

**Zelluläre Rolle und molekulare Grundlagen
des Endosomentransports in *Ustilago maydis***

Dissertation
an der Fakultät für Biologie der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorgelegt von
Roland Wedlich-Söldner

München, 2001

1. Gutachter: Prof. Dr. Regine Kahmann
2. Gutachter: Prof. Dr. Thomas Cremer

Dissertation eingereicht am: 30.05.2001
Tag der mündlichen Prüfung: 27.07.2001

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Wedlich-Söldner, R., Bölker, M, Kahmann, R. und Steinberg, G. (2000) A putative endosomal t-SNARE links exo- and endocytosis in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *EMBO J.*, **19**, 1974-1986.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Ergebnisse	8
2.1 Der endosomale t-SNARE Yup1 verknüpft Exo- und Endozytose	8
2.1.1 Segregationsanalyse der <i>yup1^{ts}</i> -Mutation.....	8
2.1.2 Morphologiedefekt und Fehlverteilung von Zellwandkomponenten in RWS1-Zellen.....	9
2.1.3 Lokalisation von Yup1-sGFP	12
2.1.4 Die PX-Domäne vermittelt die Lokalisation von Yup1 auf Endosomen	16
2.1.5 Die Endozytose ist in <i>yup1^{ts}</i> -Zellen blockiert	18
2.2 Molekulare Grundlagen der Bewegung früher Endosomen	20
2.2.1 Mit Yup1-GFP markierte Endosomen werden entlang von Mikrotubuli bewegt... 20	
2.2.2 UmKin3 ist ein neuer Motor der Unc104/KIF1-Familie	22
2.2.3 Kin3 lokalisiert auf frühen Endosomen und bewegt entlang von MT	26
2.2.4 <i>kin3</i> -Deletionsmutanten weisen Defekte in der Zelltrennung und im Knospungsmuster auf.....	29
2.2.5 In <i>kin3</i> -Deletionsstämmen ist die Endosomenorganisation beeinträchtigt	31
2.2.6 Die Überexpression von <i>kin3</i> verändert die Endosomenorganisation	33
2.2.7 Kin3 ist für polares Wachstum von Hyphen wichtig	35
2.2.8 Zytoplasmatisches Dynein ist für den Großteil der Restbewegung von Endosomen nach <i>kin3</i> -Deletion verantwortlich.....	38
2.2.9 Konventionelles Kinesin beeinflusst die Organisation, aber nicht die Bewegung früher Endosomen	40
3. Diskussion	45
3.1 Ein t-SNARE als Bindeglied zwischen Endo- und Exozytose	45
3.2 Endosomentransport entlang von MT	47
3.3 Antiparallel arbeitende Motormoleküle	48
3.4 Ausblick	53
4. Zusammenfassung	54

5. Material und Methoden	56
5.1 Material	56
5.1.1 Stämme	56
5.1.2 Verwendete Kits	62
5.1.3 Enzyme, Proteine	62
5.1.4 Nukleinsäuren	63
5.1.5 Chemikalien	64
5.1.6 Antikörper	66
5.1.7 Sonstige Materialien	66
5.1.8 Puffer und Lösungen	66
5.1.9 Medien	72
5.1.10 Plasmide	74
5.2 Mikrobiologische und genetische Methoden	79
5.2.1 <i>Escherichia coli</i>	79
5.2.2 <i>Ustilago maydis</i>	81
5.3 Molekularbiologische Methoden	83
5.3.1 Handhabung von Nukleinsäuren	83
5.3.2 Isolierung von Nukleinsäuren	84
5.3.3 <i>in vitro</i> -Modifikationen von DNA	86
5.3.4 Auftrennung und Nachweis von Nukleinsäuren	88
5.3.5 Sequenzierung von DNA	91
5.3.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	92
5.4 Zellbiologische Methoden	93
5.4.1 Mikroskopie und Bildverarbeitung	93
5.4.2 Wachstumskurven	94
5.4.3 Färbungen	94
5.5 Biochemische Methoden	96
5.5.1 Messung der Proteinkonzentration	96
5.5.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen	96
5.5.3 Transfer und Nachweis von Proteinen auf Membranen (Western Blot)	97
5.5.4 Isolation von Proteinen aus <i>E. coli</i>	98
5.5.5 Isolation von Gesamtprotein aus <i>U. maydis</i>	99
5.5.6 Heterologe Expression von Proteinen in <i>E. coli</i>	99
5.5.7 Reinigung von Proteinen über Nickel-Chromatographie	99
5.5.8 ATPase Messung für Kinesine	100
5.5.9 Gelfiltration	101
5.6 Computeranalyse	102
6. Literaturverzeichnis	103
Anhang	110

Abkürzungen

AA	Aminosäure(n)	PAA	Polyacrylamid
Abb.	Abbildung	PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
amp	Ampicillin	PBS1	Phosphat-gepufferte isotonische Salzlösung
Ara	Arabinose	PC	Phenol/Chloroform
ATP	Adenosin-5'-triphosphat	PCR	„polymerase chain reaction“
bp	Basenpaar(e)	PD	„potato dextrose“
BSD	„brightly stained dot“	PEG	Polyethylenglycol
C-terminal	carboxyterminal	PH	Pleckstrin-Homologie
Cbx	Carboxin	PX	NADPH-Oxidase-p40
CFP	„cyan green fluorescent protein“	PIPES	Piperazine N-N'-bis (2-Ethan-sulphonat)
CM	„complete medium“	RNA	Ribonukleinsäure
cpm	„counts per minute“	RT	Raumtemperatur
crg	„carbon regulated gene“	SDS	Natriumdodecylsulfat
DAPI	4',6'-Diamidino-2-Phenylindol	SGFP	„synthetic green fluorescent protein“
dATP	Desoxyadenosin-5'-triphosphat	TAE	Tris-Acetat + Na ₂ -EDTA
dCTP	Desoxycytosin-5'-triphosphat	TBE	Tris-Borat + Na ₂ -EDTA
dGTP	Desoxyguanosin-5'-triphosphat	TE	Tris-HCl + Na ₂ -EDTA
DIC	„differential interference contrast“	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylen-diamin
DMF	Dimethylformamid	t-SNARE	„target soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein attachment protein receptor“
DMSO	Dimethylsulfoxid	TLR	„trilobed region“
DNA	Desoxyribonukleinsäure	Tris	Trishydroxymethylamino-Methan
DTT	Dithiothreitol	ts	temperatursensitiv
dTTP	Desoxythymidin-5'-triphosphat	U	Unit (Enzymaktivitätseinheit)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	UARS	„ <i>Ustilago maydis</i> autonomously replicating sequence“
EGFP	„enhanced green fluorescent protein“	Upm	Umdrehungen pro Minute
EGTA	Ethylenglycoltetraessigsäure	UV	ultraviolettes Licht
FHA	„forkhead associated“	v/v	Volumen pro Volumen
FITC	„fluoresceine isothiocyanat“	WGA	„wheat germ agglutinin“
GFP	„green fluorescent protein“	wt	Wildtyp
GTP	Guanosin-5'-triphosphat	w/v	Gewicht pro Volumen
Glu	Glucose	YFP	„yellow green fluorescent protein“
H ₂ O _{bid.}	zweifach destilliertes Wasser		
Hyg	Hygromycin		
kb	Kilobasenpaar = 1.000 bp		
KHC	„kinesin heavy chain“		
KRP	„kinesin related protein“		
min	Minute		
MOPS	3-(N-Morpholino)propan-sulphonat		
MT	Mikrotubulus/Mikrotubuli		
N-terminal	aminoterminal		
Nat	Nourseothricin		
NM	„nitrate minimal medium“		
OD _{xx}	Optische Dichte bei xx nm		
ORF	„open reading frame“		

Sofern nicht anders aufgeführt, wurden SI-Einheiten und dezimale Vielfache von SI-Einheiten verwendet. Elemente wurden mit Elementformeln angegeben. Gattungsnamen wurden nach erstmaliger Verwendung mit dem ersten Buchstaben abgekürzt

1. Einleitung

Polares Wachstum ermöglicht Zellen, ihre Umgebung zu erkunden (Nabi, 1999) und ist damit von entscheidender Bedeutung für Entwicklungsprozesse (Gardner, 1999), (Goldstein *et al.*, 1993). Grundlage für das polare Wachstum ist die Fähigkeit, intrazelluläre Transportvorgänge auszurichten (Nelson, 1992). Dabei spielt die strukturelle Basis für den Transport, also das Aktin- und MT-Zytoskelett (Nelson, 1991) sowie die Aktivität der beteiligten molekularen Motoren (Fischer, 2000), eine wichtige Rolle. Für den polaren Transport membranöser Organellen ist zudem die exakte Regulation der Membranfusion von entscheidender Bedeutung (Aroeti *et al.*, 1998), (Brown und Breton, 2000). Defekte sowohl in der Transport- als auch in der Fusionsmaschinerie können somit zu Störungen im polaren Wachstum führen. Anders als die meisten Protozoen und Vertebratenzellen sind Pflanzen- und Pilzzellen von einer starren Zellwand umgeben, die dem internen hydrostatischen Druck entgegenwirkt. Pilzzellen sind zu gerichtetem Wachstum fähig, indem sie sich an genau definierten Stellen ausdehnen. Dies wiederum erlaubt einen gewissen Grad an Motilität, der für das Eindringen des Pilzes in ein Substrat wichtig ist (Wessels, 1986). Voraussetzung für gerichtetes Spitzenwachstum ist der polare Transport von biosynthetischen und hydrolytischen Enzymen sowie von Membran- und Zellwandbestandteilen in den Apex von Hyphen oder die wachsende Knospe des Pilzes. Diese Faktoren, wie etwa Chitinsynthetasen, werden meist in Mikrovesikeln transportiert (Gow, 1995). Daher ist polares Wachstum auch in Pilzen von gerichteter Vesikelexozytose abhängig, an der das Zytoskelett (Heath, 1995) und daran assoziierte molekulare Motoren (Steinberg, 2000) entscheidend mitwirken.

Das Wachstum von Pilzhypen wird in der Regel von einer Vesikelakkumulation in der Wachstumszone begleitet, dem so genannten Spitzenkörper (Grove und Bracker, 1970). Es gibt mehrere Hinweise darauf, dass diese Struktur als eine Art Speicherorganell dient, das die wachsende Hyphenspitze mit sekretorischen Vesikeln versorgt (Bartnicki-Garcia, 1996). Nach Schätzungen verschmelzen in schnell wachsenden Hyphen von *Neurospora crassa* bis zu 38000 Vesikel pro Minute mit der apikalen Membran (Collinge und Trinci, 1974). Die tatsächliche Zahl könnte sogar noch höher liegen, da Recyclingprozesse zwischen der Plasmamembran und den Endosomen bei dieser Schätzung nicht berücksichtigt wurden (Wessels, 1986). Tatsächlich haben elektronenmikroskopische Untersuchungen an Pollenschläuchen von Pflanzen gezeigt, dass Membranrecycling vermutlich eine herausragende Bedeutung für das polare Wachstum hat (Wessels, 1986). Hinweise auf

Membranrecycling in Pilzzellen stammen bislang nur von *Uromyces fabae* (Hoffmann und Mendgen, 1998) und *Saccharomyces cerevisiae* (Chuang und Schekman, 1996). Das Wissen über molekulare Komponenten, die für Membrantransport und polares Wachstum in Pilzen wichtig sind, stammt überwiegend aus Beobachtungen an *S. cerevisiae* und *Schizosaccharomyces pombe* (Mata und Nurse, 1998). Allerdings konnte bei mehreren filamentösen Pilzen gezeigt werden, dass molekulare Motoren am Spitzenwachstum von Hyphen beteiligt sind (Lehmler *et al.*, 1997), (Seiler *et al.*, 1997), (Wu *et al.*, 1998).

Von den bekannten Klassen molekularer Motoren bewegen Myosine entlang von Aktinfilamenten, Kinesine und Dyneine entlang von Mikrotubuli. Von höheren Eukaryonten ist seit geraumer Zeit bekannt, dass ihre Organellen über lange Strecken meist entlang von Mikrotubuli bewegt werden (Sheetz, 1996). Im Gegensatz dazu wurde bis vor kurzem angenommen, dass der Organellentransport in Pilzen mit Ausnahme der Kernbewegung fast ausschließlich durch Aktin und assoziierte Myosine vermittelt wird (Allan, 1995). Diese Vermutung beruhte vor allem auf Beobachtungen an *S. cerevisiae*, wo Myosine der Klassen I und V an Endo- und Exozytose beteiligt sind (Brown, 1997) (Schott *et al.*, 1999). Auch in anderen Pilzen, wie *Ashbya gossipii* (Wendland und Philippsen, 2001) oder *Aspergillus nidulans* (Suelmann und Fischer, 2000), spielt Aktin eine wichtige Rolle beim polaren Wachstum und Organellentransport.

Demgegenüber stehen inzwischen zahlreiche neuere Studien, vor allem aus filamentösen Pilzen, die die große Bedeutung Mikrotubuli-abhängiger Transportvorgänge auch in Pilzen belegen (Steinberg, 2000), (Yamashita und May, 1998). Dabei wurde vor allem die zelluläre Rolle konventioneller Kinesine (KHCs) untersucht. KHCs spielen beim polaren Wachstum in *N. crassa* (Seiler *et al.*, 1997), *Nectria hematococca* (Wu *et al.*, 1998) und *Ustilago maydis* (Lehmler *et al.*, 1997) eine wichtige Rolle. Zudem gibt es Hinweise, dass KHCs am Transport von Vakuolen (Steinberg *et al.*, 1998) und am Recycling von Golgi-Membranen (Brazer *et al.*, 2000) beteiligt sein können. Neben den KHCs gibt es zahlreiche Gruppen Kinesin-ähnlicher Proteine (KRPs, „kinesin related proteins“), die ebenfalls für intrazelluläre Transportvorgänge wichtig sind. So sind Mitglieder der KRP85/95-Gruppe am Opsin-Transport in Cilien von Säugetier-Photorezeptorzellen (Marszalek *et al.*, 2000) und von Membrankomponenten in Maus-Neuronen (Takeda *et al.*, 2000) beteiligt. Moleküle aus der Unc104/KIF1-Gruppe transportieren Vorläufer synaptischer Vesikel (Okada *et al.*, 1995), Mitochondrien (Nangaku *et al.*, 1994) und Vesikel vom Golgi-Apparat zum Endoplasmatischen Retikulum (Dorner *et al.*, 1998). Über eine mögliche Funktion von KRPs

beim Organellentransport in Pilzen ist bislang jedoch noch nichts bekannt. Die Identifizierung eines Mitglieds der Unc104/KIF1-Familie aus dem thermophilen Pilz *Thermomyces lanuginosus* (Sakowicz *et al.*, 1999), und die Identifizierung eines Proteins der selben Familie im Genomprojekt von *N. crassa* lässt allerdings erwarten, dass KRPs auch in Pilzen an intrazellulären Transportvorgängen beteiligt sind.

In dieser Arbeit wurden molekulare Aspekte von polarem Wachstum und Dimorphismus in *U. maydis* untersucht. Dieser fakultativ pflanzenpathogene Basidiomyzet kann als haploide, Hefe-ähnliche Zellform im Labor gehalten werden und ist sowohl für genetische als auch molekularbiologische Untersuchungen leicht zugänglich (Bannuett, 1995). Der Organismus ist darüber hinaus hervorragend für zytologische Analysen geeignet (Lehmler *et al.*, 1997); (Steinberg *et al.*, 1998). *U. maydis* besitzt ein dynamisches MT-Zytoskelett, das neben der Mitose auch den Organellentransport und die Morphogenese unterstützt (Steinberg *et al.*, 2001). Aus diesem Grund bietet sich der Pilz besonders für die Analyse von MT-abhängigen Vorgängen an. Im Laufe seines Lebenszyklus durchläuft *U. maydis* mehrere morphologische Phasen. Ein morphologischer Wechsel erfolgt, wenn zwei haploide Zellen unterschiedlichen Paarungstyps fusionieren und aus ihnen ein filamentöses Dikaryon hervorgeht (Bannuett, 1995). Auf der Blattoberfläche von Maispflanzen expandieren diese Hyphen durch Spitzenwachstum, wobei sie leere Zellwandabschnitte zurücklassen. Dieser Vorgang benötigt das konventionelle Kinesin von *U. maydis*, Kin2 (Lehmler *et al.*, 1997). Nach dem Eindringen in die Wirtspflanze fängt der Pilz wieder an sich zu teilen und induziert dabei die Ausbildung von Pflanzengallen. Im Inneren der Pflanze werden schließlich auch die Karyogamie und Sporogenese durchlaufen (Bannuett, 1995). Aus den dabei entstehenden diploiden Sporen können dann nach erfolgter Meiose haploide Sporidien hervorgehen und den Lebenszyklus erneut beginnen.

In der dieser Arbeit vorausgehenden Diplomarbeit wurde ein „Screen“ nach temperatursensitiven morphologischen Mutanten von *U. maydis* durchgeführt. Eine der dabei identifizierten Mutanten, FB1-yup1^{ts}, zeigte einen auffälligen Defekt im polaren Wachstum. Die Zellen waren stark angeschwollen, hatten eine veränderte Zellwandzusammensetzung und teilten sich durch Einziehen lateraler Septen anstatt durch Knospung. Da die Zellen zudem nach der Zellteilung nicht voneinander getrennt wurden, führte dies zur Bildung bizarr geformter Zellketten.

Die Komplementation des temperatursensitiven Phänotyps mit einer genomischen Genbank führte zur Identifizierung des *yup1*-Gens. Yup1 zeigte im Sequenzvergleich mit BLAST

(Altschul *et al.*, 1997) signifikante Ähnlichkeit zu bekannten Proteinen, die sich aber vorwiegend auf eine C-terminale „Coiled-Coil“-Region (Abb. 1 A, schraffierter Balken) beschränkte. So ist Yup1 mit einem hypothetischen Protein aus *S. pombe* (AL031523, Sp1 in Abb. 1 A, 30 % Identität) und mit Vam7p aus *S. cerevisiae* (Vam7 in Abb. 1 A, 19 % Identität) verwandt. Letzteres ist in der Bäckerhefe an der Vakuolenorganisation (Wada und Anraku, 1992) und am Transport zur Vakuole (Sato *et al.*, 1998) beteiligt. Für Sequenzen mit <30% Identität sind Algorithmen, die auf einem wie bei BLAST durchgeführten paarweisen Vergleich von Sequenzen beruhen, nur begrenzt geeignet (Brenner *et al.*, 1998). Eine sensitivere Methode zum Vergleich von Sequenzen mit schwacher Homologie ist das „generelle Profil Alignment“ (Bucher *et al.*, 1996). Eine nach Abschluß meiner Diplomarbeit durchgeführte Analyse der C-terminalen „Coiled-coil“-Region von Yup1 mit diesem Verfahren ordnete das Protein klar der Superfamilie der t-SNAREs zu („target soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein attachment protein receptors“; $p=1e-4$; Abb. 1 B). Genauer gehört Yup1 zur t-SNARE-Unterfamilie, die Vam7p enthält, zu ($p=1e-8$; Abb. 1 B; die Stammbaumerstellung und Sequenzvergleiche wurden freundlicherweise von Dr. K. Hofmann durchgeführt).

Die Sequenzvergleiche zeigten außerdem, dass Yup1 eine N-terminale NADPH-Oxidase-p40 (PX)-Domäne trägt (Abb. 1 A, schwarzer Balken). Diese ist vermutlich für Protein-Protein-Interaktionen wichtig (Ponting, 1996), wurde bislang aber noch nicht gezielt untersucht. Je nach Algorithmus, der der Berechnung zugrunde lag, umfasst die PX-Domäne in Yup1 AA 4-149 ($p: 1,9e-5$, PFAM; (Bateman *et al.*, 1999)), AA 4-149 ($p: 1,7e-7$, SMART; (Schultz *et al.*, 1998)) oder AA 10-146 (NScore 13.661, Prosite profiles). In der vorliegenden Arbeit wird die in allen drei Analysen vorhergesagte Region (AA 10-146) als PX-Domäne bezeichnet. Das *yup1^{ts}*-Allel enthielt zwei Punktmutationen, die zu einem einzelnen Aminosäureaustausch an Position 145 führen (Phe zu Ala; Quadrat in Abb. 1 A). Dieser Austausch liegt genau am Ende der vermuteten PX-Domäne.

Nach der so genannten SNARE-Hypothese (Sollner *et al.*, 1993) können t-SNAREs auf Zielmembranen mit v-SNAREs auf ankommenden Vesikeln fusionieren. Der beobachtete morphologische Defekt in FB1-yup1^{ts} beruhte vermutlich auf einer Störung in der Sekretion. Daher sollte das betroffene t-SNARE auf der Zielmembran für den sekretorischen Vesikeltransport, also der Plasmamembran, liegen und dort besonders in den Regionen aktiven Wachstums. Überraschenderweise lokalisierte aber ein Yup1-GFP-Fusionsprotein auf nicht näher charakterisierten, schnell beweglichen Organellen und auf Vakuolenmembranen. Die beobachtete Veränderung der Zellwand in FB1-yup1^{ts}-Zellen führte zu der Annahme, dass eine Fehlverteilung von Chitin für den morphologischen Defekt verantwortlich sein könnte. Chitin ist der Hauptbestandteil pilzlicher Zellwände und maßgeblich für deren Festigkeit verantwortlich (Ruiz-Herrera und Martinez-Espinoza, 1999). Die Biosynthese von Chitinmolekülen erfolgt durch Chitinsynthetasen in der Plasmamembran (Farkas, 1979). In *S. cerevisiae* werden Chitinsynthetasen über so genannte Chitosomen zur Plasmamembran transportiert (Leal-Morales *et al.*, 1988). Bei diesen Organellen handelt es sich möglicherweise um eine spezielle Klasse von Endosomen, die als Reservoir für Chitinsynthetasen dienen, und von denen die Enzyme bei Bedarf zu Regionen aktiven Wachstums gebracht werden (Chuang und Schekman, 1996). In Anlehnung an diese Situation in der Bäckerhefe wurde ein hoch spekulatives Modell für die Wirkungsweise von Yup1 aufgestellt. Danach liegt Yup1 auf Endosomen und wird für die Erkennung und Fusion von Chitinsynthetase-haltigen Transportvesikeln benötigt, die von der Plasmamembran abgeschnürt werden. Von den Endosomen könnten die Chitinsynthetasen dann wieder gerichtet in Regionen aktiven Wachstums sekretiert werden.

Diesem Modell lagen eine Reihe von Annahmen zugrunde, die zum Ende meiner Diplomarbeit im Juli 1997 nicht oder noch nicht ausreichend belegt waren. So war zwar gezeigt worden, dass das *yup1*-Gen die Temperatursensitivität der FB1-yup1^{ts}-Mutante komplementieren konnte, doch war noch unklar, ob sich die Komplementation auch auf die morphologischen Defekte erstreckte. Zudem gab es keinerlei experimentelle Hinweise darauf, dass die Yup1-GFP tragenden Vesikel tatsächlich Endosomen waren, oder dass die Endozytose wie gefordert in der FB1-yup1^{ts}-Mutante gestört war.

Zielstellung der vorliegenden Arbeit war zunächst, die Ergebnisse aus meiner Diplomarbeit abzusichern, und die aus dem hypothetischen Modell entstandenen Fragen zur Funktion von Yup1 beim polaren Wachstum zu klären. Desweiteren sollte das Yup1-GFP-Fusionsprotein als molekularer Marker verwendet werden, um die molekularen Grundlagen für die schnelle Bewegung der mit Yup1-GFP gefärbten Organellen zu untersuchen. Dabei galt es zu klären, welche Zytoskelettelemente der Bewegung zugrunde liegen, und welche molekularen Motoren beteiligt sind.

2. Ergebnisse

2.1 Der endosomale t-SNARE Yup1 verknüpft Exo- und Endozytose

2.1.1 Segregationsanalyse der *yup1^{ts}*-Mutation

Bevor die Rolle von Yup1 beim polaren Wachstum untersucht werden konnte, musste sichergestellt werden, dass die morphologischen Defekte der ursprünglich isolierten FB1-*yup1^{ts}*-Mutante ausschließlich auf die *yup1^{ts}*-Mutation zurückzuführen waren. Die Transformation von pTZ-EB2,2-Hyg in FB1-*yup1^{ts}* führte zwar zur Komplementation der Temperatursensitivität; ein Teil der Zellen (ca. 20 %) war jedoch nach Wachstum bei restriktiver Temperatur verdickt und leicht gekrümmt (nicht gezeigt).

Daraufhin wurde die Mutante mit dem Wildtyp-Stamm FB2 rückgekreuzt, und die Segregation der Meioseprodukte analysiert (siehe Material und Methoden). Dabei traten zwei Typen von temperatursensitiven Segreganten auf, die beide die *yup1^{ts}*-Mutation trugen (Nachweis der Mutation siehe Material und Methoden). Der eine Typ zeigte wie die ursprüngliche FB1-*yup1^{ts}*-Mutante keinerlei Wachstum bei 34 °C. Die andere Variante bildete bei restriktiver Temperatur Mikrokolonien auf Platte. Durch erneute Rückkreuzung einer Segregante des zweiten Typs (Paarungstyp *al b1*) mit FB2 entstanden schließlich die Mutanten RWS1 (*a2b1yup1^{ts}*) und RWS2 (*a1b2yup1^{ts}*), die bei 34 °C geringfügiges Wachstum auf Platte zeigten, sich morphologisch aber nicht signifikant von FB1-*yup1^{ts}* unterschieden. Nach der Kreuzung von RWS1 mit dem kompatiblen Wildtyp-Stamm FB6b, segregierte die *yup1^{ts}*-Mutation im Verhältnis 1:1 und vollständig mit der Temperatursensitivität sowie den morphologischen Defekten. Zudem konnten alle Veränderungen von RWS1-Zellen durch das *yup1*-Gen auf Plasmid pTZ-EB2,2-Hyg komplementiert werden (nicht gezeigt).

Zur weiteren Bestätigung dafür, dass ausschließlich ein Defekt in *yup1* für den beobachteten Phänotyp verantwortlich war, wurde der regulierbare *crg*-Promotor (Bottin *et al.*, 1996) vor das *yup1*-Gen integriert (Stamm RWS24). Nach Abschalten des Promotors in Glukosehaltigem Medium zeigten die RWS24-Zellen den gleichen Phänotyp wie RWS1-Zellen (nicht gezeigt).

Mit RWS1 lag nun ein Stamm vor, bei dem sowohl die Temperatursensitivität als auch die Morphologiedefekte auf die *yup1^{ts}*-Mutation zurückgeführt werden konnten. Dieser Stamm wurde für alle folgenden Analysen verwendet.

2.1.2 Morphologiedefekt und Fehlverteilung von Zellwandkomponenten in RWS1-Zellen

Haploide *U. maydis*-Zellen vermehren sich durch Knospung. Die Tochterzelle wird an einem der Pole der länglichen Mutterzelle gebildet (Abb. 2 A1). Um aktive Wachstumszonen zu markieren, wurde die Zellwand mit Rhodamin-gekoppeltem Weizenkeim-Agglutinin (WGA) gefärbt. Dieses Lektin bindet an oligomeres Chitin (Nagata und Burger, 1974). Außerdem wurde Calcofluor verwendet, das nicht genau spezifizierte, neu gebildete Zellwand-Polymere von Pilzen färbt (Mitchison und Nurse, 1985).

In Wildtyp-Zellen des Stammes FB6a (*a2b1*) färbten beide Farbstoffe ähnliche Regionen. Während des Knospnwachstums (Abb. 2 A2 und A3) markierten sie die Knospe und die Knospennarben (Pfeilspitze in Abb. 2 A2 und A3) sowie während der Zelltrennung die neu gebildeten Septen (Abb. 2 A4 und A5). Allerdings gab es keine exakte Kolokalisation von WGA und Calcofluor (Abb. 2 A4 und A5). Dies deutete darauf hin, dass die Bindestellen der beiden Farbstoffe nicht identisch sind, und Calcofluor in der Zellwand von *U. maydis* nicht an Chitin bindet. Nach dem Wechsel zu 34 °C wuchsen FB6a-Zellen normal bis auf eine geringe vorübergehende Zunahme des Zell- und Knospenhalsdurchmessers (Abb. 3 A). Dies resultierte vermutlich aus einem kurzzeitig gestörten Aktin-Netzwerk infolge des raschen Temperaturwechsels (G. Steinberg, persönliche Mitteilung). Nach 1-2 h bei 34 °C hatten sich die Wildtyp-Zellen wieder erholt (Abb. 3 A).

Im Gegensatz dazu zeigten RWS1-Zellen, die bei 24 °C nicht von Wildtyp-Zellen zu unterscheiden waren (nicht gezeigt), bei 34 °C eine dramatisch veränderte Morphologie: Zell- und Knospenhalsdurchmesser nahmen innerhalb von zwei Stunden stark zu (Abb. 3 A). Die Zellen teilten sich wie bei der FB1-yup1^{ts}-Mutante durch Septierung (Abb. 3 B) anstatt durch Knospung und trennten sich nach der Teilung nicht voneinander. Gleichzeitig verschwand Calcofluor aus den Zellspitzen (Abb. 2 A7), obwohl WGA (und damit Chitin) noch immer an den Zellpolen konzentriert war (Abb. 2 A6). Stattdessen reagierte Calcofluor, aber nicht WGA, verstärkt mit den medianen Septen und den lateralen Zellwandbereichen (Abb. 2 A7). Eine starke Chitin-Konzentration an beiden Zellpolen deutete auf bipolares Wachstum hin (Abb. 3 B). Nach zwölf Stunden bei 34 °C hatte RWS1 lange Zellketten mit kurzen Verzweigungen gebildet (Abb. 2 B3). WGA war immer noch an den Zellspitzen konzentriert (Abb. 2 B1), Calcofluor dagegen war gleichmäßig über die Zellwand verteilt (Abb. 2 B2). Jede Zelle innerhalb der Ketten enthielt einen Zellkern (nicht gezeigt), und auch die

Vakuolenorganisation war mit ein bis zwei größeren Vakuolen pro Zelle nicht merklich gestört (Abb. 2 B4).

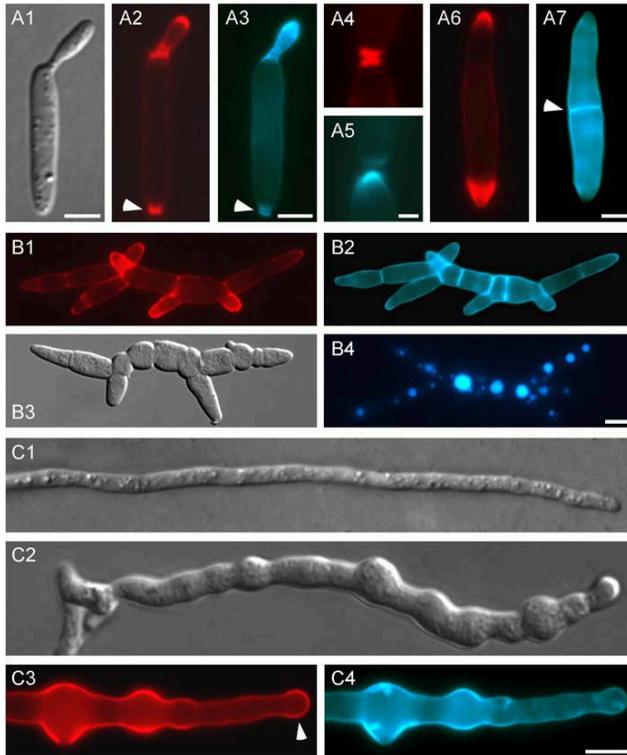


Abbildung 2: Morphologie und Zellwandzusammensetzung von RWS1 bei 34 °C. (A) FB6a-Zellen (A1-A5) und RWS1-Zellen nach 2 h bei 34 °C (A6 und A7). Die Zellwand wurde mit WGA (rot) oder Calcofluor (blau) gefärbt. Beide Farbstoffe lokalisierten an der Spitze der wachsenden Knospe (A2 und A3), an der Knospennarbe (Pfeilkopf in A2 und A3) und an neu gebildeten Septen (A4 und A5). Allerdings kam es zu keiner exakten Kolokalisation (A4 und A5). Nach 2 h bei 34 °C war die WGA-Färbung auf die Wachstumsspitzen der Zellen beschränkt, während Calcofluor nicht mehr an den Spitzen, sondern in den seitlichen Wänden und besonders in den anomal gebildeten Septen lokalisierte (Pfeilkopf in A7). Die Größenbalken in A1-A3 und A6-A7 entsprechen 3 µm und in A4-A5 1 µm. (B) Phänotyp von RWS1 12 h nach Temperaturwechsel. Die Zellen zeigten eine extrem veränderte Morphologie (B3). Die länglichen, multizellulären Ketten enthielten mehrere Wachstumsregionen, die mit WGA gefärbt werden konnten (B1). Calcofluor war in alten Zellwänden und Septen konzentriert (B2). Die Vakuolenmorphologie war gegenüber dem Wildtyp unverändert, und jede Zelle enthielt ein bis zwei große Vakuolen, die mit dem Farbstoff CellTracker™ blue gefärbt werden konnten (B4). Der Größenbalken entspricht 5 µm. (C) Phänotyp von dikaryotischen Hyphen nach Fusion von RWS1 und RWS2. Bei permissiver Temperatur zeigten mutante Hyphen normale Morphologie (C1). Bei 34 °C waren die RWS1/2-Hyphen wesentlich kürzer und zeigten eine stark veränderte Morphologie (C2). WGA war wie im Wildtyp noch an der Hyphenspitze (Pfeilkopf in C3) und besonders in geschwollenen Bereichen entlang der Hyphen (C3) konzentriert. Calcofluor war gleichmäßig über den Großteil der Hyphe verteilt und geringfügig in den seitlichen Verdickungen angereichert (C4). Der Größenbalken entspricht 5 µm.

Durch Kreuzung von RWS1 mit dem kompatiblen Stamm RWS2 (*a1b2yup1^Δ*) auf Aktivkohle-haltigen Agarplatten konnte ein filamentöses Dikaryon erzeugt werden, das nach Temperaturshift erlauben sollte, die Rolle von Yup1 im Hyphenwachstum zu untersuchen. Die dikaryotischen Spitzenzellen von Wildtyp-Hyphen aus einer Kontrollkreuzung von FB6a und FB6b (*a1b2*) waren im Mittel $120,7 \pm 12,3 \mu\text{m}$ ($n=21$) lang und hatten einen Durchmesser von 1-2 μm . Polare Akkumulation von Chitin an der Hyphenspitze markierte die Stelle starken Wachstums (nicht gezeigt). Bei permissiver Temperatur wiesen Hyphen aus einer Kreuzung von RWS1 und RWS2 keine merklichen Unterschiede zu Wildtyp-Hyphen auf (Abb. 2 C1).

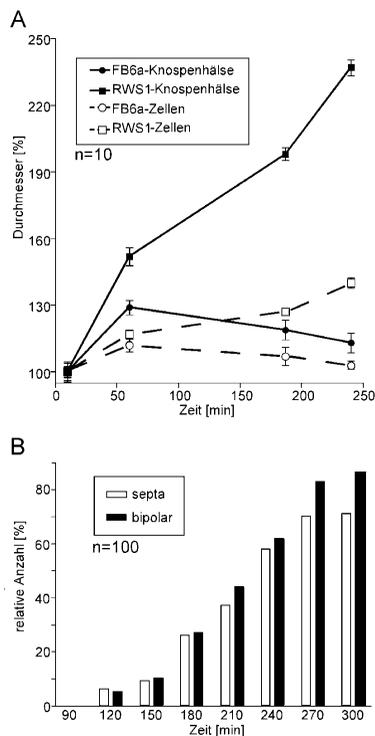


Abbildung 3: Morphologie und Wachstum von haploiden RWS1-Sporidien nach Temperaturwechsel. (A) Quantifizierung der morphologischen Veränderungen in der RWS1-Mutante und des entsprechenden Wildtyp-Stammes bei 34°C. Nach dem Wechsel auf 34 °C wurden FB6a-Zellen insgesamt (leere Kreise) und vor allem im Knospenhals (ausgefüllte Kreise) dicker, erholten sich aber innerhalb von 4 h wieder. Im Gegensatz dazu wurden RWS1-Zellen über den gesamten Zeitraum dicker (leere Quadrate) und verloren ihren Knospenhals vollständig (ausgefüllte Quadrate). (B) Quantifizierung von bipolarem Wachstum und Septierung nach Temperaturwechsel. Die ersten Zellen, die bipolares Wachstum und Septierung aufwiesen, traten bei RWS1 etwa nach 2 h bei 34 °C auf.

Für die Analyse der Hyphen bei restriktiver Temperatur wurden diese zunächst für sechs Stunden bei permissiver Temperatur inkubiert und nach weiteren 12-16 h Inkubation bei 34 °C analysiert. Mutante Hyphen waren deutlich kürzer als Wildtyp-Hyphen ($78,0 \pm 9,1 \mu\text{m}$, $n=7$) und enthielten verdickte Bereiche (Abb. 2 C2). Die WGA- und Calcofluor-Färbungen waren zudem nicht auf die Hyphenspitze beschränkt. Beide Farbstoffe färbten die gesamte Zellwand der Spitzenzelle und waren besonders in den angeschwollenen Bereichen konzentriert (Abb. 2 C3 und C4). Wie in haploiden RWS1-Zellen war WGA, aber nicht Calcofluor, auch an der Hyphenspitze konzentriert (Abb. 2 C3 und C4). Dies deutete auf einen Defekt in der Sekretion einer Zellwandkomponente hin, die durch Calcofluor gefärbt wird.

2.1.3 Lokalisation von Yup1-sGFP

C-terminale Fusionen von Yup1 und dem grün fluoreszierenden Protein (GFP) (Chalfie *et al.*, 1994) sollten genaueren Einblick in die Funktion von Yup1 gewähren. Das Plasmid pYup1SG1 enthält das Fusionsgen unter der Kontrolle des nativen *yup1*-Promotors. Im Plasmid pYup1SG2 reguliert der starke, konstitutive *otef*-Promotor (Spellig *et al.*, 1996) die Expression des *yup1*-Gens. Ektopische Integration der Plasmide in RWS1 führte zu einer vollständigen Aufhebung des temperatursensitiven Morphologiedefekts (nicht gezeigt). Dies zeigte, dass das Yup1-GFP-Fusionsprotein biologisch aktiv ist. Expression von Yup1-GFP in FB1 durch den endogenen Promotor (Stamm RWS3; Abb. 4 A) oder den *otef*-Promotor (Stamm RWS4; Abb.4 B1-B4) führte zu vergleichbarer subzellulärer Lokalisation (siehe unten), wobei das Signal nach Expression des Yup1-GFP-Fusionsproteins unter dem *otef*-Promotor deutlich stärker war. Deshalb wurden alle nachfolgenden Lokalisationsstudien und die Analyse der Vesikelbewegung mit RWS4 durchgeführt. Im Western-Blot konnte mit Hilfe eines GFP-Antikörpers gezeigt werden, dass die Menge von Yup1-GFP in diesem Stamm etwa siebenmal höher als in RWS4 war. Weder Morphologie noch Verdopplungszeit waren jedoch davon beeinträchtigt (nicht gezeigt).

Bereits in meiner Diplomarbeit konnte Yup1-GFP auf Vakuolenmembranen und auf schnell beweglichen Organellen lokalisiert werden. Eine genauere Analyse zeigte, dass Yup1-GFP in RWS4 auf vier unterscheidbaren Strukturen lokalisierte (Abb. 4 B1): (i) schnell bewegliche Vesikel mit einem Durchmesser von weniger als $0,5 \mu\text{m}$ (Abb. 4 B1-B4, Pfeilkopf); (ii) hell leuchtende Vesikelakkumulationen (im Weiteren auch als BSDs bezeichnet, „brightly stained dots“; Stern in Abb. 4 B1) von $0,94 \pm 0,14 \mu\text{m}$ Durchmesser ($n = 13$ Zellen aus 2 Experimenten); (iii) ein bis zwei hellere Flecken, die in Kontakt mit Vakuolen standen (Pfeil in Abb. 4 B1); und (iv) schwach gefärbte Vakuolenmembranen (V in Abb. 4 B1).

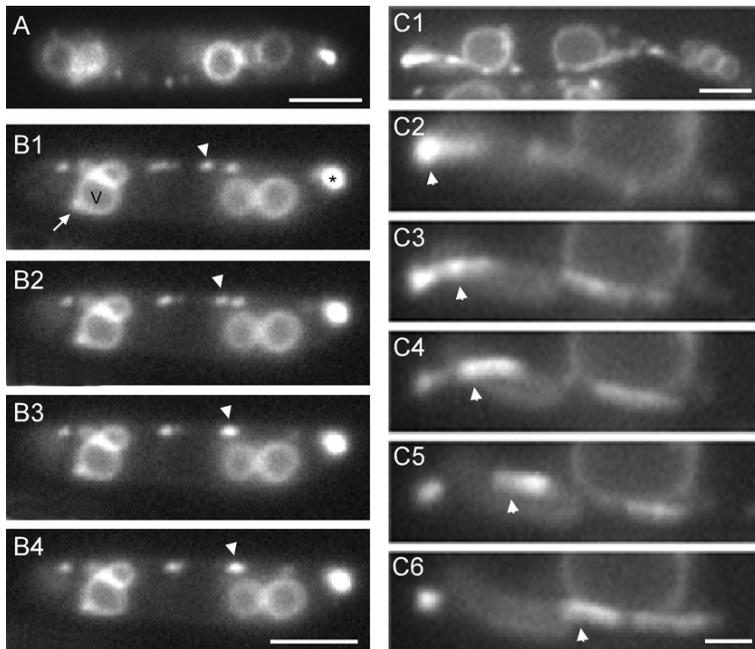


Abbildung 4: Subzelluläre Lokalisation des Yup1-GFP-Fusionsproteins. (A) Epifluoreszenzaufnahme von mit Yup1-GFP gefärbten Vesikeln in einer Zelle, die das Fusionsprotein unter der Kontrolle des nativen *yup1*-Promotors exprimiert (RWS3). Der Größenbalken entspricht 3 µm. (B) Epifluoreszenzaufnahme von Yup1-GFP tragenden Vesikeln in einem Stamm, der Yup1-GFP überexprimiert (RWS4). Einzelaufnahmen wurden im Abstand von 0,4 s genommen (B1-B4). Yup1-GFP lokalisierte vorwiegend in den BSDs (Stern in B1) und in sich schnell bewegenden, vesikelartigen Organellen (Pfeilspitze in B1-B4). Außerdem konnte man Yup1-GFP in Vakuolenmembranen (V; B1) und Vakuolen-assoziierten Flecken (Pfeil in B1) finden. Die Lokalisation von Yup1-GFP in RWS3 und RWS4 ist identisch. Der Größenbalken entspricht 3 µm. (C) Auflösung eines BSDs in mit Yup1-GFP markierten Vesikeln in einer RWS4-Zelle. Ein BSD am knospenabgewandten Zellpol der Mutterzelle (C1) zerfiel innerhalb weniger Sekunden in sich schnell bewegende Vesikel (Pfeilspitze in C2-C6). Das Intervall zwischen den einzelnen Bildern beträgt etwa 1 s. Die Größenbalken entsprechen 3 µm (C1) beziehungsweise 1 µm (C2-C6).

Yup1-GFP-markierte Vesikel bewegten sich entlang der Peripherie der Zelle (Abb. 4 B1-B4). Die Bewegung verlief bidirektional, häufig saltatorisch und entlang definierter Bahnen. Einzelne Vesikel zeigten häufig Fusion miteinander (nicht gezeigt) und standen in dynamischem Kontakt zu den BSDs, in denen sie akkumulierten. Manchmal konnte beobachtet werden, wie BSDs in zahlreiche kleine Vesikel zerfielen (Abb. 4 C1-C6).

