht zu einem fehlerhaften Einbau des *ura4⁺* Markers im genomischen *mal3* Locus gekommen war (Abb.5-4c).

Der so hergestellte *mal3Δ::ura4⁺* Stamm wurde für die spätere Integration der *mal3-mut*-Fragmente im genomischen *mal3* Locus verwendet.

5.1.1.3 Integration der mutierten *mal3* Varianten im genomischen *mal3* Locus von *S. pombe*

Die 2,4 Kb großen *mal3-mut*-Fragmente wurden, mit Ausnahme von *mal3-206*, durch Hydrolyse mit den Restriktionsendonukleasen *PvuI* und *HincII* (Kap.4.10.1) aus dem entsprechenden pBSK/ *mal3-mut* Vektor isoliert (Kap.4.5). Dabei wiesen die *mal3-mut*-Fragmente an ihren 5' und 3' Enden je 0,8 Kb Homologie zum 5' bzw. 3' Bereich des *mal3Δ::ura4⁺* Locus auf. Anschließend wurden die *mal3-mut*-Fragmente in den *mal3Δ::ura4⁺* Stamm transformiert und mittels homologer Rekombination im *mal3Δ::ura4⁺* Locus so integriert, dass der *ura4⁺* Marker durch das jeweilige *mal3-mut*-Fragment substituiert wurde (Abb.5-5a). Da der *mal3Δ::ura4⁺* Stamm nicht in Gegenwart von 5-FOA wachsen kann (Abb.

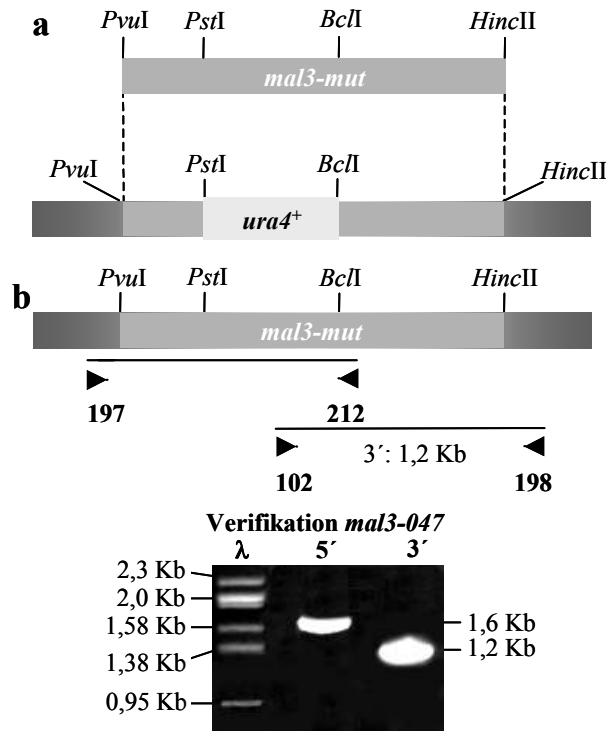


Abb.5-5: Herstellung von *mal3* Mutantenstämmen.

a: Schematische Darstellung der Substitution des *ura4⁺* Markers durch *mal3*-DNA-Fragmente mit einer spezifischen Punktmutation (*mal3-mut*). *mal3-mut*-DNA-Fragmente wurden mittels Hydrolyse mit *PvuI* und *HincII* aus dem entsprechenden Vektor pBSK/*mal3-mut* isoliert und in den *mal3Δ::ura4⁺* Stamm transformiert. Dabei wurde der *ura4⁺* Marker mittels homologer Rekombination gegen das mutierte *mal3-mut*-DNA-Fragment ausgetauscht. Selektion auf positive Transformanten erfolgte durch 5-FOA.

b: Die korrekte Integration wurde mittels PCR überprüft. Aufgeführt sind die verwendeten Oligonukleotide anhand ihrer Nummern in der Oligonukleotidsammlung (Kap.4.6) und die erwarteten Fragmentgrößen für den 5' und den 3' Übergang. Die Oligonukleotide 197 und 212 dienten zur Überprüfung des 5' Übergangs, während die Oligonukleotide 102 und 198 zur Überprüfung des 3' Übergangs verwendet wurden. Die PCR-Produkte wurden auf 0,7%igen Agarosegelen aufgetrennt. Das abgebildete Gel zeigt beispielhaft die Verifikation von *mal3-047*. λ = λ -Größenstandard (Abb.5-4b, Legende), 5' = PCR-Produkt für den 5' Übergang, 3' = PCR-Produkt für den 3' Übergang.

5-6), konnte auf positive Transformanten durch Anwesenheit von 5-FOA im Nährmedium selektioniert werden. Bei positiven Transformanten wurde die korrekte Integration der *mal3-mut*-Fragmente mittels PCR verifiziert. Hierfür wurden die 5' und 3' Übergänge von integriertem *mal3-mut*-Fragment und genomischem *mal3* Locus unter Verwendung spezifischer Oligonukleotide überprüft (Abb.5-5b). Nach erfolgter Integration bestand der einzige Unterschied zwischen Wildtyp und *mal3*-Mutantenstämmen in der jeweils generierten Mutation.

Da bei dem *mal3-206F/V*-Fragment eine *HincII* Schnittstelle generiert worden war, erfolgte die Isolierung dieses Fragments durch Hydrolyse mit *PvuI* und *SmaI*. Das isolierte *mal3-206F/V*-Fragment hatte eine Größe von 2,2 Kb und wies an seinen 5' bzw. 3' Enden 0,8 Kb Homologie bzw. 0,5 Kb Homologie zum 5' bzw. 3' Bereich des *mal3Δ::ura4⁺* Locus auf.

Der *mal3* Locus von hergestellten Mutanten-Stämmen wurde sequenziert

(Kap.4.10.1), um durch die Mutagenese-PCR generierte Zweit-Mutationen und fehlerhaften Einbau bei der homologen Rekombination in den *mal3* Locus (Kap.5.1.1.2) auszuschließen. Mit Ausnahme von *mal3-047K/A* und *mal3-206F/V* bestand der einzige Sequenzunterschied bei allen übrigen mutierten *mal3* Loci zum Wildtyp *mal3⁺* Locus jeweils in dem mutierten Kodon. Bei Sequenzierung von *mal3-047K/A* wurde eine Zweitmutation 10 Bp 3' zu der eigentlichen Mutation gefunden. Da es sich hierbei jedoch um eine stille Mutation handelt, sind keine weiteren Effekte durch diese Zweitmutation zu erwarten. Bei *mal3-206F/V* war es

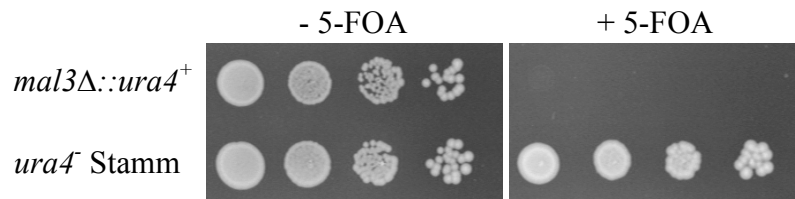


Abb.5-6: Der *mal3Δ::ura4⁺* Stamm kann nicht in der Gegenwart von 5-FOA wachsen.

Logarithmisch wachsende Zellen eines *mal3Δ::ura4⁺* sowie eines *ura⁻ S. pombe* Stammes wurden auf Minimalmedium mit oder ohne 2 g/ L 5-FOA für vier Tage bei 30°C inkubiert. Dem Medium wurde eine limitierende Menge von Uracil zugesetzt, um *ura⁻* Zellen das Wachstum zu ermöglichen. Zellzahl von links nach rechts: 10⁴, 10³, 10², 10 Zellen.

allerdings zu einem „Frameshift“ gekommen. Dieser bewirkte, dass ab Aminosäure 211 nicht mehr die *mal3⁺* Aminosäuresequenz kodiert war, sondern 12 heterologe Aminosäuren kodiert wurden, gefolgt von einem verfrühten Stop-Kodon. Deshalb wurde *mal3-206F/V* in *mal3-206-pst* (premature stop) umbenannt (Abb.5-1). Trotz mehrerer Versuche, diese Mutagenese zu wiederholen, konnte die ursprünglich geplante *mal3-206* Mutation nicht hergestellt werden.

Insgesamt wurden so 10 Mutantenstämme hergestellt, welche Mal3-Varianten mit einer einzelnen Aminosäure-Substitution endogen exprimieren. Der Stamm *mal3-206-pst* exprimiert endogen eine um 97 Aminosäuren verkürzte Mal3-Variante.

5.1.2 Werden die hergestellten Mal3-Varianten exprimiert und assoziieren sie noch mit Mikrotubuli?

Um Rückschlüsse auf die Rolle der CH- und EB1-Domänen bei der Funktion von Mal3 ziehen zu können, wurden die verschiedenen *mal3*-Mutanten-Stämme phänotypisch charakterisiert. Da die Möglichkeit bestand, dass die eingeführten Mutationen sich negativ auf die Expression bzw. die Stabilität der Mal3-Varianten auswirken, wurden zuerst die Mal3-Varianten-Mengen in den jeweiligen Zellen überprüft.

Da kein funktioneller Antikörper gegen Mal3 vorhanden war, wurden *S. pombe* Stämme hergestellt, welche endogen mit dem GFP (englisch: green fluorescent protein) Epitop fusionierte Mal3-Varianten exprimieren (Kap.4.12.1). So konnte Mal3 in Proteinextrakten mit einem anti-GFP Antikörper nachgewiesen werden. Deshalb wurden alle *mal3* Mutantenstämme mit einer mittels PCR amplifizierten GFP/ *ura4⁺* Kassette transformiert. Die Kassette wies dabei 80 bzw. 83 Bp an ihrem 5′ bzw. 3′ Ende zu den chromosomalen, mutierten *mal3* ORFs auf und wurde mittels homologer Rekombination am 3′ Ende des mutierten *mal3* ORFs (im Folgenden als *mal3-mut-GFP-ORFs* bezeichnet) im *S. pombe* Genom integriert (Abb.5-7a). Die Integration wurde mittels PCR überprüft (Abb.5-7b).

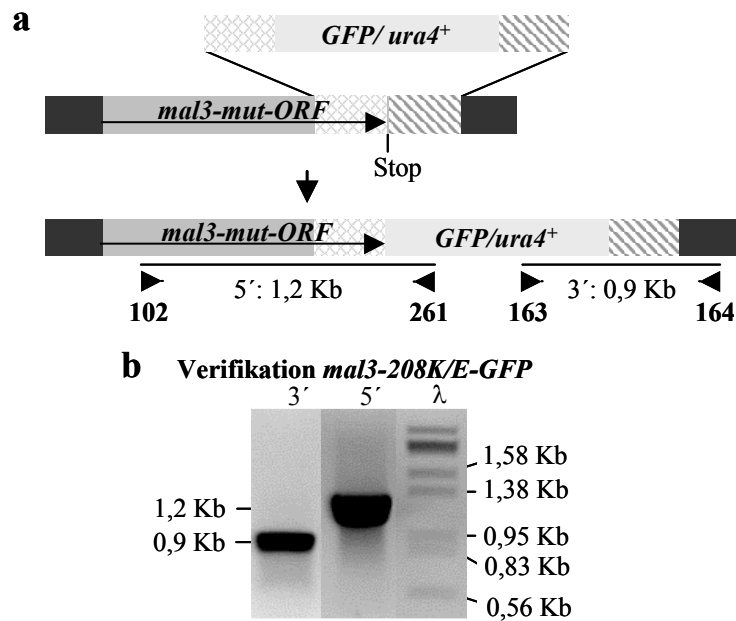


Abb.5-7: Herstellung von *S. pombe* Stämmen, die Mal3-Varianten-GFP Fusionsproteine exprimieren.

a: Schematische Darstellung der Herstellung von *mal3-mut-GFP/ura4⁺* Fusions-ORFs (Kap.4.12.1). Die *GFP/ura4⁺* Kasse wurde mit den Oligonukleotiden 354 und 429 mittels PCR amplifiziert, in die *mal3*-Mutanten-Stämme transformiert und mittels homologer Rekombination am 3' Ende der *mal3-mut*-ORFs integriert. Dabei wurde lediglich das Stop-Kodon der *mal3-mut*-ORFs deletiert. Die Verifikation erfolgte mittels PCR. Der *mal3-mut-GFP/ura4⁺* ORF ist schematisiert dargestellt. Die 5' bzw. 3' Übergänge wurden mit den Oligonukleotiden 102 und 261 bzw. 163 und 164 amplifiziert. Bei positiven Transformanten musste für den 5' Übergang ein 1,2 Kb, für den 3' Übergang ein 0,9 Kb großes DNA-Fragment entstehen.

b: Verifikation positiver Transformanten erfolgte mittels PCR auf *S. pombe* Zellen. Die PCR Produkte wurden auf 0,7%igen Agarose-Gelen aufgetrennt. Das gezeigte Gel-Bild zeigt beispielhaft die Verifikation für *mal3-208-GFP/ura4⁺*. 3' bezeichnet das PCR-Produkt für den 3' Übergang. 5' bezeichnet das PCR-Produkt für den 5' Übergang. λ bezeichnet den λ -Größenstandard (Abb.5-4b, Legende).

Mal3-206-pst fehlen die C-terminalen 97 Aminosäuren. Für die Herstellung des *mal3-206-pst*-GFP Fusions ORFs wurde eine GFP-Kassette so im *mal3⁺* Locus eines Wildtyp *S. pombe* Stammes integriert, dass dieser anschließend das verkürzte Mal3-206-pst-GFP Fusions-Protein exprimierte. Die genaue Vorgehensweise wird in Kapitel 4.12.1 detailliert beschrieben.

5.1.2.1 Die Mal3-Varianten werden ähnlich zum Wildtyp exprimiert

Die Expression der Mal3-Varianten wurde mittels Western-Blot Analysen verifiziert. Repräsentativ für alle Mal3-Varianten wurden dabei sechs verschiedene mit dem GFP Epitop fusionierte Mal3-Varianten überprüft. Dafür wurden Protein-Extrakte der jeweiligen *mal3-mut-GFP* Stämme sowie eines *mal3⁺-GFP* und eines Wildtyp Stammes ohne GFP-Epitop hergestellt und identische Proteinmengen verwendet (Kap.4.14.1). Als Ladekontrolle wurde Aktin parallel zum GFP-Epitop in den Proteinextrakten nachgewiesen (Abb.5-8). In der Kontrolle ohne GFP-Epitop wurde kein GFP Signal detektiert. Dabei glich die aufgetragene Proteinmenge der des Mal3-GFP Wildtyp Proteinextraktes, da die Intensität der beiden Aktin-

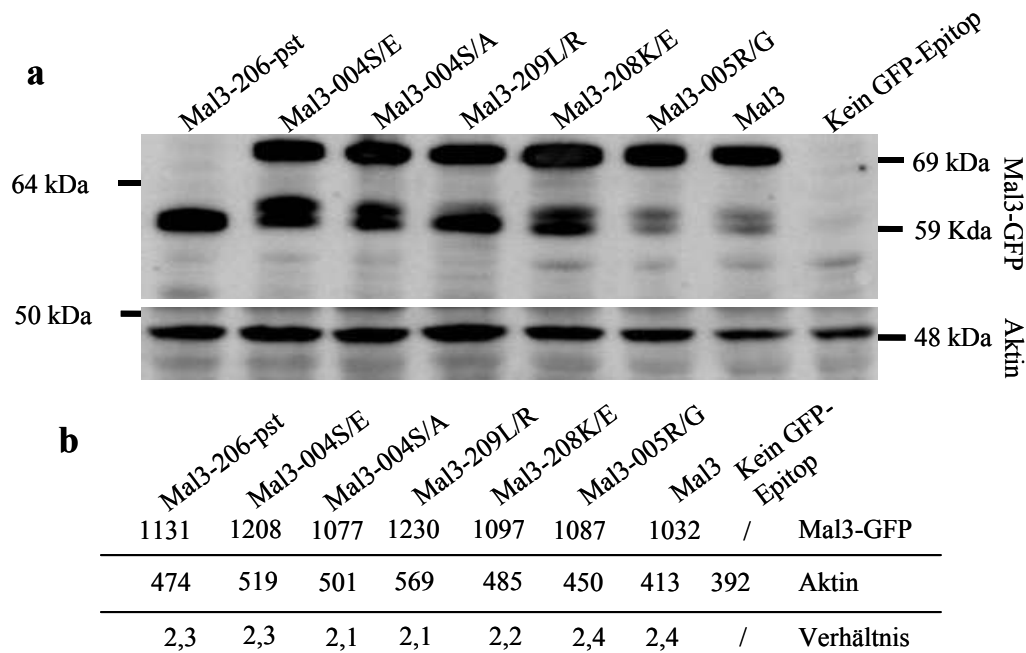


Abb.5-8: Die Mal3-Varianten werden in ähnlichen Mengen wie Wildtyp Mal3 exprimiert.

a: Von den angegebenen *S. pombe* Stämmen wurden Proteinextrakte hergestellt (Kap.4.14.1). Diese wurden auf einem 8%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf eine Nylon-Membran transferiert (Kap.4.14.3). Die Mal3-Varianten wurden mittels eines polyklonalen GFP-Antikörpers, die Aktin-Ladekontrolle mittels eines monoklonalen anti-Aktin-Antikörpers markiert. Als Zweitantikörper wurden Peroxidase konjugierte Antikörper verwendet, welche spezifisch die Erst-Antikörper binden. Die Detektion erfolgte mit Hilfe des ECL AdvanceTM Western Blotting Detection Kits im Luminescence Imager LAS-1000. Für alle Mal3-mut-GFP Varianten sowie Wildtyp Mal3-GFP konnten spezifische Signale bei 69 kDa, bzw. für Mal3-206-pst-GFP, bei 59 kDa detektiert werden. Für Aktin wurde ein Signal bei 43 kDa detektiert.

b: Die Quantifizierung der Signale erfolgte mit dem Programm Image-Gauge. Es wurde für jede Mal3-Variante das Verhältnis zwischen der Intensität des GFP spezifischen Signals und des Aktin spezifischen Signals berechnet.

Signale ähnlich ist (Abb.5-8). Für alle Mal3-mut-GFP Varianten sowie Wildtyp Mal3-GFP konnten spezifische Signale bei 69 kDa, bzw. für Mal3-206-pst-GFP bei 59 kDa detektiert werden. Zusätzlich wurden auch Abbau-Produkte detektiert. Durch Quantifizierung wurde das jeweilige Verhältnis zwischen der Intensität des GFP-Signals und des Aktin-Signals für jede Mutante und den Wildtyp berechnet (Abb.5-8). Wildtyp Mal3 weist ein GFP/ Aktin Verhältnis von 2,4 auf. Die Mutanten-Stämme weisen Werte zwischen 2,1 bis 2,4 für das GFP/ Aktin Verhältnis auf. Da die erhaltenen Werte für die Mal3-Varianten nicht signifikant von dem für Wildtyp Mal3 erhaltenen Wert abweichen, kann geschlossen werden, dass die Mal3-Varianten in vergleichbaren Mengen wie Wildtyp Mal3 exprimiert werden.

Dies bedeutet, dass die in späteren Kapiteln analysierten Phänotypen auf eine eingeschränkte Funktion der jeweiligen Mal3-Variante zurückgeführt werden können und nicht auf eine veränderte Protein-Konzentration in der Zelle.

5.1.2.2 Die hergestellten Mal3-Varianten assoziieren unterschiedlich effizient mit Mikrotubuli

Das Wildtyp Mal3 Protein assoziiert sowohl mit dem Interphasen-Mikrotubuli-Zytoskelett (Abb.5-9a), dem Spindelpolkkörper (SPK), als auch mit Mikrotubuli der mitotischen Spindel (Abb.5-10). Daher wurde untersucht, ob die unterschiedlichen Mal3-Varianten noch mit Mikrotubuli assoziieren. Dazu wurde in den *mal3-mut-GFP* Stämmen die subzelluläre Lokalisierung der jeweiligen Mal3-Variante mittels Immunofluoreszenz-Mikroskopie (Kap.4.13) bestimmt (Abb.5-9a). Es wurde bei allen *mal3*-Mutanten-Stämmen quantifiziert, wie viele Interphasen-Mikrotubuli noch Mal3 Signale aufweisen und wie viele nicht. Die erhaltenen Werte wurden im Vergleich zu Wildtyp Mal3, welches auf allen Interphasen-Mikrotubuli lokalisiert ist (also 100%), ausgewertet. Dabei zeigte sich, dass, mit Ausnahme von Mal3-097W/R, bei Mal3-Varianten mit Aminosäuresubstitutionen in der CH-Domäne (im Folgenden als CH-Mal3-Varianten bezeichnet) die Assoziation mit Interphasen-Mikrotubuli stark reduziert ist (Abb.5-9b). So ist die Assoziation von Mal3-004S/A und Mal3-047K/A mit Mikrotubuli um ca. 30% gegenüber Wildtyp Mal3 reduziert. Die Lokalisierung von Mal3-004S/E und Mal3-005R/G an Interphasen-Mikrotubuli ist sogar zu über 70% reduziert. Dabei ist bei diesen vier Varianten auch die Intensität der Signale die noch mit Interphasen-Mikrotubuli kolokalisieren im Vergleich zu Wildtyp Mal3 stark reduziert (Daten nicht gezeigt). Stattdessen scheint es zu einer Anreicherung im Zytoplasma zu kommen, da bei diesen Mal3-Varianten ein stärkeres zytoplasmatisches Hintergrund-Signal auftritt (Abb.5-9a). Dieser Effekt ist bei Mal3-004S/E und Mal3-005R/G am stärksten ausgeprägt. Daraus folgt, dass diese einzelnen Aminosäuren der CH-Domäne, mit Ausnahme von Tryptophan 097, für die Assoziation von Mal3 mit Interphasen-Mikrotubuli wichtig sind. Bei Mal3-Varianten mit Substitutionen in der EB1-Domäne (im Folgenden als EB1-Mal3-Varianten bezeichnet) konnten lediglich leichte bis moderate Effekte beobachtet werden. So entspricht die Signalintensität aller EB1-Mal3-Varianten an Interphasen-Mikrotubuli der des Wildtyp Mal3 Proteins (Daten nicht gezeigt). Dabei ist die Kolokalisierung von Mal3-201E/A, Mal3-208K/R, Mal3-209L/F und Mal3-238L/F mit Interphasen-Mikrotubuli nur leicht mit Werten zwischen 2 und 6% reduziert (Abb.5-9b). Die Assoziation von Mal3-209L/R mit Interphasen-Mikrotubuli ist moderat um 14% reduziert (Abb.5-9b). Zusammenfassend bedeutet dies, dass diese spezifischen Aminosäuren der EB1-Domäne nicht essentiell für die Bindung von Mal3 an Interphasen-Mikrotubuli sind. Ferner bewirken

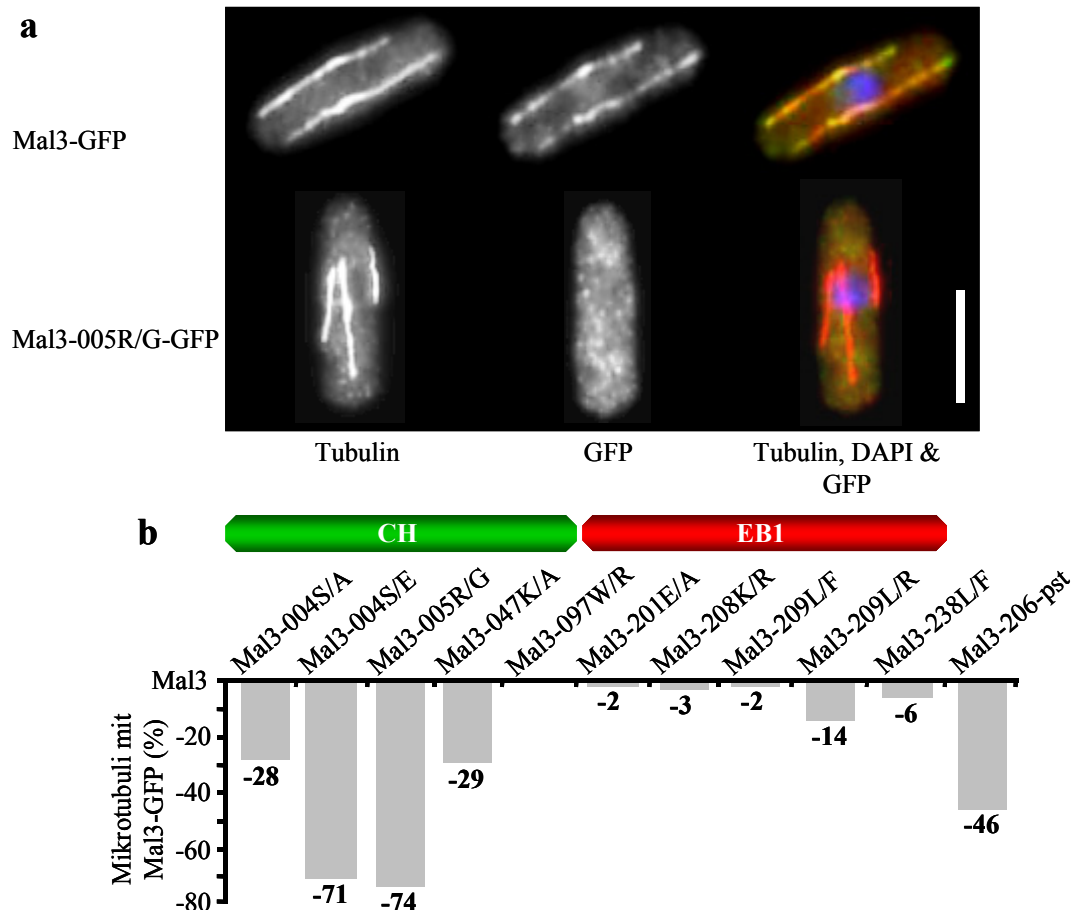


Abb.5-9: Assoziation der Mal3-Varianten mit dem Interphasen-Mikrotubuli-Zytoskelett.

a: Lokalisierung von Mal3-Varianten mittels Immunofluoreszenz-Mikroskopie. Repräsentativ sind die Lokalisierung von Mal3-GFP entlang von Mikrotubuli und die zytoplasmatische Lokalisierung von Mal3-005R/G-GFP gezeigt. Mikrotubuli und Mal3-GFP bzw. Mal3-005R/G-GFP wurden mittels Antikörpern, DNA mittels DAPI angefärbt (Kap.4.13). Der weiße Balken entspricht 5 μ m Länge.

b: Quantifizierung der Assoziation von Mal3-Varianten mit Mikrotubuli. Dabei wurden Mikrotubuli gezählt, die mit bzw. nicht mit Mal3-Varianten assoziiert waren. Es wurden mindestens 50 Mikrotubuli pro *mal3*-Mutanten-Stamm ausgewertet. Es wurden die Prozentzahlen von Mikrotubuli, die nicht mit Mal3-Varianten assoziiert sind im Vergleich zum Wildtyp als negative Werte aufgetragen. Dabei wurde der für Wildtyp Mal3 erhaltene Wert als Y-Achse festgelegt.

einzelne Aminosäureänderungen in der EB1-Domäne viel mildere Effekte bezüglich der Mikrotubuli-Assoziation als Aminosäureänderungen in der CH-Domäne.

Die Deletion der C-terminalen 97 Aminosäuren bei Mal3-206-pst führt allerdings zu einer erheblichen Verschlechterung der Assoziation mit Interphasen-Mikrotubuli (Abb.5-9b). Von diesen 97 Aminosäuren gehören 37 Aminosäuren zur EB1-Domäne. Also wird entweder ein Teil der letzten 97 Aminosäuren, oder es werden alle 97 Aminosäuren für eine effiziente Bindung an Mikrotubuli benötigt.

Während der Mitose ist Wildtyp Mal3 mit den SPK's, der mitotischen Spindel und den Astral-Mikrotubuli assoziiert. Beim Austritt aus der Mitose assoziiert Mal3 mit der post-Anaphase-Mikrotubuli-Anordnung (PAA), aus der später das Interphasen-Mikrotubuli-Zytoskelett hervorgeht. Die verschiedenen Mal3-Varianten sind unterschiedlich stark an den

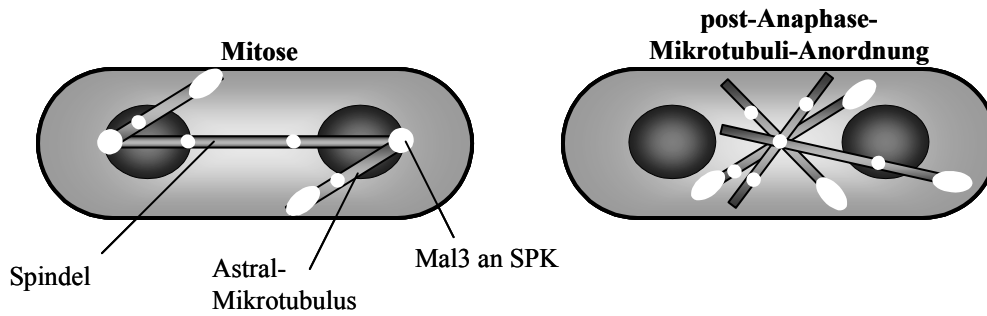


Abb.5-10: Assoziation der Mal3-Varianten mit der mitotischen Spindel und der post-Anaphase-Mikrotubuli-Anordnung.

Schematisierte Darstellung einer Anaphase B Spindel und der post-Anaphase-Mikrotubuli-Anordnung (PAA). Mikrotubuli sind als graue Stäbe, Mal3 als weiße Punkte und Elipsen dargestellt. Die Größe dieser Punkte und Elipsen symbolisiert die Stärke der beobachteten Signale. Die Zellkerne sind in dunklem grau dargestellt.

SPKs, der mitotischen Spindel, den Astral-Mikrotubuli und der post-Anaphase-Mikrotubuli-Anordnung (PAA) reduziert. Dabei korreliert die Intensität der beobachteten Phänotypen bei den spezifischen Mal3-Varianten mit den in der Interphase beobachteten Phänotypen. So ist mit Ausnahme von Mal3-097W/R bei CH-Mal3-Varianten die Assoziation mit den SPKs, der mitotischen Spindel, den Astral-Mikrotubuli und der PAA stark reduziert. Die Assoziation von Mal3-004S/E und Mal3-005R/G mit jeder dieser Strukturen ist mit über 90% extrem reduziert (Abb.5-11a bis d). Mal3-004S/A und Mal3-047K/A kolokalisieren mit über 50% der untersuchten SPKs nicht mehr (Abb.5-11a). Die Assoziation mit mitotischen Spindeln und Astral-Mikrotubuli ist sogar noch stärker reduziert (Abb.5-11b und d). Im Gegensatz hierzu sind nur 16% der untersuchten PAAs nicht mit Mal3-047K/A assoziiert, im Vergleich zu 35% bei Mal3-004S/A. Allerdings ist hierbei zu berücksichtigen, dass die Signalintensität dieser beiden Varianten auf post-Anaphase Mikrotubuli nahezu gleich reduziert ist (Daten nicht gezeigt), so dass diese Abweichung vermutlich aufgrund unterschiedlich effizienter Fixierungen beim Immunofluoreszenz Protokoll zustande kommt. Daraus folgt, dass analog zu der Bindung an Interphasen-Mikrotubuli diese Aminosäuren eine Funktion bei der Bindung an mitotische Strukturen haben.

Bei EB1-Mal3-Varianten können analog zu den für Interphasen-Mikrotubuli beobachteten Effekten lediglich leichte bis moderate Effekte auf die Assoziation mit mitotischen Strukturen beobachtet werden. Dabei ist die Kolokalisierung von Mal3-201E/A, Mal3-208K/R, Mal3-209L/F und Mal3-238L/F mit den SPKs, der mitotischen Spindel, Astral-Mikrotubuli und der PAA leicht reduziert (Abb.5-11a bis d). Stattdessen ist die Assoziation von Mal3-209L/R mit mitotischen Strukturen moderat reduziert (Abb.5-11a bis d). Mal3-206-pst kolokalisiert mit Werten zwischen 50 und 76% stark reduziert mit mitotischen Strukturen. Diese Resultate bedeuten, dass analog zu Interphasen-Mikrotubuli diese spezifischen Aminosäuren der EB1-Domäne nicht essentiell für die Bindung an mitotische Strukturen sind. Die bei Mal3-206-pst

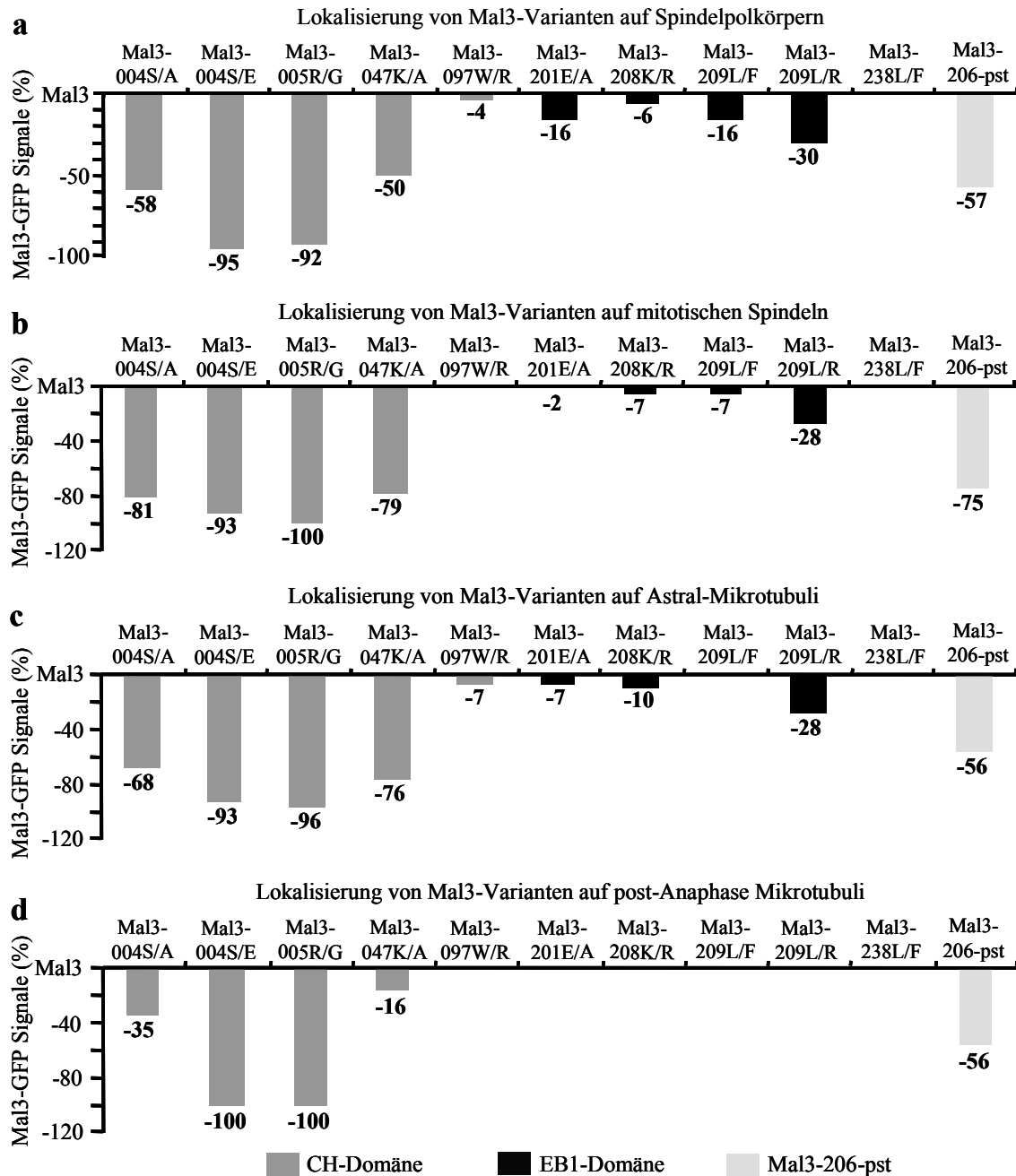


Abb.5-11: Quantifizierung der Assoziation von Mal3-Varianten mit der mitotischen Spindel und der post-Anaphase-Mikrotubuli-Anordnung.

a – d: Es wurden mitotische Mikrotubuli gezählt, die mit bzw. nicht mit Mal3-Varianten assoziiert waren. Es wurden mindestens 50 Zellen, welche sich in der Mitose oder post-Mitose befanden, pro *mal3*-Mutanten-Stamm ausgewertet. Der für Wildtyp Mal3-GFP erhaltene Wert wurde auf 100% gesetzt und als Y-Achse festgelegt. Der Prozentsatz von mitotischen Spindeln oder PAAs, welche nicht mit der entsprechenden Mal3-Variante assoziiert waren, wurden als negative Werte in Bezug auf den Wildtyp aufgetragen.

beobachteten starken Effekte müssen durch das Fehlen der C-terminalen 97 Aminosäuren zustande kommen.

Bei allen Mal3-Varianten ist auffällig, dass keine Lokalisierungsdefekte auftreten, die spezifisch für Interphasen-Mikrotubuli oder eine der mitotischen bzw. post-mitotischen Strukturen sind. Stattdessen ist die Assoziation je nach Mal3-Variante mit Interphasen-Mikrotubuli und mitotischen bzw. post-mitotischen Strukturen gleichermaßen stark reduziert.

Zusammenfassend lassen sich die erhaltenen Resultate so interpretieren, dass die Aminosäuren der CH-Domäne generell für die Assoziation von Mal3 mit Mikrotubuli sowohl in der Interphase als auch in der Mitose benötigt werden. Die einzelnen Aminosäuren der EB1-Domäne haben hierbei eine untergeordnete Funktion.

5.1.3 Die verschiedenen Mal3-Varianten haben unterschiedlich stark ausgeprägte Effekte auf die Integrität der mitotischen Spindel

5.1.3.1 Die Thiabendazol-Hypersensitivität von *mal3*-Mutanten-Stämmen korreliert mit den Lokalisierungsdefekten der jeweils exprimierten Mal3-Variante

Thiabendazol (TBZ) ist eine Mikrotubuli destabilisierende Chemikalie. Zellen, die Defekte beim Ablauf der Mitose, wie z.B. Defekte beim Aufbau und der Funktion der mitotischen Spindel oder einer fehlerhaften Verknüpfung von Spindel-Mikrotubuli mit den Kinetochoren aufweisen, sind oft hypersensitiv gegenüber dieser Chemikalie. Dies kann in seriellen Tropftests (Kap.4.7.2) in der Gegenwart von TBZ durch ein schlechteres Kolonienwachstum der entsprechenden Mutante im Vergleich zu Kontrollstämmen getestet werden. Deshalb wurde das Wachstum aller *mal3*-Mutanten-Stämme in Gegenwart von TBZ im Vergleich zu einem Wildtyp-Stamm und dem TBZ hypersensitiven *mal3Δ::his3⁺* Stamm in seriellen Tropftests überprüft (Abb.5-12). Dabei korreliert die TBZ-Hypersensitivität der Mutanten-Stämme mit der Reduktion der entsprechenden Mal3-Variante auf Mikrotubuli. Zellen,

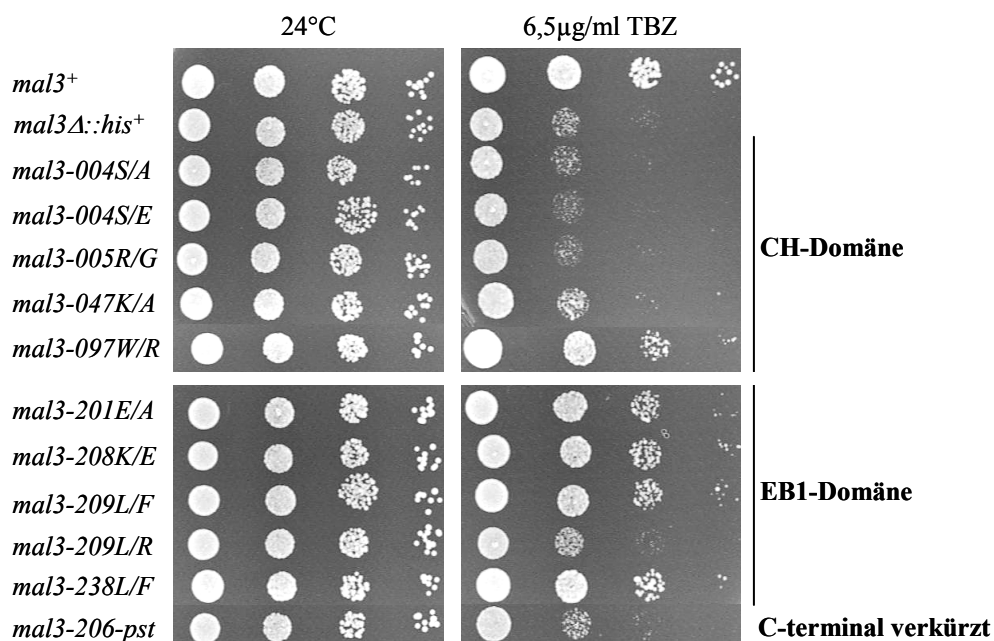


Abb.5-12: Wachstum von *mal3*-Mutanten-Stämmen in der Gegenwart von TBZ.

Logarithmisch wachsende Zellen der *mal3*-Mutanten-Stämme sowie eines *mal3Δ::his3⁺* und eines Wildtyp *S. pombe* Stammes wurden auf YE5S mit oder ohne 6,5 µg/ ml TBZ für fünf Tage bei 24 °C inkubiert (Kap.4.7.2).

welche Mal3-004S/E oder Mal3-005R/G -die in ihrer Bindung an Mikrotubuli am stärksten beeinträchtigt sind- exprimieren, sind sogar stärker sensitiv gegenüber TBZ als der *mal3Δ::his3⁺* Stamm. Die Assoziation der Varianten Mal3-004S/A, Mal3-047K/A und Mal3-206-pst mit Mikrotubuli ist ebenfalls stark reduziert. Die entsprechenden Mutanten-Stämme *mal3-004S/A*, *mal3-047K/A* und *mal3-206-pst* sind folglich auch stark sensitiv gegenüber TBZ. Dabei gleicht das Wachstum von *mal3-004S/A* und *mal3-206-pst* in der Gegenwart von TBZ dem Wachstum von *mal3Δ::his3⁺*, während *mal3-047K/A* etwas besseres Wachstum zeigt. Der *mal3-209L/R* Stamm zeigt leicht besseres Wachstum in der Gegenwart von TBZ als *mal3-004S/A*, *mal3-047K/A* und *mal3-206-pst*. Analog dazu ist die Lokalisierung von Mal3-209L/R auf Mikrotubuli nur leicht reduziert. Die in den übrigen Mutanten-Stämmen exprimierten Mal3-Varianten sind nicht signifikant an Mikrotubuli reduziert. Diese Stämme zeigen folglich nur leicht verschlechtertes Wachstum im Vergleich zur Wildtyp-Kontrolle. Daraus folgt, dass die Assoziation von Mal3 mit Mikrotubuli wichtig für den korrekten Ablauf der Mitose ist. Die TBZ-Hypersensitivität der Mutanten-Stämme *mal3-004S/E* und *mal3-005R/G* ist im Vergleich zum *mal3Δ* Stamm erhöht. Vermutlich üben Mal3-004S/E und Mal3-005R/G noch eine Funktion aus, die sich zusätzlich negativ auswirkt.

5.1.3.2 Die Mutation *mal3-004S/E* ist „semidominant“

Mal3-004S/E und Mal3-005R/G bewirken bei den betroffenen Zellen eine stärkere TBZ-Hypersensitivität als die komplette Abwesenheit von Mal3. Dies könnte durch den Gewinn einer zusätzlichen neuen Funktion bewirkt werden, die sich negativ auf die betroffene Zelle auswirkt. Zum anderen besteht jedoch auch die Möglichkeit, dass dieser Effekt durch eine „Rest-Funktion“ zustande kommt, durch die z.B. mit Mal3 interagierende Proteine wegtitriert werden und dem Prozess, für den sie benötigt werden, nicht mehr zur Verfügung stehen. Mutationen, die zu einem „Funktions-Gewinn“ führen, sind dominant. Aus diesem Grund wurden repräsentativ für beide Mutanten-Stämme *mal3-004S/E/ mal3⁺* heterozygot diploide *S. pombe* Stämme hergestellt. Anschließend wurde das Wachstum von *mal3-004S/E/ mal3⁺*

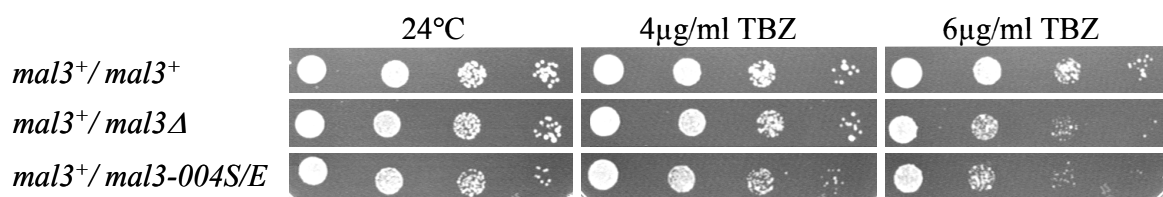


Abb.5-13: *mal3-004S/E* verhält sich semidominant.

Diploide *mal3⁺/ mal3⁺*, *mal3⁺/ mal3Δ*, *mal3⁺/ mal3-004S/E* Zellen (Kap.4.11.2) wurden Ü/N bei 24°C in MM ohne Adenin inkubiert und anschließend auf MM ohne Adenin, ohne oder mit 4 µg/ ml bzw. 6 µg/ ml TBZ für 120 Std. bei 24°C inkubiert (Kap.4.7.2).

