

# Haspin-Proteine der Hefe sind negative Regulatoren der Zellpolarität



DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES  
DER NATURWISSENSCHAFTEN (DR. RER. NAT.)  
DER FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

vorgelegt von  
Britta Swoboda

aus  
München

im Jahr 2012

Promotionsgesuch eingereicht am:

06.11.2012

Die Arbeit wurde angeleitet von:

Prof. Dr. Wolfgang Seufert

Unterschrift:

# Erklärung

---

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe des Literaturzitats gekennzeichnet.

Regensburg, November 2012

THERE ARE THINGS KNOWN,  
AND THERE ARE THINGS UNKNOWN  
IN BETWEEN THERE ARE DOORS.

William Blake

<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>9</b>
<b>1 Zusammenfassung .....</b>	<b>13</b>
<b>2 Abstract.....</b>	<b>15</b>
<b>3 Einleitung.....</b>	<b>17</b>
3.1 Der Zellteilungszyklus in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	17
3.1.1 Die Phasen des Zellzyklus.....	17
3.1.2 Die Entwicklung der Zellpolarität.....	19
3.1.3 Das Wachstum einer mitotischen Hefezelle .....	20
3.1.4 Die Organisation des Mikrotubuli-Zytoskeletts.....	23
3.1.4.1 Der mitotische Spindelzyklus.....	23
3.1.4.2 Die Orientierung der mitotischen Spindel.....	25
3.2 Die Regulation des Zellzyklus.....	26
3.2.1 Die Regulation durch zyklinabhängige Kinasen.....	27
3.2.2 Die Regulation durch Proteindegradation .....	28
3.2.3 Die Regulation durch Kontrollsysteme .....	29
3.3 Die atypischen Haspin-Proteinkinasen.....	32
3.3.1 Die Distribution der Haspin-Proteine.....	32
3.3.2 Der Aufbau der Haspin-Proteine .....	32
3.3.3 Histon H3 Threonin 3 – das bekannte Haspin Substrat .....	34
3.3.4 Die Haspin-Homologen Alk1 und Alk2 in der Hefe <i>S. cerevisiae</i> .....	35
<b>4 Ergebnisse.....</b>	<b>37</b>
4.1 Subzelluläres Lokalisationsmuster von Alk1 und Alk2 im Zellteilungszyklus .....	37
4.1.1 Lokalisation der Haspin-Proteine.....	37
4.1.2 Funktionsbereiche der N-terminalen Alk2-Domäne .....	42
4.2 Regulation der Alk2-Lokalisation durch Kin4.....	47
4.2.1 <i>ALK2</i> interagiert genetisch mit <i>KIN4</i> .....	47
4.2.2 Kin4 beeinflusst Alk1-Lokalisation nicht .....	48
4.2.3 Kin4-Verlust verändert Alk2-Lokalisation.....	49
4.2.4 Erhöhte Kin4-Mengen reduzieren Alk2-Kortexlokalisierung.....	53
4.2.5 Kin4 beeinflusst Alk2-Modifikation.....	59
4.3 Haspin-Proteine sind Regulatoren der Zellpolarität.....	62
4.3.1 Verlust von Haspin-Proteinen verstärkt Zellpolarität.....	62

# Inhaltsverzeichnis

---

4.3.1.1	<i>alk2Δ</i> -Mutante repolarisiert Komponenten des Zellwachstums .....	62
4.3.1.2	<i>alk1Δ alk2Δ</i> -Mutanten zeigen prolongiertes Wachstum.....	65
4.3.1.3	<i>alk1Δ alk2Δ</i> -Phänotyp benötigt Aktin-Zytoskelett .....	68
4.3.1.4	In <i>alk1Δ alk2Δ</i> -Mutanten persistiert Polaritätsmaschinerie .....	70
4.3.2	Erhöhte Alk2 Mengen beeinträchtigen die Zellpolarität.....	72
4.3.2.1	<i>ALK2</i> -Überexpression inhibiert spezifisch Knospung.....	72
4.3.2.2	<i>ALK2</i> -Überexpression inhibiert Aktin-Polarisation.....	73
4.3.2.3	<i>ALK2</i> -Überexpression verhindert Etablierung der Polarität .....	75
4.3.3	Bem2 als potentielles Substrat von Haspin .....	79
4.4	Wirkung von Haspin auf das Mikrotubuli-Zytoskelett.....	82
4.4.1	Spindelorientierung dauert in <i>alk1Δ alk2Δ</i> -Mutanten länger .....	84
4.4.2	Haspin ist kein Bestandteil bekannter Spindelorientierungswege .....	88
4.4.3	Haspin beeinflusst Dynamik der Mikrotubuli .....	94
4.5	Zusammenhang von Haspin und Histon H3 Threonin 3 in <i>S. cerevisiae</i> .....	97
4.5.1	H3 T3A-Phänotyp korreliert nicht mit dem der <i>alk1Δ alk2Δ</i> -Mutante.....	97
4.5.2	Keine Verbindung von Haspin zu CPC-Komponenten .....	99
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>104</b>
5.1	Modell für die Wirkungsweise von Haspin in der Zellpolarität.....	105
5.1.1	Verbindung von Haspin zur Mutterzell-spezifischen Kinase Kin4.....	107
5.1.2	Verbindung von Haspin zum Rho-GAP Bem2 .....	112
5.2	Haspin-Proteine beeinflussen die Dynamik des Mikrotubuli-Zytoskeletts .....	114
5.3	In <i>S. cerevisiae</i> besteht kein funktioneller Zusammenhang von Haspin mit der Histon H3 Threonin 3 Phosphorylierung .....	118
<b>6</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>120</b>
6.1	Arbeiten mit Bakterien .....	120
6.1.1	Kultivierung von Bakterien.....	120
6.1.2	Transformation von Plasmid-DNA mittels Elektroporation.....	120
6.2	Arbeiten mit Hefe – <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	120
6.2.1	Kultivierung von Hefestämmen in Flüssigmedium .....	120
6.2.2	Aufbewahrung und Konservierung von Hefestämmen .....	121
6.2.3	Wachstumstest von Hefestämmen mittels Verdünnungsreihe.....	121
6.2.4	Kreuzung von haploiden Hefestämmen .....	121
6.2.5	Sporulation diploider Hefezellen und Tetraden-Analyse.....	121

# Inhaltsverzeichnis

---

6.2.6	Kontrolle der Genexpression durch regulierbare Promotoren .....	122
6.2.7	Zellzyklus-Arreste .....	122
6.2.8	Hefetransformation nach der Lithiumacetat-Methode .....	123
6.3	Fixierung, Färbung, Mikroskopie und Durchflusszytometrie von Hefezellen .....	124
6.3.1	Ethanol-Fixierung von Hefezellen.....	124
6.3.2	Formaldehyd-Fixierung von Hefezellen .....	124
6.3.3	DNA-Färbung mit DAPI von Hefezellen .....	124
6.3.4	Aktin-Färbung von Hefezellen .....	125
6.3.5	Aktin-Depolymerisation mit Latrunculin B.....	125
6.3.6	Direkte Fluoreszenzmikroskopie mit Agarose beschichteten Objektträgern – <i>live-cell imaging</i> 125	
6.3.7	Indirekte Immunfluoreszenz .....	126
6.3.7.1	Beschichtung der Multiwell Objektträger mit Polylysin.....	126
6.3.7.2	Vorbereitung der Proben.....	126
6.3.8	Mikroskopie.....	127
6.3.9	Durchflusszytometrie.....	127
6.4	Genetische und molekularbiologische Methoden .....	128
6.4.1	Polymerasekettenreaktion (PCR) .....	128
6.4.1.1	PCR zur Amplifikation von DNA-Fragmenten.....	129
6.4.1.2	PCR-vermittelte Modifikation von chromosomalen Genen .....	129
6.4.1.3	Gezielte Mutagenese eines Gens mittels PCR.....	130
6.4.1.4	Kolonie-PCR zur Bestimmung des Paarungstyps von Hefestämmen .....	131
6.4.2	Restriktionsverdau von DNA .....	132
6.4.3	Gelelektrophorese von DNA.....	132
6.4.4	Ligation .....	133
6.4.5	Plasmidpräparation aus <i>Escherichia coli</i> .....	133
6.4.5.1	Plasmidschnellisolation .....	133
6.4.5.2	Säulenreinigung von Plasmid-DNA .....	134
6.4.6	Bestimmung von Konzentration und Reinheitsgrad einer DNA-Lösung .....	134
6.4.7	Präparation von genomischer DNA aus Hefezellen.....	134
6.5	Proteinanalytische Methoden.....	135
6.5.1	Herstellung von Proteinlysaten aus Hefezellen .....	135
6.5.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	135
6.5.3	Western-Blot und immunologischer Nachweis von Proteinen.....	136

# Inhaltsverzeichnis

---

<b>7</b>	<b>MATERIAL</b> .....	<b>138</b>
7.1	Nukleinsäuren .....	138
7.2	Proteine und Enzyme .....	138
7.3	Antikörper und Seren .....	138
7.3.1	Primäre Antikörper und Seren .....	138
7.3.2	Sekundäre Antikörper.....	139
7.4	Chemikalien .....	139
7.5	Verbrauchsmaterialien .....	141
7.6	Geräte und Software .....	142
7.6.1	Geräte .....	142
7.6.2	Software .....	144
7.7	Medien, Puffer und Lösungen.....	145
7.7.1	Bakterienmedien.....	145
7.7.2	Hefemedien .....	145
7.7.3	Puffer und Lösungen.....	146
7.8	Oligonukleotide.....	149
7.9	Plasmide .....	152
7.10	Hefestämme .....	154
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>163</b>
<b>9</b>	<b>Anhang</b> .....	<b>171</b>
9.1	Abbildungsverzeichnis.....	171
9.2	Tabellenverzeichnis.....	172
	<b>Lebenslauf</b> .....	<b>173</b>
	<b>Danksagung</b> .....	<b>174</b>

## Abkürzungsverzeichnis

1C	einfacher DNA-Gehalt (vor der Replikation der DNA)
2C	doppelter DNA-Gehalt (nach der Replikation der DNA)
$\alpha$ -	anti
$\Delta$	Deletion eines Gens
$\lambda$	Wellenlänge
$\Omega$	Ohm, Einheit des Widerstands
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
$\mu$	Mikro ( $10^{-6}$ )
$\mu\text{g}$	Mikrogramm
$\mu\text{l}$	Mikroliter
$\mu\text{F}$	Mikrofarad, Einheit der elektrischen Kapazität
`	Minute
<b>A</b>	
A	Ampere oder auch Absorption
aa	Aminosäuren ( <i>a</i> mino <i>a</i> cid)
Amp	Ampicillin
APC	<i>a</i> naphase <i>p</i> romoting <i>c</i> omplex
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	2'-Desoxyadenosintriphosphat
<b>B</b>	
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin ( <i>b</i> ovine <i>s</i> erum <i>a</i> lbumine)
bzw.	beziehungsweise
<b>C</b>	
cDNA	<i>c</i> opy DNA
CDK	zyklinabhängige Kinase ( <i>c</i> yclin <i>d</i> ependent <i>k</i> inase)
CKI	<i>c</i> yclin <i>d</i> ependent <i>k</i> inase <i>i</i> nhibitor
clonNAT	Nourseothricin
CPC	<i>c</i> hromosomal <i>p</i> assenger <i>c</i> omplex
c-terminal	carboxyterminal
C-Terminus	Carboxy-Ende einer Polypeptidkette
<b>D</b>	
D	Glukose
Da	Dalton
DAPI	4', 6'-Diamidino-2-phenylindol
DIC	<i>d</i> ifferential <i>i</i> nterference <i>c</i> ontrast
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure ( <i>d</i> esoxyribo <i>n</i> ucleic <i>a</i> cid)
dNTP	2'-Desoxynukleosidtriphosphat

# Abkürzungsverzeichnis

---

DTT	Dithiothreitol
<b>E</b>	
E	Extinktion
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ePK	eukaryotische Proteinkinase
et al.	<i>et altera</i>
EtOH	Ethanol
<b>F</b>	
FEAR	<i>Cdc fourteen early anaphase release</i>
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
<b>G</b>	
g	Gramm
G/Gal	Galaktose
GAP	<i>GTPase activating protein</i>
GDP	Guanosin-Diphosphat
GEF	<i>guanine nucleotide exchange factor</i>
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GTP	Guanosin-Triphosphat
<b>H</b>	
h	Stunde ( <i>hour</i> )
Haspin	<i>haploid germ cell specific nuclear protein kinase</i>
<b>I</b>	
IF	Immunfluoreszenz
<b>K</b>	
k	Kilo (10 <sup>3</sup> )
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
kV	Kilovolt
<b>L</b>	
l	Liter
LB	<i>Luria Broth</i> , Bakterienmedium
<b>M</b>	
M	molar (Mol/Liter)
mA	Milliampere
MEN	<i>mitotic exit network</i>
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter

## Abkürzungsverzeichnis

---

mM	millimolar
mRNA	Boten-( <i>messenger</i> ) RNA
ms	Millisekunde
MT	Mikrotubuli
MW	Molekulargewicht
MYC	c-myc-Epitop
<b>N</b>	
nm	Nanometer (10 <sup>9</sup> )
N-terminal	aminoterminal
N-Terminus	Amino-Ende einer Polypeptidkette
<b>O</b>	
OD <sub>600</sub>	Optische Dichte bei der Wellenlänge $\lambda = 600$ nm
ORF	offener Leserahmen ( <i>open reading frame</i> )
<b>P</b>	
<i>p</i>	Promotor
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Saline ( <i>phosphate buffered saline</i> )
PCR	Polymerase-Kettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PEG	Polyethylenglykol
<i>pGAL1</i>	Galaktose-induzierbarer Promotor
<i>pGALL</i>	abgeschwächter Galaktose-induzierbarer Promotor
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
<i>pADH</i>	konstitutiver <u>A</u> lkohol- <u>D</u> ehydrogenase <u>P</u> romotor
<i>pTEF2</i>	konstitutiver Promotor aus <i>Ashbya gossypii</i>
<i>pTPI</i>	konstitutiver <u>T</u> riose <u>P</u> hosphat <u>I</u> somerase Promotor
<b>R</b>	
R	Raffinose
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
<b>S</b>	
s	Sekunde
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SCF	Ubiquitinligasekomplex aus Skp1, Cullin und F-Box Protein
SD	synthetisch definiert
SDS	Natriumdodecylsulfat
SGA	<i>synthetic genetic array</i>
SH	Stammhintergrund
SPBm/t	Spindelpolkörper <u>M</u> utter/ <u>T</u> ochter ( <i>spindle pole body</i> )
SPOC	<i>spindle orientation checkpoint</i>

## Abkürzungsverzeichnis

---

### T

<i>t</i>	Terminator
T3ph	Threonin 3 Phosphorylierung
<i>tADH1</i>	<u>A</u> lkohol- <u>D</u> ehydrogenase-Terminator
TAE	Tris/Acetat/EDTA Puffer
TBS(-T)	Tris-gepufferte Saline (mit Tween)
<i>tCYC1</i>	Terminator des Gens <i>CYC1</i>
TE	Tris/EDTA
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris (hydroxymethyl) aminomethan

### U

U	Unit (Enzymmenge)
u.a.	unter anderem
Upm	Umdrehung pro Minute
UV	ultraviolettes Licht

### V

V	Volt
vgl.	vergleiche

### W

WB	Western-Blot
w/v	Masse pro Volumen
WT	Wildtyp

### X

X-Gal	(5-Brom-4-chlor-3-indolyl)- $\beta$ -D-galactosid
XY	Hefe-Vollmedium

### Z

z.B.	zum Beispiel
------	--------------

Aminosäuren und Nukleotide werden nach den internationalen Regeln abgekürzt. Die Schreibweise der Gene und Proteine richtet sich nach der Hefenomenklatur. Gängige Fachausdrücke aus dem Englischen wurden übernommen, wenn eine deutsche Entsprechung nicht existiert oder gebräuchlich ist.

## 1 Zusammenfassung

Haspine sind Serin/Threonin-Kinasen, die aufgrund ihrer abweichenden Struktur eine distinkte Subgruppe von eukaryotischen Proteinkinasen bilden. Der Name (*haploid germ cell specific nuclear protein kinase*) reflektiert ihre Entdeckung in testikulären Maus-Gameten, wobei inzwischen bekannt ist, dass sie ubiquitär in proliferierenden Zellen aller bislang untersuchten Organismen exprimiert werden. In Säugern, Pflanzen, *S. pombe* und *X. laevis* phosphorylieren Haspine das Histon H3 an der Position Threonin 3. Über diese Modifikation unterstützt Haspin u.a. die Chromosomen-Kohäsion und die Positionierung des CPCs (*chromosomal passenger complex*) am inneren Zentromer. In *S. cerevisiae* gibt es – anders als in Säugern - statt einem, zwei Haspin-Homologe, Alk1 und Alk2, deren Funktion bislang weitestgehend unverstanden ist. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass in der Bäckerhefe die Haspin-Proteine das spezifisch auf die Tochterzelle gerichtete Wachstum in der Mitose beenden. Im Vergleich mit anderen morphogenetischen Ereignissen ist dieser Schritt molekular unverstanden.

Hinweise für eine solche Funktion lieferten die Analysen der Haspin-Doppelmutante und die Überexpressionsstudien von *ALK2*. Die Abwesenheit von *ALK1* und *ALK2* führte dazu, dass die Zellen nicht mehr in der Lage waren, die Asymmetrie der Mutter-Tochterzelle aufzuheben. Durch die Visualisierung einer Serie von Komponenten des polarisierten Wachstums und des Aktin-Zytoskeletts zeigte sich, dass die Polarisationsmaschinerie am Kortex nicht aufgelöst werden konnte. Folglich bildeten sich große, elongierte Tochterzellen. Darüber hinaus wirkten erhöhte Alk2-Mengen inhibitorisch auf die Assemblierung von Proteinen der Polaritätsmaschinerie und auf die Polarisation des Aktin-Zytoskeletts. Dadurch wurde spezifisch die Ausbildung einer Knospe unterbunden, während die Spindelpol-Duplikation und die DNA-Replikation in der Zellprogression fortschritten.

Weiterhin unterstützten mikroskopische Studien der räumlichen und zeitlichen Lokalisation von Alk1 und Alk2 eine Aufgabe bei der Beendigung des spezifisch auf die Tochterzelle gerichteten Zellwachstums. Dabei zeigte sich zum Einen, dass beide Homologen Zellzyklus-abhängig reguliert werden und in der G1-Phase, in der die Etablierung der Zellpolarität beginnt, nicht vorhanden sind. Zum Anderen wurde beobachtet, dass Alk1 inhomogen im Zytoplasma und am mütterlichen Kortex lokalisiert, Alk2 hingegen im Kern, an der nukleären Spindel und am Knospenhals. Nachdem der Kern den Knospenhals passierte, war Alk2 und auch Alk1, im Metaphase-arretierten Zustand, verstärkt am Knospenkortex zu detektieren. Durch die Untersuchung verschiedener N- und C-terminaler Verkürzungen von Alk2 konnte gezeigt werden, dass der N-terminale Bereich hinreichende Regionen für die nukleäre, kortikale als auch für die Knospenhals-Lokalisation beinhaltet.

Zudem ergab sich, dass die asymmetrisch lokalisierende Kinase Kin4 die kortikale und nukleäre Lokalisation von Alk2 steuert. Auf diese Weise wird Alk2 zum richtigen Zeitpunkt zur Beendigung des polaren Wachstums an den Kortex der Tochterzelle gelenkt. Erhöhte Kin4-Mengen führten zu einem Verlust der kortikalen Alk2-Lokalisation. Entsprechend bewirkte die Abwesenheit des Mutterzell-spezifischen Kin4s eine Zunahme des Alk2-Signals am mütterlichen Kortex. Zusätzlich nahm in *kin4Δ*-Mutanten das nukleäre Signal von Alk2(1-676) und des N-terminalen Subfragments Alk2(1-333) ab, während das der Verkürzungen Alk2(291-330) und Alk2(112-333) unverändert in seiner Intensität war. Aus diesem Grund scheint der Einfluss von Kin4 auf die Kernlokalisierung von Alk2 indirekt über den Bereich der Aminosäuren 1 bis 112 vermittelt zu werden.

Des Weiteren zeigte sich, dass Haspin die Lokalisation von Bem2 steuert. In der *alk1Δ alk2Δ*-Mutante war das am Zellwachstum beteiligte Protein nicht mehr am Kortex zu detektieren, während es nach *ALK2*-Überexpression dort verstärkt lokalisierte. Möglicherweise stellt Bem2 das potentielle Zielprotein von den Haspin-Homologen zur Beendigung des polaren Wachstums dar.

Genetische Interaktionen der Haspin-Doppelmutante mit dem Gen des Kinesin-verwandten Motorproteins Cin8 wiesen auf eine Verbindung zum Mikrotubuli-Zytoskelett hin. Bei der Visualisierung der Spindel der Haspin-Doppelmutanten zeigte sich, dass die Abwesenheit beider Proteine die Orientierung der Spindel stört, was in falsch ausgerichteten Mikrotubuli-Strukturen resultierte. Es konnte gezeigt werden, dass Alk1 und Alk2 keine Bestandteile bekannter Spindelorientierungswege sind, jedoch mit diesen in Verbindung stehen. Zudem wurde eine Rolle von Haspin in der Mikrotubuli-Dynamik immer wahrscheinlicher, da genetische Interaktionen von *alk1Δ alk2Δ* mit Mutanten, die eine veränderte Mikrotubuli-Dynamik aufwiesen, beobachtet wurden.

Weiterhin wurde deutlich, dass Haspin in *S. cerevisiae* – anders als in Säugerzellen - seine Funktionen nicht über eine Histon H3 Threonin 3 Phosphorylierung ausübt. Zum Einen zeigte eine Histon-Mutante, bei der diese Stelle unmodifizierbar war, nicht die Phänotypen der Haspin-Doppelmutante. Zum Anderen wurde in der Bäckerhefe die in der Literatur beschriebene, über Haspin-vermittelte CPC-Lokalisation nicht festgestellt.

Zusammengenommen weisen diese Daten darauf hin, dass die Haspin-Homologen Alk1 und Alk2 in *S. cerevisiae* das asymmetrisch auf die Tochter gerichtete Wachstum in der Mitose beenden. Dabei stellt nicht, wie aus anderen Organismen bekannt, das Histon H3 Threonin 3 das relevante Substrat dar, sondern womöglich das Rho-GAP Bem2.

## 2 Abstract

Haspins are serin/threonine kinases which form, due to their different structure, a distinct subgroup of eukaryotic protein kinases. The name *haploid germ cell specific nuclear protein kinase* (Haspin) reflects their discovery in testicular mice germ cells, however it is known, to date, that they are ubiquitarily expressed in all probed organisms. In mammals, plants, *S. pombe* and *X. laevis*, Haspins phosphorylate histone H3 at position threonine 3. In addition to other functions Haspin supports the cohesion of chromosomes and the positioning of the CPC (chromosomal passenger complex) to the inner centromere using this modification. Unlike the situation in mammals, in *S. cerevisiae*, there are two instead of one Haspins, Alk1 and Alk2, whose function is almost unknown up to now. In this work it was shown that Haspins in budding yeast terminate the specific daughter cell directed growth in mitosis. Unlike other morphogenetic events this step has been hardly investigated on a molecular level.

Details for such a function were obtained through analysis of the Haspin-double mutant and the overexpression of *ALK2*. In the absence of *ALK1* and *ALK2* the cells were not able to break down the asymmetry between the mother-daughter cell. Through visualization of a series of polarity growth components and the actin cytoskeleton, this work describes that the polarity machinery at the cortex could not dissolve and consequently, large, elongated daughter cells emerged. In addition, an elevated amount of Alk2 appeared to inhibit the assembly of the polarity machinery and the actin cytoskeleton. Thereby, the formation of the bud was specifically prevented, while the duplication of the spindle pole body and the DNA-replication proceeded in the cell cycle.

Furthermore, microscopy studies of the spatial and temporal localization of Alk1 and Alk2 support their function in determining the polarized growth. On the one hand it could be shown that both Haspin proteins are cell-cycle dependent regulated and are absent in G1-phase, where the polarity establishment begins. On the other hand it could be shown that Alk1 is localized in the cytoplasm and the mother cortex, while Alk2 was present in the nucleus, at the nuclear spindle and at the budneck. After the nucleus passed the budneck, Alk2 and Alk1 were strongly detected at the bud cortex. Analysis of various Alk2 constructs, C-terminal as well as N-terminal truncated, could delimit the area of the nuclear, cortical and the budneck localization to the N-terminal region.

Moreover the asymmetric localizing kinase Kin4 directs the cortical and nuclear localization of Alk2 and navigates therefore Alk2 at the right time to the daughter cortex. An increased amount of Kin4 led to a loss of the cortical Alk2 localization. In addition, the absence of the mother specific Kin4 resulted in an increased cortical Alk2 signal. Furthermore, the nuclear signal of Alk2(1-676) and Alk2(1-333) was reduced in *kin4Δ* mutants, while the signal of Alk2(291-330) and

Alk2(112-333) was unaltered. For this reason the influence of Kin4 on the nuclear localization of Alk2 seems to be mediated indirectly through the amino acids 1 – 112.

Moreover it was shown that Haspin regulates the localization of Bem2. In the *alk1Δ alk2Δ* mutant the polarity growth protein was no longer detectable at the cortex, while after the overexpression of *ALK2*, Bem2 localized there more intensely. It is possible that Bem2 is the potential substrate of Haspin for terminating the polarized growth.

Genetic interactions of the Haspin double mutant with the gene of the kinesin-related motorprotein Cin8 indicated a connection to the microtubule network. By visualization of the spindle in the Haspin double mutants, it could be shown that the simultaneously absence of Alk1 and Alk2 disturbed the spindle orientation, resulting in misorientated microtubule structures. This work discovered that Alk1 and Alk2 do not perform their function through one of the common spindle orientation pathways, however they are connected to them. In addition, a role of Haspins in microtubule dynamics became more likely, because genetic interactions of *alk1Δ alk2Δ* with mutants, which had altered microtubule dynamics, could be observed.

Moreover, unlike the situation in mammals, Haspins in *S. cerevisiae* do not perform their function through histone H3 threonine 3 phosphorylation. On the one hand, a histone mutant, which was not modifiable at this site, did not phenocopy the Haspin double mutant. On the other hand, the CPC-localization interceded by Haspin described in the literature, could not be determined in budding yeast.

Taken together, the results strengthen the opinion that the Haspin-homologues Alk1 and Alk2 in *S. cerevisiae* terminate the daughter cell directed growth by breaking down the mother-daughter cell asymmetry. Thereby, unlike in other organisms, the relevant target protein is not histone H3 threonine 3, but potentially Rho-GAP Bem2.

## 3 Einleitung

Um funktionelle Aspekte der Haspin-Proteine zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit der Modellorganismus *Saccharomyces cerevisiae* verwendet. Dieser einzellige Pilz, der taxonomisch in die Klasse der Ascomyceten gehört, ist sehr beliebt, da er zu den einfachsten Eukaryoten zählt und viele seiner circa 6200 Hefegene Homologe im Genom höherer Eukaryoten aufweisen (Dolinski and Botstein, 2007; Sherman, 1998). Im Hinblick auf die Analyse der genetischen Komplexität eukaryotischer Zellen ergeben sich daraus einige Vorteile, wodurch grundlegende Mechanismen, wie zum Beispiel der Zellzyklus, eleganter untersucht werden können. Des Weiteren ist der im Jahr 1996 vollständig sequenzierte Organismus mittels etablierter Methoden leicht zu manipulieren. Aus diesem Grund können Stämme mit einem bestimmten, gewünschten Genotyp innerhalb kurzer Zeit erzeugt werden (Goffeau et al., 1996). Zudem ist die Bäckerhefe im haploiden Zustand kultivierbar, wodurch sich die Auswirkungen von genetischen Veränderungen leichter auswerten lassen. Neben diesen Vorteilen ist dieser Modellorganismus leicht zu kultivieren und besitzt unter guten Nährstoffbedingungen eine kurze Generationszeit von 90 – 120 min.

### 3.1 Der Zellteilungszyklus in *Saccharomyces cerevisiae*

#### 3.1.1 Die Phasen des Zellzyklus

Der mitotische Zellteilungszyklus ist eine Abfolge von koordinierten Prozessen, die zu einer Ausbildung einer neuen Zelle aus einer existierenden führen. Die Teilung kann entweder symmetrisch durch Querteilung der Ausgangszelle oder wie in der Bäckerhefe asymmetrisch durch Knospung der Mutterzelle erfolgen. Wie in Abbildung 3.1 zu sehen ist, gliedert sich der Zellzyklus in die G1-, S-, G2- und M-Phase (Lew, 1997).

Innerhalb der G1-Phase (*gap*) findet vorwiegend das Wachstum der Zelle bis zum Erreichen einer kritischen Zellgröße statt. Zudem wird bereits die DNA-Replikation durch die Assemblierung von Prä-Replikationskomplexen an Replikationsursprünge eingeleitet. Bei guten Nährstoffbedingungen übertritt gegen Ende der G1-Phase eine ausreichend große Zelle den kritischen, irreversiblen Kontrollpunkt START (siehe Kapitel 3.2.3). Die Zelle muss den Zyklus bis zur nächsten G1-Phase vollständig durchlaufen, auch wenn sich die anfangs günstigen Bedingungen verschlechtern (Herskowitz, 1988). Die Entscheidung über den Eintritt in den Zellzyklus wird zusätzlich von der Anwesenheit von Paarungspheromonen bestimmt.

Die anschließende S-Phase (*S*ynthese) beginnt kurz nach dem Überschreiten des START-Punkts. Neben der Replikation der DNA und der Ausbildung einer Knospe durch apikales Wachstum (siehe Kapitel 3.1.3) werden die Spindelpolkörper (SPB: *s*pindle *p*ole *b*ody) dupliziert. Diese zu

den Zentrosomen höherer Eukaryoten äquivalenten Strukturen bilden zytoplasmatische und nukleäre Mikrotubuli und sind später maßgeblich am Spindelaufbau beteiligt (siehe Kapitel 3.1.4.1).

Die G2-Phase ist in *S. cerevisiae* nicht stark ausgeprägt und kann schwer von der M-Phase abgrenzt werden, da in diesem Organismus keine Auflösung der Kernhülle stattfindet. In diesem Fall spricht man von einer Endomitose. Am G2/M-Phasen-Übergang kommt es aufgrund einer Umorganisation des Aktin-Zytoskeletts zum stetigen isotropen Knospenwachstum.

Die M-Phase (Mitose), die die exakte Aufteilung des duplizierten, genetischen Materials auf zwei Zellen beinhaltet, lässt sich wiederum in fünf weitere Abschnitte untergliedern: Prophase, Metaphase, Anaphase, Telophase und Zytokinese. In der Prophase wird das Chromatin mit Hilfe von Kondensin-Komplexen vollständig zu Chromosomen kompaktiert. Die Anheftung der Chromosomen über ihre Kinetochore an die Mikrotubuli der assemblierten, mitotischen Spindel erfolgt in der (Pro-)Metaphase. Dabei wird in der Bäckerhefe im Gegensatz zu höheren Eukaryoten keine Metaphase-Platte ausgebildet (Guacci et al., 1994; Straight et al., 1997). Im mittleren Bereich der bipolaren Spindel gibt es jedoch einen Bereich, in dem bevorzugt die beidseitig gebunden Kinetochore der Schwesterchromatiden angeordnet werden (Tanaka et al., 2005). Durch die Auflösung der Chromosomenkohäsion und die Depolymerisation der nukleären Mikrotubuli werden in der Anaphase die beiden Schwesterchromatiden voneinander getrennt (Cohen-Fix and Koshland, 1997). Nachdem die Einchromatid-Chromosomen mit Hilfe des mitotischen Spindelapparats vollständig zu den entgegengesetzten Polen gezogen wurden, baut sich dieser in der Telophase ab und die Chromosomen dekodensieren. Der Teilungszyklus endet mit der Zytokinese, in der die Tochter- von der Mutterzelle durch die Ausbildung eines Septums und einer Zellwand separiert wird. Die resultierenden, genetisch identischen Zellen können in einen neuen Zellteilungszyklus eintreten.

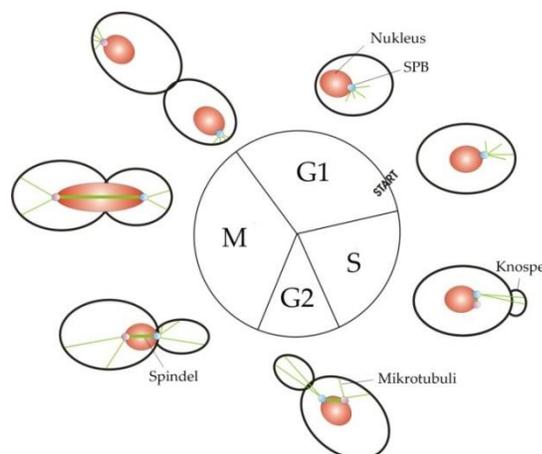


Abbildung 3.1 Der Zellzyklus der Knospungshefe *S. cerevisiae*

Der Zyklus unterteilt sich in vier Phasen: G1-, S-, G2- und M-Phase. START zeigt den Eintrittspunkt der Zellen in den Teilungszyklus an. In der S(ynthese)-Phase wird die DNA repliziert und die Spindelpolkörper werden bei gleichzeitiger Knospenausbildung dupliziert. Mit der Wanderung der SPBs an die entgegengesetzten Pole bildet sich die Spindel aus, die dann in der M-Phase die Teilung der Chromosomen vermittelt. In der Zytokinese werden die Mutter- und die Tochterzelle voneinander getrennt.

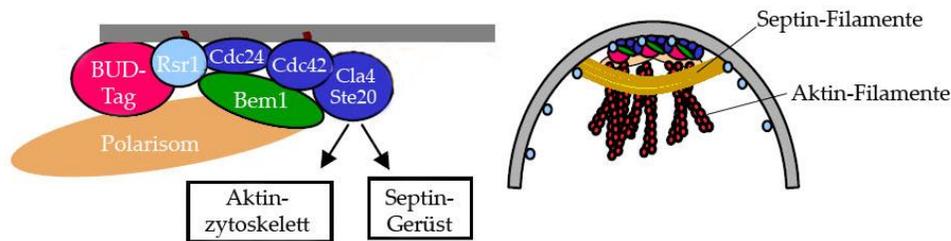
## 3.1.2 Die Entwicklung der Zellpolarität

Im vegetativen, mitotischen Zellzyklus, während der sexuellen Konjugation und bei pseudohyphalem Wuchs zeigen Hefezellen polarisiertes Wachstum, welches als Antwort auf intrazelluläre bzw. extrazelluläre Signale etabliert wird (Bi and Park, 2012; Howell and Lew, 2012). Dieser Prozess beinhaltet drei Schritte: erstens die Auswahl der Wachstumsstelle am Zellkortex, zweitens deren Definition durch die Anlagerung von Proteinen des Knospenselektionsapparats, drittens die asymmetrische Verteilung der Zellkomponenten, die letztendlich das Wachstum der Zelle vorbereiten.

Für die Knospung muss im ersten Schritt die Stelle für das zukünftige Wachstum gekennzeichnet werden. Dabei dient ein aus Septinen und aus den Proteinen Bud3, Bud4, Axl2/Bud10 bestehender Ring, der nach der Zytokinese sowohl in der Mutter- als auch in der Tochterzelle am ehemaligen Knospenhals lokalisiert, als räumlicher Orientierungspunkt. Unmittelbar neben diesem beginnen haploide Zellen mit dem erneuten Wachstum (axiales Muster), diploide hingegen gegenüber (bipolar). Zur Definition des Knospungspunkts werden das Ras-verwandte GTPase- bzw. Transmembran-Protein Rsr1/Bud1 und dessen Regulatoren Bud2 (GAP = *GTPase-activating protein*) und Bud5 (GEF = *guanosine exchange factor*), von dem über Kinasen aktivierten Ringkomplex an diese Stelle der Plasmamembran rekrutiert (Park and Bi, 2007; Ubersax et al., 2003). Die Proteine des Knospenselektionsapparats sind die bedeutendsten Bindeglieder zwischen den anfänglichen, kortikalen Markierungen und Cdc42, der zentralen Rho-GTPase für die Errichtung der Zellpolarität. Dabei stellt dessen Akkumulation den wichtigsten Schritt in diesem Prozess dar. Cdc24, das einzige GEF von Cdc42, wird in der frühen G1-Phase durch den Inhibitor Far1 im Kern zurückgehalten, um eine verfrühte Cdc42-Aktivierung zu verhindern. Erst nach dem Abbau von Far1 wird Cdc24 entlassen und kann seine GEF-Funktion ausüben (Perez and Rincon, 2010; Shimada et al., 2000). In der Bäckerhefe gibt es für Cdc42 vier negativ-regulatorische GAPs: Rga1, Rga2, Bem3 und Bem2. Letzteres reguliert auch die Rho-GTPase Rho1, die an der Etablierung der Zellpolarität beteiligt ist ((Howell and Lew, 2012) siehe Kapitel 3.1.3).

Bei der Errichtung der Zellpolarität katalysiert zunächst Bud5 den Nukleotid-Austausch von GDP zu GTP bei Rsr1. In diesem aktivierten Zustand bindet Rsr1 an Cdc24, welches wiederum

GDP-Cdc42 und Bem1 bindet. Bem1 fungiert hierbei als Gerüstprotein für Cdc42 und Cdc24. Somit assemblieren alle Polaritätsproteine an der neuen Knospungsstelle, an der sich nun auch Bud2 befindet. Bud2 inaktiviert Rsr1 durch die Hydrolyse des gebundenen GTPs. Dadurch dissoziiert Cdc24 von Rsr1 und Bem1, und aktiviert Cdc42, indem es den Austausch von GDP zu GTP katalysiert. Letztendlich wird Rsr1 wieder aktiviert, wodurch der Zyklus erneut beginnt und es nach zahlreichen Wiederholungen zur Anhäufung von aktiviertem Cdc42 an der neuen Knospungsstelle kommt. Durch seine Effektoren, wie z.B. Cla4 und Ste20, organisiert dann das aktivierte Cdc42 die Lokalisation von Septinen, das Aktin-Zytoskelett und die polarisierte Sekretion für das Wachstum (Abbildung 3.2) (Park and Bi, 2007). Darüber hinaus kommt es zur Assemblierung des Polarisoms, einem Proteinkomplex aus dem Formin Bni1, dem Aktin- und Formin-bindenden Bud6, dem Gerüstprotein Spa2 und Pea2, welcher während des apikalen Wachstums an der Knospenspitze verbleibt und zur Entwicklung der Tochterzelle beiträgt. (Amberg et al., 1997; Evangelista et al., 1997; Park and Bi, 2007; Sheu et al., 2000; Sheu et al., 1998).



**Abbildung 3.2 Die anfängliche Etablierung der Polarität bei der Knospententwicklung**

Kortikale Markierungen, die von verschiedenen Bud-Proteinen festgelegt werden, und die GTPase Rsr1 initiieren die Knospentstehung. An der Plasmamembran führen der Cdc42/Cdc24-Komplex, dessen Assemblierung durch das Gerüstprotein Bem1 unterstützt wird, und das Polarisom zur Entwicklung der Knospe. Über verschiedene Cdc42 Effektoren, u.a. Cla4 und Ste20, kommt es zur Polarisation des Aktin-Zytoskeletts und zur Septinring-Bildung. (verändert nach Pruyne und Bretscher, 2000)

### 3.1.3 Das Wachstum einer mitotischen Hefezelle

Bei der Etablierung der Polarität assemblieren Septine, eine Gruppe von GTP-bindenden Proteinen, innerhalb kurzer Zeit nach ihrer Aktivierung durch Cdc42 am Knospenhals zu einem hoch organisiertem Netzwerk, dem Septinring. Diese Formation dient als Gerüst für Proteine, die für die Knospenselektion, Zytokinese bzw. den Morphogenese-Kontrollweg (siehe Kapitel 3.2.3) benötigt werden. Der Septinring stellt außerdem eine räumliche Barriere für die korrekte Lokalisation vieler Proteine, die am apikalen Wachstum oder am Mitoseaustritt beteiligt sind, und eine wichtige Komponente der Zytokinese dar (Park and Bi, 2007).

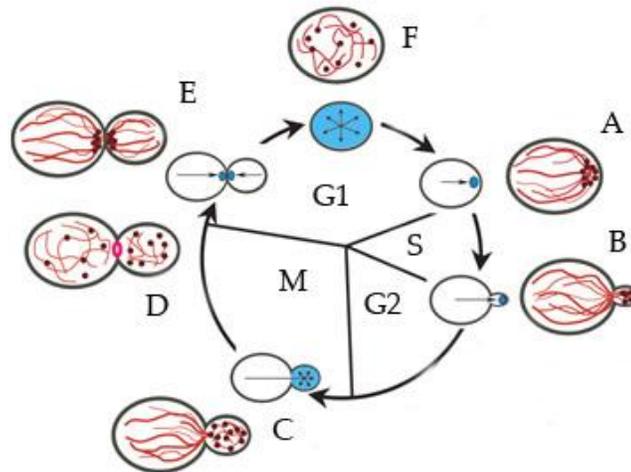
Weiterhin ist für das polarisierte Wachstum durch Exozytose einer Hefezelle ein Aktin-

Zytoskelett essentiell. Neben den kurzen filamentösen Aktin-Patches, die vor allem an Stellen des polarisierten Wachstums lokalisieren, gibt es noch Aktin-Kabel und Aktin-Ringe. Der evolutionär konservierte Arp2/3-Komplex übernimmt die Nukleation der Aktin-Patches, wobei die GTPase Cdc42 zur räumlichen Organisation und Polarisation beiträgt (Park and Bi, 2007). In *S. cerevisiae* gibt es die beiden Formine Bni1 und Bnr1, die für die Polymerisation von Aktin-Kabeln verantwortlich sind. Nach der Interaktion mit Cdc42 und der damit verbundenen Aktivierung sorgt Bni1 mithilfe von Bud6 für die Bildung von Aktin-Kabeln vom Kortex aus entlang der Mutter-Tochter-Achse (Dong et al., 2003; Moseley and Goode, 2005). Das von Septinen - und damit indirekt von Cdc42 - aktivierte Bnr1 bildet hingegen vom Knospenhals Aktin-Kabel in Richtung des Mutterkortex. Zur Stabilisierung der Zytoskelett-Komponenten tragen Tropomyosine und Fimbrine, wie Sac6, bei. An diesen zytoplasmatischen Aktin-„Schienen“ werden über Myosinmotoren sekretorische post-Golgi-Vesikel in Assoziation mit dem Exozyst-Komplex (bestehend aus acht Untereinheiten, u.a. der GTPase Sec4) und andere nötige Kargos für das apikale Knospenwachstum zum Polarisationssignal transportiert (Pruyne et al., 2004a; Pruyne et al., 2004b; Schott et al., 2002). Dort angelangt, kommt es zur Interaktion mit den Plasmamembran-lokalisierten Exozyst-Proteinen Sec3 und Exo70 und letztendlich über SNARE-Proteine zur Verschmelzung der Vesikel- und Plasmamembranen. Im Prozess der Exozytose interagiert Cdc42 direkt mit Sec3 und dirigiert es an polarisierte Stellen der Plasmamembran. Neben der Initiierung der Aktin-Kabel-Formation stellt dies einen weiteren Beitrag von Cdc42 zum Prozess der Exozytose dar (Park and Bi, 2007).

Für das Knospenwachstum muss sich zudem die harte Zellwand, die hauptsächlich aus  $\beta$ -1,3 Glukanen besteht, an der Wachstumsstelle durch die Neusynthese von Zellmaterial ausdehnen. Diesen Prozess übernimmt die  $\beta$ -1,3 Glukansynthase, die aus den beiden katalytischen, integralen Membran-Untereinheiten Fks1 und Fks2, und aus der regulatorischen Untereinheit Rho1 besteht. Dabei wird die GTPase Rho1 über seine redundanten GEFs Rom1 und Rom2 aktiviert und stimuliert die Glukansynthase-Aktivität. Zusätzlich unterstützt die aktive GTPase über Bni1 die Polymerisation von Aktin-Kabeln, über Sec3 die gerichtete Exozytose und über Pkc1 die Aktin-Organisation bzw. die Transkription von Zellwand-Genen (Cabib et al., 1998; Lesage and Bussey, 2006; Levin, 2005; Schmidt et al., 2002). Die negative Regulation von Rho1 erfolgt über vier unterschiedliche GAPs, wobei Bem2 eines dieser Proteine darstellt.

Am Übergang von der G2- zur M-Phase findet der Übergang vom apikalen zum isotropen Wachstum statt. Bislang werden in der Literatur drei Prozesse beschrieben, die zu diesem Vorgang beitragen. Dabei werden zum Einen die polarisationsfördernden G1-CDKs durch die Aktivität der G2-CDKs inaktiviert (Howell and Lew, 2012). Zum Anderen dissoziieren die GEF-Polaritätskomplexe von der Stelle des apikalen Wachstums. Dabei wird Cdc24 von der Kinase

Cln2/Cdc28 und Cla4, einem Cdc42-Effektor und PAK-Protein, phosphoryliert. Folglich wird an den Knospenspitzen die Bindung von Cdc24 zum Gerüstprotein Bem1 aufgelöst, die GTPase Cdc42 über die gesamte Knospe verteilt und damit die Zellpolarität aufgehoben (Gulli et al., 2000). Des Weiteren werden für den apikalen-isotropen Wachstumsübergang Lipid-Flippasen Clb2-CDK abhängig aktiviert. Diese führen zur Umstrukturierung der Plasmamembran. Dadurch werden die GAPs Rga1 und Rga2 aktiviert, die wiederum die Dissoziation von Cdc42 von der Knospenspitze bewirken (Howell and Lew, 2012). Nach diesen Prozessen erfolgt das isotrope Wachstum der Tochterzelle (Abbildung 3.3 C). Hierfür verbleiben vorerst alle kortikalen Aktin-Strukturen exklusiv in der Knospe. Für diese Asymmetrie der Mutter-Tochter-Zelle wird ein intakter Septinring am Knospenhals benötigt (Barral et al., 2000). In der späten Anaphase kommt es vorerst - über bis dato unbekannte Mechanismen - zur homogenen Verteilung der Aktin-Patches auf beide Zellkörper (*mother-daughter asymmetry breakdown*) (Abbildung 3.3 D). Nach der CDK-Inaktivierung werden diese an den Knospenhals umgelagert (Howell and Lew, 2012). Dabei assoziieren die Zytoskelett-Komponenten mit den Myosinen und formieren den Aktin-Myosin-Ring, der zum Abschluss der Mitose kontrahiert und sich auflöst (Abbildung 3.3 E).



**Abbildung 3.3 Das Wachstum der Knospe**

Die Rho-GTPase Cdc42 (blau) und Proteine der Polaritätsmaschinerie sind für die Zellpolarität und das Wachstum essentiell. Diese Proteine orientieren das Aktin-Zytoskelett, welches aus Aktin-Kabeln (rot) und kortikalen Patches (braun) besteht. Durch das Aktin-Zytoskelett werden die sekretorischen Vesikel zur Zelloberfläche gelenkt, wo diese akkumulieren, fusionieren und zum polarisierten Wachstum führen (Pfeile). **(A)** Der Zellzyklus beginnt in G1 mit der Festlegung der neuen Knospungsstelle. **(B)** Die Anhäufung von Cdc42 führt zu einem apikalen Wachstum in Richtung der Knospenspitze. **(C)** Während des G2/M-Phasen-Übergangs verteilt sich Cdc42 über die Knospenoberfläche, wodurch ein isotropes Knospenwachstum folgt und eine elliptisch geformte Tochterzelle entsteht. **(D)** Nach Beendigung des Knospenwachstums verteilen sich die Aktin-Kabel und -Patches und der entstandene Zytokineserring (pink) kontrahiert. **(E)** Für die Entwicklung der neuen Zellwände werden über Cdc42 das Aktin-

Zytoskelett und das Wachstum zwischen die zwei neuen Zellen gelenkt. **(F)** Während die Mutter sofort wieder in den Zellzyklus eintritt, wächst die Tochter vorerst ungerichtet weiter (verändert nach Pruyne und Bretscher (2000)).

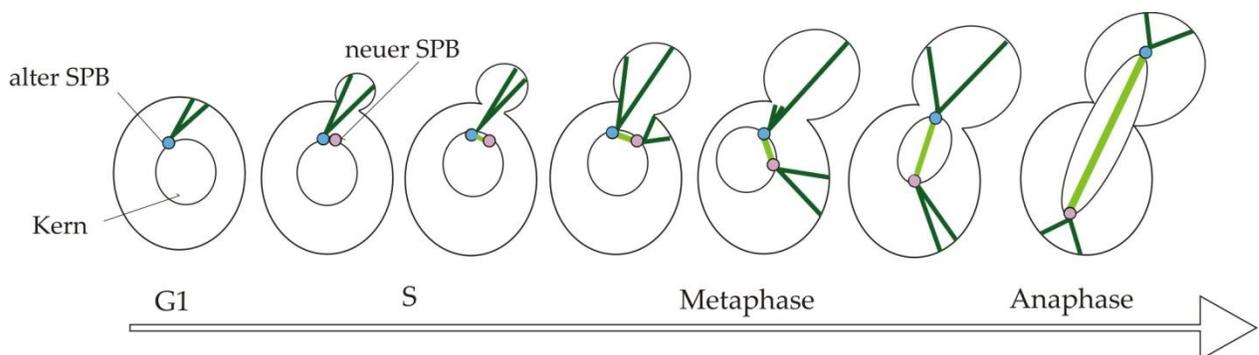
## 3.1.4 Die Organisation des Mikrotubuli-Zytoskeletts

### 3.1.4.1 Der mitotische Spindelzyklus

Im Zellzyklus stellt die Spindel eine hoch dynamisch Zellkomponente dar. Ihre Untereinheiten, die Mikrotubuli, sind für deren Aufbau und Funktion bei der Trennung der Schwesterchromatiden verantwortlich (Winey and Bloom, 2012).

Der Spindelzyklus beginnt in der späten G1-Phase, in der sich eine Satellitenstruktur über eine „half-bridge“ an den existierenden SPB auf der zytoplasmatischen Seite anlagert (Jaspersen and Winey, 2004). In der frühen S-Phase hat sich der Satellit zu einem duplizierten Plaque vergrößert, perforiert über eine Pore in die Kernhülle und reift zum vollständig entwickelten, duplizierten SPB heran (Adams and Kilmartin, 1999, 2000). Die komplexen Mikrotubuli-Organisationszentren in Hefe (mindestens 30 verschiedene Proteine, u.a. Spc34, Spc42) bestehen aus einer zytoplasmatischen, einer zentralen und einer nukleären Schicht (bzw. Plaque). Die mittlere Region, die die Kernhülle durchdringt, bildet der zentrale Plaque. Die beiden anliegenden Komponenten sind für die Nukleation der Mikrotubuli durch den ringförmigen  $\gamma$ -Tubulin-Komplex, der aus den Proteinen Spc97, Spc98 und Tub4 besteht, wichtig (Knop et al., 1997). Für die Polymerisation von astralen Mikrotubuli bindet der Tub4-Komplex an das zytoplasmatische Spindelpolprotein Spc72, während für die Bildung der Kernspindel-Mikrotubuli der  $\gamma$ -Tubulin-Komplex mit dem nukleären Spindelpolprotein Spc110 wechselwirkt (Knop and Schiebel, 1997, 1998; Lin et al., 2011). Nach Beendigung der SPB-Verdoppelung liegen zwei SPBs mit nukleären Mikrotubuli benachbart über eine Brücke verbunden vor. Zum Aufbau der mitotischen Spindel wandern die beiden SPBs mit der Hilfe der Clb/CDK-Aktivität und des Kinesin-verwandten Motorproteins Cin8, das sich als Homotetramer an die nukleären, quervernetzten Mikrotubuli anlagert, auseinander (Hildebrandt et al., 2006; Roof et al., 1992; Winey and O'Toole, 2001). In *S. cerevisiae* existieren sechs Zellzyklus-relevante Motorproteine, wobei es fünf Kinesine (Cin8, Kip1, Kip2, Kip3, Kar3) und ein zytoplasmatisches Dynein (Dyn1) gibt. Cin8 gehört neben Kip1 zur *bimC*-Familie der Kinesin-verwandten Proteine. Interessanterweise ist die konservierte Motordomäne nicht für die Separation der SPBs nötig (Crasta et al., 2006; Hildebrandt and Hoyt, 2000). Vor der SPB-Trennung wird festgelegt, dass der alte SPB (SPBt) in die Tochter transportiert wird und der neue SPB (SPBm) in der Mutter verbleibt (Schuyler and Pellman, 2001; Segal and Bloom, 2001). Bei diesem Prozess polymerisieren nur astrale Mikrotubuli des SPBt zur zukünftigen Knospungsstelle und wechselwirken dort mit kortikalen Komponenten. Etwas später interagieren neu-gebildete,

astrale Mikrotubuli des SPBt mit Proteinen am Knospenhals, wodurch der Eintritt der Spindel in die Tochterzelle verhindert wird. Auch der SPBm beginnt mit der Polymerisation von 2 - 3 zytoplasmatischen Mikrotubuli, die jedoch mit dem Kortex der Mutterzelle interagieren (Smeets and Segal, 2002). Zwischen den SPBs entwickelt sich eine kurze Prä-Metaphase-Spindel, die sich bis zur M-Phase zu einer ca. 1 – 2 µm langen, bipolaren Struktur entwickelt hat. Die Metaphase-Spindel besteht aus 8 interpolaren Pol-zu-Pol- und 16 Kinetochor-Mikrotubuli (Maddox et al., 2000). Erstere formieren die Kern- oder Zentralspindel, verbinden die beiden SPBs miteinander und helfen in der Anaphase B diese auseinander zu schieben. An die anderen nukleären, hochdynamischen Mikrotubuli werden die Kinetochore der Chromosomen angelagert (Higuchi and Uhlmann, 2005). In der Bäckerhefe lässt sich die Anaphase in zwei Phasen gliedern: in der kürzeren Anaphase A werden die Chromosomen durch die Depolymerisation der nun weniger dynamischen Kinetochor-Mikrotubuli polwärts gezogen und in der Anaphase B findet die Spindelelongation und die damit verbundene finale Chromosomentrennung statt. Die Anaphase-Spindel wird im Bereich der überlappenden Mikrotubuli (*spindle midzone*) von den Spindel-assoziiierenden und zum Teil bündelnden Proteinen Ase1, Bik1, Bim1, Cin8 und Kar3 stabilisiert (Gardner et al., 2008; Pellman et al., 1995). Bei der Spindelelongation wirken maßgeblich Motorproteine mit: Kip3 sorgt für das Wachstum der Mikrotubuli-Plus-Enden, während Cin8 und Kip1 den Transport der antiparallelen Mikrotubuli zu deren Plus-Enden katalysieren (DeZwaan et al., 1997; Hildebrandt and Hoyt, 2000). Ebenso wird über zytoplasmatische Faktoren das Ereignis der Kerntrennung beeinflusst und gelenkt (siehe Kapitel 3.1.4.2). Kurz bevor die Spindel sich auflöst (*spindle breakdown*), besteht sie nur mehr aus sehr kurzen Kinetochor- und wenigen interpolaren Mikrotubuli. Der genaue Mechanismus ist bis dato nicht bekannt.



**Abbildung 3.4 Die Spindel im Zellzyklus**

In der G1-Phase nukleieren astrale Mikrotubuli (dunkelgrün) des Spindelpols in Richtung der zukünftigen Knospungsstelle. Nach dessen Duplikation liegen zwei SPBs benachbart gegenüber des Knospenhalses vor, wobei beide nukleäre (hellgrün) und zytoplasmatische (dunkelgrün) Mikrotubuli ausbilden. Anschließend beginnt sich die bipolare Spindel mit Hilfe der Mikrotubuli aufzubauen. In

Metaphase zeigt sich die Kernspindel zunächst als kurze Struktur, während sie in der Anaphase durch die Aktivität von Motorproteinen elongiert (verändert nach Huisman und Segal (2005)).

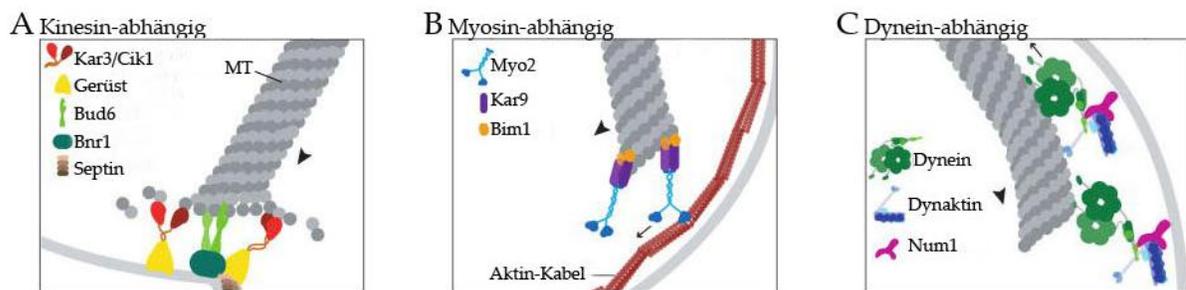
### 3.1.4.2 Die Orientierung der mitotischen Spindel

Während der asymmetrischen Zellteilung der Bäckerhefe muss sich die Spindel entlang der Zellpolaritätsachse ausrichten. Dazu treten die astralen Mikrotubuli der SPBs mit zytoplasmatischen Komponenten in Kontakt, wobei die Organisation einem zeitlichen und räumlichen Programm unterliegt (Markus et al., 2012; Merlini and Piatti, 2011; Siller and Doe, 2009).

Die erste Phase beinhaltet das Aktin-bindende Protein Bud6, welches früh zum polarisierten Zellwachstum durch die Stimulierung der Aktin-Kabel-Nukleation beiträgt. Zudem dient es aufgrund seiner Lokalisation für die astralen Mikrotubuli des alten SPBs an der zukünftigen Knospungsstelle als kortikaler Anker. Während der Knospentwicklung bestehen diese Mikrotubuli-Interaktionen mit Bud6 fort, wodurch die Spindelpolkörper fixiert werden. Sobald die Spindel aufgebaut ist, lokalisiert Bud6 über Septine und Bnr1 auch am Knospenhals. Mit Hilfe des Motorproteins Kar3 und seiner zum Minus-Ende der Mikrotubuli gerichteten Motilität, kommt es zur Mikrotubuli-Depolymerisation am Plus-Ende (Abbildung 3.5 A). Diese neuen Interaktionen stellen sicher, dass der SPBt in die Richtung und nicht komplett in die Knospe gezogen wird (Huisman and Segal, 2005). Man spricht auch vom Kinesin-abhängigen „*capture-shrinkage*“-Mechanismus (Moore and Cooper, 2010).

Obwohl sich der Bud6-Weg der Spindelorientierung mit dem zweiten, im Folgenden beschriebenen, Kar9-abhängigen Weg zeitlich überschneidet, grenzen sich beide nach Huisman et al. voneinander ab (Huisman et al., 2004). In diesem frühen, Aktin-abhängigen Weg verhilft Kar9, ein APC- (*adenomatous polyposis coli*) homologes Protein, zunächst zur Etablierung der Asymmetrie der SPBs, indem es durch Phosphorylierung (an S496) von der Clb4/CDK auf den SPBt beschränkt wird. Über das Adapterprotein Bim1, das selbst zudem Mikrotubuli bindet, wird Kar9 auf den SPBt geladen und anschließend im Komplex zu den Plus-Enden der zytoplasmatischen Mikrotubuli befördert. Für den Bim1-Kar9-Transport ist das zytoplasmatische Motorprotein Kip2 und eine weitere Phosphorylierung von Kar9 (an S197) durch die CDK nötig (Moore and Miller, 2007). An den Plus-Enden angekommen, interagiert Kar9 mit Myo2, einem Aktin-assoziiierenden Typ V Myosinmotor. Die zytoplasmatischen Mikrotubuli werden über diese Verbindung an den Aktin-Kabeln entlang zum Knospenhals und an die Spitze der Tochterzelle transportiert (Abbildung 3.5 B). Dabei wird die Spindel in die Richtung der Teilungsebene bewegt und senkrecht dazu ausgerichtet. In der Anaphase werden die astralen Mikrotubuli-Knospenhals-Verbindungen durch die Ubiquitinierung von Kar9 aufgelöst (Hotz and Barral, 2010).

Der dritte Weg der Spindelorientierung ist Aktin-unabhängig, findet in der Anaphase statt und benötigt den kortikalen Dynein/Dynaktin-Komplex. Dafür wird nach Etablierung der SPB-Asymmetrie mit Hilfe von weiteren Proteinen ein inaktiver Dynein/Dynaktin-Komplex auf die SPBs geladen. Anschließend erfolgt der Kip2-abhängige Transport an den Kortex beider Zellkörper und die Verankerung bzw. Komplexaktivierung durch das Membran-gebundene Num1. Wie in Abbildung 3.5 C zu erkennen ist, gleiten die Mikrotubuli durch die Minus-Enden gerichtete Aktivität des Dynein/Dynaktin-Komplexes am Kortex entlang und generieren eine ziehende Kraft auf die Spindel (Moore and Cooper, 2010; Moore et al., 2009). Darüber hinaus könnte Dynein in Zusammenarbeit mit Bud6 durch den „capture-shrinkage“-Mechanismus zur Spindelelongation beitragen (Huisman and Segal, 2005).



**Abbildung 3.5 Die Koordination der Spindelorientierung durch kortikale Komponenten**

(A) „Capture-shrinkage“-Mechanismus am Knospenhals: die MT-Plus-Enden werden am Knospenhals durch das Formin-interagierende Protein Bud6 festgehalten und durch die Depolymerase-Aktivität eines Kinesin-14 (Kar3/Cik1) Proteins verkürzt. (B) Mittels Myosin-V-Motoren werden die MT-Plus-Enden an Aktin-Kabeln entlang in die Knospe transportiert. Der Pfeil zeigt die Richtung des Myosin-Motors an, die durch die Polarität der nukleierten Aktin-Kabel genau festgelegt ist. Die Pfeilspitze demonstriert die Kraft, die auf den Mikrotubuli ausgeübt wird. (C) MTs werden durch die Minus-Enden gerichtete Aktivität des Motorproteins und seinem Aktivator, Dynaktin, am Knospenkortex entlang gezogen. Dabei wird der Dynein-Dynaktin-Komplex durch das kortikale Protein Num1 verankert (verändert nach Moore und Cooper (2010)).

## 3.2 Die Regulation des Zellzyklus

Um den korrekten Ablauf des komplexen Zellzyklus und damit die exakte Weitergabe des genetischen Materials zu gewährleisten, gibt es innerhalb der Zelle verschiedene Regulationsmechanismen und funktionell regulatorische Proteine (King et al., 1996; Morgan, 2007). Zum Einen werden die Prozesse durch Zyklin-abhängige Kinasen (CDK) gesteuert, zum Anderen überwachen sogenannte „checkpoints“ wichtige Übergänge, um einen ordnungsgemäßen Zellzyklus-Ablauf zu gewähren. Des Weiteren wird durch eine gezielte Ubiquitin-abhängige Protein-Degradation das unidirektionale Fortschreiten im Zellzyklus bewerkstelligt.

## 3.2.1 Die Regulation durch zyklinabhängige Kinasen

Die zentralen Regulatoren der einzelnen Zellzyklusphasen sind die zyklinabhängigen Kinasen (CDKs, *cyclin dependent kinases*) (Enserink and Kolodner, 2010; Morgan, 1997). Als hochkonservierte Serin-/Threonin-Kinasen phosphorylieren sie ihre Substrate innerhalb von Konsensussequenzen an S/TP-Motiven und werden selbst auf vielfache Weise reguliert (Übersax et al., 2003). Bereits der Name deutet darauf hin, dass CDKs für ihren enzymatischen Aktivitätszustand eine regulatorische Untereinheit, ein Zyklin, benötigen. Die Mengen dieser Proteine oszillieren während des Zellzyklus und führen somit nur in ihrer Anwesenheit zur CDK-Aktivierung. Positiv stimulierend wirkt auch eine Phosphorylierung an T169 der katalytischen CDK-Untereinheit durch CAKs (*CDK activating kinases*). Einen negativen regulatorischen Effekt erzielen CKIs (*CDK inhibitors*), die durch ihre Assoziation an den Komplex aus CDK und Zyklin diesen inhibieren. Zudem führt auch die posttranslationale Modifikation an Y19 zur Inaktivierung der CDKs.

In der Bäckerhefe existiert für den Zellteilungszyklus nur eine relevante zyklinabhängige Kinase, Cdc28, die der Cdk1 aus Säugern entspricht. Diese bindet im Zellzyklus neun verschiedene Zykline, die zur Steuerung der einzelnen Prozesse zeitlich entsprechend vorhanden sind. Dabei kann aufgrund ihrer temporalen Expression und Funktion zwischen drei verschiedenen Zyklinen unterschieden werden: Cln1-3 sind G1-Phasen-, Clb5-6 S-Phasen- und Clb1-4 M-Phasen-Zykline. Am G1/S-Phasen-Übergang ist ein Komplex aus Cdc28 und den G1-Phasen Zyklinen Cln1–3 von Bedeutung (Richardson et al., 1989). Für den Eintritt in den Teilungszyklus inhibiert Cln3/Cdc28 durch Phosphorylierung den Transkriptionsinhibitor Whi5, wodurch die START-spezifischen Zykline *CLN1*, *CLN2*, *CLB5* und *CLB6* transkribiert werden (Costanzo et al., 2004). In der späten G1-Phase wird durch Cdc28 in Verbindung mit Cln1 bzw. Cln2 die Duplikation der Spindelpole und die Knospenausbildung durch die ringförmige, polarisierte Anlagerung von Aktin-Patches initiiert (Lew and Reed, 1993). Der Eintritt in die S-Phase wird durch die Proteolyse des Clb/CDK-Inhibitors Sic1 und die eingestellte Proteolyse von Clb-Zyklinen ermöglicht. Über die Aktivität der Clb5,6/Cdc28-Komplexe kommt es dann zur DNA-Replikation (Epstein and Cross, 1992; Schwob et al., 1994), wobei die Clb5-assozierte Kinase zusätzlich zur Errichtung der Spindelpolarität beiträgt (Segal et al., 2000). Die mitotischen Zykline Clb1-4 in Verbindung mit der CDK kontrollieren den Eintritt und den Ablauf der M-Phase: Clb3 und Clb4 sind dabei für die Ausbildung und Elongation des mitotischen Spindelapparats verantwortlich, Clb1,2/Cdc28-Komplexe aktivieren hingegen den zur Proteolyse benötigten Komplex APC/C (siehe Kapitel 3.2.2) und initiieren somit die Auflösung der Kohäsion von Schwesterchromatiden (Surana et al., 1991). Durch die Cdc14-abhängige Degradation der mitotischen Zykline und die Anreicherung des Clb/CDK-

Inhibitors Sic1 kommt es zum Austritt aus der M-Phase und zur Zytokinese. Die Phosphatase Cdc14 ist eine CDK-antagonistische Phosphatase und als zentrale Komponente in den Signalwegen FEAR (*CDC fourteen early anaphase release*) und MEN (*mitotic exit network*) maßgeblich am Austritt der Mitose beteiligt (Amon, 2008).

### 3.2.2 Die Regulation durch Proteindegradation

Das unidirektionale Fortschreiten von einer Zellzyklus-Phase zur nächsten wird durch den gezielten, Ubiquitin-vermittelten Abbau von Regulatorproteinen gesteuert. Die Degradation findet zu drei Zeitpunkten des Zellzyklus statt, am G1/S-Phasen-Übergang, vor der Anaphase zur Auflösung der Schwesterchromatid-Kohäsion und beim Austritt aus der Mitose (King et al., 1996). Der Prozess des spezifischen Abbaus eines Proteins erfolgt durch das Ubiquitin-Proteasom-System. Dabei wird über eine Enzymkaskade  $E1 \rightarrow E2 \rightarrow E3$  das hochkonservierte Protein Ubiquitin mehrfach auf das Substrat übertragen, was letztendlich zur Erkennung und zum Abbau am 26S Proteasom führt (Miller and Gordon, 2005). Im ersten Schritt wird Ubiquitin durch eine kovalente Thioesterbindung an einen Cysteinrest des Ubiquitin-aktivierenden Enzyms E1 (Uba1) aktiviert (Varshavsky et al., 2000; Weissman, 2001). In einem weiteren Schritt wird das aktivierte Ubiquitin auf das Ubiquitin-konjugierende E2-Enzym (Ubc1-13) und von diesem auf das E3-Enzym, die Ubiquitin-Protein-Ligase, übertragen. Nachdem durch die E3-Ligasen das spezifische Substrat erkannt wurde, erfolgt letztendlich die Ubiquitinierung des abzubauenen Zielproteins über eine Isopeptidbindung an einem Lysinrest (Patton et al., 1998). Im Zellteilungszyklus von *S. cerevisiae* gibt es zwei wichtige Ubiquitin-Ligase-Komplexe, den SCF (Skp1/Cullin/E-Box Protein) und den APC/C (*anaphase promoting complex* oder *cyclosome*) (Peters, 1998). Obwohl die beiden Multiprotein-Komplexe weitläufig verwandt sind, nutzen sie unterschiedliche Mechanismen der Substraterkennung und der Regulation.

Der SCF-Komplex besteht aus dem Adapterprotein Skp1, dem Gerüstprotein Cullin Cdc53 und dem RING-Protein Rbx1. Mit Hilfe von Substraterkennungsfaktoren, den sogenannten F-Box-Proteinen (Cdc4, Grr1), werden G1-Zykline und CDK-Inhibitoren für den Abbau festgelegt, wodurch der G1/S-Phasen-Übergang gesteuert wird. Dabei gehören zu den Zielproteinen des Cdc4 gebundenen SCF-Komplexes die CDK-Inhibitoren Sic1 und Far1, dagegen bei Bindung von Grr1 die G1-Zykline Cln1 und Cln2 (Patton et al., 1998). Die Regulation der Degradation von SCF-Substraten erfolgt primär über deren Phosphorylierung, da nicht-phosphorylierte Proteine keine effiziente E3-Bindung und folglich keinen Abbau erlauben.

Der APC/C-Komplex besteht aus 11 - 13 Untereinheiten und seine Aktivität wird über die Bindung von den aktivierenden Untereinheiten, Cdc20 und Hct1/Cdh1, reguliert (Peters, 2006; Schwab et al., 1997; Visintin et al., 1997). Strukturell setzt sich dieser Komplex aus dem

Gerüstprotein Cullin Apc2 und dem RING-Protein Apc11, das das E2-Ubiquitin-Konjugat bindet, zusammen (Barford, 2011). Die Substraterkennung von Cdc20 bzw. Hct1 erfolgt über bestimmte Sequenzmotive, den D- (*destruction-box* Konsensus RXXLXXXN (Glotzer et al., 1991)) und den KEN-Boxen (Konsensus KENXXXE/D/N (Pfleger and Kirschner, 2000)). Am Ende der Metaphase aktiviert das im Zellteilungszyklus instabile Cdc20 den APC/C, nachdem dieser durch Kinasen phosphoryliert wurde (Shirayama et al., 1999). Der damit verbundene Securin-Abbau führt zur Aktivierung der Separase Esp1, die die Kohäsion der Schwesterchromatiden auflöst und somit zu deren Trennung beiträgt. Zum Austritt aus der Mitose trägt auch die Degradation des S-Phasen Zyklins Clb5 durch den APC/C<sup>Cdc20</sup> bei (Shirayama et al., 1999). Die Proteinmenge an Hct1 ist während des Zellzyklus im Gegensatz zu Cdc20 stets unverändert. Hct1 ist es nur im unphosphorylierten Zustand möglich, an den APC/C zu binden (Zachariae et al., 1998). Sobald eine Zelle den START-Punkt passiert hat, erfolgt die inhibitorische Modifikation von Hct1 durch die CDK, bis in der Anaphase durch die Phosphatase Cdc14 die Phosphorylierung aufgehoben wird (Jaspersen et al., 1999). Ein aktiver APC/C<sup>Hct1</sup> führt zur Proteolyse der Polo-Kinase Cdc5, des Zyklins Clb2, Cdc20, des Spindelproteins Ase1 und des Motorproteins Cin8, und persistiert bis zum erneuten Eintritt in den Zellteilungszyklus (Harper et al., 2002; Wasch et al., 2010).

### 3.2.3 Die Regulation durch Kontrollsysteme

Fehlerhafte Ereignisse im Zellteilungszyklus können zu verheerenden Folgen für eine Zelle führen. Um dem entgegenzuwirken, entwickelte die Zelle Kontrollsysteme (*checkpoints*), die Störungen in kritischen Ereignissen registrieren und das Fortschreiten in die nächste Zellzyklus-Phase so lange verhindern, bis der Prozess ordnungsgemäß abgeschlossen ist bzw. die äußeren Umstände optimiert sind. Ein Kontrollsystem kann allgemein als eine Transduktionskaskade verstanden werden, bei der die Sensorproteine Zellschäden bzw. ungünstige Bedingungen detektieren und agierende Effektorproteine aktivieren (Hartwell and Weinert, 1989; Lew, 2000). Am START-Kontrollpunkt in der späten G1- Phase trifft eine Zelle nur dann die Entscheidung in einen neuen Zellzyklus einzutreten, wenn sie über ausreichend Nährstoffe verfügt, die kritische Zellgröße erreicht und keinen Paarungspartner in näherer Umgebung hat. Dadurch soll u.a. verhindert werden, dass die Zellgröße durch zu früh einsetzende Teilungszyklen abnimmt.

In der S-Phase wird die DNA-Synthese zur Aufrechterhaltung der DNA-Integrität von zwei Kontrollpunkten überwacht, dem *DNA-damage checkpoint* und dem *S-phase checkpoint* (Branzei and Foiani, 2006; Kolodner et al., 2002). Ein DNA-Schaden bzw. unvollständig replizierte DNA wird durch bestimmte Sensorproteine (Rad17, Rad24, Ddc1, Mec3, Rad9 bzw. Dpb11, Rfc5, Pol2,

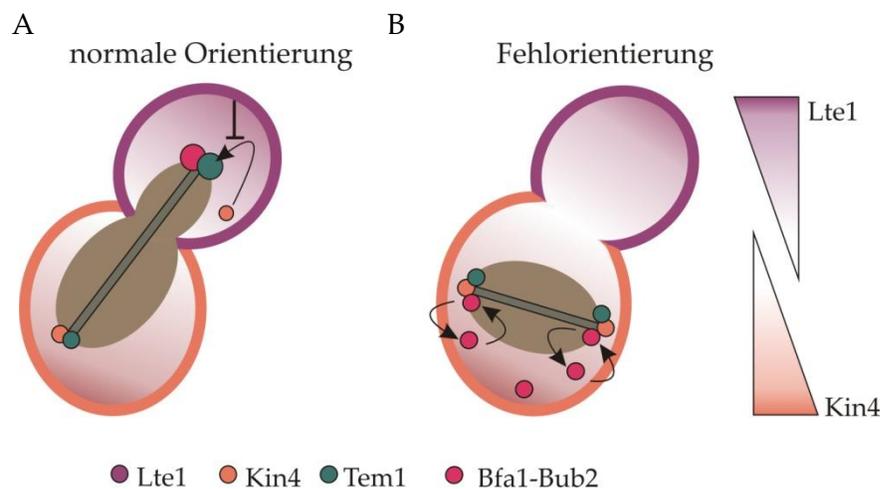
Drc1) erkennt und führt zur Aktivierung der Kinase Mec1 des Kontrollpunkts. Diese bewirkt über zwei unterschiedliche Wege den Arrest in der Anaphase: zum Einen durch die Stabilisierung des Securins Pds1, welches die Trennung der Schwesterchromatiden verhindert, und zum Anderen durch die Proteinkinase Rad53, welche die DNA-Reparatur initiiert (Pelliccioli et al., 2001).