Die BSDs waren meist stationär und zeigten nur langsame Bewegung. Ihre Lage war vom Zellzyklus abhängig (Abb. 5 A1-A4). In nicht knospenden Zellen wurden BSDs in $56,0 \pm 8,3\%$ der Zellen an einem der beiden Pole beobachtet (Abb. 5 A1; alle Werte: $n =$

3 Experimente mit je > 100 Zellen). Zellen mit kleinen Knospen hatten meist einen BSD in der wachsenden Knospe ($81,2 \pm 9,7\%$; Abb. 5 A2, Pfeil). In Zellen mit größeren Knospen lag ein BSD meist am Knospen-abgewandten Pol der Mutterzelle ($96,2 \pm 0,1\%$; Abb. 5 A3; siehe auch Abb. 4 C1). Schließlich wurde das neu gebildete Septum während der Zellteilung in der Regel von zwei BSDs flankiert ($80,7 \pm 2,3\%$; Abb. 5 A4).

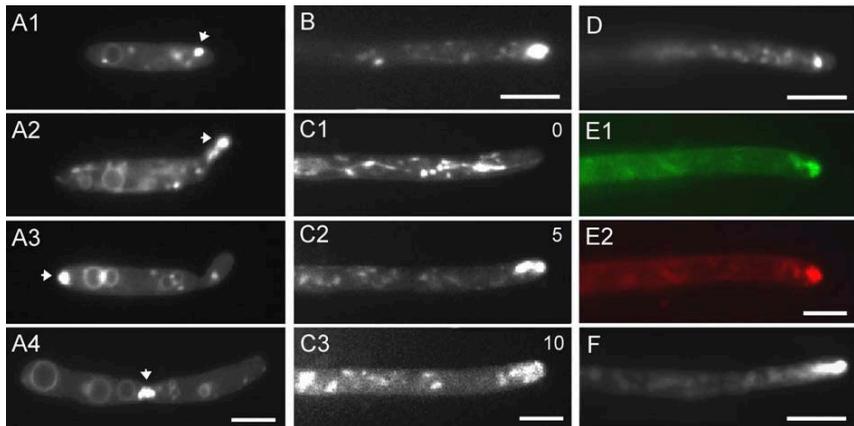


Abbildung 5: Lokalisation von BSDs in haploiden Sporidien und dikaryotischen Hyphen. **(A)** Lokalisation von Yup1-GFP-Vesikelakkumulationen (BSDs) in verschiedenen Zellzyklusstadien von *U. maydis*-Sporidien (RWS4). Die BSDs waren oft an einem Pol von nicht knospenden Zellen (Pfeil in A1) und in kleinen Knospen (Pfeil in A2) zu finden. In Zellen mit größeren Knospen waren die BSDs fast immer am Knospen-abgewandten Pol der Mutterzelle zu finden (Pfeil in A3) und befanden sich schließlich zu beiden Seiten des neu gebildeten Septums vor der Zellteilung (Pfeil in A4). Der Größenbalken entspricht 3 μm . **(B)** Hyphe aus einer Kreuzung von RWS3 und FB2. Ein BSD befindet sich im Apex der Hyphe. Größenbalken entspricht 5 μm . **(C)** Dynamik der Yup1-GFP-Akkumulation in einer Hyphe aus der Kreuzung von RWS4 mit FB2. Mechanische Belastung der Hyphen führte zu sofortigem Auflösen der BSDs (C1). Nach etwa 5 min erschienen die apikalen BSDs wieder (C2) und blieben für weitere 5-10 min unter dem Mikroskop bestehen (C3). Spitzenwachstum konnte nur in Hyphen mit BSDs gemessen werden. Zeitangabe in Minuten befindet sich in der jeweils rechten oberen Ecke der Bilder. Der Größenbalken entspricht 3 μm . **(D)** Apikale Vesikelakkumulation in einer Hyphe (RWS4xFB2), die vor Präparation fixiert wurde. **(E)** Kolokalisation des apikalen BSDs mit dem Endozytosemarker FM4-64. Hyphen (RWS4xFB2) wurden für 2 min mit FM4-64 gefärbt und dann für 7 min mit Wasser gewaschen. Die Yup1-GFP-Akkumulation (grün, E1) kolokalisierte exakt mit den endosomalen Vesikeln im Apex der Hyphe (rot, E2). Der Größenbalken entspricht 3 μm . **(F)** Akkumulation von Yup1-GFP-Vesikeln in der Spitze einer SG200 Δ kin2-Hyphe. Obwohl Hyphen dieses Stammes keine Vesikel in der Hyphen Spitze akkumulieren (Lehmler *et al.*, 1997), enthielten sie deutlich sichtbare BSDs. Der Größenbalken entspricht 5 μm .

Um auszuschließen, dass BSDs durch die Überexpression von Yup1-GFP entstehen, wurde die Quantifizierung in RWS3 wiederholt. Auch in diesem Stamm, in dem Yup1-GFP unter dem nativen *yup1*-Promotor exprimiert wurde, enthielten über 80 % aller knospenden Zellen polare BSDs. Die Lokalisation stimmte vollständig mit der in RWS4 überein (nicht gezeigt).

Um die Endosomenorganisation in Hyphen beobachten zu können, wurden die Yup1-GFP exprimierenden Stämme mit kompatiblen Wildtyp-Stämmen gekreuzt. Vesikel-Akkumulationen konnten in den Spitzen von Hyphen beobachtet werden, die aus Kreuzungen von FB2 mit RWS3 (Abb. 5 B) oder FB2 mit RWS4 (Abb. 5 C-E) hervorgegangen waren. Mechanische Störung, wie etwa bei der Übertragung der Hyphen von der Platte auf den Objektträger, führte zu sofortigem Zerfall der BSDs in zahlreiche Vesikel und Membranschläuche, die dann aus dem Apex transportiert wurden (Abb. 5 C1). Um die Effekte der mechanischen Störung zu reduzieren, wurden die Hyphen auf dem Objektträger zunächst für 10 min ruhen gelassen. Anschließend wurden im Abstand von 1 min Aufnahmen gemacht. Zu Beginn der Betrachtung waren meist noch keine BSDs in den Hyphenspitzen zu sehen. In dieser Zeit konnte auch kein Spitzenwachstum festgestellt werden, obwohl die Bewegung der Yup1-GFP-Vesikel ungestört schien. In der abgebildeten Hyphe (Abb. 5 C1-3) war nach 5 min eine apikale Vesikelakkumulation zu sehen (Abb. 5 C2). Innerhalb der nächsten 5 min blieb dieser BSD im Hyphenapex (Abb. 5 C3), und Spitzenwachstum mit einer Geschwindigkeit von 0,4 – 0,8 $\mu\text{m}/\text{min}$ setzte ein. Nach 10 min war der BSD wieder zerfallen, und die Hyphe hörte auf zu wachsen. Da zugleich auch die Bewegung der Yup1-GFP-Vesikel zum Erliegen kam, war der Effekt vermutlich auf die Bestrahlung oder auf Sauerstoffmangel zurückzuführen, und der Versuch wurde abgebrochen. Um zu zeigen, dass Vesikelakkumulationen auch in Hyphen vorkommen, die nicht mechanisch gestört wurden, wurden Hyphen aus einer FB2xRWS4-Kreuzung vor der mikroskopischen Analyse mit 1 % Formaldehyd fixiert. In 23% der so behandelten Hyphen konnten BSDs detektiert werden (Abb. 5 D), wengleich die Fixierung das GFP-Signal abschwächte. Dieser Fixierungseffekt erklärt möglicherweise auch die fehlenden BSDs in der Mehrzahl der Hyphen.

Lokalisation und Verhalten der BSDs in den Hyphenspitzen ähnelte stark denen pilzlicher Spitzenkörper. Diese Struktur besteht vermutlich aus sekretorischen Vesikeln und ist am polaren Hyphenwachstum beteiligt (Wessels, 1986). In EM-Studien konnte gezeigt werden, dass Hyphen des Stammes SG200 $\Delta kin2$ keine Spitzenkörper-ähnlichen Vesikelakkumulationen enthielten (Lehmler *et al.*, 1997). Überraschenderweise konnten auch in diesen *kin2*-defizienten Hyphen BSDs beobachtet werden (Abb. 5 F), was darauf hindeutet, dass die BSDs in Hyphen und der postulierte Spitzenkörper nicht identisch sind.

Interessanterweise konnten BSDs in Hyphen mit dem Endozytosefärbstoff FM4-46 gefärbt werden (Abb. 5 E1-2, FM4-64: rot, Yup-GFP: grün). Dies deutete darauf hin, dass die Yup1-GFP tragenden Vesikel Teil des endosomalen Kompartiments sein könnten (siehe unten).

2.1.4 Die PX-Domäne vermittelt die Lokalisation von Yup1 auf Endosomen

Eine der Hauptforderungen des in meiner Diplomarbeit aufgestellten Modells war, dass Yup1 auf Endosomen lokalisiert. Der Vorgang der Endozytose wurde in *S. cerevisiae* (Vida und Emr, 1995) und mittlerweile auch in einer Reihe anderer Pilze (Fischer-Parton et al, 2000) mit Hilfe des lipophilen Farbstoffs FM4-64 verfolgt. In *U. maydis* gab es vor dieser Studie keinerlei Untersuchungen über Endozytose. Eine „Pulse-chase“-Färbung von RWS4-Zellen mit FM4-64 und dem strukturell verwandten Farbstoff RH414 (nicht gezeigt) zeigte, dass bewegliche, periphere Vesikel (Abb. 6 A1) mit den zuvor gezeigten Yup1-GFP-Vesikeln kolokalisieren (Abb. 6 A2, Überlapp in A3). Es handelt sich bei diesen Vesikeln also vermutlich um Endosomen. BSDs wurden ebenfalls durch FM4-64 gefärbt (Pfeilkopf in Abb. 6 A1). Unter den verwendeten Färbebedingungen wurden keine Vakuolenmembranen durch FM4-64 gefärbt (Pfeil in Abb. 6 A3).

Um die Rolle der PX-Domäne bei der Lokalisation von Yup1 an den Zielmembranen zu ermitteln, wurden die gesamte PX-Domäne sowie verkürzte Versionen mit GFP fusioniert und unter dem *otef*-Promotor in Wildtyp-Zellen (FB1) exprimiert (Abb. 6 B1). Die vollständige PX-Domäne (AA 10-146; pPX10-146) lokalisierte wie das gesamte Fusionsprotein („+“ in Abb. 6 B1). Verkürzungen am N- oder C-Terminus der Domäne hingegen führten zu einem vollständigem Verlust der Lokalisation („-“ in Abb. 6 B1). Das Plasmid pPX10-146 wurde außerdem in den RWS1-Stamm integriert (RWS43). Bei permissiver Temperatur kolokalisierte das PX10-146-GFP-Fusionsprotein mit FM4-64 in Vesikeln und BSDs (Abb. 6 B2). Bereits 10 min nach dem Wechsel zu 34 °C war das PX10-146-GFP-Protein in unbeweglichen, zytoplasmatischen Aggregaten fehllokalisiert (grün in Abb. 6 B3). FM4-64 färbte eine andere Art von Aggregaten, die wolkenförmig waren (rot in Abb. 6 B3). Schließlich wurde noch ein vollständiges Yup1^{ts}-GFP-Fusionskonstrukt hergestellt (pYup1^{ts}SG) und in FB1-Zellen transformiert (RWS46). Bei permissiver Temperatur kolokalisierte das Fusionsprotein vollständig mit FM4-64 (nicht gezeigt). Bei 34 °C jedoch erschien das Yup1^{ts}-GFP-Protein in den oben beschriebenen unbeweglichen Aggregaten (grün in Abb. 6 B4) - FM4-64 gelangte dagegen weiterhin, vermutlich über das Wildtyp-Yup1, in die schnell beweglichen Endosomen (rot in Abb. 6 B4). Diese Ergebnisse

zeigen, dass die PX-Domäne eine wichtige Funktion bei der Lokalisation von Yup1 an endosomalen Membranen ausübt.

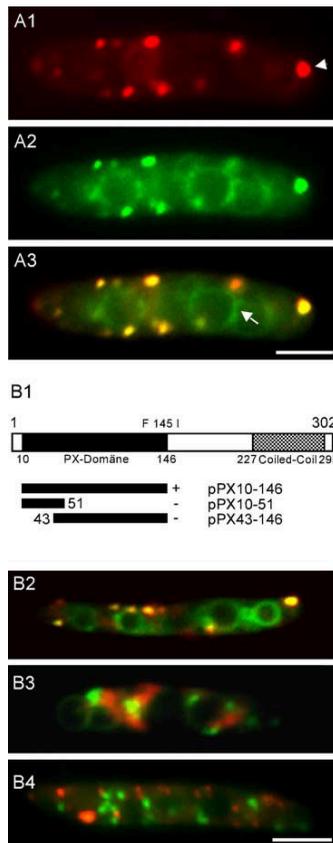


Abbildung 6: Lokalisation von Yup1-GFP auf Endosomen. (A) Kolokalisation von Yup1-GFP-Vesikeln mit Endosomen in RWS4. Yup1-GFP-Fusionsprotein lokalisiert auf kleinen, peripheren Vesikeln (grün, A1), die mit dem Endozytosefarbstoff FM4-64 gefärbt werden konnten (rot, A2). Im Überlapp (A3) wird deutlich, dass Yup1-GFP außerdem auf Vakuolenmembranen zu finden ist, die nicht mit FM4-64 gefärbt wurden (Pfeil in A3). Der Größenbalken entspricht 3 µm. (B) Deletionsanalyse der N-terminalen PX-Domäne von Yup1. C-terminal verkürzte Yup1-Stücke wurden mit GFP fusioniert, und die entsprechende subzelluläre Verteilung dieser Fusionsproteine in Wildtyp-Zellen wurde analysiert. Die gesamte PX-Domäne (AA 10-146) ist für die korrekte Lokalisation im Wildtyp ausreichend (mit „+“ angegeben, B1). Deletionen am Anfang oder Ende der PX-Domäne führten zu einem Verlust der Lokalisation („-“ in B1). Bei permissiver Temperatur kolokalisierten das PX10-146-GFP-Fusionsprotein und FM4-64 (Überlapp in B2) in RWS1 Zellen. Bei 34 °C hingegen aggregierte das Fusionsprotein im Zytoplasma (grün in B3), während FM4-64 diffus über die Zelle verteilt war (rot, B3). Ein Yup1^{ts}-GFP-Fusionsprotein lokalisierte bei 34 °C im Wildtyp ebenfalls in unbeweglichen Aggregaten (grün, B4), die klar von den mit FM4-64 gefärbten Endosomen unterscheidbar waren (rot, B4). Der Größenbalken entspricht 3 µm.

2.1.5 Die Endozytose ist in *yup1^{ts}*-Zellen blockiert

Die Kolokalisation mit FM4-64 zeigte, dass Yup1-GFP vorwiegend auf dem endosomalen Kompartiment lokalisiert. Dies legte eine Funktion von Yup1 in der Endozytose nahe. Deshalb wurde der Verlauf der Endozytose in Wildtyp- und RWS1-Zellen untersucht.

Bei „Pulse-Chase“-Färbungen von Wildtyp-Zellen mit FM4-64 oder RH414 (nicht gezeigt) begann die Endozytose mit der schnellen Aufnahme des Farbstoffs in die Plasmamembran in weniger als einer Minute (Abb. 7 A1). Nach einer Minute akkumulierte der Farbstoff in definierten Bereichen der Plasmamembran. Diese Regionen waren unbeweglich und relativ gleichmäßig über die Zelloberfläche verteilt (Abb. 7 A2). Sie hatten einen Durchmesser von $0,76 \pm 0,04 \mu\text{m}$ ($n = 9$) und oft eine dreilappige Symmetrie (Abb. 7 C1). Um sicher zu gehen, dass es sich bei diesen Strukturen nicht um Zellwandbereiche handelte, wurde die Aufnahme des Farbstoffs in zellwandlose Protoplasten verfolgt. Auch hier bildeten sich die charakteristischen dreilappigen Strukturen (TLR, „trilobed regions“) (nicht gezeigt). Nach 4-6 min wurde der Farbstoff in schnell bewegliche Schläuche und Vesikel unterhalb der Zelloberfläche aufgenommen (Abb. 7 A3). Diese frühen Endosomen kolokalisierten mit den Yup1-GFP-Vesikeln (Abb. 6 A). Im weiteren werden daher Yup1-GFP-Vesikel und frühe Endosomen als gleichwertige Begriffe verwendet. Nach 12-15 min waren vorwiegend Vakuolenmembranen und mit Vakuolen assoziierte späte Endosomen mit FM4-64 gefärbt (Abb. 7 A4). Nach 30-60 min lag dann schließlich der Farbstoff ausschließlich in den Vakuolenmembranen vor (Abb. 7 A5).

Um zu ermitteln, ob die Aufnahme von FM4-64 Energie benötigte, wurden Zellen vor der Färbung mit 5 mM Natriumazid (NaN_3) vergiftet. Azid entkoppelt die Atmungskette und stoppt dadurch die ATP-Produktion. Diese Behandlung der Zellen verhinderte die Aufnahme des Farbstoffs in die Plasmamembran und in die TLR nicht, was darauf hindeutete, dass diese Schritte kein ATP benötigen. Hingegen konnten weder FM4-64 noch RH414 in frühe Endosomen oder nachfolgende Kompartimente aufgenommen werden (nicht gezeigt).

In RWS1 bei 34 °C (siehe Material und Methoden) erfolgte die Aufnahme von FM4-64 in die Plasmamembran (Abb. 7 B1) und TLR wie in Wildtyp-Zellen, jedoch deutlich langsamer. Die TLR waren erst nach 5-6 min gefärbt (Abb. 7 B2). Am auffälligsten war, dass der Farbstoff nach den TLR keine schnell bewegliche Organellen färbte. Stattdessen erschien er in fleckigen, wolkenartigen Aggregaten (Abb. 7 B3), die unbeweglich waren und teilweise eine vesikuläre Struktur zu haben schienen (Abb. 7 C2). Auch nach einer Stunde war nur eine geringe Menge des Farbstoffs in die Vakuolenmembran gelangt (Pfeil in Abb. 7 B4).

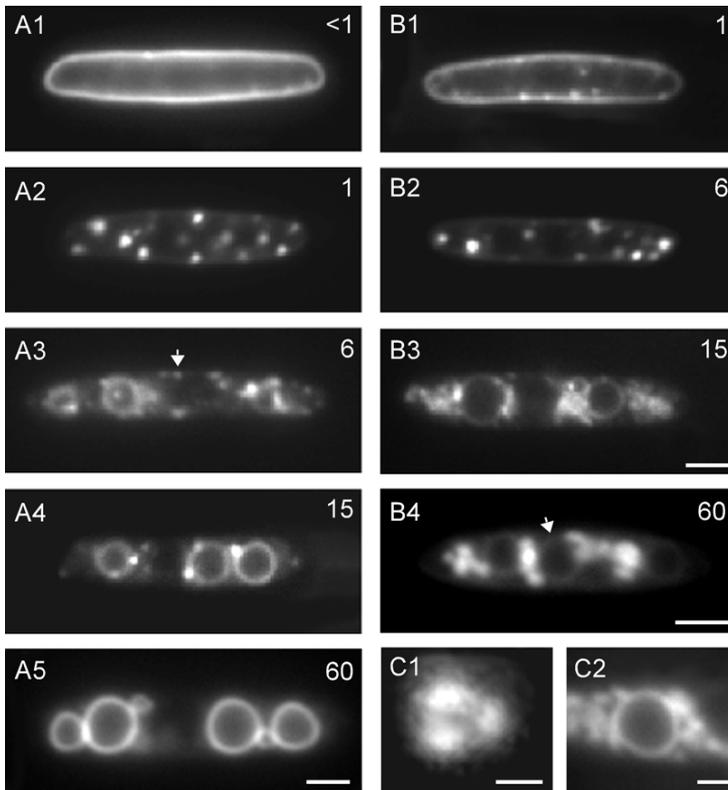


Abbildung 7: Analyse der Endozytose in haploiden *U. maydis*-Sporidien. (A) Die Endozytose in FB6a-Zellen wurde in „Puls-Chase“-Experimenten mit dem Lebendfarbstoff FM4-64 verfolgt. „Chase“-Zeiten sind in Minuten oben rechts im jeweiligen Bild angegeben. Nachdem der Farbstoff sehr schnell in die Plasmamembran inserierte (A1), wurde er in unbeweglichen, oft dreilappigen Regionen der Plasmamembran konzentriert (A2). Anschließend wurde der Farbstoff in die Zelle aufgenommen und erschien in schnell beweglichen, frühen Endosomen (Pfeil in A3). Von dort gelangte der Farbstoff zu den späten Endosomen in der Nähe der Vakuolen (A4) und schließlich in die Vakuolenmembran (A5). Der Größenbalken entspricht 3 μm . (B) Endozytose in RWS1-Zellen bei restriktiver Temperatur. Nach 2 h bei 34 $^{\circ}\text{C}$ gelangte das FM4-64 noch immer in die Plasmamembran (B1) und die dreilappigen Strukturen (B2), wenn auch verzögert. Anschließend erschien das FM4-64 in diffusen, vesikulären Akkumulationen innerhalb der Zelle (B3), in denen es selbst noch nach einer Stunde (Pfeil in B4) festgehalten wurde. Der Größenbalken entspricht 3 μm . (C) Detailaufnahmen einer typischen dreilappigen Struktur aus einer Wildtyp-Zelle (C1) und von vesikulären Akkumulationen in RWS1 bei 34 $^{\circ}\text{C}$ (nach 60 min „Chase“, C2). Die Größenbalken entsprechen 0,5 μm in C1 und 1 μm in C2.

Erste Veränderungen in der FM4-64-Endozytose konnten bereits nach 30 min Inkubation bei der restriktiven Temperatur festgestellt werden (nicht gezeigt). Nach zwei Stunden bei 34 $^{\circ}\text{C}$ war die Endozytose in fast allen Zellen unterbrochen. Diese Beobachtungen deuten auf einen schweren Endozytosedefekt in RWS1-Zellen hin.

2.2 Molekulare Grundlagen der Bewegung früher Endosomen

2.2.1 Mit Yup1-GFP markierte Endosomen werden entlang von Mikrotubuli bewegt

Mit Yup1-GFP gefärbte Vesikel wurden im Stamm RWS4 bidirektional mit einer mittleren Geschwindigkeit von $3,1 \pm 0,3 \mu\text{m/s}$ ($n=150$ Zellen; Abb. 8 C) bewegt. Um zu ermitteln, welche Zytoskelettelemente dieser schnellen Bewegung zu Grunde liegen, wurden RWS4-Zellen mit verschiedenen Inhibitoren behandelt. Benomyl ist bei einer Konzentration von $10 \mu\text{M}$ ein effizienter Inhibitor des MT-Zytoskeletts in *U. maydis* (Steinberg *et al.*, 2001). Die Behandlung von RWS4 mit Benomyl für 30 min führte zum völligen Verschwinden aller MT (nicht gezeigt) und zum Erliegen sämtlicher gerichteter Bewegung der Yup1-GFP-Vesikel (nicht gezeigt). Durch Auswaschen des Inhibitors konnte die Bewegung innerhalb weniger Minuten wiederhergestellt werden. Im Gegensatz dazu hatte die Behandlung von RWS4 mit dem Aktin-Inhibitor Cytochalasin D ($10 \mu\text{M}$; (Selden *et al.*, 1980)) oder dem Myosin-Inhibitor BDM (2,3-butanedion monoxim; 10mM ; (Steinberg und McIntosh, 1998)) keinen merklichen Einfluss auf die Endosomenbewegung (nicht gezeigt). Dieser Befund lässt darauf schließen, dass die beobachtete bidirektionale Bewegung entlang von MT abläuft. In Übereinstimmung mit dieser Hypothese kolokalisierten MT, die mittels Immunfluoreszenz gefärbt wurden (Abb. 8 A2), und Yup1-GFP-Vesikel (Abb. 8 A1; Überlagerung in Abb. 8 A3).

Um das MT-abhängige Bewegungsverhalten in lebenden Zellen analysieren zu können, wurde der Stamm RWS5 hergestellt, der sowohl Yup1-GFP als auch ein GFP- α Tubulin (GFP-Tub1)-Fusionsprotein exprimiert. In diesem Stamm konnte zusätzlich zur Endosomenbewegung auch die MT-Dynamik in lebenden Zellen beobachtet werden (siehe auch (Steinberg *et al.*, 2001)). Die gleichzeitige Betrachtung zweier GFP-Fusionsproteine war möglich, da die langgestreckten MT klar von punktförmigen Endosomen oder BSDs unterschieden werden konnten. Übereinstimmend mit den oben beschriebenen Befunden bewegten sich die Yup1-GFP-Vesikel ausschließlich entlang von MT (Abb. 8 B1-B4). Die Vesikel standen häufig in Kontakt mit BSDs an den Enden von MT (Abb. 8 D1-D9).

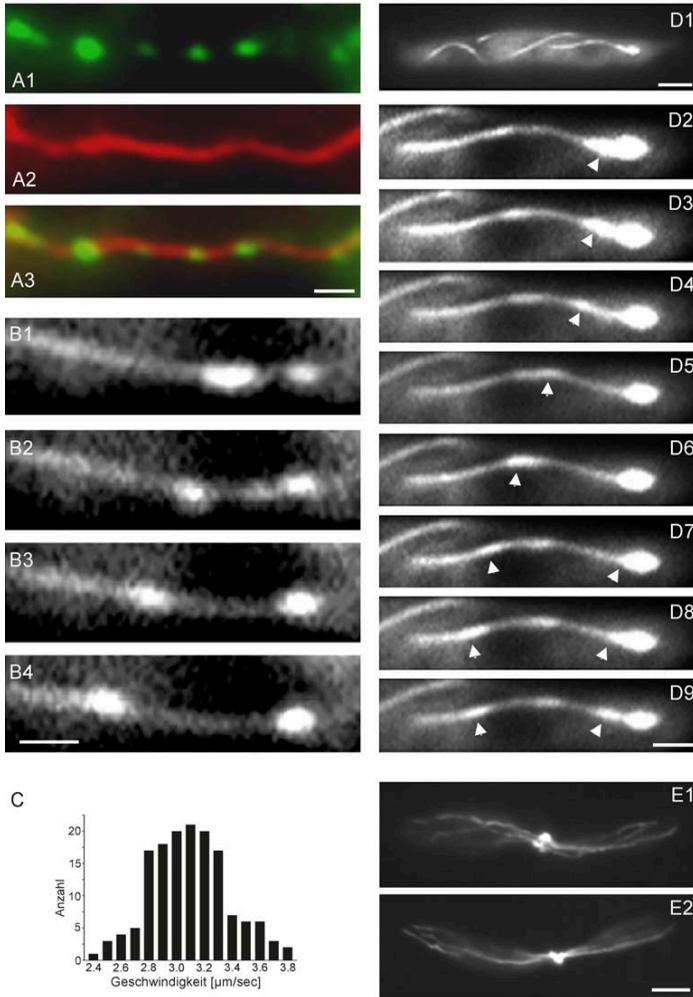


Abbildung 8: Analyse der Endosomenbewegung. (A) Kolokalisation von mit Yup1-GFP markierten Vesikeln (A1) mit MT, die durch Immunfluoreszenz sichtbar gemacht wurden (A2, Überlapp in A3). Der Größenbalken entspricht 1 μm . (B) Darstellung der Bewegung von Yup1-GFP-Vesikeln entlang eines einzelnen MT in RWS5 (enthält GFP- α Tubulin, B1-B4). Das Zeitintervall zwischen den Bildern beträgt 0,2 s. Der Größenbalken entspricht 1 μm . (C) Geschwindigkeitsverteilung von Yup1-GFP-Vesikeln in RWS4. GFP gefärbte Vesikel zeigten schnelle, bidirektionale Bewegung mit $3,1 \pm 0,3 \mu\text{m}/\text{s}$ ($n = 150$). (D) Zelle mit einem BSD am Ende eines MT in RWS5. Man beachte die einzelnen Vesikel, die aus dem BSD austreten (Pfeilspitzen in D2-D9), der am Ende eines MT nahe eines Zellpols gelegen ist (Übersichtsbild in D1). Die Größenbalken entsprechen 3 μm (D1) beziehungsweise 1 μm (D2-D9). (E) Darstellung des Mikrotubulizytoskeletts mittels Immunfluoreszenz (wurde freundlicherweise von Dr. G. Steinberg durchgeführt). Die Organisation der MT in FB6a (E1) und RWS1 (E2) 2 h nach Wechsel auf die restriktive Temperatur war nicht unterscheidbar. Der Größenbalken entspricht 3 μm .

Gelegentlich konnte beobachtet werden, wie ein ganzer BSD durch einem schrumpfenden Mikrotubulus mitgezogen wurde (nicht gezeigt). Da die Bewegung der Endosomen von MT abhing, wurde analysiert, ob eine Veränderung im MT-Zytoskelett für die beobachteten Morphologiedefekte in der RWS1-Mutante verantwortlich waren. Hierfür wurde mittels Immunfluoreszenz die Tubulin-Verteilung in RWS1 und FB6a bei permissiver und restriktiver Temperatur verglichen. Weder bei 24 °C (nicht gezeigt) noch bei 34 °C konnten Unterschiede zwischen den Stämmen festgestellt werden (Abb. 8 E1 und E2, von G. Steinberg zur Verfügung gestellt).

2.2.2 UmKin3 ist ein neuer Motor der Unc104/KIF1-Familie

Nachdem bestimmt wurde, dass die Bewegung von Endosomen entlang von MT erfolgt, stellte sich unmittelbar die Frage, welche Motorproteine daran beteiligt sind. Mitglieder der Unc104/KIF1- und der Krp85/95-Gruppe von Kinesin-ähnlichen Proteinen sowie konventionelle Kinesine sind häufig am intrazellulären Transport von Organellen beteiligt (Kim und Endow, 2000). Das konventionelle Kinesin von *U. maydis*, Kin2, wurde bereits beschrieben (Lehmler *et al.*, 1997), (Steinberg *et al.*, 1998), und es gab keine Hinweise darauf, dass es am Transport von Endosomen beteiligt ist (siehe auch 2.2.9). In einem von M. Artmeier und G. Steinberg durchgeführten PCR-Ansatz wurden weitere Kinesine identifiziert, die als Organellentransporter in Frage kamen. Dabei wurde ein 480 bp-Fragment isoliert, dessen abgeleiteter ORF Ähnlichkeit zur Unc104/KIF1-Familie zeigte. Trotz intensiver Suche gelang es nicht, ein Mitglied der Krp85/95-Gruppe zu isolieren (G. Steinberg, persönliche Mitteilung). Daher galt dieser mögliche Unc104/KIF1-Vertreter als guter Kandidat für den Endosomentransport. Mit Hilfe des isolierten PCR-Fragments wurde aus einer genomischen Cosmidbank (Bölker *et al.*, 1995a) das zugehörige Gen, *kin3*, isoliert und sequenziert.

Das *kin3*-Gen (Sequenz siehe Anhang) kodiert für ein Protein mit einem abgeleiteten Molekulargewicht von 184,5 kD. Kin3 besitzt eine N-terminale Motordomäne, die zwischen allen Kinesinen stark konserviert ist, zudem aber auch einzelne Untergruppen definiert (Kim und Endow, 2000). Ein Vergleich der vorhergesagten Aminosäuresequenz der Motordomänen verschiedener Kinesine zeigte, dass Kin3 die höchste Verwandtschaft zu Mitgliedern der Unc104/KIF1-Gruppe Kinesin-ähnlicher Proteine hat (Abb. 9 A, Identität zwischen UmKin3 und abgebildeten Mitgliedern der Unc104/KIF1-Gruppe 55,9-64,5 %, Identität zwischen UmKin3 und NKIN: 39,4 %, und UmKin2: 40,1 %).

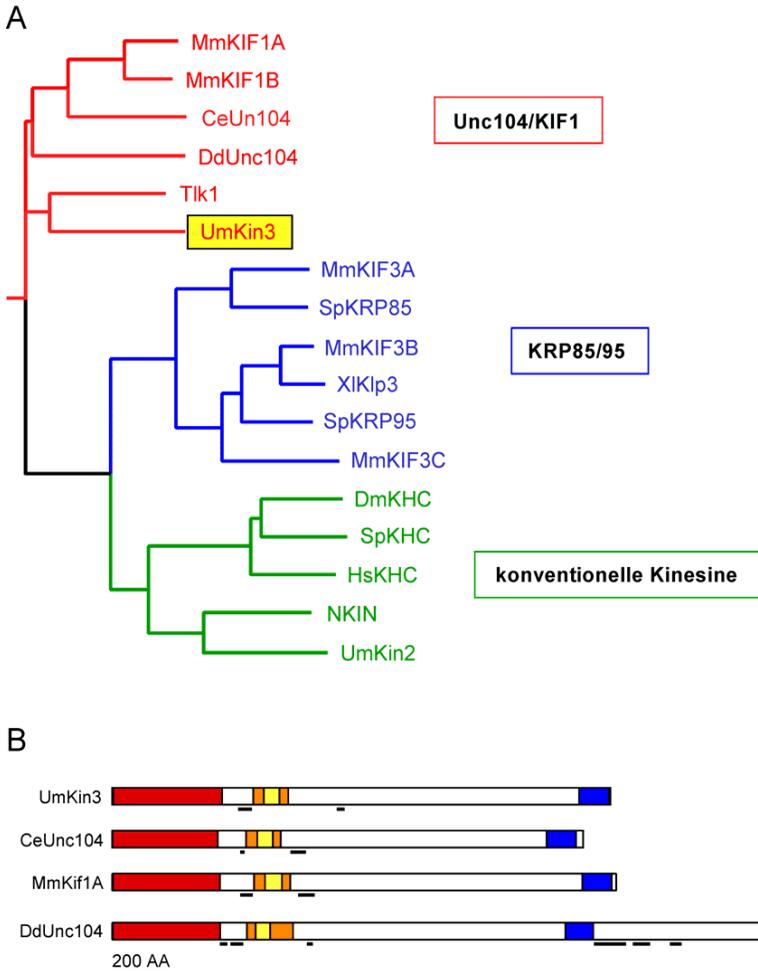


Abbildung 9: Sequenzanalyse von Kin3. **(A)** Stammbaum mit ausgewählten Vertretern der Kinesin-Superfamilie. Kinesine, die am Organellentransport beteiligt sind, gehören in erster Linie zu den konventionellen Kinesinen, der KRP85/98-Familie und zur Unc104/KIF1-Familie. In dem Stammbaum, der anhand der hoch konservierten Kinesinmotordomäne mit Clustal W (Thompson *et al.*, 1994) erstellt wurde, ist Kin3 aus *U. maydis* klar der Unc104/KIF1-Familie zugeordnet und steht dem einzigen anderen pilzlichen Vertreter dieser Gruppe, Tik1, am nächsten. Mm: *Mus musculus*, Ce: *Caenorhabditis elegans*, Dd: *Drosophila melanogaster*, Sp: *S. pombe*, Xl: *Xenopus laevis*, Hs: *Homo sapiens*, Um: *U. maydis*, NKIN ist aus *Neurospora crassa* und Tik1 stammt aus *Thermomyces lanuginosus*. **(B)** Domänenorganisation von Kin3 und nahen Verwandten. Neben der stark konservierten Motordomäne (rot) enthalten die meisten Vertreter der Unc104/KIF1-Familie noch weitere charakteristische Domänen. Eine schwach konservierte FHA-Domäne (gelb) liegt dabei innerhalb der so genannten AF6/cno-Domäne (orange). Eine PH-Domäne (blau) liegt meist am C-Terminus der Proteine. „Coiled-coil“-Regionen (schwarze Balken unter den Proteinen, mit COILS bestimmt bei einer Fensterweite von 28 AA (Lupas *et al.*, 1991)) sind bei allen Mitgliedern der Gruppe, mit Ausnahme von DdUnc104, nur kurz.

Der nächste Verwandte, Tlk1, stammt aus dem thermophilen Pilz *Thermomyces lanuginosus* (Sakowicz *et al.*, 1999). Neben dem nur partiell sequenzierten Tlk1 ist Kin3 das bislang einzige bekannte pilzliche Mitglied der Unc104/KIF1-Familie.

Die Domänenorganisation von Kin3 ist typisch für viele bislang untersuchte Mitglieder der Unc104/KIF1-Familie (Abb. 9 B). Neben der hoch konservierten N-terminalen Motordomäne (Tabelle 1; Abb. 9 B rot) besitzt Kin3 vermutlich eine „forkhead-associated“ (FHA)-Domäne (Abb. 9 B gelb, Tabelle 1), die eventuell für Phosphorylierungs-abhängige Protein-Protein-Wechselwirkungen wichtig ist (Li *et al.*, 1999), (Wang *et al.*, 2000). Die zuvor beschriebene AF6/cno- oder Unc104-Domäne (Ponting, 1995); (Pollock *et al.*, 1999) umfasst die FHA-Domäne (Abb. 9 B orange) und stellt möglicherweise nur eine besondere Form der FHA-Domäne dar (Westerholm-Parvinen *et al.*, 2000). Kin3 enthält weiterhin eine C-terminale PH-Domäne (Tabelle 1), die vermutlich für die Bindung des transportierten „Kargos“ verantwortlich ist. Kin3 enthält nach der Analyse mit TMpred (Hofmann und Stoffel, 1993) keine Transmembranregion und nur kurze Bereiche, die „coiled coils“ ausbilden könnten (AA 423-470 und AA 755-782; schwarze Balken in Abb. 9 B; nach COILS mit einer Fensterweite von 28 AA (Lupas *et al.*, 1991)).

Tabelle 1: Domänenorganisation bei Mitgliedern der Unc104/KIF1-Familie ¹

Protein		Länge	Motordomäne		FHA-Domäne		PH-Domäne	
			SMART	PFAM	SMART	PFAM	SMART	PFAM
UmKin3	AA	1679	4-369	12-390	510-562	511-579	1570-1670	1570-1668
	p		1,18e-171	3,1e-166	2,23 ⁵	5,9e-1 ⁵	1,69e-11	1,1e-13
MmKif1A ²	AA	1695	3-362	11-383	515-572	516-587	1581-1680	1581-1678
	p		1,57e-176	5,6e-187	2,77e-8	1,2e-15	1,52e-13	7,1e-20
CeUnc104 ³	AA	1584	1-355	9-376	488-540	489-555	1461-1558	1461-1558
	p		5,75e-193	1,2e-235	3,21e-4 ⁵	2,0e-2 ⁵	2,3e-17	5,9e-16
DdUnc104 ⁴	AA	2205	2-363	9-381	482-531	500-566	1524-1618	1539-1636
	p		1,23e-169	1e-184	6,7 ⁵	8,4e-7 ⁵	2,68e-14	1,8e-16

¹ Für jede Domäne ist die genaue Position (in AA) und die Irrtumswahrscheinlichkeit p angegeben, die von den SMART- (Schultz *et al.*, 2000; Schultz *et al.*, 1998) bzw. PFAM- Servern (Bateman *et al.*, 1999) ermittelt wurden.

² Kif1 A aus *M. musculus*, SWISS-PROT: P33173

³ Unc104 aus *C. elegans*, SWISS-PROT: P23678

⁴ Unc104 aus *Dictyostelium discoideum*, TrEMBL: Q9NGQ2

⁵ Irrtumswahrscheinlichkeiten für die FHA-Domänen sind niedrig, aber im Rahmen der Werte anderer FHA-Domänen. Die Kernaminosäuren der Domäne sind jeweils konserviert (Westerholm-Parvinen *et al.*, 2000)

Die im Folgenden präsentierten Daten (siehe 2.2.3-2.2.7) deuten darauf hin, dass Kin3 in der Zelle eine aktive Rolle beim Transport von Endosomen wahrnimmt. Daher wurde eine grundlegende Charakterisierung der biochemischen Eigenschaften von Kin3 vorgenommen.

Mitglieder der Unc104/KIF1-Familie können sowohl als Monomer (Okada und Hirokawa, 1999) als auch als Dimer (Pollock *et al.*, 1999) vorliegen. Um zu überprüfen, in welcher Form Kin3 in der Zelle vorliegt, wurde die Größe des nativen Proteins über Gelfiltration bestimmt. Als Ausgangsmaterial diente der Stamm RWS75, in dem für die Proteindetektion ein myc³-Tag am C-Terminus von Kin3 angebracht wurde. Zellen dieses Stammes zeigten keinerlei sichtbare Veränderungen im Vergleich zu Wildtyp-Zellen (nicht gezeigt). Dies deutete darauf hin, dass das Kin3-myc³-Protein funktionsfähig war. In der Gelfiltration (Abb. 10 A) eluierte Kin3-myc³ (193,5 kD) zwischen den Eichproteinen Katalase (247 kD, 14,0 ± 0,6 ml) und Aldolase (149 kD, 17,6 ± 0,6 ml). Dies entsprach der erwarteten Elution eines Monomers und legte nahe, dass Kin3 in der Zelle als solches vorliegt.

Für einen Beweis der Motoraktivität sollte gezeigt werden, dass Kin3 MT in einem *in vitro*-„gliding assay“ bewegen kann (siehe Steinberg und Schliwa, 1996). Dazu wurden mehrere Kin3-Fragmente in *E. coli* exprimiert. Das Gesamtprotein war weder mit C- oder N-terminalem His⁶-Tag, noch als GST-Fusionsprotein löslich (nicht gezeigt). Auch der Versuch, das Gesamtprotein in Insektenzellen zu exprimieren, war bislang nicht erfolgreich. Kürzere Fragmente mit C-terminalen His⁶-Tags waren in *E. coli* löslich und konnten in größerer Menge gereinigt werden. Das Konstrukt Kin3-U2 enthielt die Motordomäne von Kin3 samt anschließender „Neck“-Region (AA 1-431, mit His⁶-Tag: 48,1 kD). Nach der Expression in *E. coli* wurde Kin3-U2 über Nickel-Affinitätschromatografie angereichert (E in Abb. 10 B) und direkt für anschließende Experimente eingesetzt. Um die MT-abhängige ATPase-Aktivität zu messen, wurde ein gekoppelter Enzym-Assay verwendet, bei dem der ATP-Verbrauch über die Oxidation von NADH und die dadurch bedingte Absorptionsabnahme bei 340 nm gemessen werden kann (Huang und Hackney, 1994). Kin3-U2 zeigte eine deutliche MT-abhängige ATPase-Aktivität (typisches Experiment in Abb. 10 C dargestellt, in Zusammenarbeit mit G. Wöhlke). Der $K_{0,5MT}$ -Wert lag bei 190 ± 70 nM Tubulin (n=3 Messungen mit unabhängigen Extrakten). Der k_{cat} -Wert von Kin3-U2 lag bei $4,76 \pm 0,23$ ATP/Kopf/s (n=3 Messungen mit unabhängigen Extrakten).

Kin3-U2 zeigte im „gliding-assay“ keinerlei Bewegungsaktivität. Wie nach der ATPase-Messung erwartet, konnte es zwar MT an die Deckglasoberfläche binden. Diese wurden jedoch in keinem Fall bewegt (nicht gezeigt). Der endgültige Beweis für die Motoraktivität von Kin3 steht somit noch aus.