Diploiden in Gegenwart von TBZ überprüft. Im Vergleich zu diploiden Wildtyp Zellen ist dabei das Wachstum von *mal3-004S/E/ mal3⁺* und *mal3Δ/ mal3⁺* heterozygot Diploiden gleich stark reduziert (Abb.5-13). D.h., dass bereits eine um 50% reduzierte Konzentration von Wildtyp Mal3 sich negativ auf die betroffene diploide Zelle auswirkt. Dass *mal3⁺/ mal3-004S/E* heterozygot Diploide sich wie *mal3⁺/ mal3Δ* heterozygot Diploide verhalten bedeutet, dass sich *mal3-004S/E* „semidominant“ und nicht dominant verhält. Aus diesem Grund kann geschlossen werden, dass es bei *mal3-004S/E* wahrscheinlich nicht zu einem „Funktions-Gewinn“ gekommen ist. Damit kommen die stärkeren Phänotypen von haploiden *mal3-004S/E* Zellen im Vergleich zu haploiden *mal3Δ* Zellen wahrscheinlich durch eine „Rest-Funktion“ zustande.

5.1.3.3 Die *mal3*-Mutanten-Stämme weisen unterschiedlich stark ausgeprägte Spindel-Defekte auf

Als nächstes wurde sowohl in fixierten als auch in lebenden Zellen untersucht, ob bei den *mal3*-Mutanten-Stämmen Spindel-Defekte und Chromosomenfehlsegregation auftreten. Sowohl in lebenden Zellen wie auch in fixierten Zellen konnten hierbei zwei spezifische, abnorme Spindel-Phänotypen beobachtet werden.

Bei Wildtyp-Zellen wird mit dem Eintritt in die Mitose die bipolare Metaphasen-Spindel aufgebaut. Zunächst bildet sich während der Prophase eine dünne Spindel zwischen den beiden separierten SPKs aus (Hagan und Hyams 1988; Übersichtsartikel: Hagan 1998). Diese Spindel elongiert und wird dicker. Die daraus entstehende Metaphase-Spindel weist zunächst zwei dicke Enden auf, die durch eine dünne Mittelzone verbunden werden (Hagan und Hyams 1988 und Abb.5-14a, *mal3-004S/A*). Solche Metaphase-Spindeln stellen ein Zwischenstadium dar und können in Wildtyp-Zellen nur sehr selten detektiert werden (Abb.5-14b). Schließlich verschwindet die dünne Mittelzone und es entsteht eine über die gesamte Länge gleichmäßig dicke Metaphasen-Spindel (Hagan und Hyams 1988 und Abb.5-14a *mal3⁺*). Bei *mal3Δ* Zellen kommt es jedoch zu einem Anstieg in der Population von Metaphase-Spindeln, die eine dünne Mittelzone aufweisen. Im Vergleich zu Wildtyp-Zellen nimmt der Anteil von Metaphase-Spindeln mit dünner Mittelzone um 14% zu (Abb.5-14b). Das bedeutet, dass dieses Zwischenstadium der Metaphase bei *mal3Δ* Zellen länger andauert. Auch bei den meisten *mal3*-Mutanten dauert dieses Zwischenstadium länger an, da die Population von Metaphase-Spindeln mit dünner Mittelzone bei nahezu allen *mal3*-Mutanten im Vergleich zu Wildtyp Zellen zunimmt. Dabei weisen die CH-Domänen-Mutanten-Stämme *mal3-004S/E* und *mal3-005R/G* die stärksten Effekte auf. Bei diesen Stämmen kommt es zu einem vier-

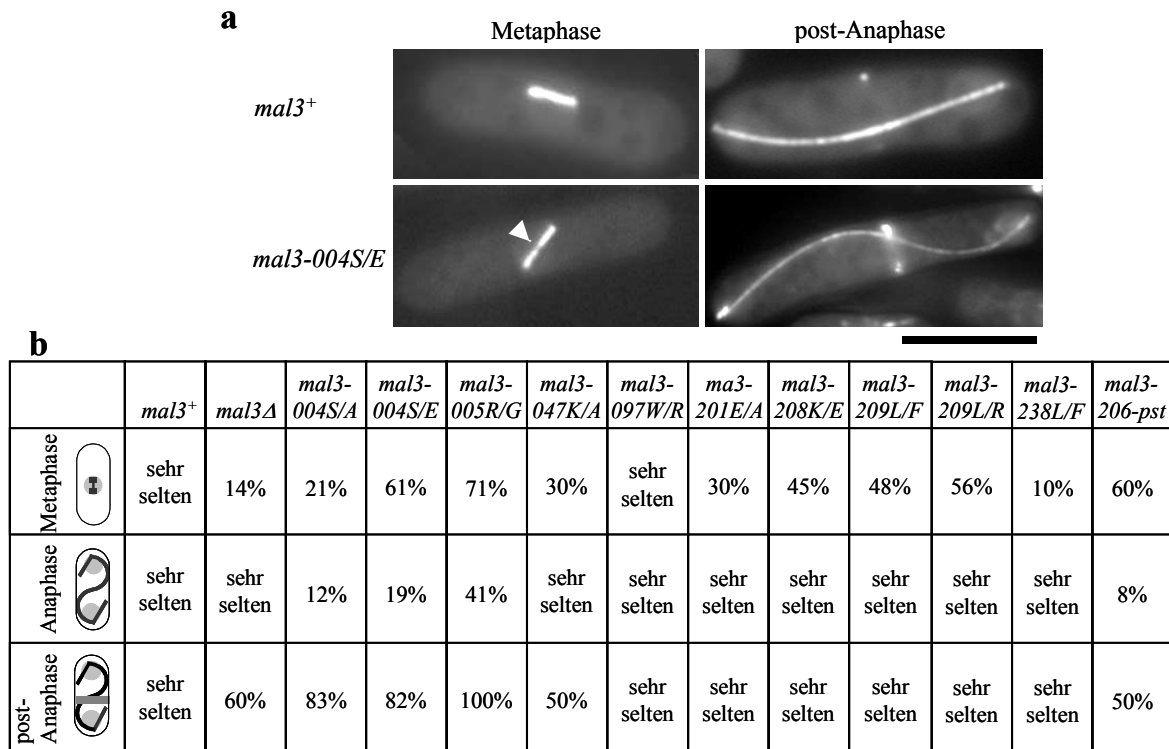


Abb.5-14: Aberrationen der mitotischen Spindel in den *mal3*-Mutanten-Stämmen.

a: Beispiele für Spindel-Aberrationen von *mal3*-Mutanten. Bei 24°C logarithmisch wachsende Zellen von *mal3*-Mutanten-Stämmen sowie eines Wildtyp Stammes, die ein mit GFP fusioniertes α -Tubulin exprimieren wurden mittels Lebend-Fluoreszenz-Mikroskopie untersucht (Kap.4.13.3). Repräsentative Spindel-Aberrationen wurden fotografiert. Der Pfeil im linken unteren Bild markiert die dünne Mittelzone der Metaphasen Spindel von *mal3-004S/E*. Der Balken entspricht 4 μ m.

b: Quantifizierung der in **a** dargestellten Phänotypen. Dafür wurden die Zellen fixiert und mittels Immunofluoreszenz-Mikroskopie untersucht (Kap.4.13). Tubulin wurde mit Antikörpern und Chromatin mittels DAPI angefärbt. Es wurden mindestens 80 Zellen, die in der Mitose waren für jeden *mal3*-Mutanten-Stamm, sowie für einen *S. pombe* Wildtyp und *mal3Δ::ura4⁺* Stamm analysiert. Für jeden beobachteten Phänotyp wurde der prozentuale Anteil bezogen auf die jeweilige mitotische Phase berechnet und aufgeführt. Die erhaltenen Werte sind als Anstieg im Vergleich zum Wildtyp angegeben.

bzw. fünffach stärkeren Anstieg von Metaphase Spindeln mit dünner Mittelzone als beim *mal3Δ*-Stamm (Abb.5-14b). Die Stämme *mal3-004S/A* und *mal3-047K/A* weisen mit dem *mal3Δ* Stamm vergleichbare Frequenzen auf, während *mal3-097W/R* sich nicht vom Wildtyp unterscheidet (Abb.5-14b). Bei den EB1-Domänen-Mutanten-Stämmen *mal3-208K/E*, *mal3-209L/F*, *mal3-209L/R* und der C-terminal verkürzten Variante *mal3-206-pst* nimmt der Anteil der Population von Metaphase-Spindeln mit dünner Mittelzone mit 45% bis 60% stärker zu als beim *mal3Δ* Stamm (Abb.5-14b). Die Stämme *mal3-201E/A* und *mal3-238L/F* weisen mit dem *mal3Δ*-Stamm vergleichbare Werte auf (Abb.5-14b). Also treten bei *mal3Δ* sowie CH-Domänen-Mutanten (mit Ausnahme von *mal3-097W/R*) und EB1-Domänen-Mutanten Probleme beim Aufbau einer bipolaren Metaphase-Spindel auf. Dies bedeutet, dass diese spezifischen Aminosäuren der CH- und EB1-Domänen, mit Ausnahme von Tryptophan 097, für den korrekten Aufbau der bipolaren Metaphase-Spindel wichtig sind. Die Tatsache, dass *mal3-004S/E*, *mal3-005R/G*, *mal3-208K/E*, *mal3-209L/F*, *mal3-209L/R* und *mal3-206-pst*

diesen Phänotyp häufiger als *mal3Δ* aufweisen bedeutet, dass diese Mal3-Varianten noch eine Funktion ausüben müssen, die sich zusätzlich negativ auswirkt. Obwohl *mal3Δ* Zellen und die *mal3*-Mutanten Probleme beim Aufbau der bipolaren Metaphase-Spindel haben, kommt es zu keinem signifikanten Anstieg von Chromosomenfehlsegregation (Daten nicht gezeigt). D.h., dass die weitere Mitose weitgehend wildtypisch durchlaufen wird.

Nach der Metaphase wird die Anaphase eingeleitet. Dabei elongiert die Spindel, so dass die beiden SPKs jeweils mit einer Hälfte der zu separierenden DNA zu den beiden gegenüberliegenden Zellpolen separiert werden (Übersichtsartikel: Hagan 1998). Wenn die SPKs und die zu separierende DNA die Zellpole erreichen, ist die Anaphase beendet. Während der folgenden post-Anaphase wird in der Zellmitte die Post-Anaphase-Mikrotubuli-Anordnung ausgebildet und die Spindel abgebaut (Hagan und Hyams 1988). Bei Wildtyp-Zellen kann es am Ende der Anaphase und während der post-Anaphase für einen kurzen Zeitraum zu einem Durchbiegen der Spindel kommen (Abb.5-14a *mal3*⁺). Dies geschieht vermutlich, weil die Elongation der Spindel nicht gestoppt wird und der Abbau der Spindel noch nicht stattfindet. Sehr selten können dabei in extremen Fällen S-förmige Spindeln in Wildtyp Zellen beobachtet werden (Abb.5-14a *mal3-004S/E* und Abb.5-14b), direkt bevor die Spindel abgebaut wird. Daraus kann geschlossen werden, dass S-förmige Spindeln auf ein Problem beim Abbau der Spindel hindeuten. Bei *mal3Δ* Zellen steigt der Anteil von S-förmig gekrümmten post-Anaphase Spindeln im Vergleich zu Wildtyp Zellen um 60% an (Abb.5-14b). Also treten bei *mal3Δ* Zellen Probleme beim korrekten Abbau der Spindel auf. Bei den CH-Domänen-Mutanten-Stämmen *mal3-004S/A*, *mal3-004S/E* und *mal3-005R/G* steigt die Population von S-förmig gekrümmten post-Anaphase Spindeln noch stärker an als bei *mal3Δ* Zellen (Abb.5-14b). Bei *mal3-005R/G* ist sogar jede untersuchte post-Anaphase Spindel S-förmig. Außerdem treten bei diesen Stämmen mit einem Anstieg von 12% bis 41% auch bereits während der späten Anaphase mehr S-förmige Spindeln auf als in Wildtyp und *mal3Δ* Zellen (Abb.5-14b). Der Anstieg von S-förmigen post-Anaphase-Spindeln bei *mal3-047K/A* ist mit 50% vergleichbar zu dem bei *mal3Δ* Zellen beobachteten Anstieg. Der Stamm *mal3-097W/R* unterscheidet sich nicht vom Wildtyp. Daraus folgt der Schluss, dass auch bei den CH-Domänen-Mutanten-Stämmen mit Ausnahme von *mal3-097W/R* Probleme beim Abbau der Spindel auftreten. Im Gegensatz hierzu weisen die EB1-Domänen-Mutanten-Stämme keine Probleme beim Abbau der Spindel auf, da bei keinem dieser Stämme ein Anstieg in der Population von S-förmigen Spindeln detektiert werden kann (Abb.5-14b). Der *mal3-206-pst* Mutanten-Stamm wiederum weist mit 50% einen zum *mal3Δ* Stamm vergleichbaren Anstieg von S-förmigen post-Anaphase Spindeln auf (Abb.5-14b). Außerdem kommt es auch zu

einem leichten Anstieg von S-förmigen Anaphase Spindeln (Abb.5-14b). Alle Mutanten-Stämme (*mal3-004S/A*, *mal3-004S/E*, *mal3-005R/G*, *mal3-047K/E* und *mal3-206-pst*), die häufiger S-förmige Anaphase und post-Anaphase Spindeln aufweisen als der Wildtyp, exprimieren Mal3-Varianten, deren Assoziation mit Mikrotubuli reduziert ist. Daher liegt der Schluss nahe, dass die Reduktion von Mal3 an Mikrotubuli oder die komplette Abwesenheit von Mal3 während der Mitose zu Problemen beim Abbau der Spindel führt. Deshalb kommt es bei solchen Mutanten zu einer Anreicherung von S-förmigen post-Anaphase-Spindeln. Dies kann entweder dadurch bedingt sein, dass der Mechanismus, durch den die mitotische Spindel abgebaut wird, nicht korrekt funktioniert, oder dass ein Signal, welches den Abbau der Spindel einleitet, nicht mehr interpretiert werden kann. Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass Zellen, die *Mal3-004S/A*, *Mal3-004S/E* oder *Mal3-005R/G* exprimieren, eine höhere Frequenz dieses Phänotyps aufweisen als Zellen, bei denen Mal3 komplett abwesend ist. Das bedeutet, dass diese Varianten noch eine Funktion ausüben, die sich zusätzlich negativ auf den Abbau der Spindel auswirkt.

5.1.3.4 Der Spindel-Kontrollpunkt ist in *mal3-004S/E* aktiviert

Der *mal3Δ*-Stamm und die *mal3*-Mutanten-Stämme weisen Probleme beim Aufbau der bipolaren Spindel auf, zeigen jedoch keine signifikant erhöhte Chromosomenfehlverteilung. Dies bedeutet, dass die korrekte bipolare Verknüpfung von Kinetochoren mit Kinetochor-Mikrotubuli noch erfolgt, so dass die DNA korrekt auf die beiden Tochter-Zellen aufgeteilt werden kann. Bei diesem Prozeß spielt der Spindel-Kontrollpunkt eine wichtige Rolle, dadurch, dass er die korrekte bipolare Verknüpfung von Kinetochoren mit Kinetochor-Mikrotubuli sicherstellt (Übersichtsartikel: Pinsky und Biggins 2005; Übersichtsartikel: Tan, Rida et al. 2005). Beim *mal3Δ*-Stamm ist der Spindel-Kontrollpunkt aktiviert (Asakawa, Toya et al. 2005). Deshalb stellte sich die Frage, ob dies auch bei den *mal3*-Mutanten der Fall ist. Hierfür wurde bei *mal3-004S/E* überprüft, ob der Spindel-Kontrollpunkt aktiviert ist. Dazu wurde *mal3-004S/E* mittels Kreuzung in einen *S. pombe* Stamm eingebracht, bei dem die Spindel-Kontrollpunkt Komponente *mph1⁺* (He, Jones et al. 1998) deletiert ist (*mph1Δ::ura4⁺*). Anschließend wurde das Wachstum von *mph1Δ/ mal3-004S/E* Doppelmutanten mit dem Wachstum der entsprechenden Einzelmутanten und dem Wachstum einer *mph1Δ/ mal3Δ* Doppelmutante verglichen. Dabei weist *mal3-004S/E* analog zu den übrigen bisher analysierten Phänotypen eine stärkere genetische Interaktion mit dem Spindel-Kontrollpunkt als *mal3Δ* auf. So ist das Wachstum von *mph1Δ/ mal3-004S/E* stärker reduziert als das Wachstum von *mph1Δ/ mal3Δ* (Daten nicht gezeigt). Um zu überprüfen, wie das

reduzierte Wachstum hervorgerufen wird, wurde untersucht, ob bei *mph1Δ/ mal3-004S/E* mehr DNA-Fehlverteilung auftritt als bei *mph1Δ/ mal3Δ* Doppelmutanten und den entsprechenden Einzelmутanten. Dabei zeigte sich, dass bei allen Mutanten bei 36°C mehr DNA-Fehlverteilung (Abb.5-15a) auftritt als bei 24°C, und dass bei beiden Doppelmutanten deutlich mehr DNA-Fehlverteilung im Vergleich zu den Einzelmутanten auftritt (Abb.5-15b). Daraus kann geschlossen werden, dass der Spindel-Kontrollpunkt bei den *mal3*-Mutanten aktiviert ist und verhindert, dass es zu massiver DNA-Fehlverteilung kommt. Bei *mph1Δ/ mal3-004S/E* tritt außerdem mehr DNA-Fehlverteilung auf als bei *mph1Δ/ mal3Δ* Doppelmutanten (Abb.5-15b). Der Spindel-Kontrollpunkt ist also für die Überlebensfähigkeit von *mal3-004S/E* essentieller als für *mal3Δ*.

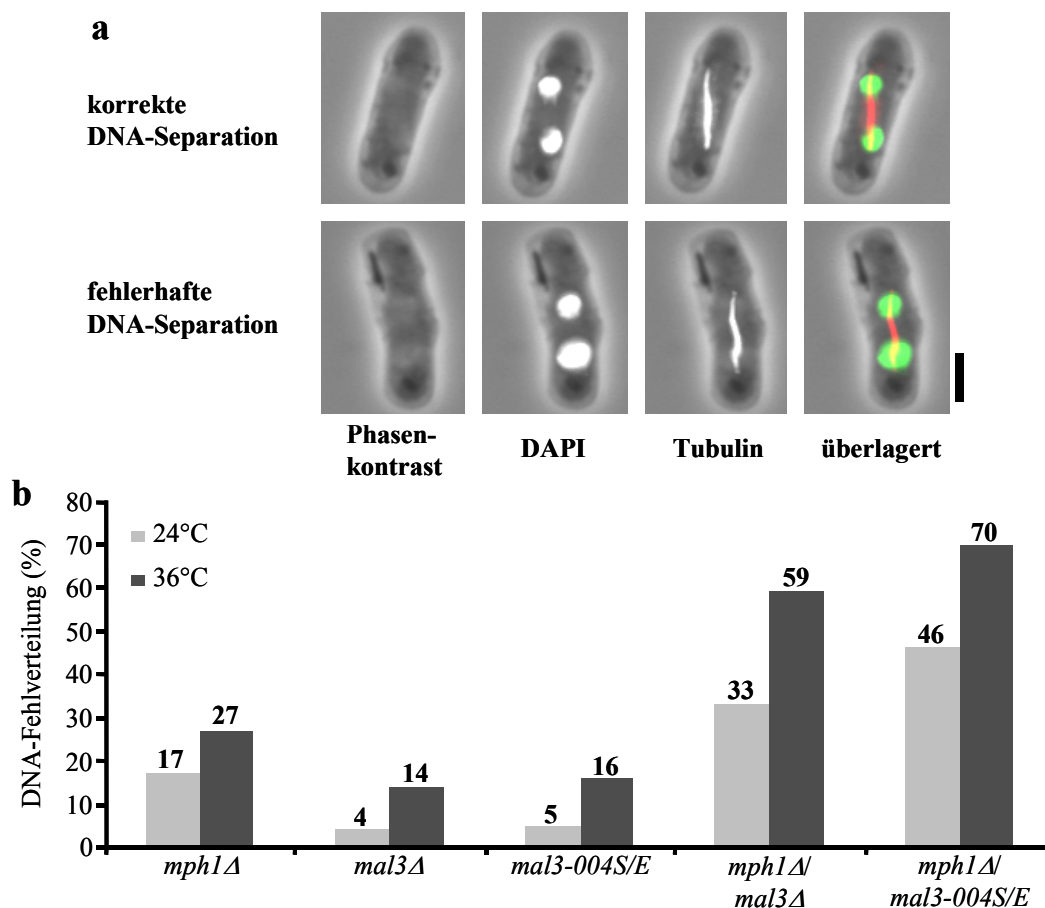


Abb.5-15: Der Spindel-Kontrollpunkt ist in *mal3-004S/E* aktiviert.

a: Beispiele für korrekte und fehlerhafte DNA-Separation während der Anaphase von *mal3Δ* Zellen. Die Zellen wurden mittels Immunofluoreszenz-Mikroskopie (Kap.4.13) untersucht. Die Anaphase-Spindel wurde mittels eines monoklonalen anti- α -Tubulin Antikörpers, DNA mittels DAPI nachgewiesen. Der Balken entspricht 3 μ m.

b: Quantifizierung der DNA-Fehlverteilung. Dafür wurden die Zellen Ü/N bei 24°C inkubiert. Ein Teil wurde dann für sechs Stunden bei 36°C inkubiert, während der Rest bei 24°C weiter inkubiert wurde. Anschließend wurden die Zellen fixiert und mittels Immunofluoreszenz-Mikroskopie (Kap.4.13) untersucht. Es wurden mindestens 50 Zellen, die in der Mitose waren für jeden Stamm analysiert. Der prozentuale Anteil von Anaphase, post-Anaphase und septierten Zellen mit ungleich separierter DNA wurde berechnet und graphisch dargestellt.

5.1.3.5 Die TBZ-Hypersensitivität von *mal3*-Mutanten kann durch *spc7*⁺, und *pic1*⁺, unterschiedlich gut supprimiert werden

Bei Pic1 handelt es sich um das *S. pombe* Homolog zum humanen Kinetochor-Protein INCENP (Cooke, Heck et al. 1987; Levenson, Huang et al. 2002). Spc7 ist ein konstitutives Kinetochor-Protein (Kerres, Vietmeier-Decker et al. 2004; Liu, McLeod et al. 2005). In einer von Dr. Corina Vietmeier-Decker durchgeführten Untersuchung wurden der *pic1*⁺ ORF sowie ein DNA-Fragment, welches für den C-Terminus des *spc7*⁺ ORFs kodierte, als extragene-Multikopien-Suppressoren der TBZ-Hypersensitivität des *mal3-1*-Mutanten-Stammes identifiziert (Vietmeier-Decker 2004). Das *spc7*-DNA-Fragment kodierte dabei für 50% des *spc7*⁺ ORFs. Auch der Volllängen *spc7*⁺ ORF suppressierte die TBZ-Hypersensitivität des *mal3-1* Stamms (Kerres, Vietmeier-Decker et al. 2004). Dies ließ den Schluß zu, dass diese Proteine eine gemeinsame Funktion mit Mal3 in der Mitose haben (Vietmeier-Decker 2004). Dabei war nicht bekannt, ob die Suppression durch diese Proteine spezifisch für CH-Mal3-Varianten, EB1-Mal3-Varianten oder sogar für spezifische Mal3-Varianten ist. Deshalb

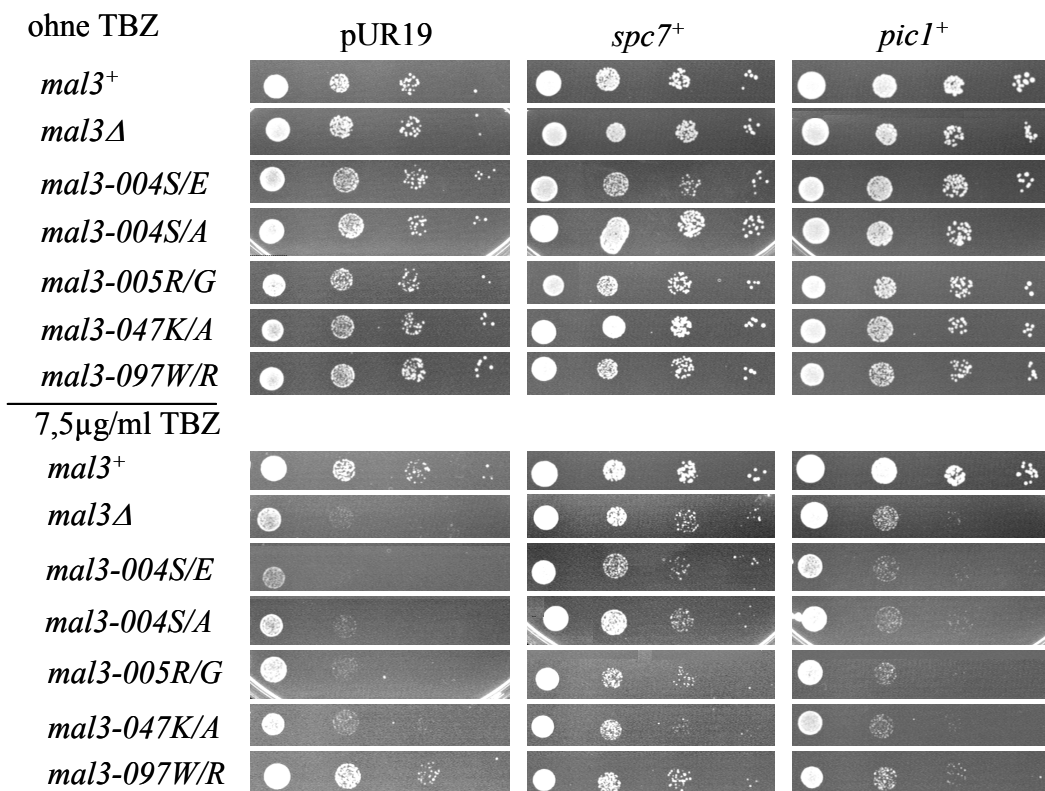


Abb.5-16: Suppression der TBZ-Hypersensitivität von CH-Domänen-Mutanten.

Ein Wildtyp *S. pombe* Stamm, sowie der *mal3Δ::his3*⁺ und CH-Domänen-Mutanten wurden mit Plasmiden, welche genomische *S. pombe* DNA-Fragmente entweder mit dem verkürzten *spc7* ORF (P336) oder dem *pic1*⁺ ORF (P351) enthielten, transformiert. Logarithmisch wachsende Zellen wurden anschließend auf Selektiv-Medium mit oder ohne 7,5 µg/ ml TBZ für sechs Tage bei 24 °C inkubiert (Kap.4.7.2).

wurde ausgetestet, ob die Suppression der TBZ-Hypersensitivität von *mal3*-Mutanten durch *pic1*⁺ oder den verkürzten *spc7* ORF Allel spezifisch ist. Dazu wurde bei allen *mal3*-Mutanten das Wachstum in der Gegenwart von TBZ überprüft, wobei die untersuchten Zellen zusätzliches *pic1*⁺ oder verkürztes *spc7* exprimierten.

Sowohl bei *CH-Domänen*-Mutanten als auch bei *EB1-Domänen*-Mutanten supprimiert der verkürzte *spc7* ORF die TBZ-Hypersensitivität der jeweiligen Mutante (Abb.5-16 und Abb.5-17). Dabei werden Mutationen, die zu einer starken TBZ-Hypersensitivität führen, im Vergleich zu Mutationen, die eine schwächere TBZ-Hypersensitivität hervorrufen, schlechter supprimiert. Der Mutantenstamm *mal3-047K/A* wird allerdings im Vergleich zu *mal3-004S/E*, *mal3-004S/A* und *mal3-005R/G*, die eigentlich sensitiver gegenüber TBZ sind, schlechter supprimiert (Abb.5-16). Folglich muss sich *Mal3-047K/A* in seinen Eigenschaften zumindest in einem Aspekt von den übrigen *Mal3*-Varianten unterscheiden, auch wenn in der bisherigen Phänotypisierung keine Besonderheiten auffällig waren.

Die Suppression durch *pic1*⁺ ist bei allen Mutanten gleichmäßig schwächer im Vergleich zum

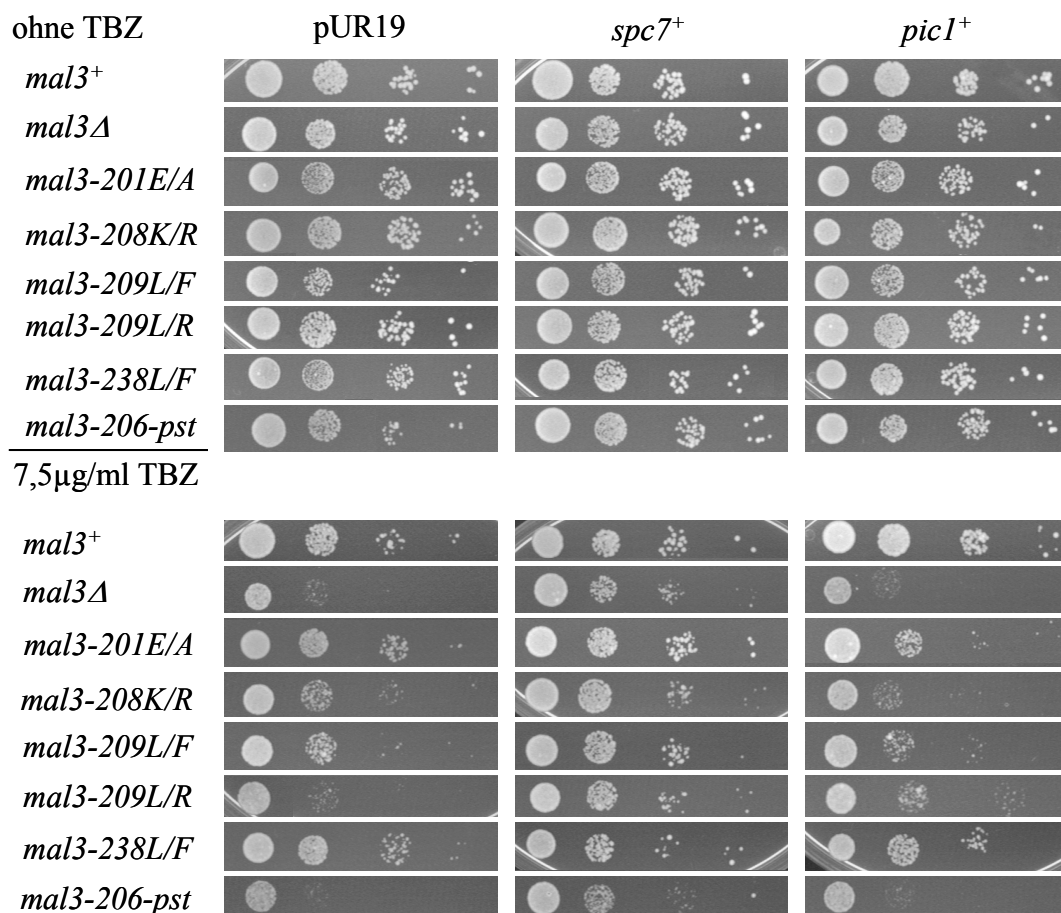


Abb.5-17: Suppression der TBZ-Hypersensitivität von *EB1-Domänen*-Mutanten.

Ein Wildtyp *S. pombe* Stamm, sowie der *mal3Δ::his3*⁺ und *EB1-Domänen*-Mutanten wurden mit Plasmiden, welche genomische *S. pombe* DNA-Fragmente entweder mit dem verkürzten *spc7* ORF (P336) oder dem *pic1*⁺ ORF (P351) enthielten, transformiert. Logarithmisch wachsende Zellen wurden anschließend auf Selektiv-Medium mit oder ohne 7,5 µg/ ml TBZ für sechs Tage bei 24 °C inkubiert (Kap.4.7.2).

verkürzten *spc7* ORF (Abb.5-16 und Abb.5-17). Auch hier ist die Suppression von der TBZ-Hypersensitivität des jeweiligen Stammes abhängig. Mutationen, die generell zu einer stärkeren TBZ-Hypersensitivität führen, werden schlechter supprimiert als Mutationen, die zu einer schwächeren TBZ-Hypersensitivität führen.

5.1.3.6 Mal3 wird für die korrekte Gruppierung von Spc7, jedoch nicht für die Gruppierung von Nuf2 und Mal2 am SPK benötigt

Zellen, die ein defektes Mal3 exprimieren, sind hypersensitiv gegenüber TBZ und bilden aberrante mitotische Spindeln aus. Es ist bekannt, dass die TBZ-Hypersensitivität von *mal3*-Mutanten durch Überexpression von *spc7*⁺ supprimiert werden kann (Kerres, 2004 und Kap.5.1.3.5). Spc7 ist am äußeren Kinetochor mit den Ndc80- und MIND-Komplexen von Kinetochor-Proteinen assoziiert und spielt wahrscheinlich eine Rolle bei der Interaktion zwischen Kinetochor und mitotischer Spindel (Kerres, Vietmeier-Decker et al. 2004; Liu, McLeod et al. 2005). Auch Mal3 spielt hierbei eine Rolle, und es ist bekannt, dass diese beiden Proteine co-immunopräzipitiert werden können (Kerres, Vietmeier-Decker et al. 2004). Aus diesem Grund wurde überprüft, ob Spc7 in Zellen, die ein defektes Mal3 exprimieren, noch korrekt lokalisiert ist. Zu diesem Zweck wurde ein *spc7*⁺-GFP Fusions-ORF in eine Auswahl von *mal3*-Mutanten-Stämmen sowie einen *mal3Δ* Stamm mittels Kreuzung eingebracht.

S. pombe hat drei Chromosomen, von denen jedes einen eigenen Kinetochor-Komplex aufweist. In Wildtyp Zellen liegen diese drei Kinetochor-Komplexe über den gesamten Zellzyklus, mit Ausnahme der Metaphase, gruppiert am Spindelpolkörper (SPK) vor (Uzawa und Yanagida 1992). Folglich kann für Spc7-GFP sowohl in lebenden Wildtyp Zellen wie auch in fixierten Zellen ein einzelnes punktförmiges Signal an der Kernhülle detektiert werden (Kerres, Vietmeier-Decker et al. 2004 und Abb.5-18a). In *mal3Δ* Zellen und den analysierten *mal3*-Mutanten hingegen ist die Gruppierung von Spc7 am SPK in der Interphase gestört. So können in fixierten Zellen statt einem Spc7-GFP Signal zwei Signale detektiert werden, von denen eines schwächer als das andere ist (Abb.5-18a). Das stärkere Signal kolokalisiert dabei mit dem SPK in *mal3Δ* Zellen (Kerres, Vietmeier-Decker et al. 2004). Dabei weisen bei *mal3-004S/E* 14% der Interphase-Zellen mehr als ein Spc7-GFP Signal pro Zellkern auf, im Gegensatz zu 7,5% bei *mal3Δ* (Abb.5-18b). Die Interphase-Zellen der Stämme *mal3-004S/A* und *mal3-209L/R* weisen mit 7% bzw. 4% vergleichbare bzw. niedrigere Frequenzen als *mal3Δ* auf.

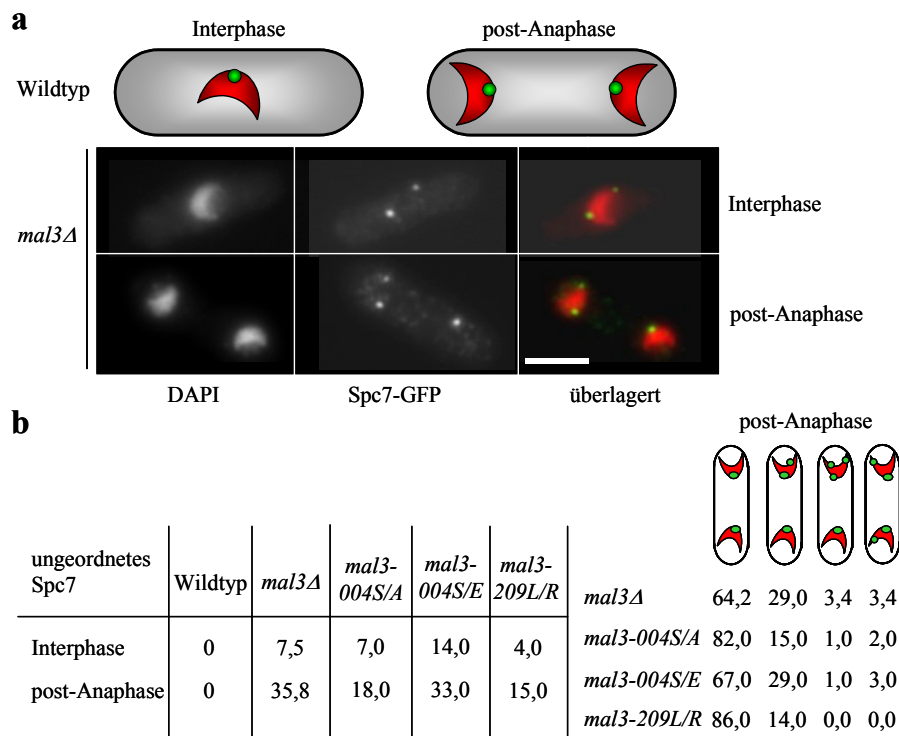


Abb.5-18: Die Gruppierung von Spc7 am SPK ist defekt in *mal3*-Mutanten.

a: Lokalisierung von Spc7-GFP in Wildtyp und *mal3Δ* Zellen mittels Immunofluoreszenz-Mikroskopie (Kap.4.13). Die Lokalisierung von Spc7 in Wildtyp Zellen ist schematisch dargestellt. Grün: Spc7, rot: DNA. Spc7-GFP wurde mittels eines polyklonalen anti-GFP Antikörpers, DNA mittels DAPI angefärbt. Der weiße Balken entspricht 3µm Länge.

b: Quantifizierung der Spc7-GFP Lokalisierung in *mal3*-Mutanten. Um die Gruppierungsdefekte in den verschiedenen *mal3*-Mutanten zu quantifizieren, wurden mindestens 100 Interphasen und 100 post-Anaphase Zellen analysiert und jeweils der prozentuale Anteil von Zellen mit falsch gruppiertem Spc7 berechnet.

In wildtypischen post-Anaphase Zellen werden beim Wildtyp zwei Spc7-GFP Signale detektiert, jeweils ein Signal pro separierender bzw. separierter DNA, das mit dem SPK kolokalisiert (Kerres, Vietmeier-Decker et al. 2004 und Abb.5-18a). Dahingegen treten bei fixierten *mal3Δ* und *mal3-004S/E* Zellen bei mehr als 33% zwei oder mehr Spc7-GFP Signale pro Zellkern auf (Abb.5-18b). Bei *mal3-004S/A* und *mal3-209L/R* weisen 18% bzw. 15% der post-Anaphase Zellen mehr als ein Spc7-GFP Signal pro Zellkern auf. Also führen ein defektes Mal3 und Abwesenheit von Mal3 zu einer gestörten Gruppierung von Spc7 am SPK in fixierten Interphase und post-Anaphase Zellen. Mal3 wird jedoch nicht generell für die Gruppierung von Kinetochor-Proteinen mit dem SPK benötigt, da Nuf2 (Nabetani, Koujin et al. 2001) und Mal2 (Fleig, Sen-Gupta et al. 1996; Jin, Pidoux et al. 2002) zwei weitere konstitutive Kinetochor-Proteine wildtypisch in den *mal3*-Mutanten mit den SPK's kolokalisieren (Daten nicht gezeigt).

In lebenden Zellen kann allerdings kein negativer Effekt auf die Gruppierung von Spc7 am SPK in *mal3Δ* Zellen und den *mal3*-Mutanten beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Die Fehllokalisierung von Spc7 wird also wahrscheinlich durch die Fixierung unterstützt. Da jedoch die Gruppierung von Nuf2 und Mal2 nicht durch die Fixierung verändert wird, handelt

es sich hierbei um einen für Spc7 spezifischen Effekt. Bei defektem Mal3 ist vermutlich die Gruppierung am SPK entweder durch eine geschwächte Assoziation von Spc7 mit dem Kinetochor oder mit dem SPK (insbesondere bei post-Anaphase Zellen) gestört. So können bei der Fixierung auftretende osmotische Kräfte Spc7 bei Zellen mit defektem Mal3 delokalisieren, weshalb Spc7 in fixierten Zellen nicht mehr komplett am SPK gruppiert ist.

Mal3 wird also für die stabile Gruppierung von Spc7 am SPK benötigt. Deshalb stellte sich die Frage, ob dies durch eine fehlende Assoziation von Spc7 mit Mal3 zustande kommt. Deshalb wurden Co-Immunopräzipitationen von Spc7 mit Mal3-004S/A, Mal3-004S/E, Mal3-005R/G, Mal3-208K/E und Mal3-209L/R durchgeführt (Kap.4.14.2). Dabei zeigte sich, dass alle getesteten Mal3-Varianten und Spc7 co-immunopräzipitiert werden können (Abb.5-19). Die Co-Immunopräzipitation von Spc7 mit den übrigen Mal3-Varianten wurde nicht getestet. Spc7 assoziiert also sowohl mit CH-Mal3-Varianten als auch mit EB1-Mal3-Varianten. Es kann also keiner der hier getesteten mutierten Aminosäuren in diesen beiden Domänen eine spezifische Funktion bei der Assoziation von Mal3 mit Spc7 zugeordnet werden und die Assoziation von Mal3 mit Mikrotubuli ist nicht essentiell für die Assoziation mit Spc7.

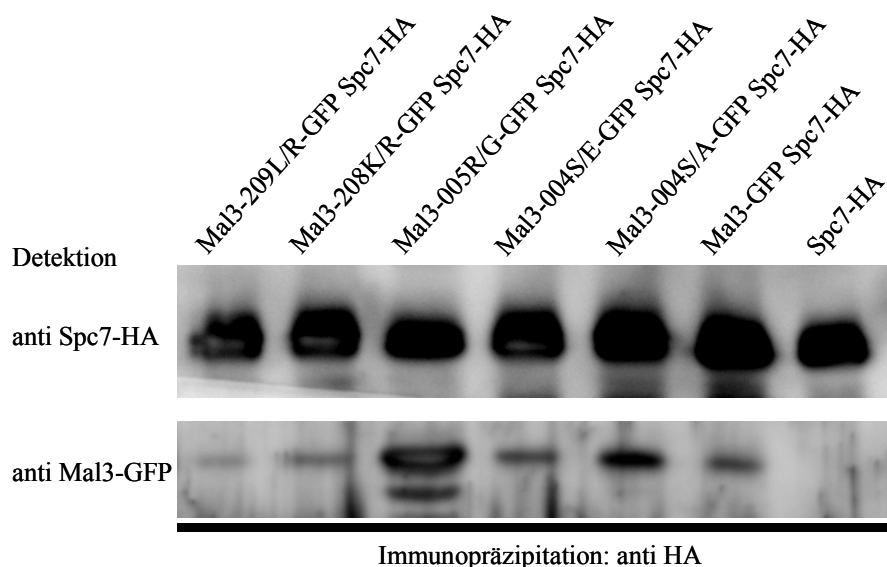


Abb.5-19: Alle untersuchten Mal3-Varianten assoziieren mit Spc7.

Es wurden Co-Immunopräzipitationen von Spc7-HA und GFP markierten Mal3-Varianten durchgeführt (Kap.4.14.2). Dabei wurde mit Anti-HA Mikrokügelchen immunopräzipitiert. SDS-Gelelektrophorese und Western-Blotting erfolgten wie in Kap.4.14 beschrieben. Da Spc7-HA 98 kDa und Mal3-GFP 69 kDa groß ist, wurde die Membran nach Blockierung mittig zwischen der 96 kDa und der 68 kDa Bande des Größenstandards durchgeschnitten. Die erhaltenen Membran-Fragmente wurden dann mit dem jeweils benötigten anti-HA bzw. anti-GFP Antikörper inkubiert. Als Zweitantikörper wurden Peroxidasekonjugate verwendet (Kap.4.14.3.4). Die Detektion erfolgte mit Hilfe des ECL-Kits im LAS-1000 Spektrometer (Kap.4.14.3.4).