Der Morphogenese-Kontrollpunkt (*morphogenesis checkpoint*) koordiniert den Prozess der Knospenbildung mit der Kernteilung. Dabei werden vor allem die Aktin- und die Septin-Organisation, das Vorhandensein als auch die Größe der Knospe überwacht, um eine verfrühte Kernteilung zu verhindern. Die Regulation der Kinase Swe1 steht hier im Fokus, wobei deren Assemblierung am Knospenhals und deren Inaktivierung durch Hyperphosphorylierung (durch die Kinasen Cla4, Clb2/Cdc28, Cdc5) den G2/M-Phasen-Übergang ermöglichen (Lee et al., 2005; Lew, 2003).

Am Metaphase/Anaphase-Übergang stellt der *spindle assembly checkpoint* (SAC) einen Mechanismus dar, um die korrekte bipolare Anheftung der replizierten Chromosomen an die mitotische Spindel zu kontrollieren (Lew and Burke, 2003). Fehler in der Biorientierung können auf eine nicht vorhandene Kinetochor-Mikrotubuli-Verknüpfung zurückzuführen sein, oder das Resultat einer simultanen Anheftung beider Schwesterkinetochore an denselben Spindelpol sein (monopolar, syntelisch) (King et al., 2007). Eine fehlende Mikrotubuli-Anbindung an ein Kinetochor wird durch das konservierte SAC-Netzwerk aus Bub- (Bub1/2/3) und Mad-Proteinen (Mad1/2/3) erkannt. Durch die damit verbundene Inaktivierung des APC/C<sup>Cdc20</sup> wird der Abbau von Securin und mitotischen Zyklinen verhindert und der Anaphase-Beginn bis zur Korrektur verzögert (Kim and Yu, 2011). Monopolare Kinetochore können keine Spannung zwischen den Kinetochoren und den SPBs generieren (Tanaka et al., 2005). Diese Störungen werden von dem „Spannungssensor“ Ipl1, der Aurora B Kinase, erkannt und aufgelöst, indem sie Komponenten des Kinetochors, wie Mad3 und Dam1 phosphoryliert. Im Anschluss fördert die Kinase die erneute Orientierung der Mikrotubuli an die Kinetochore (King et al., 2007).

Der *spindle position checkpoint* (SPOC) ist ein Kontrollsystem, das verhindert, dass Zellen mit fehlorientierter Spindel die Mitose verlassen können (Caydasi and Pereira, 2012). Tem1, eine Ras-ähnliche GTPase, ist das Schlüsselprotein in diesem Prozess, dessen Regulation räumlich und zeitlich stattfindet. Nach der Bindung des GTPase-aktivierenden Dimerkomplexes Bub2/Bfa1 wird Tem1 durch die Hydrolyse des gebundenen GTPs inaktiviert. Dabei besitzt Bub2 die katalytische Funktion, Bfa1 ist hingegen für die Tem1-Interaktion nötig. Als GEF stimuliert Lte1 die positive Regulation von Tem1. Die subzelluläre Lokalisation dieser Proteine ändert sich während des Zellzyklus. In der G1-Phase bis zur Metaphase befinden sich das inaktiv gehaltene Tem1 und der Bub2/Bfa1-Komplex an beiden SPBs. Die Menge an Tem1

nimmt am SPBt zu, sobald die korrekt positionierte Spindel den Knospenhals passiert (Abbildung 3.6 A). Anschließend wird Bub2/Bfa1 durch die Polo-Kinase Cdc5 inhibiert. Das exklusiv am Tochterkortex lokalisierte Lte1 tritt nun räumlich mit der GTPase in Verbindung, aktiviert sie und lässt den Eintritt in MEN (*mitotic exit network*) zu. Am Ende dieser Signalkaskade bewerkstelligt das vollständig aus dem Nukleolus freigesetzte Cdc14 den Abschluss des Zellzyklus, indem die Phosphatase die Proteolyse von den mitotischen Zyklinen vermittelt und den Clb/CDK-Inhibitor Sic1 aktiviert. Im Falle einer Spindel Fehlorientierung lokalisiert und inaktiviert Bub2/Bfa1 an beiden SPBs Tem1 (Abbildung 3.6 B) (Fraschini et al., 2008; Piatti et al., 2006). Unterstützung leistet die Serin/Threonin Kinase Kin4, die von dem Spindelpolprotein Spc72 zu den SPBs rekrutiert wird (Maekawa et al., 2007). Dabei phosphoryliert Kin4 Bfa1 (an S150, S180) und schützt es vor der inhibitorischen Modifikation durch Cdc5. Folglich wird die GAP-Aktivität aufrecht erhalten und der Mitoseaustritt verzögert (Fraschini et al., 2008; Maekawa et al., 2007). In einem ungestörten Zellzyklus lokalisiert die Mutterzell-spezifische SPOC-Komponente Kin4 am Kortex, am SPB und mit Beendigung der Mitose am Knospenhals (Maekawa et al., 2007). Kin4 unterliegt einer Zellzyklus-regulierten Phosphorylierung. Dabei wird durch die Aktivität der Kinase Elm1, einem Knospenhalsprotein, die katalytische Aktivität von Kin4 initiiert. Die Phosphatase 2A (PP2A) mit ihrer regulatorischen Untereinheit Rts1 könnte hingegen die Lokalisation von Kin4 direkt durch Dephosphorylierung steuern (Caydasi and Pereira, 2012; Chan and Amon, 2009).



**Abbildung 3.6 Die Lokalisation von SPOC-Komponenten bei einer normal und fehlorientierten Spindel**

(A) Die Lokalisation der SPOC-Komponenten ist bei einer richtig, entlang der Mutter-Tochterzell-Achse orientierten Spindel asymmetrisch. Dabei befinden sich Bfa1-Bub2 und Tem1 verstärkt am SPBt, während Kin4 nur am SPBm und am mütterlichen Kortex lokalisiert. Hierbei verhindert Lte1 die Kin4-Assoziation mit dem SPBt. (B) Bei einer fehlorientierten Spindel hingegen, liegen alle Proteine symmetrisch an den

SPBs vor, was für die Mutterzell-spezifische Kinase Kin4 bedeutet, dass sie zusätzlich am SPBt lokalisiert. Unter diesen Umständen hält Kin4 die Aktivität des GAP-Proteins aufrecht, wodurch die GTPase Tem1 und das Fortschreiten im Zellzyklus inhibiert werden (verändert nach Caydasi und Pereira, 2012).

## 3.3 Die atypischen Haspin-Proteinkinasen

### 3.3.1 Die Distribution der Haspin-Proteine

Im Jahr 1994 wurde im Zuge der Beschreibung Keimzell-spezifischer cDNAs erstmals die mRNA von Haspin in männlichen Gameten von Mäusen entdeckt. Aufgrund der hohen Expression in diesem Gewebe wurde das Protein mit Haspin (*haploid germ cell-specific nuclear protein kinase*) bzw. *Gsg2* (*germ cell-specific gene 2*) bezeichnet (Tanaka et al., 1994). Allerdings ist das Vorkommen von Haspin nicht auf haploide Zellen beschränkt, tatsächlich sind diese Proteine ubiquitär in somatischen Geweben mit teilungsaktiven Zellen vorhanden (Higgins, 2001b). Ebenso wurde in den humanen Tumor-Zelllinien HeLa und U2OS Haspin-Aktivität detektiert (Dai et al., 2009; Dai et al., 2005). Haspin-Homologe wurden in allen bisher untersuchten Vertretern des eukaryotischen Reichs gefunden, jedoch ist ihre Existenz in Prokaryoten und Archäen nicht bekannt. Beispielsweise wurden Haspin-Proteine in Vertebraten wie Säugetieren (z.B. *Homo sapiens*, *Bos taurus*), dem Frosch *Xenopus laevis*, Fischen (z.B. *Fugu rubripes*) als auch in Arthropoden (z.B. *Drosophila melanogaster*), in Nematoden (z.B. *Caenorhabditis elegans*), in Pflanzen (z.B. *Arabidopsis thaliana*), in Pilzen (z.B. *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Encephalitozoon cuniculi*) und in Amöben nachgewiesen (Higgins, 2001a, 2003; Yoshimura et al., 2001). Die Anzahl der Haspin-Proteine variiert in den verschiedenen Organismen. So weisen *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *S.pombe* und *D. melanogaster* nur einen Vertreter auf, *C. elegans* hingegen 5 Haspin-Homologe und 16 verwandte Haspin-ähnliche Gene. In *S. cerevisiae* gibt es zwei offene Leserahmen (*orf*), die für die Haspin-Homologen Alk1 und Alk2 kodieren.

### 3.3.2 Der Aufbau der Haspin-Proteine

Haspin-Proteine lassen sich aufgrund ihres funktionellen Aufbaus in eine N- und C-terminale Region einteilen. Im divergenten N-terminalen Bereich, der nur gering zwischen den Spezies konserviert ist, bestehen sogar bei Haspin-Homologen desselben Organismus gravierende Unterschiede in der Aminosäure-Sequenz. *In vitro* Analysen führten zu der Annahme, dass dieser Bereich die enzymatische Aktivität von Haspin modulieren könnte (Eswaran et al., 2009; Villa et al., 2009). Zudem scheint der N-terminale Bereich für die subzelluläre Lokalisation verantwortlich zu sein, da sowohl im menschlichen als auch murinen Haspin potentielle Kernlokalisationssequenzen (NLS) gefunden wurden (Higgins, 2001b; Tanaka et al., 1999). Die Annahme wurde durch die exklusive Kernlokalisierung eines Haspin-EGFP Fusionskonstrukts in

HEK-293- und COS-7-Zellen bestätigt (Tanaka et al., 1999). In der Bäckerhefe ist bisher noch keine NLS beschrieben worden, jedoch können Degradationssignale in Form von KEN- und D-Box-Motiven gefunden werden. Dabei werden beide Motive für den APC/C-abhängigen Abbau von Alk2 benötigt (Nespoli et al., 2006).

Der C-terminale Bereich aller Haspin-Proteine weist eine divergente eukaryotische Proteinkinase-Domäne (ePK) auf. Aus diesem Grund bilden sie eine einzigartige Gruppe von Kinasen, die nur entfernt mit anderen ePK-Familien verwandt ist. Trotz der Abwesenheit von einigen hoch konservierten Motiven in anerkannten ePKs, zeigen Haspin-Proteine aus Säugerzellen eine Serin/Threonin-Kinase-Aktivität. Sogar die noch divergenteren Haspin-Homologen Alk1 und Alk2 der Bäckerhefe scheinen aktive Kinasen zu sein (Diergardt, 2007; Nespoli et al., 2006). Zwei Studien, bei denen die Kristallstruktur der Kinasedomäne von humanem Haspin untersucht wurde, konnten die für ePK-charakteristische, zweigeteilte Struktur bestätigen. Dabei setzt sich diese konservierte Struktur der ePK-Domäne aus einem kleineren N-terminalen Bereich (Region I-V), der für die Nukleotidbindung zuständig ist, und einem C-terminalen Bereich (Region VI-XI), der das Substrat bindet und den Phosphotransfer bewerkstelligt, zusammen (Hanks and Hunter, 1995). Bei den Analysen ließen sich jedoch einige signifikante, strukturelle Unterschiede und eine Vielzahl an Haspin-spezifischen Insertionen erkennen (Eswaran et al., 2009; Villa et al., 2009). Die Kinasedomäne von Haspin ist *in vitro* alleine aktiv und exponiert dafür bestimmte Aminosäure-Reste. Zudem wird diese aktive Konformation durch Haspin-spezifische Insertionen, wie z.B. eine zusätzliche  $\beta$ -Haarnadel und zahlreiche  $\alpha$ -Helices stabilisiert. Viele ePKs benötigen für die Stabilität in der aktiven, offenen Konformation eine Phosphorylierung im „Aktivierungssegment“ (*activation segment*), um die Substratbindung zu ermöglichen. Interessanterweise unterscheidet sich das Aktivierungssegment der Haspin-Proteine erheblich von dem der anderen ePKs: zum Einen trägt das Haspin-Aktivierungssegment zur Stabilisierung einen zusätzlichen  $\beta$ -Strang, zum Anderen sind das „APE“-Motiv und die  $\alpha$ -EF-Helix von ePKs durch eine große helikale Insertion ersetzt. Des Weiteren wurden keine potentiellen Phosphorylierungsstellen und damit entsprechende Modifikationen im Aktivierungssegment beobachtet (Eswaran et al., 2009; Higgins, 2010; Villa et al., 2009). Allerdings sind in der Aminosäuresequenz die katalysierenden (Lysin in der Region II, Glutamat in der Region III, Aspartat in der Region VII) und an der  $Mg^{2+}$ -ATP-Bindung (G-X-G-X-X-G-X-V-Motiv in der Region I) mitwirkenden Bereiche zwischen der Haspin- und der ePK-Domäne konserviert. Sequenzähnlichkeiten weisen Haspin-Proteine untereinander in der katalytischen Schleife der Region IVb durch ein konserviertes Motiv mit der Sequenz (F/L)-E-H-R-(D/N)-L-(H/T/N) auf. In der Bäckerhefe unterscheidet sich die Kinasedomäne der Homologen Alk1 und Alk2 sogar von den Mitgliedern der Haspin-Familie,

da konservierte Aminosäuren (Lysin in der Region II, Glutamat in Region III, Aspartat in Region VII) fehlen und die konservierte Region I anstelle von G-X-G-X-X-G-X-V ein S-X-S-X-X-S-X-(NS)-Motiv trägt (Higgins, 2003).

Trotz ihrer zahlreichen Unterschiede zu den Sequenzen der ePKs scheinen Haspin-Proteine aufgrund ihres ubiquitären Vorkommens in fast allen eukaryotischen Organismen und ihrer Funktion als Proteinkinasen wichtige Komponenten der zellulären Regulation darzustellen. Im Jahr 1999 konnten Tanaka et al. in Mäusen erstmals eine funktionelle Verbindung von Haspin zum Zellteilungszyklus erstellen (Tanaka et al., 1999).

### 3.3.3 Histon H3 Threonin 3 – das bekannte Haspin Substrat

Bislang ist das Threonin 3 des Histons H3 das einzige bekannte Substrat von Haspin in Säugetieren, Pflanzen, dem Frosch *X. laevis* und der Spaltheife *S. pombe* (Higgins, 2010; Kelly et al., 2010; Kurihara et al., 2011; Wang et al., 2010; Yamagishi et al., 2010). Das Histon H3 wird an vielen weiteren Stellen, wie z.B. Serin 10, Threonin 11 und Serin 28 phosphoryliert (Dai and Higgins, 2005), wobei die Phosphorylierung an H3 S10 durch die Aurora B Kinase die am besten charakterisierte Modifikation darstellt. Die Phosphorylierung an Threonin 3 nimmt in Säugerzellen am Ende der G2-Phase an den Chromosomenarmen zu und erreicht ihr Maximum in der Metaphase, wobei zudem eine zunehmende Konzentration am inneren Zentromer zu sehen ist. Während der Anaphase nimmt die Phosphorylierung ab und ist in der Telophase nicht mehr nachweisbar (Dai et al., 2006; Dai et al., 2005; Higgins, 2010). Das Phosphorylierungsmuster ist in Übereinstimmung mit der Haspin-Lokalisation. Das zeitliche und räumliche Auftreten der H3 T3ph gab funktionelle Hinweise darauf, dass Haspin zu Beginn der Mitose die Chromosomenarm-Kondensation erleichtert, in der Metaphase zur Anordnung der Chromosomen in der Metaphaseplatte beiträgt und in der Anaphase im Zentromerbereich eine Rolle bei der Kohäsion der Schwesterchromatiden spielt. Des Weiteren wurde 2008 zum ersten Mal phosphoryliertes H3 T3 mit der Aktivierung der Kinase Aurora B, der katalytischen Untereinheit des *chromosomal passenger complexes* (CPC), in Verbindung gebracht (Rosasco-Nitcher et al., 2008). Mehrere Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass eine weitere Komponente des CPCs, Survivin, an den Haspin-modifizierten Rest des Histons H3 bindet und dadurch den CPC positioniert (Kelly et al., 2010; Wang et al., 2010). Dieser Komplex setzt sich aus den Proteinen Incenp, Survivin, Borealin und der Aurora B Kinase zusammen und ist maßgeblich am *spindle assembly checkpoint* (SAC) beteiligt (Vagnarelli and Earnshaw, 2004). Die Aktivierung dieses Kontrollsystems erfolgt über Aurora B, wenn an einem einzigen Chromosom keine amphitelische Orientierung der Spindel-Mikrotubuli vorliegt. Als „Spannungssensor“ registriert die Kinase diesen Anheftungsfehler und führt einen Zellzyklus-Arrest herbei, um Zeit für die

korrekte biorientierte Positionierung der Mikrotubuli an die Kinetochore zu gewinnen. Mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie konnte gezeigt werden, dass der CPC während des Zellzyklus eine hohe Dynamik aufweist und seine Untereinheiten in der Prophase an den Chromosomenarmen, in der Metaphase am inneren Zentromer, in der Anaphase an der Zentralspindel und zwischen der Anaphase und der Zytokinese am „*spindle midbody*“ lokalisieren (Vader et al., 2006). Zwischen der Prometaphase und der Anaphase ist die Positionierung des CPCs am inneren Zentromer für seine Funktionalität im SAC essentiell. Dabei bindet der CPC an diesen Bereich über phosphoryliertes Threonin 3 des Histons 3 und Serin 121 des Histons 2A, den Modifikationsstellen, die das innere Zentromer definieren (Yamagishi et al., 2010). Die Phosphorylierungsstelle des Histons H3 an T3 wird, wie schon erwähnt, durch Haspin modifiziert, die zweite des Histons 2A an S121 durch Bub1, einer Kinase, die ausschließlich zwischen den Kinetochoren zweier Schwesterchromatiden lokalisiert. In der Prophase phosphoryliert Bub1 nur in einem definierten Zentromerbereich das Serin 121, Haspin hingegen, aufgrund einer Pds5-abhängigen Anbindung an den Kohäsion-Komplex, zusätzlich an den Chromosomenarmen. Zur Auflösung der Kohäsion in diesem perizentromerischen Bereich sind im Prophase-Signalweg die Kinasen Plk1 (*Polo-like kinase 1*) und Aurora B, jedoch nicht die Separase selbst, nötig (Higgins, 2010). Während der CPC über die BIR-Domäne des Survivin direkt mit dem H3 T3ph assoziiert, erfolgt dessen Bindung an H2A S121ph indirekt über das Adapterprotein Shugoshin. Beim Vorhandensein von beiden Histonmodifikationen im inneren Zentromer ist diese Komplexassemblierung besonders effektiv. Ein Zusammenhang zwischen der H3 T3 Phosphorylierung durch Haspin und der Lokalisation des CPC konnte bislang in verschiedenen humanen Zelllinien sowie bei *X. laevis* und *S. pombe* gezeigt werden, in der Bäckerhefe jedoch nicht (Kelly et al., 2010; Wang et al., 2010; Yamagishi et al., 2010).

Haspin scheint die Hauptkinase der Histon H3 T3 Phosphorylierung zu sein. Nicht nur die spezifisch an Threonin 3 verstärkte Phosphorylierung nach Überexpression, sondern auch die eliminierte H3 T3ph nach Haspin *RNA interference* (RNAi) sprechen dafür (Dai et al., 2005; Markaki et al., 2009). Über die Kinase VRK1 (*mammalian vaccinnia-related kinase 1*) wurde auch berichtet, dass sie Histon H3 an Threonin 3 und Serin 10 phosphoryliert, jedoch in einem unbedeutendem Maße (Kang et al., 2007).

### **3.3.4 Die Haspin-Homologen Alk1 und Alk2 in der Hefe *S. cerevisiae***

In der Bäckerhefe *S. cerevisiae* gibt es die zwei Haspin-Proteine Alk1 und Alk2. Das Auftreten der beiden Homologen wird während des Zellzyklus reguliert. In einer genomweiten Transkriptionsstudie zeigte lediglich das mRNA-Expressionsmuster von *ALK1* ein ähnliches

Profil wie bereits bekannte Zellzyklusregulatoren (z.B. das Zyklin Clb2, die Polo-Kinase Cdc5, der Transkriptionsfaktor Swi5) (Spellman et al., 1998). Die Transkription des *ALK1*-Gens kann dadurch dem sogenannten *CLB2*-Cluster zugeordnet werden, dessen Expression periodisch verläuft und ein Maximum in der frühen M-Phase zeigt (Cho et al., 1998; Spellman et al., 1998). Die Menge der *ALK2* mRNA ist während des Zellzyklus relativ konstant, lediglich im Prozess der Sporulation ist ein Expressionsanstieg zu verzeichnen (Chu et al., 1998). Dabei ist die Transkription dem früh-mittel Muster zuzuordnen, bei dem die Gene zwei Stunden nach der Sporulation und nochmals nach fünf bis sieben Stunden abgeschrieben werden. Gene mit einem solchen zeitlichen Expressionsmuster sind funktionell am Geschehen der Schwesterchromatid-Kohäsion oder am Ende der Meiose beteiligt (Chu et al., 1998).

Die posttranslationale Regulation erfolgt bei Mitose-relevanten Proteinen häufig über die APC/C-abhängige Degradation. Beide Haspin-Homologen weisen im N-terminalen Bereich die gängigen APC/C-Abbausignale der KEN- und D-Box auf. In der G1-Phase ist Alk2, wie Alk1, nicht vorhanden, jedoch steigt die Proteinmenge in der frühen G2-Phase maximal an, um in der Anaphase APC/C-abhängig über die KEN- und D-Box abgebaut zu werden (Diergardt, 2007; Nespoli et al., 2006). Diese Abbaumotive führen bei Alk1 zu einer moderaten, bei Alk2 hingegen zu einer massiven Instabilität (Nespoli et al., 2006). Alk1 hat eine Proteinelänge von 760 aa mit einem entsprechenden Molekulargewicht von 86 kDA, Alk2 ist hingegen 676 aa lang und 76 kDA schwer.

Funktionelle Untersuchungen der Haspin-Einzel- bzw. -Doppelmutante zeigten keinen auffälligen Phänotyp (Diergardt, 2007; Nespoli et al., 2006). In Vorarbeiten konnte jedoch aufgrund einer genetischen Interaktion mit dem Motorprotein Cin8 eine Verbindung zum Mikrotubuli-Zytoskelett geschaffen werden.

Der Wissensstand zu diesen Proteinen in *S. cerevisiae* ist bis dato relativ gering. Die bereits erwähnten Charakteristika der Haspin-Proteine zeigen nicht unwesentliche Parallelen zu bekannten Mitoseregulatoren. Zudem lassen Schlüsselergebnisse, wie die Haspin-Verbindung zum Mikrotubuli-Zytoskelett, ihre Rolle im Zellteilungszyklus als Proteinkinasen immer bedeutender und interessanter werden.

## 4 Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war es, mehr über die Funktion der weitestgehend unbekanntenen Haspin-Homologen Alk1 und Alk2 im Zellteilungszyklus der Bäckerhefe zu erfahren. Hierfür wurden in mikroskopischen Untersuchungen die Lokalisationen sowie deren Regulation - ausgehend von einer beschriebenen physischen Interaktion von Alk2 mit der SPOC-Kinase Kin4 - spezifiziert. Zur Klärung von funktionellen Aspekten wurden die Auswirkungen der Haspin-Deletionen und der *ALK2*-Überexpression herangezogen. Nachdem diese Untersuchungen ergaben, dass Alk1 und Alk2 Regulatoren der Zellpolarität darstellen, wurde die Frage des Substrats von Haspin untersucht. Des Weiteren wurde die in der vorangegangenen Diplomarbeit beschriebene Wechselwirkung von Haspin mit dem Mikrotubuli-Zytoskelett näher charakterisiert (Swoboda, 2008). Da aus der Literatur bekannt ist, dass Haspin die Hauptkinase der Histon H3 Threonin 3 Phosphorylierung ist (Dai et al., 2005; Kurihara et al., 2011; Yamagishi et al., 2010), lag ein weiterer Fokus auf der Überprüfung dieser Modifikation in der Bäckerhefe.

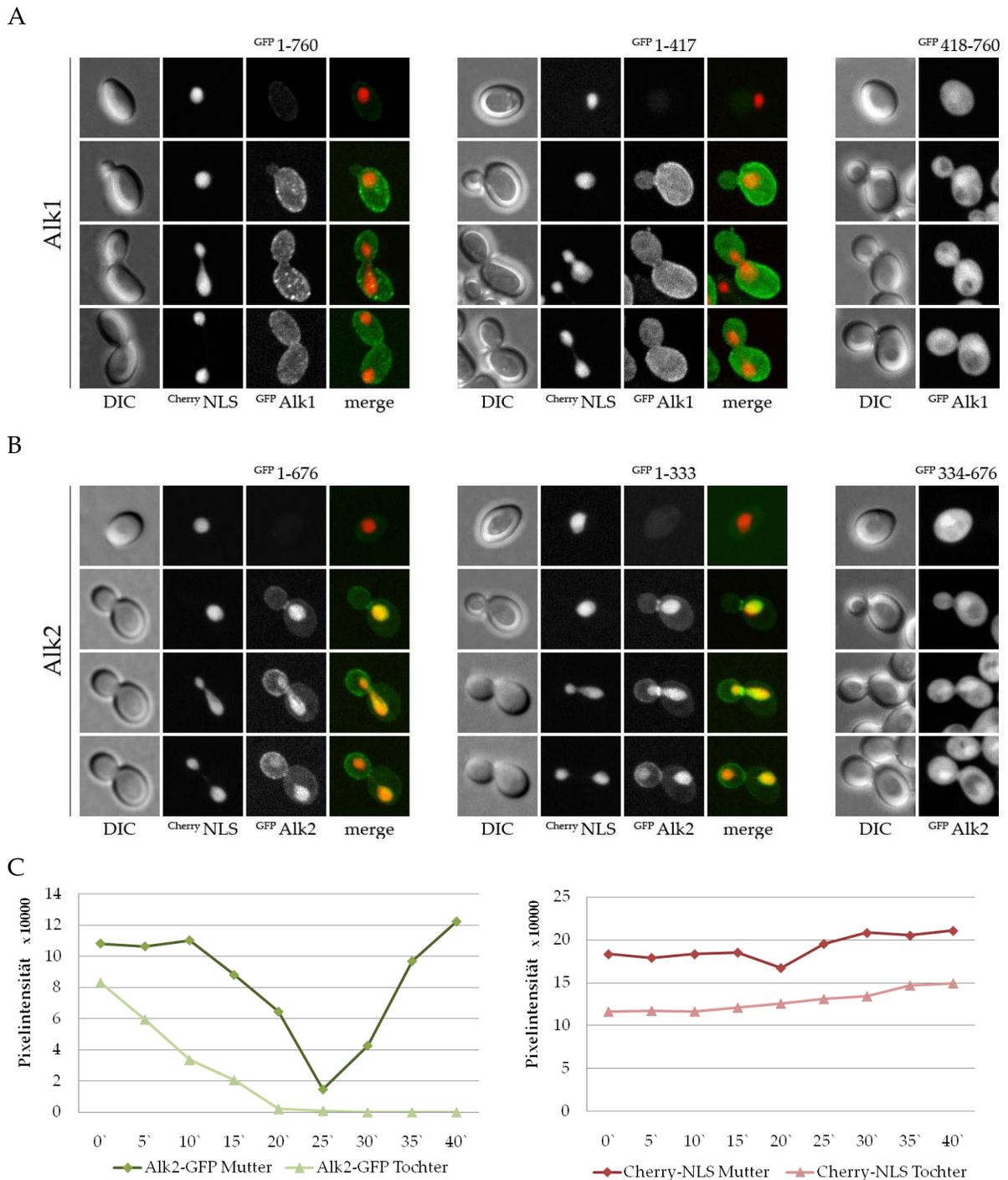
### 4.1 Subzelluläres Lokalisationsmuster von Alk1 und Alk2 im Zellteilungszyklus

#### 4.1.1 Lokalisation der Haspin-Proteine

Um funktionelle Aspekte eines Proteins zu analysieren, ist dessen Lokalisation ein hilfreiches Indiz, da somit potentielle Wirkungsorte visualisiert werden. Hierfür wurden einerseits Alk1 und Alk2 in ihrer gesamten Länge und andererseits nur ihre N- bzw. C-terminalen Bereiche in lebenden Zellen im konfokalen Mikroskop angesehen. Für die Visualisierung wurden die Konstrukte N-terminal mit GFP fusioniert und konstitutiv unter der Kontrolle des *TEF2*-Promotors exprimiert. Um den Zellkern zu visualisieren und somit die Zellzyklus-Phase besser spezifizieren zu können, wurde eine veränderte Form des Transkriptionsfaktors Swi5, die sich ausschließlich im Zellkern befindet, verwendet. An dieses modifizierte Protein, das in den Abbildungen mit NLS bezeichnet wird, wurde am N-Terminus ein Cherry-Fluorophor gekoppelt.

Die beiden Haspin-Homologen zeigten räumlich und zeitlich im Zellteilungszyklus Unterschiede auf. Wie in Abbildung 4.1 A zu sehen ist, lokalisierte das vollständige Alk1 bevorzugt in der Mutterzelle im Zytoplasma in granulären Strukturen. Alk2 hingegen, war am stärksten im Kern zu detektieren, wobei es zusätzlich am Knospenhals, an der Kernspindel und ab der Anaphase am Zellkortex der Tochterzelle anzufinden war (Abbildung 4.1 B). Diese Beobachtung steht in Übereinstimmung mit der von Tanaka et al., die eine EGFP-Haspin Fusion

im Kern von Mäusezellen visualisierten (Tanaka et al., 1999). Des Weiteren konnte Diergardt (2007) zeigen, dass Alk2 an nukleäre Chromatin-Strukturen bindet. Wurde das zeitliche Auftreten der ungekürzten Konstrukte betrachtet, so fiel auf, dass Alk1 und Alk2 in der G1-Phase abwesend waren. Alk2 trat am Anfang der S-Phase im Kern als starkes und am Knospenhals als schwächeres Signal auf. Zudem war es an der Zentralspindel erkennbar. Sobald ein Teil des Kerns den Mutter-Tochter-Zellübergang passierte, reduzierte sich das Alk2-Kernsignal in der Tochterzelle, während die Kortex-Lokalisation in diesem Zellkörper zeitgleich zunahm und bis zum Ende der Anaphase persistierte. In Abbildung 4.1 C wurde die Abnahme des Alk2-Kernsignals im Vergleich zum Kernsignal in beiden Zellkörpern verdeutlicht. Dabei zeigte sich nach der Kernteilung, dass das nukleäre Haspin-Signal in der Mutter vorerst stabil blieb und etwas später abgebaut wurde, wobei das Signal in der Tochter unmittelbar danach abnahm. Die Kontrollen des Cherry-NLS-Konstrukts wiesen ein relativ konstantes Signal auf. Aufgrund der konstitutiven Überexpression von *ALK2* durch den *TEF2*-Promotor war es etwas länger im Zellzyklus als unter endogenen Promotorbedingungen zu sehen. Diese Beobachtung ist nicht auf einen fehlenden APC/C-abhängigen Abbau zurückzuführen, da bei Zellen in der G1-Phase kein Signal detektierbar war. Bisherige Immunfluoreszenz- und lebend-Zell-Beobachtungen unter der Verwendung des schwächeren endogenen Promotors ließen keine Detektion des Kortex-Signals zu. In diesen Experimenten konnte nur die dominante Kern- und die relativ schwache Knospenhals-Lokalisation visualisiert werden ((Swoboda, 2008) bzw. siehe Kapitel 4.2.3). Das konstitutiv exprimierte Alk1 trat hingegen am S/G2-Phasen-Übergang vorerst als schwaches Signal auf, das sich bis zum Ende der Anaphase anreicherte. Die N-terminalen Konstrukte beider Haspin-Homologen wiesen exakt dasselbe Verhalten hinsichtlich der Lokalisation und des zeitlichen Auftretens wie die ungekürzten Versionen auf. Im Vergleich hierzu, zeigten die C-Termini von Alk1 und Alk2 keine spezifische Lokalisation. Diese waren homogen in der Zelle verteilt und während des kompletten Zellzyklus durchgehend vorhanden. Diese Ergebnisse zeigen, dass der N-terminale Bereich notwendig für den Abbau ist, was mit den bekannten Abbausequenzen der Haspin-Homologen im N-terminalen Bereich (Alk1: 200-KEN-202 und 224-RTPLKPLVN-232; Alk2: 116-KEN-118 und 150-RTPLRPISN-158) übereinstimmt (Nespoli et al., 2006).



**Abbildung 4.1 Die Lokalisation von Alk1 und Alk2**

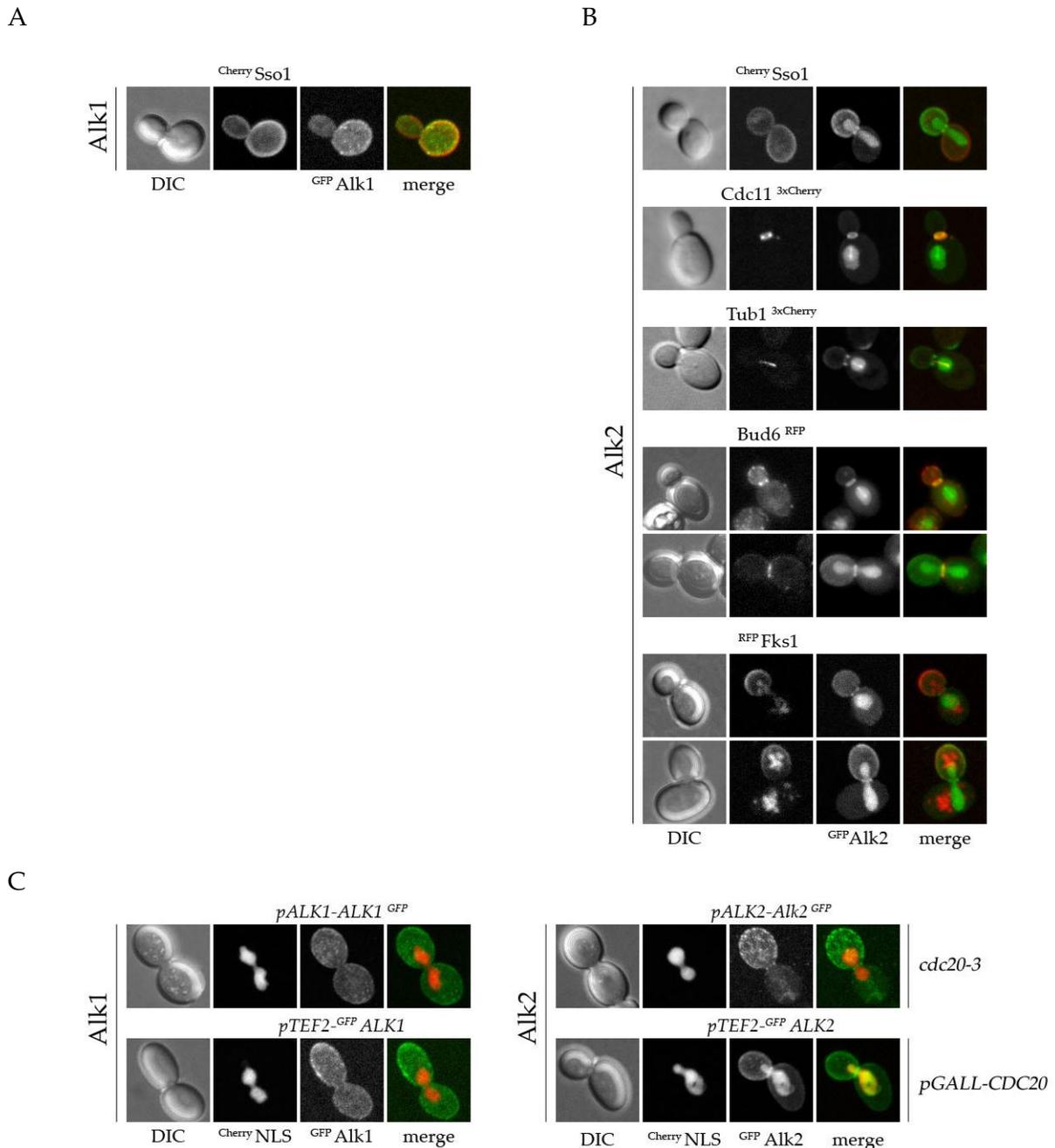
(A) Die Zellen der Stämme W11335 (*ALK1::pTEF2-GFP-ALK1(1-760)-LEU2 his3-Δ1::pTEF2-CHERRY-SWI5-S/A-tCYC1-HIS3*), W11695 (*tCYC1::pTEF2-GFP-ALK1(1-417)-tCYC1-LEU2 alk1Δ::URA3 his3-Δ1::pTEF2-CHERRY-SWI5-S/A-tCYC1-HIS3*), W11337 (*alk1::pTEF2-GFP-ALK1(418-760)-LEU2*), (B) W11079 (*ALK2::pTEF2-GFP-ALK2(1-676)-URA3 his3-Δ1::pTEF2-CHERRY-SWI5-S/A-tCYC1-HIS3*), W12059 (*tCYC1::pTEF2-GFP-ALK2(1-333)-tCYC1-LEU2 alk2A::natMX4 his3-Δ1::pTEF2-CHERRY-SWI5-S/A-tCYC1-HIS3*) und W11339 (*alk2::pTEF2-GFP-ALK2(334-676)-LEU2*) wurden in der exponentiellen Wachstumsphase für die lebend-Zell-Mikroskopie präpariert. Die Analyse erfolgte im inversen Mikroskop mit Hilfe eines *spinning-disk*-Systems unter einem 0,75 % SD++ Agaroseblöckchen. Eingesetzte Laserintensitäten: 488 nm-

## Ergebnisse

---

Laser <sup>GFP</sup>Alk2 25 %, 568 nm-Laser <sup>Cherry</sup>NLS 20 %. (C) Quantitative Auswertung des abnehmenden Alk2-Kernsignals im Vergleich zum Kernsignal. Der Stamm W11079 wurde wie unter (A, B) beschrieben für ein Zeitreihen-Experiment (*time-lapse*) vorbereitet und für 1 h am konfokalen Mikroskop mikroskopiert, wobei alle 5 min 10 Z-Ebenen pro Kanal aufgenommen wurden. Mittels des Programms *ImageJ* wurden die Intensitäten der Z-Ebenen der verschiedenen Kanäle aufsummiert (mit Berücksichtigung des Hintergrundsignals) und analysiert. Gemessen wurde ab dem Zeitpunkt, an dem beide Kerne getrennt vorlagen, welches im Diagramm 0 min entspricht. Aus 10 vermessenen Zellen wurde eine repräsentative exemplarisch dargestellt.

Zur Spezifizierung der visualisierten Haspin-Strukturen wurden mehrere Kolo-kalisationen durchgeführt. Dabei diente das Plasmamembran-Protein Sso1, das N-terminal mit Cherry fusioniert war, zur Überlagerung für das kortikale Haspin. Das bevorzugte Auftreten von Alk1 in der Mutterzelle (Abbildung 4.2 A), als auch das spezifische Vorkommen von Alk2 am Kortex der Tochterzelle traten mit diesem Komarker besonders hervor (Abbildung 4.2 B). Des Weiteren wurde das Signal von Alk2 am Knospenhals durch die Kolo-kalisation mit den Septin Cdc11, sowie das Vorhandensein an der Spindel mit Tub1, der  $\alpha$ -Tubulin-Untereinheit, bestätigt. Beide Komarker waren am C-Terminus mit einem 3xCherry-Fluorophor gekoppelt. Das zeitliche Auftreten von Alk2 am Tochterkortex wurde mit den am polarisierten Zellwachstum beteiligten Proteinen Bud6 und Fks1 verfolgt. Im Falle von Bud6 erfolgte die RFP-Markierung C-terminal, bei der  $\beta$ -Glukansynthese hingegen N-terminal. Beide Proteine waren während der Knospenaus-bildung in hoher Konzentration am Tochterkortex anzutreffen. Wie aus der Abbildung 4.2 B zu entnehmen ist, konnte das Alk2-Signal erst nach der Bud6- und der Fks1-Abnahme bzw. am Ende des Knospenwachstums verstärkt am Kortex detektiert werden. Alk2 bindet jedoch weder über Bud6 noch über Aktin-Strukturen an den Kortex, da die Lokalisation durch die Abwesenheit der Komponenten nicht beeinträchtigt war (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 4.2 Ko- bzw. Metaphase-Lokalisationen von Alk1 und Alk2**

Die Zellen der Stämme **(A)** W11867 (*ALK1::pTEF2-GFP-ALK1(1-760)-LEU2 SSO1::pTEF2-CHERRY-SSO1-URA3*), **(B)** W11105 (*ALK2::pTEF2-GFP-ALK2(1-676)-LEU2 SSO1::pTEF2-CHERRY-SSO1-URA3*), W11102 (*ALK2::pTEF2-GFP-ALK2(1-676)-URA3 CDC11-3xCHERRY-LEU2*), W11100 (*ALK2::pTEF2-GFP-ALK2(1-676)-URA3 TUB1::TUB1-3xCHERRY-tCYC1-LEU2*), W10885 (*ALK2::pTEF2-GFP-ALK2(1-676)-URA3 BUD6-yERFP-tADH1-SpHIS5*) und W11533 (*ALK2::pTEF2-GFP-ALK2(1-676)-URA3 fks1::pFKS1-yERFP-FKS1-URA3*) wurden in der logarithmischen Wachstumsphase für die lebend-Zell-Mikroskopie vorbereitet und im konfokalen Mikroskop unter einem 0,75 % SD++ Agaroseblöckchen analysiert. Eingesetzte Laserintensitäten: 488 nm-Laser 25 %, 561 nm-Laser variierte entsprechend dem Protein: CherrySso1 100 %, Cdc11<sup>3xCherry</sup> 100 %, Tub1<sup>3xCherry</sup> 100 %, Bud6<sup>RFP</sup> 100 %, <sup>RFP</sup>Fks1 86%. **(C)** Logarithmisch in XYD-Medium wachsende Zellen der Stämme W10362 (*pALK1-ALK1(1-760)-yEGFP-tADH1-CaURA3 trp1::pTEF2-CHERRY-SWI5-S/A-tCYC1-TRP1 cdc20-3*) und W10399 (*pALK2-ALK2(1-676)-yEGFP-tADH1-CaURA3 trp1::pTEF2-*

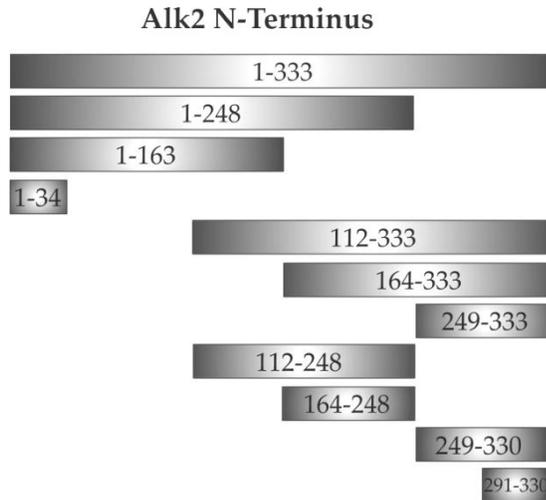
*CHERRY-SWI5-S/A-tCYC1-TRP1 cdc20-3*) wurden zur Ausprägung des temperatursensitiven Allels *cdc20-3* von 25°C zu 37°C überführt, für 3 h in Metaphase arretiert und für die lebend-Zell-Mikroskopie aufgearbeitet. Die Stämme W11686 (*ALK1::pTEF2-GFP-ALK1(1-760)-URA3 his3-Δ1::pTEF2-CHERRY-SWI5-S/A-tCYC1-HIS3 natNT2-pGALL-CDC20*) und W11685 (*ALK2::pTEF2-GFP-ALK2(1-676)-URA3 his3-Δ1::pTEF2-CHERRY-SWI5-S/A-tCYC1-HIS3 natNT2-pGALL-CDC20*) wurden in XYRG-Medium angezogen, in der exponentiellen Wachstumsphase in XYD-Medium überführt und zur Repression des *GALL*-Promotors bzw. zum Metaphase-Arrest für 3 h bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden sie unter einem 0,75 % SD++ Agaroseblöckchen am konfokalen Mikroskop betrachtet. Eingesetzte Laserintensitäten: 488 nm-Laser<sup>GFP</sup>Alk 25 %, 561 nm-Laser<sup>Cherry</sup>NLS 20 %.

Das Expressionsmaximum zeigt Alk2 in der frühen bzw. Alk1 in der späten M-Phase (Diergardt, 2007). Aus diesem Grund war es von Interesse ihre Lokalisation in der Metaphase genauer zu betrachten, um einen Hinweis auf die Funktion zu bekommen. Die Arreste wurden durch den Funktionsverlust des *CDC20*-Gens herbeigeführt, wobei dessen Expression einerseits durch den vorgeschalteten *GALL*-Promotor reprimiert und andererseits durch den Einsatz der temperatursensitiven Mutante *cdc20-3* verhindert wurde. Das Fehlen von Cdc20 verhindert die Aktivierung des APC/C in der Mitose, wodurch das Securin nicht abgebaut, die Separase nicht aktiviert, folglich die Kohäsion der Schwesterchromatiden nicht aufgelöst werden kann und der Metaphase/Anaphase-Übergang ausbleibt. Die Lokalisation der beiden GFP-markierten Haspin-Homologen wurde unter dem endogenen und dem konstitutiven *TEF2*-Promotor angesehen. Um den Zell-Arrest zu kontrollieren, wurde als Komarker das <sup>Cherry</sup>NLS Konstrukt verwendet. Dabei zeigte sich, dass die Mehrheit der für drei Stunden in Metaphase arretierten Zellen einen elongierten Kern aufwies. Unerwarteter Weise befand sich Alk1 unabhängig vom eingesetzten Promotor nach dem Metaphase-Arrest verstärkt am Kortex der Tochterzelle (Abbildung 4.2 C). Dies könnte für eine kortikale Funktion an der Knospe sprechen. Das unter dem endogenen Promotor exprimierte Alk2 lokalisierte besonders am Tochterkortex und etwas schwächer am Knospenhals, wobei das Kernsignal komplett fehlte. Bei der konstitutiven Expression war Alk2 aufgrund der erhöhten Menge zusätzlich im Kern anzutreffen. Diese Ergebnisse zeigen, dass beide Haspin-Proteine während ihrer höchsten Expression bevorzugt am Tochterkortex anzufinden sind. In ihrem funktionell aktiven Zustand könnten sie dort womöglich wichtige, bisher unbekannte Aufgaben ausführen.

## 4.1.2 Funktionsbereiche der N-terminalen Alk2-Domäne

Den verschiedenen Lokalisationen und dem unterschiedlichen, zeitlichen Auftreten von Alk2 müssen entsprechende Sequenzmotive zugrunde liegen. Aus den Beobachtungen in Abbildung 4.1 A, B ist ersichtlich, dass der N-terminale Bereich von Haspin für dessen Lokalisation hinreichend und nötig ist. Um die Regionen, die für die Kern-, Kortex- und Knospenhalslokalisierung und für den Abbau des Haspin-Homologen Alk2 verantwortlich sind,

zu definieren, wurden verschiedene C- und N-terminale Verkürzungen des N-terminalen Bereichs von Alk2 hergestellt (Abbildung 4.3). Diese Konstrukte wurden am C-terminalen Ende mit einem GFP-Fluorophor fusioniert und von einem *TEF2*-Promotor exprimiert. Für die Translation wurde den N-terminalen Verkürzungen vor ihre Sequenz ein ATG-Startcodon angefügt. Über homologe Rekombination wurden die linearisierten Plasmide in den *CYC1*-Terminator integriert.



**Abbildung 4.3 Schematische Darstellung hergestellter C- und N-terminaler Verkürzungen des Alk2-Proteins**

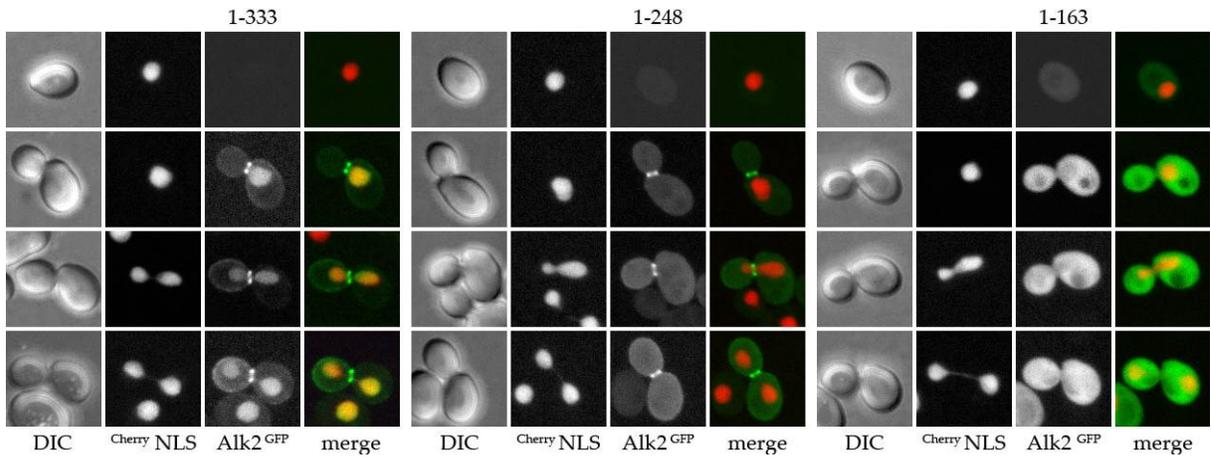
Hier angegeben sind die Aminosäuren, die das jeweils verkürzte Protein einschließt. Alle Subfragmente sind C-terminal mit einem GFP-Fluorophor fusioniert und werden konstitutiv über den *TEF2*-Promotor exprimiert.

Aus der Literatur ist bisher nur das Abbaumotiv der KEN-Box im Bereich 116-KEN-118 und der D-Box in der Region 150-RTPLRPISN-158 bekannt (Nespoli et al., 2006).

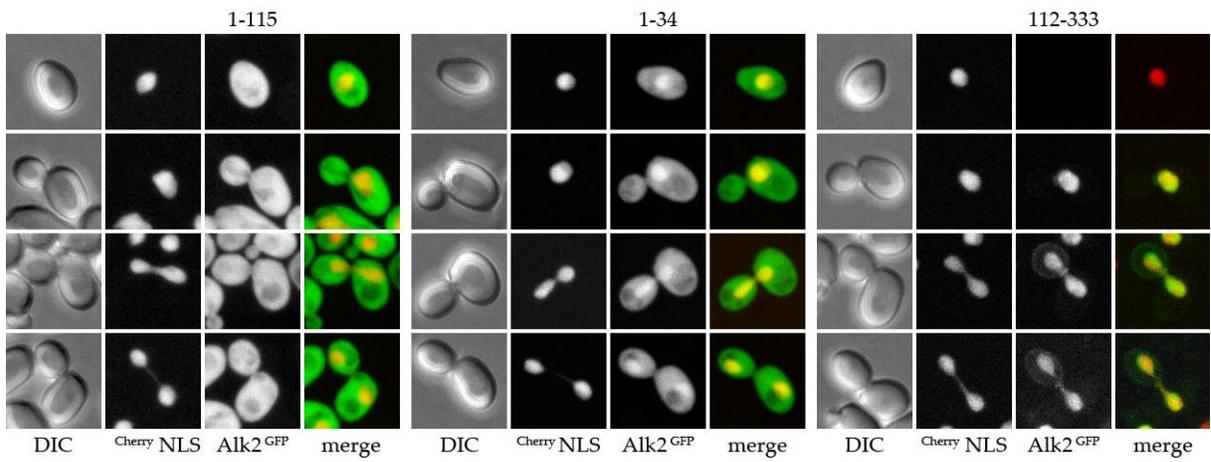
Die komplette N-terminale Domäne, Alk2(1-333)-GFP, diente als Kontrolle für den Abbau und die Lokalisation, wobei sich keine Unterschiede zum N-terminal fusionierten GFP-Konstrukt zeigten (siehe Kapitel 4.1.1). Dieses Konstrukt lokalisierte erst nach der G1-Phase im Kern, am Knospenhals, an der Spindel und am Ende der Metaphase zusätzlich am Tochterkortex. Die Verkürzung Alk2(112-333) entsprach dem Muster des Kontrollstamms. Die Subfragmente Alk2(1-115), Alk2(1-163) und Alk2(112-248) begrenzten die notwendige und hinreichende Abbau-Region auf die Aminosäuren 115 bis 163, in welcher auch die bekannten KEN- und D-Box-Motive liegen. Das erste Konstrukt existierte dauerhaft im Zellzyklus, während die anderen beiden wieder abgebaut werden konnten und folglich kein Signal in G1-Zellen zeigten (Abbildung 4.4 A, B, C). Für den Nachweis einer potenziellen Kernlokalisationssequenz im N-terminalen Bereich von Alk2 waren die Konstrukte Alk2(1-248), Alk2(249-333), Alk2(249-330) und Alk2(291-330) wichtig (Abbildung 4.4 A, D). Das Fragment mit den N-terminalen

Aminosäuren Alk2(1-248) zeigte eine ausschließlich exonukleäre Lokalisation am Knospenhals und im Zytoplasma. Die Expression des Konstrukts Alk2(249-333) bzw. Alk2(249-330) lieferte ein Kernsignal, wobei das noch kleinere Fragment Alk2(291-330) ausreichend war, um diese Alk2-Lokalisation zu erreichen. Aus den Beobachtungen dieser Verkürzungen resultiert, dass die 39 Aminosäuren in der Region 291 - 330 notwendig und hinreichend für die Kernlokalisierung sind. Eine Analyse der Aminosäuresequenz von Alk2 mit dem Programm cNLS-Mapper (basierend auf (Kosugi et al., 2009), [http://nls-mapper.iab.keio.ac.jp/cgi-bin/NLS\\_Mapper\\_form.cgi](http://nls-mapper.iab.keio.ac.jp/cgi-bin/NLS_Mapper_form.cgi)) schlägt bei einem mittleren Score von 4 eine potentielle, zweigeteilte NLS zwischen den Aminosäuren 286 und 317 (ELNHKHSSSNLSFRSLKHKTSHSSLNKLKVRRL) vor. Die über die Subfragmente identifizierte Region 291-330 überlappt somit teilweise mit dem vorhergesagten NLS-Bereich des Programms. Der für die kortikale Lokalisation von Alk2 verantwortliche Bereich konnte auf die Region 164 bis 333 beschränkt werden. Dabei zeigten Zellen mit dem Subfragment Alk2(164-248) und Alk2(249-333) keine Kortex-Lokalisation, sondern im Falle von Alk2(164-248) eine homogene Verteilung im Zytoplasma und bei Alk2(249-333) eine fast exklusive Kern-Lokalisation (Abbildung 4.4 C, D). Die N-terminale Verkürzung Alk2(164-333) lieferte in der Anaphase ein sehr starkes, kortikales Alk2 Signal in der Tochterzelle (Abbildung 4.4 C). Dieses Ergebnis macht deutlich, dass die Aminosäuren 164 bis 248 notwendig, die weiter C-terminal gelegenen jedoch auch für die kortikale Lokalisation von Alk2 wichtig sind. Eine Spezifizierung der Region, die für die Lokalisation am Knospenhals wichtig ist, war durch die Verkürzungen Alk2(1-248), Alk2(112-248) und Alk2(164-248) möglich. Nachdem Alk2(1-248) ein entsprechendes Signal am Mutter-Tochter-Zellübergang zeigte, das kürzere Fragment Alk2(164-248) dagegen nicht, wies die Beobachtung darauf hin, dass weiter N-terminal gelegene Bereiche noch für diese Lokalisation nötig sein müssen (Abbildung 4.4 A, D). Bei der Expression des größeren Subfragments Alk2(112-248) war das Knospenhals-Signal detektierbar, was zeigte, dass die Aminosäuren 112 bis 248 für diese Lokalisation von Alk2 nötig und hinreichend sind (Abbildung 4.4. C).

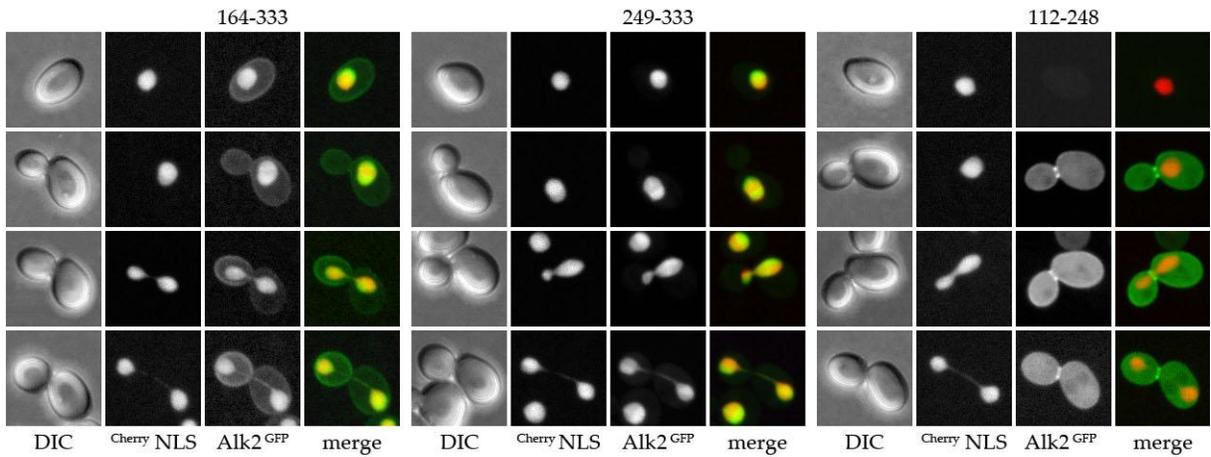
A



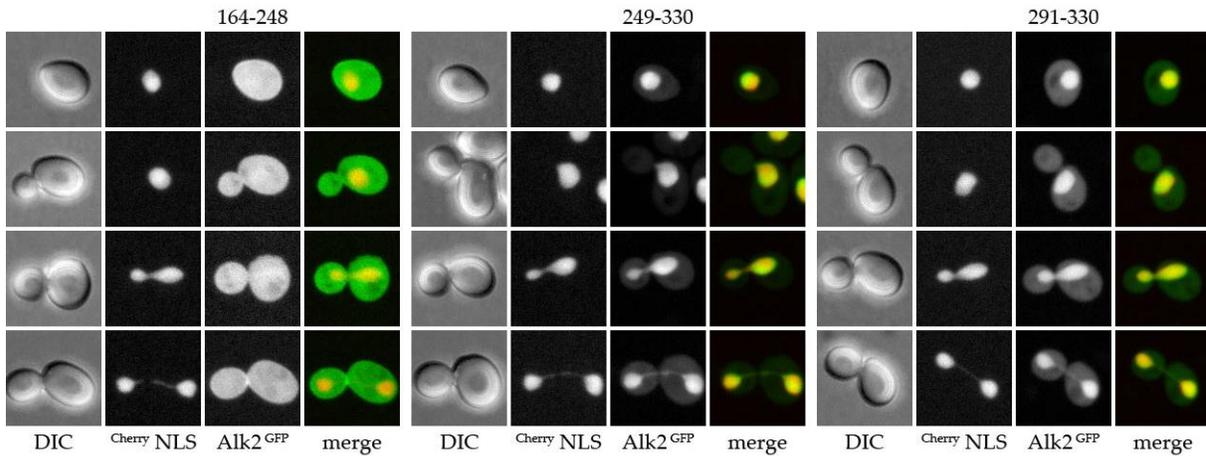
B



C



D

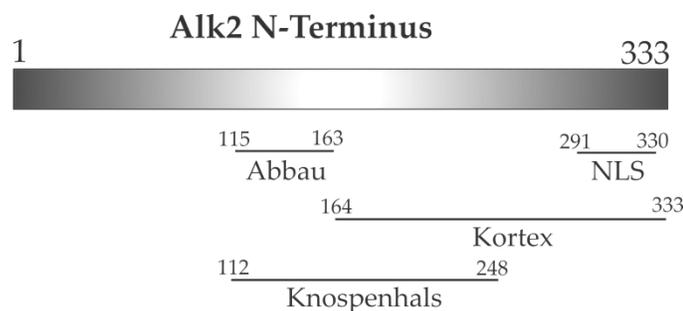


**Abbildung 4.4 Lokalisation der verkürzten N-terminalen Alk2-Konstrukte**

Die Zellen der folgenden Stämme (gemeinsamer Genotyp: *tCYC1::pTEF2-ALK2-Verkürzung-GFP-tCYC1-URA3 alk2Δ::natMX4 his3-Δ1::pTEF2-CHERRY-SWI5-S/A-tCYC1-HIS3*) wurden in der logarithmischen Wachstumsphase für die lebend-Zell-Mikroskopie vorbereitet und im konfokalen Mikroskop unter einem 0,75 % SD++ Agaroseblöckchen analysiert: **(A)** W12290 (*ALK2(1-333)*), W12307 (*ALK2(1-248)*), W12288 (*ALK2(1-163)*), **(B)** W12286 (*ALK2(1-115)*), W12284 (*ALK2(1-34)*), W12313 (*ALK2(112-333)*), **(C)** W12315 (*ALK2(164-333)*), W12317 (*ALK2(249-333)*), W12309 (*ALK2(112-248)*), **(D)** W12311 (*ALK2(164-248)*), W12319 (*ALK2(249-330)*) und W12321 (*ALK2(291-330)*). Eingesetzte Laserintensitäten: 488 nm-Laser *Alk2<sup>GFP</sup>* 25 %, 561 nm-Laser *CherryNLS* 20 %.

Zusammen genommen zeigen die mikroskopischen Studien, dass für die Kernlokalisierung eine hinreichende Domäne im Bereich 291-330 existiert. Des Weiteren kann die Region, die für das Kortex-Signal von Alk2 verantwortlich ist, auf die Aminosäuren 164 bis 333 eingegrenzt werden. Die für die Alk2-Lokalisation am Knospenhals nötige Sequenz überlappt partiell mit der kortikalen und ist im Bereich 112 bis 248 anzufinden. Neben diesen Regionen, die die Lokalisation des Haspin-Homologen festlegen, zeigt sich eine für die Degradation wichtige Domäne im Bereich 115 bis 163.

A



B

Alk2-Konstrukt	Abbau	Kern	Kortex	Knospenhals	Zytoplasma
1-676	ja	ja	ja	ja	nein
1-333	ja	ja	ja	ja	nein
1-248	ja	nein	nein	ja	leicht
1-163	ja	nein	nein	nein	ja
1-115	nein	nein	nein	nein	ja
1-34	nein	nein	nein	nein	ja
112-333	ja	ja	ja	ja	nein
164-333	nein	ja	ja	nein	nein
249-333	nein	ja	nein	nein	leicht
112-248	ja	nein	nein	ja	ja
164-248	nein	nein	nein	nein	ja
249-330	nein	ja	nein	nein	leicht
291-330	nein	ja	nein	nein	leicht

**Abbildung 4.5 Schematische Zusammenfassung der Ergebnisse der Alk2-Verkürzungen**

(A) Der Bereich 115 bis 163 ist für den Abbau des Haspin-Homologen zuständig. Über die kleine Region der Aminosäuren 291 bis 330 wird die Lokalisation von Alk2 im Kern vermittelt. Zudem dient die Domäne 164 bis 333 der kortikalen Lokalisation, während die Aminosäuren 112 bis 248 für die Knospenhals-Lokalisation verantwortlich sind. (B) Die Tabelle zeigt die Möglichkeit des Abbaus und die entsprechenden Lokalisationen der Alk2-Subfragmente.

## 4.2 Regulation der Alk2-Lokalisation durch Kin4

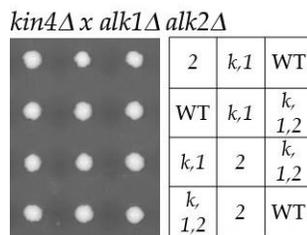
### 4.2.1 ALK2 interagiert genetisch mit KIN4

Breitkreutz et al. (2010) suchten genomweit nach Wechselwirkungspartnern bzw. Substraten von Proteinkinasen und Phosphatasen. Hierfür wurden in Überexpressionsstudien Interaktionen von Proteinen mit Hilfe von massenspektrometrischen Methoden analysiert. In diesem Zuge wurde eine physikalische Wechselwirkung zwischen Alk2 und Kin4, einer Serin/Threonin-Kinase des Spindelpositionierungskontrollpunkts (SPOC), festgestellt. Um die

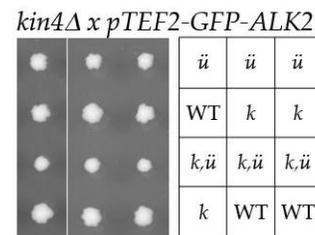
Frage einer genetischen Interaktion der beiden Gene zu klären, wurde einerseits ein *kin4Δ*-Stamm mit der *alk1Δ alk2Δ*-Mutante gekreuzt und andererseits mit einem Stamm, mit dem Genotyp *pTEF2-GFP ALK2*. Danach wurden die diploiden Zellen zur Sporulation angesetzt und mittels eines Mikromanipulators wurden die Tetraden auf einer Vollmediumplatte ausgelegt.

In der Tetraden-Analyse der ersten Kreuzung war keine genetische Interaktion zu erkennen (Abbildung 4.6 A). Alle möglichen Kombinationen dieser Mutanten wuchsen wie Kolonien des Wildtyps. Aus Abbildung 4.6 B geht hervor, dass *kin4Δ*-Mutanten in Verbindung mit konstitutiv überexprimierten Alk2-Mengen ein vermindertes Wachstum bei 30°C zeigten. Das Ergebnis demonstriert, dass neben der physikalischen Interaktion von *KIN4* und *ALK2*, auch eine genetische existiert. Dies könnte dafür sprechen, dass das Haspin-Homologe negativ von der SPOC-Kinase reguliert wird.

A



B



**Abbildung 4.6 Synthetischer Effekt von *kin4Δ* und *pTEF2-GFP-ALK2***

Die Zellen der Stämme **(A)** W10611 (*kin4Δ::kanMX4*) und W4766 (*alk1Δ::URA3 alk2Δ::natMX4*) bzw. **(B)** W11517 (*kin4Δ::kanMX4 ALK2::pTEF2-GFP-ALK2(1-676)-URA3 CDC11::CDC11-3xCHERRY-LEU2*) und W10407 (*his3-Δ1::pTEF2-CHERRY-SWI5-S/A-tCYC1-HIS3*) wurden miteinander gekreuzt, zur Sporulation gebracht und anschließend der Tetraden-Analyse unterzogen. Die Sporen wurden auf XYD-Platten ausgelegt und 3 Tage bei 30°C inkubiert. Die Genotypen wurden mit Hilfe der Selektionsmarker bestimmt und folgendermaßen bezeichnet: WT (Wildtyp), *k* (*kin4Δ*), *1* (*alk1Δ*), *2* (*alk2Δ*), *ü* (*pTEF2-GFP-ALK2*). Zur Übersichtlichkeit wurden nur die relevanten Merkmale erwähnt.

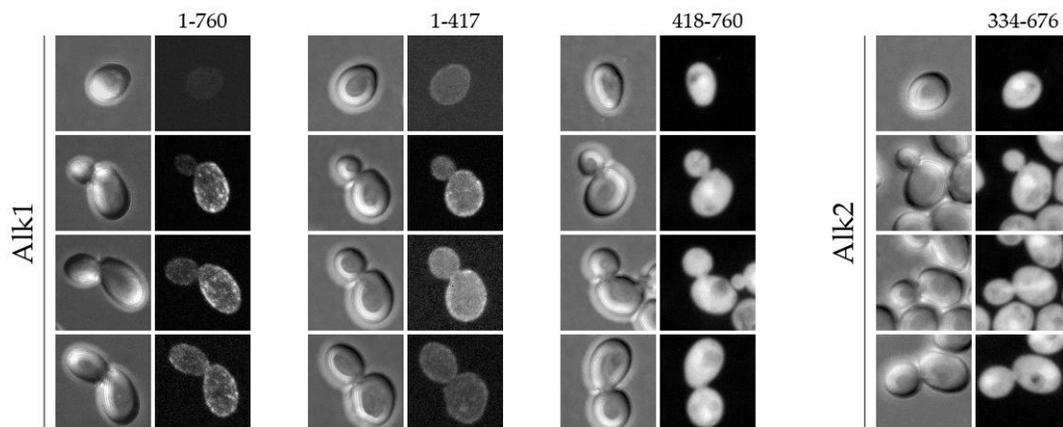
## 4.2.2 Kin4 beeinflusst Alk1-Lokalisation nicht

Für eine genauere Charakterisierung der Kin4-Wirkung auf die Haspin-Homologen war es von Interesse einen potentiellen Einfluss der Kinase auf deren Lokalisation zu untersuchen. Kin4 befindet sich während des Zellzyklus exklusiv in der Mutterzelle, v.a. am Kortex und an den Spindelpolkörpern. In der Literatur wird beschrieben, dass das spezifisch in der Tochterzelle am Kortex lokalisierte GEF des SPOCs, Lte1, inhibitorisch auf die Kin4 Lokalisation in der Knospe wirkt (Bertazzi et al., 2011; Falk et al., 2011). Damit ähnelt die kortikale Lokalisation von Kin4 der von Alk1, wie in Abbildung 4.2 A durch eine Kofärbung mit dem Plasmamembran-Protein Sso1 zu sehen war. Aus diesem Grund wurde eine mögliche Interaktion von Kin4 mit Alk1 untersucht. Des Weiteren wurde, aufgrund der beschriebenen physikalischen Wechselwirkung

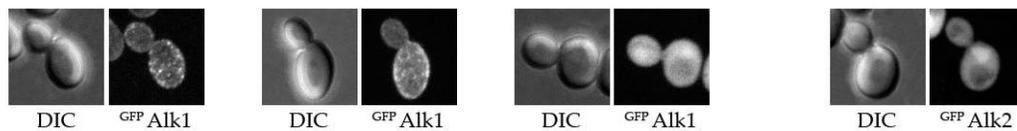
von Kin4 mit Alk2, auch der Einfluss auf die katalytisch-wirkende C-terminale Domäne von Alk2 analysiert. Hierfür wurden durch Kreuzung die gewünschten Stämme generiert und im Fluoreszenzmikroskop analysiert.

Aus den mikroskopischen 2D-Projektionen der Abbildung 4.7 geht hervor, dass die Deletion von *KIN4* weder einen Einfluss auf die Lokalisation von Alk1, noch auf dessen N- bzw. C-terminale Domäne hatte. Alk1 und das N-terminale Fragment waren nach wie vor am Kortex der Mutterzelle, das C-terminale Konstrukt im Zytoplasma zu sehen. Die katalytische Domäne von Alk2 war ebenso unbeeinträchtigt und homogen im Zytoplasma verteilt.

A



B



**Abbildung 4.7 Lokalisation von Alk1 (volle Länge, N-, C-terminale Domäne) und der C-terminalen Alk2-Domäne in *kin4Δ*-Mutanten**

Die Zellen der Stämme (A) W11868 (*kin4Δ::kanMX4 ALK1::pTEF2-GFP-ALK1(1-760)-LEU2*), W11817 (*kin4Δ::kanMX4 tCYC1::pTEF2-GFP-ALK1(1-417)-tCYC1-LEU2 alk1Δ::URA3*), W11816 (*kin4Δ::kanMX4 alk1::pTEF2-GFP-ALK1(418-760)-LEU2*) und W11514 (*kin4Δ::kanMX4 alk2::pTEF2-GFP-ALK2(334-676)-LEU2*) wurden in der logarithmischen Wachstumsphase für die lebend-Zell-Mikroskopie vorbereitet und im inversen Mikroskop mit Hilfe eines *spinning-disk*-Systems unter einem 0,75 % SD++ Agaroseblöckchen analysiert. Eingesetzte Laserintensitäten: 488 nm-Laser  $GFP_{Alk1}$  100%,  $GFP_{Alk2}$  25 %. Die unter (B) aufgeführten Zellen stellen die entsprechenden Wildtyp-Stämme dar (Stammnamen siehe Abbildung 4.1).

### 4.2.3 Kin4-Verlust verändert Alk2-Lokalisation

Die Verbindung zwischen Kin4 und Alk2 wurde aufgrund des Resultats von Breitzkreutz et al. weiter evaluiert (Breitzkreutz et al., 2010), indem die Lokalisation des ungekürzten Alk2-Proteins, dessen N-terminaler Domäne und der in Kapitel 4.1.2 aufgeführten Alk2-Subfragmente in einem *KIN4*-Deletionsstamm betrachtet wurde. Dazu wurden die Stämme der C-terminal mit GFP fusionierten Haspin-Konstrukte, deren Expression über den *TEF2*- bzw. endogenen Promotor

stattfind, mit einer *kin4Δ*-Mutante gekreuzt und der Tetraden-Analyse unterzogen. Hierbei zeigten die *KIN4*-Deletionsmutanten in Kombination mit den verschiedenen Alk2-Verkürzungen keine Wachstumsdefekte (Daten nicht gezeigt). Die Stämme mit dem geeigneten Genotyp, die als Kern- bzw. Zellzyklus-Marker das <sup>Cherry</sup>NLS-Konstrukt beinhalteten, wurden anschließend im konfokalen Mikroskop analysiert.

Durch Abbildung 4.8 wird ersichtlich, dass der Verlust von Kin4 eine Abnahme des Kernsignals des vollständigen und des N-terminalen Fragments von Alk2 verursachte (Abbildung 4.8 A). Das gleiche Resultat war auch mit dem weniger stark exprimierenden, endogenen Promotor zu erkennen. Es stellte sich die naheliegende Frage, ob Kin4 Alk2 direkt an einer potentiellen NLS phosphoryliert, dadurch die Kernlokalisationssequenz aktiviert und letztendlich Alk2 in den Kern befördert. Im Falle einer Kin4-abhängigen NLS sollte die Deletion von *KIN4* zu einem Verlust des Alk2-Kernsignals in allen verkürzten Konstrukten führen. Diese Vermutung konnte mit den Verkürzungen Alk2(112-333), Alk2(164-333), Alk2(249-333), Alk2(249-330) sowie Alk2(291-330) widerlegt werden, da deren Kernlokalisierung in *kin4Δ*-Stämmen persistierte (Abbildung 4.8 C, E). Aus diesen Beobachtungen wird deutlich, dass einerseits Kin4 nicht notwendig für die Kernlokalisierung von Alk2 ist. Andererseits vermittelt die SPOC-Kinase seine Wirkung indirekt auf das nukleäre Signal über die Aminosäure-Region 1 bis 112 von Alk2, da nur in Anwesenheit dieser Sequenz Kerneffekte in *kin4Δ*-Stämmen zum Vorschein kamen. Eine mögliche Erklärung wäre, dass dieser Bereich unter Wildtyp-Bedingungen eine intramolekulare Inhibition auf die NLS von Alk2 ausübt. Nur eine Modifikation von Kin4 in dieser Region bzw. ihr Sequenzverlust führt zur Aktivierung der Kernlokalisationssequenz und zum Eintritt von Alk2 in den Kern. Kin4 könnte somit helfen nicht die NLS an sich zu aktivieren, sondern die auto-inhibitorische Wirkung aufzulösen. Des Weiteren wäre denkbar, dass die N-terminale Domäne 1 bis 112 als zytoplasmatischer Anker fungiert, der unter dem Einfluss von Kin4 steht. Bei diesem Modell würde Kin4 den Anker derart modifizieren, dass dieser seine Funktion verliert und folglich Alk2 in den Kern eintreten kann.