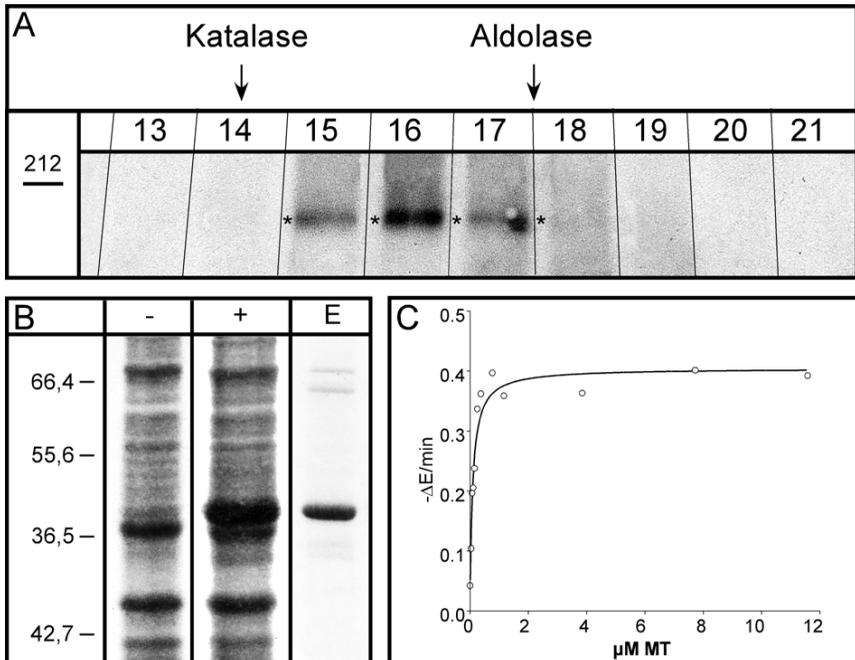


Abbildung 10: Biochemische Charakterisierung des Kin3-Proteins. (A) Western-Blot mit den Fraktionen 13-21 aus einem Gelfiltrationslauf mit Gesamtprotein aus RWS75. Kin3-myc³ wurde mit einem monoklonalen emyc-Antikörper (freundlicherweise von Dr. R. Gräf zur Verfügung gestellt) detektiert. Die detektierten Banden (Fraktionen 15-18) sind mit Sternchen markiert. Die Höhe der Markerbanden bei 212 kD ist angegeben. Die Elutionspeaks für die Eichproteine Katalase (247 kD) und Aldolase (149 kD) wurden als Mittelwert von drei Gelfiltrationsläufen angegeben (Pfeile). (B) Coomassie-gefärbtes Gel eines *E. coli*-Stammes, der Kin3-U2 exprimiert. Abgebildet sind Gesamtproteinextrakte vor Induktion (-) und nach 4h Induktion (+). Zudem ist das angereicherte Kin3-U2-Fragment nach der Elution von einer Nickel-Sepharose-Säule dargestellt (E). Kin3-U2 umfaßt AA 1-431 von Kin3 und besitzt 6 Histidine am C-Terminus, die nach der Expression in *E. coli* für die Reinigung über Nickel-Affinitätschromatografie verwendet wurden. (C) Bestimmung der Mikrotubuli-abhängigen ATPase-Aktivität von Kin3-U2 über einen gekoppelten enzymatischen Test (Huang und Hackney, 1994). Es wird die Abnahme der Extinktion ($-\Delta E/\text{min}$) in Abhängigkeit von der MT-Konzentration ($\mu\text{M MT}$) angegeben. Kin3-U2 hat einen k_{cat} von 4,32 ATP/Kopf/s). Die Stimulation durch MT erfolgte mit einem $K_{0,5\text{MT}}$ von 75 nM.

2.2.3 Kin3 lokalisiert auf frühen Endosomen und bewegt entlang von MT

Wenn Kin3 am Transport von Endosomen beteiligt ist, sollte es auch auf Endosomen lokalisieren. Um dies zu prüfen, wurde GFP C-terminal an Kin3 fusioniert. Das Fusionskonstrukt wurde sowohl unter der Kontrolle des nativen *kin3*-Promotors als auch des konstitutiven *otef*-Promotors in einem *kin3*-Deletionsstamm exprimiert (RWS82 bzw. RWS84). Die Deletion

von *kin3* führt zu einem markanten Phänotyp (siehe 2.2.4). Die Expression beider Fusionskonstrukte führte zu einer vollständigen Wiederherstellung der Wildtyp-Morphologie (nicht gezeigt). Dies deutete darauf hin, dass das GFP-Fusionsprotein funktionell ist und das native Protein ersetzen kann.

Für die Lokalisationsstudien wurde das Fusionskonstrukt in Wildtyp-Zellen exprimiert. In RWS16-Zellen, in denen Kin3-GFP unter dem *kin3*-Promotor exprimiert wurde, lokalisierte das Fusionsprotein in kleinen Flecken, die schnelle, bidirektionale und saltatorische Bewegung entlang peripherer Bahnen zeigten (Pfeilspitzen in Abb. 11 B). Unter dem nativen Promotor war die Expression jedoch so schwach, dass die Dynamik einzelner Flecken nur selten zu verfolgen war. Daher wurde für eine eingehendere Bewegungsanalyse der Stamm RWS28 verwendet, in dem das Kin3-GFP-Fusionsprotein ausgehend von dem stärkeren *otef*-Promotor exprimiert wird. Die Kin3-GFP-Flecken bewegten sich wie in RWS16 bidirektional und saltatorisch (nicht gezeigt). Die Bewegung war mit $2,87 \pm 0,19 \mu\text{m/s}$ (n=20 Vesikel aus 3 Experimenten; Abb. 18 B) etwa so schnell wie die der Yup1-GFP-markierten frühen Endosomen in RWS4 (mit CCD Kamera: $2,91 \pm 0,30 \mu\text{m/s}$, n=30; t-Test: nicht signifikant unterschiedlich, p=0,5667).

Zudem lokalisierte Kin3-GFP auf hellen Akkumulationen, die, ähnlich den beschriebenen BSDs, mit den beweglichen Kin3-GFP-Flecken in Verbindung standen (Abb. 11 B). Die Überexpression von Kin3-GFP durch den *otef*-Promotor erleichterte zwar die Beobachtung beweglicher Flecken, führte aber zu leicht vergrößerten Akkumulationen (siehe auch Kapitel 2.2.6). Daher wurde die Verteilung der Akkumulationen in RWS16 untersucht. Abhängig vom Zellzyklusstadium waren die Akkumulationen in nicht knospenden Sporidien an einem Pol (Abb. 11 A1), in kleinen Knospen (Abb. 11 A2) gegenüber der wachsenden Knospe in der Mutterzelle (Abb. 11 A3) und während der Zelltrennung am Septum (Abb. 11 A4) zu finden. In dikaryotischen Hyphen aus einer FB1xRWS16-Kreuzung trat eine Akkumulation im Apex auf (Abb. 11 A5).

Um sicher zu stellen, dass Kin3-GFP entlang von MT bewegt, wurden im Stamm RWS155 Kin3-YFP (grün in Abb. 11 C1-3) und CFP-Tub1 (rot in Abb. 11 C1-3; Tub1 ist das α -Tubulin von *U. maydis* (Steinberg *et al.*, 2001)) co-exprimiert. Diese beiden GFP-Varianten eignen sich besonders für Kolokalisationsstudien in lebenden Zellen (Miller *et al.*, 1999). Die mit Kin3-YFP gefärbten kleinen Flecken (Abb. 11 C3) und Akkumulationen (Abb. 11 C2) bewegten sich entlang der mit CFP gefärbten MT (Übersicht in Abb. 11 C1). Dies wurde auch durch Darstellung der MT in RWS16 mittels Immunfluoreszenz (nicht gezeigt) sowie durch Inhibitorexperimente mit dem MT-Inhibitor Benomyl (nicht gezeigt) bestätigt.

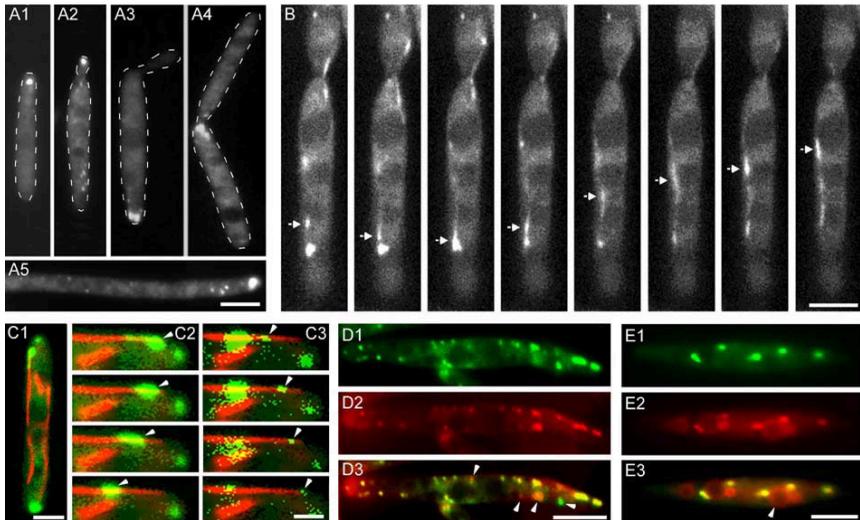


Abbildung 11: Lokalisation von Kin3-GFP in RWS16. (A) Das Kin3-GFP-Fusionsprotein unter der Kontrolle des nativen Promotors lokalisierte in RWS16 auf einzelnen Vesikeln (Pfeilspitzen), die an Regionen polaren Wachstums akkumulierten. Die Akkumulationen traten typischerweise an einem Pol von nicht knospenden Sporidien (A1), in kleinen Knospen von Zellen (A2), gegenüber der wachsenden Knospe in der Mutterzelle (A3) und während der Zelltrennung am Septum (A4) auf. In dikaryotischen Hyphen war häufig eine Akkumulation im Apex zu finden (A5). Der Größenbalken entspricht 3 μm . (B) Bidirektionale Bewegung eines kleinen mit Kin3-GFP markierten Flecks (Pfeilköpfe) in einer RWS28-Zelle. Das Kin3-GFP-Fusionsprotein wurde in diesem Stamm unter dem *otef*-Promotor exprimiert. Das Zeitintervall zwischen den Bildern beträgt 500 ms. Der Größenbalken entspricht 3 μm . (C) Kolokalisation von Kin3-YFP mit CFP-Tub1. Es wurde zunächst ein einzelnes Bild der MT mit dem CFP-Filtersatz aufgenommen (rot), und anschließend eine Bildsequenz der Kin3-gefärbten Vesikel und Akkumulationen (grün) mit dem YFP-Filtersatz. Dadurch konnte die Bewegung einzelner Kin3-YFP-gefärbter Vesikel (C3) und von Akkumulationen (C2) entlang von MT gezeigt werden (Übersicht in C1). Der Zeitabstand zwischen den Bildern beträgt 700 ms. Die Größenbalken entsprechen 2 μm in C1 und 1 μm in C2,3. (D) Kolokalisation von Kin3-GFP (grün, D1) und FM4-64 (rot, D2). Überlapp in D3. Der Größenbalken entspricht 3 μm . (E) Kolokalisation von Kin3-YFP (grün, E1) und Yup1-CFP (rot, E2). Überlapp in E3. Der Größenbalken entspricht 3 μm .

Die polare Verteilung und das dynamische Verhalten der mit Kin3-GFP gefärbten beweglichen Flecken und Akkumulationen legte nahe, dass es sich bei ihnen um frühe Endosomen handelte. Um zu überprüfen, ob Kin3 wirklich auf Endosomen lokalisiert, wurde Kin3-GFP (grün, Abb. 11 D1) mit dem Endozytosefarbstoff FM4-64 (rot, Abb. 11 D2) kolokalisiert. Eine „Pulse chase“-Färbung von frühen Endosomen in RWS16 zeigte eine Kolokalisierung des Farbstoffs mit Kin3-GFP (Überlagerung in Abb. 11 D3). Allerdings trugen einige FM4-64-Flecken kein Kin3-GFP (Abb. 11 D2 und 3; Pfeilköpfe). Dies deutete

darauf hin, dass Kin3-GFP nur auf einer Subfraktion von Endosomen lokalisierte. Für einen direkten Vergleich der Lokalisation von Yup1 und Kin3 wurde ein Stamm hergestellt, der Yup1-CFP- und Kin3-YFP-Fusionsproteine exprimiert (RWS128). In RWS128 konnte eine Kolokalisation von Kin3-YFP (grün, Abb. 11 E1) und Yup1-CFP (rot, Abb. 11 E2) in frühen Endosomen gezeigt werden (Überlagerung in Abb. 11 E3), wobei Yup1-CFP im Gegensatz zu Kin3-YFP auch in den Vakuolenmembranen zu finden war (Pfeilspitze in Abb. 11 E3). Da sowohl Kin3-YFP als auch Yup1-CFP trotz Expression unter dem *otef*-Promotor nur eine schwache Fluoreszenz zeigten, und die notwendige Fixierung der Zellen die Signale weiter abschwächte, ist es möglich, dass Signale von einzelnen frühen Endosomen nicht detektierbar waren. Möglicherweise sind deshalb nur wenige deutliche Flecken zu erkennen, die allerdings beide Fusionsproteine tragen (Abb. 11 E).

Zusammenfassend deutet die Kolokalisation von Kin3-GFP mit FM4-64 und Kin3-YFP mit Yup1-CFP darauf hin, dass Kin3 auf frühen Endosomen lokalisiert und diese entlang von MT durch die Zelle bewegt.

2.2.4 *kin3*-Deletionsmutanten weisen Defekte in der Zelltrennung und im Knospungsmuster auf

Die Lokalisation von Kin3-GFP auf Endosomen war noch kein Beleg dafür, dass Kin3 wirklich am Transport dieser Organellen beteiligt ist. Um eine aktive Rolle von Kin3 bei der Bewegung früher Endosomen zu zeigen, wurde das *kin3*-Gen deletiert (siehe Material und Methoden).

Der Deletionsstamm (RWS59) zeigte einen charakteristischen Phänotyp. Die haploiden Sporidien behielten ihre längliche Wildtyp-Form bei (Abb. 12 B). Nach der Zellteilung wurden die Sporidien allerdings nicht mehr voneinander getrennt, was zu großen baumförmigen Zellaggregaten führte (Abb. 12 B). Lediglich $4,9 \pm 1,4$ % ($n=3$ Experimente zu >100 Zellen) der Zellen lagen nicht in Aggregaten von drei oder mehr Zellen vor. Sie wurden vermutlich durch Scherkräfte von bestehenden „Bäumen“ abgetrennt. Die „Bäume“ bildeten in Flüssigkultur charakteristische Ringe (Abb. 12 A). Färbungen mit WGA oder Calcofluor zeigten keine auffälligen Veränderungen im Zellwandaufbau von Δ Kin3-Zellen (nicht gezeigt). Die Zellen einzelner „Bäume“ konnten durch Ultraschall-Behandlung mechanisch voneinander getrennt werden. Dabei blieben die einzelnen Zellen intakt, was darauf hindeutete, dass die Trennung der Protoplasten nicht beeinträchtigt war, und lediglich die Zellwand zwischen den Sporidien nicht vollständig abgebaut worden war (nicht gezeigt). Folgerichtig führte die Behandlung von *U. maydis*-Wildtyp-Zellen mit dem Chitinase-

Inhibitor Allosamidin (Spindler und Spindler-Barth, 1999) zu einem vergleichbaren Phänotyp (Abb. 12 C).

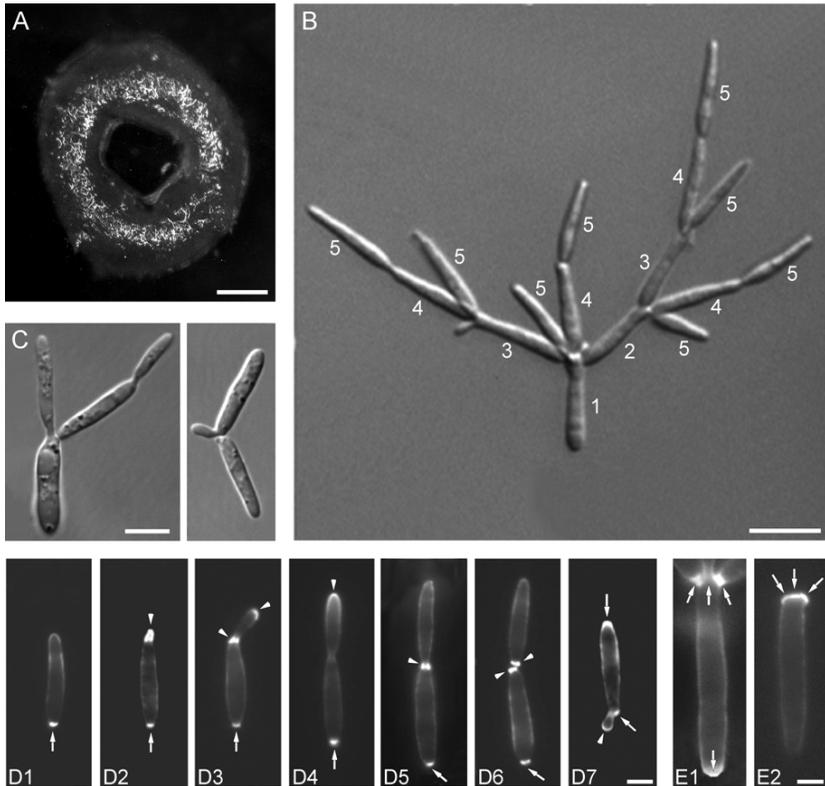


Abbildung 12: Morphologische Defekte durch *kin3*-Deletion. (A) Koloniemorphologie von RWS59. Der Größenbalken entspricht 400 μm . (B) Morphologie von RWS59-Zellen. Der Zelltrennungsdefekt führte zu Baum-ähnlichen Strukturen. Die Reihenfolge der entstandenen Verzweigungen ist mit 1-5 angezeigt. Der Größenbalken entspricht 10 μm . (C) Behandlung von Wildtyp-Zellen (FB2) mit 250 $\mu\text{g/ml}$ Allosamidin führte ebenfalls zu einer spezifischen Störung der Zelltrennung. Der Größenbalken entspricht 5 μm . (D) Chitinverteilung und Knospungsmuster in FB2-Zellen (D1-D7). Chitin wurde mit Rhodamin-gekoppeltem WGA gefärbt. In FB2-Zellen wurde die neue Knospe fast immer gegenüber der letzten Knospennarbe (Pfeile) gebildet. Chitin war zunächst in der neu gebildeten Knospe konzentriert (D2, Pfeilspitze). Mit der wachsenden Knospe ging die WGA-Färbung zunehmend vom Knospenhals zur Knospenspitze über (D3, D4). Während der Zellteilung färbte WGA die Septen im Knospenhals (Pfeilspitzen in D5, D6). Nachfolgende Knospen wurden überwiegend alternierend angelegt (D7, Pfeile). Die Abbildung wurde freundlicherweise von Dr. G. Steinberg zur Verfügung gestellt. Der Größenbalken entspricht 3 μm . Pfeile markieren in (D) und (E) Knospennarben; Pfeilspitzen markieren Wuchsregionen. (E) Knospungsmuster in RWS59-Zellen. Aufeinander folgende Knospen wurden meist von einem einzelnen Pol aus gebildet (E1, E2). Nach dem Sonifizieren der Zellen wurden einzelne Knospennarben sichtbar (E2, Pfeile). In intakten „Bäumen“ der RWS59-Zellen waren an Verzweigungspunkten Chitiringe zu erkennen, die das monopolare Teilungsmuster verdeutlichten (E1, Pfeile). Der Größenbalken entspricht 2 μm .

Ein weiterer Defekt des *kin3*-Deletionsstammes trat bei Betrachtung des Verzweigungsmusters in den baumförmigen Aggregaten zu Tage. Zellen des Wildtypstammes FB2 zeichnen sich durch ein überwiegend alternierendes Knospungsmuster aus ($95,7 \pm 2,1$ %, $n = 3$ Experimente zu je > 100 Zellen), was durch WGA-Färbung der Knospennarben deutlich gemacht werden kann (Abb. 12 D1-7, die Abbildung wurde freundlicherweise von Dr. G. Steinberg zur Verfügung gestellt). Außer in der Knospennarbe (Pfeile in Abb. 12 D und E) war WGA zunächst in der neu gebildeten Knospe konzentriert (Pfeilspitze in Abb. 12 D2). Mit der wachsenden Knospe ging die WGA-Färbung zunehmend vom Knospenhals zur Knospenspitze über (Pfeilspitzen in Abb. 12 D3 und 4). Während der Zellteilung färbte WGA beide Septen im Knospenhals (Pfeilspitzen in Abb. 12 D5 und 6). Die nachfolgenden Knospen wurden am gegenüber liegenden Zellpol angelegt (Abb. 12 D7). Die RWS59-Zellen hingegen zeigten ein überwiegend monopolarer Knospungsmuster ($83,4 \pm 0,8$ %, $n = 3$ Experimente zu je > 100 Zellen; gezählt wurden einzelne Verzweigungen innerhalb eines „Baumes“). Dabei wurden aufeinander folgende Knospen vom selben Pol aus gebildet (Abb. 12 E1 und 2). Dies wurde sowohl an den deutlichen Chitinringen der Verzweigungspunkte intakter „Bäume“ (Pfeile in Abb. 12 E1) als auch an den Knospennarben sonifizierter Zellen (Pfeile in Abb. 12 E2) deutlich. Dieses monopolare Knospungsmuster erklärt die charakteristische „Baumstruktur“ des RWS59-Stammes (Abb. 12 B, Reihenfolge der Knospenbildung ist mit 1-5 angegeben).

2.2.5 In *kin3*-Deletionsstämmen ist die Endosomenorganisation beeinträchtigt

Um den Effekt der *kin3*-Deletion auf die Organisation von Endosomen zu analysieren, wurde Yup1-GFP unter dem *otef*-Promotor im *kin3*-Deletionsstamm RWS59 exprimiert.

In diesem Stamm (RWS80) wurde zunächst das Verhalten einzelner Endosomen beobachtet. Dabei war zum einen die Zahl der freien Endosomen pro Fläche stark reduziert (RWS4-Zellen: $0,41 \pm 0,08$ Vesikel/ μm^2 , $n=15$; RWS80-Zellen: $0,18 \pm 0,05$ Vesikel/ μm^2 , $n=15$; Abb. 18 A, gelbe Balken). Zum anderen bewegten sich die verbliebenen freien Endosomen nur selten (RWS4-Zellen: $88,6 \pm 6,1$ % bewegt, $n=15$; RWS80-Zellen: $32,9 \pm 11,5$ % bewegt, $n=15$ Zellen; Abb. 18 A, rote Balken). Die Anzahl der bewegten Vesikel verringerte sich damit gegenüber der in RWS4 auf ein Sechstel von $0,36$ auf $0,06$ bewegte Vesikel/ μm^2 (Abb. 18 A, schwarze Balken). Die Restbewegung war teilweise noch bidirektional, aber nur etwa halb so schnell wie im Wildtyp (Wildtyp-Zellen: $2,91 \pm 0,30$ $\mu\text{m/s}$, $n=30$; RWS80-Zellen: $1,38 \pm 0,33$ $\mu\text{m/s}$, $n=20$; Abb. 18 B). Diese Defekte wie auch der morphologische Phänotyp der *kin3*-Deletion (siehe Abb. 11 B) konnten durch ektopische Expression von *kin3* unter dem nativen Promotor (RWS97) vollständig revertiert werden (Abb. 18 A und B).

Die reduzierte Bewegung einzelner Endosomen wurde von einer deutlich veränderten Organisation der BSDs begleitet. Statt der polaren Vesikelakkumulationen, die man im Wildtyp beobachtet, zeichneten sich fast alle RWS80-Zellen ($98,7 \pm 0,94 \%$, $n = 3$ Experimente mit je >100 Zellen) durch einen einzelnen apolaren BSD aus. Dabei war die Verteilung dieser BSDs nicht zufällig. So lagen sie meist in der Mitte von nicht knospenden Zellen (Abb. 13 A1; Abstand des BSDs zur Zellspitze/Zelllänge = $0,49 \pm 0,05$; $n=10$ Zellen aus 3 Experimenten). Bei Zellen mit kleinen Knospen befanden sie sich zwischen der Zellmitte und dem Knospenhals (Abb. 13 A2, Abstand des BSDs zum Knospenhals/Zelllänge = $0,33 \pm 0,13$; $n=10$ Zellen aus 3 Experimenten). Zellen mit mittelgroßen Knospen besaßen immer eine Akkumulation im Knospenhals (Abb. 13 A3; $n=12$ Zellen aus 3 Experimenten). Bei Zellen mit großen Knospen waren die Vesikelakkumulationen in der Mitte der Knospen zu finden (Abb. 13 A4, Abstand des BSDs zum Knospenhals/Knospenlänge = $0,52 \pm 0,05$; $n=10$ Zellen aus 3 Experimenten). Die Vesikelakkumulationen zeigten häufig langsame, amöboide Bewegung über kurze Distanzen (nicht gezeigt). Gelegentlich konnte auch beobachtet werden, wie ein ganzer BSD mit hoher Geschwindigkeit über eine größere Strecke bewegt wurde ($1,53 \pm 0,08 \mu\text{m/s}$, $n=10$ BSDs aus 3 Experimenten).

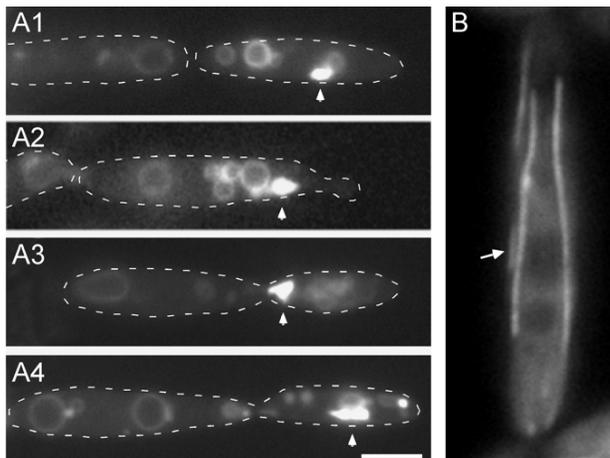


Abbildung 13: Endosomenorganisation im *kin3*-Deletionsstamm. (A) Störung der Endosomenorganisation nach *kin3*-Deletion. RWS80-Zellen ohne Knospe (A1) hatten eine Akkumulation von Yup1-GFP-gefärbten Endosomen in der Mitte der Mutterzelle. Bei Zellen mit kleinen Knospen wanderten diese Akkumulationen in Richtung des Knospenhals (A2), wo sie stets bei Zellen mit mittelgroßen Knospen zu finden waren (A3). Bei Zellen mit großen Knospen, die vor der Teilung standen, war die Akkumulation wiederum in der Mitte der Tochterzelle zu finden (A4). BSDs sind durch Pfeilspitzen markiert. Der Größenbalken entspricht 3 µm. (B) MT-Organisation in RWS109. Der Pfeil zeigt einen verkürzten MT. Der Größenbalken entspricht 3 µm.

Diese gestörte Endosomenverteilung könnte durch eine veränderte Organisation des MT-Zytoskeletts bedingt sein. Um dies zu untersuchen, wurde GFP-Tub1 im *kin3*-Deletionsstamm RWS59 exprimiert. In diesem Stamm (RWS109) ähnelte die MT-Organisation der des Vergleichsstammes FB2*otef*GFP_{Tub1} (Steinberg *et al.*, 2001). In mehreren Fällen wurden allerdings leicht verkürzte MT beobachtet (Pfeil in Abb. 13 B).

Insgesamt deutete die signifikant verringerte Bewegung von frühen Endosomen in RWS80 darauf hin, dass Kin3 der Hauptmotor für die Bewegung dieser Organellen ist. Die in diesem Stamm detektierte Restbewegung ist vermutlich auf weitere molekulare Motoren zurückzuführen.

2.2.6 Die Überexpression von *kin3* verändert die Endosomenorganisation

In *kin3*-Deletionsmutanten war eine klare Restbewegung von Endosomen zu beobachten. Dies deutete auf eine Beteiligung mehrerer Motoren am Endosomentransport hin. Um die zentrale Rolle von Kin3 am Endosomentransport weiter abzusichern, wurde untersucht, ob die Überexpression von *kin3* ebenfalls zu einer veränderten Organisation der Endosomen führt. Hierfür wurde der Stamm RWS85 hergestellt, in dem Kin3 unter der Kontrolle des regulierbaren *crg*-Promotors (Bottin *et al.*, 1996) steht, und in den zudem das Yup1-GFP-Fusionskonstrukt unter der Kontrolle des *otef*-Promotors eingebracht wurde. In Glukosehaltigen Medien ist der *crg*-Promotor abgeschaltet (Abb. 14 B), und die RWS85-Zellen zeigten wie nach *kin3*-Deletion eine gestörte Zelltrennung, die zur Ausbildung von baumartigen, verzweigten Zellaggregaten führte (nicht gezeigt). In Arabinosehaltigen Medien kam es zu einer starken Überexpression von *kin3* (Northern Blot in Abb. 14 B), das in Wildtyp-Zellen nur schwach exprimiert wurde (Abb. 14 B). RWS85-Zellen waren etwas länger als Wildtyp-Zellen (FB2: $17,40 \pm 2,65 \mu\text{m}$, n=23 Zellen aus 3 Experimenten; RWS85: $19,72 \pm 2,56 \mu\text{m}$, n=25 Zellen aus 3 Experimenten; t-Test: signifikant unterschiedlich, $p=0.0035$), zeigten aber keine weiteren morphologischen Veränderungen (Abb. 14 A).

Der Effekt auf die Organisation der Endosomen war hingegen sehr deutlich. Sämtliche BSDs blieben polar, waren aber deutlich größer als in RWS4-Zellen (Abb. 14 A1-4; Durchmesser der Flecken in RWS4: $0,94 \pm 0,14 \mu\text{m}$, n=15 Zellen aus 2 Experimenten; in RWS85: $1,34 \pm 0,15 \mu\text{m}$, n=20 Zellen aus 3 Experimenten; t-Test: signifikant unterschiedlich $p<0,0001$). Entsprechend der verstärkten Akkumulation von Vesikeln in den BSDs war die Zahl freier Vesikel verringert ($0,33 \pm 0,04 \text{ Vesikel}/\mu\text{m}^2$, n=15; Abb. 18 A gelber Balken), wengleich sich diese ähnlich häufig bewegten wie in Wildtyp-Zellen ($88,3 \pm 9,1 \%$, n=15; Abb. 18 A rote Balken; t-Test: zu Wildtyp-Wert nicht signifikant unterschiedlich, $p=0,9126$).

Die Geschwindigkeit der Vesikel war ebenfalls vergleichbar zum Wildtyp ($2,88 \pm 0,23 \mu\text{m/s}$, $n=20$; Abb. 18 B; zu RWS4-Wert nicht signifikant unterschiedlich, $p=0,6915$).

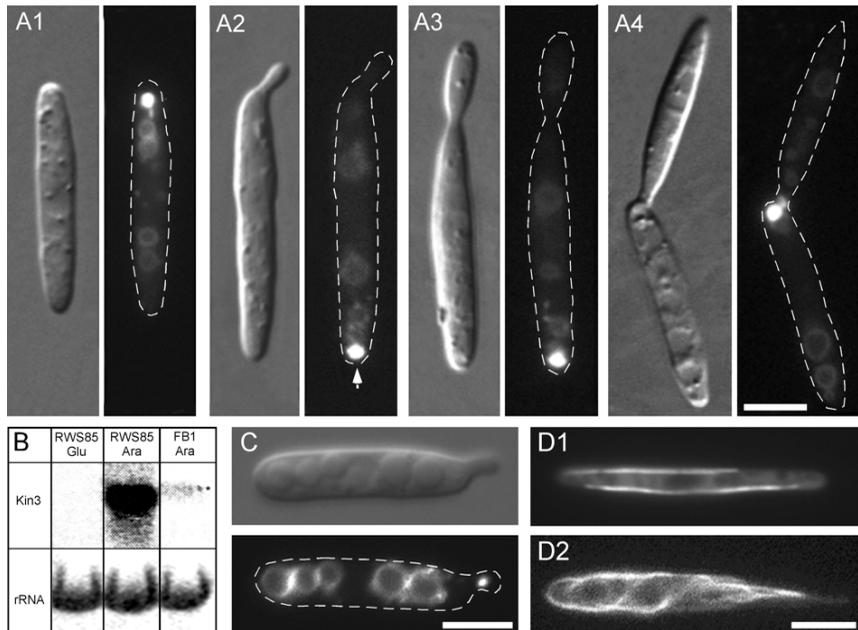


Abbildung 14: Überexpression von *kin3*. (A) Lokalisation der BSDs in RWS85. In Zellen ohne Knospen (A1), mittelgroßen Knospen (A3) und Zellen in der Teilung (A4) waren die BSDs wie im Wildtyp lokalisiert, aber wesentlich größer. In Zellen mit kleinen Knospen (A2) lagen die BSDs gegenüber der Knospe (Pfeilkopf). Dies steht im Gegensatz zu Wildtyp-Zellen (C), die einen BSD in der kleinen Knospe enthalten. (B) Northern Blot von *Kin3*-RNA im Wildtyp (FB1) und in RWS85 unter induzierenden (Ara) oder reprimierenden (Glu) Bedingungen. Als Kontrolle für die RNA-Menge wurde eine rRNA-Bande abgebildet, die nach dem Transfer der RNA mit Methyleneblau gefärbt wurde. (C) BSD-Position in einer RWS4-Zelle mit kleiner Knospe. (D) Organisation der MT nach Überexpression von *kin3* (D2). GFP-Tub1 wurde in TM2 (*a2b2* rKin3) unter dem *otef*-Promotor exprimiert (RWS110). Die MT waren gegenüber dem Vergleichsstamm (D1, FB2otefGFP-Tub1, I. Schulz, persönliche Mitteilung) verlängert und stark verbogen. Die Größenbalken entsprechen jeweils 3 μm .

Die Überexpression von *kin3* führte auch zu einer veränderten Verteilung der BSDs. So besaßen $96,5 \pm 0,36 \%$ der Zellen ohne Knospen einen BSD an einem der beiden Pole (Abb. 14 A1, $n=3$ Experimente zu >100 Zellen), während im Vergleichsstamm RWS4 lediglich $56,0 \pm 8,3 \%$ der Zellen ohne Knospen einen polaren BSD enthielten ($n=3$ Experimente zu >100 Zellen). Der deutlichste Unterschied trat in Zellen mit kleinen Knospen auf. Dort lagen die BSDs nicht wie in RWS4 in der Knospe (Abb. 14 C; $95,8 \pm 8,6 \%$ der BSDs in der Knospe, $n=3$ Experimente zu >40 Zellen), sondern zu $96,9 \pm 2,5 \%$ ($n=3$ Experimente zu

>40 Zellen) auf der Knospen-abgewandte Seite der Mutterzelle (Abb. 14 A2 und Tabelle 2). In diesem Zellzyklus-Stadium liegen dort bei Wildtyp-Zellen vorwiegend die plus-Enden der MT (Steinberg *et al.*, 2001). Im Stamm RWS110 stand Kin3 unter der Kontrolle des *crg*-Promotors, und es wurde zudem das GFP-Tub1-Fusionskonstrukt unter der Kontrolle des *otef*-Promotors eingebracht. Dadurch konnte die Organisation der MT bei Überexpression von *kin3* überprüft werden. Während FB2otefGFPTub1-Zellen mehrere gerade MT oder MT-Bündel enthielten (Abb. 14 D1 und (Steinberg *et al.*, 2001)), waren in RWS110-Zellen die MT verlängert und oft stark verbogen (Abb. 14 D2). An der Knospen-abgewandten Seite von Zellen mit kleinen Knospen lagen allerdings immer noch vorwiegend die plus-Enden der MT (nicht gezeigt).

Besonders die Umverteilung von frühen Endosomen an die „+“-Enden der MT nach *kin3*-Überexpression unterstützt die These, dass Kin3 eine aktive Transportfunktion für diese Organellenklasse ausübt.

2.2.7 Kin3 ist für polares Wachstum von Hyphen wichtig

Um die Funktion von Kin3 in der Hyphe zu analysieren, wurde RWS59 mit dem kompatiblen *kin3*-Deletionsstamm RWS76 (*alb1*) gemischt und auf Aktivkohle-haltige Platten getropft.

Bei der Kreuzung von kompatiblen Wildtyp-Stämmen kommt es zur Ausbildung von Konjugationsschläuchen an den Zellpolen der Sporidien (Abb. 15 A1, 12 h nach der Kreuzung). Anstatt Konjugationsschläuche zu bilden, waren nach der Kreuzung der Mutanten die Zellen lediglich verbogen und etwas verlängert (Pfeilspitzen in Abb. 15 A2).

Konjugationshyphen können miteinander oder mit den Zellkörpern kompatibler Sporidien verschmelzen und dikaryotische Hyphen ausbilden (Snetselaar *et al.*, 1996). Die *kin3*-Deletionsstämme konnten zwar mit kompatiblen Wildtyp-Stämmen Filamente bilden (nicht gezeigt), nicht jedoch bei der Kreuzung untereinander. Dies war vermutlich auf das Fehlen von Konjugationsschläuchen zurückzuführen. Die Hyphenbildung nach Fusion haploider Sporidien wird anders als die Ausbildung von Konjugationsschläuchen durch die *a*- und *b*-Paarungstyp-Gene reguliert (Bannuett und Herskowitz, 1989). Um die Rolle von Kin3 in diesem so genannten *b*-abhängigen Filament zu ermitteln, ohne auf die Bildung von Konjugationsschläuchen angewiesen zu sein, wurde der Stamm RWS160 konstruiert. RWS160 ist ein $\Delta kin3$ -Derivat von AB33, in dem *bW2* und *bE1* unter der Kontrolle des Nitrat-regulierten *nar1*-Promotors stehen (A. Brachmann, persönliche Mitteilung). Nach Induktion der *b*-Gene bildeten AB33-Zellen in Flüssigkultur monopolare Filamente aus, die nach 15 h im Mittel $98,9 \pm 9,1 \mu\text{m}$ ($n = 20$) lang waren (Abb. 15 B1). Diese Filamente

hinterließen in $97,3 \pm 4,2$ % der Fälle ($n=3$ Experimente zu >20 Hyphen) die für dikaryotische Hyphen charakteristischen leeren Abschnitte (Lehmler *et al.*, 1997).

In RWS160 wurden ebenfalls Filamente gebildet, die nach 15 h jedoch wesentlich kürzer als AB33-Hyphen waren ($40,3 \pm 12,3$ μm , $n=29$). Diese Filamente wuchsen zudem nicht völlig gerade (Abb. 15 B3). $52,1 \pm 2,1$ % ($n=3$ Experimente zu >27 Zellen) der Zellen zeigten darüber hinaus ein bipolares Erscheinungsbild mit zwei unterschiedlich langen Ausläufern an den Polen (Abb. 15 B3). Nach 16 h konnte keine Verlängerung der RWS160-Hyphen mehr festgestellt werden (nicht gezeigt). Zu diesem Zeitpunkt hatten lediglich $58,2 \pm 3,7$ % ($n=3$ Experimente zu >20 Hyphen) der Ausläufer leere Abschnitte gebildet. Diese leeren Abschnitte befanden sich meist an den Spitzen der kürzeren Ausläufer (nicht gezeigt). Zur genaueren Analyse der Zellwand von AB33- und RWS160-Hyphen wurden Färbungen mit WGA und Calcofluor vorgenommen (Abb. 15 C). Sowohl das Chitin-spezifische WGA (rot) als auch Calcofluor (blau) waren an der Spitze von AB33-Hyphen konzentriert (Abb. 15 C2 und 3). Die polare Verteilung von WGA blieb in RWS160-Ausläufern erhalten (Abb. 15 C6). Calcofluor war ebenfalls in den Hyphenspitzen konzentriert (Pfeilspitzen in Abb. 15 C5), färbte aber im Gegensatz zu WGA in RWS160 auch die Seitenwände der zentralen Zellkörper (Abb. 15 C5).

Nach Färbung von Hyphen des Stammes AB33 mit dem Endozytosefarbstoff FM4-64 war wie in dikaryotischen Wildtyp-Hyphen (siehe Abb. 5 B und C) eine große Zahl dynamischer Endosomen zu sehen, die sich über die gesamte Hyphenlänge bewegten und häufig im Apex akkumulierten (Abb. 15 B2, siehe auch Abb. 5 B-F). In Zellen des *kin3*-Deletionsstammes RWS160 hingegen akkumulierten fast alle Endosomen in den Zellkörpern (Abb. 15 B4). Nur vereinzelt gelangten Endosomen in die kurzen hyphenähnlichen Ausläufer (Pfeilspitzen in Abb. 15 B4). Die Endosomenbewegung war erwartungsgemäß stark reduziert; Restbewegung war aber auch hier zu beobachten (nicht gezeigt). Diese Befunde deuten auf einen direkten Zusammenhang zwischen der Endosomenfehlverteilung und dem Auftreten von aberranten, verkürzten Hyphen in Abwesenheit von Kin3 hin.

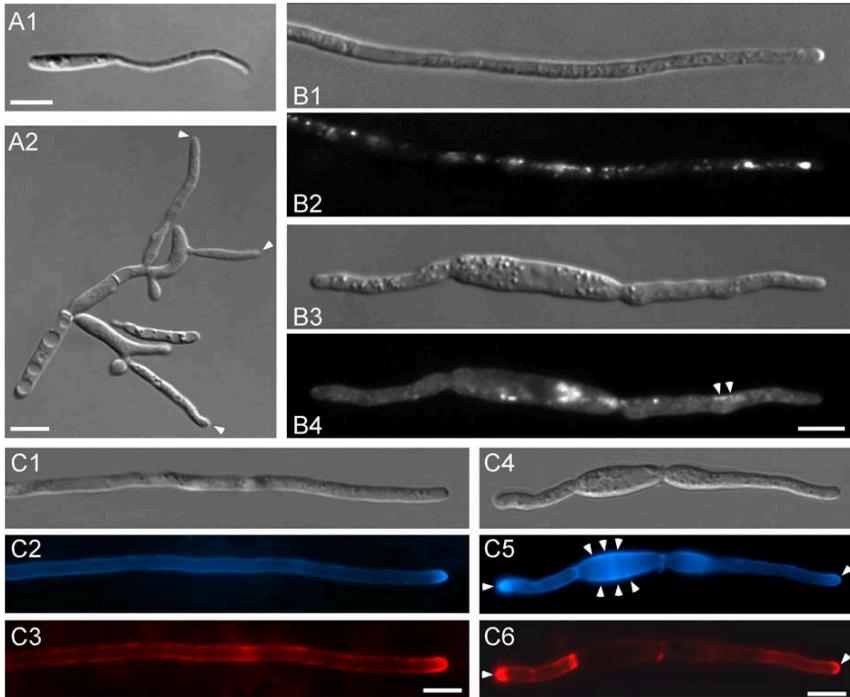


Abbildung 15: (A) Effekt der *kin3*-Deletion auf die Bildung von Paarungsschläuchen. FB2-Wildtyp-Zellen bilden zur Paarung lange Paarungsschläuche an einem der Zellpole aus (A1). In RWS59 konnten lediglich leicht verbogene und elongierte Zellen beobachtet werden (A2), und es kam nicht zur Bildung dikaryotischer Hyphen. Für die Induktion der Paarungsschläuche wurden die jeweiligen Stämme (FB2, RWS59) und kompatiblen Stämme (FB1, RWS76) gemischt und etwa 18 h auf Aktivkohle-haltigen Platten inkubiert. Die Größenbalken entsprechen 5 μ m. (B) *kin3*-Deletion im *b*-abhängigen Filament. In den Stämmen AB33 (B1, 2) und RWS160 (B3, 4; AB33 Δ Kin3) wurde in haploiden Sporidien die Bildung von Filamenten durch Induktion der *b*-Paarungstyp- Gene herbeigeführt. Die Filamente in RWS160 waren wesentlich kürzer und unregelmäßiger (B3) als in AB33 (B1). Während die Endosomen in AB33 wie in dikaryotischen Hyphen im Apex der Hyphe akkumulierten (B2) und sehr dynamisch waren, gelangten Endosomen nur vereinzelt in die Spitzen der unregelmäßig geformten RWS160-Hyphen (B4, Pfeilspitzen). Der überwiegende Teil akkumulierte in der zentralen Mutterzelle und zeigte nur wenig Bewegung (B4). Der Größenbalken entspricht 4 μ m. (C) WGA- und Calcofluor-Färbung von Hyphen. WGA (rot) war sowohl in den AB33- Hyphen (C3) als auch in den Ausläufern von RWS160-Zellen (C6, Pfeilspitzen) in den Zellspitzen lokalisiert. Calcofluor (blau) war ebenfalls im Apex von Hyphen konzentriert (C2, Pfeilspitzen in C5), färbte aber auch die Seitenwände der zentralen RWS160-Sporidien (Pfeilspitzen in C5). Die Größenbalken entsprechen 3 μ m.