5.1.4 Die verschiedenen Mal3-Varianten haben unterschiedlich stark ausgeprägte Effekte auf die Integrität des Interphasen-Mikrotubuli-Zytoskeletts und das polare Wachstum von *S. pombe*

5.1.4.1 Die Zellform von *S. pombe* wird durch die Mal3-Varianten negativ beeinflusst

S. pombe Zellen wachsen polar an ihren beiden Zellenden. Das Interphasen-Mikrotubuli-Zytoskelett spielt eine essentielle Rolle bei der Beibehaltung der zylindrischen Zellform und aberrante Interphasen-Mikrotubuli führen zu gekrümmten und verzweigten Zellformen (Übersichtsartikel: Hayles und Nurse 2001; Sawin und Snaith 2004). Die Mikrotubuli eines *mal3Δ* Stammes sind extrem verkürzt (Beinhauer, Hagan et al. 1997). Folglich sind *mal3Δ* Zellen gekrümmt und/ oder verzweigt (Abb.5-20a). Aus diesem Grund wurde bei allen *mal3*-Mutanten-Stämmen zunächst überprüft, ob sie ebenfalls eine aberrante Zellform aufweisen. Während der Wildtyp-Stamm keine Aberrationen der Zellform aufweist, sind beim *mal3Δ::his3⁺* Stamm 42,7% der Zellen gebogen oder verzweigt (Abb.5-20b). Die *mal3*-Mutanten weisen ebenfalls aberrante Zellformen auf, wobei bei den Stämmen *mal3-004S/E*

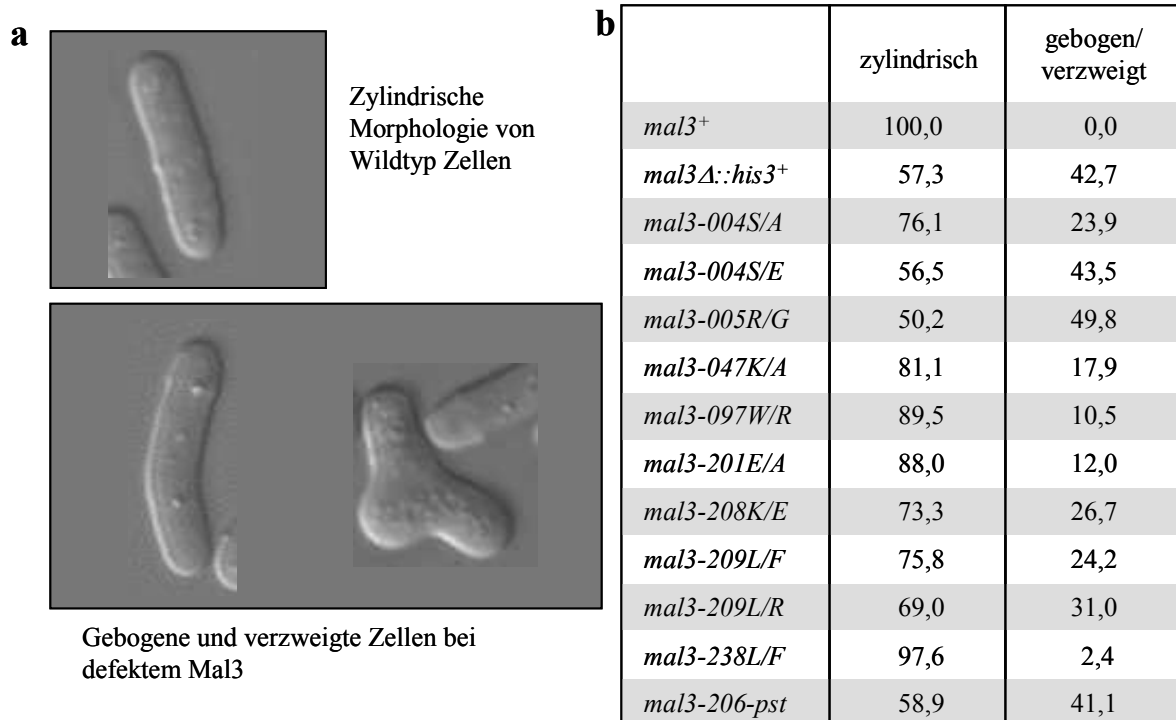


Abb.5-20: Aberrante Zellformen von *mal3*-Mutanten.

a: Zellen der *mal3*-Mutanten-Stämme wurden Ü/N bei 30°C auf YE5S Platten inkubiert, erneut auf YE5S ausgestrichen und Ü/N bei 20°C inkubiert. Dann wurden die Zellen in dd H₂O resuspendiert und mikroskopisch untersucht.

b: Quantifizierung von **a**. Der prozentuale Anteil von gebogenen und verzweigten Zellen wurde bestimmt. Als Kontrollen wurden parallel ein *S. pombe* Wildtyp Stamm und der *mal3Δ::his3⁺* unter den selben Bedingungen analysiert.

und *mal3-005R/G* mit mehr als 43% häufiger aberrante Zellformen auftreten als bei *mal3Δ::his3⁺*. Diese beiden Varianten scheinen also wie in der Mitose ebenso in der Interphase neben ihrer Reduktion auf Mikrotubuli noch einen weiteren Effekt zu haben. Die drei übrigen CH-Mal3-Varianten haben mildere Effekte auf die Zellform. So sind bei *mal3-004S/A* und *mal3-047K/A* 23,9% bzw. 17,9% der Zellen gebogen oder verzweigt, während *mal3-097W/R* mit 10,5% aberranten Zellformen milde Effekte zeigt. Im Gegensatz hierzu zeigen die Mutanten-Stämme *mal3-208K/E*, *mal3-209L/F* bzw. *mal3-209L/R*, die EB1-Mal3-Varianten exprimieren, mit Werten zwischen 24,2% und 31% aberranten Zellformen zu *mal3-004S/A* vergleichbare Werte auf (Abb.5-20b). Vermutlich ist die Assoziation von Mal3-004S/A und Mal3-047K/A mit Mikrotubuli noch ausreichend, um weitgehend normales polares Wachstum und damit eine zylindrische Zellform zu gewährleisten. Bei Mal3-208K/E, Mal3-209L/F und Mal3-209L/R, die nicht an Mikrotubuli reduziert sind, muss eine andere Funktion von Mal3 gestört sein, so dass es zu aberranten Zellformen kommt. Bei *mal3-201E/A* und *mal3-238L/F* sind nur sehr wenige Zellen gebogen oder verzweigt (Abb.5-20b). Währenddessen ist die Frequenz aberranter Zellformen bei Zellen, die die partielle Deletion *Mal3-206-pst* exprimieren, mit der von *mal3Δ::his3⁺* vergleichbar (Abb.5-20b). Zusammenfassend kann aufgrund dieser Daten geschlossen werden, dass eine Reduktion von Mal3-Varianten auf Interphasen-Mikrotubuli die Ausbildung von aberranten Zellformen bewirkt. Die Tatsache, dass auch EB1-Mal3-Varianten, die nicht auf Mikrotubuli reduziert sind, zu aberranten Zellformen führen bedeutet, dass bei diesen Varianten eine andere Funktion gestört sein muss, die für polares Wachstum benötigt wird. Daraus folgt, dass die Assoziation von Mal3 mit Mikrotubuli nicht gleichbedeutend mit einem funktionellen Mal3 Protein ist, sondern dass zusätzlich noch andere Funktionen von Mal3 für ein voll funktionelles Protein benötigt werden.

Als nächstes wurde überprüft, ob die aberrante Zellform bei den *mal3*-Mutanten-Stämmen durch Aberrationen des Interphasen-Mikrotubuli-Zytoskeletts zustande kommen.

5.1.4.2 Die aberrante Zellform von *mal3*-Mutanten korreliert mit Aberrationen des Interphasen-Mikrotubuli-Zytoskeletts

Das Interphasen-Mikrotubuli-Zytoskelett der *mal3*-Mutanten wurde mit dem Mikrotubuli-Zytoskelett eines Wildtyp Stammes und eines *mal3Δ::ura4⁺* Stammes verglichen. Dabei weisen die Zellen der Mutanten-Stämme entweder das Wildtyp Interphasen-Mikrotubuli-Zytoskelett (Abb.5-21a, die beiden oberen Zellen) oder einen von drei spezifischen Phänotypen auf. Die Zellen eines Mutanten-Stammes können bevorzugt einen speziellen

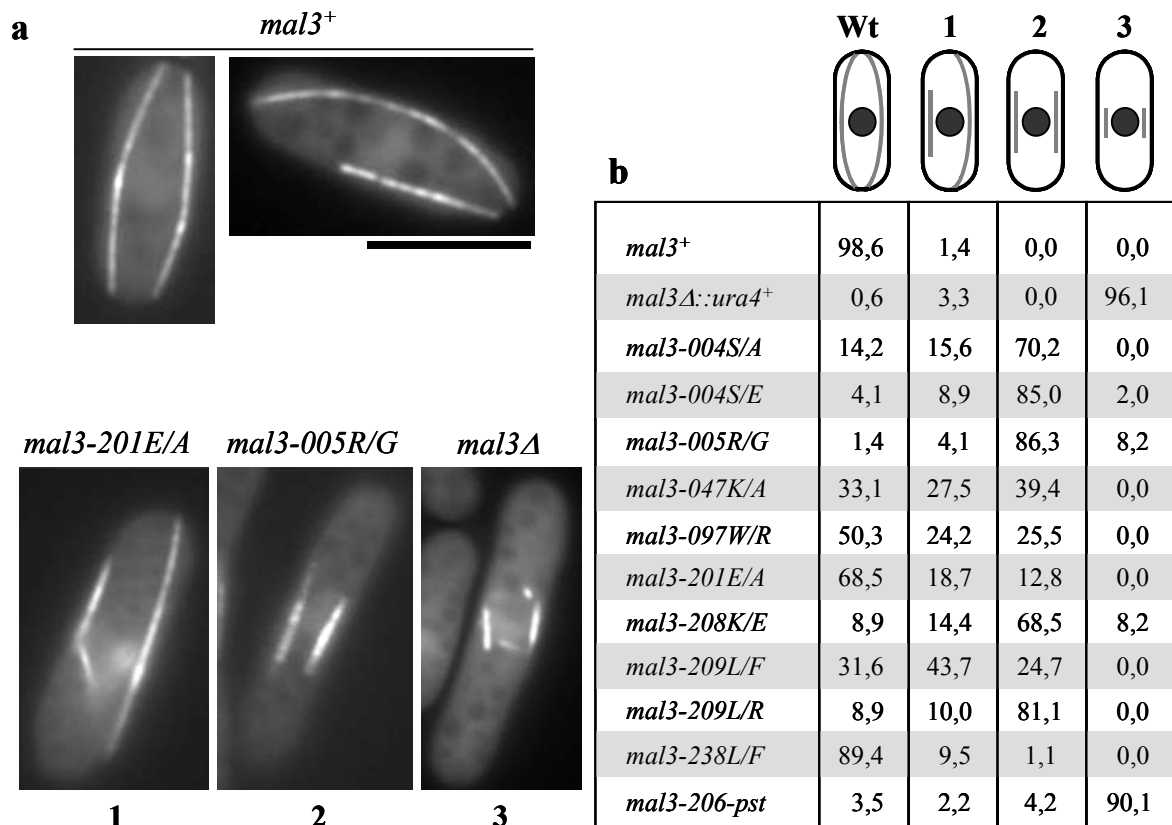


Abb.5-21: Aberrationen des Interphasen Mikrotubuli-Zytoskeletts in den *mal3*-Mutanten-Stämmen.

a: Beispiele für die drei gefundenen Interphasen-Mikrotubuli-Phänotypen im Vergleich zum Wildtyp Interphasen-Mikrotubuli-Zytoskelett. Bei 24°C logarithmisch wachsende Zellen von *mal3*-Mutanten-Stämmen sowie eines Wildtyp und des *mal3Δ::ura4⁺* Stammes, die ein mit GFP fusioniertes α -Tubulin exprimieren wurden mittels Fluoreszenz-Mikroskopie untersucht (Kap.4.13.3). 1: Interphasen-Mikrotubuli-Phänotyp 1, Zellen bei denen die meisten Interphasen-Mikrotubuli verkürzt sind, die jedoch gleichzeitig Interphasen-Mikrotubuli aufweisen, die die gesamte Zelle durchspannen, bzw. die Zellenden erreichen. 2: Interphasen-Mikrotubuli Phänotyp 2, Zellen bei denen die Interphasen-Mikrotubuli verkürzt sind, jedoch nicht so extrem wie bei *mal3Δ*. 3: Interphasen-Mikrotubuli Phänotyp 3, Zellen die extrem verkürzte Interphasen-Mikrotubuli aufweisen, wie bei *mal3Δ*.

b: Quantifizierung der in **a** dargestellten Phänotypen. Dafür wurden die Zellen fixiert und mittels Immunofluoreszenz-Mikroskopie untersucht (Kap.4.13). Tubulin wurde mit Antikörpern und Chromatin mittels DAPI angefärbt. Es wurden mindestens 200 Zellen für jeden *mal3*-Mutanten-Stamm sowie eines *S. pombe* Wildtyp und des *mal3::ura4⁺* Stammes analysiert. Für jeden beobachteten Phänotyp wurde der prozentuale Anteil bezogen auf die Gesamtzellzahl ermittelt. Die Schemata unter 1, 2 und 3 stellen die jeweils in **a** mit 1, 2 und 3 bezeichneten Phänotypen der *mal3*-Mutanten dar.

Phänotyp aufweisen, oder bei einem Mutanten-Stamm kommen mehrere Zell-Populationen vor, welche unterschiedliche Phänotypen aufweisen. Das Wildtyp Interphasen-Mikrotubuli-Zytoskelett durchspannt die gesamte Zelle, so dass die Mikrotubuli-Plus-Enden die Zell-Enden erreichen. Beim ersten der drei Interphasen-Mikrotubuli-Phänotypen sind die meisten Interphasen-Mikrotubuli einer Zelle verkürzt, jedoch weist die betroffene Zelle ebenfalls Interphasen-Mikrotubuli auf, die wie Wildtyp Interphasen-Mikrotubuli die Zelle durchspannen bzw. die Zellenden erreichen (Abb.5-21a untere linke Zelle). Dieser Phänotyp kommt auch bei Wildtyp Zellen mit geringer Frequenz vor (Abb.5-21b). Beim zweiten Phänotyp weisen die betroffenen Zellen Interphasen-Mikrotubuli auf, die zwar verkürzt sind, jedoch nicht so extrem wie im *mal3Δ* Stamm. Trotzdem erreichen diese Interphasen-

Mikrotubuli nicht die Zellenden (Abb.5-21a untere mittlere Zelle). Beim dritten Phänotyp sind die Interphasen-Mikrotubuli so extrem verkürzt wie im *mal3Δ* Stamm (Abb.5-21a untere rechte Zelle). Die Quantifizierung dieser Phänotypen erfolgte mit fixierten Zellen.

Interessant ist hierbei, dass die Mikrotubuli-Aberrationen mit den aberranten Zellformen (Kap.5.1.4.1) korrelieren. Bei *mal3*-Mutanten, deren Zellen hauptsächlich verkürzte Interphasen-Mikrotubuli aufweisen, ist die Frequenz, mit der aberrante Zellformen auftreten, am höchsten. So sind die Zellen von *mal3-004S/E* und *mal3-005R/G* am häufigsten gebogen oder verzweigt. Dabei weisen bei *mal3-004S/E* und *mal3-005R/G* über 85% der Zellen verkürzte Interphasen-Mikrotubuli (Phänotyp 2) auf (Abb.5-21b). Im Gegensatz hierzu weisen die Zellen von *mal3-097W/R*, *mal3-201E/A* und *mal3-238L/F* mit über 50% hauptsächlich Wildtyp Interphasen-Mikrotubuli auf. Passend dazu weisen die Zellen dieser Stämme auch weniger Zellen mit aberranten Zellformen auf. Bei *mal3-004S/A*, *mal3-208K/E* und *mal3-209L/R* weisen mit über 68% die meisten Zellen verkürzte Interphasen-Mikrotubuli auf (Abb.5-21b). Jedoch steigt bei diesen Stämmen der Anteil von Zellen, die zusätzlich Interphasen-Mikrotubuli aufweisen, welche die gesamte Zelle durchspannen (Phänotyp1). Folglich sind weniger Zellen dieser Mutanten-Stämme gebogen oder verzweigt. Bei den Mutantenstämmen *mal3-047K/A* und *mal3-209L/F* treten Zellen mit einem Wildtyp Interphasen-Mikrotubuli-Zytoskelett sowie den Interphasen-Mikrotubuli-Phänotypen zwei und drei im nahezu gleichen Verhältnis auf (Abb.5-21b).

Mal3-206-pst bindet stark reduziert an Interphasen-Mikrotubuli und ist so verkürzt, dass 70% der EB1-Domäne fehlen. Also sind hier die beiden zuvor beschriebenen Funktionen von Mal3 betroffen, die für die Integrität des Interphasen-Mikrotubuli-Zytoskeletts eine Rolle spielen. Passend dazu sind 90% der Interphasen-Mikrotubuli von *mal3-206-pst* so verkürzt wie in einem *mal3Δ* Stamm (Abb.5-21b) und aberrante Zellformen treten bei *mal3-206-pst* ebenso häufig wie bei *mal3Δ* auf (Kap.5.1.4.1).

Also weisen Zellen, die CH-Mal3-Varianten exprimieren, sowie Zellen, die EB1-Mal3-Varianten exprimieren, aberrante Interphasen-Mikrotubuli auf. Daraus folgt, dass nicht nur die Bindung bzw. die CH-Domäne von Mal3 für die Integrität des Interphasen-Mikrotubuli-Zytoskeletts benötigt wird, sondern auch eine andere durch die EB1-Domäne ausgeführte Funktion hierbei eine Rolle hat. Je nachdem wie stark die Bindung an Interphasen-Mikrotubuli bzw. die durch die EB1-Domäne ausgeführte Funktion beim jeweiligen Mutanten-Stamm beeinträchtigt ist, sind Interphasen-Mikrotubuli verkürzt. Dies führt zu unterschiedlich hohen Frequenzen von aberranten Zellformen bei den *mal3*-Mutanten.

5.1.4.3 Warum sind die Interphasen-Mikrotubuli in *mal3Δ* und *mal3*-Mutanten Zellen verkürzt?

Die *mal3*-Mutanten-Stämme weisen also unterschiedlich stark verkürzte Interphasen-Mikrotubuli auf. Aus diesem Grund stellte sich die Frage, wodurch diese Variationen bewirkt werden.

Die Mikrotubuli in *S. pombe* Zellen sind hoch dynamische Strukturen (Kap.3.2.3). Während der Interphase wachsen sie mit ihrem Plus-Ende für eine gewisse Zeitspanne auf die Zellenden zu. Am Zellende stoppt das Wachstum und nach kurzer Zeit schrumpfen die Interphasen-Mikrotubuli wieder zurück (Drummond und Cross 2000). Für *mal3Δ* Zellen konnte gezeigt werden, dass die verkürzten Interphasen-Mikrotubuli aufgrund einer verkürzten Wachstumszeit zustande kommen (Busch und Brunner 2004). Aus diesem Grund wurde bei einer Auswahl von *mal3*-Mutanten-Stämmen überprüft, ob bei diesen die Wachstumszeit von Interphasen-Mikrotubuli, je nachdem wie stark diese verkürzt sind, unterschiedlich stark im Vergleich zum Wildtyp verkürzt ist. Da sowohl Mutationen in der CH- wie auch in der EB1-Domäne zu verkürzten Interphasen-Mikrotubuli führen, wurden für diese Analyse sowohl Mutanten-Stämme mit Mutationen in der CH- als auch Mutanten-Stämme mit Mutationen in der EB1-Domäne ausgewählt. Die Wachstumszeit von Interphasen-Mikrotubuli wurde mittels Lebend-Fluoreszenz-Mikroskopie bestimmt (Kap.4.13.3). Abbildung 5-22a fasst die experimentelle Vorgehensweise zusammen.

Wildtyp Zellen weisen eine durchschnittliche Interphasen-Mikrotubuli-Wachstumszeit von 77,7 Sek. auf (Abb.5-22b). Die Wachstumszeiten von Interphasen-Mikrotubuli in *mal3-004S/E* und *mal3-005R/G*, die hauptsächlich verkürzte Interphasen-Mikrotubuli aufweisen, sind im Vergleich dazu drastisch verkürzt und gleichen mit durchschnittlich 13,8 bzw. 17,0 Sek. den Wachstumszeiten von *mal3Δ* (Abb.5-22b). Allerdings sind die Interphasen-Mikrotubuli in *mal3-004S/E* und *mal3-005R/G* länger als in *mal3Δ* Zellen. Die Interphasen-Mikrotubuli von *mal3-004S/A* und *mal3-209L/R*, welche einen geringeren Anteil an verkürzten Interphasen-Mikrotubuli aufweisen, wachsen mit 28,6 und 30,5 Sek. in etwa doppelt so lang wie die von *mal3-004S/E* und *mal3-005R/G* (Abb.5-22b). Dahingegen weisen die Interphasen-Mikrotubuli-Wachstumszeiten im Mutanten-Stamm *mal3-201E/A*, welcher hauptsächlich wildtypische Interphasen-Mikrotubuli aufweist, mit 47,5 Sek. in etwa 60% der Wachstumszeit von Wildtyp Interphasen-Mikrotubuli auf (Abb.5-22b).

Die ermittelten Interphasen-Mikrotubuli-Wachstumszeiten korrelieren mit den in fixierten Zellen beobachteten Interphasen-Mikrotubuli-Phänotypen. Je größer der Anteil an verkürzten

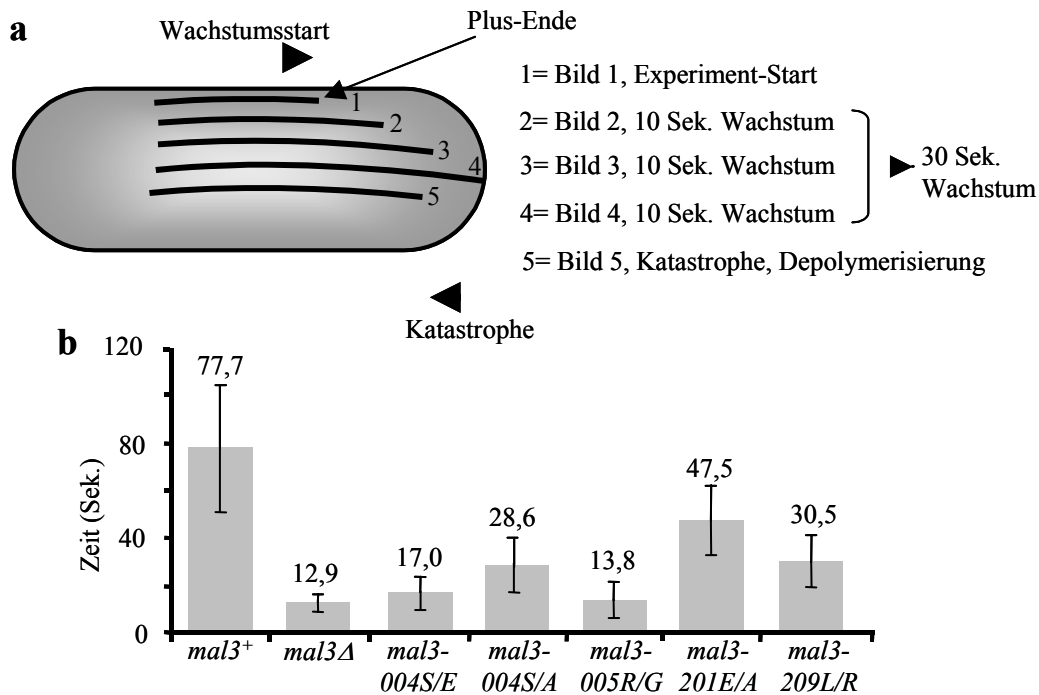


Abb.5-22: Interphasen-Mikrotubuli Wachstumszeiten in ausgewählten *mal3*-Mutanten-Stämmen.

a: Schematisierte Darstellung der experimentellen Durchführung (Kap.4.13.3). Bei 24°C logarithmisch wachsende Zellen von *mal3*-Mutanten-Stämmen sowie eines Wildtyp und des *mal3Δ::ura4⁺* Stammes, die ein mit GFP fusioniertes α -Tubulin exprimieren wurden mittels Lebend-Fluoreszenz-Mikroskopie untersucht. Dabei wurden von spezifischen Interphasen-Mikrotubuli über einen Zeitraum von 150 Sek. alle 10 Sek. Bilder gemacht. Anhand der Bilder konnte ermittelt werden wie lange die Interphasen-Mikrotubuli mit ihren Plus-Enden auf die Zellenden zu wuchsen. Es wurden nur solche Interphasen-Mikrotubuli ausgewertet, die in einer fokalen Ebene wuchsen.

b: Quantifizierung des in **a** dargestellten Experiments. Es wurden pro aufgeführtem Stamm mindestens 20 Mikrotubuli-Plus-Enden analysiert. Der Mittelwert, sowie die Standardabweichung sind für die jeweils untersuchten Stämme in einem Diagramm dargestellt. Die Zahlen über den jeweiligen Stämmen geben den genauen Zahlenwert des jeweils ermittelten Mittelwertes für den jeweiligen Stamm an.

Interphasen-Mikrotubuli in den Zellen des jeweiligen Mutanten-Stammes ist, desto drastischer ist die Dauer von Interphasen-Mikrotubuli-Wachstumszeiten verkürzt. Dies bedeutet, dass die Interphasen-Mikrotubuli sowohl bei *CH-Domänen*-Mutanten als auch bei *EB1-Domänen*-Mutanten aufgrund kürzerer Wachstumszeiten auftreten. Deshalb kann geschlossen werden, dass sowohl die CH-Domäne als auch die EB1-Domäne wichtig für die Funktion von Mal3 bei der Polymerisierung von Interphasen-Mikrotubuli sind.

5.1.4.4 Lokalisierung von Proteinen, die für korrektes polares Wachstum von *S. pombe* benötigt werden in *mal3*-Mutanten

Bei der Phänotyp-Analyse der *mal3*-Mutanten wurde gezeigt, dass die Interphasen-Mikrotubuli in den unterschiedlichen Mutanten-Stämmen verkürzt sind und dadurch morphologische Aberrationen ausgebildet werden (Kap.5.1.4.1 bis Kap.5.1.4.2). Die Proteine Tea1 und Tip1 werden ebenfalls für korrektes polares Wachstum benötigt (Mata und Nurse 1997; Brunner und Nurse 2000). Dabei wird Tip1 wie Mal3 für die Integrität des Interphasen-

Mikrotubuli-Zytoskeletts benötigt, während Tea1 für die korrekte Lokalisierung der Wachstumszonen an den beiden Zellenden benötigt wird. Beide Proteine sind an beiden Zellenden lokalisiert. Darüber hinaus lokalisiert Tip1 entlang von Interphasen-Mikrotubuli, ist jedoch insbesondere an den Plus-Enden von Mikrotubuli konzentriert (Brunner und Nurse 2000). Für die Interaktion von Tip1 mit Mikrotubuli wird Mal3 benötigt und Tip1 interagiert mit der EB1-Domäne von Mal3 (Busch und Brunner 2004). Tea1 kolokalisiert nur mit einigen wenigen Mikrotubuli-Plus-Enden und das Interphasen-Mikrotubuli-Zytoskelett wird benötigt, um Tea1 an den Zellenden zu lokalisieren (Mata und Nurse 1997). Hier wurde überprüft, ob Tea1 und Tip1 in den *mal3*-Mutanten-Stämmen noch korrekt lokalisiert sind, oder ob spezifische Lokalisierungs-Defekte in verschiedenen Mutanten auftreten. Dafür wurden jeweils *tea1*⁺ bzw. *tip1*⁺ ORFs, welche mit dem GFP-ORF fusioniert sind, in eine Auswahl von *mal3*-Mutanten-Stämmen mittels Kreuzung eingebracht, um so mittels Immunofluoreszenz-Mikroskopie die subzelluläre Lokalisierung von Tea1 und Tip1 in diesen Stämmen zu überprüfen (Kap.4.13). Die Lokalisierung von Tea1 wurde zusätzlich mittels Lebend-Fluoreszenz-Mikroskopie untersucht.

5.1.4.4.1 Die Lokalisierung von Tea1-GFP an Zellenden ist in den *mal3*-Mutanten reduziert

Sowohl in lebenden, wie auch in fixierten, angefärbten Wildtyp Zellen ist Tea1 immer an beiden Zellenden vorhanden (Abb.5-23a). Darüber hinaus sind bei 28% der Zellen auch Signale im Zytoplasma vorhanden, welche mit den Plus-Enden von Interphasen-Mikrotubuli kolokalisieren (Abb.5-23b, Mata, 1997). Bei *mal3Δ* und den untersuchten *mal3*-Mutanten treten unterschiedlich stark ausgeprägte Abweichungen von diesem Lokalisierungsmuster auf. Beim *mal3Δ* Stamm ist die Intensität von Tea1-GFP Signalen an Zellenden sowohl in lebenden (Daten nicht gezeigt) als auch in fixierten Zellen reduziert (Abb.5-23b). Der Mutanten-Stamm *mal3-238L/F* zeigt die gleiche Lokalisierung von Tea1 wie der Wildtyp (Abb.5-23b). Bei allen übrigen Mutanten ist die Intensität von Tea1-GFP Signalen an Zellenden ähnlich wie bei *mal3Δ* reduziert (Abb.5-23a, *mal3-005R/G*, Abb.5-23b). Dieser Effekt ist bei *mal3-005R/G* sogar noch stärker ausgeprägt als beim *mal3Δ*-Stamm und bei *mal3-209L/F* und *mal3-206-pst* ähnlich zum *mal3Δ*-Stamm (Abb.5-23b). Bei *mal3-201E/A* ist dieser Effekt schwächer ausgeprägt (Abb.5-23b). Außerdem ist bei *mal3-005R/G* der Anteil von Zellen, welche Tea1-GFP ausschließlich an den Zellenden aufweisen, mit 34% wesentlich stärker reduziert als beim *mal3Δ* Stamm und den übrigen Mutanten.

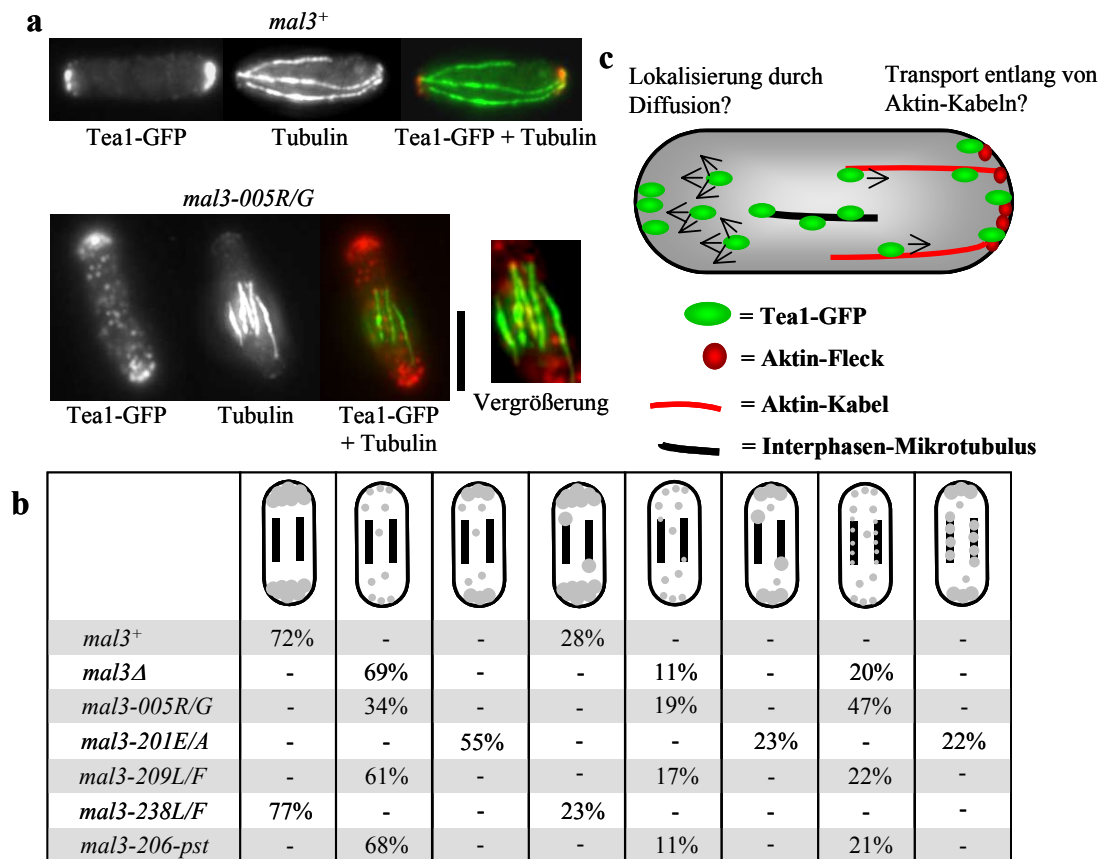


Abb.5-23: Tea1 ist bei Abwesenheit von Mal3 oder defektem Mal3 falsch lokalisiert.

a: Lokalisierung von Tea1-GFP in Wildtyp und *mal3-005R/G* Zellen mittels Immunofluoreszenz-Mikroskopie (Kap.4.13). Interphasen-Mikrotubuli und Tea1-GFP wurden mittels Antikörpern angefärbt. Der schwarze Balken entspricht 5 µm Länge.

b: Quantifizierung der Tea1-GFP Lokalisierung in *mal3*-Mutanten. Um die Lokalisierungsdefekte an Interphasen-Mikrotubuli in den verschiedenen *mal3*-Mutanten zu quantifizieren, wurde für jeden untersuchten Mutanten-Stamm ausgewertet wieviele Zellen jeweils Tea1-GFP Signale ausschließlich an den Zellenden aufweisen, wieviele Zellen zusätzlich Tea1-GFP an Interphasen-Mikrotubuli-Plus-Enden aufweisen und wieviele Zellen neben der Lokalisierung an den Zellenden zusätzlich Tea1-GFP entlang von Interphasen-Mikrotubuli aufweisen. Außerdem wurde überprüft, wieviele Zellen Tea1-GFP frei im Zytoplasma aufweisen. Die unterschiedliche Intensität der Tea1-GFP Signale bei den verschiedenen *mal3*-Mutanten wird durch die Größe der Punkte symbolisiert. Mutanten bei denen die Intensität der Signale in etwa identisch war, wurden in eine Rubrik eingeteilt. Pro Mutanten-Stamm wurden mindestens 30 Zellen analysiert.

c: Schematische Darstellung möglicher Tea1 Lokalisierungsmechanismen am Zellende von *mal3-005R/G* Zellen. Dargestellt ist die mögliche Lokalisierung durch Diffusion oder durch Transport entlang von Aktin-Kabeln. Dafür wurden die Zellen mittels Immunofluoreszenz-Mikroskopie untersucht. Aktin wurde mittels Rhodamin-Phalloidin, Tea1-GFP mittels eines polyklonalen GFP-Antikörpers nachgewiesen.

Bei lebenden Wildtyp-Zellen können auch im Zytoplasma definierte Tea1-GFP Signale detektiert werden, die vermutlich mit den Plus-Enden von Interphasen-Mikrotubuli koloalisieren (Daten nicht gezeigt). Bei *mal3Δ*, *mal3-005R/G*, *mal3-209L/F* und *mal3-206-pst* können in lebenden Zellen keine definierten Tea1-GFP-Signale im Zytoplasma detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Bei *mal3-201E/A* sind im Gegensatz dazu in lebenden Zellen stäbchenförmige Tea1-GFP Signale zu beobachten, die in ihrer Form und in ihrem Verhalten Mikrotubuli gleichen (Daten nicht gezeigt). In fixierten Zellen können bei *mal3Δ* und allen untersuchten *mal3*-Mutanten auch Tea1-GFP Signale an den Plus-Enden und entlang von

Interphasen-Mikrotubuli detektiert werden (Abb.5-23a; Vergrößerung *mal3-005R/G*). Bei *mal3-201E/A* Zellen sind diese Signale etwas schwächer als in Wildtyp-Zellen, jedoch stärker als bei *mal3Δ* und den übrigen *mal3*-Mutanten (Abb.5-23b). Dabei sinkt bei *mal3Δ* und allen *mal3*-Mutanten, mit Ausnahme von *mal3-201E/A*, der Anteil von Zellen, welche Tea1-GFP an den Plus-Enden von Interphasen-Mikrotubuli aufweisen, auf unter 20% (Abb.5-23b). Stattdessen zeigen über 20% der Zellen des *mal3Δ*-Stammes und der Mutantenstämme Tea1-GFP Signale entlang von Interphasen-Mikrotubuli (Abb.5-23b). Bei *mal3-005R/G* steigt diese Zellpopulation sogar auf 47% (Abb.5-23a Vergrößerung von *mal3-005R/G* und Abb.5-23b). Außerdem können beim *mal3Δ* Stamm und den untersuchten *mal3*-Mutanten zytoplasmatische Signale, die häufig nicht mit Interphasen-Mikrotubuli kolokalisieren, detektiert werden (Abb.5-23b). Dieser Effekt ist bei *mal3-005R/G* am stärksten ausgeprägt (Abb.5-23a und b). Bei den Zellen von *mal3Δ*, *mal3-209L/F* und *mal3-206-pst* treten marginal weniger zytoplasmatische Signale (Daten nicht gezeigt), bei *mal3-201E/A* kaum zytoplasmatische Signale auf (Abb.5-23b).

Sowohl die Assoziation von Mal3 mit Interphasen-Mikrotubuli wie auch die Funktion der EB1-Domäne (leicht gestört bei *mal3-201E/A* und stark gestört bei *mal3-209L/F*) werden also offensichtlich für die Assoziation von Tea1 mit Interphasen-Mikrotubuli und die Akkumulation an Plus-Enden benötigt. Da Tea1 zudem bei allen *mal3*-Mutanten bis auf *mal3-201E/A* stark an Zellenden reduziert ist, kann zudem geschlossen werden, dass Mal3 und das Interphasen-Mikrotubuli-Zytoskelett für die Lokalisierung von Tea1 an den Zellenden benötigt werden, jedoch offensichtlich nicht essentiell sind.

Die Mikrotubuli in den *mal3*-Mutanten-Stämmen *mal3-005R/G* und *mal3-206-pst* sowie dem *mal3Δ* Stamm sind verkürzt, aber Tea1-GFP ist wenn auch reduziert trotzdem an den Zellenden lokalisiert. Deshalb muss es einen weiteren Mechanismus geben, durch den Tea1 an die Zellenden gelangen kann. Dabei stellte sich die Frage, ob die Tea1-GFP Signale, die nicht mit Mikrotubuli assoziieren, durch gerichteten Transport oder durch Diffusion zu den Zellenden transportiert werden könnten (Abb.5-23c). Gerichteter Transport könnte alternativ zu Mikrotubuli nur entlang von Aktin-Kabeln erfolgen. Deshalb wurde der *mal3-005R/G* Stamm darauf untersucht, ob Tea1-GFP Signale mit Aktin-Kabeln kolokalisieren (Kap.4.13.1). Jedoch konnte hierbei keine Kolokalisierung von Tea1-GFP mit Aktin-Kabeln detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Daraus folgt, dass die Lokalisierung von Tea1-GFP an Zellenden von *mal3*-Mutanten eventuell durch Diffusion erfolgt.

5.1.4.4.2 Die Lokalisierung von Tip1 an den Zellenden und Plus-Enden von Interphasen-Mikrotubuli ist in den *mal3*-Mutanten reduziert

Die Signal-Intensität von Tip1-GFP war in lebenden Wildtyp Zellen so schwach, dass eine sichere Aussage über Lokalisierungsdefekte in lebenden *mal3*-Mutanten nicht möglich gewesen wäre. Deshalb wurde die Lokalisierung von Tip1-GFP nur in fixierten Zellen untersucht. In Wildtyp-Zellen sind an beiden Zellenden und an Interphasen-Mikrotubuli-Plus-Enden mehrere starke Tip1-GFP Signale vorhanden (Abb.5-24a) Dabei setzen sich die Signale an Zellenden aus mehreren Einzelsignalen zusammen (Brunner und Nurse 2000 und Abb.5-24a). Die Signal-Intensität von Tip1-GFP an Zellenden und Interphasen-Mikrotubuli-Plus-Enden ist bei *mal3Δ* und allen untersuchten Mutanten mit Ausnahme von *mal3-238L/F* unterschiedlich stark reduziert (Abb.5-24a). Um diese Ergebnisse zu quantifizieren wurde bei den *mal3*-Mutanten und *mal3Δ* ausgewertet, ob schwächere Einzelsignale an Zellenden detektiert werden können. Außerdem wurde überprüft, ob die Intensität von Tip1-Signalen an

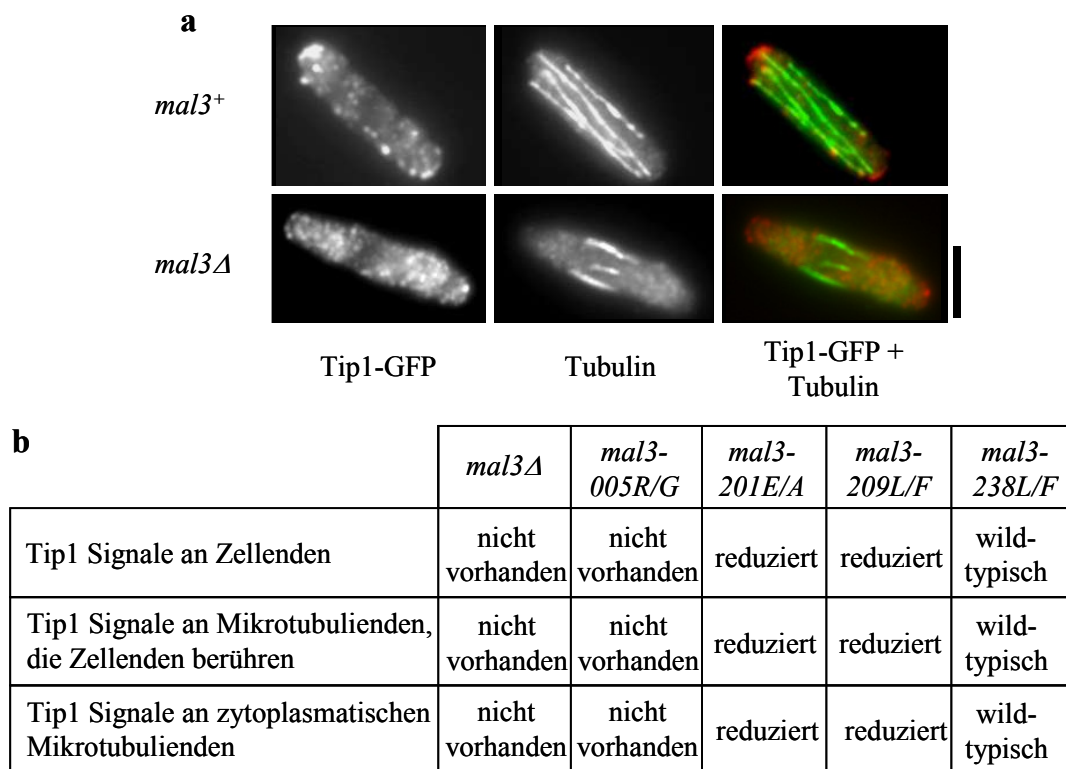


Abb.5-24:Tip1 ist bei Abwesenheit von Mal3 oder defektem Mal3 falsch lokalisiert.

a: Lokalisierung von Tip1-GFP in Wildtyp und *mal3Δ* Zellen mittels Immunofluoreszenz-Mikroskopie (Kap.4.13). Interphasen-Mikrotubuli und Tip1-GFP wurden mittels Antikörpern angefärbt. Der schwarze Balken entspricht 5 µm Länge.

b: Quantifizierung der Tip1-GFP Lokalisierung in *mal3*-Mutanten. Um die Lokalisierungsdefekte an Interphasen-Mikrotubuli in den verschiedenen *mal3*-Mutanten zu quantifizieren, wurde für jeden untersuchten Mutanten-Stamm ausgewertet, wie viele Tip1-GFP Einzel-Signale an den Zellenden vorhanden sind und wie viele Interphasen-Mikrotubuli-Plus-Enden Tip1-GFP Signale aufweisen. Wurden Tip1-GFP Signale detektiert, wurde ebenfalls analysiert ob diese Signale im Vergleich zu Tip1-GFP Signalen im Wildtyp schwächer waren oder nicht. Es wurden mindestens 30 Zellen pro untersuchtem Stamm analysiert.

Interphasen-Mikrotubuli-Plus-Enden reduziert ist oder ob sogar kein Tip1 mehr an Plus-Enden detektiert werden kann.

In *mal3Δ* und *mal3-005R/G* Zellen können so gut wie nie Tip1-GFP Signale an den Zellenden und an Interphasen-Mikrotubuli-Plus-Enden detektiert werden (Abb.5-24b). In den seltenen Fällen wo noch ein Tip1-GFP-Signal an Zellenden oder Interphasen-Mikrotubuli-Plus-Enden detektiert werden kann, ist die Intensität dieses Signals extrem reduziert (Abb.5-24a und b). Mal3 muss also mit Mikrotubuli assoziiert sein, damit Tip1 korrekt an den Plus-Enden von Interphasen-Mikrotubuli und den Zellenden lokalisiert werden kann. Bei *mal3-201E/A* und *mal3-209L/F* Zellen können Einzelsignale an Zellenden detektiert werden. Im Vergleich zu Wildtyp-Zellen sind diese Signale jedoch schwächer und setzen sich nicht wie in Wildtyp Zellen zu einem großen Signal zusammen. Folglich ist Tip1 an Zellenden von *mal3-201E/A* und *mal3-209L/F* Zellen reduziert (Abb.5-24b), jedoch nicht so stark wie bei *mal3-005R/G* oder *mal3Δ*. Interphasen-Mikrotubuli-Plus-Enden weisen bei *mal3-201E/A* und *mal3-209L/F* generell schwächere Tip1-GFP Signale auf als bei Wildtyp-Zellen. Der Anteil von Interphasen-Mikrotubuli-Plus-Enden, welche kein Tip1-GFP aufweisen, ist im Vergleich zu Wildtyp-Zellen bei *mal3-201E/A* und *mal3-209L/F* ebenfalls erhöht, und wenn Signale detektiert werden können, sind diese schwächer als in Wildtyp Zellen (Abb.5-24b). Das bedeutet, dass auch die EB1-Domäne eine Funktion bei der Assoziation von Tip1 mit Interphasen-Mikrotubuli-Plus-Enden und Zellenden hat.

