



**Struktur und zelluläre Funktionen von
cytoplasmatischem Dynein und
Organisation des Mikrotubuli-Cytoskeletts
in *Ustilago maydis***

Dissertation

zur

**Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat)**

**dem Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von**

**Anne Straube
aus Halle / Saale**

Marburg / Lahn 2002

**Struktur und zelluläre Funktionen von
cytoplasmatischem Dynein und Organisation des
Mikrotubuli-Cytoskeletts in *Ustilago maydis***

Dissertation

zur

**Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat)**

dem Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Anne Straube
aus Halle / Saale

Marburg / Lahn 2002

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation angenommen
am: 05.02.2003.

Erstgutachter: PD Dr. Gero Steinberg
Zweitgutachter: Prof. Dr. Renkawitz-Pohl

Tag der mündlichen Prüfung am: 10.02.2003.

Das Titelbild zeigt Mitose-Spindeln in einer konditionellen Mutante von Dyn2. Dabei sind die Mikrotubuli in rot und die Spindelpolkörper in grün zu sehen. Unter restriktiven Bedingungen sind abnormale, ja bizarre Spindelmorphologien zu beobachten. Siehe dazu Abbildung 32 auf Seite 46.

Teile dieser Arbeit sind veröffentlicht in:

Straube, A., Enard, W., Berner, A., Wedlich-Soldner, R., Kahmann, R. and Steinberg, G. (2001). A split motor domain in a cytoplasmic dynein. *EMBO Journal* 20 (18), 5091-5100.

Wedlich-Soldner, R., Schulz, I., Straube, A. and Steinberg, G. (2002). Dynein supports motility of endoplasmic reticulum in the fungus *Ustilago maydis*. *MBC*, 13, 965-977.

Straube, A., Brill, M., Oakley, B.R., Horio, T. and Steinberg, G. (2003). Microtubule organization requires cell cycle dependent nucleation at dispersed cytoplasmic sites, polar and perinuclear MTOCs in the plant pathogen *Ustilago maydis*. *MBC* in press.

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von Mai 1999 bis September 2000 am Institut für Genetik und Mikrobiologie der LMU München unter Leitung von Frau Prof. Dr. Regine Kahmann und Betreuung durch Herrn Dr. Gero Steinberg sowie von Oktober 2000 bis November 2002 am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie in der Abteilung Organismische Interaktionen unter Betreuung von Herrn PD Dr. Gero Steinberg durchgeführt.

Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation mit dem Titel „Struktur und zelluläre Funktionen von cytoplasmatischem Dynein und Organisation des Mikrotubuli-Cytoskeletts in *Ustilago maydis*“ selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Diese Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, 13.12.2002

Anne Straube

*Gewidmet meiner Mutter,
die schon während meiner Kindheit
die Liebe zu den kleinen Lebewesen in mir geweckt hat.*

Zusammenfassung

Vorraussetzung für das polare Wachstum der meisten eukaryontischen Zellen ist ein gerichteter Transport entlang von Mikrotubuli, die an Zellkern-assoziierten Mikrotubuli-organisierenden Zentren (MTOCs) nukleiert werden. In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass in der haploiden Sporidie des pflanzenpathogenen Pilzes *Ustilago maydis* verschiedene Mikrotubuli-Nukleationsstellen genutzt werden, um eine Mikrotubuli-Umorganisation während des Zellzyklus zu ermöglichen. Die *in vivo*-Beobachtung von GFP-Mikrotubuli und Peb1-YFP, einem Marker für Mikrotubuli-Plus-Enden, zeigte eine antipolare Mikrotubuli-Anordnung in Zellen ohne Knospe und deutete auf im Cytoplasma verteilte Mikrotubuli-Nukleationszentren hin. Während der Knospung bildete sich ein MTOC an der Wachstumsregion. Dies führte zu einer schnellen Polarisierung des Mikrotubuli-Cytoskeletts, wobei etwa 85% der Minus-Enden am Knospenhals fokussiert waren. Sowohl die Überexpression als auch die Reduktion von Tub2, dem γ -Tubulin aus *U. maydis*, beeinflussten die Anzahl der Interphase-Mikrotubuli, was dafür spricht, dass γ -Tubulin auch für die Nukleation Spindelpolkörper-unabhängiger Mikrotubuli benötigt wird. Der Spindelpolkörper ist in *U. maydis* nur während der mitotischen Phase aktiv, wenn astrale und Spindel-Mikrotubuli ausgebildet werden.

Die Fokussierung der Mikrotubuli-Minus-Enden an der Wachstumsregion legte die Vermutung nahe, dass der Dynein-vermittelte Transport eine große Bedeutung für das polare Wachstum in *U. maydis* hat. Cytoplasmatisches Dynein aus *U. maydis* unterscheidet sich durch die Organisation seiner schweren Kette von allen anderen bisher isolierten Motorproteinen. Die ATP-Hydrolyse-Stelle und die Mikrotubuli-Bindestelle werden von zwei essentiellen Genen kodiert, *dyn1* und *dyn2*, die in getrennte Polypeptide übersetzt werden und nur einen relativ labilen Komplex bilden. Diese Organisation ist überraschend, da eine enge Kopplung von ATP-Spaltung und der Verrichtung mechanischer Arbeit an der Mikrotubuli-Oberfläche für die Funktion eines Mikrotubuli-Motors erforderlich ist. Die Beteiligung an verschiedenen zellulären Prozessen zeigt allerdings, dass es trotz der ungewöhnlichen Organisation in *U. maydis* gelingt, einen funktionsfähigen Dynein-Komplex zu bilden. Für den 21S großen Dyn1-Komplex konnte eine ATP-unabhängige Mikrotubuli-Bindung gezeigt

werden; Dyn2, das vermutlich die Mikrotubuli-Bindestelle enthält, konnte allerdings *in vitro* nicht an Mikrotubuli binden.

Dyn2 kodiert zudem eine etwa 33 kD große C-terminale Domäne, die in vielen pilzlichen Dyneinen nicht enthalten ist, aber in höheren Eukaryonten gefunden wird. Die hohe Konservierung weist auf eine funktionale Bedeutsamkeit dieser Region hin. Die Überexpression der C-terminalen 311 Aminosäuren von *Dyn2* führte zu Veränderungen der dynamischen Instabilität von Interphase-Mikrotubuli, während Dynein-abhängige Transportvorgänge dadurch kaum beeinträchtigt waren.

Pilzliche cytoplasmatische Dyneine sind für Positionierung und Transport des Zellkerns zuständig. Eine substantielle Bedeutung für den Ablauf der Mitose konnte bisher jedoch nicht gezeigt werden. In dieser Arbeit wurde nachgewiesen, dass Dynein aus *U. maydis* für die Trennung der Spindelpolkörper und die Verlängerung der Spindel während der Anaphase wichtig ist, sowie das Entfernen der Kernhülle vor der Mitose ermöglicht. Während der Passage des Knospenhalses war die Umlagerung von Nup107-YFP, einem fluoreszenzmarkierten Nucleoporin, von den Kernporen an die mitotischen Chromosomen zu beobachten. Die restliche Kernhülle schien in der Mutterzelle zurückzubleiben. Die Beteiligung von Dynein an bislang unentdeckten Funktionen in der Mittelzone der Anaphase-Spindel wird aufgrund seiner Lokalisation gefordert.

Abkürzungen und Fachbegriffe

A	Alanin
aa	Aminosäuren
AAA	„ATPase associated with cellular activities“ = Familie der Chaperon-ähnlichen ATPasen
Abb.	Abbildung
α	bei Antikörpern: anti-
Amp	Ampicillin
ATP	Adenosintriphosphat
ble ^R	Phleomycin-Resistenz-Kassette
bp	Basenpaar(e)
C311	C-terminale Domäne (311 Aminosäuren lang) von Dyn2 aus <i>U. maydis</i>
cbx-Lokus	Genort der Eisen-Schwefel-Untereinheit der Succinatdehydrogenase aus <i>U. maydis</i>
cbx ^R	Carboxin-Resistenz-Kassette
CFP	cyan fluoreszierendes Protein
CM	Komplettmedium
CM-A	Komplettmedium mit 1% Arabinose
CM-G	Komplettmedium mit 1% Glucose
<i>crg</i> -Promotor	Promotor des Arabinase-Gens aus <i>U. maydis</i>
C-terminal	carboxy-terminal
DAPI	4',6'-Diamidino-2-Phenylindol
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
DHC	„Dynein Heavy Chain“ = schwere Dynein-Kette
DIC	„Differential Interference Contrast“
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleotide
DTT	Dithiothreitol
E	Glutaminsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eGFP	„enhanced green fluorescent protein“ = verstärktes GFP
EGTA	Ethylenglykoltetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
F	Phenylalanin
FACS	„Fluorescence Assisted Cell Sorter“ = Durchflußzytometer
G	Glycin
G9	Antikörper gegen ein konserviertes Peptid aus <i>S. pombe</i> γ -Tubulin
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HA	Hämagglutinin (Oberflächenglykoprotein) des Influenza-Virus
hyg ^R	Hygromycin-Resistenz-Kassette

kb	Kilobasenpaar
kD	Kilodalton
L	Leucin
min	Minute
ml	Milliliter
µl	Microliter
µm	Micrometer
MPM-2	Antikörper, der mitotische Phosphoproteine erkennt
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
MT	Mikrotubulus
MTOC	Mikrotubuli-organisierendes Zentrum
nat ^R	Nourseothricin-Resistenz-Kassette
nt	Nukleotide
N-terminal	amino-terminal
OD	Optische Dichte
<i>otef</i> -Promotor	Promotor des Translations-Elongationsfaktors 1 aus <i>U. maydis</i> , durch 14 Tetracyclin-Operatorsequenzen 8-fach verstärkt
PAA	Polyacrylamid
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
Peb1	Mikrotubuli-Plus-Enden-bindendes Protein aus <i>U. maydis</i>
PEG	Polyethylenglykol
PIPES	Piperazin-N-N'-bis-(2-ethansulfonat)
PTS	paarweise vorliegende <u>T</u> ubulin- <u>S</u> truktur in der Knospenhalsregion
R	Arginin
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
S	Sedimentationskoeffizient
SDS	Natriumdodecylsulfat
T	Threonin
TAE	Tris-Acetat + Na ₂ EDTA
TBE	Tris-Borat + Na ₂ EDTA
TE	Tris-HCl + Na ₂ EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
Tub1	α-Tubulin aus <i>U. maydis</i>
Tub2	γ-Tubulin aus <i>U. maydis</i>
U	„Unit“ = Enzymeinheit
Upm	Umdrehungen pro Minute
wt	Wildtyp
xg	Vielfaches der Erdbeschleunigung
YFP	gelb fluoreszierendes Protein

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG	I
ABKÜRZUNGEN UND FACHBEGRIFFE	III
INHALTSVERZEICHNIS	V
1 EINLEITUNG	1
1.1 Das Mikrotubuli-Cytoskelett.....	1
1.2 Mikrotubuli-abhängige Motorproteine.....	3
1.3 Cytoplasmatisches Dynein in <i>U. maydis</i>	5
1.4 <i>Ustilago maydis</i> – Pathogen, Delikatesse und Modellorganismus	6
2 ERGEBNISSE	9
2.1 Organisation des MT-Cytoskeletts in <i>U. maydis</i>	9
2.1.1 Peb1 gehört zur Familie der EB1-ähnlichen Proteine und lokalisiert an wachsenden Plus-Enden von Mikrotubuli	9
2.1.2 Polares Wachstum wird von Änderungen in der Mikrotubuli-Ausrichtung begleitet .	11
2.1.3 Mikrotubuli-Nukleationsstellen im Cytoplasma von Interphase-Zellen	12
2.1.4 γ -Tubulin ist für die Nukleation an cytoplasmatischen Nukleationsstellen wichtig	15
2.2 Die Struktur des cytoplasmatischen Dyneins aus <i>U. maydis</i>	18
2.2.1 Die DHC aus <i>U. maydis</i> besteht aus zwei interagierenden Polypeptiden	18
2.2.2 Monomeres Dyn2 bindet <i>in vitro</i> nicht an Mikrotubuli	21
2.2.3 Fusionen aus Dyn1 und Dyn2 können die Mutantenphänotypen teilweise retten	22
2.3 Zelluläre Funktion der C-terminalen Domäne von cytoplasmatischem Dynein..	26
2.3.1 Deletionen in der C-terminalen Domäne führen zu einem letalen Phänotyp.....	26
2.3.2 Lokalisation von C311	31
2.3.3 Die Überexpression der C-terminalen Domäne führt zu Veränderungen der dynamischen Instabilität von Mikrotubuli	32
2.4 Funktionen von cytoplasmatischem Dynein während der Mitose von <i>U. maydis</i>	36
2.4.1 Dynein lokalisiert in der Mitose-Spindel	36
2.4.2 Markerproteine für die Kernhülle	37

2.4.3	Dynein ist für den Kernhüllenabbau vor der Mitose wichtig.....	40
2.4.4	Dynein ist essentiell für die Verlängerung der Spindel während der späten Anaphase.....	43
2.4.5	Dynein ist für die Spindelpolkkörperentrennung wichtig.....	44
3	DISKUSSION	47
3.1	Organisation des Mikrotubuli-Cytoskeletts in <i>U. maydis</i>.....	47
3.2	Mikrotubuli-Ausrichtung und Dynein-abhängiger Transport in <i>U. maydis</i>	50
3.3	Kernhüllenabbau in <i>U. maydis</i>.....	51
3.4	Funktionen von Dynein während der Mitose in <i>U. maydis</i>	54
3.5	Struktur und Mikrotubuli-Bindung des Dynein-Komplexes in <i>U. maydis</i>	57
3.6	Schlussfolgerungen und Ausblick.....	59
4	MATERIAL UND METHODEN	61
4.1	Material und Bezugsquellen.....	61
4.1.1	Medien, Lösungen, Enzyme und Kits	61
4.1.2	Antikörper	61
4.1.3	Oligonukleotide	62
4.1.4	Verwendete Plasmide und Plasmidkonstruktionen	63
4.1.5	<i>E. coli</i> -Stämme	71
4.1.6	<i>U. maydis</i> -Stämme	71
4.2	Mikrobiologische Methoden.....	73
4.2.1	Kultivierung von <i>Escherichia coli</i>	73
4.2.2	Kultivierung von <i>Ustilago maydis</i>	74
4.2.3	Transformation von <i>U. maydis</i>	76
4.3	Molekularbiologische Methoden.....	77
4.3.1	Isolierung von Nukleinsäuren	77
4.3.2	<i>in vitro</i> -Modifikationen von Nukleinsäuren.....	79
4.3.3	RbCl-Transformation von <i>E. coli</i>	81
4.3.4	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	81
4.3.5	Nachweis von Nukleinsäuren im Southern Blot	84
4.3.6	Sequenz- und Strukturanalyse	85
4.4	Biochemische Methoden	86
4.4.1	Isolierung von Proteinen	86
4.4.2	Auftrennung und Nachweis von Proteinen	87
4.4.3	Immunpräzipitation	89

4.4.4	Saccharose-Dichtegradient.....	89
4.4.5	Mikrotubuli-Bindeassay	90
4.4.6	Expression und Reinigung von 6xHis-markierten Proteinen.....	91
4.4.7	Herstellung und Affinitätsreinigung von Antikörpern	92
4.5	Zellbiologische Methoden	92
4.5.1	Fixieren und Färben von Zellen	92
4.5.2	Immunfluoreszenz	93
4.5.3	Mikroskopie und Bildverarbeitung	93
4.5.4	FACS-Analyse	95
5	LITERATURVERZEICHNIS	96

1 Einleitung

Koordinierte Bewegungen ausführen zu können, ist eine der grundlegenden Eigenschaften eines jeden Lebewesens. Durch gezielte Bewegungen gelingt dem Leopard, eine Antilope zu erbeuten, phototrophen Purpurbakterien, zum Licht zu schwimmen und der Mimose, ihre Blätter zusammenzufalten. Gerichtete Bewegung findet aber vor allem auf subzellulärer und molekularer Ebene statt. Die Bewegung von Chromosomen, RNA-Molekülen oder Vesikeln, angefüllt mit Enzymen und Strukturproteinen ist für die Gleichverteilung des Erbmaterials bei der Zellteilung, den Aufbau einer polarisierten Zelle und die Anlieferung von Strukturkomponenten zu den Wachstumszonen notwendig. Diese Bewegung wird in eukaryontischen Zellen durch ein komplexes System an filamentösen Proteinstrukturen wie Mikrotubuli und Aktinfilamente, Motorproteinen wie Myosine, Kinesine und Dyneine, Zielerkennungsmolekülen wie SNAREs und unzähligen regulatorischen Komponenten ermöglicht. Eine zentrale Bedeutung für den intrazellulären Langstrecken-Transport in den meisten eukaryontischen Zelltypen haben Mikrotubuli und Mikrotubuli-assoziierte Proteine.

1.1 Das Mikrotubuli-Cytoskelett

Das Mikrotubuli-Cytoskelett ist für verschiedenste Lebensprozesse von essentieller Bedeutung. Dazu gehört der Aufbau und die Funktion der mitotischen Spindel, der intrazelluläre Transport von Organellen und Vesikeln und die Erlangung und Erhaltung der Polarität der Zelle. Mikrotubuli sind Polymere, die aus α - und β -Tubulin-Heterodimeren aufgebaut sind (Bryan und Wilson, 1971). Die Tubulin-Dimere sind longitudinal in Protofilamenten angeordnet, von denen 12-15 lateral zusammengelagert eine 25 nm dicke Röhre bilden. Dieser Aufbau führt zu unterschiedlichen Enden mit β -Tubulin am Plus-Ende und α -Tubulin am Minus-Ende und bewirkt eine intrinsische Polarität der Mikrotubuli (Nogales *et al.*, 1999).

Mikrotubuli sind dynamische Polymere, die an den Enden durch Hinzufügen oder Abspalten von Tubulin-Dimeren wachsen und schrumpfen können (Desai und Mitchison, 1997). Dabei ist die Polymerisationsgeschwindigkeit am Plus-Ende höher als am Minus-Ende. Mikrotubuli-

Enden zeigen einen zufälligen Wechsel zwischen Phasen langsamen Wachstums und schneller Depolymerisation, ein Verhalten, das als dynamische Instabilität bekannt ist (Mitchison und Kirschner, 1984). Der Übergang von Wachstum zu Schrumpfen wird Katastrophe genannt, während der Wechsel zurück zum Wachstum „Rescue“ heißt. Es sind verschiedene Proteine bekannt, die bevorzugt mit dem Mikrotubuli-Plus-Ende interagieren und deren Stabilität modifizieren können. Dazu gehören CLIP-170 und Homologe (Perez *et al.*, 1999; Brunner und Nurse, 2000), Dynein und Dynactin (Valetti *et al.*, 1999; Vaughan *et al.*, 1999; Xiang *et al.*, 2000) und auch Proteine der EB1-Familie (Mimori-Kiyosue *et al.*, 2000; Tirnauer und Bierer, 2000). Diese Proteine sind von Hefen bis zum Menschen konserviert und ermöglichen beispielsweise die gezielte Stabilisierung jedes einzelnen Mikrotubulus bis der Zellpol erreicht ist (Brunner und Nurse, 2000) oder die Verankerung von Plus-Enden an spezifischen Stellen des Zellkortex (Adames und Cooper, 2000; Lee *et al.*, 2000).

Im Gegensatz zu den dynamischen Plus-Enden sind die Minus-Enden gewöhnlich stabilisiert und in das perinukleäre MTOC (Mikrotubuli-organisierendes Zentrum) eingebettet. Dieses wird in Wirbeltieren Centrosom (Kirschner, 1978) und in Pilzen Spindelpolkörper genannt (Heath, 1981). Beide MTOCs enthalten γ -Tubulin, ein spezialisiertes Tubulin, das zuerst in *Aspergillus nidulans* entdeckt (Oakley und Oakley, 1989) und später in allen daraufhin untersuchten Eukaryonten gefunden wurde (Joshi, 1994). γ -Tubulin ist für die Nukleation von Mikrotubuli am Centrosom und am Spindelpolkörper essentiell (Oakley *et al.*, 1990; Horio *et al.*, 1991; Joshi *et al.*, 1992; Felix *et al.*, 1994). Jedoch ist der Mechanismus mit dem γ -Tubulin die Polymerisation von Mikrotubuli unterstützt noch nicht aufgeklärt (Leguy *et al.*, 2000). Interessanterweise gibt es viele Zellen, in denen die meisten Mikrotubuli nicht im Centrosom verankert sind. Dadurch können in diesen Zellen andere als radiale Anordnungen der Mikrotubuli beobachtet werden (Hyman und Karsenti, 1998). Solche nicht-centrosomalen Mikrotubuli können auf verschiedene Weise gebildet werden. Freie Mikrotubuli werden entweder am Centrosom nukleiert und dann freigegeben (Keating *et al.*, 1997) oder sie können durch das Brechen von Mikrotubuli (Waterman-Storer und Salmon, 1997) oder die direkte Nukleation im Cytoplasma entstehen (Vorobjev *et al.*, 1997; Yvon und Wadsworth, 1997). Da die Tubulin-Konzentration im Cytoplasma normalerweise zu niedrig ist, um eine spontane Polymerisation zu ermöglichen, sind für die Mikrotubuli-Nukleation im Cytoplasma zelluläre Faktoren wie γ -Tubulin notwendig. Entsprechend wurde γ -Tubulin auch an nicht-

centrosomalen MTOCs lokalisiert (Horio *et al.*, 1991; McDonald *et al.*, 1993; Muresan *et al.*, 1993; Chabin-Brion *et al.*, 2001; Heitz *et al.*, 2001).

Durch Modifikationen am Minus-Ende wie Nukleation, Verankerung oder Freigabe und am Plus-Ende wie gezielte Stabilisierung und Destabilisierung können verschiedene polarisierte Mikrotubuli-Muster aufgebaut werden. Erst eine gerichtete Anordnung von Mikrotubuli ermöglicht den Transport von Makromolekülen, Organellen und Vesikeln zu den polaren Wachstumszonen und die gleichmäßige Vererbung der Chromosomen während der Mitose.

1.2 Mikrotubuli-abhängige Motorproteine

Der gerichtete Transport entlang der Mikrotubuli wird durch sogenannte Motorproteine vermittelt. Motorproteine wandeln bei der ATP-Hydrolyse freigewordene Energie in mechanische Energie um. Durch die gleichzeitige spezifische Bindung an das Transportgut („Cargo“) wird eine gerichtete Bewegung von Organellen, mRNAs, Chromosomen etc. in der Zelle möglich. Mikrotubuli-abhängige Motoren gehören entweder zur Kinesin-Superfamilie oder zu den Dyneinen. Die zentrale Komponente jeden Motormoleküls ist seine schwere Kette. Der Motorkopf enthält die ATPase-Stelle und eine Mikrotubuli-Bindestelle und wird aus einem Teil der schweren Kette gebildet. Dabei ist die Lage der Motordomäne in der Primärsequenz oft für die Bewegungsrichtung entscheidend. So wandern Dyneine und C-terminale Kinesine zum Minus-Ende der Mikrotubuli, während sich die meisten Kinesine zum Mikrotubuli-Plus-Ende bewegen. Viele Prozesse werden durch eine Kräftebalance zwischen entgegengesetzt ausgerichteten Motoren gesteuert. Ein Beispiel hierfür ist die Aufrechterhaltung einer konstanten Spindellänge während der Metaphase in *Drosophila*-Zellen, wobei das minus-gerichtete Kinesin Ncd dem plus-gerichteten KLP61F und cytoplasmatischem Dynein entgegenwirkt (Sharp *et al.*, 2000a). Zudem modifizieren Motorproteine die dynamische Stabilität der Mikrotubuli und es ist bisher ungeklärt, in welchem Umfang die gezielte Destabilisierung eines Mikrotubulus oder das „Entlanglaufen“ des Motorkopfs auf der Mikrotubuli-Oberfläche zum Transport verschiedener „Cargos“ beitragen (McIntosh *et al.*, 1969; Inoue und Salmon, 1995).

Dynein unterscheidet sich von den Kinesinen durch seine enorme Größe. Die schwere Dynein-Kette (DHC, Dynein Heavy Chain) ist etwa 450 kD groß und bildet mit 70% ihrer C-terminalen Aminosäuren einen Motorkopf, der zehnmal größer ist, als der der Kinesine (Koonce und Samsó, 1996; Samsó *et al.*, 1998). Zudem dimerisieren zwei DHCs im N-terminalen Bereich und binden dort die leichten und mittelschweren Dynein-Ketten

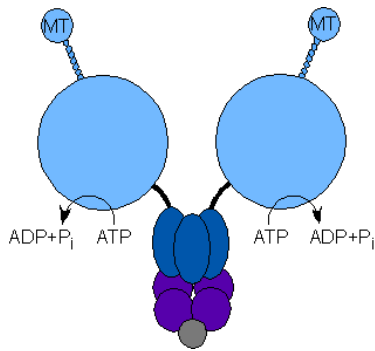


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Dynein-Komplexes.

Zwei schwere Ketten (hellblau) dimerisieren und interagieren mit leichten und mittelschweren Ketten (blau, lila) im N-terminalen Bereich. Die C-terminalen Bereiche bilden die Motorköpfe, die sowohl eine ATP-Hydrolysestelle als auch die Mikrotubuli-Bindestelle enthalten. Abbildung modifiziert nach Steinberg, 2000.

(Habura *et al.*, 1999; Tynan *et al.*, 2000) (Abb. 1). Der Dynein-Motorkopf besteht aus einem Ring globulärer Untereinheiten (Samso *et al.*, 1998), wobei 6 von diesen höchstwahrscheinlich AAA-Module darstellen (Neuwald *et al.*, 1999). Deshalb wird Dynein zur Familie der AAA-Proteine, zu den ATPasen, die mit zellulären Aktivitäten assoziiert sind, gezählt (King, 2000). Die ersten 4 AAA-Module enthalten ATP-Bindestellen, sogenannte P-Loops, wobei eine ATP-Hydrolyse wahrscheinlich nur am 1. P-Loop erfolgt (Gibbons *et al.*, 1991; Ogawa, 1991). Zwischen dem 4. und 5. AAA-Modul befindet sich die Mikrotubuli-Bindestelle, eine intramolekulare Coiled-coil-Struktur mit einer kleinen globulären Domäne, die wahrscheinlich als 7., elongierte Domäne in der Transmissionselektronenmikroskopie sichtbar ist (Gee *et al.*, 1997; Koonce, 1997; Samso *et al.*, 1998). Die Kopplung von ATP-Hydrolyse und Bewegung der

Mikrotubuli-Binde-Domäne erfolgt vermutlich durch Konformationsänderungen, die den Winkel zwischen den AAA-Modulen verändern (Mocz und Gibbons, 2001).