2.2.8 Zytoplasmatisches Dynein ist für den Großteil der Restbewegung von Endosomen nach *kin3*-Deletion verantwortlich.

Nach der Deletion von *kin3* war die Bewegung der Endosomen auf etwa ein Sechstel des Wildtyp-Wertes reduziert. Um zu überprüfen, ob diese Restbewegung ebenfalls entlang von MT verlief, wurden RWS80-Zellen mit dem MT-Inhibitor Benomyl behandelt. Nach 20 min Inkubation konnte keine Bewegung mehr beobachtet werden. Auswaschen von Benomyl mit frischem Medium führte nach 5 min wieder zu ersten Bewegungsereignissen und nach 30 min zur Wiederherstellung der Restaktivität von RWS80 (nicht gezeigt).

Desweiteren wurde in RWS80 das GFP-Tub1-Fusionsprotein exprimiert (RWS181), um die Restbewegung von Endosomen entlang von MT in lebenden Zellen untersuchen zu können. Die in diesem Stamm ablaufenden Bewegungsvorgänge erfolgten alle entlang von MT (Abb. 16 A-C). Es konnten einzelne Endosomen beobachtet werden, die überwiegend ($63,4 \pm 5,1$ %, $n=3$ Experimente zu >30 Vesikel in >20 Zellen) in Richtung der BSDs bewegt wurden und in seltenen Fällen bidirektionale Bewegung entlang einzelner MT zeigten (Pfeilspitzen in Abb. 16 A). Durch Analyse der Polymerisations- und Depolymerisationsrichtung der MT konnte festgestellt werden, dass die BSDs ohne Ausnahme an den minus-Enden von MT zu finden waren ($n=31$, Polymerisation in Abb. 16 D gezeigt). Gelegentlich konnte die schnelle Bewegung eines BSDs entlang eines MT beobachten werden (Abb. 16 B, siehe oben), wobei aber in keinem Fall die Orientierung der zugrunde liegenden MT klar zu bestimmen war. Zusätzlich zur direkten Bewegung von Endosomen und BSDs wurden letztere auch indirekt durch die Dynamik einzelner MT bewegt. So befanden sich BSDs beispielsweise während der späten Anaphase im Zentrum von MT-Astern an den Spindelpolkkörpern (Abb. 16 A), wo sie durch die Dynamik der Astern mitbewegt wurden (nicht gezeigt). Auch durch die Bewegung ganzer MT entlang des Zellkortex (Steinberg *et al.*, 2001) wurden BSDs mitgezogen (Abb. 16 C; MT-Enden sind durch weiße Sternchen gekennzeichnet).

Die Position der BSDs an den minus-Enden von MT, und die überwiegende Bewegung einzelner Endosomen in Richtung der BSDs deuteten darauf hin, dass in erster Linie ein minus-Motor für die beobachtete Restbewegung verantwortlich war. Der bislang einzige bekannte MT-abhängige minus-Motor, der am Organellentransport beteiligt ist, ist das zytoplasmatische Dynein (Karki und Holzbaur, 1999). In *U. maydis* besteht die schwere Kette des zytoplasmatischen Dyneins aus zwei Polypeptiden, Dyn1 und Dyn2 (A. Straube und G. Steinberg, unveröffentlicht). Der Stamm IS2 enthält ein temperatursensitives *dyn2*-Allel

(I. Schulz, persönliche Mitteilung), das bei restriktiver Temperatur zu multiplen Defekten unter anderem im Kerntransport, in der MT-Organisation und im polarem Wachstum führt.

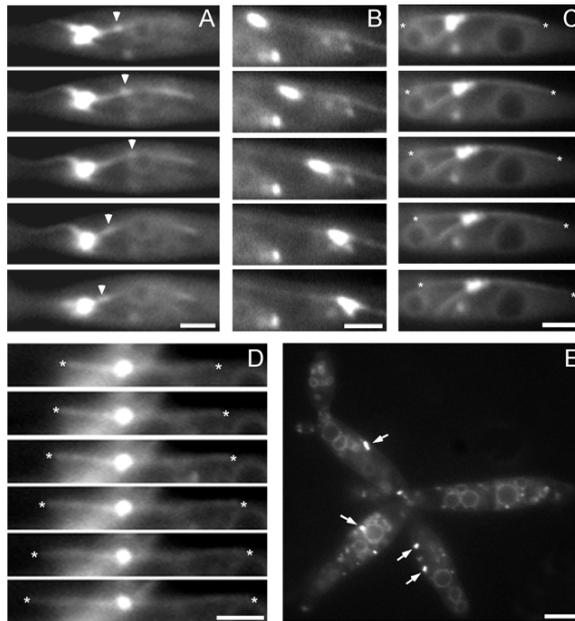


Abbildung 16: Restbewegung von Endosomen nach Deletion von *kin3*. (A-D) Das GFP-Tub1-Fusionsprotein wurde unter der Kontrolle des *otef*-Promotors in RWS80 exprimiert (RWS181). Yup1-GFP und GFP-Tub1 wurden gleichzeitig mit dem FITC-Filtersatz betrachtet. Der Zeitabstand zwischen einzelnen Bildern beträgt jeweils 1,4 s. Die Größenbalken entsprechen 2 μm . (A) Bidirektionale Bewegung eines Endosoms (Pfeilspitzen) entlang eines astralen MT während der Mitose. Ein BSD befindet sich im Zentrum der Aster. (B) Schnelle Bewegung eines BSDs entlang eines MT. (C) Passive Bewegung eines BSDs durch Bewegung eines MT entlang des Zellkortex. Die Enden des MT sind mit weißen Sternchen markiert. (D) BSD am minus-Ende von zwei wachsenden MT. (E) Endosomenorganisation in RWS195 nach 2 h Inkubation bei restriktiver Temperatur. Die BSDs waren verkleinert (Pfeil) oder verschwunden. Die Zahl kleiner Flecken war hingegen erhöht.

Um zu ermitteln, ob Dynein für die Restbewegung von Endosomen verantwortlich ist, wurde in IS2 das *kin3*-Gen deletiert und das Yup1-GFP-Fusionsprotein unter dem *otef*-Promotor exprimiert (RWS195). Bei permissiver Temperatur war in diesem Stamm die Bewegung und Organisation von Endosomen mit denen in RWS80 vergleichbar (nicht gezeigt). Nach 2-2,5 h Inkubation bei restriktiver Temperatur war hingegen fast keine Bewegung mehr detektierbar ($0,7 \pm 1,5$ % bewegte Vesikel, $n=15$ Zellen; Abb. 18 A roter Balken). Die BSDs waren häufig verkleinert (Abb. 16 E, Pfeil) oder vollständig verschwunden (Abb. 16 E). Gleichzeitig waren deutlich mehr kleine Flecken in den Zellen zu sehen ($0,27 \pm 0,06$ Flecken/ μm^2 , $n=15$;

Abb. 18 A gelber Balken). Diese Flecken entsprachen vermutlich freien Endosomen oder fragmentierten BSDs.

Die präsentierten Daten zeigen, dass die Restbewegung von Endosomen nach *kin3*-Deletion entlang von MT verläuft, und dass in erster Linie der minus-Motor Dynein diese Bewegung vermittelt. Daraus ergab sich unmittelbar die Forderung, dass Dynein auch für die Akkumulation der Endosomen in kleinen Knospen verantwortlich sein muss, da sich dort vorwiegend die minus-Enden der MT befinden. Daher wurde die Verteilung der BSDs in Zellen des Stammes RWS132 analysiert, die das *dyn2^{ts}*-Allel enthielten und das Yup1-GFP-Fusionsprotein exprimierten. Nach 20-40 min Inkubation bei 33 °C enthielten $82,0 \pm 4,2$ % der RWS133-Zellen mit kleinen Knospen einen BSD auf der Knospen-abgewandten Seite, also an den plus-Enden der MT (n=3 Experimente zu je 50 Zellen). Dies entspricht der aufgestellten Forderung und unterstreicht damit die Bedeutung von Dynein für den minus-gerichteten Transport früher Endosomen.

2.2.9 Konventionelles Kinesin beeinflusst die Organisation, aber nicht die Bewegung früher Endosomen

Nach Deletion von *kin3* (RWS80) wurde in zwei Fällen beobachtet, wie ein Endosom während der Mitose zum plus-Ende eines MT bewegt wurde (siehe Abb. 16 A). Da bei restriktiver Temperatur auch in RWS195 noch einzelne Endosomen bewegt wurden, lag die Vermutung nahe, dass neben Kin3 und Dynein noch ein weiterer plus-Motor an der Bewegung von Endosomen beteiligt ist. Das konventionelle Kinesin aus *U. maydis*, Kin2, wurde bereits mit dem Transport von Vakuolen (Steinberg *et al.*, 1998) und polarem Wachstum von Hyphen (Lehmler *et al.*, 1997) in Verbindung gebracht. Es ist ein plus-Motor und kam für den Transport von Endosomen grundsätzlich in Frage.

Zunächst wurde der Effekt einer Überexpression von *kin2* nach Deletion von *kin3* untersucht. Dazu wurde in RWS80 der *crg*-Promotor vor das *kin2*-Gen inseriert. Die Überexpression von *kin2* in diesem Stamm (RWS180) führte zu einem partiellen „Rescue“ des Δ Kin3-Phänotyps. Zwar waren noch häufig ($71,8 \pm 0,65$ %, n= 3 Experimente zu >100 Zellen) kleine „Bäumchen“ von 3 oder mehr Zellen (Abb. 17 A) zu sehen, doch traten kaum große Aggregate auf, und es gab auch zahlreiche einzelne Sporidien ($28,2 \pm 0,65$ %, n= 3 Experimente zu >100 Zellen). Mehr als die Hälfte der Zellen hatte wieder ein bipolares Knospungsmuster (monopolar: $40,5 \pm 1,9$ %, bipolar: $59,5 \pm 1,9$ %, n=3 Experimente zu >50 Zellen). Zudem enthielten die Zellen häufig ($66,2 \pm 1,8$ %, n=3 Experimente zu >40 Zellen)

polare BSDs an den Zellspitzen (Abb. 17 A; RWS80: $9,87 \pm 0,17$ % polare BSDs, n=3 Experimente zu je >70 Zellen).

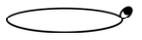
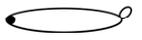
Interessanterweise wurde der partielle „rescue“ der Endosomenverteilung nicht durch vermehrten Transport einzelner Endosomen verursacht. Die Überexpression von *kin2* in RWS180 führte sogar zu einer leicht verringerten Bewegungsaktivität gegenüber RWS80 (Abb. 18, $28,9 \pm 15,3$ % bewegte Endosomen, n=15, p=0,4259 nicht signifikant unterschiedlich; Geschwindigkeit: $1,1 \pm 0,36$ $\mu\text{m/s}$, n=20, p=0,0145 signifikant unterschiedlich). Auch in Anwesenheit von Kin3 führte weder die Deletion von *kin2* (RWS114) noch die Überexpression von *kin2* (RWS 134, Northern Blot in Abb. 16 C) zu einer signifikanten Reduzierung des bewegten Anteils an Endosomen in der Zelle (Abb. 18 A rote Balken; t-Test: p=0,9586 für RWS114 und p=0,3112 für RWS134. nicht signifikant unterschiedlich). Während die Geschwindigkeit der Endosomen in RWS114 nicht verringert war (Abb. 18 B; $2,82 \pm 0,35$ $\mu\text{m/s}$, n=20; t-Test: p=0,3524 nicht signifikant unterschiedlich), führte die *kin2*-Überexpression in RWS134 zu einer Reduktion der Bewegungsgeschwindigkeit (Abb.18 B; $2,07 \pm 0,12$ $\mu\text{m/s}$, n=20). Schließlich konnte auch bei gleichzeitiger Deletion von *kin3* und *kin2* (RWS90) keine merkliche Bewegungsreduktion gegenüber RWS80 festgestellt werden (Abb. 18; bewegte Endosomen: $32,9 \pm 11,5$ %, n=15 in RWS80; $26,7 \pm 13,4$ %, n=15 in RWS90; t-Test: p=0,1127 nicht signifikant unterschiedlich; Bewegungsgeschwindigkeit: $1,38 \pm 0,33$ $\mu\text{m/s}$, n=20 in RWS80; $1,52 \pm 0,34$ $\mu\text{m/s}$, n=20 in RWS90; t-Test: p=0,1645 nicht signifikant unterschiedlich). Es konnte somit kein Hinweis darauf gefunden werden, dass Kin2 direkt am Transport von Endosomen beteiligt ist.

Wenn Kin2 keine Endosomen bewegt, stellt sich die Frage, wie der partielle „Rescue“ der *kin3*-Deletion in RWS180 erreicht wird. Um eine Antwort auf diese Frage zu erhalten, wurde neben der Endosomenbewegung auch der Einfluss von Kin2 auf die Organisation der BSDs untersucht. Die BSDs im *kin2*-Deletionsstamm RWS114 waren polar lokalisiert, aber wie nach Überexpression von *kin3* in RWS85 deutlich größer als in RWS4-Zellen (Durchmesser: $1,32 \pm 0,18$ μm , n=24 Zellen aus 2 Experimenten; t-Test: p<0,0001 signifikant unterschiedlich; Abb. 17 B1-3). Dementsprechend war auch die Anzahl freier Endosomen reduziert (Abb. 18 A, gelbe Balken). Umgekehrt führte die Überexpression von *kin2* in RWS134 zu einer weitgehenden Auflösung der BSDs, die in schnell wachsenden Zellen nicht mehr beobachtet wurden (nicht gezeigt). Bei Deletion von *kin2* und gleichzeitiger Überexpression von *kin3* (RWS162) wurde ein additiver Effekt auf die BSD-Größe beobachtet (Durchmesser von $1,52 \pm 0,18$ μm , n=21 Zellen aus 2 Experimenten). Die Konzentration der Endosomen in den BSDs war dabei so stark, dass in den meisten Zellen überhaupt keine freien Endosomen mehr beob-

achtet wurden (Abb. 18 A, gelber Balken). Über die in RWS85 beobachtete Verlängerung der Zellen hinaus konnten keine weiteren morphologischen Veränderungen festgestellt werden (nicht gezeigt).

Zusätzlich zu dem Einfluss von *Kin2* auf die BSD-Größe, konnte auch ein Effekt auf die Verteilung der BSDs beobachtet werden. RWS114-Zellen mit kleinen Knospen (Abb. 17 B1, Tabelle 2) und Zellen, die sich in der Teilung befanden (nicht gezeigt), hatten normal lokalisierte BSDs. Hingegen besaßen ein Viertel der Zellen mit mittelgroßen Knospen aberrante Endosomenakkumulationen in der Knospenspitze (Abb. 17 B2 und 3, Tabelle 2: $75,2 \pm 1,3$ % gegenüber der Knospe, $24,8 \pm 1,3$ % in der Knospenspitze, n=3 Experimente zu >40 Zellen). Bezüglich der BSD-Verteilung kam es in RWS162 zu einer Überlagerung der Effekte von *kin3*-Überexpression und *kin2*-Deletion. Die BSDs traten in Zellen mit kleinen Knospen zu $64,9 \pm 6,4$ % (n=3 Experimente zu >40 Zellen, Tabelle 2) an dem Knospen-abgewandten Pol der Mutterzelle auf (also ähnlich wie in RWS85-Zellen). Zellen mit mittelgroßen Knospen hatten immerhin noch zu $13,0 \pm 1,0$ % (n=3 Experimente zu >40 Zellen, Tabelle 2) aberrant lokalisierte BSDs in der Knospenspitze wie RWS114-Zellen.

Tabelle 2: Verteilung der BSDs in Zellen mit kleinen und mittleren Knospen⁶

Stadium Stamm				
RWS4	$95,8 \pm 8,6$	$4,2 \pm 8,6$	$2,5 \pm 5,2$	$97,5 \pm 5,2$
RWS114	100 ± 0	0 ± 0	$24,8 \pm 1,3$	$75,2 \pm 1,3$
RWS85	$3,1 \pm 2,5$	$96,9 \pm 2,5$	0 ± 0	100 ± 0
RWS162	$35,1 \pm 6,4$	$64,9 \pm 6,4$	$13,0 \pm 1,0$	$87,0 \pm 1,0$

Die nach Deletion von *kin2* vergrößerten BSDs bildeten oft Membranschläuche, die teilweise mehr als die Hälfte der Zelllänge durchmaß (Abb. 17 D, in RWS114). Ähnliche Schläuche konnten auch bei Deletion in Stämmen beobachtet werden, in denen *kin3* deletiert wurde (RWS80, RWS90). Sie wurden jedoch nicht in RWS4-Zellen beobachtet und traten fast nie nach Überexpression von *kin3* auf, waren also nicht einfach eine Folge vergrößerter BSDs.

⁶ Werte sind in % angegeben und aus 3 unabhängigen Experimenten zu je >40 Zellen errechnet. Es wurden nur Zellen gewertet, die einen klaren BSD enthielten. Die Position der BSDs ist schematisch mit schwarzen Flecken angedeutet. Die Stämme RWS85 und RWS162 wurden in Arabinose-haltigen Medien analysiert, also unter Überexpressionsbedingungen für *kin3*.

Die Wachstumsspitzen der Schläuche zeigten gelegentliche Richtungswechsel (Abb. 17 D, Pfeilspitzen) und schienen entlang von Bahnen bewegt zu werden.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Überexpression von *kin2* auf bislang ungeklärte Weise den Phänotyp einer *kin3*-Deletion abschwächen kann. Es wurden keine Hinweise auf eine direkte Beteiligung von Kin2 am Transport von frühen Endosomen gefunden. Allerdings scheint Kin2 an der Organisation und Verteilung von BSDs beteiligt zu sein.

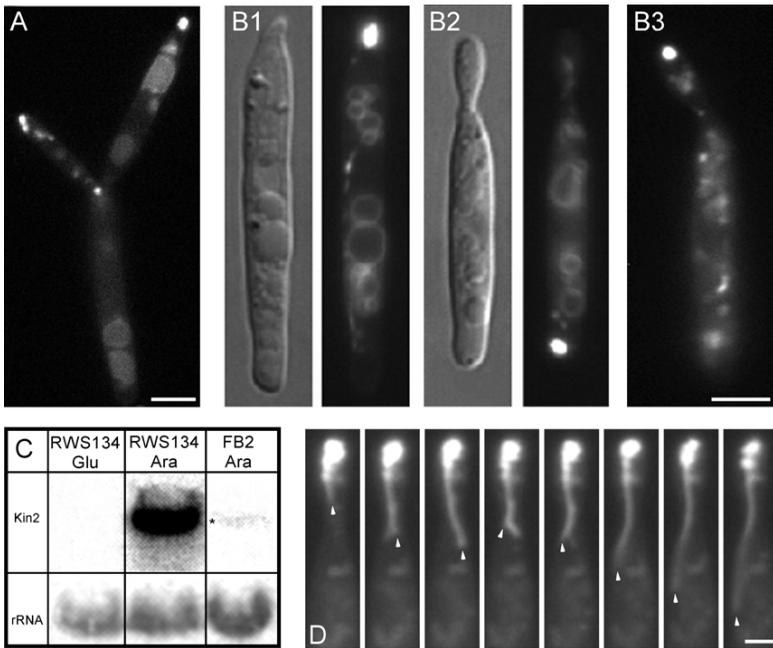


Abbildung 17: Endosomenorganisation ist von Kin2 abhängig. (A) Überexpression von *kin2* in einem *kin3*-Deletionsstamm (RWS180). Die „Bäumchen“ waren meist nur klein und enthielten oft polare BSDs an den Zellspitzen. Der Größenbalken entspricht 3 µm. (B) Im *kin2*-Deletionsstamm RWS114 waren die BSDs aus mit Yup1-GFP gefärbten Vesikeln wesentlich größer als in RWS4. In Zellen mit kleinen Knospen (A1) und während der Zellteilung (nicht gezeigt) waren die BSDs wie in RWS4-Zellen lokalisiert. In Zellen mit mittelgroßen Knospen waren etwa 75 % der BSDs korrekt gegenüber der Knospenspitze lokalisiert (A2) und 25 % fehlerhaft in der Knospenspitze (A3). Der Größenbalken entspricht 3 µm. (C) Northern-Blot für die Überexpression von *kin2*. Im Wildtyp ist *kin2* nur schwach exprimiert (FB2 Ara). In RWS134 ist *kin2* in Glukose-haltigem Medium reprimiert (RWS134 Glu) und in Arabinose-haltigem Medium (RWS134 Ara) ähnlich stark exprimiert, wie *kin3* in RWS85 (ca. 30x). Als Kontrolle für die RNA-Menge wurde eine rRNA-Bande abgebildet, die nach dem Transfer der RNA mit Methyleneblau gefärbt wurde. (D) „Schlauchbildung“ in RWS114. Nach Deletion von *kin2* wurde häufig die Umwandlung von BSDs in lange Membranschläuche beobachtet. Die Pfeilspitzen zeigen die Wachstumsspitze des Schlauches. Der Zeitabstand zwischen den Bildern beträgt 1,2 s. Der Größenbalken entspricht 2 µm.

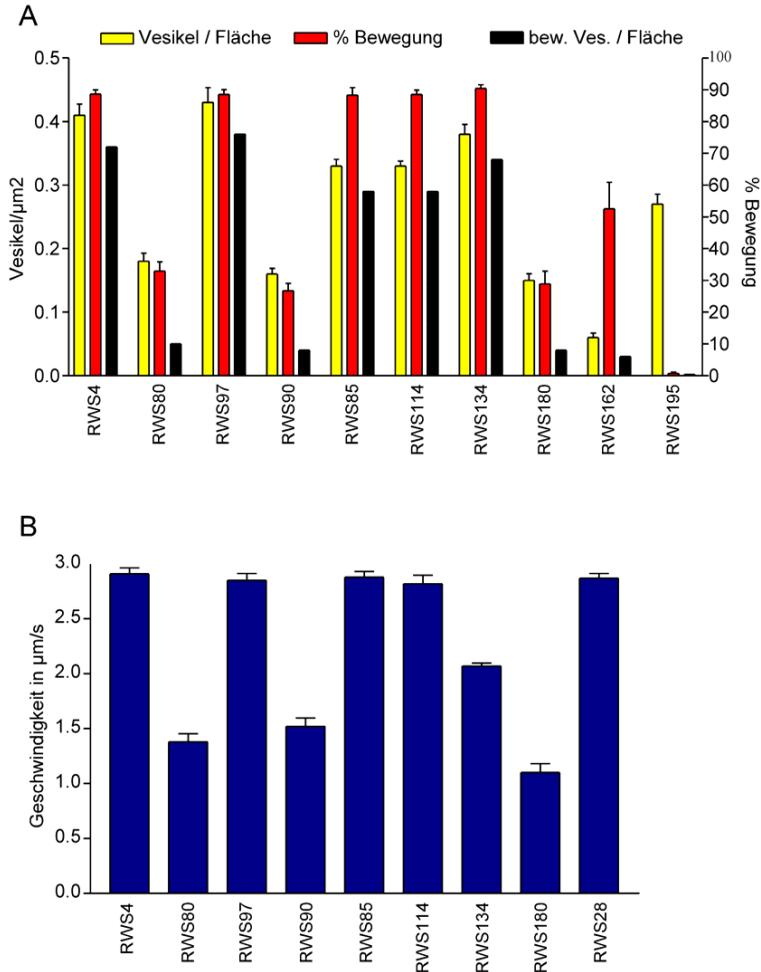


Abbildung 18: Quantifizierung der Endosomenbewegung. (A) Bestimmung der Anzahl freier Endosomen/Fläche (FE, gelbe Balken) und dem Anteil an bewegten Endosomen (BE, rote Balken) im Beobachtungszeitraum von 30-40 s. Balken entsprechen Mittelwerten aus 15 Zellen. Die Standardfehler sind angegeben. Die Anzahl der bewegten Endosomen/Fläche (BEF) wurde aus den Mittelwerten der oben genannten Messungen errechnet (FE x BE) und als Absolutwert angegeben (schwarze Balken). FE und BEF sind in Endosomen/µm² angegeben; BE ist in % angegeben. (B) Geschwindigkeit der Endosomenbewegung. Die Balken entsprechen Mittelwerten aus 20 Messungen. Standardfehler sind angegeben. In allen angegebenen Stämmen mit Ausnahme von RWS28 wurde das Yup1-GFP-Fusionsprotein unter der Kontrolle des *otef*-Promotors exprimiert. Darüber hinaus wurden die folgenden Veränderungen vorgenommen: RWS80: *Δkin3*, RWS97: *Δkin3+kin3*, RWS90: *Δkin2Δkin3*, RWS85: *crgkin3*, RWS114: *Δkin2*, RWS134: *crgkin2*, RWS180: *crgkin2Δkin3*, RWS162: *crgkin3Δkin2*, RWS195: *dyn2tsΔkin3*, RWS28: *otefkin3gfp* (siehe auch Material und Methoden).

3. Diskussion

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass der t-SNARE Yup1 an der Endozytose in *U. maydis* beteiligt ist. Gleichzeitig sind *yup1^{ts}*-Mutanten durch morphologische Defekte gekennzeichnet, die auf Störungen in der polaren Sekretion beruhen. Diese auf den ersten Blick widersprüchlichen Befunde können in einem Modell erklärt werden, das Endo- und Exozytose durch Membranrecycling über frühe Endosomen verbindet.

3.1 Ein t-SNARE als Bindeglied zwischen Endo- und Exozytose

Nach der SNARE-Hypothese üben t-SNAREs („target“-SNAREs) ihre Funktion auf der Zielmembran eines Transportweges aus, wo sie die Fusion mit ankommenden Vesikeln vermitteln (Sollner *et al.*, 1993). Yup1-GFP (Y) lokalisiert in Wildtyp-Zellen vorwiegend auf frühen Endosomen (Abb. 19 A). Nach dem Modell vermittelt das Molekül dort - vermutlich über die Interaktion mit einem unbekanntem v-SNARE (A) - die Fusion endozytotischer Vesikel (O) mit den frühen Endosomen (EE). Dieser Vorgang wird vermutlich durch raschen Langstreckentransport über MT erleichtert (siehe auch 3.2), welcher zudem für die polare Akkumulation von Endosomen in den BSDs an Stellen aktiven Wachstums benötigt wird. Die BSDs könnten polares Zellwachstum und die Zelltrennung unterstützen, indem von ihnen aus Zellwand-modifizierende Enzyme (E) gerichtet sekretiert werden. Die Enzyme werden schließlich nach Ausübung ihrer Funktion über definierte Bereiche der Plasmamembran (TLR, Abb. 19 A) endozytiert und zurück zu den frühen Endosomen transportiert. Yup1-GFP lokalisierte außer auf Endosomen auch auf Vakuolenmembranen (V). *yup1^{ts}*-Mutanten zeigen im Gegensatz zu einer Mutante des verwandten t-SNAREs Vam7p aus *S. cerevisiae* (Wada und Anraku, 1992) keinerlei Defekte in der Organisation oder Morphologie von Vakuolen. Daher ist es wahrscheinlich, dass das Yup1-GFP auf Vakuolenmembranen keine Funktion ausübt, sondern möglicherweise nur auf dem Weg zur Degradierung dorthin gelangt (Y).

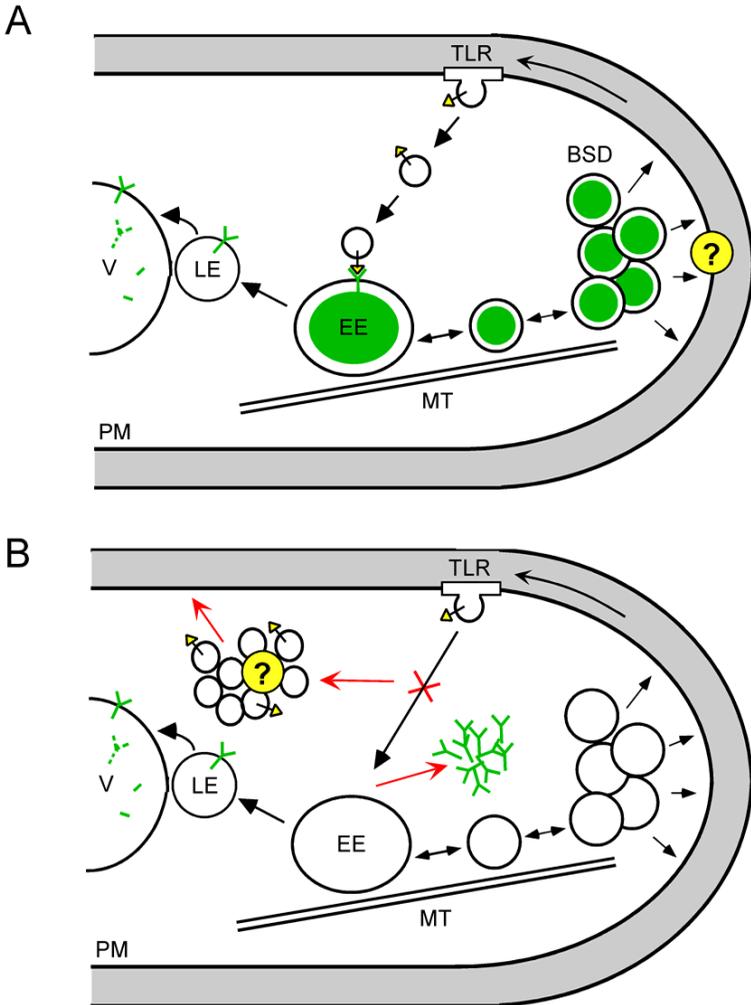


Abbildung 19: Modell für die Funktion von Yup1. (A) Yup1-GFP (grünes Y) lokalisiert auf frühen Endosomen (EE), die schnell entlang von MT bewegt werden. Die Endosomen akkumulieren in Regionen aktiven Wachstums, wo sie BSDs bilden und möglicherweise Komponenten für die Zellwandsynthese in die Plasmamembran (PM) bringen. Solche Komponenten könnten Zellwand-modifizierende Enzyme sein, die dann über die dreilagigen Strukturen (TLR) endozytiert und erneut zu den frühen Endosomen transportiert werden. Die Fusion endozytotischer Vesikel mit frühen Endosomen würde dann das t-SNARE Yup1 und das zugehörige v-SNARE auf den Transportvesikeln (gelbes Dreieck) benötigen. Außerdem kann Yup1 über späte Endosomen (LE) zur Vakuole (V) transportiert werden, wo es abgebaut wird. (B) In RWS1-Zellen, die das *yup1^{ts}*-Allel tragen, führt die Mutation in der PX-Domäne bei 34 °C zu einer Delokalisierung von Yup1, das dann im Zytoplasma aggregiert. Deshalb können endozytotische Transportvesikel nicht mehr mit den frühen Endosomen fusionieren und akkumulieren ebenfalls im Zytoplasma. Dadurch wird der Transport von Zellwandkomponenten zu den Wachstumsregionen unterbrochen, was zu einer veränderten Zellwandzusammensetzung und gestörten Morphologie führt.

In RWS1-Zellen, die das *yup1^{ts}*-Allel tragen, kam es bei 34 °C zu einer fehlerhaften Akkumulation des FM4-64-Farbstoffes in wolkenartigen Aggregaten. Zudem aggregierte das Yup1-GFP-Fusionsprotein, vermutlich als Folge der Mutation in der PX-Domäne, im Zytoplasma (Abb. 19 B). Da damit kein Zell-interner Marker mehr für Endosomen vorlag, kann nicht ausgeschlossen werden, dass es sich bei den mit FM4-64 gefärbten, wolkenartigen Aggregaten um fehlerhaft organisierte frühe Endosomen handelte. Das Fehlen gerichteter Bewegung von einzelnen Aggregaten und deren diffuses Erscheinungsbild deuten jedoch darauf hin, dass es sich dabei vielmehr um endozytotische Transportvesikel handelt, die nicht mehr mit frühen Endosomen fusionieren können und daher im Zytoplasma aggregieren. Durch diese Unterbrechung der Endozytose werden das Recycling und die nachfolgende Anlieferung von Zellwandkomponenten in Regionen polaren Wachstums verhindert. Dies hat wiederum eine Fehlorganisation der Zellwand zur Folge, was sich in einer veränderten Calcofluorfärbung und einer gestörten Morphologie äußert. Möglicherweise trägt auch die ungerichtete Fusion der akkumulierten endozytotischen Vesikel mit der Plasmamembran zur veränderten Morphologie bei. Ein derartiger Vorgang wurde besonders durch die starke laterale WGA-Färbung der Hyphen nahegelegt und könnte ebenfalls zu der veränderten Zellwandstruktur beitragen.

Die Rolle, die hier für Endosomen beim polaren Zellwachstum vorgeschlagen wird, ist für Vertebraten-Zellen seit längerem etabliert. Am besten ist das Phänomen im Axon untersucht, wo Recycling zur Dynamik synaptischer Vesikel beiträgt (Pearse und Bretscher, 1981) und apikales Zellwachstum unterstützt (Dai und Sheetz, 1995). Außerdem sind Endosomen-abhängige Recyclingprozesse bei der Etablierung von Zellpolarität im Mausembryo (Fleming *et al.*, 1986) wichtig. In Pilzen wurde ein derartiges Konzept zwar gefordert, doch gibt es bislang nur sehr wenige Hinweise auf Membranrecycling. So hat man in der Bäckerhefe gezeigt, dass während des Wachstums Recycling von Chitinsynthetasen über eine spezielle Klasse von Endosomen, die Chitosomen, erfolgt (Chuang und Schekman, 1996). Die hier durchgeführten Untersuchungen unterstreichen die Bedeutung von Endosomen bei der polaren Sekretion auch in Pilzen.

3.2 Endosomentransport entlang von MT

Die mit Yup1-GFP gefärbten frühen Endosomen werden in schneller, bidirektionaler und saltatorischer Bewegung entlang von MT transportiert. In mehreren Säugersystemen wurde ebenfalls beobachtet, dass Endosomen entlang von MT bewegt werden (Lane und Allan,

1998). Die Geschwindigkeit dieses Transports war allerdings 50-100 Mal niedriger als in *U. maydis* (Herman und Albertini, 1984). Mikrotubuli sind zudem für die beobachtete polare Akkumulation von Endosomen in BSDs an Stellen aktiven Wachstums notwendig. Dies stimmt mit dem Befund überein, dass MT beim polaren Wachstum von *U. maydis* eine zentrale Rolle spielen (Steinberg *et al.*, 2001).

Wenn die BSDs das Wachstum und die Trennung von Zellen unterstützen, stellt sich die Frage, weswegen einzelne Endosomen eine so außergewöhnlich hohe Dynamik zeigen. Die primäre Funktion der frühen Endosomen ist vermutlich das Aufsammeln endozytotischer Vesikel. Die schnelle, bidirektionale Bewegung der Endosomen unterstützt diesen Prozess, indem durch sie die Distanz zwischen Plasmamembran und frühen Endosomen minimiert wird. Eine ähnliche Erklärung wurde bereits für die bidirektionale Bewegung von Endosomen in Axonen vorgeschlagen (Nakata *et al.*, 1998). Alternativ könnten sämtliche endozytierten Vesikel direkt an ihren Zielort gebracht werden. Dies wäre jedoch energetisch unverhältnismäßig aufwändiger, da die Zahl der transportierten Vesikel um ein Vielfaches größer ist als die der Endosomen.

3.3 Antiparallel arbeitende Motormoleküle

Bei der Aufklärung des Bewegungsmechanismus von Kinesinen hat man bereits beachtliche Fortschritte gemacht (Sack *et al.*, 1999), (Vale und Milligan, 2000). Allerdings blieb lange Zeit ungeklärt, was konventionelle Kinesine (KHCs) und Kinesin-ähnliche Proteine (KRPs), die am Organellentransport beteiligt sind, transportieren. Erst in den letzten Jahren hat man für einige Kinesine spezifische „Kargos“ identifizieren können, wobei besonders Mitglieder der Unc104/KIF1-Familie untersucht wurden. So bindet das KIF1A-Homolog KIF13A an β -Adaptin im „coat“ von Vesikeln, die vom Trans-Golginetzwerk abknospen (Nakagawa *et al.*, 2000). CeUnc104 und KIF1A sind am Transport von synaptischen Vorläufervesikeln beteiligt (Hall und Hedgecock, 1991), (Okada *et al.*, 1995), und KIF1B transportiert zumindest in einer Isoform Mitochondrien (Nangaku *et al.*, 1994). Bei zahlreichen weiteren KRPs gibt es bislang noch keine Informationen über das transportierte „Kargo“.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass das KRP Kin3 zusammen mit Dynein für die Bewegung früher Endosomen in *U. maydis* verantwortlich ist. Damit konnte zum ersten Mal spezifischen Motormolekülen eine Funktion beim Endosomentransport *in vivo* zugewiesen werden. Bislang war lediglich bekannt, dass konventionelles Kinesin und Dynein *in vitro* Endosomen aus Rattenleberzellen transportieren können (Bananis *et al.*, 2000), (Pol *et al.*, 1997).

Kin3 ist für den größten Teil der Bewegung früher Endosomen verantwortlich. Anhand seiner N-terminalen Motordomäne und der typischen Domänenorganisation konnte Kin3 eindeutig der Unc104/KIF1-Familie (Kim und Endow, 2000) von Kinesin-ähnlichen Motoren zugeordnet werden. Von der Unc104/KIF1-Familie sind bis jetzt etwa 20 Mitglieder bekannt. Alle bislang beschriebenen Moleküle dieser Gruppe bewegen zum plus-Ende von MT (Bloom, 2001). Das bislang am besten untersuchte Mitglied ist KIF1A aus *Mus musculus*, das für den Transport von synaptischen Vorläufervesikeln verantwortlich ist. Neben Kin3 ist lediglich ein einziger pilzlicher Vertreter der Unc104/KIF1-Familie bekannt, TIKIF1, aus dem thermophilen Pilz *T. lanuginosus* (Sakowicz *et al.*, 1999).

Neben Kin3 ist vor allem der minus-Motor Dynein für den Transport von Endosomen verantwortlich. Gleichzeitiges Ausschalten von Kin3 und Dynein führte zu einem fast vollständigen Erliegen der Endosomenbewegung. Warum benötigt eine Zelle zwei in unterschiedliche Richtungen transportierende Motoren, um eine Organellenklasse zu bewegen? Der Grund dafür dürfte in der Organisation des MT-Zytoskeletts von *U. maydis* liegen (Steinberg *et al.*, 2001). Ein einzelner Motor mit festgelegter Polarität kann nur dann die bidirektionale Bewegung der Endosomen ermöglichen, wenn die zugrunde liegenden MT antiparallel orientiert sind. Die MT von *U. maydis*-Sporidien mit wachsenden Knospen waren jedoch überwiegend unipolar ausgerichtet (Steinberg *et al.*, 2001), was die Beteiligung von mindestens zwei Motoren mit entgegengesetzter Polarität notwendig macht. Zudem stellt ein Wechselspiel von antiparallel arbeitenden Motormolekülen eine einfache Möglichkeit dar, die beobachtete Zellzyklus-abhängige Positionierung der BSDs zu erreichen. Nachfolgend werden die Zusammenhänge zwischen MT-Organisation, Motoraktivität und Endosomenorganisation in einem Modell zusammengefasst und in Bezug auf die betroffenen zellulären Prozesse diskutiert (Abb. 20).

Während der Zellteilung (Abb. 20 A) sind die MT vorwiegend antiparallel angeordnet (Steinberg *et al.*, 2001). Für die Akkumulation der Endosomen an den Teilungssepten ist nach der Analyse der *kin3*-Deletions- und Überexpressionsstämme vorwiegend Kin3 verantwortlich, wenn auch eine zusätzliche Beteiligung von Dynein zum jetzigen Zeitpunkt nicht ausgeschlossen werden kann. Sowohl in der *yup1^Δ*-Mutante als auch nach Deletion von *kin3* bleiben die Sporidien nach Abschluss der Mitose und Zytokinese über die Zellwand miteinander verbunden. Dies deutet darauf hin, dass die BSDs an den Teilungssepten essentiell für die Zelltrennung sind. In Übereinstimmung mit dem Modell für die Yup1-Funktion (siehe Abb. 19) könnten Zellwand-abbauende Enzyme, wie etwa Chitinasen, in Endosomen gespeichert und von den BSDs aus sekretiert werden.

Durch die Analyse der Polymerisation und Depolymerisation GFP-markierter MT konnte gezeigt werden, dass sich die minus-Enden der MT während des Knospenswachstums überwiegend im Knospenhals befinden (Abb. 20 B), wo sie möglicherweise von Kern-unabhängigen MT-Organisationszentren (grüne Punkte in Abb. 20 B und C) zusammengehalten werden (Steinberg *et al.*, 2001). In diesem Stadium akkumulieren die Endosomen überraschenderweise nicht in der Wachstumsregion der Knospe, sondern am Knospen-abgewandten Pol der Mutterzelle an den plus-Enden der MT. Auch für diese BSD-Positionierung ist die Aktivität von Kin3 notwendig. Im *kin3*-Deletionsstamm trat ein klarer Defekt im Knospungsmuster auf, der auf einer fehlerhaften Lokalisation der BSDs im Knospenhals zurückzuführen sein könnte. In *S. cerevisiae* sind zahlreiche Gene identifiziert worden, die für die Auswahl der Knospungsstellen wichtig sind (Sheu *et al.*, 2000). Über einen Einfluss der Endosomenorganisation auf das Knospungsmuster ist jedoch bislang nichts bekannt. Es kann nur vermutet werden, dass Endosomen dabei eine ähnliche Funktion wie bei der Zelltrennung ausüben – als Lieferanten oder Reservoir für Faktoren, die für die Markierung der Knospungsstellen wichtig sind.

In Sporidien, die gerade mit der Knospenbildung beginnen (Abb. 20 C), befinden sich die minus-Enden der MT ebenfalls im Knospenhals (Steinberg *et al.*, 2001). Je nach Knospengröße ragen kurze MT mit ihren plus-Enden in die Knospe hinein (Steinberg *et al.*, 2001). Für die Positionierung der BSDs in den kleinen Knospen ist vermutlich der minus-Motor Dynein verantwortlich. So führte das Ausschalten von Dynein zu einer Verschiebung der BSDs auf die Knospen-abgewandte Seite der Zellen. Ein ähnlicher Effekt konnte durch die Überexpression von *kin3* erzielt werden. Diese Ergebnisse sowie die Beobachtung, dass mehr Endosomen in kleine Knospen als von ihnen weg transportiert wurden, lassen sich durch ein dynamisches Gleichgewicht bei der Endosomenorganisation erklären. In solch einem Gleichgewicht werden einzelne Endosomen unabhängig voneinander entweder durch Dynein oder durch Kin3 transportiert. Die relative Aktivität der beiden Motormoleküle zueinander, die sich in unterschiedlicher Bewegungsgeschwindigkeit, Bewegungslänge oder Anzahl der bewegten Endosomen ausdrückt, sorgt dann für eine Netto-Bewegung der Endosomen hin zu den minus- oder plus-Enden der MT. Dies kann wiederum für die polare Akkumulation der Endosomen in BSDs sorgen.