Die *mal3Δ* und *mal3-005R/G* Stämme weisen häufig verkürzte Mikrotubuli auf, die Stämme *mal3-201E/A* und *mal3-209L/F* seltener (Kap.5.1.4.2). Analog dazu ist die Lokalisierung von Tip1 an Zellenden unterschiedlich stark gestört. Zusammengefasst bedeutet dies, dass je häufiger die Interphasen-Mikrotubuli verkürzt sind, desto stärker ist die Lokalisierung von Tip1 an Zellenden eingeschränkt. Interphasen-Mikrotubuli werden also benötigt, um Tip1 an den Zellenden zu lokalisieren. Mal3 muss dabei mit Mikrotubuli assoziiert sein, damit Tip1 korrekt an den Plus-Enden von Interphasen-Mikrotubuli lokalisiert werden kann. Außerdem wird auch eine von der EB1-Domäne ausgeführte Funktion benötigt, um Tip1 an Interphasen-Mikrotubuli-Plus-Enden zu lokalisieren.

5.1.5 Die Funktionen von Mal3 in der Mitose und der Interphase lassen sich nicht trennen

Die hier durchgeführte phänotypische Analyse ergab, dass alle *mal3*-Mutanten-Stämme entweder Defekte in der Mitose und der Interphase aufweisen, oder in beiden Phasen keine Effekte aufweisen. Daraus folgt, dass offensichtlich beide Domänen sowohl in der Mitose als

auch in der Interphase für die Funktion von Mal3 benötigt werden. Des weiteren können zumindestens durch diese Mutanten-Analyse die Funktionen von Mal3 während der Mitose und der Interphase nicht getrennt werden, da kein Mutanten-Stamm ausschließlich Phänotypen in der Mitose oder der Interphase aufweist.

5.2 Charakterisierung der Suppression von *mal3*-Mutanten durch *asp1*⁺

Der *asp1*⁺ ORF wurde ursprünglich als Suppressor von Mutanten des Aktin regulierenden Arp2/3 Komplexes isoliert (Feoktistova, McCollum et al. 1999). Asp1 selbst spielt ebenfalls eine Rolle bei der Regulation bzw. Integrität des Aktin-Zytoskeletts. Die Überexpression von *asp1*⁺ supprimiert die TBZ-Hypersensitivität des *mal3-1*-Mutanten-Stammes (Vietmeier-Decker 2004). Dabei war nicht bekannt, ob die Suppression durch *asp1*⁺ spezifisch für CH-Mal3-Varianten, EB1-Mal3-Varianten oder sogar für spezifische Mal3-Varianten ist. Deshalb wurde ausgetestet, ob die Suppression der TBZ-Hypersensitivität von *mal3*-Mutanten durch *asp1*⁺ Allel spezifisch ist. Dazu wurde bei allen *mal3*-Mutanten das Wachstum in der Gegenwart von TBZ überprüft, wobei die untersuchten Zellen zusätzliches *asp1*⁺ exprimierten.

5.2.1 Die TBZ-Hypersensitivität aller *mal3*-Mutanten kann durch Überexpression von *asp1*⁺ supprimiert werden

Sowohl bei CH-Domänen-Mutanten als auch bei EB1-Domänen-Mutanten supprimiert *asp1*⁺ die TBZ-Hypersensitivität der jeweiligen Mutante gut (Abb.5-25). Dabei werden Mutationen, die zu einer starken TBZ-Hypersensitivität führen, ähnlich wie der *mal3Δ* Stamm supprimiert (Abb.5-25). Bei Mutationen, die eine schwächere TBZ-Hypersensitivität hervorrufen, vermittelt die Überexpression von *asp1*⁺ Wildtyp ähnliches Wachstum. Allerdings wird der Mutantenstamm *mal3-047K/A* im Vergleich zu *mal3-004S/E*, *mal3-004S/A* und *mal3-005R/G*, die eigentlich sensibler gegenüber TBZ sind, spezifisch schlechter supprimiert (Abb.5-25). Dieser Effekt ist vergleichbar mit der spezifisch schlechteren Suppression von *mal3-047K/A* durch den verkürzten *spc7* ORF (Kap.5.1.3.5) und deutet ebenfalls an, dass der *mal3-047K/A* Stamm sich zumindest in einem Aspekt von den übrigen CH-Domänen-Mutanten unterscheiden muss.

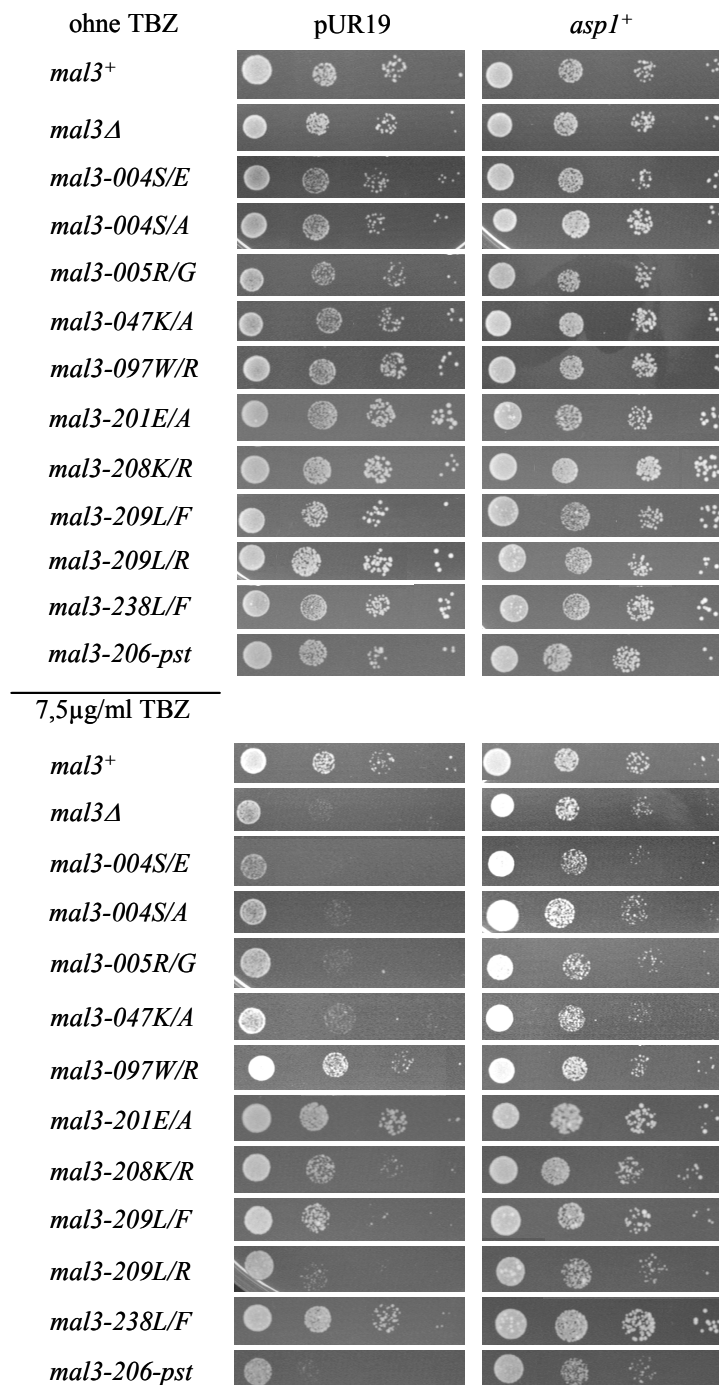


Abb.5-25: Suppression der TBZ-Hypersensitivität von *mal3*-Mutanten durch zusätzliches *Asp1*.

Ein Wildtyp *S. pombe* Stamm, sowie der *mal3Δ::his3*⁺ und alle *mal3*-Mutanten, wurden mit einem Plasmid, welches ein genomisches *S. pombe* DNA-Fragment mit dem *asp1*⁺ ORF (P344) enthält, transformiert. Logarithmisch wachsende Zellen wurden anschließend auf Selektiv-Medium mit oder ohne 7,5 μg/ ml TBZ für sechs Tage bei 24 °C inkubiert (Kap.4.7.2).

5.2.2 *Asp1* hat einen Einfluss auf die Lokalisierung von *Mal3-004S/A* an Mikrotubuli

Im Rahmen der weiteren Untersuchungen wurde überprüft, ob *Asp1* einen Einfluss auf die Lokalisierung von *Mal3* hat. Dabei wurde unter anderem getestet, ob zusätzliches *Asp1* dazu führt, dass *Mal3*-Varianten, die reduziert mit Mikrotubuli assoziieren (Kap.5.1.2.2), wieder

besser mit Mikrotubuli assoziieren. Dies wurde stellvertretend beim *mal3-004S/A-GFP* Stamm überprüft. Dazu wurde *asp1*⁺ in diesem Stamm durch den *nmt1*-Promotor überexprimiert (Kap.4.7.2) und überprüft, ob die Lokalisierung von Mal3-004S/A-GFP wieder mehr der Lokalisierung von Wildtyp Mal3 gleicht. Bei Kontroll-Zellen die kein *asp1*⁺ überexprimieren, sind nur wenige schwache, definierte Mal3-004S/A-GFP Signale vorhanden, die vermutlich mit Mikrotubuli assoziiert sind (Abb.5-26). Im Gegensatz hierzu weisen *mal3-004S/A*-Zellen mit zusätzlichem Asp1 mehr und stärkere Mal3-004S/A-GFP Signale auf (Abb.5-26). Dabei erinnert die lineare Abfolge punktförmiger Mal3-004S/A-GFP Signale in Interphasen-Zellen wieder mehr an die kometenförmige Lokalisierung von Wildtyp Mal3 auf Interphasen-Mikrotubuli. Allerdings ist die Intensität dieser Mal3-004S/A-GFP Signale immer noch wesentlich schwächer als die Intensität von Wildtyp Mal3-GFP Signalen (Abb.5-26). In fixierten *mal3-004S/A-GFP* Zellen mit oder ohne zusätzlichem Asp1 konnte gezeigt werden, dass die lebend detektierten Mal3-004S/A-GFP Signale tatsächlich mit Mikrotubuli koloalisieren (Daten nicht gezeigt). Auch hier ist die Intensität von Mal3-004S/A-GFP Signalen in Zellen die *asp1*⁺ überexprimieren stärker als in Zellen die *asp1*⁺ nicht überexprimieren (Daten nicht gezeigt). Dies bedeutet, dass bei zusätzlichem Asp1 in der Zelle wieder mehr Mal3-004S/A-GFP mit Mikrotubuli assoziiert ist. Daraus folgt, dass die Suppression der TBZ-Hypersensitivität von *mal3-004S/A* durch Asp1 durch die verbesserte Assoziation von Mal3-004S/A mit Mikrotubuli bewirkt werden könnte. Dies ist auch bei den übrigen Mal3-Varianten, deren Assoziation mit Mikrotubuli gestört ist, möglich.

Da Mal3-004S/A-GFP in Gegenwart von zusätzlichem Asp1 besser mit Mikrotubuli assoziiert, war als nächstes interessant, ob Asp1 selbst auch mit Mikrotubuli assoziiert ist und so Mal3-004S/A an Mikrotubuli rekrutieren könnte. Ein Asp1-GFP Fusionsprotein ist jedoch

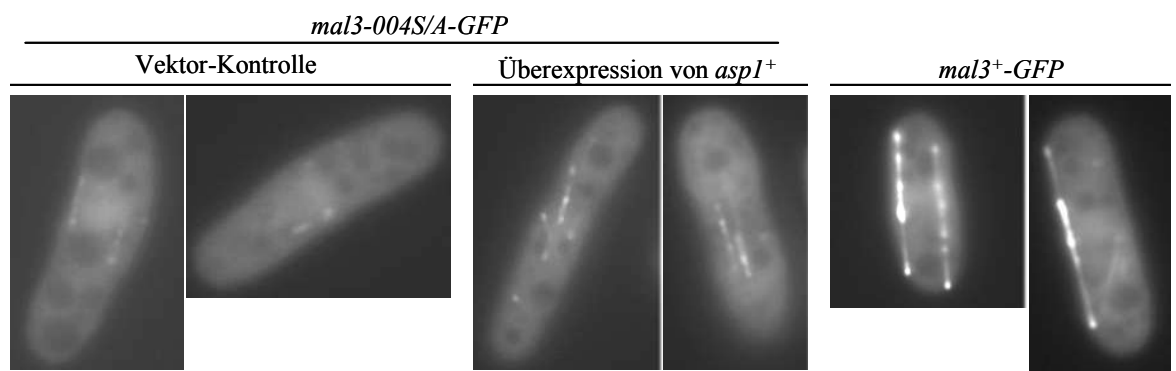


Abb.5-26: Zusätzliches Asp1 führt zu mehr definierten Mal3-004S/A-GFP Signalen.

mal3-004S/A-GFP Zellen wurden entweder mit dem Plasmid pREP3X/ *asp1*⁺ oder als Kontrolle mit leerem pREP3X Plasmid transformiert. Die Überexpression erfolgte durch den *nmt1*-Promotor, wobei die Zellen für 16 Stdn. in flüssig Medium inkubiert wurden, um den Promotor zu dereprimieren. Die Zellen wurden mittels Lebend-Fluoreszenz-Mikroskopie untersucht (Kap.4.13). Vektor-Kontrolle: Zellen, die nur mit leerem pREP3X transformiert wurden. Überexpression von *asp1*⁺: Zellen die *asp1*⁺ überexprimieren. Mal3-GFP: parallel untersuchter Stamm der endogen Wildtyp *mal3*⁺-GFP exprimiert. Der Balken entspricht 5 µm.

im gesamten Zytoplasma lokalisiert und es kann zu keinem Zeitpunkt des Zellzyklus ein spezifisches Asp1 Signal an Mikrotubuli detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

Um zu überprüfen, ob Asp1 in Wildtyp Zellen für die Assoziation von Wildtyp Mal3 mit Mikrotubuli benötigt wird, wurde die Lokalisierung von Mal3-GFP in *asp1Δ* Stämmen in lebenden Zellen überprüft. Allerdings unterscheidet sich das Lokalisierungsmuster sowie die Intensität von Mal3-GFP Signalen in *asp1Δ* Stämmen nicht signifikant von Wildtyp-Stämmen (Daten nicht gezeigt). Auch interagieren Mal3 und Asp1 nicht in einer Zwei-Hybrid-Analyse (Daten nicht gezeigt). Also hat Asp1 keinen essentiellen Einfluss auf die Lokalisierung von Mal3 an Mikrotubuli.

5.2.3 Asp1 und Mal3 sind hypersensitiv gegenüber TBZ und Latrunculin B

Der Aktin-Regulator Asp1 supprimiert die TBZ-Hypersensitivität von *mal3*-Mutanten Zellen und verbessert die Lokalisierung von Mal3-004S/A an Mikrotubuli. Deshalb stellte sich die Frage, ob Asp1 ebenfalls für den korrekten Ablauf der Mitose benötigt wird. Gleichzeitig stellte sich jedoch auch die Frage, ob auch das Aktin-Zytoskelett und Mal3 voneinander abhängig sind. Deshalb wurde bei einigen *mal3*-Mutanten das Wachstum in Gegenwart von Latrunculin B (LatB) überprüft.

5.2.3.1 Der *asp1Δ* Stamm ist TBZ-Hypersensitiv

Um zu überprüfen, ob *asp1Δ* Zellen Probleme beim Ablauf der Mitose haben, wurde das Wachstum eines *asp1Δ* Stammes in der Gegenwart von TBZ überprüft. Dabei zeigte sich, dass *asp1Δ* Zellen im Vergleich zu einem Wildtyp-Stamm stark reduziertes Wachstum in Gegenwart von TBZ zeigen (Abb.5-27). Die Hypersensitivität ist jedoch nicht so stark ausgeprägt wie bei *mal3Δ* Zellen (Abb.5-27). Daraus folgt, dass Asp1 wahrscheinlich einen Einfluss auf den Ablauf der Mitose hat.

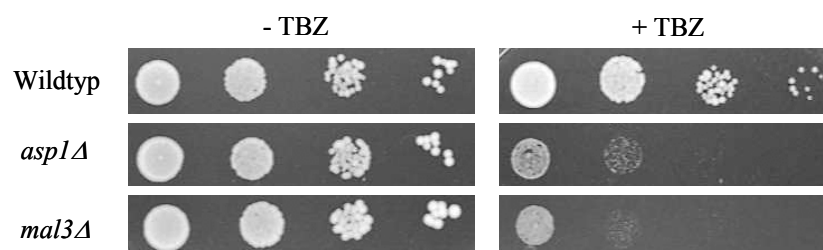


Abb.5-27: Die Abwesenheit von Asp1 führt zu TBZ-Hypersensitivität.

Logarithmisch wachsende Wildtyp, *asp1Δ::ura4⁺* und *mal3Δ::ura4⁺* Zellen wurden für 4 Tage auf Medium mit oder ohne 7,5 µg/ ml TBZ bei 24°C inkubiert.

5.2.3.2 Defektes Mal3 führt zu Latrunculin B Sensitivität

LatB verhindert die Polymerisierung von Aktin-Filamenten und zerstört so das Aktin-Zytoskelett der Zelle (Morton, Ayscough et al. 2000). Der *mal3Δ* Stamm sowie die Mutanten-Stämme *mal3-005R/G* und *mal3-206-pst* Zellen sind stark sensitiv gegenüber LatB (Abb.5-28). Die Stämme *mal3-201E/A*, *mal3-209L/F* und *mal3-238L/F* sind leicht sensitiv gegenüber LatB (Abb.5-28). Je stärker die Funktion von Mal3 also gestört ist (Kap.5.1.3.1 bis 5.1.4.5), desto stärker ist die LatB Sensitivität ausgeprägt. Allerdings können bei den *mal3*-Mutanten keine Defekte von Aktin-Flecken oder Aktin-Kabeln detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Folglich haben Mal3 und das Aktin-Zytoskelett einen Einfluss aufeinander, allerdings hat Mal3 keinen Einfluss auf die korrekte Lokalisierung von Aktin-Flecken und Aktin-Kabeln.

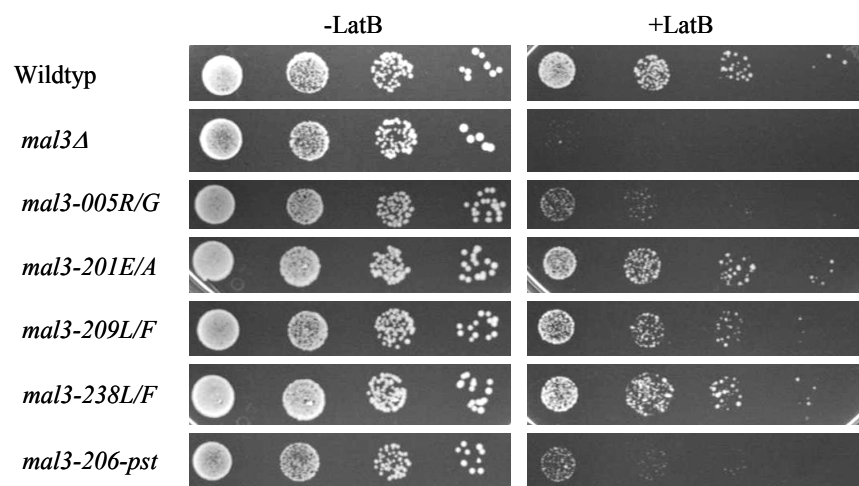


Abb.5-28: Defekte oder Abwesenheit von Mal3 führen zu Latrunculin B-Hypersensitivität.

Logarithmisch wachsende Wildtyp, *mal3Δ::ura4⁺* und *mal3*-Mutanten Zellen wurden für 4 Tage auf Medium mit oder ohne 4 μ mol LatB bei 24°C inkubiert.

5.2.3.3 Die Deletion von *asp1⁺* zeigt additive Effekte mit *mal3Δ* und *mal3-005R/G* in der Mitose

Um zu überprüfen, ob *asp1⁺* und *mal3⁺* in einer linearen genetischen Kaskade zusammenwirken, wurden Doppelmutanten hergestellt. Diese Doppelmutanten wurden anschließend auf Sensitivität gegenüber TBZ und LatB sowie Temperatur-Sensitivität (36°C) und Kälte-Sensitivität (18°C) hin überprüft. Dabei ist sowohl das Wachstum von *asp1Δ/mal3Δ* als auch das Wachstum von *asp1Δ/mal3-005R/G* Doppelmutanten im Vergleich zu den jeweiligen Einzelmutanten bei 18°C, 36°C und in der Gegenwart von geringen LatB Konzentrationen reduziert (Abb.5-29a). In der Gegenwart von TBZ ist das Wachstum der Doppelmutanten sogar noch stärker reduziert (Abb.5-29a). Die Phänotypen von *asp1Δ*, *mal3Δ*

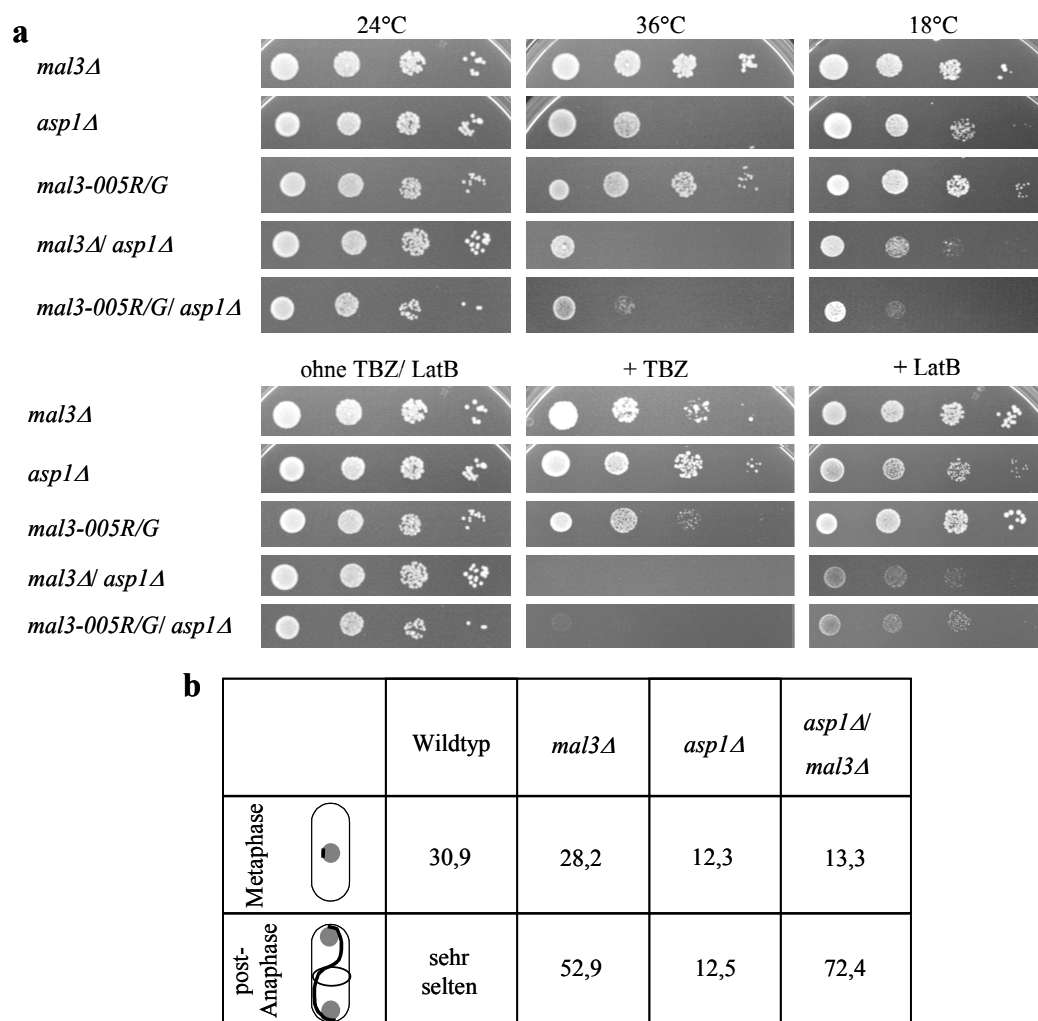


Abb.5-29: Die Deletionen von *mal3* und *asp1* verhalten sich additiv.

a: Serielle Tropftests. Logarithmisch wachsende Zellen von *mal3Δ/asp1Δ* und *mal3-005R/G/asp1Δ* Doppelmutanten und *mal3Δ*, *mal3-005R/G* und *asp1Δ* Einzelmутanten wurden bei 18°C, 36°C und auf Medium mit oder ohne 5,5 µg/ ml TBZ oder 2 µmol LatB inkubiert. Inkubationszeiten; 18°C: zehn Tage, 36°C: zwei Tage, TBZ und LatB: sechs Tage.

b: Die angegebenen Stämme aus einer Tetrade wurden Ü/N bei 18°C inkubiert, fixiert und Tubulin mittels eines anti-α-Tubulin Antikörpers sowie DNA mittels DAPI detektiert. Angegeben ist zum einen der prozentuale Anteil von Zellen, die eine Metaphase-Spindel aufweisen, sowie der prozentuale Anstieg von S-förmigen post-Anaphase Spindeln im Vergleich zum Wildtyp. Es wurden mindestens 70 mitotische Zellen pro Stamm analysiert.

und *mal3-005R/G* verhalten sich also additiv. Also wirken Mal3 und Asp1 nicht in einer linearen genetischen Kaskade während der Mitose zusammen. Stattdessen lassen die additiven Effekte lediglich den Schluss zu, dass Mal3 und Asp1 parallele Funktionen in unabhängigen Prozessen oder eine gemeinsame Funktion (z.B. in einem Komplex) im selben Prozess besitzen könnten.

Um zu testen warum *asp1Δ/ mal3Δ* Doppelmutanten bei 18°C reduziertes Wachstum zeigen, wurde überprüft, ob die mitotische Spindel dieser Zellen Defekte aufweist und ob es zu DNA-Fehlverteilung kommt. Dafür wurden logarithmisch bei 18°C wachsende Zellen eines Wildtyp, *mal3Δ*, *asp1Δ* und eines *asp1Δ/ mal3Δ* Stammes, die alle aus derselben Tetrade

(Kap.4.11.3) hervorgegangen waren, fixiert. Anschließend wurden die Zellen auf aberrante Mitosen hin untersucht. Dabei wurde kein signifikanter Anstieg von DNA-Fehlverteilung bei der Doppelmutante im Vergleich zu den Einzelmутanten detektiert. Allerdings treten bei mitotischen Spindeln zwei Effekte auf. Bei Wildtyp Zellen weisen 18% aller mitotischen Zellen Metaphase-Spindeln auf (Hagan und Hyams 1988). Die Deletion von *mal3*⁺ bewirkt einen transienten Metaphasen-Arrest, was durch einen Anstieg der Population von Metaphasen Zellen beim *mal3Δ* Stamm deutlich wird (Beinhauer, Hagan et al. 1997). So sind 28,2% aller mitotischen Zellen in der Metaphase (Abb.5-29b). Im Vergleich zu *mal3Δ* weisen *asp1Δ* und *asp1Δ/ mal3Δ* Zellen Werte auf, die den für Wildtyp Zellen publizierten Werten entsprechen (Abb.5-29b). Die Abwesenheit von *asp1*⁺ scheint also den Metaphasen-Arrest von *mal3Δ* aufzuheben. Allerdings muss hierbei berücksichtigt werden, dass beim Wildtyp-Stamm dieser Tetrade 30,9% aller mitotischen Zellen Metaphase-Spindeln aufweisen (Abb.5-29b). Im genetischen Hintergrund dieser Kreuzung muss also noch eine weitere Mutation vorliegen, die mit für die beobachteten Phänotypen verantwortlich ist. Dies macht es schwer eine sichere Aussage darüber zu machen, ob *asp1Δ* den Metaphasen-Arrest von *mal3Δ* aufhebt oder nicht.

Zum Zweiten verstärkt die Abwesenheit von *asp1*⁺ in einem *mal3Δ* Stamm-Hintergrund die Probleme von *mal3Δ* beim Austritt aus der Mitose. So akkumulieren bei der Doppelmutante mehr post-Anaphase Zellen als bei den beiden Einzelmутanten (Abb.5-29b). Davon zeigen bei *asp1Δ/ mal3Δ* Zellen 72,4% S-förmig gekrümmte post-Anaphase Spindeln (Kap.5.1.3.3), im Vergleich zu 52,9% bei *mal3Δ* bzw. 12,5% bei *asp1Δ* Zellen (Abb.5-29b). Dies bedeutet, dass in *asp1Δ/ mal3Δ* Doppelmutanten offensichtlich der Abbau der post-Anaphase Spindel noch stärker gestört ist als in *mal3Δ* Zellen. Zusammen mit der Tatsache, dass auch bei der *asp1Δ* Einzelmутante 12,5% der post-Anaphase Zellen S-förmige Spindeln aufweisen, bedeutet dies, dass beide Proteine beim Abbau der Spindel entweder parallel oder gemeinsam eine Rolle spielen.

5.2.3.4 Die Deletion von *asp1*⁺ zeigt nur zum Teil additive Effekte mit *mal3Δ* und *mal3-005R/G* in der Interphase

Sowohl Mal3 als auch Asp1 werden für die Beibehaltung der zylindrischen Zellform von *S. pombe* benötigt (Beinhauer, Hagan et al. 1997; Feoktistova, McCollum et al. 1999). Bei defektem Mal3 werden gekrümmte und verzweigte Zellen ausgebildet. Dies wird durch die verkürzten Interphasen-Mikrotubuli von *mal3*-Mutanten bewirkt. Bei Abwesenheit von Asp1 werden bei hohen Temperaturen gehäuft geschwollene Zellen ausgebildet, was durch eine

reduzierte Lokalisierung der Aktin-Flecken an den Zellenden hervorgerufen wird. Deshalb wurde die Zellform sowie das Interphasen-Mikrotubuli-Zytoskelett und das Aktin-Zytoskelett von *asp1Δ/ mal3Δ* Doppelmutanten im Vergleich zu den jeweiligen Einzelmutanten untersucht. Dabei zeigt die untersuchte *asp1Δ/ mal3Δ* Doppelmutante einen additiven Effekt auf die Zellform. Bei der *mal3Δ* Einzelmutante sind 16,5% der untersuchten Zellen gekrümmt oder verzweigt, geschwollene Zellen treten nicht auf (Abb.5-30). Die *asp1Δ* Einzelmutante weist nur sehr wenige gekrümmte oder verzweigte Zellen auf und 2,4% der Zellen sind geschwollen (Abb.5-30). Bei der Doppelmutante sind hingegen 21,8% der Zellen gekrümmt oder verzweigt, 8,3% der Zellen sind geschwollen (Abb.5-30). Außerdem sind 8% der Zellen geschwollen und gleichzeitig gekrümmt oder verzweigt (Abb.5-30). Also verhalten sich die Morphologie-Phänotypen von *mal3Δ*-Mutanten und *asp1Δ* additiv.

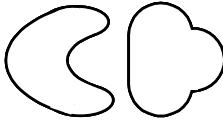
				
<i>mal3Δ</i>	83,5%	16,5%	-	-
<i>asp1Δ</i>	96,7%	0,9%	2,4%	-
<i>mal3Δ/ asp1Δ</i>	62,4%	21,8%	8,3%	7,0%

Abb.5-30: Die Deletionen von *mal3*⁺ und *asp1*⁺ führen zu additiven Morphologie Phänotypen.

Logarithmisch bei 24°C wachsende Zellen eines *mal3Δ/ asp1Δ* Stammes und der *mal3Δ* und *asp1Δ* Ausgangsstämme wurden analysiert. Angegeben sind die prozentualen Anteile von Wildtyp Zellformen, gekrümmten und verzweigten Zellen, sowie geschwollenen Zellen mit oder ohne Krümmung bzw. Verzweigung. Es wurden mindestens 234 Zellen pro Stamm analysiert.

Für die Untersuchung des Interphasen-Mikrotubuli-Zytoskeletts wurden der *mal3Δ*, *asp1Δ* und *asp1Δ/ mal3Δ* Stamm einer Tetrade verwendet. 97,5% aller *asp1Δ* Zellen weisen ein wildtypisches Interphasen-Mikrotubuli-Zytoskelett auf (Abb.5-31a). Bei der *mal3Δ* Einzelmutante weisen 98,3% aller Zellen extrem verkürzte Interphasen-Mikrotubuli auf (Abb.5-30a). Die Frequenzen, mit denen Aberrationen des Interphasen-Mikrotubuli-Zytoskeletts bei der Doppelmutante, auftreten liegen zwischen denen der *mal3Δ* und *asp1Δ* Einzelmutanten. So weisen nur 37,7% der Zellen extrem verkürzte Interphasen-Mikrotubuli auf, während bei 49,5% der Zellen das Interphasen-Mikrotubuli-Zytoskelett zwar aberrant ist, jedoch nicht so extrem wie bei *mal3Δ* (Abb.5-31a). Also zeigt das Interphasen-Mikrotubuli-Zytoskelett von *asp1Δ/ mal3Δ* Zellen keine additiven Effekte. Stattdessen scheint die Abwesenheit von *asp1*⁺ in einem *mal3Δ* Stamm-Hintergrund die Mikrotubuli-Defekte von *mal3Δ* Zellen teilweise aufzuheben.

a

				
<i>mal3Δ</i>	1,7%	98,3%	-	-
<i>asp1Δ</i>	97,5%	-	2,5%	-
<i>mal3Δ/asp1Δ</i>	11,8%	37,7%	18,3%	31,2%

b

						
<i>mal3-005R/G</i>	33,5%	42,8%	7,9%	15,8%	-	-
<i>asp1Δ</i>	29,9%	27,5%	3,0%	9,0%	5,2%	25,4%
<i>asp1Δ/ mal3-005R/G</i>	32,8%	22,4%	4,1%	10,4%	11,2%	19,1%

Abb.5-31: Das Interphasen-Mikrotubuli und das Aktin-Zytoskelett von *asp1Δ/ mal3-005R/G* Doppelmutanten.

a: Logarithmisch bei 18°C wachsende Zellen eines *mal3Δ*, *asp1Δ* und *mal3Δ/ asp1Δ* Stammes wurden fixiert. Tubulin wurde mittels eines anti- α -Tubuli, DNA mittels DAPI detektiert. Die Stämme stammen aus derselben Tetrade. Für die Analyse von Aberrationen des Interphasen-Mikrotubuli-Zytoskeletts wurden dieselben Kategorien wie in Abb.5-21 (1, 2, 3) verwendet. Angegeben sind die prozentualen Anteile von Zellen, die ein Wildtyp Interphasen-Mikrotubuli Zytoskelett aufweisen, sowie von Zellen, die verschieden stark verkürzte Interphasen-Mikrotubuli aufweisen. Es wurden mindestens 150 Zellen pro Stamm analysiert.

b: Logarithmisch bei 18°C wachsende Zellen eines *mal3-005R/G*, *asp1Δ* und *mal3-005R/G/ asp1Δ* Stammes wurden fixiert. Aktin wurde mittels Rhodamin-Phalloidin, DNA mittels DAPI detektiert. Die Stämme stammen aus derselben Tetrade. Angegeben sind jeweils prozentuale Anteile der angegebenen Aktin-Lokalisierungsmuster. Es wurden mindestens 100 Zellen pro Stamm analysiert.

Das Aktin-Zytoskelett wurde bei einer Tetrade, die aus einer Kreuzung von *mal3-005R/G* und *asp1Δ* hervorgegangen war, untersucht. Der *mal3-005R/G* Stamm weist keine Fehllokalisierung von Aktin-Flecken auf. Allerdings ist der Anteil von Zellen, die Aktin-Flecken an beiden Zellenden aufweisen, mit 42,8% (Abb.5-31b) signifikant höher als bei Wildtyp-Zellen (30% nicht gezeigt). Der *asp1Δ* Stamm hingegen unterscheidet sich von Wildtyp-Zellen durch eine Fehllokalisierung von Aktin-Flecken. So weisen 25,4% der Zellen Aktin-Flecken in der gesamten Zelle auf und nicht mehr ausschließlich an den Zellenden (Abb.5-31b). Diese Zellen sind immer geschwollen. Darüber hinaus kann bei 5,2% der Zellen kein Aktin mehr nachgewiesen werden (Abb.5-31b). Bei der Doppelmutante können zwei Effekte beobachtet werden. Zum einen weisen nur 22,4% der Zellen eine bipolare Verteilung der Aktin-Flecken auf, was den für Wildtyp-Zellen publizierten Werten entspricht (Abb.5-31b). Also wird die Akkumulation von Zellen mit Aktin-Flecken an beiden Zellenden bei

mal3-005R/G durch die Abwesenheit von *asp1*⁺ aufgehoben. Zum Zweiten treten auch bei der Doppelmutante Zellen auf die geschwollen sind und eine diffuse Aktin-Flecken-Verteilung aufweisen. Allerdings ist der Anteil mit 19,1% im Vergleich zur *asp1Δ* Einzelmutante leicht reduziert (Abb.5-31b). Dafür sind jedoch 11,2% der Zellen geschwollen und weisen überhaupt keine Aktin-Flecken mehr auf (Abb.5-31b). Im Vergleich zu *asp1Δ* ist der Anteil solcher Zellen also erhöht. Die Fehllokalisierung von Aktin-Flecken bei *asp1Δ* und *mal3-005R/G* verhält sich also leicht additiv.

Zusammenfassend haben Mal3 und Asp1 additive Effekte auf die Zellform und das Aktin-Zytoskelett, während die Aberrationen des Interphasen-Mikrotubuli-Zytoskeletts von *mal3Δ* Zellen in Kombination mit *asp1Δ* teilweise aufgehoben werden. Also scheinen Mal3 und Asp1 entgegengesetzte Funktionen bei der Organisation des Interphasen-Mikrotubuli-Zytoskeletts zu haben. Für die Zellform und das Aktin-Zytoskelett ist dies jedoch nicht der Fall. Stattdessen lassen die additiven Effekte lediglich den Schluss zu, dass Mal3 und Asp1 parallele Funktionen in unabhängigen Prozessen oder eine gemeinsame Funktion im selben Prozess (z.B. in einem Komplex) besitzen könnten.

5.3 Charakterisierung der genetischen Interaktion von *mal3*⁺ und *peg1*⁺

Ein DNA-Fragment, welches für die C-terminalen 483 Aminosäuren des Peg1 Proteins kodiert, supprimiert die TBZ-Hypersensitivität des *mal3-1* Stammes (Vietmeier-Decker 2004 und Abb.5-32a). Peg1 weist Homologie zu Mitgliedern der konservierten CLASP-Protein-Familie auf (Abb.5-32b). In der Mitose ist es während der Metaphase, wie auch humanes CLASP1 und *Drosophila* Mast/ Orbit, mit den Kinetochoren assoziiert (Lemos, Sampaio et al. 2000; Maiato, Fairley et al. 2003; Karig 2004). Während der Anaphase lokalisiert Peg1 wie die übrigen CLASP-Familien-Mitglieder auf der Spindel-Mittelzone (Karig 2004). Wie die Säuger Mitglieder CLASP1 und CLASP2 und *Drosophila* MAST/ Orbit, ist Peg1 mit den MTOCs und vermutlich auch Interphasen-Mikrotubuli assoziiert (Akhmanova, Hoogenraad et al. 2001); Persönliche Mitteilung Dr. Agnes Grallert). Ferner werden die Säuger CLASP1 und CLASP2 Proteine für die Integrität des Interphasen-Mikrotubuli-Zytoskeletts benötigt, indem sie Interphasen-Mikrotubuli stabilisieren (Akhmanova, Hoogenraad et al. 2001). Außerdem assoziieren CLASP1 und CLASP2 mit dem zu Mal3 homologen Protein EB1 und regulieren die Dynamik von Interphasen-Mikrotubuli am Zell-Kortex (Mimori-Kiyosue, Grigoriev et al. 2005).

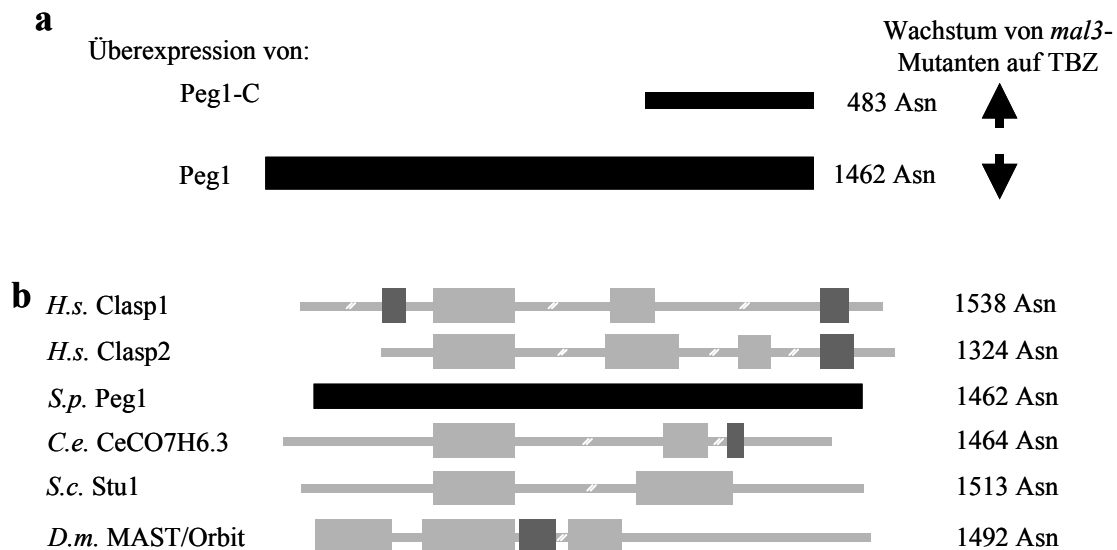


Abb.5-32: Peg1 weist Homologie zur CLASP-Protein-Familie auf, und ein C-terminales Fragment supprimiert die TBZ-Hypersensitivität von *mal3*-Mutanten.

a: Das C-terminale Peg1-Fragment und Vollängen Peg1 sind schematisch durch Balken dargestellt. Überexpression des C-terminalen Peg1-Fragments verbessert das Wachstum von *mal3*-Mutanten (Pfeil nach oben) in Gegenwart von TBZ (Karig, Doktorarbeit, HHU Düsseldorf, 2004). Überexpression von Vollängen Peg1 verschlechtert das Wachstum von *mal3*-Mutanten (Pfeil nach unten) in Gegenwart von TBZ.

b: Homologie-Vergleiche einzelner CLASP-Protein-Familien-Mitglieder mit Peg1. Die Vergleiche wurden mit dem BlastP Algorithmus (Altschul, Madden et al. 1997) erstellt. Dunkel graue Boxen: 27%- 31% identische Aminosäuren, hellgraue Boxen: 21%- 24% identische Aminosäuren. *H.s.*: *Homo sapiens*, *S.p.*: *Schizosaccharomyces pombe*, *C.e.*: *Caenorhabditis elegans*, *S.c.*: *Saccharomyces cerevisiae*, *D.m.*: *Drosophila melanogaster*. Datenbank-Identifikationsnummern: CLASP1: KIAA0622, CLASP2: KIAA0627, Peg1: Spac3G9.12, CeCO7H6.3: CeCO7H6.3, Stu1: YBL034C, MAST/Orbit: NP730597.

Durch weitere in unserer Arbeitsgruppe durchgeführte Analysen konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von Vollängen Peg1 im Gegensatz zum verkürzten Peg1 Fragment spezifisch die TBZ-Hypersensitivität von *mal3Δ* und *mal3*-Mutanten Zellen verstärkte (Karig 2004 und Abb.32a). Dies bedeutet, dass Vollängen Peg1 und das C-terminale Fragment von Peg1 sich funktionell von einander unterscheiden und das Peg1 und Mal3 vermutlich entgegengesetzte Funktionen haben. Um diese Funktionen weiter zu charakterisieren, wurden Doppelmutanten von *peg1* und *mal3* hergestellt und die Phänotypen dieser Doppelmutanten analysiert.