Da Kinesine oft eine spezialisierte Aufgabe übernehmen, enthält eine Zelle meist verschiedene Vertretern der Kinesin-Superfamilie. Dagegen ist oft nur ein Dynein zu finden, das eine ganze Reihe wichtiger zellulärer Funktionen hat (Goldstein, 2001). So sorgt Dynein in den Zellen höherer Eukaryonten für die Erhaltung und Lokalisation des Golgi-Apparates (Corthesy-Theulaz *et al.*, 1992), den Vesikel-Transport zwischen frühen und späten Endosomen (Aniento *et al.*, 1993), die Akkumulation von Pigmenten in Fisch-Melanophoren (Ogawa *et al.*, 1987; Rodionov und Borisy, 1997) und den Transport von Viren (Sodeik *et al.*, 1997; Jacob *et al.*, 2000; Raux *et al.*, 2000; Alonso *et al.*, 2001; Suomalainen *et al.*, 2001) und RNA (Schnorrer *et al.*, 2000; Bullock und Ish-Horowicz, 2001; Wilkie und Davis, 2001). Zudem erfüllt Dynein essentielle Funktionen während der Mitose höherer Eukaryonten (Karki und Holzbaur, 1999).

In verschiedenen pilzlichen Modellsystemen ist Dynein an Transport und Positionierung des Zellkerns beteiligt (Eshel *et al.*, 1993; Xiang *et al.*, 1995; Inoue *et al.*, 1998; Minke *et al.*, 1999). Jedoch ist sein Fehlen in diesen Organismen nicht letal. In dem pflanzenpathogenen Pilz *Ustilago maydis* hat cytoplasmatisches Dynein wie in höheren eukaryontischen Zellen

essentielle Bedeutung für das Überleben und zeigt einen ungewöhnlichen Aufbau seiner schweren Kette (Straube *et al.*, 2001).

1.3 Cytoplasmatisches Dynein in *U. maydis*

Die schwere Kette des cytoplasmatischen Dyneins aus *U. maydis* wird abweichend von allen anderen bisher isolierten Motorproteinen von zwei Genen kodiert (Abb. 2, Straube *et al.*, 2001). Das Gen *dyn1* codiert vermutlich für den Schwanz-Bereich des Moleküls mit den Bindungsstellen für die leichten und intermediären Ketten und der Dimerisierungsdomäne (Habura *et al.*, 1999) und für den Teil des Motorkopfes, der die Nukleotid-Bindestellen (Gibbons *et al.*, 1991;

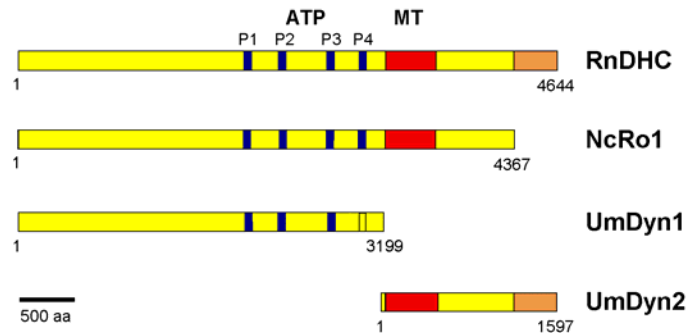


Abbildung 2: Primärstruktur von Dyn1 und Dyn2.

Die DHC1 aus Ratte (oben) enthält 4 P-Loops (blau), die auch in der vorhergesagten Aminosäure-Sequenz von Dyn1 enthalten sind. Allerdings weicht P4 in Dyn1 von der Konsensus-Sequenz ab. Dyn1 enthält keine Mikrotubulin-Bindestelle (rot). Diese ist in Dyn2 zu finden. Die etwa 33 kD große C-terminale Domäne (orange) ist ebenfalls in Dyn2 enthalten, obwohl DHCs anderer Pilze, wie z.B. Ro1 aus *N. crassa* (2. von oben), diese nicht besitzen. Balken: 500 Aminosäuren. Abbildung modifiziert nach Straube *et al.*, 2001.

Ogawa, 1991) bereitstellt. Der restliche Teil des Kopfbereiches mit der Mikrotubulin-Bindestelle (Gee *et al.*, 1997; Koonce, 1997) scheint von *dyn2* codiert zu werden. Beide Gene sind auf verschiedenen Chromosomen lokalisiert worden und werden in zwei getrennte mRNAs transkribiert (Straube *et al.*, 2001). Für die Funktionsanalyse sind Mutanten hergestellt worden, bei denen entweder *dyn1* oder *dyn2* unter der Kontrolle des regulierbaren *crg*-Promotors (Bottin *et al.*, 1996) stehen (FB1rDyn1 und FB1rDyn2). Dieser Promotor wird durch einen Wechsel von arabinose- zu glucosehaltigem Medium reprimiert. FB1rDyn1 und FB1rDyn2 waren nicht fähig auf glucosehaltigem Medium Kolonien zu bilden. Unter reprimierenden Bedingungen konnten Defekte in der Kernverteilung (Abb. 3) und Zellmorphologie beobachtet werden. Dyn1 und Dyn2 scheinen also, wie aus anderen Pilzen bekannt, am Kerntransport beteiligt zu sein (Straube *et al.*, 2001). Die Letalität der Dynein-Nullmutanten ist allerdings für Pilze ungewöhnlich und bisher nur aus *Dictyostelium* und höheren Eukaryonten bekannt (Dick *et al.*, 1996; Gepner *et al.*, 1996; Koonce und Knecht, 1998). Dynein aus *U. maydis* ist also nicht nur wegen seiner einzigartigen Struktur, sondern

auch aufgrund seiner funktionellen Bedeutsamkeit sehr interessant. Der in dieser Arbeit untersuchte Modellorganismus *U. maydis* wird im folgenden Abschnitt näher vorgestellt.

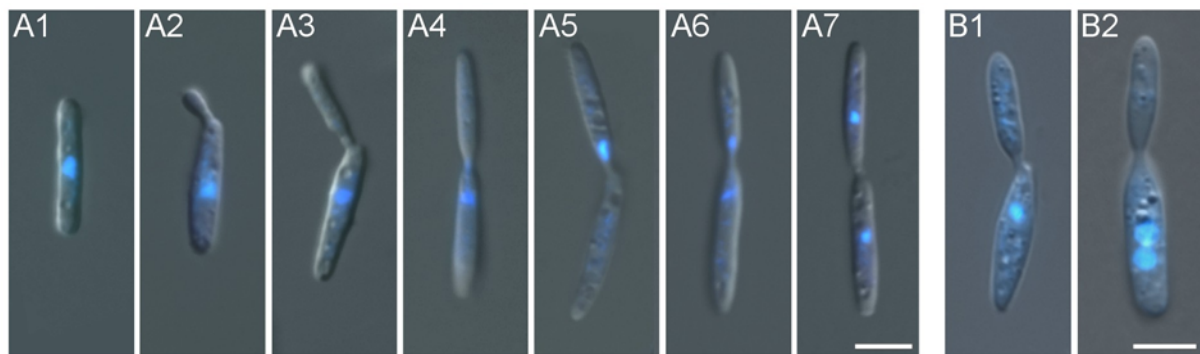


Abbildung 3: Kernwanderung in *U. maydis*.

A: Die zigarrenförmigen Sporidien von *U. maydis* vermehren sich durch polares Knospen. Während der Interphase befindet sich der Zellkern in der Zellmitte (A1, A2). Erreicht die Knospe etwa 2/3 der Mutterzelllänge, so wird der Kern durch den Knospenhals in die Tochterzelle transportiert (A3, A4). Dort wird die Mitose initiiert (A5). Während der späten Anaphase wird einer der Tochterkerne wieder durch den Knospenhals zurück in die Mutterzelle gezogen (A6). Die Mitose endet mit der Positionierung beider Kerne in der Mitte von Tochter- bzw. Mutterzelle (A7). Überlagerung von DAPI-Färbung und DIC-Bild. Balken: 5µm. Abbildung zur Verfügung gestellt von G. Steinberg.

B: In konditionellen Mutanten von *Dyn2* wird der Zellkern nicht mehr in die Tochterzelle transportiert. Deswegen können mitotische Kerne in der Mutterzelle beobachtet werden (B1) und beide Tochterkerne verbleiben nach der Mitose in der Mutterzelle (B2). Balken: 5µm.

1.4 *Ustilago maydis* – Pathogen, Delikatesse und Modellorganismus

Ustilago maydis ist der Erreger des Maisbeulenbrandes. Der Pilz verursacht die Ausbildung von rußig, verbrannt aussehenden Tumoren, die mit dunkel gefärbten Sporen angefüllt sind. Diese können an Stamm, Blättern oder Blüten einer infizierten Maispflanze auftreten. *U. maydis* gehört zur Klasse der Basidiomyceten und ist ein fakultativ biotropher Pflanzenparasit ohne Fruchtkörper. Während seines Lebenszyklus existiert der Pilz in drei verschiedenen Kernphasen, die mit unterschiedlichen morphologischen Stadien gekoppelt sind. Haploide *U. maydis* Sporidien weisen eine zigarrenförmige Zellform auf und vermehren sich hefeartig durch wechselseitiges Sprossen an den Zellpolen (Abb.3; Wedlich-Söldner *et al.*, 2002b). Treffen zwei kompatible Sporidien auf der Wirtspflanze Mais aufeinander, so bilden sie Konjugationshyphen aus, die fusionieren und ein Dikaryon ausbilden. Dieses Filament dringt nach Ausbildung Appressorien-ähnlicher Strukturen direkt in die Epidermis junger Blätter ein (Snetselaar und Mims, 1993). Innerhalb des pflanzlichen Gewebes wächst der Pilz intra- und interzellulär als dikaryotisches Mycel. An geeigneten Stellen werden dann Tumore gebildet. Diese bestehen aus einem Verband stark vergrößerter Pflanzenzellen.

Innerhalb der Tumore kommt es zu einer starken Proliferation des Pilzes. Nach der Karyogamie entwickeln sich sporogene Hyphen, aus denen sich diploide Brandsporen differenzieren. Die Teliosporen werden freigesetzt, wenn die Tumore aufbrechen. Bei Auskeimen der Sporen entstehen als Ergebnis der meiotischen Teilungen wieder haploide Sporidien.

U. maydis ist aber nicht nur als Pathogen einer weit verbreiteten und intensiv angebauten Nutzpflanze bekannt. Huitlacoche, junge Tumore von *U. maydis*, sind in Mexiko und anderen lateinamerikanischen Staaten ein traditionelles Nahrungsmittel und werden auch in Nordamerika als Delikatesse gehandelt (Banuett, 1992; Valverde *et al.*, 1995). Aufgrund seiner ernährungstechnisch günstigen Zusammensetzung wird über eine Herstellung von Huitlacoche in großem Maßstab nachgedacht (Valverde *et al.*, 1995).

Während der letzten Jahrzehnten wurde *U. maydis* als Modellorganismus für die Aufklärung grundlegender Lebensprozesse etabliert. Eine kurze Generationszeit, eine einfache axenische Kultivierung in großem Maßstab und ein relativ schneller sexueller Lebenszyklus von nur 3 Wochen ermöglichen rasche genetische Arbeiten. So wird *U. maydis* seit fast 40 Jahren für die Studien zur homologen Rekombination verwendet (Holliday, 1961; Christensen, 1963). Zudem existiert *U. maydis* während seiner vegetativen Phase in haploider Form, was molekulargenetische Manipulationen erheblich erleichtert. Entsprechend sind für *U. maydis* molekularbiologische Methoden wie Transformation auch mit freireplizierenden Plasmiden (Tsukuda *et al.*, 1988; Wang *et al.*, 1988), die Gen-Inaktivierung durch homologe Rekombination (Fotheringham und Holloman, 1989), mehrere Selektionsmarker (Gold *et al.*, 1994; Kojic und Holloman, 2000), Auxotrophiemarker (Holliday, 1961; Banks und Taylor, 1988; Kronstad und Leong, 1989) sowie konstitutive und regulierbare Promotoren (Holden *et al.*, 1989; Banks *et al.*, 1993; Bottin *et al.*, 1996; Spellig *et al.*, 1996; Brachmann *et al.*, 2001) etabliert. Diese Methoden ermöglichen die umfassende Funktionsanalyse verschiedenster Gene. Eine einfache Identifizierung und Isolation neuer Gene wird durch die Verfügbarkeit der genomischen Sequenz von *U. maydis* ermöglicht (zur Verfügung gestellt von der Bayer CropScience AG).

In den letzten Jahren hat sich *U. maydis* zu einem Modellorganismus für die Untersuchung des Mikrotubuli-Cytoskeletts entwickelt. Mikrotubuli und Mikrotubuli-abhängige Transportvorgänge sind für das polare Wachstum von *U. maydis* essentiell (Wedlich-Söldner *et al.*, 2000; Steinberg *et al.*, 2001). Das Mikrotubuli-Cytoskelett ist während der Interphase von 2-4 Mikrotubuli-Bündeln, die die gesamte Zelllänge durchspannen, geprägt. Bei Beginn der Knospenbildung wird eine gepaarte Tubulin-Struktur (PTS) an der Knospungsstelle

gebildet und es wurde vermutet, dass in den PTS die Mikrotubuli-Minus-Enden fokussiert werden und so eine Polarisierung des Mikrotubuli-Cytoskeletts erfolgt (Steinberg *et al.*, 2001). Solch eine Polarisierung würde bedeuten, dass der minus-gerichtete Mikrotubuli-abhängige Transport während des Knospenwachstums eine entscheidende Rolle spielt. Ob diese Hypothese stimmt, soll in der vorliegenden Arbeit geklärt werden. Cytoplasmatisches Dynein lokalisierte an den PTS und in Dynein-defizienten Zellen verloren diese Tubulin-Strukturen ihre polare Lokalisation (Straube *et al.*, 2001). Zudem zeigten Dynein-Mutanten eine massive Störung des Mikrotubuli-Cytoskeletts, die Bündel lösten sich auf und Veränderungen der Mikrotubuli-Stabilität wurden beobachtet (Schulz, 2000). Cytoplasmatisches Dynein hat also in *U. maydis* eine große Bedeutung nicht nur für den Transport entlang von Mikrotubuli, sondern auch für die Struktur des Mikrotubuli-Cytoskeletts selbst.

2 Ergebnisse

2.1 Organisation des MT-Cytoskeletts in *U. maydis*

Die Basis für das Verstehen der zellulären Funktionen eines zum Mikrotubuli-Minus-Ende gerichteten Motors, ist ein umfassendes Wissen über die Ausrichtung der Mikrotubuli in der Zelle. Es waren bereits in einer früheren Studie die Dynamiken GFP-markierter Mikrotubuli in *U. maydis* untersucht worden (Steinberg *et al.*, 2001). Dabei wurden dynamische Enden als Mikrotubuli-Plus-Enden klassifiziert und so die Ausrichtung der Mikrotubuli bestimmt. Da auch für Minus-Enden ein dynamisches Verhalten beobachtet werden konnte, wenn diese vom MTOC abgelöst werden (Keating *et al.*, 1997), konnte diese Analyse nur Hinweise liefern. Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher die Ausrichtung der Mikrotubuli noch einmal mit anderen Methoden untersucht werden. Zu den bevorzugt an Mikrotubuli-Plus-Enden bindenden Proteinen gehören EB1 und seine Homologe. Für die vorliegende Arbeit wurde ein EB1-ähnliches Protein als Marker für das Mikrotubuli-Plus-Ende und γ -Tubulin für das Minus-Ende benutzt.

2.1.1 *Peb1* gehört zur Familie der EB1-ähnlichen Proteine und lokalisiert an wachsenden Plus-Enden von Mikrotubuli

Die genomische Sequenz von *Ustilago maydis* (bereitgestellt von der Bayer CropScience AG) wurde nach einem Homologen zu EB1 durchsucht. Dabei wurde ein Gen gefunden, das *peb1* (Plus-Ende bindend) genannt wurde. *Peb1* enthält einen offenen Leserahmen, der ein 289 Aminosäuren langes Protein kodiert. Phylogenetische Untersuchungen ergaben, dass *Peb1* mit bekannten EB1-ähnlichen Proteinen verwandt ist (siehe Abb. 4A). Die vorhergesagte Aminosäuresequenz von *Peb1* zeigt 37% Identität zu dem dazu ähnlichsten Protein MAL3 von *Schizosaccharomyces pombe*. *Peb1* ist ein leicht saures Protein und enthält zwischen den Aminosäuren 186 und 226 eine vorhergesagte Coiled-coil-Region. Diese Struktur ist typisch für EB1-ähnliche Proteine (für eine Zusammenfassung siehe Tirnauer und Bierer, 2000).

Für die *in vivo*-Lokalisation von *Peb1* wurde ein YFP-Fusionsprotein hergestellt. Dazu wurde das Plasmid pSLB-*Peb1*-YFP-hom kloniert und homolog in den *peb1*-Lokus des Wildtyp-

Stammes FB2 integriert. Die erfolgreiche homologe Rekombination wurde durch Southern Blots bestätigt und resultierte in der Expression eines C-terminal mit YFP fusionierten Peb1-Proteins unter Kontrolle des endogenen *peb1*-Promotors (Stamm FB2EBY). Für die gleichzeitige Lokalisation von Mikrotubuli wurde Plasmid pSLH-CFP-Tub1 in FB2EBY transformiert, das eine N-terminale Fusion des α -Tubulins aus *U. maydis* mit CFP enthält. Die Expression beider Fusionsproteine erlaubte die simultane Beobachtung von CFP-Mikrotubuli und Peb1-YFP. Zunächst wurden mitotische Zellen analysiert. In Übereinstimmung mit Veröffentlichungen über die Lokalisation von EB1-ähnlichen Proteinen in Hefe und in Vertebraten-Zellen (Berrueta *et al.*, 1998; Morrison *et al.*, 1998) war Peb1-YFP an Spindel- und astralen Mikrotubuli zu finden (Abb. 4B, 4C). Die Lokalisation an den Plus-Enden konnte am deutlichsten in Zellen gezeigt werden, die sich in der späten Anaphase befinden. In diesem Stadium bilden die Spindelpolkörper lange astrale Mikrotubuli aus, wobei die Minus-Enden an den Spindelpolkörpern gebunden sind und die Plus-Enden nach außen zum Zellkortex reichen (Steinberg *et al.*, 2001; Abb. 4C1). Die Kolokalisation während dieses Stadiums zeigte, dass ausnahmslos alle Peb1-YFP-Signale (Abb. 4C2; grün in C3) mit

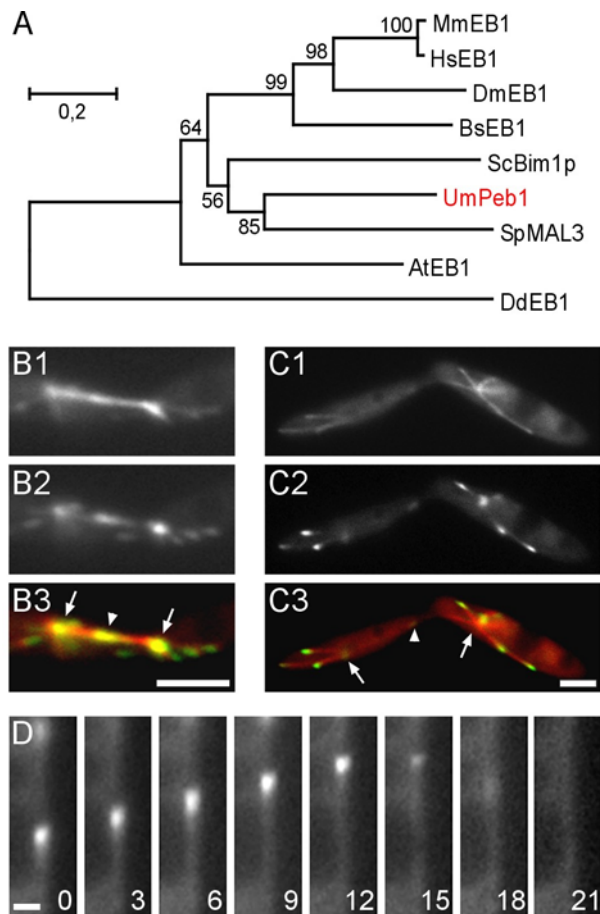


Abbildung 4: Peb1 und seine Lokalisation.

A: Phylogenetischer Baum ausgewählter Vertreter der EB1-Familie. Peb1 aus *U. maydis* ist am nächsten verwandt zu MAL3 aus *S. pombe*. Folgende Proteine wurden benutzt: *Mus musculus* EB1: AAA96320, *Homo sapiens* EB1: I52726, *Drosophila melanogaster* EB1: AAF57390, *Botryllus schlosseri* EB1: CAA67697, *Saccharomyces cerevisiae* Bim1p: NP010932, *Ustilago maydis* Peb1: AJ489529, *Schizosaccharomyces pombe* MAL3: CAA70707, *Arabidopsis thaliana* EB1: NP201056. Bootstrap-Werte sind an den Verzweigungspunkten angegeben. Balken: 0,2 Austausch pro Aminosäure.

B, C: Peb1-YFP (B2, C2) lokalisiert an den distalen Mikrotubuli-Enden (CFP-Tub1 in B1, C1). Das wird besonders deutlich in der Anaphase (Überlagerung in B3, C3, CFP-Tub1 in rot, Peb1-YFP in grün). Peb1-YFP lokalisiert auch im Mittelbereich der Spindel (Pfeilköpfe) und an den Spindelpolen (Pfeile). Balken: 3 μ m.

D: Peb1-YFP bindet nur an wachsende Mikrotubuli-Enden. Sobald ein Mikrotubuli zu schrumpfen beginnt, verschwindet das Peb1-YFP-Signal. Relative Zeitabstände zum ersten Bild sind in Sekunden am rechten, unteren Bildrand angegeben. Balken: 1 μ m.

Mikrotubuli assoziiert waren, entweder mit den äußeren Mikrotubuli-Enden oder mit den Spindelpolkkörpern (Pfeile in Abb. 4B, 4C), wo sich möglicherweise die Enden von sehr kurzen Mikrotubuli befinden. Außerdem fanden sich Peb1-YFP-Signale in der Mitte der Spindel (Pfeilkopf in Abb. 4B, 4C), wo höchstwahrscheinlich die Plus-Enden der Spindel-Mikrotubuli überlappen.

In der Interphase bewegten sich Peb1-YFP-Signale langsam parallel zur Längsachse der Zelle (Abb. 5A, 5B). Ihre Geschwindigkeit wurde mit $9,44 \pm 0,89 \mu\text{m}/\text{min}$ ($n=12$) bestimmt, was dem vorher ermittelten Wert für die Wachstumsgeschwindigkeit von Mikrotubuli in *Ustilago maydis* entsprach (nicht signifikant unterschiedlich, $P:0,0731$; Steinberg *et al.*, 2001). Peb1-YFP markierte ausschließlich wachsende Mikrotubuli-Plus-Enden. Das Signal verblasste, sobald ein Mikrotubulus zu depolymerisieren begann (Abb. 4D) und Mikrotubuli-Enden wurden von Peb1-YFP gebunden, wenn sie erneut polymerisierten. Dieses Verhalten und das Lokalisationsmuster sind charakteristisch für EB1-Proteine (Morrison *et al.*, 1998; Tirnauer *et al.*, 1999; Mimori-Kiyosue *et al.*, 2000). Zusammenfassend sprechen diese Daten dafür, dass Peb1-YFP an wachsende Mikrotubuli-Plus-Enden bindet und deshalb als *in vivo*-Marker für die Ausrichtung von Mikrotubuli in *U. maydis* benutzt werden kann.

2.1.2 Polares Wachstum wird von Änderungen in der Mikrotubuli-Ausrichtung begleitet

Die Beobachtung von Peb1-YFP in der lebenden Zelle ermöglichte die Bestimmung der Ausrichtung der Mikrotubuli in verschiedenen Zellzyklusstadien. In Zellen ohne Knospe und mit sehr kleinen Knospen wurden Bewegungen der Peb1-YFP-Signale in Richtung beider Zellpole mit gleicher Häufigkeit beobachtet (Abb. 5A, Überlagerung von A2 und A4 in A5; Abb. 5C, die prozentuale Häufigkeit mit der sich Signale in die jeweilige Richtung bewegen ist durch die Länge der Pfeile veranschaulicht und in Zahlen angegeben). Erreichte die Knospe eine Länge von etwa 15% der Mutterzelle, kam es zu einer Polarisierung der Mikrotubuli. Das bedeutet, dass sowohl in der Tochter- als auch in der Mutterzelle die meisten Mikrotubuli-Plus-Enden zu den distalen Zellpolen wuchsen (Abb. 5B). Die Polarisierung der Mikrotubuli verstärkte sich in der Mutterzelle während des Knospenwachstums (Abb. 5C). Während dieser Zellzyklus-Stadien blieb der Zellkern in der Mitte der Mutterzelle und es konnte beobachtet werden, dass Mikrotubuli-Plus-Enden den Kern (Pfeil in Abb. 5B1) passierten während sie wuchsen (Abb. 5B). Wahrscheinlich gingen

diese Mikrotubuli also nicht vom Spindelpolkkörper aus. Nach der Mitose teilten sich Tochter- und Mutterzelle. Dabei wurden zwei Septen zwischen beiden Zellen eingezogen. In diesem Stadium (höchstwahrscheinlich G1) wurde erneut eine bipolare Mikrotubuli-Organisation wie in nicht-knospenden Zellen wiedergefunden (Abb. 5C).