Die *yup1^{ts}*-Mutante wurde ursprünglich als Polaritätsmutante isoliert. Der Defekt in *Yup1* führte zu einer klaren Störung des polaren Wachstums, die sich in stark verdickten Zellen äußerte. Die Lokalisation der BSDs in kleinen Knospen von Wildtyp-Zellen deutete zudem darauf hin, dass Endosomen das Knospenswachstum unterstützen können. Allerdings konnten

mittelgroße Knospen auch ohne BSDs wachsen. Die Fehlverteilung der BSDs nach Deletion oder Überexpression von *kin3* führte ebenfalls zu keiner erkennbaren Störung der Zellmorphologie. Zwar konnten sich die Sporidien nicht voneinander trennen und zeigten einen Defekt im Knospungsmuster, doch wuchsen sie weiterhin polar und waren nicht dicker als Wildtyp-Zellen. Wie kommt es zu den unterschiedlichen Phänotypen der *yup1^{ts}*-Mutante und des *kin3*-Deletionsstammes? Durch den Defekt in Yup1 können bestimmte Faktoren vermutlich überhaupt nicht mehr in die Endosomen gelangen, wodurch es zu einer vollständigen Unterbrechung des Recyclingprozesses kommt. Zudem könnten die im Zytoplasma akkumulierten endozytotischen Vesikel durch ungerichtete Fusion mit der Plasmamembran zum apolaren Wachstum von *yup1^{ts}*-Zellen beitragen (Abb. 19 B). Die Deletion von *kin3* hingegen führt lediglich zu einer starken Reduzierung der Endosomenbewegung. Durch die Dynein-abhängige Restbewegung sind die BSDs meist in der Nähe der Wachstumsregion positioniert. Es kommt also möglicherweise nicht zu einer veränderten Zusammensetzung einzelner Endosomen, sondern nur zu erhöhten Distanzen, die beim Recycling überbrückt werden müssen. Die dadurch bedingte Verlangsamung des Recyclingprozesses bewirkt keine erkennbaren Defekte im Knospenwachstum von $\Delta kin3$ -Stämmen aus.

In Wildtyp-Hyphen wurde eine direkte Rolle der Endosomen beim polaren Wachstum beobachtet. Spitzenwachstum konnte nur in Hyphen gemessen werden, die intakte apikale BSDs enthielten. In Hyphen in denen für den Transport zur Wachstumsspitze Distanzen von bis zu über 100 μm zurückgelegt werden müssen, ist also für ein kontinuierliches Wachstum der rasche MT- und Kin3-abhängige Langstreckentransport von Endosomen notwendig. Dass *kin3*-unabhängiges polares Wachstum möglich ist, wurde auch aus der Untersuchung des Spitzenwachstums von Hyphen deutlich. Das Ausschalten von *kin3* führte lediglich zu deutlich verkürzten Hyphen, wobei Endosomen -vermutlich mittels Dynein- noch vereinzelt bis in die Hyphenspitzen transportiert wurden.

Beim Wachstum von Knospen und in verkürzten $\Delta kin3$ -Hyphen könnte die relativ geringe Distanz zwischen den fehllokalisierten BSDs und der Wachstumsregion auch direkt von sekretorischen Vesikeln zurückgelegt werden. Beim Spitzenwachstum von Pilzhypen erfolgt der Transport sekretorischer Vesikel entlang von Aktin (Torralba und Heath, 2001). Untersuchungen an einem MyosinV-Motor (C. Gruber und G. Steinberg, persönliche Mitteilung) deuten darauf hin, dass auch in *U. maydis* Aktin-abhängige Transportprozesse bei der Sekretion mitwirken. Der Myosin- und Aktin-abhängige Transport ist in $\Delta kin3$ -Stämmen

vermutlich nicht gestört und könnte in Verbindung mit der Dynein-abhängigen Restbewegung der Endosomen polares Wachstum über relativ kurze Distanzen aufrecht erhalten. Inwieweit das zwar eingeschränkte, aber weiterhin polare Wachstum von $\Delta kin3$ -Hyphen auf der Restbewegung von Endosomen über Dynein oder auf dem Transport sekretorischer Vesikel entlang von Aktin beruht, ist zum jetzigen Zeitpunkt noch unklar.

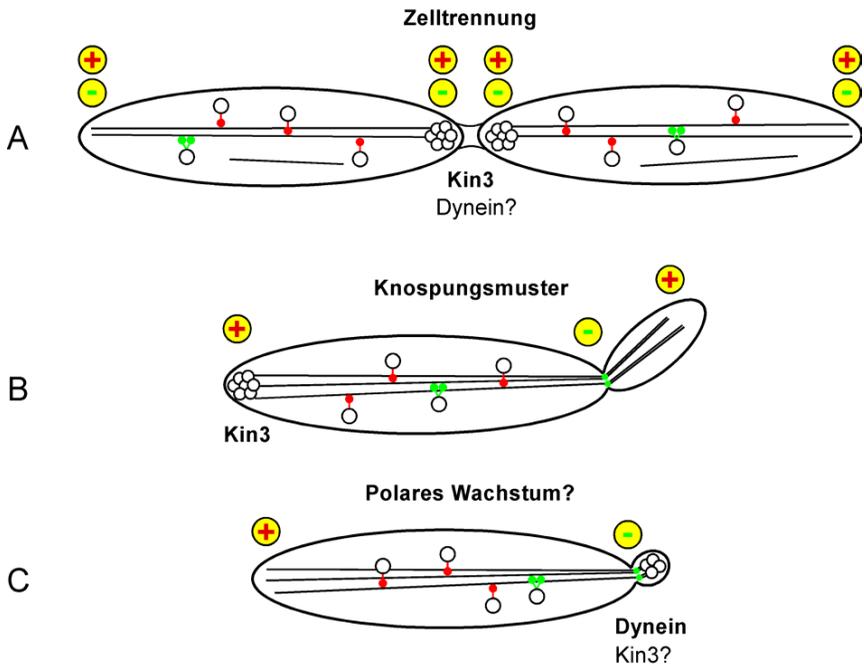


Abbildung 20: Schematische Darstellung der Organisation von MT und Endosomen in verschiedenen Zellzyklusstadien. (A) MT und Endosomen in Sporidien vor der Zelltrennung. (B) Organisation von MT und Endosomen während des Knospenswachstums. (C) Endosomen und MT in der initialen Phase der Knospenbildung. BSDs sind durch Häufung von Endosomen dargestellt. Kin3 ist als Monomer und in rot (plus-Motor) abgebildet; Dynein als Dimer und in grün (minus-Motor). Die vermutlichen Kern-unabhängigen MT-Organisationszentren (Steinberg *et al.*, 2001) sind als grüne Kreise dargestellt. Die Haupt-Orientierung der MT ist über den jeweiligen Zellen angegeben.

3.4 Ausblick

Mit der Beschreibung der Endosomenorganisation und der Identifizierung zweier am Endosomentransport beteiligter Motormoleküle gelang ein Einblick in das komplexe Gefüge, das dem polaren Wachstum von *U. maydis*-Zellen zugrunde liegt. Nach der Deletion von *kin3* konnte vereinzelt noch Bewegung von Endosomen zu den plus-Enden der MT beobachtet werden. Diese Restbewegung und der noch nicht verstandene Einfluss von Kin2 auf die Organisation der BSDs zeigen, dass die Grundlagen der Endosomenorganisation sehr viel komplexer sind als angenommen.

Das Wechselspiel von Kin3 und Dynein bei der Organisation der Endosomen muss strengen Regulationsmechanismen unterliegen, um die Zellzyklus-abhängige Positionierung der BSDs zu ermöglichen. Es wird Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein, zu ermitteln, welche Moleküle an der Regulation beteiligt sind und wie sie die Aktivität von Kin3 und Dynein beeinflussen.

Die mit Yup1-GFP markierten frühen Endosomen sind nicht nur bei der Untersuchung der Endosomenorganisation und deren biologischer Relevanz nützlich. Sie stellen auch ein attraktives Werkzeug zur *in vivo*-Analyse mechanistischer Eigenschaften von Motormolekülen dar. So könnte das aktuelle Problem der Prozessivität monomerer Motormoleküle (Okada und Hirokawa, 1999) (Pierce *et al.*, 1999) untersucht werden. Insgesamt bietet das hier aufgedeckte System bislang einmalige Möglichkeiten für die *in vivo*-Analyse MT-abhängiger Transportprozesse.

4. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit den molekularen Grundlagen polaren Wachstums im phytopathogenen Basidiomycet *Ustilago maydis*. Zunächst wurde die zelluläre Rolle des t-SNAREs Yup1 analysiert. Ein temperatursensitiver Defekt im *yup1*-Gen hatte zu Störungen in der Zelltrennung und im polaren Wachstum von Sporidien geführt. Mutante Zellen bildeten dabei lange verzweigte Ketten aus verdickten Zellen. Die Lokalisation eines Yup1-GFP-Fusionsproteins auf beweglichen Organellen hatte zum Aufstellen eines spekulativen Modells geführt, bei dem Yup1 auf Endosomen die Fusion mit ankommenden endozytotischen Vesikeln vermittelt. Eine erstmalige Charakterisierung der Endozytose von *U. maydis* in dieser Arbeit zeigte, dass es sich bei den mit Yup1-GFP markierten, schnellen Organellen tatsächlich um frühe Endosomen handelte. Diese akkumulierten Zellzyklus-abhängig an Regionen aktiven Wachstums in BSDs. Die Akkumulation früher Endosomen im Apex von Hyphen war für das Spitzenwachstum erforderlich. In *yup1^{ts}*-Zellen war bei restriktiver Temperatur eine gestörte Endozytose zu beobachten. Dieser Zusammenhang zwischen Zellmorphologie und polarer Sekretion einerseits und Endozytose andererseits deutete darauf hin, dass Membranrecycling über frühe Endosomen entscheidend am polaren Wachstum von *U. maydis*-Zellen im Speziellen und pilzlichen Hyphen im Allgemeinen mitwirkt.

Mittels des Yup1-GFP-Fusionsproteins konnten die molekularen Grundlagen der beobachteten Bewegung von Endosomen untersucht werden. Es wurde gezeigt, dass sich frühe Endosomen entlang von MT bewegen. Für diese Bewegung war in erster Linie das Kinesin Kin3 verantwortlich. Dieses Molekül ist ein neues Mitglied der Unc104/KIF1-Familie von Kinesin-ähnlichen molekularen Motoren und bewegt als solches vermutlich in Richtung der plus-Enden von MT. Gelfiltrationsexperimente legten nahe, dass Kin3 in der Zelle als Monomer vorliegt. Die N-terminale Motordomäne zeigte *in vitro* eine MT-stimulierte ATPase Aktivität. Ein Kin3-GFP-Fusionsprotein lokalisierte in schnell beweglichen Flecken, die im Bewegungsverhalten den frühen Endosomen glichen. Ein Kin3-YFP-Fusionsprotein bewegte entlang von MT und kolokalisierte zudem mit einem Yup1-CFP-Fusionsprotein auf Endosomen. Die Deletion von *kin3* führte zu einer starken Reduzierung der Endosomenbewegung. Die *in vivo*-Untersuchung der MT-Dynamik im $\Delta kin3$ -Stamm ergab, dass der Großteil der Endosomen in Akkumulationen an den minus-Enden der MT konzentriert war. Entsprechend führte die Überexpression von *kin3* zu einer verstärkten Konzentration der Endosomen an den plus-Enden von MT. Die Zellform einzelner

Sporidien war im *kin3*-Deletionsstamm nicht verändert. Allerdings trennten sich die Zellen nach der Teilung wie in der *yup1^{ts}*-Mutante nicht voneinander. Dieser Trennungsdefekt und ein verändertes Knospungsmuster führten zur Bildung von großen Baum-ähnlichen Zellaggregaten. Im Hyphenstadium führte die Deletion von *kin3* außerdem zu einer deutlichen Störung des polaren Wachstums.

Die nach Deletion von *kin3* beobachtete Restbewegung der Endosomen beruhte fast ausschließlich auf der Aktivität des zytoplasmatischen Dyneins von *U. maydis*. Das konventionelle Kinesin von *U. maydis*, Kin2, zeigte ebenfalls einen Einfluss auf die Organisation und Position endosomaler Akkumulationen, obwohl es vermutlich nicht direkt am Transport einzelner Endosomen beteiligt ist.

Die präsentierten Daten zeigen, dass Endosomen MT- und Zellzyklus-abhängig organisiert sind. Die Position der BSDs korrelierte dabei mit Funktionen der Endosomen bei der Zelltrennung, in der Bestimmung des Knospungsmusters und beim polaren Wachstum. Da die MT während des Knospenswachstums unipolar ausgerichtet sind, nutzt die *U. maydis*-Zelle das Wechselspiel des plus-Motors Kin3 und des minus-Motors Dynein, um die Endosomen Zellzyklus-abhängig an den plus- oder minus-Enden der MT zu akkumulieren.

5. Material und Methoden

5.1 Material

5.1.1 Stämme

Ustilago maydis-Stämme:

Tabelle 3: In dieser Arbeit verwendete *U. maydis*-Stämme

Ausgangsstämme

Stamm	Genotyp	Resistenzen ⁷	Referenz
FB1	<i>a1 b1</i>	-	(Bannuett und Herskowitz, 1989)
FB2	<i>a2 b2</i>	-	(Bannuett und Herskowitz, 1989)
FB6a	<i>a2 b1</i>	-	(Bannuett und Herskowitz, 1989)
FB6b	<i>a1 b2</i>	-	(Bannuett und Herskowitz, 1989)
FBD11	<i>a1 a2 b1 b2</i>	-	(Bannuett und Herskowitz, 1989)
SG200	<i>a1 mfa2 bW2 bE</i>	P	(Bölker <i>et al.</i> , 1995b)
FB1otefGFPTub1	<i>a1 b1 potefGFPTub1</i>	C	(Steinberg <i>et al.</i> , 2001)
FB2otefGFPTub1	<i>a2 b2 potefGFPTub1</i>	C	(Steinberg <i>et al.</i> , 2001)
FB2rGFPTub1	<i>a2 b2 prGFPTub1</i>	C	(Steinberg <i>et al.</i> , 2001)
FB2 Δ kin2	<i>a2 b2 Δkin2</i>	H	(Lehmler <i>et al.</i> , 1997)
AB33	<i>a2 P_{nar}bW2 P_{nar}bE1</i>	P	A. Brachman, persönliche Mitteilung
TM2	<i>a2 b2 P_{CRG}kin3</i>	N	T. Müller, persönliche Mitteilung

In dieser Arbeit konstruierte Stämme

Stamm	Genotyp ⁸	Resistenzen	transformiertes Plasmid	Ausgangsstamm
RWS1	<i>a2 b1 yup1^{IS}</i>	-	-	-
RWS2	<i>a1 b2 yup1^{IS}</i>	-	-	-
RWS3	<i>a1 b1 pYup1SG1</i>	C	pYup1SG1	FB1
RWS4	<i>a1 b1 pYup1SG2</i>	C	pYup1SG2	FB1
RWS5	<i>a2 b2 prGFPTub1 pYup1SGBle</i>	C, P	pYup1SGBle	FB2rGFPTub1
RWS16	<i>a2 b2 pKin3GFP1</i>	C	pKin3GFP1	FB2

⁷ Resistenzen sind mit H für Hygromycin, C für Carboxin, P für Phleomycin und N für Nourserythromycin abgekürzt. Sie sind in der Reihenfolge der Einführung angegeben.

⁸ Plasmidnamen im Genotyp bedeuten, dass das gesamte Plasmid ektopisch integriert wurde.

Material und Methoden

RWS24	<i>a2 b2 P_{CRG}yup1</i>	N	pCRGYup1	FB2
RWS28	<i>a2 b2 pKin3GFP2</i>	C	pKin3GFP2	FB2
RWS43	<i>a2 b1 yup1^{ts} pPX10-146</i>	C	pPX10-146	RWS1
RWS46	<i>a1 b1 pYup1^{ts}SG</i>	C	pYup1 ^{ts} SG	FB1
RWS52	<i>a2 b2 Δkin2 Δkin3</i>	H, P	pKin3KOBle	FB2 Δ kin2
RWS59	<i>a2 b2 Δkin3</i>	H	pKin3KOHyg	FB2
RWS75	<i>a2 b2 kin3::myc³</i>	H	pKin3myc	FB2
RWS76	<i>a1 b1 Δkin3</i>	H	pKin3KOHyg	FB1
RWS80	<i>a2 b2 Δkin3 pYup1SGBle</i>	H, P	pYup1SGBle	RWS59
RWS82	<i>a2 b2 Δkin3 pKin3GFP1</i>	H, C	pKin3GFP1	RWS59
RWS84	<i>a2 b2 Δkin3 pKin3GFP2</i>	H, C	pKin3GFP2	RWS59
RWS85	<i>a2 b2 P_{CRG}kin3 pYup1SG2</i>	N, C	pYup1SG2	TM2
RWS90	<i>a2 b2 Δkin2 Δkin3 pYup1SG2</i>	H, P, C	pYup1SG2	RWS52
RWS95	<i>a2 b2 pYup1SG2</i>	C	pYup1SG2	FB2
RWS97	<i>a2 b2 Δkin3 pYup1SG2 pRU4-Kin3</i>	H, B, C	pRU4-Kin3	RWS80
RWS109	<i>a2 b2 Δkin3 potefGFPTub1</i>	H, C	potefGFPTub1	RWS59
RWS110	<i>a2 b2 P_{CRG}kin3 potefGFPTub1</i>	N, C	potefGFPTub1	TM2
RWS114	<i>a2 b2 Δkin2 pYup1SG2</i>	H, C	pYup1SG2	FB2 Δ kin2
RWS125	<i>a1 b1 pKin3YFP</i>	C	pKin3YFP	FB1
RWS128	<i>a1 b1 pKin3YFP pPX10-146CFP</i>	C, H	pPX10-146CFP	RWS125
RWS134	<i>a2 b2 pYup1SG2 P_{CRG}kin2</i>	C, N	pCRGkin2	RWS95
RWS155	<i>a1 b1 pKin3YFP pYFPTub1</i>	C, H	pYFPTub1	RWS125
RWS160	<i>a2 P_{nar}bW2 P_{nar}bE1 Δkin3</i>	P, H	pKin3KOHyg	AB33
RWS162	<i>a2 b2 Δkin2 P_{CRG}kin3 pYup1SG2</i>	H, C, N	pCRGkin3	RWS114
RWS180	<i>a2 b2 Δkin3 P_{CRG}kin2 pYup1SG2</i>	H, B, N	pCRGkin2	RWS80
RWS181	<i>a2 b2 Δkin3 pYup1SG2 potefGFPTub1</i>	H, B, C	potefGFPTub1	RWS80

RWS1: Segregante, die ein temperatursensitives *yup1*-Allel enthält. Der Stamm ist aus der Segregationsanalyse der ursprünglich isolierten FB1-*yup1^{ts}*-Mutante entstanden (siehe 2.1.1). Das *yup1^{ts}*-Allel wurde mittels PCR überprüft (siehe 5.3.6).

RWS2: Segregante, die ein temperatursensitives *yup1*-Allel enthält. Der Stamm ist aus der Segregationsanalyse der ursprünglich isolierten FB1-*yup1^{ts}*-Mutante entstanden (siehe 2.1.1). Das *yup1^{ts}*-Allel wurde mittels PCR überprüft (siehe 5.3.6).

RWS3: Das Plasmid pYup1SG1 wurde mit *SspI* im *cbx*-Resistenzgen linearisiert und ektopisch in den FB1-Stamm integriert. Die Kopiezahl des Inserts wurde nicht bestimmt.

RWS4: Das Plasmid pYup1SG2 wurde mit *SspI* im *cbx*-Resistenzgen linearisiert und ektopisch in den FB1-Stamm integriert. Die Kopiezahl des Inserts wurde nicht bestimmt.

RWS5: Das Plasmid pYup1SGble wurde mit *AlwNI* linearisiert und ektopisch in den FB2rGFPTub1-Stamm integriert. Die Kopiezahl des Inserts wurde nicht bestimmt.

RWS16: Das Plasmid pKin3GFP1 wurde mit *SspI* im *cbx*-Resistenzgen linearisiert und ektopisch in den FB2-Stamm integriert. Die Kopiezahl des Inserts wurde nicht bestimmt.

RWS24: Das Plasmid pCRGYup1 wurde mit *SacII* linearisiert und in den Stamm FB2 transformiert. Dadurch wurde der regulierbare *crg*-Promotor homolog vor das *yup1*-Gen integriert. Die Integration wurde mittels Southern Blot überprüft (Restriktion der genomischen DNA mit *NcoI*; Sonde: 2,0 kb *EcoRI/BglII*-Fragment mit dem *yup1*-Gen aus pCM54-yup2).

RWS28: Das Plasmid pKin3GFP2 wurde mit *SspI* im *cbx*-Resistenzgen linearisiert und ektopisch in den FB2-Stamm integriert. Die Kopiezahl des Inserts wurde nicht bestimmt.

RWS43: Das Plasmid pPX10-146 wurde mit *SspI* im *cbx*-Resistenzgen linearisiert und ektopisch in den RWS1-Stamm integriert. Die Kopiezahl des Inserts wurde nicht bestimmt.

RWS46: Das Plasmid pYup1¹⁸SG wurde mit *SspI* im *cbx*-Resistenzgen linearisiert und ektopisch in den FB1-Stamm integriert. Die Kopiezahl des Inserts wurde nicht bestimmt.

RWS52: Das Plasmid pKin3KOBle wurde mit *SspI* linearisiert und in den Stamm FB2Δkin2 transformiert. Dadurch wurde der Bereich von *kin3*, der für AA 12-885 kodiert, durch die Phleomycin-Resistenzkassette mittels homologer Rekombination ersetzt. Der Austausch wurde mittels Southern Blot überprüft (Restriktion der genomischen DNA mit *EcoRI*; als Sonde dienten zwei PCR-Fragmente: ein 1,3 kb Fragment (mit RS33 und RS11 amplifiziert), das einen Teil des *kin3*-Promotors und den Anfang des *kin3*-Gens enthielt, und ein 0,8 kb Fragment (mit RS23 und RS27 amplifiziert), das das Ende des *kin3*-Gens und die darauf folgende nicht translatierte Region enthielt).

RWS59: Das Plasmid pKin3KOHyg wurde mit *SspI* linearisiert und in den Stamm FB2 transformiert. Dadurch wurde der Bereich von *kin3*, der für AA 12-885 kodiert, durch die Hygromycin-Resistenzkassette mittels homologer Rekombination ersetzt. Der Austausch wurde mittels Southern Blot überprüft (Restriktion der genomischen DNA mit *EcoRI*; als Sonde dienten zwei PCR-Fragmente: ein 1,3 kb Fragment (mit RS33 und RS11 amplifiziert), das einen Teil des *kin3*-Promotors und den Anfang des *kin3*-Gens enthielt, und ein 0,8 kb Fragment (mit RS23 und RS27 amplifiziert), das das Ende des *kin3*-Gens und die darauf folgende nicht translatierte Region enthielt).

RWS75: Das Plasmid pKin3myc wurde mit *BspHI* linearisiert und in den Stamm FB2 transformiert. Dadurch wurde ein *myc*³-Tag über homologe Rekombination mit dem Ende von *kin3* fusioniert. Die Fusion wurde mittels Southern Blot überprüft (Restriktion der genomischen DNA mit *EcoRI*; Sonde: ein 3,2 kb *PstI*-Fragment mit dem 3'-Bereich des *kin3*-Gens aus pUC18-Kin3*PvuII*).BBBBBBBB

RWS76: Das Plasmid pKin3KOHyg wurde mit *SspI* linearisiert und in den Stamm FB1 transformiert. Dadurch wurde der Bereich von *kin3*, der für AA 12-885 kodiert, durch die Hygromycin-Resistenzkassette mittels homologer Rekombination ersetzt. Der Austausch wurde mittels Southern Blot überprüft (Restriktion der genomischen DNA mit *EcoRI*; als Sonde dienten zwei PCR-Fragmente: ein 1,3 kb Fragment (mit RS33 und RS11 amplifiziert), das einen Teil des *kin3*-Promotors und den Anfang des *kin3*-Gens enthielt und ein 0,8 kb Fragment (mit RS23 und RS27 amplifiziert), das das Ende des *kin3*-Gens und die darauffolgende nicht translatierte Region enthielt).

RWS80: Das Plasmid pYup1SGble wurde mit *AlwNI* linearisiert und ektopisch in den RWS59-Stamm integriert. Die Kopiezahl des Inserts wurde nicht bestimmt.

RWS82: Das Plasmid pKin3GFP1 wurde mit *SspI* im *cbx*-Resistenzgen linearisiert und ektopisch in den RWS59-Stamm integriert. Die Kopiezahl des Inserts wurde nicht bestimmt.

RWS84: Das Plasmid pKin3GFP2 wurde mit *SspI* im *cbx*-Resistenzgen linearisiert und ektopisch in den RWS59-Stamm integriert. Die Kopiezahl des Inserts wurde nicht bestimmt.

RWS85: Das Plasmid pYup1SG2 wurde mit *SspI* im *cbx*-Resistenzgen linearisiert und ektopisch in den TM2-Stamm integriert. Die Kopiezahl des Inserts wurde nicht bestimmt.

RWS90: Das Plasmid pYup1SG2 wurde mit *SspI* im *cbx*-Resistenzgen linearisiert und ektopisch in den RWS52-Stamm integriert. Die Kopiezahl des Inserts wurde nicht bestimmt.

RWS95: Das Plasmid pYup1SG2 wurde mit *SspI* im *cbx*-Resistenzgen linearisiert und ektopisch in den FB2-Stamm integriert. Die Kopiezahl des Inserts wurde nicht bestimmt.

RWS97: Das Plasmid pRU4-Kin3 wurde mit *SspI* im *cbx*-Resistenzgen linearisiert und ektopisch in den RWS80-Stamm integriert. Die Kopiezahl des Inserts wurde nicht bestimmt.

RWS109: Das Plasmid potefGFPTub1 wurde mit *SspI* im *cbx*-Resistenzgen linearisiert und ektopisch in den RWS59-Stamm integriert. Die Kopiezahl des Inserts wurde nicht bestimmt.

RWS110: Das Plasmid potefGFPTub1 wurde mit *SspI* im *cbx*-Resistenzgen linearisiert und ektopisch in den TM2-Stamm integriert. Die Kopiezahl des Inserts wurde nicht bestimmt.

RWS114: Das Plasmid pYup1SG2 wurde mit *SspI* im *cbx*-Resistenzgen linearisiert und ektopisch in den FB2 Δ kin2-Stamm integriert. Die Kopiezahl des Inserts wurde nicht bestimmt.

RWS125: Das Plasmid pKin3YFP wurde mit *SspI* im *cbx*-Resistenzgen linearisiert und ektopisch in den FB1-Stamm integriert. Die Kopiezahl des Inserts wurde nicht bestimmt.

RWS128: Das Plasmid pPX10-146CFP wurde mit *SspI* linearisiert und ektopisch in den RWS125-Stamm integriert. Die Kopiezahl des Inserts wurde nicht bestimmt.

RWS134: Das Plasmid pCRGKin2 wurde mit *SspI* linearisiert und in den Stamm RWS95 transformiert. Dadurch wurde der regulierbare *crg*-Promotor homolog vor das *kin2*-Gen integriert. Die Integration wurde im Southern Blot überprüft (Restriktion der genomischen DNA mit *EcoRI*, Sonde: ein 3,0 kb *EcoRI*-Fragment mit dem *kin2*-Gen).

RWS155: Das Plasmid pCFPTub1 wurde mit *AtwNI* linearisiert und ektopisch in den RWS125-Stamm integriert. Die Kopiezahl des Inserts wurde nicht bestimmt.

RWS160: Das Plasmid pKin3KOHyg wurde mit *SspI* linearisiert und in den Stamm AB33 transformiert. Dadurch wurde der Bereich von *kin3*, der für AA 12-885 kodiert, durch die Hygromycin-Resistenzkassette mittels homologer Rekombination ersetzt. Der Austausch wurde mittels Southern Blot überprüft (Restriktion der genomischen DNA mit *EcoRI*; als Sonde dienten zwei PCR-Fragmente: ein 1,3 kb Fragment (mit RS33 und RS11 amplifiziert), das einen Teil des *kin3*-Promotors und den Anfang des *kin3*-Gens enthielt und ein 0,8 kb Fragment (mit RS23 und RS27 amplifiziert), das das Ende des *kin3*-Gens und die darauf folgende nicht translatierte Region enthielt).

RWS162: Das Plasmid pCRGKin3 wurde mit *SspI* linearisiert und in den Stamm RWS114 transformiert. Dadurch wurde der regulierbare *crg*-Promotor homolog vor das *kin3*-Gen integriert. Die Integration wurde mittels Southern Blot überprüft (Restriktion der genomischen DNA mit *EcoRI*; als Sonde dienten zwei PCR-Fragmente: ein 1,3 kb Fragment (mit RS33 und RS11 amplifiziert), das einen Teil des *kin3*-Promotors und den Anfang des *kin3*-Gens enthielt und ein 0,8 kb Fragment (mit RS23 und RS27 amplifiziert), das das Ende des *kin3*-Gens und die darauffolgende nicht translatierte Region enthielt).

RWS180: Das Plasmid pCRGKin2 wurde mit *SspI* linearisiert und in den Stamm RWS80 transformiert. Dadurch wurde der regulierbare *crg*-Promotor homolog vor das *kin2*-Gen integriert. Die Integration wurde im Southern Blot überprüft (Restriktion der genomischen DNA mit EcoRI, Sonde: ein 3,0 kb EcoRI-Fragment mit dem *kin2*-Gen).

RWS181: Das Plasmid potefGFPTub1 wurde mit *SspI* im *cbx*-Resistenzgen linearisiert und ektopisch in den RWS80-Stamm integriert. Die Kopiezahl des Inserts wurde nicht bestimmt.

Bei ektopischer Integration der GFP-Konstrukte wurden stets mindestens 10 Transformanten auf Leuchtintensität, GFP-Lokalisation und Morphologie hin überprüft, um Defekte durch die Integration auszuschließen. Die Lokalisation wurde, wo möglich, bei Transformanten mit besonders hoher und besonders niedriger Leuchtintensität verglichen, um Lokalisationsartefakte durch Überexpression zu erkennen.

***Escherichia coli*-Stämme:**

Für Klonierungen wurde der Stamm DH5 α (Hanahan, 1985) verwendet, ein Derivat von *Escherichia coli* K12: *F*⁻, Φ 80 Δ *lacZ* Δ M15, Δ (*lacZYA-argF*), *U169 endA1, hsdR17* (τ K⁻, mK⁺), *supE44, thi-1, gyrA1, gyrA96, relA1, recA1*.

Für die Isolation von Plasmiden, die anschließend mit methylierungssensitiven Restriktionsenzymen restringiert werden sollten, wurde der Stamm JM110 (STRATAGENE) verwendet: *rpsL* (Str^r) *thr leu thi-1 lacY galK galT ara tonA tsx dam dcm supE44 Δ (*lac-proAB*) [*F*⁺ *traD36 proAB lacI*^r Δ M15]*

Für die heterologe Expression von Proteinen in *E. coli* wurde der Stamm BL21-CodonPlusTM-RIL (STRATAGENE) verwendet, der zusätzliche Kopien der Gene für die *E. coli-argU, ileY* und *leuW tRNA*-Gene trägt: *E. coli B F ompT hsdS*(*rB*⁻ *mB*⁻) *dcm*⁺ *Tet*^r *gal endA Hte* [*argU ileY leuW Cam*^r].

Die Nomenklatur von *E. coli*-Stämmen richtet sich nach (Demerec *et al.*, 1966)

5.1.2 Verwendete Kits

JETSORB® (Genomed) zur Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

JETSTAR® (Genomed) zur Plasmid-Maxipräparation

Megaprime® DNA Labeling System (Amersham) zur radioaktiven Markierung von DNA-Fragmenten

ECL+ Detection Kit® (Amersham) zur Detektion von Proteinen im Western Blot

TOPO TA Cloning® (Invitrogen) zur Klonierung von PCR Produkten

5.1.3 Enzyme, Proteine

Tabelle 4: In dieser Arbeit verwendete Enzyme und Proteine

Name	Hersteller
Albumin (aus Rinderserum)	Sigma
Alkalische Phosphatase (aus Kälberdarm)	Boehringer
AmpliTaQFS	ABI
<i>E. coli</i> DNA-Polymerase I (Klenow Fragment)	Boehringer
L-Lactat-Dehydrogenase	Böhringer
Lysozym (aus Hühnerei)	Boehringer
Novozym 234	Novo Nordisc
<i>Pfu I</i> DNA-Polymerase	Stratagene
Polynukleotidkinase (PNK)	Boehringer
Proteinase K	Boehringer
Pyruvat-Kinase	Boehringer
Restriktionsenzyme	New England Biolabs, Bohringer, Pharmacia
Ribonuklease A (aus Rinderpankreas)	Boehringer
T4 DNA-Ligase	Boehringer
T4 DNA-Polymerase	Boehringer

5.1.4 Nukleinsäuren

Zur Herstellung von CM-Medium (Holliday, 1974) (Bannuett und Herskowitz, 1989) wurde Herings sperma-DNA (Sigma) verwendet.

Als DNA-Größenstandards für die Agarose-Gelelektrophorese dienten λ -DNA PstI- und BstEII-Fragmente (Laborpräparate):

λ -DNA BstEII-Fragmente:	8454 bp	4324 bp	1264 bp
	7242 bp	3675 bp	702 bp
	6369 bp	2323 bp	224 bp
	5686 bp	1929 bp	117 bp
	4822 bp	1371 bp	

λ -DNA PstI-Fragmente:	11509 bp	1700 bp	216 bp
	5077 bp	1159 bp	211 bp
	4749 bp	1093 bp	200 bp
	4507 bp	805 bp	164 bp
	2838 bp	514 bp	150 bp
	2560 bp	468 bp	94 bp
	2459 bp	458 bp	87 bp
	2443 bp	339 bp	72 bp
	2130 bp	264 bp	15 bp
	1936 bp	249 bp	

Tabelle 5: In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide:

Name	Nukleotidsequenz (5'→3')	Zweck ⁹
Reverse	AAC AGC TAT GAC CAT G	SEQ
Universal	GTA AAA CGA CGG CCA GT	SEQ
MB86	GTC GAC TCG GGC GAT GGT G	SEQ, PCR
RS1	GTA CCC ATG GCA CAA ACA CAG CCA	PCR, SEQ
RS2	GTA CTC ATG AAT CCT GCT CCT GCG CCG GCA AAC TTT CTT CCT ATC CC	PCR, SEQ
RS3	AAG GCG ATC GTG ATG CAC GAG	SEQ
RS4	CTG CTA ACC GGG TTT GCG GTG	SEQ
RS11	GTT TCC GCC GAG ACT GTC	SEQ; Klonierung von pCRGKin3, pKin3GFP2 und pET-Kin3
RS22	GGG AAG GCT GAT GAG CTT	SEQ, Klonierung von pKin3myc, pKin3GFP2 und pET-Kin3
RS25	ATC GGT GGA AAT GTG TGA	SEQ; Klonierung von pCRGKin3
RS38	GCT GGA TCC ATG GCC GAC TCG GGC AAC	Klonierung von pKin3GFP2
RS39	GAC CAT GGC TGC TGC TGC GCA AAA CAC ATG GCC CGC	Klonierung von pKin3GFP2
RS40	CGC TGC AGT GTT GCG GGG ATA TGA CG	Klonierung von pCRGYup1
RS41	CAA GTT CCA CTC CAA CTG	Klonierung von pCRGYup1
RS42	CGC TGC AGA TGG CGG AGC TCT ATG G	Klonierung von pCRGKin3

⁹ SEQ: Sequenzierung von DNA, PCR: Polymerase-Kettenreaktion

RS43	GAA CCA TGG CCG ACT CGG GCA AC	Klonierung von pCRGKin3, pET-Kin3
RS44	GCA GAT CTG ATT CGT GAT TGT TGC AG	Klonierung von pCRGKin3
RS45	TAG CGG CCG CGA TGG CGG AGC TCT ATG G	Klonierung von pCRGKin3
RS48	GCA TCC CGG GGC AAA ACA CAT GGC CCG C	Klonierung von pKin3myc
RS50	GAT ACC ATG GCA ATC TCA ATA CCA CGT TAC	Klonierung von pPX10-146 und pPX10-51
RS51	GAT CCA TGG CGA GCC GTA CAA ATT CCG AG	Klonierung von pPX10-146 und pPX43-146
RS52	GAT CCA TGG CGA TAA ACT GCT TGA ACG C	Klonierung von pPX10-51
RS53	GAT CAC GCG TAT TCT AGA AGG CGT CAT G	Klonierung von pKin3myc
RS54	GAT CGA ATT CTT ACG GTC CAA GTG GGA T	Klonierung von pKin3myc
RS55	GAT CCA TGG CGA CGA TAC TCG GAA TTT G	Klonierung von pPX43-146
RS56	CAT GGA TCC GCA AAA CAC ATG GCC CGC	Klonierung von pET-Kin3
RS79	GAG AAT TCC GTA AAT AAT CGT GAA ATA	Klonierung von pCRGKin2
RS80	GAG CGG CCG CGA CTT GGC GGT GTA AGT G	Klonierung von pCRGKin2
RS81	GAA CAT GTC CAA CAA CAT CAA G	Klonierung von pCRGKin2
RS82	GAA AGC TTG GTA GAA GAA ACA GCA CG	Klonierung von pCRGKin2
RS97	AGC CTA GGT CCC TAC GTC GAG	Klonierung von pET-Kin3-U2
RS99	CTG AAT CCT CAG TGG TGG TGG TGG TGG TGC TGC AAC TCG GCC TTG GTG AC	Klonierung von pET-Kin3-U2

5.1.5 Chemikalien

Tabelle 6: In dieser Arbeit verwendete Chemikalien

Name	Quelle	Name	Quelle
Acrylamid	BioRad	IPTG	Sigma
Agarose	SeaKem	Isopropanol	Merck
Agarose (low-melting Type VII)	Sigma	Kaliumacetat	Sigma
p-Aminobenzoesäure	Sigma	Kaliumdihydrogenphosphat	Merck
Ammoniumacetat	Merck	Kaliumnitrat	Merck
Ammoniumsulfat	Baker	Kupfer[II]sulfat	Merck
Ammoniumpersulfat	Merck	Lithiumchlorid	Merck
Ampicillin	Sigma	Lucifer Yellow	Sigma
AMP-PNP	Sigma	Magnesiumchlorid	Merck
Apyrase (aus Kartoffel gradeIII)	Sigma	Magnesiumsulfat	Merck
Arabinose, L(-)	Sigma	Manganchlorid	Merck
ATP	Boehringer	β-Mercaptoethanol	Sigma
Bacto Agar	Difco	Methanol	Merck
Benomyl	Aldrich	MOPS	Sigma
Bisacrylamid	BioRad	Nicotinamid-adenin-dinukleotid	Sigma
Bluo-Gal	Sigma	Natrium-p-Aminosalicylsäure	Sigma
Borsäure	Roth	Natriumacetat	Merck
Bromphenolblau	Merck	Natriumchlorid	Roth

Material und Methoden

Calciumchlorid	Merck	tri-Natriumcitrat	Merck
Calciumpantothenat	Sigma	Natriumdihydrogenphosphat	Roth
Carboxin	Boehringer	Natrium-EDTA	Serva
Casamino Acids	Difco	Natriumhydroxid	Riedel-de Haën
Charcoal	Sigma	Natriumacetat	Merck
CellTracker™ Blue CMAC	MolecularProbes	Natriummolybdat	Merck
Chloramphenicol	Sigma	Natriumsulfat	Merck
Chloroform	Merck	Nikotinsäure	Sigma
Cholinchlorid	Sigma	Nocadazol (Nocodazole)	Sigma
ClonNat	Hans Knöll-Inst. Jena	Paraffin, flüssig	Merck
CMTMRos	MolecularProbes	Pepton	Difco
Coomassie Brilliant Blue	Sigma	Phenol	Fluka
Cytochalasin D	Sigma	Phosphoenolpyruvat (Monokaliumsalz)	Sigma
DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole)	Sigma	PIPES	Sigma
Desoxyribonukleotidtriphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Pharmacia	Polyethylenglycol (PEG4000)	Sigma
Dimethylsulfoxid	Sigma	Poly-L-lysin	Sigma
α - ³⁵ S-dATP	Amersham	Potato Dextrose Broth	Difco
α - ³² P-dCTP	Amersham	RH 414	MolecularProbes
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck	Salzsäure	Merck
Dithiothreitol	Boehringer	SDS	Roth
EGTA	Boehringer	Sorbitol	Sigma
Eisen[III]chlorid	Merck	Sucrose	Merck
Essigsäure	Merck	TEMED	BioRad
Ethanol	Merck	Trizma-Base	Sigma
Ethidiumbromid	Sigm	Trizma-HCl	Sigma
FM4-64	MolecularProbes	Triton X-100	BioRad
Folsäure	Sigma	Trypton	Difco
Formaldehyd (37 %)	Merck	WGA (FITC Konjugat)	Sigma
Formaldehyd (16 %) EM-grade	Sigma	WGA (TRITC Konjugat)	Sigma
Formamid	Merck	Wortmannin	Sigma
Gelatine	Sigma	X-Gal	Sigma
Glukose	Merck	Xylencyanol FF	BioRad
Glycerin (87 %)	Merck	Yeast Extract	Difco
GTP	Sigma	Zinkchlorid	Merck
Harnstoff	BRL		
Heparin	Sigma		
8-Hydroxychinolin	Merck		
Hygromycin B	Boehringer, Duchefa		

5.1.6 Antikörper

Tabelle 7 : In dieser Arbeit verwendete Antikörper

Bezeichnung/Hersteller	Verwendung ¹⁰	Klonalität, Ideotyp, Isotyp
N356 Amersham	IF	mAb, Anti- α -Tubulin, Maus IgG
N 350 Amersham	IF	mAb, Anti-Actin, Maus IgM
111-165-144 Dianova	IF	mAb, Anti-Maus-IgG, konjugiert mit Cy3
111-165-075 Dianova	IF	mAb, Anti-Maus-IgM, konjugiert mit Cy3
von R. Gräf zur Verfügung gestellt	Western Blot	Anti myc

5.1.7 Sonstige Materialien

Dialysefilter VSPW 0,025 μ m (Millipore), Deckgläser (Marienfeld, 18x18 mm, Nr.1), Elektroprotrationsküvetten 0,2 cm (BioRad), Filterpapier 3MM (Whatman), Glasperlen 150-212 microns (Sigma), MicroSpin[®] S-300 Säulen (Pharmacia), Nylonfilter Biodyne[®] B (Pall), Objektträger (Marienfeld, 75x25 mm, geputzt), Papierfilter (S&S 595), Petrischalen (Greiner), 15 ml und 50 ml PPN-Röhrchen (Greiner), QIAGEN-tip[®] 500 (Qiagen), Röntgenfilme CEA RP (CEA) und Kodak X-omat[®] XAR-5 (Kodak), Sigma-cote[®] (Sigma), Sterilfilter 0,20 μ m (Sartorius), Thermalpapier (Hitachi).

5.1.8 Puffer und Lösungen

Tabelle 8: In dieser Arbeit verwendete Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Rezept
AE-Puffer	50 mM Na-Acetat, pH 5,3 10 mM Na ₂ -EDTA in H ₂ O _{bid} .
AE-Phenol (sauer)	Phenol mit 0,18 % (w/w) 8-Hydroxychinolin versetzt und mit AE-Puffer äquilibriert
AE-Phenol/Chloroform	50 % Ae-Phenol 50 % Chloroform
Alkalische Phosphatase-Puffer (10x)	10 mM ZnCl ₂ 10 mM MgCl ₂ 100 mM Tris-HCl, pH 8,3 in H ₂ O _{bid} .