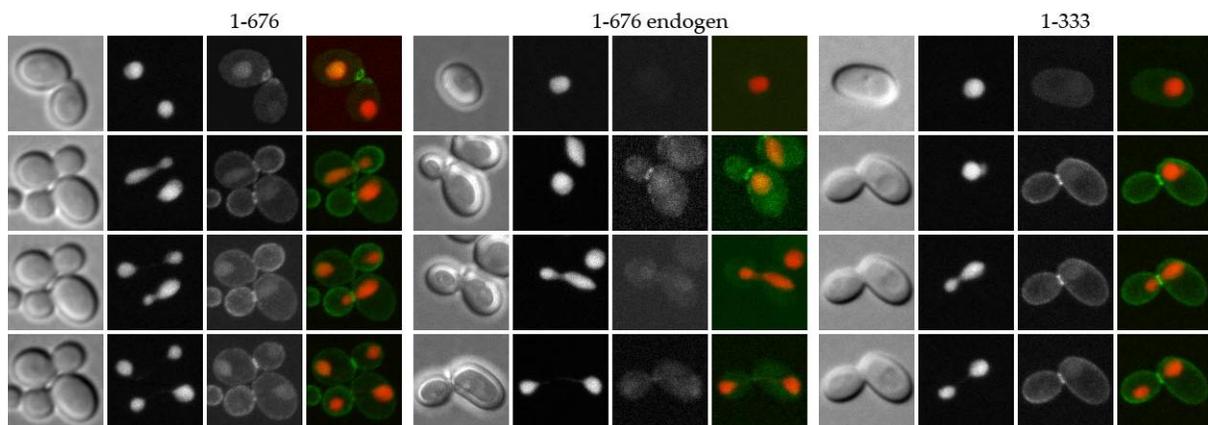
Interessanterweise verstärkte sich bei den Konstrukten Alk2(1-676), Alk2(1-333), Alk2(112-333) und Alk2(164-333) in Abwesenheit der Kinase Kin4, die unter Normalbedingungen ausschließlich in der Mutterzelle v.a. am Kortex lokalisiert, das kortikale Alk2-Signal in der Mutterzelle. Das intensivste, kortikale Signal lieferte das kürzeste Konstrukt Alk2(164-333) (Abbildung 4.8 C), wobei diese Beobachtung auf einen nicht vorhandenen Abbau des Konstrukts zurückzuführen sein könnte. Bei dessen Unterteilung in die Subfragmente Alk2(164-248) und Alk2(249-333) blieb die kortikale Lage aus, was die Wichtigkeit beider Regionen bei der Kortex-Lokalisation unterstreicht (Abbildung 4.8 C, D). In den vergleichbaren Zellen der Wildtyp-Stämme fehlte die Mutterzell-spezifische Kortex-Lokalisation von Alk2. Aus diesen

Daten konnte geschlussfolgert werden, dass die Region 164 bis 333 von Alk2 hinreichend für die Regulation der kortikalen Lokalisation in der Mutterzelle durch die Kinase Kin4 ist. Dabei könnte Kin4 Alk2-Rezeptoren am Kortex modifizieren und sie somit unzugänglich für Haspin machen. Eine andere mögliche Erklärung könnte sein, dass in Anwesenheit von Kin4 das Haspin-Homologe sterisch gehindert wird, eine Bindung mit dem Kortex einzugehen. In Abwesenheit der SPOC-Kinase lagert sich hingegen Alk2 mittels seiner dafür verantwortlichen Region an den Kortex an.

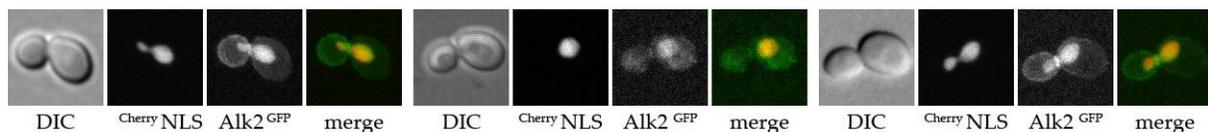
Eine schwache Zunahme des zytoplasmatischen Signals war bei den eben erwähnten Konstrukten (Alk2(1-676), Alk2(1-333), Alk2(112-333), Alk2(164-333)) als auch bei den fast vollständig nukleär, lokalisierenden Subfragmenten Alk2(249-330), Alk2(249-333) und Alk2(291-330) zu verzeichnen. Nachdem alle Konstrukte den Bereich 291-330 aufwiesen, könnte dies bedeuten, dass Kin4 über diese Region zytoplasmatisch lokalisiertes Alk2 beeinflusst (Abbildung 4.8 A, C, E). Bei den kortikal lokalisierenden Konstrukten wäre es auch möglich, dass aufgrund der fehlenden, inhibitorischen Wirkung der SPOC-Kinase auf das Haspin-Homologe die zytoplasmatischen Alk2-Mengen in der Mutterzelle, die zwischen dem Kern und dem Kortex shutteln, zunehmen. Den Verkürzungen Alk2(249-330), Alk2(249-333) und Alk2(291-330) fehlten die für die kortikale Lokalisation nötigen Aminosäuren 164 bis 248. Aus diesem Grund waren sie nicht in der Lage an den Kortex zu binden und lokalisierten deswegen womöglich verstärkt im Zytoplasma.

Die Verkürzungen Alk2(1-248) und Alk2(112-248), die ausschließlich am Knospenhals lokalisierten (Abbildung 4.8 B, D), sowie die Subfragmente Alk2(1-34), Alk2(1-163) und Alk2(164-248), die zytoplasmatisch verteilt waren (Abbildung 4.8 B, D), zeigten keine Beeinträchtigung im Lokalisationsverhalten durch den Verlust von Kin4.

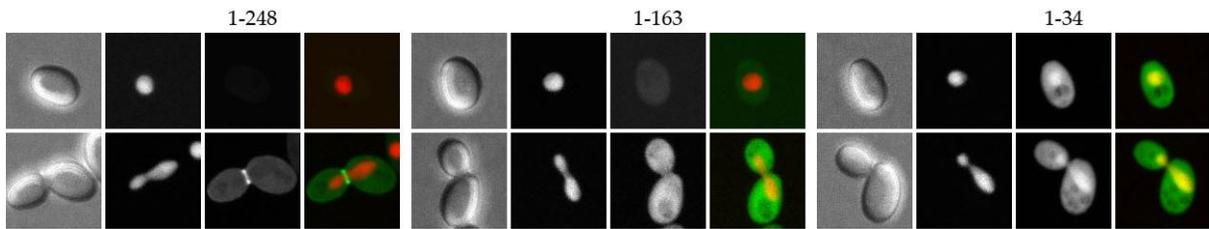
A



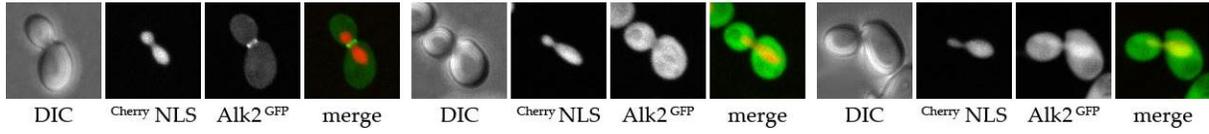
A-i



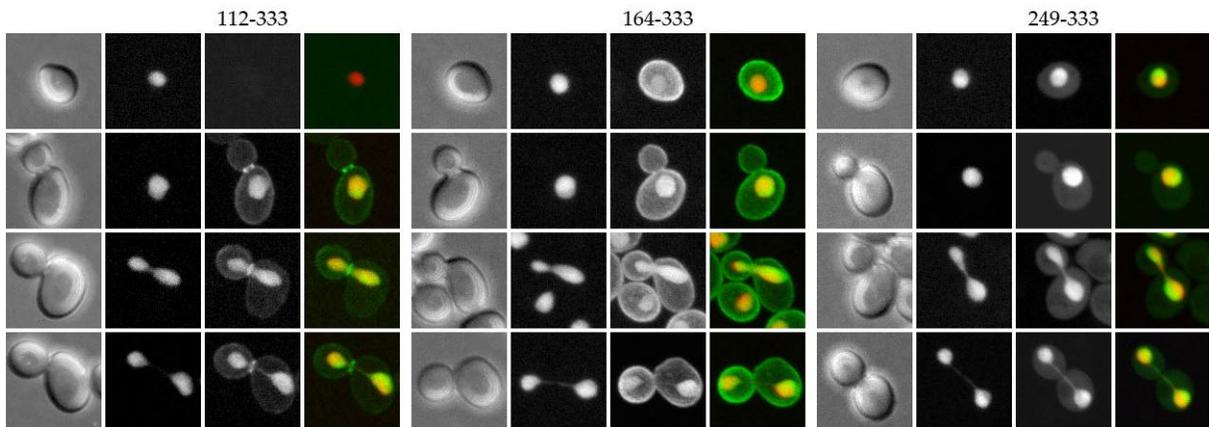
B



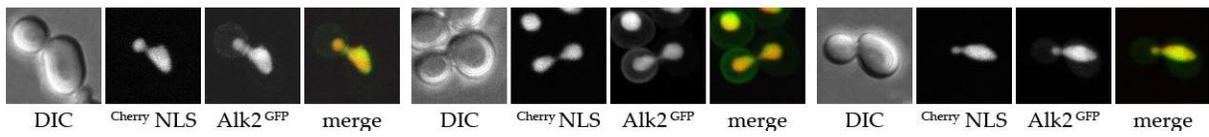
B-i



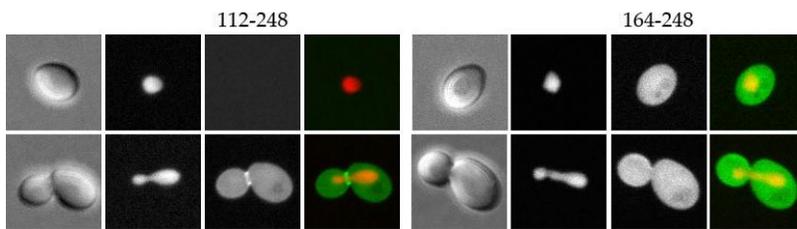
C



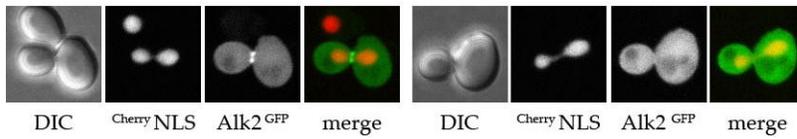
C-i

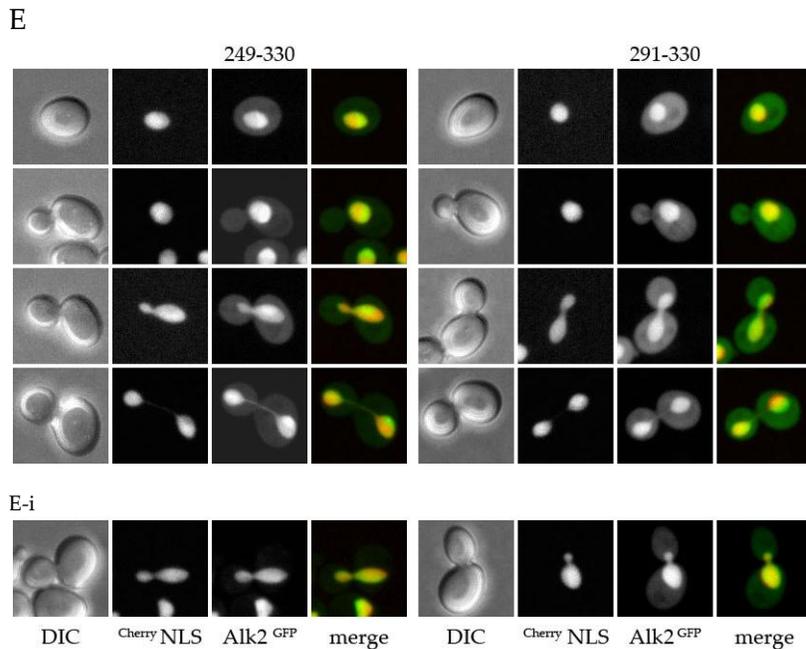


D



D-i





**Abbildung 4.8 Das Fehlen von *KIN4* beeinflusst die nukleäre, kortikale und zytoplasmatische Alk2-Lokalisation**

Die Zellen der Stämme (A) W12058 (*kin4Δ::kanMX4 ALK2::pTEF2-GFP-ALK2(1-676)-LEU2 his3-Δ1::pTEF2-CHERRY-SWI5-S/A-tCYC1-HIS3*), W12047 (*kin4Δ::kanMX4 pALK2-ALK2(1-676)-yEGFP-tADH1-CaURA3 his3-Δ1::pTEF2-CHERRY-SWI5-S/A-tCYC1-HIS3*) und der folgenden Stämme (gemeinsamer Genotyp: *kin4Δ::kanMX4 tCYC1::pTEF2-ALK2-Verkürzung-GFP-tCYC1-URA3 alk2Δ::natMX4 his3-Δ1::pTEF2-CHERRY-SWI5-S/A-tCYC1-HIS3*) wurden in der logarithmischen Wachstumsphase für die lebend-Zell-Mikroskopie vorbereitet und im konfokalen Mikroskop unter einem 0,75 % SD++ Agaroseblöckchen analysiert: (A) W12295 (*ALK2(1-333)*), (B) W12324 (*ALK2(1-248)*), W12293 (*ALK2(1-163)*), W12292 (*ALK2(1-34)*), (C) W12333 (*ALK2(112-333)*), W12323 (*ALK2(164-333)*), W12325 (*ALK2(249-333)*), (D) W12326 (*ALK2(112-248)*), W12338 (*ALK2(164-248)*), (E) W12327 (*ALK2(249-330)*) und W12334 (*ALK2(291-330)*). Eingesetzte Laserintensitäten: 488 nm-Laser Alk2<sup>GFP</sup> 25 %, 561 nm-Laser <sup>Cherry</sup>NLS 20 %. Die unter (A-E)-i aufgeführten Zellen stellen die entsprechenden Wildtyp-Stämme dar (Stammnamen siehe Abbildung 4.4)

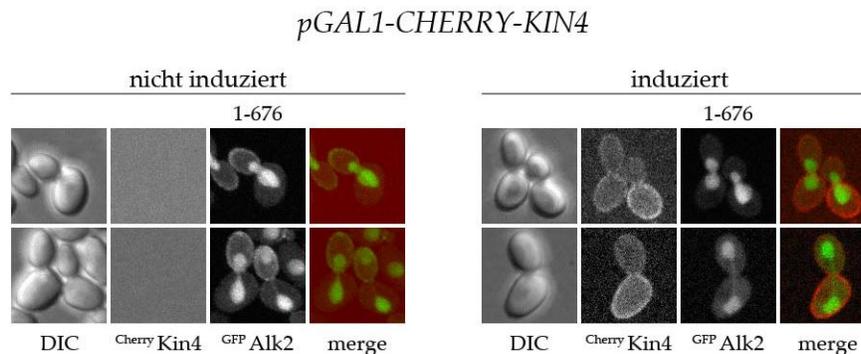
#### 4.2.4 Erhöhte Kin4-Mengen reduzieren Alk2-Kortexlokalisierung

Nachdem die Deletion von *KIN4* die Alk2-Lokalisation veränderte, war es von Interesse die Auswirkungen der Überexpression zu überprüfen. Ein bisher bekannter, in der Literatur beschriebener Phänotyp bei erhöhten Kin4-Mengen stellt der Arrest von Zellen in der Anaphase dar (D'Aquino et al., 2005). Grund für dieses Erscheinungsbild der Zellen ist die Inhibition des Austritts der Phosphatase Cdc14 aus dem Nukleolus, da der SPOC aktiviert ist.

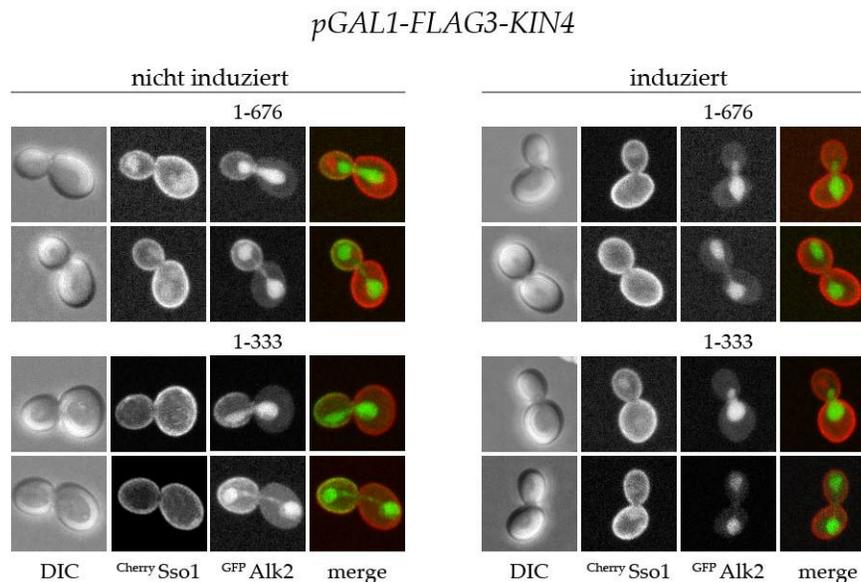
Zur Induktion der *KIN4*-Expression wurde das Gen unter die Kontrolle des regulierbaren *GAL1*-Promotors gestellt und N-terminal mit *CHERRY* bzw. mit dem *FLAG3*-Epitop versehen. Die Plasmide wurden über homologe Rekombination in das genomische *KIN4* integriert. Abbildung 4.9 A zeigt zunächst die Alk2-Lokalisation im uninduzierten Zustand, wobei neben dem starken nukleären, auch das kortikale Signal vorhanden war. Nach der *KIN4*-Induktion befand sich das

exprimierte <sup>Cherry</sup>Kin4 in beiden Zellkörpern. Auch unter diesen Bedingungen war die Spezifität der SPOC-Kinase für die Mutterzelle zu erkennen. Interessanterweise änderte sich das Lokalisationsmuster von Alk2 am Tochterkortex durch die erhöhten Kin4-Mengen. Das Haspin-Homologe war unter diesen Umständen exklusiv im Kern zu detektieren, während das kortikale Signal völlig fehlte (Abbildung 4.9 A). Zur verbesserten Darstellung wurden Kofärbungen mit dem Plasmamembran-Protein Sso1 durchgeführt. Durch die Überlagerungen der GFP-Signale von Alk2(1-676) bzw. Alk2(1-333) mit dem N-terminal markierten <sup>Cherry</sup>Sso1 wurde in den uninduzierten Zellen die verstärkte Lokalisation von Alk2 am Tochterkortex in der Anaphase nochmals verdeutlicht. Im induzierten Zustand konnte dort nur mehr das Kin4-Signal detektiert werden, was den Verlust der Alk2-Lokalisation widerspiegelt (Abbildung 4.9 B).

A



B



**Abbildung 4.9 Kortikales Alk2-Signal geht bei KIN4-Überexpression verloren**

Für die lebend-Zell-Mikroskopie wurden die Stämme **(A)** W12039 (*KIN4::pGAL1-CHERRY-KIN4-LEU2 ALK2::pTEF2-GFP-ALK2(1-676)-URA3*), **(B)** W12282 (*KIN4::pGAL1-FLAG3-KIN4-LEU2 ALK2::pTEF2-GFP-ALK2(1-676)-LEU2 SSO1::pTEF2-CHERRY-SSO1-URA3*) und W12283 (*KIN4::pGAL1-FLAG3-KIN4-LEU2 tCYC1::pTEF2-GFP-ALK2(1-333)-tCYC1-LEU2 alk2Δ::matMX4 SSO1::pTEF2-CHERRY-SSO1-URA3*) zunächst

## Ergebnisse

---

bei 25°C in Vollmedium mit 2 % Raffinose kultiviert. Ein Teil der uninduzierten Zellen wurde unter einem 0,75 % SD++ Agaroseblöckchen im inversen Mikroskop mit Hilfe eines *spinning-disk*-Systems analysiert. Eingesetzte Laserintensitäten: 488 nm-Laser 25 %, 561 nm-Laser <sup>Cherry</sup>Kin4 95 %, <sup>Cherry</sup>Sso1 100 %. Bei einer OD<sub>600</sub> = 0,3 wurde das restliche Medium mit 2 % Galaktose versetzt, um die Expression von Kin4 für 3 h durch den *GAL1*-Promotor zu induzieren. Die induzierten Zellen wurden unter einem 1 % SRG++ Agaroseblöckchen wie oben beschrieben mikroskopiert.

Die Ergebnisse zeigen, dass erhöhte Kin4-Mengen die kortikale Lokalisation von Alk2(1-676) und Alk2(1-333) beeinträchtigen. Aus diesen Beobachtungen heraus sollten nach *KIN4*-Überexpression die Regionen, in denen Kin4 auf Alk2 wirkt, mittels der Subfragmente genauer identifiziert werden. Die Stammherstellung erfolgte durch Kreuzung, um in den resultierenden Zellen nach *KIN4*-Überexpression die gleichen Mengen, sowie dieselbe Wirkung der SPOC-Kinase auf die unterschiedlichen Haspin-Konstrukte zu erzielen. Hierfür wurden Zellkulturen, die C-terminal GFP-markierte Haspin-Verkürzungen enthielten, mit einem Stamm gekreuzt, bei dem *KIN4* unter der Kontrolle des induzierbaren *GAL1*-Promotors stand.

Im uninduzierten bzw. induzierten Zustand zeigte das Fragment Alk2(1-333) dieselbe Lokalisation wie seine N-terminal mit GFP fusionierte Form (vgl. Abbildung 4.9). Zusätzlich zur Kernlokalisierung wurde hier bei erhöhten Kin4-Mengen Alk2(1-333) am Knospenhals detektiert. Die Beobachtung zeigt, dass nur die kortikale Alk2-Lokalisation von der SPOC-Kinase verändert wird, während das Signal am Mutter-Tochter-Übergang von Kin4 unbeeinträchtigt zu sein scheint.

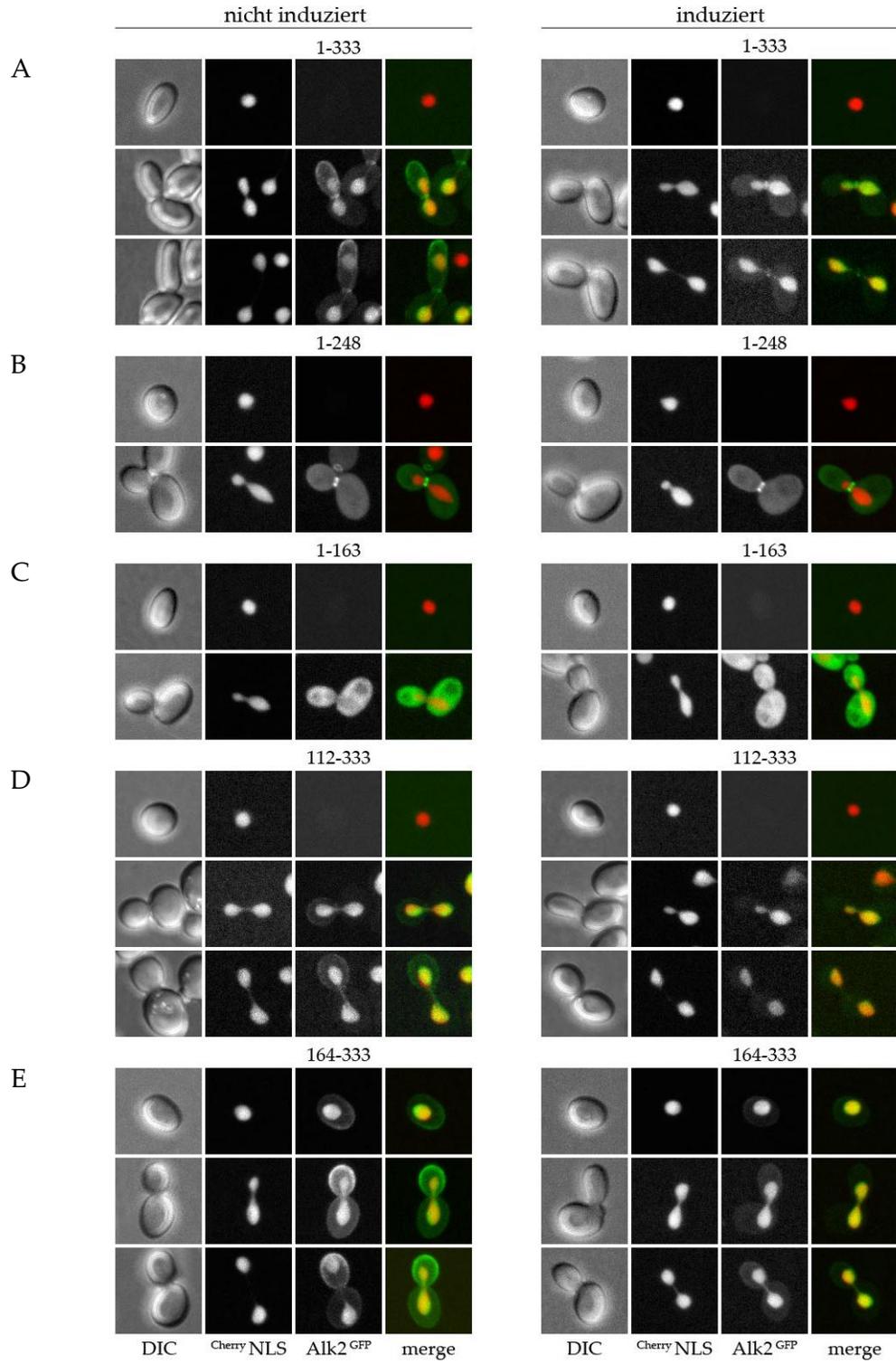
Die im Normalzustand am Kortex lokalisierenden Konstrukte Alk2(112-333) und Alk2(164-333) hatten nach *KIN4*-Überexpression kein kortikales Signal mehr. Wie bei Alk2(1-676) und dessen N-terminaler Domäne verblieb ausschließlich die Kernlokalisierung, wobei dieser Befund bei dem Signal-stärkeren Alk2(164-333) wesentlich deutlicher ausfiel (Abbildung 4.10 D, E).

Wie in Abbildung 4.10 durch die Subfragmente Alk2(249-333), Alk2(249-330) und Alk2(291-330) erkennbar ist, schien die Region der Aminosäuren 291-330 eine leichte Regulation durch die *KIN4*-Überexpression zu erfahren. Unter normalen Bedingungen befand sich bei den Konstrukten Alk2(249-333) bzw. Alk2(249-330) neben dem starken Kern-, ein schwaches Zytoplasma-Signal. Letzteres schien in dem kürzesten Fragment Alk2(291-330) noch stärker aufzutreten. Im induzierten Zustand von *KIN4* hingegen, reduzierte sich das Signal fast vollständig auf den Kern (Abbildung 4.10 F, I, J). Auch hier scheint, wie in den *kin4Δ*-Stämmen, die Region der Aminosäuren 291 bis 330 für Kin4 eine Rolle bei der zytoplasmatischen Alk2-Regulation zu spielen. Die Konstrukte Alk2(1-333), Alk2(112-333) und Alk2(164-333) beinhalteten zwar ebenso diese Region, jedoch war unter uninduzierten Bedingungen kein zytoplasmatisches Signal detektierbar, wodurch sich keine Schlüsse auf dieses Signal bei *KIN4*-Überexpression ziehen lassen.

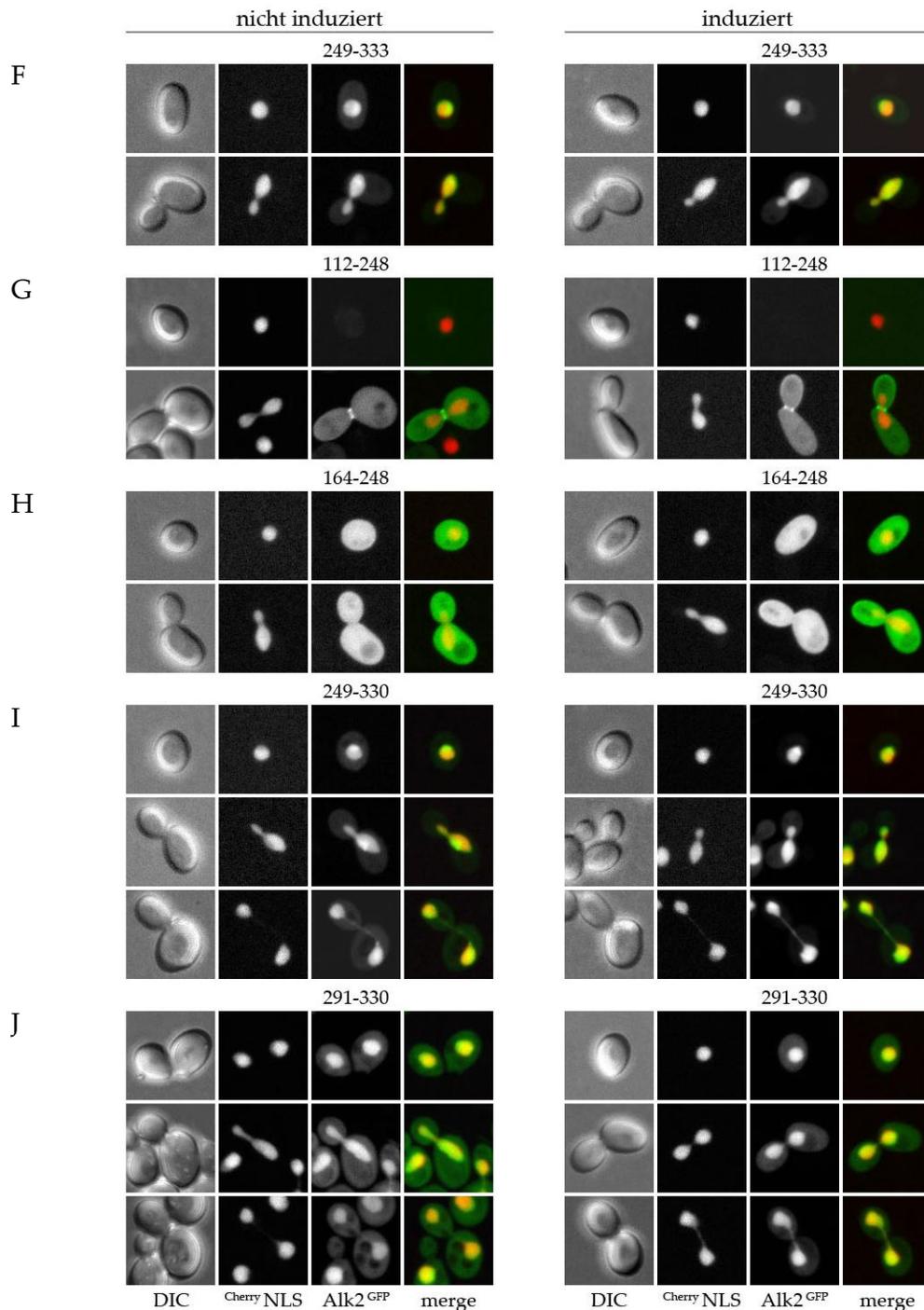
Erhöhte Mengen an Kin4 bewirkten bei den Verkürzungen Alk2(1-163) bzw. Alk2(164-248), die homogen im Zytoplasma lokalisierten, und bei Alk2(1-248) bzw. Alk2(112-248), die sich bevorzugt am Knospenhals und etwas im Zytoplasma befanden, keine räumlichen Veränderungen (Abbildung 4.10 C, H, B, G).

Alle Beobachtungen der Deletion bzw. der Überexpression von *KIN4* belegten, dass die nukleäre und kortikale Lokalisation von Alk2 im N-terminalen Bereich über die SPOC-Kinase reguliert wird. Bei den detaillierten Analysen mittels Subfragmenten zeigte sich, dass der Bereich 164 bis 333 für die Kin4-abhängige Regulation der kortikalen Alk2-Lokalisation wichtig ist. Jedoch könnte Kin4 auch regulatorisch auf zytoplasmatisches Alk2 über die Region 291 bis 330 wirken. Der Einfluss der SPOC-Kinase auf das Kernsignal des Haspin-Homologen scheint nicht direkt durch die Modifikation der NLS, sondern indirekt über die Aminosäuren 1 bis 112 vermittelt zu werden.

*pGAL1-FLAG3-KIN4*



*pGAL1-FLAG3-KIN4*



**Abbildung 4.10** Erhöhte Mengen an Kin4 bewirken den Verlust der kortikalen Alk2-Lokalisation

Für die lebend-Zell-Mikroskopie wurden Zellen der Stämme (gemeinsamer Genotyp: *KIN4::pGAL1-FLAG3-KIN4-LEU2 tCYC1::pTEF2-ALK2-Verkürzung-GFP-tCYC1-URA3 alk2Δ::natMX4 his3-Δ1::pTEF2-CHERRY-SWI5-S/A-tCYC1-HIS3*) **(A)** W12296 (*ALK2*(1-333)), **(B)** W12342 (*ALK2*(1-248)), **(C)** W12294 (*ALK2*(1-163)), **(D)** W12349 (*ALK2*(112-333)), **(E)** W12341 (*ALK2*(164-333)), **(F)** W12343 (*ALK2*(249-333)), **(G)** W12352 (*ALK2*(112-248)), **(H)** W12344 (*ALK2*(164-248)), **(I)** W12345 (*ALK2*(249-330)) und **(J)** W12346 (*ALK2*(291-330)) zunächst bei 25°C in Vollmedium mit 2 % Raffinose kultiviert. Ein Teil der uninduzierten Zellen wurde unter einem 0,75 % SD++ Agaroseblöckchen im inversen Mikroskop mit Hilfe eines *spinning-disk*-Systems

analysiert. Eingesetzte Laserintensitäten: 488 nm-Laser Alk2<sup>GFP</sup> 25 %, 561 nm-Laser <sup>Cherry</sup>NLS 20 %. Bei einer OD<sub>600</sub> = 0,3 wurde das restliche Medium mit 2 % Galaktose versetzt, um die Expression von Kin4 für 3 h durch den *GAL1*-Promotor zu induzieren. Die induzierten Zellen wurden unter einem 1 % SRG++ Agaroseblöckchen wie oben beschrieben mikroskopiert.

### 4.2.5 Kin4 beeinflusst Alk2-Modifikation

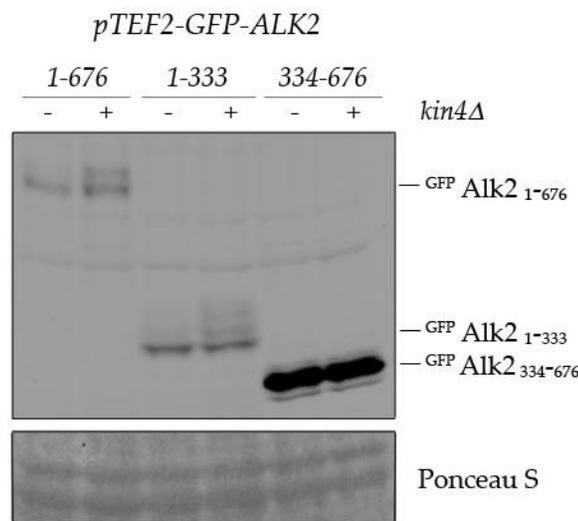
Bislang gibt es Belege dafür, dass die GAP-Untereinheit des SPOCs, Bfa1, ein Substrat von Kin4 ist und an S150 und S180 phosphoryliert wird (Maekawa et al., 2007). Die Resultate von Breitkreutz et al. (2010) bestätigten eine physische Wechselwirkung von Alk2 mit Kin4. Zudem zeigte sich eine Verbindung der beiden Proteine in den mikroskopischen Untersuchungen (siehe Kapitel 4.2.3), da die Proteinkinase Kin4 sowohl die nukleäre, als auch die kortikale Lokalisation von Alk2 regulierte. Aus diesen Gründen stellte sich einerseits die Frage, ob Alk2 auch ein direktes Substrat von Kin4 ist. Sollte dies der Fall sein, wäre eine verringerte Modifikation von Alk2 in Kin4-Abwesenheit zu erwarten. Andererseits galt es zu überprüfen, ob quantitative Veränderungen der SPOC-Kinase die Mengen von Alk2 beeinflussen. Letzteres war das Resultat der mikroskopischen Beobachtung, dass die Konstrukte Alk2(1-676) und Alk2(1-333) in *kin4Δ*-Stämmen massiv schwächere Kernsignale im Vergleich zum Wildtyp aufwiesen. Um diesen Fragestellungen nachzugehen, wurden in der Western-Blot-Analyse N-terminal GFP-markiertes Alk2 und dessen N- bzw. C-terminale Domäne in Wildtyp-Stämmen und *KIN4*-Deletionsmutanten nachgewiesen.

In Abbildung 4.11 ist zu erkennen, dass die Abwesenheit von Kin4 die Mengen der unmodifizierten Form von Alk2 und dessen Verkürzungen nicht beeinträchtigte. Der C-terminale Bereich unterschied sich in seiner Intensität von den beiden anderen Fragmenten, was auf die fehlenden Abbaumotive im N-terminalen Bereich und der damit unterbliebenen Degradation zurückzuführen ist. Unerwarteterweise konnte in *kin4Δ*-Stämmen über der normalen, unmodifizierten Bande des vollständigen und N-terminalen Alk2-Fragments eine zusätzliche, höher laufende Modifikation detektiert werden. Diese war in dem C-terminalen, katalytisch-wirkenden Konstrukt nicht vorhanden. Zum Einen kann aus den Resultaten der Western-Blot-Analyse geschlossen werden, dass die N-terminale Region des Haspin-Homologen Alk2 für die nachweisbaren Modifikationen verantwortlich ist. Zum Anderen kann aus den Mobilitätsanalysen gefolgert werden, dass kein direkter physischer Zusammenhang zwischen Kin4 und dem N-terminalen Bereich von Alk2 besteht. Dieser Einfluss scheint eher indirekt über ein weiteres Protein zu verlaufen, welches in *KIN4*-Abwesenheit hyperaktiv ist. Trotz allem schließt diese Beobachtung eine Kin4-Phosphorylierung an Alk2 nicht komplett aus. Denn Kin4 könnte durch einen mäßigen Phosphorylierungsgrad an Alk2 bestimmte Modifikationsstellen maskieren und für andere Proteine unzugänglich machen. In Kin4-

## Ergebnisse

Abwesenheit hingegen, sind diese ungetarnt und können (hyper-) modifiziert werden.

In einer weiteren Western-Blot-Analyse wurde überprüft, ob Alk1 die Kinase darstellt, die in Kin4-Abwesenheit zu einer verstärkten Alk2-Modifikation führt. Hierfür wurden durch Kreuzung Stämme generiert, die sowohl *KIN4* als auch *ALK1* deletiert hatten und konstitutiv *Myc<sup>3</sup>Alk2* exprimierten. Jedoch war in den Doppelmutanten *kin4Δ alk1Δ* keine verringerte Phosphorylierung von Alk2 im Vergleich zur *ALK1*-Wildtyp-Situation zu erkennen. Dieses Ergebnis deutete darauf hin, dass nicht Alk1 für diese zusätzlichen, höher laufenden Banden verantwortlich ist, sondern ein anderes modifizierendes Protein. Unter Wildtyp-Bedingungen scheint dieses Protein von Kin4 in seiner phosphorylierenden Aktivität an Alk2 inhibiert zu werden (Daten nicht gezeigt).



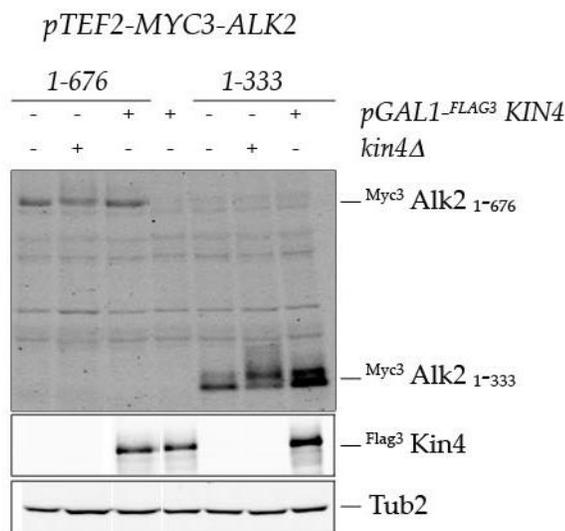
**Abbildung 4.11 Der N-terminale Bereich von Alk2 wird in Kin4-Abwesenheit stärker modifiziert**

Die Stämme W10797 (*ALK2::pTEF2-GFP-ALK2(1-676)-LEU2*), W11700 (*kin4Δ::kanMX4 ALK2::pTEF2-GFP-ALK2(1-676)-LEU2*), W11338 (*tCYC1::pTEF2-GFP-ALK2(1-333)-tCYC1-LEU2 alk2Δ::natMX4*), W11520 (*kin4Δ::kanMX4 tCYC1::pTEF2-GFP-ALK2(1-333)-tCYC1-LEU2 alk2Δ::natMX4*), W11339 (*alk2::pTEF2-GFP-ALK2(334-676)-LEU2*) und W11514 (*kin4Δ::kanMX4 alk2::pTEF2-GFP-ALK2(334-676)-LEU2*) wurden bei 25°C in XYD-Medium kultiviert und in der logarithmischen Wachstumsphase bei einer  $OD_{600} = 0,8$  für die Western-Blot-Analyse aufgearbeitet. Der Nachweis der GFP-fusionierten Haspin-Derivate erfolgte mit dem GFP-Antikörper. Die gleichmäßige Beladung des SDS-Gels wurde durch eine Färbung der Membran mit Ponceau S kontrolliert.

Des Weiteren wurde proteinanalytisch auch der Einfluss der *KIN4*-Überexpression bzw. des Kin4-Verlusts auf Alk2 und dessen N-terminaler Domäne untersucht. Hierfür wurde Alk2(1-676) bzw. Alk2(1-333) über Klonierung unter die Kontrolle des *TEF2*-Promotors gestellt und gleichzeitig am N-Terminus mit dem Myc-Epitop markiert. Nach der homologen Rekombination in den *CYC1*-Terminator erfolgte die Kreuzung mit den entsprechenden Kin4-Stämmen.

## Ergebnisse

Die semiquantitative Analyse zeigte, dass im Wildtyp-Zustand Alk2(1-676) eine schwache Bande und eine zusätzlich kaum sichtbare, langsamer laufende aufwies. Letztere könnte auf die autophosphorylierende Aktivität von Alk2 zurückzuführen sein, da von dem Haspin-Homologen bekannt ist, dass es *in vitro* als auch *in vivo* Autophosphorylierung zeigt (Diergardt, 2007; Kiener, 2011). Vergleichbar mit dem GFP-fusionierten Alk2-Konstrukt (Abbildung 4.11) lieferte die Abwesenheit von Kin4 auch hier zusätzliche, höher laufende Banden, die für eine verstärkte Modifikation sprechen. Das Alk2-Signal bei Überexpression von *KIN4* ähnelte sehr stark der Wildtyp-Situation, wobei die unmodifizierte Bande etwas intensiver erschien. Von der N-terminalen Alk2-Domäne wurden deutlichere Banden detektiert. Unter normalen Bedingungen zeigte das Alk2(1-333) Fragment, das keine Proteinkinase-Domäne enthält, eine höhere molekulare Bande. Diese Beobachtung spricht aufgrund der fehlenden Möglichkeit der Autophosphorylierung dafür, dass Alk2 am N-terminalen Ende von einem bislang unbekanntem Protein modifiziert wird. In *kin4Δ*-Stämmen nahm die Signalstärke der unmodifizierten Bande von Alk2 ab, während die der modifizierten im Vergleich zum Wildtyp anstieg (vgl. Abbildung 4.11). Die Überexpression von *KIN4* erzeugte eine Signalzunahme von beiden Banden. Die Stabilisierung von Alk2 ist vermutlich die Konsequenz des Anaphase-Arrests, der durch die SPOC-Kinase erzeugt wurde. Wie schon eingangs (siehe Kapitel 4.2.4) erwähnt, inhibiert Kin4 den Austritt von Cdc14 aus dem Nukleolus und folglich die APC/C-abhängige Degradation. Da das Haspin-Homologe Alk2 aus diesem Grund wahrscheinlich nicht abgebaut werden konnte, akkumulierte im selben Verhältnis wie im Wildtyp sowohl dessen unmodifizierte als auch dessen modifizierte Form.



**Abbildung 4.12 Erhöhte Kin4-Mengen bewirken eine Zunahme des Alk2-Signals**

Die Stämme W11107 (*ALK2::pTEF2-MYC3-ALK2(1-676)-LEU2*), W11498 (*kin4Δ::kanMX4 ALK2::pTEF2-MYC3-ALK2(1-676)-LEU2*), W11901 (*KIN4::pGAL1-FLAG3-KIN4-LEU2 ALK2::pTEF2-MYC3-ALK2(1-676)-LEU2*), W11873 (*KIN4::pGAL1-FLAG3-KIN4-LEU2*), W12271 (*tCYC1::pTEF2-MYC3-ALK2(1-333)-tCYC1-*

LEU2 *alk2Δ::natMX4*), W11907 (*kin4Δ::kanMX4 tCYC1::pTEF2-MYC3-ALK2(1-333)-tCYC1-LEU2 alk2Δ::natMX4*) und W12272 (*KIN4::pGAL1-FLAG3-KIN4-LEU2 tCYC1::pTEF2-MYC3-ALK2(1-333)-tCYC1-LEU2 alk2Δ::natMX4*) wurden bei 25°C in XYR-Medium kultiviert. Bei einer OD<sub>600</sub> = 0,3 wurde das Medium mit 2 % Galaktose versetzt, um die Expression von Kin4 für 3 h durch den *GAL1*-Promotor zu induzieren. In der Western-Blot-Analyse erfolgte der Nachweis von Myc3Alk2(1-676) bzw. Myc3Alk2(1-333) mit dem Antikörper 9E10 und von Flag3Kin4 mit dem Antikörper M2 (α-FLAG). Als Ladekontrolle diente Tubulin, das durch den α-Tub2-Antikörper sichtbar gemacht wurde.

## 4.3 Haspin-Proteine sind Regulatoren der Zellpolarität

### 4.3.1 Verlust von Haspin-Proteinen verstärkt Zellpolarität

Die Deletion von Genen stellt ein hilfreiches Mittel dar, um funktionelle Aspekte von Proteinen studieren zu können. In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die Haspin-Einzelmutanten *alk1Δ* und *alk2Δ* als auch die Doppelmutante *alk1Δ alk2Δ* keine sichtbaren Beeinträchtigungen im Wachstumsverhalten haben. Zudem wiesen sie bei durchflusszytometrischen Analysen ein dem Wildtyp vergleichbares DNA-Profil auf (Diergardt, 2007; Swoboda, 2008), was für eine normale Dauer der Zellzyklus-Phasen spricht. Des Weiteren zeigte sich bei mikroskopischen Untersuchungen in der logarithmischen Wachstumsphase eine normale Zellmorphologie. In dieser Arbeit war es von Interesse die Funktion der Haspin-Homologen in der Metaphase, dem Zeitpunkt ihrer maximalen Expression, näher zu charakterisieren. Die Überlegung war, dass ein Verlust in dieser, für Haspin wichtigen Phase eher zu einem ausgeprägteren Phänotyp führt als in asynchroner Kultur. Der Arrest der Zellen in der Metaphase wurde durch die Repression des *GALL*-Promotors, der *CDC20* unter seiner Kontrolle hatte, bewerkstelligt.

#### 4.3.1.1 *alk2Δ*-Mutante repolarisiert Komponenten des Zellwachstums

Um mehr über die Funktion von den beiden Haspin-Homologen Alk1 und Alk2 zu erfahren, wurden Stämme generiert, die durch Kreuzung aus den Einzelmutanten und einem in Metaphase-arretierbaren Stamm (*pGALL-CDC20*) entstanden. Die resultierenden Stämme wurden anschließend durch die Färbung des Aktin-Zytoskeletts und das Einbringen von GFP-markierten Proteinen der Polaritätsmaschinerie analysiert.

Wie in Abbildung 4.13 (linke Spalte) zu sehen ist, zeigte der Wildtyp den von ihm erwarteten Phänotyp in der Metaphase. Die Morphologie wies zwei in etwa gleich große Zellkörper auf, bei denen die Aktin-Patches und -Kabel, wie aus der Aktinfärbung hervorging, homogen verteilt waren. Zudem zeigte die Visualisierung der β-Glukansynthase Fks1, ein Protein, das als Zellwachstumsmarker diente, aufgrund seiner Abwesenheit, dass das Wachstum der Tochterzelle beendet war. Des Weiteren waren die GFP-markierten Proteine des Polarisoms, wie Bni1 oder Spa2, und der Polaritätsmaschinerie, wie Bem1 und Cdc24, homogen in beiden

Zellkörpern verteilt. Dieses Muster spricht dafür, dass die Zellen das isotrope Wachstum der Knospe beendet haben, da die Asymmetrie der Mutter-Tochterzelle, aufgrund der gleichmäßigen Verteilung von filamentösem Aktin und den Polaritätskomponenten, aufgehoben wurde. Die *alk1Δ*-Mutante zeigte keine beobachtbaren Unterschiede zum Wildtyp (Daten nicht gezeigt). Jedoch wies die *alk2Δ*-Mutante einen charakteristischen Phänotyp in der Metaphase auf. Diese Zellen bildeten schlauchförmige Auswüchse, bei denen das Aktin-Zytoskelett an der Spitze konzentriert war. Die detektierten Aktin-Kabel richteten sich in diese Richtung aus (Abbildung 4.13 A). An dieser Stelle zeigte GFP-markiertes Fks1 ein intensives Signal, welches auf ein verstärktes, andauerndes Wachstum hinwies. Zudem war eine Konzentration der Proteine, Bni1, Spa2, Bem1 und Cdc24 zu erkennen. Interessanterweise lokalisierte der Septinring, dessen Assemblierung eines der frühesten Ereignisse im Zellzyklus darstellt, ausschließlich am Knospenhals und eine erneute Ausbildung blieb aus (Abbildung 4.13 B). Diese Beobachtung verdeutlicht, dass der Auswuchs keine echte neue Tochterzelle darstellt, da die Septinring-Assemblierung essentiell für die erneute Knospenausbildung ist.

Die quantitative Auswertung in Abbildung 4.13 C stellt die Häufigkeit einer solchen Auswölbung bzw. des verstärkten Wachstums im Wildtyp und den beiden Einzelmutanten dar. Als Marker diente das GFP-Signal der  $\beta$ -Glukansynthase. Dabei wird verdeutlicht, dass dieser Phänotyp, der in ca. 40 % der Zellen auftrat, für die Deletion des *ALK2*-Gens charakteristisch ist, denn weder der Wildtyp noch die *alk1Δ*-Mutante wiesen eine anormale Zellmorphologie in Metaphase auf.

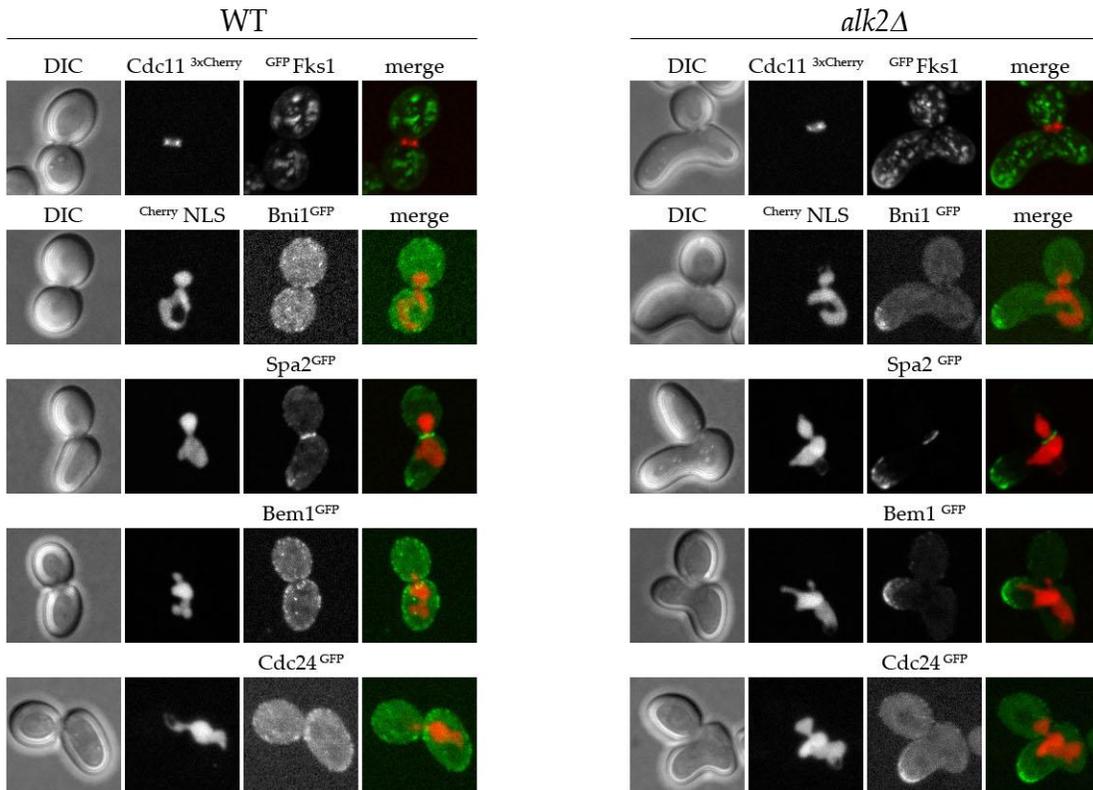
Diese Auswölbung wurde stets neben der alten Knospe initiiert. Dabei stellte sich die Frage, ob dieser Auswuchs aus der Mutter- oder aus der Tochterzelle entsteht. Hierfür wurde im Mikroskop der Verlauf eines Metaphase-Arrests in einem *alk2Δ*-Stamm, der ein GFP-fusioniertes Fks1 trug, verfolgt. Das Ergebnis der Zeitraffer-Aufnahmen war, dass der Auswuchs keine Spezifität für einen Zellkörper hat. Denn, wie aus der linken Abbildung 4.13 D hervorgeht, wuchs hier die Mutterzelle weiter, während auf der rechten Seite die Tochterzelle den Auswuchs bildete.

Das Haspin-Homologe Alk2 scheint, aus diesen Beobachtungen heraus, die Assemblierung der Polaritätskomponenten bzw. deren Aktivitätszustand zu inhibieren, um dem polaren Wachstum entgegenzuwirken. Gemäß dieser Überlegung kommt es bei der Abwesenheit von Alk2 zum repolarisierten Zellwachstum.

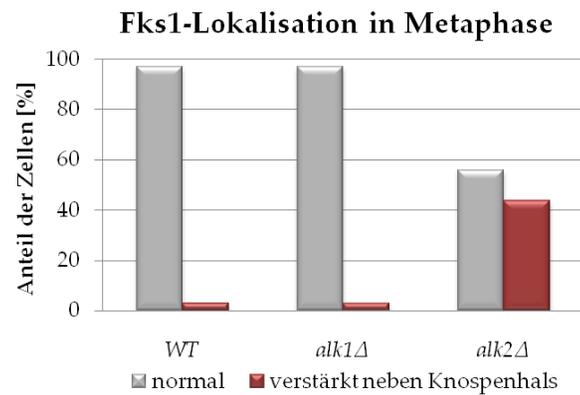
A



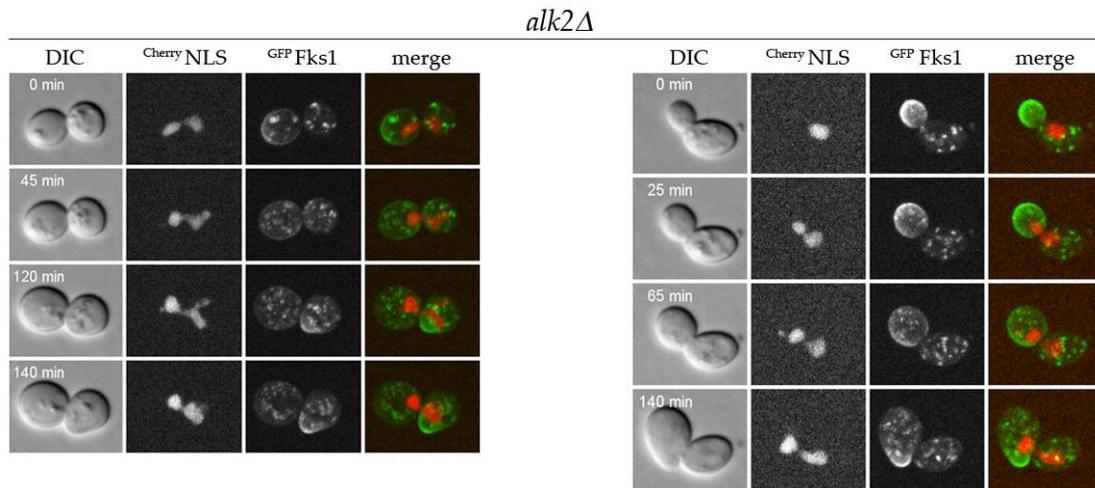
B



C



D



**Abbildung 4.13 *alk2Δ*-Mutanten repolarisieren Komponenten des Zellwachstums**

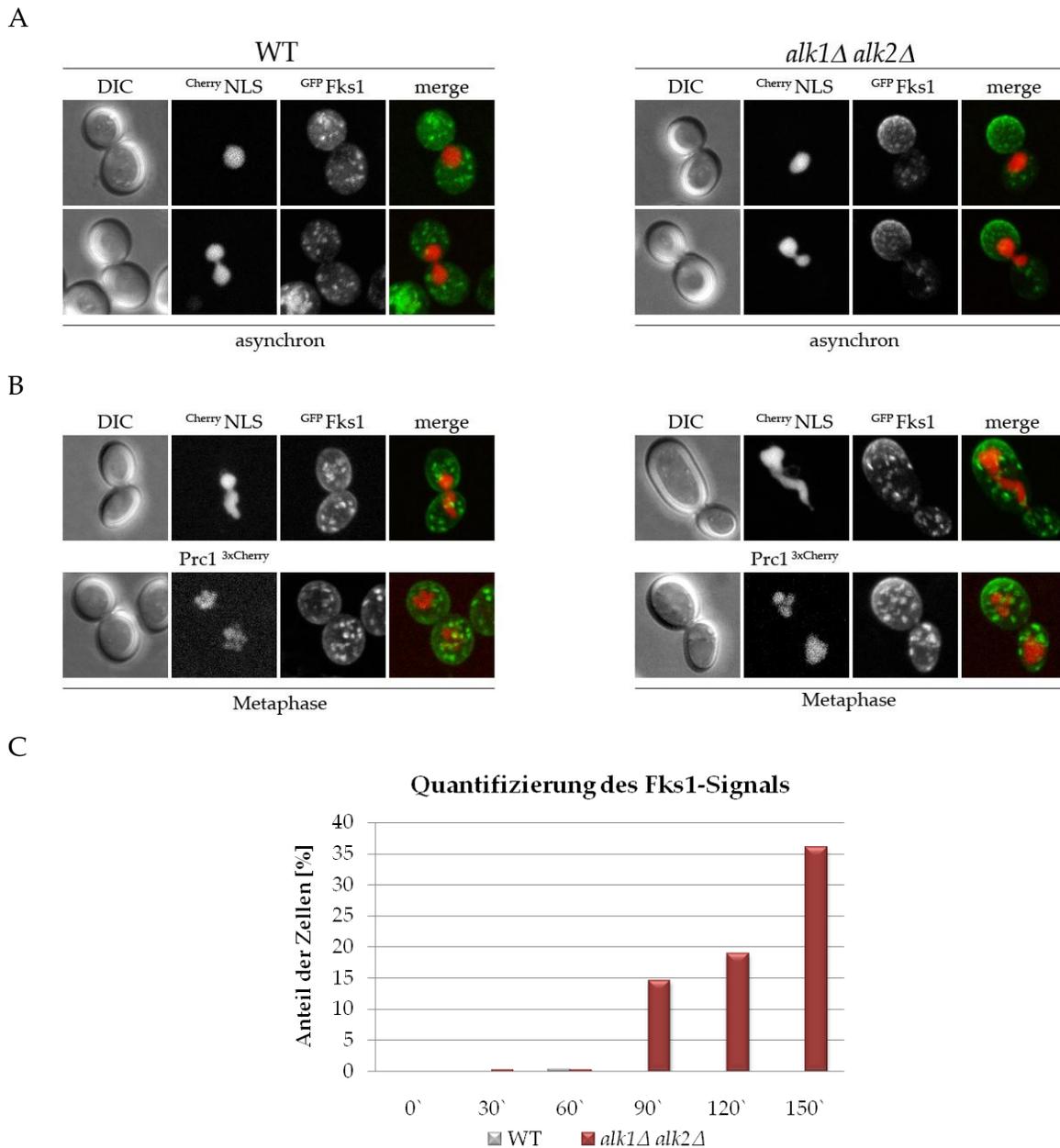
(A) Asynchron in XYRG-Medium wachsende Zellen der Stämme W9145 (*natNT2-pGALL-CDC20*) und W10620 (*alk2Δ::HIS3MX6 natNT2-pGALL-CDC20*) wurden zur Repression des *GALL*-Promotors in XYD-Medium überführt und für 3 h in Metaphase durch den Verlust von Cdc20 arretiert. Anschließend erfolgten die Fixierung mit Formaldehyd und die Färbung der Aktin-Strukturen mittels FITC-gekoppelten Phalloidin. Für die Analyse im Mikroskop wurden zur Probenfixierung Wasseragaroseblöckchen ohne Zucker verwendet. Eingesetzte Laserintensität: 488 nm-Laser 100 %. (B) Zellen der Stämme W12049 (*fks1::pFKS1-GFP-FKS1-URA3 CDC11::CDC11-3xCHERRY-LEU2 natNT2-pGALL-CDC20*), W12050 (*alk2Δ::natMX4 fks1::pFKS1-GFP-FKS1-URA3 CDC11::CDC11-3xCHERRY-LEU2 natNT2-pGALL-CDC20*) und der folgenden Stämme (gemeinsamer Genotyp: *his3-Δ1::pTEF2-CHERRY-SWI5-S/A-tCYC1-HIS3 natNT2-pGALL-CDC20*) wurden wie unter (A) beschrieben in Metaphase arretiert: W11248 (*BNI1-yEGFP-tADH1-CaURA3*), W11324 (*alk2Δ::natMX4 BNI1-yEGFP-tADH1-CaURA3*), W11249 (*SPA2-yEGFP-tADH1-CaURA3*), W12052 (*alk2Δ::natMX4 SPA2-yEGFP-tADH1-CaURA3*), W12034 (*BEM1-yEGFP-tADH1-SpHIS5*), W11914 (*alk2Δ::natMX4 BEM1-yEGFP-tADH1-SpHIS5*), W12035 (*CDC24-yEGFP-tADH1-SpHIS5*) und W11917 (*alk2Δ::natMX4 CDC24-yEGFP-tADH1-SpHIS5*). Für die Analyse im konfokalen Mikroskop wurden die Zellen unter 0,75 % SD++ Agaroseblöckchen positioniert. Eingesetzte Laserintensitäten: 488 nm-Laser variierte entsprechend dem Protein: <sup>GFP</sup>Fks1 45 %, Bni1<sup>GFP</sup> 100 %, Spa2<sup>GFP</sup> 86 %, Bem1<sup>GFP</sup> 86 %, Cdc24<sup>GFP</sup> 86 %; 561 nm-Laser Cdc11<sup>3xCherry</sup> 100 %, <sup>Cherry</sup>NLS 20 %. (C) Zellen der Stämme (gemeinsamer Genotyp: *fks1::pFKS1-GFP-FKS1-URA3 natNT2-pGALL-CDC20*) W9399 (WT), W10357 (*alk1Δ::natMX4*) und W10358 (*alk2Δ::natMX4*) wurden wie unter (A) beschrieben in Metaphase arretiert. Anhand des <sup>GFP</sup>Fks1-Signals wurden Rückschlüsse auf ein verstärktes Wachstum der Zellen gezogen. Insgesamt wurden 150 Zellen pro Stamm ausgezählt. (D) Der Stamm W10627 (*alk2Δ::natMX4 fks1::pFKS1-GFP-FKS1-URA3 his3-Δ1::pTEF2-CHERRY-SWI5-S/A-tCYC1-HIS3 natNT2-pGALL-CDC20*) wurde in der logarithmischen Wachstumsphase von XYRG- in XYD-Flüssigmedium überführt und zur anfänglichen Repression des *GALL*-Promotors für 70 min darin inkubiert. Anschließend wurden die Zellen unter 0,75 % SD++ Agaroseblöckchen mikroskopiert. Eingesetzte Laserintensitäten: 488 nm- bzw. 561 nm-Laser 8 %. Die Zeitraffer-Aufnahmen entstanden im Abstand von 5 min.

#### 4.3.1.2 *alk1Δ alk2Δ*-Mutanten zeigen prolongiertes Wachstum

Nachdem die Deletion von *ALK2* zu einem Phänotyp in der Metaphase führte, stellte sich die

Frage, ob eine simultane Abwesenheit beider Haspin-Homologen einen ähnlichen oder womöglich einen eigenen Phänotyp aufweist. Für eine nähere Charakterisierung wurde die Haspin-Doppelmutante zur Visualisierung der Zellwand mit der GFP-markierten  $\beta$ -Glukansynthase ausgestattet. Neben dieser Fluoreszenzmarkierung trugen die Stämme zur Einordnung in die entsprechende Zellzyklusphase bzw. zur Arrest-Kontrolle den Kernmarker <sup>Cherry</sup>NLS. Eine erste Einschätzung der Haspin-Doppelmutante im Mikroskop konnte schon in der unarretierten, logarithmisch wachsenden Kultur gemacht werden. Wie in Abbildung 4.14 A zu erkennen ist, zeigte die Mutante ein intensives, kortikales Fks1-Signal in Metaphase, das bis zum Ende der Anaphase aufrecht erhalten blieb. Der Wildtyp hingegen, wies schon zum Teil in der Metaphase ein recht homogenes Signal auf, welches kurze Zeit später komplett abwesend war. Dieses Verteilungsmuster änderte sich kaum in Metaphase-arretierten Zellen beider Stämme (Abbildung 4.14 B). Wie auch schon in Kapitel 4.3.1.1 erwähnt, war der Zellwachstumsmarker Fks1 in Metaphase-arretierten Wildtypzellen kaum mehr am Kortex der Tochterzelle zu sehen. Jedoch zeigte die Doppelmutante eine für sich spezifische Zellmorphologie, die letztendlich das Resultat des Bildes der asynchronen Kultur widerspiegelte: diese Zellen wiesen in Metaphase einen riesigen Tochterzellkörper mit starkem Fks1-Signal und eine verkümmerte Mutterzelle auf. Der Kern war vollständig in das Kompartiment der Tochter gewandert. Des Weiteren deuteten die Beobachtungen des Vakuolenmarkers Prc1 darauf hin, dass die Vitalität des mütterlichen Zellkörpers der Haspin-Doppelmutante reduziert war. In beiden Zellkompartimenten zeigte der unbeeinträchtigte Wildtyp die Vakuole als eine wolkige Ansammlung von Organellen (Conradt et al., 1992). Im Gegensatz dazu, war in der Haspin-Doppelmutante die Vakuole der Tochterzelle strukturell zwar normal, in der Mutterzelle fusionierten hingegen die wolkigen Vakuolenvesikel zu einem Agglomerat, was mit einer hohen Abbaurate einhergehen könnte. Normalerweise beträgt die Vakuole ein Viertel des Zellvolumens (Wada et al., 1990), jedoch bestand die Mutterzelle aufgrund ihrer geringen Zellausmaße fast ausschließlich aus dieser Organelle.

In Abbildung 4.14 C wurde der zeitliche Verlauf eines Metaphase-Arrests in Zellen des Wildtyps und der Haspin-Doppelmutante verfolgt, wobei das Zellwachstum über das Fks1-Signal am Tochterkortex untersucht wurde. Dabei zeigte sich in beiden Stämmen, dass mit zunehmender Zeit die Anzahl der Metaphase-arretierten Zellen kontinuierlich anstieg. Ein überdurchschnittlich andauerndes Fks1-Signal und damit resultierendes Wachstum war jedoch nur in der Haspin-Doppelmutante zu detektieren. Auch nach einem 3 stündigen Metaphase-Arrest lagen alle Wildtypzellen mit zwei in etwa gleich großen Zellkörpern vor und keine zeigte ein solches, prolongiertes Signal.



**Abbildung 4.14 Die Abwesenheit beider Haspin-Proteine verursacht ein länger andauerndes Wachstum**

Zellen der Stämme (A) W9405 (*fks1::pFKS1-GFP-FKS1-URA3 pTEF2-CHERRY-SWI5-S/A-tCYC1-HIS3*) und W9406 (*alk1Δ::URA3 alk2Δ::natMX4 fks1::pFKS1-GFP-FKS1-URA3 pTEF2-CHERRY-SWI5-S/A-tCYC1-HIS3*) wurden in der logarithmischen Wachstumsphase für die lebend-Zell-Mikroskopie vorbereitet und im konfokalen Mikroskop unter einem 0,75 % SD++ Agaroseblöckchen analysiert. Eingesetzte Laserintensitäten: 488 nm-Laser <sup>GFP</sup>FKS1 25 %, 561 nm-Laser <sup>Cherry</sup>NLS 20 %. (B) Zur Repression des *GALL*-Promotors wurden die bei 25°C in XYRG-Medium wachsenden Stämme (gemeinsamer Genotyp: *fks1::pFKS1-GFP-FKS1-URA3 natNT2-pGALL-CDC20*) W9401 (*pTEF2-CHERRY-SWI5-S/A-tCYC1-HIS3*), W9402 (*alk1Δ::URA3 alk2Δ::natMX4 pTEF2-CHERRY-SWI5-S/A-tCYC1-HIS3*), W11523 (*prc1::PRC1-3xCHERRY-tCYC1-LEU2*) und W11524 (*alk1Δ::URA3 alk2Δ::natMX4 prc1::PRC1-3xCHERRY-tCYC1-LEU2*) bei einer OD<sub>600</sub> = 0,4 in XYD-Medium überführt, 3 h in Metaphase arretiert und im Mikroskop wie unter (A) beschrieben untersucht. 488 nm-Laser bei Prc1<sup>3xCherry</sup> 100 %.(C) Im Verlauf des Metaphase-Arrests

wurden zu den angegebenen Zeiten Proben von W9401 und W9402 für die mikroskopische, quantitative Auswertung entnommen. Zellen, die sich in der späten Metaphase befanden und eine große Tochterzelle aufwiesen, wurden hinsichtlich ihres kortikalen Fks1-Signals ausgezählt. Dabei wurde zwischen normalen Zellen, die kein Fks1-Signal mehr hatten, und Zellen, bei denen ein überdurchschnittlich langes Fks1-Signal zu detektieren war, unterschieden. Pro Stamm und Zeitpunkt wurden 300 Zellen ausgewertet. Mikroskopische Aufarbeitung und Bedingungen der Stämme siehe (A).

### 4.3.1.3 *alk1Δ alk2Δ*-Phänotyp benötigt Aktin-Zytoskelett

Die Entwicklung der Zellmorphologie hängt maßgeblich von dem Aktin-Zytoskelett ab (Lee et al., 2005; Lew, 2003). Für die Etablierung, Organisation und Aufrechterhaltung dieser Zellstruktur sind – neben den hierfür essentiellen Forminen Bni1 und Bnr1 - Komponenten wie das Fimbrin Sac6 und das Aktin- und Formin-interagierende Protein Bud6 nötig. Im Detail unterstützt Sac6 durch seine Aktin-bündelnde Aktivität die filamentösen Aktin-Strukturen, während Bud6 zur Kabel-Nukleation dieses Zytoskeletts durch das Formin Bni1 beiträgt. Es konnte bestätigt werden, dass die Abwesenheit von Bud6 zu einem starken Verlust der Aktin-Kabel führt (Amberg et al., 1997; Graziano et al., 2011). Um den Einfluss des Aktin-Zytoskeletts auf die Morphologie der Haspin-Doppelmutante zu überprüfen, wurden zum Einen die Deletionen von *ALK1* und *ALK2* mit der von *BUD6* durch Kreuzung kombiniert. Anschließend wurden mikroskopisch die Aktin-Strukturen der Dreifachmutante über Alexa488-gekoppeltes Phalloidin im Metaphase-Arrest analysiert. Zum Anderen wurde das Aktin-Zytoskelett von Zellen des Wildtyps und der Doppelmutante nach Behandlung mit dem Aktin-depolymerisierenden Agens Latrunculin B betrachtet.

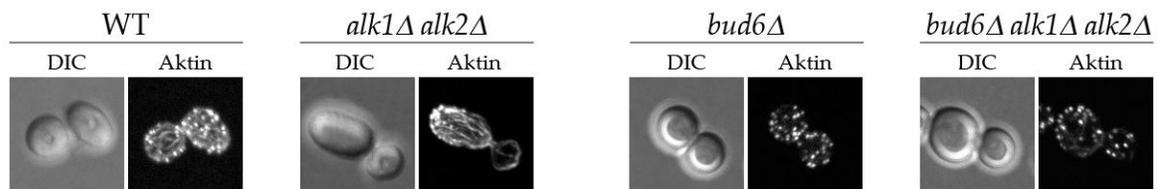
Wie aus Abbildung 4.15 hervorgeht, zeigte der Wildtyp in Metaphase ein homogen verteiltes Muster von Aktin-Patches bzw. -Kabeln. Die Haspin-Doppelmutante beinhaltete beinahe das komplette Aktin-Zytoskelett in der Tochterzelle, wohingegen die Mutter fast keine dieser Strukturen aufwies. Am Kortex der Tochter lokalisierten hauptsächlich die Patches, die von einem stark ausgeprägten und ausgerichteten Aktin-Kabel-Netzwerk umgeben waren. Im Vergleich dazu wurden bei der *bud6Δ*-Mutante keine Aktin-Kabel, sondern nur homogen verteilte Aktin-Patches detektiert, was mit den Angaben der Literatur übereinstimmt (Amberg et al., 1997; Graziano et al., 2011). Diese Beobachtung verdeutlicht, dass Bud6 für die Bildung der Aktin-Kabel essentiell ist. Bei der Kombination aller drei Deletionen von *BUD6*, *ALK1* und *ALK2* resultierte ein dem Wildtyp bzw. der *bud6Δ*-Mutante ähnlicher Phänotyp mit gleichmäßig verteilten Patches. Die fehlenden Aktin-Kabel-Strukturen waren vermutlich der Grund für das Ausbleiben der großen Tochterzelle der *alk1Δ alk2Δ*-Mutante.