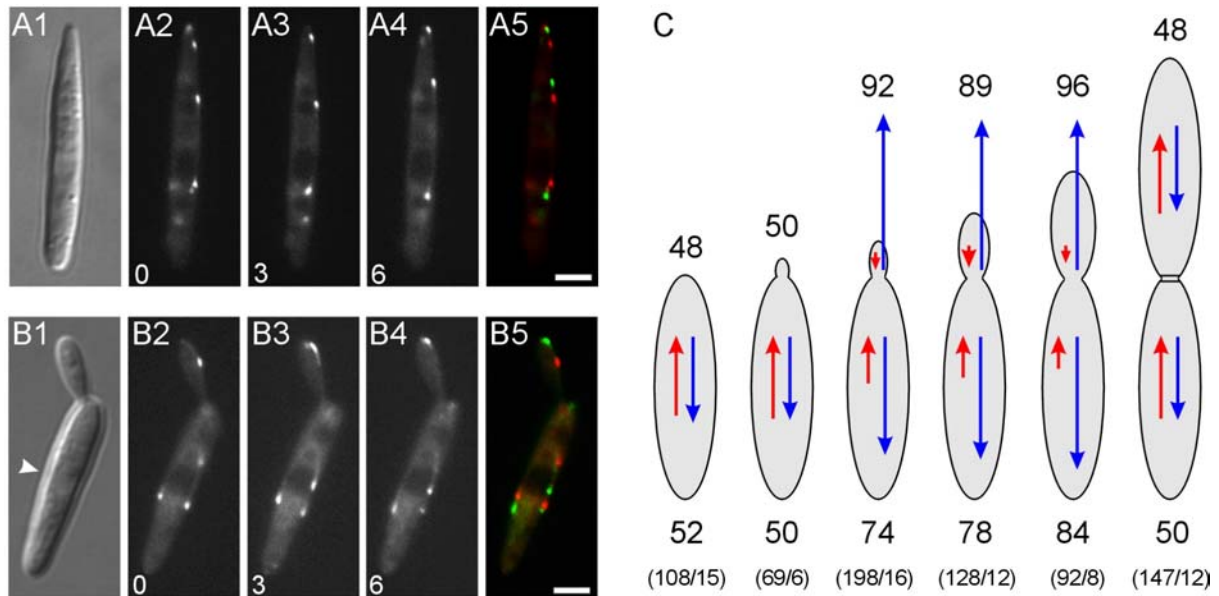


Abbildung 5: Mikrotubuli-Ausrichtung in *U. maydis*.

A, B: Die Bewegung von Peb1-YFP in Zellen ohne Knospe (A) und mit kleiner Knospe (B) zeigt die Ausrichtung der Mikrotubuli an, da es nur an wachsende Plus-Enden bindet. A5 und B5 zeigen Überlagerungen der Zeitpunkte 0s (rot) und 6s (grün). Die Zeit zwischen den Bildern ist in Sekunden am unteren, linken Bildrand angegeben. Balken: 3µm.

C: Quantifizierung der Mikrotubuli-Ausrichtung während der Interphase. Die blauen Pfeile und Zahlen unter und über den Zeichnungen geben den Prozentsatz der Peb1-YFP-Bewegungen in Richtung der Zellpole an. Die roten Pfeile zeigen den Anteil der Bewegungen zur Knospungsstelle an. Zellen ohne oder mit sehr kleinen Knospen zeigten eine gleichmäßige Verteilung von Mikrotubuli, die zu beiden Zellpolen wuchsen. Eine Polarisation erfolgte, sobald die Knospe eine Länge von ~15% der Mutterzelle erreichte. Nach Bildung der Septen konnte wieder eine bipolare Mikrotubuli-Anordnung in Mutter- und Tochterzelle beobachtet werden. Alle Zahlen basieren auf einer Beobachtung von jeweils 6-16 Zellen für 45s (die tatsächliche Anzahl der Signale und Zellen ist in Klammern angegeben). Graphische Darstellung zur Verfügung gestellt von G. Steinberg.

2.1.3 Mikrotubuli-Nukleationsstellen im Cytoplasma von Interphase-Zellen

Peb1-YFP färbte ausschließlich wachsende Mikrotubuli-Enden. Deshalb sollten plötzlich erscheinende Peb1-YFP-Signale entweder das Weiterwachsen eines Mikrotubulus nach einer Katastrophe oder die Neubildung von Mikrotubuli anzeigen. Zudem können in die Fokusebene des Objektivs wachsende Mikrotubuli-Enden ein neu erscheinendes Peb1-YFP-Signal verursachen. Um Mikrotubuli-Nukleationsereignisse eindeutig zu identifizieren, wurden deshalb nur Ereignisse berücksichtigt, bei denen mindestens zwei Signale zur selben

Zeit an der selben Stelle im Cytoplasma erschienen und sich dann in verschiedene Richtungen bewegten.

Solche Nukleationsereignisse konnten nicht am Kern gefunden werden, was dafür spricht, dass der Spindelpolkkörper während der Interphase inaktiv ist und zu der Beobachtung passt, dass Mikrotubuli-Plus-Enden am Kern vorbeiwachsen. In knospenden Zellen wurden stattdessen zahlreiche Nukleationen am Knospenhals beobachtet (Abb. 6A). Das stimmt mit der beschriebenen Mikrotubuli-Ausrichtung während des Knospenwachstums (Abb. 5C) überein und legt die Vermutung nahe, dass sich im Knospenhals ein Mikrotubuli-organisierendes Zentrum (MTOC) befindet.

In Zellen ohne Knospen wurden Mikrotubuli an verschiedensten Stellen im Cytoplasma nukleiert (Abb. 6B). Um die Existenz dieser cytoplasmatischen Mikrotubuli-Nukleationsstellen zu bestätigen und ihre Anzahl und Position in der Zelle zu bestimmen, wurden die Mikrotubuli mit der Mikrotubuli-destabilisierenden Substanz Benomyl (Urani *et al.*, 1995) zerstört und ihr Wiedererscheinen nach Auswaschen von Benomyl beobachtet. Eine Inkubation mit 20 μ M Benomyl für 10 min reichte aus, um alle Mikrotubuli vollständig zu depolymerisieren. In FB1GT-Zellen hinterließ diese Behandlung einen gleichmäßigen Hintergrund von GFP-Tub1 (Abb. 6C1). Etwa eine Minute nach Überführen in frisches Medium, begannen Mikrotubuli an verschiedenen Stellen in der Zelle zu wachsen (Abb. 6C2). Während der nächsten zwei Minuten verlängerten sich die Mikrotubuli und wurden anschließend gebündelt (Abb. 6C3-5). Innerhalb von 5 min wurde ein normales Mikrotubuli-Cytoskelett wiederhergestellt. Pro Fokusebene wurden $6,5 \pm 1,9$ ($n=34$ Zellen) entstehende Mikrotubuli gezählt und die Gesamtzahl an Mikrotubuli pro Zelle wurde auf 10-15 geschätzt. In einer früheren Studie wurde die Anzahl der Mikrotubuli-Bündel pro Zelle mit 3-4 bestimmt. Das deutet darauf hin, dass ein Bündel wahrscheinlich 2-4 Mikrotubuli enthält.

Wiederholung des Experiments mit dem Stamm FB2EBY zeigte, dass einige Peb1-YFP-Signale gegenüber Benomyl-Behandlung resistent waren (Abb. 6D). Diese Signale waren jedoch nur sehr schwach und zeigten lediglich Brownsche Molekularbewegung. 45 Sekunden nach Auswaschen von Benomyl erschienen viele helle Peb1-YFP-Signale (Abb. 6E1). Diese waren beweglich, aber auf eine Fläche mit einem Durchmesser unter $1\mu\text{m}$ begrenzt. Das konnte verdeutlicht werden, indem die Positionen von jedem Peb1-YFP-Punkt während der 45 s einer Bildsequenz verfolgt wurden (Abb. 6E2). In einer Region erschienen oft zwei oder drei Signale zumindest vorübergehend. Das spricht dafür, dass es sich bei diesen Regionen um die Positionen von Nukleationszentren handelt. Gerichtete Bewegung der Peb1-YFP-

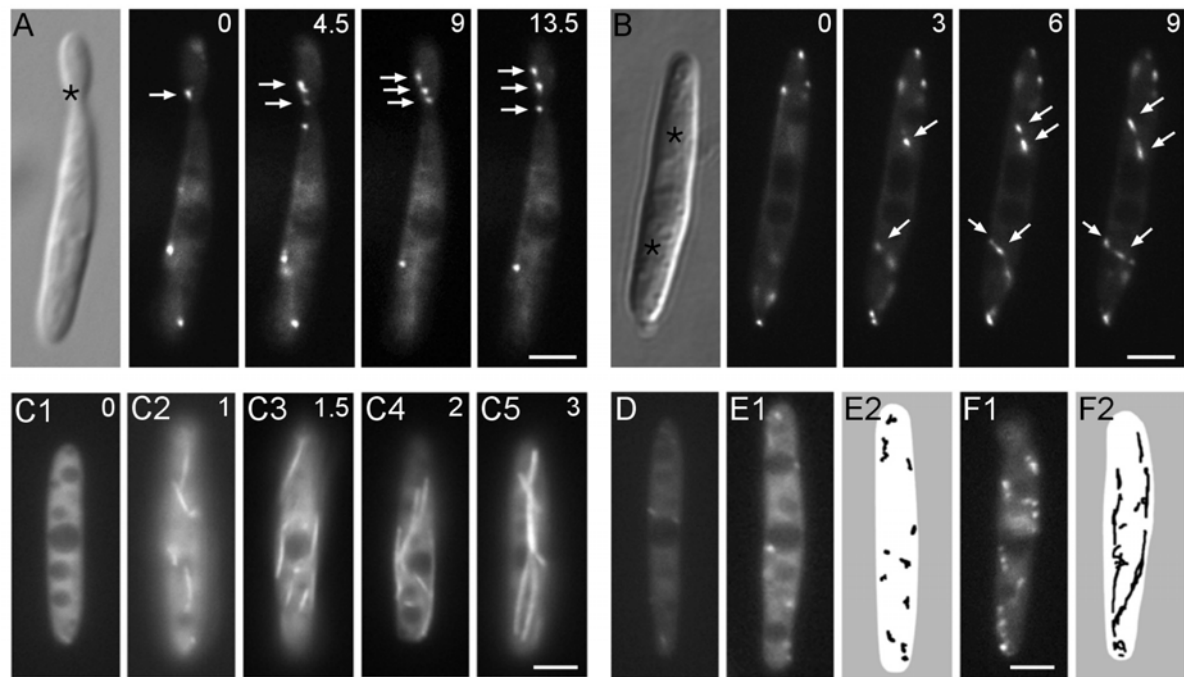


Abbildung 6: Mikrotubuli-Nukleationen in *U. maydis*.

A, B: Nukleationsstellen wurden definiert als Orte, wo zwei oder mehr Peb1-YFP-Signale (Pfeile) zur gleichen Zeit erscheinen und sich in verschiedene Richtungen bewegen. Solche Nukleationsstellen (Sternchen in DIC-Bildern) waren gleichmäßig in nicht-knospendenden Zellen verteilt (B) oder befanden sich bei Zellen mit Knospen in der Nähe des Knospenhalses (A). Zeiten zwischen den Bildern sind in Sekunden in der rechten, oberen Ecke angegeben. Balken: 3µm.

C: Nach Behandlung mit Benomyl konnten keine Mikrotubuli in FB1GT detektiert werden (C1). Kurz nach Auswaschen der Droge mit frischem Medium begann die Mikrotubuli-Nukleation gleichzeitig an verschiedenen Stellen in nicht-knospendenden Zellen (C2, C3). Mikrotubuli-Wachstum (C3, C4) wurde gefolgt von ihrer Bündelung (C5) und ein normales Mikrotubuli-Muster war nach wenigen Minuten Erholung wiederhergestellt. Zeiten zwischen den Bildern sind in Minuten in der rechten, oberen Ecke angegeben. Balken: 3µm.

D, E, F: Nur einige blasse Peb1-YFP-Signale widerstanden der Behandlung mit 20 µM Benomyl (D). Helle Peb1-YFP-Punkte erschienen etwa 45s nach Auswaschen von Benomyl (E1), bewegten sich jedoch nicht weiter als 1µm von ihrem Entstehungsort. Das wird deutlich, wenn jedes Signal während einer 45s-langer Bildsequenz verfolgt wird (E2). Eine gerichtete Bewegung von Peb1-YFP-Signalen erfolgte 60s nach Benomyl-Behandlung (F). Balken: 3µm.

Signale über größere Entfernungen konnte 60 s nach Benomyl-Auswaschen beobachtet werden (Abb. 6F). In der Fokusebene einer Zelle waren durchschnittlich $12,9 \pm 2,1$ (n=10 Zellen) Nukleationsstellen gleichmäßig verteilt. An 72% dieser Stellen wurden mehr als ein Mikrotubulus nukleiert. Der Vergleich mit der Anzahl nukleierter Mikrotubuli führt zu dem Schluss, dass scheinbar nur jede zweite Nukleationsstelle einen stabilen Mikrotubulus nukleiert.

2.1.4 γ -Tubulin ist für die Nukleation an cytoplasmatischen Nukleationsstellen wichtig

Frühere Studien haben gezeigt, dass polares Knospen in *U. maydis* durch die Ausbildung von zwei Tubulin-Strukturen (PTS: paired tubulin structures) begleitet wird. In diesen Strukturen schienen die Minus-Enden der Mikrotubuli gebündelt zu sein (Steinberg *et al.*, 2001). Deshalb war es wahrscheinlich, dass diese Strukturen Teil des vorhergesagten polaren MTOC am Knospenhals sind. Diese Annahme wurde durch Immunfluoreszenz-Experimente von G. Steinberg unterstützt, in denen mit kreuzreaktiven Antikörpern gegen γ -Tubulin von *A. nidulans* und *S. pombe* Signale an den PTS detektiert werden konnten. Die Knospenhals-Region stellt also nicht nur den bevorzugten Ort der Mikrotubuli-Nukleation während des Knospenwachstum dar, sondern enthält zudem γ -Tubulin, eingebettet in eine zweiteilige α -Tubulin-enthaltende Struktur, die PTS. Zudem konnten mit dem MPM-2-Antikörper Phosphoepitope, die spezifisch für aktive MTOCs sind (Centonze und Borisy, 1990; Masuda *et al.*, 1992; Vaughn und Harper, 1998), an den PTS lokalisiert werden. Dagegen zeigte der Spindelpolkörper von *U. maydis* nur während der Mitose eine Färbung mit MPM-2, was dafür spricht, dass dieser während der Interphase inaktiv ist und Mikrotubuli-Nukleationen direkt im Cytoplasma erfolgen.

Tub2, das γ -Tubulin aus *U. maydis*, wurde im Rahmen ihrer Diplomarbeit von Marianne Brill isoliert (Brill, 1998). Sie stellte zudem ein Tub2-GFP-Fusionskonstrukt her, das unter Kontrolle des induzierbaren *crg*-Promotors (Bottin *et al.*, 1996) stand. Tub2-GFP konnte jedoch in diesem Stamm, FB2rT2G, nur am Spindelpolkörper lokalisiert werden. Zudem wurde ein relativ gleichmäßiger cytoplasmatischer Hintergrund von Tub2-GFP detektiert. Die mit den kreuzreaktiven γ -Tubulin-Antikörpern beobachtete Lokalisation an den PTS konnte mit FB2rT2G jedoch nicht bestätigt werden. Nichtsdestotrotz wurde getestet, ob γ -Tubulin an der cytoplasmatischen Mikrotubuli-Nukleation in *U. maydis* beteiligt ist. Dafür wurde im Rahmen dieser Arbeit eine konditionelle Mutante von Tub2 hergestellt, indem Plasmid pSLB-*crg*-Tub2-hom kloniert und homolog in den *tub2*-Lokus integriert wurde. Dabei wurde das endogene *tub2*-Gen unter die Kontrolle des regulierbaren *crg*-Promotors gestellt. Nach Wachstum in CM-A wurde Tub2 in diesem Stamm (FB1rTub2) etwa zweifach überexprimiert (Abb. 7A). Die Proteinmenge verringerte sich nach Wechsel zu restriktiven Bedingungen (CM-G) und nach 4 Stunden in CM-G konnten nur noch Spuren von Tub2 im Western Blot detektiert werden (Abb. 7A). FB1rTub2-Zellen konnten keine Kolonien auf CM-G-Platten bilden, was dafür spricht, dass *tub2* ein essentielles Gen ist (Abb. 7B). Dieser Stamm bildete

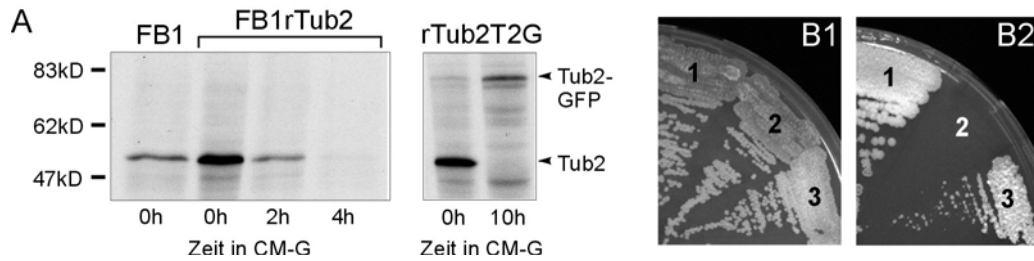


Abbildung 7: Kontrollierte Expression von Tub2 und Tub2-GFP und resultierende Wachstumsdefekte.

A: Tub2 und Tub2-GFP wurden mit dem G9-Antikörper, der ein hochkonserviertes Peptid aus γ -Tubulin von *S. pombe* erkennt (zur Verfügung gestellt von T. Horio), im Wildtyp-Stamm FB1 und in den Mutanten FB1rTub2 und FB1rTub2T2G detektiert. Tub2 ist in den Mutanten bei Wachstum in CM-A(0h) etwa zweifach überexprimiert. Medienwechsel zu CM-G führt zum Ausdünnen von Tub2, wobei nach 4h nur noch Spuren von Tub2 nachweisbar sind. Interessanterweise erhöht sich das Expressionslevel von Tub2-GFP nach Wachstum in CM-G, wenn endogenes Tub2 reprimiert ist, obschon das Fusionskonstrukt von einem konstitutiven Promotor kontrolliert wird.

B: Wachstum von FB1 (1), FB1rTub2 (2) und FB1rTub2T2G (3) auf CM-A (B1) und CM-G (B2). FB1rTub2 kann auf CM-G-Platten keine Kolonien bilden. Dieser Wachstumsdefekt wird durch die Expression von Tub2-GFP in FB1rTub2T2G gerettet (B2). Abb. zur Verfügung gestellt von G. Steinberg.

die Grundlage für zellbiologische Untersuchungen, die von G. Steinberg durchgeführt worden sind. Dabei wurde gezeigt, dass die zweifache Überexpression von Tub2 in Stamm FB1rTub2 nach Wachstum in CM-A zu abnormalen PTS und einer erhöhten Anzahl cytoplasmatischen Mikrotubuli führte. Entsprechend führte die Reduktion von Tub2 während des Wachstum in CM-G zu weniger Mikrotubuli in Interphase-Zellen und zu einer Anhäufung von Zellen mit abnormen Mitose-Spindeln. Tub2 ist also für die Nukleation von Mikrotubuli während des gesamten Zellzyklus wichtig und ermöglicht die Mikrotubuli-Nukleation sowohl von den Spindelpolkörpern während der Mitose als auch von den cytoplasmatischen MTOCs in der Interphase.

Das Tub2-GFP Fusionsprotein wurde auf seine biologische Funktionalität überprüft. Dazu wurde Plasmid pCU-otef-Tub2-GFP hergestellt und in die konditionelle Mutante FB1rTub2 transformiert. Das Fusionskonstrukt wird dabei in den *cbx*-Lokus integriert und steht unter Kontrolle des konstitutiven *otef*-Promotors (Spellig *et al.*, 1996). Trotzdem wurde das Fusionsprotein in CM-A nur schwach exprimiert (Abb. 7A). Unter restriktiven Bedingungen (CM-G) wurde das *tub2*-Gen allerdings reprimiert und die Tub2-GFP-Expression verstärkt (Abb. 7A). Dieser Stamm, FB1rTub2T2G konnte auf CM-G-Platten Kolonien bilden (Abb. 7B). Das spricht dafür, dass Tub2-GFP funktionell ist und endogenes Tub2 ersetzen kann. In FB1rTub2T2G war das Tub2-GFP-Signal stärker als in FB1rT2G, lokalisierte ebenfalls am Spindelpolkörper und färbte ansonsten nur einen cytoplasmatischen Hintergrund. Die *in vivo*-Beobachtung von Mikrotubuli-Minus-Enden war auch mit diesem Stamm leider nicht möglich. Allerdings konnte G. Steinberg in FB1rTub2T2G nach Wachstum in CM-G mit

einem anti-GFP-Antikörper das polare MTOC in knospenden Zellen detektieren (nicht gezeigt) und so die Ergebnisse, die mit kreuzreaktiven γ -Tubulin-Antikörpern erhalten wurden, bestätigen.

Zusammenfassend konnte also mit Peb1-YFP gezeigt werden, dass in septierten Zellen und Zellen ohne Knospe die Mikrotubuli-Nukleation an zahlreichen im Cytoplasma verteilten Nukleationszentren erfolgt. Daraufhin werden diese Mikrotubuli in bipolare Bündel zusammengeführt. Während des Knospenwachstums werden die meisten Mikrotubuli in der Nähe des Knospenhalses nukleiert. Höchstwahrscheinlich sind die Minus-Enden der dort nukleierten Mikrotubuli in ein polares MTOC eingebettet. Diese Mikrotubuli-Ausrichtung erfordert zum Mikrotubuli-Minus-Ende gerichteten Transport, um Strukturproteine und Enzyme aus der Mutterzelle zur wachsenden Knospe zu transportieren. Im *U. maydis*-Genom wurden bisher zwei minus-gerichtete Motoren gefunden, cytoplasmatisches Dynein und das C-terminale Kinesin Kin4. Die Nullmutation von Kin4 zeigt keine Defekte während des polaren Wachstums von *U. maydis* (Schuberth, 2000). Cytoplasmatisches Dynein ist also wahrscheinlich für den Transport zur Knospe verantwortlich und war deshalb im Fokus der folgenden Untersuchungen, die zunächst seine Struktur und anschließend seine zellulären Funktionen aufklären sollten.

2.2 Die Struktur des cytoplasmatischen Dyneins aus *U. maydis*

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, zeichnet sich Dynein aus *U. maydis* durch eine außergewöhnliche Gen-Organisation seiner schweren Kette aus. Es konnten zwei Gene, *dyn1* und *dyn2* isoliert werden, die Homologien zu schweren Ketten cytoplasmatischer Dyneine zeigten und wie andere cytoplasmatische Dyneine am Kerntransport beteiligt waren. Allerdings waren die kodierenden Sequenzen für die essentiellen Bestandteile einer Motordomäne, nämlich die Mikrotubuli-Bindestelle und die ATP-Hydrolyse-Stelle, dabei getrennt. Da beide Gene essentiell waren (Enard, 1998; Berner, 1999), konnte ausgeschlossen werden, dass es sich um Pseudogene handelte. Unklar war jedoch, ob beide Gene in getrennte Polypeptide übersetzt würden, die dann möglicherweise miteinander interagieren oder ob ein Spleißmechanismus existiert, der zu einer „normalen“ schweren Dynein-Kette führt. Posttranslationales Spleißen war an einer Protonen-ATPase in *S. cerevisiae* entdeckt worden (Kane *et al.*, 1990), beschränkte sich bisher aber auf autokatalytische Inteine, also interne Proteinsequenzen.

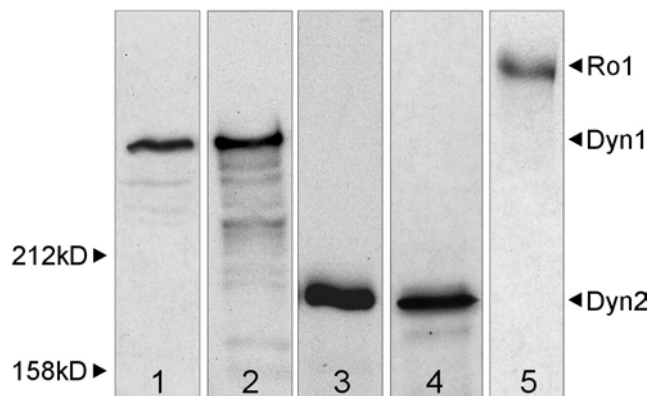
2.2.1 Die DHC aus *U. maydis* besteht aus zwei interagierenden Polypeptiden

Für die Untersuchung der Genprodukte von *dyn1* und *dyn2* wurden *U. maydis*-Stämme hergestellt, die Fusionsproteine mit verschiedenen Epitopen exprimieren sollten. Dabei wurde besonderes Augenmerk darauf gelegt, dass die Expression vom endogenen Locus unter Kontrolle des nativen Promotors erfolgte. Durch den homologen Austausch der Epitop-markierten Kopie gegen das endogene Gen wurde sichergestellt, dass die Fusion keinen Funktionsverlust zur Folge hatte. Beide Gene wurden am 5'-Ende und am 3'-Ende des offenen Leserahmens markiert, um zu überprüfen, ob der Leserahmen vollständig translatiert wird. Die Stämme FB1HDyn1 und FB1HDyn2 exprimierten N-terminal mit einem dreifachen HA-Epitop markiertes Dyn1 bzw. Dyn2 und zeigten im Western Blot nach Detektion mit Antikörpern gegen HA (Sigma) Banden von etwa 360 kD für HA-Dyn1 und etwa 180 kD für HA-Dyn2 (Abb. 8, Spuren 1, 3). Diese Größen entsprechen der errechneten Molekülmasse bei Übersetzung beider offener Leserahmen in getrennte Polypeptide und beide Banden sind deutlich kleiner als die schwere Kette des cytoplasmatischen Dyneins von *Neurospora crassa*, Ro1, das in einem Proteinextrakt von *N. crassa* mit dem α Ro1-Antikörper (zur Verfügung gestellt von M. Plamann) detektiert wurde (Abb. 8, Spur 5). Banden entsprechender Größe

wurden auch für die C-terminal markierten Proteine Dyn1-Flag und Dyn2-Myc erhalten (Abb. 8, Spuren 2, 4). *Dyn1* und *dyn2* werden also vollständig in getrennte Polypeptide translatiert.

Abbildung 8: Western-Nachweis von Dyn1 und Dyn2.