¹⁰ IF: Immunfluoreszenzfärbung

Ampicillin-Lösung	10 mg/ml Ampicillin in H ₂ O _{bid.} , sterilfiltriert
Anodenpuffer I	300 mM Tris/HCl pH 10,4 in H ₂ O _{bid.}
Anodenpuffer II	30 mM Tris/HCl pH 10,4 in H ₂ O _{bid.}
AP100	100 mM PIPES pH 6,9 2 mM MgCl ₂ 1 mM EDTA 1 mM EGTA
Assay Puffer (ATPase)	12 mM Aces KOH pH 6,8 25 mM Kaliumacetat pH 6,85 2 mM Mg-Acetat 0,5 mM EGTA x KOH pH 8,0
Auftragspuffer (DNA, 6x)	50 % (w/v) Sucrose 0,25 % (w/v) Bromphenolblau 0,25 % (w/v) Xylencyanol FF in TE-Puffer (s. u.)
Auftragspuffer (RNA)	0,25 % (w/v) Bromphenolblau 0,25 % (w/v) Xylencyanol FF 50 % Glycerin in 1 x MOPS (s.u.)
Auftragspuffer (SDS Probenpuffer für Protein, 3x)	400 mM Tris/HCl pH 6,8 30 mM DTT 6 % SDS 37,5 % Glycerin 0,006 % Bromphenolblau in H ₂ O _{bid.}
Blocklösung (Western Blot)	0,1 % Azid 0,05 % Tween 5 % Milchpulver in TBS
Carboxin-Lösung	5 mg/ml Carboxin in Methanol
Coomassie-Färbelösung	0,25 % (w/v) Coomassie Brilliantblau R-250 20 % (v/v) Methanol 10 % (v/v) Essigsäure in H ₂ O _{bid.}
CAP-Puffer (10x)	100 mM Tris-HCl, pH 8,5 100 mM NaCl
Heparin-Lösung	15 mg/ml Heparin in H ₂ O _{bid.} , sterilfiltriert
His-Bindepuffer	25 mM Tris-HCl pH 7.5 500 mM NaCl 5 mM Imidazol 0.5 % Triton X-100 in H ₂ O _{bid.}

His-Waschpuffer	25 mM Tris-HCl pH 7.5 500 mM NaCl 50 mM Imidazol 0.1 % Triton X-100 in H ₂ O _{bid} .
His-Eluationspuffer	25 mM Tris-HCl pH 7.5 500 mM NaCl 1 M Imidazol 0.02 % Triton X-100 in H ₂ O _{bid} .
Hygromycin-B-Lösung	50 mg/ml Hygromycin in PBS ₃ , sterilfiltriert
Klenow-Puffer (10x)	100 mM MgCl ₂ 500 mM Tris-HCl, pH 7,5 in H ₂ O _{bid} .
Kathodenpuffer	25 mM Tris/HCl pH 9,4 40 mM ε-NH ₂ -Capronsäure in H ₂ O _{bid} .
Ligase-Puffer (10x)	50 mM MgCl ₂ 660 mM Tris-HCl, pH 7,5 10 mM DTT 10 mM ATP in H ₂ O _{bid} .
Lysispuffer (DNA aus <i>U. maydis</i>)	2 % Triton-X 100 1 % SDS 100mM NaCl 10mM Tris-HCL, pH 8,0 1mM EDTA in H ₂ O _{bid} .
Lysispuffer (RNA)	
Lösung 1	250 mM EGTA 1,25 M NaCl 1 M Tris-HCl, pH 8,5 in H ₂ O _{bid} .
Lösung 2	12 % (w/v) Natrium-p-Aminosalicylsäure in H ₂ O _{bid} . frisch ansetzen
Lösung 3	2 % (w/v) tri-iso-Propylnaphthalensulfonat in H ₂ O _{bid} . frisch ansetzen
Herstellung	Unter Rühren 40 ml Lösung 2 langsam in 40 ml Lösung 3 tropfen lassen, dann 20 ml Lösung 1 hinzugeben; mit NaOH auf pH 8,9 (unter Rühren auf Eis) einstellen (Niederschlagbildung!); vor Gebrauch filtrieren; auf Eis einen Tag haltbar

Lysozym-RNase-Lösung	10 mg/ml Lysozym 10 mM Tris-Cl, pH 8,0 100µg/ml RNase A in H ₂ O _{bid.}
Minilysat III-Lösung	3 M Na-Acetat pH 4,8
MOPS-Puffer (10x)	200 mM MOPS, pH 7,0 80 mM Na-Acetat 10 mM Na ₂ -EDTA in H ₂ O _{bid.}
Northern Hybridisierungspuffer	50 mM PIPES, pH 6,5 100 mM NaCl 50 mM NaPO ₄ , pH 7,0 1mM EDTA 5 % SDS in H ₂ O _{bid.}
Northern Waschpuffer	1 x SSC 5 % SDS in H ₂ O _{bid.}
Novozym-Lösung	12,5 mg/ml Novozym in H ₂ O _{bid.} , sterilfiltriert
PBS 10x	11,2g Na ₂ HPO ₄ x2 H ₂ O pH 7,2 19,7g KH ₂ PO ₄ 1g MgCl ₂ x 7 H ₂ O 2g KCl 80 g NaCl in H ₂ O _{bid.}
PBST	1 x PBS mit 0,05 % Tween 100
PCR-Puffer (10x)	500 mM KCl 15 mM MgCl ₂ 100 mM Tris-Cl, pH 8,3 in H ₂ O _{bid.}
<i>Pfu I</i> -Puffer (10x)	200 mM Tris-HCl, pH 8,8 100 mM KCl 100 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ 20 mM MgSO ₄ 1 % Triton X-100 1 mg/ml BSA
Phenol, alkalisch	dest. Phenol wird mit 0,18 % (w/w) 8-Hydroxychinolin versetzt und mit 0,5 M Tris-HCl, pH 8.0 äquilibriert
Phenol/Chloroform	50 % Phenol 50 % Chloroform

Proteinase K Lösung	50 mM Tris-HCL pH 7,6 0,1 % SDS 50 mM NaCl 100 µg/ml Proteinase K
Proteingel Laufpuffer	25 mM Tris/HCl pH 6,8 200 mM Glycin 0,1 % SDS in H ₂ O _{bid.}
PonceauS	2 % (v/v) PonceauS 30 % (v/v) Trichloressigsäure 30 % (v/v) Schwefelsalicylsäure in H ₂ O _{bid.}
RF1	100 mM RbCl ₂ 50 mM MgCl ₂ 4 H ₂ O 30 mM Kaliumacetat KCl x H ₂ O 15 % Glycerol pH 5,8
RF2	10 mM MOPS 10 mM RbCl ₂ 75 mM KCl 2 H ₂ O 15 % Glycerol pH 5,8
RNA-Hybridisierungspuffer	50 mM PIPES, pH 6,5 100 mM NaCl 50 mM NaPO ₄ , pH 7,0 1 mM Na ₂ EDTA, pH 7,0 5 % (w/v) SDS in H ₂ O _{bid.}
RNA-Waschpuffer	1 x SSC 5 % (w/v) SDS in H ₂ O _{bid.}
RNase A-Lösung	10 mg/ml RNase A 15 mM NaCl 10 mM Tris-Cl, pH 8,0 in H ₂ O _{bid.}
SCS	20 mM Na-Citrat, pH 5,8 1 M Sorbitol in H ₂ O _{bid.} , sterilfiltriert
Southern-Hybridisierungspuffer	500 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,0 7 % (w/v) SDS in H ₂ O _{bid.}

Southern-Waschpuffer	100 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,0 1 % (w/v) SDS in H ₂ O _{bid.}
SSC (20x)	400 mM Na-Citrat, pH 7,0 3 M NaCl in H ₂ O _{bid.}
STC	10 mM Tris-Cl, pH 7,5 100 mM CaCl ₂ 1 M Sorbitol in H ₂ O _{bid.}
STC/PEG	15 g STC (s. o.) 10 g PEG 4000
STET	10 mM Tris-Cl, pH 8,0 100 mM NaCl 1 mM Na ₂ -EDTA 5 % (v/v) Triton X-100 in H ₂ O _{bid.}
TAE (50x)	2 M Tris-Acetat 100 mM Na ₂ -EDTA in H ₂ O _{bid.}
TBE (5x)	500 mM Tris-Borat, pH 7,9 10 mM Na ₂ -EDTA in H ₂ O _{bid.}
TBS	50 mM Tris/HCl pH 7,5 150 mM NaCl in H ₂ O _{bid.}
TE (10x)	100 mM Tris-HCl, pH 7,9 10 mM Na ₂ -EDTA in H ₂ O _{bid.}
VALAP	33 % Vaseline (w/w) 33 % Lanolin (w/w) 33 % Paraffin (w/w)
X-Gal-Lösung	10 mg/ml X-Gal in Dimethylformamid

5.1.9 Medien

Tabelle 9: In dieser Arbeit verwendete Medien

Bezeichnung	Rezept
a) <i>U. maydis</i> -Medien:	
CM-Medium (Holliday, 1974); (Bannuett und Herskowitz, 1989)	1,5 g NH_4NO_3 2,5 g Casamino Acids 0,5 g DNA 1 g Yeast Extract 10 ml Vitamin-Lösung (s. u.) 62,5 ml Salz-Lösung (s. u.) 0,5 ml Spurenelement-Lösung (s. u.) mit H_2O auf 980 ml auffüllen nach dem Autoklavieren 20 ml 50 % (w/v) Glucose zufügen und mit NaOH auf pH 7,0 einstellen
MM-Medium (Holliday, 1974)	62,5 ml Salz-Lösung (s. u.) 0,5 ml Spurenelement-Lösung (s. u.) 1,5 g KNO_3 mit H_2O auf 980 ml aufgefüllt und autoklaviert nach dem Autoklavieren 20 ml 50 % (w/v) Glucose zufügen und mit NaOH auf pH 7,0 einstellen
Salz-Lösung (Holliday, 1974)	8 g KH_2PO_4 2 g Na_2SO_4 1 g $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ mit H_2O auf 1 l aufgefüllt und sterilfiltriert
Spurenelement-Lösung (Holliday, 1974)	60 mg H_3BO_3 191 mg MnCl_2 400 mg ZnCl_2 47 mg $\text{NaMoO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ 140 mg $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ 557 mg $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ Mit H_2O auf 1 l aufgefüllt und sterilfiltriert
Vitamin-Lösung (Holliday, 1974)	100 mg Thiamin 20 mg Calciumpantothenat 50 mg p-Aminobenzoessäure 20 mg Nikotinsäure 20 mg Cholinchlorid 40 mg myo-Inositol 50 mg Folsäure Mit H_2O auf 1 l aufgefüllt und sterilfiltriert

NSY-Glycerin (Cryomedium)	8 g Nutrient Broth 1 g Yeast Extract 5 g Saccharose 800 ml 87 % Glycerin mit H ₂ O auf 1 l aufgefüllt
PD-Medium	24 g Potato Dextrose Broth 20 g Bacto Agar (für Platten) mit H ₂ O auf 1 l aufgefüllt und autoklaviert
Regenerationsagar (Schulz <i>et al.</i> , 1990)	a) Top-Agar: 1,5 % (w/v) Bacto-Agar 1 M Sorbitol in YEPS-Medium (s. u.) b) Bottom-Agar: wie a), zusätzlich Antibiotikum (doppelte Arbeitskonzentration)
YEPS-Medium (Tsukuda <i>et al.</i> , 1988)	10 g Yeast Extract 20 g Pepton 20 g Saccharose mit H ₂ O auf 1 l aufgefüllt
b) <i>E.coli</i> -Medien:	
LB-Medium (Sambrook <i>et al.</i> , 1989)	10 g Trypton 5 g Yeast Extract 10 g NaCl mit H ₂ O auf 1 l aufgefüllt
YT-Medium (Sambrook <i>et al.</i> , 1989)	8 g Trypton 5 g Yeast Extract 5 g NaCl mit H ₂ O auf 1 l aufgefüllt
dYT-Medium (Sambrook <i>et al.</i> , 1989)	16 g Trypton 10 g Yeast Extract 5 g NaCl mit H ₂ O auf 1 l aufgefüllt
dYT-Glycerin (Cryomedium) (Sambrook <i>et al.</i> , 1989)	16 g Trypton 10 g Yeast Extract 5 g NaCl 800 ml 87 % Glycerin mit H ₂ O auf 1 l aufgefüllt

Wenn nicht gesondert vermerkt, wurden alle Medien durch Autoklavieren sterilisiert. Zur Herstellung von Platten wurden 1,5 % Bacto-Agar zugesetzt, für Aktivkohleplatten zusätzlich 10 g/l Charcoal. Zur Plasmidselektion wurden nach dem Autoklavieren und Abkühlen des Mediums auf 60°C Antibiotika in folgenden Arbeitskonzentrationen zugesetzt: 200 µg/ml Hygromycin, 2µg/ml Carboxin 100 µg/ml Ampicillin. Auf Aktivkohleplatten ist wegen der Adsorption der Antibiotika an die Aktivkohle-Oberfläche keine Plasmidselektion durchführbar.

5.1.10 Plasmide

Tabelle 10: In dieser Arbeit verwendete Plasmide

Name	Resistenz marker	Anmerkungen
Ausgangsplasmide		
pUC18/19, pTZ18/19R	A	Klonierungsvektoren (Pharmacia), Blau/Weiß-Selektion ist möglich.
pSL1180	A	Klonierungsvektor (Pharmacia), großer Polylinker
pSP72	A	Klonierungsvektor (Promega)
pBS(+)-SK	A	Klonierungsvektor (Stratagene), Blau/Weiß-Selektion ist möglich.
pCR®2.1-TOPO	A, K	Klonierungsvektor für PCR-Produkte mittels Topoisomeraseaktivität (Invitrogen).
pCM54	A, H	Frei replizierendes Plasmid, das eine Hygromycin-Resistenzkassette und eine UARS (" <i>Ustilago</i> autonomously replicating sequence") enthält (Tsukuda <i>et al.</i> , 1988).
pCM54-Bank	A, H	Genomische DNA von <i>U. maydis</i> wurde partiell mit <i>Sau3A</i> restringiert und Fragmente zwischen 6 kb und 11 kb in die <i>Bam</i> HI-Schnittstelle des pCM54-Vektors inseriert (Bauchwitz und Holloman, 1990).
Cosmidbank pUMcos ^x	A, Cx	Cosmidbank des <i>U. maydis</i> -Stammes FBD 11, erzeugt durch Ligation partiell restringierter <i>Mbol</i> I-Fragmente in die <i>Bam</i> HI-Schnittstelle des Vektors pUMcos. pUMcos ist ein Derivat des Vektors pScos1 (Stratagene), in dem ein <i>Bgl</i> II- <i>Hind</i> III-Fragment, das die Neomycin-Resistenzkassette enthält, durch ein <i>Eco</i> RV- <i>Sma</i> I-Fragment aus dem Vektor pCBX122, das Carboxin-Resistenz in <i>U. maydis</i> vermittelt, ausgetauscht wurde (Bölker <i>et al.</i> , 1995a).
pCBX122	A, Cx	Ein Derivat von pCM54, das anstatt der Hygromycin- eine Carboxin-Resistenzkassette als 3,2 kb <i>Eco</i> RI/ <i>Hind</i> III-Fragment und eine UARS enthält (Keon <i>et al.</i> , 1991).
p123	A, Cx	ein pSP72 Derivat, das eine Cbx-Resistenzkassette und das <i>egfp</i> –Gen (aus pEGFP-N) hinter dem <i>otef</i> -Promotor terminiert durch den <i>nos</i> Terminator enthält (C. Aichinger und R. Kahmann, unveröffentlicht).
pSL-Hyg(+), pSL-Hyg(-)	A, H	Enthält die Hygromycin-Resistenzkassette als 2.896 bp <i>Not</i> I-Fragment in unterschiedlicher Orientierung in die <i>Not</i> I-Schnittstelle von pSL1180 inseriert. Das <i>hph</i> -Gen (aus <i>E. coli</i>) wird von dem <i>hsp70</i> -Promotor und dem <i>hsp70</i> -Terminator flankiert (A. Brachmann, persönliche Mitteilung).
pSLHyg(-)ΔEcoRI	A, H	Im pSL-Hyg(-) Vektor wurde die <i>Eco</i> RI-Schnittstelle in der Hygromycin-Kassette durch eine stille Mutation entfernt (G. Weinzierl, persönliche Mitteilung).

pSL-Cbx(+), pSL-Cbx(-)	A, C	Enthält die Carboxin-Resistenzkassette als 1.939 bp <i>NotI</i> -Fragment in unterschiedlicher Orientierung in die <i>NotI</i> -Schnittstelle von pSL1180 inseriert. Das <i>cbx'</i> -Gen wird von seinem eigenen Promotor und Terminator flankiert (A. Brachmann, persönliche Mitteilung).
pSL-Ble(+), pSL-Ble(-)	A, P	Enthält die Phleomycin-Resistenzkassette als 2.407 bp <i>NotI</i> -Fragment in unterschiedlicher Orientierung in die <i>NotI</i> -Schnittstelle von pSL1180 inseriert. Das <i>ble</i> -Gen (aus <i>Streptoalloteichus hindustanus</i>) wird von dem <i>hsp70</i> -Promotor (aus <i>U. maydis</i>) und dem <i>trpC</i> -Terminator (aus <i>Aspergillus nidulans</i>) flankiert (A. Brachmann, persönliche Mitteilung).
pSL-Nat(+), pSL-Nat(-)	A, N	Aus pSLNat wurde die Nourseothricin-Resistenzkassette als 1.455 bp <i>BamHI/PstI</i> -Fragment ausgeschnitten und in die entsprechenden Stellen in pBS(+)/SK eingefügt (pBS-Nat). Daraus wurde die Kassette als 1.467 bp <i>NotI</i> -Fragment ausgeschnitten und in unterschiedlicher Orientierung in die <i>NotI</i> -Schnittstelle von pSL1180 inseriert. Das <i>natI</i> -Gen (aus <i>Streptomyces noursei</i>) wird von dem <i>gapI</i> -Promotor (aus <i>U. maydis</i>) und dem <i>cycI</i> -Terminator (aus <i>S. cerevisiae</i>) flankiert (A. Brachmann, persönliche Mitteilung).
pSLNat	A, N	pSL1180-Derivat, das ein 1,4 kb <i>XbaI/BglII</i> -Fragment mit der Nourseothricin-Resistenzkassette enthält (C. Aichinger, pers. Mitteilung).
pRU4wt	A, C	Dieses Plasmid besitzt ein pSP72-Rückgrat mit zerstörter <i>SspI</i> -Schnittstelle, 986 bp des <i>narI</i> -Promotors (mit Wildtyp <i>narI</i> -Sequenz am Translations-Startpunkt) und daran anschließend das <i>sgfp</i> -Gen und den <i>nos</i> -Terminator. Es enthält zudem eine 1884 bp große Carboxin-Resistenzkassette (A. Brachmann, persönliche Mitteilung).
pEGFP-N	A, K	enthält das <i>egfp</i> -Gen, Clontech
pEYFP-N1	A, K	enthält das <i>yfp</i> -Gen, Clontech
pECFP-N1	A, K	enthält das <i>cfp</i> -Gen, Clontech
prGFPTub1	A, C	p123-Derivat, das ein <i>egfp-tub1</i> -Fusionskonstrukt hinter dem regulierbaren <i>crg</i> -Promotor trägt (Steinberg <i>et al.</i> , 2001).
potefGFPTub1	A, C	der <i>crg</i> -Promotor aus prGFPTub1 wurde durch den konstitutiven <i>otef</i> -Promotor ersetzt (Steinberg <i>et al.</i> , 2001).
pOTEF-SG	A, C	Enthält den <i>otef</i> -Promotor vor <i>sgfp-TYG</i> und dem <i>nos</i> -Terminator. Zusätzlich befindet sich auf dem Plasmid eine Carboxin-Resistenzkassette zur Selektion in <i>U. maydis</i> (Spelling <i>et al.</i> , 1996).
pNEBUC	A, C	Frei replizierendes Plasmid, das eine Carboxin-Resistenzkassette und eine UARS (" <i>Ustilago</i> autonomously replicating sequence") enthält (G. Weinzierl, persönliche Mitteilung).
pCK152	A	Enthält ein 120 bp <i>BamHI</i> -Fragment, das für ein Triple-Myc-Epitop kodiert (C. Koch, persönliche Mitteilung).

p194	A, C	Enthält den PCR-amplifizierten 3,6 kb <i>crg</i> -Promotor in der <i>Bam</i> HI-Schnittstelle von pSP72. Das ATG liegt in Richtung der <i>Xba</i> I-Schnittstelle. Die Cbx-Resistenzkassette wurde als <i>Eco</i> RV/ <i>Sma</i> I-Fragment in die <i>Eco</i> RV-Schnittstelle von pSP72 kloniert (A. Botin, unveröffentlicht).
pCM54-yup1	A, H	Plasmid aus der pCM54 Bank, das ein 9,7 kb großes Insert mit dem <i>yup1</i> -Gen trägt.
pCM54-yup2	A, H	Plasmid aus der pCM54-Bank, das ein 5,6 kb großes Insert mit dem <i>yup</i> -Gen trägt.
pTZ-EB2,2-Hyg	A, H	Enthält ein 2,2 kb großes <i>Eco</i> RI- <i>Bgl</i> II-Fragment mit dem <i>yup1</i> -Gen aus pCM54-yup2 und eine <i>Hind</i> III-Hygromycin-Resistenzkassette in den entsprechenden Schnittstellen des pTZ19R-Vektors kloniert.
pYup1SG2	A, C	Der <i>yup1</i> -Leserahmen wurde mit den Primern RS1 und RS2 amplifiziert. Dadurch wurden eine <i>Nco</i> I-Schnittstelle am Anfang des Gens und eine <i>Bsp</i> HI-Schnittstelle am Ende des Gens generiert. Das 900 bp <i>Nco</i> I- <i>Bsp</i> HI-Fragment wurde in den mit <i>Nco</i> I geöffneten Vektor pOTEF-SG (Spellig <i>et al.</i> , 1996) ligiert. Dadurch wurde das Fusionskonstrukt unter die Kontrolle des <i>otef</i> -Promotors gesetzt.
pKin3KOBle	A, P	Die Phleomycin-Resistenzkassette wurde als <i>Nor</i> I-Fragment aus pSLBle(-) an die Stelle der Hygromycin-Resistenzkassette von pKin3KOHyg gesetzt. Sie wurde in derselben Orientierung wie das <i>kin3</i> -Gen integriert (T. Müller, persönliche Mitteilung)

In dieser Arbeit konstruierte Plasmide

p123-YFP	A, C	Enthält das <i>yfp</i> -Gen aus pYFP-N als 726 bp <i>Nco</i> I/ <i>Not</i> I-Fragment in die entsprechenden Schnittstellen von p123 kloniert.
p123-CFP	A, C	Enthält das <i>cfp</i> -Gen aus pCFP-N als 726 bp <i>Nco</i> I/ <i>Not</i> I-Fragment in die entsprechenden Schnittstellen von p123 kloniert.
PrGFP _{Tub} Hyg	A, H	Das <i>gfp-tub1</i> -Fusionskonstrukt hinter dem <i>crg</i> -Promotor wurde als 5186 bp <i>Bam</i> HI/ <i>Eco</i> RI-Fragment aus prGFP _{Tub} 1 in den mit <i>Eco</i> RI und <i>Bam</i> HI geöffneten pSLHyg(-) Δ <i>Eco</i> RI-Vektor ligiert.
pYup1SG1	A, C	Ein 1,4 kb großes <i>Hind</i> III- <i>Sph</i> I-Fragment aus pYup1SG1, das den <i>otef</i> -Promotor enthielt, wurde durch ein 1,1 kb großes <i>Hind</i> III- <i>Sph</i> I-Fragment mit dem Wildtyp-Promotor aus pCM54-yup2 ersetzt.
pYup1 ^{IS} SG	A, C	Das <i>yup1^{IS}</i> -Allel wurde mit den Primern RS1 und RS2 aus RWS1 amplifiziert. Dadurch wurden eine <i>Nco</i> I-Schnittstelle am Anfang des Gens und eine <i>Bsp</i> HI-Schnittstelle am Ende des Gens generiert. Das 900 bp <i>Nco</i> I- <i>Bsp</i> HI-Fragment wurde in den mit <i>Nco</i> I geöffneten Vektor pOTEF-SG (Spellig <i>et al.</i> , 1996) ligiert.

pPX10-146, pPX10-51 pPX43-146	A, C	Bereiche, die für Teile der Yup1 PX-Domäne kodieren, wurden mittels PCR amplifiziert (Aminosäuren 10-146 wurden mit RS50 und RS51 amplifiziert, Aminosäuren 10-51 wurden mit RS50 und RS52 amplifiziert, Aminosäuren 43-146 wurden mit RS55 und RS51 amplifiziert), wobei an beiden Enden <i>NcoI</i> -Schnittstellen generiert wurden. Die erzeugten Fragmente wurden dann in den mit <i>NcoI</i> geöffneten p123-Vektor ligiert.
pYup1SGBle	A, P	Das <i>yup1-gfp</i> -Fusionskonstrukt hinter dem <i>otef</i> -Promotor wurde als 2892 bp großes <i>PvuII/EcoRV</i> -Fragment in die <i>EcoRV</i> -Schnittstelle von pSLBle(-) ligiert.
pCRGYup1	A, N	In einer fünf-Fragment-Ligation wurden folgende Fragmente ligiert: ein 952 bp <i>SalI-PstI</i> -Fragment aus dem <i>yup1</i> -Promotor (mit RS40 und MB86 amplifiziert), ein 1455 bp <i>PstI-BamHI</i> -Fragment mit der Nat-Resistenzkassette aus pSL-Nat(-), ein 3524 bp <i>BamHI-NcoI</i> -Fragment mit dem <i>crg</i> -Promotor aus p194, ein 976 <i>NcoI-XbaI</i> -Fragment mit dem <i>yup1</i> -Gen (mit RS1 und RS41 amplifiziert und partiell restringiert ?) und das 2898 bp große <i>XhoI-XbaI</i> -Rückgrat von pBS(+)-SK.
pUC18-Kin3PvuII	A	Enthält ein 9455 bp langes <i>PvuII</i> -Fragment aus dem Cosmid (19C5), das den kompletten <i>kin3</i> -Locus trägt. Diente als Ausgangsplasmid für alle weiteren Konstruktionen.
pUC18-Kin3DraI	A	Enthält das <i>kin3</i> -Gen auf einem 6024 bp <i>DraI</i> -Fragment in der <i>HincII</i> -Schnittstelle von pUC18.
pKin3GFP1	A, C	Enthält das <i>kin3-egfp</i> -Fusionskonstrukt hinter dem nativen <i>kin3</i> -Promotor. Dazu wurden ein 2072 bp <i>KpnI-SphI</i> -Fragment aus pUC18-Kin3PvuII, ein 4265 bp <i>SphI-SacII</i> -Fragment aus pUC18-Kin3PvuII und 516 bp <i>SacII-NcoI</i> -Fragment (PCR mit RS22 und RS39) in einer 4-Fragment-Ligation in den mit <i>KpnI</i> und <i>NcoI</i> geöffneten p123-Vektor ligiert.
pKin3GFP2	A, C	Enthält das <i>kin3-egfp</i> -Fusionskonstrukt hinter dem <i>otef</i> -Promotor. Dazu wurden ein 263 bp <i>BamHI-SphI</i> -Fragment (PCR mit RS38 und RS11), ein 4265 bp <i>SphI-SacII</i> -Fragment aus pUC18-Kin3PvuII und ein 516 bp <i>SacII-NcoI</i> -Fragment (PCR mit RS22 und RS39) in einer 4-Fragment-Ligation in den mit <i>BamHI</i> und <i>NcoI</i> geöffneten p123-Vektor ligiert.
p123-Kin3YFP	A, C	Das <i>yfp</i> -Gen wurde als 723 bp <i>NcoI-NotI</i> Fragment aus p123-YFP geschnitten und in einer 3-Fragment-Ligation mit einem 10069 bp <i>NotI-SacII</i> -Fragment sowie einem 516 bp <i>SacII-NcoI</i> -Fragment aus p123Kin3GFP2 ligiert.

pCRGKin3	A, N	Das Konstrukt wurde in zwei Schritten erstellt. Zunächst wurden in einer 5-Fragment-Ligation ein 650 bp <i>EcoRI-PstI</i> Fragment (PCR mit RS25 und RS42, partiell restringiert), ein 1455 bp <i>PstI-BamHI</i> -Fragment aus pSLNat(-), ein 3524 bp <i>BamHI-NcoI</i> -Fragment aus p194 und ein 749 bp <i>NcoI-SalI</i> -Fragment (PCR mit RS43 und RS11, partiell restringiert) zwischen die <i>EcoRI</i> - und <i>SalI</i> -Schnittstellen von pUC18 ligiert. Anschließend wurde aus diesem Vorkonstrukt ein 6324 bp <i>NotI-SspI</i> -Fragment mit einem 962 bp <i>BglII-NotI</i> -Fragment (PCR mit RS44 und RS45) und einem 2072 bp <i>SspI-BamHI</i> -Fragment aus pUC18 ligiert.
pKin3KOHyg	A, H	Eine 2936 bp <i>BstWI-NsiI</i> -Hygromycin-Resistenzkassette wurde aus pSLHyg(-) zwischen die <i>BstWI</i> - und <i>NsiI</i> -Schnittstellen von pUC18-Kin3 <i>DraI</i> ligiert.
pKin3myc	A, H	Ein 506 bp <i>SacII-XmaI</i> -Fragment (PCR mit RS22 und RS48, 5'-Flanke) wurde mit einem 270 bp <i>XmaI-KpnI</i> -Fragment aus pCK152 (<i>myc</i> ³ -Tag), der 2991 bp <i>KpnI-MluI</i> -Hyg-Kassette aus pSLHyg(+) und einem 615 bp <i>MluI-EcoRI</i> -Fragment (PCR mit RS53 und RS54, 3'-Flanke) in den mit <i>SacII</i> und <i>EcoRI</i> geöffneten pBS(+)-SK-Vektor ligiert.
p123PX10-146CFP	A, C	Die PX-Domäne aus Yup1 wurde als 414 bp großes <i>NcoI</i> -Fragment aus pPX10-146 in die <i>NcoI</i> -Schnittstelle von p123-CFP ligiert.
pPX10-146CFP	A, H	Ein 2388 bp großes <i>EcoRV-PvuII</i> -Fragment mit dem <i>yup1-cfp</i> -Fusionskonstrukt hinter dem <i>otef</i> -Promotor wurde aus p123PX10-146CFP ausgeschnitten und in die <i>EcoRV</i> -Schnittstelle von pSLHyg(+) ligiert.
pCFPTub1	A, H	Das Plasmid trägt das <i>cfp-tub1</i> -Fusionskonstrukt hinter dem <i>otef</i> -Promotor und eine Hygromycin-Resistenzkassette. Dazu wurden ein 1558 bp <i>KpnI-AvaII</i> -Fragment aus p123-CFP (<i>otef</i> -Promotor + CFP), ein 1199 bp <i>AvaII-SphI</i> -Fragment aus prGFPTub1Hyg und das 6778 bp <i>SphI-KpnI</i> -Rückgrat von prGFPTubHyg in einer 3-Fragment-Ligation zusammen ligiert.
pCRGKin2	A, N	Mit den Primern RS79 und RS80 wurden 686 bp des <i>kin2</i> -Promotors als <i>EcoRI-NotI</i> -Fragment bis zum Translationsstart amplifiziert. Desgleichen wurde ein 609 bp <i>AflII-HindIII</i> -Fragment ab dem ATG mit den Primern RS81 und RS82 amplifiziert. Diese Fragmente wurden dann in einer 5-Fragment-Ligation mit einem 1449 bp <i>NotI-BamHI</i> -Fragment und einem 3524 bp <i>BamHI-NcoI</i> -Fragment aus pCRGKin3 (enthalten zusammen eine Nat-Resistenzkassette und den <i>crg</i> -Promotor) und dem 2812 bp <i>HindIII-EcoRI</i> -Rückgrat von pTZ19R ligiert. Das erhaltene Plasmid diente zur Integration des regulierbaren <i>crg</i> -Promotors vor das <i>kin2</i> -Gen.

pRU4-Kin3	A, C	pRU4wt wurde mit <i>HpaI</i> und <i>EcoRI</i> geöffnet. Nach Auffüllen der <i>EcoRI</i> -Schnittstelle wurde in dieses Plasmidrückgrat ein <i>PvuII</i> -Fragment aus pNEBUC-Kin3 ligiert, das das <i>kin3</i> -Gen hinter dem nativen Promotor enthielt.
pNEBUC-Kin3	A, C	Enthält den gesamten <i>kin3</i> -Locus als <i>PvuII</i> -Fragment aus pUC18-Kin3PvuII, der in die <i>SmaI</i> -Schnittstelle von pNEBUC integriert wurde.
pET-Kin3	A	Enthält das gesamte Kin3-Gen im pET15b-Vektor. Dazu wurden ein 259 bp <i>NcoI-SphI</i> -Fragment (PCR mit RS43 und RS11), ein 4265 bp <i>SphI-SacII</i> -Fragment aus pUC18Kin3PvuII, ein 506 bp <i>SacII-BamHI</i> -Fragment (PCR mit RS22 und RS56, partiell restringiert) in das 5638 bp <i>BamHI-NcoI</i> -Rückgrat von pET15b ligiert.
pET-Kin3-U2	A	In den mit <i>AvrII</i> und <i>BamHI</i> geöffneten pET-Kin3-Vektor wurde ein 787 bp <i>AvrII-BamHI</i> -Fragment (PCR mit RS97 und RS99) ligiert. Dadurch wurden lediglich der Motorkopf und der Motorhals von Kin3 exprimiert
pCK152	A	Enthält ein 120 bp <i>BamHI</i> -Fragment, das für ein Triple-Myc-Epitop kodiert (C. Koch, persönliche Mitteilung).

5.2 Mikrobiologische und genetische Methoden

5.2.1 *Escherichia coli*

Kultivierung von *E. coli*

E. coli-Stämme wurden entweder als Schüttelkulturen bei 200 Upm oder auf Festmedien unter aeroben Bedingungen bei 37 °C kultiviert. Übernachtskulturen wurden von YT-Amp-Festmedien angeimpft. Die bei -80 °C gelagerten Glycerinkulturen wurden vor weiteren Arbeiten immer zuerst auf YT-Amp-Festmedien ausgestrichen.

Bestimmung der Zelldichte bei *E. coli*

Die Zelldichte von Flüssigkulturen wurde photometrisch in einem Novospec II-Photometer (Pharmacia Biotech) bei 600 nm bestimmt. Um eine lineare Abhängigkeit sicherzustellen, wurden für die Messung die OD₆₀₀ der Kulturen durch entsprechende Verdünnung auf einen Wert unterhalb von 0,8 verdünnt. Als Nullwert wurde die OD₆₀₀ des jeweiligen Kulturmediums verwendet. OD₆₀₀ = 1,0 entspricht etwa 10⁹ Zellen/ml.

Transformation von RbCl₂-behandelten *E. coli*-Zellen (modifiziert nach (Cohen *et al.*, 1972))

Zur Herstellung transformationskompetenter Bakterienzellen wurden 100 ml LB-Medium, dem je 10 mM MgCl₂ und MgSO₄ zugesetzt waren, mit 1 ml einer frischen DH5 α -Übernachtskultur angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5-0,7 bei 37 °C und 200 Upm inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugieren für 15 min bei 3.000 Upm und 4 °C (Heraeus Varifuge 3.0R) pelletiert und in 33 ml eiskalter RF1-Lösung resuspendiert. Nach 30 bis 60 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen erneut abzentrifugiert (15 min, 3.000 Upm, 4 °C, Heraeus Varifuge 3.0R), der Überstand abgenommen, die Zellen in 5 ml eiskalter RF2-Lösung resuspendiert und 15 min inkubiert. Die Zellsuspension wurde zu je 100 μ l aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

Zur Transformation wurden die Zellen auf Eis aufgetaut, jeweils 50 μ l mit 10 μ l Plasmidlösung (1-5 ng Plasmid) bzw. Ligationsansatz versetzt und 15 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock von 2 min bei 42 °C wurde der Transformationsansatz zur phänotypischen Expression der durch das eingebrachte Plasmid vermittelten Antibiotika-Resistenz mit 800 μ l dYT-Medium versetzt und 30 min bei 500 Upm und 37 °C in einem Eppendorf-Wärmeblock inkubiert. 200 μ l des Transformationsansatzes wurden auf YT-Platten mit 100 μ g/ml Ampicillin ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Auf diese Weise konnte eine Transformationsrate von 10⁶ Transformanten pro 1 μ g eingesetzter Plasmid-DNA erreicht werden.

Elektroporations-Transformation von *E. coli*

Eine frische Übernachtskultur von *E. coli* DH5 α wurde 1:100 in 500 ml LB-Medium verdünnt und bei 37 °C und 200 Upm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5-0,7 geschüttelt. Die Zellen wurden dann für 15-30 min auf 0 °C heruntergekühlt und anschließend abzentrifugiert (300 Upm, 15 min, 4°C, Heraeus Varifuge 3.0R). Das Pellet wurde in 500 ml kaltem Wasser resuspendiert, abzentrifugiert, erneut in kaltem Wasser (250 ml) resuspendiert und wieder pelletiert. Anschließend wurden die Zellen in 10 ml kaltem 10 %-igen Glycerin resuspendiert, abzentrifugiert und schließlich in 0,5-1 ml kaltem 10 %-igen Glycerin aufgenommen. Die Transformations-kompetenten Zellen wurden aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C aufbewahrt.

Zur Transformation wurden die elektrokompententen Zellen langsam auf Eis aufgetaut. 40 μ l Zellsuspension wurden mit bis zu 5 μ l DNA aus einem Ligationsansatz gemischt und 1 min

auf Eis inkubiert. Der Transformationsansatz wurde daraufhin in eine vorgekühlte 0,2 cm breite Elektroporationsküvette überführt und die Küvette in die vorgesehene Halterung des Gene Pulsers gestellt (Gene Pulser, BioRad). Direkt danach wurde der Puls ausgelöst (25 mF, 2,5 kV, 200 W). Die Entladungszeit sollte zwischen 4 und 5 ms liegen. Im Anschluß an die Entladung wurde sofort 1 ml SOC-Medium in den Transformationsansatz pipettiert. Die Zellen wurden zur Regeneration 45 min bei 37 °C inkubiert und anschließend auf YT-Amp-Platten ausgestrichen.

5.2.2 *Ustilago maydis*

Kultivierung von *U. maydis*

U. maydis-Stämme wurden entweder als Schüttelkulturen bei 200 Upm oder auf Festmedien unter aeroben Bedingungen bei 28 °C kultiviert, sofern nicht anders vermerkt. Übernachtskulturen wurden von Kulturen auf Festmedien, die weniger als einen Monat bei 4 °C gelagert wurden, angeimpft. Die bei -80 °C gelagerten Glycerinkulturen wurden vor weiteren Arbeiten immer zuerst auf Festmedien ausgestrichen.

Bestimmung der Zelldichte bei *U. maydis*

Die Zelldichte von Flüssigkulturen wurde photometrisch in einem Novospec-II-Photometer (Pharmacia Biotech) bei 600 nm bestimmt. Um eine lineare Abhängigkeit sicherzustellen, wurden für die Messung die OD₆₀₀ der Kulturen durch entsprechende Verdünnung auf einen Wert unterhalb von 0,8 verdünnt. Als Nullwert wurde die OD₆₀₀ des jeweiligen Kulturmediums verwendet. Bei Wildtypstämmen entsprach eine OD₆₀₀ von 1,0 etwa $1-5 \times 10^7$ Zellen/ml.

Transformation von *U. maydis*

Dieses Protokoll ist modifiziert nach (Schulz *et al.*, 1990) und (Gillissen *et al.*, 1992).

50ml einer frischem *U. maydis*-Kultur wurden bei 28 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,3-0,8 bei 200 Upm angezogen. Die Zellen wurden dann durch 8 min Zentrifugation bei 2.800 Upm (4 °C; Heraeus Zentrifuge 3.0R) pelletiert. Nach einmaligem Waschen in 25 ml SCS wurden diese in 2 ml SCS mit 3,5 mg/ml Novozym resuspendiert. Die Protoplastierung wurde unter dem Mikroskop verfolgt bis nach 10-30 min etwa 30 % der Zellen protoplastiert waren. Dann wurden 10 ml SCS zugegeben und die Protoplasten 10 min bei 2.300 Upm (4 °C, Heraeus Varifuge 3.0R) pelletiert. Um das Novozym vollständig zu entfernen, wurden die Zellen

zweimal in 10 ml SCS und anschließend in 10 ml STC gewaschen, bevor sie in 0,5 ml eiskaltem STC aufgenommen wurden. Die Protoplasten wurden entweder bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt (bis zu 1 Jahr) oder innerhalb von 3-4 h transformiert.

Zur Transformation von integrativen Plasmiden wurden 50 μl Protoplasten mit etwa 5 μg linearisierter Plasmid-DNA (in 5-20 μl) und 1 μl Heparin-Lösung für 10 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 0,5 ml STC/PEG folgte eine weitere Inkubation von 15 min auf Eis. Anschließend wurde der gesamte Transformationsansatz auf einer entsprechend selektiven Regenerations-Platte (kurz vorher mit Top-Agar überschichtete Hyg- oder Cbx-Bottom-Agarplatte) ausgestrichen. Nach 2 bis 5 Tagen Inkubation bei $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ wurden die gewachsenen Kolonien mit Zahnstochern auf frischen PD-Platten mit Hygromycin bzw. Carboxin vereinzelt.

Test auf filamentöses Wachstum (Puhalla, 1968)

U. maydis-Stämme wurden in Flüssigmedium bei $29\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zu einer OD_{600} von 0.5-1.0 inkubiert. Die Zellen wurden geerntet (Zentrifugieren bei 2.800 Upm für 7 min bei RT in der Heraeus-Varifuge 3.0R) und das Pellet anschließend in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid}}$ so aufgenommen, dass die Zelldichte bei einer OD_{600} von etwa 5,0 lag. Bei Kreuzungen wurden gleiche Volumina der jeweiligen Kreuzungspartner in einem Eppendorf-Gefäß miteinander gemischt. Von jedem Ansatz wurden 3 μl auf eine PD-CC-Platte getropft. Die Platte wurde für 12-24 h bei $21\text{ }^{\circ}\text{C}$ unter Luftabschluß inkubiert. Anschließend wurde der Kreuzungsversuch anhand der Filamentbildung ausgewertet.

Test auf Pathogenität (Gillissen *et al.*, 1992)

Logarithmisch wachsende *U. maydis*-Kulturen wurden abzentrifugiert (5 min bei 2.800 Upm) und zu einer OD_{600} von 5,0 in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid}}$ resuspendiert. Gleiche Volumina der zu testenden Kreuzungspartner wurden vermischt. Etwa 1 ml dieser Suspension wurde in junge Pflanzen von *Zea mays* ?cv. Golden Bantam (7 Tage alt) mittels einer 1 ml Spritze und einer 26GA3/80.45x10-Kanüle inokuliert. Die Pflanzen wuchsen im Gewächshaus unter kontrollierten Bedingungen (15/6 Stunden Tag/Nacht bei min. 40.000 Lux Beleuchtungsstärke, Temperatur Tag: $26-30\text{ }^{\circ}\text{C}$, Nacht : $16-20\text{ }^{\circ}\text{C}$). Die Entwicklung von Symptomen (Antocyanfärbung und Gallenbildung) wurde über 2-3 Wochen verfolgt. Nach etwa zwei Wochen konnten meist die Gallen geerntet werden.