5.3.1 Mal3 und Peg1 haben antagonistische Funktionen

5.3.1.1 Die Deletion von *mal3*⁺ supprimiert die Temperatursensitivität von *peg1.1* Zellen und *peg1.1* supprimiert die TBZ-Hypersensitivität

Für die Herstellung von Doppelmutanten wurde der temperatursensitive Mutanten-Stamm *peg1.1* mit einem *mal3Δ* Stamm sowie verschiedenen *mal3*-Mutanten gekreuzt. Anschließend wurde das Wachstum von Doppelmutanten im Vergleich zu den jeweiligen Einzelmутanten und einem Wildtyp-Stamm bei erhöhten Temperaturen und der Gegenwart von TBZ

verglichen. Bei 34°C wachsen der Wildtyp sowie der *mal3Δ* Stamm gleich gut, während der *peg1.1* Stamm bei dieser Temperatur kein Wachstum mehr zeigt (Abb.5-33). Die *peg1.1/ mal3Δ* Doppelmutante wächst hingegen wildtypisch bei 34°C (Abb.5-33). Auch bei 36°C ist diese Tendenz zu beobachten, allerdings zeigt die Doppelmutante bei dieser Temperatur im Vergleich zum Wildtyp und *mal3Δ* stark reduziertes Wachstum (Abb.5-33). Diese Resultate konnten durch Bestimmung der Lebendzellzahl in *mal3Δ*, *peg1.1* und *mal3Δ/ peg1.1* Kulturen bestätigt werden (Kap.4.7.2). Dabei wurde gefunden, dass die Lebendzellzahl in *peg1.1* Kulturen bei 34°C und (stärker ausgeprägt) bei 36°C in einem Zeitraum von 24 Std. konstant abnimmt (Daten nicht gezeigt). Die Lebendzellzahl von *mal3Δ/ peg1.1* Kulturen ist bei 34°C nicht reduziert und nimmt bei 36°C langsamer ab als bei *peg1.1* Kulturen (Daten nicht gezeigt). Die Deletion von *mal3⁺* in einem *peg1.1* Stamm-Hintergrund ist also in der Lage, bei 34°C die Temperatursensitivität von *peg1.1* komplett und bei 36°C partiell aufzuheben. Da bei *peg1.1/ mal3Δ* Doppelmutanten die Temperatursensitivität von *peg1.1* supprimiert wird, stellte sich die Frage, ob im entgegengesetzten Fall *peg1.1* die TBZ-Hypersensitivität von *mal3Δ* aufheben kann. Deshalb wurde das Wachstum von *peg1.1/ mal3Δ* Doppelmutanten, *peg1.1*, *mal3Δ* und Wildtyp-Zellen in der Gegenwart von TBZ überprüft. Wildtyp und *peg1.1* Zellen wachsen in der Gegenwart von TBZ bei 24°C gleich gut (Abb.5-

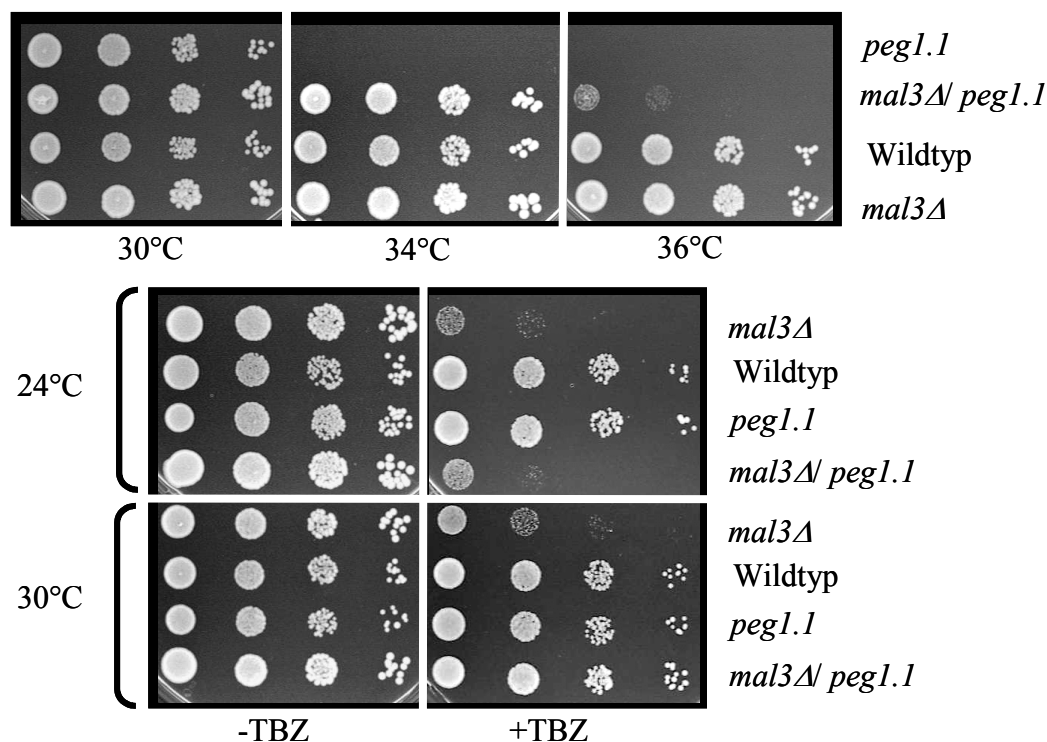


Abb.5-33: Peg1 und Mal3 haben antagonistische Funktionen.

Logarithmisch bei 24°C wachsende Zellen der vier angegebenen Stämme aus einer Tetrade wurden auf YE5S bei 30°C, 34°C und 36°C für 3 Tage inkubiert. Außerdem wurden Zellen bei 24°C und 30°C auf YE5S mit oder ohne 7 µg TBZ/ ml für 5 Tage inkubiert.

33). Die Doppelmutante und *mal3Δ* zeigen hingegen stark reduziertes Wachstum. Bei 24°C ist die Funktion des temperatursensitiven Peg1.1 Proteins höchst wahrscheinlich noch nicht oder nur marginal gestört. Bei erhöhten Temperaturen sollte die Funktion von Peg1.1 stärker eingeschränkt sein. Deshalb wurde das Wachstum von Doppelmutanten auch bei 28°C und 30°C in der Gegenwart von TBZ im Vergleich zu den Einzelmutanten und dem Wildtyp analysiert. Bei beiden Temperaturen gleicht das Wachstum der *peg1.1/mal3Δ* Doppelmutante dem Wachstum der *peg1.1* Einzelmutanten und des Wildtyps, während das Wachstum der *mal3Δ* Einzelmutante stark reduziert ist (Abb.5-33). Je stärker also die Funktion von Peg1

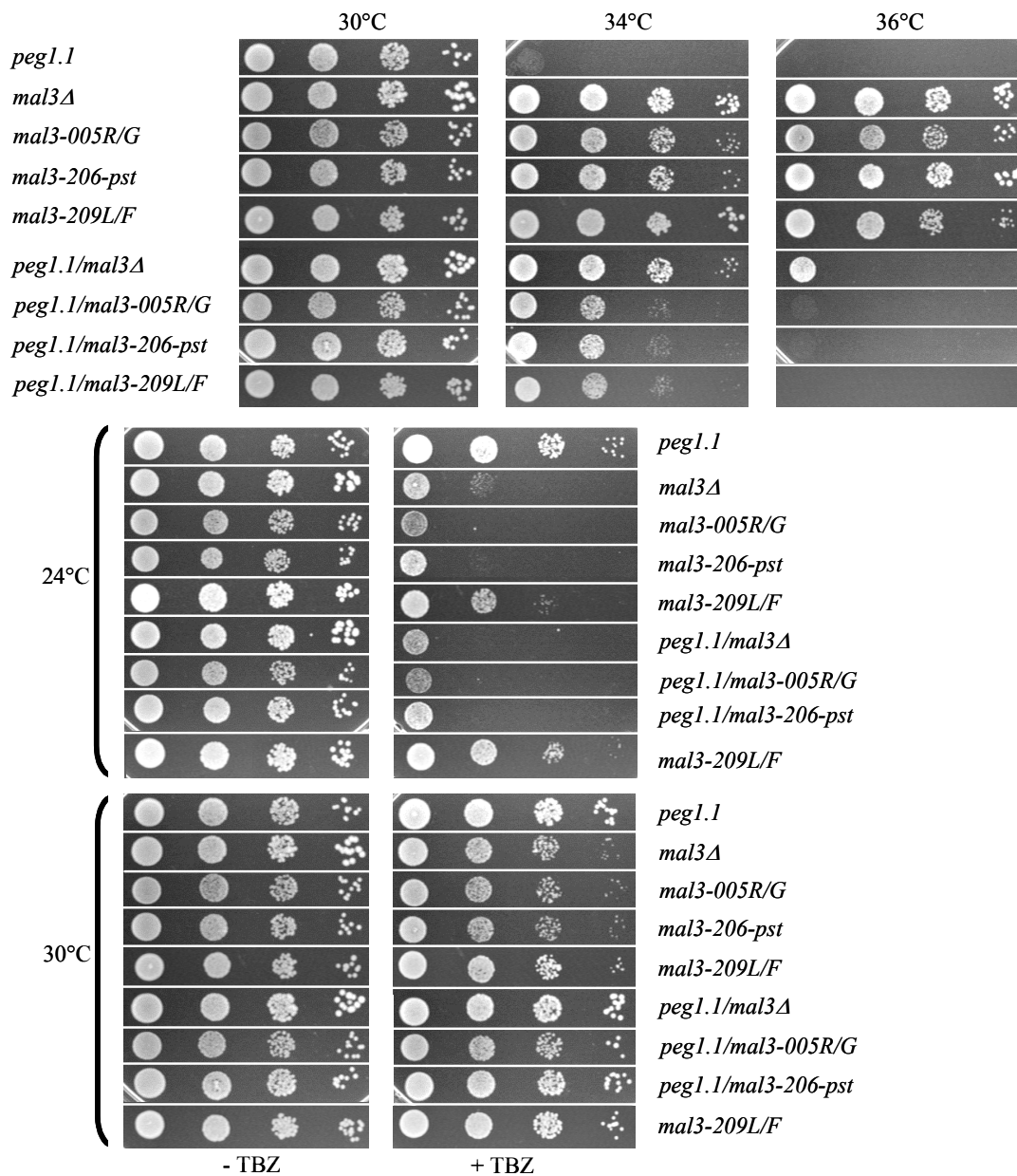


Abb.5-34: Mal3-Varianten heben die Temperatursensitivität von *peg1.1* nicht so gut auf, wie die Deletion von *mal3*⁺.

Logarithmisch bei 24°C wachsende Zellen der angegebenen Stämme wurden auf YE5S bei 30°C, 34°C und 36°C für 3 Tage inkubiert. Außerdem wurden Zellen bei 24°C bzw. 30°C auf YE5S mit oder ohne 7,5 µg TBZ/ ml für vier bzw. fünf Tage inkubiert.

inhibiert wird, desto besser kann die TBZ-Hypersensitivität von *mal3Δ* Zellen supprimiert werden. Für die Doppelmutanten *peg1.1/ mal3-005R/G*, *peg1.1/ mal3-206-pst* und *peg1.1/ mal3-209L/F* kann die gleiche Tendenz wie für *peg1.1/ mal3Δ* Doppelmutanten beobachtet werden (Abb.5-34). Allerdings wird die Temperatursensitivität von *peg1.1* durch die *mal3*-Mutanten nicht so gut aufgehoben wie durch die Deletion von *mal3*⁺ (Abb.5-34). Mutationen von *mal3*⁺ und *peg1*⁺ heben also bei Doppelmutanten abhängig von der Konzentration funktionellen Proteins gegenseitig ihre negativen Auswirkungen auf. Daraus kann geschlossen werden, dass Mal3 und Peg1 antagonistische Funktionen haben.

5.3.1.2 Die Länge von Interphasen-Mikrotubuli von *peg1.1/ mal3Δ* Doppelmutanten liegt zwischen den Längen von Interphasen-Mikrotubuli der beiden Einzelmutanten

Die antagonistische Funktion von Mal3 und Peg1 während der Mitose wurde von Dr. Inga Karig weiterbearbeitet, während meine Arbeit sich mit den antagonistischen Funktionen von Peg1 und Mal3 bei der Integrität des Interphasen-Mikrotubuli-Zytoskeletts beschäftigt. Wenn Mal3 und Peg1 tatsächlich antagonistische Funktionen haben, sollte sich dies auch im Mikrotubuli-Zytoskelett der Einzelmutanten und Doppelmutanten widerspiegeln. Deshalb wurde zunächst überprüft ob das Interphasen-Mikrotubuli-Zytoskelett von *peg1.1* Zellen Aberrationen aufweist. Dazu wurde das Interphasen-Mikrotubuli-Zytoskelett von *peg1.1* Zellen mit dem Interphasen-Mikrotubuli-Zytoskelett von Wildtyp und *mal3Δ* Zellen verglichen. Bei *mal3Δ* Zellen sind die Interphasen-Mikrotubuli extrem verkürzt, so dass die Mikrotubuli-Plus-Enden so gut wie nie die Zellenden erreichen (Abb.5-35a). Bei 36°C inkubierte *peg1.1* Zellen weisen durchschnittlich längere Interphasen-Mikrotubuli als Wildtyp Zellen auf. So treten Interphasen-Mikrotubuli auf, die sich um die Zellenden herumbiegen (Abb.5-35a). Also wirken sich ein defektes Mal3 und ein defektes Peg1 gegensätzlich auf das Interphasen-Mikrotubuli-Zytoskelett aus. Mal3 ist ein Mikrotubuli-Wachstum unterstützendes Protein, da es bei defektem Mal3 zur Ausbildung verkürzter Mikrotubuli kommt (Beinhauer, Hagan et al. 1997). Hingegen ist Peg1 ein Mikrotubuli-Wachstum inhibierendes Protein, da bei defektem Peg1 Interphasen-Mikrotubuli zu lang sind. Passend dazu konnte gezeigt werden, dass die Mikrotubuli in *peg1.1* Zellen im Vergleich zu Wildtyp Zellen bei 36°C für eine längere Zeitspanne wachsen, bevor ein „Katastrophe“ Ereignis eintritt (persönliche Mitteilung Dr. Grallert, PICR Manchester). Dabei führen Defekte bei beiden Proteinen zur Ausbildung aberranter Zellformen. So sind auch bei 36°C inkubierte *peg1.1* Zellen häufig gekrümmt oder verzweigt (Abb.5-35a). Diese Zellen sind oft elongiert. Allerdings weisen

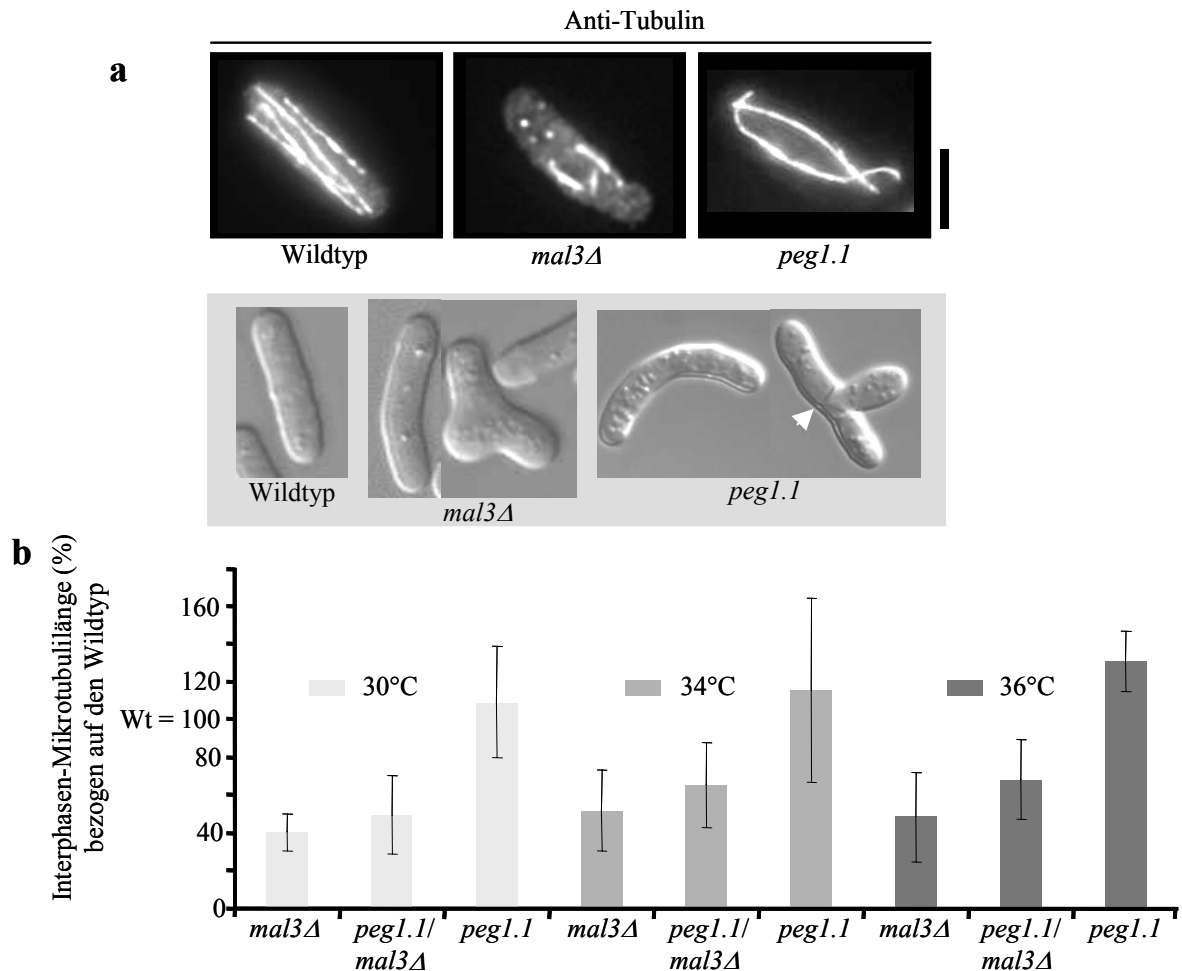


Abb.5-35: Peg1 und Mal3 haben antagonistische Einflüsse auf das Interphasen-Mikrotubuli-Zytoskelett.

a: Logarithmisch bei 24°C wachsende *peg1.1* Zellen wurden für sechs Stunden bei 36°C inkubiert und fixiert oder mittels Nomarsky-Mikroskopie auf aberrante Zellformen untersucht. Bei fixierten Zellen wurde Tubulin mittels eines anti- α -Tubulin Antikörpers nachgewiesen. Zum Vergleich ist auch das Interphasen-Mikrotubuli-Zytoskelett einer Wildtyp Zelle und einer *mal3Δ* Zelle gezeigt. Der weiße Pfeil im unteren rechten Bild markiert das Septum an dem die Verzweigung der *peg1.1* Zelle auftritt. Der schwarze Balken entspricht 5 μ m Länge.

b: Wildtyp, *peg1.1*, *mal3Δ* und *peg1.1/mal3Δ* Zellen wurden Ü/N bei 24°C und anschließend für sechs Stunden bei 30°C, 34°C oder 36°C inkubiert und fixiert. Tubulin wurde mittels eines anti- α -Tubulin Antikörpers nachgewiesen. Anschließend wurde die Länge (μ m) von Interphasen-Mikrotubuli mit Hilfe der Längen-Mess-Funktion der Openlab Software gemessen. Dabei wurden zwei Interphasen-Mikrotubuli-Bündel die miteinander in der Zellmitte überlappten und sich zu entgegengesetzten Zellenden erstreckten, als ein Bündel gemessen. Es wurden mindestens 15 Interphasen-Mikrotubuli pro Stamm und Temperatur gemessen und aus den jeweils erhaltenen Werten die Mittelwerte berechnet. Die bei jeder Temperatur für den Wildtyp erhaltenen Mittelwerte wurden auf 100% gesetzt. Für die Interphasen-Mikrotubuli der übrigen Stämme wurde ausgewertet wieviel Prozent der Wildtyp-Mikrotubuli-Länge die Interphasen-Mikrotubuli erreichen. Dies wurde graphisch aufgetragen.

peg1.1 Zellen, die verzweigt sind, immer ein Septum auf, das direkt neben der Position liegt, an der die Verzweigung auftritt (Abb.5-35a). Dies ist ein signifikanter Unterschied zu anderen Polaritätsmutanten (z.B. *mal3*-Mutanten), bei denen Verzweigungen unabhängig davon auftreten, ob die betroffenen Zellen Septen aufweisen.

Wenn Mal3 und Peg1 wirklich antagonistisch auf das Interphasen-Mikrotubuli-Zytoskelett wirken, dann sollten *peg1.1/mal3Δ* Doppelmutanten Interphasen-Mikrotubuli-Längen

aufweisen, die zwischen den Längen von Interphasen-Mikrotubuli der beiden Einzelmутanten liegen und wieder mehr den Interphasen-Mikrotubuli von Wildtyp Zellen gleichen. Aus diesem Grund wurden ein Wildtyp Stamm, eine *peg1.1/ mal3Δ* Doppelmutante sowie die beiden Einzelmутanten bei 30°C, 34°C und 36°C inkubiert und fixiert. Dabei ist die Funktion von Peg1.1 bei 30°C nicht so stark eingeschränkt wie bei 34°C und 36°C (Abb.5-33). Anschließend wurden die Längen von Interphasen-Mikrotubuli gemessen. Interphasen-Mikrotubuli in kurzen Zellen sind durchschnittlich kürzer als die Interphasen-Mikrotubuli in langen Zellen. Dies würde die erhaltenen Ergebnisse verfälschen. Um vergleichbare Werte für die verschiedenen Mutanten und den Wildtyp zu erhalten, wurden für diese Analyse nur Zellen, die zwischen 12,0 und 12,5 µm lang waren, verwendet. Dabei sind Interphasen-Mikrotubuli in Wildtyp Zellen bei allen drei Temperaturen durchschnittlich zwischen 8,8 (34°C) und 10 µm (30°C und 36°C) lang (Daten nicht gezeigt). In *mal3Δ* Zellen weisen Interphasen-Mikrotubuli durchschnittlich zwischen 40% und 49% der Länge von Wildtyp Interphasen-Mikrotubuli auf (Abb.5-35b). Die durchschnittlich größere Länge von Interphasen-Mikrotubuli in *peg1.1* Zellen im Vergleich zu Wildtyp Zellen nimmt mit steigender Temperatur zu. So sind Interphasen-Mikrotubuli in *peg1.1* Zellen bei 30°C im Schnitt 9%, bei 34°C 15% und bei 36°C 30% länger als in Wildtyp Zellen (Abb.5-35b). Je stärker also die Funktion von Peg1.1 eingeschränkt ist, desto länger werden Interphasen-Mikrotubuli. Bei 30°C weisen die Interphasen-Mikrotubuli von *peg1.1/ mal3Δ* Zellen 49% der Länge von Interphasen-Mikrotubuli in Wildtyp Zellen auf (Abb.5-35b). Dies ist im Vergleich zu *mal3Δ* Zellen nur marginal länger. Bei 34°C und 36°C jedoch weisen die Interphasen-Mikrotubuli von Doppelmutanten Zellen durchschnittlich 65% bzw. 68% der Länge von Wildtyp Interphasen-Mikrotubuli auf (Abb.5-35b). Dies ist eindeutig länger als bei *mal3Δ* Einzelmутanten. Ist also die Funktion von Peg1.1 stark eingeschränkt (bei 34°C und 36°C), können die verkürzten Mikrotubuli von *mal3Δ* Zellen teilweise aufgehoben werden und ihre Länge auf Werte angehoben werden, die mehr der Länge von Wildtyp Interphasen-Mikrotubuli gleichen. Ist die Funktion von Peg1.1 kaum eingeschränkt (bei 30°C), kann lediglich ein leichter Effekt beobachtet werden. Zusammengefasst bedeutet dies, dass Mal3 und Peg1 antagonistische Funktionen bei der Organisation des Interphasen-Mikrotubuli-Zytoskeletts haben.

6 Diskussion

6.1 Die Rolle der konservierten CH- und EB1-Domänen bei der Funktion von Mal3

Die Funktion der EB1-Proteine bei der Regulation des Mikrotubuli-Zytoskeletts wird seit einigen Jahren intensiv untersucht. Dabei fokussierten sich die meisten Studien auf die Rolle von EB1-Proteinen bei der Interaktion von Mikrotubuli-Plus-Enden mit Kinetochoren oder dem Zellkortex (Übersichtsartikel: Mimori-Kiyosue und Tsukita 2003). Eine zentrale Frage war hierbei die Rolle der konservierten CH- und EB1-Domänen bei der Funktion von EB1-Proteinen. Diese Studien wurden hauptsächlich *in vitro* durchgeführt oder es wurden partielle EB1-Protein-Fragmente in transfizierten Zelllinien überexprimiert (Fodde, Kuipers et al. 2001; Askham, Vaughan et al. 2002; Bu und Su 2003). Auf diese Weise wurden Rückschlüsse auf die Funktionen von EB1-Proteinen gezogen sowie den CH- und EB1-Domänen spezifische Rollen bei den Funktionen von EB1-Proteinen zugeordnet (Askham, Vaughan et al. 2002; Bu und Su 2003). Problematisch bei all diesen Studien ist jedoch, dass aufgrund der *in vitro* Situation bzw. der Überexpression von EB1-Proteinen oder Protein-Fragmenten nie absolut sicher auf die tatsächliche *in vivo* Relevanz der erhaltenen Daten geschlossen werden kann.

Bei der von mir gewählten *in vivo* Analyse wurden die Mal3-Varianten vom endogenen *mal3*-Promotor im genomischen *mal3*-Locus unter physiologischen Bedingungen exprimiert. Außerdem war die Konzentration von Mal3-Varianten in *mal3*-Mutanten-Zellen der Konzentration von Mal3 in Wildtyp Zellen ähnlich. Der einzige Unterschied zwischen Wildtyp Zellen und Zellen, welche Mal3-Varianten exprimierten, bestand lediglich in der einzelnen Aminosäureänderung, die bei der jeweiligen Variante vorgenommen worden war. Der Vorteil dieser Analyse besteht darin, dass die Auswirkungen der einzelnen Veränderungen bei Mal3 unter physiologischen Bedingungen untersucht werden konnten. Somit können aufgrund der beobachteten Phänotypen spezifischere Aussagen über die Rollen der CH- und EB1-Domänen bei der Funktion von Mal3 unter physiologischen Bedingungen gemacht werden.

6.1.1 Die CH-Domäne wird für die Bindung an Mikrotubuli benötigt

Vier von fünf der in dieser Arbeit analysierten CH-Mal3-Varianten assoziierten reduziert mit Mikrotubuli, während Aminosäure-Substitutionen in der EB1-Domäne keinen oder einen

schwächeren Effekt auf die Bindung an Mikrotubuli hatten. Dieser Effekt war in mitotischen Zellen und Interphase Zellen gleich stark ausgeprägt. Daraus folgt, dass die CH-Domäne für die Bindung an Mikrotubuli benötigt wird. Die Aminosäuren Serin 004, Arginin 005 und Lysin 047 spielen hierbei im Gegensatz zu Tryptophan 097 wichtige Rollen. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass eine andere Substitution von Tryptophan 097 einen stärkeren Effekt hervorgerufen hätte. Diese Resultate bestätigen Arbeiten, bei denen N-terminale Fragmente von humanem EB1, welche die CH-Domäne enthielten, in Zelllinien transient überexprimiert wurden (Askham, Vaughan et al. 2002; Bu und Su 2003). Dabei konnte gezeigt werden, dass die ersten 130 Aminosäuren von Säuger EB1 essentiell und ausreichend für die Bindung an Mikrotubuli sind, und dass einzelne Aminosäure-Substitutionen in der CH-Domäne zu einem kompletten Verlust der Mikrotubuli-Bindung führen können (Hayashi und Ikura 2003). Die Tatsache, dass in der CH-Domäne lokalisierte Mutationen die Bindung von Mal3 an Mikrotubuli negativ beeinflussen bedeutet in diesem Zusammenhang, dass die CH-Domäne von EB1-Proteinen generell für die Bindung an Mikrotubuli benötigt wird. Dabei scheinen einzelne Aminosäuren kritischer für die Bindung zu sein als andere (diese Arbeit und Hayashi und Ikura 2003).

6.1.1.1 Funktion einzelner Aminosäuren bei der Bindung der CH-Domäne an Mikrotubuli

Für die N-terminalen 130 Aminosäuren des humanen EB1-Proteins wurde die räumliche Struktur aufgeklärt (Hayashi und Ikura 2003). Dieses Fragment bildet eine aus sechs α -helicalen Bereichen bestehende globuläre Struktur aus. Die Aminosäure-Sequenzen der CH-Domänen von EB1-Proteinen sind sehr ähnlich. Dabei sind 28% aller Aminosäuren der CH-Domäne konserviert, wobei kurze Blöcke mit hoch konservierten Aminosäuren über die gesamte Länge der CH-Domäne zu finden sind. Zudem sind EB1-Proteine funktionell homolog (Beinhauer, Hagan et al. 1997; Nakamura, Zhou et al. 2001). Deshalb sind eine ähnliche räumliche Struktur, ein ähnlicher Funktionsmechanismus und gleiche Funktionen konservierter Aminosäuren der CH-Domänen von EB1 und Mal3 sehr wahrscheinlich. Die räumliche Struktur der CH-Domäne von Mal3 wurde basierend auf den Struktur-Daten von Hayashi und Nakamura simuliert. Sie weist eine zur CH-Domäne von humanem EB1 ähnliche Struktur auf (Abb.6-1a).

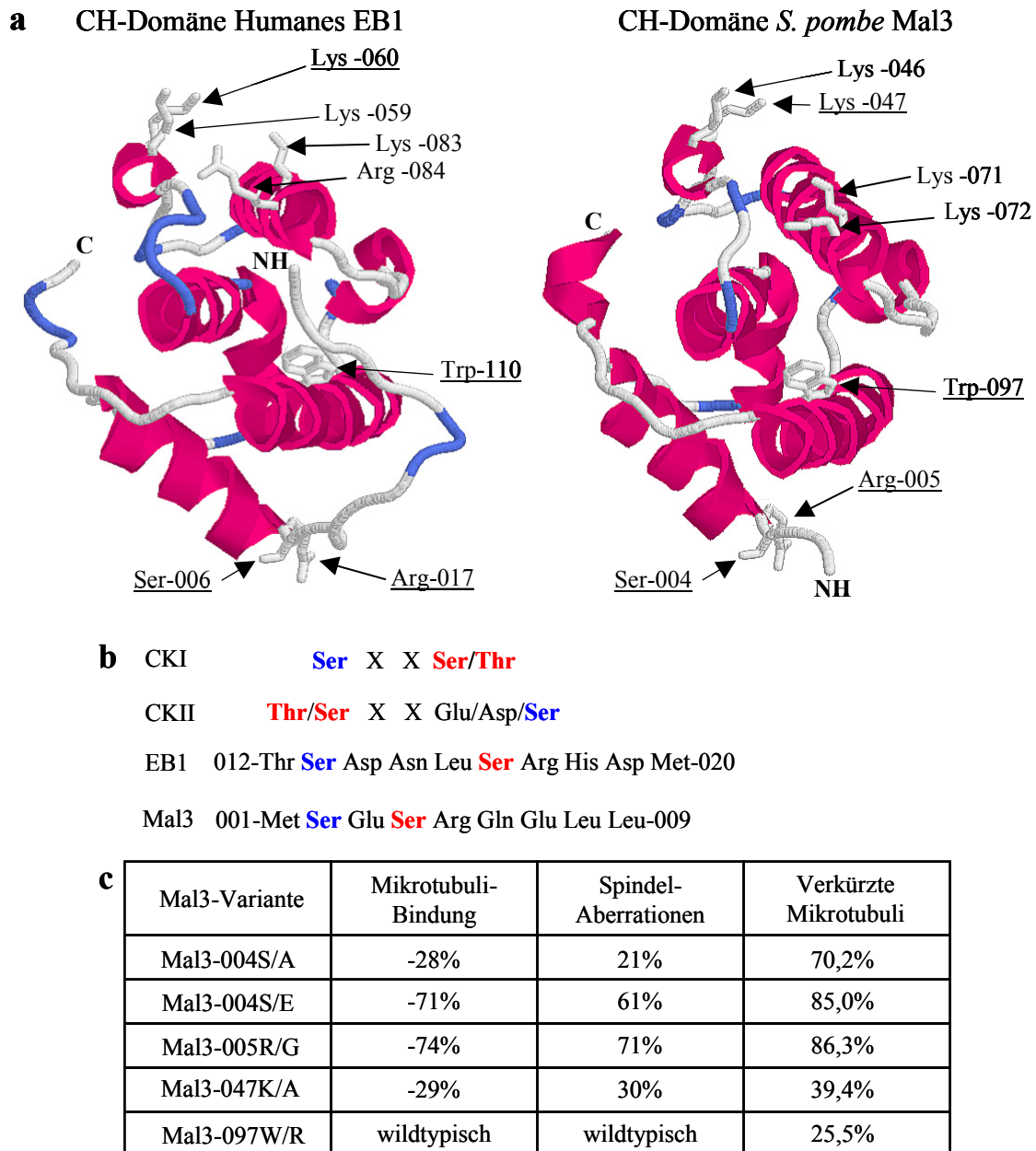


Abb.6-1: Computer-simulierte Position der substituierten Aminosäuren in der CH-Domäne.

a: Simulierte globuläre Struktur der Wildtyp EB1 und Mal3 CH-Domänen. Das Modell wurde unter Verwendung der für die CH-Domäne von humanem EB1 veröffentlichten Daten (pdb-file: 1PA7) durch die SwissProt Datenbank (swissmodel.expasy.org) erstellt. Unterstrichene Aminosäuren wurden bei den Mal3-Varianten substituiert. Die Darstellungen wurden mit dem Programm Rasmol erstellt. NH: Amino-Terminus; C: Carboxyl-Terminus

b: Casein Kinase I oder II Konsensussequenzen und putative Phosphorylierungssequenzen bei EB1 und Mal3. Blaue Reste müssen Phosphoryliert sein, damit Phosphorylierung am roten Rest erfolgen kann. „/“ bedeutet, dass eine der aufgeführten Aminosäuren an dieser Position liegen muss. „X“ bedeutet, dass eine beliebige Aminosäure an dieser Position liegen kann.

c: Zusammenfassung der Phänotypen-Intensitäten bei den verschiedenen CH-Mal3-Varianten. Um einfach zu vergleichende Werte zu haben sind nur die auffälligsten Werte angegeben. Angegeben sind von links nach rechts: 1. Untersuchte Mutante, 2. Reduktion auf Interphasen-Mikrotubuli (Kap.5.1.2.2), Metaphase Spindeln mit dünner Mittelzone (Kap.5.1.3.3) und die Frequenz mit der verkürzte Interphasen-Mikrotubuli auftreten (Kap.5.1.4.2, Phänotyp 2).

6.1.1.1.1 Serin 004 und Arginin 005 liegen in einer CKI/ CKII Phosphorylierungs-Konsensus- Sequenz

Phosphorylierung tritt als Modifikation bei Mikrotubuli-Binde-Domänen häufig auf, um die Bindung an Mikrotubuli (selten) positiv oder (meistens) negativ zu regulieren (Übersichtsartikel: Walczak 2000; Akhmanova, Hoogenraad et al. 2001; Zumbrunn, Kinoshita et al. 2001; Übersichtsartikel: Mimori-Kiyosue und Tsukita 2003; Übersichtsartikel: Galjart 2005; Wittmann und Waterman-Storer 2005). Ein gut charakterisiertes Beispiel für Mikrotubuli assoziierende Proteine, deren Bindung an Mikrotubuli durch Phosphorylierung reguliert wird, ist die Mikrotubuli-Wachstum fördernde tau-Protein-Familie. tau-Proteine binden entlang von Mikrotubuli mittels drei bis vier kurzer Bindemotive, deren Bindung unabhängig von einander durch Phosphorylierung inhibiert werden kann (Übersichtsartikel: Butner und Kirschner 1991; Übersichtsartikel: Drewes, Ebner et al. 1998). Mal3 wird ebenfalls phosphoryliert (Beinhauer 1999; Busch und Brunner 2004). Dabei ist jedoch unbekannt, an welcher/ welchen Positionen Phosphorylierung erfolgt und wie diese Proteinmodifikation die Funktion von Mal3 beeinflusst. Direkt am N-Terminus der CH-Domäne von Mal3 liegen das Serin 004 und das Arginin 005 (Abb.6-1a). Wie auch die bei humanem EB1 homologen Serin 016- und Arginin 017-Reste, sind diese beiden Reste sehr wahrscheinlich Oberflächen-exponiert. Das Serin 016 der humanen CH-Domäne liegt in Konsensus-Sequenzen, die von den Casein-Kinasen I und II (CKI und CKII) phosphoryliert werden (Hayashi und Ikura 2003 und Abb.6-1b). Es wurde postuliert, dass Serin 016 die einzige in einer Phosphorylierungs-Konsensus-Sequenz liegende Aminosäure ist, die exponiert ist (Hayashi und Ikura 2003).

CKI und CKII sind hoch konservierte Serin/ Threonin Kinasen, die eine Vielzahl unterschiedlicher Protein-Gruppen phosphorylieren (Übersichtsartikel: Meggio und Pinna 2003; Übersichtsartikel: Knippschild, Gocht et al. 2005). Auch Mikrotubuli assoziierte Proteine und Tubuline selbst werden von CKI und CKII phosphoryliert (Übersichtsartikel: Pinna 1990; Karki, Tokito et al. 1997; Zhang, Qiu et al. 2001; Wolff, Xiao et al. 2005). CKI weisen meistens eine spezifische Lokalisierung an subzellulären Strukturen wie z.B. Vesikeln, der mitotischen Spindel und Zellkernen auf (Übersichtsartikel: Gross und Anderson 1998), während CKII ubiquitär lokalisiert sind (Übersichtsartikel: Meggio und Pinna 2003). CKI und CKII erkennen spezifisch Serine und Threonine, die in negativ geladenen (sauren) Aminosäure-Sequenzen liegen (Übersichtsartikel: Meggio und Pinna 2003). Je saurer die umgebende Region ist, desto effizienter erfolgt die Phosphorylierung. Dabei scheint bei CKI ein weiteres phosphoryliertes Serin an Position -3 vor dem zu phosphorylierenden Serin bzw.

Threonin wichtig zu sein (Übersichtsartikel: Meggio und Pinna 2003). Bei CKII ist eine saure oder eine weitere phosphorylierte Aminosäure an Position +3 vom zu phosphorylierenden Serin/ Threonin aus essentiell für die Phosphorylierung (Übersichtsartikel: Meggio und Pinna 2003). Die Konsensus-Sequenzen für die Phosphorylierung durch CKI und CKII sind bei EB1-Proteinen allerdings nicht sehr stark konserviert (Abb.6-1b). Zunächst ist die Region um das betroffene Serin bei allen EB1-Proteinen nicht besonders sauer und es treten bei vielen EB1-Proteinen auch basische Aminosäuren auf, welche die Phosphorylierung stören müssten. Des weiteren liegt zwar bei den meisten EB1-Proteinen ein weiteres Serin, das phosphoryliert werden könnte in der Region, allerdings ist dieses nicht an der für CKI essentiellen Position -3 zu finden. Stattdessen liegt ein solches Serin z.B. bei Mal3 an Position +2 und bei humanem EB1 an Position +4. Die für die Phosphorylierung durch CKII essentielle saure Aminosäure an Position +3 ist jedoch bei allen EB1-Proteinen vorhanden (Abb.6-1b).

Aufgrund der möglichen Phosphorylierung an Serin 016 von humanem EB1 wurden für die homologe Aminosäure von Mal3 (Serin 004) die Mal3-Varianten Mal3-004S/A und Mal3-004S/E hergestellt. Dabei sollte der Austausch gegen das strukturell ähnliche Alanin eine Phosphorylierung an dieser Position blockieren. Der Austausch gegen Glutaminsäure sollte eine permanente Phosphorylierung simulieren (Gould und Feoktistova 1996). Sollte die Mikrotubuli-Bindung von Mal3 tatsächlich durch exklusive Phosphorylierung an diesem spezifischen Serin reguliert werden, so wäre zu erwarten gewesen, dass die beiden Substitutionen sich genau entgegengesetzt auswirken. Allerdings war dies nicht der Fall (Abb.6-1c). Jedoch assoziierte Mal3-004S/E wesentlich schlechter mit Mikrotubuli und rief auch sonst wesentlich stärkere Effekte als Mal3-004S/A hervor. Interessant ist in diesem Zusammenhang auch, dass die Substitution von basischem Arginin 005 gegen nicht basisches Glycin (Mal3-005R/G) ähnlich starke Effekte auf die Funktion von Mal3 hatte wie der Austausch von Serin 004 gegen Glutaminsäure (Abb.6-1b). Der Austausch gegen Glycin bei Mal3-005R/G bewirkt, dass die Aminosäuresequenz bei Serin 004 eher der Konsensussequenz für eine Phosphorylierung durch CKII entspricht als bei Wildtyp Mal3. Dies sollte eine mögliche Phosphorylierung von Serin 004 fördern, so dass im Vergleich zu Wildtyp Mal3 ein höherer Anteil von Mal3-005R/G phosphoryliert in der betroffenen Zelle vorliegt. Dies könnte die schlechtere Bindung von Mal3-005R/G an Mikrotubuli erklären. Zusammengenommen läßt dies den Schluss zu, dass Serin 004 wirklich phosphoryliert wird und die Phosphorylierung die Bindung von Mal3 an Mikrotubuli inhibiert. Allerdings assoziierte Mal3-004S/A nicht effizienter mit Mikrotubuli als Wildtyp Mal3. Somit müssen weitere Faktoren die Bindung von Mal3 an Mikrotubuli unabhängig von einer möglichen

Phosphorylierung an Serin 004 beeinflussen. Dies könnte z.B. durch Phosphorylierung anderer Aminosäuren geschehen. Stattdessen assoziierten Mal3-004S/A reduziert mit Mikrotubuli. Dieser Widerspruch kann durch zwei mögliche Szenarien erklärt werden. Zum einen könnte die Phosphorylierung von Serin 004 benötigt werden, um Mal3 effizient in die Nähe von Mikrotubuli zu rekrutieren. Dort könnte dann durch Dephosphorylierung die Bindung von Mal3 an Mikrotubuli ermöglicht werden. Zum anderen könnte die sequentielle Abfolge von Phosphorylierung/ Dephosphorylierung von Serin 004 und anderen Phospho-Aminosäuren für mögliche Bewegungen von Mal3 entlang von Mikrotubuli benötigt werden. Durch das Stören eines solchen Gleichgewichts könnte eine weniger stabile Assoziation mit Mikrotubuli hervorgerufen werden und eine reduzierte Assoziation von Mal3 mit Mikrotubuli bewirken.

Allerdings stellen die hier präsentierten Daten keinen Beweis für eine tatsächliche Phosphorylierung von Serin 004 dar. Somit kann nicht ausgeschlossen werden, dass die beobachteten Phänotypen aufgrund negativer Auswirkungen auf die räumliche Struktur der CH-Domäne zustande kommen. Dabei kommen z.B. sterische Hinderung mit anderen in dieser Region lokalisierten Aminosäuren sowie Ladungseffekte in Frage.

In diesem Zusammenhang ist auch interessant, dass CKI und CKII Familien-Mitglieder bei *S. pombe* identifiziert worden sind (Kearney, Ebert et al. 1994; Snell und Nurse 1994; Wang, Vancura et al. 1994; Verde, Mata et al. 1995; Kitamura und Yamashita 1998). Über die genauen Funktionen von CKI ist dabei noch relativ wenig bekannt. Alle CKI sind nicht essentiell und Abwesenheit von CKI scheint keine direkten Effekte auf die Mitose und polares Wachstum zu haben. Der einzige bislang bekannte Vertreter der CKII ist Orb5 (Snell und Nurse 1994; Verde, Mata et al. 1995). Orb5 wird benötigt, um die Lokalisierung von Aktin am Zellende in Zellendwachstum umzusetzen, vermutlich indem es Wachstumskomponenten aktiviert. (Snell und Nurse 1994). Orb5 Mutationen bewirken keine verkürzten oder elongierten Mikrotubuli (Snell und Nurse 1994). D.h., dass Mal3 seine Funktion bei der Mikrotubuli-Dynamik vermutlich noch korrekt ausführen kann. Also spielen vermutlich noch andere Kinasen eine Rolle bei der Phosphorylierung/ Regulation von Mal3 und damit Mikrotubuli-Wachstum. Zukünftige Experimente werden zeigen müssen, ob Mal3 wirklich an Serin 004 phosphoryliert wird und ob diese Phosphorylierung durch Orb5 erfolgt.

6.1.1.1.2 Lysin 047 ist Oberflächen exponiert und könnte eine Rolle bei der Interaktion mit Mikrotubuli spielen, während Tryptophan 097 in einer hydrophoben Region liegt und nicht für die Assoziation mit Mikrotubuli benötigt wird

Mikrotubuli-Binde-Domänen weisen häufig eine positive Gesamt-Ladung auf (Hayashi und Ikura 2003). Die Tubulin-Dimere in Mikrotubuli sind so angeordnet, dass der negativ geladene C-Terminus von Tubulin Oberflächen-exponiert ist, so dass er für positiv geladene Binde-Motive zugänglich ist und gebunden werden kann (Nogales, Whittaker et al. 1999). Bei der humanen CH-Domäne stehen drei Lysine und ein Arginin aus der globulären Struktur heraus und bilden solch eine positiv geladene Region (Abb.6-1a). Die drei Lysine sind bei Mal3 konserviert, stehen aus der simulierten globulären Struktur heraus und bilden ebenfalls eine positiv geladene Region (Abb.6-1a). Eines dieser drei Lysine ist das Lysin 047 (Abb.6-1a). Die zum Arginin der humanen CH-Domäne analoge Position bei Mal3 wird durch ein weiteres Lysin besetzt. Dieses steht in der simulierten Struktur allerdings in eine andere Richtung, so dass es nicht zu der positiv geladenen Region beiträgt. Dieser Unterschied zwischen der humanen CH-Domänen Struktur und der Mal3-CH-Domänen Struktur könnte aufgrund der Simulation zustande kommen. Somit besteht die Möglichkeit, dass dieser Unterschied zwischen der humanen CH-Domänen- und der Mal3-CH-Domänen-Struktur tatsächlich nicht besteht. Darüber hinaus wurde auch eine konservierte Oberflächen-exponierte hydrophobe Fläche identifiziert (Hayashi und Ikura 2003), welche auch bei Mal3 vorhanden zu sein scheint. Dabei liegen die beiden homologen Tryptophan Reste 097 (Mal3) und 110 (EB1) im Zentrum dieser hydrophoben Fläche (Abb.6-1a). Tryptophan 110 ist essentiell für die Stabilität der räumlichen CH-Domänen Struktur von EB1 (Hayashi und Ikura 2003). Hayashi et. al. postulierten aufgrund der Struktur-Daten und funktioneller *in vitro* Analysen, dass die Interaktion der CH-Domäne mit Mikrotubuli zum Teil durch elektrostatische Wechselwirkungen zustande kommt. Jedoch sollen die exponierten Lysin-Reste hierbei keine Rolle spielen. Stattdessen wurde postuliert, dass die Bindung an Mikrotubuli hauptsächlich durch hydrophobe Wechselwirkungen zustande kommt, die durch die hydrophobe Fläche vermittelt werden (Hayashi und Ikura 2003). Meine Analyse lässt jedoch genau den gegenteiligen Schluss zu. Unter physiologischen Bedingungen wird das Lysin 047 sehr wohl für die Bindung an Mikrotubuli benötigt (Abb.6-1c). Deshalb kann geschlossen werden, dass elektrostatische Wechselwirkungen für die Bindung von EB1-Proteinen an Mikrotubuli unter physiologischen Bedingungen benötigt werden. Gleichzeitig hatte die Substitution des hydrophoben Tryptophan 097 durch ein hydrophiles Arginin keine Auswirkungen auf die Funktion von Mal3 (Abb.6-1c). Dies macht eine Interaktion mit

Mikrotubuli über hydrophobe Interaktionen und eine Funktion von Tryptophan 097 bei der Stabilisierung der CH-Domänen-Struktur eher unwahrscheinlich. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass andere Aminosäure-Substitutionen von Tryptophan 097 oder anderer Aminosäuren in der hydrophoben Region nicht stärkere Effekte hervorgerufen hätten. Eine weitere Erklärung könnte allerdings auch sein, dass im Gegensatz zum N-terminalen EB1 Fragment, welches von Hayashi und Ikura verwendet wurde, die Substitution von Tryptophan 097 im Volllängen Protein durch Umlagerungen in der Struktur des Mal3 Proteins stabilisiert werden kann.