Sowohl N-terminal mit HA (1) als auch C-terminal mit dem FLAG-Epitop (2) markiertes Dyn1 zeigten eine Bande von etwa 360 kD Größe. HA-Dyn2 (3) und Dyn2-Myc (4) wurden bei etwa 180 kD nachgewiesen. Beide Polypeptide wurden demnach vollständig und getrennt voneinander translatiert. Zum Vergleich ist die deutlich größere schwere Dynein-Kette Ro1 aus *N. crassa* abgebildet (5). Der Nachweis erfolgte mit den entsprechenden Epitop-Antikörpern (1-4) bzw. mit dem Ro1-Antikörper (5, zur Verfügung gestellt von M. Plamann)



Um einen funktionellen Dynein-Motorkopf zu bilden, müssten Dyn1 und Dyn2 miteinander interagieren. Um das zu überprüfen, wurden Immunpräzipitationsexperimente durchgeführt. Dynabeads (Dyna), kleine magnetisierbare Kügelchen, wurden mit Antikörpern gegen HA oder Myc (Sigma) beladen und mit einem Proteinextrakt aus dem Stamm FB2HDyn1/Dyn2M inkubiert. Dieser enthielt sowohl HA-Dyn1 als auch Dyn2-Myc. Nach Isolation der an die Beads gebundenen Proteine wurden diese mittels Western Blot analysiert. Mit dem α HA-Antikörper konnte aus FB2HDyn1/Dyn2M nicht nur HA-Dyn1 sondern auch Dyn2-Myc isoliert werden (Abb. 9, Spur 2). Dies ist nur möglich, wenn beide Proteine miteinander interagieren. Entsprechend konnte aus dem selben Extrakt mit einem α Myc-Antikörper Dyn2-Myc und HA-Dyn1 präzipitiert werden (Abb. 9, Spur 1). Umfangreiche Kontrollen bestätigten die Spezifität dieses Experimentes: Dynabeads, die nicht mit einem Antikörper beladen wurden, konnten keines der beiden Proteine binden (Abb. 9, Spur 3). Außerdem konnte HA-Dyn1 aus dem Stamm FB1HDyn1 nicht mit einem α Myc-Antikörper isoliert werden, wohl aber mit dem α HA-Antikörper (Abb. 9, Spuren 4, 5). Und analog dazu konnte Dyn2-Myc auch nur mit einem α Myc-Antikörper, nicht aber mit anti-HA aus einem Extrakt

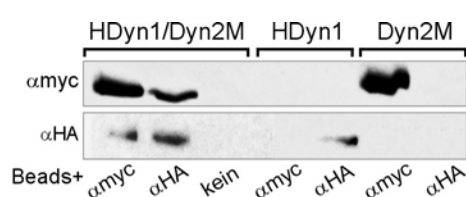


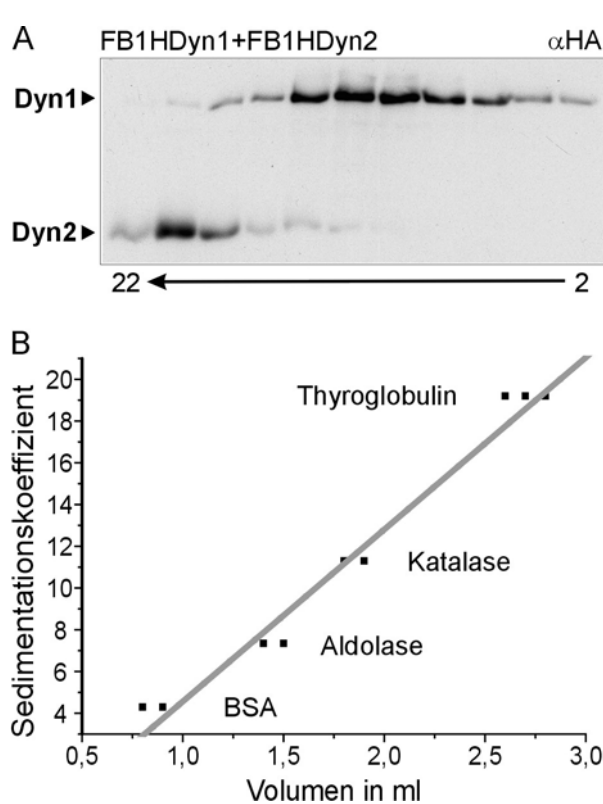
Abbildung 9: Co-Immunpräzipitation von Dyn1 und Dyn2.

Proteinextrakte von FB2HDyn1/Dyn2M wurden mit Dynabeads inkubiert, die mit Antikörpern gegen HA (α HA) oder Myc (α myc) beladen waren. Beide Antikörper präzipitierten HA-Dyn1 und Dyn2-Myc. Beads ohne Antikörper (kein) konnten keines der beiden Proteine binden. Keiner der beiden Antikörper präzipitierte unspezifisch HA-Dyn1 oder Dyn2-Myc.

von FB2Dyn2M präzipitiert werden (Abb. 9, Spuren 6, 7). Diese Experimente zeigen eine Interaktion beider Polypeptide in Zellextrakten und lassen vermuten, dass trotz der außergewöhnlichen Gen-Organisation in *U. maydis* ein funktioneller Dynein-Komplex gebildet wird. Diese Vermutung wird durch indirekte Immunfluoreszenz-Experimente von G. Steinberg unterstützt, die eine Kolo-kalisation von HA-Dyn1 und Dyn2-Myc zeigten (Straube *et al.*, 2001).

Daraufhin wurde versucht, diesen Komplex aus dem Stamm FB2HDyn1/Dyn2M über Saccharose-Dichtegradienten aufzureinigen. Während dieser Prozedur dissoziierte der Komplex vollständig und HA-Dyn1 und Dyn2-Myc wurden reproduzierbar in verschiedenen Fraktionen detektiert (nicht gezeigt). Das selbe Ergebnis wurde bei Verwendung der Stämme FB1HDyn1 und FB1HDyn2 erzielt (Abb. 10A). Der Vergleich mit den Eichproteinen Thyroglobulin, Katalase, Aldolase und Rinder-Serumalbumin erlaubte eine Bestimmung der Sedimentationskoeffizienten (Abb. 10B). Dyn2 scheint im Dichtegradienten als Monomer zu

Abbildung 10: Dyn1 und Dyn2 im Saccharose-Dichtegradienten.



A: Extrakte von FB1HDyn1 und FB1HDyn2 wurden auf 10-25% Saccharose-Gradienten geladen und für 13h bei 150.000 xg zentrifugiert. Fraktionen zu 200 µl (nur jede zweite aufgetragen) wurden im Western Blot mit Antikörpern gegen HA analysiert. Dyn1 ist vollständig von Dyn2 getrennt, was dafür spricht, dass der Dyn1-Dyn2-Komplex während der Präparation dissoziiert. Fraktionsnummern sind unter dem Blot angegeben.

B: Zur Bestimmung der Sedimentationskoeffizienten wurde das Verhalten von vier Proteinen in parallel angesetzten Saccharose-Dichtegradienten beobachtet. Für BSA (Rinder-Serumalbumin), Aldolase aus dem Muskelgewebe von Kaninchen, Rinder-Katalase und Thyroglobulin aus Schweinen waren die Sedimentationskoeffizienten bekannt (Smith, 1973). In drei Experimenten wurde das jeweils durchwanderte Volumen des Dichtegradienten bestimmt und graphisch gegen den Sedimentationskoeffizienten aufgetragen. Durch lineare Regression wurde eine Eichgerade mit folgender Formel erzeugt:

$$Y = (-3,68 \pm 0,79) + (8,24 \pm 0,43) * X.$$

In diese Formel wurden die ermittelten durchwanderten Volumen von Dyn1, Dyn2 und Dyn1-2 (s.u.) als X-Werte eingesetzt und ihr Sedimentationskoeffizient errechnet.

sedimentieren, da der Sedimentationskoeffizient von $7,6 \pm 1,8$ S globulären Proteinen von etwa 150 kD, wie γ -Globulin und Ceruloplasmin, entspricht (Smith, 1973). Cytoplasmatische Dynein-Komplexe aus *D. melanogaster* und *D. discoideum* sedimentieren bei 20 S (Koonce und McIntosh, 1990; Hays *et al.*, 1994). Dyn1 sedimentiert mit vergleichbarer Geschwindigkeit ($21,6 \pm 2,5$ S). Das spricht für die Bildung eines großen, stabilen Dyn1-Komplexes, der wahrscheinlich ein Dimer von Dyn1 enthält, das mit leichten und mittelschweren Ketten interagiert.

2.2.2 Monomeres Dyn2 bindet *in vitro* nicht an Mikrotubuli

Aus der Organisation der DHC in zwei getrennten Polypeptide resultierte die Frage, ob Dyn2, das die Mikrotubuli-Bindestelle enthalten sollte, ein ATP-abhängiges Mikrotubuli-Bindeverhalten zeigt. Da Dyn2 in Zellextrakten vorwiegend als Monomer vorlag, konnte seine Mikrotubuli-Bindefähigkeit ohne eine vorherige Isolation untersucht werden. Für den *in vitro*-Mikrotubuli-Bindeassay wurden Mikrotubuli aus gereinigtem Tubulin (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von G. Wöhlke und M. Schliwa) polymerisiert und unter ATP-Mangelbedingungen mit FB2HDyn1/Dyn2M-Extrakten inkubiert. Unter diesen Bedingungen sollte Dynein an die Mikrotubuli binden (Koonce und McIntosh, 1990). Die Mikrotubuli wurden dann durch Zentrifugation isoliert und weiterhin unter ATP-Mangel gewaschen. Unter Gegenwart von Magnesium-Ionen und ATP können dann aktive Motormoleküle von den Mikrotubuli abgelöst werden. Überraschenderweise waren nur sehr

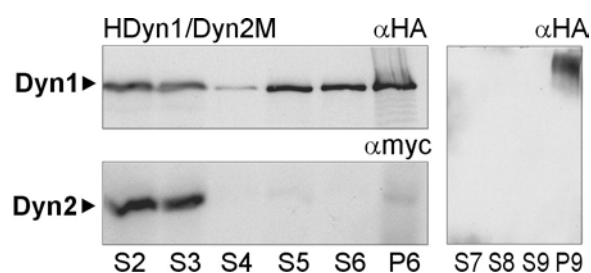


Abbildung 11: Die Mikrotubuli-Bindefähigkeit von Dyn1 und Dyn2.

Mikrotubuli-Bindeassays wurden mit Extrakten von FB2HDyn1/Dyn2M durchgeführt. HA-Dyn1 und Dyn2-Myc wurden im selben 150.000 xg-Überstand nachgewiesen (S2). Nur ein geringer Anteil wurde an Mikrotubuli gebunden, so dass der überwiegende Teil der Proteine im folgenden Überstand enthalten war (S3). Während des Waschschritts wurden geringe Mengen HA-Dyn1 abgelöst (S4), während kein Dyn2-Myc in S4 gefunden wurde. Überraschenderweise konnte mit 10 mM MgATP HA-Dyn1 von den Mikrotubuli gelöst werden (S5, S6), aber von Dyn2-Myc konnten nur sehr geringe Mengen in S5, S6 oder dem Mikrotubuli-Pellet (P6) gefunden werden. S5 und S6 wurden auf einen 10-25% Saccharose-Gradienten geladen. Nach der Zentrifugation wurden die HA-Dyn1 enthaltenden Fraktionen gepoolt und für die Mikrotubuli-Bindung eingesetzt. HA-Dyn1 konnte vollständig an Mikrotubuli binden (P9) und kein HA-Dyn1 verblieb im Überstand (S7). Es konnte jedoch auch nicht durch MgATP abgelöst werden (S8, S9).

geringe Mengen Dyn2 (<2%, durch Vergleich der Intensitäten aller Spuren auf Western Blots von drei unabhängigen Experimenten quantifiziert) fähig, an Mikrotubuli zu binden und nur Spuren davon ließen sich durch MgATP-Zugabe ablösen (S5, S6 in Abb. 11). Im Gegensatz dazu konnten etwa 10% des eingesetzten HA-Dyn1 an Mikrotubuli gebunden werden und bis zu 50% davon lösten sich nach MgATP-Zugabe wieder von den Mikrotubuli (Abb. 11). Wurden die Proteine in den Überständen S5 und S6 über einen Dichtegradienten aufgetrennt und der Mikrotubuli-Bindeversuch mit den HA-Dyn1-beinhaltenden Fraktionen wiederholt, so wurde das gesamte eingesetzte HA-Dyn1 an Mikrotubuli gebunden, aber ein Ablösen mit MgATP konnte nicht beobachtet werden (S7 bis P9 in Abb. 11). Nach Dichtegradienten-Auftrennung eines Gesamtextrakts von Stamm FB2HDyn1/Dyn2M und Einsatz der HA-Dyn1-enthaltenden Fraktionen im Mikrotubuli-Bindeversuch wurde ein ähnliches Ergebnis erzielt. Auch dabei war eine effektivere Bindung von Dyn1 an Mikrotubuli und kein Ablösen durch MgATP beobachtet worden (nicht gezeigt). Diese Resultate sprechen dafür, dass die Mikrotubuli-Bindung von Dyn1 durch zusätzliche, unbekannte Faktoren reguliert wird, die im Rohextrakt enthalten sind, aber während der Dichtegradienten-Zentrifugation verloren gehen, also nicht Bestandteile des Dyn1-Komplexes sind. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass monomeres Dyn2 nicht zur Bindung an Mikrotubuli befähigt ist, obschon es die Mikrotubuli-Bindestelle enthalten sollte, und der partiell gereinigte Dyn1-Komplex eine ATP-unabhängige Mikrotubuli-Bindestelle besitzt.

2.2.3 Fusionen aus Dyn1 und Dyn2 können die Mutantenphänotypen teilweise retten

Die Ergebnisse von Ko-Immünpräzipitation, Kolo-kalisation und Analyse des Kernverteilungsdefektes der konditionellen Mutanten (Straube *et al.*, 2001) legen den Schluss nahe, dass Dyn1 und Dyn2 *in vivo* als Komplex vorliegen und als solcher gemeinsame Funktionen erfüllen. Die abgestimmte Expression und Zusammenlagerung zweier essentieller Genprodukte stellt für die Zelle eine regulatorische Herausforderung dar, die möglicherweise durch einen Vorteil an anderer Stelle ausgeglichen wird. Man könnte sich vorstellen, dass mindestens einer der beiden Teile der Dyneinkette einen alternativen Komplex bildet und so zusätzliche zelluläre Aufgaben übernimmt. Stimmt diese Hypothese, so sollte eine komplette DHC die Phänotypen mindestens einer der konditionellen Dyn1- und Dyn2-Mutanten nicht retten, da ein Fusionskonstrukt aus Dyn1 und Dyn2 nur die Aufgaben übernehmen sollte, die

ein Dyn1-Dyn2-Komplex ausübt, ein alternativer Interaktionspartner von Dyn1 oder Dyn2 aber nicht mehr binden könnte.

Zunächst wurde für dieses Experiment eine konditionelle Mutante von Dyn1 benötigt, die nicht Hygromycin-resistent war. Dazu wurde das Plasmid pSLB-crg-Dyn1-hom kloniert und durch homologe Rekombination in den *dyn1*-Lokus von FB1 integriert. Nach Inkubation in Glucose-haltigem Medium (CM-G) zeigte der neue FB1rDyn1 einen vergleichbaren Phänotyp zum Hygromycin-resistenten FB1rDyn1-Stamm und war wie FB1rDyn2 Phleomycin-resistent.

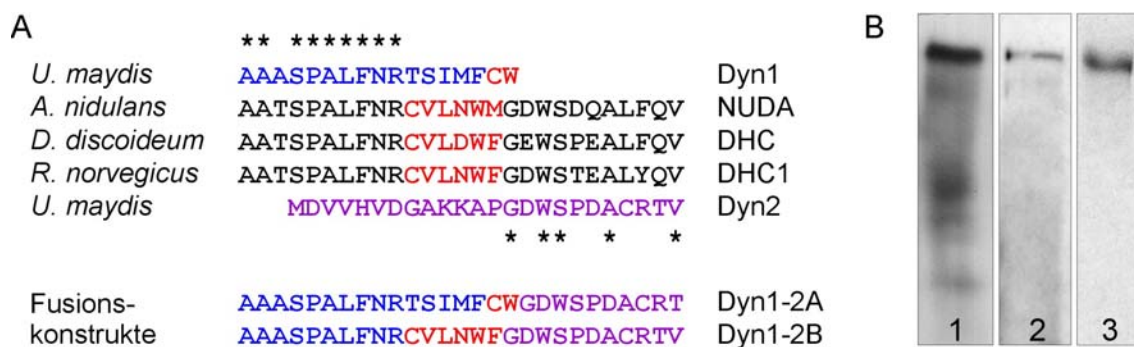


Abbildung 12: Die Trennungsstelle der DHC und die Dyn1-Dyn2-Fusionskonstrukte.

A: Der Übergang vom C-Terminus von Dyn1 (blau) zum N-Terminus von Dyn2 (lila) befindet sich in einer hochkonservierten Region. Dyn1 und Dyn2 enthalten zusammen die meisten der konservierten Aminosäuren (Sternchen). Bei der Herstellung der beiden Fusionsproteine Dyn1-2A und Dyn1-2B wurden die ersten 13 Aminosäuren von Dyn2 deletiert, da sie keinerlei Homologie zeigen. In Dyn1-2B sind zudem 6 Aminosäuren (rot) eingefügt worden, die an dieser Stelle typisch für DHCs sind. Abb. modifiziert nach Straube *et al.*, 2001.

B: Western-Nachweis der Epitop-markierten Fusionsproteine. Sowohl mit einem Antikörper gegen den N-terminal fusionierten HA-Marker (B1) als auch gegen das C-terminal fusionierte Myc-Epitop (B2) konnten die Fusionsproteine detektiert werden, was dafür spricht, dass die Fusionskonstrukte vollständig exprimiert werden. Als Beispiele sind gezeigt: FB1rDyn1HDyn1-2BM mit anti-HA (B1) und FB1rDyn2Dyn1-2AM mit anti-Myc (B2). Zum Vergleich ist die schwere Dynein-Kette Ro1 von *N. crassa* mit dem Ro1-Antikörper nachgewiesen worden (B3). Alle drei Banden hatten eine ähnliche Größe.

Die Bedeutung der Kettentrennung in der *U. maydis*-DHC sollte durch die Expression von zwei Fusionskonstrukten aus Dyn1 und Dyn2 in diesen konditionellen Mutanten untersucht werden. Die Spaltungsstelle der DHC befindet sich in einer hochkonservierten Region (Abb. 12A). Sequenzvergleiche mit den DHCs anderer Organismen zeigte, dass Dyn1 und Dyn2 um 14 Aminosäuren überlappen. Das Fusionskonstrukt Dyn1-2A enthält die vollständige kodierende Sequenz von *dyn1* fusioniert an *dyn2* ohne die ersten 39 Nukleotide. Diese Deletion wurde vorgenommen, um in Anlehnung an die Sequenzen von DHCs anderer Organismen einen ähnlichen Abstand an der Übergangsstelle zu erhalten (Abb. 12A). In Dyn1-2B ersetzen die 6 hochkonservierten Aminosäuren CVLNWF an der Übergangsstelle die letzten 7 Aminosäuren von Dyn1 (Abb. 12A). Die fusionierten Leserahmen wurden unter Kontrolle des natürlichen *dyn1*-Promotors gestellt und mit Epitop-Markern am N- und C-

Terminus fusioniert. Die Plasmide pGEH-HDyn1-2AM und pGEH-HDyn1-2BM wurden ektopisch in die Stämme FB1rDyn1 und FB1rDyn2 integriert. Die Integration der Plasmide wurde durch Southern Blots überprüft, da ausgeschlossen werden musste, dass über die langen homologen Bereiche eine Integration in den *dyn1*-Lokus erfolgte und dadurch die Kontrolle des endogenen *dyn1*-Gens durch den *crg*-Promotor verlorenging. Beide Fusionsproteine wurden vollständig exprimiert und konnten im Western Blot unter Verwendung von HA-Antikörpern, die den N-terminalen Marker binden, als auch mit Myc-Antikörpern, die den C-terminalen Marker erkennen, detektiert werden (Abb. 12B1, 12B2). Das apparante Molekulargewicht der Fusionsproteine nach der SDS-Gelelektrophorese war vergleichbar mit Ro1 aus *Neurospora crassa* (Abb. 12B3) und Dyn1-2 migrierte im Saccharose-Dichtegradient mit $22,4 \pm 2,5$ S (n=3 Experimente). Quantitative Western-Analysen zeigten, dass die Fusionskonstrukte, obwohl sie unter Kontrolle des *dyn1*-Promotors

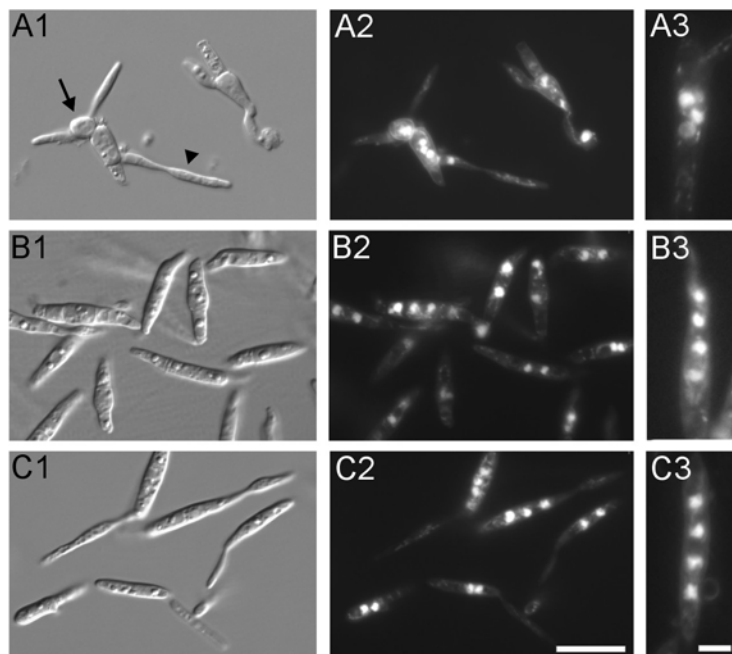


Abbildung 13: Teilweise Rettung des morphologischen und des Kernverteilungsdefekts von FB1rDyn2 durch Dyn1-2-Fusionen.

A: Nach 24h in CM-G zeigen FB1rDyn2-Zellen deutliche Morphologie-Defekte. Oft war ein Verlust der Zellpolarität zu beobachten (Pfeil in A1). Gleichzeitig wurden lange knospenähnliche Verlängerungen sichtbar (Pfeilkopf in A1), die meist keinen Zellkern enthielten (A2). Die DAPI-Färbung (A2, A3) zeigte, dass sich Kerne anhäuferten, was auf eine fehlende Kernbewegung schließen lässt.

B, C: Expression von HDyn1-2AM (B) oder HDyn1-2BM (C) in FB1rDyn2 führte zu einer teilweisen Rettung des Morphologie-Defektes (B1, C1). Die entsprechende DAPI-Färbung zeigte jedoch, dass die meisten Zellen trotzdem viele Zellkerne enthielten (B2, C2). Diese waren jedoch in der Zelle aufgereiht (B3, C3). Kernanhäufungen konnten kaum beobachtet werden.

Balken für A1, A2, B1, B2, C1, C2: 10 μ m. Balken für A3, B3, C3: 3 μ m.

standen, lediglich geringe Expressionsstärken erreichten, die weniger als 10% im Vergleich zu HA-Dyn1 ausmachten (nicht gezeigt).

Trotzdem ermöglichten beide Fusionsproteine ein verbessertes Wachstum von FB1rDyn1 und FB1rDyn2 in CM-G und retteten den Morphologiedefekt zumindest teilweise. Als Beispiele sind Zellen von FB1rDyn2HDyn1-2AM (Abb. 13B) und FB1rDyn2HDyn1-2BM (Abb. 13C) im Vergleich zu FB1rDyn2 (Abb. 13A) gezeigt. Auffällig war, dass die Zellkerne nach Expression beider Fusionsproteine nicht mehr eng nebeneinander angehäuft, sondern in der Zelle aufgereiht waren, obwohl noch immer etwa 80-90% der Zellen entweder keinen oder mehr als einen Kern enthielten (Abb. 13).

Aufgrund der geringen Stabilität bzw. Expressionsstärke der Fusionsproteine kann aus diesen Experimenten nicht geschlossen werden, ob die Kettentrennung funktionell bedeutsam ist. Es kann lediglich festgestellt werden, dass eine fusionierte schwere Kette fähig ist, zelluläre Funktionen von Dyn1 und Dyn2 zu übernehmen. Ob die restlichen Defekte auf die verminderte Proteinmenge oder einen eingeschränkten Funktionsumfang zurückzuführen sind, muss ungeklärt bleiben.

Zusammenfassend konnte mit N- und C-terminal markierten Polypeptiden gezeigt werden, dass Dyn1 und Dyn2 vollständig translatiert werden und miteinander interagieren können. Der Dyn1-Dyn2-Komplex schien aber sehr instabil zu sein, da er während der Dichtezentrifugation vollständig dissoziierte. Trotzdem legen die Kollokalisationsstudien und die mit ähnlicher Ausprägung auftretenden Kernverteilungsdefekte von FB1rDyn1 und FB1rDyn2 (Straube *et al.*, 2001) die Vermutung nahe, dass Dyn1 und Dyn2 *in vivo* zusammenwirken, zumal Fusionskonstrukte aus Dyn1 und Dyn2 die Mutantenphänotypen teilweise retten konnten.

2.3 Zelluläre Funktion der C-terminalen Domäne von cytoplasmatischem Dynein

Eine weitere strukturelle Besonderheit der schweren Dynein-Kette aus *U. maydis* ist die Existenz einer etwa 33 kD großen C-terminalen Domäne, die in den Dyneinen anderer pilzlicher Modellorganismen fehlt (siehe Abb. 2). Diese Domäne ist in den DHCs höherer Organismen ebenfalls vorhanden und zudem recht gut konserviert. Die letzten 285 Aminosäuren von Dyn2 und der DHC aus Ratte zeigen 37,5% Identität, was für eine funktionelle Bedeutsamkeit dieser Region spricht. Es sollte daher untersucht werden, welche Funktion diese Domäne in *U. maydis* hat. Da in pilzlichen Systemen bisher für Dynein Funktionen beim Kerntransport und der Verlängerung und Ausrichtung der Mitose-Spindel durch das Ziehen an astralen Mikrotubuli nachgewiesen wurden, war die Beteiligung des C-terminalen Bereichs an anderen Funktionen zu erwarten.