Auch im zweiten Ansatz konnte sich der morphologische Phänotyp der Haspin-Doppelmutante durch den Abbau von Aktin-Kabeln mittels Latrunculin B während des Metaphase-Arrests nicht ausprägen. Hierbei wurde in der lebend-Zell-Mikroskopie das Aktin-Zytoskelett über Sac6,

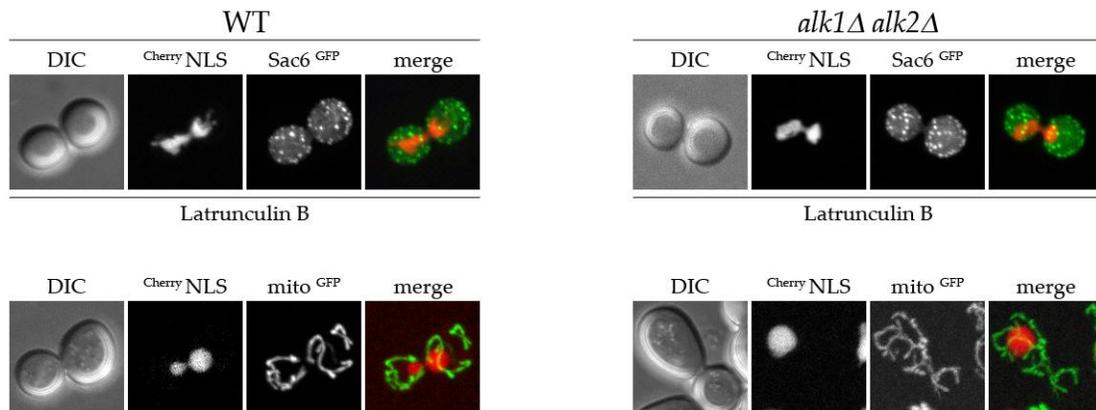
welches am C-Terminus mit GFP-markiert war, visualisiert. Ein Vorteil dieser Aktin-Visualisierung gegenüber der von fixierten Zellen mittels Phalloidin war der zusätzliche Einsatz des <sup>Cherry</sup>NLS-Markers zur Einteilung der Zellen in die entsprechende Zellzyklusphase. Vergleichbar mit dem Wildtyp lokalisierten die filamentösen Aktin-Patches homogen verteilt in beiden Zellkörpern. Auch hier konnte sich der Phänotyp der Haspin-Doppelmutante aufgrund der Abwesenheit der hierfür wichtigen Aktin-Strukturen nicht ausprägen.

Aktin-Kabel werden als Schienen von vielen Komponenten, wie z.B. sekretorischen Vesikeln, der Vakuole, den Mikrotubuli-Plus-Enden, dem Trans-Golgi-Netzwerk, mRNAs und u.a. auch von den Kraftwerken der Zelle, den Mitochondrien, für den gerichteten Transport in die Tochterzelle genutzt (Pruyne et al., 2004b). Zur Verdeutlichung der ungleichen Verteilung der Aktin-Kabel in der Haspin-Doppelmutante wurden diese indirekt über GFP-markierte Mitochondrien in der Metaphase nachgewiesen ((Hermann et al., 1997; Westermann and Neupert, 2000). Während im Wildtyp das Netzwerk der röhrenförmigen Membranen gleichmäßig verteilt war, fiel in der Mutante die Konzentration der Organellen auf. Zum Einen spiegelt dieses Ergebnis die geballte Ansammlung der Aktin-Kabel wider. Zum Anderen zeigt es den verstärkten Transport von Cargos und den erhöhten Energiebedarf der Knospe. Aus diesem Grund ist es der Doppelmutante möglich eine solch große Tochterzelle zu bilden.

A



B



**Abbildung 4.15 Aktin-Kabel sind für die Ausprägung des *alk1Δ alk2Δ*-Phänotyps nötig**

Zur Repression des *GALL*-Promotors wurden die bei 25°C in XYRG-Medium wachsenden Stämme (gemeinsamer Genotyp: *natNT2-pGALL-CDC20*) **(A)** W9145 (WT), W9185 (*alk1Δ::URA3 alk2Δ::natMX4*), W9396 (*bud6Δ::kanMX4*), W11526 (*bud6Δ::kanMX4 alk1Δ::URA3 alk2Δ::natMX4*), **(B)** W11878 (*SAC6-yEGFP-tADH1-SpHIS5 his3-Δ1::pTEF2-CHERRY-SWI5-S/A-tCYC1-HIS3*) und W11879 (*alk1Δ::URA3*)

*alk2Δ::natMX4 SAC6-yEGFP-tADH1-SpHIS5 his3-Δ1::pTEF2-CHERRY-SWI5-S/A-tCYC1-HIS3*) bei einer  $OD_{600} = 0,4$  in XYD-Medium überführt und 3 h in Metaphase arretiert. Die unter (A) aufgeführten Stämme wurden fixiert und mit FITC-gekoppeltem Phalloidin erfolgte eine Färbung der Aktin-Strukturen. Für die Analyse im Mikroskop wurden zur Probenfixierung Wasseragaroseblöckchen ohne Zucker verwendet. Eingesetzte Laserintensität: 488 nm-Laser 100 %. Bei den unter (B) aufgeführten Stämmen war im XYD-Medium zusätzlich 20  $\mu\text{g/ml}$  Latrunculin B enthalten. Für die konfokale Mikroskopie wurden die Zellen unter 0,75 % SD++ Agaroseblöckchen positioniert. Eingesetzte Laserintensitäten: 488 nm-Laser *Sac6<sup>GFP</sup>* 95%, 561 nm-Laser *CherryNLS* 20 %. **(C)** Zellen der Stämme W10361 (*pTPI-mt-GFP-LEU2 trp1::pTEF2-CHERRY-SWI5-S/A-tCYC1-TRP1 cdc20-3*) und W10602 (*alk1Δ::HIS3MX6 alk2Δ::kanMX4 pTPI-mt-GFP-LEU2 trp1::pTEF2-CHERRY-SWI5-S/A-tCYC1-TRP1 cdc20-3*) wurden bei 25°C in SD-Medium kultiviert und durch die Temperaturerhöhung auf 37°C aufgrund des temperatursensitiven *cdc20-3*-Allels für 3 h in Metaphase arretiert. Die konfokale Mikroskopie erfolgte unter 0,75 % SD++ Agaroseblöckchen. Eingesetzte Laserintensitäten: 488 nm-Laser *mito<sup>GFP</sup>* 10 %, 561 nm-Laser *CherryNLS* 20 %.

#### 4.3.1.4 In *alk1Δ alk2Δ*-Mutanten persistiert Polaritätsmaschinerie

Nachdem die Doppelmutante ein länger andauerndes, polares Wachstum zeigte, stellte sich die Frage, ob die Zellpolaritätskomponenten in der Metaphase, ähnlich wie bei der *alk2Δ*-Mutante (Abbildung 4.13), verstärkt an dem Kortex der Tochterzelle lokalisieren. Sollte sich dies bestätigen, wäre es von Interesse das Wirkungsgeschehen von Haspin über die Proteine zeitlich einzuordnen. Um diesen Fragen nachzugehen, wurde eine Vielzahl von Proteinen, die am anfänglichen Polarisationsgeschehen der Zelle zu etwas unterschiedlichen Zeitpunkten beteiligt sind, mit GFP am carboxyterminalen Ende fusioniert, mit der Haspin-Doppelmutante gekreuzt und die entsprechenden Stämme nach der Tetraden-Analyse im Mikroskop betrachtet. Die Rho-GTPasen Rho1 und Cdc42 wurden jedoch zu deren Funktionserhalt am N-terminalen Ende mit dem Fluoreszenzprotein gekoppelt.

Wie aus Abbildung 4.16 zu erkennen ist, zeigten die etwas später im Prozess der Zellpolarität agierenden Aktin-assoziiierenden Komponenten Bud6 und Sac6 bzw. die Polarisom-Untereinheiten Bni1 und Spa2 in der Haspin-Doppelmutante eine starke Konzentration am Kortex in den Metaphase-arretierten Zellen. Beim Wildtyp hingegen war im Falle von Bni1, Bud6 und Spa2 kein kortikales Signal mehr zu detektieren. Lediglich am Knospenhals waren die beiden letzteren zu finden, während Sac6 homogen verteilte Aktin-Patches aufwies. Die sehr früh an der Etablierung der Zellpolarität beteiligten GTPasen Rho1 und Cdc42, sowie das Cdc42-spezifische GEF Cdc24 und das Gerüstprotein Bem1 zeigten das selbe Bild wie die oben beschriebenen Komponenten: in Wildtypzellen ein schwaches, homogenes Signal, während in der Haspin-Doppelmutante diese Polaritätsproteine weiterhin agglomerierten. Da alle der visualisierten, positiv-regulierenden Polaritätsmarker ein ähnliches Bild zeigten, scheint es, als ob die Haspin-Proteine vorzeitiger Einfluss auf den Prozess der Zellpolarität nehmen. Die früh im Zellzyklus am Mutter-Tochterzell-Übergang lokalisierenden Septine zeigten ein

unbeeinträchtigt Ringmuster am Knospenhals in der Haspin-Doppelmutante (Daten nicht gezeigt). Damit könnte die Zielstruktur von Haspin zwischen der Septin-Assemblierung und der Etablierung der Zellpolarität liegen. Eine andere Hypothese wäre, dass Alk1 und Alk2 über einen potentiellen Gegenspieler der Zellpolarität, wie das GAP Bem2, in diesem Prozess wirken. Der Verlust der Haspin-Homologen Alk1 und Alk2 scheint die Auflösung der Zellpolarität zu inhibieren. Nach dem Wildtyp zu urteilen, befinden sich die Zellen im Metaphase-Arrest am Ende des isotropen Knospenswachstums, da die Asymmetrie der Aktin-Strukturen zwischen der Tochter- und Mutterzelle aufgehoben wurde. Die Haspin-Doppelmutanten hingegen verbleiben im Zustand des polaren Wachstums, da die Dissoziation der Polaritätsmaschinerie nicht initiiert werden kann.

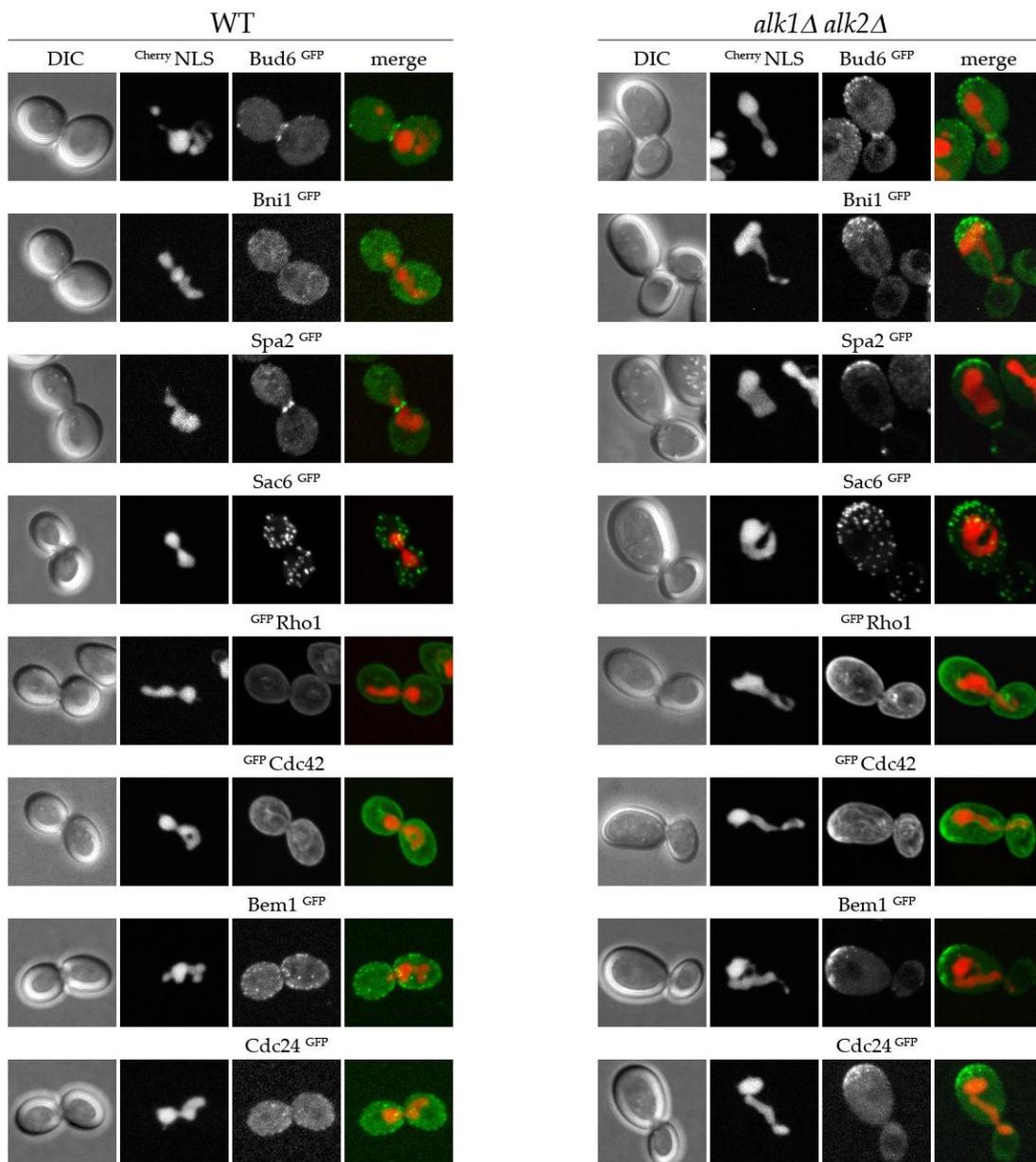


Abbildung 4.16 *alk1Δ alk2Δ*-Mutanten können Polarität am Kortex nicht auflösen

Die bei 25°C in XYRG-Medium wachsenden Zellen der Stämme (gemeinsamer Genotyp: *his3-Δ1::pTEF2-CHERRY-SWI5-S/A-tCYC1-HIS3 natNT2-pGALL-CDC20*) W10793 (*bud6::BUD6-yEGFP-tCYC1-LEU2*), W10634 (*alk1Δ::URA3 alk2Δ::natMX4 bud6::BUD6-yEGFP-tCYC1-LEU2*), W11248 (*BNI1-yEGFP-tADH1-CaURA3*), W10670 (*alk1Δ::URA3 alk2Δ::natMX4 BNI1-yEGFP-tADH1-CaURA3*), W12051 (*SPA2-yEGFP-tADH1-CaURA3*), W11265 (*alk1Δ::URA3 alk2Δ::natMX4 SPA2-yEGFP-tADH1-CaURA3*), W11878 (*SAC6-yEGFP-tADH1-SpHIS5*), W11879 (*alk1Δ::URA3 alk2Δ::natMX4 SAC6-yEGFP-tADH1-SpHIS5*), W12362 (*RHO1::pTEF2-GFP-RHO1-LEU2*), W12363 (*alk1Δ::URA3 alk2Δ::natMX4 RHO1::pTEF2-GFP-RHO1-LEU2*), W12360 (*CDC42::pTEF2-GFP-CDC42-LEU2*), W12361 (*alk1Δ::URA3 alk2Δ::natMX4 CDC42::pTEF2-GFP-CDC42-LEU2*), W12034 (*BEM1-yEGFP-tADH1-SpHIS5*), W11915 (*alk1Δ::URA3 alk2Δ::natMX4 BEM1-yEGFP-tADH1-SpHIS5*), W12035 (*CDC24-yEGFP-tADH1-SpHIS5*) und W11918 (*alk1Δ::URA3 alk2Δ::natMX4 CDC24-yEGFP-tADH1-SpHIS5*) wurden zur Repression des GALL-Promotors in XYD-Medium überführt und für 3 h in Metaphase arretiert. Für die lebend-Zell-Mikroskopie wurden die Zellen unter 0,75 % SD++ Wasseragaroseblöckchen positioniert. Eingesetzte Laserintensitäten variierten entsprechend dem Protein: 488 nm-Laser Bni1<sup>GFP</sup> 100 %, Sac6<sup>GFP</sup> 95%, Bud6<sup>GFP</sup> 86 %, Spa2<sup>GFP</sup> 86 %, GFP<sup>Rho1</sup> 86 %, GFP<sup>Cdc42</sup> 86 %, Bem1<sup>GFP</sup> 86 %, Cdc24<sup>GFP</sup> 86 %; 561 nm-Lasers <sup>Cherry</sup>NLS 20 %.

## 4.3.2 Erhöhte Alk2 Mengen beeinträchtigen die Zellpolarität

### 4.3.2.1 ALK2-Überexpression inhibiert spezifisch Knospung

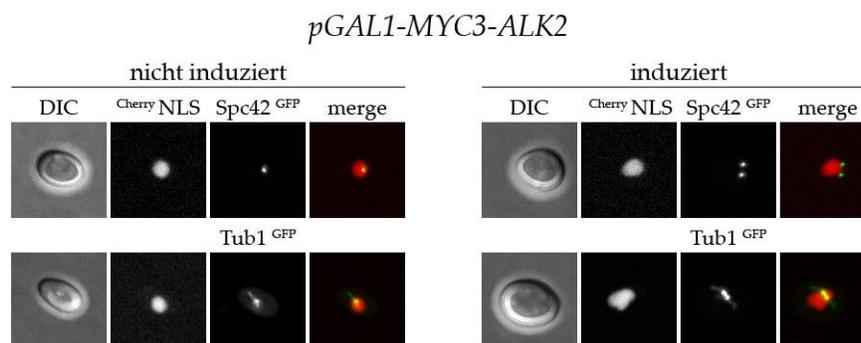
Nachdem die Deletionsanalysen eine funktionelle Verbindung von Haspin zum Polarisationsgeschehen ergaben, sollten im Hinblick auf diesen Prozess die Auswirkungen der Überexpression von *ALK2* näher charakterisiert werden. Hierfür wurde über Klonierung das Gen des Haspin-Homologen unter die Kontrolle des induzierbaren *GAL1*-Promotors gestellt und durch homologe Rekombination in das Genom der Stammhintergründe W303 und S288c integriert.

Aus der Literatur ist bereits bekannt, dass die erhöhten Mengen von Alk2 zu einem Arrest in der späten G2- bzw. der frühen M-Phase mit repliziertem DNA-Gehalt führen (Nespoli et al., 2006) und Dosis-abhängig letal sind (Diergardt, 2007). Eine quantitative Analyse der Zellmorphologie nach *ALK2*-Überexpression wies im Stammhintergrund W303 einen erhöhten Anteil an Zellen ohne Knospe (ca. 80 %) auf (Diergardt, 2007). In Zusammenarbeit mit Richard Kiener wurde dieser morphologische Phänotyp im Stammhintergrund S288c untersucht. Aufgrund der geringer exprimierten Alk2-Menge oder -Wirkung war in diesen Experimenten der Anteil an knospenlosen Zellen auf nur ca. 65 % angestiegen (Kiener, 2011).

Um die arretierten Zellen nach Überexpression von *ALK2* besser zu charakterisieren, wurden in der lebend-Zell-Mikroskopie Spindel-Strukturen betrachtet. Die Visualisierung der Spindelpolkomponente Spc42 und des  $\alpha$ -Tubulins Tub1 erfolgte durch ein C-terminal fusioniertes GFP. Zur Betrachtung der Kernstruktur diente <sup>Cherry</sup>NLS.

Aus Abbildung 4.18 wird ersichtlich, dass unter uninduzierten Promotorbedingungen knospenlose Zellen einen SPB mit monopolen Mikrotubuli hatten. Die Überexpression von

*ALK2* führte zu einem erhöhten Anteil an knospenlosen Zellen, die duplizierte Spindelpole mit einer kurzen, bipolaren Spindel aufwiesen. Dieser Effekt war spezifisch für erhöhte *Alk2*-Mengen und kam in allen knospenlosen Zellen vor. Aus dieser Beobachtung geht hervor, dass die *ALK2*-Überexpression nicht zu einem allgemeinen G1-Arrest der Zellen führt: während die Knospung spezifisch inhibiert wird, schreiten die normalerweise zeitgleich mit der Tochterzell-Entwicklung ablaufenden Prozesse der SPB-Duplikation und der DNA-Replikation weiter fort.



**Abbildung 4.17** Erhöhte Mengen an *Alk2* führen zu knospenlosen Zellen mit duplizierten Spindelpolen und bipolarer Spindel

Exponentiell in XYR-Medium wachsende Kulturen der Stämme W11628 (*ura3::pGAL1-MYC3-ALK2-tCYC1-URA3 leu2::pSPC42-SPC42-yEGFP-tCYC1-LEU2 trp1::pTEF2-CHERRY-SWI5-S/A-tCYC1-TRP1*) und W11636 (*ALK2::pGAL1-MYC3-ALK2-URA3 tub1::TUB1-GFP-URA3 his3Δ-1::pTEF2-CHERRY-SWI5-S/A-tCYC1-HIS3 CDC11::CDC11-3xCHERRY-LEU2*) wurden bei einer  $OD_{600} = 0,3$  mit 2 % Galaktose versetzt, um den *GAL1*-Promotor für 3 h bei 25°C zur Expression von *ALK2* zu induzieren. Ein Teil der uninduzierten Zellen wurde unter einem 0,75 % SD++ Agaroseblöckchen im inversen Mikroskop mit Hilfe eines *spinning-disk*-Systems analysiert. Eingesetzte Laserintensitäten: 488 nm-Laser Spc42<sup>GFP</sup> 50 %, Tub1<sup>GFP</sup> 75 %; 561 nm-Laser <sup>Cherry</sup>NLS 20 %. Die für 3 h induzierten Proben wurden unter einem 1 % SRG++ Agaroseblöckchen wie oben beschrieben mikroskopiert.

### 4.3.2.2 *ALK2*-Überexpression inhibiert Aktin-Polarisation

Der knospenlose Phänotyp, der sich bei erhöhten *Alk2*-Mengen ausprägt, zeigt, dass die Ausbildung einer Knospe nicht initiiert werden kann. Für die Entstehung einer neuen Tochterzelle ist das Aktin-Zytoskelett von zentraler Bedeutung (Hartwell et al., 1974). Zum Einen verhelfen die Aktin-Patches durch Polarisation vor dem Eintritt in den Zellzyklus die zukünftige Knospungsstelle festzulegen. Zum Anderen werden später für das Wachstum der neuen Zelle die Aktin-Kabel für den Transport von sekretorischen Vesikeln benötigt. Um die Frage der Aktin-Organisation in diesen Zellen zu klären, wurde das Aktin-Zytoskelett einerseits in lebenden Zellen mit dem GFP-fusionierten Fimbrin Sac6 und andererseits in fixierten Proben durch eine Färbung mit FITC-gekoppeltem Phalloidin dargestellt.

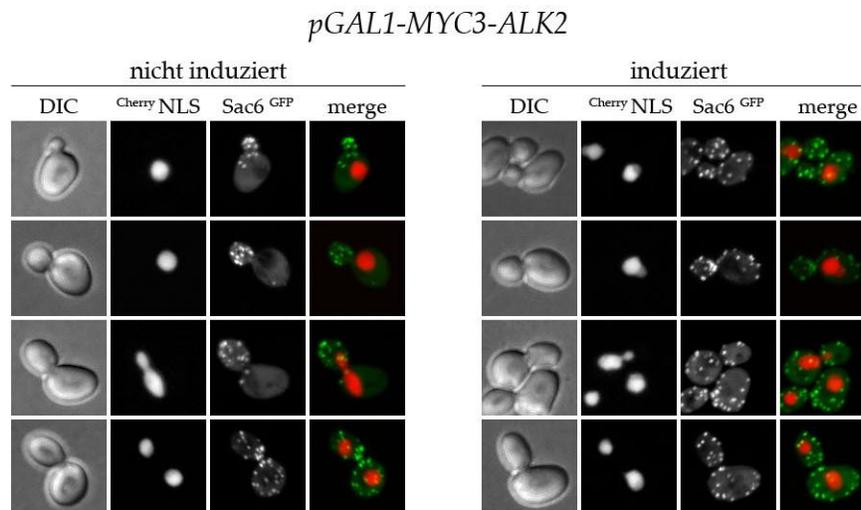
Für die Einwirkung von erhöhten *Alk2*-Mengen auf die Aktin-Strukturen wurde der Stammhintergrund S288c verwendet. Dieser bildete aufgrund der schwächeren Expression von

# Ergebnisse

Alk2 noch Knospen, jedoch waren die Tochterzellen wesentlich kleiner als unter normalen Bedingungen. Im ersten Ansatz mit Sac6<sup>GFP</sup> war es aufgrund des Kernmarkers möglich, die Zellen mit ihren ungewöhnlich kleinen Knospen in die korrekte Zellzyklus-Phase einzuordnen. Die Verteilung des Fimbrins Sac6 zeigte, dass die Polarisation des Aktin-Zytoskeletts verfrüht aufgehoben wurde, da bei vielen Zellen mit vergleichsweise kleiner Knospe die Aktin-Patches bereits nicht mehr auf die Tochter konzentriert waren (Abbildung 4.18 A). In der Wildtyp-Situation wurde diese Polarisation wesentlich länger aufrechterhalten. Die homogene Verteilung der Aktin-Patches fand hier erst nach der Anaphase statt. Die Aktin-Visualisierung mittels FITC-gekoppeltem Phalloidin führte zum selben Ergebnis: die Polarität im Wildtyp hielt bis zum Ende des isotropen Knospenwachstums an, während sie bei hohen Alk2-Mengen erst gar nicht etabliert werden konnte (Abbildung 4.18 B).

Das Aktin-Zytoskelett trägt maßgeblich zur korrekten Spindelorientierung bei. Bei der Überexpression von *ALK2* durch den konstitutiven *TEF2*-Promotor zeigten Stämme in der lebend-Zell- bzw. indirekten Immunfluoreszenz-Mikroskopie einen erhöhten Anteil an Zellen mit fehlorientierter Spindel (Abbildung 4.18 C). Eine plausible Erklärung dieser Beobachtung könnte sein, dass die Spindel-Ausrichtung aufgrund des diffus über beide Zellkörper verteilten Aktin-Zytoskeletts erschwert war.

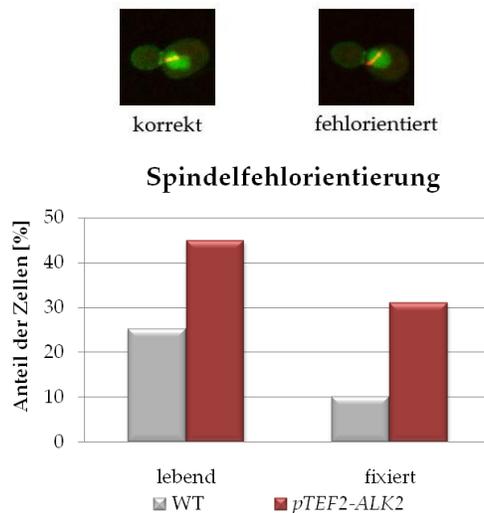
A



B



C



**Abbildung 4.18** *ALK2*-Überexpression wirkt der Polarisation des Aktin-Zytoskeletts und der Spindelorientierung entgegen

Exponentiell in XYR-Medium wachsende Kulturen der Stämme **(A)** W11691 (*ALK2::pGAL1-MYC3-ALK2-URA3 SAC6-yEGFP-tADH1-SpHIS5 his3-Δ1::pTEF2-CHERRY-SWI5-S/A-tCYC1-HIS3*) **(B)** W11000 (*ALK2::pGAL1-MYC3-ALK2-URA3*) wurden bei einer  $OD_{600} = 0,3$  mit 2 % Galaktose versetzt, um den *GAL1*-Promotor für 3 h bei 25°C zur Expression von *ALK2* zu induzieren. **(A)** Ein Teil der uninduzierten Zellen wurde unter einem 0,75 % SD++ Agaroseblöckchen positioniert und im inversen Mikroskop mit Hilfe eines *spinning-disk*-Systems analysiert. Eingesetzte Laserintensitäten: 488 nm-Laser Sac6<sup>GFP</sup> 95 %, 561 nm-Laser <sup>Cherry</sup>NLS 20 %. Die für 3 h induzierten Proben wurden unter einem 1 % SRG++ Agaroseblöckchen wie oben beschrieben mikroskopiert. Der unter **(B)** aufgeführte Stamm wurde im uninduzierten Zustand und nach der 3 stündigen Induktion mit Formaldehyd fixiert, mit FITC-gekoppeltem Phalloidin gefärbt und für die konfokale Mikroskopie mit Wasseragarose-beschichteten Objektträgern vorbereitet. Eingesetzte Laserintensität: 488 nm-Laser 100 %. **(C)** Zellen der Stämme W9913 (*TUB1::TUB1-3xCHERRY-tCYC1-LEU2*), W11100 (*ALK2::pTEF2-GFP-ALK2-URA3 TUB1::TUB1-3xCHERRY-tCYC1-LEU2*), BY4741 (Wildtyp) und W11107 (*ALK2::pTEF2-MYC3-ALK2-LEU2*) wurden bei 25°C in XYD-Medium kultiviert, in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet und im Falle von W9913 bzw. W11100 für die lebend-Zell-Mikroskopie und im Falle von BY4741 bzw. W11107 nach 30-minütiger Formaldehyd-Fixierung für die indirekte Immunfluoreszenz-Mikroskopie vorbereitet. Die Visualisierung der Spindel erfolgte im zweiten Ansatz mit dem Tubulin-Antikörper YOL1-34. Ausgewertet wurde die Spindelorientierung von 200 Prä-Anaphase-Zellen, die noch keinen elongierten Kern aufwiesen. Ein Winkel von < 45° zwischen der Zentralspindel und dem Knospenhals wurde als Fehlorientierung der Spindel definiert.

### 4.3.2.3 *ALK2*-Überexpression verhindert Etablierung der Polarität

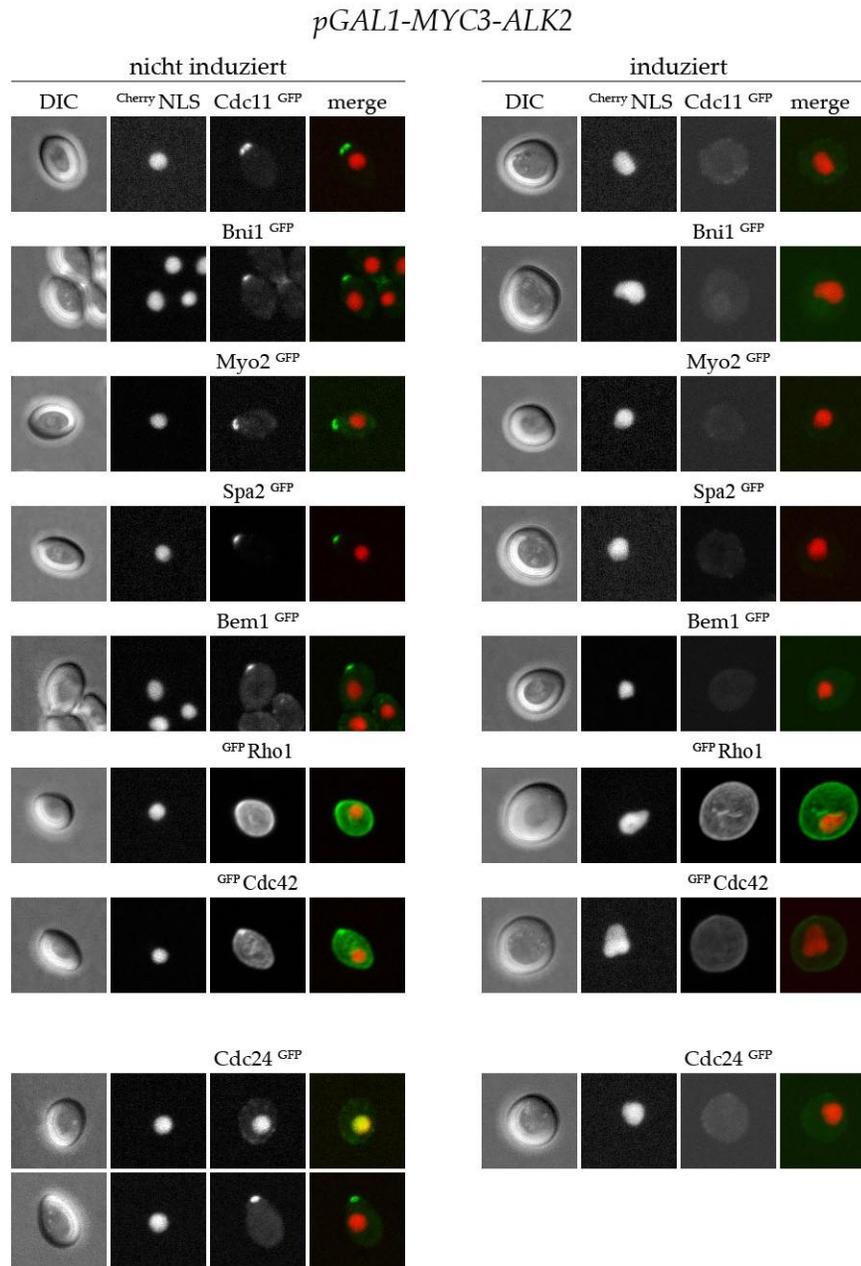
Um einen Einblick in den zugrunde liegenden, molekularen Mechanismus der Wirkungsweise des Haspin-Homologen zu erhalten, wurden nach *ALK2*-Überexpression ausgewählte Proteine aus dem Polarisationsgeschehen angesehen. Zu diesem Zweck wurden Stämme durch Kreuzung generiert, bei denen *ALK2* unter der Kontrolle des induzierbaren *GAL1*-Promotors

stand und die zudem eine über GFP-visualisierbare Komponente der Polaritätsmaschinerie hatten.

Es bestätigte sich, dass erhöhte Mengen an Alk2 diese Proteine beeinflussten. Das Septin Cdc11, welches schon früh im Zellzyklus zur Definition der zukünftigen Knospungsstelle an dieser lokalisiert und dort zur Bildung des Septinrings beiträgt, zeigte im uninduzierten Zustand die beschriebene ringförmige, polarisierte Struktur (Park and Bi, 2007). Diese Formation war bei erhöhten Alk2-Mengen nicht mehr zu sehen. Die Polarisom-Komponenten, Bni1 und Spa2, die etwas später am Polaritätsgeschehen beteiligt sind, wiesen dasselbe Verhalten auf. Ebenso lagen die Myosine, Myo1 (nicht gezeigt) und Myo2 im Wildtyp-Zustand polarisiert vor, wobei ihr Signal bei *ALK2*-Überexpression verschwand. Auch die Rho-GTPasen, Rho1 und Cdc42, und das Gerüstprotein Bem1 waren unter normalen Bedingungen polarisiert an der zukünftigen Knospungsstelle zu detektieren, während die Überexpression von *ALK2* in ihrem Signalverlust resultierte. Interessanterweise konnten mit Cdc24 die Zielstrukturen, auf die Alk2 wirken könnte, eingegrenzt werden. Dieses Protein wird in der G1-Phase durch den Inhibitor Far1 im Kern zurückgehalten und kann erst nach START an die Initiationsstelle der angehenden Knospe gelangen (Gulli et al., 2000). Dieses Muster konnte auch im uninduzierten Zustand verfolgt werden: erst nachdem das nukleäre Signal verschwand, war kurz danach Cdc24 kortikal und polarisiert zu detektieren. Auch hier führte die *ALK2*-Überexpression zur Abwesenheit des konzentrierten Signals. Es scheint, als ob Cdc24 aus dem Kern austreten kann, jedoch dessen anschließende polarisierte Anlagerung an die neue Knospungsstelle durch Alk2 verhindert wird. Damit könnten sich Zielstrukturen von Alk2 in dieser Zeitspanne befinden.

Zur Verdeutlichung der Wirkung von Alk2 auf die Proteine der Polaritätsmaschinerie wurden Zellen ohne polarisiertes Signal vor und nach der Induktion des Promotors quantitativ ausgewertet. Wie in Abbildung 4.19 B zu sehen ist, hatte unter normalen Bedingungen die Mehrheit der knospenlosen G1-Zellen ein kortikales, konzentriertes Signal. Diese Beobachtung zeigt, dass die Polaritätsproteine sich schon vor der sichtbaren Knospenbildung an die zukünftige Knospungsstelle anlagern. Nur wenige Zellen, die sich in der frühen G1-Phase befanden, zeigten keine Polarisation, da sie nicht unmittelbar nach der Beendigung der Zytokinese mit der erneuten Polarisation begannen. Bei erhöhten Alk2-Mengen hingegen, konnte bei allen untersuchten Polaritätskomponenten keine spezifische, polare Lokalisation beobachtet werden. Dies bekräftigt den Einfluss des Haspin-Proteins Alk2 auf die Polaritätsmaschinerie und zeigt sein antagonistisches Verhalten bei der Etablierung der Polarität und des Knospenwachstums.

A



B

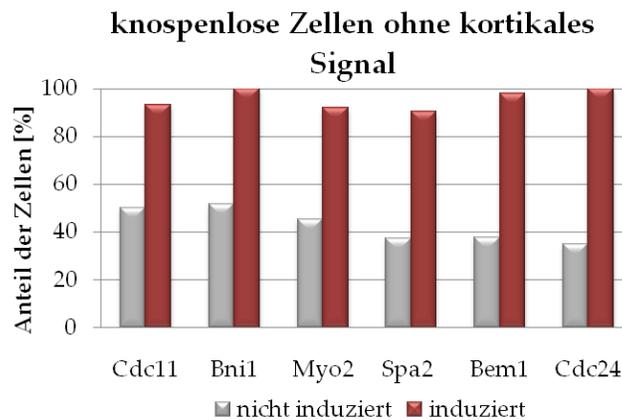


Abbildung 4.19 Alk2 verhindert die Bildung der Polaritätsmaschinerie

## Ergebnisse

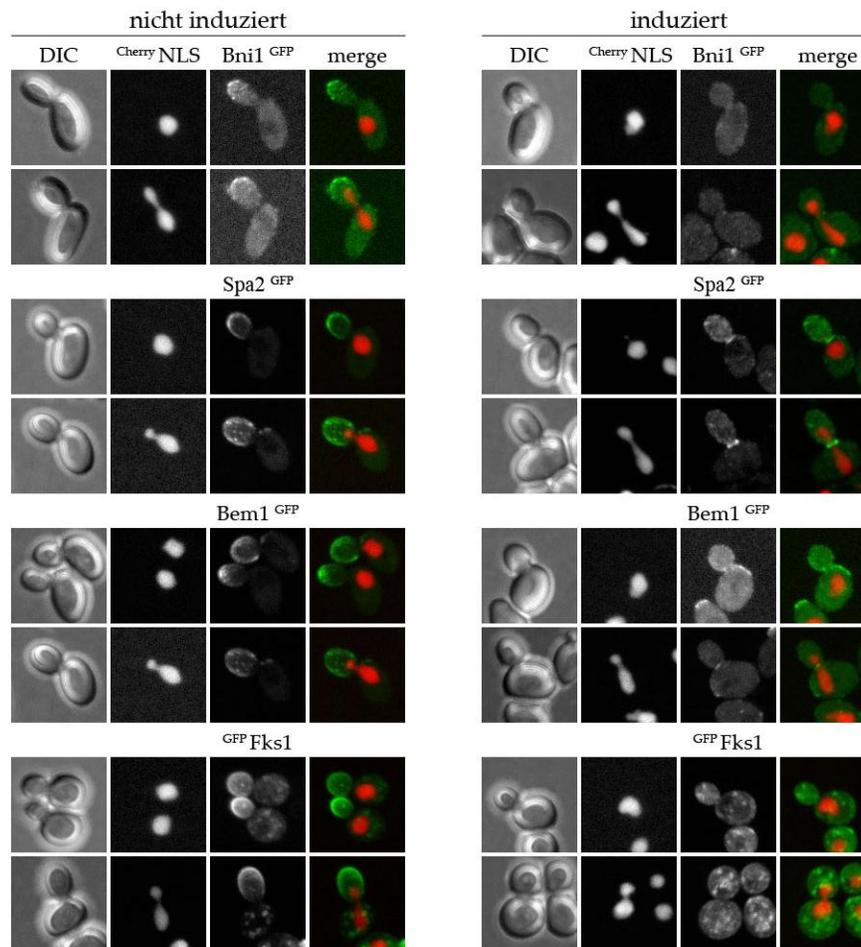
Exponentiell in XYR-Medium wachsende Kulturen der Stämme (gemeinsamer Genotyp: *ura3::pGAL1-MYC3-ALK2-tCYC1-URA3 trp1::pTEF2-CHERRY-SWI5-S/A-tCYC1-TRP1*) W11629 (*leu2::CDC11-GFP-LEU2*), W11874 (*BNI1-yEGFP-tADH1-CaURA3*), W11880 (*MYO2-yEGFP-tADH1-CaURA3*), W11631 (*SPA2-yEGFP-tADH1-CaURA3*), W11904 (*BEM1-yEGFP-tADH1-SpHIS5*), W12056 (*RHO1::pTEF2-GFP-RHO1-LEU2*), W12054 (*CDC42::pTEF2-GFP-CDC42-LEU2*) und W12306 (*CDC24-yEGFP-tADH1-SpHIS5*) wurden bei einer  $OD_{600} = 0,3$  mit 2 % Galaktose versetzt, um den *GAL1*-Promotor für 3 h bei 25°C zur Expression von *ALK2* zu induzieren. **(A)** Ein Teil der uninduzierten Zellen wurde unter einem 0,75 % SD++ Agaroseblöckchen positioniert und im inversen Mikroskop mit Hilfe eines *spinning-disk*-Systems analysiert. Eingesetzte Laserintensitäten: 488 nm-Laser Cdc11<sup>GFP</sup> 100 %, Bni1<sup>GFP</sup> 100 %, Myo2<sup>GFP</sup> 100 %, Spa2<sup>GFP</sup> 86 %, Bem1<sup>GFP</sup> 86 %, <sup>GFP</sup>Rho1 86 %, <sup>GFP</sup>Cdc42 86 %, Cdc24<sup>GFP</sup> 86 %; 561 nm-Laser <sup>Cherry</sup>NLS 20 %. Die für 3 h induzierten Proben wurden unter einem 1 % SRG++ Agaroseblöckchen wie oben beschrieben mikroskopiert. **(B)** Für die quantitative Auswertung wurden 200 Zellen pro Stamm im un- bzw. induzierten Zustand ausgezählt. Dargestellt ist der prozentuale Anteil an knospenlosen Zellen, die kein polarisiertes Signal hatten.

Die folgenden Versuche mit dem Stammhintergrund S288c lieferten vergleichbare Ergebnisse. Jedoch war es hier, aufgrund der nicht vollständig unterdrückten Knospenbildung, möglich, bei *ALK2*-Überexpression den Verlauf der Polarisation der Proteine in der Knospe zu verfolgen. Die Polarisom-Proteine, Bni1 und Spa2, und das Gerüstprotein Bem1 wiesen unter normalen Bedingungen bis zum Ende der Anaphase eine konzentrierte Lokalisation am Kortex der Tochterzelle auf. Diese war bei erhöhten Alk2-Mengen in Zellen mit sehr kleiner Knospe noch zu detektieren, wobei die Signale frühzeitig in Metaphase verschwanden (Abbildung 4.20). Im Falle von Spa2 schien es, als ob die Proteine folglich eher an den Knospenhals umorientiert wurden. Die  $\beta$ -Glukansynthase Fks1 lieferte in Metaphasezellen ebenso ein unpolarisiertes Muster im induzierten Zustand, wobei kleinere Knospen auch hier Polarität erkennen ließen. Dies würde die geringere Größe der Tochterzellen erklären. Aufgrund der stark abgeschwächten Zellwandsynthese waren diese Zellen nicht mehr in der Lage der Knospe ein normales Wachstum zu gewähren.

Neben dem kompletten Alk2 wurde außerdem dessen N-terminaler Bereich nach Überexpression analysiert. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die erhöhten Mengen der verkürzten Version die Lokalisation von Proteinen der Polaritätsmaschinerie (z.B. Spa2, Fks1), die Aktin-Kabel-Polarisation sowie die Spindelpol-Duplikation nicht beeinträchtigte (Daten nicht gezeigt). Diese Zellen bildeten elongierte Knospen aus, was verdeutlicht, dass hier die Polarisation noch stattfinden konnte. Die Beobachtungen weisen darauf hin, dass der C-terminale Bereich, der die Proteinkinase-Domäne beinhaltet, wichtig für die Funktion des Haspin-Homologen Alk2 bei der Aufhebung der Zellpolarität ist.

Zusammenfassend zeigten die Ergebnisse, dass Alk2 die Assemblierung der Polaritätskomponenten verhindert und dadurch dem Knospenwachstum entgegenwirkt.

## *pGAL1-MYC3-ALK2*



**Abbildung 4.20** Alk2 baut die Polarisationsmaschinerie verfrüht ab

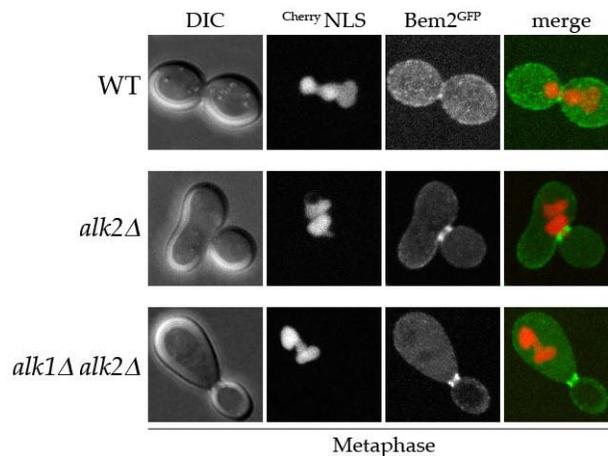
Exponentiell in XYR-Medium wachsende Kulturen der Stämme (gemeinsamer Genotyp: *ALK2::pGAL1-MYC3-ALK2-URA3 his3-Δ1::pTEF2-CHERRY-SWI5-S/A-tCYC1-HIS3*) W11875 (*BNI1-yEGFP-tADH1-CaURA3*), W11908 (*SPA2-yEGFP-tADH1-CaURA3*), W11905 (*BEM1-yEGFP-tADH1-SpHIS5*) und W11634 (*fks1::pFKS1-GFP-FKS1-URA3*) wurden bei einer  $OD_{600} = 0,3$  mit 2 % Galaktose versetzt, um den *GAL1*-Promotor für 3 h bei 25°C zu induzieren. Ein Teil der uninduzierten Zellen wurde unter einem 0,75 % SD++ Agaroseblöckchen positioniert und im inversen Mikroskop mit Hilfe eines *spinning-disk*-Systems analysiert. Eingesetzte Laserintensitäten: 488 nm-Laser Cdc11<sup>GFP</sup> 100 %, Bni1<sup>GFP</sup> 100 %, Myo2<sup>GFP</sup> 100 %, Spa2<sup>GFP</sup> 86 %, Bem1<sup>GFP</sup> 86 %, <sup>GFP</sup>Rho1 86 %, <sup>GFP</sup>Cdc42 86 %, Cdc24<sup>GFP</sup> 86 %; 561 nm-Laser <sup>Cherry</sup>NLS 20 %. Die für 3 h induzierten Proben wurden unter einem 1 % SRG++ Agaroseblöckchen wie oben beschrieben mikroskopiert.

### 4.3.3 Bem2 als potentielles Substrat von Haspin

In den Überexpressionsstudien von Breitzkreutz et al. (2010) wurde neben der SPOC-Kinase Kin4 auch das Rho-GAP Bem2 als physischer Interaktionspartner von Alk2 gefunden. Bem2 lokalisiert an Stellen des polarisierten Wachstums und trägt durch seinen inaktiven Zustand, der durch Hyperphosphorylierung der Cdc28-Cln2 Kinase gewährt wird, zur ortsspezifischen Aktivierung von Cdc42 bei der Knospentwicklung bei (Knaus et al., 2007). Nachdem durch

die bisherigen Funktionsanalysen eine Beziehung zwischen den Haspin-Proteinen und der Zellpolarität geschaffen werden konnte, war es von Interesse, Bem2, das eine wichtige, zentrale, regulatorische Komponente bei der Entwicklung der Zellpolarität darstellt, in Verbindung mit Haspin genauer zu charakterisieren. Hierfür wurde die Lokalisation von Bem2 über GFP-Fusionen in den Haspin-Mutanten in der Metaphase, sowie bei erhöhten Alk2-Mengen angesehen.

Aus Abbildung 4.21 geht hervor, dass im Wildtyp die anfängliche Polarisation von Bem2 in Metaphase arretierten Zellen aufgehoben wurde. Beide Zellkörper hatten ein homogen verteiltes, teils granuläres Signal, welches noch am Zellkortex und schwach am Knospenhals zu erkennen war. Im Vergleich dazu, sowie zu anderen Polarisationsproteinen, lieferte Bem2 in der Haspin-Einzelmutante *alk2Δ* als auch in der Doppelmutante *alk1Δ alk2Δ* ein komplett anderes Lokalisationsmuster. Hier war ein dominantes Signal am Knospenhals zu sehen, während das kortikale in beiden Mutanten vollständig verschwand.



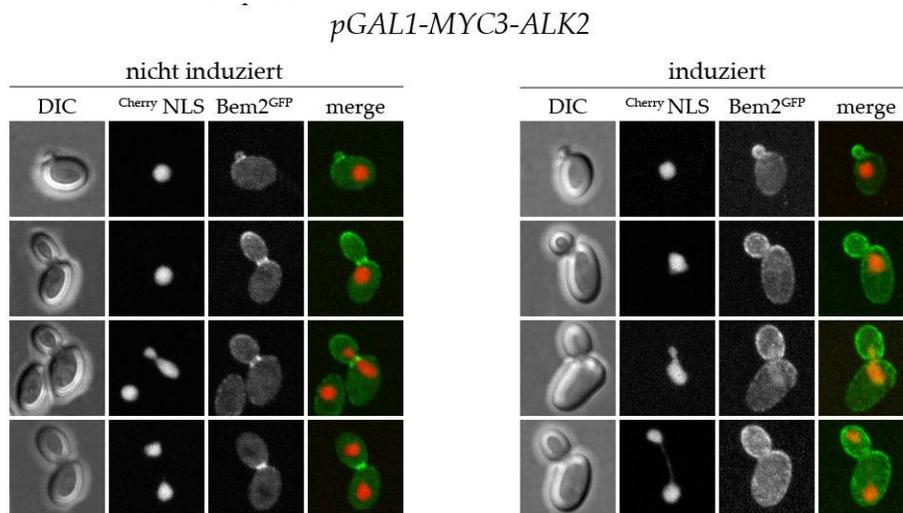
**Abbildung 4.21 Bem2 lokalisiert in Haspinmutanten nicht mehr am Kortex**

Zellen der Stämme (gemeinsamer Genotyp: *BEM2-yEGFP-tADH1-CaURA3 his3-Δ1::pTEF2-CHERRY-SWI5-S/A-tCYC1-HIS3 natNT2-pGALL-CDC20*) W10628 (WT), W10796 (*alk2Δ::natMX4*) und W11246 (*alk1Δ::URA3 alk2Δ::HIS3MX6*) wurden in XYRG-Medium bis zu einer  $OD_{600} = 0,3$  kultiviert. Zur Repression des *GALL*-Promotors wurden die Kulturen in XYD-Medium überführt und 3 h in Metaphase arretiert. Für die lebend-Zell-Mikroskopie wurden die Zellen unter 0,75 % SD++ Agaroseblöckchen positioniert. Eingesetzte Laserintensitäten: 488 nm-Laser Bem2<sup>GFP</sup> 100 %, 561 nm-Laser <sup>Cherry</sup>NLS 20 %.

Die Ergebnisse der Deletionsanalysen stimmten mit denen der *ALK2*-Überexpression überein. Unter normalen Bedingungen lokalisierte Bem2 bei der Knospenbildung sehr früh am Knospenhals und an der apikalen Wachstumsstelle. Diese Verteilung blieb bis zum Ende der Anaphase bestehen, wobei das kortikale Signal schwächer wurde. Nach der Kerntrennung lag das Rho-GAP Bem2 nur mehr am Knospenhals vor. Bei erhöhten Alk2-Mengen hingegen lokalisierte Bem2 während des gesamten Zellzyklus verstärkt am Kortex der Tochterzelle,

während das Signal am Mutter-Tochter-Übergang nicht mehr zu detektieren war. Dieses Ergebnis konnte in beiden Stammhintergründen bestätigt werden.

Bei Bem2 war im Gegensatz zu den in Kapitel 4.3.1.4 und 4.3.2.3 aufgeführten Polarisationsproteinen ein völlig anderes Lokalisationsmuster zu erkennen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Lokalisation von Bem2 am Kortex der Tochterzelle von Alk2 abhängig ist und darüber gesteuert werden könnte.



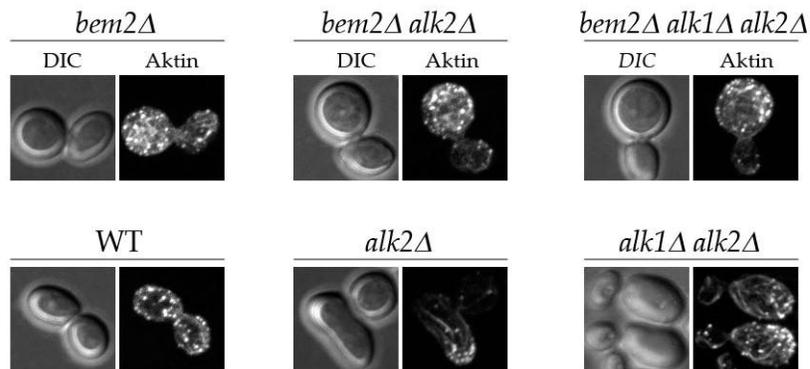
**Abbildung 4.22 Erhöhte Alk2-Mengen führen zu einer verstärkten, kortikalen Bem2-Lokalisation**

Der in XYR-Medium logarithmisch wachsende Stamm W11633 (*ALK2::pGAL1-MYC3-ALK2-URA3 BEM2-yEGFP-tADH1-CaURA3 his3-A1::pTEF2-CHERRY-SWI5-S/A-tCYC1-HIS3*) wurde bei einer  $OD_{600} = 0,3$  mit 2 % Galaktose versetzt, um den *GAL1*-Promotor für 3 h bei 25°C zur Expression von *ALK2* zu induzieren. Ein Teil der uninduzierten Zellen wurde unter einem 0,75 % SD++ Agaroseblöckchen positioniert und im inversen Mikroskop mit Hilfe eines *spinning-disk*-Systems analysiert. Eingesetzte Laserintensitäten: 488 nm-Laser Bem2<sup>GFP</sup> 100 %, 561 nm-Laser <sup>Cherry</sup>NLS 20 %. Die für 3 h induzierte Probe wurde unter einem 1 % SRG++ Agaroseblöckchen wie oben beschrieben mikroskopiert.

Zur weiteren Charakterisierung der beobachteten Verbindung wurde in der Tetraden-Analyse eine genetische Interaktion der Deletionen von *BEM2*, *ALK1* und *ALK2* untersucht. Weder die Kombination aus der *bem2Δ*-Mutante und den Haspin-Einzelmutanten, noch die gleichzeitige Abwesenheit von allen drei Genen führte zu einem sichtbaren Wachstumsdefekt (Daten nicht gezeigt). Bem2 steht für *bud emergence*, da die Deletionsmutanten in der Knospenausbildung beeinträchtigt sind. In mikroskopischen Analysen zeigte sich der in der Literatur beschriebene Phänotyp in sehr großen Mutterzellen mit relativ kleinen Tochterzellen (Bender and Pringle, 1991). Hierbei stellte sich die Frage, ob der Verlust von *BEM2* den Phänotyp des verstärkten Zellwachstums der Haspin-Einzel- sowie der Doppelmutante in der Metaphase wieder beheben könnte. Dafür wurden die Doppelmutante *bem2Δ alk2Δ* als auch die Dreifachmutante *bem2Δ alk1Δ alk2Δ* über die Repression des vor *CDC20* geschalteten *GALL*-Promotors in der Metaphase

arretiert. Neben der morphologischen Analyse wurde zudem das Aktin-Zytoskelett durch Phalloidin-Färbung untersucht.

In der Metaphase wies die Morphologie der *BEM2*-Deletionsmutante eine kleine Knospe und eine große, runde Mutterzelle auf, in der das Aktin-Netzwerk aus Patches und Kabeln verteilt war. Dieser Phänotyp wird von Knaus et al. (2007) folgendermaßen erklärt: die Abwesenheit von Bem2 führt zu einer Hyperaktivierung von Cdc42. Dadurch kommt es an mehreren Stellen innerhalb der Zelle zur Polarisierung. Folglich polymerisieren die Aktin-Strukturen ungerichtet und die Mutterzelle wächst in ihrer Ganzheit. Eine zusätzliche Deletion von *ALK2* alleine bzw. die simultane Abwesenheit von *ALK1* und *ALK2* konnte weder eine Veränderung in der zellulären Form, noch im Aktin-Zytoskelett bewirken. Aus diesen Beobachtungen wird deutlich, dass die Deletion von *BEM2* den Phänotyp der Haspin-Einzel- als auch der Doppelmutante supprimiert.



**Abbildung 4.23** *bem2Δ* supprimiert den Phänotyp der Haspin-Doppelmutante

Zellen der Stämme (gemeinsamer Genotyp: *natNT2-pGALL-CDC20*) W10914 (*bem2Δ::kanMX4*), W9145 (WT), W10916 (*bem2Δ::kanMX4 alk2Δ::HIS3MX6*), W10620 (*alk2Δ::HIS3MX6*), W10913 (*bem2Δ::kanMX4 alk1Δ::URA3 alk2Δ::HIS3MX6*) und W9185 (*alk1Δ::URA3 alk2Δ::natMX4*) wurden in XYRG-Medium bis zu einer  $OD_{600} = 0,3$  kultiviert. Zur Repression des *GALL*-Promotors wurden die Kulturen in XYD-Medium überführt und 3 h in Metaphase arretiert. Anschließend erfolgten die Zell-Fixierung mit Formaldehyd, die Färbung mit FITC-gekoppeltem Phalloidin und die Vorbereitung für die konfokale Mikroskopie mit Wasseragarose-beschichteten Objektträgern. Eingesetzte Laserintensität: 488 nm-Laser 100 %.

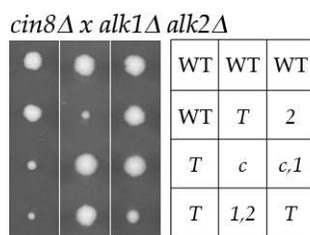
## 4.4 Wirkung von Haspin auf das Mikrotubuli-Zytoskelett

In vorherigen Arbeiten konnte durch einen SGA-Screen eine funktionelle Verbindung von Haspin zum Mikrotubuli-Zytoskelett geschaffen werden. Dabei zeigte sich in einem Set von 4800 Deletionsmutanten eine genetische Interaktion der Haspin-Doppelmutante mit der Deletion des Gens *CIN8* (Diergardt, 2007). In unabhängigen Tetraden-Analysen konnte diese in Form eines synthetischen Wachstumsdefekt bestätigt werden (Diergardt, 2007; Swoboda, 2008) (Abbildung 4.24 A). *Cin8* gehört zur *bimC*-Familie der Kinesin-verwandten Motorproteine und

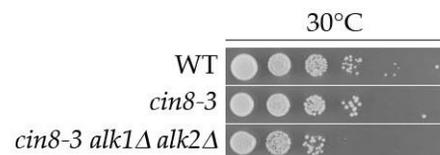
## Ergebnisse

hat ein weites Wirkungs- und Funktionsspektrum. Dieses beinhaltet u.a. die Förderung der Spindelpol-Duplikation, die die Mikrotubuli-bündelnde Aktivität von Cin8 benötigt, sowie in der Anaphase den katalytischen Transport von Mikrotubuli zu ihren Plus-Enden, wobei dafür die charakteristische N-terminale Motordomäne erforderlich ist. Um zu überprüfen, ob eine funktionslose Motordomäne womöglich schon alleine für die beobachtete, genetische Interaktion zwischen *cin8Δ* und *alk1Δ alk2Δ* verantwortlich ist, wurde eine Dreifachmutante durch Kreuzung generiert, die neben den Deletionen von beiden Haspin-Genen eine mutierte, funktionslose Motordomäne von Cin8 (*cin8-R196K*) besaß (Gheber et al., 1999). Diese Dreifachmutanten zeigten in der Tetraden-Analyse einen schwächeren Wachstumsdefekt im Vergleich zur *cin8Δ alk1Δ alk2Δ*-Mutante (Daten nicht gezeigt). In einem Wachstumstest, bei dem die Zellen in einer Verdünnungsreihe auf eine Vollmediumplatte überführt und inkubiert wurden, spiegelte sich auch hier der synthetische Effekt in abgeschwächter Form wider (Abbildung 4.24 B). Die *cin8-3*-Mutante wuchs bei 30°C ohne Beeinträchtigung, während die zusätzliche Abwesenheit von *ALK1* und *ALK2* zu einem verschlechterten Wachstumsverhalten führte. In mikroskopischen Analysen äußerte sich die fehlende Motoraktivität der *cin8-3*-Mutante in einer erhöhten Anzahl an Zellen mit verkürzten Metaphase-Spindeln. Der simultane Verlust beider Haspin-Homologen in Kombination mit *cin8-3* ließ diesen Zellanteil ansteigen (Abbildung 4.24). Womöglich leisten Alk1 und Alk2 einen Beitrag zur Spindelpol-Trennung. Diese Beobachtungen verdeutlichen, dass die Motordomäne von Cin8 eine wichtige Rolle bei der genetischen Interaktion mit Haspin spielt. Jedoch sind für den *cin8Δ alk1Δ alk2Δ*-Phänotyp weitere Bereiche des Kinesins nötig.

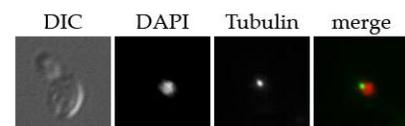
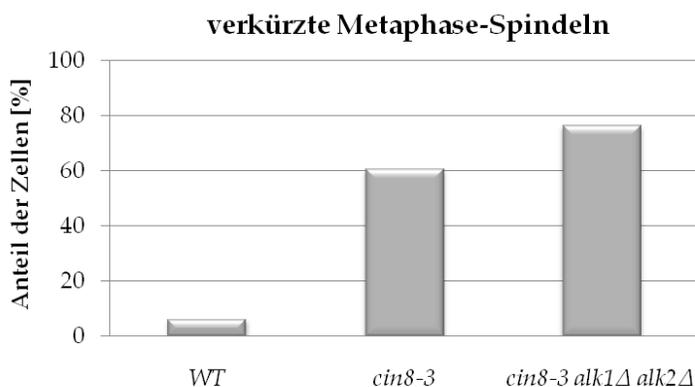
A



B



C



## Abbildung 4.24 Synthetischer Wachstumsdefekt von *cin8Δ* bzw. *cin8-3* mit *alk1Δ alk2Δ*

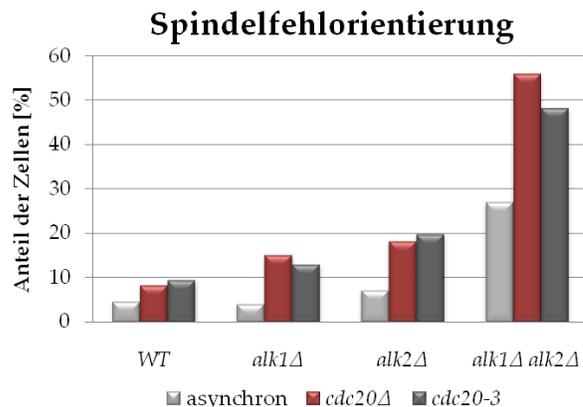
(A) Die Stämme W4766 (*alk1Δ::URA3 alk2 Δ::natMX4*) und W9158 (*cin8Δ::HIS3MX6*) wurden gekreuzt und zur Sporulation angesetzt. In der Tetraden-Analyse wurden die Sporen auf XYD-Platten vereinzelt und 3 Tage bei 30°C inkubiert. Die Bestimmung der Genotypen erfolgte mit Hilfe von Selektionsmarkern, wobei diese folgendermaßen bezeichnet wurden: WT (Wildtyp), c (*cin8Δ*), 1 (*alk1Δ*), 2 (*alk2Δ*), T (*cin8Δ alk1Δ alk2Δ*). (B) Die durch Kreuzung von W9013 (*cin8-3 kip1::HIS3*) mit W9142 (*alk1Δ::natMX4 alk2Δ::kanMX4 kip1::HIS3*) entstandenen Stämme W9144 (*cin8-3 alk1Δ::natMX4 alk2Δ::kanMX4 kip1::HIS3*) und W9143 (*cin8-3 kip1::HIS3*) wurden bezüglich des Wachstums mit K699 (WT) verglichen. Hierfür wurden Zellen dieser Stämme in 6 Verdünnungsschritten auf eine XYD-Platte überführt und 3 Tage bei 25°C, 30°C und 37°C inkubiert. Stämme mit dem Genotyp *cin8-3 kip1::HIS3* waren bei 37°C letal. Da sich bei 25°C und 30°C keine Wachstumsunterschiede zeigten, wurde nur eine Temperatur dargestellt. Zur Übersichtlichkeit wurde nur der relevante Genotyp angegeben. (C) Für die indirekte Immunfluoreszenz-Mikroskopie wurden die unter (B) aufgeführten Stämme in der logarithmischen Wachstumsphase vorerst bei 30°C kultiviert. Anschließend wurden diese zur Ausprägung des temperatursensitiven *cin8-3*-Allels zu 37°C überführt, 3 h inkubiert und danach mit Formaldehyd fixiert. Die Visualisierung der Mikrotubuli-Strukturen erfolgte mit  $\alpha$ -Tub2, die DNA wurde mit DAPI sichtbar gemacht. Das Diagramm zeigt den Anteil an Zellen, die ihre duplizierten SPBs nicht trennen konnten und damit eine verkürzte Metaphase-Spindel aufwiesen. Ausgezählt wurden pro Stamm jeweils 200 Zellen.

### 4.4.1 Spindelorientierung dauert in *alk1Δ alk2Δ*-Mutanten länger

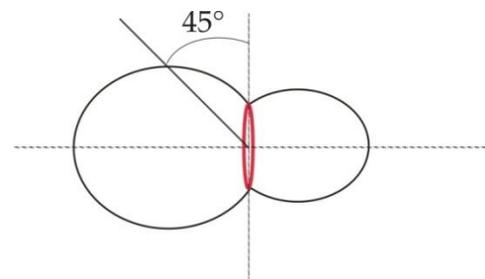
Durch den funktionellen Hinweis zum Mikrotubuli-Zytoskelett war es in der vorangegangenen Diplomarbeit möglich, nach intensiveren Analysen eine gehäufte Anzahl an fehlorientierten Spindeln in der Haspin-Doppelmutante festzustellen (Swoboda, 2008). Um den Beitrag der einzelnen Haspin-Proteine in diesem Kontext zu testen, wurden die Spindel-Strukturen der Einzelmutanten im Stammhintergrund W303 im asynchronen, sowie im Metaphase-arretierten Zustand in der indirekten Immunfluoreszenz-Mikroskopie sichtbar gemacht und beurteilt. Unter normalen Bedingungen haben die Spindeln in der Metaphase bzw. in der Prä-Anaphase innerhalb der Zelle eine bestimmte Orientierung: sie richten sich entlang der Mutter-Tochterzell-Achse aus. Der Wildtyp diente als Positiv-Kontrolle für eine korrekte Spindelorientierung. Eine Metaphase- bzw. Prä-Anaphase-Spindel galt als fehlorientiert, sobald ein Winkel zwischen dem Knospenhals und der Kernspindel kleiner als 45° zu messen war (Abbildung 4.25). Aus der quantitativen Auswertung ist ersichtlich, dass der Anteil der Fehlorientierung in allen vier Stämmen im logarithmisch wachsenden Zustand geringer war als der in Metaphase-arretierten Zellen. Die Einzelmutanten wiesen einen ähnlich niedrigen Wert auf wie der Wildtyp. Im Vergleich dazu hatte die *alk1Δ alk2Δ*-Mutante einen wesentlich höheren Zellanteil an fehlorientierten Spindeln mit knapp 30%. In beiden Metaphase-Arresten hatte der Wildtyp den geringsten Wert an falsch ausgerichteten Spindeln von ca. 8 % zu verzeichnen. Die Einzelmutante *alk1Δ* wies hingegen einen etwas erhöhten Anteil von ca. 14 % auf, ebenso stieg

die prozentuale Menge der fehlorientierten Spindeln in der *alk2Δ*-Mutante auf knapp 20 %. Mit Abstand am schlechtesten konnte die Doppelmutante ihre Spindeln entlang der Mutter-Tochter-Achse in der Metaphase ausrichten, denn ca. die Hälfte aller Zellen waren nicht mehr in der Lage ihre Spindeln richtig zu orientieren. Es scheint, dass die Abwesenheit eines einzelnen Haspin-Proteins keinen gravierenden Einfluss auf die Orientierung der Spindel hat, nur ihr simultanes Fehlen verursacht diesbezüglich einen starken Effekt. Beide Homologe könnten aufgrund ihrer kortikalen bzw. Knospenhals-Lokalisation einen Beitrag zu diesem Prozess leisten.

A



B



**Abbildung 4.25 Nur das simultane Fehlen von beiden Haspin-Proteinen beeinträchtigt die Spindelorientierung**

(A) Asynchrone Kulturen der Stämme BY4741, W10599 (*alk1Δ::URA3*), W10415 (*alk2Δ::natMX4*) und W4766 (*alk1Δ::URA3 alk2Δ::natMX4*) wurden mit Formaldehyd für die indirekte Immunfluoreszenz fixiert. Für Metaphase-arretierte Zellen wurden einerseits die Stämme (gemeinsamer Genotyp: *cdc20Δ::LEU2 ade2::pGALL-CDC20-ADE2*) W7809 (WT), W7810 (*alk1Δ::HIS3MX6*), W7811 (*alk2Δ::kanMX4*) und W7812 (*alk1Δ::HIS3MX6 alk2Δ::kanMX4*) in XYRG-Medium bis zu einer  $OD_{600} = 0,3$  angezogen und anschließend zur Repression des *GALL*-Promotors für 3 h in XYD-Medium inkubiert. Andererseits wurden Zellen der Stämme (gemeinsamer Genotyp: *cdc20-3*) W7813 (WT), W7814 (*alk1Δ::HIS3MX6*), W7815 (*alk2Δ::kanMX4*) und W7816 (*alk1Δ::HIS3MX6 alk2Δ::kanMX4*) in XYD-Medium bei 25°C bis zu einer  $OD_{600} = 0,3$  inkubiert, dann für den Metaphase-Arrest zu 37°C überführt und für 3 h kultiviert. Nach der Fixierung mittels Formaldehyd wurden die Mikrotubuli der Zellen mit dem Tub2-Antikörper in der indirekten Immunfluoreszenz-Mikroskopie visualisiert. Das Diagramm zeigt die quantitative Auswertung der Spindelorientierung von Prä-Anaphase-Zellen. Dabei wurde ein Winkel zwischen dem Knospenhals und der Zentralspindel  $< 45^\circ$  als Grenze für die Fehlorientierung festgelegt. Ausgezählt wurden jeweils 200 Zellen. (B) Schematische Darstellung zur Definition einer fehlorientierten Spindel. Der Septinring ist am Mutter-Tochterzell-Übergang in rot eingezeichnet.

Mit Hilfe des „*live-cell-imaging*“ war es möglich die Orientierung der Spindel von der Spindelpol-Duplikation bis zur Kerntrennung mikroskopisch zu verfolgen. In drei unabhängigen Ansätzen wurden detaillierte Erkenntnisse in dem dynamischen Prozess der

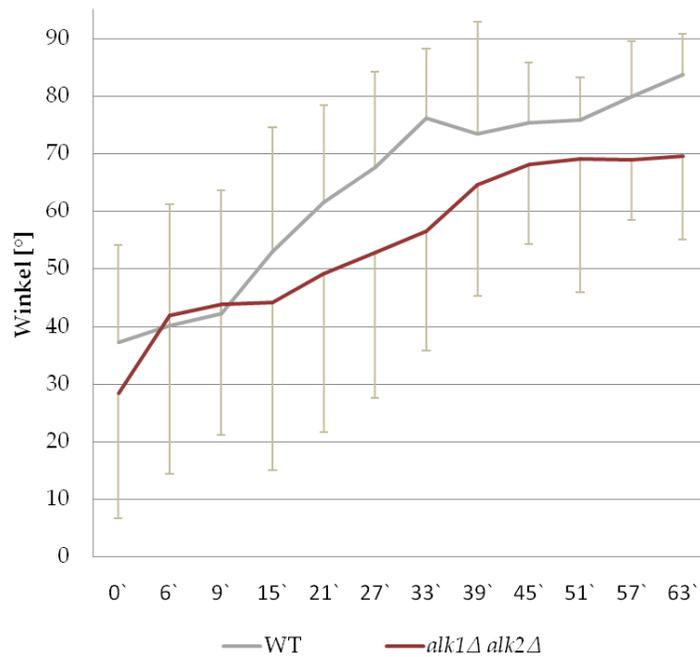
nukleären Mikrotubuli erlangt. Für die Analysen wurden Zellen des Wildtyps und der Doppelmutante bezüglich der Fehlorientierung der Spindel verglichen. Beide Stämme enthielten eine GFP-fusionierte Version des Spindelpolproteins Spc42 und Cdc11<sup>3xCherry</sup> zur Markierung des Septinrings. Dabei wurde die zentrale Spindel indirekt über die Achse, die durch die beiden SPB-Signale gelegt wurde, dargestellt. Die Winkel, die zwischen dem Septinring und der Kernspindel gemessen wurden, demonstrierten somit die Ausrichtung der Spindel zur Mutter-Tochter-Achse. Je kleiner dieser Winkel war, desto ausgeprägter war die Fehlorientierung.

Die erste graphische Auswertung stellt alle vermessenen Winkel zwischen dem Knospenhals und der Kernspindel als Mittelwerte über die Zeit dar. Dabei zeigte sich, dass der Wildtyp kurz nach der Duplikation der Spindelpolkörper einen geringen Winkel von ca. 40° aufwies. In der Literatur wird beschrieben, dass die duplizierten SPBs vorerst bis zur Etablierung der SPBs-Asymmetrie Seite-an-Seite parallel zum Knospenhals liegen (Segal et al., 2000). Dieses Bild zeigte sich in den mikroskopischen Analysen in Form einer Spindel-Querstellung zur Mutter-Tochter-Zellachse und deutete darauf hin, dass die Spindeln zu Beginn noch keine Orientierung erfahren. Der Wildtyp begann nach 15 min die Kernspindel entlang der Achse zu orientieren, da die gemessenen Werte ab diesem Zeitpunkt kontinuierlich bis zu einem Winkel von 70° anstiegen und bis zum Kerneintritt in die Tochterzelle in diesem Messbereich verblieben. Es muss noch erwähnt werden, dass eine Zelle nicht nur bei einem Winkel von exakt 90° die Anaphase zuließ. Aus den mikroskopischen Beobachtungen zeigte sich, dass die Zellen zwischen einem Winkel von 70° bis 90° mit der Kernelongation beginnen. Die Spindel der Haspin-Doppelmutante wurde - ähnlich wie der Wildtyp - anfänglich noch nicht ausgerichtet, wobei die resultierende Spindelfehlorientierung in der Mutante zeitlich länger andauerte. Dies zeigte sich im Diagramm - verglichen zum Wildtyp - in einer niedrigeren und flacheren Kurve, was bedeutet, dass die Zellen in der Abwesenheit von beiden Haspin-Homologen mehr Zeit benötigen, um die Spindel richtig auszurichten. Die Fehlerbalken entstanden aus einzelnen Zellen, bei denen extreme Werte gemessen wurden. Dennoch stellen die Kurven einen beobachtbaren Trend dar, der durch die folgende Analyse bekräftigt wurde. In dieser wurde die Ausrichtung der Kernspindel dargestellt, deren Winkel zwischen Spindel und Knospenhals weniger als 26° betrug und damit eine starke Fehlorientierung demonstrierte. Aus Abbildung 4.26 B geht hervor, dass der Wildtyp anfangs eine erhöhte Anzahl an Zellen hatte, deren Spindel noch nicht orientiert war. Nach 12 min reduzierte sich dieser Anteil zusehends und nach 27 min waren stark fehlorientierte Spindeln nicht mehr zu beobachten. Folglich konnte der Wildtyp innerhalb von kurzer Zeit seine Spindeln richtig - entlang der Mutter-Tochter-Achse - orientieren. In diesem Diagramm wird das Verhalten der Haspin-Doppelmutante bezüglich der Spindelorientierung besonders deutlich. Der nach der Spindelpol-Duplikation sehr hohe Anteil

## Ergebnisse

an Zellen (ca. 60 %), die noch keine Spindelorientierung erfahren, nahm zwar auch stetig ab, jedoch gab es noch nach 45 min eine nennenswerte Anzahl an Zellen mit einer stark fehlorientierten Spindel. Zum Einen kann aus den Ergebnissen geschlossen werden, dass die Abwesenheit von Haspin zu einer verstärkten Spindelfehlorientierung führt. Zum Anderen benötigen diese Zellen wesentlich mehr Zeit, um die Spindeln entlang der Mutter-Tochter-Achse auszurichten.