6.1.2 Die Aminosäure-Substitutionen in der EB1-Domäne haben einen schwachen Einfluss auf die Mikrotubuli-Bindung von Mal3

Die in der EB1-Domäne eingeführten Aminosäure-Substitutionen hatten nur einen schwachen Einfluss auf die Assoziation von Mal3 mit Mikrotubuli. So war die Assoziation von EB1-Mal3-Varianten mit Interphasen-Mikrotubuli um lediglich 2-14% reduziert (Abb.6-2d). Dies bedeutet, dass die bei EB1-Domänen-Mutanten-Stämmen beobachteten Phänotypen nicht aufgrund einer reduzierten Bindung von Mal3 an Mikrotubuli zustande kommen, sondern eine andere Funktion bei diesen EB1-Mal3-Varianten gestört sein muss. Eine Möglichkeit hierbei ist, dass die Interaktion mit anderen Proteinen ausser Tubulin gestört ist. Es ist bekannt, dass der C-Terminus von Mal3, inklusive der EB1 Domäne, für die Interaktion mit dem CLIP-Protein Tip1 benötigt wird (Brunner und Nurse 2000; Busch und Brunner 2004). Tip1 hat lediglich beim polaren Wachstum eine Funktion (Brunner und Nurse 2000). Also kann eine gestörte Interaktion mit Tip1 lediglich teilweise für die beobachteten Phänotypen verantwortlich sein.

Auch für EB1-Proteine aus anderen Organismen ist bekannt, dass die EB1-Domäne für die Bindung an Interaktionspartner benötigt wird (Miller, Cheng et al. 2000; Askham, Vaughan et al. 2002; Bu und Su 2003; Honnappa, John et al. 2005; Slep, Rogers et al. 2005). So wurde für Säuger EB1-Proteine durch Analyse von mutierten oder verkürzten Fragmenten gezeigt, dass die EB1-Domäne für die Interaktion mit anderen Mikrotubuli assoziierten Proteinen wie APC, p150/ Glued und MACF2 benötigt wird (Berrueta, Tirnauer et al. 1999; Askham, Vaughan et al. 2002; Bu und Su 2003; Honnappa, John et al. 2005; Slep, Rogers et al. 2005). Für das *S. cerevisiae* EB1-Protein Bim1 wurde gezeigt, dass es mittels seiner EB1-Domäne mit dem Kortex-Protein Kar9 an den Plus-Enden von Mikrotubuli interagiert (Miller, Cheng et al. 2000). Die Aminosäuresequenz, mit der APC, MACF2 und Kar9 an EB1 bzw. Bim1 binden, ist bei allen drei Proteinen konserviert (Übersichtsartikel: Bienz 2001, Honnappa

2004, Slep 2005). APC fördert Mikrotubuli-Wachstum *in vitro* und wird für die Interaktion von Mikrotubuli mit dem Zellkortex und dem Kinetochor benötigt (Munemitsu, Souza et al. 1994; Fodde, Kuipers et al. 2001; Nakamura, Zhou et al. 2001; Übersichtsartikel: Pellman 2001; Übersichtsartikel: Mimori-Kiyosue und Tsukita 2003). Die Assoziation von Kar9 mit Bim1 an den Plus-Enden von Mikrotubuli vermittelt die Interaktion von Mikrotubuli mit dem Zellkortex und wird abhängig davon für die korrekte Orientierung der mitotischen Spindel von *S. cerevisiae* entlang der Zell-Längsachse benötigt (Maekawa, Usui et al. 2003). MACF2 ist ein Spektraplaklin, welches Aktin und Mikrotubuli vernetzt und damit eine Rolle bei der Interaktion von Mikrotubuli mit dem Zellkortex während der Interphase spielt (Bernier, De Repentigny et al. 1998; Gregory und Brown 1998; Sun, Leung et al. 2001; Übersichtsartikel: Roper, Gregory et al. 2002; Kodama, Karakesisoglou et al. 2003; Slep, Rogers et al. 2005). Abwesenheit von MACF2 führt zu verlängerten Mikrotubuli, die ihr Wachstum am Zellkortex nicht abstoppen und sich um den Zellkortex herumbiegen (Kodama, Karakesisoglou et al. 2003). Für keines dieser drei Proteine wurde bis heute ein homologes Protein in *S. pombe* identifiziert. Deshalb ist es schwer, über mögliche Effekte, die gestörte Interaktionen möglicher Homologe dieser Proteine mit Mal3 haben könnten, zu spekulieren. Sollte ein APC Homolog in *S. pombe* existieren und ähnliche Funktionen wie bei Säugern übernehmen, könnten die beobachteten Phänotypen von EB1-Mal3-Varianten durch eine gestörte Interaktion mit diesem Protein zustande kommen. Sowohl Kar9 als auch MACF2 scheinen lediglich bei der Interaktion von Mikrotubuli-Plus-Enden mit dem Zellkortex eine direkte gemeinsame Funktion mit Bim1 bzw. EB1 zu haben. Ob eine gestörte Interaktion eines Kar9 bzw. MACF2 Homologs von *S. pombe* mit Mal3 zu den beobachteten Phänotypen sowohl in der Mitose als auch beim polaren Wachstum führen könnte, ist deshalb fraglich.

p150/ Glued wird für die Neubildung von Mikrotubuli und die Interaktion von Mikrotubuli mit dem Zellkortex und Kinetochoren benötigt (Wojcik, Basto et al. 2001; Ligon, Shelly et al. 2003; Übersichtsartikel: Schliwa und Woehlke 2003). Das p150/ Glued Homolog Ssm4 von *S. pombe* spielt nur bei der Paarung von Hefe-Zellen eine Rolle (Niccoli, Yamashita et al. 2004). Eine mögliche gestörte Interaktion von Mal3 und Ssm4 kommt also für die beobachteten Phänotypen nicht in Betracht.

Neben der Interaktion mit anderen Proteinen wird die EB1-Domäne jedoch auch für die Homo-Dimerisierung von Säuger EB1-Proteinen benötigt (Honnappa, John et al. 2005; Slep, Rogers et al. 2005 und Abb.6-2a). Es ist bekannt, dass auch Mal3 als Homo-Dimer vorliegt (Browning und Hackney 2005). Dabei scheint die Interaktion von EB1-Proteinen mit anderen Proteinen abhängig von der Homo-Dimerisierung zu sein (Honnappa, John et al. 2005).

Allerdings wurde in einer umfangreichen Mutanten-Analyse mit der humanen EB1-Domäne gezeigt, dass einzelne Aminosäure-Substitutionen in der EB1-Domäne in der Regel keine Auswirkungen auf die Dimerisierung haben (Slep, Rogers et al. 2005). Zusammengenommen lässt dies den Schluss zu, dass die bei EB1-Domänen-Mutanten-Stämmen beobachteten Phänotypen durch eine gestörte Interaktion, welche durch die Veränderung eines Binde-Motivs bewirkt wird, zustande kommen.

6.1.2.1 Auswirkungen einzelner Aminosäure-Substitutionen auf mögliche Binde-Motive für andere Proteine in der EB1-Domäne von Mal3

Auch die räumliche Struktur der EB1-Domäne von humanem EB1 wurde aufgeklärt (Honnappa, John et al. 2005; Slep, Rogers et al. 2005). Dabei bilden zwei EB1-Domänen ein Tetra-Helix-Bündel aus. Eine längere α -Helix aus einer EB1-Domäne windet sich um die analoge α -Helix der anderen EB1-Domäne, gefolgt von jeweils einer unstrukturierten Region, welche je in einer weiteren α -Helix mündet, die antiparallel zu den beiden ersten α -Helices verlaufen (Abb.6-2a). Dabei überkreuzen sich die beiden ersten α -Helices. Ein Computer-Modell für das Tetra-Helix-Bündel von Mal3 ist in Abb.6-2a angegeben. Aufgrund der starken Konservierung der EB1-Domäne wird angenommen, dass diese räumliche Struktur bei allen EB1-Familien-Mitgliedern vorkommt (Honnappa, John et al. 2005). Basierend auf den Struktur-Daten von Slep et. al. können alle in dieser Arbeit substituierten Aminosäuren zwei spezifischen Binde-Motiven zugeordnet werden, welche bei Säuger EB1 für die Bindung an andere Proteine benötigt werden (Wen, Eng et al. 2004; Honnappa, John et al. 2005; Slep, Rogers et al. 2005). Das erste Motiv ist eine Oberflächen-exponierte polare Region, die viele geladene, hydrophile Aminosäuren enthält und direkt vor dem zweiten Motiv liegt (Abb.6-2b). Das zweite Motiv wird durch die Überkreuzung der beiden längeren Helices und die beiden antiparallelen kleineren Helices gebildet. Dadurch wird eine hydrophobe Spalte ausgebildet, in die hydrophobe Aminosäuren eines Interaktionspartners „fassen“ können (Honnappa, John et al. 2005; Slep, Rogers et al. 2005). Für das humane EB1 Protein wurde durch Analyse von mutierten oder verkürzten Fragmenten gezeigt, dass die Interaktions-Motive der EB1-Domäne in unterschiedlichen Kombinationen für die Interaktion mit anderen Proteinen benötigt werden. Sowohl das erste als auch das zweite Motiv werden benötigt, damit humanes EB1 an APC und MACF2 binden kann. Allerdings wurde durch Mutanten-Analysen gezeigt, dass das erste Binde-Motiv nicht absolut essentiell für diese Interaktion ist (Wen, Eng et al. 2004; Slep, Rogers et al. 2005). Das zweite Motiv und die 20 C-terminalen Aminosäuren des EB1 Proteins werden für die Interaktion mit p150/ Glued benötigt, während

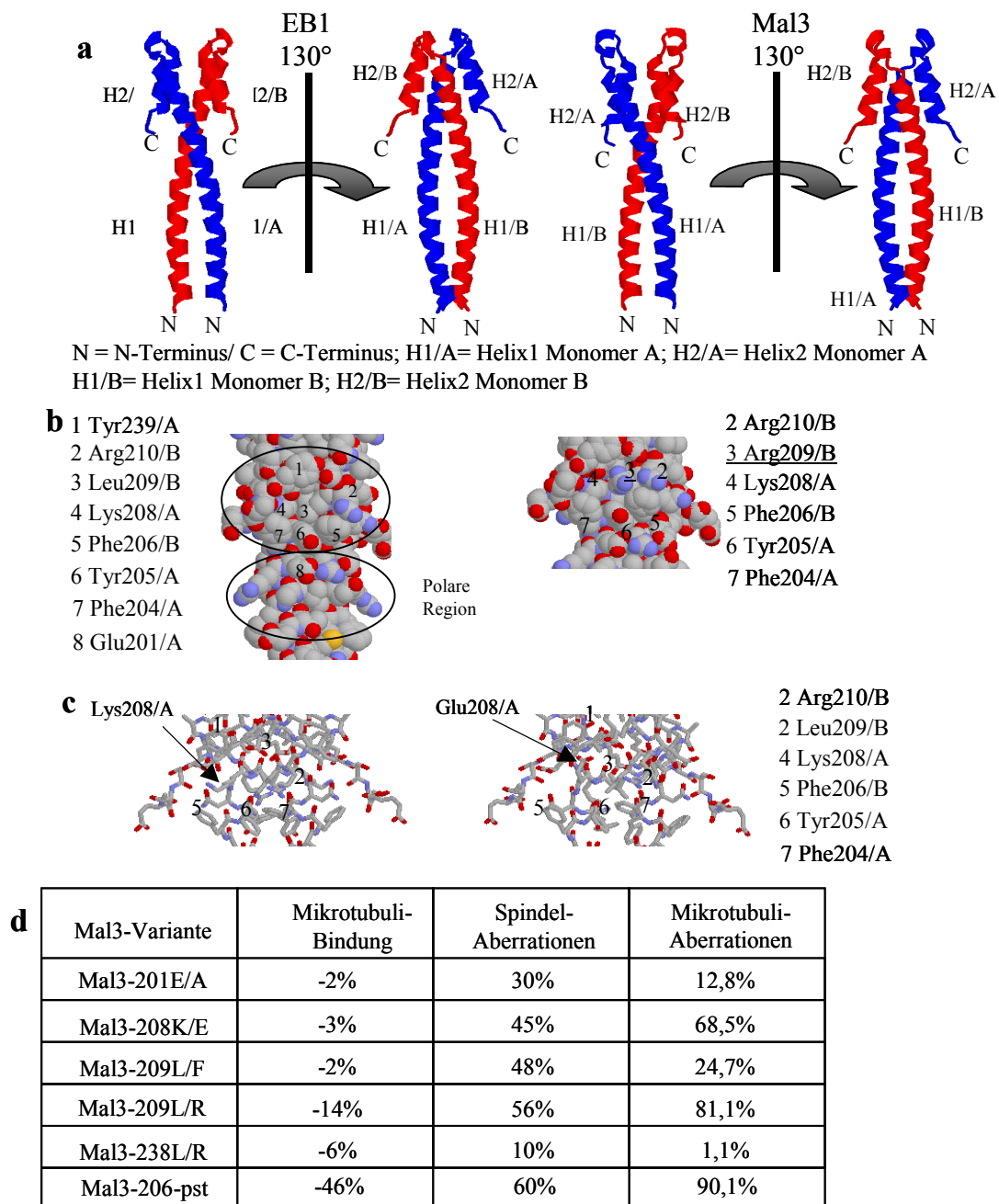


Abb.6-2: Computer-simulierte Position der substituierten Aminosäuren in der EB1-Domäne.

a: Simulierte Tetra-Helix-Bündel Struktur der EB1-Domänen von humanem EB1 und Mal3. Das Modell wurde unter Verwendung der pdb-Dateien 1yig und 1yib (humanes EB1) durch die SwissProt Datenbank (swissmodel.expasy.org) erstellt. Die Darstellungen wurden mit dem Programm Rasmol erstellt. N: Amino-Terminus; C: Carboxyl-Terminus.

b: Lokalisierung der substituierten Aminosäuren in der polaren Region und der hydrophoben Spalte. Die Zahlen auf den jeweiligen Aminosäuren geben an, um welche Aminosäure es sich jeweils handelt. Die Darstellungen wurden mit dem Programm Rasmol erstellt. Rechts sind die Auswirkungen der Substitution von Leucin durch Arginin an Position 209 dargestellt. Die Simulation wurde wie unter „a“ beschrieben unter Verwendung der veränderten Aminosäuresequenz erstellt.

c: Auswirkungen von Mal3-208K/E. Pfeile markieren die Position von Lysin 208 und der eingeführten Glutaminsäure 208. Die Simulation wurde wie unter „a“ beschrieben, unter Verwendung der veränderten Aminosäuresequenz erstellt.

d: Zusammenfassung der Phänotypen-Intensitäten bei den verschiedenen EB1-Mal3-Varianten. Um einfach zu vergleichende Werte zu haben sind nur die auffälligsten Werte angegeben. Angegeben sind von links nach rechts: 1. Untersuchte Mutante, 2. Reduktion auf Interphasen-Mikrotubuli (Kap.5.1.2.2), Metaphase Spindeln mit dünner Mittelzone (Kap.5.1.3.3) und die Frequenz mit der verkürzte Interphasen-Mikrotubuli auftreten (Kap.5.1.4.2, Phänotyp 2 oder 3).

das erste Interaktions-Motiv nicht benötigt wird (Askham, Vaughan et al. 2002; Wen, Eng et al. 2004; Honnappa, John et al. 2005; Slep, Rogers et al. 2005).

Glutaminsäure 201 steht wie die homologe Glutaminsäure bei humanem EB1 aus der Struktur des ersten Binde-Motivs heraus und könnte aufgrund seiner Ladung für elektrostatische Interaktionen mit anderen Proteinen benötigt werden. Die Substitution von Glutaminsäure 201 mit Alanin könnte dann eine mögliche Interaktion mit einem anderen Protein stören (siehe oben). Tatsächlich war die Funktion der EB1-Domäne bei Zellen, die Mal3-201E/A exprimieren, eingeschränkt, jedoch nicht so extrem wie bei anderen EB1-Mal3-Varianten. Da das erste Binde-Motiv für die Funktion anderer EB1-Proteine nicht essentiell zu sein scheint, liegt es nahe, dass dies auch bei Mal3 so ist. Dies könnte die beobachteten milden Phänotypen erklären (Abb.6-2d).

Lysin 208 liegt im zweiten Binde-Motiv und bildet eine Begrenzung der hydrophoben Spalte. In der Simulation steht der hydrophile Lysin-Rest von Mal3 wie der analoge Rest bei EB1 aus der hydrophoben Region heraus (Honnappa, John et al. 2005; Slep, Rogers et al. 2005), so dass er diese nicht beeinflusst. Der Austausch von Lysin 208 gegen die kleinere entgegengesetzt geladene Glutaminsäure könnte laut Computer-Modell dazu führen, dass der hydrophile Glutaminsäure-Rest in den hydrophoben Bereich hinein ragt und die Integrität dieses Bereichs stört (Abb.6-2c). In diesem Fall wäre zu erwarten, dass sich diese Substitution negativ auf die Funktion der EB1-Domäne auswirkt. Passend dazu konnten bei der hier durchgeführten Analyse moderate Phänotypen bei Zellen beobachtet werden, die Mal3-208K/E exprimierten (Abb.6-2d). Eine Substitution des analogen Restes (Lysin 220) von humanem EB1 gegen Alanin scheint sich stärker auszuwirken. So bindet die EB1-Domäne in *in vitro* Experimenten nicht mehr an den Interaktionspartner MACF2 (Slep, Rogers et al. 2005). Bis heute wurde kein MACF2 Homolog in Hefen identifiziert (siehe oben). Da die hydrophobe Spalte jedoch vermutlich generell eine Funktion bei der Interaktion mit anderen Proteinen hat, könnte bei *S. pombe* auch die Interaktion mit einem anderen Interaktionspartner betroffen sein (Askham, Vaughan et al. 2002; Bu und Su 2003; Wen, Eng et al. 2004; Slep, Rogers et al. 2005). Ursache für die beobachteten Unterschiede könnte sein, dass die Substitution mit unterschiedlichen Aminosäuren erfolgte. Allerdings kann auch der Schluss gezogen werden, dass Substitutionen an dieser Position sich unter physiologischen Bedingungen nicht so stark auswirken wie unter *in vitro* Bedingungen.

Leucin 209 und Leucin 238 liegen im simulierten EB1-Domänen-Modell wie die analogen Leucine bei humanem EB1 in der zweiten Binde-Domäne im Zentrum der hydrophoben Spalte (Abb.6-2b). Dabei liegt Leucin 209 direkt am Boden der hydrophoben Spalte. Leucin

209 wurde zum einen durch ein Phenylalanin, zum anderen durch ein Arginin substituiert. Leucin 238 wurde durch ein Phenylalanin substituiert. Bei Simulation dieser Substitutionen treten mit Phenylalanin keine starken Effekte auf. Der Unterschied zum jeweiligen Leucin besteht lediglich darin, dass Phenylalanin mehr Platz einnimmt, wodurch im Fall von Leucin 209 die hydrophobe Spalte verengt wird, bei Leucin 238 wird die Struktur der hydrophoben Spalte nicht beeinflusst. Passend dazu konnten bei der Substitution von Leucin 209 milde Phänotypen beobachtet werden, während die Substitution von Leucin 238 keine Effekte hatte. Simulation der Arginin Substitution lässt den Schluss zu, dass das größere Arginin mit seiner hydrophilen Gruppe aus der hydrophoben Spalte heraussteht und diese blockiert (Abb.6-2b). Aufgrund dessen wäre zu erwarten, dass diese Substitution stärkere Effekte als die Substitution gegen Phenylalanin hervorruft. Tatsächlich führte die Substitution von Leucin 209 gegen Arginin zu den stärksten Phänotypen, die für EB1-Mal3-Varianten mit Aminosäure-Substitutionen beobachtet werden konnten (Abb.6-2d).

Zusammenfassend kann also geschlossen werden, dass die Protein-Binde-Motive aus humanem EB1 auch bei Mal3 eine Funktion haben. Diese liegt sehr wahrscheinlich in der Interaktion mit anderen Proteinen.

6.1.3 Der C-Terminus von Mal3 wird für die effiziente Bindung an Mikrotubuli benötigt

Bei der verkürzten Variante Mal3-206-pst fehlen die letzten 97 Aminosäuren. Die Bindung von Mal3-206-pst an Mikrotubuli ist stark beeinträchtigt (Abb.6-2d). Also werden unter physiologischen Bedingungen die letzten 97 Aminosäuren für die effiziente Bindung an Mikrotubuli benötigt. Zellen, die Mal3-206-pst exprimieren, weisen nahezu dieselben Phänotypen auf wie Zellen, bei denen Mal3 komplett abwesend ist. Eine C-terminal um 56 Aminosäuren verkürzte Mal3-Variante kann bei leichter Überexpression die Phänotypen von *mal3Δ* Zellen supprimieren (Beinhauer, Hagan et al. 1997). Das impliziert, dass die letzten 56 Aminosäuren nicht absolut essentiell für die Funktion von Mal3 sind. Also kommt der bei Mal3-206-pst beobachtete Funktions-Verlust sehr wahrscheinlich durch den Verlust der übrigen 41 Aminosäuren zustande. Davon gehören 37 Aminosäuren zur insgesamt 52 Aminosäuren langen EB1-Domäne.

Für Mal3 wurde gezeigt, dass es Homo-Dimere ausbildet (Browning und Hackney 2005). Bei humanem EB1 wird dafür die gesamte EB1-Domäne benötigt (Honnappa, John et al. 2005; Slep, Rogers et al. 2005). Diese Dimerisierung scheint jedoch nicht für die Mikrotubuli-Bindung benötigt zu werden, da in Überexpressions-Studien die ersten 130 Aminosäuren von

EB1 ausreichen, um noch Mikrotubuli binden zu können (Hayashi und Ikura 2003). Es wäre möglich, dass Mal3-206-pst nicht mehr dimerisieren kann bzw. die Dimerisierung stark beeinträchtigt ist, da bei Mal3-206-pst über 70% der EB1-Domäne fehlen. Die starken Effekte, die bei Mal3-206-pst auftraten, würden dann bedeuten, dass in der *in vivo* Situation die Dimerisierung sehr wohl für eine effiziente Bindung an Mikrotubuli benötigt wird. Diese Möglichkeit wird durch eine in *Dictyostelium discoidum* durchgeführte Studie gestützt (Rehberg und Graf 2002). In dieser Studie wurde gezeigt, dass partiell deletierte EB1-Varianten, welchen die EB1 Domäne fehlt, nicht mehr oligomerisieren können und ebenfalls nicht mehr Mikrotubuli binden (Rehberg und Graf 2002). Zusammengenommen würde dies dann bedeuten, dass die Bindung des N-terminalen Fragments von humanem EB1 an Mikrotubuli vermutlich durch die Überexpression zustande kommt (Askham, Vaughan et al. 2002; Bu und Su 2003; Hayashi und Ikura 2003).

6.1.4 Die Funktionen von Mal3 in der Mitose und der Interphase lassen sich nicht trennen

Die hier durchgeführte Analyse ergab, dass alle analysierten Mutanten sowohl Defekte beim Ablauf der Mitose als auch beim polaren Wachstum aufweisen, oder sich bei beiden Prozessen wildtypisch verhalten. Das bedeutet, dass die Funktionen von Mal3 während der Mitose und des polaren Wachstums nicht getrennt werden können. Diese Funktionen liegen - wie auch bei den anderen EB1-Familien-Mitgliedern - in der Regulation der Mikrotubuli-Dynamik im Zytoplasma (Übersichtsartikel: Mimori-Kiyosue und Tsukita 2003; Busch und Brunner 2004) und vermutlich auch an den Kinetochor-Komplexen (Tirnauer, Canman et al. 2002; Übersichtsartikel: Mimori-Kiyosue und Tsukita 2003; Kerres, Vietmeier-Decker et al. 2004). Darüber hinaus wurde für die EB1-Proteine gezeigt, dass sie Funktionen bei der Interaktion von Mikrotubuli mit dem Zellkortex vermitteln (Übersichtsartikel: Mimori-Kiyosue und Tsukita 2003). Eine ähnliche Funktion für Mal3 wurde noch nicht gezeigt, ist jedoch wahrscheinlich. Außerdem wird Mal3 benötigt, um die Assoziation anderer Proteine an Mikrotubuli zu ermöglichen.

Im Folgenden soll darauf eingegangen werden, wie die Mutanten sich auf das Mikrotubuli-Zytoskelett auswirken.

6.1.4.1 Die Mal3-Varianten Mal3-004S/E und Mal3-005R/G bewirken stärkere Phänotypen als die komplette Abwesenheit von Mal3

Zellen die Mal3-004S/E oder Mal3-005R/G exprimierten, wiesen unter allen Test-Kriterien stärkere Phänotypen als Zellen auf, die kein Mal3 mehr exprimieren. Mal3-004S/E verhielt sich nicht dominant, d.h. Mal3-004S/E hat keine zusätzliche Funktion durch die Aminosäure-Substitution gewonnen. Da Mal3-005R/G sich ähnlich wie Mal3-004S/E verhielt, ist dies auch für Mal3-005R/G wahrscheinlich. Beide Mal3-Varianten assoziierten stark reduziert mit Mikrotubuli. Für die Säuger CH-Domäne wurde gezeigt, dass sie mit dem Formin mDia an Mikrotubuli-Plus-Enden interagiert (Wen, Eng et al. 2004). Diese Interaktion wird für die Ausbildung stabiler, undynamischer Mikrotubuli benötigt (Wen, Eng et al. 2004). Es besteht also generell die Möglichkeit, dass auch die CH-Domäne von Mal3 mit anderen Proteinen interagiert, die für die Integrität des Mikrotubuli-Zytoskeletts benötigt werden. Vor diesem Hintergrund könnten die stärkeren Phänotypen dieser beiden Varianten dadurch zustande kommen, dass sie aufgrund ihrer Modifikation spezifisch Proteine dauerhaft binden, die durch andere Mal3-Varianten und Wildtyp Mal3 nicht dauerhaft gebunden werden. So könnten Mal3-004S/E und Mal3-005R/G solche Proteine aus Prozessen, welche bei der Organisation des Mikrotubuli-Zytoskeletts eine Rolle spielen, wegtitrieren, für die diese Proteine benötigt werden. Dieser Effekt könnte dabei entweder durch eine permanente Phosphorylierung oder durch einen spezifischen negativen Einfluss auf die Struktur der CH-Domäne bei Mal3-004S/E und Mal3-005R/G bewirkt werden.

6.1.4.2 Wieso haben die verschiedenen *mal3*-Mutanten Probleme beim Aufbau einer bipolaren Spindel?

Bei *mal3Δ* Zellen, CH-Domänen-Mutanten und EB1-Domänen-Mutanten traten Probleme beim Aufbau einer bipolaren Metaphase-Spindel auf. Dadurch akkumulierten Metaphase Spindeln mit dünner Mittelzone. Mal3 wird also offensichtlich für den Aufbau einer korrekten bipolaren Spindel benötigt. Auch der Funktionsverlust von EB1-Proteinen aus anderen Organismen ruft Probleme beim Aufbau einer korrekten bipolaren Metaphasen Spindel hervor (Rehberg und Graf 2002; Rogers, Rogers et al. 2002). In diesen Studien wurde auch gezeigt, dass die für den Aufbau der Metaphasen Spindel benötigte Zeitspanne im Vergleich zu Wildtyp Zellen verlängert ist. Infolgedessen akkumulieren Zellen, welche sich in der Pro-Metaphase oder Metaphase befinden. Tatsächlich bewirkt auch die Deletion von *mal3*⁺ einen Anstieg in der Population von Metaphase Zellen (Beinhauer, Hagan et al. 1997). Außerdem

ist die Zeitspanne vom Beginn des Spindel-Aufbaus bis zum Eintritt in die Anaphase bei *mal3Δ* Zellen um 60% länger als bei Wildtyp Zellen (Asakawa, Toya et al. 2005). Also bewirken vermutlich auch Mal3-Varianten, dass die betroffene Zelle länger braucht, um eine korrekte Spindel aufzubauen.

Mal3 ist auf der gesamten mitotischen Spindel lokalisiert und für andere EB1-Proteine wurde gezeigt, dass sie mit allen polymerisierenden Mikrotubuli-Plus-Enden der Spindel assoziiert sind (Rogers, Rogers et al. 2002; Übersichtsartikel: Mimori-Kiyosue und Tsukita 2003; Asakawa, Toya et al. 2005). Damit ist es wahrscheinlich, dass Mal3 generell für die Dynamik bzw. Integrität von Spindel-Mikrotubuli benötigt wird. Dabei wäre vor allem bei einem defekten Aufbau von Pol zu Pol Mikrotubuli zu erwarten, dass Metaphase-Spindeln mit dünner Mittelzone ausgebildet werden. Die unterschiedlichen Frequenzen, mit denen Metaphase Spindeln mit dünner Mittelzone bei *mal3*-Mutanten auftraten, könnten in diesem Zusammenhang bedeuten, dass der Aufbau von Pol zu Pol Mikrotubuli in den verschiedenen Mutanten unterschiedlich stark verzögert sein könnte. Da einige Mutanten häufiger Metaphase-Spindeln mit dünner Mittelzone aufwiesen als die Deletion von *mal3*⁺, stellt sich die Frage, weshalb dies der Fall ist.

Die CH-Mal3-Varianten Mal3-004S/A und Mal3-047K/A assoziierten stark reduziert mit mitotischen Spindeln und Spindelpolkörpern. Gleichzeitig war die Frequenz, mit der Metaphase-Spindeln mit dünner Mittelzone auftreten, im Vergleich zu *mal3Δ* Zellen nur leicht erhöht. Dies könnte bedeuten, dass diese Mal3-Varianten ihre eigene Mikrotubuli-Wachstum fördernde Funktion nicht mehr korrekt ausführen können. Zusätzlich titrieren sie vermutlich andere Komponenten, die mit Mal3 interagieren und für die Integrität der mitotischen Spindel benötigt werden, von der Spindel weg, so dass diese ihre Funktion nicht mehr ausführen können. So könnte es zu stärkeren Phänotypen als bei *mal3Δ* Zellen kommen. Bei EB1-Mal3-Varianten traten Metaphase Spindeln mit dünner Mittelzone wesentlich häufiger auf als bei *mal3Δ* Zellen. Bis auf Mal3-206-pst war die Bindung dieser Varianten an die mitotische Spindel und Spindelpolkörper kaum reduziert. Vermutlich kommen die hier beobachteten Effekte durch eine gestörte Interaktion mit einem oder mehreren Proteinen zustande. Diese gestörte Interaktion müsste mehrere -vielleicht sogar normalerweise von Mal3 unabhängige- Proteine in ihren Funktionen am Mikrotubuli-Plus-Ende stärker behindern als die Abwesenheit von Mal3. Ein möglicher Interaktionspartner, dessen Funktion von Mal3-Varianten negativ beeinflusst werden könnte, ist das CLASP-Protein Peg1. Zellen, die Peg1.1 exprimieren, weisen wie *mal3*-Mutanten Metaphase-Spindeln mit dünner Mittelzone auf. Allerdings schaffen diese Spindeln es häufig nicht sich bipolar zwischen zwei

Spindelpolkörpern auszurichten, sondern „brechen“ auseinander. Dies führt zur Ausbildung monopolarer Spindeln, die nicht in die Anaphase eintreten können. Mal3-Varianten könnten in diesem Zusammenhang die Funktion von Peg1 stärker inhibieren als die Abwesenheit von Mal3. Allerdings muss eine Rest-Funktion noch vorhanden sein, da defekte Spindeln bei *mal3*-Mutanten normal in die Anaphase eintreten.

6.1.4.3 Abwesenheit und Defekte von Mal3 bewirken Probleme bei der Interaktion der mitotischen Spindel mit Kinetochoren und aktivieren den Spindel Kontrollpunkt

Mal3 ist auch mit Kinetochor-Mikrotubuli assoziiert. Deshalb ist es wahrscheinlich, dass die Mal3-Varianten oder die Abwesenheit von Mal3 sich ebenfalls negativ auf die Verknüpfung von Kinetochor-Mikrotubuli mit Kinetochoren auswirken. Humanes EB1 lokalisiert spezifisch an Kinetochoren, die mit polymerisierenden Mikrotubuli-Plus-Enden assoziiert sind (Tirnauer, Canman et al. 2002). Dabei spielt es bei der Interaktion von Kinetochor-Mikrotubuli mit den Kinetochoren eine Rolle, indem es APC an den Plus-Enden von Kinetochor-Mikrotubuli lokalisiert (Fodde, Kuipers et al. 2001; Kaplan, Burds et al. 2001; Green, Wollman et al. 2005). EB1 gebundenes APC assoziiert dann mit dem Kinetochor, so dass eine Verbindung zwischen Mikrotubulus und Kinetochor entsteht. Für *S. pombe* Mal3 ist eine ähnliche Funktion sehr wahrscheinlich, da Mal3 mit dem essentiellen Kinetochor-Protein Spc7 assoziiert ist, und Defekte von *mal3*-Mutanten durch zusätzliches Spc7 aufgehoben werden konnten (Kerres, Vietmeier-Decker et al. 2004). Mal3 interagiert ebenfalls mit dem CLASP-Protein Peg1, welches während der frühen Mitose ebenfalls mit den Kinetochoren assoziiert ist. CLASP-Proteine werden für die Einlagerung von Tubulin Dimeren an Plus-Enden von Mikrotubuli benötigt, die mit Kinetochoren verknüpft sind (Maiato, Khodjakov et al. 2005). Außerdem wurde postuliert, dass Mal3 für die Dynamik von Spindel-Mikrotubuli, welche mit den Kinetochoren verknüpft werden müssen, benötigt wird (Asakawa, Toya et al. 2005). Erfolgt die Verknüpfung von Mikrotubuli und Kinetochoren nicht, so wird der Spindel-Kontrollpunkt aktiviert. Dieser registriert fehlerhafte oder fehlende Verknüpfungen von Kinetochoren mit der mitotischen Spindel und verhindert dann den Übergang von der Metaphase in die Anaphase (Übersichtsartikel: Cleveland, Mao et al. 2003; Übersichtsartikel: Tan, Rida et al. 2005). Abwesenheit von *mal3*⁺ aktiviert spezifisch den Teil des Spindel-Kontrollpunkts, der auf Kinetochore reagiert, bei denen aufgrund fehlerhafter Verknüpfung nicht der für die Separation notwendige Zug zu den entgegengesetzten SPKs entsteht (Asakawa, Toya et al. 2005). Der Spindel-Kontrollpunkt scheint auch bei den hier

analysierten *mal3*-Mutanten aktiviert zu sein, da er bei *mal3-004S/E* Zellen aktiviert war. Zusammengenommen könnte dies bedeuten, dass die Funktion der Mal3-Varianten bei der Verknüpfung von Kinetochoren mit Kinetochor-Mikrotubuli gestört ist. Abwesenheit von Mal3, Reduktion von CH-Mal3-Varianten auf Mikrotubuli und gestörte Interaktionen von EB1-Mal3-Varianten mit anderen Proteinen, wie zum Beispiel Spc7, Peg1 oder einem möglichen APC Homolog in *S. pombe* könnten hierfür verantwortlich sein. Für eine defekte Verknüpfung von Spindel und Kinetochoren spricht auch die Tatsache, dass Überexpression von Spc7 die TBZ-Hypersensitivität von *mal3*-Mutanten supprimieren konnte. Allerdings konnte gezeigt werden, dass eine Auswahl von Mal3-Varianten noch mit Spc7 assoziiert war. Also müsste die Interaktion mit einem anderen Kinetochor-Protein gestört sein, die Assoziation mit Spc7 in *mal3*-Mutanten schwächer sein, oder die Assoziation mit Spc7 erfolgt bei diesen Mutanten nicht am Kinetochor. Spc7 war in *mal3*-Mutanten Zellen während der Metaphase jedoch normal an Kinetochoren lokalisiert. Mal3-Varianten müssten dann also mit einer Subpopulation von Spc7 im Nukleoplasma assoziieren. Deshalb ist es wahrscheinlicher, dass die Assoziation von Mal3-Varianten mit Spc7 geschwächt ist, was in dieser Studie nicht gezeigt werden konnte.

6.1.4.4 Die konservierten CH- und EB1-Domänen wirken auf unterschiedliche Weise auf die Mikrotubuli-Dynamik ein

+TIPs regulieren die Dynamik von Mikrotubuli dadurch, dass sie „Katastrophe“ oder „Neu-Wachstum“ Ereignisse verhindern bzw. herbeiführen (Übersichtsartikel: Mimori-Kiyosue und Tsukita 2003). So unterstützt *S. pombe* Mal3 Mikrotubuli-Wachstum, indem es die Mikrotubuli-Dynamik als Anti-„Katastrophe“-Faktor beeinflusst (Busch und Brunner 2004). Folglich wachsen Interphasen-Mikrotubuli von *S. pombe* Zellen bei Abwesenheit von Mal3 für eine kürzere Zeitspanne und sind stark verkürzt (Beinhauer, Hagan et al. 1997). Verkürzte Interphasen-Mikrotubuli bewirken, dass die betroffenen Zellen aberrante Zellformen ausbilden (Beinhauer, Hagan et al. 1997; Browning, Hayles et al. 2000; Brunner und Nurse 2000; Übersichtsartikel: Hayles und Nurse 2001). Hier wurde gezeigt, dass sowohl die CH- als auch die EB1-Domäne von Mal3 für wildtypisches Mikrotubuli-Wachstum benötigt werden. Folglich waren die Interphasen-Mikrotubuli bei *mal3*-Mutanten verkürzt. Abhängig davon wie stark dieser Phänotyp ausgeprägt war, wurden aberrante Zellformen ausgebildet. Die CH-Domäne wird für die Bindung von Mal3 an Mikrotubuli benötigt. Für die EB1-Domäne von anderen EB1-Proteinen ist bekannt, dass sie für die Interaktion mit anderen Proteinen benötigt werden (Miller, Cheng et al. 2000; Askham, Vaughan et al. 2002; Bu und

Su 2003; Honnappa, John et al. 2005; Slep, Rogers et al. 2005). Des weiteren konnte in einer *in vitro* Studie gezeigt werden, dass humanes Volllängen EB1 Mikrotubuli nur polymerisieren kann, wenn es mit dem Interaktionspartner APC oder p150/ Glued assoziiert ist (Nakamura, Zhou et al. 2001; Hayashi, Wilde et al. 2005). Kürzlich wurde außerdem gezeigt, dass ein verkürztes EB1-Fragment, dem die Bindestelle für p150/ Glued fehlt, *in vitro* Mikrotubuli polymerisieren kann (Hayashi, Wilde et al. 2005). Diesem EB1-Fragment fehlen die letzten C-terminalen 20 Aminosäuren, die einen flexiblen „Schwanz“ hinter der EB1-Domäne ausbilden, der wie auch die EB1-Domäne mit p150/ Glued interagiert (Hayashi, Wilde et al. 2005). Daraus wurde geschlossen, dass EB1 eine intrinsische Mikrotubuli-polymerisierende Funktion hat. Der C-Terminus von EB1 übt jedoch eine autoinhibitorische Wirkung auf diese Funktion aus, die durch Bindung von Interaktionspartnern aufgehoben werden kann (Hayashi, Wilde et al. 2005). Ein möglicher Funktionsmechanismus von Mal3 wäre demnach, dass Mal3 mittels der CH-Domäne an Mikrotubuli bindet und Mikrotubuli polymerisiert. Die EB1-Domäne von Mal3 könnte dabei mit anderen Proteinen interagieren, welche die Funktion von Mal3 aktivierend oder inhibierend beeinflussen. Zusätzlich könnten solche Proteine auch eigenständig das Wachstum von Mikrotubuli beeinflussen, nachdem sie von Mal3 an das Mikrotubuli-Plus-Ende rekrutiert wurden.

Ein solches Protein könnte das mit dem C-Terminus von Mal3 interagierende Tip1 Protein sein. Tip1 gehört zur CLIP-Protein-Familie und assoziiert abhängig von Mal3 mit Mikrotubuli und Zellenden (Brunner und Nurse 2000; Busch und Brunner 2004). Dabei war jedoch nicht bekannt, wie Mal3 die Lokalisierung von Tip1 auf Mikrotubuli genau beeinflusst. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Mal3 an Mikrotubuli gebunden sein muss, damit Tip1 mit Mikrotubuli assoziieren kann. Zusätzlich konnte auch gezeigt werden, dass die Interaktion von Tip1 mit Mikrotubuli durch die EB1-Domäne von Mal3 beeinflusst wird. Deshalb ist es sehr wahrscheinlich, dass spezifisch die EB1-Domäne von Mal3 für die Interaktion mit Tip1 benötigt wird. Mal3 könnte also als eine Art „Andockstelle“ für Tip1 an Mikrotubuli dienen. Tip1 könnte dann entweder als Modulator der Mal3-Funktion dienen oder eigenständig auf die Dynamik von Mikrotubuli wirken. Ein ähnlicher Mechanismus ist auch bei höheren Eukaryoten möglich, da auch das humane CLIP-Protein (CLIP170) das EB1 Protein benötigt, um stabil mit Mikrotubuli-Plus-Enden assoziieren zu können (Komarova, Lansbergen et al. 2005).

Tip1 fördert Mikrotubuli-Wachstum (Busch und Brunner 2004). Folglich sind Interphasen-Mikrotubuli in *tip1Δ* Zellen verkürzt (Brunner und Nurse 2000; Busch und Brunner 2004). Dies eröffnet die Möglichkeit, dass die verkürzten Mikrotubuli in den *mal3*-Mutanten

zumindest teilweise aufgrund einer Reduktion von Tip1 an Mikrotubuli-Plus-Enden zustande kommen könnten. Z.B. war die Mikrotubuli-Wachstums-Dauer in *mal3-201E/A* Zellen um 40% kürzer als in Wildtyp Zellen. Gleichzeitig ist Tip1 an den Mikrotubuli-Plus-Enden leicht reduziert. In diesem Zusammenhang ist auch interessant, dass die für *mal3-004S/A* und *mal3-209L/R* gemessenen Mikrotubuli-Wachstumszeiten den Mikrotubuli-Wachstumszeiten eines *tip1Δ* Stammes gleichen (persönliche Mitteilung Dr. Grallert, PICR, Manchester). Es wurde nicht getestet, ob oder wie stark die Bindung von Tip1 an Mikrotubuli in diesen beiden Stämmen beeinträchtigt war. Deshalb kann nur spekuliert werden, dass die verkürzten Wachstumszeiten von Mikrotubuli in diesen Stämmen zumindest teilweise durch die Abwesenheit von Tip1 am Plus-Ende zustande kommen.

Zusammenfassend kann jedoch gesagt werden, dass die Möglichkeit besteht, dass Mal3 die Mikrotubuli-Dynamik nicht nur durch seine eigene Funktion beeinflusst sondern auch durch die Lokalisierung anderer Proteine. Zudem besteht die Möglichkeit, dass wie bei humanem EB1 die Funktion von Mal3 bei der Mikrotubuli-Dynamik durch Interaktionspartner moduliert wird. Weitere Studien werden zeigen müssen, wie Mal3 die Mikrotubuli-Dynamik genau beeinflusst und ob/ wie die Funktion von Mal3 durch Interaktionspartner dabei beeinflusst wird.