Um die Funktion der Domäne zu untersuchen, wurden verschiedene Strategien verfolgt. Die Deletion der C-terminalen Domäne oder die Mutation entscheidender Aminosäuren sollte zum Ausfall ihrer Funktionen führen. Das setzt jedoch voraus, dass die Gesamtstruktur des Dynein-Komplexes insoweit unverändert bleibt, dass andere Funktionen nicht mitbetroffen werden oder das Protein nicht destabilisiert und abgebaut wird. Hinweise auf die Funktion der C-terminalen 311 Aminosäuren von Dyn2 (im folgenden als C311 abgekürzt) wurden auch von ihrer Überexpression erwartet. Die Domäne sollte mit dem nativen Protein um für die Domäne spezifische Bindungspartner konkurrieren und dadurch spezifische Funktionen hemmen. Die subzelluläre Lokalisation der isoliert exprimierten Domäne könnte ebenfalls wichtige Anhaltspunkte liefern. Schlussendlich würde die Isolation von Bindungspartnern von C311 weitergehende Einblicke in die Funktionsweise geben, die durch dreidimensionale Strukturdaten untermauert und verfeinert werden können. All diese Strategien wurden zur Untersuchung der Funktion von C311 verfolgt, allerdings lagen für die meisten Ansätze beim Zusammenstellen der Arbeit noch keine abschließende Ergebnisse vor.

2.3.1 Deletionen in der C-terminalen Domäne führen zu einem letalen Phänotyp

Zunächst wurde die gesamte C-terminale Domäne von Dyn2 deletiert. Da nicht eindeutig festgestellt werden konnte, wo genau die C-terminale Domäne beginnt, wurden zwei Konstrukte hergestellt. pSLH-N1287 und pSLH-N1312 enthalten verkürzte *dyn2*-Gene, die

für die N-terminalen 1287 bzw. 1312 Aminosäuren kodieren. Die Plasmide enthalten außerdem ein 1,6 kb großes *dyn2*-Promotorfragment zur Expressionskontrolle. pSLH-N1287 und pSLH-N1312 wurden ektopisch in den Stamm FB1rDyn2 eingebracht. Der Kernverteilungsdefekt von FB1rDyn2 in CM-G konnte dadurch nicht gerettet werden. Eine Überprüfung der Expression der verkürzten Konstrukte erfolgte allerdings bisher nicht. Da in anderen pilzlichen Modellsystemen Dynein für den Kerntransport zuständig ist, ohne dass

	* 20 * 40 *		
Deletionen :	QPSWMKALRANALQWLTLPTTVTLFGSDAGSVHDPlyrFWAREHRTGSS :	50	REGA
UmDyn2 :	QPSWMKALRANALQWLTLPTTVTLFGSDAGSVHDPlyrFWAREHRTGSS :	50	
RnDHC :	RPAWMRTLHTTASNWLHLIPQTLSPKRTVENIKDPLFRFFEREVKMGAK :	50	
DmDHC :	RPSWMKALHNSATAWLELLPKNLQVLKRTVENIKDPLYRYFFEREVTSGSR :	50	
	60 * 80 * 100		
Deletionen :	LLCAVRNDLQEVVAVCDGDSRQTNHNRTLLTDLPKAVIPQSWRRYSVPKS :	100	
UmDyn2 :	LLCAVRNDLQEVVAVCDGDSRQTNHNRTLLTDLPKAVIPQSWRRYSVPKS :	100	
RnDHC :	LLQDVRQDLADVQVCEGKKKQTNYLRTLINELVKGI LPRSWSHYTVPAG :	100	
DmDHC :	LLQTVILDLDVVLICQGEKKQTNHHRSMSELVIRGII PKGWKRYTVPAG :	100	
	* 120 * 140 *		
Deletionen :	MTLAEWIVDLRARLEQLERITREASELGAGASGGYDMAEVVLGGLFSPGA :	150	ΔTT
UmDyn2 :	MTLAEWIVDLRARLEQLERITREASELGAGASGGYDMAEVVLGGLFSPGA :	150	
RnDHC :	MTVIQVWSDFSERIKQLQNI SQAAAAGGAKELKN--- IHVCLGALFVPEA :	147	
DmDHC :	CTVIQWITDFSNRVQQLQKVSQVLSQAGAKELQG--- FPVWLGGLLNPEA :	147	ΔGL
	160 * 180 * 200		
Deletionen :	YLTATRQSVAHASNVSLNLSLRLLN--DAKAGLEPGKFAIRGLKLOGA :	198	ΔFA
UmDyn2 :	YLTATRQSVAHASNVSLNLSLRLLN--DAKAGLEPGKFAIRGLKLOGA :	198	
RnDHC :	YITATRQYVAQANSWSLEELCLEVNVV--ASQSTTLDACSFVGTGLKLOGA :	196	
DmDHC :	YITATRQCVAQANSWSLEELALDVTITDAGLKNQKDCCFVGTGLKLOGA :	197	
	* 220 * 240 *		
Deletionen :	NWDPEAKRIKLNDDGGVTNLGLTALVWEQQQQKQEGEAGAEQGVKVRISVY :	248	
UmDyn2 :	NWDPEAKRIKLNDDGGVTNLGLTALVWEQQQQKQEGEAGAEQGVKVRISVY :	248	
RnDHC :	TCS--NNKLSLSNAISTVLPVPLTQLRWGKQTSAE-----KKASVVTLFVY :	238	
DmDHC :	QCK--NNELLASTIMMDLPVTILKW--IKISSE-----PRISKLTLPVY :	238	
	260 * 280		
Deletionen :	LNQDRSQALFATMLDVDVGKATVAQRAVALRAS----- :	283	
UmDyn2 :	LNQDRSQALFATMLDVDVGKATVAQRAVALRAS----- :	283	
RnDHC :	LNFTTRADLI FTVD FEIATKEDPRSFYERGVAVLCTE--- :	274	
DmDHC :	LNSTRTELEFTVDLAVAAGQESHFSFYERGVAVLTSTALN :	277	

Abbildung 14: Alignment der C-terminalen Domänen verschiedener schwerer Dynein-Ketten.

Die C-terminalen 283 Aminosäuren von Dyn2 sind mit den C-Termini von DHC1 aus *Rattus norvegicus* (RnDHC, NP_062099) und CDHC aus *Drosophila melanogaster* (DmDHC, P37276) verglichen worden. Übereinstimmende Aminosäuren in allen drei Proteinen sind hellblau unterlegt. Über dem Sequenzalignment ist der C-Terminus von Dyn2 ein zweites Mal angefügt und die hergestellten Deletionen und die REGA-Mutation markiert.

diese die C-terminale Domäne enthalten, lag die Vermutung nahe, dass das Fehlen der etwa 33 kD großen C-terminalen Domäne zu einer starken Beeinträchtigung der Stabilität des Dynein-Komplexes führte und so der gesamte Komplex nicht mehr funktionsfähig war. Deswegen wurde eine neue Strategie verfolgt, die in der Deletion kurzer, konservierter Bereiche der C-terminalen Domäne bestand. Dafür wurden drei Bereiche ausgewählt, die in der Sequenz der schweren Ketten cytoplasmatischen Dyneins von Ratte, Fruchtfliege und *U. maydis* konserviert waren (Abb. 14). Zusätzlich wurden zwei nebeneinanderliegende, geladene Aminosäuren, Arginin R1356 und Glutaminsäure E1357, ausgewählt, die durch 4 Punktmutationen in kleine, ungeladene Aminosäuren, Glycin und Alanin, verändert wurden. Diese Mutation wurde deshalb REGA genannt (Abb. 14).

Zunächst wurde versucht, die Deletionen homolog in das endogene *dyn2*-Gen des Wildtyp-Stammes FB1 einzuführen. In allen überlebenden Transformanten mit homologer Integration der Konstrukte erfolgte die Rekombination stromabwärts von den Mutationen, so dass diese nicht eingeführt wurden. Das lag nicht in der Natur des Konstruktes, denn eine homologe Einführung aller drei Deletionen in eine Kopie des *dyn2*-Gens gelang im diploiden *U. maydis*-Stammes FBD11. Das legte den Schluss nahe, dass diese Deletionen einen letalen Phänotyp verursachen. Um diesen näher zu analysieren zu können, wurden Dyn2 Δ TT, Dyn2 Δ FA und

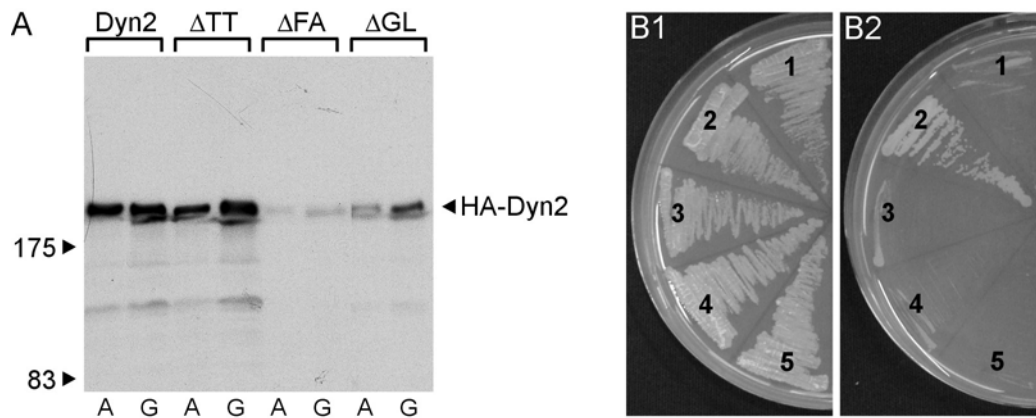


Abbildung 15: Expression und Wachstum verschiedener Dyn2-Allele.

A: 3HA-Fusionskonstrukte von Dyn2, Dyn2 Δ TT, Dyn2 Δ FA und Dyn2 Δ GL wurden in FB1rDyn2 ektopisch integriert. Die Expression dieser Proteine ist auf dem Western Blot mit dem anti-HA-Antikörper überprüft worden. Nur Dyn2 Δ TT wurde in ähnlicher Menge wie Dyn2 exprimiert. Dabei war die Expression unabhängig vom verwendeten Medium (CM-A oder CM-G). Die gleichmäßige Proteinladung wurde mit α -Tubulin-Antikörpern bestätigt (nicht gezeigt).

B: FB1rDyn2 (1) konnte keine Kolonien auf CM-G-Platten bilden (B2). Dieser Defekt wurde durch Expression von HA-Dyn2 (2) gerettet. Die Expression der Mutantallele Dyn2 Δ TT (3), Dyn2 Δ FA (4) und Dyn2 Δ GL (5) konnte den Wachstumsdefekt von FB1rDyn2 nicht retten. Das Wachstum auf CM-A-Platten war in keiner der Mutanten beeinträchtigt (B1).

Dyn2 Δ GL mit einem dreifachen HA-Marker am N-Terminus versehen und ektopisch in den regulierbaren Stamm FB1rDyn2 integriert. Als Kontrolle wurde ein unverändertes HA-Dyn2-Konstrukt verwendet. Die ektopische Integration wurde mittels Southern Blot überprüft. Häufig traten homologe Rekombinationen im *dyn2*-Lokus auf, die zum Verlust der Kontrolle des endogenen *dyn2* durch den *crg*-Promotor führten, was nicht erwünscht war. Stämme mit ektopischer Integration der einzelnen Konstrukte wurden dann im Western auf die Expression des HA-Fusionsproteins getestet (Abb. 15A). Von Dyn2 Δ GL und Dyn2 Δ F_A wurden nur sehr geringe Proteinmengen auf dem Western Blot detektiert, was dafür spricht, dass diese Proteine nicht stabil sind oder nicht effizient exprimiert werden können. Allerdings konnten von Dyn2 Δ TT ähnliche Proteinmengen wie im Kontrollstamm FB1rDyn2HDyn2 detektiert werden (Abb. 15A).

Erwartungsgemäß wurde durch die Expression von HA-Dyn2 im Kontrollstamm der letale

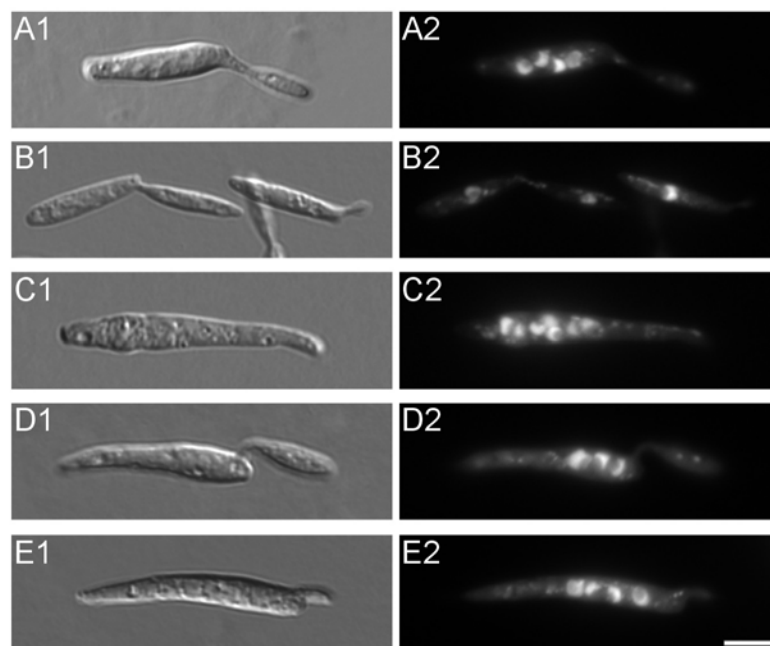


Abbildung 16: Kernverteilungsdefekte in den Dyn2-Mutanten.

A: Nach 20h Wachstum in CM-G zeigten FB1rDyn2-Zellen einen typischen Kernverteilungsdefekt. Die Zellen waren verdickt (A1) und enthielten eine Anhäufung von Zellkernen (DAPI in A2).

B: Im Kontrollstamm wurde HA-Dyn2 in FB1rDyn2 exprimiert. Dadurch wurde die Morphologie und der Kernverteilungsdefekt gerettet.

C: Obwohl Dyn2 Δ TT in ausreichender Menge exprimiert wurde (siehe auch Abb. 15), konnte dieses Allel den Kernverteilungsdefekt nicht retten.

D, E: Dyn2 Δ F_A und Dyn2 Δ GL wurden nicht in der gleichen Menge wie Dyn2 exprimiert oder wurden schnell abgebaut. Entsprechend trat in FB1rDyn2H Δ F_A (D) und FB1rDyn2H Δ GL (E) ein starker Kernverteilungsdefekt nach Wachstum in CM-G auf.

Balken: 5 μ m.

Phänotyp von FB1rDyn2 gerettet. FB1rDyn2HDyn2 konnte auf CM-G-Platten Kolonien bilden (Abb. 15B2). Zudem waren der Morphologie- und der Kernverteilungsdefekt vollständig gerettet (Abb. 16B; vergleiche FB1rDyn2 in 16A). Möglicherweise aufgrund der geringen Expressionsstärke konnten Dyn2 Δ F_A und Dyn2 Δ G_L weder das Wachstum auf Platte, noch den Morphologie- und den Kernverteilungsdefekt von FB1rDyn2 retten (Abb. 15B2, 16D, E). Ähnliche Wachstumsdefekte zeigte trotz der ausreichenden Expressionsstärke auch FB1rDyn2H Δ TT (Abb. 15B2). Zudem traten in diesem Stamm morphologische Defekte und Kernanhäufungen wie in FB1rDyn2 auf (Abb. 16C).

FB1REGA enthält die oben beschriebenen Punktmutationen im endogenen *dyn2*-Gen. Drei unabhängige, auf diese Weise mutierte Stämme zeigten normales Wachstum, Wildtyp-ähnliche Kernverteilung und Mikrotubuli-Anordnung (Abb. 17A, 17B). Das änderte sich, wenn diese Stämme bei 32°C anstatt 29°C inkubiert wurden. Dann konnten Defekte in Morphologie, Kernverteilung und Mikrotubuli-Anordnung beobachtet werden (Abb. 17C, D). Vorläufige Ergebnisse zeigen allerdings, dass Kernverteilungsdefekte nur in etwa 30% der Zellen auftraten und die Störung des Mikrotubuli-Cytoskeletts gegenüber Dynein-defizienten Zellen geringer war. Beispielsweise konnten in FB1REGAGT-Zellen sehr häufig Mikrotubuli-Bündel beobachtet werden, die in FB1rDyn2 nur noch in 20% der Zellen gefunden wurden (Schulz, 2000). Da mehrere Defekte mit einem verminderte Phänotyp auftraten, liegt die Vermutung nahe, dass die REGA-Mutation nach Temperaturerhöhung die Funktion des gesamten Komplexes beeinträchtigt, aber nicht vollständig ausschaltet.

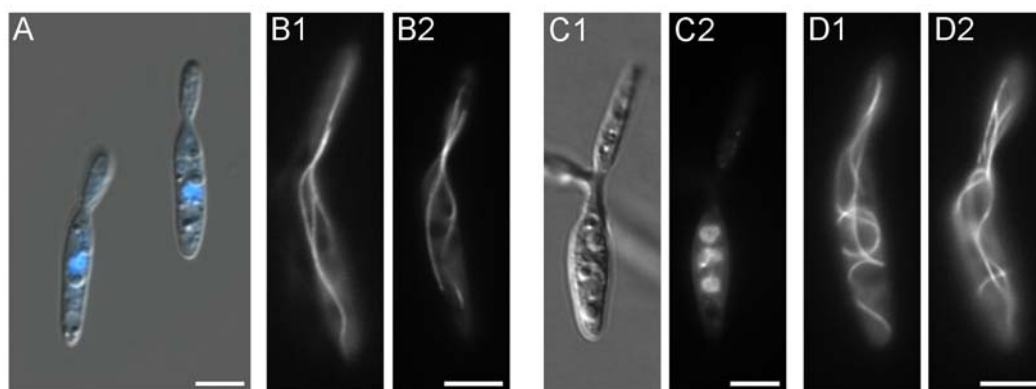


Abbildung 17: Temperatursensitiver Phänotyp der REGA-Mutation.

A, B: Nach Wachstum bei 29°C sahen FB1REGAGT-Zellen Wildtyp-ähnlich aus. Überlagerung von DAPI-Färbung und DIC-Bild in A. Die Mikrotubuli-Organisation war ebenfalls normal (B). Balken: 5µm.

C, D: Nach Inkubation für 20h bei 32°C wurden in FB1REGAGT für Dynein-Mutanten typische Morphologie- und Kernverteilungsdefekte (C), sowie viele lange, schlaufige Mikrotubuli beobachtet (D). Balken: 5 µm.

Zusammenfassend sprechen die Ergebnisse sehr dafür, dass die C-terminale Domäne für die Gesamtstruktur des Dynein-Komplexes sehr bedeutsam ist und deswegen bei strukturellen Änderungen in C311 ein vollständiger Funktionsausfall des gesamten Dynein-Komplexes erfolgt. Spezifische Aussagen zur Bedeutung dieser Region konnten mit den durchgeführten Untersuchungen nicht getroffen werden.

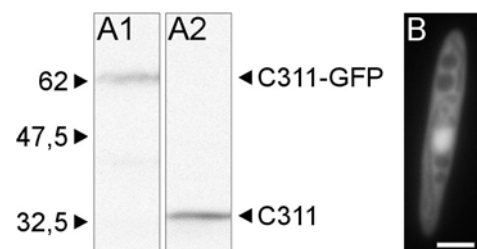
2.3.2 Lokalisation von C311

Um in Mutanten von Dyn2 ohne jeweils eine Epitop-Markierung vornehmen zu müssen, die Expression und Lokalisation überprüfen zu können und die isolierte C-terminale Domäne nachweisen zu können, wurde ein polyklonaler Antikörper gegen in *E. coli* exprimiertes C311 hergestellt. Der Einsatz dieses Antikörpers in der Immunfluoreszenz führte zu keinem auswertbaren Ergebnis, obwohl der Antikörper erfolgreich für die Detektion von Dyn2 und von C311 auf Nitrocellulose-Membranen verwendet werden konnte (Abb. 18, 19).

Abbildung 18: Lokalisation von C311-GFP.

A: Western-Analyse von FB1C311G mit dem anti-C311-Antikörper zeigte eine erwartete Bande von etwa 60 kD (A1). Das C311-GFP-Fusionsprotein wurde also vollständig exprimiert. Im Vergleich dazu wurde ein Proteinextrakt aufgetragen, der C311 enthielt (A2)

B: C311-GFP war gleichmäßig im Cytoplasma von FB1C311G verteilt und reicherte sich im Zellkern an. Balken: 3 μ m.



Zusätzlich wurde ein Fusionskonstrukt der letzten 311 Aminosäuren von Dyn2 mit GFP hergestellt und ektopisch in *U. maydis* integriert. Das Konstrukt wurde vollständig exprimiert, da in der Western-Analyse eine Bande bei etwa 60 kD nachgewiesen werden konnte (Abb. 18A1). In der Zelle wurde das C311-GFP-Fusionsprotein als gleichmäßiger Hintergrund im gesamten Cytoplasma mit einem erhöhten Level im Zellkern gefunden (Abb. 18B). Diese Lokalisation lässt den Schluss zu, dass C311 möglicherweise eine Funktion im Kern ausübt, zumindest muss C311-GFP ein Kernlokalisierungssignal enthält, da nur Moleküle, die kleiner als etwa 40 kD sind, die Kernporen ohne spezifischen Transport passieren können (Peters, 1983, 1984). Für einen Mikrotubuli-Motor ist allerdings während der Interphase im Zellkern keine Aufgabe möglich, bei der Mikrotubuli involviert sind.

2.3.3 Die Überexpression der C-terminalen Domäne führt zu Veränderungen der dynamischen Instabilität von Mikrotubuli

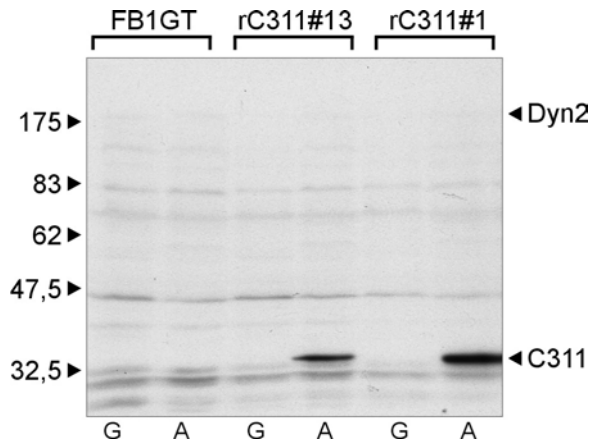


Abbildung 19: Überexpression von C311.

Western Blot von Proteinextrakten des Ausgangsstamms FB1GT und von zwei FB1rC311GT-Stämmen nach Wachstum in CM-G (G) und CM-A (A). Bei etwa 180 kD wurde in allen Spuren mit dem anti-C311-Antikörper Dyn2 detektiert (sehr schwach). Ein vielfach stärkeres Signal wurde bei etwa 33 kD für C311 in den Überexpressionsstämmen erhalten, wenn diese unter induzierenden Bedingungen (CM-A) angezogen wurden. Da es sich hier um ein ungereinigtes Ratten-Serum handelt, sind zusätzlich unspezifische Banden detektiert worden. Die gleichmäßige Beladung mit Protein wird an den unspezifischen Banden deutlich.

Da die Deletionsmutanten und die Lokalisationsversuche zu keinem greifbaren Ergebnis führten, wurden in einem weiteren Ansatz die C-terminalen 311 Aminosäuren von Dyn2 überexprimiert. Dazu wurden sie unter Kontrolle des regulierbaren *crg*-Promotors gestellt, der eine starke Expression in Arabinose-haltigem Medium (CM-A) erlaubt, während Glucose-haltige Medien (CM-G) zur Repression führen. Das Plasmid pNEBH-crg-C311 wurde ektopisch in das Genom von Stamm FB1GT integriert. Die Expression von C311 wurde durch Western Blot Analyse mit dem spezifischen C311-Antikörper (siehe unten) untersucht. Es wurden Mutanten ausgewählt, die nach Anzucht in CM-A eine besonders starke Expression von C311 aufwiesen und gleichzeitig in CM-G keine C311-Expression zeigten (Fig. 19). Die Überexpressionsmutanten zeigten keinen Kernverteilungsdefekt in CM-A. In vier unabhängigen Transformanten konnten sowohl in CM-G als auch CM-A in weniger als 1% der Zellen kein oder mehr als ein Zellkern gefunden werden (CM-G: $0,18 \pm 0,11$ %; CM-A: $0,38 \pm 0,23$ %; $n=4$ Transformanten, je >500 Zellen). In höheren Eukaryonten ist Dynein an verschiedensten Schritten während der Mitose beteiligt (Karki und Holzbaur, 1999) und es wurde daher angenommen, dass die Existenz der C-terminalen Domäne auf eine mitotische Funktion von Dynein auch in *U. maydis* hinweist. Allerdings konnte nach Überexpression von C311 kein Hinweis auf einen DNA-Segregationsdefekt gefunden werden. Die FACS-Analyse verschiedener Propidium-Iodid-gefärbter FB1rC311-Stämme zeigte sowohl unter reprimierenden (CM-G) als auch unter induzierenden Bedingungen (CM-A) eine Verteilung wie in Wildtyp-Zellen (Abb. 20). Zudem hatte die Überexpression von C311 keinen Einfluss auf die Morphologie und Organisation der Spindel ($n=50$ mitotische Zellen).

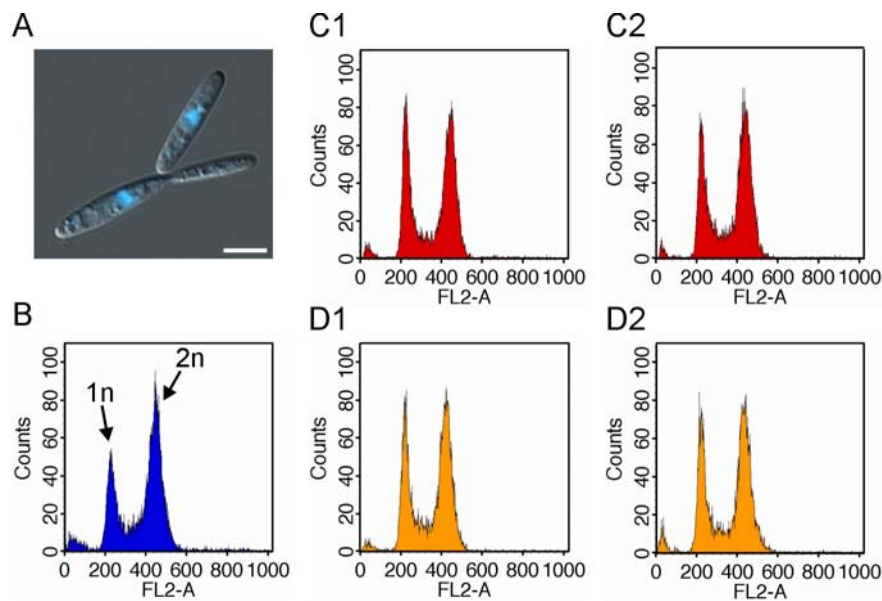


Abbildung 20: FACS-Analyse von FB1rC311GT-Zellen.