A



B

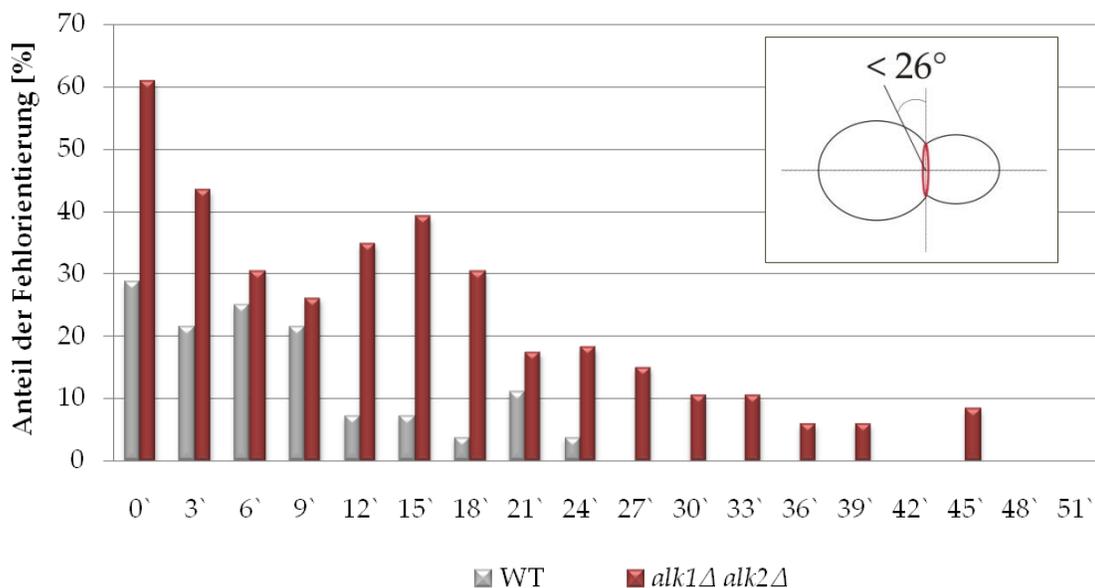


Abbildung 4.26 Die Spindelorientierung benötigt mehr Zeit in Abwesenheit von Haspin

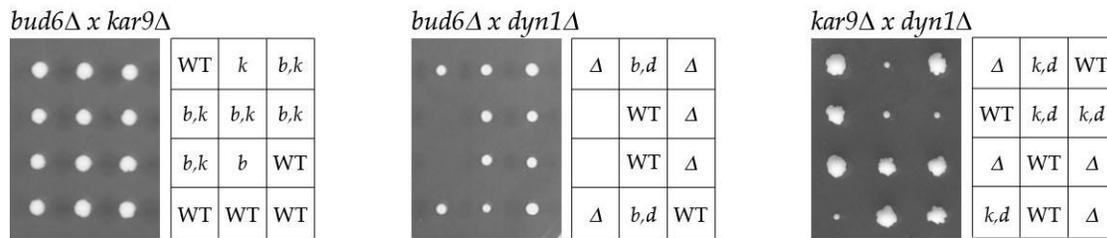
Asynchron in XYD-Medium wachsende Zellen der Stämme W10352 (*SPC42-yEGFP-tADH1-HIS3MX6*)

CDC11::CDC11-3xCHERRY-LEU2) und W10353 (*alk1Δ::URA3 alk2Δ::natMX4 SPC42-yEGFP-tADH1-HIS3MX6 CDC11::CDC11-3xCHERRY-LEU2*) wurden für die lebend-Zell-Mikroskopie unter einem 0,75 % SD++ Agaroseblöckchen positioniert und im inversen Mikroskop mit Hilfe eines *spinning-disk*-Systems analysiert. Eingesetzte Laserintensitäten: 488 nm-Laser Spc42<sup>GFP</sup> 10 %, 561 nm-Laser Cdc11<sup>3xCherry</sup> 25 %. Die Zeitraffer-Aufnahmen entstanden im Abstand von 5 min. **(A)** Gemessen wurde der Winkel zwischen dem Septinring und der Achse durch die beiden SPBs. Dargestellt ist der Verlauf der Mittelwerte der Winkel der Zellen, die bei Zeitpunkt 0 min ihre SPBs getrennt haben. Verfolgt wurden die Winkel bis zum Kerndurchtritt durch den Knospenhals. Die Fehlerbalken stellen den Betrag der Standardabweichungen der Messungen dar, wobei diese der Übersichtlichkeit halber nur in eine Richtung eingezeichnet sind **(B)** In diesem Diagramm ist der prozentuale Anteil an Zellen pro Zeitpunkt dargestellt, die einen Winkel zwischen dem Knospenhals und der Kernspindel < 26° aufwiesen. Vermessen wurden pro Stamm 28 Zellen.

## 4.4.2 Haspin ist kein Bestandteil bekannter Spindelorientierungswege

Bislang wurden der Bud6-„*capture-shrinkage*“ (Moore and Cooper, 2010), der frühe Aktin-abhängige Kar9- (Huisman et al., 2004) und der späte Aktin-unabhängige Dynein-Weg (Moore et al., 2009) der Spindelorientierung identifiziert. Der erste führt durch die Bud6-Lokalisation an der entstehenden Knospungsstelle und am -hals zu einer anfänglichen Orientierung der Spindel, da Bud6 Mikrotubuli-Plus-Enden einfängt (*capture*) und verhilft diese abzubauen (*shrinkage*). In der Literatur wird darüber diskutiert, ob dieser Weg als eigenständig angesehen werden kann. Im zweiten Weg, wird Kar9 über Bim1 (*binding to microtubules*) zu den Plus-Enden der astralen Mikrotubuli gebracht, wo der Komplex mit dem Myosin Myo2 wechselwirkt und Aktin-abhängig an den Kortex der Tochterzelle transportiert wird. Der dritte Weg der Spindelorientierung beinhaltet das Motorprotein Dynein. In Assoziation mit dem Dynaktin-Komplex lässt dieses kortikal gelegene Protein durch seine Minus-Enden gerichtete Motoraktivität die Mikrotubuli am Kortex entlang gleiten, wodurch auf die Spindel eine Kraft ausgeübt wird und zu dessen Orientierung beiträgt.

Der Kar9- und der Dynein-Weg stellen die genetisch definierten Wege für die Spindelorientierung dar. Sie sind funktionell überlappend, was sich in den genetischen Wechselwirkungen widerspiegelt: während die Abwesenheit des Kar9- oder des Dynein-Wegs zu keiner Beeinträchtigung der Zelle führt, wirkt sich ihr simultaner Verlust letal aus (Miller and Rose, 1998). Eine solche genetische Verbindung ist weder von Kar9 mit Bud6, noch von Dynein mit Bud6 bekannt. Die Tetraden-Analysen in Abbildung 4.27 führten zur Bestätigung der bisherigen Erkenntnisse.



**Abbildung 4.27 Genetische Interaktion von *kar9Δ* mit *dyn1Δ***

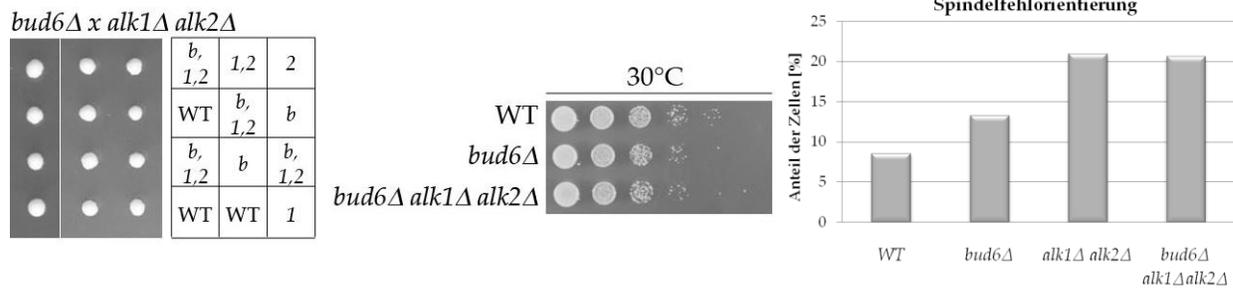
Zellen der Stämme W8095 (*bud6Δ::kanMX4*) und W8297 (*kar9Δ::HIS3MX6*), W8096 (*bud6Δ::kanMX4*) und W7887 (*dyn1Δ::kanMX4*) sowie W7266 (*kar9Δ::kanMX4*) und W7887 (*dyn1Δ::kanMX4*) wurden gekreuzt und zur Sporulation angesetzt. In der Tetraden-Analyse wurden die Sporen auf XYD-Platten vereinzelt und 3 Tage bei 30°C inkubiert. Die Bestimmung der Genotypen erfolgte mit Hilfe von Selektionsmarkern, wobei diese folgendermaßen bezeichnet wurden: WT (Wildtyp), *b* (*bud6Δ*), *k* (*kar9Δ*), *d* (*dyn1Δ*), Δ (entweder *bud6Δ*, *kar9Δ*, *dyn1Δ* oder *bud6Δ dyn1Δ*).

Die Beobachtungen der Spindelfehlorientierung der Haspin-Doppelmutante führten zu der Überlegung, dass die Haspin-Proteine Bestandteil eines bekannten Spindelorientierungswegs sein könnten. Sollte Haspin in einem der genetisch definierten Spindelorientierungswege mitbeteiligt sein, so müssten auch die Haspin-Deletionsmutanten in Kombination mit *kar9Δ* bzw. *dyn1Δ* eine eingeschränkte Lebensfähigkeit zur Folge haben. Falls Haspin bei der Spindelorientierung über den Bud6-Weg wirkt, könnte eine genetische Interaktion von *alk1Δ alk2Δ* mit *bud6Δ* in Form eines synthetischen Wachstumsdefekts resultieren. Zu diesem Zweck wurden Dreifachmutanten durch Kreuzung aus der Haspin-Doppelmutante und der Mutante *bud6Δ*, *kar9Δ* bzw. *dyn1Δ* hergestellt. Anschließend wurden diese in der Tetraden-Analyse, im Wachstumstest und im Mikroskop analysiert. In den Tetraden-Analysen als auch in den sensitiveren Wachstumstests auf Vollmediumplatten waren in allen drei Ansätzen keine synthetischen Wachstumsdefekte erkennbar (Abbildung 4.28 A, B, C). Die Einzelmutanten *bud6Δ*, *kar9Δ*, *dyn1Δ*, sowie alle möglichen resultierenden Kombinationen von *alk1Δ alk2Δ* mit diesen Spindelorientierungsmutanten bildeten Kolonien von Wildtyp-Größe. Zur Beurteilung der Spindelfehlorientierung im asynchronen Zustand wurden die Mikrotubuli in der indirekten Immunfluoreszenz-Mikroskopie visualisiert. Beim Verlust von Bud6 war nur ein geringer Anteil von Zellen mit einer unkorrekten Spindel-Ausrichtung zu verzeichnen. Die Deletion von *BUD6* bei gleichzeitiger Abwesenheit von *ALK1* und *ALK2* hatte keinen Anstieg der Spindel-Fehlorientierung im Vergleich zur Haspin-Doppelmutante zur Folge (Abbildung 4.28 A). Dasselbe Verteilungsmuster in der quantitativen Auswertung war auch in Kombination mit der *dyn1Δ*-Mutante zu sehen: während die Einzelmutante *dyn1Δ* einen Zellanteil von ca. 17 % mit fehlorientierten Spindeln zeigte, lagen die Dreifachmutante *dyn1Δ alk1Δ alk2Δ* und die Haspin-Doppelmutante *alk1Δ alk2Δ* bei einem Wert von ca. 20 % (Abbildung 4.28 C). Der Kar9-Weg zeigte ein etwas anderes Bild. Liakopoulos et al. zeigten, dass die *KAR9*-Deletionsmutante

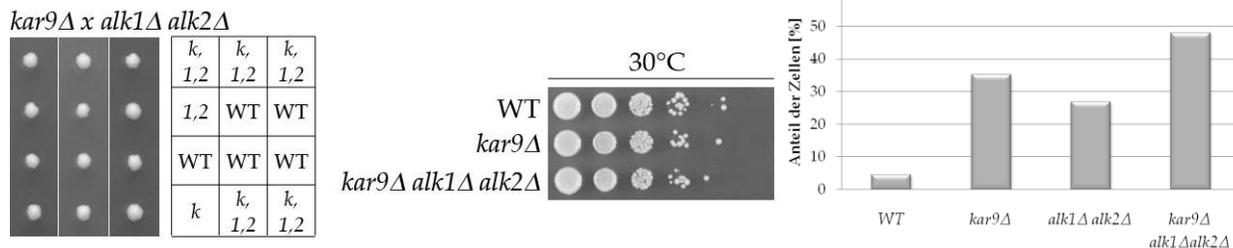
## Ergebnisse

überhaupt nicht mehr in der Lage ist ihre Spindeln bzw. Mikrotubuli zu orientieren (Liakopoulos et al., 2003). In dieser Analyse wurden lediglich ca. 30 % an Zellen mit einer fehlorientierten Spindel nachgewiesen. In Kombination mit *alk1Δ alk2Δ* stieg dieser Anteil sogar auf ca. 45 % (Abbildung 4.28 B). Diese Beobachtung könnte darauf hinweisen, dass Haspin einen Beitrag im Dynein-Weg zur Spindelorientierung leistet, wobei dieser aufgrund der fehlenden genetischen Interaktion von untergeordneter Rolle sein dürfte.

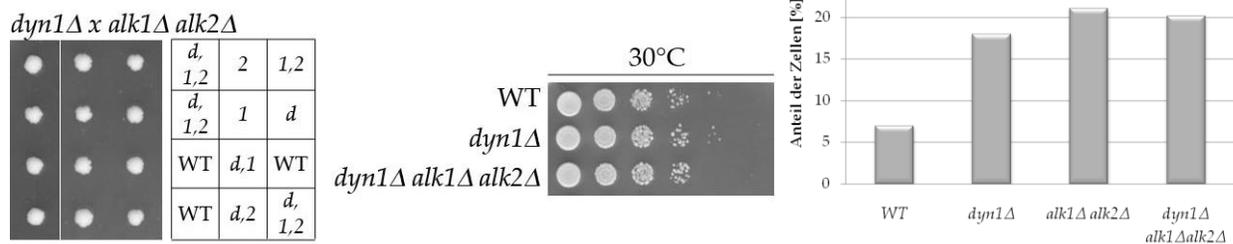
A



B



C



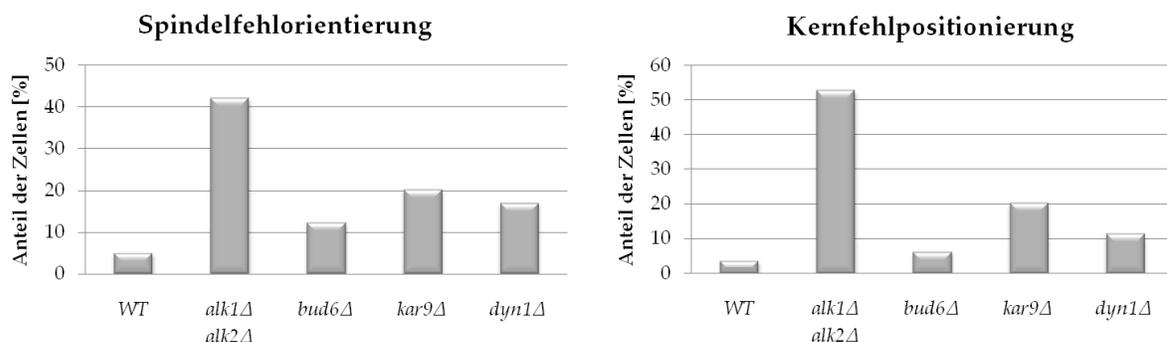
**Abbildung 4.28 Keine genetische Interaktion von *alk1Δ alk2Δ* mit Spindelorientierungsmutanten**

Die Haspin-Doppelmutante W4766 (*alk1Δ::URA3 alk2Δ::natMX4*) wurde mit dem Stamm (A) W8095 (*bud6Δ::kanMX4*), (B) W7265 (*kar9Δ::kanMX4*) und (C) W7887 (*dyn1Δ::kanMX4*) gekreuzt, zur Sporulation angesetzt und einer Tetraden-Analyse unterzogen. Die Bezeichnung der Genotypen erfolgte folgendermaßen: WT (Wildtyp), *b* (*bud6Δ*), *k* (*kar9Δ*), *d* (*dyn1Δ*), 1 (*alk1Δ*), 2 (*alk2Δ*). Stationäre Kulturen der Stämme BY4741 (Wildtyp), (A) W8095 (*bud6Δ::kanMX4*), W8444 (*bud6Δ::kanMX4 alk1Δ::URA3 alk2Δ::natMX4*), (B) W7265 (*kar9Δ::kanMX4*), W7268 (*kar9Δ::kanMX4 alk1Δ::URA3 alk2Δ::natMX4*), (C) W7887 (*dyn1Δ::kanMX4*) und W8258 (*dyn1Δ::kanMX4 alk1Δ::URA3 alk2Δ::natMX4*) wurden in Verdünnungsreihen auf XYD-Mediumplatten überführt und bei 25°C, 30°C und 37°C für 3 Tage inkubiert. Nachdem sich keine Wachstumsunterschiede bei den verschiedenen Temperaturen zeigten,

## Ergebnisse

wurde nur eine dargestellt. Für die indirekte Immunfluoreszenz-Mikroskopie wurden die Stämme in der logarithmischen Wachstumsphase mit Formaldehyd fixiert. Die Visualisierung der Mikrotubuli-Strukturen erfolgte mit  $\alpha$ -Tub2. Das Diagramm zeigt die quantitative Auswertung der Spindelorientierung von Prä-Anaphase-Zellen, die noch keinen elongierten Kern aufwiesen. Ein Winkel zwischen dem Knospenhals und der Zentralspindel von  $< 45^\circ$  wurde als Grenze für die Spindelfehlorientierung festgelegt. Ausgezählt wurden jeweils 150 Zellen.

Zur Untersuchung, ob die Haspin-Doppelmutante Ähnlichkeiten bezüglich der Spindelfehlorientierung mit den Einzelmutanten *bud6 $\Delta$* , *kar9 $\Delta$*  bzw. *dyn1 $\Delta$*  in der Metaphase hat, wurde die Ausrichtung der Kernspindel in diesen Stämmen verglichen. Des Weiteren wurde die Lokalisation des Kerns bestimmt, wobei ein sich am Kortex befindender Nukleus als fehlorientiert galt. Aus den Diagrammen der Spindelfehlorientierung und der Kernfehlpositionierung ist ersichtlich, dass in der Metaphase die erhöhte Spindelfehlorientierung, sowie der kortikal-lokalisierte Kern spezifisch für die Haspin-Doppelmutante waren (Abbildung 4.29). Weder die Deletion von *BUD6*, noch die von *KAR9* oder *DYN1* lieferten einen so hohen Anteil an Zellen mit diesen Phänotypen. Die *kar9 $\Delta$* -Mutante zeigte von den Spindelorientierungsmutanten in der Metaphase den höchsten Wert in beiden Kategorien und ähnelte somit noch am ehesten der Haspin-Doppelmutante. Auch diese Beobachtung schließt eine Beteiligung von Haspin in dem Dynein-Weg der Spindelorientierung nicht aus. Jedoch erscheint es, aufgrund des für Haspin spezifischen Phänotyps, eher unwahrscheinlich. Aus der Literatur ist bekannt, dass die Kernposition durch die astralen Mikrotubuli gesteuert wird. Folglich resultieren Störungen der zytoplasmatischen Spindelstrukturen häufig in einer nicht korrekten Kernpositionierung (Hoepfner et al., 2002). Wie in Abbildung 4.29 zu erkennen ist, spiegelte sich die von Hoepfner et al. beschriebene Feststellung in diesen Untersuchungen wider, da die Kernpositionierung und die Spindelfehlorientierung in gleicher Weise verändert waren.



**Abbildung 4.29 Spindelfehlorientierung und Kernfehlpositionierung spezifisch für *alk1 $\Delta$  alk2 $\Delta$***

In XYRG-Medium wachsende Zellen der Stämme (gemeinsamer Genotyp: *natNT2-pGALL-CDC20*) W9145 (WT), W9185 (*alk1 $\Delta$ ::URA3 alk2 $\Delta$ ::natMX4*), W9396 (*bud6 $\Delta$ ::kanMX4*), W9239 (*kar9 $\Delta$ ::HIS3MX6*) und W9238

## Ergebnisse

---

(*dyn1Δ::kanMX4*) wurden in XYD-Medium überführt und für 3 h in Metaphase arretiert. Nach der Fixierung mit Formaldehyd wurden die Zellen für die indirekte Immunfluoreszenz-Mikroskopie aufgearbeitet. Die Visualisierung der Mikrotubuli-Strukturen erfolgte mit  $\alpha$ -Tub2. Das Diagramm zeigt die quantitative Auswertung der Spindelorientierung von Prä-Anaphase-Zelle. Dabei wurde ein Winkel zwischen dem Knospenhals und der Zentralspindel von  $< 45^\circ$  als Grenze für die Spindelfehlorientierung festgelegt. Ein am Kortex lokalisierender Kern galt als fehlpositioniert. In beiden Diagrammen wurden jeweils 150 Zellen pro Stamm ausgezählt.

Aus den bisherigen Ergebnissen kann geschlussfolgert werden, dass die Haspin-Proteine keine Komponenten der bekannten Wege der Spindelorientierung sind. Deswegen kam die Idee auf, dass Haspin in einem neuen, unabhängigen Weg zur Orientierung der Spindel beitragen könnte. Nachdem die Doppelmutante *kar9Δ dyn1Δ* zwar ein sehr schlechtes Wachstum zeigt, jedoch nicht vollständig letal ist, sollte im Falle eines existierenden Haspin-Spindelorientierungsweges die Vierfachmutante nicht mehr lebensfähig sein. Hierfür wurde die *kar9Δ dyn1Δ*-Mutante mit der Haspin-Doppelmutante gekreuzt. Die nach der Meiose generierten Stämme wurden in der Tetraden-Analyse, sowie im Wachstumstest hinsichtlich ihrer Koloniengröße beurteilt. Zur weiteren Charakterisierung wurde ihr DNA-Gehalt von asynchronen Kulturen in durchflusszytometrischen Messungen bestimmt und ihre Mikrotubuli-Strukturen mikroskopisch überprüft. Interessanterweise zeigte die generierte Vierfachmutante *kar9Δ dyn1Δ alk1Δ alk2Δ* ein verbessertes Wachstum im Vergleich zur *kar9Δ dyn1Δ*-Doppelmutante. Es trat hier keine weitere synthetische Letalität auf, sondern eine genetische Interaktion in Form von einer partiellen Suppression (Abbildung 4.30 A). Auch in der Durchflusszytometrie konnte das verbesserte Wachstum der Vierfachmutante gezeigt werden. Die Doppelmutante *kar9Δ dyn1Δ* wies einen stark erhöhten Anteil an Zellen auf, deren DNA-Gehalt kleiner war, als der eines einfachen Chromosomensatzes. Zudem verzeichnete das Profil einen Anstieg an Zellen, die mehr als den replizierten DNA-Gehalt hatten. Der Anteil an Zellen mit diesen Phänotypen nahm deutlich ab, wenn zusätzlich noch *ALK1* und *ALK2* deletiert wurden (Abbildung 4.30 B). Ebenso bestätigten die mikroskopischen Analysen eine verbesserte Vitalität der Vierfachmutanten. Die Beobachtungen lieferten einen erhöhten Anteil an Zellen mit normal ausgerichteten, astralen Mikrotubuli, während der von zerstörten Spindelstrukturen wesentlich geringer war, als in der *kar9Δ dyn1Δ*-Doppelmutante (Abbildung 4.30 C). Charakteristisch für die letzt genannte Mutante war der stark erhöhte Anteil an Zellen, die 2 Kerne in einem Zellkörper aufwiesen. In der Vierfachmutante war dieser Phänotyp seltener zu beobachten, was bedeuten könnte, dass in diesen Stämmen die Orientierung der Spindel und damit die Kernaufteilung wieder besser funktioniert.

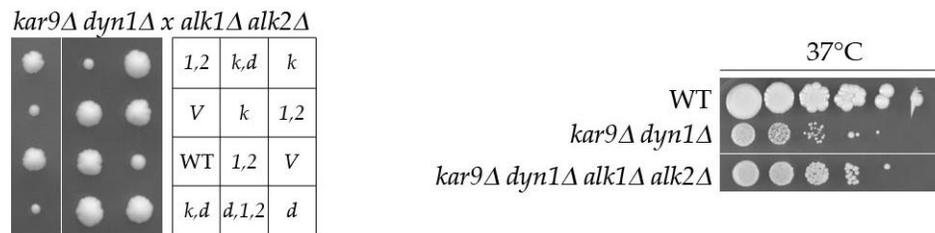
Es wurde auch überprüft, ob die Defekte der Spindelorientierung durch den Kontrollmechanismus des SPOCs erkannt werden. Jedoch zeigte weder die Dreifachmutante

# Ergebnisse

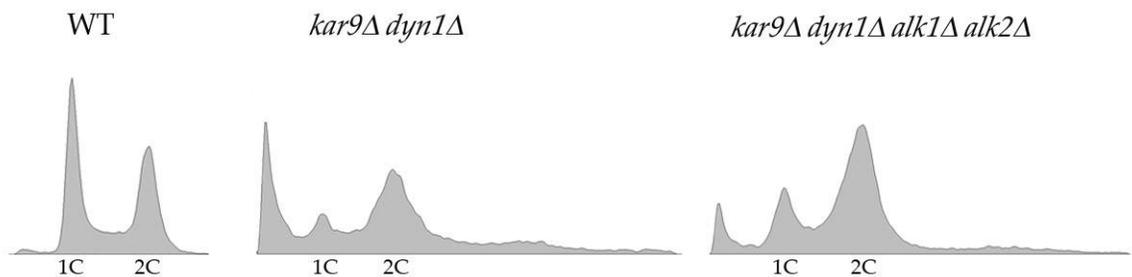
*bub2Δ alk1Δ alk2Δ*, noch *bfa1Δ alk1Δ alk2Δ* in der Tetraden-Analyse einen synthetischen Effekt, so dass daraus geschlossen werden kann, dass diese Spindelstörungen nicht von dem „checkpoint“ registriert werden (Daten nicht gezeigt).

Die Ergebnisse legen nahe, dass kein dritter Haspin-spezifischer Weg der Spindelorientierung existiert. Dennoch stehen die Haspin-Proteine in Beziehung mit dem Kar9- und Dyn1-Weg der Spindelorientierung. Eine mögliche Hypothese wäre, dass Haspin in diesem Kontext die Dynamik von Mikrotubuli direkt beeinflussen oder über Kortex-Wechselwirkungen die Ausrichtung der Spindel steuern könnte.

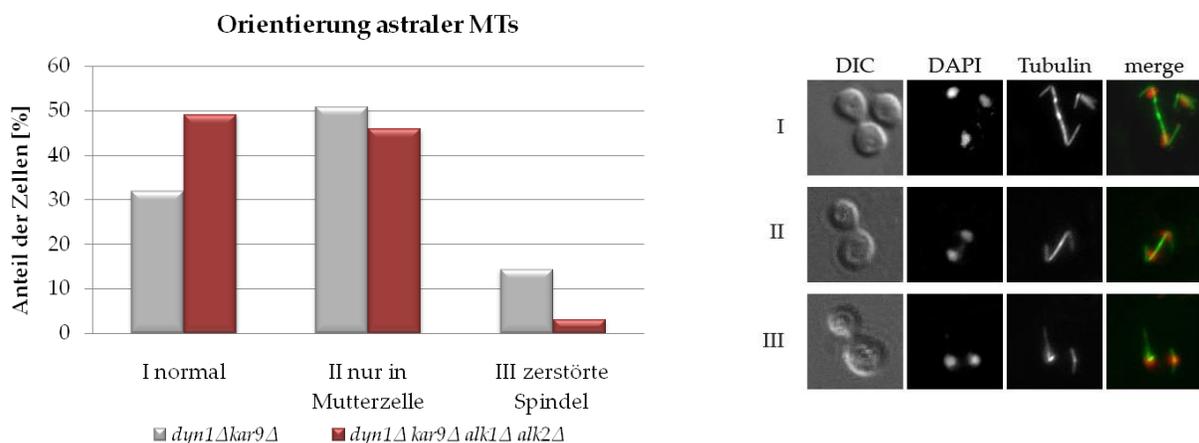
A



B



C



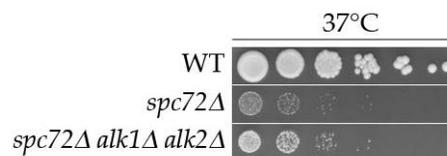
**Abbildung 4.30 *alk1Δ alk2Δ* supprimieren den *kar9Δ dyn1Δ*-Phänotyp**

(A) Der Stamm W8262 (*kar9Δ::HIS3MX6*) wurde mit dem Stamm W8258 (*dyn1Δ::kanMX4 alk1Δ::URA3 alk2Δ::natMX4*) gekreuzt, zur Sporulation angesetzt und einer Tetraden-Analyse unterzogen. Die Bezeichnung der Genotypen erfolgte folgendermaßen: WT (Wildtyp), *k* (*kar9Δ*), *d* (*dyn1Δ*), 1 (*alk1Δ*), 2 (*alk2Δ*), *V* (*kar9Δ dyn1Δ alk1Δ alk2Δ*). Stationäre Kulturen der Stämme BY4741 (Wildtyp), W8382 (*kar9Δ::HIS3MX6 dyn1Δ::kanMX4*) und W8383 (*kar9Δ::HIS3MX6 dyn1Δ::kanMX4 alk1Δ::URA3*)

*alk2Δ::natMX4*) wurden in Verdünnungsreihen auf XYD-Mediumplatten überführt und bei 25°C, 30°C und 37°C für 3 Tage inkubiert. Nachdem sich keine Wachstumsunterschiede bei den verschiedenen Temperaturen zeigten, wurde nur eine dargestellt. **(B)** Die unter (A) im Wachstumstest beschriebenen Stämme wurden bei einer  $OD_{600} < 1$  für die durchflusszytometrische Bestimmung des DNA-Gehalts ethanolfixiert und aufgearbeitet. **(C)** Für die indirekte Immunfluoreszenz-Mikroskopie wurden die Stämme in der logarithmischen Wachstumsphase mit Formaldehyd fixiert. Die Visualisierung der Mikrotubuli-Strukturen erfolgte mit  $\alpha$ -Tub2, die DNA wurde mit DAPI sichtbar gemacht. Das Diagramm zeigt die quantitative Auswertung der Orientierung der astralen Mikrotubuli der beiden SPBs. Dabei wurden die Mikrotubuli-Strukturen nach folgenden Kriterien kategorisiert: 1. normale Kontakte der astralen MTs in beide Zellkörper, 2. Kontakte der astralen MTs nur an dem Kortex der Mutterzelle, 3. zerstörte Spindel. Ausgezählt wurden pro Stamm jeweils 300 Zellen.

### 4.4.3 Haspin beeinflusst Dynamik der Mikrotubuli

Bei der Orientierung der Spindel spielt die Dynamik der Mikrotubuli eine wesentliche Rolle. Dabei können zu dynamische als auch zu steife Mikrotubuli diesen Prozess erschweren (Gupta et al., 2002; Hoepfner et al., 2002). In der vorangegangenen Diplomarbeit konnte eine genetische Interaktion von Haspin und dem Spindelpolprotein Spc72 bestätigt werden (Swoboda, 2008). Dieses Protein lokalisiert auf der zytoplasmatischen Seite des SPBs und sorgt dort als astraler Mikrotubuli-Anker für die Spindel- und Kernausrichtung (Soues and Adams, 1998). Die Deletion von *SPC72* führt zu sehr kurzen, instabilen bzw. zur Abwesenheit von astralen Mikrotubuli, so dass die resultierenden Auswirkungen vergleichbar mit hoch dynamischen Mikrotubuli sind. Der *spc72Δ*-Phänotyp zeichnete sich durch ein sehr schlechtes Wachstum aus, wie in dieser Arbeit nochmals bestätigt werden konnte. Entgegen der *spc72Δ*-Einzelmutante wuchs die Dreifachmutante *spc72Δ alk1Δ alk2Δ* wieder besser (Abbildung 4.31). Der supprimierte Phänotyp der *spc72Δ*-Mutante könnte dadurch bedingt sein, dass die Abwesenheit von beiden Haspin-Proteinen zur Stabilität der wenigen Mikrotubuli führt. Im Rückschluss könnten Alk1 und Alk2 an der Destabilisierung von Mikrotubuli beteiligt sein.



**Abbildung 4.31 *alk1Δ alk2Δ* supprimieren den *spc72Δ*-Phänotyp**

Stationäre Kulturen der Stämme BY4741 (Wildtyp), W7247 (*spc72::kanMX4*) und W7250 (*spc72::kanMX4 alk1Δ::URA3 alk2Δ::natMX4*) wurden in Verdünnungsreihen auf XYD-Mediumplatten überführt und bei 25°C, 30°C und 37°C für 3 Tage inkubiert. Nachdem sich keine Wachstumsunterschiede bei den verschiedenen Temperaturen zeigten, wurde nur eine dargestellt.

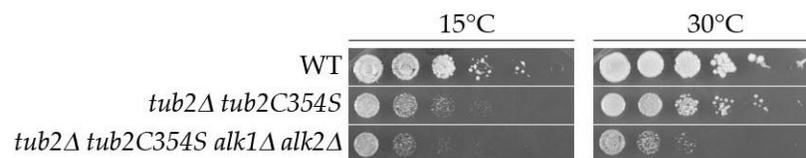
Zur weiteren Überprüfung des Einflusses von Haspin auf die Stabilität von Mikrotubuli, wurde

eine Tubulin-Mutante, die in der Literatur mit einer geringeren Mikrotubuli-Dynamik beschrieben wird, durch Klonierung hergestellt. Dabei wurde im *TUB2*-Gen an Position 354 das Cystein gegen ein Serin ausgetauscht (Huisman et al., 2004). Die Null-Mutante von *TUB2* ist letal. Aus diesem Grund wurde ein *ARS/CEN*-Plasmid mit der mutierten *tub2*-Version zuerst in einen heterozygot, diploiden Stamm *tub2Δ /TUB2* transformiert. Nach der Sporulation und der Tetraden-Analyse wurden Stämme erhalten, die im Genom *TUB2* deletiert hatten und durch die mutierte Version *tub2 C354S* auf dem Plasmid gerettet wurden. Dieser Stamm wurde anschließend mit der Haspin-Doppelmutante weitergekreuzt.

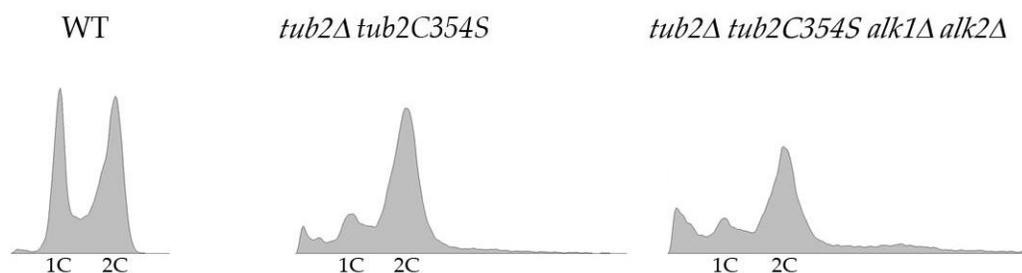
Wie aus Abbildung 4.32 zu erkennen ist, zeigte die Tubulin-Mutante im Vergleich zum Wildtyp eine wesentlich geringere Koloniengröße. In Kombination mit den Haspin-Deletionen verschlechterte sich das Wachstum zunehmend (Abbildung 4.32 A). Auch in den durchflusszytometrischen Analysen konnte der schlechtere Zustand der Dreifachmutante beobachtet werden. Die *tub2*-Mutante wies einen geringen Anteil an Zellen mit einem weniger als einfachen (< 1 C) und einem mehr als doppelten (> 2 C) DNA-Gehalt auf. Diese Anteile erhöhten sich sichtbar in der Dreifachmutante *tub2 C354S alk1Δ alk2Δ* (Abbildung 4.32 B). Bei der Visualisierung der Mikrotubuli zeigte sich zudem, dass die astralen Mikrotubuli-Strukturen der Tubulin-Mutante besser normale, kortikale Verbindungen zur Tochterzelle eingehen konnten. Im Gegensatz hierzu, knüpften die tochter-spezifischen Plus-Enden der astralen Mikrotubuli der Dreifachmutanten vermehrt Kontakte zum Knospenhals und an den Mutterzell-Kortex (Abbildung 4.32 C). Der Grund für das verschlechterte Wachstum der Dreifachmutanten könnte sein, dass die stabilen Mikrotubuli der *tub2 C354S*-Mutante durch die Abwesenheit der Haspin-Proteine noch weiter stabilisiert werden und folglich keine normalen Verbindungen zum Kortex der Tochterzelle eingegangen werden.

Diese Beobachtungen der *tub2*-Mutante unterstützen auch die Vermutung, dass die Haspin-Homologen die Mikrotubuli-Strukturen dynamisch halten könnten.

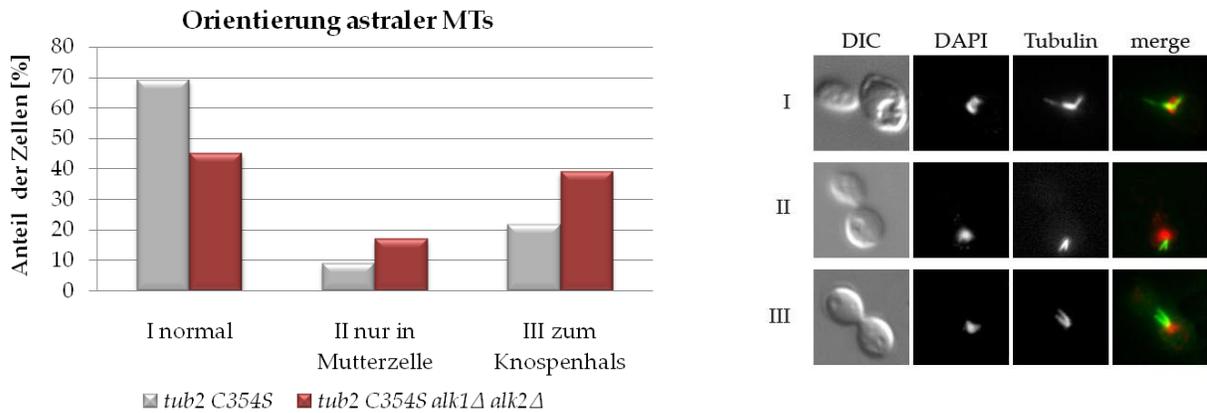
A



B



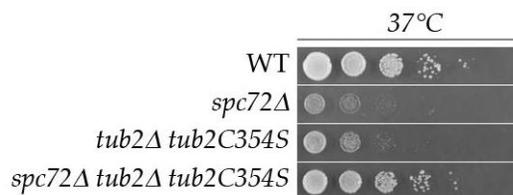
C



**Abbildung 4.32 *alk1Δ alk2Δ* verstärkten den *tub2Δ C354S*-Phänotyp**

(A) Stationäre Kulturen der Stämme BY4741 (Wildtyp), W8418 (*tub2Δ::kanMX4 pTUB2-tub2-C354S-tCYC1-LEU2*) und W8419 (*tub2Δ::kanMX4 pTUB2-tub2-C354S-tCYC1-LEU2 alk1Δ::URA3 alk2Δ::natMX4*) wurden in Verdünnungsreihen auf XYD-Mediumplatten überführt und bei 15°C, 25°C, 30°C und 37°C für 3 - 6 Tage inkubiert. (B) Die Zellen wurden in Selektivmedium bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,7 kultiviert und anschließend für die Durchflusszytometrie aufgearbeitet. (C) Für die indirekte Immunfluoreszenz-Mikroskopie wurden die Stämme in der logarithmischen Wachstumsphase mit Formaldehyd fixiert. Die Visualisierung der Mikrotubuli-Strukturen erfolgte mit  $\alpha$ -Tub2, die DNA wurde mit DAPI sichtbar gemacht. Das Diagramm zeigt die quantitative Auswertung der Orientierung der astralen Mikrotubuli der beiden SPBs. Dabei wurden die Mikrotubuli-Strukturen nach folgenden Kriterien kategorisiert: 1. normale Kontakte der astralen MTs in beide Zellkörper, 2. Kontakte der astralen MTs nur an dem Kortex der Mutterzelle, 3. Kontakte der astralen MTs nur an dem Knospenhals. Ausgezählt wurden pro Stamm jeweils 300 Zellen.

Ein weiteres Ergebnis unterstützt die obige Hypothese. Wie aus Abbildung 4.33 hervorgeht, zeigte die Kombination der *tub2 C354S*- mit der *spc72Δ*-Mutante ein verbessertes Wachstum (Abbildung 4.33). Somit bewirkte die *tub2 C354S*-Mutation denselben Effekt auf das Wachstum des *spc72Δ*-Stammes, wie die simultane Deletion von *ALK1* und *ALK2*. Das heißt, dass die Abwesenheit von Haspin eine ähnliche Wirkung, wie die Mikrotubuli stabilisierende *tub2*-Mutation hat und im Rückschluss die Haspin-Proteine die Dynamik dieser Zytoskelett-Komponente unterstützen könnten.



**Abbildung 4.33 *tub2Δ C354S*-Mutante supprimiert den *spc72Δ*-Phänotyp**

Stationäre Kulturen der Stämme BY4741 (WT), W7247 (*spc72::kanMX4*), W8418 (*tub2Δ::kanMX4 pTUB2-tub2-C354S-tCYC1-LEU2*) und W8926 (*spc72::kanMX4 tub2Δ::kanMX4 pTUB2-tub2-C354S-tCYC1-LEU2*) wurden in Verdünnungsreihen auf XYD-Mediumplatten überführt und bei 25°C, 30°C und 37°C für 3

Tage inkubiert. Nachdem sich keine Wachstumsunterschiede bei den verschiedenen Temperaturen zeigten, wurde nur eine dargestellt.

## 4.5 Zusammenhang von Haspin und Histon H3 Threonin 3 in *S. cerevisiae*

Um die Wirkung von Kinasen zu verstehen, ist es erforderlich die Zielproteine zu kennen. Im Falle der Haspin-Kinase wurde das Histon H3 Threonin 3 als Substrat entdeckt (Higgins, 2010). Denn, einerseits führte der Verlust von Haspin durch *RNAi* zu einem Ausbleiben dieser Modifikation, andererseits ging die Überexpression mit einer Verstärkung der Phosphorylierung einher (Dai et al., 2005). In Abwesenheit von Haspin wurden mitotische Störungen beobachtet, die der fehlenden Modifikation an Histon H3 T3 zugeschrieben wurden. In der Bäckerhefe gibt es bislang noch keine Anhaltspunkte dafür, dass die Haspin-Homologen Alk1 und Alk2 das Histon H3 an Threonin 3 phosphorylieren und darüber ihre Funktion im Zellteilungszyklus ausführen.

Zur Überprüfung, ob in diesem Modellorganismus die Histon H3 T3-Phosphorylierung einen Beitrag zur Funktion der Haspin-Homologen leistet, wurde ein Stamm generiert, bei dem das Threonin 3 des Histons H3 durch Alanin ausgetauscht wurde, so dass keine potentielle Phosphorylierung von Haspin mehr möglich war. Das Histon H3 hat in *S. cerevisiae* die zwei offenen Leserahmen *HHT1* und *HHT2*. Mindestens eines der redundanten Gene ist für die Lebensfähigkeit erforderlich, da die simultane Abwesenheit Letalität nach sich zieht. Zur Herstellung des Stammes wurde ein Plasmid mit der mutierten Version des Histon H3 T3A durch Transformation stabil in den endogenen *HHT1*-Promotor des heterozygot-diploiden Stammes *HHT1/hht1Δ HHT2/hht2Δ* integriert. Anschließend erfolgten die Sporulation und die Tetraden-Analyse. Der resultierende Stamm (*H3 T3A*) war lebensfähig und wuchs wie der Wildtyp. Daraus kann geschlossen werden, dass der Threoninrest bzw. die potentielle Phosphorylierbarkeit nicht essentiell ist.

### 4.5.1 H3 T3A-Phänotyp korreliert nicht mit dem der *alk1Δ alk2Δ*-Mutante

Um die Frage der Histon H3 T3-Phosphorylierung durch Haspin in *S. cerevisiae* zu klären, wurde folgende Überlegung angestellt: Sollte in der Bäckerhefe Haspin die Kinase der Histon H3 T3-Phosphorylierung sein und darüber seine Funktionen ausüben, müsste die Histon-Mutante die gleichen Phänotypen wie die Haspin-Doppelmutante zeigen. Hierfür wurden folgende Phänotypen der Haspin-Doppelmutante in der Histon H3 T3A-Mutante überprüft: zum Einen wurde eine genetische Interaktion mit der *cin8Δ*-Mutante untersucht und zum Anderen wurde in mikroskopischen Analysen die Zellmorphologie und die Spindel-fehlorientierung in der Metaphase betrachtet. Durch Kreuzung und anschließender Tetraden-

# Ergebnisse

Analyse wurde ein Stamm generiert, der die Histon-Mutation in Kombination mit der *CIN8*-Deletion aufwies.

Das Wachstumsverhalten der *H3 T3A cin8Δ*-Kolonien war sowohl in der Tetraden-Analyse als auch im Wachstumstest unbeeinträchtigt und unterschied sich nicht von den Zellen des Wildtyps (Abbildung 4.34 A, B). Zur Verdeutlichung ist in Abbildung 4.34 A, B zum Vergleich der synthetische Wachstumsdefekt der Dreifachmutante *alk1Δ alk2Δ cin8Δ* dargestellt, der sich auch im Wachstumstest widerspiegelte.

Auch im Mikroskop konnte die Histon *H3 T3A*-Mutante nicht die Phänotypen der Haspin-Doppelmutante reproduzieren. In der Metaphase wies dieser Stamm, wie der Wildtyp, keine überdimensional große Tochterzelle, sondern zwei relativ gleich große Zellkörper auf. Zudem waren die Spindeln entlang der Mutter-Tochter-Achse orientiert. Wie aus der quantitativen Auswertung hervorgeht, war die Spindelfehlorientierung spezifisch für die Haspin-Doppelmutante.

Nachdem die charakteristischen Phänotypen der Haspin-Doppelmutante in der Histon-Mutante nicht beobachtet werden konnten, kann davon ausgegangen werden, dass diese nicht aus der fehlenden Histon H3 Threonin 3 Phosphorylierung resultieren. Es erscheint wahrscheinlicher, dass in *S. cerevisiae* Haspin seine Funktion über andere Substrate ausübt. Ob die Haspin-Homologen jedoch definitiv nicht zur Modifikation dieser Stelle beitragen, kann nicht bestätigt werden.

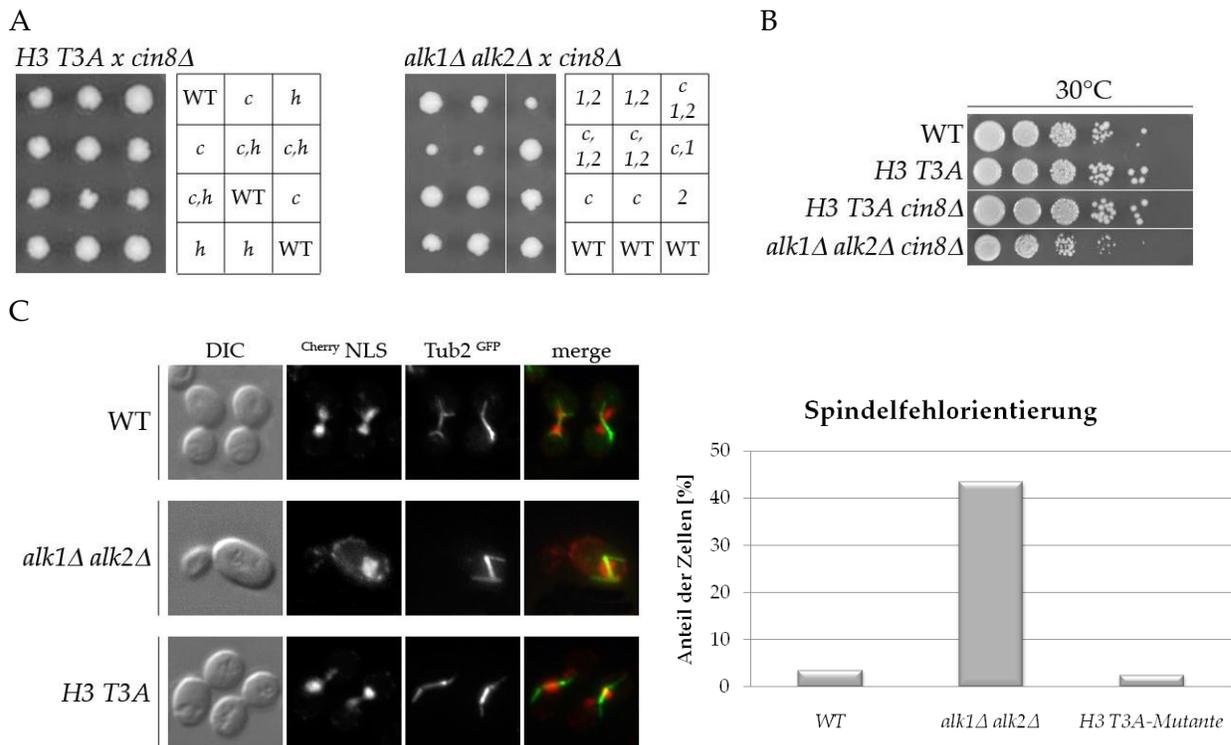


Abbildung 4.34 *H3 T3A*-Mutante spiegelt nicht *alk1Δ alk2Δ* Phänotyp wider

Zellen der Stämme **(A)** W8927 (*cin8Δ::kanMX4*) und W9920 (*hht1Δ::HIS3MX6 hht2Δ::natMX4 phht1::pHHT1-hht1-T3A-tCYC1-URA3*) bzw. W8927 und W4766 (*alk1Δ::URA2 alk2Δ::natMX4*) wurden zur Sporulation angesetzt und einer Tetraden-Analyse unterzogen. Die Bezeichnung der Genotypen erfolgte folgendermaßen: WT (Wildtyp), *c* (*cin8Δ*), *h* (*T3A*), *1* (*alk1Δ*), *2* (*alk2Δ*), *T* (*cin8Δ alk1Δ alk2Δ*). **(B)** Stationäre Kulturen der Stämme BY4741 (WT), W9920 (*hht1Δ::HIS3MX6 hht2Δ::natMX4 phht1::pHHT1-hht1-T3A-tCYC1-URA3*), W10012 (*cin8Δ::kanMX4 hht1Δ::HIS3MX6 hht2Δ::natMX4 phht1::pHHT1-hht1-T3A-tCYC1-URA3*) und W7255 (*cin8Δ::kanMX4 alk1Δ::URA2 alk2Δ::natMX4*) wurden in Verdünnungsreihen auf XYD-Mediumplatten überführt und bei 25°C, 30°C und 37°C für 3 Tage inkubiert. Nachdem sich keine Wachstumsunterschiede bei den verschiedenen Temperaturen zeigten, wurde nur eine dargestellt. **(C)** Für die indirekte Immunfluoreszenz-Mikroskopie wurden die Zellen der Stämme (gemeinsamer Genotyp: *natNT2-pGALL-CDC20*) W9145 (WT), W9185 (*alk1Δ::URA2 alk2Δ::natMX4*) und W10156 (*hht1Δ hht2Δ phht1::pHHT1-hht1-T3A-tCYC1-URA3*) bei einer OD<sub>600</sub> = 0,3 in XYD-Medium überführt, um den *GALL*-Promotor bei 25°C zu reprimieren. Die für 3 h in Metaphase arretierten Proben wurden mit Formaldehyd fixiert. Die Visualisierung der Mikrotubuli-Strukturen erfolgte mit  $\alpha$ -Tubulin, die DNA wurde mit DAPI gefärbt. Das Diagramm zeigt die quantitative Auswertung der Spindelfehlorientierung von Metaphase-arretierten Zellen. Dabei wurde ein Winkel zwischen dem Knospenhals und der Zentralspindel von < 45° als Grenze für die Spindelfehlorientierung festgelegt. Ausgezählt wurden jeweils 325 Zellen.

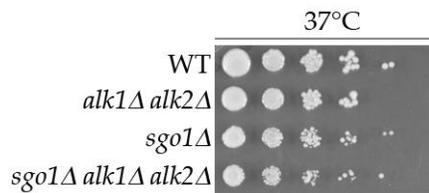
## 4.5.2 Keine Verbindung von Haspin zu CPC-Komponenten

Jüngste Studien in *S. pombe* und Säugerzellen zeigten, dass Haspin durch die Histon H3 T3ph einen Beitrag zur Definition des inneren Zentromers und damit zur CPC-(*chromosomal passenger complex*) Positionierung leistet (Kelly et al., 2010; Wang et al., 2010; Yamagishi et al., 2010). Das dabei von Yamagishi et al. (2010) postulierte Modell beinhaltet zwei unabhängige Signaltransduktionswege, die zusammen wichtig für die korrekte Lokalisation des CPCs sind. Der erste Weg beinhaltet die Phosphorylierung der Bub1-Kinase an H2A S121, worüber Shugoshin an das Histon binden kann und die CPC-Anheftung vermittelt. Der zweite Weg umfasst Pds5, Haspin, Histon H3 und Survivin. Durch die Interaktion des N-terminalen Bereichs von Haspin mit dem Kohäsin-assoziierten Protein Pds5 kommt es zur Modifikation von Histon H3 T3. Über diese kann Survivin mittels seiner BIR-Domäne an Histon H3 binden, wodurch die CPC-Lokalisation entscheidend beeinflusst wird. In *S. pombe* wurde in Wachstumstesten gezeigt, dass die beiden Wege redundant sind, da der Ausfall von einem System keine sichtbaren Wachstumsdefekte zur Folge hatte. Die gleichzeitige Abwesenheit von Schlüsselproteinen beider Signaltransduktionswege führte hingegen zur Letalität der Zellen, was Yamagishi et al. (2010) durch die simultane Deletion von Shugoshin und Haspin zeigten. Um den Sachverhalt dieser genetischen Interaktion in der Bäckerhefe zu überprüfen, wurde die Dreifachmutante *sgo1Δ alk1Δ alk2Δ* durch Kreuzung der Haspin-Doppelmutante mit der *sgo1Δ*-Mutante erzeugt.

Der Wachstumstest lieferte keine Hinweise darauf, dass in *S. cerevisiae* eine genetische Interaktion zwischen der CPC-Komponente Shugoshin und Haspin vorliegt. Die Abwesenheit

## Ergebnisse

von *ALK1*, *ALK2* und *SGO1* zeigte keinen synthetischen Wachstumsdefekt (Abbildung 4.35). Dieser Stamm hatte wie die *sgo1Δ*-Einzelmutante Kolonien von Wildtyp-Größe. Dieses Ergebnis könnte darauf hindeuten, dass in *S. cerevisiae* entweder die CPC-Lokalisation anderweitig bewerkstelligt wird oder die Histon H3 T3 Phosphorylierung durch Haspin nicht existiert.

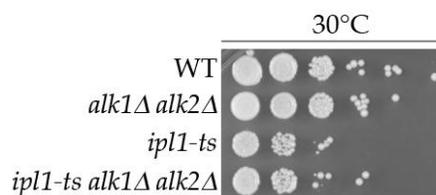


**Abbildung 4.35 Haspin zeigt in *S. cerevisiae* keine genetische Interaktion mit Shugoshin**

Stationäre Kulturen der Stämme BY4741 (Wildtyp), W4766 (*alk1Δ::URA3 alk2Δ::natMX4*), 1849 (*sgo1Δ::kanMX4*, Euroscarf-Kollektion) und W11689 (*sgo1Δ::kanMX4 alk1Δ::URA3 alk2Δ::natMX4*) wurden in Verdünnungsreihen auf XYD-Mediumplatten überführt und bei 25°C, 30°C und 37°C für 3 Tage inkubiert. Nachdem sich keine Wachstumsunterschiede bei den verschiedenen Temperaturen zeigten, wurde nur eine dargestellt.

In Säugerzellen ist Haspin eine wichtige Komponente, um eine vernünftige Lokalisation des CPCs zu gewährleisten. Aus diesem Grund, wurde der Frage nachgegangen, ob Haspin in der Bäckerhefe mit der CPC-Komponente Aurora B genetisch wechselwirkt. Da das Gen für Aurora B essentiell ist, wurde die Temperatur-sensitive Version *ipl1-ts* mit der Haspin-Doppelmutante gekreuzt. Die nach der Tetraden-Analyse entstandenen Stämme wurden in einem Wachstumstest verglichen.

Dabei zeigte sich, dass die *ipl1-ts*-Mutante ein vermindertes Wachstum zum Wildtyp und zur Haspin-Doppelmutante aufwies. Die Dreifachmutante *ipl1-ts alk1Δ alk2Δ* wuchs auf vergleichbarem Niveau wie die *ipl1-ts*-Einzelmutante (Abbildung 4.36). Eine Wachstumsverschlechterung konnte damit nicht bestätigt werden, was womöglich zu erwarten gewesen wäre, wenn Haspin auch in *S. cerevisiae* für die CPC-Lokalisation von Bedeutung ist. Auch diese Ergebnisse lieferten - neben den von Shugoshin - keine Befunde für eine Haspin-abhängige CPC-Lokalisation bzw. dafür, dass Histon H3 T3 ein Substrat von Haspin in der Bäckerhefe darstellt.



**Abbildung 4.36 Haspin zeigt keine genetische Interaktion mit Aurora B**

Stationäre Kulturen der Stämme K699 (Wildtyp), W6917 (*alk1Δ::natMX4 alk2Δ::kanMX4*), W11559 (*ipl1-321*) und W11644 (*ipl1-321 alk1Δ::natMX4 alk2Δ::kanMX4*) wurden in Verdünnungsreihen auf XYD-

## Ergebnisse

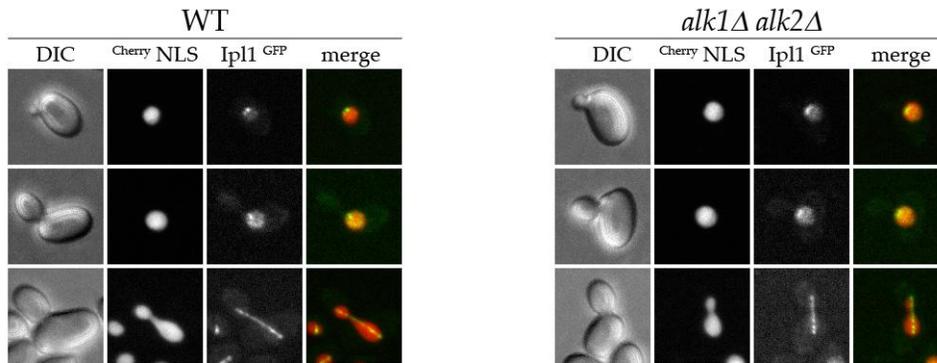
---

Mediumplatten überführt und bei 25°C, 30°C und 37°C für 3 Tage inkubiert. Nachdem sich keine Wachstumsunterschiede bei den verschiedenen Temperaturen zeigten, wurde nur eine dargestellt.

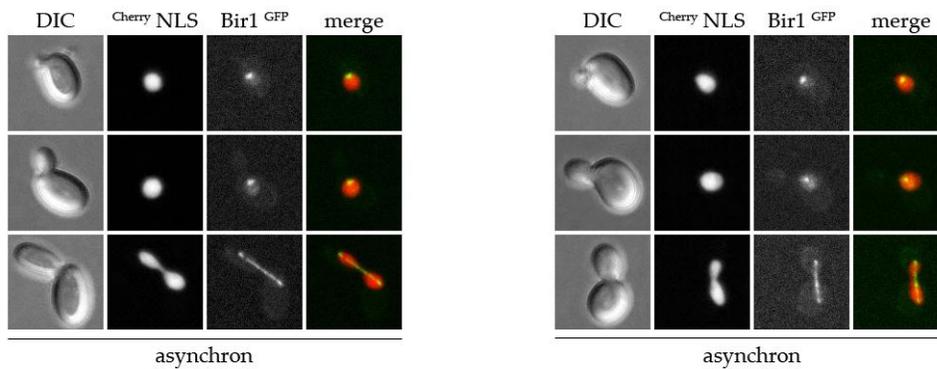
Survivin besitzt für die Bindung an H3 T3ph hochkonservierte Aminosäuren in der BIR-Domäne. In mikroskopischen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass Mutationen in diesen speziellen Aminosäuren, zur Fehllokalisierung von Survivin in mitotischen HeLa-Zellen führten (Yamagishi et al., 2010). In diesen Mutanten war nur ein geringer Teil dieser Proteine am Zentromer aufzufinden, während der Großteil homogen im Zellkern verteilt vorlag. Aufgrund dieser Daten kam die Idee auf, dass die Abwesenheit der Histon H3 T3 Phosphorylierung bzw. der Haspin-Proteine ebenso zu diesem Phänotyp führen sollte. Hierfür wurde in der Bäckerhefe die Lokalisation von Bir1, dem Survivin-homologen Protein in *S. cerevisiae*, und von Aurora B im Wildtyp und in der Haspin-Doppelmutante verglichen. Die Zellen enthielten den Kernmarker <sup>Cherry</sup>NLS und für einen Metaphase-Arrest ein über den *GALL*-Promotor reguliertes *CDC20*-Gen. Bereits vor der Mitose-Phase bis zum Ende der Metaphase zeigte die asynchrone Wildtyp-Kultur neben einem diffusen, nukleären Ipl1- bzw. Bir1-Signal, auch ein konzentrierteres. Dieses schien den Kinetochor-Komplexen zu entsprechen (Abbildung 4.37 A, B). Später im Zellzyklus assoziierten die CPC-Proteine mit den Spindel-Mikrotubuli. Die Kinetochor-Lokalisation von Ipl1 und Bir1 war durch die Deletionen der Haspin-Doppelmutante nicht beeinflusst. Ein Zellarrest in der Metaphase bewirkte eine gleichmäßige Verteilung der GFP-fusionierten CPC-Komponenten im Nukleus sowohl im Wildtyp als auch in der Haspin-Doppelmutante (Abbildung 4.37 C). Nach den Beobachtungen im asynchronen Zustand ist dies ein ungewöhnliches Lokalisationsmuster der Proteine. Womöglich wird die Assoziation von Ipl1 und Bir1 an die Zentralspindel durch den Arrest inhibiert. Aus den mikroskopischen Daten ergaben sich keine Unterschiede hinsichtlich der Lokalisation von Ipl1 und Bir1 bei der Haspin-Doppelmutante und dem Wildtyp. Dieses Ergebnis kann als Indiz für eine Haspin-unabhängige Regulation der CPC-Lokalisation in *S. cerevisiae* gewertet werden.

Letztendlich kann aus den Beobachtungen resümiert werden, dass keine Übereinstimmungen mit den Beobachtungen von Yamagishi et al. (2010) gemacht werden konnten. Dies könnte womöglich für einen anderen Mechanismus in *S. cerevisiae* bei der CPC-Lokalisation sprechen oder dafür, dass das Histon H3 T3 kein Substrat von Haspin darstellt.

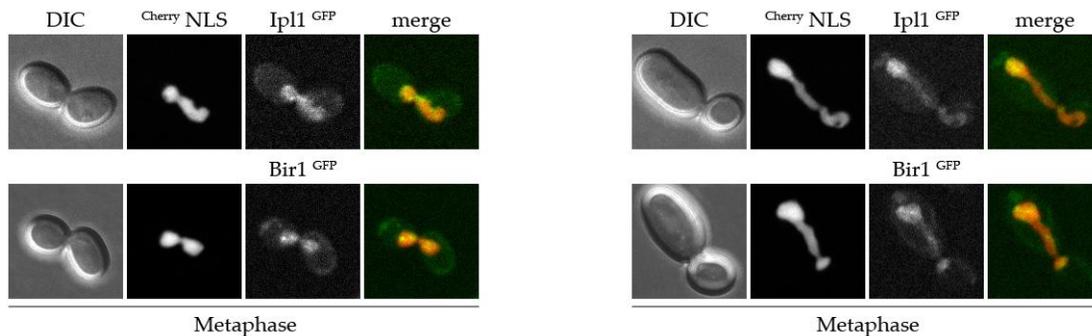
A



B



C



**Abbildung 4.37 Bir1 und Aurora B lokalisieren in Haspin-Abwesenheit normal**

Die in XYRG-Medium logarithmisch wachsenden Stämme (gemeinsamer Genotyp: *his3-Δ1::pTEF2-CHERRY-SWI5-S/A-tCYC1-HIS3 natNT2-pGALL-CDC20*) **(A)** W12358 (*IPL1-yEGFP-tADH1-SpHIS5*), W12359 (*alk1Δ::URA3 alk2Δ::natMX4 IPL1-yEGFP-tADH1-SpHIS5*), **(B)** W11865 (*BIR1-yEGFP-tADH1-SpHIS5*) und W11692 (*alk1Δ::URA3 alk2Δ::natMX4 BIR1-yEGFP-tADH1-SpHIS5*) wurden bei einer  $OD_{600} = 0,3$  in XYD-Medium überführt, um den *GALL*-Promotor für 3 h bei 25°C zu reprimieren. Ein Teil der asynchronen Zellen wurde unter einem 1 % SRG++ Agaroseblöckchen positioniert und im inversen Mikroskop mit Hilfe eines *spinning-disk*-Systems analysiert. Eingesetzte Laserintensitäten: 488 nm-Laser  $Ipl1^{GFP}$  95 %,  $Bir1^{GFP}$  100 %, 561 nm-Laser  $CherryNLS$  20 %. **(C)** Die für 3 h in Metaphase arretierten Proben wurden unter einem 0,75 % SD++ Agaroseblöckchen wie oben beschrieben mikroskopiert.

Letztendlich wurde in einer Western-Blot-Analyse die Phosphorylierung von Histon H3 T3 in *S.*

*cerevisiae* unter Einsatz eines monoklonalen, phosphospezifischen Antikörpers untersucht. Ein erworbenes Lysat asynchroner, mitotischer HeLa-Zellen, das als Kontrolle eingesetzt wurde, lieferte ein positives Signal. Im Vergleich dazu, konnte in den verschiedenen, zu testenden Hefestämme, wie dem Wildtyp, der Haspin-Doppelmutante, einem Stamm mit erhöhten Alk2-Mengen und der H3 T3A-Mutante keine H3 T3-Phosphorylierung nachgewiesen werden. Die Frage nach der Existenz dieser Modifikation in *S. cerevisiae* bleibt offen. Abschließend kann resümiert werden, dass die Histon H3 T3-Phosphorylierung nicht die Ursache der Phänotypen der Haspin-Doppelmutante ist.

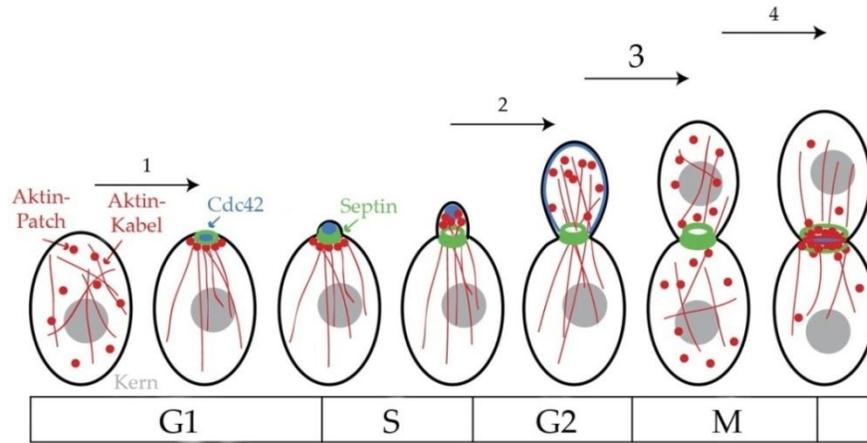
## 5 Diskussion

Proteinkinasen sind wichtige Regulatoren des Zellteilungszyklus. Haspin wurde als eine neue Subgruppe von Serin/Threonin Kinasen identifiziert, obwohl sie gravierende sequenzielle Unterschiede in der katalytischen Domäne zu denen von typischen ePKs aufweisen (Higgins, 2001a, 2003; Tanaka et al., 1999). Ein Hinweis auf die Funktion von Haspin ergab sich erstmals in einer genomweiten mRNA-Transkriptionsstudie. Hierbei zeigte *ALK1* Ähnlichkeiten mit dem Cluster des mitotischen Zyklins *CLB2*, wodurch Haspin in Verbindung mit mitotischen Prozessen gebracht wurde (Spellman et al., 1998). Jüngste Studien konnten sowohl in Säugerzellen als auch in *S. pombe* eine spezifischere Funktion der Proteinkinase nachweisen (Kelly et al., 2010; Wang et al., 2010; Yamagishi et al., 2010). Hierbei spielt Haspin durch seine Substratphosphorylierung an Histon H3 Threonin 3 in der Lokalisation des *chromosomal passenger complex* (CPC) eine Rolle. In dieser Arbeit wurden funktionelle Aspekte der Haspin-Homologen in der Bäckerhefe untersucht, wobei sich zeigte, dass diese im Prozess des Zellwachstums in einem bislang uncharakterisierten Schritt agieren: Die Analysen der Doppelmutante *alk1Δ alk2Δ* sowie die Überexpressionsstudien von *ALK2* führten zu dem Resultat, dass die Haspin-Proteine in *S. cerevisiae* das spezifisch auf die Tochterzelle gerichtete Wachstum beendeten. Dabei konnte in Abwesenheit beider Homologen die kortikale Polarisationsmaschinerie nicht aufgelöst werden, während bei erhöhten Mengen an Alk2 ihre Etablierung nicht zustande kam. Mit Hilfe von mikroskopischen Studien konnte ein detaillierteres Bild ihrer Lokalisationen gewonnen werden. Vor allem Alk2 wies ein interessantes Lokalisationsmuster auf: in der S-Phase bis zur Metaphase war es im Kern anzufinden. Sobald der Kern den Knospenhals passierte, befand es sich jedoch zusätzlich am Kortex der Tochterzelle. Mit Hilfe von N-terminalen Verkürzungen konnten Domänen in Alk2 identifiziert werden, die für die zellulären Lokalisationen sowie für den APC/C-abhängigen Abbau zuständig sind. Des Weiteren wurde beobachtet, dass die kortikale und nukleäre Lokalisation von Alk2 durch die Mutterzell-spezifische SPOC-Kinase Kin4 reguliert wird. Zusätzlich wurde das GAP Bem2 als ein potentielles Substrat von Haspin identifiziert. Das Lokalisationsverhalten des kortikal gelegenen Cdc42-Regulators veränderte sich sowohl in *alk1Δ alk2Δ*-Mutanten als auch bei *ALK2*-Überexpression, welches die Regulation durch die Haspin-Kinase widerspiegelte. Aufbauend auf den Ergebnissen der genetischen Interaktion von Haspin mit dem Gen des Kinesin-verwandten Motorproteins Cin8, zeigte sich durch weitere Kreuzungen der Haspin-Doppelmutante mit einer *spc72Δ*- bzw. *tub2*-Mutante, dass Alk1 und Alk2 womöglich die Dynamik des Mikrotubuli-Zytoskeletts erhöhen. Weiterhin wurde die in der Literatur (Dai and Higgins, 2005; Kurihara et al., 2011; Yamagishi et al., 2010) beschriebene

Phosphorylierung von Haspin an Histon H3 Threonin 3 in der Bäckerhefe untersucht, wobei diese Modifikation nicht bestätigt werden konnte. Es zeigte sich, dass Haspin in diesem Organismus seine Funktionen über andere Zielproteine ausführt.

### **5.1 Modell für die Wirkungsweise von Haspin in der Zellpolarität**

Die Zellmorphologie korreliert mit dem Zellzyklus. Dabei lässt sich die Entwicklung der Zellform zeitlich in vier Abschnitte einteilen (Howell and Lew, 2012) (Abbildung 5.1): In der ersten Phase (späte G1-Phase) lagern sich Aktin-Patches und Polaritätsproteine an die ausgewählte, zukünftige Knospungsstelle am Kortex an. Durch die Polarisierung des Zytoskeletts, die gerichtete Sekretion und dem damit verbundenen polaren, gerichteten Wachstum beginnt sich eine Knospe zu entwickeln (Abbildung 5.1-1). In der zweiten Phase (frühe G2-Phase) wechselt das apikale zum isotropen Wachstum. Dabei verteilen sich alle Aktin-Patches und -Kabel wahllos innerhalb der Tochterzelle, was in einem gleichmäßig über die Knospe verteilten Wachstum resultiert (Abbildung 5.1-2). Die dritte Phase (späte M-Phase) beinhaltet den Zusammenbruch der Mutter-Tochter-Asymmetrie. Zum Einen teilt sich hierbei das Aktin-Zytoskelett symmetrisch auf beide Zellkörper auf und zum Anderen dissoziieren die Polaritätskomponenten vom Tochterkortex. Dies führt zum Wachstum beider Zellkompartimente (Abbildung 5.1-3). Im letzten Schritt wird das Wachstum auf den Knospenhals fokussiert, was zur Zytokinese und Zellseparation führt (Abbildung 5.1-4). Die Prozesse der ersten, zweiten und letzten Phase sind durch Veränderungen der Cdc28-Aktivität bedingt (Pruyne and Bretscher, 2000): Während des G1/S-Phasen-Übergangs führt die Aktivität der Cln-CDK-Komplexe zum apikalen, filamentösen Knospenwachstum. Dabei phosphorylieren sie möglicherweise Proteine der Polaritätsentwicklung und fördern die Polarisierung von Cdc42. In der M-Phase wird der Wechsel vom polarisierten zum isotropen Wachstum über die Cdc28-Clb1/Clb2-Komplexe vermittelt. Für die Zellseparation – der letzten Phase bei der Entwicklung der Zellmorphologie – wird die CDK durch die Phosphatase Cdc14 inaktiviert, wodurch die Zytokinese ablaufen kann. Allerdings sind die Ereignisse, die zur Auflösung der Asymmetrie zwischen den Zellkörpern führen, nicht durch veränderte CDK-Aktivitäten zu erklären. Der regulatorische Auslöser dieser Prozesse ist bis heute in der Literatur nicht beschrieben (Howell and Lew, 2012).