Sporulation und Segregationsanalyse

Von den infizierten Pflanzen wurden Tumore abgeschnitten und etwa eine Woche bei 37 °C getrocknet. Die aus den Tumoren präparierten Sporen wurden 15 min in einer 1,5 %igen CuSO₄-Lösung inkubiert, um eventuell noch vorhandene Sporidien abzutöten und anschließend mit H₂O_{bid} gewaschen. Verdünnungen dieser Sporensuspension wurden auf PD-Platten ausplattiert, denen Chloramphenicol, Kanamycin und Tetracyclin zugesetzt waren, um bakterielle Kontaminationen zu entfernen. Die aus einer Spore auswachsenden Sporidien wurden vereinzelt und der Genotyp durch Testkreuzungen mit den Stämmen FB1 (*a1 b1*), FB2 (*a2 b2*), FB6b (*a1 b2*) und FB6a (*a2 b1*) bestimmt. Als Schnelltest zum Nachweis für erfolgreiche Meiose können die aus einer Spore entstandenen Kolonien auch direkt auf PD-CC-Festmedium vereinzelt werden. Bereiche mit hoher Koloniedichte müssen filamentös erscheinen; dicht nebeneinander liegende Kolonien in der Hälfte der Fälle an der Kontaktstelle Filamentbildung zeigen, in der anderen Hälfte der Fälle dagegen nicht, und einzeln liegende Kolonien müssen eine glatte Koloniemorphologie aufweisen

5.3 Molekularbiologische Methoden

Alle Standardmethoden sind in (Sambrook *et al.*, 1989) beschrieben.

5.3.1 Handhabung von Nukleinsäuren

Fällung von Nukleinsäuren

Die Reinigung und Konzentrierung von Nukleinsäuren aus wässrigen Lösungen erfolgte durch Fällung. Hierfür wurden zur Probe 1/10 Volumen 3 M Na-Acetat pH 5,3 und das 2,5-fache Volumen an kaltem Ethanol zugegeben, gemischt und für 1 h bei -20 °C gefällt. Das Präzipitat wurde durch 10- bis 20-minütiges Zentrifugieren (22.000 Upm, 4 °C, Beckmann Avanti[®]30 Zentrifuge) pelletiert. Der Niederschlag wurde mit 70 % Ethanol gewaschen, um Salze zu entfernen. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet getrocknet und in einem kleinen Volumen Wasser oder TE-Puffer gelöst.

Phenol/Chloroform-Extraktion von DNA

Proteine und andere Verunreinigungen wurden aus wässrigen DNA-Lösungen durch Extraktion mit PC entfernt. Die Probe wurde mit dem selben Volumen PC kräftig gemischt. Die Phasentrennung erfolgte durch Zentrifugation (22.000 Upm, 5 min, Beckmann Avanti®30 Zentrifuge) und Überführung der oberen wässrigen Phase in ein neues Reaktionsgefäß. Die so gereinigten Nucleinsäuren wurden anschließend mit Ethanol präzipitiert.

Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäuren

Die Konzentration von Nucleinsäuren erfolgte photometrisch. Bei einer Wellenlänge von 260nm und einer Schichtdicke von 1 cm entspricht ein Absorptionswert von 1,0 einer Konzentration von etwa 50 µg/ml doppelsträngiger DNA und 40 µg/ml einzelsträngiger DNA oder RNA.

Als Maß für die Reinheit der Desoxyribonucleinsäuren diente der Quotient aus den Optischen Dichten bei den Wellenlängen 260 nm und 280 nm. Für reine DNA und RNA sollte er bei etwa 1,8 liegen. Niedrigere Werte deuten Verunreinigungen mit Proteinen; höhere Werte Verunreinigungen mit Salzen oder Zuckern an. Die Messungen erfolgten in einem Lambda-Bio UV-Spektralphotometer (Perkin Elmer).

5.3.2 Isolierung von Nucleinsäuren

Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Isolierung erfolgte nach der Methode „Lyse durch Kochen“. 1,5 ml einer *E. coli*-Übernachtskultur wurden 30 s bei 13.000 Upm (RT, Heraeus Biofuge pico) pelletiert. Das Zellpellet wurde in 350 µl STET resuspendiert, nach Zugabe von 30 µl Lysozym-RNase-Lösung kräftig geschüttelt und anschließend 50 s bei 95 °C in einem Heizblock inkubiert. Die lysierten Zellen und die denaturierte DNA wurden 10 min bei 13.000 Upm abzentrifugiert (Heraeus Biofuge pico) und danach mit einem sterilen Zahnstocher aus der wässrigen Lösung entfernt. Die Reinigung der Plasmid-DNA erfolgte durch Fällung mit 40 µl 3 M Na-Acetat, pH 5,3 und 420 µl Isopropanol bei RT für 5 min und anschließende Zentrifugation für 5 min bei 13.000 Upm (Heraeus Biofuge pico). Das Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen und nach Trocknung in 50–100 µl TE-Puffer aufgenommen. Mit dieser Methode gelang es routinemäßig aus 1,5 ml Übernachtskultur 50-100 µg Plasmid-DNA zu isolieren.

DNA-Isolierung aus *U. maydis*

Die Methode ist modifiziert nach (Hoffman und Winston, 1987). 15 ml einer Übernachtskultur wurden pelletiert, der Überstand abgegossen und das Pellet in der restlichen Flüssigkeit resuspendiert. Es wurden 200 µl *Ustilago*-Lysis Puffer, 400 µl PC und 0,3 g Glasperlen zugegeben. Die Proben wurden für 10 min auf einem Vibrax-VXR-Schüttler (AKI) geschüttelt. Es folgte eine Zentrifugation für 15 min bei 13.000 Upm. 400 µl des Überstands wurden in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und mit 1 ml Ethanol gefällt. Nach Zentrifugation für 2 min bei 13.000 Upm wurde der Überstand abgenommen und das Pellet in 1 ml 70 % Ethanol gewaschen. Nach einer weiteren zweiminütigen Zentrifugation bei 13.000 Upm wurde das Pellet in 50–100 µl TE/RNase resuspendiert und bei 4 °C aufbewahrt.

RNA-Isolierung aus *U. maydis*-Flüssigkulturen

Diese Methode ist modifiziert nach (Schmitt *et al.*, 1990). Zellen von einer frischen Platte wurden aus einer Vorkultur in 20 ml Medium angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bei 29 °C und 200 Upm inkubiert. 15 ml dieser Kultur wurden abzentrifugiert (3.000 Upm, 10 min, RT, Heraeus Varifuge 3.0R) und das Pellet in 600 µl AE-Puffer mit 1 % (w/v) SDS resuspendiert. Anschließend wurden 600 µl AE-Phenol zugegeben und die Probe 20 s kräftig geschüttelt. Der Zellaufschluß erfolgte bei 65 °C für 4 min unter ständigem Schütteln (Eppendorf-Thermomixer). Im Anschluß daran wurde die Probe auf –80 °C abgekühlt, bis sich Phenolkristalle bildeten (etwa 4 min). Nach Phasentrennung durch Zentrifugieren (22.000 Upm, 20 min, 4 °C, Beckman Avanti30-Zentrifuge) wurde die obere, wässrige Phase mit der RNA in ein neues Gefäß überführt. Es folgte eine Extraktion mit 600 µl AE-Phenol/Chloroform. Die wässrige RNA-Lösung (400 µl) wurde danach mit 40 µl 3 M Na-Acetat pH 5,3 versetzt und mit 1 ml Ethanol gefällt (1 h bei –20 °C). Nach Zentrifugation (22.000 Upm, 20 min, 4 °C, Beckman Avanti30-Zentrifuge) wurde die RNA mit 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet, in 20 µl H₂O_{bid} aufgenommen und bei –80 °C aufbewahrt. Zur Kontrolle und Konzentrationsabschätzung wurde 1 µl auf einem 1 %igen TBE-Agarosegel analysiert und photometrisch bei 260 nm gemessen.

Maxipräparation von Plasmid-DNA aus *E.coli*:

Die Maxiplasmidpräparation erfolgte nach dem JETSTAR[®]-Kit von Genomed. Dabei wurde das Protokoll des Herstellers verwendet.

5.3.3 *in vitro*-Modifikationen von DNA

Restriktion von DNA

Zur Spaltung von doppelsträngiger DNA wurden Typ II-Restriktionsendonukleasen unter den vom Hersteller empfohlenen Pufferbedingungen eingesetzt. Nach der Restriktion wurden dem Ansatz 1/10 Volumen Auftragspuffer zugesetzt und die Reaktionsprodukte auf TBE- oder TAE-Agarosegelen analysiert.

Dephosphorylierung linearer DNA-Fragmente

5'-terminale Phosphatgruppen wurden mit Alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm abgespaltet. Da DNA-Stränge ohne 5'-terminale Phosphatgruppen nicht religieren können, kann so die Religation von linearisierter Plasmid-DNA verhindert werden. Ein typischer Reaktionsansatz enthielt: 1 µg Plasmid-DNA, 1 U Alkalische Phosphatase und 4,5 µl Alkalische Phosphatase-Puffer in 45 µl Reaktionsvolumen. Der Ansatz wurde zweimal 15 min bei 60 °C inkubiert und zwischendurch noch einmal 1 U Alkalische Phosphatase zugegeben. Zur Inaktivierung des Enzyms wurde eine Extraktion mit 50 µl PC durchgeführt. Die DNA wurde über ein Agarosegel gereinigt oder durch Zugabe von 10 µl Na-Acetat, pH 5,3 und 250 µl Ethanol gefällt, mit 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in TE-Puffer aufgenommen.

Ligation von DNA-Fragmenten

Doppelsträngige DNA-Fragmente wurden mit Hilfe der T4 DNA-Ligase kovalent verknüpft. Das zu klonierende Fragment wurde in der Regel in fünffachem molarem Überschuß gegenüber der dephosphorylierten linearisierten Plasmid-DNA eingesetzt. Ein typischer Reaktionsansatz enthielt:

100 ng linearisierter, dephosphorylierter Vektor
fünffacher molarer Überschuß an linearem Fragment
1U T4 DNA-Ligase
in 10 µl Ligase-Puffer

Der Ansatz wurde entweder 1-4 h bei RT oder über Nacht bei 16 °C inkubiert. Für eine anschließende Transformation durch Elektroporation wurde der Ansatz für 45 min gegen 10 % Glycerin dialysiert (Dialysefilter, Millipore).

Auffüllen von 5'-überhängenden DNA-Fragmentenden

Das Klenow-Fragment der *E. coli* DNA-Polymerase I ist in der Lage, 5'-überhängende DNA-Fragmentenden in Anwesenheit von Desoxyribonukleotiden und Magnesiumionen (mindestens 5 mM) aufzufüllen und glatte Enden zu erzeugen. Die Reaktion kann in allen herkömmlichen Restriktionspuffern durchgeführt werden.

Ein typischer Reaktionsansatz enthielt:

1 µg lineare DNA in beliebigem Restriktionspuffer

50 µM dNTPs

1 U Klenow-Fragment der *E. coli* DNA-Polymerase I

Der Ansatz wurde 15 min bei RT inkubiert. Das Enzym wurde anschließend durch Inkubation bei 75 °C für 10 min hitzeinaktiviert. Die behandelten DNA-Fragmente konnten direkt in eine Ligationsreaktion eingesetzt werden.

Entfernen von 3'-überhängenden DNA-Fragmentenden

Die T4-DNA-Polymerase ist in der Lage, vom 3'-Ende linearer DNA-Fragmente Nukleotide abzuspalten. Diese Aktivität steht im Gleichgewicht mit einer 5'→3'-Polymeraseaktivität. Um sicherzustellen, dass nur die 3'-überhängenden Nukleotide abgespaltet werden, muss die Reaktion in Anwesenheit eines großen Überschusses an Desoxyribonukleotiden und bei niedriger Temperatur durchgeführt werden. Die Reaktion kann in allen herkömmlichen Restriktionspuffern stattfinden. Im idealen Fall sind die Reaktionsprodukte DNA-Fragmente mit glatten Enden.

Ein typischer Reaktionsansatz enthielt:

1 µg lineare DNA

0,1 mM dNTPs

1 U T4 DNA-Polymerase

Der Ansatz wurde 10 min bei 12 °C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Phenol/Chloroform-Extraktion zur Inaktivierung des Enzyms. Nach einem Fällungsschritt wurde die DNA in TE-Puffer aufgenommen.

5.3.4 Auftrennung und Nachweis von Nukleinsäuren

Nicht-denaturierende Agarose-Gelelektrophorese

In einem Agarosegel können Nukleinsäuren im elektrischen Feld entsprechend ihrer Größe aufgetrennt, identifiziert und isoliert werden. In der Regel wurden Gele mit 1 % Agarose hergestellt. Hierfür wurde die entsprechende Menge an Agarose in 1 x TAE- oder 0,5 x TBE-Puffer aufgekocht, nach Abkühlung auf etwa 60 °C mit Ethidiumbromid versetzt (Endkonzentration 0,5 µg/ml) und in einen Elektrophoreseschlitten gegossen. Nach Erstarren des Gels wurde die Gelkammer mit 1 x TAE- bzw. 0,5 x TBE-Puffer gefüllt. Die Proben wurden vor dem Auftragen im Verhältnis 5:1 mit nativem Auftragspuffer gemischt. Die Elektrophorese erfolgte bei konstanter Spannung (5-10 V/cm). Die DNA-Banden konnten im UV-Durchlicht (254 nm) mit einer „eagle eye“-Apparatur (Stratagene) detektiert und auf Thermalpapier photographisch dokumentiert werden.

Denaturierende Gelelektrophorese von RNA

Eine Denaturierung der RNA konnte durch eine Behandlung mit Glyoxal und DMSO erreicht werden. Diese Methode hat gegenüber der häufig verwendeten Formamid/Formaldehyd-Denaturierung den Vorteil, bei der Gelelektrophorese eine deutlich bessere Auftrennung der Fragmente zu bieten. Die RNA-Probe (5-15 µg) wurde dazu in 16 µl MOPS-Puffer mit 1 M Glyoxal und 50% DMSO für 1 h bei 50 °C denaturiert, mit 4 µl RNA-Auftragspuffer versetzt und auf ein 1% MOPS-Agarosegel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei 5-7 V/cm für 2 h, das Gel wurde alle 30 min im Puffer umgedreht und gleichzeitig die Elektrodenpolung vertauscht, um den pH-Wert des Puffers möglichst konstant zu halten.

Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Für die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde der JETSORB®-Kit (Genomed) verwendet. Das Prinzip besteht darin, die DNA unter Hochsalzbedingungen an eine Silikatmatrix zu binden, von Verunreinigungen freizuwaschen und schließlich unter Niedersalzbbedingungen die DNA von dieser Matrix zu eluieren. Die Isolierung wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Mit dieser Methode konnten DNA-Fragmente einer Länge von 100 bp bis 5 kb aus Agarosegelen zu etwa 80-90 % isoliert werden.

Alternativ wurden Agarosestückchen für 5 min bei 8.000 Upm durch Glaswolle zentrifugiert. Diese befand sich in einem 0,5 ml Reaktionsgefäß mit Loch im Boden, das in einem 1,5 ml

Gefäß plaziert war. Die Agarose wird bei dieser Prozedur in der Glaswolle zurück gehalten und die Qualität der erhaltenen DNA reicht für Ligationsansätze aus.

Transfer von DNA (Southern-Blot)

Der Transfer der aufgetrennten DNA-Fragmente aus einem Agarosegel auf eine Nylonmembran erfolgte durch Kapillar-Blot. Hierbei wird die Transfer-Lösung (0,4 M NaOH) aus einem Pufferreservoir über Kapillarkräfte durch das Gel hindurch in einen auf dem Gel plazierten Stapel Papierhandtücher gesaugt. Die DNA-Fragmente werden durch den Pufferstrom aus dem Gel eluiert und binden an die darüberliegende Nylonmembran. Ein gleichmäßig verteiltes Gewicht auf dem Papierstapel garantiert eine dichte Verbindung zwischen den jeweiligen Lagen des Transfersystems sehr eng zusammen. Vor dem Transfer wurde das Agarosegel 15 min in 0,25 M HCl inkubiert, um einen Teil der Purine abzuspalten, damit ein Transfer großer DNA-Fragmente erleichtert wird. Anschließend wurde das Gel für 15 min in 0,4 M NaOH inkubiert.

Aufbau des Blots von unten nach oben:

- Whatman 3MM-Brücke zum Pufferreservoir
- 1 Lage Whatman 3MM
- Agarosegel, von Parafilm umgeben
- Nylonmembran (Biodyne® B)
- 1 Lage Whatman 3MM
- Stapel Papierhandtücher
- Glasplatte
- Gewicht (ca. 500 g)

Der Kapillar-Blot erfolgte für 4 h oder über Nacht. Anschließend wurden der Filter getrocknet, und die DNA-Moleküle durch UV-Behandlung (280 nm) in einem Stratalinker (Stratagene) für 2 min kovalent mit der Membran verknüpft.

Spezifischer Nachweis an Membranen gebundener DNA

Die Biodyne® B-Membranen wurden zur Absättigung der unspezifischen Bindungsstellen mit Southern-Hybridisierungspuffer für 20 min bei 65 °C präinkubiert. Nach Wechsel der Hybridisierungslösung wurde die bei 95°C für 2 min denaturierte radioaktive Hybridisierungsprobe zugegeben (Endkonzentration etwa 10^6 cpm/ml). Die Hybridisierung erfolgte bei 65 °C über Nacht. Danach wurden die Membranen zweimal für jeweils 15 min bei 65 °C mit Southern-Waschpuffer gewaschen. Schließlich wurden die Filter in Plastikfolie eingeschweißt und zusammen mit einem Kodak X-omat®-XAR-5-Röntgenfilm in einer

Kassette mit Verstärkerfolie je nach Intensität der Signale 1-150 h bei -80 °C exponiert. Die Röntgenfilme wurden in einem QX-60 Röntgenfilm-Entwickler (Konica) entwickelt.

Transfer von RNA (Northern-Blot)

Der Transfer erfolgte analog zum Southern-Blot mit einer Hybond N⁺-Membran statt der Biodyne[®] B-Membran.

Der Kapillar-Blot erfolgte über Nacht. Anschließend wurde der Filter getrocknet und die RNAs durch UV-Bestrahlung (2 min) kovalent mit der Membran verknüpft.

Spezifischer Nachweis an Membranen gebundener RNA

Die Hybond-N⁺-Membranen wurden zum Absättigen der Bindungsstellen mit RNA-Hybridisierungspuffer für 30 min bei 60 °C präinkubiert. Nach Wechsel der Hybridisierungslösung wurde die bei 95 °C denaturierte radioaktiv markierte Hybridisierungsprobe zugegeben (10⁶ cpm/ml Endkonzentration). Die Hybridisierung erfolgte bei 60 °C für 12-15 h. Im Anschluß an die Hybridisierung wurden die Filter 5 min und 2 x 20 min mit RNA-Waschpuffer bei 60 °C gewaschen. Die Filter wurden zusammen mit einem Röntgenfilm (Kodak X-omat[®] XAR-5) in einer Kassette mit Verstärkerfolie je nach Intensität der Signale 2-48 h bei -70 °C exponiert.

Herstellung einer Hybridisierungssonde (Feinberg und Vogelstein, 1984)

Die Herstellung spezifischer Hybridisierungssonden mit sehr hoher spezifischer Aktivität erfolgte durch "Primer Extension" mit Hilfe des Megaprime-DNA-Labeling-System-Kits (Amersham).

Das als Sonde vorgesehene denaturierte DNA-Fragment wird mit einem Gemisch aus Hexanukleotiden zufälliger Sequenz als Primer und [α-³²P]dCTP mit Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I radioaktiv markiert.

Ein Ansatz enthielt:

- 100-500 ng DNA
- 5 µl Primer (Kit)
- mit H₂O *ad* 34µl
- 5 min 95 °C
- 10 µl Megaprime Reaction Buffer (Kit)
- 5 µl [α-³²P]dCTP (50 mCi)
- 1 µl Klenow-Enzym (2 U)

Der Ansatz wurde 30 min bei 37 °C inkubiert und anschließend durch Zugabe von 4 µl 0,5 M EDTA gestoppt.

Die Abtrennung der Nukleotide vom markierten DNA-Fragment erfolgte über MicroSpin® S300-Säulen (Pharmacia):

Die Abtrennung nicht eingebauter Nukleotide mit Hilfe von MicroSpin® S300-Säulen erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

5.3.5 Sequenzierung von DNA

Plasmid-DNA wurde mit einem 377-Sequenzierautomat von Perkin Elmer sequenziert. Vor der automatischen Sequenzierung wurde die Plasmid-DNA durch den JETQUICK® (Genomed)-Kit aufgereinigt. Die Sequenzreaktion wurde mit 30 Zyklen nach Angabe des Herstellers durchgeführt. Das Prinzip entspricht der Didesoxy-Methode (Sanger *et al.*, 1977). In den Reaktionsansatz werden ddNTPs gegeben, durch deren Einbau ein Kettenabbruch erfolgt. Die verschiedenen Basen sind mit unterschiedlichen Fluoreszenz-Farbstoffen markiert.

Nach der Sequenzreaktion wird die DNA gefällt. Das getrocknete Pellet wird in 4 µl Formamid/25 mM EDTA (4:1)-Puffer aufgenommen. Nach der Zugabe von 6 µl Auftragspuffer wird die Probe 5 min bei 95 °C aufgeköcht. Ein 2 µl Aliquot wird anschließend auf das Gel aufgetragen.

Die Banden werden nach der Auftrennung in einem Sequenzgel und Anregung durch einen Laser von einer Photozelle detektiert. Die erhaltenen Sequenzen wurden mit der Software des 377-Systems auf einem Apple Macintosh-Computer ausgewertet.

Dabei wurden folgende zusätzliche Reagenzien und Lösungen verwendet:

Ammoniumpersulfat	BioRad
Acrylamid	BioRad
Bisacrylamid	BioRad
Dye Terminatoren-Mix	ABI
EDTA	Merck
Formamid	BRL
Lichrosolv Millipore Wasser	Merck
Rotiphorese NF-Harnstoff für autom. Sequenzierung	Roth
Rotiphorese NF-10 x TBE-Puffer für autom. Sequenzierung	Roth

5.3.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Standard-PCR

Mit Hilfe der PCR-Amplifikation können definierte DNA-Sequenzen aus einem komplexen Gemisch von DNA selektiv angereichert werden. Man benötigt hierzu zwei Primer, von denen der eine zum 3'-Bereich der gewünschten Sequenz und der andere zum Gegenstrang des 5'-Bereiches komplementär ist. Die Reaktionen wurden in einem Robocycler-Gradient- (Stratagene) oder Hybaid OmniGene-Gerät durchgeführt.

Ein typischer PCR-Ansatz enthielt:

1 µl	DNA (10 ng/µl)
0,5 µl	Primer 1 (100 pmol/µl)
0,5 µl	Primer 2 (100 pmol/µl)
1 µl	dNTPs (je 10 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP)
2 µl	Taq DNA-Polymerase (1 U/µl)
5 µl	10 x PCR-Puffer
5 µl	25 mM MgCl ₂
<i>ad</i> 50µl H ₂ O _{bid.}	

Das optimale Temperaturprofil der Reaktion hängt von der Matrize und besonders von den benutzten Primern ab. Mit dem Robocycler ist es möglich, die „Annealingtemperatur“ in einem Temperaturgradienten von 1 °C-Schritten einzustellen.

Programm für Standard-PCRs:

1.	5 min 94 °C;
2.	30 - 33 x 1 min 94 °C, 1 min. 50 – 65 °C, je nach Ansatz 1-3 min. 72 °C (etwa 1000 bp pro Minute)
3.	10 min 72 °C

Ganz-Zell-PCR aus *U. maydis*-Zellen

Zur einfachen Überprüfung von Transformanten kann man eine PCR direkt aus *U. maydis*-Kolonien durchführen. Dabei wurden Einzelkolonien in 100 µl H₂O_{bid.} resuspendiert und davon jeweils 1,5 µl zu einem 50 µl Reaktionsansatz gegeben. Der einzige Unterschied zu Standard-PCR-Reaktionen bestand in einer längeren initialen Denaturierungszeit (10 min bei 94 °C), um ein Platzen der *U. maydis*-Zellen zu erreichen. Diese Technik hat sich als zuverlässiges Mittel zur Vorauswahl richtiger Transformanten erwiesen. Es sind jedoch einige Punkte zu beachten: (1) Das Zellmaterial sollte frisch sein (Kolonie nicht älter als 3 Tage), (2)

Es sollte nicht zuviel Material eingesetzt werden; idealerweise eine Kolonie mit einem Durchmesser von etwa 1 mm, (3) Die Amplifikation von Fragmenten, die länger als 1,5 kb sind, verläuft generell relativ schlecht und ist nicht immer reproduzierbar; die Amplifikatlängen sollten daher zwischen 200 und 500 bp liegen, (4) Die Elongationszeiten müssen für eine erfolgreiche Amplifikation gegenüber Standard-PCR-Ansätzen verdoppelt werden, und (5) kommt es immer wieder zum Ausfall einzelner Reaktionen. Es ist demnach besser eine PCR auf das Wegfallen einer bestimmten Bande durchzuführen, so dass das Auftreten von falsch Positiven minimiert wird.

Überprüfung der *yupI^{ts}*-Mutation

Zur schnellen Überprüfung der *yupI^{ts}*-Mutation wurde mit den Primern RS1 und RS2 mittels Ganz-Zell-PCR das jeweilige *yupI*-Allel amplifiziert. Durch die *yupI^{ts}*-Mutation entstand eine neue *Tsp509I*-Schnittstelle, die durch Restriktion des PCR-Produkts leicht nachzuweisen war. Dabei traten im Wildtyp-Allel eine 639 bp große Bande und im *yupI^{ts}*-Allel zwei 347 bp und 292 bp große Banden auf.

5.4 Zellbiologische Methoden

5.4.1 Mikroskopie und Bildverarbeitung

Die Betrachtung von *U. maydis*-Zellen erfolgte an einem Lichtmikroskop (Axiophot, ZEISS) mittels Nomarsky-Optik. Für DIC-Mikroskopie und Fluoreszenzmikroskopie wurde überwiegend ein 100 x Plan-APOCHROMAT Objektiv (Zeiss) mit einer numerischen Apertur von 1,4 verwendet. Für Fluoreszenzaufnahmen wurden folgende Standardfiltersätze verwendet: FITC (Anregung: 450-490 nm, Farbteiler: 510 nm, Emission: 515-565 nm), Rhodamin (Anregung: 546 nm, Farbteiler: 580 nm, Emission: >590 nm) und DAPI (Anregung: 365 nm, Farbteiler: 395 nm, Emission: >397 nm). Für die Kolokalisation von FM4-64 und GFP wurde die GFP-Fluoreszenz mit einem spezifischen GFP-Filtersatz beobachtet (Anregung bei 470 ± 20 nm, Farbteiler bei 493 nm, Emission bei 505-530 nm). Für die Beobachtung von CFP und YFP wurden ebenfalls spezifische Filter verwendet (CFP: Anregung bei 436 nm, Farbteiler bei 455 nm, Emission bei 480-500 nm; YFP: Anregung bei 500 ± 20 nm, Farbteiler bei 515 nm, Emission bei 535 ± 30 nm). Aufnahmen wurden mit einer hoch auflösenden CCD-Kamera (C4742-25, Hamamatsu) und dem Programm IMAGE PRO PLUS (Media Cybernetics, Version 2.01) erstellt. Kontrastverstärkung, Skalierung von Maßstäben und die Vergrößerung von Bildausschnitten wurden ebenfalls mit

IMAGE PRO PLUS durchgeführt. Die im TIFF-Format gespeicherten Bilder wurden mit den Programmen ADOBE-PHOTOSHOP (Adobe, Versionen 4.0-6.0) und CANVAS (Deneba, Versionen 3.5-7) weiter verarbeitet.

5.4.2 Wachstumskurven

Maximal 10 Übernachtskulturen wurden bei einer $OD_{600} < 1$ mit dem entsprechenden Medium auf eine OD_{600} von $0,4 \pm 0,03$ abgeglichen, und von jeder Probe wurde je 1 ml in 3 x 20 ml frisches Medium überimpft. Diese 20ml-Kulturen wurden bei 28 °C und 200 Upm geschüttelt. Alle 2 h, beginnend nach einer Stunde und endend nach 13 h, wurde unter exakter Notierung der Uhrzeit von jeder schüttelnden Probe ein Aliquot entnommen (1ml) und auf Eis gestellt. Von den gesammelten Proben wurde dann die OD_{600} gemessen, wobei ab $OD_{600} > 0,5$ verdünnt wurde, um im linearen Bereich zu bleiben. Von den jeweils drei Meßwerten ($n=3$) pro Zeitwert und Stamm wurden der Mittelwert und die Standardabweichung bestimmt und zur Erstellung einer Wachstumskurve durch „nicht lineare Regression“ mit der Gleichung „exponential growth 2“ in dem Programm PRISM verwendet.

5.4.3 Färbungen

Kernfärbung

4-6-diamidino-2-phenylindol (DAPI) färbt die DNA im Zellkern und in Mitochondrien. Übernachtskulturen wurden bei einer $OD_{600} < 1$ abzentrifugiert (ca 3600 Upm, HERAEUS-Zentrifuge), einmal in Wasser gewaschen und das Pellet in 1 x PBS aufgenommen. Die Zellen wurden 15 min bei RT in 1 % Formaldehyd fixiert, zweimal mit PBS gewaschen und anschließend für 15 min bei 65 °C mit 1 µg/ml DAPI in PBS gefärbt. Die Färbung wurde mit dem DAPI-Filter betrachtet.

Zellwandfärbung

Es wurden die beiden Farbstoffe Calcofluor und WGA (wheat germ agglutinin) verwendet. Calcofluor färbt neu gebildetes Zellwandmaterial (Mitchison und Nurse, 1985). Es wurde in Konzentrationen von 2 µg/ml zugegeben. Die Zellen wurden anschließend einmal in Wasser gewaschen und im Lichtmikroskop mit DAPI-Filtersatz betrachtet. Rhodamin-gekoppeltes WGA ist ein spezifischer Farbstoff für Chitin (Nagata und Burger, 1974). Die Färbung erfolgte mit 25 µg/ml für 5 min und anschließender Betrachtung mit dem Rhodamin-Filtersatz.

Vakuolenfärbung

Vakuolen wurden wie beschrieben (Steinberg *et al.*, 1998) mit CellTrackerTMblue gefärbt. Zellen wurden 2 min bei 500 g sedimentiert, in 10 mM HEPES pH 7,4 mit 5 % Glukose resuspendiert und mit 100 μ M Farbstoff für 20-30 min bei RT inkubiert. Nach einmaligem Waschen mit Puffer wurden die Zellen im DAPI-Filtersatz betrachtet.

Mitochondrienfärbung

Mitochondrien wurden mit Mitotracker CMTMRos (Molecular Probes, M-7510) gefärbt. Zellen wurden 2 min bei 500 g pelletiert und in 10 mM HEPES pH 7,4 mit 2 % Glukose resuspendiert. Die Endkonzentration des Farbstoffs lag bei 0,5 μ M und die Färbung wurde 30 min bei 30 °C durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen zweimal in Puffer gewaschen und direkt für die Fluoreszenz-Lichtmikroskopie verwendet. Das Absorptionsmaximum von CMTMRos liegt bei 551 nm und das Emissionsmaximum bei 576 nm. Es wurde der Rhodamin-Filtersatz verwendet.

Endozytosefärbung

Zellen aus einer logarithmischen Kultur wurden für 1-3 min mit 16 μ M FM4-64 (Vida und Emr, 1995) oder 16 μ M RH414 (Betz und Bewick, 1992) bei RT gefärbt (Puls). Anschließend wurden die Zellen für 1 min bei 3000 Upm pelletiert und in Wasser resuspendiert. Nach 1-60 min (chase, beschrieben in (Steinberg *et al.*, 1998)) wurden die Zellen mit dem Rhodamin-Filtersatz betrachtet. Um die Endozytose in den temperatursensitiven Stämmen zu verfolgen, wurden die Zellen für 2 h bei 34 °C inkubiert und dann wie oben beschrieben gefärbt, wobei sie bei der Färbung auf der restriktiven Temperatur gehalten und unverzüglich analysiert wurden, um Veränderungen des Phänotyps zu minimieren. Für die Kollokalisation mit GFP wurden die Zellen nach der Färbung für 5 min in 1 % Formaldehyd fixiert und einmal in PBS gewaschen.

Immunfluoreszenz

Indirekte Immunfluoreszenz von Mikrotubuli wurde mit einem monoklonalen Antikörper gegen α -Tubulin (N356, Amersham), wie in (Steinberg *et al.*, 1998) beschrieben, durchgeführt.

5.5 Biochemische Methoden

5.5.1 Messung der Proteinkonzentration

Zur Mittelwertbildung wurden 1, 2 und 3 μl einer Probe eingesetzt (nach Hersteller-Anleitung, BIORAD). Die Probe wurde mit 1 ml Bradford-Reagenz (1:5 verdünnte Ausgangslösung, nach (Bradford, 1976)) versetzt. Nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die OD_{595} bestimmt und daraus die Proteinmenge im Vergleich zu einer Eichkurve (BSA) berechnet.

Die erhaltene Proteinmenge aus einer 200 ml *U. maydis*-Kultur lag bei 2,5-5,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Die Aufbewahrung der Proben erfolgt nach Mischen mit SDS-Probenpuffer bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

5.5.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen

Proteine werden bei dieser Methode unter denaturierenden Bedingungen elektrophoretisch nach ihrer Masse aufgetrennt. Angewendet wurde die Methode der diskontinuierlichen Polyacrylamidgelelektrophorese (Garfin, 1990). Dabei wird zwischen zwei vertikale Glasplatten ein Trenngel und, nachdem dieses polymerisiert ist, darüber ein weitmaschigeres Sammelgel gegossen. Die Proteine werden an der Grenze der Gele verdichtet und dann nach ihrer Größe aufgetrennt. Durch die Verwendung eines Sammelgels erhält man schärfere Banden. Die Konzentration des Trenngels betrug 5 % bei der Darstellung von Kin3 und 10 % bei Proteinen unter 100 kD. Die Auftrennung erfolgte in einer Biorad-Apparatur (Mini Protean II) bei 150 V für 1 h. Für das 10 %ige Trenngel wurden folgende Gellösungen verwendet:

Sammelgel:

125 mM Tris-Cl, pH6,8
5 % Acrylamid
0,13 % Bisacrylamid
0,1 % SDS
in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid}}$

Trenngel:

375 mM Tris-Cl, pH 8,8
10 % Acrylamid
0,27 % Bisacrylamid
0,1 % SDS
in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid}}$

Zum Starten der Polymerisation:

0,1 % Ammoniumpersulfat
0,04 % TEMED

0,1 % Ammoniumpersulfat
0,04 % TEMED

5.5.3 Transfer und Nachweis von Proteinen auf Membranen (Western Blot)

Die im Gel aufgetrennten Proteine wurden mittels eines Semidry-Elektroblots in einem dreistufigen Puffersystem auf eine PVDF-Membran (Immobilon-P[®], Millipore; oder PALL) oder Nitrozellulose-Membran (Schleicher & Schuell) übertragen. Dazu wurde auf der Elektroblotapparatur (CarboGlas[®], Schleicher&Schüll) folgender Blot aufgebaut (von unten nach oben, Filterpapier Whatman GB004):

Anodenplatte

2 Whatman-Papiere, getränkt in Anodenpuffer I

1 Whatman-Papier, getränkt in Anodenpuffer II

aktivierte Immobilon-P[®]-Membran

Polyacrylamid-Gel

3 Whatman-Papiere, getränkt in Kathodenpuffer

Kathodenplatte

Vor dem Blotaufbau wurde die PVDF-Membran in Methanol aktiviert, mit H₂O_{bid} gewaschen und anschliessend für 10 min in Anodenpuffer II inkubiert. Das Gel wurde vor dem Transfer 10 min in Kathodenpuffer eingelegt.

Durch die angelegte Spannung (1 mA/cm², 10-20 V, 1 h) wurden die Proteine auf die PVDF-Membran transferiert. Die Effizienz des Transfers wurde durch PonceauS-Färbung überprüft. Dazu wurde die Membran 1 min in der Färbelösung inkubiert und anschließend mit H₂O gewaschen, bis sich Proteinbanden abzeichneten.

Parallel zum Western Blot wurde jeweils ein zweites Gel für die Coomassie-Färbung und Mengenabschätzung verwendet. Dazu wurde das Polyacrylamid-Gel für 1 h in Coomassie-Färbelösung inkubiert und anschließend mit Entfärbelösung behandelt, bis die Proteinbanden deutlich zu erkennen waren. Danach wurde das Gel auf ein Whatman 3MM-Filterpapier gelegt und unter Vakuum getrocknet.

Die Membran wurde zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen für den ersten Antikörper in Blockierungspuffer mindestens 1 h oder über Nacht bei 4°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Dann erfolgte die Inkubation der Membran für mindestens 1 h bei RT (leicht geschüttelt) mit dem ersten Antikörper (Anti- α -Tubulin N356 1:5000 in 1 x TBST mit 0,1 % Azid und ohne Milchpulver). Dann wurde die Membran 2 x 10 min mit TBST und dann 2 x 10 min in Blockierungspuffer ohne Azid (kann die Lumineszenzreaktion stören) und mit nur 0,5 % Milchpulver gewaschen. Die Detektion erfolgte durch einstündige Inkubation mit einem zweiten Antikörper (W402B, HRP-gekoppelter Anti-Maus-IgG-Antikörper;

verdünnt 1:4000 in 1 x TBS mit 0,5 % Milchpulver, ohne Tween), der den konstanten Teil des ersten Antikörpers (IgG-Maus) erkennt und mit dem Enzym Meerrettich-Peroxidase gekoppelt ist. Die Peroxidase katalysiert die Oxidation von Luminol. Nach 1 x 15 min. Waschen in TBST und 3 x 5min Spülen in PBS erfolgte die Detektion durch Zugabe von Peroxidase-Substrat. Der immunologische Nachweis der Proteine erfolgte mit Hilfe des Amersham ECL+ Western Blotting-Kits. Das durch die Oxidation emittierte Licht der Wellenlänge 420 nm wurde mittels eines Röntgenfilms detektiert. Die genaue Vorgehensweise entsprach den Angaben im Kit.

Quantitative Western-Analyse

Nach Abschätzung der Proteinmenge nach Bradford (s.o.) wurden in etwa gleiche Proteinmengen über zwei parallel laufende 10 %-ige Acrylamidgele aufgetrennt, von denen eines zur Proteinübertragung auf eine Membran verwendet wurde, und das andere zur Bestätigung vergleichbarer Proteinmengen in allen Spuren Coomassie-gefärbt (s.o.) wurde. Durch PonceauS-Färbung (s.o.) der Membran und durch Coomassie-Färbung des geblotteten Gels wurde die gleichmäßige Übertragung der Proteine aus dem Gel auf die Membran kontrolliert. Die Signale auf dem Röntgenfilm (s.o.) wurden dreimal mit dem Programm IMAGE PRO PLUS quantifiziert und der Mittelwert verwendet.

5.5.4 Isolation von Proteinen aus E. coli

Für die Isolation von Gesamtprotein wurde 1 ml einer Kultur ($OD_{600} < 0,8$) pelletiert und in 50 μ l TE (pH 8,0) resuspendiert. Nach Zugabe von 1 Vol von 2 x SDS-Probenpuffer wurden die Proben direkt auf einem SDS-Gel analysiert.

Für die Trennung in lösliche und unlösliche Fraktion wurden 50-500 ml Kultur bei einer OD_{600} von 0,3-0,8 pelletiert und in 800 μ l-3 ml Lysispuffer resuspendiert. Als Lysispuffer wurde TE (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 2 mM EDTA), AP100 oder His-Bindepuffer (bei anschließender Reinigung über Ni-Affinität, s.u.) verwendet. Nach Zugabe von Lysozym auf 100 μ g/ml (frisch) und 1 % TritonX-100 wurde die Suspension 15 min bei 30 °C inkubiert. Die Probe wurde dann für 5 min auf Eis gestellt und anschließend sonifiziert (Branson Sonifier, 2-3 Pulse bei Stärke 3-4 und 90%). Lösliche und unlösliche Fraktion wurden durch Zentrifugation für 30 min bei 20.000 rpm (Beckmann Avanti) und 4 °C getrennt.

Zur Analyse der Proteine wurden die jeweiligen Fraktionen 1:1 mit 2 x Probenpuffer gemischt und auf ein SDS-Gel aufgetragen.

5.5.5 Isolation von Gesamtprotein aus *U. maydis*

Zellen wurden von Platte in 200 ml PD-Medium angeimpft, über Nacht bei 28°C und 200 Upm inkubiert und bei einer $OD_{600} < 1$ geerntet. Für die folgenden Schritte wurden die Zellen immer auf Eis gehalten, um Proteinaseaktivitäten möglichst zu verhindern. 200 ml Zellkultur wurden 7 min bei 3000 Upm und 4°C zentrifugiert und die Zellpellets in 40 ml AP100 ohne Proteinase-Inhibitoren gewaschen (weitere Zentrifugation bei 2500 Upm). Die Zellen wurden in 2 ml AP100 mit 1 mM DTT und Proteinase-Inhibitormix (Boehringer) aufgenommen und in der French Press durch dreimalige Behandlung unter einem Druck von 1100 psi aufgeschlossen. Es folgte eine halbstündige Zentrifugation bei 24000 Upm und 4°C zur Gewinnung eines Organell-freien Überstands (Beckmann Avanti®30 Zentrifuge). Der Überstand wurde abgenommen und zur Proteinbestimmung eingesetzt.

5.5.6 Heterologe Expression von Proteinen in *E. coli*

Für die heterologe Expression von Proteinen in *E. coli* wurde der Stamm BL21-CodonPlus™-RIL verwendet. BL21 enthält eine chromosomale Kopie des T7-Polymerase-Gens unter dem lacUV5-Promotors (Lysogen des Phagen DE3). Bei Induktion des Stammes mit IPTG wird das T7-Polymerase Gen transkribiert und eingebrachte Gene hinter dem T7-Promotor können exprimiert werden. BL21 kann außerdem die Lon- und OmpT-Proteasen nicht mehr machen, was die Stabilität mancher Proteine erhöht. Zur Kontrolle der Expression wurde zunächst Gesamtprotein nach unterschiedlichen Induktionszeiten bei 37 °C analysiert. Anschließend wurde die Löslichkeit des Proteins bei unterschiedlichen Temperaturen getestet.

5.5.7 Reinigung von Proteinen über Nickel-Chromatographie

Proteine mit His⁶-Tags wurden über Affinität zu Nickel-Sepharose gereinigt. Die Sepharose wurde zunächst nacheinander mit 5 Vol (Bettvolumen) Wasser, 5 Vol Ni-Sulfat (50 mM) und 5 Vol His-Bindepuffer in einer Minisäule (MoBiTec) equilibriert. Der Proteinextrakt in Bindepuffer wurde dann für 1-2 h bei 4 °C mit der Nickel-Sepharose inkubiert (Eppendorftube, Drehrad) oder langsam über die Säule gegeben. Unter Umständen wurde der Durchfluß ein zweites Mal über die Säule gegeben. Die Sepharose wurde hintereinander mit 10 Vol His-Bindepuffer, 5 Vol His-Waschpuffer gewaschen. Das gebundene Protein wurde 3 x mit je 1 Vol His-Eluonspuffer abgelöst. Proben von sämtlichen Schritten wurden gesammelt und auf einem SDS-Gel überprüft.