A: FB1rC311GT-Zellen zeigten auch nach Wachstum unter induzierenden Bedingungen keinen Kernverteilungsdefekt. Jede Zelle enthielt einen Zellkern. Überlagerung von DAPI-Färbung und DIC-Bild. Balken: 5 μ m.

B: Die FACS-Analyse von FB1GT-Zellen in CM-A zeigte eine Verteilung von Kernen mit einfachem (1n) und zweifachem (2n) Chromosomensatz. Der kleine Peak bei etwa 50 stammt von fluoreszierenden Partikeln in der Probe. Zellen mit einem drei- oder vierfachen Chromosomensatz konnten nur selten gefunden werden.

C, D: Vier unabhängige Transformanten von FB1rC311GT wurden ebenfalls analysiert. Hier sind die Ergebnisse für zwei dieser Transformanten nach Wachstum in CM-G (C1, C2) und CM-A (D1, D2) gezeigt. In keinem Falle war eine signifikante Anzahl von Zellen mit einem erhöhten DNA-Gehalt gefunden worden. Die Überexpression von C311 führte nicht zu einem DNA-Segregationsdefekt.

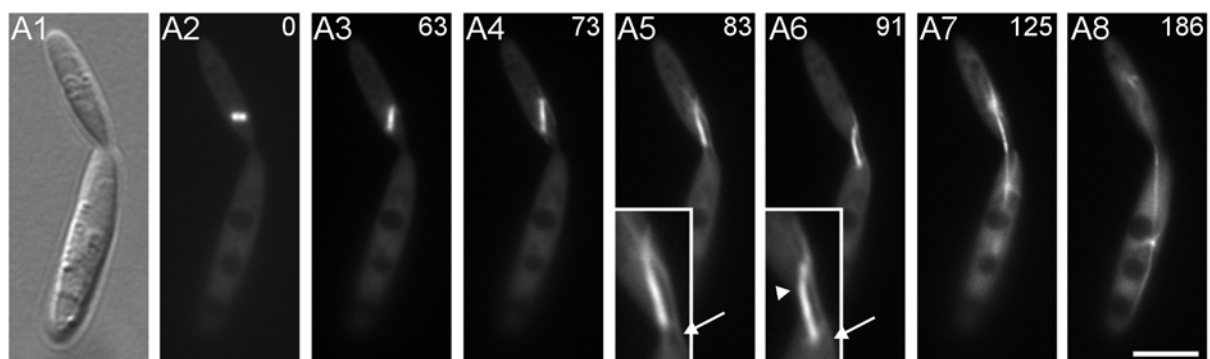


Abbildung 21: Typischer Verlauf einer Mitose in FB1rC311GT unter induzierenden Bedingungen.

Unter Überexpressionsbedingungen wurde in FB1rC311GT-Zellen wie auch im Wildtyp die Mitose in der Tochterzelle in der Nähe des Knospenhalses initiiert (A1, DIC-Bild). Die Spindelausrichtung (GFP-Tub1; A2, A3) wurde gefolgt von einer schnellen Verlängerung der Spindel, die mit dem Passieren des Knospenhalses einherging (A4-A7). Dabei kam es unter Überexpression der C-terminalen Domäne von Dyn2 oft zu einer vorübergehenden Krümmung der Spindel (Pfeilkopf in A6), da einer der sehr langen astralen Mikrotubuli (Pfeile) aus der Tochterzelle durch den Knospenhals gewachsen war und in Richtung Mutterzelle zog (A5 und A6 mit eingesetzten Vergrößerungen). Die Positionierung der Tochterkerne erfolgte dann mit Hilfe der astralen Mikrotubuli in der Mitte beider Zellen (A8). Zeitabstände sind in Sekunden in der rechten, oberen Ecke angegeben. Balken: 5 μ m.

Während des Verlaufs der Mitose unter Überexpression von C311 (Abb. 21) wurde eine erhöhte Stabilität der astralen Mikrotubuli beobachtet was häufig dazu führte, dass ein Mikrotubulus durch den Knospenhals wanderte (Pfeile in 21A5 und 21A6) und eine Krümmung der Spindel (Pfeilkopf in 21A6) während der Verlängerung hervorrief. Diese Störungen wiesen auf einen Einfluss von C311 auf die Mikrotubuli-Dynamik hin, behinderten den Ablauf der Chromosomenverteilung allerdings nicht.

Während der Interphase traten Veränderungen des Mikrotubuli-Cytoskeletts unter Überexpression von C311 deutlicher zutage. Die Überexpression von C311 führte zur Verlängerung der Mikrotubuli, was sich in stark gebogenen, schlaufigen Mikrotubuli ausdrückte (Abb. 22B). Da die Mikrotubuli-Länge von den dynamischen Eigenschaften der Mikrotubuli abhängt, wurden die Häufigkeiten von „Rescue“ und Katastrophen, sowie die Polymerisations- und Depolymerisationsraten in FB1rC311GT-Zellen quantitativ analysiert. Dabei wurde herausgefunden, dass für die Verlängerung der Mikrotubuli Änderungen in zwei Parametern der dynamischen Instabilität zuständig waren. Die C311-Überexpression sorgte für die Verringerung der Katastrophenfrequenz und zu einer etwa dreifachen Erhöhung der „Rescuefrequenz“ (Tabelle I). Dadurch kam es seltener zu Verkürzungen von Mikrotubuli (Katastrophe) und gleichzeitig zu häufigerem Beginn von Mikrotubuli-Polymerisationen („Rescue“). Die Polymerisations- und Depolymerisationsgeschwindigkeiten waren nicht verändert.

Tabelle I: Mikrotubuli-Dynamik in den C311-Überexpressionsstämmen.

	FB1rC311GT#13		FB1rC311GT#1	
	CM-G (↓)	CM-A (↑)	CM-G (↓)	CM-A (↑)
Polymerisationsgeschwindigkeit*	9,73 ± 3,94 (27)	10,05 ± 4,20	9.64 ± 2.63 (23)	9,86 ± 5,25 (15)
Depolymerisationsgeschwindigkeit*	34,81 ± 18,22	35,00 ± 15,6	33.09 ± 14.16	36,20 ± 13,99
Rescuefrequenz [†]	0,007	0,027	0,009	0,022
Katastrophenfrequenz [†]	0,045	0,033	0,047	0,034
Mikrotubuli-Bündel**	78,3	83,8	86,5	73,5
Mikrotubuli-Biegen**	52,2	59,9	43,3	44,1
Mikrotubuli-Bewegen**	8,7	8,1	16,0	12,2

Werte angegeben als: *Mittelwert ± Standardabweichung (n=Anzahl der Ereignisse) in µm/min; [†]Übergänge pro Sekunde; **Prozent der Zellen (n > 35 Zellen).

Sehr ähnliche Auswirkungen auf die Mikrotubuli-Dynamiken waren auch in den konditionellen Dyneinmutanten FB1rDyn1 und FB1rDyn2 unter reprimierenden Bedingungen aufgetreten (Schulz, 2000; Abb. 22). Die in den Dyneinmutanten von Irene Schulz

beobachteten Defekte in der Bündelung von Mikrotubuli, dem Aneinandergleiten und Biegen von Mikrotubuli und der Bewegung einzelner Mikrotubuli konnten durch die Überexpression von C311 aber nicht hervorgerufen werden (Tabelle I, Abb. 22). Die Überexpression von C311 scheint also zur Verdrängung des Dynein-Komplexes von Interaktionspartnern zu führen, die für die Modulation der dynamischen Instabilität von Mikrotubuli durch den Dynein-Komplex gebunden werden. Einen Einfluss auf die Dynein-abhängige Motilität der Mikrotubuli und den Dynein-vermittelten Transport scheint C311 jedoch nicht zu haben.

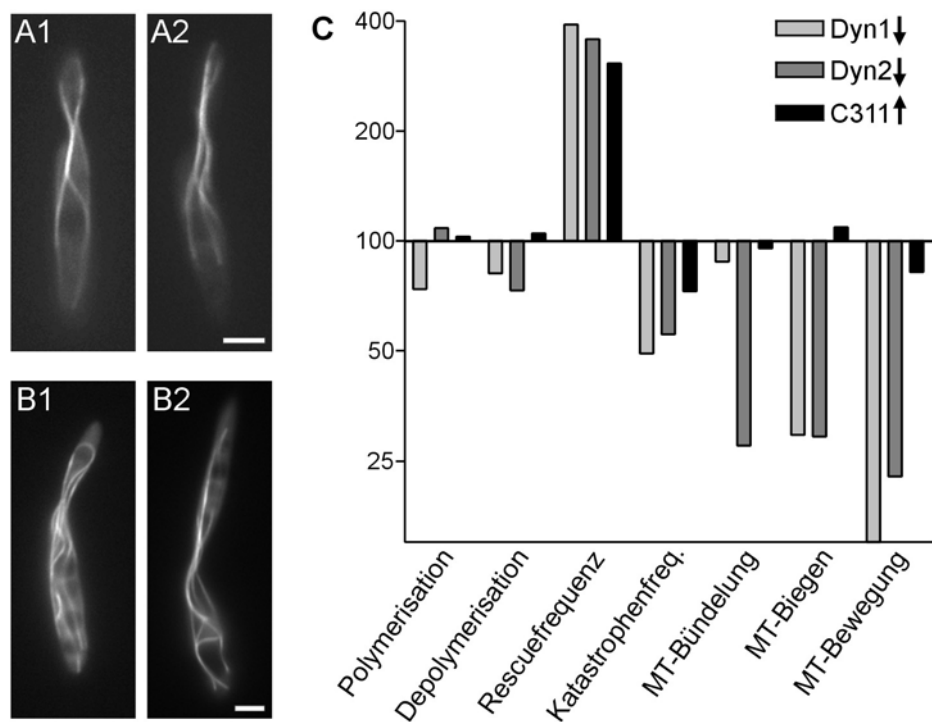


Abbildung 22: Veränderung der Mikrotubuli-Dynamik unter C311-Überexpression.

A: Das Mikrotubuli-Cytoskelett war normal in FB1rC311GT-Zellen nach Wachstum in CM-G. Balken: 3 μ m.

B: Nach Wachstum unter induzierenden Bedingungen (CM-A) traten in FB1rC311GT-Zellen häufig schlaufige, stark gebogene, sehr lange Mikrotubuli auf. Balken: 3 μ m.

C: Die Mikrotubuli-Verlängerung bei C311-Überexpression (schwarze Säulen) wurde von Änderungen der dynamischen Instabilität der Mikrotubuli verursacht. Insbesondere war die „Rescuefrequenz“ erhöht und die Katastrophenfrequenz verringert. Einen ähnlichen Einfluß auf die Mikrotubuli-Dynamik haben die Repression von Dyn1 (hellgrau) und von Dyn2 (dunkelgrau). Die in den Dynein-Mutanten auftretenden Defekte in der Bündelung, dem Biegen und Aneinandergleiten und der Bewegung einzelner Mikrotubuli war bei C311-Überexpression nicht gestört. Die Werte für die C311-Überexpression zeigen die Änderungen nach Inkubation in CM-A im Vergleich zu Wachstum in CM-G. Die Werte für FB1rDyn1GT und FB1rDyn2GT sind als Prozent Änderung zum Wildtyp FB1GT in CM-G angegeben und aus Schulz, 2000 entnommen.

2.4 Funktionen von cytoplasmatischem Dynein während der Mitose von *U. maydis*

Dynein und Dynactin wurden in höheren Eukaryonten als wichtige Komponenten für den Ablauf der Mitose identifiziert und ihre Lokalisation in der mitotischen Spindel spiegelt diese Funktionen wieder (Karki und Holzbaur, 1999). In Pilzen hingegen konnte Dynein nicht innerhalb des mitotischen Kerns detektiert werden, und die mitotische Rolle von Dynein beschränkt sich hier auf Zugkräfte vom Zellkortex aus. Da *Ustilago* im Gegensatz zu anderen pilzlichen Modellorganismen eine „offene“ Mitose absolviert (Heath, 1980; O'Donnell und McLaughlin, 1984), also die Kernhülle während der Mitose geöffnet wird, könnte Dynein an die Spindel-Mikrotubuli binden und dort den Ablauf der Mitose mitgestalten.

2.4.1 Dynein lokalisiert in der Mitose-Spindel

Zunächst sollte also überprüft werden, ob Dynein in *U. maydis* wie in höheren Eukaryonten in der Mitose-Spindel lokalisiert ist. Die *in vivo*-Lokalisation von Dyn1 und Dyn2 durch GFP-Fusionen war nicht erfolgreich. Das GFP-Dyn1-Fusionsprotein (Enard, 1998) konnte zwar auf dem Western Blot nachgewiesen werden (Abb. 23A), jedoch war im Fluoreszenz-Mikroskop nur ein kaum erkennbares, schnell bleichendes Signal zu sehen, das für *in vivo*-

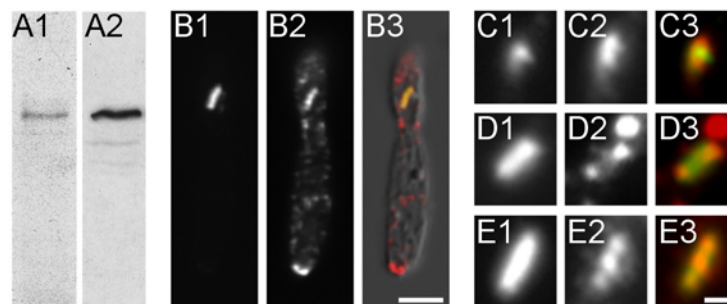


Abbildung 23: Lokalisierung von GFP-Dyn1 in der Mitose-Spindel.

A: Western-Nachweis von GFP-Dyn1 (A1). Es ist eine Bande in der selben Höhe wie HA-Dyn1 detektiert worden (siehe auch Abb. 3), was dafür spricht, dass auch GFP-Dyn1 vollständig exprimiert wurde.

B: *In situ*-Lokalisation von α -Tubulin (B1) und GFP-Dyn1 (B2) mittels spezifischer Antikörper gegen Tubulin bzw. GFP zeigen die Anwesenheit von Dyn1 entlang der Spindel-Mikrotubuli (B3, Überlagerung von α -Tubulin (grün) mit GFP-Dyn1 (rot) in einem DIC-Bild). Balken: 5 μ m.

C, D, E: Während der Prophase ist die Spindel punktförmig (C1, grün in C3). In diesem Stadium lokalisierte Dyn1 (C2, rot in C3) an den Spindelpolen (C3). Die Lokalisation an den Spindelpolen konnte auch während der Metaphase noch beobachtet werden (D). Während der Anaphase wurde Dyn1 zudem in der Mittelzone der Spindel gefunden (E) oder entlang der gesamten Spindel-Mikrotubuli (B). Balken: 1 μ m.

Kolokalisationsstudien nicht ausreichte. Durch den Einsatz von GFP-Antikörpern in der Immunfluoreszenz konnte das Fusionsprotein allerdings detektiert werden. Neben einem starken cytoplasmatischen Hintergrund fiel vor allem die Lokalisation entlang der Spindel-Mikrotubuli auf. GFP-Dyn1 lokalisierte schon in frühen Mitose-Stadien an den Spindelpolkörpern (Abb. 23C) und konnte in späteren Mitose-Stadien vor allem an den Polen und in der Mittelzone der Spindel detektiert werden (Abb. 23D, 23E). Das selbe Lokalisationsmuster wurde mit dem kreuzreaktiven ro1-Antikörper erhalten, der den Bereich um den 1. P-Loop der *Neurospora*-DHC erkennt (G. Steinberg, unveröffentlicht). Die Lokalisation von Dyn2 in der Mitose-Spindel wurde sowohl mit Antikörpern gegen zwei rekombinante Polypeptide aus Dyn2 als auch mit anti-HA und anti-Myc in den Epitop-markierten Stämmen versucht, schlug jedoch bislang fehl. Trotzdem weist die Lokalisation von Dyn1 in der Mitose-Spindel darauf hin, dass der Dynein-Komplex in *U. maydis* wie auch in höheren Eukaryonten mitotische Funktionen erfüllt.

2.4.2 Markerproteine für die Kernhülle

Kürzlich sind Hinweise auf eine Beteiligung von Dynein am Abbau der Kernhülle in Säuger-Zellen gefunden worden (Beaudouin *et al.*, 2002; Salina *et al.*, 2002). Da auch *U. maydis* eine „offene“ Mitose durchläuft, war die Beobachtung der Kernhülle während des Zellzyklus sehr interessant. Als *in vivo*-Marker für die Kernhülle wurden deshalb ER-ständige fluoreszierende Proteine und die Fusion eines Nucleoporins mit YFP hergestellt.

Die ersten 17 Aminosäuren des Calreticulin-Vorläufer-Moleküls aus Ratte sind ein Signalpeptid, das für die Proteinbiosynthese an der Membran des Endoplasmatischen Retikulum sorgt. Der KDEL-Rezeptor im GOLGI erkennt lösliche ER-ständige Proteine an ihrer C-terminalen Aminosäuresequenz KDEL und veranlasst ihren Rücktransport zum ER (Lewis und Pelham, 1992). Um einen *in vivo*-Marker für das ER zu erhalten, wurden deswegen die Signalsequenz von Calreticulin mit dem N-Terminus und die Aminosäuren HDEL bzw. KDEL an den C-Terminus von eGFP (Clontech) fusioniert. Beide Konstrukte, pER3 (HDEL) und pER4 (KDEL), können in den *cbx*-Lokus integriert werden und führen nach Expression in *U. maydis* zur Färbung eines dynamischen Netzwerks, das in der gesamten Zelle aufgespannt und mit der Kernhülle verbunden war (Abb. 24A). Diese Färbung entspricht hochwahrscheinlich dem ER, zumal eine Kolokalisation mit ERTracker Blue-White DPX (Molecular Probes) durch G. Steinberg gezeigt werden konnte (Wedlich-Söldner *et al.*, 2002a). Außerdem konnte nach gleichzeitiger Färbung der DNA mit dem

Lebendfarbstoff Höchst 33342 mit ER-GFP das Verschwinden der Kernhülle während der Mitose gezeigt werden (Abb. 24B, C). Um den Interphase-Kern war mit ER-GFP die Kernhülle gut zu erkennen (Abb. 24B1, C1). Während der Pro- und Metaphase war die nun kondensierte DNA (Abb. 24B2, B3) nicht mehr von einer Hülle umgeben (Abb. 24C2, C3). Allerdings wurde bereits während der Anaphase eine neue Hülle um die noch kondensierten Kerne gebildet (Abb. 24B4, C4). Um Kollokalisationsstudien zu ermöglichen, wurde eGFP in pER3 durch CFP und YFP ausgetauscht. Dies veränderte die Lokalisation erwartungsgemäß nicht.

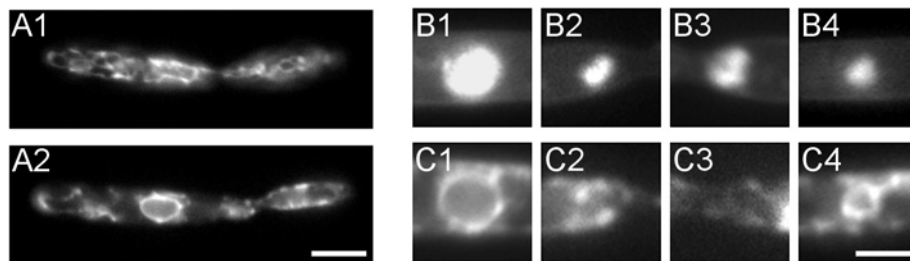


Abbildung 24: Das Endoplasmatische Retikulum in *U. maydis*.

A: ER-CFP färbte ein dynamisches Netzwerk, das sich über die gesamte Peripherie der Sporidien von *U. maydis* erstreckte (A1). In der mittleren Fokus-Ebene einer Zelle trat die Kernhülle hervor, die Teil des ER-Membransystems ist (A2). Balken: 5 μ m.

B, C: Der Interphase-Kern (B1, Höchst 33342) war von einer Kernhülle umgeben (C1, ER-GFP). Während der Mitose wurden die Chromosomen kondensiert (B2, C2) und die Kernhülle abgebaut (C2, C3), Während der Anaphase wurde um die noch kondensierten Tochterkerne (B4) bereits eine neue Kernhülle (C4) gebildet. Balken: 2 μ m. Abbildung zur Verfügung gestellt von G. Steinberg.

Mit dem ER-GFP-Konstrukt konnte die Kernhülle zwar sichtbar gemacht werden, jedoch war es für die Untersuchung des Kernhüllenabbaus vor der Mitose nötig, die Kernhülle vom ER-Netzwerk zweifelsfrei unterscheiden zu können und die Ergebnisse durch Verwendung eines zweiten Markers zu bestätigen. Als spezifische Kernhüllenproteine bieten sich zu diesem Zweck Nucleoporine an. Nup107 wurde bereits in *S. pombe* für die Visualisierung der Kernhülle verwendet (Tran *et al.*, 2001) und ein homologes Protein konnte in der genomischen Sequenz von *U. maydis* auffindig gemacht werden (Abb. 25A). Nup107 aus *S. pombe* und aus *U. maydis* besitzen 20% identische und 39% ähnliche Aminosäuren. Um Überexpressionseffekte zu vermeiden wurde die C-terminale Fusion mit dem Fluoreszenz-Molekül durch homologe Rekombination durchgeführt, da aus *S. pombe* bekannt war, dass eine C-terminale GFP-Fusion biologisch aktiv ist (Tran *et al.*, 2001). Das Plasmid pSLB-Nup107-YFP-hom enthielt nur den 3'-Bereich der kodierenden Sequenz von Nup107 aus *U. maydis*. Eine erfolgreiche homologe Integration des Konstruktes in den *nup107*-Lokus von Wildtyp-Stamm FB2 sollte zur Expression eines gelb-fluoreszierenden vollständigen Nup107

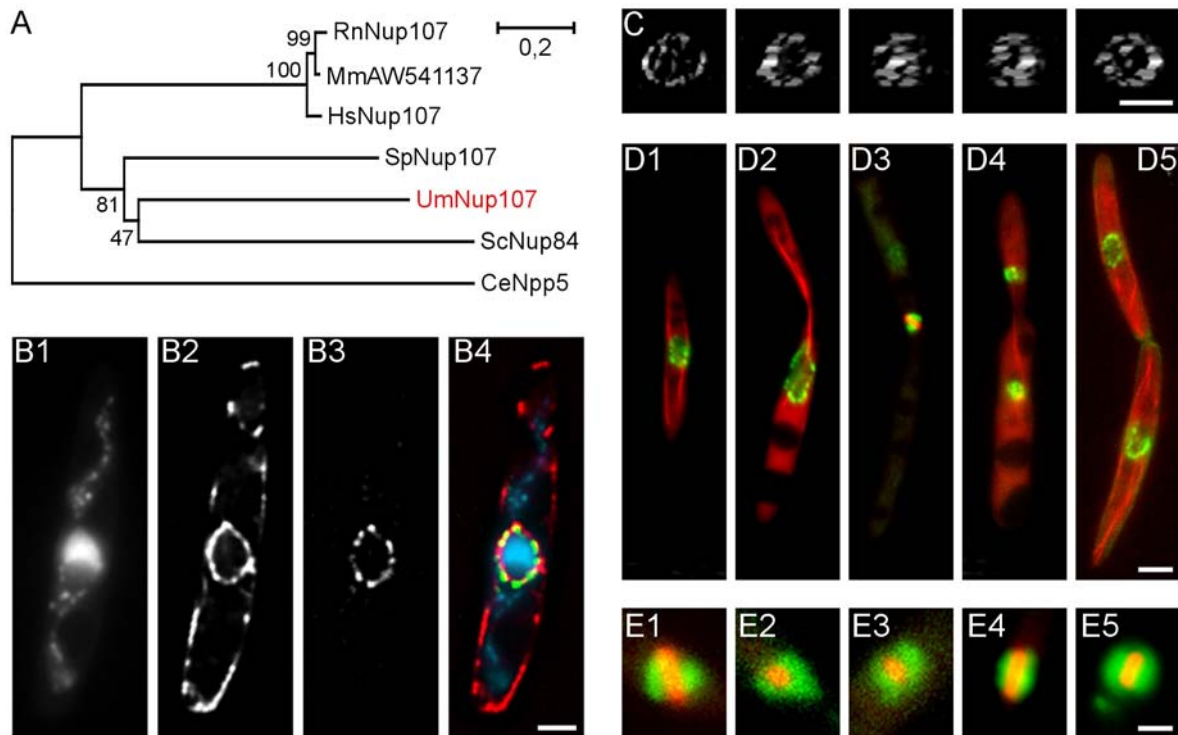


Abbildung 25: Das Nup107-ähnliche Nucleoporin aus *U. maydis* lokalisiert in der Kernhülle und während der Mitose an den Chromosomen.

A: Phylogenetischer Baum ausgewählter Vertreter der Nup107-Familie. Nup107 aus *U. maydis* ist am nächsten verwandt zu Nup107 aus *S. pombe*. Folgende Proteine wurden benutzt: *Rattus norvegicus* Nup107: NP_446282, *Mus musculus* AW541137: AAH04655, *Homo sapiens* Nup107: P57740, *Schizosaccharomyces pombe* Nup107: CAB46674, *Ustilago maydis* Nup107: unveröffentlicht, *Saccharomyces cerevisiae* Nup84p: NP_010167, *Caenorhabditis elegans* Npp5: CAA913161. Bootstrap-Werte sind an den Verzweigungspunkten angegeben. Balken: 0,2 Austausch pro Aminosäure.

B: Während der Interphase war der Zellkern in der Mitte der Mutterzelle lokalisiert (B1, DAPI-Färbung). ER-CFP färbt die Kernhülle und kortikal lokalisiertes Endoplasmatisches Retikulum (B2). Nup107-YFP färbt Punkte in der Kernhülle, höchstwahrscheinlich die Kernporen (B3). Für diese Aufnahmen wurde ein Bilderstapel verschiedener Fokus-Ebenen aufgenommen, durch Dekonvolution von Streulicht bereinigt und der mittlere Längsschnitt durch die Zelle für die Darstellung ausgewählt. Überlagerung von DNA (hellblau), ER (rot) und Nup107 (grün) in B4. Balken: 2 μm .