6.1.4.5 Die Lokalisierung von Tea1 an Mikrotubuli und Zellenden ist von Mal3 abhängig

Tea1 ist ein Zellendfaktor, der Wachstumszonen definiert (Mata und Nurse 1997; Übersichtsartikel: Bretscher, Edwards et al. 2002; Snaith, Samejima et al. 2005). Tea1 wird auf Mikrotubuli-Plus-Enden zu den Zellenden transportiert, wo es abgeladen wird, und der Mikrotubulus nach kurzer Zeit zurückschrumpft (Behrens und Nurse 2002). Bei Aberrationen des Mikrotubuli-Zytoskeletts kann Tea1 nicht mehr korrekt lokalisiert werden. So kann es zu falsch lokalisierten Wachstumszonen kommen (Sawin und Snaith 2004).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sowohl die Assoziation von Mal3 mit Interphasen-Mikrotubuli wie auch die Funktion der EB1-Domäne benötigt werden, um Tea1 an Interphasen-Mikrotubuli-Plus-Enden zu lokalisieren. Die verkürzten Interphasen-Mikrotubuli von *mal3*-Mutanten führten dazu, dass Tea1 nicht mehr korrekt an den Zellenden lokalisiert war. Deshalb kann geschlossen werden, dass die Fehllokalisierung von Tea1 in *mal3*-Mutanten zu aberranten Zellformen führt, weil Tea1 fehlerhaft am Zellkortex akkumuliert und dort Wachstumszonen definiert. Dabei ähnelt das in *mal3*-Mutanten beobachtete aberrante Tea1 Lokalisierungsmuster dem von Tea1 in *tip1*- und *tea2*-Mutanten

(Browning, Hayles et al. 2000; Brunner und Nurse 2000). Tip1 und das Kinesin-Motorprotein Tea2 werden für den Transport von Tea1 entlang von Interphasen-Mikrotubuli zu den Mikrotubuli-Plus-Enden benötigt (Browning, Hayles et al. 2000; Brunner und Nurse 2000). Tip1 interagiert dabei mit Tea1. Tea2 und Tip1 assoziieren mit Mal3, und Mal3 wird für die Lokalisierung beider Proteine an Mikrotubuli benötigt (Browning, Hackney et al. 2003; Busch und Brunner 2004). Mal3 selbst interagiert nicht mit Tea1 (persönliche Mitteilung Dr. Grallert, PICR, Manchester). Tea1 war hauptsächlich in *mal3*-Mutanten fehllokalisiert, bei denen auch Tip1 fehllokalisiert war. Deshalb ist es wahrscheinlich, dass Mal3 die Lokalisierung von Tea1 an Mikrotubuli indirekt darüber beeinflusst, dass es für die Lokalisierung von Tip1 und Tea2 an Mikrotubuli benötigt wird.

6.1.5 Zusammenfassung für die Mal3-Varianten

In dieser Studie wurden *mal3*-Mutanten hergestellt, die Mal3-Varianten mit Veränderungen in den bei allen EB1-Proteinen hoch konservierten CH- und EB1-Domänen exprimieren. Durch Analyse dieser Mutanten konnte eine Funktion der CH-Domäne bei der Bindung an Mikrotubuli bestätigt werden. Die hier aufgeführten Daten lassen zusätzlich den Schluss zu, dass diese Interaktion durch elektrostatische Wechselwirkungen vermittelt wird. Zusätzlich wurde der Verdacht erhärtet, dass diese Bindung durch Phosphorylierung an einem konservierten Lysin am N-Terminus der CH-Domäne reguliert wird. Ferner implizieren die präsentierten Daten eine Funktion der EB1-Domäne bei der Dimerisierung und Protein-Protein-Interaktion von EB1-Proteinen. Des weiteren lassen die gefundenen Phänotypen von *mal3*-Mutanten den Schluss zu, dass beide konservierten Domänen für die Funktion von Mal3 bei der Mikrotubuli-Dynamik benötigt werden. Allerdings bleibt offen, wie Mal3 selbst Mikrotubuli-Wachstum fördert und welche Rolle die beiden konservierten Domänen bei dieser Funktion spielen. Bis jetzt kann lediglich gesagt werden, dass die CH-Domäne Mikrotubuli bindet, während die EB1-Domäne zumindest teilweise durch Interaktion mit anderen Proteinen einen Einfluss auf die Mikrotubuli-Dynamik hat. Dies bestätigt andere Studien darin, dass EB1-Proteine für die Rekrutierung anderer Proteine an das Mikrotubuli-Plus-Ende benötigt werden.

Die hergestellten *mal3*-Mutanten weisen alle unterschiedlich stark ausgeprägte Defekte in der Mitose und beim polaren Wachstum von *S. pombe* auf. Während der Mitose ist der Aufbau der bipolaren Spindel zum Teil stärker beeinträchtigt als bei kompletter Abwesenheit von Mal3 und die Interaktion der Spindel mit den Kinetochoren ist eingeschränkt. Während der Interphase sind Mikrotubuli in den verschiedenen Mutanten unterschiedlich stark verkürzt. Es

konnte gezeigt werden, dass die Assoziation anderer Proteine wie Tip1 und Tea1 mit Mikrotubuli-Plus-Enden von der Mal3 Funktion abhängt. Aufgrund der verkürzten Interphasen-Mikrotubuli ist der Zellendmarker Tea1 nicht mehr korrekt an den Zellenden lokalisiert. Deshalb kommt es zur Ausbildung verzweigter und gekrümmter Zellen.

Die Analyse der generierten *mal3*-Mutanten konnte aus zeitlichen Gründen nur begonnen werden. Allerdings sollten diese Mutanten sich in zukünftigen Studien als wertvolles Mittel zur Aufklärung der Funktionen von Mal3 und wie die CH- und EB1-Domänen bei diesen Funktionen mitwirken, erweisen. Aufgrund der hohen Konserviertheit von EB1-Proteinen sollten sich aus solchen Studien leicht generelle Aussagen über die EB1-Protein-Familie machen lassen.

6.2 Mal3 und Asp1 haben Funktionen bei der Organisation des Mikrotubuli und des Aktin-Zytoskeletts

6.2.1 Wie supprimiert Asp1 die Phänotypen von *mal3*-Mutanten?

Der *asp1*⁺ ORF wurde ursprünglich als extragener Multikopien-Suppressor der *arp3-cl* Mutation identifiziert (Feoktistova, McCollum et al. 1999). Arp3 ist eine Komponente des konservierten Arp2/3-Komplexes. Dieser Komplex wird für die Integrität des Aktin-Zytoskeletts benötigt.

Die Überexpression von *asp1*⁺ suppressierte spezifisch die TBZ-Hypersensitivität und den Verlust eines zusätzlichen Mini-Chromosoms von *mal3*-Mutanten und *mal3Δ* (Niwa, Matsumoto et al. 1986; Vietmeier-Decker 2004 und diese Arbeit). Ausserdem liegen Asp1 und Mal3 in einem Komplex vor (persönliche Mitteilung J. Pöhlmann, HHU Düsseldorf). Deshalb stellt sich die Frage, wie Asp1 *mal3*-Mutanten suppressieren kann.

Abwesenheit von Asp1 führte zu einer starken Hypersensitivität gegenüber TBZ. Dies deutet darauf hin, dass Asp1 eine Funktion bei der Organisation des Mikrotubuli-Zytoskeletts bzw. der mitotischen Spindel hat. Diese könnte ähnlich zu Mal3 sein. Zusätzliches Asp1 bewirkte, dass Mal3-004S/A besser mit Mikrotubuli kolokalisiert. Dies könnte auch bei den übrigen Mal3-Varianten und dem Wildtyp Mal3 geschehen. Jedoch wurde dies nicht getestet. Allerdings suppressierte zusätzliches Asp1 auch die TBZ-Hypersensitivität des *mal3Δ* Stammes. Zusammengefasst könnte dies bedeuten, dass zusätzliches Asp1 *mal3*-Mutanten über einen von Mal3 abhängigen Effekt und über einen von Mal3 unabhängigen Effekt suppressieren kann. Ein mögliches Szenario wäre, dass Asp1 eine bessere Bindung von Mal3-Varianten an Mikrotubuli bewirkt und gleichzeitig die Funktion von Mal3 übernehmen

bzw. überbrücken kann. Es ist jedoch nicht bekannt, ob die bessere Lokalisierung von Mal3-004S/A an Mikrotubuli für die Suppression verantwortlich ist. Somit ist ein weiteres mögliches Szenario, dass Asp1 *mal3*-Mutanten komplett dadurch supprimiert, dass es die Funktion von Mal3 übernimmt bzw. überbrückt.

Eine weitere Frage ist, wie zusätzliches Asp1 bewirken kann, dass wieder mehr Mal3 an Mikrotubuli bindet. Asp1 weist Homologie zu sauren Phosphatasen auf, obwohl noch kein experimenteller Beweis vorliegt, dass es sich bei Asp1 tatsächlich um eine Phosphatase handelt. Allerdings war Mal3 wildtypisch in einem *asp1Δ* Stamm lokalisiert. Zusätzliches Asp1 bewirkte, dass die Variante Mal3-004S/A, bei der die mögliche Phosphorylierung an Serin 004 blockiert ist, wieder besser mit Mikrotubuli assoziiert. Deshalb ist es unwahrscheinlich, dass Asp1 durch eine mögliche Dephosphorylierung von Mal3 eine bessere Bindung von Mal3 an Mikrotubuli bewirkt. Wahrscheinlicher ist, dass zusätzliches Asp1 die Bindung von Mal3 an Mikrotubuli beeinflusst, indem es mit Mal3 in einem Komplex assoziiert und dieses an Mikrotubuli rekrutiert. Es besteht auch die Möglichkeit, dass Asp1 die Lokalisierung von Mal3 indirekt, über einen oder mehrere andere Faktoren, beeinflusst.

6.2.2 Mal3 und Asp1 haben gemeinsame Funktionen während der Mitose und beim polaren Wachstum

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass sowohl Mal3 als auch Asp1 für den korrekten Ablauf der Mitose, als auch für korrektes polares Wachstum von *S. pombe* Zellen benötigt werden. Dabei wiesen Doppelmutanten von *asp1*⁺ und *mal3*⁺ hauptsächlich additive Phänotypen auf. Dies kann zum einen so interpretiert werden, dass Mal3 und Asp1 parallele Funktionen haben und somit nicht gemeinsam wirken. Allerdings können Asp1 und Mal3 co-immunopräzipitiert werden, liegen also in einem Komplex vor (persönliche Mitteilung, J. Pöhlmann, HHU Düsseldorf). Dies macht es wahrscheinlicher, dass Asp1 und Mal3 gemeinsam wirken und die additiven Effekte aufgrund der Tatsache, dass die Funktion/ Integrität des Komplexes bei Doppelmutanten stärker gestört wird, zustande kommen.

Lediglich bei der Organisation des Mikrotubuli-Zytoskeletts wurden nicht ausschließlich additive Phänotypen detektiert. Stattdessen waren die Interphasen-Mikrotubuli in *asp1/ mal3* Doppelmutanten länger als in einem *mal3*-Mutanten-Stamm. Ferner hatte die Deletion von *asp1*⁺ selbst keinen Effekt auf das Interphasen-Mikrotubuli-Zytoskelett. Allerdings muss hierbei beachtet werden, dass lediglich fixierte Zellen untersucht wurden. Deshalb kann keine Aussage darüber gemacht werden, ob Asp1 nicht einen Effekt auf die Dynamik von Interphasen-Mikrotubuli hat. So könnte die Abwesenheit von Asp1 Mikrotubuli z.B. generell

undynamischer machen. So könnten Mikrotubuli längere Zeit in einem „Pause“ Zustand sein, in dem sie weder wachsen noch schrumpfen. Dann wäre nicht zu erwarten, dass in fixierten *asp1Δ* Zellen unbedingt ein Effekt auf das Interphasen-Mikrotubuli-Zytoskelett zu beobachten wäre. Gleichzeitig könnte ein solcher „Pause“ Effekt den Verlust von Mal3 als anti-„Katastrophe“-Faktor teilweise aufheben, so dass in fixierten Zellen längere Mikrotubuli als in einem *mal3*-Mutanten-Stamm detektiert werden könnten. Bei mitotischen *asp1Δ/ mal3Δ* Doppelmutanten konnten hingegen ein nicht additiver und ein additiver Effekt beobachtet werden. So wurde in Doppelmutanten der durch *mal3Δ* verursachte Metaphasen-Arrest aufgehoben. Allerdings muss hierbei berücksichtigt werden, dass die bei diesem Experiment parallel durchgeführte Wildtyp-Kontrolle wie der *mal3Δ* Stamm einen Metaphasen-Arrest aufwies. Da Einzel-, Doppelmutanten und Wildtyp aus derselben Tetrade stammen bedeutet dies, dass vermutlich eine Zweit-Mutation im Stamm-Hintergrund mit für die beobachteten Effekte verantwortlich ist. Somit ist fraglich, ob dieser Effekt überhaupt signifikant ist. Sollte er signifikant sein, so wäre es möglich, dass der durch *asp1Δ* hervorgerufene „Pause“ Effekt die negativen Effekte auf die Spindel durch *mal3Δ* aufhebt. Spezifisch müsste dadurch die gestörte Verknüpfung von Kinetochor und Kinetochor-Mikrotubuli aufgehoben werden. Eine alternative, allerdings unwahrscheinliche Erklärung wäre, dass Asp1 ein negativer Regulator der Spindel Kinetochor Verknüpfung ist. Außerdem traten bei der Doppelmutante mehr S-förmige post-Anaphase Spindeln als bei den beiden Einzelmutanten auf. Dieser Phänotyp wird vermutlich nicht direkt durch Defekte bei der Mikrotubuli-Dynamik hervorgerufen. Stattdessen wird vermutlich ein Signal, welches die Elongation der Spindel beendet oder den Abbau der Spindel einleitet, nicht mehr korrekt interpretiert. Der hierbei beobachtete additive Effekt würde dann bedeuten, dass Asp1 und Mal3 beide eine Rolle bei der Umsetzung dieses Signals spielen.

Zusammenfassend weisen *asp1/ mal3* Doppelmutanten jedoch hauptsächlich additive Effekte auf die Mitose und das polare Wachstum auf. Deshalb kann gesagt werden, dass Mal3 und Asp1 vermutlich gemeinsame Funktionen bei diesen beiden Prozessen übernehmen.

6.2.3 Eine mögliche Funktion von Asp1 beim polaren Wachstum

Asp1 wird für die Integrität des Aktin- sowie des Mikrotubuli-Zytoskeletts benötigt, auch wenn Asp1 mit keiner dieser beiden Strukturen kolokalisiert und trotz des Einflusses auf den Arp2/3 Komplex keine stabile Assoziation mit diesem nachgewiesen werden konnte (Feoktistova, McCollum et al. 1999). Es gibt mittlerweile immer mehr Hinweise auf eine Interaktion von Komponenten des Aktin- und des Mikrotubuli-Zytoskeletts (Lee, Tirnauer et

al. 2000; Fukata, Watanabe et al. 2002; Kodama, Karakesisoglou et al. 2003; Übersichtsartikel: Mimori-Kiyosue und Tsukita 2003; Wen, Eng et al. 2004; Slep, Rogers et al. 2005). Dabei kommt den EB1-Proteinen eine zentrale Rolle zu (Lee, Tirnauer et al. 2000; Kodama, Karakesisoglou et al. 2003; Wen, Eng et al. 2004). Auch bei *S. pombe* kooperieren das Aktin- und das Mikrotubuli-Zytoskelett beim polaren Wachstum. Dabei wird Tea1 durch Mikrotubuli an Zellenden lokalisiert und rekrutiert dann Komponenten des Polarisoms zu den Zellenden (Mata und Nurse 1997; Glynn, Lustig et al. 2001; Übersichtsartikel: Chang und Peter 2003; Feierbach, Verde et al. 2004). Das Formin For3 im Polarisom synthetisiert dann spezifisch neue Aktin-Kabel (Feierbach und Chang 2001). Dies scheint wiederum für die korrekte Orientierung von Mikrotubuli entlang der Zell-Längsachse und die Etablierung von Wachstumszonen benötigt zu werden (Feierbach und Chang 2001; Übersichtsartikel: Chang und Peter 2003). In diesem Zusammenhang könnte Asp1 im Komplex mit Mal3 eine Funktion bei der Verknüpfung oder der Regulation der Verknüpfung von Mikrotubuli und Aktin übernehmen. Da Asp1 im gesamten Zytoplasma verteilt ist, könnte zum Beispiel die Interaktion von Aktin-Kabeln mit Mikrotubuli entlang des Zellkortex so vermittelt/ reguliert werden. Allerdings könnte Asp1 auch als eine Art Aktivator für den Arp2/3 Komplex agieren, sobald Mikrotubuli-Plus-Enden mit Mal3 und Tea1 die Zellenden erreichen. So könnten Asp1 und Mal3 ebenfalls eine Funktion bei der durch Mikrotubuli gesteuerten Aktin-Organisation an Zellenden spielen. Dies kann entweder abhängig oder unabhängig vom „Tea1-Mechanismus“ geschehen.

6.3 Mal3 und Peg1 haben antagonistische Funktionen

6.3.1 Peg1 ist ein Interphasen-Mikrotubuli-Wachstum inhibierendes Protein

Funktionelle Analysen und Homologie-Vergleiche zeigten, dass Peg1 zur konservierten Familie der CLASP-Proteine gehört (diese Arbeit, Karig 2004 und persönliche Mitteilung Dr. Grallert, PICR). Wie CLASP-Proteine aus anderen Organismen, assoziiert Peg1 mit den Kinetochor-Komplexen während der Mitose, wird für die Integrität der mitotischen Spindel benötigt, assoziiert mit Vertretern der CLIP-Proteine und EB1-Proteine und spielt eine Rolle bei der Mikrotubuli-Dynamik (Inoue, do Carmo Avides et al. 2000; Lemos, Sampaio et al. 2000; Akhmanova, Hoogenraad et al. 2001; Yin, You et al. 2002; Maiato, Fairley et al. 2003; Inoue, Savoian et al. 2004; Mimori-Kiyosue, Grigoriev et al. 2005). Die temperatursensitive *peg1.1* Mutante wies bei 36°C Interphasen-Mikrotubuli auf, die länger als Wildtyp

Interphasen-Mikrotubuli waren und sich um die Zellenden herumbogen. Dieser Effekt kommt dadurch zustande, dass Interphasen-Mikrotubuli von *peg1.1* Zellen im Vergleich zu Wildtyp Zellen in etwa die doppelte Zeit wachsen, bis ein „Katastrophe“ Ereignis eintritt (persönliche Mitteilung, Dr. Grallert, PICR, Manchester). Daraus folgt der Schluss, dass Peg1 ein Interphasen-Mikrotubuli-Wachstum inhibierendes Protein ist. Effekte von CLASP-Proteinen auf die Dynamik von Interphasen-Mikrotubuli wurden auch in höheren Eukaryoten untersucht (Akhmanova, Hoogenraad et al. 2001; Mimori-Kiyosue, Grigoriev et al. 2005). Dabei wurde die Menge von CLASP-Protein durch RNA-Interferenz oder Antikörper-Injektion verringert. Allerdings war bei diesen Studien noch bis zu 30% CLASP-Protein in den Zellen vorhanden. Dabei wurde gezeigt, dass CLASP-Proteine spezifisch auf die Dynamik von Interphasen-Mikrotubuli in Nähe des Zellkortex wirken (Mimori-Kiyosue, Grigoriev et al. 2005). Dabei sollen CLASP-Proteine zum einen lokal am Zellkortex das Wachstum von dynamischen Interphasen-Mikrotubuli fördern, indem sie als „pro-Neu-Wachstum“-Faktoren wirken. Dies steht im Gegensatz zu den hier präsentierten Ergebnissen. Allerdings bestand in den mit höheren Eukaryoten durchgeführten Studien keine absolute „Null-Situation“ in Bezug auf die Menge von CLASP-Proteinen in den Zellen. Es ist nicht auszuschließen, dass unterschiedlich reduzierte Protein-Mengen unterschiedliche Effekte auf die Dynamik von Interphasen-Mikrotubuli hervorrufen. Ferner wurde in denselben Studien festgestellt, dass bei verringerter CLASP-Protein-Konzentration im Vergleich zum Wildtyp Interphasen-Mikrotubuli in etwa doppelt so lange wachsen, bis ein „Katastrophe“ Ereignis eintritt (Mimori-Kiyosue, Grigoriev et al. 2005). Dies entspricht den in meiner Arbeit präsentierten Ergebnissen. Deshalb kann geschlossen werden, dass CLASP-Proteine insgesamt eher Interphasen-Mikrotubuli-Wachstum inhibieren. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass sich die Wirkungsweisen von CLASP-Proteinen zwischen verschiedenen Organismen bzw. Organismen-Gruppen unterscheiden.

Zum anderen wurde durch Antikörper-Injektion und Überexpressionsstudien mit CLASP-Proteinen gezeigt, dass diese auch für die Ausbildung stabiler und dynamischer Interphasen-Mikrotubuli benötigt werden. Diese Interphasen-Mikrotubuli ragen in die wachsenden Membran-Ausstülpungen von migrierenden Fibroblasten hinein und dienen dem gerichteten Transport von Komponenten, die für das Wachstum benötigt werden (Akhmanova, Hoogenraad et al. 2001; Wittmann und Waterman-Storer 2005). Allerdings treten bei *S. pombe* Zellen keine stabilen, undynamischen Interphasen-Mikrotubuli auf, weshalb sich die Situationen in *S. pombe* und höheren Säuger-Zellen diesbezüglich nicht vergleichen lassen.

6.3.2 Mal3 und Peg1 sind Antagonisten und haben voneinander unabhängige Funktionen

Mal3 wirkt positiv, Peg1 wirkt negativ auf die Wachstumsdauer von Interphasen-Mikrotubuli. Mal3 und Peg1 haben also unterschiedliche bzw. gegensätzliche Funktionen bei der Dynamik von Interphasen-Mikrotubuli. Mutationen von *mal3*⁺ supprimierten die Temperatursensitivität von *peg1.1* Zellen und *peg1.1* supprimierte die TBZ-Hypersensitivität von *mal3*-Mutanten. Daraus folgt, dass Mal3 und Peg1 antagonistische Funktionen haben. Passend dazu waren die Interphasen-Mikrotubuli von *mal3/ peg1.1* Doppelmutanten aufgrund längerer Mikrotubuli-Wachstumszeiten länger als die Interphasen-Mikrotubuli von *mal3*-Einzelmутanten. Jedoch erreichten die Interphasen-Mikrotubuli-Wachstumszeiten von *mal3/ peg1.1* nicht die Dauer von Wildtyp Interphasen-Mikrotubuli-Wachstumszeiten (persönliche Mitteilung, Dr. Grallert, PICR, Manchester). Ähnliche Effekte wurden auch mit dem CLIP-Protein Tip1 und Peg1 und *mal3/ tip1/ peg1.1* Doppelmutanten gefunden (persönliche Mitteilung, Dr. Grallert, PICR, Manchester). Dabei wiesen *mal3/ peg1.1*, *tip1/ peg1.1* und *mal3/ tip1/ peg1.1* Doppel- bzw. Triplemutanten in etwa dieselben Interphasen-Mikrotubuli-Wachstumszeiten auf. Also fördert die *peg1.1*-Mutation offensichtlich Interphasen-Mikrotubuli-Wachstum unabhängig von Mal3 und Tip1. Im Umkehrschluss bedeutet dies, dass Wildtyp Peg1 sowohl im Wildtyp als auch in der Gegenwart von *mal3*-Mutationen und/ oder *tip1*-Mutationen Interphasen-Mikrotubuli-Wachstum inhibiert. Daraus folgt, dass die Peg1 Funktion unabhängig von den Mal3- und Tip1-Funktionen ist. Gleichzeitig sind die Funktionen von Tip1 und Mal3 unabhängig von Peg1. Trotzdem interagieren alle drei Proteine miteinander in Hefe-2-Hybrid-Analysen und können co-immunopräzipitiert werden (persönliche Mitteilung, Dr. Grallert, PICR, Manchester).

Sowohl heterolog in *E. coli* exprimierte oder *in vitro* translatierte EB1-Proteine, CLIP-Proteine als auch CLASP-Proteine können *in vitro* autark mit Mikrotubuli assoziieren (Diamantopoulos, Perez et al. 1999; Akhmanova, Hoogenraad et al. 2001; Nakamura, Zhou et al. 2001; Yin, You et al. 2002; Hayashi und Ikura 2003; Arnal, Heichette et al. 2004). *In vivo* kolokalisieren CLIP170 und EB1 direkt am Plus-Ende wachsender Interphasen-Mikrotubuli, während CLASP-Proteine vornehmlich an Plus-Enden wachsender Interphasen-Mikrotubuli in Zellkortexnähe lokalisieren (Akhmanova, Hoogenraad et al. 2001; Mimori-Kiyosue, Grigoriev et al. 2005). Dabei lokalisieren CLASP-Proteine hauptsächlich an einer Region die hinter dem Plus-Ende von Interphasen-Mikrotubuli liegt, so dass nur eine partielle Kolokalisierung von CLIP170, EB1 und CLASP-Proteinen an Plus-Enden vorliegt (Akhmanova, Hoogenraad et al. 2001; Wittmann und Waterman-Storer 2005). Außerdem ist

die Assoziation von EB1 und CLIP170 mit Interphasen-Mikrotubuli-Plus-Enden in COS1-Zellen nicht von der Assoziation von CLASP-Proteinen mit Interphasen-Mikrotubuli abhängig (Akhmanova, Hoogenraad et al. 2001). In COS1-Zellen ist die Lokalisierung von CLASP-Proteinen am Interphasen-Mikrotubuli-Plus-Ende unabhängig von CLIP170 (Akhmanova, Hoogenraad et al. 2001). Diese Daten deuten analog zu den in dieser Arbeit erhaltenen Resultaten ebenfalls darauf hin, dass CLASP-Proteine im Vergleich zu CLIP-zusammen mit EB1-Proteinen distinkte, unabhängige Funktionen bei der Dynamik und Organisation von Interphasen-Mikrotubuli übernehmen.

In einer mit HeLa Zellen durchgeführten Studie wurde gezeigt, dass Überexpression von CLASP-Proteinen zusätzliches EB1 an Interphasen-Mikrotubuli-Plus-Enden rekrutiert, die am Zellkortex liegen (Mimori-Kiyosue, Grigoriev et al. 2005). Daraus wurde abgeleitet, dass CLASP-Proteine das Wachstum solcher Interphasen-Mikrotubuli unterstützen, indem sie EB1 an die Plus-Enden rekrutieren (Mimori-Kiyosue, Grigoriev et al. 2005). Dies widerspricht jedoch der hier gemachten Aussage, dass Mal3 (EB1) und Peg1 (CLASP) antagonistische Funktionen haben. Eine Möglichkeit diese beiden unterschiedlichen Aussagen zu erklären, besteht in der Tatsache, dass +TIPs an Interphasen-Mikrotubuli-Plus-Enden generell an unterschiedlichen Zell-Positionen und zu unterschiedlichen Zeitpunkten unterschiedliche Interaktionspartner binden und Aufgaben übernehmen können. So kann nicht ausgeschlossen werden, dass Peg1 (CLASP) und Mal3 (EB1) zu unterschiedlichen Zeitpunkten miteinander oder anderen Proteinen interagieren und dabei sowohl gemeinsame als auch antagonistische Funktionen ausüben könnten, um die Integrität des Mikrotubuli-Zytoskeletts sicherzustellen. Zukünftige Analysen werden zeigen müssen, inwiefern CLASP-Proteine und EB1-Proteine an Mikrotubuli-Plus-Enden zu unterschiedlichen Zeitpunkten und an unterschiedlichen Zell-Positionen zusammen- oder antagonistisch wirken.

6.3.3 Mal3 und Peg1 haben unterschiedliche Effekte auf das polare Wachstum

Peg1 und Mal3 haben unabhängige Funktionen. Ein weiteres Beispiel dafür ist die Tatsache, dass Peg1 und Mal3/ Tip1 unterschiedliche Effekte auf das polare Wachstum von *S. pombe* Zellen haben. *Peg1.1* Zellen wiesen bei erhöhten Temperaturen gekrümmte und verzweigte Zellen auf. Im Unterschied zu anderen Polaritätsmutanten, wie z.B. *mal3Δ* und *tip1Δ* Zellen (Beinhauer, Hagan et al. 1997; Brunner und Nurse 2000), traten bei diesen Zellen Verzweigungen ausschließlich in septierten Zellen an der Position wo das Septum lag auf. Deshalb stellt sich die Frage, wie diese Unterschiede zustande kommen könnten. Mal3 wird

für ein wildtypisches Interphasen-Mikrotubuli-Zytoskelett und damit für die korrekte Lokalisierung von Tea1 an beiden Zellenden benötigt. Bei *peg1.1* Zellen konnte Tea1 an beiden Zellenden lokalisieren, obwohl das Wachstum vieler Interphasen-Mikrotubuli nicht an Zellenden abgestoppt wurde (persönliche Mitteilung, Dr. Grallert, PICR, Manchester und eigene unpublizierte Daten). In *peg1.1/ mal3Δ* Doppelmutanten war wieder mehr Tea1 im Vergleich zu *mal3Δ* Einzelmутanten an Zellenden lokalisiert. Dies kam wahrscheinlich durch die längeren Interphasen-Mikrotubuli in Doppelmutanten im Vergleich zu *mal3*-Einzelmутanten zustande. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass Peg1 keine direkte Rolle bei der Lokalisierung von Tea1 an Zellenden spielt, sondern die Zellform unabhängig von diesem Prozess beeinflusst.

Die für *peg1.1* Zellen beobachteten Zellformen gleichen eher den Phänotypen von einigen anderen, zum Teil noch nicht charakterisierten, Polaritäts-Mutanten, die alle elongierte Interphasen-Mikrotubuli aufweisen und gekrümmte Zellen ausbilden (Verde, Mata et al. 1995; Radcliffe, Hirata et al. 1998; West, Malmstrom et al. 2001; Sawin, Lourenco et al. 2004; Pardo und Nurse 2005). Bei einem Teil dieser Proteine handelt es sich um Komponenten der Interphasen-MTOCs oder Proteine, die mit diesen assoziiert sind (Radcliffe, Hirata et al. 1998; Vardy und Toda 2000; Sawin, Lourenco et al. 2004). Aufgrund von Lokalisierungsstudien besteht die Möglichkeit, dass auch Peg1 mit Interphasen-MTOCs assoziiert ist (Karig, unpublizierte Daten, persönliche Mitteilung Dr. Grallert, PICR Manchester). Allerdings ist die Anzahl von Interphasen-Mikrotubuli bei diesen Mutanten im Gegensatz zu *peg1.1* stark reduziert. Die beobachteten Zellformen und der Interphasen-Mikrotubuli-Phänotyp von *peg1.1* ähneln tatsächlich eher denen von *k1p5Δ* und *k1p6Δ* Zellen (West, Malmstrom et al. 2001). K1p5 und K1p6 sind KinI Proteine. Dabei handelt es sich um Proteine, die Homologie zu Kinesin-Motor-Proteinen aufweisen, jedoch keine Motoraktivität besitzen (West, Malmstrom et al. 2001; Hunter, Caplow et al. 2003; Übersichtsartikel: Walczak 2003). Stattdessen wirken KinI Proteine Mikrotubuli depolymerisierend. Folglich sind die Interphasen-Mikrotubuli von *k1p5Δ* und *k1p6Δ* Zellen elongiert (West, Malmstrom et al. 2001). Die *k1p5Δ* und *k1p6Δ* Stämme selbst weisen keine aberranten Zellformen auf, bewirken jedoch gekrümmte Zellen in Mutanten-Stammhintergründen, die zu elongierten Zellen führen (West, Malmstrom et al. 2001). Es wurde deshalb postuliert, dass die gesteigerte Zelllänge zusammen mit den elongierten Interphasen-Mikrotubuli aberrante Zellformen bewirkt, da durch die größere Distanz zwischen den beiden Zellenden das „Polaritätsprogramm“ anfälliger für Aberrationen von Interphasen-Mikrotubuli wird (West, Malmstrom et al. 2001). Tatsächlich waren auch *peg1.1* Zellen bei erhöhten Temperaturen

häufig elongiert. Dies eröffnet die Möglichkeit, dass auch bei *peg1.1* Zellen dieser Effekt zu gekrümmten Zellen führt. So könnte es zu Wachstumszonen kommen, die sich nicht über das gesamte Zellende erstrecken, sondern nur über einen Teilbereich. Dies könnte dann zur Ausbildung aberranter Zellformen führen. Allerdings ist nichts über die betroffenen Faktoren des „Polaritätsprogramms“ bei *klp5Δ* und *klp6Δ* Zellen bekannt (West, Malmstrom et al. 2001). In diesem Zusammenhang zeigt eine Studie, dass es bei Zellen mit elongierten Interphasen-Mikrotubuli zu einer Anreicherung von Tea1 an spezifischen Positionen am Zellende kommt, so dass Wachstumszonen nur in einem Teil-Bereich der Zellenden definiert werden. Dies führt zu gekrümmten Zellen (Pardo und Nurse 2005). Bei *peg1.1* Zellen wurde lediglich überprüft, ob Tea1 generell noch an Zellenden lokalisiert ist. So besteht die Möglichkeit, dass auch bei *peg1.1* Zellen Tea1 nur an bestimmten Bereichen der Zellenden lokalisiert ist.

Dies erklärt jedoch noch nicht wie verzweigte *peg1.1* Zellen entstehen. Vermutlich kann bei diesen Zellen das Septum nicht korrekt abgebaut werden, so dass die beiden Folge-Zellen nicht getrennt werden können. Wenn dann Wachstumszonen am Zellkortex direkt vor dem Septum definiert werden, kann es zur Ausbildung verzweigter Zellen kommen. Dabei könnte die Fehlplatzierung der Wachstumszonen wie oben beschrieben zustande kommen.

In der hier durchgeführten Analyse konnte die Funktion von Peg1 bei der Organisation von Interphasen-Mikrotubuli und beim polaren Wachstum von *S. pombe* näher charakterisiert werden. Peg1 weist neben der Homologie zu anderen CLASP-Proteinen auch funktionell viele Gemeinsamkeiten auf (z.B. Mikrotubuli-Assoziation, Assoziation mit EB1-Proteinen bzw. CLIP-Proteinen, usw.). Allerdings konnten bei Peg1 auch neue Eigenschaften detektiert werden, die vielleicht allgemeine Gültigkeit für CLASP-Proteine haben könnten und das momentane Verständnis von CLASP-Proteinen erweitern könnten. Peg1 (CLASP) inhibiert Wachstum von Interphasen-Mikrotubuli und übt seine Funktion unabhängig von Mal3 (EB1) und Tip1 (CLIP) aus. Ferner wirkt Peg1 (CLASP) antagonistisch zu Mal3 (EB1) und Tip1 (CLIP). Zukünftige Studien werden zeigen müssen, ob diese Funktionen allgemeine Gültigkeit für CLASP-Proteine haben.

6.4 Allgemeine Zusammenfassung der Diskussion

Durch funktionelle Mutanten-Analysen von Mal3 konnten die Rollen der konservierten CH- und EB1-Domänen von Mal3 weiter aufgeklärt werden und generelle Rückschlüsse auf die Funktionen dieser beiden Domänen bei EB1-Proteinen gezogen werden. Durch

weiterführende Analysen der Funktionen des mit Mal3 assoziierten Proteins Peg1 konnte weiter aufgeklärt werden, in welchem funktionellen Zusammenhang Mal3 (EB1-Proteine) und Peg1 (CLASP-Proteine) stehen. Zukünftige Analysen werden zeigen müssen, wie die gemeinsamen und entgegengesetzten Funktionen von EB1- und CLASP-Proteinen sowie generell +TIPs zeitlich und positionsspezifisch reguliert bzw. modifiziert werden, um die Funktionen von +TIPs bei der Organisation des Zytoskeletts aufzuklären.

7 Literaturverzeichnis

- Abe, K., I. P. Whitehead, et al. (1999). "Involvement of NH(2)-terminal sequences in the negative regulation of Vav signaling and transforming activity." *J Biol Chem* **274**(43): 30410-8.
- Akhmanova, A., C. C. Hoogenraad, et al. (2001). "Clasps are CLIP-115 and -170 associating proteins involved in the regional regulation of microtubule dynamics in motile fibroblasts." *Cell* **104**(6): 923-35.
- Alfa, C. E., I. M. Gallagher, et al. (1993). "Antigen localization in fission yeast." *Methods Cell Biol* **37**: 201-22.
- Altschul, S. F., T. L. Madden, et al. (1997). "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs." *Nucleic Acids Res* **25**(17): 3389-402.
- Arnal, I., C. Heichette, et al. (2004). "CLIP-170/tubulin-curved oligomers coassemble at microtubule ends and promote rescues." *Curr Biol* **14**(23): 2086-95.
- Arnal, I., E. Karsenti, et al. (2000). "Structural transitions at microtubule ends correlate with their dynamic properties in *Xenopus* egg extracts." *J Cell Biol* **149**(4): 767-74.
- Asakawa, K., M. Toya, et al. (2005). "Mal3, the fission yeast EB1 homologue, cooperates with Bub1 spindle checkpoint to prevent monopolar attachment." *EMBO Rep* **6**(12): 1194-200.
- Askham, J. M., P. Moncur, et al. (2000). "Regulation and function of the interaction between the APC tumour suppressor protein and EB1." *Oncogene* **19**(15): 1950-8.
- Askham, J. M., K. T. Vaughan, et al. (2002). "Evidence that an interaction between EB1 and p150(Glued) is required for the formation and maintenance of a radial microtubule array anchored at the centrosome." *Mol Biol Cell* **13**(10): 3627-45.
- Bannister, A. J., P. Zegerman, et al. (2001). "Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain." *Nature* **410**(6824): 120-4.
- Barth, A. I., K. A. Siemers, et al. (2002). "Dissecting interactions between EB1, microtubules and APC in cortical clusters at the plasma membrane." *J Cell Sci* **115**(Pt 8): 1583-90.
- Basi, G., E. Schmid, et al. (1993). "TATA box mutations in the *Schizosaccharomyces pombe* *nmt1* promoter affect transcription efficiency but not the transcription start point or thiamine repressibility." *Gene* **123**(1): 131-6.
- Behrens, R. and P. Nurse (2002). "Roles of fission yeast tealp in the localization of polarity factors and in organizing the microtubular cytoskeleton." *J Cell Biol* **157**(5): 783-93.
- Beinhauer, J. D. (1999). "Mal3p, ein neues und evolutionär konserviertes Mikrotubuli-assoziiertes Protein aus der Spaltheife *Schizosaccharomyces pombe*." *Dissertation Universität Giessen*.
- Beinhauer, J. D., I. M. Hagan, et al. (1997). "Mal3, the fission yeast homologue of the human APC-interacting protein EB-1 is required for microtubule integrity and the maintenance of cell form." *J Cell Biol* **139**(3): 717-28.
- Belmont, L. D., A. A. Hyman, et al. (1990). "Real-time visualization of cell cycle-dependent changes in microtubule dynamics in cytoplasmic extracts." *Cell* **62**(3): 579-89.
- Bernier, G., Y. De Repentigny, et al. (1998). "Dystonin is an essential component of the Schwann cell cytoskeleton at the time of myelination." *Development* **125**(11): 2135-48.
- Bernier, G., M. Mathieu, et al. (1996). "Cloning and characterization of mouse ACF7, a novel member of the dystonin subfamily of actin binding proteins." *Genomics* **38**(1): 19-29.
- Berrueta, L., J. S. Tirnauer, et al. (1999). "The APC-associated protein EB1 associates with components of the dynactin complex and cytoplasmic dynein intermediate chain [In Process Citation]." *Curr Biol* **9**(8): 425-8.

- Biggins, S. and C. E. Walczak (2003). "Captivating capture: how microtubules attach to kinetochores." Curr Biol **13**(11): R449-60.
- Billadeau, D. D., S. M. Mackie, et al. (2000). "Specific subdomains of Vav differentially affect T cell and NK cell activation." J Immunol **164**(8): 3971-81.
- Boeke, J. D., J. Trueheart, et al. (1987). "5-Fluoroorotic acid as a selective agent in yeast molecular genetics." Methods Enzymol **154**: 164-75.
- Bretscher, A., K. Edwards, et al. (2002). "ERM proteins and merlin: integrators at the cell cortex." Nat Rev Mol Cell Biol **3**(8): 586-99.
- Bridge, A. J., M. Morphew, et al. (1998). "The fission yeast SPB component Cut12 links bipolar spindle formation to mitotic control." Genes&Development **12**: 927-942.
- Browning, H. and D. D. Hackney (2005). "The EB1 homolog Mal3 stimulates the ATPase of the kinesin Tea2 by recruiting it to the microtubule." J Biol Chem **280**(13): 12299-304.
- Browning, H., D. D. Hackney, et al. (2003). "Targeted movement of cell end factors in fission yeast." Nat Cell Biol **5**(9): 812-8.
- Browning, H., J. Hayles, et al. (2000). "Tea2p Is a Kinesin-like Protein Required to Generate Polarized Growth in Fission Yeast." J Cell Biol **151**(1): 15-28.
- Brunner, D. and P. Nurse (2000). "CLIP170-like tip1p spatially organizes microtubular dynamics in fission yeast." Cell **102**(5): 695-704.
- Bu, W. and L. K. Su (2003). "Characterization of functional domains of human EB1 family proteins." J Biol Chem.
- Bulinski, J. C. and G. G. Gundersen (1991). "Stabilization of post-translational modification of microtubules during cellular morphogenesis." Bioessays **13**(6): 285-93.
- Busch, K. E. and D. Brunner (2004). "The microtubule plus end-tracking proteins mal3p and tip1p cooperate for cell-end targeting of interphase microtubules." Curr Biol **14**(7): 548-59.
- Busch, K. E., J. Hayles, et al. (2004). "Tea2p kinesin is involved in spatial microtubule organization by transporting tip1p on microtubules." Dev Cell **6**(6): 831-43.
- Butner, K. A. and M. W. Kirschner (1991). "Tau protein binds to microtubules through a flexible array of distributed weak sites." J Cell Biol **115**(3): 717-30.
- Cande, W. Z. and C. J. Hogan (1989). "The mechanism of anaphase spindle elongation." Bioessays **11**(1): 5-9.
- Caplow, M. (1992). "Microtubule dynamics." Curr Opin Cell Biol **4**(1): 58-65.
- Cassimeris, L., N. K. Pryer, et al. (1988). "Real-time observations of microtubule dynamic instability in living cells." J Cell Biol **107**(6 Pt 1): 2223-31.
- Chang, F. and M. Peter (2003). "Yeasts make their mark." Nat Cell Biol **5**(4): 294-9.
- Clarke, L., H. Amstutz, et al. (1986). "Analysis of centromeric DNA in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*." Proc Natl Acad Sci U S A **83**(21): 8253-7.
- Cleveland, D. W., Y. Mao, et al. (2003). "Centromeres and kinetochores: from epigenetics to mitotic checkpoint signaling." Cell **112**(4): 407-21.
- Cooke, C. A., M. M. Heck, et al. (1987). "The inner centromere protein (INCENP) antigens: movement from inner centromere to midbody during mitosis." J Cell Biol **105**(5): 2053-67.
- Corpet, F. (1988). "Multiple sequence alignment with hierarchical clustering." Nucleic Acids Res **16**(22): 10881-90.
- Desai, A. and T. J. Mitchison (1997). "Microtubule polymerization dynamics." Annu Rev Cell Dev Biol **13**: 83-117.
- Diamantopoulos, G. S., F. Perez, et al. (1999). "Dynamic localization of CLIP-170 to microtubule plus ends is coupled to microtubule assembly." J Cell Biol **144**(1): 99-112.

- Ding, R., K. L. McDonald, et al. (1993). "Three-dimensional reconstruction and analysis of mitotic spindles from the yeast, *Schizosaccharomyces pombe*." *J Cell Biol* **120**(1): 141-51.
- Dogterom, M., J. W. Kerssemakers, et al. (2005). "Force generation by dynamic microtubules." *Curr Opin Cell Biol* **17**(1): 67-74.
- Drewes, G., A. Ebner, et al. (1998). "MAPs, MARKs and microtubule dynamics." *Trends Biochem Sci* **23**(8): 307-11.
- Drummond, D. R. and R. A. Cross (2000). "Dynamics of interphase microtubules in *Schizosaccharomyces pombe*." *Current Biology* **10**: 766-775.
- Dujardin, D., U. I. Wacker, et al. (1998). "Evidence for a role of CLIP-170 in the establishment of metaphase chromosome alignment." *J Cell Biol* **141**(4): 849-62.
- Durkacz, B., D. Beach, et al. (1985). "The fission yeast cell cycle control gene *cdc2*: structure of the *cdc2* region." *Mol. Gen. Genet.*(201): 543-545.
- Ekwall, K., J. P. Javerzat, et al. (1995). "The chromodomain protein Swi6: a key component at fission yeast centromeres." *Science* **269**(5229): 1429-31.
- Ekwall, K., E. R. Nimmo, et al. (1996). "Mutations in the fission yeast silencing factors *clr4+* and *rik1+* disrupt the localisation of the chromo domain protein Swi6p and impair centromere function." *J Cell Sci* **109**(Pt 11): 2637-48.
- Etienne-Manneville, S. (2004). "Actin and microtubules in cell motility: which one is in control?" *Traffic* **5**(7): 470-7.
- Feierbach, B. and F. Chang (2001). "Roles of the fission yeast formin for3p in cell polarity, actin cable formation and symmetric cell division." *Curr Biol* **11**(21): 1656-65.
- Feierbach, B., F. Verde, et al. (2004). "Regulation of a formin complex by the microtubule plus end protein tea1p." *J Cell Biol* **165**(5): 697-707.
- Feoktistova, A., D. McCollum, et al. (1999). "Identification and characterization of *Schizosaccharomyces pombe* *aspl1(+)*, a gene that interacts with mutations in the Arp2/3 complex and actin." *Genetics* **152**(3): 895-908.
- Fink, G. R., J. B. Hicks, et al. (1983). "Methods in yeast genetics, laboratory manual " *Cold Spring Harbor Laboratory, New York*.
- Fleig, U., M. Sen-Gupta, et al. (1996). "Fission yeast *mal2⁺* is required for chromosome segregation." *Mol Cell Biol* **16**(11): 6169-77.
- Fodde, R., J. Kuipers, et al. (2001). "Mutations in the APC tumour suppressor gene cause chromosomal instability." *Nature Cell Biology* **3**: 433-438.
- Fuchs, E. and I. Karakesisoglou (2001). "Bridging cytoskeletal intersections." *Genes Dev* **15**(1): 1-14.
- Fujita, A., L. Vardy, et al. (2002). "A fourth component of the fission yeast gamma-tubulin complex, Alp16, is required for cytoplasmic microtubule integrity and becomes indispensable when gamma-tubulin function is compromised." *Mol Biol Cell* **13**(7): 2360-73.
- Fukata, M., T. Watanabe, et al. (2002). "Rac1 and Cdc42 capture microtubules through IQGAP1 and CLIP-170." *Cell* **109**(7): 873-85.
- Funabiki, H., I. Hagan, et al. (1993). "Cell cycle-dependent specific positioning and clustering of centromeres and telomeres in fission yeast." *J Cell Biol* **121**(5): 961-76.
- Galjart, N. (2005). "CLIPs and CLASPs and cellular dynamics." *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**(6): 487-98.
- Garcia, M. A., N. Koonrugs, et al. (2002). "Spindle-kinetochore attachment requires the combined action of Kin I-like Klp5/6 and Alp14/Dis1-MAPs in fission yeast." *Embo J* **21**(22): 6015-24.
- Garcia, M. A., L. Vardy, et al. (2001). "Fission yeast ch-TOG/XMAP215 homologue Alp14 connects mitotic spindles with the kinetochore and is a component of the Mad2-dependent spindle checkpoint." *Embo J* **20**(13): 3389-401.