**Abbildung 5.1 Morphogenetische Ereignisse des Zellzyklus.**

Die vier morphologischen Ereignisse sind: (1) die Polarisation in der späten G1-Phase, die durch Cln1,2-Cdc28-Komplexe ausgeführt wird, (2) der apikale-isotrope Wachstumsumbruch in der frühen G2-Phase, der durch die Clb1,2-Cdc28-Komplexe veranlasst wird, (3) die Auflösung der Asymmetrie zwischen der Mutter- und Tochterzelle in der späten Mitose, wobei hier die Schlüsselproteine bislang unbekannt sind und (4) das refokussierte Wachstum in Richtung des Knospenhalses, der durch die Inaktivierung der Clb-Cdc28-Aktivität eingeleitet wird. Während des Zellzyklus ist die Lokalisation von Aktin in rot, von Septin in grün und die der GTPase Cdc42 in blau dargestellt (verändert nach Howell und Lew, 2012).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Haspin-Proteine der Hefe negative Regulatoren des polaren Zellwachstums darstellen. Damit ist es gelungen, molekulare Komponenten des Asymmetrie-Symmetrie-Übergangs bzw. des „mother-daughter-asymmetry breakdowns“ zu identifizieren. Zum Einen beruht diese Behauptung auf dem Phänotyp der Haspin-Doppelmutante. Diese Zellen waren im Metaphase-arretierten Zustand nicht mehr in der Lage, die Polarisation aufzuheben. Bei Betrachtung des Aktin-Zytoskeletts (Abbildung 4.15 A) und von Proteinen der Polarisationsmaschinerie (Abbildung 4.16), wie z.B. dem GEF Cdc24, der GTPase Cdc42, dem Polarisom-Gerüstprotein Spa2, dem Formin Bni1, wiesen diese eine erneute Polarisierung am Kortex auf. Aus diesem Grund bildeten sich extrem große, elongierte Tochterzellen mit einer verkümmerten Mutterzelle (Abbildung 4.15). Das verstärkte Wachstum konnte mittels der  $\beta$ -Glukansynthese nachgewiesen werden, jedoch erfolgte keine erneute Knospenbildung, da die Septine normal lokalisierten (Abbildung 4.14). Zum Anderen beruht die Aussage, dass die Haspin-Proteine neu entdeckte Regulatoren des Asymmetrie-Symmetrie-Übergangs sind, auf dem Phänotyp der *ALK2*-Überexpression. Hierbei waren Zellen mit erhöhten Alk2-Mengen nicht mehr in der Lage die anfängliche Polarisation zu etablieren. Diverse Polaritätsproteine, wie Rho1, Bem1, Cdc42, Cdc24 und Polarisomproteine, wie Bni1, Spa2 und Myo2, konnten sich nicht mehr an die zukünftige Knospungsstelle anlagern, wodurch die Ausbildung eines polarisierten Aktin-Zytoskeletts unterbunden wurde (Abbildung 4.18 A, B, Abbildung 4.19 A, Abbildung 4.20). Für die Entstehung einer Knospe ist jedoch ein intaktes

Aktin-Zytoskelett wichtig (Hartwell et al., 1974). Aus diesem Grund resultierte aus dem homogen verteilten bzw. unpolarierten Aktin-Netzwerk ein G2/M-Phasen-Arrest der Zellen, da nur spezifisch die Knospung inhibiert wurde, während die SPB-Duplikation und die DNA-Replikation im Zellzyklus weiter voranschritten (Abbildung 4.17). Aus dieser Beobachtung ist ersichtlich, dass die drei Prozesse, die normalerweise zeitgleich am S-Phasen-Übergang stattfinden, unabhängig voneinander geregelt werden.

Des Weiteren ist das Lokalisationsmuster beider Haspin-Proteine mit einer Aufgabe in der Depolarisation von Polaritätsproteinen am Ende des gerichteten Wachstums vereinbar. Von Alk1 war ein zytoplasmatisches und vorwiegend Mutterzell-spezifisch kortikales Signal zu detektieren, welches allerdings unter Metaphase-arretierten Bedingungen verstärkt am Tochterkortex lokalisierte (Abbildung 4.1 A, Abbildung 4.2 C). Alk2 hingegen, befand sich ab der frühen S-Phase bis zum Ende der Metaphase in der Mutterzelle im Kern, an der nukleären Spindel und am Knospenhals (Abbildung 4.1 B). Erst nachdem der Kern den Knospenhals passierte und in den Tochterzellkörper eintrat, war in der Knospe ein Kortex-Signal zu beobachten. Zeitgleich nahm das Kern-Signal in diesem Zellkörper ab. Unter Metaphase-arretierten Bedingungen wies auch dieses Haspin-Homologe ein intensiveres kortikales Signal spezifisch in der Tochterzelle auf (Abbildung 4.2 C).

Zusätzlich wird die Funktion von Alk1 und Alk2 bei der Beendigung des gerichteten Wachstums durch ihr zeitliches Auftreten am Tochterkortex untermauert. Beide Proteine sind während der Polaritätsetablierung in der G1-Phase aufgrund der im N-terminalen Bereich enthaltenden KEN- und D-Boxen abwesend, was die Ausbildung einer Knospe ermöglicht (Abbildung 4.1). Erst am Ende des Zellwachstums lokalisiert Alk2 bzw. Alk1 - unter Metaphase-arretierten Bedingungen - am Kortex der Tochterzelle (Abbildung 4.1, Abbildung 4.2 C). Somit stimmt das zeitliche Wirkungsfenster der Zellzyklus-regulierten Haspin-Homologen am Kortex der Knospe mit dem der Auflösung der Polarisation am Tochterkortex überein.

### **5.1.1 Verbindung von Haspin zur Mutterzell-spezifischen Kinase Kin4**

Es zeigte sich, dass das komplexe Lokalisationsverhalten von Alk2 durch die SPOC-Kinase Kin4 gesteuert wird und diese dafür sorgt, dass Alk2 zur rechten Zeit, zur Beendigung des polaren Wachstums, am rechten Ort, am Tochterzell-Kortex, lokalisiert.

Kin4 ist eine Mutterzell-spezifische SPOC-Komponente, die während des Zellzyklus durchgehend am Mutterkortex lokalisiert (D'Aquino et al., 2005; Pereira and Schiebel, 2005). Am Mitose-Ausgang akkumuliert Kin4 am Knospenhals und in der G1-Phase an der neuen Knospungsstelle. Für eine kurze Zeit ist Kin4 bei einer korrekt orientierten Spindel mittels des zytoplasmatischen Spindelpolproteins Spc72 am SPBm verankert (Maekawa et al., 2007),

während es bei Spindelfehlorientierung in der Metaphase an beiden SPBs im mütterlichen Zellkörper lokalisiert (D'Aquino et al., 2005; Pereira et al., 2000). Kin4 ist somit immer vom Zellkompartiment der Tochter ausgeschlossen (Bertazzi et al., 2011).

Dabei stellt sich die Frage, wie die asymmetrische Lokalisation von kortikalen Proteinen zwischen zwei Zellkörpern bewerkstelligt wird? Zu einem gewissen Teil ist dies bei dem GEF Lte1 und der Kinase Kin4 verstanden. Dabei wird – im Falle von Lte1 – während der Entwicklung der Zellpolarität das zytoplasmatisch lokalisierte Protein von der PAK-Kinase Cla4 phosphoryliert, damit aktiviert und an den Kortex der Tochterzelle rekrutiert (Hofken and Schiebel, 2002; Jensen et al., 2002; Pereira et al., 2000; Seshan et al., 2002). Des Weiteren verhelfen der Septinring und mitotische Clb-CDKs das GEF am Tochterzell-Kortex zu lokalisieren (Castillon et al., 2003; Geymonat et al., 2010). Im Falle des Mutterzell-spezifischen Kin4 wird spekuliert, dass seine kortikale Abwesenheit in der Tochterzelle durch Mechanismen, wie einem Knospen-spezifischen Abbau oder einem retrograden Transport, bedingt sein könnte (Caydasi and Pereira, 2012). Zudem wurde das Tochterzell-spezifische Lte1 als neuer Regulator der asymmetrischen Kin4-Lokalisation beschrieben, da es die SPOC-Kinase – aus bisher unbekanntem Gründen – hindert in die Knospe einzutreten (Bertazzi et al., 2011).

Die Regulation der asymmetrischen, kortikalen Lokalisation von Alk2 in der Tochterzelle scheint nicht über diese Mechanismen abzulaufen, sondern – wie bereits weiter oben erwähnt – von Kin4 reguliert zu werden. In dieser Arbeit zeigte sich, dass einerseits die Mutterzell-spezifische Kinase die Anlagerung von Alk2 an den Kortex der Mutterzelle verhinderte, denn in Abwesenheit von Kin4 wurde Alk2 verstärkt am mütterlichen Kortex detektiert (Abbildung 4.8 A, C). Zudem waren bei erhöhten Kin4-Mengen die kortikalen Alk2-Signale verschwunden (Abbildung 4.9). Andererseits regulierte die SPOC-Kinase die nukleäre Lokalisation von Alk2, da der Verlust von Kin4 bei dem N-terminalen Fragment Alk2(1-333) zu einem abgeschwächten Alk2-Kernsignal führte (Abbildung 4.8 A).

Als Nächstes stellt sich die Frage, wie Kin4 die kortikale Lokalisation von Alk2 ausschließlich auf die Tochterzelle beschränkt. In der Mutterzelle könnte Kin4 die Anlagerung von Alk2 an den Kortex verhindern, indem die SPOC-Kinase kortikale Alk2-Rezeptoren modifiziert und auf diese Weise unzugänglich für das Haspin-Homologe macht. Eine weitere Vorstellung wäre, dass ein sterisches Problem, aufgrund der kortikalen, überlappenden Bindungsstellen von beiden Proteinen, vorliegt. In diesem Fall könnte Kin4 Alk2 dahingehend modifizieren, dass die Assoziation des Haspin-Homologen mit dem Kortex reduziert und dessen Transport in den Kern gefördert wird, wodurch letztendlich weniger Alk2 an den Kortex binden kann. Zum Einen findet diese Hypothese Unterstützung durch die Überexpressionsstudien von *KIN4*, da die erhöhten Mengen der SPOC-Kinase zu einem vollständigen Verlust des kortikalen und

einem exklusiv nukleären Alk2-Signal führten (Abbildung 4.9). Zum Anderen lieferten die Konstrukte Alk2(1-676) und Alk2(1-333) in *KIN4*-Deletionsmutanten ein verstärktes Kortex- und ein stark abgeschwächtes Kern-Signal (Abbildung 4.8 A). Für den Kernimport von Alk2 ist jedoch eine direkte NLS-Aktivierung durch Modifikation der SPOC-Kinase nicht nötig, da das Subfragment Alk2(291-330), welches für die nukleäre Lokalisation nötig und hinreichend ist, als auch die Verkürzungen Alk2(112-333), Alk2(164-333), Alk2(249-333) und Alk2(249-330) in *Kin4*-Abwesenheit im Kern zu detektieren waren (Abbildung 4.8 C, E). In dieser Arbeit wird gezeigt, dass die Wirkung von *Kin4* auf die nukleäre Alk2-Lokalisation indirekt über die Region der Aminosäuren 1 bis 112 vermittelt wird. Dieser Bereich fungiert womöglich als ein zytoplasmatischer Anker von Alk2. Hierbei könnte die Assoziation von Alk2 mit dem Kortex durch die Phosphorylierung der kortikalen Kinase *Kin4* an dieser Region gelöst werden. Folglich wird die NLS aktiviert und ein gewisser Teil von Alk2 in den Kern befördert. Ein weiteres Modell wäre, dass der Bereich der Aminosäuren 1 bis 112 eine intramolekulare Inhibition auf die NLS ausübt und die SPOC-Kinase diese durch Modifikation aufhebt, was letztendlich in einer aktiven NLS und der Alk2-Kernlokalisierung resultieren würde. In Analogie wäre das letzt genannte Modell mit dem der *Cdc24*-Autoinhibition von Gulli und Peter (2001). Dabei wird beschrieben, dass in Abwesenheit eines aktivierenden Signals, die N-terminale Calponin-Homologie-Domäne (CH) von *Cdc24* die katalytische Db1 Homologie-Domäne (DH) inhibiert. Erst nachdem die CH-Domäne an bestimmte Proteine, wie *Rsr1* oder *Far1*, gebunden hat, nimmt *Cdc24* seine aktive, offene Konformation an. Dabei löst sich die inhibitorische N-terminale Domäne von der katalytischen DH-Domäne, wodurch letztere befreit wird.

Die Möglichkeit, dass sich *Kin4* negativ auf eine vorhandene Alk2-NES auswirken könnte, erscheint eher unwahrscheinlich, da *Kin4* nicht im Kern vorhanden ist.

Ein direkter Einfluss in Form von einer Phosphorylierung von *Kin4* auf Alk2, wie es nach den Ergebnissen von Breitkreutz et al. (2010) zu erwarten gewesen wäre, konnte mittels Western-Blot-Analysen nicht bestätigt werden. Es zeigte sich interessanterweise, dass die Abwesenheit von *Kin4* zu einer verstärkten Modifikation an Alk2 führte (Abbildung 4.11, Abbildung 4.12). Die SPOC-Kinase verhindert somit, dass andere Proteine Alk2 in der N-terminalen Domäne modifizieren. Eine mögliche Vorstellung wäre, dass *Kin4* Alk2 durch eine geringe Phosphorylierung unzugänglich für andere Proteine macht bzw. maskiert. Vergleichbar ist dieses Modell mit der Phosphorylierung von *Bfa1* an S150 und S180 durch *Kin4* (Maekawa et al., 2007). Dabei wird im SPOC im Falle einer fehlorientierten Spindel durch diese Modifikationen die *Bfa1*-*Bub2*-Aktivität aufrecht erhalten, um eine inhibitorische Phosphorylierung an dem Dimer-Komplex durch die Polo-Kinase *Cdc5* zu unterbinden (D'Aquino et al., 2005; Maekawa et al., 2007; Pereira and Schiebel, 2005). Eine andere Hypothese ist, dass *Kin4* ein Alk2-

modifizierendes Protein durch Phosphorylierung inhibiert. In *KIN4*-Deletionsmutanten sind diese dann hyperaktiv und führen zu dem beobachteten Modifikationsmuster an Alk2.

Im Zytoplasma gibt es sogenannte 14-3-3 Proteine. Diese sauren Proteine binden über phosphorylierte Serin- oder Threonin-Reste ihre Interaktionspartner (Muslin et al., 1996; Yaffe et al., 1997) und führen somit u.a. zur Protein-Stabilisierung, zur Veränderung der enzymatischen Aktivität oder zu einer abgewandelten Protein-Lokalisation (Tzivion and Avruch, 2002). Auf diese Weise regulieren sie beispielsweise das Aktin-Zytoskelett oder den Zellzyklus. Es ist denkbar, dass in *Kin4*-Abwesenheit das stärker modifizierte (womöglich phosphorylierte) und im Zytoplasma lokalisierte Alk2 an die 14-3-3 Proteine gebunden wird.

Über die gerade beschriebene Regulation der Alk2-Lokalisation steuert *Kin4* zusätzlich indirekt zeitlich die Aktivität des Haspin-Homologen, da es Alk2 nur zum Zeitpunkt der Beendigung des polaren Wachstums befähigt, an den Kortex zu binden, um einen verfrühten Wachstumsstopp zu unterbinden. In Analogie wäre diese Überlegung mit dem Mechanismus von *Cdc24*, welches von *Far1* gebunden und im Nukleus zurückgehalten wird, bevor es nach dessen Degradation aus dem Kern transportiert wird und am Kortex seine Funktion ausüben kann (Gulli and Peter, 2001). Eine ähnliche Wirkungsweise zeigt sich beim Transkriptionsfaktor *Ace2*, der die Expression von Tochter-spezifischen Genen induziert. Dieser ist erst aktiv, nachdem er aus dem Zytoplasma beider Zellkörper exklusiv in den Kern der Tochterzelle transportiert wurde (Mazanka et al., 2008; Parnell and Stillman, 2008).

Eine Idee, wie Alk2 wieder aus dem Kern exportiert werden könnte, wäre, dass ein dynamischer, *steady-state* Kern-Import bzw. -Export des Haspin-Homologen besteht, wobei die *Kin4*-Asymmetrie für die Unterschiedlichkeit der Alk2-Lokalisation in den Zellkörpern verantwortlich ist. In der Mutterzelle verhindert *Kin4* die Verankerung von Alk2 an den Kortex, wodurch das Haspin-Homologe im Zytoplasma frei verfügbar für den Kernimport ist. Folglich häuft es sich im Nukleus an. Im Zellkompartiment der Tochter hingegen, ist es Alk2 aufgrund der Abwesenheit von *Kin4* möglich, an hoch affine Bindungsstellen am Kortex zu binden. Aus diesem Grund ist wesentlich weniger frei zugängliches Alk2 im Zytoplasma vorhanden, wodurch in der Knospe der Kernexport relativ gesehen zum -Import überwiegt. Eine weitere, differenziertere Vorstellung wäre, dass die NES von Alk2 durch eine potentielle *Kin4* Modifikation blockiert wird. Im Kern könnte durch eine Phosphatase die inhibitorische Phosphorylierung jedoch aufgehoben werden und folglich die NES aktivieren. Diese Idee stützt sich auf das Modell der *Ace2*-Kerninhibition. Hierbei wird *Ace2* an seiner NES durch die *Cbk1*-Kinase phosphoryliert, wodurch die Exportsequenz maskiert und inhibiert wird (Mazanka et al., 2008).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass das asymmetrisch lokalisierende *Kin4* das

Haspin-Homologe Alk2 über die Aminosäure-Region 1 bis 112 beschränkt, sich im mütterlichen Zellkompartiment exklusiv im Kern aufzuhalten. Tritt ein Teil des Kerns durch den Knospenhals und befindet sich in der Kin4-freien Zone der Tochterzelle, fehlt die Regulation durch die SPOC-Kinase und Alk2 wird aus dem Nukleus entlassen. Dort kann das Haspin-Homologe aktiv werden und zur rechten Zeit, in der Anaphase, am rechten Ort, am Kortex der Tochterzelle, das Zellwachstum beenden, indem es die Asymmetrie zwischen der Mutter- und der Tochterzelle aufhebt.

Ein weiterer, interessanter Punkt ist: welchen Schritt bzw. welche Zielstruktur beeinträchtigt Haspin in der Reaktionsabfolge der Polaritätskomponenten? Der Ablauf der Prozesse im Polarisationsgeschehen ist gut verstanden (Bi and Park, 2012). Um die vorherige Frage zu klären, wurden verschiedene Polarisationskomponenten nach *ALK2*-Überexpression untersucht, wobei sich zeigte, dass alle, die später als Cdc24 in der Reaktionsabfolge wirkten, in der Zelle delokalisiert waren. Diese Beobachtung verdeutlicht, dass der durch Alk2 beeinträchtigte Schritt bzw. die Zielstruktur des Haspin-Homologen vor Cdc24 liegt, da alle folgenden Prozesse bzw. Lokalisationen nicht mehr stattfinden konnten. Wie schon weiter oben erwähnt, wird Cdc24 in der G1-Phase durch das Adapter-Protein Far1 im Nukleus zurückgehalten (Gulli and Peter, 2001). Für die Knospen-Entwicklung phosphoryliert Cdc28-Cln zum Einen Far1, wodurch dessen Degradation und der Cdc24-Kernaustritt initiiert werden. Zum Anderen trägt die Kinase durch seine Aktivität zur Polarisation des zytoplasmatischen Cdc42-GEFs bei. In der Literatur wird beschrieben, dass die aktive CDK einerseits dabei Cdc24 direkt modifiziert und somit dessen Konformation gegenüber Plasmamembran-Interaktionspartnern begünstigt. Andererseits könnten Plasmamembran-Komponenten, an die Cdc24 bindet, von der Kinase phosphoryliert werden, die wiederum im modifizierten Zustand der Cdc24-Assoziation an die zukünftige Knospungsstelle verhelfen. Des Weiteren ist bekannt, dass das Transmembran-Protein Rsr1/Bud1 mit dem konservierten CH-Motiv der N-terminalen Domäne von Cdc24 interagiert. Auf diese Weise wird das GEF an die zukünftige Knospungsstelle rekrutiert und darüber zusätzlich aktiviert (Gulli and Peter, 2001). Zudem wurde festgestellt, dass die Pleckstrin-Homologie -Domäne von Cdc24, die mit dem Gerüstprotein Bem1 interagiert, als auch dessen DH-Domäne für die polare Lokalisation an der Knospenspitze wichtig sind (Fujimura-Kamada et al., 2012; Mionnet et al., 2008). Bei erhöhten Alk2-Mengen wurde Cdc24 aus dem Kern transportiert, jedoch fand die Anlagerung an die zukünftige Knospungsstelle nicht statt (Abbildung 4.19 A). Folglich könnte die Kinase-Aktivität des Haspin-Homologen Cdc24 negativ beeinflussen, indem es das GEF-Protein - womöglich in der DH-Domäne - direkt modifiziert. Infolgedessen könnte die positive Cdc28-Cln-Phosphorylierung an Cdc24 aufgehoben und die Anbindung an die Plasmamembran verhindert werden. Ein weiteres,

denkbares Szenario wäre, dass die Haspin-Proteine die GTPase Rsr1/Bud1, das Gerüstprotein Bem1 oder andere Cdc24-Plasmamembran-Bindestellen phosphorylieren, diese dadurch strukturell verändert und somit unzugänglich für das GEF-Protein gemacht werden.

Abschließend lässt sich festhalten, dass sich die Zielproteine des Haspin-Homologen Alk2 oberhalb bzw. auf gleicher Ebene von Cdc24 befinden. Möglicherweise stellt Cdc24 selbst ein Substrat dar.

### 5.1.2 Verbindung von Haspin zum Rho-GAP Bem2

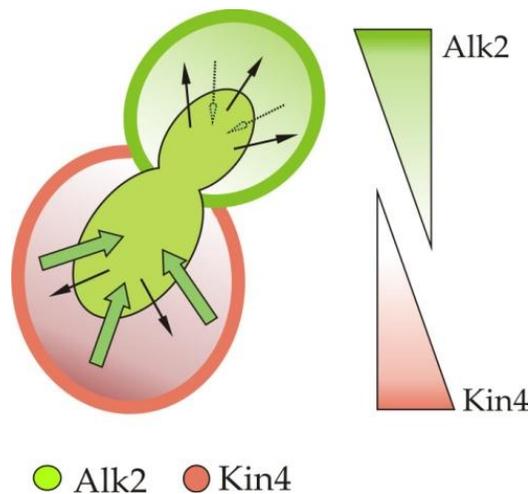
Letztendlich stellt sich die interessante Frage über welches Substrat Haspin Einfluss auf die Zellpolarität nehmen könnte? Das aus der Literatur bekannte Haspin-Substrat Histon H3 T3 schied als kritisches Zielprotein nach diversen Untersuchungen aus. Ein in dieser Arbeit identifizierter, sehr wahrscheinlicher Kandidat, stellte Bem2 dar. Bem2 steht für *bud emergence* und ist für die anfängliche Etablierung der Polarität und für die Knospentwicklung wichtig. Aus diesem Grund bilden *bem2Δ*-Mutanten keine oder sehr kleine Knospen (Bender and Pringle, 1991). Der Phänotyp der Haspin-Doppelmutante in Metaphase wurde von dem der *BEM2*-Deletionsmutante supprimiert. Diese Beobachtung könnte darauf zurückzuführen sein, dass durch den Verlust von Bem2 die Zellen schon vor dem Prozess der Knospentwicklung gestoppt werden. Dadurch kommen die Auswirkungen, die durch die Abwesenheit der später im Zellzyklus agierenden Haspin-Proteine entstehen würden, nicht zum Tragen. Weiterhin inaktiviert Bem2 als GAP-Protein durch GTP-Hydrolyse die an der Zellpolarität beteiligten Rho-GTPasen Cdc42 und Rho1 (Bi and Park, 2012).

Die Idee, dass Bem2 ein Substrat von Haspin in *S. cerevisiae* sein könnte, wird durch die Beobachtungen der Haspin-Doppelmutante unter Metaphase-arretierten Bedingungen (Abbildung 4.21) und durch die der *ALK2*-Überexpression unterstützt (Abbildung 4.22). Dabei zeigte sich, dass die Lokalisation des GAP-Proteins durch Alk2 verändert bzw. gesteuert wird. Folglich stellt Bem2 ein potentielles Substrat von Alk2 dar, wobei in proteinanalytischen Untersuchungen aufgrund der Größe von 245 kDa keine direkten Hinweise erbracht werden konnten (Daten nicht gezeigt).

Wie könnte die Regulation der kortikalen Bem2-Lokalisation in der Tochterzelle durch Alk2 aussehen? Eine Hypothese wäre, dass das Haspin-Homologe das GAP-Protein derart phosphoryliert, dass es in seiner aktiven Konformation stabilisiert wird und besser an den Kortex, jedoch nicht an den Knospenhals, binden kann. Zudem könnte sich die Phosphorylierung positiv auf die Bem2-Aktivität auswirken. Um eine gezielte Aktivierung von Cdc42 an den Knospungsstellen zu gewähren, wird die Aktivität von Bem2 über die Phosphorylierung der Cdc28-Cln2 negativ reguliert (Knaus et al., 2007). Aufgrund dieser aus

der Literatur bekannten Ergebnisse, ergibt sich die weitere Vorstellung, dass Alk2 eine inhibitorische Modifikation an der aktiven CDK-Cln ausübt und folglich Bem2 in seiner Funktion unterstützen könnte. Die knospenlosen Zellen bzw. die Zellen mit den unterdurchschnittlich kleinen Tochterzellen, welche den Phänotyp der erhöhten Alk2-Mengen widerspiegeln, könnten sich durch eine solch erhöhte, kortikale Bem2-GAP-Aktivität erklären lassen. Folglich werden am Kortex der Tochterzelle die an der Zellpolarität beteiligten GTPasen Cdc42 und Rho1 verstärkt inhibiert, wodurch aufgrund des reduzierten Wachstums keine bzw. kleinere Knospen resultieren. Während der Zytokinese reguliert Bem2 am Knospenhals über seine GAP-Aktivität an Cdc42 die Dynamik des Septin-Aufbaus (Caviston et al., 2003). Nachdem bei *ALK2*-Überexpression die Bem2-Lokalisation am Knospenhals fehlte, könnte es sein, dass die dort ansässige, hyperaktive Cdc42-GTPase schneller die Zytokinese beenden kann und somit einen weiteren Teil zu den kleineren Knospen beiträgt.

In *S. cerevisiae* könnte Haspin über die oben beschriebenen Modelle die Auflösung der Asymmetrie zwischen der Mutter- und Tochterzelle bewirken, die für die Beendigung des polarisierten Wachstums nötig ist.



**Abbildung 5.2 Modell der Regulation der Alk2-Lokalisation**

In der Mutterzelle verhindert die Mutterzell-spezifische Kinase Kin4 die Anlagerung von Alk2 an den Kortex. Folglich ist Alk2 vermehrt im Zytoplasma frei verfügbar und wird aus diesem Grund über seine NLS in den Kern transportiert. In der Tochterzelle kann Alk2 aufgrund der Kin4-Abwesenheit an den Kortex binden. Die frei verfügbare Menge an Alk2 ist in diesem Zellkompartiment damit geringer, wodurch der Kernexport gegenüber dem -Import relativ gesehen überwiegt. Am Kortex der Tochterzelle könnte Alk2 über das potentielle Substrat Bem2 die Asymmetrie der Tochter- und Mutterzelle aufheben, was letztendlich zur Beendigung des polaren Wachstums führt.

## 5.2 Haspin-Proteine beeinflussen die Dynamik des Mikrotubuli-Zytoskeletts

Eine funktionelle Verbindung von den Haspin-Proteinen mit dem Mikrotubuli-Zytoskelett konnte von Diergardt (2007) erbracht werden, wobei sich in der vorliegenden Arbeit zusehends spezifische Rollen in der Dynamik der Mikrotubuli verfestigten. In den anfänglichen Funktionsanalysen wurden in einem SGA-Screen Dreifachmutanten generiert, da weder die Haspin-Einzelmutanten noch die -Doppelmutanten sichtbare Phänotypen aufwiesen (Diergardt, 2007). Dieses Phänomen lässt sich durch Redundanz erklären, da die Funktion der Haspin-Proteine durch einen parallelen Reaktionsweg substituiert werden kann. In diesem Screen lieferte die Haspin-Doppelmutante in Kombination mit der *CIN8*-Deletionsmutante einen synthetischen Wachstumsdefekt. Solche genetischen Interaktionen treten dann zwischen zwei Genen auf, wenn diese entweder in einem einzigen, linearen Signalweg beteiligt sind oder die synthetisch letalen Gene in einem parallelen bzw. kompensatorischen Signalweg agieren (Ye et al., 2005). Somit lassen genetische Interaktionen Funktionsvorhersagen bei uncharakterisierten Genen zu.

Cin8 ist eines von fünf Kinesin-verwandten Motorproteinen, welches zur Dynamik der Mikrotubuli beiträgt. Dabei unterstützt es als bipolares Homotetramer u.a. die Spindelpol-Duplikation sowie den Transport der Spindel-Mikrotubuli in der Anaphase B mit Hilfe seiner Motordomäne (Hildebrandt et al., 2006; Hildebrandt and Hoyt, 2000). Der Verlust von Cin8 bzw. dessen Motordomäne führt zu verkürzten Spindeln (Winey and Bloom, 2012). Die Haspin-Doppelmutante zeigte in Kombination mit der mutierten Cin8-Motordomäne einen synthetischen Wachstumsdefekt (Abbildung 4.24 B). Dies könnte bedeuten, dass die Haspin-Proteine einen Beitrag zur Dynamik des Zytoskeletts leisten, indem sie den Transport der Mikrotubuli zu ihren Plus-Enden katalysieren. Bekräftigt wird die Aussage durch die mikroskopische Beobachtung, bei der die Spindelstrukturen der *cin8-3 alk1Δ alk2Δ*-Mutante im Vergleich zur *cin8-3*-Einzelmutante einen erhöhten Anteil an Zellen mit nicht elongierten Spindeln in der Metaphase zeigten (Abbildung 4.24 C). Aufgrund der Lage erscheint es plausibel, dass das nukleär, an der Kernspindel lokalisierte Alk2 hierfür einen Beitrag leisten könnte. Nachdem die genetische Interaktion der *cin8-3*-Mutante mit der *alk1Δ alk2Δ*-Mutante nicht so ausgeprägt war wie die der *cin8Δ* mit der Haspin-Doppelmutante, könnte dies darauf hinweisen, dass weitere, z.B. für die *bundeling*-Aktivität wichtige Bereiche für den massiveren, synthetischen Wachstumsdefekt verantwortlich sind. Die *bundeling*-Aktivität von Cin8 ist für die Trennung der duplizierten Spindelpolkörper wichtig (de Gramont et al., 2007). Es konnte jedoch nicht gezeigt werden, dass die temporale Spindelpol-Duplikationsrate der Haspin-Doppelmutante im Vergleich zum Wildtyp verzögert war (Daten nicht gezeigt). Nachdem Cin8

neben dem Funktionsbereich der Mikrotubuli-Organisation zusätzlich eine Vielzahl von genetischen Interaktionspartnern in verschiedenen Zellprozessen, wie z.B. in der Zellpolarisation, in Kontrollpunkten, in DNA-bezogenen Prozessen, aufzeigt, könnten die Haspin-Proteine weitere Funktionen in diesen Bereichen haben. U.a. führt die Deletion von *CIN8* mit der von *BEM2* zu einer synthetischen Letalität (Tong et al., 2004), was auch an dieser Stelle nochmals die Rolle der Haspin-Proteine bei der Zellpolarität unterstreicht.

Die anfängliche Ausrichtung der Spindel beginnt mit der Orientierung der astralen Mikrotubuli. Während der Spindelpol-Separation nukleieren zytoplasmatische Mikrotubuli des SPBt in Richtung der Knospe. Zeitgleich interagieren die des SPBm mit Proteinen am mütterlichen Kortex vorerst in der Nähe des Knospenhalses und kurze Zeit später zu entfernter gelegenen kortikalen Stellen in der Mutterzelle. Durch diesen sehr dynamischen Prozess richtet sich die Spindel innerhalb von 20 min entlang der Mutter-Tochter-Achse aus (Segal et al., 2000). Dabei wird die Orientierung der Spindel durch verschiedene Wege, die Proteine wie Bud6, Kar9 und Dynein beinhalten, unterstützt (Huisman et al., 2004; Huisman and Segal, 2005; Moore and Cooper, 2010). In mikroskopischen Analysen konnte via „*live-cell imaging*“ gezeigt werden, dass die anfängliche Orientierung der Spindel in Abwesenheit von den Haspin-Homologen wesentlich mehr Zeit benötigt wie im Wildtyp (Abbildung 4.26). Eine daraus resultierende, erhöhte Anzahl an fehlorientierten Spindeln, die größtenteils an den Zellkortices lokalisierten, war nur bei der simultanen Abwesenheit beider Proteine zu verzeichnen (Abbildung 4.25 A). Die Überlegung, dass die Haspin-Homologen folglich Komponenten der bekannten Spindelorientierungswege darstellen könnten, wurde durch die Kombination der *alk1Δ alk2Δ*-Mutante mit Deletionsmutanten der Spindelorientierung in Tetraden-Analysen und in mikroskopischen Untersuchungen widerlegt (Abbildung 4.28). Es konnte aber gezeigt werden, dass Alk1 und Alk2 mit den zwei genetisch definierten Wegen der Spindelorientierung (Kar9- bzw. Dynein-Weg) in Verbindung stehen. Diese Beobachtungen und das Lokalisationsmuster der Haspin-Homologen könnten darauf hinweisen, dass das kortikale Alk1 in der Mutterzelle astrale Mikrotubuli des SPBm bindet, während das am Knospenhals (womöglich über Bni1) lokalisierte Alk2 (hierfür nötige Region 112-248) mit den zytoplasmatischen Mikrotubuli des SPBt interagiert. Derart könnten die beiden Proteine der Spindel zur anfänglichen Orientierung verhelfen und diese im Zellkompartiment der Mutter fixieren bzw. zurückhalten. Die Beobachtung, dass die erhöhte Spindelfehlorientierung nur in der Doppelmutante auftrat (Abbildung 4.25 A), könnte darauf zurückzuführen sein, dass das Fehlen einer Anbindung eines SPBs noch relativ gut kompensiert werden kann. Werden jedoch – im Fall der Haspin-Doppelmutante - weder am mütterlichen Kortex noch am Knospenhals die Mikrotubuli fixiert, resultiert dies in einer länger andauernden und erhöhten Spindelfehlorientierungsrate. Zur

Überprüfung der kortikalen Mikrotubuli-Kontakte wurden in der Haspin-Doppelmutante die astralen Tubulin-Strukturen über GFP-Fusionen und über indirekte Antikörperfärbungen visualisiert. Hierbei konnte keine Aussage über eine womöglich geringere Mikrotubuli-Anbindung aufgrund der fehlenden Haspin-Homologen gemacht werden, da diese Tubulin-Signale sehr schwach waren. In der späten Metaphase bzw. in der Anaphase ist die Spindelorientierung normalerweise vollendet. Denkbar wäre, dass sich ab diesem Zeitpunkt der Einfluss der Homologen auf die Ausrichtung der Spindel reduziert und ihre Mikrotubuli-Anbindung nun der Kern-Stabilisierung innerhalb der Zelle dient. Zusätzlich beginnen zu dieser Zeit die Homologen am Tochterkortex zu lokalisieren, was bedeuten könnte, dass ihre funktionelle Priorität auf Prozesse der Polarität umgelenkt wird und sie folglich das polarisierte Zellwachstum beenden.

Aus der Literatur ist bekannt, dass für die Orientierung der Spindel eine Asymmetrie an den SPBs erforderlich ist. Dabei wird Kar9 durch die aktive Cdc28-Clb4 an Serin 496 phosphoryliert, wodurch Kar9 nur mehr auf den SPB<sub>t</sub>, jedoch nicht mehr auf den SPB<sub>m</sub> geladen werden kann (Liakopoulos et al., 2003). Des Weiteren trägt auch Clb5 zur Kar9-Asymmetrie bei, wobei dieser Mechanismus bislang unverstanden ist (Hotz et al., 2012). Fehlt die Etablierung der SPBs-Asymmetrie nukleieren beide SPBs astrale Mikrotubuli in Richtung der Knospe, was letztendlich in einer zur Mutter-Tochter-Zellachse quergestellten Spindel resultiert. Womöglich könnte der Phänotyp der Haspin-Doppelmutante auch durch symmetrische, nicht unterscheidbare SPBs bedingt sein. Dabei könnten die Haspin-Proteine über ihre Kinase-Aktivität SPB-lokalisierende Proteine phosphorylieren und zur Asymmetrie der Spindel beitragen. Kar9 erscheint hierbei eine eher unwahrscheinlichere Substrat-Komponente, da sich in den Untersuchungen keine Hinweise auf eine Interaktion ergaben.

Haspin-Proteine könnten zudem auch direkt an der Dynamik des Mikrotubuli-Zytoskeletts beteiligt sein, wobei sie die Agilität der Tubulin-Strukturen fördern könnten. Hinweise wurden durch genetische Interaktionen der Haspin-Doppelmutante mit Tubulin-Mutanten, die die Dynamik der Mikrotubuli veränderten, erbracht. Zum Einen wurde eine Wechselwirkung mit der Spindelpolkomponente *SPC72*, die als zytoplasmatischer Anker für astrale Mikrotubuli dient, untersucht. Der Phänotyp der *spc72Δ*-Mutanten zeichnet sich durch multinukleäre Zellen mit instabilen bzw. mit einer reduzierten Anzahl an Mikrotubuli aus (Knop and Schiebel, 1998; Swoboda, 2008). Diese *spc72Δ*-Mutanten zeigten ein verschlechtertes Wachstum, welches durch die zusätzlichen Haspin-Deletionen supprimiert wurde (Abbildung 4.31). Die Dreifachmutante *spc72Δ alk1Δ alk2Δ* wies im Vergleich zur *SPC72*-Deletionsmutante bessere astrale Mikrotubuli-Kontakte zum Knospenhals auf. Dieses Ergebnis könnte dadurch zu erklären sein, dass die Deletionen von Haspin zu einer Stabilisierung der wenigen astralen Mikrotubuli führen. Zum

Anderen wurde eine genetische Interaktion von Haspin mit einer Tubulin-Mutante, deren Zellen stabilere Mikrotubuli aufzeigten, festgestellt (Huisman et al., 2004). Hierbei zeigte sich, dass die wachstumsbeeinträchtigte *tub2*-Mutante durch den simultanen Verlust von *ALK1* und *ALK2* noch schlechter wuchs und weniger astrale Mikrotubuli-Anbindungen an den Knospenkortex aufwies (Abbildung 4.32). Auch diese Beobachtung stützt die Idee, dass die Haspin-Homologen in *S. cerevisiae* die Dynamik von Mikrotubuli direkt positiv beeinflussen könnten. Aus der Literatur ist bekannt, dass das Mikrotubuli-Zytoskelett ein hoch dynamisches Netzwerk darstellt, welches entsprechend der Zellzyklus-Phase reguliert wird (Higuchi and Uhlmann, 2005). In der Metaphase unterliegen die Spindel-Mikrotubuli einer sehr hohen *turnover*-Rate. Auf diese Weise können während der bipolaren Chromosomen-Anordnung zum Einen Korrekturen bei falschen Mikrotubuli-Kinetochor-Kontakten vorgenommen werden. Zum Anderen erleichtert ein dynamischer, labiler Mikrotubuli die Suche nach Kinetochoren. Durch den destabilisierenden Einfluss von Haspin auf die Mikrotubuli könnte die Biorientierung der Chromosomen und die Suche der Mikrotubuli nach Kinetochor-Kontakten erleichtert werden. Später, ab dem Beginn der Anaphase kommt es durch die Aktivierung der Separase und der Phosphatase Cdc14 zu einer abrupten Stabilisierung der Mikrotubuli. In dieser Phase bedarf es für die Separation der Schwesterchromatiden ein Netzwerk aus stabilen Tubulin-Röhren (Higuchi and Uhlmann, 2005).

Es wäre möglich, dass in der Haspin-Doppelmutante die beobachtete Spindelfehlorientierung nur die Folge der Zellpolarität-Auswirkungen ist. Jedoch weisen Proteinkinasen typischerweise eine Vielzahl an Substraten auf, sodass es durchaus plausibel ist, dass auch die Haspin-Proteine mehrere Zielproteine besitzen. Zudem scheint ihr Einfluss auf das Mikrotubuli-Zytoskelett unabhängig von den Auswirkungen der Zellpolarität zu sein, da die Spindelfehlorientierung auch in asynchronen Kulturen mit einem richtig polarisierten Aktin-Zytoskelett zu beobachten war.

Abschließend lässt sich festhalten, dass die initial vorhandene Verbindung durch das Motorprotein Cin8 von Haspin zum Mikrotubuli-Zytoskelett weiter spezifiziert werden konnte. Dabei wäre es möglich, dass *Alk1* und *Alk2* in mehreren Bereichen auf das Mikrotubuli-Netzwerk einwirken. Für die Spindelorientierung könnten sie als Bindepartner für Mikrotubuli-Plus-Enden am Kortex bzw. am Knospenhals fungieren. Des Weiteren sind eine Funktion in der Anaphase B zur Unterstützung der Spindelelongation und ein direkter Einfluss auf die Dynamik der Mikrotubuli denkbar.

### 5.3 In *S. cerevisiae* besteht kein funktioneller Zusammenhang von Haspin mit der Histon H3 Threonin 3 Phosphorylierung

Von den Haspin-Proteinen der eukaryotischen Organismen - Säugern, Fröschen, Pflanzen und der Spaltheife - ist bekannt, dass sie Histon H3 an Threonin 3 phosphorylieren und über diese Modifikation ihre Funktionen ausüben. Es wird beschrieben, dass Haspin somit zur Chromosomenarm-Kondensation, in der Metaphase zur Anordnung der Chromosomen und später die Kohäsion der Schwesterchromatiden unterstützt (Dai and Higgins, 2005). Mitotische Defekte resultierten nach Repression der Expression von Haspin, wodurch diese auf die fehlende Phosphorylierung zurückgeführt wurden.

Um zu überprüfen, ob in der Bäckerhefe die Haspin-Proteine ihre Funktion über die Modifikation an Histon H3 T3 ausüben, wurde ein Stamm generiert, dem die potentielle Modifikationsstelle aufgrund eines Aminosäure-Austausches (Threonin zu Alanin: T3A-Mutante) fehlte. Sollte auch in diesem Organismus für Haspin das Histon H3 T3 das Substrat sein, so müsste die T3A-Mutante die Phänotypen der Haspin-Doppelmutante widerspiegeln. Eine solche Beobachtung zeigte sich nicht in der Histon-Mutante (Abbildung 4.34). Die Phänotypen der Haspin-Doppelmutante, wie die genetische Interaktion mit *CIN8* in Form von einem synthetischen Wachstumsdefekt, die erhöhte Spindelfehlorientierung als auch die morphologisch riesigen Tochterzellen in der Metaphase, sind in der Bäckerhefe folglich nicht auf eine mangelnde Phosphorylierung des Histons H3 T3 zurückzuführen.

Jüngst sind Publikationen erschienen, die der Phosphorylierung an Histon H3 Threonin 3 eine Rolle bei der Lokalisation des CPCs am inneren Zentromer zukommen lassen (Kelly et al., 2010; Wang et al., 2010; Yamagishi et al., 2010). In *S. cerevisiae* sind bislang noch keine Daten über eine solche Phosphorylierung bekannt. Aus diesem Grund wurde über genetische und mikroskopische Analysen eine potentielle Rolle von Haspin in der CPC-Lokalisation untersucht. Die resultierenden Ergebnisse deuten nicht darauf hin, dass Haspin in diesem Modellorganismus entscheidend zu dem Prozess beiträgt, da sich die Beobachtungen aus *S. pombe* von Yamagishi et al. (2010) nicht zeigten (Abbildung 4.35, Abbildung 4.36, Abbildung 4.37). Das Zentromer in *S. cerevisiae* definiert sich genetisch durch eine spezifische, 125 Basenpaar lange DNA-Sequenz. In allen Eukaryoten, in denen beschrieben wurde, dass die Histon H3 T3ph einen wichtigen Beitrag zur CPC-Lokalisation liefert, existieren hingegen keine konservierten DNA-Motive, die ausreichend oder notwendig sind, um das Zentromer zu definieren (Torras-Llort et al., 2009). Daher ist eine epigenetische Definition der Zentromer-Region in *S. cerevisiae* nicht zwingend erforderlich. Eine weitere Erklärung könnte sein, dass in den verschiedenen Modellorganismen die nukleäre Lokalisation der Haspin-Proteine von unterschiedlicher Bedeutung für deren Funktion ist. In *S. pombe* und Säugern lokalisiert Haspin

ausschließlich im Kern, wodurch dessen einziger Funktionsbereich widergespiegelt wird. Im Vergleich dazu lokalisiert in der Bäckerhefe Alk2 am Knospenhals, am Tochterkortex und im Kern. Neben einer potentiellen Rolle im Mikrotubuli-Zytoskelett im Kern, könnte die nukleäre Lokalisation von Alk2 u.a. ein inaktives Depot darstellen, wovon für die Beendigung des Tochterzell-spezifischen Wachstums Gebrauch gemacht wird.

Des Weiteren war der Nachweis einer potentiellen Phosphorylierung mit phosphospezifischen Antikörpern nicht erfolgreich. Falls die Histon H3 T3ph existieren sollte, könnte es sich um eine sub-stöchiometrische Modifikation handeln. Dies würde bedeuten, dass die Menge der Phosphorylierung so gering war, dass diese unter der Nachweisgrenze lag. Dies wirft die Frage der Funktion von H3 T3ph in dem Organismus auf, sofern es hier diese Phosphorylierung gibt.

Insgesamt ist offen geblieben, ob die Histon H3 T3-Phosphorylierung durch Haspin in *S. cerevisiae* existiert. Es scheint plausibler, dass in diesem Modellorganismus andere Zielproteine für die Haspine vorhanden sind. Somit könnten die Homologen neben dem zur Zellpolarität beitragenden, potentiellen Zielprotein Bem2 noch weitere Proteine im Mikrotubuli-Zytoskelett als Substrate haben.

Zusammenfassend lieferte diese Arbeit einen Beitrag, um die bisher vorhandene Lücke bei der Zellmorphologie-Entwicklung, ansatzweise zu schließen. Dabei beendigen Haspin-Proteine der Bäckerhefe das spezifisch auf die Tochterzelle gerichtete Wachstum, indem sie die Asymmetrie zwischen der Mutter- und der Tochterzelle aufheben. Über welche Mechanismen dies genau abläuft, ist bis dato noch nicht bekannt. Aus diesem Grund zeigen sich weitere, wichtige Fragestellungen auf, die es in Zukunft zu klären gilt.

## 6 Methoden

### 6.1 Arbeiten mit Bakterien

Für die Amplifikation von *E. coli*- und Hefe-Shuttlevektoren wurde der Bakterienstamm *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  verwendet.

Genotyp: F-,  $\Phi$ 80dlacZ\_M15\_(lacZYA-argF)U169 deoR recA1 endA1 hsdR17(rk-, mk+) phoA supE44  $\lambda$ -thi-1 gyrA96 relA1

#### 6.1.1 Kultivierung von Bakterien

Die Kultivierung von *E. coli* DH5 $\alpha$  erfolgte schüttelnd oder rollend in LB-Flüssigmedium oder auf LB-Agar mit Ampicillin (100  $\mu$ g/ml) bei 37°C. Zur Überprüfung der DH5 $\alpha$ -Transformanden auf  $\alpha$ -Komplementation wurden jeweils 100  $\mu$ l X-Gal (100  $\mu$ M) und IPTG (400  $\mu$ M) auf einer LB-Ampicillin-Agarplatte ausplattiert.

#### 6.1.2 Transformation von Plasmid-DNA mittels Elektroporation

Zur Entfernung störender Salze wurde die zu transformierende Plasmid-DNA 20 min gegen destilliertes Wasser dialysiert. 50  $\mu$ l elektrokompente DH5 $\alpha$ -*E. coli*-Zellen wurden auf Eis aufgetaut, mit 1–10  $\mu$ l Plasmid-DNA versetzt und in eine vorgekühlte, sterile Elektroporationsküvette (2 mm Plattenabstand) luftblasenfrei überführt. Die Elektroporation erfolgte unter folgenden Parametern:

Feldstärke 12,5 kV/cm

Widerstand 200  $\Omega$

Kapazität 25  $\mu$ F

Kondensatorspannung 2,5 kV

Nach dem Stromstimulus wurden die Zellen unverzüglich in 1 ml 37°C vorgewärmtes SOC-Medium gegeben und für die phänotypische Expression des  $\beta$ -Lactamase-Gens 1 h bei 37°C inkubiert. Die Selektion auf resistente Klone erfolgte auf LB-Ampicillin-Platten, indem 1 bis 10  $\mu$ l der Zellen darauf ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert wurden.

### 6.2 Arbeiten mit Hefe – *Saccharomyces cerevisiae*

#### 6.2.1 Kultivierung von Hefestämmen in Flüssigmedium

Für die Kultivierung von *Saccharomyces cerevisiae* wurde ein XY-Vollmedium verwendet, welches je nach Verwendung 2 % Glukose (D), 2 % Galaktose (G), 2 % Raffinose (R) oder 2 % Raffinose und 2 % Galaktose (RG) als Kohlenstoffquelle beinhaltet. Um den Selektionsdruck bei Stämmen mit episomalen Plasmid zu gewähren, wurden diese auf einem synthetischen

Medium kultiviert. Für Experimente wurden Vorkulturen in Röhrchen in einem Roller über mehrere Stunden angezogen. Hiervon wurde am Abend die Hauptkultur in einem größeren Volumen definiert angeimpft und unter geeigneten Bedingungen inkubiert, um am nächsten Morgen eine exponentiell wachsende Kultur mit einer  $OD_{600}$  zwischen 0,3 und 0,8 zu erhalten.

## **6.2.2 Aufbewahrung und Konservierung von Hefestämmen**

Hefestämme wurden wenige Tage in Flüssigkultur bei Raumtemperatur oder mehrere Wochen in Form von Kolonien auf Agarplatten bei 4°C aufbewahrt. Für die dauerhafte Konservierung wurden 5 ml einer stationären Übernachtskultur pelletiert (2 min, 2000 Upm), in 2 ml 15 % Glycerin resuspendiert und bei -70°C eingefroren.

## **6.2.3 Wachstumstest von Hefestämmen mittels Verdünnungsreihe**

Um das Wachstum von Hefestämmen unter verschiedenen Bedingungen, wie Temperatur oder Medien analysieren zu können, wurden die jeweiligen Stämme zunächst über Nacht bei 30°C angezogen. Die stationären Kulturen wurden mit Wasser auf eine optische Zelldichte von  $OD_{600} = 1$  (entspricht ca.  $0,2 \times 10^7$  Zellen) in einem Volumen von 200  $\mu$ l eingestellt. Hiervon ausgehend wurde in einer Mikrotiterplatte eine Verdünnungsreihe mit fünf weiteren 1:10-Verdünnungsschritten erstellt. Von den Stammsuspensionen wurden gleiche Volumina mit einem Metallstempel („Frogger“) auf Vollmediumplatten überführt und 2 - 4 Tage bei 15°C, 25°C, 30°C bzw. 37°C inkubiert.

## **6.2.4 Kreuzung von haploiden Hefestämmen**

Eine klassische Methode der Hefegenetik zur Kombination der Genotypen zweier haploider Hefestämme mit unterschiedlichem Paarungstyp (MAT a/ $\alpha$ ) stellt die Kreuzung dar.

Dazu wurde auf Vollmediumplatten etwas Zellmaterial der jeweiligen Hefestämme miteinander vermengt und bei 30°C mindestens 5 h inkubiert. Die Selektion auf diploide Zellen erfolgte über die Auxotrophiemarker oder Antibiotika-Resistenzen der Ausgangsstämme, indem etwas Zellmaterial auf einer entsprechenden Selektionsplatte ausgestrichen wurde. Die herangewachsenen Einzelkolonien wurden zur Sporulation angesetzt.

Für die Generierung von homozygot, diploiden Stämmen, die keine Möglichkeit der Selektion boten, wurden mittels eines Mikromanipulators Zygoten auf Vollmediumplatten ausgelegt. Um die erfolgte Kreuzung zu bestätigen, wurde der Paarungstyp mit Hilfe von PCR überprüft.

## **6.2.5 Sporulation diploider Hefezellen und Tetraden-Analyse**

Unter guten Bedingungen teilen sich diploide wie haploide Hefen durch Mitose. Herrschen Mangelbedingungen - wie Kohlenstoff- und Stickstoffmangel - durchlaufen diploide Hefezellen

den meiotischen Teilungszyklus. Dabei bilden sie eine Tetrade aus vier haploiden Überdauerungssporen, die von einem Ascus umgeben ist. Die Sporen stellen Überdauerungsformen bei ungünstigen Bedingungen dar, so dass sie den mitotischen Teilungszyklus wieder aufnehmen, sobald sich die Wachstumsbedingungen verbessert haben.

Um die Sporulation im Labor möglichst rasch zu induzieren, wurden 2 ml nährstoffreiches Präsporulationsmedium mit Zellmaterial eines diploiden Stammes angeimpft und mindestens 5 h bei 30°C über Tag rollend inkubiert. Die Kulturen wurden am nächsten Tag (2 min, 2000 Upm) pelletiert, in 2 ml nährstoffarmen Sporulationsmedium gewaschen, in 2 ml Sporulationsmedium aufgenommen und bei 25°C im Roller inkubiert. Die Sporulation dauerte je nach Stammhintergrund etwa 3 (W303) bis 6 (S288C) Tage. Im Durchlichtmikroskop wurde der Anteil an sporulierten Zellen überprüft. Für die Tetraden-Analyse wurde die Ascuswand verdaut, indem 100 µl Tetradensuspension mit 100 µl Novozymbilösung für 20 - 30 min bei Raumtemperatur versetzt wurden. Hiervon wurden 15 µl auf eine Vollmediumplatte streifenförmig aufgetragen. Mit Hilfe eines Mikromanipulators wurden auf einer Vollmediumplatte die vier zusammengehörigen Sporen einer Tetrade anhand eines Rasters einzeln positioniert. Nach einer Inkubationszeit von 3 - 5 Tagen bei 30°C waren die Sporen zu Kolonien herangewachsen und ihr Genotyp wurde mit einem Markertest charakterisiert. Hierfür wurden die Zellen in 180 µl Wasser in einer Mikrotiterplatte resuspendiert, mit Hilfe eines Metallstempels auf die entsprechenden Selektivplatten übertragen und nach 24 h Inkubation bei 30°C das Wachstumsverhalten ausgewertet.

### 6.2.6 Kontrolle der Genexpression durch regulierbare Promotoren

Für die gezielte, induzierbare Expression von *ALK2* und *KIN4* wurde der *pGAL1*-Promotor vor dem jeweiligen Gen in das Genom integriert. Hierfür wurden die Stämme bis zu einer  $OD_{600}$  von 0,3 - 0,4 in XYR (2 %) bei 25°C angezogen und mit 2 % Galaktose für 3 h induziert.

Durch die Repression des vor *CDC20* geschalteten *GALL*-Promotors arretierten die Zellen in der Metaphase. Dabei wurden die Zellen in Medium mit jeweils 2 % Raffinose und Galaktose bei 30°C kultiviert, in der exponentiellen Wachstumsphase in 2 % Glukose-enthaltendes Vollmedium umgesetzt und für 3 h inkubiert.

### 6.2.7 Zellzyklus-Arreste

In dieser Arbeit wurden Hefezellen in der Metaphase des Zellzyklus arretiert. Hierfür wurden die Zellen mit dem Mikrotubuli-depolymerisierenden Substrat Nocodazol (W303: 7,5 µg/ml; S288c: 20 µg/ml) behandelt. Das Spindelkontrollsystem war nach 3-stündiger Inkubation bei 30°C aktiviert, wobei die DNA repliziert und die Schwesterchromatiden ungetrennt vorlagen. Hefezellen wurden zudem noch durch die Depletion von *CDC20* in der Metaphase angehalten.

Die Inhibition der Expression des APC/C-Aktivators wurde entweder, wie im Kapitel 6.2.6 beschrieben, durch die Repression des vor *CDC20* geschalteten *GALL*-Promotors oder durch das temperatursensitive *cdc20-3* Allel bei der restriktiven Temperatur von 37°C bewerkstelligt. Dabei können die Zellen durch das Fehlen des APC/C-Aktivators nicht mehr aus der Mitose austreten, weil der Abbau von den mitotischen Zyklinen und die damit verbundene Inaktivierung der CDK nicht stattfinden können.

## 6.2.8 Hefetransformation nach der Lithiumacetat-Methode

Durch Behandlung mit Lithiumacetat-Ionen können Hefezellen befähigt werden fremde DNA aufzunehmen (Gietz and Woods, 2002).

Für die Transformation wurden 2 ml einer logarithmisch wachsenden Kultur ( $OD_{600}$  von 0,7 - 1) abzentrifugiert (2 min, 2000 Upm) und zweimal in 1 ml sterilem Wasser gewaschen. Die pelletierten Zellen wurden zunächst in Wasser und 50 % PEG 3350 resuspendiert, bevor die restlichen Komponenten des Transformationsansatzes hinzupipettiert und auf dem Vortex-Mixer gemischt wurden.

Transformationsansatz	
50 % PEG 3350 (w/v)	240 µl
DNA in sterilem H <sub>2</sub> O	34 µl
Heringssperma DNA	50 µl
1 M LiAc	36 µl

Der Transformationsansatz wurde 20 min bei Raumtemperatur auf dem Roller und anschließend für 15 min bei 42°C im Heizblock inkubiert. Die Zellen wurden kurz abzentrifugiert (30 s, 13200 Upm), in 250 µl sterilem Wasser aufgenommen und auf der entsprechenden Selektivplatte ausplattiert. Bei der Transformation mit Resistenzmarkern wurde der abzentrifugierte Zellansatz in 5 ml Vollmedium aufgenommen und für 3 h bei 30°C im Roller inkubiert. In dieser Zeit sollte der Stamm die entsprechende Antibiotika-Resistenz entwickeln. Danach wurden diese Stämme abzentrifugiert (2 min, 2000 Upm), in 250 µl sterilem Wasser aufgenommen und auf Platten mit Kanamycin bzw. clonNAT ausplattiert. Nach einer Inkubationszeit von 3 Tagen bei 30°C waren Transformanden auf den Platten zu sehen.

### 6.3 Fixierung, Färbung, Mikroskopie und Durchflusszytometrie von Hefezellen

#### 6.3.1 Ethanol-Fixierung von Hefezellen

Durch die Behandlung mit 70 % Ethanol können Hefezellen fixiert und damit länger (1 - 2 Jahre) aufbewahrt werden. Zudem wird die Membran porös, wodurch eine DNA-Färbung mit interkalierenden Farbstoffen ermöglicht wird.

Hierfür wurde 1 OD<sub>600</sub> an Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet, in 150 µl sterilem Wasser resuspendiert und unter ständigem Schütteln langsam mit 350 µl 100 % Ethanol versetzt. Vor dem weiteren Einsatz wurden die Zellen in 1 ml Natrium-Citrat-Puffer (50 mM, pH 7,0) gewaschen und zur Vereinzelnung der eventuell agglomerierten Zellen mit zehn Ultraschall-Impulsen behandelt.

#### 6.3.2 Formaldehyd-Fixierung von Hefezellen

Die Fixierung von Zellen mittels Formaldehyd führt zur Quervernetzung der enthaltenen, zellulären Proteine. Manche Methoden, wie z.B. die indirekte Immunfluoreszenz oder die Aktin-Visualisierung mittels Phalloidin, benötigen eine derartige anfängliche Struktur-Fixierung. Die Fixierungszeiten des zu untersuchenden Proteins richten sich nach dessen Komplexität. Somit bedarf es einer kürzeren Fixierungszeit bei Proteinen, die Bestandteil größerer Komplexe sind (z.B. Spc34 2 min) im Vergleich zu weniger komplexen Strukturen (z.B. Tubulin 90 min).

4,4 ml einer exponentiell wachsenden Kultur mit einer Zelldichte von etwa 1 OD<sub>600</sub> wurden mit 610 µl 37 % Formaldehyd versetzt und für 2 - 90 min im Rollator bei 25°C inkubiert. Danach wurden die Zellen 2 min bei 2000 Upm abzentrifugiert, in 1 ml Puffer B resuspendiert und nach einem weiteren Zentrifugationsschritt in 1 ml Puffer B aufgenommen. Die fixierten Zellen wurden auf eine OD<sub>600</sub> von 1 mit Puffer B eingestellt, bei 4°C gelagert und innerhalb von einer Woche weiterverarbeitet.

#### 6.3.3 DNA-Färbung mit DAPI von Hefezellen

Mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI (4', 6'-Diamidino-2-phenylindol), welcher sich bevorzugt an AT-reiche Regionen der DNA anlagert, können unter Anregung mit Licht der Wellenlänge  $\lambda = 361$  nm DNA-haltige Zellstrukturen sichtbar gemacht werden. Das Emissionsmaximum des Fluorochroms liegt im blauen Bereich bei 454 nm.

Ethanolfixierte Zellen wurden in 1 ml Natriumcitrat-Puffer (50 mM, pH 7,0) gewaschen und zur Auflösung von Zellaggregaten mit Ultraschall (8 Pulse, 40 % Leistung) behandelt. 5 µl der Zellen wurden auf einen Objektträger mit 2 µl DAPI-enthaltendem Mounting Medium vermengt und nach kurzem Antrocknen im Fluoreszenzmikroskop analysiert.

### 6.3.4 Aktin-Färbung von Hefezellen

Die Zytoskelett-Komponente Aktin kann durch Färbung mit Farbstoff (FITC = Fluoresceinisothiocyanat bzw. Alexa488) gekoppeltem Phalloidin visualisiert werden (Adams and Pringle, 1991). Dieses vom Knollenblätterpilz stammende Gift bindet selektiv polymerisiertes F-Aktin.

Hierfür wurden Zellen von einer Platte in 4,4 ml Vollmedium angeimpft und über 4 h bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden die Kulturen 30 min bei 25°C mit 610 µl 37 % Formaldehyd fixiert, bei 2000 Upm 2 min abzentrifugiert und fünfmal in 500 µl PBS/BSA mit 1 % Triton X gewaschen. Das Pellet wurde in 100 µl PBS/BSA mit 2 µl Phalloidin (Stammlösung: 0,1 mg/ml in DMSO) resuspendiert und für mindestens 90 min im Dunkeln rollend bei Raumtemperatur gefärbt. Zur Entfernung des überschüssigen Farbstoffs wurden die Hefezellen zweimal mit PBS/BSA mit 1 % Triton X gewaschen und am Ende in 40 µl 1 x PBS aufgenommen. Von der Suspension wurden 2 µl unter Wasser-Agaroseblöckchen (0,75 - 1 %) auf Deckgläschen mit Hilfe des *spinning-disk*-Systems im konfokalen Mikroskop analysiert. Die Aufnahmen entstanden bei einer Belichtungszeit von 200 ms und einer Laserintensität im Wellenlängenbereich 488 nm von 100 %.

### 6.3.5 Aktin-Depolymerisation mit Latrunculin B

Latrunculin B wirkt gegen das Aktin-Zytoskelett von Zellen, indem es zum Einen durch die Anlagerung an G-Aktin die Polymerisation von F-Aktin verhindert. Zum Anderen zerstört das marine Toxin die Organisation von Mikrofilamenten.

In flüssigem Vollmedium kultivierte Zellen wurden abends in 5 ml so verdünnt, dass sie am nächsten Tag in der exponentiellen Wachstumsphase waren. Die Stämme wurden mit 20 µM Latrunculin B (Stammlösung 1,5 mM) versetzt und bei 25 °C im Roller für 30 min inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 2 min bei 2000 Upm abzentrifugiert, auf eine OD<sub>600</sub> von 3 eingestellt und 3 µl davon auf Agarose beschichteten Objektträgern im konfokalen Mikroskop untersucht.

### 6.3.6 Direkte Fluoreszenzmikroskopie mit Agarose beschichteten Objektträgern – *live-cell imaging*

Für die Betrachtung lebender Hefezellen mit GFP- bzw. Cherry-Fluorophor-fusionierten Proteinen, wurden Agarose beschichtete Objektträger mit entsprechendem Zucker hergestellt. Hierfür wurde eine Wasser-Agaroselösung in der Mikrowelle aufgeköcht, nach kurzem Abkühlen mit dem Vollmedium im Falcon zehnmal invertiert und ganzflächig, gleichmäßig in eine Petrischale gegossen. Die Agarose mit den entsprechenden Zuckern wurde folgendermaßen hergestellt (Zeng et al., 1999):

Agarose mit Glukose		Agarose mit Galaktose/Raffinose	
H <sub>2</sub> O-Agarose	0,75 %	H <sub>2</sub> O-Agarose	1 %
10 x Dropout ++	1,5 ml	10 x Dropout ++	1,5 ml
10 x YNB	1,5 ml	10 x YNB	1,5 ml
20 % Glukose	1,5 ml	20 % Galaktose	0,5 ml
		10 % Raffinose	3 ml

Die wachsenden Zellen wurden für 2 min bei 2000 Upm abzentrifugiert. Zur Vermeidung der Autofluoreszenz von Vollmedium wurde die Zelldichte mit Wasser auf OD<sub>600</sub> = 3 eingestellt. 3 µl dieser Zellen wurden auf einem Deckglas (24 × 66 mm) positioniert und mit einem erkalteten, starren 10 × 10 × 2 mm großem Agarosestückchen langsam (zur Vermeidung von Luftbasen) bedeckt. Um dem Austrocknen des Nährstoffmediums vorzubeugen, wurde darauf ein Deckgläschen gegeben. Die Betrachtung der Zellen erfolgte im inversen Mikroskop mit Hilfe eines *spinning-disk*-Systems bei 21 – 23°C. Die 2D-Projektionen der Aufnahmen entstanden aus 10 optischen Schnitten mit einem Abstand von 0,5 µm, wobei die Belichtungszeit 200 ms betrug.

### 6.3.7 Indirekte Immunfluoreszenz

Die Methode der indirekten Immunfluoreszenz ermöglicht die Lokalisation von Proteinen in Formaldehyd-fixierten Zellen (Pringle et al., 1991). Dafür wird ein spezifisch gegen das Epitop-markierte Protein gerichteter Primärantikörper auf die Zellen gebracht. Der Sekundärantikörper, der das Fluorophor trägt, richtet sich gegen diesen und emittiert bei entsprechender Anregung längerwelliges Licht, so dass die Zielstrukturen sichtbar werden.

#### 6.3.7.1 Beschichtung der Multiwell Objektträger mit Polylysin

Die staubfreien Objektträger wurden pro Well mit 10 µl abzentrifugierten Polylysinen (1 mg/ml) beschichtet und für 10 – 15 min in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Zur besseren Anheftung der Polylysine am Objektträger wurden diese für 1 h getrocknet. Anschließend wurde jedes Well fünfmal 5 min lang mit 50 µl abzentrifugiertem Wasser gewaschen. Die beschichteten Objektträger wurden zur Trocknung staubfrei in einer Petrischale aufbewahrt.

#### 6.3.7.2 Vorbereitung der Proben

Für das weitere Vorgehen der Immunfluoreszenz wurden Formaldehyd-fixierte Zellen (Vorgehensweise 6.3.2) mit einer Zelldichte von  $1,0 \times 10^7$  folgendermaßen weiterverarbeitet:

Für den Verdau der Zellwand wurden die Ansätze mit 20 µl Zymolyase 20 T (1 mg/ml) und

25 µl DTT (1 M) für 12 (in XYD) – 30 min (in XYRG) rollend bei 37°C versetzt. Anschließend wurden die Zellen einmal mit Puffer B gewaschen, in 500 µl Puffer B resuspendiert und 40 µl hiervon auf die Polylysin-beschichteten Wells pipettiert. Die Zellen wurden zum Absetzen für 10 min staubfrei auf dem Objektträger inkubiert, anschließend wurde der überschüssige Puffer-Überstand abgenommen und der Objektträger bis zur Immobilisierung der Hefen getrocknet (mindestens 30 min). Für die bessere Darstellung von Kernstrukturen wurden die Objektträger vorsichtig für 6 min in Methanol (-20°C) und danach unverzüglich für 30 s in (-20°C) Aceton getaucht. Zur Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen für Antikörper wurden die Proben für 1 h mit 45 µl PBS/BSA (1 mg/ml) in einer feuchten Kammer überschichtet. Der Puffer wurde bestmöglich abgenommen, worauf die Inkubation über Nacht mit dem primären, in PBS/BSA verdünnten Antikörper folgte. Am nächsten Tag wurden die noch ungebundenen Antikörper durch fünfmaliges Waschen für 5 min mit jeweils 40 µl PBS/BSA entfernt. 20 µl des entsprechenden sekundären, Fluorophor-gekoppelten Antikörpers wurden auf die Wells aufgetragen und mit den Zellen bei Raumtemperatur für 2 h abgedunkelt inkubiert. Nach Entfernung des überschüssigen, sekundären Antikörpers durch fünfmaliges Waschen für 5 min mit 40 µl PBS/BSA von den Zellen, wurden diese mit 3 µl DAPI-enthaltendem Mounting-Medium überschichtet und mit einem Deckgläschen abgedeckt. Das Aushärten des Objektträgers erfolgte dunkel bei 4°C.

### 6.3.8 Mikroskopie

Für die Visualisierung, Beobachtung und Dokumentation von Hefezellen wurde für die direkte Fluoreszenz- bzw. indirekte Immunfluoreszenz-Mikroskopie das Mikroskop Imager M1 und die AxioCam MRm von der Firma Zeiss eingesetzt. In der konfokalen „live-cell“-Mikroskopie wurde das inverse Mikroskop Observer Z.1 mit der *spinning-disk* Einheit CSU-X1 von Yokogawa verwendet. Die Bedienung der Mikroskope und der Kameras, sowie die Auswertung der Aufnahmen wurden mit der Axio Vision LE Rel. 4.8 Software durchgeführt.

### 6.3.9 Durchflusszytometrie

Zur Bestimmung des DNA-Gehalts bzw. zur Ermittlung des Zellteilungsstadiums, als auch der Zellgröße von Zellen, wurde die Technik der Durchflusszytometrie eingesetzt (Haase, 1997). Das Fluorochrom Sytox Green ermöglicht hierbei die DNA-Färbung einer Zelle.

Hierfür wurden ethanolfixierte Zellen in 1 ml Natriumcitrat-Puffer (50 mM, pH 7,0) gewaschen und in 500 µl Natriumcitrat-Puffer resuspendiert. Zur Vereinzelung der Zellen wurden diese mit Ultraschall behandelt und anschließend auf eine Zelldichte von  $OD_{600} = 0,25$  in einem Volumen von 250 µl eingestellt. Um störende RNAs und Proteine für die DNA-Messung zu entfernen, wurden zuerst 10 µl RNase A (10 mg/ml) zugegeben und für 1 h im Thermoschüttler

bei 50°C inkubiert. Anschließend wurden 10 µl Proteinase K (10 mg/ml) zu der Suspension pipettiert und eine weitere Stunde bei 50°C geschüttelt. Die Zellen wurden abzentrifugiert, in 250 µl Natriumcitrat-Puffer pH 7,0 aufgenommen und über Nacht bei 4°C im Dunkeln durch die Zugabe von 1 µM Sytox Green gefärbt.

20 µl der Sytox Green gefärbten Proben wurden in 1 ml Tris/HCl (0,5 M, pH 7,5) verdünnt und anschließend im Durchflusszytometer (Partec CA-III) analysiert. Die Messdaten wurden mit der Software WinMDI ausgewertet.

## 6.4 Genetische und molekularbiologische Methoden

### 6.4.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR *polymerase chain reaction*) dient der exponentiellen *in vitro* Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente (Mullis et al., 1986). Dabei kommt es zur Abfolge mehrerer Zyklen von Denaturierung einer doppelsträngigen DNA-Matrize bei 94°C, Anlagerung der Oligonukleotide bei ca. 54 – 64°C (*annealing*) und enzymatischer DNA-Synthese bei 72°C (*extension*). Der zu vervielfältigende Bereich wird durch die Verwendung von einzelsträngigen, gegenläufigen Oligonukleotiden (Primer) definiert, die zum Anfangs- bzw. End-Bereich des Zielfragments homolog sind. Diese Reaktion erfordert eine thermostabile DNA-Polymerase, welche die Synthese der komplementären Desoxyribonukleotide an die 3'-Hydroxy-Enden der Primer zum Matrizenstrang addiert.

Die PCR wurde präparativ für die Amplifikation von DNA-Fragmenten aus Plasmiden oder genomischer DNA, sowie für die zielgerichtete Mutagenese eingesetzt. Aufgrund der Korrekturleseaktivität der *KOD*-Polymerase wurde diese bei präparativen Anwendungen verwendet. Für analytische Zwecke, wie zum Beispiel zur Bestimmung des Paarungstyps mittels MAT-PCR, wurde die *Taq*-Polymerase benutzt.

## 6.4.1.1 PCR zur Amplifikation von DNA-Fragmenten

Mit Hilfe dieser Methode wurden präparativ Gene und Genfragmente, teils mit ihren endogenen Promotoren aus dem Genom oder von einem Plasmid für Klonierungen amplifiziert. Hierzu wurden an die 5'-Enden der Oligonukleotid-Primer ausgewählte Restriktionsschnittstellen eingeführt, um die resultierenden PCR-Produkte anschließend spezifisch in einen vorgesehenen Vektor klonieren zu können.

Reaktionsansatz DNA-Fragmente	
KOD Hot Start DNA Puffer (10 x)	5 µl
dNTP-Mix (2 mM)	5 µl
MgSO <sub>4</sub> (25 mM)	6 µl
Primer forward (10 pmol/µl)	3 µl
Primer reverse (10 pmol/µl)	3 µl
KOD Hot Start DNA Polymerase (1 U/µl)	1 µl
DNA-Matrize	1 µl
steriles H <sub>2</sub> O	26 µl
Gesamtvolumen	50 µl

Temperaturprofil		
Denaturierung	94°C	5 min
Denaturierung	94°C	30 s
Annealing	T <sub>a</sub> °C	30 s
Elongation	72°C	1 kb/min
} 25 Zyklen		
Restamplifikation	72°C	5 min

Die Annealingtemperatur T<sub>a</sub> wurde 2 - 4°C unter der Schmelztemperatur der Oligonukleotid-Primer gewählt. Bei der Verwendung genomischer DNA als DNA-Matrize wurden 25, bei einem Plasmid hingegen nur 20 Zyklen der Amplifikation durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden auf einem 0,7 % Agarosegel überprüft, mit dem *QIAquick PCR Purification Kit* gemäß den Angaben des Herstellers aufgereinigt und in 30 µl Wasser eluiert.

## 6.4.1.2 PCR-vermittelte Modifikation von chromosomalen Genen

Mit dieser Methode und unter Verwendung des pFA-Systems von Longtine et al. bzw. des pFA-link-Systems von Sheff und Thorn und dessen Erweiterungen können Gene deletiert, mit einem Epitop bzw. Fluoreszenzmarker fusioniert sowie unter die Kontrolle eines anderen Promotors gestellt werden (Goldstein and McCusker, 1999; Janke et al., 2004; Longtine et al., 1998; Sheff and Thorn, 2004). Der amplifizierte Sequenzbereich enthält an den Enden homologe Bereiche

zum Integrationsort, über die es letztendlich möglich ist, durch homologe Rekombination in das Hefegenom zu integrieren.

Dafür waren die verwendeten Primer am 5'-Ende mit 50 bp langen homologen Sequenzen zum gewünschten Integrationsort im Genom und die 3'-Enden mit 18 komplementären Basen zum jeweiligen pFA-Plasmid ausgestattet.