C: Die Abbildung zeigt Ansichten der 3D-Rekonstruktion eines Z-Achsen-verschobenen Bildstapels von FB2NupY aus 5 verschiedenen Blickwinkeln. Nup107-YFP färbt vermutlich die Kernporen, die in die kugelförmige Kernhülle integriert sind. Balken: 2 μm .

D: Kolokalisation von CFP-Tub1 (rot) und Nup107-YFP (grün) während des Zellzyklus von *U. maydis*. Während der Interphase färbte Nup107-YFP die Kernhülle in der Mitte der Mutterzelle (D1). Vor der Mitose wurde der Zellkern in die Tochterzelle gezogen. Dabei wurde durch Dynein-abhängige Zugkräfte die Kernhülle verformt (D2). Während der Mitose war keine Kernhülle vorhanden, Nup107 wurde an die Chromosomen rekrutiert (D3) und verblieb dort bis während der Spindelverlängerung in der Anaphase eine neue Kernhülle um die Tochterkerne gebildet wurde (D4). In septierten Zellen lokalisierte Nup107-YFP bereits wieder punktförmig in der Kernhülle. Balken: 3 μm .

E: Während der Pro- und Metaphase lokalisierte Nup107-YFP an die Chromosomen. In Stamm FB2NupYCT wurde CFP-Tub1 (rot in E1-E5) in lebenden Zellen mit Nup107-YFP (grün in E1-E3) und in fixierten Zellen mit DAPI-gefärbten Chromosomen (grün in E4, E5) kolokalisiert. Balken: 1 μm .

führen. Gemäß der erwarteten Lokalisation in den Kernporen, färbte Nup107-YFP zahlreiche Punkte (Abb. 25B3, 25C) um den Zellkern (DAPI in Abb. 25B1), die mit der von ER-CFP-

gefärbten Kernhülle kolokalisierten (Abb. 25B2). In verschiedenen Zellzyklus-Stadien wurde Nup107-YFP dort detektiert, wo sich der Zellkern befindet (Abb. 25D, vergleiche mit Abb. 3A). Dabei wurde eine Verformung der Kernhülle in Zellen mit mittelgroßer Knospe beobachtet, in denen höchstwahrscheinlich gerade der Transport des Kerns zur Tochterzelle erfolgt (Abb. 25D2), das spricht für ein Ziehen an der Hülle in Richtung des polaren MTOCs im Knospenhals. Ein minus-gerichteter Motor ist also wahrscheinlich involviert, was auch die Phänotypen der Dynein-Mutanten nahelegen (Abb. 3B). Während der Mitose konnte kein punktförmiger Nup107-YFP-Ring um die Spindel detektiert werden. Stattdessen wurde ein schwaches, aber spezifisches, diffuses Signal um die Mitose-Spindel detektiert (Abb. 25D3, 25E1-3). Diese Lokalisation ähnelt der von mitotischen Chromosomen (Abb. 25E4, E5). Eine Kolokalisation mit DAPI war allerdings nicht möglich, da das mitotische Nup107-YFP-Signal während des Fixierens der Zellen nicht erhalten blieb. Trotzdem bindet Nup107-YFP wahrscheinlich während der Mitose an die Chromosomen, da in Säuger-Zellen für den Kernporen-Subkomplex, der Nup107 enthält, eine Lokalisation an den Kinetochoren gezeigt werden konnte (Belgareh *et al.*, 2001).

2.4.3 Dynein ist für den Kernhüllenabbau vor der Mitose wichtig

Um den Einfluss von Dynein auf den Abbau der Kernhülle in *U. maydis* einschätzen zu können, wurde die Kernhülle mit beiden Markerproteinen während des Zellzyklus beobachtet.

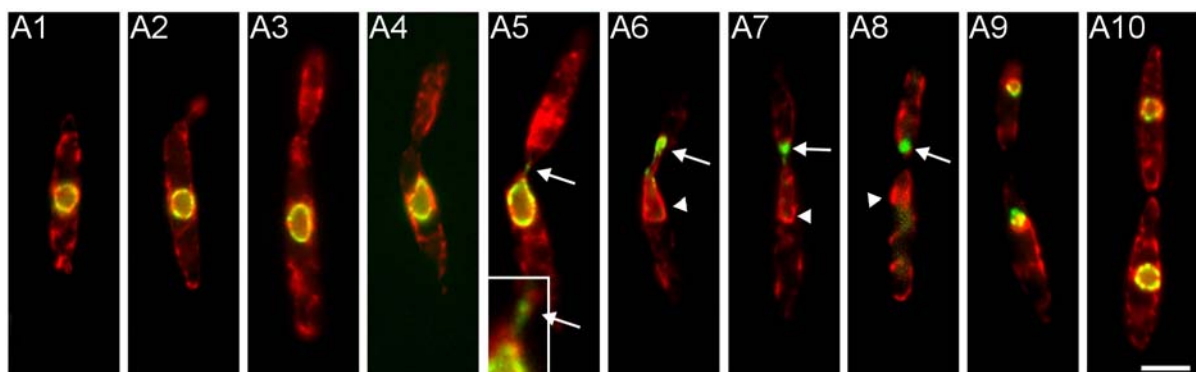


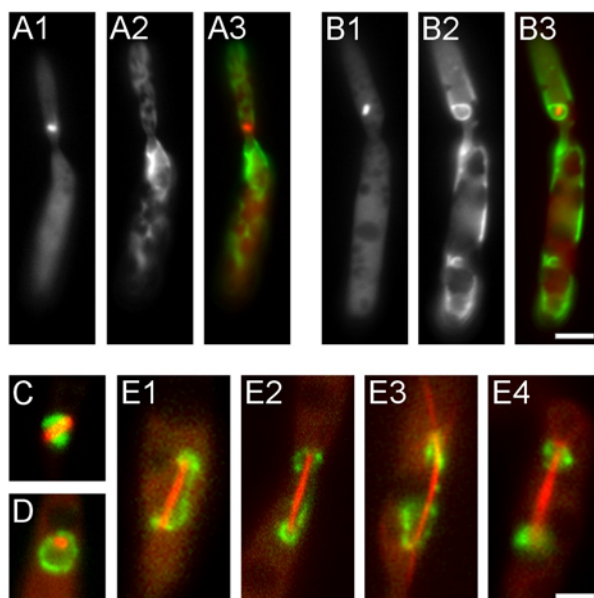
Abbildung 26: Die Kernhülle während des Zellzyklus von *U. maydis*.

Während der Interphase wurde mit ER-CFP (rot) und Nup107 (grün) die Kernhülle gefärbt (A1-4, A10, Überlagerung wird gelb). Kurz vor der Mitose wurde der Kern in die Tochterzelle gezogen. Dabei verformt sich die Kernhülle (A4, A5). Während der Passage des Knospenhalses begann Nup107 sich von der Kernhülle zu lösen (Pfeile in A5, Einsatz zeigte die 3-fache Vergrößerung des Knospenbereichs). Die Kernhülle verblieb in der Mutterzelle (Pfeilköpfe in A6-A8) während Nup107-YFP mit der DNA in die Tochterzelle wanderte (Pfeile in A5-A8). Während der Spindelverlängerung in der Anaphase wurden bereits neue Kernhüllen gebildet, die Nup107-YFP enthielten (A9, wegen der schnellen Spindelbewegung und zeitversetzter Aufnahme kolokalisieren beide Signale nicht vollständig). Balken: 5 µm.

ER-CFP und Nup107-YFP kolokalisierten während der gesamten Interphase (Abb. 26A1-5). Die Verformungen der Kernhülle, die wahrscheinlich während des prämitotischen Kerntransports auftreten, konnten mit beiden Markern detektiert werden (Abb. 26A4-5). Am Knospenhals begann Nup107-YFP von der Kernhülle zu dissoziieren und vermutlich zusammen mit der DNA in die Tochterzelle zu wandern (Pfeile in Abb. 26A5-A9). Die ER-CFP-enthaltenden Membranen verblieben scheinbar in der Mutterzelle (Pfeilköpfe in Abb. 26A6-A8). Die Kernhülle bildete sich schon während der Anaphase neu. Beide Marker, ER-CFP und Nup107-YFP, konnten bereits während der Spindelverlängerung um die kondensierten Tochterkerne detektiert werden (Abb. 26A9).

Der Kernhüllenabbau und die Nup107-Umlagerung sind Mikrotubuli-abhängig. Bei Behandlung von *U. maydis*-Zellen mit 4 μ M Benomyl konnten diese keine Mitose durchführen und arretierten mit kondensiertem Chromatin (nicht gezeigt). Um diese Zellkerne konnten meistens Kernhüllen gefunden werden (Abb. 27B), die Nup107-YFP enthielten (Abb. 27D). Das bedeutet, dass die Kondensation der Chromosomen, die in Säuger-Zellen erst bei Öffnung der Kernhülle erfolgt (Beaudouin *et al.*, 2002), in *U. maydis* nicht den zuvorigen Abbau der Kernhülle erfordert, obschon in unbehandelten Zellen die Umlagerung von Nup107 erfolgte, bevor die Chromosomen vollständig kondensiert waren. Die arretierten

Abbildung 27: Unter Einfluß von Benomyl erfolgt kein Kernhüllenabbau.



A: In FB1ERYCT-Zellen erfolgte die Mitose in der Tochterzelle. Dabei war die Spindel (A1, CFP-Tub1; rot in A3) nicht von einer Kernhülle umgeben (A2, ER-YFP; grün in A3).

B: Nach Behandlung von FB1ERYCT mit 4 μ M Benomyl arretierten die Zellen vor der Mitose. Nach Auswaschen der Droge wurden Spindeln ausgebildet. Diese befanden sich meist in der Mutterzelle, waren manchmal aber auch richtig positioniert. Trotzdem waren diese Spindeln fast immer mit einer Kernhülle umgeben (CFP-Tub1 in B1, rot in B3; ER-YFP in B2, grün in B3). Balken für A und B: 4 μ m.

C, D, E: In FB2NupYCT-Zellen fanden wir Nup107-YFP (grün) an den Chromosomen um die Mitose-Spindel (rot), eine Kernhülle war nicht vorhanden (C). Nach Benomyl-Behandlung verblieb Nup107-YFP in der Kernhülle (D). Auch nach Auswaschen von Benomyl wurde die Kernhülle nicht abgebaut oder Nup107-YFP an die Chromosomen rekrutiert. Stattdessen wurde die Hülle scheinbar während der Spindelverlängerung zerrissen (E1-3) und direkt für den Bau der neuen Hülle verwendet (E4). Balken: 1 μ m.

Zellen wurden durch Inkubation in frischem Medium aus der Blockade befreit und begannen innerhalb weniger Minuten eine Mitose-Spindel auszubilden (Abb. 27E), allerdings ohne vorher die Kernhülle abzubauen oder Nup107 an die DNA zu rekrutieren. Vielmehr schien die Kernhülle während der Spindelverlängerung durchstoßen oder auseinandergerissen zu werden (Abb. 27E). Aus den Überresten der Hülle wurden dann sehr schnell neue Kernhüllen gebildet (Abb. 27E4).

Das Fehlen eines funktionsfähigen Dynein-Komplexes führte ebenfalls zu Defekten beim Kernhüllenabbau. In FB1rDyn2-Zellen, die sowohl CFP-Tub1 als auch ER-YFP exprimierten, waren ähnlich wie in den Benomyl-behandelten Zellen, Prophase- und Metaphase-Spindeln von einer Kernhülle umgeben (Abb. 28A, B). In der temperatursensitiven Dyneinmutante FB2DyntsNupYCT konnte bei restriktiver Temperatur auch Nup107-YFP kreisförmig um Pro- und Metaphase-Spindeln gefunden werden (Abb. 28C, D4-6). Viele dieser Hüllen waren jedoch nicht mehr durchgängig, sondern von der Spindel durchbrochen (Abb. 28C, D3-5). Zusammenfassend scheint also sowohl die Umlagerung von Nup107-YFP als auch der Abbau der Kernhülle von Mikrotubuli und dem Mikrotubuli-Motor Dynein abhängig zu sein.

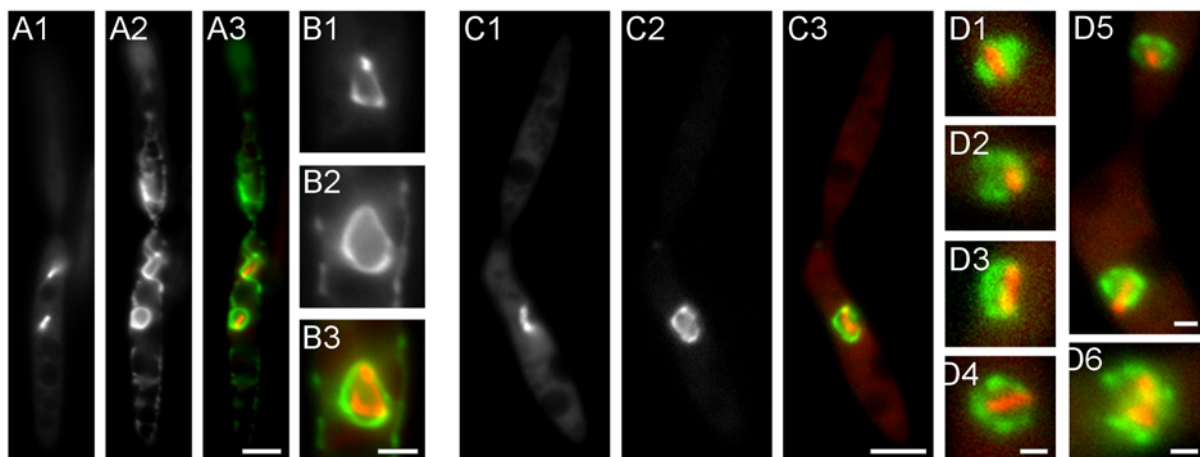


Abbildung 28: In Dyneinmutanten ist der Kernhüllenabbau gestört.

A, B: In FB1rDyn2ERYCT-Zellen waren nach 19h Wachstum in CM-A die meisten Mitose-Spindeln (CFP-Tub1 in A1, B1) mit Kernhüllen (ER-YFP in A2, B2) umgeben, wie die Falschfarben-Überlagerung deutlich zeigt (A3, B3, CFP-Tub1 in rot, ER-YFP in grün). Balken für A: 4 μ m, für B: 2 μ m.

C: In der temperatursensitiven Mutante FB2DyntsNupYCT konnte nach 8h Wachstum bei restriktiver Temperatur (30°C) auch eine mit Nup107-YFP gefärbte Kernhülle (C2, grün in C3) um Spindel-Mikrotubuli (C1, rot in C3) gefunden werden. Die Nup107-YFP-Umlagerung an die DNA hatte also nicht stattgefunden. Balken: 4 μ m.

D: Überlagerungen von Nup107-YFP (grün) und CFP-Tub1 (rot) in FB2DyntsNupYCT-Zellen bei 30°C zeigten Spindeln, die mit einem diffusen Nup107-YFP-Signal umgeben waren, was der Lokalisation im Wildtyp ähnelte (D1, vergleiche mit Abb. 25E). Allerdings kamen sehr viele Spindeln vor, die noch von einer Nup107-YFP-enthaltenden Hülle umgeben waren (D4-D6). Diese Hülle war oft nicht durchgängig und von der Spindel durchbrochen (D3, D4, D5 unten). Alle Balken: 1 μ m.

2.4.4 Dynein ist essentiell für die Verlängerung der Spindel während der späten Anaphase

Die Mitose wird in *U. maydis* normalerweise in der Tochterzelle in der Nähe des Knospenhalses initiiert. In den beiden konditionellen Mutanten FB1rDyn1 und FB1rDyn2 war der prämitotische Kerntransport unter restriktiven Bedingungen gestört, sodass Mitose-Spindeln zumeist in der Mutterzelle gebildet wurden (Abb. 28A, 28C). Auffälligerweise konnten keine langen Anaphase-Spindeln in diesen Mutanten gefunden werden, was nahelegt, dass für die Spindelverlängerung ebenfalls der Dynein-Komplex nötig ist. Ob dieser Defekt eine Folge der Fehlpositionierung der Spindel ist, wurde an Zellen untersucht, in denen die Mitose im Beisein von Dynein ebenfalls in der Mutterzelle initiiert wird. Dafür wurden Wildtyp-Zellen, die GFP-markierte Mikrotubuli exprimierten, mit 4 μ M Benomyl behandelt und so direkt vor der Mitose mit kondensiertem Chromatin in der Mutterzelle arretiert (nicht gezeigt). Wenige Minuten nachdem diese Zellen in frisches Medium überführt wurden, konnte in der Mutterzelle eine Mitose-Spindel beobachtet werden (Abb. 29A1), die dann oft erst während der späten Anaphase in die Tochterzelle gezogen wurde (Abb. 29A4). Eine Verteilung der Tochterkerne auf Mutter- und Tochterzelle erfolgte also auch ohne den prämitotischen Kerntransport zum Knospenhals. In den Dyneinmutanten wurden dagegen Anhäufungen von dicht nebeneinanderliegenden Kernen beobachtet (DAPI in Abb. 30A2, 30B1), die jeweils von einer eigenen Kernhülle umgeben waren (ER-CFP in Abb. 30A3, 30B2). Die Mitose war also abgeschlossen, ohne dass es zu einer räumlichen Verteilung der Tochterkerne gekommen war. Dynein scheint also auch für die Kernbewegung während der Anaphase essentiell zu sein.

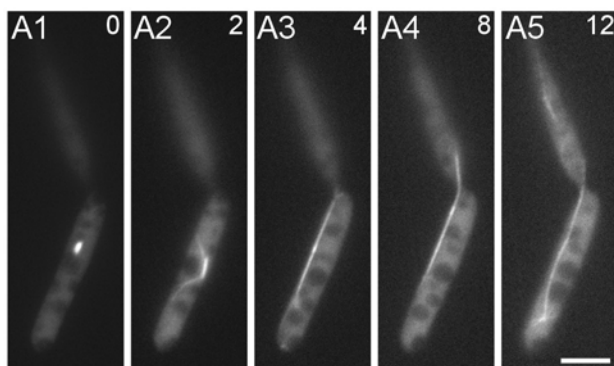


Abbildung 29: Mitose nach Benomyl-Arrest.

FB1GT-Zellen wurden für 3h mit 4 μ M Benomyl behandelt und arretierten mit kondensiertem Chromatin in der Mitte der Mutterzelle. Wenige Minuten nach Auswaschen der Droge wurde in der Mutterzelle eine Mitose initiiert (A1). Auch die Metaphase (A2) und die Spindelverlängerung während der Anaphase (A3) konnte noch in der Mutterzelle erfolgen. Während der Spindelverlängerung wurde diese jedoch durch den Knospenhals manövriert (A4, A5), so dass es zu einer normalen Verteilung der Zellkerne kam. Zeitabstände sind in Minuten in der rechten oberen Ecke angegeben. Balken: 5 μ m.

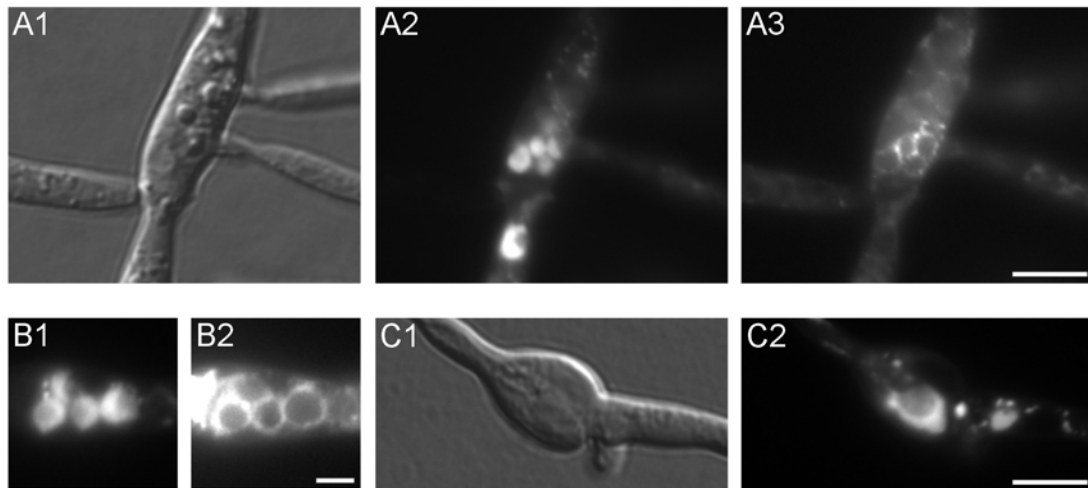


Abbildung 30: Anhäufungen von Zellkernen in FB1rDyn2-Zellen.

A, B: Nach 26h Wachstum unter restriktiven Bedingungen traten in FB1rDyn2ERYCT auffällige morphologische Defekte auf (A1). Zellen verloren ihre Polarität und waren angefüllt mit zahlreichen Zellkernen (A2, B2, DAPI-Färbung). Die dicht nebeneinander liegenden Zellkerne besaßen jeder eine eigene Kernhülle. Die Mitose wurde also höchstwahrscheinlich abgeschlossen, ohne dass es zu einer räumlichen Trennung der Kerne kam (A3, B2). Balken für A: 5 μ m, für B: 2 μ m.

C: Neben den Zellen mit Kernanhäufungen kamen auch Zellen vor, die einen oder wenige sehr große Zellkerne (C2) enthielten, deren DAPI-Intensität für einen vielfachen Chromosomensatz spricht. Balken: 5 μ m.

2.4.5 Dynein ist für die Spindelpolpertrennung wichtig

In Zellen mit angehäufteten Kernen müssen mehrere Mitosen bis zur Verlängerung während der Anaphase auch unter Dynein-Mangel noch erfolgreich durchgeführt worden sein. In einem Teil der Zellen von FB1rDyn2 wurden jedoch einzelne Kerne gefunden, die stark vergrößert waren (Abb. 30C2). Mittels quantitativer DAPI-Messung konnte bestätigt werden, dass diese ein Vielfaches des normalen DNA-Gehaltes in ihrem Zellkern enthalten (nicht gezeigt). Zudem wurden an vielen Zellkernen mehr als ein Spindelpolkörper gefunden (Abb. 31B2-3, 32B). Beispielsweise zeigt der Kern in Abbildung 32B fünf Spindelpolkörper in einer Fokusebene. Da die Färbung von Tub2-GFP sehr schwach war und schnell bleichte, gelang die Korrelation von DAPI-Intensität und Anzahl der Spindelpolkörper bislang nicht. Trotzdem liegt die Vermutung nahe, dass ein Kern mit mehreren Spindelpolkörpern auch einen vielfachen Chromosomensatz besitzt. Die Vervielfachung von DNA und Spindelpolkörpern in Dynein-defizienten Zellen legte den Schluss nahe, dass Dynein auch während früher Mitose-Stadien wichtige Funktionen ausübt und passt zu der beobachteten Lokalisation von GFP-Dyn1 in der Mitose-Spindel.

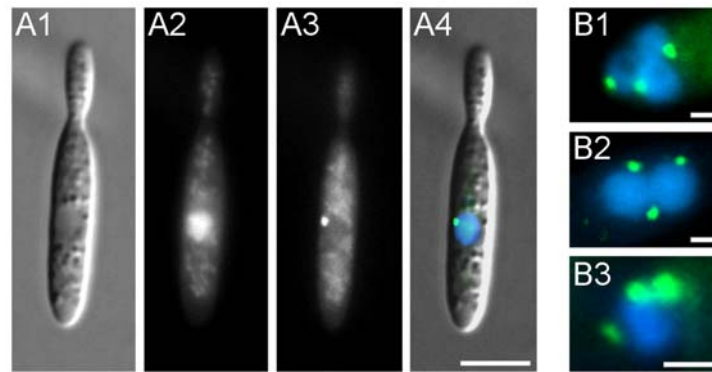


Abbildung 31: Zellkerne und Spindelpolkörper in FB1rDyn2.

A: Unter permissiven Bedingungen zeigte FB1rDyn2T2G eine normale Kernverteilung. Der Zellkern war während der Interphase in der Mitte der Mutterzelle lokalisiert (A2, Höchst-Färbung). Ein Spindelpolkörper (A3, Tub2-GFP) war mit dem Kern verbunden (Überlagerung von Tub2 (grün), DNA (blau) und dem DIC-Bild (A1) in A4). Balken: 5 μ m.

B: Nach Wachstum in CM-G zeigt FB1rDyn2T2G einen Kernverteilungsdefekt. Mehrere Kerne akkumulierten in der Mutterzelle und lagen oft ganz nah beieinander (B1, B2). Diese Kerne enthielten entweder jeweils einen Spindelpolkörper (B1), was dafür spricht, dass auch jeder Kern einen Chromosomensatz enthält, oder mehrere Spindelpolkörper (B2, B3) und damit wahrscheinlich auch mehrere Chromosomensätze. Überlagerung von DNA in blau (Höchst) und Tub2-GFP in grün. Balken: alle 1 μ m.