- Gimona, M., K. Djinovic-Carugo, et al. (2002). "Functional plasticity of CH domains." FEBS Lett **513**(1): 98-106.
- Gimona, M. and R. Mital (1998). "The single CH domain of calponin is neither sufficient nor necessary for F-actin binding." J Cell Sci **111 (Pt 13)**: 1813-21.
- Gimona, M. and S. J. Winder (1998). "Single calponin homology domains are not actin-binding domains." Curr Biol **8**(19): R674-5.
- Glynn, J. M., R. J. Lustig, et al. (2001). "Role of bud6p and tealp in the interaction between actin and microtubules for the establishment of cell polarity in fission yeast." Curr Biol **11**(11): 836-45.
- Gorbsky, G. J., P. J. Sammak, et al. (1987). "Chromosomes move poleward in anaphase along stationary microtubules that coordinately disassemble from their kinetochore ends." J Cell Biol **104**(1): 9-18.
- Goshima, G., S. Saitoh, et al. (1999). "Proper metaphase spindle length is determined by centromere proteins Mis12 and Mis6 required for faithful chromosome segregation." Genes and Development **13**: 1664-1677.
- Gould, K. L. and A. Feoktistova (1996). "Characterization of novel mutations at the *Schizosaccharomyces pombe* cdc2 regulatory phosphorylation site, tyrosine 15." Mol Biol Cell **7**(10): 1573-86.
- Green, R. A., R. Wollman, et al. (2005). "APC and EB1 function together in mitosis to regulate spindle dynamics and chromosome alignment." Mol Biol Cell **16**(10): 4609-22.
- Gregory, S. L. and N. H. Brown (1998). "kakapo, a gene required for adhesion between and within cell layers in *Drosophila*, encodes a large cytoskeletal linker protein related to plectin and dystrophin." J Cell Biol **143**(5): 1271-82.
- Grimm, C., J. Kohli, et al. (1988). "Genetic engineering of *Schizosaccharomyces pombe*: a system for gene disruption and replacement using the ura4 gene as a selectable marker." Mol Gen Genet **215**(1): 81-6.
- Gross, S. D. and R. A. Anderson (1998). "Casein kinase I: spatial organization and positioning of a multifunctional protein kinase family." Cell Signal **10**(10): 699-711.
- Groysman, M., C. S. Russek, et al. (2000). "Vav, a GDP/GTP nucleotide exchange factor, interacts with GDIs, proteins that inhibit GDP/GTP dissociation." FEBS Lett **467**(1): 75-80.
- Gundersen, G. G. and J. C. Bulinski (1986). "Microtubule arrays in differentiated cells contain elevated levels of a post-translationally modified form of tubulin." Eur J Cell Biol **42**(2): 288-94.
- Gundersen, G. G., S. Khawaja, et al. (1987). "Postpolymerization detyrosination of alpha-tubulin: a mechanism for subcellular differentiation of microtubules." J Cell Biol **105**(1): 251-64.
- Gurland, G. and G. G. Gundersen (1995). "Stable, detyrosinated microtubules function to localize vimentin intermediate filaments in fibroblasts." J Cell Biol **131**(5): 1275-90.
- Hagan, I. and M. Yanagida (1992). "Kinesin-related cut7 protein associates with mitotic and meiotic spindles in fission yeast." Nature **356**(6364): 74-6.
- Hagan, I. and M. Yanagida (1995). "The product of the spindle formation gene sad1+ associates with the fission yeast spindle pole body and is essential for viability." J Cell Biol **129**(4): 1033-47.
- Hagan, I. M. (1998). "The fission yeast microtubule cytoskeleton." J Cell Sci **111**(Pt 12): 1603-12.
- Hagan, I. M. and J. S. Hyams (1988). "The use of cell division cycle mutants to investigate the control of microtubule distribution in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*." J Cell Sci **89**(Pt 3): 343-57.

- Hayashi, I. and M. Ikura (2003). "Crystal structure of the amino-terminal microtubule-binding domain of end-binding protein 1 (EB1)." J Biol Chem **278**(38): 36430-4.
- Hayashi, I., A. Wilde, et al. (2005). "Structural basis for the activation of microtubule assembly by the EB1 and p150Glued complex." Mol Cell **19**(4): 449-60.
- Hayashi, T., Y. Fujita, et al. (2004). "Mis16 and Mis18 are required for CENP-A loading and histone deacetylation at centromeres." Cell **118**(6): 715-29.
- Hayden, J. H., S. S. Bowser, et al. (1990). "Kinetochore capture astral microtubules during chromosome attachment to the mitotic spindle: direct visualization in live newt lung cells." J Cell Biol **111**(3): 1039-45.
- Hayles, J. and P. Nurse (2001). "A journey into space." Nat Rev Mol Cell Biol **2**(9): 647-56.
- He, X., M. H. Jones, et al. (1998). "Mph1, a member of the Mps1-like family of dual specificity protein kinases, is required for the spindle checkpoint in *S. pombe*." J Cell Sci **111**(Pt 12): 1635-47.
- Hirokawa, N. (1998). "Kinesin and dynein superfamily proteins and the mechanism of organelle transport." Science **279**(5350): 519-26.
- Holy, T. E. and S. Leibler (1994). "Dynamic instability of microtubules as an efficient way to search in space." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(12): 5682-5.
- Honnappa, S., C. M. John, et al. (2005). "Structural insights into the EB1-APC interaction." Embo J **24**(2): 261-9.
- Howard, J. and A. A. Hyman (2003). "Dynamics and mechanics of the microtubule plus end." Nature **422**(6933): 753-8.
- Hunter, A. W., M. Caplow, et al. (2003). "The kinesin-related protein MCAK is a microtubule depolymerase that forms an ATP-hydrolyzing complex at microtubule ends." Mol Cell **11**(2): 445-57.
- Hwang, E., J. Kusch, et al. (2003). "Spindle orientation in *Saccharomyces cerevisiae* depends on the transport of microtubule ends along polarized actin cables." J Cell Biol **161**(3): 483-8.
- Hyman, A. A., D. Chretien, et al. (1995). "Structural changes accompanying GTP hydrolysis in microtubules: information from a slowly hydrolyzable analogue guanylyl-(alpha,beta)-methylene-diphosphonate." J Cell Biol **128**(1-2): 117-25.
- Infante, A. S., M. S. Stein, et al. (2000). "Detyrosinated (Glu) microtubules are stabilized by an ATP-sensitive plus-end cap." J Cell Sci **113** (Pt 22): 3907-19.
- Inoue, Y. H., M. do Carmo Avides, et al. (2000). "Orbit, a novel microtubule-associated protein essential for mitosis in *Drosophila melanogaster*." J Cell Biol **149**(1): 153-66.
- Inoue, Y. H., M. S. Savoian, et al. (2004). "Mutations in orbit/mast reveal that the central spindle is comprised of two microtubule populations, those that initiate cleavage and those that propagate furrow ingression." J Cell Biol **166**(1): 49-60.
- Ish Horowicz, D. and J. F. Burke (1981). "Rapid and efficient cosmid cloning." Nucleic Acids Res **9**(13): 2989-98.
- Jin, Q. W., A. L. Pidoux, et al. (2002). "The mal2p protein is an essential component of the fission yeast centromere." Mol Cell Biol **22**(20): 7168-83.
- Kaplan, K. B., A. A. Burds, et al. (2001). "A role for the Adenomatous Polyposis Coli protein in chromosome segregation." Nat Cell Biol **3**(4): 429-32.
- Karig, I. E. (2004). "Funktionelle Analyse mitotischer Komponenten in der Spaltheife *Schizosaccharomyces pombe*." Dissertation HHU Düsseldorf.
- Karki, S., M. K. Tokito, et al. (1997). "Casein kinase II binds to and phosphorylates cytoplasmic dynein." J Biol Chem **272**(9): 5887-91.
- Kearney, P. H., M. Ebert, et al. (1994). "Molecular cloning and sequence analysis of two novel fission yeast casein kinase-1 isoforms." Biochem Biophys Res Commun **203**(1): 231-6.

- Kerres, A., C. Vietmeier-Decker, et al. (2004). "The Fission Yeast Kinetochore Component Spc7 Associates with the EB1 Family Member Mal3 and Is Required for Kinetochore-Spindle Association." *Mol Biol Cell* **15**(12): 5255-67.
- Khawaja, S., G. G. Gundersen, et al. (1988). "Enhanced stability of microtubules enriched in deetyrosinated tubulin is not a direct function of deetyrosination level." *J Cell Biol* **106**(1): 141-9.
- Kirschner, M. and T. Mitchison (1986). "Beyond self-assembly: from microtubules to morphogenesis." *Cell* **45**(3): 329-42.
- Kirschner, M. W. (1978). "Microtubule assembly and nucleation." *Int Rev Cytol* **54**: 1-71.
- Kitamura, K. and I. Yamashita (1998). "Identification of a novel casein kinase-1 homolog in fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*." *Gene* **214**(1-2): 131-7.
- Knippschild, U., A. Gocht, et al. (2005). "The casein kinase 1 family: participation in multiple cellular processes in eukaryotes." *Cell Signal* **17**(6): 675-89.
- Kodama, A., I. Karakesisoglou, et al. (2003). "ACF7: an essential integrator of microtubule dynamics." *Cell* **115**(3): 343-54.
- Komarova, Y., G. Lansbergen, et al. (2005). "EB1 and EB3 control CLIP dissociation from the ends of growing microtubules." *Mol Biol Cell* **16**(11): 5334-45.
- Komarova, Y. A., A. S. Akhmanova, et al. (2002). "Cytoplasmic linker proteins promote microtubule rescue in vivo." *J Cell Biol* **159**(4): 589-99.
- Korinek, W. S., M. J. Copeland, et al. (2000). "Molecular linkage underlying microtubule orientation toward cortical sites in yeast." *Science* **287**(5461): 2257-9.
- Kreitzer, G., G. Liao, et al. (1999). "Deetyrosination of tubulin regulates the interaction of intermediate filaments with microtubules in vivo via a kinesin-dependent mechanism." *Mol Biol Cell* **10**(4): 1105-18.
- Lee, L., J. S. Tirnauer, et al. (2000). "Positioning of the mitotic spindle by a cortical-microtubule capture mechanism." *Science* **287**(5461): 2260-2.
- Lemos, C. L., P. Sampaio, et al. (2000). "Mast, a conserved microtubule-associated protein required for bipolar mitotic spindle organization." *Embo J* **19**(14): 3668-82.
- Levenson, J. D., H. K. Huang, et al. (2002). "The *Schizosaccharomyces pombe* aurora-related kinase Ark1 interacts with the inner centromere protein Pic1 and mediates chromosome segregation and cytokinesis." *Mol Biol Cell* **13**(4): 1132-43.
- Liakopoulos, D., J. Kusch, et al. (2003). "Asymmetric loading of Kar9 onto spindle poles and microtubules ensures proper spindle alignment." *Cell* **112**(4): 561-74.
- Ligon, L. A., S. S. Shelly, et al. (2003). "The microtubule plus-end proteins EB1 and dynactin have differential effects on microtubule polymerization." *Mol Biol Cell* **14**(4): 1405-17.
- Liu, X., I. McLeod, et al. (2005). "Molecular analysis of kinetochore architecture in fission yeast." *Embo J* **24**(16): 2919-30.
- Louie, R. K., S. Bahmanyar, et al. (2004). "Adenomatous polyposis coli and EB1 localize in close proximity of the mother centriole and EB1 is a functional component of centrosomes." *J Cell Sci* **117**(Pt 7): 1117-28.
- Maekawa, H., T. Usui, et al. (2003). "Yeast Cdk1 translocates to the plus end of cytoplasmic microtubules to regulate bud cortex interactions." *Embo J* **22**(3): 438-49.
- Maiato, H., J. DeLuca, et al. (2004). "The dynamic kinetochore-microtubule interface." *J Cell Sci* **117**(Pt 23): 5461-77.
- Maiato, H., E. A. Fairley, et al. (2003). "Human CLASP1 is an outer kinetochore component that regulates spindle microtubule dynamics." *Cell* **113**(7): 891-904.
- Maiato, H., A. Khodjakov, et al. (2005). "*Drosophila* CLASP is required for the incorporation of microtubule subunits into fluxing kinetochore fibres." *Nat Cell Biol* **7**(1): 42-7.
- Mandelkow, E. M., E. Mandelkow, et al. (1991). "Microtubule dynamics and microtubule caps: a time-resolved cryo-electron microscopy study." *J Cell Biol* **114**(5): 977-91.

- Maniatis, T., E. F. Fritsch, et al. (1982). "Molecular cloning. A laboratory manual." Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Maniatis, T., E. F. Fritsch, et al. (1989). "Molecular cloning. A laboratory manual." Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Marks, J. and J. S. Hyams (1985). "Localization of F-actin through the cell division cycle of *Schizosaccharomyces pombe*." European Journal of Cell Biology **39**: 27-32.
- Mastrorade, D. N., K. L. McDonald, et al. (1993). "Interpolar spindle microtubules in PTK cells." J Cell Biol **123**(6 Pt 1): 1475-89.
- Masuda, H., T. Hirano, et al. (1990). "In vitro reactivation of spindle elongation in fission yeast *nuc2* mutant cells." J Cell Biol **110**(2): 417-25.
- Masuda, H., K. L. McDonald, et al. (1988). "The mechanism of anaphase spindle elongation: uncoupling of tubulin incorporation and microtubule sliding during in vitro spindle reactivation." J Cell Biol **107**(2): 623-33.
- Mata, J. and P. Nurse (1997). "tea1 and the microtubular cytoskeleton are important for generating global spatial order within the fission yeast cell." Cell **89**(6): 939-49.
- Matsudaira, P. (1991). "Modular organization of actin crosslinking proteins." Trends Biochem Sci **16**(3): 87-92.
- Maundrell, K. (1990). "*nmt1* of fission yeast. A highly transcribed gene completely repressed by thiamine." J Biol Chem **265**(19): 10857-64.
- Maundrell, K. (1993). "Thiamine-repressible expression vectors pREP and pRIP for fission yeast." Gene **123**(1): 127-30.
- May, J. W. (1962). "Sites of cell-wall extension demonstrated by the use of fluorescent antibody." Exp Cell Res **27**: 170-2.
- McDonald, K. L., M. K. Edwards, et al. (1979). "Cross-sectional structure of the central mitotic spindle of *Diatoma vulgare*. Evidence for specific interactions between antiparallel microtubules." J Cell Biol **83**(2 Pt 1): 443-61.
- McIntosh, J. R., K. L. McDonald, et al. (1979). "Three-dimensional structure of the central mitotic spindle of *Diatoma vulgare*." J Cell Biol **83**(2 Pt 1): 428-42.
- McIntosh, J. R., U. P. Roos, et al. (1985). "Architecture of the microtubule component of mitotic spindles from *Dictyostelium discoideum*." J Cell Sci **75**: 93-129.
- Meads, T. and T. A. Schroer (1995). "Polarity and nucleation of microtubules in polarized epithelial cells." Cell Motil Cytoskeleton **32**(4): 273-88.
- Meggio, F. and L. A. Pinna (2003). "One-thousand-and-one substrates of protein kinase CK2?" Faseb J **17**(3): 349-68.
- Merdes, A. and J. De Mey (1990). "The mechanism of kinetochore-spindle attachment and polewards movement analyzed in PtK2 cells at the prophase-prometaphase transition." Eur J Cell Biol **53**(2): 313-25.
- Miller, R. K., S. C. Cheng, et al. (2000). "Bim1p/Yeb1p mediates the Kar9p-dependent cortical attachment of cytoplasmic microtubules." Mol Biol Cell **11**(9): 2949-59.
- Mimori-Kiyosue, Y., I. Grigoriev, et al. (2005). "CLASP1 and CLASP2 bind to EB1 and regulate microtubule plus-end dynamics at the cell cortex." J Cell Biol **168**(1): 141-53.
- Mimori-Kiyosue, Y., N. Shiina, et al. (2000). "The dynamic behavior of the APC-binding protein EB1 on the distal ends of microtubules." Curr Biol **10**(14): 865-8.
- Mimori-Kiyosue, Y. and S. Tsukita (2003). "'Search-and-Capture' of Microtubules through Plus-End-Binding Proteins (+TIPs)." J Biochem (Tokyo) **134**(3): 321-6.
- Mitchison, J. M. (1957). "The growth of single cells. I. *Schizosaccharomyces pombe*." Exp Cell Res **13**(2): 244-62.
- Mitchison, J. M. and P. Nurse (1985). "Growth in cell length in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*." J Cell Sci **75**: 357-76.
- Mitchison, T. and M. Kirschner (1984). "Microtubule assembly nucleated by isolated centrosomes." Nature **312**(5991): 232-7.

- Mitchison, T. J. (1993). "Localization of an exchangeable GTP binding site at the plus end of microtubules." *Science* **261**(5124): 1044-7.
- Mitchison, T. J. and M. W. Kirschner (1984). "Dynamic instability of microtubule growth." *Nature* **312**: 237-242.
- Mitchison, T. J. and M. W. Kirschner (1985). "Properties of the kinetochore in vitro. I. Microtubule nucleation and tubulin binding." *J Cell Biol* **101**(3): 755-65.
- Moreno, M. B., A. Duran, et al. (2000). "A family of multifunctional thiamine-repressible expression vectors for fission yeast." *Yeast* **16**(9): 861-72.
- Moreno, S., A. Klar, et al. (1991). "Molecular genetic analysis of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*." *Methods Enzymol* **194**: 795-823.
- Morrison, E. E., B. N. Wardleworth, et al. (1998). "EB1, a protein which interacts with the APC tumour suppressor, is associated with the microtubule cytoskeleton throughout the cell cycle." *Oncogene* **17**(26): 3471-7.
- Morton, W. M., K. R. Ayscough, et al. (2000). "Latrunculin alters the actin-monomer subunit interface to prevent polymerization." *Nat Cell Biol* **2**(6): 376-8.
- Muller-Reichert, T., D. Chretien, et al. (1998). "Structural changes at microtubule ends accompanying GTP hydrolysis: information from a slowly hydrolyzable analogue of GTP, guanylyl (alpha,beta)methylenediphosphonate." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(7): 3661-6.
- Munemitsu, S., B. Souza, et al. (1994). "The APC gene product associates with microtubules in vivo and promotes their assembly in vitro." *Cancer Res* **54**(14): 3676-81.
- Nabeshima, K., H. Kurooka, et al. (1995). "p93dis1, which is required for sister chromatid separation, is a novel microtubule and spindle pole body-associating protein phosphorylated at the Cdc2 target sites." *Genes Dev* **9**(13): 1572-85.
- Nabetani, A., T. Koujin, et al. (2001). "A conserved protein, Nuf2, is implicated in connecting the centromere to the spindle during chromosome segregation: a link between the kinetochore function and the spindle checkpoint." *Chromosoma* **110**(5): 322-34.
- Nakamura, M., X. Z. Zhou, et al. (2001). "Critical role for the EB1 and APC interaction in the regulation of microtubule polymerization." *Curr Biol* **11**(13): 1062-7.
- Nakaseko, Y., G. Goshima, et al. (2001). "M phase-specific kinetochore proteins in fission yeast. Microtubule- associating Dis1 and Mtc1 display rapid separation and segregation during anaphase." *Curr Biol* **11**(8): 537-49.
- Nakaseko, Y., K. Nabeshima, et al. (1996). "Dissection of fission yeast microtubule associating protein p93Dis1: regions implicated in regulated localization and microtubule interaction." *Genes Cells* **1**(7): 633-44.
- Nathke, I. S., C. L. Adams, et al. (1996). "The adenomatous polyposis coli tumor suppressor protein localizes to plasma membrane sites involved in active cell migration." *J Cell Biol* **134**(1): 165-79.
- Niccoli, T., A. Yamashita, et al. (2004). "The p150-Glued Ssm4p regulates microtubular dynamics and nuclear movement in fission yeast." *J Cell Sci* **117**(Pt 23): 5543-56.
- Nislow, C., V. A. Lombillo, et al. (1992). "A plus-end-directed motor enzyme that moves antiparallel microtubules in vitro localizes to the interzone of mitotic spindles." *Nature* **359**(6395): 543-7.
- Niwa, O., T. Matsumoto, et al. (1986). "Construction of a mini-chromosome by deletion and its mitotic and meiotic behaviour in fission yeast." *Mol Gen Genet* **203**(203): 397-405.
- Nogales, E., M. Whittaker, et al. (1999). "High-resolution model of the microtubule." *Cell* **96**(1): 79-88.
- Okazaki, K., N. Okazaki, et al. (1990). "High-frequency transformation method and library transducing vectors for cloning mammalian cDNAs by trans-complementation of *Schizosaccharomyces pombe*." *Nucleic Acids Res* **18**(22): 6485-9.

- Pardo, M. and P. Nurse (2005). "The nuclear rim protein Amol is required for proper microtubule cytoskeleton organisation in fission yeast." *J Cell Sci* **118**(Pt 8): 1705-14.
- Partridge, J. F., B. Borgstrom, et al. (2000). "Distinct protein interaction domains and protein spreading in a complex centromere." *Genes and Development* **14**: 783-791.
- Pellman, D. (2001). "A CINtillating new job for the APC tumor suppressor." *Science* **291**: 2555-2556.
- Pidoux, A. L. and R. C. Allshire (2000). "Centromeres: getting a grip of chromosomes." *Curr Opin Cell Biol* **12**(3): 308-19.
- Pidoux, A. L., W. Richardson, et al. (2003). "Sim4: a novel fission yeast kinetochore protein required for centromeric silencing and chromosome segregation." *J Cell Biol* **161**(2): 295-307.
- Pierre, P., J. Scheel, et al. (1992). "CLIP-170 links endocytic vesicles to microtubules." *Cell* **70**(6): 887-900.
- Pinna, L. A. (1990). "Casein kinase 2: an 'eminence grise' in cellular regulation?" *Biochim Biophys Acta* **1054**(3): 267-84.
- Pinsky, B. A. and S. Biggins (2005). "The spindle checkpoint: tension versus attachment." *Trends Cell Biol* **15**(9): 486-93.
- Purich, D. L. and D. Kristofferson (1984). "Microtubule assembly: a review of progress, principles, and perspectives." *Adv Protein Chem* **36**: 133-212.
- Radcliffe, P., D. Hirata, et al. (1998). "Identification of novel temperature-sensitive lethal alleles in essential beta-tubulin and nonessential alpha 2-tubulin genes as fission yeast polarity mutants." *Mol Biol Cell* **9**(7): 1757-71.
- Radcliffe, P. A., M. A. Garcia, et al. (2000). "The cofactor-dependent pathways for alpha- and beta-tubulins in microtubule biogenesis are functionally different in fission yeast." *Genetics* **156**(1): 93-103.
- Radcliffe, P. A. and T. Toda (2000). "Characterization of fission yeast alp11 mutants defines three functional domains within tubulin-folding cofactor B." *Mol Gen Genet* **263**: 752-760.
- Rea, S., F. Eisenhaber, et al. (2000). "Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases." *Nature* **406**(6796): 593-9.
- Rehberg, M. and R. Graf (2002). "*Dictyostelium* EB1 is a genuine centrosomal component required for proper spindle formation." *Mol Biol Cell* **13**(7): 2301-10.
- Rieder, C. L. (1990). "Formation of the astral mitotic spindle: ultrastructural basis for the centrosome-kinetochore interaction." *Electron Microsc Rev* **3**(2): 269-300.
- Rieder, C. L. and S. P. Alexander (1990). "Kinetochores are transported poleward along a single astral microtubule during chromosome attachment to the spindle in newt lung cells." *J Cell Biol* **110**(1): 81-95.
- Rogers, S. L., G. C. Rogers, et al. (2002). "*Drosophila* EB1 is important for proper assembly, dynamics, and positioning of the mitotic spindle." *J Cell Biol* **158**(5): 873-84.
- Roper, K., S. L. Gregory, et al. (2002). "The 'spectraplakins': cytoskeletal giants with characteristics of both spectrin and plakin families." *J Cell Sci* **115**(Pt 22): 4215-25.
- Rosenblatt, J., L. P. Cramer, et al. (2004). "Myosin II-dependent cortical movement is required for centrosome separation and positioning during mitotic spindle assembly." *Cell* **117**(3): 361-72.
- Sagolla, M. J., S. Uzawa, et al. (2003). "Individual microtubule dynamics contribute to the function of mitotic and cytoplasmic arrays in fission yeast." *J Cell Sci* **116**(Pt 24): 4891-903.
- Saitoh, S., K. Ishii, et al. (2005). "Spindle checkpoint signaling requires the mis6 kinetochore subcomplex, which interacts with mad2 and mitotic spindles." *Mol Biol Cell* **16**(8): 3666-77.

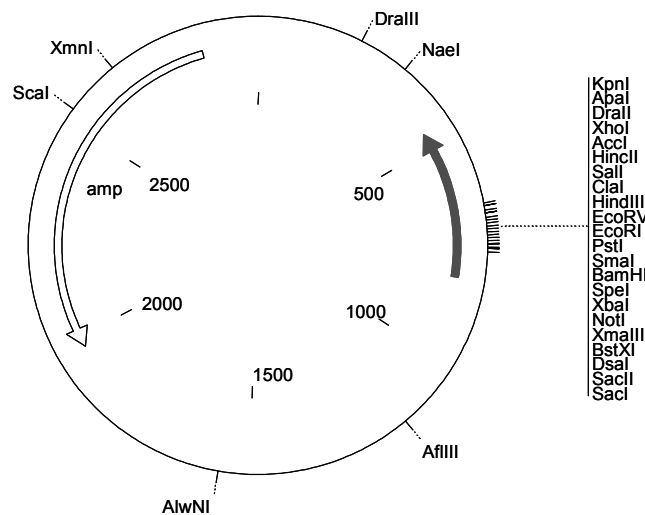
- Saitoh, S., K. Takahashi, et al. (1997). "Mis6, a fission yeast inner centromere protein, acts during G1/S and forms specialized chromatin required for equal segregation." Cell **90**(1): 131-43.
- Sammak, P. J. and G. G. Borisy (1988). "Direct observation of microtubule dynamics in living cells." Nature **332**(6166): 724-6.
- Sammak, P. J., G. J. Gorbsky, et al. (1987). "Microtubule dynamics in vivo: a test of mechanisms of turnover." J Cell Biol **104**(3): 395-405.
- Sawin, K. E., P. C. Lourenco, et al. (2004). "Microtubule nucleation at non-spindle pole body microtubule-organizing centers requires fission yeast centrosomin-related protein mod20p." Curr Biol **14**(9): 763-75.
- Sawin, K. E. and H. A. Snaith (2004). "Role of microtubules and tea1p in establishment and maintenance of fission yeast cell polarity." J Cell Sci **117**(Pt 5): 689-700.
- Schiebel, E. (2000). "gamma-tubulin complexes: binding to the centrosome, regulation and microtubule nucleation." Curr Opin Cell Biol **12**(1): 113-8.
- Schliwa, M. and G. Woehlke (2003). "Molecular motors." Nature **422**(6933): 759-65.
- Schulze, E., D. J. Asai, et al. (1987). "Posttranslational modification and microtubule stability." J Cell Biol **105**(5): 2167-77.
- Schuyler, S. C. and D. Pellman (2001). "Microtubule "plus-end-tracking proteins": The end is just the beginning." Cell **105**(4): 421-4.
- Schwartz, K., K. Richards, et al. (1997). "BIM1 Encodes a Microtubule-binding Protein in Yeast." Mol Biol Cell **8**(12): 2677-91.
- Slep, K. C., S. L. Rogers, et al. (2005). "Structural determinants for EB1-mediated recruitment of APC and spectraplakins to the microtubule plus end." J Cell Biol **168**(4): 587-98.
- Snaith, H. A., I. Samejima, et al. (2005). "Multistep and multimode cortical anchoring of tea1p at cell tips in fission yeast." Embo J **24**(21): 3690-9.
- Snaith, H. A. and K. E. Sawin (2003). "Fission yeast mod5p regulates polarized growth through anchoring of tea1p at cell tips." Nature **423**(6940): 647-51.
- Snaith, H. A. and K. E. Sawin (2005). "Tea for three: control of fission yeast polarity." Nat Cell Biol **7**(5): 450-1.
- Snell, V. and P. Nurse (1994). "Genetic analysis of cell morphogenesis in fission yeast--a role for casein kinase II in the establishment of polarized growth." Embo J **13**(9): 2066-74.
- Su, L. K., M. Burrell, et al. (1995). "APC binds to the novel protein EB1." Cancer Res **55**(14): 2972-7.
- Sun, D., C. L. Leung, et al. (2001). "Characterization of the microtubule binding domain of microtubule actin crosslinking factor (MACF): identification of a novel group of microtubule associated proteins." J Cell Sci **114**(Pt 1): 161-172.
- Takahashi, K., E. S. Chen, et al. (2000). "Requirement of Mis6 centromere connector for localizing a CENP-A-like protein in fission yeast." Science **288**(5474): 2215-9.
- Takahashi, K., E. S. Chen, et al. (2000). "Requirement of Mis6 centromere connector for localizing a CENP-A -like protein in fission yeast." Science **288**: 2215-2219.
- Tan, A. L., P. C. Rida, et al. (2005). "Essential tension and constructive destruction: the spindle checkpoint and its regulatory links with mitotic exit." Biochem J **386**(Pt 1): 1-13.
- Tatebe, H., K. Shimada, et al. (2005). "Wsh3/Tea4 is a novel cell-end factor essential for bipolar distribution of Tea1 and protects cell polarity under environmental stress in *S. pombe*." Curr Biol **15**(11): 1006-15.
- Tippit, D. H., L. Pillus, et al. (1983). "Near-neighbor analysis of spindle microtubules in the alga *Ochromonas*." Eur J Cell Biol **30**(1): 9-17.
- Tippit, D. H., D. Schulz, et al. (1978). "Analysis of the distribution of spindle microtubules in the diatom *Fragilaria*." J Cell Biol **79**(3): 737-63.

- Tirnauer, J. S., J. C. Canman, et al. (2002). "EB1 targets to kinetochores with attached, polymerizing microtubules." Mol Biol Cell **13**(12): 4308-16.
- Tirnauer, J. S., S. Grego, et al. (2002). "EB1-microtubule interactions in *Xenopus* egg extracts: role of EB1 in microtubule stabilization and mechanisms of targeting to microtubules." Mol Biol Cell **13**(10): 3614-26.
- Tirnauer, J. S., E. O'Toole, et al. (1999). "Yeast Bim1p promotes the G1-specific dynamics of microtubules." J Cell Biol **145**(5): 993-1007.
- Toda, T., M. Yamamoto, et al. (1981). "Sequential alterations in the nuclear chromatin region during mitosis of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*: video fluorescence microscopy of synchronously growing wild-type and cold-sensitive cdc mutants by using a DNA-binding fluorescent probe." J Cell Sci **52**: 271-87.
- Troxell, C. L., M. A. Sweezy, et al. (2001). "pkl1(+) and klp2(+): Two kinesins of the Kar3 subfamily in fission yeast perform different functions in both mitosis and meiosis." Mol Biol Cell **12**(11): 3476-88.
- Uzawa, S. and M. Yanagida (1992). "Visualization of centromeric and nucleolar DNA in fission yeast by fluorescence in situ hybridization." J Cell Sci **101**(Pt 2): 267-75.
- Vardy, L. and T. Toda (2000). "The fission yeast gamma-tubulin complex is required in G(1) phase and is a component of the spindle assembly checkpoint." Embo J **19**(22): 6098-111.
- Venkatram, S., J. J. Tasto, et al. (2004). "Identification and characterization of two novel proteins affecting fission yeast gamma-tubulin complex function." Mol Biol Cell **15**(5): 2287-301.
- Verde, F., J. Mata, et al. (1995). "Fission yeast cell morphogenesis: identification of new genes and analysis of their role during the cell cycle." J Cell Biol **131**(6 Pt 1): 1529-38.
- Vietmeier-Decker, C. (2004). "Die Funktion des Mikrotubuli-assoziierten *S. pombe* Proteins Mal3p in der Mitose." Dissertation, HHU Düsseldorf.
- Vinh, D. B., J. W. Kern, et al. (2002). "Reconstitution and characterization of budding yeast gamma-tubulin complex." Mol Biol Cell **13**(4): 1144-57.
- Walczak, C. E. (2000). "Microtubule dynamics and tubulin interacting proteins." Curr Opin Cell Biol **12**(1): 52-6.
- Walczak, C. E. (2003). "The Kin I kinesins are microtubule end-stimulated ATPases." Mol Cell **11**(2): 286-8.
- Wang, P. C., A. Vancura, et al. (1994). "Cytoplasmic forms of fission yeast casein kinase-1 associate primarily with the particulate fraction of the cell." J Biol Chem **269**(16): 12014-23.
- Webster, D. R., G. G. Gundersen, et al. (1987). "Differential turnover of tyrosinated and detyrosinated microtubules." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(24): 9040-4.
- Wen, Y., C. H. Eng, et al. (2004). "EB1 and APC bind to mDia to stabilize microtubules downstream of Rho and promote cell migration." Nat Cell Biol **6**(9): 820-30.
- West, R. R., T. Malmstrom, et al. (2001). "Two related kinesins, klp5+ and klp6+, foster microtubule disassembly and are required for meiosis in fission yeast." Mol Biol Cell **12**(12): 3919-32.
- Wittmann, T., A. Hyman, et al. (2001). "The spindle: a dynamic assembly of microtubules and motors." Nature Cell Biology **3**: 28-34.
- Wittmann, T. and C. M. Waterman-Storer (2005). "Spatial regulation of CLASP affinity for microtubules by Rac1 and GSK3{beta} in migrating epithelial cells." J Cell Biol **169**(6): 929-39.
- Wojcik, E., R. Basto, et al. (2001). "Kinetochore dynein: its dynamics and role in the transport of the Rough deal checkpoint protein." Nat Cell Biol **3**(11): 1001-7.

-
- Wolff, S., Z. Xiao, et al. (2005). "Interaction of casein kinase 1 delta (CK1 delta) with the light chain LC2 of microtubule associated protein 1A (MAP1A)." Biochim Biophys Acta **1745**(2): 196-206.
- Yin, H., D. Pruyne, et al. (2000). "Myosin V orientates the mitotic spindle in yeast." Nature **406**(6799): 1013-5.
- Yin, H., L. You, et al. (2002). "Stu1p is physically associated with beta-tubulin and is required for structural integrity of the mitotic spindle." Mol Biol Cell **13**(6): 1881-92.
- Zhang, Y., W. J. Qiu, et al. (2001). "Differential molecular assemblies underlie the dual function of Axin in modulating the WNT and JNK pathways." J Biol Chem **276**(34): 32152-9.
- Zumbrunn, J., K. Kinoshita, et al. (2001). "Binding of the adenomatous polyposis coli protein to microtubules increases microtubule stability and is regulated by GSK3 beta phosphorylation." Curr Biol **11**(1): 44-9.

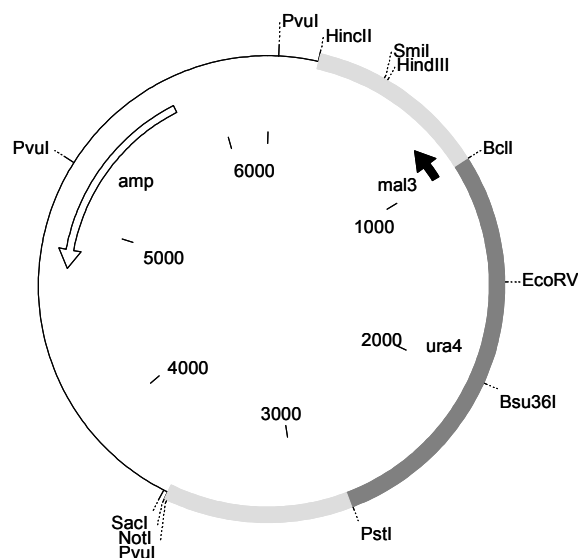
8 Anhang

8.1 Für die Mutagenese von *mal3*⁺ verwendete und hergestellte Plasmide



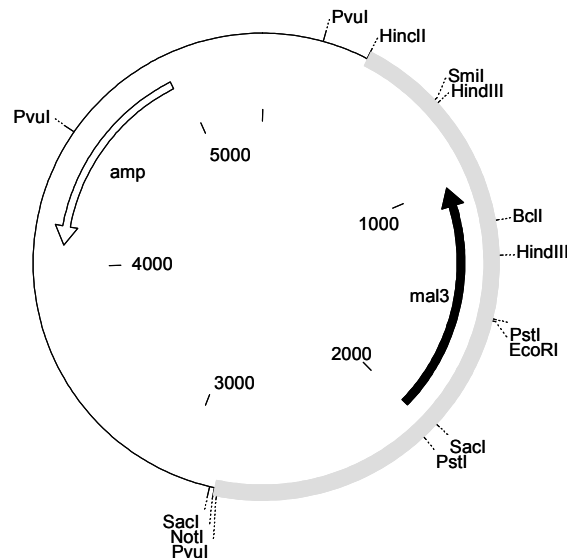
pBluescript sk + (pBSK):

Herkunft Stratagene. 2964 Bp groß. Enthält das *Amp*^R Gen (leerer Pfeil) als Selektionsmarker für die Selektion gegen Ampicillin in *E. coli*. Multiple Cloning site liegt in *lacZ* Marker (dunkel grauer Pfeil) für die Blau-Weiß Selektionierung.



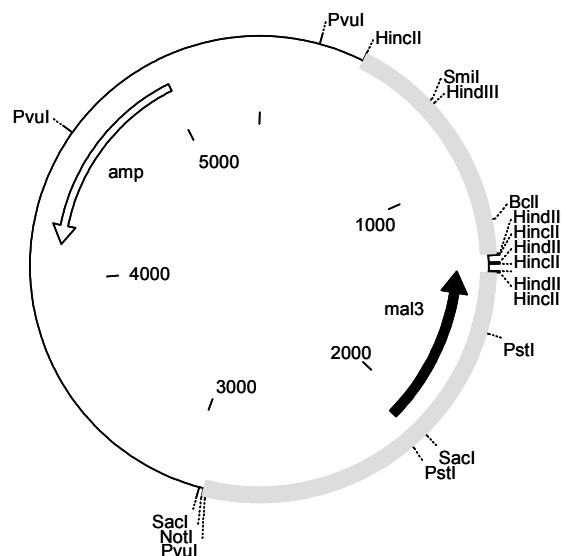
pBSK/ *mal3*Δ:: *ura4*⁺ (P524):

6266 Bp groß. pBSK/ *mal3*⁺ mit 1,8 Kb großem *ura4*⁺ Marker (grauer Bereich) *PstI*/ *BclI* in *mal3*⁺ ORF kloniert. Kurzer schwarzer Pfeil: die restlichen 175 BP des *mal3*⁺ ORFs. Enthält noch 802 BP des *mal3*⁺ Locus 5' und 778 BP 3' zum *ura4*⁺ Marker. Enthält das *Amp*^R Gen (leerer Pfeil) als Selektionsmarker für die Selektion in *E. coli*.



pBSK mit genomischem *mal3*⁺ Locus (pBSK/ *mal3*⁺, P187):

5352 Bp groß. Genomisches *mal3*⁺ Fragment (hell grauer Bereich), 2450 BP *Xba*I/ *Hinc*II in MCS von pBSK kloniert kloniert, enthält 987 Bp *mal3*⁺ ORF (schwarzer Pfeil) + 861 Bp 5' Bereich + 602 Bp 3' Bereich. Enthält das *Amp*^R Gen (leerer Pfeil) als Selektionsmarker für die Selektion in *E. coli*. Dieses Plasmid wurde als Template für die Mutagenese des *mal3*⁺ ORFs verwendet. Mutierte Plasmide unterscheiden sich nur in der jeweiligen Mutation von diesem Plasmid



pBSK/ *mal3*-206-pst (P532):

5416 Bp groß. Plasmid 187 mit Mutation ttg > gtt Phe-206 > Val. Mutierte Sequenz ist dreimal vorhanden, so dass 72 zusätzliche Bp vorhanden sind. Hierdurch wird ein frameshift hervorgerufen, der ein verfrühtes Stop-Kodon bewirkt. Schwarzer Pfeil: verkürzter *mal3*⁺ ORF. Enthält das *Amp*^R Gen (leerer Pfeil) als Selektionsmarker für die Selektion in *E. coli*.

8.2 Publikationen

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

Mol Biol Cell 15(12): 5255-67

eingereicht:

Grallert, A., Beuter, C., Karig, I., Wilks, D., Bagley, S., Craven, R., Fleig, U., Hagan, I.

S. pombe CLASP needs dynein, not EB1 or CLIP170 to induce microtubule instability and slows polymerization rates at cell tip1 in a dynein dependent manner.

Genes & Development 2006

9 Danksagung

An dieser Stelle bedanke ich mich bei all den Menschen, die meinen Weg in den letzten vier Jahren gemeinsam mit mir gegangen sind und mich bei meiner Arbeit unterstützt haben....

Mein ganz besonderer Dank gilt hierbei Frau Dr. Ursula Fleig. Ursula hat mir das Vertrauen geschenkt, nach meiner Diplom-Arbeit auch meine Doktor-Arbeit in ihrer Arbeitsgruppe anzufertigen. Sie hat mir bei allen Höhen und Tiefen während dieser Zeit unermüdlich, unterstützend und diskussionsbereit mit Rat und Tat zur Seite gestanden. So manches Experiment wäre ohne ihre motivierenden Worte und kritischen Anregungen sicherlich nicht zustande gekommen. Ursula hat mein persönliches Weiterkommen sowohl im Labor aber auch durch lehrreiche und interessante Aufenthalte in Kopenhagen, Lausanne und San Diego maßgeblich gefördert und mir viele Perspektiven aufgezeigt. Auch für die Hilfsbereitschaft, die sie mir nicht zuletzt beim lesen und diskutieren der verschiedenen Manuskriptvarianten entgegengebracht hat, möchte ich ihr danken. Danke Ursula!

Ein besonderer Dank gebührt auch Herrn Prof. Dr. Johannes H. Hegemann, für seine stetige Unterstützung, wissenschaftlichen Ratschläge und kritischen Anmerkungen während dieser Zeit. Ohne die wissenschaftliche Betreuung von Hans und insbesondere Ursula wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Ebenfalls danke ich Herrn Prof. Dr. Wagner für die freundliche Übernahme des Koreferats.

Außerdem sei allen Mitarbeitern der AGs Hegemann/ Fleig und des Instituts für Mikrobiologie für die freundschaftliche und kollegiale Atmosphäre gedankt. Ein ganz herzliches Dankeschön geht dabei an meine direkten Laborkolleginnen Corina, Inga, Anne, Eva und Eva, Visnja und Jennifer, die mit mir das „Abenteuer Labor“ Rücken an Rücken bzw. Seite an Seite, durchgestanden haben. Vor allem die stets freundliche Atmosphäre und „geistreiche Konversation“ während dieser Zeit werde ich nicht vergessen.

Großer Dank gebührt auch meinen Freunden und meiner Familie. Dabei geht ein ganz besonderer Dank an meine Eltern für die fortwährende Unterstützung in allen Lebenslagen.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name:	Christoph Beuter
geboren am:	02.12.1975 in Düsseldorf
Familienstand:	ledig

Schulausbildung

August 1982 – Juli 1986	Grundschule an der Rolandstraße in Düsseldorf
September 1986 – Juni 1995	Max-Planck-Gymnasium in Düsseldorf
	Abschluß: Allgemeine Hochschulreife

Universitätsausbildung und Berufserfahrung:

Oktober 1995 – August 2001	Studiengang Biologie (Diplom) Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf Abschluß: Diplom-Biologe Diplomarbeit: Charakterisierung von Komponenten der Chromosomensegregation bei der Spalthefe <i>Schizosaccharomyces pombe</i>
seit September 2001	wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. J. H. Hegemann/ PD. Dr. U. N. Fleig, Institut für Mikrobiologie, Lehrstuhl für funktionelle Genomforschung der Mikroorganismen, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Düsseldorf, Januar 2006

(Christoph Beuter)

Eidesstattliche Erklärung

Die hier vorgelegte Dissertation habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt. Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, 23.01.2006

(Christoph Beuter)