### Reaktionsansatz Genommanipulation

KOD Hot Start DNA Puffer (10 x)	5 µl
dNTP-Mix (2 mM)	5 µl
MgSO <sub>4</sub> (25 mM)	6 µl
Primer forward (10 pmol/µl)	3 µl
Primer reverse (10 pmol/µl)	3 µl
KOD Hot Start DNA Polymerase (1 U/µl)	1 µl
Plasmid-DNA (pFA6a) ca. 50 ng	1 µl
steriles H <sub>2</sub> O	26 µl
Gesamtvolumen	50 µl

### Temperaturprofil

Denaturierung	94°C	5 min	
Denaturierung	94°C	1 min/ 30 s	25 - 30 Zyklen
Annealing	54 - 62°C	1 min/ 30 s	
Elongation	72°C	3 min/ 150 s	
Restamplifikation	72°C	5 min	

Um Oligonukleotide, Nukleotide, Pufferkomponenten und Enzyme aus dem PCR-Ansatz für weitere Zwecke zu entfernen, wurden die DNA-Fragmente mit dem *QIAquick PCR Purification Kit* der Firma Qiagen nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. Die Elution wurde in einem Volumen von 30 µl Wasser durchgeführt.

#### 6.4.1.3 Gezielte Mutagenese eines Gens mittels PCR

Durch eine spezielle lineare Amplifikation von DNA ist es möglich gezielte Mutationen in ein Gen einzuführen (Braman et al., 1996). Hierfür wird ein komplettes Plasmid, das nicht größer als 10 kb sein sollte, amplifiziert. Die 50 bp langen Oligonukleotide beinhalten die gewünschte Mutation und binden über die davon seitlich gelegenen, zum Gen homologen Bereiche an die entsprechende Stelle auf dem Plasmid.

## Reaktionsansatz zielgerichtete Mutagenese

KOD Hot Start DNA Puffer (10 x)	5 µl
dNTP-Mix (2 mM)	5 µl
MgSO <sub>4</sub> (25 mM)	3 µl
Primer forward (10 pmol/µl)	5 µl
Primer reverse (10 pmol/µl)	5 µl
KOD Hot Start DNA Polymerase (1 U/µl)	1 µl
DNA-Matrize	1 µl
steriles H <sub>2</sub> O	25 µl
Gesamtvolumen	50 µl

## Temperaturprofil

Denaturierung	94°C	4 min		
Denaturierung	94°C	1 min	15 Zyklen	
Annealing	58°C	1 min		
Elongation	72°C	5 min		
Restamplifikation	72°C	5 min		

Nach der Amplifikation lag neben dem mutagenisierten PCR-Produkt noch die alte, unmutierte Matrize vor. Dieses aus *E. coli* stammende Plasmid war an 5'-GATC-3'-Sequenzen methyliert und wurde deswegen durch das Restriktionsenzym *DpnI* (10 U) für 2 h bei 37°C abgebaut. In dieser Arbeit wurde zudem über eine Punktmutation eine neue Restriktionsschnittstelle generiert. Dadurch war es nach dem Restriktionsverdau aufgrund des resultierenden Bandenmusters möglich, die gewünschte Mutation zu überprüfen.

### 6.4.1.4 Kolonie-PCR zur Bestimmung des Paarungstyps von Hefestämmen

Auf dem Chromosom III ist der Paarungstyp von Hefezellen im *MAT*-Lokus kodiert. Dieser unterscheidet sich in einem kleinen Abschnitt bei *a*- und *α*-Stämmen.

Für diese PCR-Methode nach Huxley et al. wurden drei Primer eingesetzt. Dabei bindet der *forward*-Primer (WS826) paarungstyp-unabhängig, die beiden *reverse*-Primer (WS827, WS828) hingegen *MATa* bzw. *MATα*-spezifisch (Huxley et al., 1990). Hieraus resultieren unterschiedlich große DNA-Fragmente, die bei *MATa*-Zellen ein 544 bp und bei *MATα*-Zellen ein 404 bp großes Genprodukt liefern. Diploide Stämme generieren beide Fragmente.

Für diesen rein analytischen Nachweis wurde die *Taq*-Polymerase ohne Korrekturleseaktivität eingesetzt. Eine geringe Menge an Zellmaterial, die als DNA-Matrize diente, wurde mit einer sterilen Pipettenspitze direkt im folgenden Ansatz resuspendiert.

## Reaktionsansatz Paarungstyp

PCR-Puffer (10 x) mit MgCl <sub>2</sub> (15 mM)	2,5 µl
dNTP-Mix (2 mM)	2,5 µl
Primer-Mix (WS826, WS827, WS828; 10 pmol/µl)	3 µl
<i>Taq</i> DNA-Polymerase (5 U/µl)	0,3 µl
steriles H <sub>2</sub> O	16,7 µl
Gesamtvolumen	25 µl

## Temperaturprofil

Denaturierung	94°C	4 min	
Denaturierung	94°C	1 min	35 Zyklen
Annealing	55°C	1 min	
Elongation	72°C	40 s	
Restamplifikation	72°C	3 min	

Nach der Amplifikation des paarungstyp-spezifischen Lokus wurden jeweils 15 µl der PCR-Produkte auf einem 1 % Agarosegel aufgetragen (siehe Kapitel 6.4.3).

### 6.4.2 Restriktionsverdau von DNA

Restriktionsendonukleasen erkennen spezifische, meist palindromische Sequenzmotive an denen sie Phosphodiesterbindungen hydrolysieren. Dadurch wird die DNA je nach Restriktionsenzym inner- oder außerhalb dieser Sequenzen gespalten und 3'-, 5'-überhängende oder glatte Enden resultieren.

#### Standardansatz

DNA	0,5–1 µg
Restriktionspuffer (10 x)	2 µl
Restriktionsenzyme	je 5–10 U
steriles H <sub>2</sub> O	Restvolumen
Gesamtvolumen	20 µl

Die Durchführung des Restriktionsverdaus entsprach den Angaben des Herstellers (NEB), wobei sich die Bedingungen je nach Enzym von Temperatur, Puffer und BSA-Zugabe unterschieden. Die Inkubation dauerte 1 bis 20 h.

### 6.4.3 Gelelektrophorese von DNA

Die Agarosegelelektrophorese ermöglicht die Auftrennung von negativ-geladenen DNA-Fragmenten entsprechend ihrer Größe im elektrischen Feld. Sie dient der Identifizierung,

Größenbestimmung, Reinheitsprüfung und Trennung von DNA, sowie zur Reinigung von Restriktions- und PCR-Fragmenten. Die interkalierende Substanz Ethidiumbromid lagert sich zwischen die Basen der Nukleinsäure und macht nach Anregung durch UV-Licht die DNA dadurch indirekt sichtbar.

Dafür wurde 0,75 - 1 % Agarose in 1 x TAE-Puffer aufgekocht, nach kurzem Abkühlen mit 0,2 µg/ml Ethidiumbromid versetzt und in eine Gießvorrichtung der Firma Hoefer überführt. Für den späteren Auftrag der Proben wurden 10 bis 12 Taschen im Gel durch einen Kamm ausgespart. Das ausgehärtete Gel wurde horizontal in eine mit 1 x TAE-Puffer befüllte Wanne gelegt, wobei sich die Probenaschen an der negativen Elektrode befanden. Die zu analysierende DNA wurde mit 10 x Ladepuffer versetzt und in die entsprechenden Geltaschen pipettiert. Zur Größenbestimmung der Fragmente diente der Längenstandard *Gene Ruler DNA Ladder Mix* von Fermentas. Die Auftrennung erfolgte bei einer Stromspannung von 80 V für 40 – 75 min und wurde anschließend unter UV-Licht analysiert.

Zur Isolation von restriktionsverdauten DNA-Fragmenten wurden die entsprechenden Banden unter UV-Licht aus dem Gel ausgeschnitten. Die Isolation und Aufreinigung der DNA aus den Agarosegelstücken erfolgte mit Hilfe des *Gel Extraction Kits* der Firma Qiagen. Die Vorgehensweise entsprach den Angaben des Herstellers, wobei in 30 µl Wasser eluiert wurde.

### 6.4.4 Ligation

Mit Hilfe von Ligasen können DNA-Fragmente nach einem Restriktionsverdau über ihre kompatiblen Enden fusioniert werden. Die relativen Mengen von Vektor und Insert wurden anhand der Intensität und Fragmentgrößen abgeschätzt.

Standardansatz	
Vektor-DNA	50–100 ng
Insert-DNA	5-fache Kopienzahl vom Vektor
<i>T4</i> -DNA-Ligase (1 U/µl)	1 U
Ligase-Puffer (10 x)	2 µl
steriles H <sub>2</sub> O	Restvolumen
Gesamtvolumen	10 µl

Die Ligation erfolgte für 2 h oder über Nacht bei Raumtemperatur.

### 6.4.5 Plasmidpräparation aus *Escherichia coli*

#### 6.4.5.1 Plasmidschnellisolation

Die Methode von Berghammer und Auer ermöglicht eine schnelle Isolation von Plasmiden mit hoher Kopienzahl aus *Escherichia coli* (Berghammer and Auer, 1993). Da diese Plasmid-DNA

stärker mit Proteinen verunreinigt ist, eignet sich die DNA lediglich für Restriktionsanalysen. Zur Aufbewahrung oder zum Sequenzieren müssen geeignetere Verfahren gewählt werden (siehe Kapitel 6.4.5.2).

2 - 4 ml einer Übernachtskultur wurden 4 min bei 13200 Upm pelletiert und in 40 µl Easy-Prep-Puffer resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen 1 min lang bei 100°C aufgeköcht, unverzüglich 1 min auf Eis inkubiert und danach 15 min bei 13200 Upm abzentrifugiert. Im Überstand befand sich nun die Plasmid-DNA, von der 3 – 5 µl zur Analyse im Restriktionsverdau mit anschließender Gelelektrophorese eingesetzt wurden.

### 6.4.5.2 Säulenreinigung von Plasmid-DNA

Für Sequenzierungen wurde die Plasmid-DNA über Säulchen des *NucleoSpin Plasmid Mini-Kits* des Herstellers Macherey-Nagel aufgereinigt. Die Elution erfolgte mit 30 – 50 µl Wasser. Zur Isolation größerer, reiner Mengen an Plasmid-DNA wurde der *GenElute™ HP Plasmid Midiprep Kit* der Firma Sigma eingesetzt. Die Durchführung entsprach jeweils den Angaben des Herstellers.

### 6.4.6 Bestimmung von Konzentration und Reinheitsgrad einer DNA-Lösung

Die Konzentration eines über Säulchen präparierten Plasmids wurde photometrisch durch die Messung der Extinktion (E) bei 260 nm bestimmt. Der Quotient aus den Messungen der Extinktionen bei 260 nm und 280 nm gab Auskunft über die Proteinverunreinigung und war damit ein Maß für die Reinheit der DNA-Lösung.

### 6.4.7 Präparation von genomischer DNA aus Hefezellen

Die Isolierung genomischer DNA aus Hefezellen bedarf einer mechanischen Zerstörung der Zellwand, einer anschließenden Zellyse mittels Detergenzien und einer alkoholischen Fällung (Cryer *et al.*, 1975; Fujimura und Sakuma, 1993).

Hierfür wurden 5 ml einer Übernachtskultur durch Zentrifugation geerntet, in 1 ml sterilem Wasser resuspendiert und auf ca. 0,3 g Glasperlen zentrifugiert. Nachdem der wässrige Überstand abgenommen wurde, wurde der Rest in 100 µl Tris/EDTA/SDS (50 mM Tris/HCl pH 7,5; 20 mM EDTA; 10 mg/ml SDS) aufgenommen. Der Hefezell-Aufschluss erfolgte mechanisch mit Hilfe der Glasperlen in der Retsch-Mühle bei 4°C mit einer Frequenz von 30/s 5 min lang. Danach wurden 500 µl Tris/SDS/EDTA-Puffer hinzugefügt, die Suspension für 10 min bei 70°C inkubiert und mit 200 µl Kaliumacetat (5 M) gemischt. Die Probe wurde 10 min auf Eis gestellt und dann 5 min bei 13200 Upm und 4°C zentrifugiert, um denaturierte Proteine und Zellmembranbestandteile abzusondern. Die im Überstand befindliche genomische DNA wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 1 ml 100% Ethanol durch mehrmaliges

Schwenken gefällt. Anschließend wurde die DNA pelletiert, für mindestens 15 min getrocknet und in 300  $\mu$ l 1 x TE-Puffer resuspendiert. Durch die Zugabe von 5  $\mu$ l RNase A (10 mg/ml) bei 65°C für 30 min wurde die störende RNA entfernt. Zur erneuten Fällung wurde die Probe mit 500  $\mu$ l 100 % Isopropanol versetzt. Die pelletierte DNA wurde in 1 ml 70 % Ethanol gewaschen und zur vollständigen Entfernung des Ethanols mindestens 15 min getrocknet. Danach wurde das Pellet in 50  $\mu$ l 1 x TE-Puffer bei 65°C gelöst.

### 6.5 Proteinanalytische Methoden

#### 6.5.1 Herstellung von Proteinlysaten aus Hefezellen

Proteinextrakte aus Hefezellen wurden durch den mechanischen Aufschluss mittels Glasperlen gewonnen. Hierfür wurden mindestens  $5 \times 10^7$  Hefezellen aus der logarithmischen Wachstumsphase für 2 min bei 2000 Upm geerntet, in 1 ml kaltem Wasser resuspendiert und auf 200  $\mu$ l Glasperlen (0,3 g) zentrifugiert. Zur Unterdrückung von Proteasen wurden alle folgenden Schritte ausschließlich bei niedrigen Temperaturen bzw. auf Eis durchgeführt. Das Zell-Glasperlen-Gemisch wurde mit 150  $\mu$ l Puffer 3 mit Glycerolphosphat (60 mM) versetzt und danach in der Retsch-Mühle bei maximaler Frequenz bei 4°C für 5 min mechanisch aufgeschlossen. Die Zellfragmente wurden bei 13000 Upm für 3 min in der Kühlzentrifuge pelletiert. 50  $\mu$ l des Proteinüberstands wurden mit dem gleichen Volumen an Lämmli-Auftragspuffer (2 x) gemischt, 10 min bei 100°C aufgeköcht und bei -20°C eingefroren. Für den quantitativen Nachweis der Proteine wurde ein Bradford-Test durchgeführt. Die Methode beruht auf der Änderung des Absorptionsmaximums des Farbstoffs Coomassie-Blau bei der Bindung an Proteine. Hierfür wurden 5  $\mu$ l aus dem Proteinüberstand 1:1000 mit Wasser verdünnt und 1:1 mit 500  $\mu$ l Bradford-Reagenz versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 5 min bei Raumtemperatur wurde bei einer OD von 595 nm die Proteinkonzentration photometrisch bestimmt. Als Referenz diente eine Probe mit 500  $\mu$ l Wasser und 500  $\mu$ l Bradford-Reagenz. Die Bestimmung der relativen Proteinkonzentrationen war für eine gleichmäßige Beladung des SDS-Gels nötig. Je nach Nachweis wurden 1 – 3 OD<sub>595</sub> (etwa 15 – 40  $\mu$ g) Protein auf das entsprechende Gel aufgetragen.

#### 6.5.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteine können anhand ihrer Größe im elektrischen Feld mit Hilfe der SDS-PAGE aufgetrennt werden. Die für diese Methode erforderliche Denaturierung bzw. Zerstörung der Sekundärstrukturen und Protein-Protein-Wechselwirkungen geschieht mit den Detergenzien  $\beta$ -Mercaptoethanol und SDS. Dabei reduziert ersteres Disulfidbrücken und letzteres lagert sich an die Proteine an, denaturiert sie und sorgt für deren negative Gesamtladung unabhängig von

ihrer Eigenladung. Die Wanderungsgeschwindigkeit hängt somit allein von der Größe des Proteins und der Quervernetzung der Polyacrylamidmatrix ab. In einem diskontinuierlichen Polyacrylamidgel durchlaufen die Proteine zwei unterschiedliche Bereiche: Im niedrigprozentigen, großporigen Sammelgel (niedrigere Acrylamidkonzentration, 0,5 M Tris/HCl pH 6,8) kommt es zur Ansammlung der Proteine auf gleicher Höhe, im höherprozentigen, engmaschigen Trenngel (höhere Acrylamidkonzentration, 0,5 M Tris/HCl pH 8,8) werden die Proteine nach ihrer Größe aufgetrennt. Nach dem Zusammenbau und der Abdichtung der Glasplatten wurde das Trenngel gegossen und mit 150 µl Isopropanol überschichtet. Sobald das Trenngel auspolymerisierte, wurde der Alkohol mit Wasser abgewaschen und das entsprechende Sammelgel darauf gegossen. Die Probentaschen wurden mit einem Kamm ausgespart und nach dem Aushärten je nach Experiment mit 15 – 40 µg Protein beladen. Als Referenz diente der Proteinmarker *ColourPlus* von NEB. Die Gelelektrophorese wurde mit 15 - 20 mA pro Gel für 2 h in einer mit 1 x Turbo-LRB befüllten Apparatur durchgeführt. Danach wurde das Sammelgel abgetrennt und das Trenngel für die Western-Blot-Analyse verwendet.

### 6.5.3 Western-Blot und immunologischer Nachweis von Proteinen

Die Western-Blot-Analyse dient dem spezifischen Nachweis von Proteinen nach deren Auftrennung im Polyacrylamidgel. Hierbei werden die in der SDS-PAGE separierten Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert und anschließend mit Hilfe von Antikörpern detektiert. Dazu bindet ein primärer Antikörper das Epitop eines markierten Proteins oder das Protein selbst. Dieser wird wiederum über seine Fc-Domäne von einem sekundären Antikörper, welcher an einen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist, spezifisch erkannt. Dieses Fluorophor wird durch einen Laser zum Fluoreszieren angeregt und mit Hilfe eines Scanners (z.B. Odyssey Infrared Imager) kann das Protein darüber detektiert werden.

Für den Transfer der Proteine auf die Nitrozellulose-Membran wurde ein in Transferpuffer getränktes Whatman GB005 Papier auf eine Graphitelektrode (Anode) der Elektrobplot-Apparatur gelegt. Darauf kam die Nitrozellulose-Membran, die vorerst zur besseren Benetzung in Wasser und anschließend ebenfalls in Transferpuffer getaucht wurde, und dann das Trenngel. Zum Abschluss wurde ein in Transferpuffer getränktes Whatman GB005 Papier auf den Stapel gelegt. Die Apparatur wurde nach dem Entfernen der Luftblasen mit der zweiten Elektrode verschlossen. Der Transfer erfolgte bei einer Stromstärke von 40 mA für 75 min pro Gel. Um den Proteintransfer und die gleichmäßige Beladung der Proben zu überprüfen, wurde die Membran für 5 min reversibel in Ponceau S gefärbt. Zur Vermeidung unspezifischer Bindungen des Antikörpers an die Membran wurden diese danach für 1 h bei Raumtemperatur

mit TBS-T Milch (5 % Magermilchpulver in TBS-T) auf der Wippe gesättigt. Anschließend wurde die Membran über Nacht bei 4°C mit dem primären Antikörper in der jeweiligen Verdünnung in TBS-T Milch schwenkend inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Nitrozellulose-Membran dreimal für 5 min in 10 ml TBS-T bei Raumtemperatur auf der Wippe gewaschen. Die Inkubation mit dem sekundären Antikörper erfolgte abgedunkelt für mindestens 2 h in 6 ml TBS-T Milch auf der Wippe bei Raumtemperatur. Abschließend wurde die Membran von ungebundenen Antikörpern durch dreimaliges Waschen für 5 min bei Raumtemperatur mit TBS-T befreit und bis zur Detektion dunkel in 1 x TBS aufbewahrt. Der spezifische Nachweis von Proteinen erfolgte durch die Detektion der Infrarot-Farbstoffe mit dem Odyssey Infrared Imager der Firma LI-COR.

## 7 MATERIAL

### 7.1 Nukleinsäuren

dNTPs	New England Biolabs, Ipswich (USA)
GeneRuler™ DNA Ladder Mix	Fermentas, Burlington (Canada)
Heringssperma-DNA	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Oligonukleotide	MWG-Biotech AG, Ebersberg

### 7.2 Proteine und Enzyme

$\alpha$ -Faktor	Sigma Chemical Company, St. Louis (USA)
BSA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Color Plus Proteinmarker	New England Biolabs, Ipswich (USA)
KOD Hot Start DNA Polymerase	Novagen (Merck), Darmstadt
Lysozym	Fluka, Deisenhofen
Novozym 234	NovoBiolabs, Bagsværd (Dänemark)
Proteinase K	AppliChem GmbH, Darmstadt
Proteinstandard	New England Biolabs, Ipswich (USA) Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs, Ipswich (USA) Fermentas, Burlington (Canada)
RNase A	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
T4 DNA-Ligase	New England Biolabs, Ipswich (USA)
<i>Taq</i> -Polymerase	Biomaster GmbH, Windeck
Zymolyase 20T	Seikagaku Corporation, Tokio (Japan)

### 7.3 Antikörper und Seren

#### 7.3.1 Primäre Antikörper und Seren

Name	Verdünnung/Einsatz		Quelle
9E10	1:100	WB	Monoklonaler Mausantikörper gegen das c-MYC-Epitop (Field et al., 1988)
	1:5000 (gereinigt)	WB	
	1:20	IF	
M2	1:20000	WB	Monoklonaler Mausantikörper gegen das FLAG-Epitop (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)
$\alpha$ -GFP	1:1000	WB	Polyklonales Kaninchenantiserum gegen GFP, Davids Biotechnologie GmbH, Regensburg

## Material

$\alpha$ -Tub2	1:6000	WB	Polyklonales Kaninchenserum gegen $\beta$ -Tubulin (Eurogentec Deutschland GmbH, Köln)
	1:200	IF	
Yol1/34	1:100	IF	Monoklonaler Ratteantikörper gegen Tubulin (Sera-Lab Ltd., Sussex, UK)

### 7.3.2 Sekundäre Antikörper

Name	Verdünnung/ Einsatz		Quelle
$\alpha$ -Kaninchen-Alexa Fluor®488	1:250	IF	MoBiTec GmbH, Göttingen
Ziege- $\alpha$ -Ratte-Alexa Fluor®488	1:250	IF	Molecular Probes, Inc., Eugene, (USA)
Ziege- $\alpha$ -Kaninchen-IRDye®680	1:5000	WB	LI-COR Biosciences, Bad Homburg
Ziege- $\alpha$ -Kaninchen-IRDye®800CW	1:5000	WB	LI-COR Biosciences, Bad Homburg
Ziege- $\alpha$ -Maus-IRDye®800CW	1:5000	WB	LI-COR Biosciences, Bad Homburg

### 7.4 Chemikalien

Aceton <i>p.a.</i>	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Acrylamid 30%/Bisacrylamid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Adeninsulfat	AppliChem GmbH, Darmstadt
Agarose ultra pure	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Aminosäuren	AppliChem GmbH, Darmstadt
Ammoniumpersulfat (APS)	Merck KGaA, Darmstadt
Ampicillin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Bacto Agar	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes (USA)
Bacto Pepton	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes (USA)
Bacto Trypton	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes (USA)
Bacto Yeast Extract	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes (USA)
Bradfordreagenz	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Bromphenolblau	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
D-Galaktose	Gerbu Biochemicals GmbH, Gaiberg
D-Glukose-Monohydrat	Merck KGaA, Darmstadt
D-Raffinose	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg Sigma Chemical Company, St. Louis (USA)
D-Saccharose	Merck KGaA, Darmstadt
D-Sorbitol	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
4',6'-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)	Sigma Chemical Company, St. Louis (USA)
Dimethylformamid (DMFA)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck KGaA, Darmstadt
Di-Natriumhydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt

## Material

Di-Kaliumhydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt
Dithiothreitol (DTT)	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe AppliChem GmbH, Darmstadt
Essigsäure	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ethanol <i>p.a.</i>	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ethidiumbromid	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Fluka, Deisenhofen
Euroagar	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes (USA)
Formaldehyd (37%)	Fluka, Deisenhofen
G418-Sulfat (Kanamycin)	Calbiochem (Merck KGaA), Darmstadt
Glycerin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
$\beta$ -Glycerolphosphat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Glycin <i>p.a.</i>	Merck KGaA, Darmstadt
Hydroxyharnstoff (HU)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Igepal CA-630	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Isopropanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe Merck KGaA, Darmstadt
Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalakto-pyranosid (IPTG)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Kaliumacetat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt
Latrunculin B	AdipoGen AG, Liestal, Schweiz
Lithiumacetat	AppliChem GmbH, Darmstadt
Magermilchpulver	Humana Milchunion eG Lasana, Everswinkel
$\beta$ -Mercaptoethanol	AppliChem GmbH, Darmstadt
Methanol <i>p.a.</i>	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Mounting Medium	Southern Biotechnology, Birmingham
myo-Inositol	AppliChem GmbH, Darmstadt
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe Merck KGaA, Darmstadt
Natriumcitrat	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Natriumfluorid	Fluka, Deisenhofen

## Material

Natriumhydroxid	Merck KGaA, Darmstadt
N,N,N',N',Tetramethyldiamin (TEMED)	Sigma Chemical Company, St. Louis (USA)
Nocodazol	Fluka, Deisendorf
Nourseothricin (clonNAT)	Werner BioAgents, Jena
p-Aminobenzoessäure	AppliChem GmbH, Darmstadt
Phalloidin Alexa488	Molecular Probes (Invitrogen GmbH), Karlsruhe
Phalloidin Fluoresceinisothiocyanat (FITC)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
p-Phenylendiamin	AppliChem GmbH, Darmstadt
Polyethylenglykol PEG 3350	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Poly-L-lysine hydrobromide MW>300000	Sigma Chemical Company, St. Louis
Ponceau S	Sigma Chemical Company, St. Louis
Salzsäure	Merck KGaA, Darmstadt
Sytox Green	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris-Base)	USB Corporation, Staufen
Tween 20	Fluka, Deisenhofen Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Uracil	AppliChem GmbH, Darmstadt
X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-galactopyranosid)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Yeast Nitrogen Base	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes (USA)

### 7.5 Verbrauchsmaterialien

Deckgläser 22 x 22 mm	Marienfeld GmbH & Co. KGm Lauda-Königshofen
Deckgläser 24 x 60 mm	Menzel Glasbearbeitungswerk GmbH & Co.KG, Braunschweig
Dialysemembran VSWP 0,025 $\mu$ m	Millipore GmbH, Schwalbach
Elektroporationsküvetten	Equibio, Maidstone Kent (UK) Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Falcon Tube (15 ml, 50 ml)	SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht
GenElute™ HP Plasmid Midiprep Kit	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Gasperlen (0,4 – 0,6mm)	Braun Biotech, Melsungen
Gaspipetten	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co KG, Eberstadt Brand GmbH & Co KG, Wertheim
Glaswaren	Schott AG, Mainz Brand GmbH & Co KG, Wertheim
Immersionsöl 518F	Zeiss, Jena

## Material

Impfösen steril 1 µl	neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg
Küvetten	SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht
Mikrotiterplatten Greiner LIA Plate white 96-well	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim
Nitrozellulose-Membran	Schleicher & Schuell BioScience GmbH, Dassel
NucleoSpin® Plasmid Mini Kit	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren
Objektträger multitest slides 12 well	MB Biomedicals, LLC, Illkirch Cedex, (FR)
Objektträger 76 x 26 mm	Menzel Glasbearbeitungswerk GmbH & Co.KG, Braunschweig
PCR Reagiergefäße	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim
Petrischalen 92 x 16mm	SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht
Pipettenspitzen 10 µl	Biozym Scientific GmbH, Wien
Pipettenspitzen 200 µl	SARSTEDT AG & Co, Nürnberg
Pipettenspitzen 1000 µl	Kisker Biotech GmbH & Co KG, Steinfurt
QIAquick Gel Extraction Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
Reagiergefäße (1,0 ml; 1,5 ml; 2,0 ml)	SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht
Röhren (für Durchflusszytometrie) 3,5 ml	SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht
Sterilfilter (0,2µm)	Schleicher & Schuell BioScience GmbH, Dassel Nalge Nunc International Corp., Rochester (USA)
Whatman GB005	Schleicher & Schuell BioScience GmbH, Dassel

## 7.6 Geräte und Software

### 7.6.1 Geräte

Brutschrank Tv50b	Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach
Brutschrank WB 120 K	Mytron Bio- und Solartechnik GmbH, Heilbad Heiligenstadt
Digitalkamera E-500	Olympus, Hamburg
Durchflusszytometer CA-III und CyFlow Space	Partec, Münster
Elektroblotapparatur Semi-Dry SEDEC M	Peqlab Biotechnologie GmbH; Erlangen
Elektroporator EP 2510	Eppendorf, Hamburg
Frogger	DAN-KAN Corp., Massachusetts (USA)
Gelapparatur für Acrylamidgele, Minigel Twin	Biometra, Göttingen
Gelapparatur für G42Agarosegele, HE33	Hoefer, San Francisco (USA)
Heizblock Test Tube Thermostat Model	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

## Material

TCR 100	
Magnetrührer MR2000 und MR2002	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach
Mehrkanalpipetten Research® (variabel) 100 µl, 300 µl, 8-Kanal	Eppendorf, Hamburg
Mikromanipulator MSM System	MSM System Singer Instruments
Mikroskop Axiostar	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen
Mikroskop Imager M1	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen
Mikroskop Observer Z.1	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen
Mikroskop Olympus CH2	Olympus, Hamburg
Mikroskop Steuereinheit MS-2000	Applied Scientific Instrumentation, Eugene (USA)
Multipette ® plus	Eppendorf AG, Hamburg
Odyssey Infrared Imaging System	LI-COR Biosciences GmbH, Bad Homburg
pH-Meter 766 Caltimatic	Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co. KG, Berlin
Photometer	Eppendorf, Hamburg
Pipetten Research® (variable) 2,5 µl, 10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl, 5000 µl	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettierhilfe Easypet®	Eppendorf AG, Hamburg
Reagenzglasroller TC-7	New Brunswick Scientific, Nürtingen
Retschmühle MM200 und MM2000	Kurt Retsch GmbH, Haan
Rotator Intelli-Mixer	neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg
Schüttelwasserbad Aquatron	Infors AG, Einsbach
Schüttelinkubator VorTemp56	Labnet International Inc., Berkshire (UK)
Sonicator W385	Weber Ultrasonics GmbH, Karlsbad-Ittersbach
Sonopuls-Ultraschall-Homogenisator HD2070	Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Berlin
Spannungsgerät EV243	Consort, Turnhout (Belgien)
Spektrophotometer Novaspec II	Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala (S)
Spektrophotometer Ultrospec III	LKB Pharmacia, Freiburg
Spinning disk system CSU-X1	Yokogawa, Tokyo, Japan
Thermocycler peqSTAR 96 Universal Gradient	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Thermocycler Primus 25	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Thermomixer 5436	Eppendorf AG, Hamburg
UV Stratalinker 1800	Stratagene, La Jolla (USA)
UV-Tisch TF-20 M	Vilbert Lourmat, Marne-la-Vallée (FR)
Vortex Mixer	neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg

## Material

Waage Kern EW6200-2NM	Kern & Sohn GmbH, Balingen
Waage Mettler AE50	Mettler Toledo Intl. Inc., Greifensee (Schweiz)
Wasseraufbereitungsanlage MilliQ	Millipore Corporation, Billerica (USA)
Wasserbad	Köttermann GmbH & Co KG Labortechnik, Uetze
Wippe Mini Rocker MR1	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Wippschüttler ST 5 CAT	neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg
Zentrifuge 5415 D	Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifuge 5415 R	Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifuge 5810	Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifuge Kühlzentrifuge RC-5B	Sorvall, Bad Homburg
Zentrifuge Multifuge 3L	Heraeus, Hanau

### 7.6.2 Software

Axio Vision LE Rel. 4.8	Carl Zeiss Vision
Bio Edit Sequence Alignment Editor	Tom Hall Ibis Biosciences, Karlsbad
Clone Manager 6	Sci Ed Central (Scientific & Educational)
Corel Draw Graphics Suite X4	Corel Corporation 2008
ImageJ	Rasband, W.S., U.S. national Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA
Microsoft Office 2007	Microsoft Corporation, Redmond (USA)
NLS-Mapper	<a href="http://www.nls-mapper.iab.keio.ac.jp">http://www.nls-mapper.iab.keio.ac.jp</a>
Odyssey Application Software 3.0.21	LI-COR Biosciences GmbH, Bad Homburg
Photoshop CS2	Adobe Systems Incorporated
Reverse Complement	<a href="http://www.bioinformatics.org/SMS/rev.comp.html">www.bioinformatics.org/SMS/rev.comp.html</a>
Windows™ FloMax® Software	Partec GmbH, Münster
WinMDI 2.8 bzw. 26	Joe Trotter

## 7.7 Medien, Puffer und Lösungen

### 7.7.1 Bakterienmedien

<b>LB-Flüssigmedium</b>	Bacto Trypton	10 g/l
	Bacto Yeast Extract	5 g/l
	NaCl	10 g/l
	NaOH	0,3 mM
<b>SOC-Flüssigmedium</b>	Bacto Trypton	20 g/l
	Bacto Yeast Extract	5 g/l
	NaCl	10 mM
	KCl	2,5 mM
	MgCl <sub>2</sub>	10 mM
	Glukose	20 mM

Für die Herstellung von festen Medien wurde zusätzlich 1,7 % (w/v) Euroagar zugegeben. Zur Selektion auf Ampicillinresistenz wurde dem Medium 100 µg/ml Ampicillin beigefügt.

### 7.7.2 Hefemedien

<b>Vollmedium flüssig (XY)</b>	Bacto Pepton	20 g/l
	Bacto Yeast Extract	10 g/l
	Tryptophan	0,2 g/l
	Adeninsulfat	0,1 g/l
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	10 mM
	Zucker	20 g/l
<b>Selektivmedium flüssig (S)</b>	Yeast Nitrogen Base (10 x)	100 ml/l
	Dropout-5 (10 x)	100 ml/l
	Zucker	20 g/l

Den Medien wurden nach dem Autoklavieren die entsprechenden Zucker mit einer Endkonzentration von 2 % zugegeben.

Je nach Auxotrophiemarker der zu selektierenden Stämme wurde das Selektivmedium mit Adenin (50 mg/l), Histidin (50 mg/l), Leucin (100 mg/l), Tryptophan (100 mg/l) oder Uracil (50 mg/l) versetzt.

Zur Selektion auf Kanamycin-Antibiotikaresistenz wurde den Vollmedien im Stammhintergrund W303 eine Konzentration von 500 µg/ml bzw. im Stammhintergrund S288c eine Konzentration von 200 µg/ml zugefügt. Bei Nourseothricin-resistenten Hefestämmen wurde clonNAT in einer Konzentration von 100 µl/ml zugegeben.

Für die Herstellung von festen Medien wurde zusätzlich 1,7 % (w/v) Euroagar beigefügt.

## Material

<b>Präsporulationsmedium</b>	Adeninsulfat	50 mg/l
	Bacto Pepton	3 g/l
	Bacto Yeast Extract	8 g/l
	Glukose	100 g/l
<b>Sporulationsmedium</b>	Bacto Yeast Extract	1 g/l
	Kaliumacetat	10 g/l
	Glukose	0,5 g/l
	10 x Dropout ++	10 ml/l

Das Präsporulations- und Sporulationsmedium wurden sterilfiltriert.

### 7.7.3 Puffer und Lösungen

<b>DNA-Auftragspuffer</b>	Tris/HCl, pH 7,8	10 mM
	EDTA	1 mM
	Bromphenolblau	2,5 mg/ml
	Glycerin	300 mg/ml
<b>Dropout-5 (10 x)</b>	Alanin	0,5 g/l
	Arginin	0,5 g/l
	Asparagin	0,5 g/l
	Aspartat	1 g/l
	Cystein	0,5 g/l
	Glutamin	0,5 g/l
	Glutamat	1 g/l
	Glycin	0,5 g/l
	(myo-)Inositol	0,5 g/l
	Isoleucin	0,5 g/l
	Lysin	0,5 g/l
	Methionin	0,5 g/l
	p-Aminobenzoesäure	0,05 g/l
	Phenylalanin	0,5 g/l
	Prolin	0,5 g/l
	Serin	1 g/l
	Threonin	1 g/l
	Tyrosin	0,5 g/l
	Valin	1 g/l
	→ über Nacht gelöst, dann sterilfiltriert	
<b>Dropout++ (10 x)</b>	Dropout-5 (10 x)	
	Adenin	0,5 g/l
	Histidin	0,5 g/l
	Leucin	1 g/l
	Tryptophan	1 g/l
	Uracil	0,5 g/l

## Material

<b>EasyPrep-Puffer</b>	Tris/HCl, pH 8,0	10 mM
	EDTA	1 mM
	Saccharose	15% (w/v)
	Lysozym	2 mg/ml
	RNase A	0,2 mg/ml
	BSA	0,1 mg/ml
	→ bei -20°C aufbewahrt	
<b>LSB (Lämmli Auftragspuffer, 2 x)</b>	Tris/HCl, pH 6,8	120 mM
	SDS	40 mg/ml
	Glycerin	200 mg/ml
	Bromphenolblau	400 µg/ml
	β-Mercaptoethanol	10 %
<b>Mounting-Medium</b>	Glycerin	900 mg/ml
	PBS	0,1%
	p-Phenylendiamin	1 mg/ml
	DAPI	100 µg/ml
<b>Novozym-Lösung</b>	Sorbitol	1M
	Tris/HCl, pH 7,5	10 mM
	EDTA	1 mM
	DTT	50 mM
	Novozym	2 mg/ml
<b>PBS-Puffer</b>	NaCl	100 mM
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	33 mM
	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	17 mM
	→ mit NaOH auf pH 7,2 eingestellt	
<b>Ponceau S</b>	Ponceau S	1 g
	Eisessig	50 ml
	Wasser	ad 1 l
<b>Puffer B</b>	Sorbitol	1,2 M
	Kaliumphosphat-Puffer (pH 7,5)	100 mM
<b>Puffer 3</b>	NaCl	150 mM
	Tris/HCl, pH 7,5	50 mM
	NaF	50 mM
	EDTA	5 mM
	Igpal CA-630	0,1 %
	β-Glycerophosphat	60 mM
<b>RNase A</b>	RNase A	10 mg/ml
	Tris/HCl, pH 7,5	10 mM
	NaCl	15 mM
	→ 15 min gekocht, langsam abgekühlt	

# Material

SDS-PAGE (Angaben aus Molecular Cloning – A Laboratory Manual (Sambrook, 1989))

<b>Trenngel 9 % (1 Stück)</b>	Wasser	2,6 ml
	1,5 M Tris/Cl, pH 8,8	1,5 ml
	Acrylamid-Mix	1,8 ml
	10 % SDS	60 µl
	10 % APS	36,5 µl
	TEMED	3,65 µl
<b>Sammelgel (1 Stück)</b>	Wasser	1,5 ml
	0,5 M Tris/Cl, pH 6,8	625 µl
	Acrylamid-Mix	335 µl
	10 % SDS	25 µl
	10 % APS	25 µl
	TEMED	2,5 µl
<b>TAE (50 x)</b>	Tris/Acetat, pH 8,0	2 M
	EDTA	50 mM
<b>TBS (10 x)</b>	Tris-Base	200 mM
	NaCl	1,37 M
	→ pH 7,6 mit HCl eingestellt	
<b>TBS-T</b>	TBS (10 x)	100 ml
	Tween 20 (10 %)	10 ml
	Wasser	ad 1 l
<b>TE (10 x)</b>	Tris/HCl, pH 7,5	100 mM
	EDTA	10 mM
<b>TE/SDS</b>	Tris/HCl, pH 7,5	10 mM
	EDTA	1 mM
	SDS	1 %
<b>Transferpuffer</b>	Glycin	2,9 g
	Tris-Base	5,8 g
	SDS (10 %)	3,7 ml
	Methanol	100 ml
	Wasser	ad 1 l
<b>Turbo-LRB</b>	Tris-Base	250 mM
<b>(Lämmli Laufpuffer, 10 x)</b>	Glycin	9,46 M
	SDS	10 g/l
<b>YNB (10 x)</b>	Yeast Nitrogen Base	17 g/l
	Ammoniumsulfat	50 g/l
<b>Zuckerlösungen</b>	20 % Glukose-Lösung	200 g/l
	20 % Galaktose-Lösung	200 g/l
	10 % Raffinose-Lösung	100 g/l
	→ autoklaviert	

## 7.8 Oligonukleotide

Tabelle 1 Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide

Oligo-nukleotid	Sequenz 5' - 3'
WS0084	TTCCCAGTCACGACGTTG Sequenzierung von pBS-Derivaten
WS0085	CACACAGGAAACAGCTATG Sequenzierung von pBS-Derivaten
WS0826	AGTCACATCAAGATCGTTTATGG Bestimmung des Paarungstyps (MAT-PCR) (Huxley et al., 1990)
WS0827	GCACGGAATATGGGACTACTTCG Bestimmung des Paarungstyps (MAT-PCR) (Huxley et al., 1990)
WS0828	ACTCCACTTCAAGTAAGAGTTTG Bestimmung des Paarungstyps (MAT-PCR) (Huxley et al., 1990)
WS1686	CAATGTGCAAACACTGCTGTGAGCTCTGTCGCTCCTCAAGG 5'-Primer für die Amplifikation der Punktmutation von <i>TUB2</i> an Stelle C354S
WS1687	CCTTGAGGAGCGACAGAGCTCACAGCAGTTTGCACATTG 3'-Primer für die Amplifikation der Punktmutation von <i>TUB2</i> an Stelle C354S
WS1721	TCCCCGCGCGTTGGTATATGTGTCGTCC 5'-Primer für die Amplifikation von <i>TUB2</i> mit <i>SacII</i> -Schnittstelle
WS1722	ATAGTTTAGCGGCCGCTTATTCAAATTCTCAGTGATTG 3'-Primer für die Amplifikation von <i>TUB2</i> mit <i>NotI</i> -Schnittstelle
WS1913	TGCAGAAATATCAAAGACAAGTATTACAAAGAAGACTAATGCGTACGCTGCAG GTCGAC 5'-Primer für die Amplifikation von <i>kanMX4-pGALL</i> aus pYM-N27, Integration vor <i>CDC20</i>
WS1914	GCTAATTGCTGCATTTCCCTTATCTCTAGAGCTTCTGGCATCGATGAATTCTCTGTC G 3'-Primer für die Amplifikation von <i>kanMX4-pGALL</i> aus pYM-N27, Integration vor <i>CDC20</i>
WS1948	AGGAAAGATCCATAGGTGAGGCTAGCACAGGTAACAGGCTAAGTTTCAAAGGTG ACGGTGCTGGTTTA 5'-Primer für die C-terminale Epitopmarkierung von <i>BNI1</i> mittels pFA6-link-System
WS1949	TGGATGTTTGTGTTTGGTATTACTGTTGTCATAATTTTTGGTTAATATTTTCGATGAAT TCGAGCTCG 3'-Primer für die C-terminale Epitopmarkierung von <i>BNI1</i> mittels pFA6-link-System
WS1952	AGCAGAAGGATGAAGCAAATTTGAGAGCATATTTGGGCCGGGTTTACTGGTGA CGGTGCTGGTTTA 5'-Primer für die C-terminale Epitopmarkierung von <i>BUD6</i> mittels pFA6-link-System
WS1953	AGCCAAAAGCACTAATCTCTTTCCGTTAGCTTTCATAAAAATTAGTGTAT TCGATGAATTCGAGCTCG 3'-Primer für die C-terminale Epitopmarkierung von <i>BUD6</i> mittels pFA6-link-System

## Material

Oligo-nukleotid	Sequenz 5' - 3'
WS2108	AGACAATCCTGCAAGATTTTATTAAGAATCCAAATGATTATTTCAAGCAAGGTGAC GGTGCTGGTTA 5'-Primer für die C-terminale Epitopmarkierung von <i>BEM2</i> mittels pFA6-link-System
WS2109	AATTTTTCTCTCTCAGCAGTGGATTGTATACATTTACCACGAAAATTGT TCGATGAATTCGAGCTCG 3'-Primer für die C-terminale Epitopmarkierung von <i>BEM2</i> mittels pFA6-link-System
WS2110	TGGAGACGGAGGACATTAAGAATACTGGAGATTTACTAAAACCTTTATAAA GGTGACGGTGCTGGTTA 5'-Primer für die C-terminale Epitopmarkierung von <i>ALK1</i> mittels pFA6-link-System
WS2111	GTATACAATAGAAAGAAAATGAAATATAAATGTCAACATTCCTATTTGTT TCGATGAATTCGAGCTCG 3'-Primer für die C-terminale Epitopmarkierung von <i>ALK1</i> mittels pFA6-link-System
WS2112	TTATAAGAACTTGCGGTGATTTGTTATCTTTGAAGGGAGAAATAATGCAG GGTGACGGTGCTGGTTA 5'-Primer für die C-terminale Epitopmarkierung von <i>ALK2</i> mittels pFA6-link-System
WS2113	CAAATCATTAAGAAGGATACAAAAGCTTGCACCTTATTACTACGATGTCT TCGATGAATTCGAGCTCG 3'-Primer für die C-terminale Epitopmarkierung von <i>ALK2</i> mittels pFA6-link-System
WS2114	AAGAGGCAAGTTTGAAGGACGAAATAAATTATTTGAATTCGAAGTTGAAG GGTGACGGTGCTGGTTA 5'-Primer für die C-terminale Epitopmarkierung von <i>SPA2</i> mittels pFA6-link-System
WS2115	TATTGATTGTCTTTGTCTTCCTTTTCTTTCTCCTCTAGATACTACTAACT TCGATGAATTCGAGCTCG 3'-Primer für die C-terminale Epitopmarkierung von <i>SPA2</i> mittels pFA6-link-System
WS2264	TGCATCCTTGGATACTAAGAAACAAGCCCTTTTGGGAAAATAAGCGGTTAGGTGA CGGTGCTGGTTA 5'-Primer für die C-terminale Epitopmarkierung von <i>IPL1</i> mittels pFA6-link-System
WS2265	TGCGGGAGTGATTAATAGTGCCCTTCAAACGATTCTGTCATACTTTAATTTTCGATGA ATTCGAGCTCG 3'-Primer für die C-terminale Epitopmarkierung von <i>IPL1</i> mittels pFA6-link-System
WS2266	TGGAAGATGACAATCAATTGATCGATATTGCTAAGAAAATGGGCATTTTAGGTGA CGGTGCTGGTTA 5'-Primer für die C-terminale Epitopmarkierung von <i>BIR1</i> mittels pFA6-link-System
WS2267	TCAAACTACAAAAAATACAAACCTTTAGCCTGTTTATCAAATTAGTTAGTCGATG AATTCGAGCTCG 3'-Primer für die C-terminale Epitopmarkierung von <i>BIR1</i> mittels pFA6-link-System
WS2268	GTGCAAGATTAATTACTTTTATCGCTTCGTTAATGACTTTGAACAAAGGTGACC GTGCTGGTTA 5'-Primer für die C-terminale Epitopmarkierung von <i>SAC6</i> mittels pFA6-link-System

# Material

Oligo-nukleotid	Sequenz 5' - 3'
WS2269	TGGAACAAGAAAGCTGAGTAGAAAACAGGTTACGAAAGTTGTTTGTGGCTCGAT GAATTCGAGCTCG 3'-Primer für die C-terminale Epitopmarkierung von <i>SAC6</i> mittels pFA6-link-System
WS2287	AGCGGATCCATGGCTTCTGTACCTAAACGCCA 5'-Primer zur Amplifikation von <i>KIN4</i> mit <i>BamHI</i> -Schnittstelle
WS2288	AGCGCGGCCGCGGTCTCCTCGAGTCAAACCTCATGCTCCTTCTTTT 3'-Primer zur Amplifikation von <i>KIN4</i> mit <i>NotI</i> - bzw. <i>BsaI</i> -Schnittstelle, <i>BsaI</i> erzeugt <i>XhoI</i> -Überhang ( <i>dove tail</i> )
WS2291	GATGACGATCATGAAAATCC 5'-Sequenzierprimer von <i>KIN4</i>
WS2311	AAGAAATGTTGGCGGAAAACAATGAGAAATTCTTGAACATTCGTCTGTATGGTGA CGGTGCTGGTTA 5'-Primer für die C-terminale Epitopmarkierung von <i>CDC24</i> mittels pFA6-link-System
WS2312	ATGTTTTTTTCTTGAATTATTTAGTATTTGCTGTATACTAGTTTTATTTATCGATGAAT TCGAGCTCG 3'-Primer für die C-terminale Epitopmarkierung von <i>CDC24</i> mittels pFA6-link-System
WS2313	AAGTCAGTAACATAATCCAAGCCAAACTGAAAATTCGTTACCGATATTGGTGA CGGTGCTGGTTA 5'-Primer für die C-terminale Epitopmarkierung von <i>BEM1</i> mittels pFA6-link-System
WS2314	GTGCATCTGCCAAGTAAAGAAGAAAAATGCTTCGTCTTCTAACACTAGATTCGATG AATTCGAGCTCG 3'-Primer für die C-terminale Epitopmarkierung von <i>BEM1</i> mittels pFA6-link-System
WS2351	GCTCTAGAATGAATTTTGATGCGGTAGCAGATCA 5'-Primer zur Amplifikation von <i>ALK2</i> mit <i>XbaI</i> -Schnittstelle, beginnt ab 1aa
WS2354	CGCAATTGTTGGCAAGTTTTTTTGATCGGATGATT 3'-Primer zur Amplifikation von <i>ALK2</i> mit <i>MfeI</i> -Schnittstelle, bis einschließlich 333aa
WS2355	CGCAATTGTGATAAAGTCGATTGGTTTGAAATAGG 3'-Primer zur Amplifikation von <i>ALK2</i> mit <i>MfeI</i> -Schnittstelle, bis einschließlich 163aa
WS2356	CGCAATTGGTTTGAAGAGTGAGCGGTATCATTAA 3'-Primer zur Amplifikation von <i>ALK2</i> mit <i>MfeI</i> -Schnittstelle, bis einschließlich 115aa
WS2357	CGCAATTGTGAAGAATTTAATGAGCTGTCGGCAT 3'-Primer zur Amplifikation von <i>ALK2</i> mit <i>MfeI</i> -Schnittstelle, bis einschließlich 34aa
WS2369	TCTCTTTCTAATATATAAATTC 5'-Sequenzierprimer, bindet in <i>pTEF2</i> (304bp nach ATG)
WS2404	TTAACATCACCATCTAATTC 3'-Sequenzierprimer, bindet in GFP (48bp nach ATG)
WS2413	CGCAATTGTAACGAATTGGTTGGTTTGGCTGA 3'-Primer zur Amplifikation von <i>ALK2</i> mit <i>MfeI</i> -Schnittstelle, bis einschließlich 248aa
WS2414	GCTCTAGAATGTCTTCAAACAAAGAAAATGTATCTCAG 5'-Primer zur Amplifikation von <i>ALK2</i> mit <i>XbaI</i> -Schnittstelle, beginnt ab 112aa

## Material

Oligo-nukleotid	Sequenz 5' - 3'
WS2415	GCTCTAGAATGAGGGATGAGCCTGTAAAGATTTTAG 5'-Primer zur Amplifikation von <i>ALK2</i> mit <i>XbaI</i> -Schnittstelle, beginnt ab 164aa
WS2416	GCTCTAGAATGCAAAAGAAGTCTTCAATTTCAAGTTTTC 5'-Primer zur Amplifikation von <i>ALK2</i> mit <i>XbaI</i> -Schnittstelle, beginnt ab 249aa
WS2417	GCTCTAGAATGTCATCATCGAACCTTTCCTTTAGAAG 5'-Primer zur Amplifikation von <i>ALK2</i> mit <i>XbaI</i> -Schnittstelle, beginnt ab 291aa
WS2418	CGCAATTGTTTTTTGATCGGATGATTCAGTTCTTG 3'-Primer zur Amplifikation von <i>ALK2</i> mit <i>MfeI</i> -Schnittstelle, bis einschließlich 330aa

## 7.9 Plasmide

**Tabelle 2 Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Plasmide**

(Sammlung: Plasmidsammlung der Arbeitsgruppe Prof. Dr. W. Seufert)

Plasmid	Beschreibung	Vektor	Quelle
pAG25	pFA6a-natMX4		Sammlung (Goldstein and McCusker, 1999)
pBluescript II KS+	E. coli-Vektor, high-copy, amp		Sammlung (Alting-Mees and Short, 1989)
pRS305	<i>tCYC1-LEU2</i>		Sammlung (Sikorski and Hieter, 1989)
pRS306	<i>tCYC1-URA3</i>		Sammlung (Sikorski and Hieter, 1989)
pRS315	<i>CEN6 ARS4 tCYC1-LEU2</i>		Sammlung (Sikorski and Hieter, 1989)
pKT128	pFA6a-link- <i>yEGFP-tADH1-SpHIS5</i>		Euroscarf-Sammlung (Sheff and Thorn, 2004)
pKT209	pFA6a-link- <i>yEGFP-tADH1-CaURA3</i>		Euroscarf-Sammlung (Sheff and Thorn, 2004)
pYM-N27	pFA6a- <i>natNT2-pGALL</i>		Euroscarf-Sammlung (Janke et al., 2004)
pWS1455	<i>ΔN-232-CDC11-GFP-tCYC1-LEU2</i>	pRS305	Sammlung
pWS1523	<i>ALK1(1-760)</i>	pBS II KS+	Sammlung

## Material

Plasmid	Beschreibung	Vektor	Quelle
pWS1525	<i>ALK1(418-760)</i>	pUC18	Sammlung
pWS1531	<i>ALK1(1-417)</i>	pUC18	Sammlung
pWS1532	<i>ALK2(1-333)</i>	pUC18	Sammlung
pWS1533	<i>ALK2(334-676)</i>	pUC18	Sammlung
pWS1534	<i>ALK2(1-676)</i>	pUC18	Sammlung
pWS1542	<i>pGAL1-MYC3-ALK2(1-333)-tCYC1-URA3</i>	pWS250	Sammlung
pWS2216	<i>pGAL1-3xFLAG-tCYC1-LEU2</i>	pWS978	Sammlung
pWS2485	<i>pHHT1-hht1 T3A</i>	pBS II KS+	Sammlung
pWS2777	<i>pTEF2-GFP-tCYC1-LEU2</i>	pWS980	Sammlung
pWS2807	<i>pGAL1-CHERRY-tCYC1-LEU2</i>	pRS305	Sammlung
pWS2891	<i>pTUB2-tub2-C354S-tCYC1-LEU2</i>	pRS315	diese Arbeit
pWS2892	<i>pTUB2-TUB2</i>	pBS II KS+	diese Arbeit
pWS2893	<i>pTUB2-tub2-C354S</i>	pBS II KS+	diese Arbeit
pWS2953	<i>pTEF2-CHERRY-SWI5-S/A-tCYC1-HIS3</i>	pWS2896	Sammlung
pWS2954	<i>pTEF2-CHERRY-SWI5-S/A-tCYC1-TRP1</i>	pWS2897	Sammlung
pWS2982	<i>TUB1</i>	pBS II KS+	Sammlung
pWS3124	<i>CDC11-3xCHERRY-LEU2</i>	pWS3076	Sammlung
pWS3145	<i>pTUB2-tub2-C354S-tCYC1-LEU2</i>	pRS305	diese Arbeit
pWS3150	<i>pTEF2-CHERRY-SWI5-S/A-tCYC1-HIS3</i>	pRS313	Sammlung
pWS3161	<i>pFKS1-GFP-FKS1-ΔC-tCYC1-URA3</i>	pRS306	Sammlung
pWS3187	<i>3xCHERRY-tCYC1-LEU2</i>	pWS968	Sammlung
pWS3232	<i>pTEF2-MYC3-tCYC1-LEU2</i>	pWS968	Sammlung
pWS3300	<i>TUB1-3xCHERRY-tCYC1-LEU2</i>	pWS3187	diese Arbeit
pWS3337	<i>pHHT1-hht1-T3A-tCYC1-URA3</i>	pRS306	diese Arbeit
pWS3433	<i>pTEF2-CHERRY-SSO1-tCYC1-URA3</i>	pWS2898	Sammlung
pWS3544	<i>pFA6a-link-yERFP-tADH1-SpHIS5</i>	pKT128	Sammlung
pWS3592	<i>pTEF2-GFP-ALK1(1-760)-tCYC1-LEU2</i>	pWS2777	Sammlung
pWS3593	<i>pTEF2-GFP-ALK1(418-760)-tCYC1-LEU2</i>	pWS2777	Sammlung
pWS3594	<i>pTEF2-GFP-ALK1(1-417)-tCYC1-LEU2</i>	pWS2777	Sammlung
pWS3595	<i>pTEF2-GFP-ALK2(1-333)-tCYC1-LEU2</i>	pWS2777	Sammlung
pWS3596	<i>pTEF2-GFP-ALK2(334-676)-tCYC1-LEU2</i>	pWS2777	Sammlung
pWS3604	<i>PRC1-3xCHERRY-tCYC1-LEU2</i>	pWS3187	Sammlung
pWS3666	<i>KIN4</i>	pBS II KS+	diese Arbeit
pWS3667	<i>pGAL1-3xFLAG-KIN4-tCYC1-LEU2</i>	pWS2216	diese Arbeit
pWS3695	<i>pTEF2-MYC3-ALK2(1-333)-tCYC1-LEU2</i>	pWS3232	diese Arbeit
pWS3707	<i>pGAL1-CHERRY-KIN4-tCYC1-LEU2</i>	pWS2807	diese Arbeit
pWS3714	<i>pTEF2-GFP-RHO1-tCYC1-LEU2</i>	pWS2777	Sammlung

## Material

Plasmid	Beschreibung	Vektor	Quelle
pWS3715	<i>pTEF2-GFP-CDC42-tCYC1-LEU2</i>	pWS2777	Sammlung
pWS3736	<i>pTEF2-GFP-tCYC1-URA3</i>	pWS893	Sammlung
pWS3752	<i>pTEF2-ALK2(1-34)-GFP-tCYC1-URA3</i>	pWS3736	diese Arbeit
pWS3753	<i>pTEF2-ALK2(1-115)-GFP-tCYC1-URA3</i>	pWS3736	diese Arbeit
pWS3754	<i>pTEF2-ALK2(1-163)-GFP-tCYC1-URA3</i>	pWS3736	diese Arbeit
pWS3755	<i>pTEF2-ALK2(1-333)-GFP-tCYC1-URA3</i>	pWS3736	diese Arbeit
pWS3811	<i>pTEF2-ALK2(164-333)-GFP-tCYC1-URA3</i>	pWS3736	diese Arbeit
pWS3812	<i>pTEF2-ALK2(1-248)-GFP-tCYC1-URA3</i>	pWS3736	diese Arbeit
pWS3813	<i>pTEF2-ALK2(112-333)-GFP-tCYC1-URA3</i>	pWS3736	diese Arbeit
pWS3814	<i>pTEF2-ALK2(249-333)-GFP-tCYC1-URA3</i>	pWS3736	diese Arbeit
pWS3815	<i>pTEF2-ALK2(112-248)-GFP-tCYC1-URA3</i>	pWS3736	diese Arbeit
pWS3816	<i>pTEF2-ALK2(164-248)-GFP-tCYC1-URA3</i>	pWS3736	diese Arbeit
pWS3817	<i>pTEF2-ALK2(249-330)-GFP-tCYC1-URA3</i>	pWS3736	diese Arbeit

## 7.10 Hefestämme

**Tabelle 3 Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Hefestämme**

(SH: Stammhintergrund, Sammlung: Stammsammlung der Arbeitsgruppe Prof. Dr. W. Seufert)

Name	MAT	Relevanter Genotyp	SH	Quelle
K699	a	<i>ade2-1 can1-100 his3-11, -15 leu2-3, -112 trp1-1 ura3-2 ssd1</i>	W303	Sammlung
BY4741	a	<i>his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	S288c	(Brachmann et al., 1998)
1849	a	<i>sgo1Δ::kanMX4</i>	S288c	Euroscarf-Kollektion
W4766	α	<i>alk1Δ::URA3 alk2Δ::natMX4</i>	S288c	Sammlung
W6917	a	<i>alk1Δ::natMX4 alk2Δ::kanMX4</i>	W303	diese Arbeit
W7247	a	<i>spc72Δ::kanMX4</i>	S288C	diese Arbeit
W7250	a	<i>spc72Δ::kanMX4 alk1Δ::URA3 alk2Δ::natMX4</i>	S288C	diese Arbeit
W7255	a	<i>cin8Δ::kanMX4 alk1Δ::URA3 alk2Δ::natMX4</i>	S288C	diese Arbeit
W7265	a	<i>kar9Δ::kanMX4</i>	S288C	diese Arbeit
W7266	α	<i>kar9Δ::kanMX4</i>	S288C	diese Arbeit
W7268	a	<i>kar9Δ::kanMX4 alk1Δ::URA3 alk2Δ::natMX4</i>	S288C	diese Arbeit
W7809	α	<i>cdc20Δ::LEU2 ade2::pGALL-CDC20-ADE2</i>	W303	diese Arbeit
W7810	a	<i>cdc20Δ::LEU2 ade2::pGALL-CDC20-ADE2 alk1Δ::HIS3MX6</i>	W303	diese Arbeit
W7811	a	<i>cdc20Δ::LEU2 ade2::pGALL-CDC20-ADE2 alk2Δ::kanMX4</i>	W303	diese Arbeit
W7812	α	<i>cdc20Δ::LEU2 ade2::pGALL-CDC20-ADE2 alk1Δ::HIS3MX6 alk2Δ::kanMX4</i>	W303	diese Arbeit
W7813	a	<i>cdc20-3</i>	W303	diese Arbeit

# Material

Name	MAT	Relevanter Genotyp	SH	Quelle
W7814	α	<i>cdc20-3 alk1Δ::HIS3MX6</i>	W303	diese Arbeit
W7815	α	<i>cdc20-3 alk2Δ::kanMX4</i>	W303	diese Arbeit
W7816	α	<i>cdc20-3 alk1Δ::HIS3MX6 alk2Δ::kanMX4</i>	W303	diese Arbeit
W7887	a	<i>dyn1Δ::kanMX4</i>	S288c	diese Arbeit
W8095	a	<i>bud6Δ::kanMX4</i>	S288c	diese Arbeit
W8096	α	<i>bud6Δ::kanMX4</i>	S288c	diese Arbeit
W8258	α	<i>dyn1Δ::kanMX4 alk1Δ::URA3 alk2Δ::natMX4</i>	S288c	diese Arbeit
W8262	a	<i>kar9Δ::HIS3MX6</i>	S288c	diese Arbeit
W8297	α	<i>kar9Δ::HIS3MX6</i>	S288c	diese Arbeit
W8382	a	<i>kar9Δ::HIS3MX6 dyn1Δ::kanMX4</i>	S288c	diese Arbeit
W8383	a	<i>kar9Δ::HIS3MX6 dyn1Δ::kanMX4 alk1Δ::URA3 alk2Δ::natMX4</i>	S288c	diese Arbeit
W8418	a	<i>tub2Δ::kanMX4 pTUB2-tub2-C354S-tCYC1-LEU2</i>	S288c	diese Arbeit
W8419	α	<i>tub2Δ::kanMX4 pTUB2-tub2-C354S-tCYC1-LEU2 alk1Δ::URA3 alk2Δ::natMX4</i>	S288c	diese Arbeit
W8444	α	<i>bud6Δ::kanMX4 alk1Δ::URA3 alk2Δ::natMX4</i>	S288c	diese Arbeit
W8926	α	<i>spc72Δ::kanMX4 tub2Δ::kanMX4 pTUB2-tub2-C354S-tCYC1-LEU2</i>	S288c	diese Arbeit
W8927	a	<i>cin8Δ::kanMX4</i>	S288c	diese Arbeit
W9013	α	<i>cin8-3 (R196K) kip1::HIS3</i>	W303	diese Arbeit
W9142	a	<i>kip1::HIS3 alk1Δ::natMX4 alk2Δ::kanMX4</i>	W303	diese Arbeit
W9143	a	<i>cin8-3 (R196K) kip1::HIS3</i>	W303	diese Arbeit
W9144	a	<i>cin8-3 (R196K) kip1::HIS3 alk1Δ::natMX4 alk2Δ::kanMX4</i>	W303	diese Arbeit
W9145	a	<i>natNT2-pGALL-CDC20</i>	S288c	diese Arbeit
W9158	a	<i>cin8Δ::HIS3MX6</i>	S288c	diese Arbeit
W9185	a	<i>alk1Δ::URA3 alk2Δ::natMX4 natNT2-pGALL-CDC20</i>	S288c	diese Arbeit
W9238	α	<i>dyn1Δ::kanMX4 natNT2-pGALL-CDC20</i>	S288c	diese Arbeit
W9239	a	<i>kar9Δ::HIS3MX6 natNT2-pGALL-CDC20</i>	S288c	diese Arbeit
W9396	a	<i>bud6Δ::kanMX4 natNT2-pGALL-CDC20</i>	S288c	diese Arbeit
W9399	a	<i>fks1::pFKS1-GFP-FKS1-URA3 natNT2-pGALL-CDC20</i>	S288c	diese Arbeit
W9401	a	<i>fks1::pFKS1-GFP-FKS1-URA3 pTEF2-CHERRY-SWI5-S/A-tCYC1-HIS3 natNT2-pGALL-CDC20</i>	S288c	diese Arbeit
W9402	α	<i>alk1Δ::URA3 alk2Δ::natMX4 fks1::pFKS1-GFP-FKS1-URA3 pTEF2-CHERRY-SWI5-S/A-tCYC1-HIS3 natNT2-pGALL-CDC20</i>	S288c	diese Arbeit
W9405	a	<i>fks1::pFKS1-GFP-FKS1-URA3 pTEF2-CHERRY-SWI5-S/A-tCYC1-HIS3</i>	S288c	diese Arbeit
W9406	a	<i>alk1Δ::URA3 alk2Δ::natMX4 fks1::pFKS1-GFP-FKS1-URA3 pTEF2-CHERRY-SWI5-S/A-tCYC1-HIS3</i>	S288c	diese Arbeit
W9913	a	<i>TUB1::TUB1-3xCHERRY-tCYC1-LEU2</i>	S288c	diese Arbeit

## Material

Name	MAT	Relevanter Genotyp	SH	Quelle
W9920	α	<i>hht1Δ::HIS3MX6 hht2Δ::natMX4</i> <i>phht1::pHHT1-hht1-T3A-tCYC1-URA3</i>	S288c	diese Arbeit
W10012	a	<i>cin8Δ::kanMX4 hht1Δ::HIS3MX6 hht2Δ::natMX4</i> <i>phht1::pHHT1-hht1-T3A-tCYC1-URA3</i>	S288c	diese Arbeit
W10156	a	<i>hht1Δ::HIS3MX6 hht2Δ::natMX4</i> <i>phht1::pHHT1-hht1-T3A-tCYC1-URA3 natNT2-pGALL-CDC20</i>	S288c	diese Arbeit
W10352	a	<i>SPC42-yEGFP-tADH1-HIS3MX6 CDC11::CDC11-3xCHERRY-LEU2</i>	S288c	diese Arbeit
W10353	α	<i>alk1Δ::URA3 alk2Δ::natMX4 SPC42-yEGFP-tADH1-HIS3MX6</i> <i>CDC11::CDC11-3xCHERRY-LEU2</i>	S288c	diese Arbeit
W10357	α	<i>alk1Δ::URA3 fks1::pFKS1-GFP-FKS1-URA3 natNT2-pGALL-CDC20</i>	S288c	diese Arbeit
W10358	α	<i>alk2Δ::natMX4 fks1::pFKS1-GFP-FKS1-URA3 natNT2-pGALL-CDC20</i>	S288c	diese Arbeit
W10361	α	<i>pTPI-mt-GFP-LEU2</i> <i>trp1::pTEF2-CHERRY-SWI5-S/A-tCYC1-TRP1 cdc20-3</i>	W303	diese Arbeit
W10362	a	<i>ALK1(1-760)-yEGFP-tADH1-CaURA3</i> <i>trp1::pTEF2-CHERRY-SWI5-S/A-tCYC1-TRP1 cdc20-3</i>	W303	diese Arbeit
W10399	α	<i>ALK2(1-676)-yEGFP-tADH1-CaURA3</i> <i>trp1::pTEF2-CHERRY-SWI5-S/A-tCYC-TRP1 cdc20-3</i>	W303	diese Arbeit
W10407	α	<i>his3-Δ1::pTEF2-CHERRY-SWI5-S/A-tCYC1-HIS3</i>	S288c	diese Arbeit
W10415	α	<i>alk2Δ::natMX4</i>	S288c	diese Arbeit
W10599	α	<i>alk1Δ::URA3</i>	S288c	diese Arbeit
W10602	α	<i>alk1Δ::HIS3MX6 alk2Δ::kanMX4 pTPI-mt-GFP-LEU2</i> <i>trp1::pTEF2-CHERRY-SWI5-S/A-tCYC1-TRP1 cdc20-3</i>	W303	diese Arbeit
W10611	a	<i>kin4Δ::kanMX4</i>	S288c	diese Arbeit
W10620	a	<i>alk2Δ::HIS3MX6 natNT2-pGALL-CDC20</i>	S288c	diese Arbeit
W10627	a	<i>alk2Δ::natMX4 fks1::pFKS1-GFP-FKS1-URA3</i> <i>his3-Δ1::pTEF2-CHERRY-SWI5-S/A-tCYC1-HIS3</i> <i>natNT2-pGALL-CDC20-</i>	S288c	diese Arbeit
W10628	a	<i>BEM2-yEGFP-tADH1-CaURA3</i> <i>his3-Δ1::pTEF2-CHERRY-SWI5-S/A-tCYC1-HIS3</i> <i>natNT2-pGALL-CDC20</i>	S288c	diese Arbeit
W10634	α	<i>bud6::BUD6-yEGFP-tCYC1-LEU2 his3-Δ1::pTEF2-CHERRY-SWI5-</i> <i>S/A-tCYC1-HIS3 alk1Δ::URA3 alk2Δ::natMX4 natNT2-pGALL-CDC20</i>	S288c	diese Arbeit
W10670	α	<i>alk1Δ::URA3 alk2Δ::natMX4 BNI1-yEGFP-tADH1-CaURA3 his3-</i> <i>Δ1::pTEF2-CHERRY-SWI5-S/A-tCYC1-HIS3 natNT2-pGALL-CDC20</i>	S288c	diese Arbeit
W10793	α	<i>bud6::BUD6-yEGFP-tCYC1-LEU2 his3-Δ1::pTEF2-CHERRY-SWI5-</i> <i>S/A-tCYC1-HIS3 natNT2-pGALL-CDC20</i>	S288c	diese Arbeit
W10796	α	<i>alk2Δ::HIS3MX6 BEM2-yEGFP-tADH1-CaURA3 his3-Δ1::pTEF2-</i> <i>CHERRY-SWI5-S/A-tCYC1-HIS3 natNT2-pGALL-CDC20</i>	S288c	diese Arbeit
W10797	a	<i>ALK2::pTEF2-GFP-ALK2(1-676)-LEU2</i>	S288c	Sammlung

## Material

Name	MAT	Relevanter Genotyp	SH	Quelle
W10885	a	<i>ALK2::pTEF2-GFP-ALK2(1-676)-URA3 BUD6-yERFP-tADH1-SpHIS5</i>	S288c	diese Arbeit
W10913	a	<i>bem2Δ::kanMX4 alk1Δ::URA3 alk2Δ::HIS3MX6 natNT2-pGALL-CDC20</i>	S288c	Sammlung
W10914	α	<i>bem2Δ::kanMX4 natNT2-pGALL-CDC20</i>	S288c	Sammlung
W10916	α	<i>bem2Δ::kanMX4 alk2Δ::HIS3MX6 natNT2-pGALL-CDC20</i>	S288c	Sammlung
W11000	a	<i>ALK2::pGAL1-MYC3-ALK2(1-676)-URA3</i>	S288c	Sammlung
W11079	α	<i>ALK2::pTEF2-GFP-ALK2(1-676)-URA3 his3-Δ1::pTEF2-CHERRY-SWI5-S/A-tCYC1-HIS3</i>	S288c	Sammlung
W11100	a	<i>ALK2::pTEF2-GFP-ALK2(1-676)-LEU2 TUB1::TUB1-3xCHERRY-tCYC1-LEU2</i>	S288c	Sammlung
W11102	α	<i>ALK2::pTEF2-GFP-ALK2(1-676)-URA3 CDC11::CDC11-3xCHERRY-LEU2</i>	S288c	Sammlung
W11105	a	<i>ALK2::pTEF2-GFP-ALK2(1-676)-LEU2 SSO1::pTEF2-CHERRY-SSO1-URA3</i>	S288c	Sammlung
W11107	a	<i>ALK2::pTEF2-MYC3-ALK2(1-676)-LEU2</i>	S288c	Sammlung
W11246	α	<i>alk1Δ::URA3 alk2Δ::HIS3MX6 BEM2-yEGFP-tADH1-CaURA3 his3-Δ1::pTEF2-CHERRY-SWI5-S/A-tCYC1-HIS3 natNT2-pGALL-CDC20</i>	S288c	diese Arbeit
W11248	a	<i>BNI1-yEGFP-tADH1-CaURA3 his3-Δ1::pTEF2-CHERRY-SWI5-S/A- tCYC1-HIS3 natNT2-pGALL-CDC20</i>	S288c	diese Arbeit
W11249	α	<i>SPA2-yEGFP-tADH1-CaURA3 his3-Δ1::pTEF2-CHERRY-SWI5-S/A- tCYC1-HIS3 natNT2-pGALL-CDC20</i>	S288c	diese Arbeit
W11265	a	<i>alk1Δ::URA3 alk2Δ::natMX4 SPA2-yEGFP-tADH1-CaURA3 his3- Δ1::pTEF2-CHERRY-SWI5-S/A-tCYC1-HIS3 natNT2-pGALL-CDC20</i>	S288c	diese Arbeit
W11324	a	<i>alk2Δ::natMX4 BNI1-yEGFP-tADH1-CaURA3 his3-Δ1::pTEF2- CHERRY-SWI5-S/A-tCYC1-HIS3 natNT2-pGALL-CDC20</i>	S288c	diese Arbeit
W11335	a	<i>ALK1::pTEF2-GFP-ALK1(1-760)-LEU2 his3-Δ1::pTEF2-CHERRY-SWI5-S/A-tCYC1-HIS3</i>	S288c	diese Arbeit
W11337	a	<i>alk1::pTEF2-GFP-ALK1(418-760)-LEU2</i>	S288c	diese Arbeit
W11339	a	<i>alk2::pTEF2-GFP-ALK2(334-676)-LEU2</i>	S288c	diese Arbeit
W11338	α	<i>tCYC1::pTEF2-GFP-ALK2(1-333)-tCYC1-LEU2 alk2Δ::natMX4</i>	S288c	diese Arbeit
W11498	a	<i>kin4Δ::kanMX4 ALK2::pTEF2-MYC3-ALK2(1-676)-LEU2</i>	S288c	diese Arbeit
W11514	α	<i>kin4Δ::kanMX4 alk2::pTEF2-GFP-ALK2(334-676)-LEU2</i>	S288c	diese Arbeit
W11517	a	<i>kin4Δ::kanMX4 ALK2::pTEF2-GFP-ALK2(1-676)-URA3 CDC11::CDC11-3xCHERRY-LEU2</i>	S288c	diese Arbeit
W11520	α	<i>kin4Δ::kanMX4 tCYC1::pTEF2-GFP-ALK2(1-333)-tCYC1-LEU2 alk2Δ::natMX4</i>	S288c	diese Arbeit
W11523	a	<i>fks1::pFKS1-GFP-FKS1-URA3 prc1::PRC1-3xCHERRY-tCYC1-LEU2 natNT2-pGALL-CDC20</i>	S288c	diese Arbeit