5.5.8 ATPase Messung für Kinesine

Die MT für den Assay werden wie folgt vorbereitet: Aliquot mit Tubulin aus -80°C nehmen und 10 min bei 80.000 rpm (Tisch-ZU TL100 Rotor, 4°C) zentrifugieren. Überstand in neues Eppendorf tube überführen, während dessen Rotor auf RT aufwärmt (25°C). Tubulin + 1 mM GTP 30 min bei 37°C polymerisieren lassen. Nach 5-10 min $20\ \mu\text{M}$ Taxol (= Paclitaxel) zugeben (4 mM Stamm). Polymerisierte MT über 1 ml Sucrosekissen (40 % in Assay-Puffer) zentrifugieren (10 min 80.000 rpm 25°C TL100, unpolymersiertes Tubulin bleibt oben). Pellet in 1/5 Vol Assay-Puffer + $20\ \mu\text{M}$ Taxol resuspendieren. Konzentration der MT bei 280 nm messen. Je $10\ \mu\text{l}$ der Verdünnungen (1:5 und 1:10 in Assay-Puffer + $20\ \mu\text{M}$ Taxol) zu $90\ \mu\text{l}$ Guanidin-HCl geben. Konzentration = $E_{280} / 1,03 \times 10 \times \text{Verdünnung}$ (μM).

Assay-Mix

4 μl ATP	10 mM Lösung, 100 mM Stammlösung von -80°C 1:10 in Assay-Puffer verdünnt
4 μl NADH	2 mg in 640 μl Assay-Puffer lösen, frisch ansetzen, auf Eis
4 μl PEP	Phosphoenolpyruvat, 2,5 mg in 500 μl Assay-Puffer lösen und mit KOH auf pH 7,0 einstellen, Volumen auf 640 μl / 2,6 g Pulver
2 μl Enzymmix	20 μl Pyruvatkinase + 20 μl Lactat-Dehydrogenase + 60 μl Assay-Puffer
0-12 μl MT	
Assay-Puffer	auf 79 μl auffüllen
1 μl Kinesin	etwa $1\ \mu\text{g}/\text{ml}$, Verdünnung in Assay-Puffer (BSA <i>ad</i> 1 mg/ml zugeben)

Reaktion sofort nach Zugabe von Kinesin in das Photometer bringen und Messung starten. Es werden Meßwertpaare von MT-Konzentration (μM) und Rate der Extinktionsabnahme ($-\Delta E/\text{min}$) notiert.

Der ATP-Turnover errechnet sich aus dem gekoppelten enzymatischen Test (Huang und Hackney, 1994). Es wird indirekt ermittelt, wieviel ATP pro Zeit und Kinesinmolekül hydrolysiert wird. Pro hydrolysiertem ATP wird im Assay ein NADH oxidiert. Die Extinktionsabnahme bei 340 nm (Maximum für NADH) ist also ein Maß für die ATP-Hydrolyse. Die molare Konzentrationsabnahme errechnet sich nach

$$E = \epsilon cd \text{ (Lambert-Beer-Gleichung)}$$

Wobei: E = Extinktion, ϵ = Extinktionskoeffizient für NADH, c = Konzentration, d = Strahlengänglänge (hier 1 cm). Der ATP-Umsatz zeigt eine hyperbolische Abhängigkeit von der MT-Konzentration (Michaelis-Menten-Kinetik) und nähert sich asymptotisch dem Maximalwert V_{max} [$\Delta E/\text{min}$]. Der molare ATP-Umsatz errechnet sich aus der Lambert-Beer-Gleichung: $\Delta c/\Delta t = \Delta E/\epsilon d$

Für ΔE wird extrapoliert V_{\max} eingesetzt und in Sekunden umgewandelt, $\varepsilon(\text{NADH}) = 6,22 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$. Also:

$$\Delta c/\Delta t = V_{\max} / 60 \times 6,22 \times 10^3 \text{ M/s} = V_{\max} / 373,2 \text{ M/s}$$

Die Menge an eingesetztem Kinesin ist:

$$[\text{Kinesin}]_{\text{Assay}} = (\text{ProteinkonzPräparation} \times \text{Vol}_{\text{pro Assay}}) / (\text{Mr}[\text{Da}] \times 80 \mu\text{l})$$

Die ATPase-Aktivität k_{cat} errechnet sich wie folgt:

$$k_{\text{cat}} = (\Delta c/\Delta t) / [\text{Kinesin}] = (V_{\max} \times \text{Mr}) / (\text{Vol} \times \text{Protkonz}) \times 2,1436 \times 10^{-4}$$

Der Wert wird in ATP/s/Kinesinmolekül (Kopf) angegeben.

5.5.9 Gelfiltration

Die Abschätzung des Molekulargewichts von Kin3 erfolgte anhand einer Gelfiltrationsanalyse (Andrews, 1970). Dabei wurde das Elutionvolumen für Kin3 mit dem verschiedener Eichproteine verglichen. Als Eichproteine wurden BSA (65,4 kD), Aldolase (149 kD), Katalase (247 kD) und Thyroglobulin (669 kD) verwendet. Damit Kin3 in den Fraktionen detektiert werden konnte, wurden Proteinextrakte des Stammes RWS75 verwendet, in dem das endogene Kin3 C-terminal mit einem 3xmyc-Tag versehen war. 500 μl des Eichproteinmises (je 0,5 mg/ml in AP100) oder des RWS75-Extraktes (siehe oben) wurden in einer FPLC-Anlage über eine „SUPEROSE 6“-Gelfiltrationssäule fraktioniert (4 °C; Laufgeschwindigkeit: 0,5 ml/min; Fraktionsgröße 1 ml). Die Säule war zuvor mit 3 Volumen partikelfreiem Laufpuffer (150 mM NaCl in AP100) equilibriert worden. Das Elutionsvolumen der einzelnen Eichproteine wurde mit einem UV-Schreiber bestimmt und als arithmetisches Mittel aus drei Eichläufen errechnet. Zur Bestimmung des Elutionsvolumen von Kin3-myc³ wurden die gesammelten Fraktionen auf einem SDS-Gel aufgetrennt, auf einen Nylon-Filter geblottet und mit einem cmyc-Antikörper geprobt. Die Bestimmung erfolgte mit drei unabhängigen Gelfiltrationsläufen.

5.6 Computeranalyse

Zur Sequenzanalyse, statistischen Auswertung und für Homologievergleiche wurden folgende Programme und Server benutzt:

SequenceNavigator 1.0.1 (ABI) zur Bearbeitung von Sequenz-Rohdaten und zum Vergleich von DNA-Sequenzen.

DNA-Strider 1.3 (Marck, 1988), (Douglas, 1995) zur Erstellung und zur Bearbeitung von Plasmid- und genomischen Sequenzen; wichtig vor allem zur Vorbereitung von Klonierungsschritten.

Prism 2.0 (GraphPad) zur statistischen Analyse und grafischen Darstellung von Daten.

SeqVu 1.0.1 (The Garvan Institute of Medical Research, Sidney) zur Nachbearbeitung von Sequenz-Alignments.

BLAST2 (Altschul *et al.*, 1997), (Madden *et al.*, 1996) zur Identifikation ähnlicher Proteine oder DNA-Sequenzen in den öffentlichen Datenbanken.

SMART (Schultz *et al.*, 1998), (Schultz *et al.*, 2000) zur Identifikation konservierter Domänen in Proteinen bzw. zur Identifikation von Proteinen mit ähnlichen Domänen oder ähnlicher Domänenstruktur.

PFAM (Bateman *et al.*, 1999) zur Identifikation konservierter Domänen in Proteinen bzw. zur Identifikation von Proteinen mit ähnlichen Domänen oder ähnlicher Domänenstruktur.

Coils (Lupas *et al.*, 1991) zur Identifikation von „Coiled-Coil“-Regionen in einem Protein nach dem Algorithmus von Lupas.

ClustalW 1.8 (Eddy, 1995) und **ClustalX** (Heringa, 1999) zum Vergleich und zur Anpassung (Alignment) mehrerer Protein- oder DNA-Sequenzen.

Zur Ermittlung der Signifikanz von Abweichungen wurden die ermittelten Mittelwerte in einem t-Test mit dem Programm PRISM verglichen. Dazu wurde die Option „No X-values, Mean (=Verdopplungszeit), Standard Error (=Standardfehler), N (=Anzahl der Freiheitsgrade weniger 1)“ gewählt und die Parameter 95 %-Konfidenzintervall, Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha=0,05$, zweiseitiger Test und Welch-Korrektur zur Berücksichtigung von Valenzunterschieden angewendet. Abweichungen mit einem p-Wert $<0,05$ wurden als nicht signifikant gewertet.

6. Literaturverzeichnis

- Allan, V. (1995) Membrane traffic motors. *FEBS Lett*, **369**, 101-6.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. und Lipman, D.J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*, **25**, 3389-402.
- Andrews, P. (1970) Estimation of molecular size and molecular weights of biological compounds by gel filtration. *Methods of Biochemical Analysis*, **18**, 1-53.
- Aroeti, B., Okhrimenko, H., Reich, V. und Orzech, E. (1998) Polarized trafficking of plasma membrane proteins: emerging roles for coats, SNAREs, GTPases and their link to the cytoskeleton. *Biochimica Et Biophysica Acta*, **1376**, 57-90.
- Banani, E., Murray, J.W., Stockert, R.J., Satir, P. und Wolkoff, A.W. (2000) Microtubule and motor-dependent endocytic vesicle sorting in vitro. *J Cell Biol*, **151**, 179-86.
- Bannuett, F. (1995) Genetics of *Ustilago maydis*, a fungal pathogen that induces tumors in maize. *Annu. Rev. Genetics*, **29**, 179-208.
- Bannuett, F. und Herskowitz, I. (1989) Different alleles of *Ustilago maydis* are necessary for maintenance of filamentous growth but not for meiosis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **86**, 5878-5882.
- Bartnicki-Garcia, S. (1996) The hypha: unifying thread of the fungal kingdom. In Sutton, B. (ed.) *A century of mycology*. Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp. 105-133.
- Bateman, A., Birney, E., Durbin, R., Eddy, S.R., Finn, R.D. und Sonnhammer, E.L. (1999) Pfam 3.1: 1313 multiple alignments and profile HMMs match the majority of proteins. *Nucleic Acids Res*, **27**, 260-2.
- Bauchwitz, R. und Holloman, W.K. (1990) Isolation of the REC2 gene controlling recombination in *Ustilago maydis*. *Gene*, **96**, 285-8.
- Betz, W.J. und Bewick, G.S. (1992) Optical analysis of synaptic vesicle recycling at the frog neuromuscular junction. *Science*, **255**, 200-3.
- Bloom, G.S. (2001) The UNC-104/KIF1 family of kinesins. *Curr Opin Cell Biol*, **13**, 36-40.
- Bölker, M., Bohnert, H.U., Braun, K.H., Gorl, J. und Kahmann, R. (1995a) Tagging pathogenicity genes in *Ustilago maydis* by restriction enzyme-mediated integration (REMI). *Mol Gen Genet*, **248**, 547-52.
- Bölker, M., Genin, S., Lehmler, C. und Kahmann, R. (1995b) Genetic regulation of mating and dimorphism in *Ustilago maydis*. *Can J Bot*, **73**, 320-25.
- Bottin, A., Kamper, J. und Kahmann, R. (1996) Isolation of a carbon source-regulated gene from *Ustilago maydis*. *Mol Gen Genet*, **253**, 342-52.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, **72**, 248-54.

- Brazer, S.C., Williams, H.P., Chappell, T.G. und Cande, W.Z. (2000) A fission yeast kinesin affects Golgi membrane recycling. *Yeast*, **16**, 149-66.
- Brenner, S.E., Chothia, C. und Hubbard, T.J. (1998) Assessing sequence comparison methods with reliable structurally identified distant evolutionary relationships. *Proc Natl Acad Sci USA*, **95**, 6073-8.
- Brown, D. und Breton, S. (2000) Sorting proteins to their target membranes. *Kidney International*, **57**, 816-24.
- Brown, S.S. (1997) Myosins in yeast. *Curr Opin Cell Biol*, **9**, 44-8.
- Bucher, P., Karplus, K., Moeri, N. und Hofmann, K. (1996) A flexible motif search technique based on generalized profiles. *Computers and Chemistry*, **20**, 3-23.
- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W.W. und Prasher, D.C. (1994) Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*, **263**, 802-5.
- Chuang, J.S. und Schekman, R.W. (1996) Differential trafficking and timed localization of two chitin synthase proteins, Chs2p and Chs3p. *J Cell Biol*, **135**, 597-610.
- Cohen, S.N., Chang, A.C. und Hsu, L. (1972) Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, **69**, 2110-4.
- Collinge, A.J. und Trinci, A.P. (1974) Hyphal tips of wild-type and spreading colonial mutants of *Neurospora crassa*. *Arch Microbiol*, **99**, 353-68.
- Dai, J. und Sheetz, M.P. (1995) Axon membrane flows from the growth cone to the cell body. *Cell*, **83**, 693-701.
- Demerec, M., Adelberg, E.A., Clark, A.J. und Hartman, P.E. (1966) A proposal for a uniform nomenclature in bacterial genetics. *Genetics*, **54**, 61-76.
- Dorner, C., Ciossek, T., Muller, S., Moller, P.H., Ullrich, A. und Lammers, R. (1998) Characterization of KIF1C, a new kinesin-like protein involved in vesicle transport from the Golgi apparatus to the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, **273**, 20267-75.
- Douglas, S.E. (1995) DNA Strider. An inexpensive sequence analysis package for the Macintosh. *Molecular Biotechnology*, **3**, 37-45.
- Eddy, S.R. (1995) Multiple alignment using hidden Markov models., **3**, 114-20.
- Farkas, V. (1979) Biosynthesis of cell walls of fungi. *Microbiological Reviews*, **43**, 117-44.
- Fischer, J.A. (2000) Molecular motors and developmental asymmetry. *Current Opinion in Genetics and Development*, **10**, 489-96.
- Fleming, T.P., Cannon, P.M. und Pickering, S.J. (1986) The cytoskeleton, endocytosis and cell polarity in the mouse preimplantation embryo. *Dev Biol*, **113**, 406-19.
- Gardner, R.L. (1999) Polarity in early mammalian development. *Current Opinion in Genetics and Development*, **9**, 417-21.
- Garfin, D.E. (1990) One-dimensional gel electrophoresis. *Methods in Enzymology*, **182**, 425-41.

- Gillissen, B., Bergemann, J., Sandmann, C., Schroerer, B., Bölker, M. und Kahmann, R. (1992) A two-component regulatory system for self/non-self recognition in *Ustilago maydis*. *Cell*, **68**, 647-57.
- Goldstein, B., Hird, S.N. und White, J.G. (1993) Cell polarity in early *C. elegans* development. *Development. Supplement*, 279-87.
- Gow, N.A.R. (1995) Tip growth and polarity. In Gow, N.A.R. and Gadd, G.M. (eds.), *The growing fungus*. Chapman & Hall, London ; New York, pp. 277-299.
- Grove, S.N. und Bracker, C.E. (1970) Protoplasmic organization of hyphal tips among fungi: vesicles and Spitzenkörper. *J Bacteriol*, **104**, 989-1009.
- Hall, D.H. und Hedgecock, E.M. (1991) Kinesin-related gene *unc-104* is required for axonal transport of synaptic vesicles in *C. elegans*. *Cell*, **65**, 837-47.
- Hanahan, D. (1985) Techniques for transformation of *Escherichia coli*. In Glover, D.M. (ed.) *DNA cloning : a practical approach*. IRL Press, Oxford, England ; Washington, D.C., pp. 109-135.
- Heath, I.B. (1995) The cytoskeleton. In Gow, N.A.R. and Gadd, G.M. (eds.), *The growing fungus*. Chapman & Hall, London ; New York, pp. 99-134.
- Heringa, J. (1999) Two strategies for sequence comparison: profile-preprocessed and secondary structure-induced multiple alignment. *Computers and Chemistry*, **23**, 341-64.
- Herman, B. und Albertini, D.F. (1984) A time-lapse video image intensification analysis of cytoplasmic organelle movements during endosome translocation. *J Cell Biol*, **98**, 565-76.
- Hoffman, C.S. und Winston, F. (1987) A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene*, **57**, 267-72.
- Hoffmann, J. und Mendgen, K. (1998) Endocytosis and membrane turnover in the germ tube of *Uromyces fabae*. *Fungal Genet Biol*, **24**, 77-85.
- Hofmann, K. und Stoffel, W. (1993) TMbase - A database of membrane spanning protein segments. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, **347**, 166.
- Holliday, R. (1974) *Ustilago maydis* Handbook of genetics. In King, R.C. (ed.) *Handbook of genetics*. Plenum Press, New York,, Vol. 1, pp. 575-595.
- Huang, T.G. und Hackney, D.D. (1994) *Drosophila* kinesin minimal motor domain expressed in *Escherichia coli*. Purification and kinetic characterization. *J Biol Chem*, **269**, 16493-501.
- Karki, S. und Holzbaur, E.L. (1999) Cytoplasmic dynein and dynactin in cell division and intracellular transport. *Current Opinion in Cell Biology*, **11**, 45-53.
- Keon, J.P., White, G.A. und Hargreaves, J.A. (1991) Isolation, characterization and sequence of a gene conferring resistance to the systemic fungicide carboxin from the maize smut pathogen, *Ustilago maydis*. *Current Genetics*, **19**, 475-81.
- Kim, A.J. und Endow, S.A. (2000) A kinesin family tree. *J Cell Sci*, **113**, 3681-2.
- Lane, J. und Allan, V. (1998) Microtubule-based membrane movement. *Biochim Biophys Acta*, **1376**, 27-55.

- Leal-Morales, C.A., Bracker, C.E. und Bartnicki-Garcia, S. (1988) Localization of chitin synthetase in cell-free homogenates of *Saccharomyces cerevisiae*: chitosomes and plasma membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **85**, 8516-20.
- Lehmler, C., Steinberg, G., Snetselaar, K.M., Schliwa, M., Kahmann, R. und Bölker, M. (1997) Identification of a motor protein required for filamentous growth in *Ustilago maydis*. *Embo J*, **16**, 3464-73.
- Li, J., Smith, G.P. und Walker, J.C. (1999) Kinase interaction domain of kinase-associated protein phosphatase, a phosphoprotein-binding domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 7821-6.
- Lupas, A., Van Dyke, M. und Stock, J. (1991) Predicting coiled coils from protein sequences. *Science*, **252**, 1162-4.
- Madden, T.L., Tatusov, R.L. und Zhang, J. (1996) Applications of network BLAST server. *Methods in Enzymology*, **266**, 131-41.
- Marck, C. (1988) 'DNA Strider': a 'C' program for the fast analysis of DNA and protein sequences on the Apple Macintosh family of computers. *Nucleic Acids Research*, **16**, 1829-36.
- Marszalek, J.R., Liu, X., Roberts, E.A., Chui, D., Marth, J.D., Williams, D.S. und Goldstein, L.S. (2000) Genetic evidence for selective transport of opsin and arrestin by kinesin-II in mammalian photoreceptors. *Cell*, **102**, 175-87.
- Mata, J. und Nurse, P. (1998) Discovering the poles in yeast. *Trends Cell Biol*, **8**, 163-7.
- Miller, D.M., Desai, N.S., Hardin, D.C., Piston, D.W., Patterson, G.H., Fleenor, J., Xu, S. und Fire, A. (1999) Two-color GFP expression system for *C. elegans*. *Biotechniques*, **26**, 914-8, 920-1.
- Mitchison, J.M. und Nurse, P. (1985) Growth in cell length in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J Cell Sci*, **75**, 357-76.
- Nabi, I.R. (1999) The polarization of the motile cell. *Journal of Cell Science*, **112**, 1803-11.
- Nagata, Y. und Burger, M.M. (1974) Wheat germ agglutinin. Molecular characteristics and specificity for sugar binding. *J Biol Chem*, **249**, 3116-22.
- Nakagawa, T., Setou, M., Seog, D., Ogasawara, K., Dohmae, N., Takio, K. und Hirokawa, N. (2000) A novel motor, KIF13A, transports mannose-6-phosphate receptor to plasma membrane through direct interaction with AP-1 complex. *Cell*, **103**, 569-81.
- Nakata, T., Terada, S. und Hirokawa, N. (1998) Visualization of the dynamics of synaptic vesicle and plasma membrane proteins in living axons. *J Cell Biol*, **140**, 659-74.
- Nangaku, M., Sato-Yoshitake, R., Okada, Y., Noda, Y., Takemura, R., Yamazaki, H. und Hirokawa, N. (1994) KIF1B, a novel microtubule plus end-directed monomeric motor protein for transport of mitochondria. *Cell*, **79**, 1209-20.
- Nelson, W.J. (1991) Cytoskeleton functions in membrane traffic in polarized epithelial cells. *Seminars in Cell Biology*, **2**, 375-85.

- Nelson, W.J. (1992) Regulation of cell surface polarity from bacteria to mammals. *Science*, **258**, 948-55.
- Okada, Y. und Hirokawa, N. (1999) A processive single-headed motor: kinesin superfamily protein KIF1A. *Science*, **283**, 1152-7.
- Okada, Y., Yamazaki, H., Sekine-Aizawa, Y. und Hirokawa, N. (1995) The neuron-specific kinesin superfamily protein KIF1A is a unique monomeric motor for anterograde axonal transport of synaptic vesicle precursors. *Cell*, **81**, 769-80.
- Pearse, B.M. und Bretscher, M.S. (1981) Membrane recycling by coated vesicles. *Annu Rev Biochem*, **50**, 85-101.
- Pierce, D.W., Hom-Booher, N., Otsuka, A.J. und Vale, R.D. (1999) Single-molecule behavior of monomeric and heteromeric kinesins. *Biochemistry*, **38**, 5412-21.
- Pol, A., Ortega, D. und Enrich, C. (1997) Identification of cytoskeleton-associated proteins in isolated rat liver endosomes. *Biochem J*, **327**, 741-6.
- Pollock, N., de Hostos, E.L., Turck, C.W. und Vale, R.D. (1999) Reconstitution of membrane transport powered by a novel dimeric kinesin motor of the Unc104/KIF1A family purified from Dictyostelium. *J Cell Biol*, **147**, 493-506.
- Ponting, C.P. (1995) AF-6/cno: neither a kinesin nor a myosin, but a bit of both. *Trends Biochem Sci*, **20**, 265-6.
- Ponting, C.P. (1996) Novel domains in NADPH oxidase subunits, sorting nexins, and PtdIns 3-kinases: binding partners of SH3 domains? *Protein Sci*, **5**, 2353-7.
- Puhalla, J.E. (1968) Compatibility reactions on solid medium and interstrain inhibition in *Ustilago maydis*. *Genetics*, **60**, 461-74.
- Ruiz-Herrera, J. und Martinez-Espinoza, A.D. (1999) Chitin biosynthesis and structural organization in vivo. *J Biol Chem*, **274**, 39-53.
- Sack, S., Kull, F.J. und Mandelkow, E. (1999) Motor proteins of the kinesin family. Structures, variations, and nucleotide binding sites. *Eur J Biochem*, **262**, 1-11.
- Sakowicz, R., Farlow, S. und Goldstein, L.S. (1999) Cloning and expression of kinesins from the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. *Protein Sci*, **8**, 2705-10.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning : a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **74**, 5463-7.
- Sato, T.K., Darsow, T. und Emr, S.D. (1998) Vam7p, a SNAP-25-like molecule, and Vam3p, a syntaxin homolog, function together in yeast vacuolar protein trafficking. *Mol Cell Biol*, **18**, 5308-19.
- Schmitt, M.E., Brown, T.A. und Trunpower, B.L. (1990) A rapid and simple method for preparation of RNA from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Research*, **18**, 3091-2.
- Schott, D., Ho, J., Pruyne, D. und Bretscher, A. (1999) The COOH-terminal domain of Myo2p, a yeast myosin V, has a direct role in secretory vesicle targeting. *J Cell Biol*, **147**, 791-808.

- Schultz, J., Copley, R.R., Doerks, T., Ponting, C.P. und Bork, P. (2000) SMART: a web-based tool for the study of genetically mobile domains. *Nucleic Acids Res*, **28**, 231-4.
- Schultz, J., Milpetz, F., Bork, P. und Ponting, C.P. (1998) SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 5857-64.
- Schulz, B., Banuett, F., Dahl, M., Schlesinger, R., Schafer, W., Martin, T., Herskowitz, I. und Kahmann, R. (1990) The b alleles of *U. maydis*, whose combinations program pathogenic development, code for polypeptides containing a homeodomain-related motif. *Cell*, **60**, 295-306.
- Seiler, S., Nargang, F.E., Steinberg, G. und Schliwa, M. (1997) Kinesin is essential for cell morphogenesis and polarized secretion in *Neurospora crassa*. *Embo J*, **16**, 3025-34.
- Selden, L.A., Gershman, L.C. und Estes, J.E. (1980) A proposed mechanism of action of cytochalasin D on muscle actin. *Biochem Biophys Res Commun*, **95**, 1854-60.
- Sheetz, M.P. (1996) Microtubule motor complexes moving membranous organelles. *Cell Struct Funct*, **21**, 369-73.
- Sheu, Y.J., Barral, Y. und Snyder, M. (2000) Polarized growth controls cell shape and bipolar bud site selection in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, **20**, 5235-47.
- Snetselaar, K.M., amp, ouml, lker, M. und Kahmann, R. (1996) *Ustilago maydis* Mating Hyphae Orient Their Growth toward Pheromone Sources. *Fungal Genet Biol*, **20**, 299-312.
- Sollner, T., Whiteheart, S.W., Brunner, M., Erdjument-Bromage, H., Geromanos, S., Tempst, P. und Rothman, J.E. (1993) SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature*, **362**, 318-24.
- Spellig, T., Bottin, A. und Kahmann, R. (1996) Green fluorescent protein (GFP) as a new vital marker in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Mol Gen Genet*, **252**, 503-9.
- Spindler, K.D. und Spindler-Barth, M. (1999) Inhibitors of chitinases. *Exs*, **87**, 201-9.
- Steinberg, G. (2000) The cellular roles of molecular motors in fungi. *Trends Microbiol*, **8**, 162-8.
- Steinberg, G. und McIntosh, J.R. (1998) Effects of the myosin inhibitor 2,3-butanedione monoxime on the physiology of fission yeast. *Eur J Cell Biol*, **77**, 284-93.
- Steinberg, G. und Schliwa, M. (1996) Characterization of the biophysical and motility properties of kinesin from the fungus *Neurospora crassa*. *J Biol Chem*, **271**, 7516-21.
- Steinberg, G., Schliwa, M., Lehmler, C., Bölker, M., Kahmann, R. und McIntosh, J.R. (1998) Kinesin from the plant pathogenic fungus *Ustilago maydis* is involved in vacuole formation and cytoplasmic migration. *J Cell Sci*, **111**, 2235-46.
- Steinberg, G., Wedlich-Söldner, R., Brill, M. und Schulz, I. (2001) Microtubules in the fungal pathogen *Ustilago maydis* are highly dynamic and determine cell polarity. *J Cell Sci*, **114**, 609-622.
- Suelmann, R. und Fischer, R. (2000) Mitochondrial movement and morphology depend on an intact actin cytoskeleton in *Aspergillus nidulans*. *Cell Motil Cytoskeleton*, **45**, 42-50.

- Takeda, S., Yamazaki, H., Seog, D.H., Kanai, Y., Terada, S. und Hirokawa, N. (2000) Kinesin superfamily protein 3 (KIF3) motor transports fodrin-associating vesicles important for neurite building. *J Cell Biol*, **148**, 1255-65.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. und Gibson, T.J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*, **22**, 4673-80.
- Torralba, S. und Heath, I. (2001) Cytoskeletal and Ca²⁺ regulation of hyphal tip growth and initiation. *Curr Top Dev Biol*, **51**, 135-87.
- Tsukuda, T., Carleton, S., Fotheringham, S. und Holloman, W.K. (1988) Isolation and characterization of an autonomously replicating sequence from *Ustilago maydis*. *Mol Cell Biol*, **8**, 3703-9.
- Vale, R.D. und Milligan, R.A. (2000) The way things move: looking under the hood of molecular motor proteins. *Science*, **288**, 88-95.
- Vida, T.A. und Emr, S.D. (1995) A new vital stain for visualizing vacuolar membrane dynamics and endocytosis in yeast. *J Cell Biol*, **128**, 779-92.
- Wada, Y. und Anraku, Y. (1992) Genes for directing vacuolar morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. II. VAM7, a gene for regulating morphogenic assembly of the vacuoles. *J Biol Chem*, **267**, 18671-5.
- Wang, P., Byeon, I.J., Liao, H., Beebe, K.D., Yongkiettrakul, S., Pei, D. und Tsai, M.D. (2000) II. Structure and specificity of the interaction between the FHA2 domain of Rad53 and phosphotyrosyl peptides. *J Mol Biol*, **302**, 927-40.
- Wendland, J. und Philippsen, P. (2001) Cell Polarity and Hyphal Morphogenesis Are Controlled by Multiple Rho-Protein Modules in the Filamentous Ascomycete *Ashbya gossypii*. *Genetics*, **157**, 601-610.
- Wessels, J.G.H. (1986) Cell wall synthesis in apical hyphal growth. *Int Rev Cytol*, **104**, 387-413.
- Westerholm-Parvinen, A., Vernos, I. und Serrano, L. (2000) Kinesin subfamily UNC104 contains a FHA domain: boundaries and physicochemical characterization. *FEBS Lett*, **486**, 285-290.
- Wu, Q., Sandrock, T.M., Turgeon, B.G., Yoder, O.C., Wirsal, S.G. und Aist, J.R. (1998) A fungal kinesin required for organelle motility, hyphal growth, and morphogenesis. *Mol Biol Cell*, **9**, 89-101.
- Yamashita, R.A. und May, G.S. (1998) Motoring along the hyphae: molecular motors and the fungal cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol*, **10**, 74-9.

Anhang

Kin3-Sequenz¹¹:

```

1/1 ATG GCC GAC TGC GGC AAC ATC AAG GTC GTC 31/11 61/21
M A D S G N I K G V V GTA CSA TGT GTC TCC ATG AAC TCG AGA GAA AGA AAT
91/31 121/41 151/51 181/61 211/71 241/81
TTT GTC GAC CAG CAA CTC ATC CTT TCA CCC CCC AAG GAA GCC GAC ACA AAA GAA AAC AGC AAA GCC ACC AAG AAA AAA TCC ATC CCC
F V D Q H Q L I L S P D N E A D T K E N S K A T K K K S M P
181/61 211/71 241/81
TTC TCG TTT GAT CGC GCC TAC GAC GAA CAC ACC GAA CAG GAC GAC TTC CAG TAC ATT GGC GTC GAA CTT TTA CAG CAT GCC TTC AAC
F S F D R A Y D E H T Q D D E F Q Y I G V E L L Q H A F N
271/91 301/101 331/111 361/121 391/121 421/141
GGC TTC AAC ACC TGT GTC TTT GCT TAC GGC CAG ACC GTC TCC GGC AAA TCA CAC TCC ATG GTC GGG TAC GCT CAA GCC AAA AGT ATA ATT
F N T C V F A Y G Q T G S G K S H S M V S Y A Q A K G I I
361/121 391/121 421/141
CCC CTC ACC TGT GCT CGC CTC TTT GAA GAT ATC AAC CAA AAG ACC GCC GGC GAT CCT AAC CTC AAA ATC AGC GTC GAG GTC AGC TAC ATT
P L T C A R L F E D I N Q K T A A D P N L K I S V E V S Y I
451/151 481/161 511/171 541/181 571/191 601/201
GAG ATC TAC AAC GAG AAA GTT CGA GAC TTG CTC AAT CAA AAA AAC AAG GGC AAT CTC AAA GTA AGA GAT CCT AGC CTA GST CCC TAC
E I Y N E K V R D L L N P K N K G N L K V R E H P S L G P Y
541/181 571/191 601/201 631/211 661/221 691/231
GTC GAG GAT CTC AGC AAG CTC GTC GPT GGC AGT TMT CCF GAT ATC ATG AAC CTC ATG MAD GAA GGC AAC GCC AGS AGC GTC GCT GCC
V E D L S K L V V A V K S Y PCC FAD ATC ATG AAC CTC ATG MAD GAA GGC AAC GCC AGS AGC GTC GCT GCC
631/211 661/221 691/231 721/241 751/251 781/261
ACC AAG ATG AAC GAC ACC AGT TCG GGT TCG CAC GCA AAT VTT TFC ACG CTT GTC CTC ACA CAA AAG CSC TFC GAT GTC GAC AAA CTG GAG
T N M N E T S S R S H A V T TFC ACG CTT GTC CTC ACA CAA AAG CSC TFC GAT GTC GAC AAA CTG GAG
721/241 751/251 781/261 811/271 841/281 871/291
GCC GAA AAG TGA TCA GCG ATC TCG ATG GTC GAC GTC GCA GGT TCC GAA GGC GCC AAC TCG ACA GGT GCC ACC GST GCA GCT CTC AAG GAA
A E K V S R I S M V D L A G S E R A A N S T G A T G A E R L K E
811/271 841/281 871/291 901/301 931/311 961/321
GGC GCC AAC ATG AAT CGC TCC CTC ACC ATT CTC GGA AAA GTC ATT GCC GCT CTC GGC ATA GCA AGT TCG GCT GTC GAG CCC CTC AAG GGC
G A N I N R S L T T C T C G A A A G T C A A S A S A V E A P V K G
901/301 931/311 961/321 991/331 1021/341 1051/351
GCC AAA AAC CAA AAA ACC GCC AAG CTA GAT AGC TTT GTA CCT TAT CGT GAT TCA CTC CTC ACC TGG TTC CAG AAC GAC AGT GTC GGC GGA
A K K P K T A S L D L V P Y R D S V L L K D S L G D S L G G
991/331 1021/341 1051/351 1171/391 1201/401 1231/411
AAC TCC AAG ACC GTC ATT GTC GCC ATC TCG CCA GAC TAC GAA GAG ACT CTC AGT AAG CTC CGT TAT GCC GAT CAG GCC AAA AAA
N S K T A M I A I S P A D Y E E T L S T A R R Y A D Q A K K
1081/361 1111/271 1141/381 1171/391 1201/401 1231/411
ATC AAG AAC AAG GCC GTC AAC GAG CAC CCC AAC GCA AAA CTC ATC CGC GAA CTC ATG AAG GAA GAG CTC GAG GTC TCT CGC ACA GCG GTC
I K N K A V V N E D P N A K L I R E L K E E L E L L R T R V
1171/391 1201/401 1231/411 1261/421 1291/431 1321/441
TCG GGC GGA GGT GGC GGC GAT GSA GAG AAC AAC TCG GAC CCA TCA ATA CCA CCC GAC AAG CAG CTC GTT CAC CAG ACC AAA ACC GGT
S G G G A D G E S N W D P S I C P D K Q V V C R Y Q T K T G
1261/421 1291/431 1321/441 1351/451 1381/461 1411/471
GAG CTC AAA ACC GTC ACC AAG GCC GAG TGG TGG CCG GAA CAG CTC GAG AGC GAA AAG GCT CTC GAA GAG CTC GGC ATC TGC GTC CAG AAG GGC AAC CTC GGC GTT
K L T K T E I E I A G G E K A L E E A G G I I S V D K G G N V I V
1351/451 1381/461 1411/471 1441/481 1471/491 1501/501
CAT ACC GCC AAC AAA CTG CCC CAT GTC GTC AAC CTC AAC GAG GAT CGC CCG ATG TCC GAG TGT CTC ATC TAT CAG ATC AAC CCC GGT CAT
H T P K K L P H L V D E D P L M S E G C L I Y Q I K P G G H
1501/501 1531/511 1561/521 1591/531 1621/541 1651/551
ACA CTG GTT GGC AAC CTA GAC AGC GGT CCC GAC GTT CAT ATC AAG T L AGC GGC ACC AAG ATC TGC AAC AAG CAC TGC ATG TTT GAT CAT
T L V G N L G S G T K H C M F D D H
1621/541 1651/551 1681/561 1711/571 1741/581 1771/591
CAG GAC GGC CTT GTC ACG GTC ACC GGC ATG CCG GAC AGC ACC ATG GTC AAC GCG AAA CGT CTT GCA CCA GAG GAG CCA AAG GCG ATT
Q B S L V T V T A M P E M T M V N G K T A M V A P D E P K R L R
1711/571 1741/581 1771/591 1801/601 1831/611 1861/621
CGA TCG GTC TAC AGA GTT I C G GGC GAT TTT CAT TGT TTT CGC TTC AAC CAT CCC GAA GAG GTC GGA AAG GCG CGA GAT CGT GTC CGG
R S G Y R V V I L G D F H V F R F N H P E E V L G R K A R D R V R
1801/601 1831/611 1861/621 1891/631 1921/641 1951/651
TCC ACC CTT GCT CTG TCC AGC GGC GAA GCG CAC AAC GAA ACG CTC ATG GAT GGC GAC TTG CCC TCC ATT CGT CCT GAC TCG CCT GCT TCC
S T L A L S T G E A H N E E L I D G D L P S T R P D S P A S
1891/631 1921/641 1951/651 1981/661 2011/671 2041/681
GGA GAC GAT GAT
G D V D W T Y A R C R G E Y T M A K L N G Q N V N F D N C L N A E E
1981/661 2011/671 2041/681 2071/691 2101/701 2131/711
GAC CTC GAA AAG TTG TGC GAA GAC ATC TCG CCG GCT CGA TCC AAA AAG TCG ATG GAA GAG S V L G G R P E S R A S
D L K L F E D I S R A R S K K S M G S V V G G R P E S R A S
2071/691 2101/701 2131/711 2161/721 2191/731 2221/741
CTG TTT GAC GAT AAT GCC AGC GAG TCG GCG AGC TCG GTT ATC CGA CCG TAC TCG CAT GGC GCA CTC ACC GAC GAT ACG AGC ATC CAT GCC
L F D D N A S E S A S V I R P Y S H G A L T D D T S I D P
2161/721 2191/731 2221/741 2251/751 2281/761 2311/771
TGG AGT CAG CCA GGC AGC GAG ATG GGT TCG ATG GCG TTC AGT GCC GGT ACC CCG ATC AAG GAG AAT GCC TAC ACC GGT GCG GCG CCC TCG
W S Q A G S E H G S A S A G T P I K E N A Y T G A G A S
2251/751 2281/761 2311/771 2341/781 2371/791 2401/801
TCG CCG GCG CTT GTT GCT GCA ACC CAG CAG AAG GAC GAG TCA CTG AGG GCA AAA GTC CCG CAG CAC TAC GAG GAA AAG GTC ACC CGT ATG GCC
S P A L V A A S H R E E E S L R A K V R L E Y E E A K L T R M A
2341/781 2371/791 2401/801 2431/811 2461/821 2491/831
AAC GGT TCG GCG CTA GCC GAT GAG CAC ATC ACG TAC AGC ACA CAG AAG CCA CTG CTA GCA AAA GTG CTC GTC AAG TGG AAG GCA
N G S P R L A D E P I E Y S D T Q K A L L R R K V L V K W K A
2431/811 2461/821 2491/831 2521/841 2551/851 2581/861
CAC ACC AAG GTA TCG ATG GCC GAA GAC GCT TTT TTT AAG GCG GTG CTC GTC AAG GAA GCG AAC GTA ATC AGC AAG CTC GCC AAG
H T K V S M A A E D A L C K A V L V K E A N V I S K E L A K R
2521/841 2551/851 2581/861 2611/871 2641/881 2671/891
GTC ACC TAT GAT GAT
V T Y Q Y T I V D D F P L A V P T S G V E A I A G L T E F D
2611/871 2641/881 2671/891 2701/901 2731/911 2761/921
GAC CTC TCC GAT CCG GAT GCT GCT TCA TCG AAG ATG CCA TCG ATG GGC ATC GAT GGC ATC GAT CAC TCG ACC TGC TAT GCT TGG
D V S D P D L A S C A K P C M G I K V L D Y L H S T C Y V W
2701/901 2731/911 2761/921 2791/931 2821/941 2851/951
TCC ATC CCA AAA TTT GAA CAG GCT CTG CCA AAG ATG CCG AAC CTA TAC ACC TTT GTC CAG AAA CCC GAA Y S K H L N W
S M P K F E Q R L Q K W F V D Y L H S T C Y V W
2791/931 2821/941 2851/951 2881/961 2911/971 2941/981
TCC GAT CCT TTC TAC GAG CCA CCT CAT CCG ACC TAT GCT TTT GTG GCG AGT GCT ATG GTA CCA CTC ACC CCG CTC TCT AGG CAG TCT TCG
S D P F Y E A P H P T G A F V A S T L V P L S T P L S R Q L S

```

¹¹ Es sind sowohl die Nucleotid- als auch die abgeleitete Aminosäure-Sequenz angegeben. Die vom PFAM-Server errechneten Domänen wurden in Farbe dargestellt. Dabei ist die Motordomäne rot, die FHA-Domäne orange und die PH-Domäne blau.

Danksagung

In den letzten Jahre haben mich zahlreiche Menschen begleitet, die meine Arbeit, meine Einstellung zur Wissenschaft oder meine persönliche Entwicklung beeinflusst haben. Besonders danken möchte ich dabei

Frau Prof. R. Kahmann. Sie behielt stets einen untrüglichen Blick für das Wesentliche und zeigte mir durch ihr Engagement für die Zellbiologie, dass Wissenschaft nie engstirnig sein sollte.

Herrn Gero Steinberg. Er prägte entscheidend meine Entwicklung als Wissenschaftler und lehrte mich, dass neben Begeisterung vor allem Zielstrebigkeit und Hartnäckigkeit für den Erfolg notwendig sind.

Kay Hofmann für die großzügige Hilfestellung bei der Sequenzanalyse und Stammbaumerstellung.

Günther Wöhlke für die Hilfe bei den ATPase-Assays. Er war immer für fachliche Diskussionen offen und besaß eine ansteckende Begeisterungsfähigkeit für biophysikalische Problemstellungen.

Lubica für die erheiternde Erweiterung meines Vokabulars und die „menschliche Komponente“.

meinen Eltern dafür, dass sie mir die Grundlagen wissenschaftlichen Denkens vermittelt und dieses gleichzeitig relativiert haben.

Irene für die schöne Musik und die vielen Stunden im Kampf ums Mikroskop.

Schubi für ein bisschen Sozialphilosophie in verschiedenen Lebenslagen.

Tina für den Rotwein und spannende Diskussionen.

Anne für die Einführung in ungewöhnliche Sportarten.

Michael für Koteletts, Katzen und Kinder.

Olli, Abram, Gerhard und Philip für Hilfe in Momenten, in denen ich nicht mehr weiter wusste.

Annemarie für einen Zoobesuch und dafür, dass sie mir gezeigt hat, dass man auch die einfachen Dinge genießen kann.

Evi für die harte, aber herzliche Hilfe bei Computerproblemen.

besonders Susanne für die Begleitung durch alle Hochs und Tiefs während meiner Arbeit. Sie war mir stets eine unersetzliche Hilfe.

Curriculum Vitae

Persönliche Daten

Name: Roland Wedlich-Söldner, geb. Söldner
Geburtsdatum: 13.02.1974
Geburtsort: München
Familienstand: verheiratet mit Susanne Wedlich

Schulbildung

1980 – 1982 Grundschole in Grenoble, Frankreich
1982 – 1983 Grundschole in Garching bei München
1983 – 1992 Gymnasium in Garching bei München
05/92 Abitur

Studium

1992 – 1996 Studium der Biologie an der Ludwig-Maximilians-Universität, München
1996 – 1997 Diplomarbeit am Institut für Genetik und Mikrobiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München
Betreuung: Prof. Dr. R. Kahmann
08/97 Diplom in Biologie

Promotion

1997 – 2000 Arbeit am Institut für Genetik und Mikrobiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München
01/01 – 05/01 Arbeit am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie in Marburg
Promotion zum Thema „Zelluläre Rolle und molekulare Grundlagen des Endosomentransports in *Ustilago maydis*“
Betreuung: Prof. Dr. R. Kahmann.