## Material

Name	MAT	Relevanter Genotyp	SH	Quelle
W11524	$\alpha$	<i>alk1<math>\Delta</math>::URA3 alk2<math>\Delta</math>::natMX4 fks1::pFKS1-GFP-FKS1-URA3 prc1::PRC1-3xCHERRY-tCYC1-LEU2 natNT2-pGALL-CDC20</i>	S288c	diese Arbeit
W11526	a	<i>bud6<math>\Delta</math>::kanMX4 alk1<math>\Delta</math>::URA3 alk2<math>\Delta</math>::natMX4 natNT2-pGALL-CDC20</i>	S288c	diese Arbeit
W11533	a	<i>ALK2::pTEF2-GFP-ALK2(1-676)-URA3 fks1::pFKS1-yERFP-FKS1-URA3</i>	S288c	diese Arbeit
W11559	$\alpha$	<i>ipl1-321</i>	W303	Sammlung
W11628	$\alpha$	<i>ura3::pGAL1-MYC3-ALK2(1-676)-tCYC1-URA3 leu2::pSPC42-SPC42-yEGFP-tCYC1-LEU2 trp1::pTEF2-CHERRY-SWI5-S/A-tCYC1-TRP1</i>	W303	diese Arbeit
W11629	a	<i>ura3::pGAL1-MYC3-ALK2(1-676)-tCYC1-URA3 leu2::CDC11-GFP- LEU2 trp1::pTEF2-CHERRY-SWI5-S/A-tCYC1-TRP1</i>	W303	diese Arbeit
W11631	a	<i>ura3::pGAL1-MYC3-ALK2(1-676)-tCYC1-URA3 SPA2-yEGFP-tADH1- CaURA3 trp1::pTEF2-CHERRY-SWI5-S/A-tCYC1-TRP1</i>	W303	diese Arbeit
W11633	$\alpha$	<i>ALK2::pGAL1-MYC3-ALK2(1-676)-URA3 BEM2-yEGFP-tADH1- CaURA3 his3-<math>\Delta</math>1::pTEF2-CHERRY-SWI5-S/A-tCYC1-HIS3</i>	S288C	diese Arbeit
W11634	$\alpha$	<i>ALK2::pGAL1-MYC3-ALK2(1-676)-URA3 fks1::pFKS1-GFP-FKS1- URA3 his3-<math>\Delta</math>1::pTEF2-CHERRY-SWI5-S/A-tCYC1-HIS3</i>	S288C	diese Arbeit
W11636	$\alpha$	<i>ALK2::pGAL1-MYC3-ALK2(1-676)-URA3 tub1::TUB1-GFP-URA3 his3-<math>\Delta</math>1::pTEF2-CHERRY-SWI5-S/A-tCYC1-HIS3 CDC11::CDC11-3xCHERRY-LEU2</i>	S288C	diese Arbeit
W11644	$\alpha$	<i>ipl1-321 alk1<math>\Delta</math>::natMX4 alk2<math>\Delta</math>::kanMX4</i>	W303	diese Arbeit
W11685	$\alpha$	<i>ALK2::pTEF2-GFP-ALK2(1-676)-URA3 his3-<math>\Delta</math>1::pTEF2-CHERRY- SWI5-S/A-tCYC1-HIS3 natNT2-pGALL-CDC20</i>	S288C	diese Arbeit
W11686	a	<i>ALK1::pTEF2-GFP-ALK1(1-760)-URA3 his3-<math>\Delta</math>1::pTEF2-CHERRY- SWI5-S/A-tCYC1-HIS3 pGALL-CDC20-natNT2</i>	S288C	diese Arbeit
W11689	a	<i>sgo1<math>\Delta</math>::kanMX4 alk1<math>\Delta</math>::URA3 alk2<math>\Delta</math>::natMX4</i>	S288C	diese Arbeit
W11691	a	<i>ALK2::pGAL1-MYC3-ALK2(1-676)-URA3 SAC6-yEGFP-tADH1- SpHIS5 his3-<math>\Delta</math>1::pTEF2-CHERRY-SWI5-S/A-tCYC1-HIS3</i>	S288c	diese Arbeit
W11692	a	<i>alk1<math>\Delta</math>::URA3 alk2<math>\Delta</math>::natMX4 BIR1-yEGFP-tADH1-SpHIS5 his3- <math>\Delta</math>1::pTEF2-CHERRY-SWI5-S/A-tCYC1-HIS3 natNT2-pGALL-CDC20</i>	S288C	diese Arbeit
W11695	$\alpha$	<i>tCYC1::pTEF2-GFP-ALK1(1-417)-tCYC1-LEU2 alk1<math>\Delta</math>::URA3 his3-<math>\Delta</math>1::pTEF2-CHERRY-SWI5-S/A-tCYC1-HIS3</i>	S288c	diese Arbeit
W11700	$\alpha$	<i>kin4<math>\Delta</math>::kanMX4 ALK2::pTEF2-GFP-ALK2(1-676)-LEU2</i>	S288c	diese Arbeit
W11816	$\alpha$	<i>kin4<math>\Delta</math>::kanMX4 alk1::pTEF2-GFP-ALK1(418-760)-LEU2</i>	S288c	diese Arbeit
W11817	a	<i>kin4<math>\Delta</math>::kanMX4 tCYC1::pTEF2-GFP-ALK1(1-417)-tCYC1-LEU2 alk1<math>\Delta</math>::URA3</i>	S288c	diese Arbeit
W11865	a	<i>BIR1-yEGFP-tADH1-SpHIS5 his3-<math>\Delta</math>1::pTEF2-CHERRY-SWI5-S/A- tCYC1-HIS3 natNT2-pGALL-CDC20</i>	S288c	diese Arbeit
W11867	$\alpha$	<i>ALK1::pTEF2-GFP-ALK1(1-760)-LEU2 SSO1::pTEF2-CHERRY-SSO1-URA3</i>	S288c	diese Arbeit

## Material

Name	MAT	Relevanter Genotyp	SH	Quelle
W11868	$\alpha$	<i>kin4<math>\Delta</math>::kanMX4 ALK1::pTEF2-GFP-ALK1(1-760)-LEU2</i>	S288c	diese Arbeit
W11873	a	<i>KIN4::pGAL1-FLAG3-KIN4-LEU2</i>	S288c	diese Arbeit
W11874	a	<i>ura3::pGAL1-MYC3-ALK2(1-676)-tCYC1-URA3 BNI1-yEGFP-tADH1-CaURA3 trp1::pTEF2-CHERRY-SWI5-S/A-tCYC1-TRP1</i>	W303	diese Arbeit
W11875	$\alpha$	<i>ALK2::pGAL1-MYC3-ALK2(1-676)-URA3 BNI1-yEGFP-tADH1-CaURA3 his3-<math>\Delta</math>1::pTEF2-CHERRY-SWI5-S/A-tCYC1-HIS3</i>	S288c	diese Arbeit
W11878	a	<i>SAC6-yEGFP-tADH1-SpHIS5 his3-<math>\Delta</math>1::pTEF2-CHERRY-SWI5-S/A-tCYC1-HIS3 natNT2-pGALL-CDC20</i>	S288c	diese Arbeit
W11879	$\alpha$	<i>alk1<math>\Delta</math>::URA3 alk2<math>\Delta</math>::natMX4 SAC6-yEGFP-tADH1-SpHIS5 his3-<math>\Delta</math>1::pTEF2-CHERRY-SWI5-S/A-tCYC1-HIS3 natNT2-pGALL-CDC20</i>	S288c	diese Arbeit
W11880	$\alpha$	<i>ura3::pGAL1-MYC3-ALK2(1-676)-tCYC1-URA3 MYO2-yEGFP-tADH1-CaURA3 trp1::pTEF2-CHERRY-SWI5-S/A-tCYC1-TRP1</i>	W303	diese Arbeit
W11901	a	<i>KIN4::pGAL1-FLAG3-KIN4-LEU2 ALK2::pTEF2-MYC3-ALK2(1-676)-LEU2</i>	S288c	diese Arbeit
W11904	a	<i>ura3::pGAL1-MYC3-ALK2(1-676)-tCYC1-URA3 BEM1-yEGFP-tADH1-SpHIS5 trp1::pTEF2-CHERRY-SWI5-S/A-tCYC1-TRP1</i>	W303	diese Arbeit
W11905	a	<i>ALK2::pGAL1-MYC3-ALK2(1-676)-URA3 BEM1-yEGFP-tADH1-SpHIS5 his3-<math>\Delta</math>1::pTEF2-CHERRY-SWI5-S/A-tCYC1-HIS3</i>	S288c	diese Arbeit
W11907	$\alpha$	<i>kin4<math>\Delta</math>::kanMX4 tCYC1::pTEF2-MYC3-ALK2(1-333)-tCYC1-LEU2 alk2<math>\Delta</math>::natMX4</i>	S288c	diese Arbeit
W11908	a	<i>ALK2::pGAL1-MYC3-ALK2(1-676)-URA3 SPA2-yEGFP-tADH1-CaURA3 his3-<math>\Delta</math>1::pTEF2-CHERRY-SWI5-S/A-tCYC1-HIS3</i>	S288c	diese Arbeit
W11914	a	<i>alk2<math>\Delta</math>::natMX4 BEM1-yEGFP-tADH1-SpHIS5 his3-<math>\Delta</math>1::pTEF2-CHERRY-SWI5-S/A-tCYC1-HIS3 natNT2-pGALL-CDC20</i>	S288c	diese Arbeit
W11915	$\alpha$	<i>alk1<math>\Delta</math>::URA3 alk2<math>\Delta</math>::natMX4 BEM1-yEGFP-tADH1-SpHIS5 his3-<math>\Delta</math>1::pTEF2-CHERRY-SWI5-S/A-tCYC1-HIS3 natNT2-pGALL-CDC20</i>	S288c	diese Arbeit
W11917	a	<i>alk2<math>\Delta</math>::natMX4 CDC24-yEGFP-tADH1-SpHIS5 his3-<math>\Delta</math>1::pTEF2-CHERRY-SWI5-S/A-tCYC1-HIS3 natNT2-pGALL-CDC20</i>	S288c	diese Arbeit
W11918	$\alpha$	<i>alk1<math>\Delta</math>::URA3 alk2<math>\Delta</math>::natMX4 CDC24-yEGFP-tADH1-SpHIS5 his3-<math>\Delta</math>1::pTEF2-CHERRY-SWI5-S/A-tCYC1-HIS3 natNT2-pGALL-CDC20</i>	S288c	diese Arbeit
W12034	a	<i>BEM1-yEGFP-tADH1-SpHIS5 his3-<math>\Delta</math>1::pTEF2-CHERRY-SWI5-S/A-tCYC1-HIS3 natNT2-pGALL-CDC20</i>	S288c	diese Arbeit
W12035	a	<i>CDC24-yEGFP-tADH1-SpHIS5 his3-<math>\Delta</math>1::pTEF2-CHERRY-SWI5-S/A-tCYC1-HIS3 natNT2-pGALL-CDC20</i>	S288c	diese Arbeit
W12039	a	<i>KIN4::pGAL1-CHERRY-KIN4-LEU2 ALK2::pTEF2-GFP-ALK2(1-676)-URA3</i>	S288c	diese Arbeit
W12047	a	<i>kin4<math>\Delta</math>::kanMX4 ALK2-yEGFP-tADH1-CaURA3 his3-<math>\Delta</math>1::pTEF2-CHERRY-SWI5-S/A-tCYC1-HIS3</i>	S288c	diese Arbeit
W12049	a	<i>fks1::pFKS1-GFP-FKS1-URA3 CDC11::CDC11-3xCHERRY-LEU2 natNT2-pGALL-CDC20</i>	S288c	diese Arbeit

## Material

Name	MAT	Relevanter Genotyp	SH	Quelle
W12050	$\alpha$	<i>alk2Δ::natMX4 fks1::pFKS1-GFP-FKS1-URA3</i> <i>CDC11::CDC11-3xCHERRY-LEU2 natNT2-pGALL-CDC20</i>	S288c	diese Arbeit
W12051	$\alpha$	<i>SPA2-yEGFP-tADH1-CaURA3 his3-Δ1::pTEF2-CHERRY-SWI5-S/A-</i> <i>tCYC1-HIS3 natNT2-pGALL-CDC20</i>	S288c	diese Arbeit
W12052	a	<i>alk2Δ::natMX4 SPA2-yEGFP-tADH1-CaURA3 his3-Δ1::pTEF2-</i> <i>CHERRY-SWI5-S/A-tCYC1-HIS3 natNT2-pGALL-CDC20</i>	S288c	diese Arbeit
W12054	a	<i>ura3::pGAL1-MYC3-ALK2(1-676)-tCYC1-URA3 CDC42::pTEF2-GFP-</i> <i>CDC42-LEU2 trp1::pTEF2-CHERRY-SWI5-S/A-tCYC1-TRP1</i>	W303	diese Arbeit
W12056	a	<i>ura3::pGAL1-MYC3-ALK2(1-676)-tCYC1-URA3 RHO1::pTEF2-GFP-</i> <i>RHO1-LEU2 trp1::pTEF2-CHERRY-SWI5-S/A-tCYC1-TRP1</i>	W303	diese Arbeit
W12058	$\alpha$	<i>kin4Δ::kanMX4 ALK2::pTEF2-GFP-ALK2(1-676)-LEU2</i> <i>his3-Δ1::pTEF2-CHERRY-SWI5-S/A-tCYC1-HIS3</i>	S288c	diese Arbeit
W12059	$\alpha$	<i>tCYC1::pTEF2-GFP-ALK2(1-333)-tCYC1-LEU2 alk2Δ::natMX4</i> <i>his3-Δ1::pTEF2-CHERRY-SWI5-S/A-tCYC1-HIS3</i>	S288c	diese Arbeit
W12271	$\alpha$	<i>tCYC1::pTEF2-MYC3-ALK2(1-333)-tCYC1-LEU2 alk2Δ::natMX4</i>	S288c	diese Arbeit
W12272	$\alpha$	<i>KIN4::pGAL1-FLAG3-KIN4-LEU2</i> <i>tCYC1::pTEF2-MYC3-ALK2(1-333)-tCYC1-LEU2 alk2Δ::natMX4</i>	S288c	diese Arbeit
W12282	a	<i>KIN4::pGAL1-FLAG3-KIN4-LEU2 ALK2::pTEF2-GFP-ALK2(1-676)-</i> <i>LEU2 SSO1::pTEF2-CHERRY-SSO1-URA3</i>	S288c	diese Arbeit
W12283	$\alpha$	<i>KIN4::pGAL1-FLAG3-KIN4-LEU2 tCYC1::pTEF2-GFP-ALK2(1-333)-</i> <i>tCYC1-LEU2 alk2Δ::natMX4 SSO1::pTEF2-CHERRY-SSO1-URA3</i>	S288c	diese Arbeit
W12284	$\alpha$	<i>tCYC1::pTEF2-ALK2(1-34)-GFP-tCYC1-URA3 alk2Δ::natMX4</i> <i>his3-Δ1::pTEF2-CHERRY-SWI5-S/A-tCYC1-HIS3</i>	S288c	diese Arbeit
W12286	$\alpha$	<i>tCYC1::pTEF2-ALK2(1-115)-GFP-tCYC1-URA3 alk2Δ::natMX4</i> <i>his3-Δ1::pTEF2-CHERRY-SWI5-S/A-tCYC1-HIS3</i>	S288c	diese Arbeit
W12288	$\alpha$	<i>tCYC1::pTEF2-ALK2(1-163)-GFP-tCYC1-URA3 alk2Δ::natMX4</i> <i>his3-Δ1::pTEF2-CHERRY-SWI5-S/A-tCYC1-HIS3</i>	S288c	diese Arbeit
W12290	$\alpha$	<i>tCYC1::pTEF2-ALK2(1-333)-GFP-tCYC1-URA3 alk2Δ::natMX4</i> <i>his3-Δ1::pTEF2-CHERRY-SWI5-S/A-tCYC1-HIS3</i>	S288c	diese Arbeit
W12292	a	<i>kin4Δ::kanMX4 tCYC1::pTEF2-ALK2(1-34)-GFP-tCYC1-URA3</i> <i>alk2Δ::natMX4 his3-Δ1::pTEF2-CHERRY-SWI5-S/A-tCYC1-HIS3</i>	S288c	diese Arbeit
W12293	a	<i>kin4Δ::kanMX4 tCYC1::pTEF2-ALK2(1-163)-GFP-tCYC1-URA3</i> <i>alk2Δ::natMX4 his3-Δ1::pTEF2-CHERRY-SWI5-S/A-tCYC1-HIS3</i>	S288c	diese Arbeit
W12294	$\alpha$	<i>KIN4::pGAL1-FLAG3-KIN4-LEU2 tCYC1::pTEF2-ALK2(1-163)-GFP-</i> <i>tCYC1-URA3 alk2Δ::natMX4 his3-Δ1::pTEF2-CHERRY-SWI5-S/A-</i> <i>tCYC1-HIS3</i>	S288c	diese Arbeit
W12295	a	<i>kin4Δ::kanMX4 tCYC1::pTEF2-ALK2(1-333)-GFP-tCYC1-URA3</i> <i>alk2Δ::natMX4 his3-Δ1::pTEF2-CHERRY-SWI5-S/A-tCYC1-HIS3</i>	S288c	diese Arbeit

## Material

Name	MAT	Relevanter Genotyp	SH	Quelle
W12296	a	<i>KIN4::pGAL1-FLAG3-KIN4-LEU2</i> <i>tCYC1::pTEF2-ALK2(1-333)-GFP-tCYC1-URA3 alk2Δ::natMX4</i> <i>his3-Δ1::pTEF2-CHERRY-SWI5-S/A-tCYC1-HIS3</i>	S288c	diese Arbeit
W12306	α	<i>ura3::pGAL1-MYC3-ALK2-tCYC1-URA3 CDC24-yEGFP-tADH1-SpHIS5 trp1::pTEF2-CHERRY-SWI5-S/A-tCYC1-TRP1</i>	W303	diese Arbeit
W12307	α	<i>tCYC1::pTEF2-ALK2(1-248)-GFP-tCYC1-URA3 alk2Δ::natMX4</i> <i>his3-Δ1::pTEF2-CHERRY-SWI5-S/A-tCYC1-HIS3</i>	S288c	diese Arbeit
W12309	α	<i>tCYC1::pTEF2-ALK2(112-248)-GFP-tCYC1-URA3 alk2Δ::natMX4</i> <i>his3-Δ1::pTEF2-CHERRY-SWI5-S/A-tCYC1-HIS3</i>	S288c	diese Arbeit
W12311	α	<i>tCYC1::pTEF2-ALK2(164-248)-GFP-tCYC1-URA3 alk2Δ::natMX4</i> <i>his3-Δ1::pTEF2-CHERRY-SWI5-S/A-tCYC1-HIS3</i>	S288c	diese Arbeit
W12313	α	<i>tCYC1::pTEF2-ALK2(112-333)-GFP-tCYC1-URA3 alk2Δ::natMX4</i> <i>his3-Δ1::pTEF2-CHERRY-SWI5-S/A-tCYC1-HIS3</i>	S288c	diese Arbeit
W12315	α	<i>tCYC1::pTEF2-ALK2(164-333)-GFP-tCYC1-URA3 alk2Δ::natMX4</i> <i>his3-Δ1::pTEF2-CHERRY-SWI5-S/A-tCYC1-HIS3</i>	S288c	diese Arbeit
W12317	α	<i>tCYC1::pTEF2-ALK2(249-333)-GFP-tCYC1-URA3 alk2Δ::natMX4</i> <i>his3-Δ1::pTEF2-CHERRY-SWI5-S/A-tCYC1-HIS3</i>	S288c	diese Arbeit
W12319	α	<i>tCYC1::pTEF2-ALK2(249-330)-GFP-tCYC1-URA3 alk2Δ::natMX4</i> <i>his3-Δ1::pTEF2-CHERRY-SWI5-S/A-tCYC1-HIS3</i>	S288c	diese Arbeit
W12321	α	<i>tCYC1::pTEF2-ALK2(291-330)-GFP-tCYC1-URA3 alk2Δ::natMX4</i> <i>his3-Δ1::pTEF2-CHERRY-SWI5-S/A-tCYC1-HIS3</i>	S288c	diese Arbeit
W12323	α	<i>kin4Δ::kanMX4 tCYC1::pTEF2-ALK2(164-333)-GFP-tCYC1-URA3</i> <i>alk2Δ::natMX4 his3-Δ1::pTEF2-CHERRY-SWI5-S/A-tCYC1-HIS3</i>	S288c	diese Arbeit
W12324	α	<i>kin4Δ::kanMX4 tCYC1::pTEF2-ALK2(1-248)-GFP-tCYC1-URA3</i> <i>alk2Δ::natMX4 his3-Δ1::pTEF2-CHERRY-SWI5-S/A-tCYC1-HIS3</i>	S288c	diese Arbeit
W12325	α	<i>kin4Δ::kanMX4 tCYC1::pTEF2-ALK2(249-333)-GFP-tCYC1-URA3</i> <i>alk2Δ::natMX4 his3-Δ1::pTEF2-CHERRY-SWI5-S/A-tCYC1-HIS3</i>	S288c	diese Arbeit
W12326	α	<i>kin4Δ::kanMX4 tCYC1::pTEF2-ALK2(112-248)-GFP-tCYC1-URA3</i> <i>alk2Δ::natMX4 his3-Δ1::pTEF2-CHERRY-SWI5-S/A-tCYC1-HIS3</i>	S288c	diese Arbeit
W12327	α	<i>kin4Δ::kanMX4 tCYC1::pTEF2-ALK2(249-330)-GFP-tCYC1-URA3</i> <i>alk2Δ::natMX4 his3-Δ1::pTEF2-CHERRY-SWI5-S/A-tCYC1-HIS3</i>	S288c	diese Arbeit
W12333	a	<i>kin4Δ::kanMX4 tCYC1::pTEF2-ALK2(112-333)-GFP-tCYC1-URA3</i> <i>alk2Δ::natMX4 his3-Δ1::pTEF2-CHERRY-SWI5-S/A-tCYC1-HIS3</i>	S288c	diese Arbeit
W12334	α	<i>kin4Δ::kanMX4 tCYC1::pTEF2-ALK2(291-330)-GFP-tCYC1-URA3</i> <i>alk2Δ::natMX4 his3-Δ1::pTEF2-CHERRY-SWI5-S/A-tCYC1-HIS3</i>	S288c	diese Arbeit
W12338		<i>kin4Δ::kanMX4 tCYC1::pTEF2-ALK2(164-248)-GFP-tCYC1-URA3</i> <i>alk2Δ::natMX4 his3-Δ1::pTEF2-CHERRY-SWI5-S/A-tCYC1-HIS3</i>	S288c	diese Arbeit
W12341	a	<i>KIN4::pGAL1-FLAG3-KIN4-LEU2</i> <i>tCYC1::pTEF2-ALK2(164-333)-GFP-tCYC1-URA3 alk2Δ::natMX4</i> <i>his3-Δ1::pTEF2-CHERRY-SWI5-S/A-tCYC1-HIS3</i>	S288c	diese Arbeit

## Material

Name	MAT	Relevanter Genotyp	SH	Quelle
W12342	a	<i>KIN4::pGAL1-FLAG3-KIN4-LEU2</i> <i>tCYC1::pTEF2-ALK2(1-248)-GFP-tCYC1-URA3 alk2Δ::natMX4</i> <i>his3-Δ1::pTEF2-CHERRY-SWI5-S/A-tCYC1-HIS3</i>	S288c	diese Arbeit
W12343	a	<i>KIN4::pGAL1-FLAG3-KIN4-LEU2</i> <i>tCYC1::pTEF2-ALK2(249-333)-GFP-tCYC1-URA3 alk2Δ::natMX4</i> <i>his3-Δ1::pTEF2-CHERRY-SWI5-S/A-tCYC1-HIS3</i>	S288c	diese Arbeit
W12344	a	<i>KIN4::pGAL1-FLAG3-KIN4-LEU2</i> <i>tCYC1::pTEF2-ALK2(164-248)-GFP-tCYC1-URA3 alk2Δ::natMX4</i> <i>his3-Δ1::pTEF2-CHERRY-SWI5-S/A-tCYC1-HIS3</i>	S288c	diese Arbeit
W12345	a	<i>KIN4::pGAL1-FLAG3-KIN4-LEU2</i> <i>tCYC1::pTEF2-ALK2(249-330)-GFP-tCYC1-URA3 alk2Δ::natMX4</i> <i>his3-Δ1::pTEF2-CHERRY-SWI5-S/A-tCYC1-HIS3</i>	S288c	diese Arbeit
W12346	α	<i>KIN4::pGAL1-FLAG3-KIN4-LEU2</i> <i>tCYC1::pTEF2-ALK2(291-330)-GFP-tCYC1-URA3 alk2Δ::natMX4</i> <i>his3-Δ1::pTEF2-CHERRY-SWI5-S/A-tCYC1-HIS3</i>	S288c	diese Arbeit
W12349	a	<i>KIN4::pGAL1-FLAG3-KIN4-LEU2</i> <i>tCYC1::pTEF2-ALK2(112-333)-GFP-tCYC1-URA3 alk2Δ::natMX4</i> <i>his3-Δ1::pTEF2-CHERRY-SWI5-S/A-tCYC1-HIS3</i>	S288c	diese Arbeit
W12352	a	<i>KIN4::pGAL1-FLAG3-KIN4-LEU2</i> <i>tCYC1::pTEF2-ALK2(112-248)-GFP-tCYC1-URA3 alk2Δ::natMX4</i> <i>his3-Δ1::pTEF2-CHERRY-SWI5-S/A-tCYC1-HIS3</i>	S288c	diese Arbeit
W12358	α	<i>IPL1-yEGFP-tADH1-SpHIS5 his3-Δ1::pTEF2-CHERRY-SWI5-S/A-</i> <i>tCYC1-HIS3 natNT2-pGALL-CDC20</i>	S288c	diese Arbeit
W12359	a	<i>alk1Δ::URA3 alk2Δ::natMX4 IPL1-yEGFP-tADH1-SpHIS5 his3-</i> <i>Δ1::pTEF2-CHERRY-SWI5-S/A-tCYC1-HIS3 natNT2-pGALL-CDC20</i>	S288c	diese Arbeit
W12360	a	<i>CDC42::pTEF2-GFP-CDC42-LEU2 his3-Δ1::pTEF2-CHERRY-SWI5-</i> <i>S/A-tCYC1-HIS3 natNT2-pGALL-CDC20</i>	S288c	diese Arbeit
W12361	a	<i>alk1Δ::URA3 alk2Δ::natMX4 CDC42::pTEF2-GFP-CDC42-LEU2 his3-</i> <i>Δ1::pTEF2-CHERRY-SWI5-S/A-tCYC1-HIS3 natNT2-pGALL-CDC20</i>	S288c	diese Arbeit
W12362	α	<i>RHO1::pTEF2-GFP-RHO1-LEU2 his3-Δ1::pTEF2-CHERRY-SWI5-S/A-</i> <i>tCYC1-HIS3 natNT2-pGALL-CDC20</i>	S288c	diese Arbeit
W12363	α	<i>alk1Δ::URA3 alk2Δ::natMX4 RHO1::pTEF2-GFP-RHO1-LEU2 his3-</i> <i>Δ1::pTEF2-CHERRY-SWI5-S/A-tCYC1-HIS3 natNT2-pGALL-CDC20</i>	S288c	diese Arbeit

## 8 Literaturverzeichnis

- Adams, A.E., and Pringle, J.R.** (1991). Staining of actin with fluorochrome-conjugated phalloidin. *Methods Enzymol* 194, 729-731.
- Adams, I.R., and Kilmartin, J.V.** (1999). Localization of core spindle pole body (SPB) components during SPB duplication in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* 145, 809-823.
- Adams, I.R., and Kilmartin, J.V.** (2000). Spindle pole body duplication: a model for centrosome duplication? *Trends Cell Biol* 10, 329-335.
- Altting-Mees, M.A., and Short, J.M.** (1989). pBluescript II: gene mapping vectors. *Nucleic Acids Res* 17, 9494.
- Amberg, D.C., Zahner, J.E., Mulholland, J.W., Pringle, J.R., and Botstein, D.** (1997). Aip3p/Bud6p, a yeast actin-interacting protein that is involved in morphogenesis and the selection of bipolar budding sites. *Mol Biol Cell* 8, 729-753.
- Amon, A.** (2008). A decade of Cdc14--a personal perspective. Delivered on 9 July 2007 at the 32nd FEBS Congress in Vienna, Austria. *FEBS J* 275, 5774-5784.
- Barford, D.** (2011). Structure, function and mechanism of the anaphase promoting complex (APC/C). *Q Rev Biophys* 44, 153-190.
- Barral, Y., Mermall, V., Mooseker, M.S., and Snyder, M.** (2000). Compartmentalization of the cell cortex by septins is required for maintenance of cell polarity in yeast. *Mol Cell* 5, 841-851.
- Bender, A., and Pringle, J.R.** (1991). Use of a screen for synthetic lethal and multicopy suppressor mutants to identify two new genes involved in morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 11, 1295-1305.
- Berghammer, H., and Auer, B.** (1993). "Easypreps": fast and easy plasmid miniprep for analysis of recombinant clones in *E. coli*. *Biotechniques* 14, 524, 528.
- Bertazzi, D.T., Kurtulmus, B., and Pereira, G.** (2011). The cortical protein Lte1 promotes mitotic exit by inhibiting the spindle position checkpoint kinase Kin4. *J Cell Biol* 193, 1033-1048.
- Bi, E., and Park, H.O.** (2012). Cell polarization and cytokinesis in budding yeast. *Genetics* 191, 347-387.
- Brachmann, C.B., Davies, A., Cost, G.J., Caputo, E., Li, J., Hieter, P., and Boeke, J.D.** (1998). Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast* 14, 115-132.
- Braman, J., Papworth, C., and Greener, A.** (1996). Site-directed mutagenesis using double-stranded plasmid DNA templates. *Methods Mol Biol* 57, 31-44.
- Branzei, D., and Foiani, M.** (2006). The Rad53 signal transduction pathway: Replication fork stabilization, DNA repair, and adaptation. *Exp Cell Res* 312, 2654-2659.
- Breitkreutz, A., Choi, H., Sharom, J.R., Boucher, L., Neduva, V., Larsen, B., Lin, Z.Y., Breitkreutz, B.J., Stark, C., Liu, G., et al.** (2010). A global protein kinase and phosphatase interaction network in yeast. *Science* 328, 1043-1046.
- Cabib, E., Drgonova, J., and Drgon, T.** (1998). Role of small G proteins in yeast cell polarization and wall biosynthesis. *Annu Rev Biochem* 67, 307-333.
- Castillon, G.A., Adames, N.R., Rosello, C.H., Seidel, H.S., Longtine, M.S., Cooper, J.A., and Heil-Chapdelaine, R.A.** (2003). Septins have a dual role in controlling mitotic exit in budding yeast. *Curr Biol* 13, 654-658.
- Caviston, J.P., Longtine, M., Pringle, J.R., and Bi, E.** (2003). The role of Cdc42p GTPase-activating proteins in assembly of the septin ring in yeast. *Mol Biol Cell* 14, 4051-4066.
- Caydasi, A.K., and Pereira, G.** (2012). SPOC alert--when chromosomes get the wrong direction. *Exp Cell Res* 318, 1421-1427.
- Chan, L.Y., and Amon, A.** (2009). The protein phosphatase 2A functions in the spindle position checkpoint by regulating the checkpoint kinase Kin4. *Genes Dev* 23, 1639-1649.
- Cho, R.J., Campbell, M.J., Winzler, E.A., Steinmetz, L., Conway, A., Wodicka, L., Wolfsberg, T.G., Gabrielian, A.E., Landsman, D., Lockhart, D.J., et al.** (1998). A genome-wide transcriptional analysis of the mitotic cell cycle. *Mol Cell* 2, 65-73.

- Chu, S., DeRisi, J., Eisen, M., Mulholland, J., Botstein, D., Brown, P.O., and Herskowitz, I.** (1998). The transcriptional program of sporulation in budding yeast. *Science* 282, 699-705.
- Cohen-Fix, O., and Koshland, D.** (1997). The metaphase-to-anaphase transition: avoiding a mid-life crisis. *Curr Opin Cell Biol* 9, 800-806.
- Conradt, B., Shaw, J., Vida, T., Emr, S., and Wickner, W.** (1992). In vitro reactions of vacuole inheritance in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* 119, 1469-1479.
- Costanzo, M., Nishikawa, J.L., Tang, X., Millman, J.S., Schub, O., Breitkreuz, K., Dewar, D., Rupes, I., Andrews, B., and Tyers, M.** (2004). CDK activity antagonizes Whi5, an inhibitor of G1/S transcription in yeast. *Cell* 117, 899-913.
- Crasta, K., Huang, P., Morgan, G., Winey, M., and Surana, U.** (2006). Cdk1 regulates centrosome separation by restraining proteolysis of microtubule-associated proteins. *EMBO J* 25, 2551-2563.
- D'Aquino, K.E., Monje-Casas, F., Paulson, J., Reiser, V., Charles, G.M., Lai, L., Shokat, K.M., and Amon, A.** (2005). The protein kinase Kin4 inhibits exit from mitosis in response to spindle position defects. *Mol Cell* 19, 223-234.
- Dai, J., and Higgins, J.M.** (2005). Haspin: a mitotic histone kinase required for metaphase chromosome alignment. *Cell Cycle* 4, 665-668.
- Dai, J., Kateneva, A.V., and Higgins, J.M.** (2009). Studies of haspin-depleted cells reveal that spindle-pole integrity in mitosis requires chromosome cohesion. *J Cell Sci* 122, 4168-4176.
- Dai, J., Sullivan, B.A., and Higgins, J.M.** (2006). Regulation of mitotic chromosome cohesion by Haspin and Aurora B. *Dev Cell* 11, 741-750.
- Dai, J., Sultan, S., Taylor, S.S., and Higgins, J.M.** (2005). The kinase haspin is required for mitotic histone H3 Thr 3 phosphorylation and normal metaphase chromosome alignment. *Genes Dev* 19, 472-488.
- de Gramont, A., Barbour, L., Ross, K.E., and Cohen-Fix, O.** (2007). The spindle midzone microtubule-associated proteins Ase1p and Cin8p affect the number and orientation of astral microtubules in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Cycle* 6, 1231-1241.
- DeZwaan, T.M., Ellingson, E., Pellman, D., and Roof, D.M.** (1997). Kinesin-related KIP3 of *Saccharomyces cerevisiae* is required for a distinct step in nuclear migration. *J Cell Biol* 138, 1023-1040.
- Diergardt, N.** (2007). Genetische Untersuchungen zur Funktion der Haspin-Kinasen Alk1 und Alk2 im Zellteilungszyklus der Hefe. VERLAG GRAUER.
- Dolinski, K., and Botstein, D.** (2007). Orthology and functional conservation in eukaryotes. *Annu Rev Genet* 41, 465-507.
- Dong, Y., Pruyne, D., and Bretscher, A.** (2003). Formin-dependent actin assembly is regulated by distinct modes of Rho signaling in yeast. *J Cell Biol* 161, 1081-1092.
- Enserink, J.M., and Kolodner, R.D.** (2010). An overview of Cdk1-controlled targets and processes. *Cell Div* 5, 11.
- Epstein, C.B., and Cross, F.R.** (1992). CLB5: a novel B cyclin from budding yeast with a role in S phase. *Genes Dev* 6, 1695-1706.
- Eswaran, J., Patnaik, D., Filippakopoulos, P., Wang, F., Stein, R.L., Murray, J.W., Higgins, J.M., and Knapp, S.** (2009). Structure and functional characterization of the atypical human kinase haspin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 20198-20203.
- Evangelista, M., Blundell, K., Longtine, M.S., Chow, C.J., Adames, N., Pringle, J.R., Peter, M., and Boone, C.** (1997). Bni1p, a yeast formin linking cdc42p and the actin cytoskeleton during polarized morphogenesis. *Science* 276, 118-122.
- Falk, J.E., Chan, L.Y., and Amon, A.** (2011). Lte1 promotes mitotic exit by controlling the localization of the spindle position checkpoint kinase Kin4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 12584-12590.
- Field, J., Nikawa, J., Broek, D., MacDonald, B., Rodgers, L., Wilson, I.A., Lerner, R.A., and Wigler, M.** (1988). Purification of a RAS-responsive adenylyl cyclase complex from *Saccharomyces cerevisiae* by use of an epitope addition method. *Mol Cell Biol* 8, 2159-2165.
- Fraschini, R., Venturetti, M., Chiroli, E., and Piatti, S.** (2008). The spindle position checkpoint: how to deal with spindle misalignment during asymmetric cell division in budding yeast. *Biochem Soc Trans* 36, 416-420.
- Fujimura-Kamada, K., Hirai, T., and Tanaka, K.** (2012). Essential role of the NH2-terminal region of

- Cdc24 guanine nucleotide exchange factor in its initial polarized localization in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* 11, 2-15.
- Gardner, M.K., Haase, J., Mythreye, K., Molk, J.N., Anderson, M., Joglekar, A.P., O'Toole, E.T., Winey, M., Salmon, E.D., Odde, D.J., et al.** (2008). The microtubule-based motor Kar3 and plus end-binding protein Bim1 provide structural support for the anaphase spindle. *J Cell Biol* 180, 91-100.
- Geymonat, M., Spanos, A., Jensen, S., and Sedgwick, S.G.** (2010). Phosphorylation of Lte1 by Cdk prevents polarized growth during mitotic arrest in *S. cerevisiae*. *J Cell Biol* 191, 1097-1112.
- Gheber, L., Kuo, S.C., and Hoyt, M.A.** (1999). Motile properties of the kinesin-related Cin8p spindle motor extracted from *Saccharomyces cerevisiae* cells. *J Biol Chem* 274, 9564-9572.
- Gietz, R.D., and Woods, R.A.** (2002). Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods Enzymol* 350, 87-96.
- Glotzer, M., Murray, A.W., and Kirschner, M.W.** (1991). Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature* 349, 132-138.
- Goffeau, A., Barrell, B.G., Bussey, H., Davis, R.W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J.D., Jacq, C., Johnston, M., et al.** (1996). Life with 6000 genes. *Science* 274, 546, 563-547.
- Goldstein, A.L., and McCusker, J.H.** (1999). Three new dominant drug resistance cassettes for gene disruption in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 15, 1541-1553.
- Graziano, B.R., DuPage, A.G., Michelot, A., Breitsprecher, D., Moseley, J.B., Sagot, I., Blanchoin, L., and Goode, B.L.** (2011). Mechanism and cellular function of Bud6 as an actin nucleation-promoting factor. *Mol Biol Cell* 22, 4016-4028.
- Guacci, V., Hogan, E., and Koshland, D.** (1994). Chromosome condensation and sister chromatid pairing in budding yeast. *J Cell Biol* 125, 517-530.
- Gulli, M.P., Jaquenoud, M., Shimada, Y., Niederhauser, G., Wiget, P., and Peter, M.** (2000). Phosphorylation of the Cdc42 exchange factor Cdc24 by the PAK-like kinase Cla4 may regulate polarized growth in yeast. *Mol Cell* 6, 1155-1167.
- Gulli, M.P., and Peter, M.** (2001). Temporal and spatial regulation of Rho-type guanine-nucleotide exchange factors: the yeast perspective. *Genes Dev* 15, 365-379.
- Gupta, M.L., Jr., Bode, C.J., Thrower, D.A., Pearson, C.G., Suprenant, K.A., Bloom, K.S., and Himes, R.H.** (2002). beta-Tubulin C354 mutations that severely decrease microtubule dynamics do not prevent nuclear migration in yeast. *Mol Biol Cell* 13, 2919-2932.
- Haase, S.B.u.D.J.L.** (1997). Flow cytometric analysis of DNA content in budding yeast, Vol 283.
- Hanks, S.K., and Hunter, T. (1995). Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J* 9, 576-596.
- Harper, J.W., Burton, J.L., and Solomon, M.J.** (2002). The anaphase-promoting complex: it's not just for mitosis any more. *Genes Dev* 16, 2179-2206.
- Hartwell, L.H., Culotti, J., Pringle, J.R., and Reid, B.J.** (1974). Genetic control of the cell division cycle in yeast. *Science* 183, 46-51.
- Hartwell, L.H., and Weinert, T.A.** (1989). Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science* 246, 629-634.
- Hermann, G.J., King, E.J., and Shaw, J.M.** (1997). The yeast gene, MDM20, is necessary for mitochondrial inheritance and organization of the actin cytoskeleton. *J Cell Biol* 137, 141-153.
- Herskowitz, I.** (1988). Life cycle of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev* 52, 536-553.
- Higgins, J.M.** (2001a). Haspin-like proteins: a new family of evolutionarily conserved putative eukaryotic protein kinases. *Protein Sci* 10, 1677-1684.
- Higgins, J.M.** (2001b). The Haspin gene: location in an intron of the integrin alphaE gene, associated transcription of an integrin alphaE-derived RNA and expression in diploid as well as haploid cells. *Gene* 267, 55-69.
- Higgins, J.M.** (2003). Structure, function and evolution of haspin and haspin-related proteins, a distinctive group of eukaryotic protein kinases. *Cell Mol Life Sci* 60, 446-462.
- Higgins, J.M.** (2010). Haspin: a newly discovered regulator of mitotic chromosome behavior. *Chromosoma* 119, 137-147.

- Higuchi, T., and Uhlmann, F.** (2005). Stabilization of microtubule dynamics at anaphase onset promotes chromosome segregation. *Nature* 433, 171-176.
- Hildebrandt, E.R., Gheber, L., Kingsbury, T., and Hoyt, M.A.** (2006). Homotetrameric form of Cin8p, a *Saccharomyces cerevisiae* kinesin-5 motor, is essential for its in vivo function. *J Biol Chem* 281, 26004-26013.
- Hildebrandt, E.R., and Hoyt, M.A.** (2000). Mitotic motors in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* 1496, 99-116.
- Hoepfner, D., Schaerer, F., Brachat, A., Wach, A., and Philippsen, P.** (2002). Reorientation of mispositioned spindles in short astral microtubule mutant *spc72Delta* is dependent on spindle pole body outer plaque and Kar3 motor protein. *Mol Biol Cell* 13, 1366-1380.
- Hofken, T., and Schiebel, E.** (2002). A role for cell polarity proteins in mitotic exit. *EMBO J* 21, 4851-4862.
- Hotz, M., and Barral, Y.** (2010). Cytokinesis: the Ubc of positioning. *Curr Biol* 20, R602-604.
- Hotz, M., Lengefeld, J., and Barral, Y.** (2012). The MEN mediates the effects of the spindle assembly checkpoint on Kar9-dependent spindle pole body inheritance in budding yeast. *Cell Cycle* 11, 3109-3116.
- Howell, A.S., and Lew, D.J.** (2012). Morphogenesis and the cell cycle. *Genetics* 190, 51-77.
- Huisman, S.M., Bales, O.A., Bertrand, M., Smeets, M.F., Reed, S.I., and Segal, M.** (2004). Differential contribution of Bud6p and Kar9p to microtubule capture and spindle orientation in *S. cerevisiae*. *J Cell Biol* 167, 231-244.
- Huisman, S.M., and Segal, M.** (2005). Cortical capture of microtubules and spindle polarity in budding yeast - where's the catch? *J Cell Sci* 118, 463-471.
- Huxley, C., Green, E.D., and Dunham, I.** (1990). Rapid assessment of *S. cerevisiae* mating type by PCR. *Trends Genet* 6, 236.
- Janke, C., Magiera, M.M., Rathfelder, N., Taxis, C., Reber, S., Maekawa, H., Moreno-Borchart, A., Doenges, G., Schwob, E., Schiebel, E., et al.** (2004). A versatile toolbox for PCR-based tagging of yeast genes: new fluorescent proteins, more markers and promoter substitution cassettes. *Yeast* 21, 947-962.
- Jaspersen, S.L., Charles, J.F., and Morgan, D.O.** (1999). Inhibitory phosphorylation of the APC regulator Hct1 is controlled by the kinase Cdc28 and the phosphatase Cdc14. *Curr Biol* 9, 227-236.
- Jaspersen, S.L., and Winey, M.** (2004). The budding yeast spindle pole body: structure, duplication, and function. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20, 1-28.
- Jensen, S., Geymonat, M., Johnson, A.L., Segal, M., and Johnston, L.H.** (2002). Spatial regulation of the guanine nucleotide exchange factor *Lte1* in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Sci* 115, 4977-4991.
- Kang, T.H., Park, D.Y., Choi, Y.H., Kim, K.J., Yoon, H.S., and Kim, K.T.** (2007). Mitotic histone H3 phosphorylation by vaccinia-related kinase 1 in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 27, 8533-8546.
- Kelly, A.E., Ghenoiu, C., Xue, J.Z., Zierhut, C., Kimura, H., and Funabiki, H.** (2010). Survivin reads phosphorylated histone H3 threonine 3 to activate the mitotic kinase Aurora B. *Science* 330, 235-239.
- Kiener, R.** (2011). Die Haspin-Kinasen *Alk1* und *Alk2*.
- Kim, S., and Yu, H.** (2011). Mutual regulation between the spindle checkpoint and APC/C. *Semin Cell Dev Biol* 22, 551-558.
- King, E.M., Rachidi, N., Morrice, N., Hardwick, K.G., and Stark, M.J.** (2007). *Ipl1p*-dependent phosphorylation of *Mad3p* is required for the spindle checkpoint response to lack of tension at kinetochores. *Genes Dev* 21, 1163-1168.
- King, R.W., Deshaies, R.J., Peters, J.M., and Kirschner, M.W.** (1996). How proteolysis drives the cell cycle. *Science* 274, 1652-1659.
- Knaus, M., Pelli-Gulli, M.P., van Drogen, F., Springer, S., Jaquenoud, M., and Peter, M.** (2007). Phosphorylation of *Bem2p* and *Bem3p* may contribute to local activation of *Cdc42p* at bud emergence. *EMBO J* 26, 4501-4513.
- Knop, M., Pereira, G., Geissler, S., Grein, K., and Schiebel, E.** (1997). The spindle pole body component *Spc97p* interacts with the gamma-tubulin of *Saccharomyces cerevisiae* and functions in microtubule organization and spindle pole body duplication. *EMBO J* 16, 1550-1564.
- Knop, M., and Schiebel, E.** (1997). *Spc98p* and *Spc97p* of the yeast gamma-tubulin complex mediate binding to the spindle pole body via their interaction with *Spc110p*. *EMBO J* 16, 6985-6995.
- Knop, M., and Schiebel, E.** (1998). Receptors determine the cellular localization of a gamma-tubulin

- complex and thereby the site of microtubule formation. *EMBO J* 17, 3952-3967.
- Kolodner, R.D., Putnam, C.D., and Myung, K.** (2002). Maintenance of genome stability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* 297, 552-557.
- Kosugi, S., Hasebe, M., Tomita, M., and Yanagawa, H.** (2009). Systematic identification of cell cycle-dependent yeast nucleocytoplasmic shuttling proteins by prediction of composite motifs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 10171-10176.
- Kurihara, D., Matsunaga, S., Omura, T., Higashiyama, T., and Fukui, K.** (2011). Identification and characterization of plant Haspin kinase as a histone H3 threonine kinase. *BMC Plant Biol* 11, 73.
- Lee, K.S., Asano, S., Park, J.E., Sakchaisri, K., and Erikson, R.L.** (2005). Monitoring the cell cycle by multi-kinase-dependent regulation of Swe1/Wee1 in budding yeast. *Cell Cycle* 4, 1346-1349.
- Lesage, G., and Bussey, H.** (2006). Cell wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* 70, 317-343.
- Levin, D.E.** (2005). Cell wall integrity signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* 69, 262-291.
- Lew, D.J.** (2000). Cell-cycle checkpoints that ensure coordination between nuclear and cytoplasmic events in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Opin Genet Dev* 10, 47-53.
- Lew, D.J.** (2003). The morphogenesis checkpoint: how yeast cells watch their figures. *Curr Opin Cell Biol* 15, 648-653.
- Lew, D.J., and Burke, D.J.** (2003). The spindle assembly and spindle position checkpoints. *Annu Rev Genet* 37, 251-282.
- Lew, D.J., and Reed, S.I.** (1993). Morphogenesis in the yeast cell cycle: regulation by Cdc28 and cyclins. *J Cell Biol* 120, 1305-1320.
- Lew, D.J., T. Weinert und J.R. Pringle** (1997). Cell Cycle control in *Saccharomyces cerevisiae*. Cold Spring Harbor Laboratory Press *Yeast III*, 607-695.
- Liakopoulos, D., Kusch, J., Grava, S., Vogel, J., and Barral, Y.** (2003). Asymmetric loading of Kar9 onto spindle poles and microtubules ensures proper spindle alignment. *Cell* 112, 561-574.
- Lin, T.C., Gombos, L., Neuner, A., Sebastian, D., Olsen, J.V., Hrle, A., Benda, C., and Schiebel, E.** (2011). Phosphorylation of the yeast gamma-tubulin Tub4 regulates microtubule function. *PLoS One* 6, e19700.
- Longtine, M.S., McKenzie, A., 3rd, Demarini, D.J., Shah, N.G., Wach, A., Brachat, A., Philippsen, P., and Pringle, J.R.** (1998). Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 14, 953-961.
- Maddox, P.S., Bloom, K.S., and Salmon, E.D.** (2000). The polarity and dynamics of microtubule assembly in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat Cell Biol* 2, 36-41.
- Maekawa, H., Priest, C., Lechner, J., Pereira, G., and Schiebel, E.** (2007). The yeast centrosome translates the positional information of the anaphase spindle into a cell cycle signal. *J Cell Biol* 179, 423-436.
- Markaki, Y., Christogianni, A., Politou, A.S., and Georgatos, S.D.** (2009). Phosphorylation of histone H3 at Thr3 is part of a combinatorial pattern that marks and configures mitotic chromatin. *J Cell Sci* 122, 2809-2819.
- Markus, S.M., Kalutkiewicz, K.A., and Lee, W.L.** (2012). Astral microtubule asymmetry provides directional cues for spindle positioning in budding yeast. *Exp Cell Res* 318, 1400-1406.
- Mazanka, E., Alexander, J., Yeh, B.J., Charoenpong, P., Lowery, D.M., Yaffe, M., and Weiss, E.L.** (2008). The NDR/LATS family kinase Cbk1 directly controls transcriptional asymmetry. *PLoS Biol* 6, e203.
- Merlini, L., and Piatti, S.** (2011). The mother-bud neck as a signaling platform for the coordination between spindle position and cytokinesis in budding yeast. *Biol Chem* 392, 805-812.
- Miller, J., and Gordon, C.** (2005). The regulation of proteasome degradation by multi-ubiquitin chain binding proteins. *FEBS Lett* 579, 3224-3230.
- Miller, R.K., and Rose, M.D.** (1998). Kar9p is a novel cortical protein required for cytoplasmic microtubule orientation in yeast. *J Cell Biol* 140, 377-390.
- Mionnet, C., Bogliolo, S., and Arkowitz, R.A.** (2008). Oligomerization regulates the localization of Cdc24, the Cdc42 activator in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 283, 17515-17530.
- Moore, J.K., and Cooper, J.A.** (2010). Coordinating mitosis with cell polarity: Molecular motors at the cell cortex. *Semin Cell Dev Biol* 21, 283-289.

- Moore, J.K., and Miller, R.K.** (2007). The cyclin-dependent kinase Cdc28p regulates multiple aspects of Kar9p function in yeast. *Mol Biol Cell* 18, 1187-1202.
- Moore, J.K., Stuchell-Brereton, M.D., and Cooper, J.A.** (2009). Function of dynein in budding yeast: mitotic spindle positioning in a polarized cell. *Cell Motil Cytoskeleton* 66, 546-555.
- Morgan, D.O.** (1997). Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu Rev Cell Dev Biol* 13, 261-291.
- Morgan, D.O.** (2007). *The Cell Cycle*. New Science Press Ltd, London.
- Moseley, J.B., and Goode, B.L.** (2005). Differential activities and regulation of *Saccharomyces cerevisiae* formin proteins Bni1 and Bnr1 by Bud6. *J Biol Chem* 280, 28023-28033.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., and Erlich, H.** (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 1, 263-273.
- Muslin, A.J., Tanner, J.W., Allen, P.M., and Shaw, A.S.** (1996). Interaction of 14-3-3 with signaling proteins is mediated by the recognition of phosphoserine. *Cell* 84, 889-897.
- Nespoli, A., Vercillo, R., di Nola, L., Diani, L., Giannattasio, M., Plevani, P., and Muzi-Falconi, M.** (2006). Alk1 and Alk2 are two new cell cycle-regulated haspin-like proteins in budding yeast. *Cell Cycle* 5, 1464-1471.
- Park, H.O., and Bi, E.** (2007). Central roles of small GTPases in the development of cell polarity in yeast and beyond. *Microbiol Mol Biol Rev* 71, 48-96.
- Parnell, E.J., and Stillman, D.J.** (2008). Getting a transcription factor to only one nucleus following mitosis. *PLoS Biol* 6, e229.
- Patton, E.E., Willems, A.R., and Tyers, M.** (1998). Combinatorial control in ubiquitin-dependent proteolysis: don't Skp the F-box hypothesis. *Trends Genet* 14, 236-243.
- Pellicoli, A., Lee, S.E., Lucca, C., Foiani, M., and Haber, J.E.** (2001). Regulation of *Saccharomyces* Rad53 checkpoint kinase during adaptation from DNA damage-induced G2/M arrest. *Mol Cell* 7, 293-300.
- Pellman, D., Bagget, M., Tu, Y.H., Fink, G.R., and Tu, H.** (1995). Two microtubule-associated proteins required for anaphase spindle movement in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* 130, 1373-1385.
- Pereira, G., Hofken, T., Grindlay, J., Manson, C., and Schiebel, E.** (2000). The Bub2p spindle checkpoint links nuclear migration with mitotic exit. *Mol Cell* 6, 1-10.
- Pereira, G., and Schiebel, E.** (2005). Kin4 kinase delays mitotic exit in response to spindle alignment defects. *Mol Cell* 19, 209-221.
- Perez, P., and Rincon, S.A.** (2010). Rho GTPases: regulation of cell polarity and growth in yeasts. *Biochem J* 426, 243-253.
- Peters, J.M.** (1998). SCF and APC: the Yin and Yang of cell cycle regulated proteolysis. *Curr Opin Cell Biol* 10, 759-768.
- Peters, J.M.** (2006). The anaphase promoting complex/cyclosome: a machine designed to destroy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 644-656.
- Pfleger, C.M., and Kirschner, M.W.** (2000). The KEN box: an APC recognition signal distinct from the D box targeted by Cdh1. *Genes Dev* 14, 655-665.
- Piatti, S., Venturetti, M., Chirolì, E., and Fraschini, R.** (2006). The spindle position checkpoint in budding yeast: the motherly care of MEN. *Cell Div* 1, 2.
- Pringle, J.R., Adams, A.E., Drubin, D.G., and Haarer, B.K.** (1991). Immunofluorescence methods for yeast. *Methods Enzymol* 194, 565-602.
- Pruyne, D., and Bretscher, A.** (2000). Polarization of cell growth in yeast. I. Establishment and maintenance of polarity states. *J Cell Sci* 113 ( Pt 3), 365-375.
- Pruyne, D., Gao, L., Bi, E., and Bretscher, A.** (2004a). Stable and dynamic axes of polarity use distinct formin isoforms in budding yeast. *Mol Biol Cell* 15, 4971-4989.
- Pruyne, D., Legesse-Miller, A., Gao, L., Dong, Y., and Bretscher, A.** (2004b). Mechanisms of polarized growth and organelle segregation in yeast. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20, 559-591.
- Richardson, H.E., Wittenberg, C., Cross, F., and Reed, S.I.** (1989). An essential G1 function for cyclin-like proteins in yeast. *Cell* 59, 1127-1133.
- Roof, D.M., Meluh, P.B., and Rose, M.D.** (1992). Kinesin-related proteins required for assembly of the

mitotic spindle. *J Cell Biol* 118, 95-108.

**Rosasco-Nitcher, S.E., Lan, W., Khorasanizadeh, S., and Stukenberg, P.T.** (2008). Centromeric Aurora-B activation requires TD-60, microtubules, and substrate priming phosphorylation. *Science* 319, 469-472.

**Sambrook, M.T.a.J.** (1989). molecular cloning: a laboratory manual.

**Schmidt, A., Schmelzle, T., and Hall, M.N.** (2002). The RHO1-GAPs SAC7, BEM2 and BAG7 control distinct RHO1 functions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* 45, 1433-1441.

**Schott, D., Huffaker, T., and Bretscher, A.** (2002). Microfilaments and microtubules: the news from yeast. *Curr Opin Microbiol* 5, 564-574.

**Schuyler, S.C., and Pellman, D.** (2001). Search, capture and signal: games microtubules and centrosomes play. *J Cell Sci* 114, 247-255.

**Schwab, M., Lutum, A.S., and Seufert, W.** (1997). Yeast Hct1 is a regulator of Clb2 cyclin proteolysis. *Cell* 90, 683-693.

**Schwob, E., Bohm, T., Mendenhall, M.D., and Nasmyth, K.** (1994). The B-type cyclin kinase inhibitor p40SIC1 controls the G1 to S transition in *S. cerevisiae*. *Cell* 79, 233-244.

**Segal, M., and Bloom, K.** (2001). Control of spindle polarity and orientation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Trends Cell Biol* 11, 160-166.

**Segal, M., Clarke, D.J., Maddox, P., Salmon, E.D., Bloom, K., and Reed, S.I.** (2000). Coordinated spindle assembly and orientation requires Clb5p-dependent kinase in budding yeast. *J Cell Biol* 148, 441-452.

**Seshan, A., Bardin, A.J., and Amon, A.** (2002). Control of Lte1 localization by cell polarity determinants and Cdc14. *Curr Biol* 12, 2098-2110.

**Sheff, M.A., and Thorn, K.S.** (2004). Optimized cassettes for fluorescent protein tagging in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 21, 661-670.

**Sherman, F.** (1998). An Introduction to the Genetics and Molecular Biology of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *The Encyclopedia of Molecular Biology and Molecular Medicine* 6, 302-325.

**Sheu, Y.J., Barral, Y., and Snyder, M.** (2000). Polarized growth controls cell shape and bipolar bud site selection in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 20, 5235-5247.

**Sheu, Y.J., Santos, B., Fortin, N., Costigan, C., and Snyder, M.** (1998). Spa2p interacts with cell polarity proteins and signaling components involved in yeast cell morphogenesis. *Mol Cell Biol* 18, 4053-4069.

**Shimada, Y., Gulli, M.P., and Peter, M.** (2000). Nuclear sequestration of the exchange factor Cdc24 by Far1 regulates cell polarity during yeast mating. *Nat Cell Biol* 2, 117-124.

**Shirayama, M., Toth, A., Galova, M., and Nasmyth, K.** (1999). APC(Cdc20) promotes exit from mitosis by destroying the anaphase inhibitor Pds1 and cyclin Clb5. *Nature* 402, 203-207.

**Sikorski, R.S., and Hieter, P.** (1989). A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 122, 19-27.

**Siller, K.H., and Doe, C.Q.** (2009). Spindle orientation during asymmetric cell division. *Nat Cell Biol* 11, 365-374.

**Smeets, M.F., and Segal, M.** (2002). Spindle polarity in *S. cerevisiae*: MEN can tell. *Cell Cycle* 1, 308-311.

**Soues, S., and Adams, I.R.** (1998). SPC72: a spindle pole component required for spindle orientation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Sci* 111 ( Pt 18), 2809-2818.

**Spellman, P.T., Sherlock, G., Zhang, M.Q., Iyer, V.R., Anders, K., Eisen, M.B., Brown, P.O., Botstein, D., and Futcher, B.** (1998). Comprehensive identification of cell cycle-regulated genes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* by microarray hybridization. *Mol Biol Cell* 9, 3273-3297.

**Straight, A.F., Marshall, W.F., Sedat, J.W., and Murray, A.W.** (1997). Mitosis in living budding yeast: anaphase A but no metaphase plate. *Science* 277, 574-578.

**Surana, U., Robitsch, H., Price, C., Schuster, T., Fitch, I., Futcher, A.B., and Nasmyth, K.** (1991). The role of CDC28 and cyclins during mitosis in the budding yeast *S. cerevisiae*. *Cell* 65, 145-161.

**Swoboda, B.** (2008). Analyse der Funktionsverbindung von Haspin-Proteinen mit dem Mikrotubuli-Zytoskelett der Hefe.

**Tanaka, H., Yoshimura, Y., Nishina, Y., Nozaki, M., Nojima, H., and Nishimune, Y.** (1994). Isolation and characterization of cDNA clones specifically expressed in testicular germ cells. *FEBS Lett* 355, 4-10.

**Tanaka, H., Yoshimura, Y., Nozaki, M., Yomogida, K., Tsuchida, J., Tosaka, Y., Habu, T., Nakanishi, T., Okada, M., Nojima, H., et al.** (1999). Identification and characterization of a haploid germ cell-specific

- nuclear protein kinase (Haspin) in spermatid nuclei and its effects on somatic cells. *J Biol Chem* 274, 17049-17057.
- Tanaka, T.U., Stark, M.J., and Tanaka, K.** (2005). Kinetochore capture and bi-orientation on the mitotic spindle. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 929-942.
- Tong, A.H., Lesage, G., Bader, G.D., Ding, H., Xu, H., Xin, X., Young, J., Berriz, G.F., Brost, R.L., Chang, M., et al.** (2004). Global mapping of the yeast genetic interaction network. *Science* 303, 808-813.
- Torras-Llort, M., Moreno-Moreno, O., and Azorin, F.** (2009). Focus on the centre: the role of chromatin on the regulation of centromere identity and function. *EMBO J* 28, 2337-2348.
- Tzivion, G., and Avruch, J.** (2002). 14-3-3 proteins: active cofactors in cellular regulation by serine/threonine phosphorylation. *J Biol Chem* 277, 3061-3064.
- Ubersax, J.A., Woodbury, E.L., Quang, P.N., Paraz, M., Blethrow, J.D., Shah, K., Shokat, K.M., and Morgan, D.O.** (2003). Targets of the cyclin-dependent kinase Cdk1. *Nature* 425, 859-864.
- Vader, G., Medema, R.H., and Lens, S.M.** (2006). The chromosomal passenger complex: guiding Aurora-B through mitosis. *J Cell Biol* 173, 833-837.
- Vagnarelli, P., and Earnshaw, W.C.** (2004). Chromosomal passengers: the four-dimensional regulation of mitotic events. *Chromosoma* 113, 211-222.
- Varshavsky, A., Turner, G., Du, F., and Xie, Y.** (2000). Felix Hoppe-Seyler Lecture 2000. The ubiquitin system and the N-end rule pathway. *Biol Chem* 381, 779-789.
- Villa, F., Capasso, P., Tortorici, M., Forneris, F., de Marco, A., Mattevi, A., and Musacchio, A.** (2009). Crystal structure of the catalytic domain of Haspin, an atypical kinase implicated in chromatin organization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 20204-20209.
- Visintin, R., Prinz, S., and Amon, A.** (1997). CDC20 and CDH1: a family of substrate-specific activators of APC-dependent proteolysis. *Science* 278, 460-463.
- Wada, Y., Kitamoto, K., Kanbe, T., Tanaka, K., and Anraku, Y.** (1990). The SLP1 gene of *Saccharomyces cerevisiae* is essential for vacuolar morphogenesis and function. *Mol Cell Biol* 10, 2214-2223.
- Wang, F., Dai, J., Daum, J.R., Niedzialkowska, E., Banerjee, B., Stukenberg, P.T., Gorbsky, G.J., and Higgins, J.M.** (2010). Histone H3 Thr-3 phosphorylation by Haspin positions Aurora B at centromeres in mitosis. *Science* 330, 231-235.
- Wasch, R., Robbins, J.A., and Cross, F.R.** (2010). The emerging role of APC/CCdh1 in controlling differentiation, genomic stability and tumor suppression. *Oncogene* 29, 1-10.
- Weissman, A.M.** (2001). Themes and variations on ubiquitylation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 169-178.
- Westermann, B., and Neupert, W.** (2000). Mitochondria-targeted green fluorescent proteins: convenient tools for the study of organelle biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 16, 1421-1427.
- Winey, M., and Bloom, K.** (2012). Mitotic spindle form and function. *Genetics* 190, 1197-1224.
- Winey, M., and O'Toole, E.T.** (2001). The spindle cycle in budding yeast. *Nat Cell Biol* 3, E23-27.
- Yaffe, M.B., Rittinger, K., Volinia, S., Caron, P.R., Aitken, A., Leffers, H., Gamblin, S.J., Smerdon, S.J., and Cantley, L.C.** (1997). The structural basis for 14-3-3:phosphopeptide binding specificity. *Cell* 91, 961-971.
- Yamagishi, Y., Honda, T., Tanno, Y., and Watanabe, Y.** (2010). Two histone marks establish the inner centromere and chromosome bi-orientation. *Science* 330, 239-243.
- Ye, P., Peyser, B.D., Pan, X., Boeke, J.D., Spencer, F.A., and Bader, J.S.** (2005). Gene function prediction from congruent synthetic lethal interactions in yeast. *Mol Syst Biol* 1, 2005 0026.
- Yoshimura, Y., Tanaka, H., Nozaki, M., Yomogida, K., Yasunaga, T., and Nishimune, Y.** (2001). Nested genomic structure of haploid germ cell specific haspin gene. *Gene* 267, 49-54.
- Zachariae, W., Schwab, M., Nasmyth, K., and Seufert, W.** (1998). Control of cyclin ubiquitination by CDK-regulated binding of Hct1 to the anaphase promoting complex. *Science* 282, 1721-1724.
- Zeng, X., Kahana, J.A., Silver, P.A., Morphew, M.K., McIntosh, J.R., Fitch, I.T., Carbon, J., and Saunders, W.S.** (1999). Slk19p is a centromere protein that functions to stabilize mitotic spindles. *J Cell Biol* 146, 415-425.

## 9 Anhang

### 9.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 3.1 Der Zellzyklus der Knospungshefe <i>S. cerevisiae</i> .....	18
Abbildung 3.2 Die anfängliche Etablierung der Polarität bei der Knospenentwicklung .....	20
Abbildung 3.3 Das Wachstum der Knospe .....	22
Abbildung 3.4 Die Spindel im Zellzyklus .....	24
Abbildung 3.5 Die Koordination der Spindelorientierung durch kortikale Komponenten.....	26
Abbildung 3.6 Die Lokalisation von SPOC-Komponenten bei einer normal und fehlorientierten Spindel.	31
Abbildung 4.1 Die Lokalisation von Alk1 und Alk2 .....	39
Abbildung 4.2 Ko- bzw. Metaphase-Lokalisationen von Alk1 und Alk2.....	41
Abbildung 4.3 Schematische Darstellung hergestellter C- und N-terminaler Verkürzungen des Alk2-Proteins .....	43
Abbildung 4.4 Lokalisation der verkürzten N-terminalen Alk2-Konstrukte.....	46
Abbildung 4.5 Schematische Zusammenfassung der Ergebnisse der Alk2-Verkürzungen .....	47
Abbildung 4.6 Synthetischer Effekt von <i>kin4Δ</i> und <i>pTEF2-GFP-ALK2</i> .....	48
Abbildung 4.7 Lokalisation von Alk1 (volle Länge, N-, C-terminale Domäne) und der C-terminalen Alk2-Domäne in <i>kin4Δ</i> -Mutanten.....	49
Abbildung 4.8 Das Fehlen von <i>KIN4</i> beeinflusst die nukleäre, kortikale und zytoplasmatische Alk2-Lokalisation .....	53
Abbildung 4.9 Kortikales Alk2-Signal geht bei <i>KIN4</i> -Überexpression verloren .....	54
Abbildung 4.10 Erhöhte Mengen an Kin4 bewirken den Verlust der kortikalen Alk2-Lokalisation .....	58
Abbildung 4.11 Der N-terminale Bereich von Alk2 wird in Kin4-Abwesenheit stärker modifiziert .....	60
Abbildung 4.12 Erhöhte Kin4-Mengen bewirken eine Zunahme des Alk2-Signals.....	61
Abbildung 4.13 <i>alk2Δ</i> -Mutanten repolarisieren Komponenten des Zellwachstums .....	65
Abbildung 4.14 Die Abwesenheit beider Haspin-Proteine verursacht ein länger andauerndes Wachstum	67
Abbildung 4.15 Aktin-Kabel sind für die Ausprägung des <i>alk1Δ alk2Δ</i> -Phänotyps nötig.....	69
Abbildung 4.16 <i>alk1Δ alk2Δ</i> -Mutanten können Polarität am Kortex nicht auflösen .....	71
Abbildung 4.17 Erhöhte Mengen an Alk2 führen zu knospenlosen Zellen mit duplizierten Spindelpolen und bipolarer Spindel .....	73
Abbildung 4.18 <i>ALK2</i> -Überexpression wirkt der Polarisation des Aktin-Zytoskeletts und der Spindelorientierung entgegen .....	75
Abbildung 4.19 Alk2 verhindert die Bildung der Polaritätsmaschinerie .....	77
Abbildung 4.20 Alk2 baut die Polarisationsmaschinerie verfrüht ab .....	79
Abbildung 4.21 Bem2 lokalisiert in Haspinmutanten nicht mehr am Kortex.....	80

Abbildung 4.22 Erhöhte Alk2-Mengen führen zu einer verstärkten, kortikalen Bem2-Lokalisation.....	81
Abbildung 4.23 <i>bem2Δ</i> supprimiert den Phänotyp der Haspin-Doppelmutante .....	82
Abbildung 4.24 Synthetischer Wachstumsdefekt von <i>cin8Δ</i> bzw. <i>cin8-3</i> mit <i>alk1Δ alk2Δ</i> .....	84
Abbildung 4.25 Nur das simultane Fehlen von beiden Haspin-Proteinen beeinträchtigt die Spindelorientierung .....	85
Abbildung 4.26 Die Spindelorientierung benötigt mehr Zeit in Abwesenheit von Haspin .....	87
Abbildung 4.27 Genetische Interaktion von <i>kar9Δ</i> mit <i>dyn1Δ</i> .....	89
Abbildung 4.28 Keine genetische Interaktion von <i>alk1Δ alk2Δ</i> mit Spindelorientierungsmutanten .....	90
Abbildung 4.29 Spindelfehlorientierung und Kernfehlpositionierung spezifisch für <i>alk1Δ alk2Δ</i> .....	91
Abbildung 4.30 <i>alk1Δ alk2Δ</i> supprimieren den <i>kar9Δ dyn1Δ</i> -Phänotyp .....	93
Abbildung 4.31 <i>alk1Δ alk2Δ</i> supprimieren den <i>spc72Δ</i> -Phänotyp.....	94
Abbildung 4.32 <i>alk1Δ alk2Δ</i> verstärken den <i>tub2Δ C354S</i> -Phänotyp.....	96
Abbildung 4.33 <i>tub2Δ C354S</i> -Mutante supprimiert den <i>spc72Δ</i> -Phänotyp.....	96
Abbildung 4.34 <i>H3 T3A</i> -Mutante spiegelt nicht <i>alk1Δ alk2Δ</i> Phänotyp wider .....	98
Abbildung 4.35 Haspin zeigt in <i>S. cerevisiae</i> keine genetische Interaktion mit Shugoshin .....	100
Abbildung 4.36 Haspin zeigt keine genetische Interaktion mit Aurora B.....	100
Abbildung 4.37 Bir1 und Aurora B lokalisieren in Haspin-Abwesenheit normal.....	102
Abbildung 5.1 Morphogenetische Ereignisse des Zellzyklus. ....	106
Abbildung 5.2 Modell der Regulation der Alk2-Lokalisation.....	113

## 9.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide .....	149
Tabelle 2 Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Plasmide.....	152
Tabelle 3 Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Hefestämme.....	154

## Lebenslauf

### Persönliche Angaben

Name: Anja Britta Swoboda  
geboren am: 14.03.1984 in München  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Familienstand: ledig  
Anschrift: Winklergasse 10, 93047 Regensburg

### Schulbildung

09/1990 – 07/1994 Grundschule Nittendorf  
09/1994 – 06/2003 Goethe Gymnasium, (nat.-math.) Regensburg  
Abschluss: **allgemeine Hochschulreife**

### Studium

10/2003 – 10/2008 Studium der Biologie, Universität Regensburg  
Abschluss: **Diplom Biologin**  
02 – 04/2007 **Praktikum**, Profos AG, Biopark Regensburg  
10/2007 – 10/2008 **Diplomarbeit**, Universität Regensburg, Lehrstuhl für Genetik,  
Prof. Dr. Wolfgang Seufert  
Titel: Analyse der Funktionsverbindung von Haspin-Proteinen mit  
dem Mikrotubuli-Zytoskelett der Hefe  
**Vortrag:** Yeast haspins function in the microtubule network  
September 2008, RZBB (4. Symposium of the Regensburg Centre  
for Biochemistry and Biophysics), Kloster Kostenz

### Promotion

01/2009-12/2012 Universität Regensburg, Lehrstuhl für Genetik,  
Prof. Dr. Wolfgang Seufert  
Titel: Haspin-Proteine der Hefe sind negative Regulatoren der  
Zellpolarität  
**Vortrag:** Yeast haspins in the cell cycle of *Saccharomyces cerevisiae*  
September 2010, 1. Summer Academy of the Regensburg Graduate  
School of Life Sciences, Kloster Kostenz  
**Poster:** - Yeast Haspin proteins in cell cycle progression,  
März 2010, 33<sup>rd</sup> Annual Meeting of the German Society of Cell  
Biology, Regensburg  
- Haspins are negative regulators of cell polarity in budding yeast  
September 2011, 2. Summer Academy of the Regensburg Graduate  
School of Life Sciences, Kloster Kostenz  
- Haspins are negative regulators of cell polarity in budding yeast  
März 2012, 35<sup>rd</sup> Annual Meeting of the German Society of Cell  
Biology, Dresden

## Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei den Menschen bedanken, die durch ihre Hilfe und Unterstützung einen wesentlichen Teil zu dieser Arbeit beigetragen haben.

Ganz besonderer Dank gilt Prof. Dr. Wolfgang Seufert für die Bereitstellung des interessanten Themas. Seine hervorragende Betreuung und die intensiven Gespräche in einer sehr angenehmen, netten Atmosphäre führten zu neuer Inspiration und Motivation.

Bei Prof. Dr. Frank Sprenger möchte ich mich zum Einen für die Begutachtung meiner Arbeit und zum Anderen für die zahlreichen Hilfeleistungen am Mikroskop bedanken. Außerdem geht mein Dank an die weiteren Mitglieder meiner Prüfungskommission, Prof. Dr. Stephan Schneuwly, Prof. Dr. Reinhard Wirth und Prof. Dr. Herbert Tschochner.

Ein herzliches Dankeschön gilt auch allen Mitgliedern des Lehrstuhls Genetik, mit denen ich die letzten Jahre zusammenarbeiten durfte. Ganz besonders möchte ich mich bei meinen zwei lieben Laborkollegen und Freunden Lea Arnold und Sebastian Höckner für die wunderbare und positive Atmosphäre bedanken. Der Laboralltag wurde durch ihre Anwesenheit immer besser, lustiger und aufgrund ihrer Ratschläge einfacher. Des Weiteren danke ich Dr. Michael Schwab, Dr. Heidi Richter, Christoph Morgenthaler, Martina Frank, Caroline Biagosch und Richard Kiener für die schöne Zeit, ihre Hilfsbereitschaft und die nette Zusammenarbeit.

Zuletzt möchte ich von ganzem Herzen den wichtigsten Menschen in meinem Leben danken. Meinen liebevollen Eltern, die mich in allen Dingen meines Lebens unterstützten und jederzeit für mich da sind. Meinem Bruder Jan für seine moralische Unterstützung, sein immer offenes Ohr und für „die Lisa“. Meinem lieben Opa danke ich für seine weisen Worte und den Zuspruch. Außerdem möchte ich mich bei meinem Freund Manuel für seine Hilfe, seine Geduld, seinen Humor und seine liebenswerte, positive Art, die mir jeden Tag verschönert, bedanken.

Vielen lieben Dank!