Nach Expression von GFP- α -Tubulin in den Mutantenstämmen FB1rDyn1, FB1rDyn2 und FB1Dyn2ts konnten unter restriktiven Bedingungen veränderte Spindelmorphologien beobachtet werden. Es traten sowohl V-förmige (Abb. 32C1, 32C2) als auch drei- und vieleckige Spindeln auf (Abb. 32C3, 32C4). Die Kollokalisierung von Spindel-Mikrotubuli und Spindelpolkörpern zeigte deutlich, dass die veränderte Spindelmorphologie durch die Nukleationsaktivität mehrerer Spindelpolkörper verursacht wurde (Abb. 32E). Ein häufig vorherrschender Typ war die V-förmige Spindel, an deren Basis ein starkes Tub2-GFP-Signal gesehen wurde (Abb. 32D1-2, 32D5-6). Die quantitative Analyse der Tub2-GFP-Intensitäten ergab für die Scheitelpunkte 193 ± 52 % der Intensität der äußeren Spindelpolkörper ($n=15$), wobei die mittlere Intensität der beiden äußeren Spindelpolkörper jeweils auf $100\% \pm 11$ % ($n=16$ V-Spindeln) gesetzt wurde. Die Spindelpolkörper normaler balkenförmiger Spindeln (Abb. 32A) des selben Stammes nach Wachstum in CM-A wurden mit $100 \pm 8,6$ % ($n=15$) bestimmt. Es traten auch Spindeln mit drei Polen auf, die alle eine ähnliche Intensität aufwiesen (Abb. 32D3). Diese Spindeln waren Dreiecke und höchstwahrscheinlich von drei Spindelpolkörper-Pärchen gebildet (Abb. 32C3, E3). Spindelpolkörper liegen also in FB1rDyn2T2G-Zellen oft als Pärchen vor, was auch Abb. 32B sehr deutlich zeigt. Es kam zudem vor, dass nicht alle Spindelpolkörper in die Bildung der Spindel involviert waren. Der obere, stark gefärbte Spindelpolkörper in Abb. 32E4 ist nicht mit der Dreiecks-Spindel

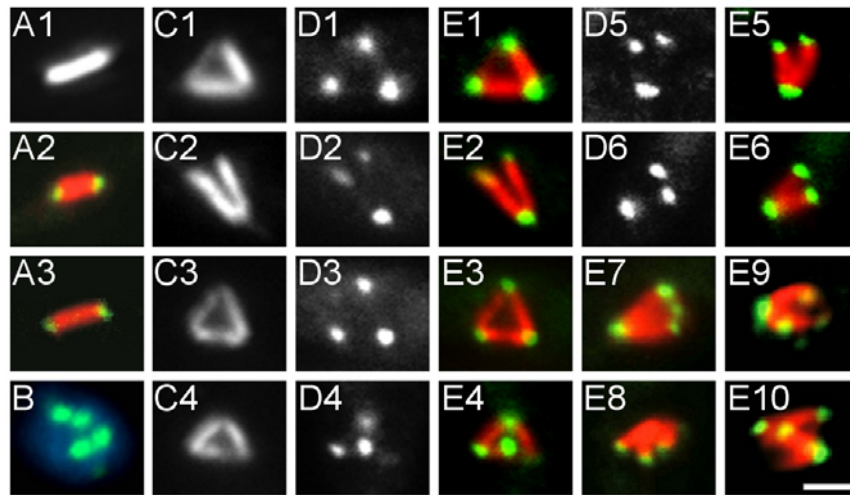


Abbildung 32: Spindelpolkörper in FB1rDyn2T2G.

A: Mitose-Spindeln in der konditionellen *dyn2*-Mutante unter permissiven Bedingungen. *In situ*-Lokalisation von α -Tubulin zeigte normale balken-förmige Spindeln (A1) in der Tochterzelle. Die Kokoloration mit Tub2-GFP färbte die Spindelpole (A2, A3).

B: Nach 21h Wachstum unter restriktiven Bedingungen konnten in der konditionellen Mutante große Zellkerne beobachtet werden, die mehrere Chromosomensätze und ebenfalls viele Spindelpolkörper enthielten.

C: Unter restriktiven Bedingungen konnten in FB1rDyn2T2G abnorme Spindelmorphologien beobachtet werden. Oft kamen V-förmige (C1, C2) oder dreieckige (C3, C4) Spindeln vor.

D: V-Spindeln enthielten ein Pärchen von Spindelpolkörpern am Scheitelpunkt und zwei einzelne Spindelpolkörper an den Schenkelspitzen (D1, D2, D5, D6). Dreiecks-Spindeln enthielten gleichhelle, vermutlich jeweils Spindelpolkörper-Pärchen an allen Schenkeln (D3, D4).

E: Überlagerung von α -Tubulin (rot) und Tub2-GFP (grün) zeigte, dass es auch Spindelpolkörper gab, die nicht Teil der Spindeln waren (E4). Neben V- und Dreiecksspindeln (E1-E6) traten auch kompliziertere Strukturen auf (E7-E10).

Balken für alle Bilder: 1 μ m.

verbunden. Bei entsprechend höherer Anzahl der Spindelpolkörper traten auch deutlich komplexere Spindelformen auf (Abb. 32E7-10).

Die aberranten Mitose-Spindeln waren zumeist in der Mutterzelle lokalisiert, was auf den defekten prämitotischen Kerntransport zurückzuführen ist. Diese Fehllokalisierung der Spindel ist jedoch nicht für die auftretenden Defekte bei der Trennung der Spindelpolkörper verantwortlich, da wie bereits oben beschrieben, nach Benomyl-Behandlung ebenfalls in der Mutterzelle normale Spindeln gebildet wurden (Abb. 29).

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Dynein in der Mitose-Spindel von *U. maydis* lokalisiert und verschiedene Funktionen während der mitotischen Phase ausübt. In Dyneinmutanten konnten Defekte beobachtet werden, die für eine Beteiligung von Dynein beim Abbau der Kernhülle, bei der Spindelpolkörper-trennung und der Verlängerung der Anaphase-Spindel sprechen.

3 Diskussion

3.1 Organisation des Mikrotubuli-Cytoskeletts in *U. maydis*

Für polares Wachstum und morphologische Veränderungen ist eine dynamische Umorganisation des Cytoskeletts und ein gerichteter Transport entlang von Aktinfilamenten und Mikrotubuli notwendig (Nabi, 1999). Mikrotubuli und Mikrotubuli-abhängige Transportvorgänge sind in *U. maydis* für das polare Knospenwachstum von essentieller Bedeutung (Wedlich-Söldner *et al.*, 2000; Steinberg *et al.*, 2001; Wedlich-Söldner *et al.*, 2002b). Das Mikrotubuli-Cytoskelett von *U. maydis* zeichnet sich durch lange, zelldurchspannende Mikrotubuli-Bündel aus (Steinberg *et al.*, 2001), deren Ausrichtung und Nukleationsstellen in dieser Arbeit durch die *in vivo*-Beobachtung des Mikrotubuli-Plus-Ende-Markers Peb1-YFP und von GFP-Mikrotubuli bestimmt werden konnte.

In *U. maydis*-Zellen ohne Knospe erfolgt die Nukleation an gleichmäßig in der Zelle verstreuten Nukleationszentren. Die spontane Nukleation einzelner Mikrotubuli im Cytoplasma von Säugetier-Zellen konnte gezeigt werden (Vorobjev *et al.*, 1997; Yvon und Wadsworth, 1997), ist also kein völlig neues Prinzip. Jedoch ist die Nukleation an zufällig

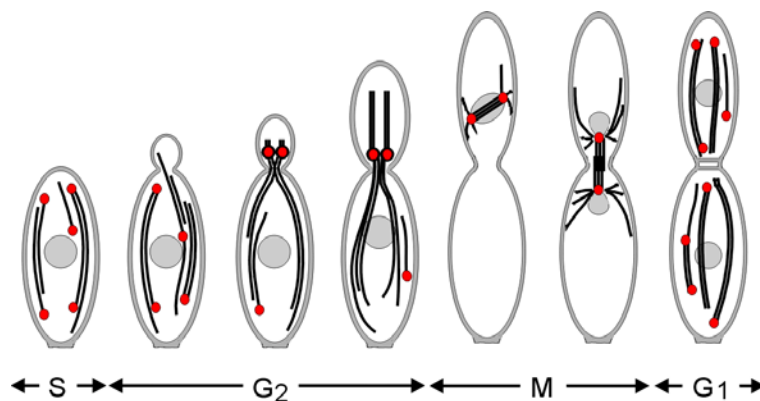


Abbildung 33: Organisation des Mikrotubuli-Cytoskeletts in haploiden Sporidien von *U. maydis*.

Das Mikrotubuli-Cytoskelett in *U. maydis* ist während des Zellzyklus verschiedenen Umorganisationen unterworfen. In nicht-knospenden Zellen (wahrscheinlich S-Phase) werden Mikrotubuli (schwarz) an zahlreichen Mikrotubuli-nukleierenden Zentren (rot) im Cytoplasma gebildet und dann zu bipolaren Bündeln zusammengelagert. Während früher Knospungsstadien bildet sich ein polares MTOC (rot) am Knospenhals, das ab einer Knospengröße von etwa 15% der Mutterzelllänge die Mikrotubuli-Nukleation im Cytoplasma dominiert und etwa 85% aller Mikrotubuli-Minus-Enden fokussiert. Während der mitotischen Phase nukleiert der Spindelpolkörper (rot) sowohl astrale als auch Spindel-Mikrotubuli. In septierten Zellen wird eine bipolare Mikrotubuli-Organisation wie in der S-Phase beobachtet. Abbildung modifiziert nach Steinberg, 2000.

verteilten Nukleationszentren, die gleichzeitig mehrere Mikrotubuli nukleieren bisher nicht beschrieben worden. Diese zufällig nukleierten Mikrotubuli werden in bipolare Bündel zusammengefasst (Abb. 33). Wahrscheinlich sind die Stellen der Mikrotubuli-Nukleation nicht für die Verankerung der Mikrotubuli-Minus-Enden zuständig. Direkt nach der Benomyl-Behandlung wurden noch einzelne Mikrotubuli beobachtet, die aber sehr schnell in 2-4 Mikrotubuli-Bündel zusammengeführt wurden. An den Mechanismen, die der Mikrotubuli-organisierenden Fähigkeit des Cytoplasmas in *U. maydis* zugrundeliegen, ist höchstwahrscheinlich Dynein beteiligt. Denn es wurde beobachtet, dass das Mikrotubuli-Cytoskelett in *U. maydis* ungewöhnlich beweglich ist und Biegen, Gleiten und Bewegungen entlang des Kortex zeigt (Steinberg *et al.*, 2001) und dass diese Beweglichkeit wie auch die Mikrotubuli-Bündelung in Dyneinmutanten stark beeinträchtigt war (Schulz, 2000).

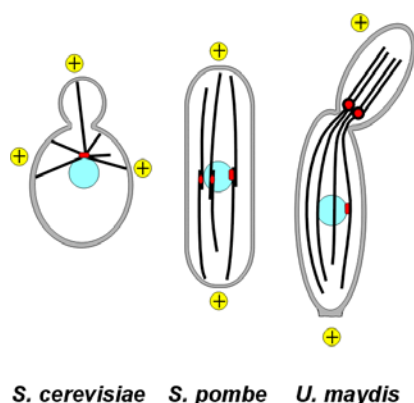
Eine Polarisation der Mikrotubuli konnte während früher Knospungsstadien beobachtet werden. Diese Umorganisation wird durch die bevorzugte Nukleation an einem polaren MTOC in der Nähe des Knospenhalses erreicht (Abb. 33). Dadurch werden Mikrotubuli-Minus-Enden am Knospenhals fokussiert und Mikrotubuli in Mutter- und Tochterzelle in unipolaren Bündeln organisiert. Frühere Studien haben gezeigt, dass ein Paar sphärischer Tubulin-Strukturen (PTS) vor der Knospenbildung an der zukünftigen Knospungsstelle gebildet wird (Steinberg *et al.*, 2001). Das legte die Vermutung nahe, dass die Bildung der PTS mit der polaren Mikrotubuli-Nukleation einhergeht. In dieser Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass erst ab Erreichen einer Knospengröße von 15% der Länge der Mutterzelle die Nukleation vom polaren MTOC dominiert. Scheinbar werden die PTS bereits gebildet, lange bevor sie Teil eines aktiven MTOCs werden. Wie die PTS entstehen, ist bisher völlig unklar. Ein potentieller Kandidat, der den Zusammenbau der PTS unterstützen könnte, ist Aktin, da für einen vergleichbaren Prozess, die Bildung des äquatorialen MTOCs während der Anaphase in *S. pombe*, Aktinfilamente essentiell sind (Heitz *et al.*, 2001). Zusätzlich könnte Dynein-abhängiger Transport eine Rolle spielen, da die PTS in Dyneinmutanten ihre polare Lokalisation verlieren (Straube *et al.*, 2001). Die Aufklärung der Zusammensetzung und der Mechanismen, die dem Zusammenbau und der Lokalisation des polaren MTOCs zugrundeliegen, ist eine große Herausforderung für die Zukunft und wird ein Verstehen der Mikrotubuli-Polarisation während der Knospenwachstums in *U. maydis* ermöglichen.

In den hier durchgeführten Experimenten wurde deutlich, dass vermutlich zwei verschiedenartige Mechanismen angewandt werden, um die Mikrotubuli-Nukleation während des Zellzyklus in *U. maydis* zu regulieren. Während des Knospenwachstums dominiert die Nukleation vom polaren MTOC, die Mikrotubuli-Nukleation von anderen Stellen im

Cytoplasma ist aber nicht vollständig reprimiert. Besonders deutlich wurde dies nach Behandlung mit Benomyl, da in knospenden Zellen Mikrotubuli-Nukleationen nicht nur an den PTS sondern gleichzeitig auch im Cytoplasma der Mutterzelle beobachtet werden konnten (eigene unveröffentlichte Beobachtung). Zudem war die Polarisierung des Cytoskeletts während der Knospungsstadien nicht vollständig und etwa 15% aller Mikrotubuli-Plus-Enden wuchsen zum polaren MTOC hin. Eine andere Strategie wird während der mitotischen Phase verfolgt. Hier wird offensichtlich jegliche Mikrotubuli-Nukleation außerhalb der Spindelpolkörper vollständig unterdrückt. In mitotischen Zellen konnte auch nach Benomyl-Behandlung niemals ein Spindelpolkörper-unabhängiger Mikrotubulus gefunden werden (eigene unveröffentlichte Beobachtung). Diese vollständige Repression cytoplasmatischer Mikrotubuli-Nukleationen wurde auch während der Mitose in Wirbeltieren beobachtet (Verde *et al.*, 1990). Wahrscheinlich wirkt ein konservierter Mechanismus bei der Zellzyklus-Kontrolle der Mikrotubuli-Nukleation in Pilzen und tierischen Zellen. Über diese Mechanismen ist allerdings sehr wenig bekannt. Lediglich wird klar, dass für die Aktivierung von MTOCs Phosphorylierungen eine entscheidende Rolle spielen (Centonze und Borisy, 1990; Masuda *et al.*, 1992).

Mikrotubuli sind relativ steife Strukturproteine, die normalerweise am Zellkern nukleiert werden und die Wachstumsregion durch Polymerisation am Plus-Ende erreichen (Desai und Mitchison, 1997). Dieses Prinzip der Mikrotubuli-Organisation ist in der Bäckerhefe *S. cerevisiae* zu finden (Abb. 34). Erreicht ein Mikrotubulus zufällig die Knospenspitze, wird er dort stabilisiert und ermöglicht die richtige Positionierung der Spindel (Korinek *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2000). Die Spalthefe *S. pombe* ist ein weiteres Beispiel für zentrale Mikrotubuli-Nukleation am Kern. In *S. pombe* ist der Spindelpolkörper zwar während der

Abbildung 34: Organisation des Mikrotubuli-Cytoskeletts in verschiedenen Hefen.



In *S. cerevisiae* kommen nur Spindelpolkörper-assoziierte Mikrotubuli vor, die durch einen Zufallsmechanismus in die Knospe einwandern und an der Knospenspitze stabilisiert werden. So wird die Ausrichtung der Mitose-Spindel und die Verteilung der Chromosomen auf Tochter- und Mutterzelle sichergestellt (Adames und Cooper, 2000). Die Spalthefe *S. pombe* besitzt wie *U. maydis* eine langgestreckte Zellform. Auch in *S. pombe* ist der Spindelpolkörper während der Interphase inaktiv. Die cytoplasmatischen Mikrotubuli werden an zahlreichen Kern-assoziierten MTOCs (rot) nukleiert und bleiben dort verankert, so dass sich auch in *S. pombe* die Mikrotubuli-Minus-Enden am Kern (hellblau) befinden und die Plus-Enden (gelb hervorgehobenes Plus-Zeichen) zum Zellkortex wachsen (Tran *et al.*, 2001). In *U. maydis* tritt dagegen ein polares MTOC entfernt vom Zellkern am Knospenhals auf, das für eine unipolare Mikrotubuli-Ausrichtung in Mutter- und Tochterzelle sorgt. Graphische Darstellung zur Verfügung gestellt von G. Steinberg.

Interphase inaktiv (Masuda *et al.*, 1992), aber Mikrotubuli-Nukleationen und deren Verankerung erfolgen an mehreren MTOCs an der Oberfläche des Zellkerns (Tran *et al.*, 2001; Abb. 34). Polymerisation am Plus-Ende erfolgt bis die Zellpole erreicht werden, was die Anlieferung von Wachstumskomponenten an die Zellpole sicherstellt (Hayles und Nurse, 2001). In *U. maydis* ist ein alternatives Prinzip verwirklicht, das Mikrotubuli das Erreichen der Wachstumszone ermöglicht. Während der Knospung erfolgt die Mikrotubuli-Nukleation in *U. maydis* entfernt vom Zellkern an einem polaren MTOC in der Nähe des Knospenhalses. Dadurch werden Mikrotubuli in Mutter- und Tochterzelle organisiert und der gerichtete Transport von notwendigen Faktoren zur Wachstumszone ermöglicht (Abb. 34). Die Ausbildung eines polaren MTOCs erlaubt eine flexible Organisation des Mikrotubuli-Cytoskeletts unabhängig von der Zellform und ist möglicherweise in *U. maydis* wegen der abgewinkelten Knospe (Winkel $34 \pm 17^\circ$, n=33 Zellen) und dem engen Knospenhals notwendig, die ein zufälliges Einwachsen von Mikrotubuli in die Knospe sehr unwahrscheinlich machen. Da eine abgewinkelte Knospe für Basidiomyceten durchaus typisch ist (G. Kost, persönliche Mitteilung), könnte das hier beschriebene Organisationsprinzip auch in anderen höheren Pilzen verwirklicht sein. Zudem könnte die Fähigkeit zu einer flexiblen Umorganisation des Mikrotubuli-Cytoskeletts während des dimorphen Lebenszyklus von *U. maydis* bedeutsam sein und beispielsweise die Ausbildung der Konjugationshyphse an der Stelle des stärksten Pheromon-Signals unterstützen.

3.2 Mikrotubuli-Ausrichtung und Dynein-abhängiger Transport in *U. maydis*

Die Fokussierung der Mikrotubuli-Minus-Enden am Knospenhals legt die Vermutung nahe, dass ein minus-gerichteter Motor für den Transport von Organellen und in der Mutterzelle synthetisierter Makromoleküle zum Knospenhals zuständig ist. Neben Dynein wurde bisher nur ein weiterer höchstwahrscheinlich minus-gerichteter Mikrotubuli-Motor in *U. maydis* identifiziert. Kin4, ein C-terminales Kinesin, ist während der gesamten Interphase jedoch im Zellkern lokalisiert (Schuberth, 2000) und deshalb wahrscheinlich nicht an cytoplasmatischen Transportvorgängen beteiligt.

Tatsächlich transportiert Dynein den Zellkern vor der Mitose zur Tochterzelle. Dabei verformte sich die Kernhülle. In Dyneinmutanten konnten solche Verformungen nicht beobachtet werden (Straube *et al.*, 2001; eigene Beobachtungen). Das spricht dafür, dass Dynein an einer Stelle der Kernhülle zieht. Ob diese Stelle mit dem Spindelpolkörper

übereinstimmt, wurde bisher nicht überprüft, ist aber eine wichtige Frage, die für die Aufklärung des Mechanismus des Kerntransports beantwortet werden muss. Allerdings übernimmt Dynein in *U. maydis* die Bewegungen des Endoplasmatischen Retikulums (Wedlich-Söldner *et al.*, 2002a), könnte also ebenso Spindelpolkörper-unabhängig die Kernhülle, die ja ein spezialisierter Abschnitt des Endoplasmatischen Retikulums ist, bewegen und dabei den Kern zur Tochterzelle ziehen.

Der Transport früher Endosomen erfolgt in *U. maydis* durch Dynein und Kin3, ein plusgerichtetes Kinesin. Die Bewegung dieser Endosomen ist für das polare Knospenwachstum und das bipolare Knospungsmuster wichtig und wird während des Zellzyklus durch eine Kräftebalance beider Motoren gesteuert (Wedlich-Söldner *et al.*, 2000; Wedlich-Söldner *et al.*, 2002b). In Zellen mit kleinen Knospen ist eine Anhäufung früher Endosomen am wachsenden Zellpol zu finden, was sich in diesem Stadium mit der Position des polaren MTOCs deckt. Wahrscheinlich wird diese Lokalisation durch Verschiebung der Kräftebalance zugunsten des Transports durch Dynein erreicht. Während in Zellen mit mittelgroßer Knospe die Kin3-Bewegung wieder überwiegt und den Netto-Transport zum distalen Zellpol verursacht.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die Fokussierung der Minus-Enden am Wachstumsort eine hohe Bedeutung für den Dynein-abhängigen Transport während des polaren Wachstums erwarten lässt. Die in *U. maydis* beobachtete Bewegung des Zellkerns und die Anlieferung früher Endosomen an den wachsenden Zellpol sind erste Beispiele, die diese Hypothese unterstützen. Bisher in *U. maydis* unerforschte Prozesse, wie beispielsweise die Vererbung der Mitochondrien und des Golgi-Apparats, sowie die Bewegung sekretorischer Vesikel, werden vermutlich ebenfalls einen Dynein-vermittelten Transport in die Tochterzelle erfordern. Die Mitose wird in der Tochterzelle, in der Nähe des Knospenhalses etwa an der Position, wo sich das polare MTOC befand, initiiert, was dadurch erklärt werden könnte, dass Dynein den Zellkern bis zu den Minus-Enden der Mikrotubuli transportiert.

3.3 Kernhüllenabbau in *U. maydis*

Die meisten pilzliche Modellsysteme durchlaufen eine geschlossene Mitose (Heath, 1980). Das bedeutet, dass die Kernhülle während der gesamten Mitose intakt bleibt. In *U. maydis* wird die Kernhülle vor der Mitose entfernt, was elektronenmikroskopische Aufnahmen

zeigten (O'Donnell und McLaughlin, 1984) und in dieser Arbeit unter Verwendung von zwei verschiedenen *in vivo*-Markern bestätigt werden konnte. Fluoreszierende ER-ständige Proteine färbten die Kernhülle und ein Netzwerk in der Interphase-Zelle. Während der mitotischen Phase blieb das ER-Netzwerk bestehen, jedoch konnten um Pro- und Metaphase-Spindeln eine Kernhülle mehr gefunden werden. Oft war stattdessen während der Mitose in der Mutterzelle ein starkes, häufig balkenförmiges ER-GFP-Signal zu erkennen (Wedlich-Söldner *et al.*, 2002a). Beobachtungen in dieser Arbeit legen die Vermutung nahe, dass es sich dabei um die in der Mutterzelle zurückgelassenen Membranen der Kernhülle handeln könnte. Der zweite Marker für die Kernhülle, das mit YFP-fusionierte Nucleoporin Nup107, kolokalisierte nur bis zum Erreichen des Knospenhalses vollständig mit den ER-CFP-

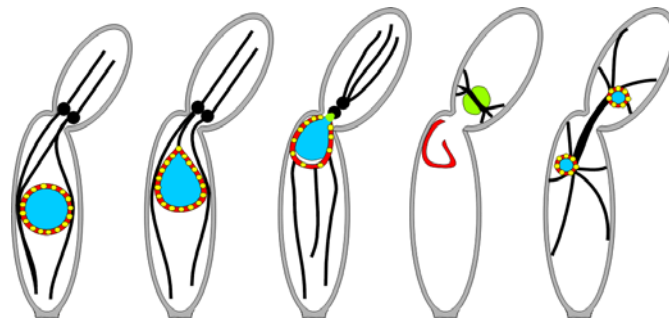


Abbildung 35: Nup107 und die Kernhülle in *U. maydis*.

Während der Interphase befindet sich der Zellkern in der Mitte der Mutterzelle und ist mit einer Kernhülle umgeben, die aus Membranen des ER (rot, das restliche ER-Netzwerk ist nicht gezeigt) und Kernporen besteht, welche Nup107 (gelb) enthalten. Während des Kerntransports zur Tochterzelle verformt sich die Kernhülle durch einwirkende Zugkräfte. Bei Passage des Knospenhalses wird Nup107 an die DNA (blau) umgelagert (Überlagerung in grün) und die Kernhülle in der Mutterzelle zurückgelassen. Während der Anaphase wird bereits eine neue Hülle um die kondensierten Tochterkerne gebildet.

gefärbten Membranen. Dann verblasste die Färbung von Nup107-YFP in der Kernhülle und stattdessen wurde ein Signal in der Tochterzelle detektiert, das nicht mit ER-CFP kolokalisierte. Das spricht für den Abbau der Kernporen und die Rekrutierung von Nup107-YFP an die Chromosomen, wie es in Säuger-Zellen gezeigt worden ist (Belgareh *et al.*, 2001). Auch nach der Umlagerung von Nup107-YFP konnten stark mit ER-CFP gefärbte Membranen in der Nähe des Knospenhalses auf der Seite der Mutterzelle gesehen werden, deren Form an die Kernhülle erinnerte (Abb. 35). Das spricht dafür, dass Teile der Kernhülle bei der Passage des Knospenhalses zurückgelassen werden. Da gleichzeitig der Abbau der Kernporen zu erfolgen scheint, kommt als Mechanismus für den Kernhüllenabbau ein einfaches Abstreifen der Hülle während die DNA durch den engen Knospenhals gezogen wird, kaum in Frage.

Die physikalische Behinderung des Kerntransports wäre allerdings ein denkbare Positionssignal, das den Auseinanderbau der Kernporen auslösen könnte. In Benomyl-behandelten Zellen, die keine Mikrotubuli mehr ausbildeten, sowie in verschiedenen Dyneinmutanten erfolgte die Initiation der Mitose in der Mutterzelle ohne den zuvorigen Abbau der Kernhülle. Das könnte darauf hinweisen, dass die Passage des Knospenhalses für den Kernhüllenabbau essentiell ist. Gleichzeitig könnten diese Defekte für eine direkte Beteiligung von Dynein- und Mikrotubuli-vermittelten Zugkräften beim Abbau der Kernhülle sprechen, wie es für Vertebraten-Zellen gezeigt werden konnte (Beaudouin *et al.*, 2002; Salina *et al.*, 2002). Allerdings sind in diesen Studien Einstülpungen der Kernhülle im Bereich der Centrosomen beschrieben worden und das Mikrotubuli- und Dynein-abhängige Ziehen der Lamina in diese Einstülpungen ist für das Aufreißen der Kernhülle verantwortlich gemacht worden (Beaudouin *et al.*, 2002; Salina *et al.*, 2002). Für solch einen Mechanismus konnten in *U. maydis* keine Hinweise gefunden werden.

Ob Mikrotubuli und Dynein trotzdem direkt beim Kernhüllenabbau in *U. maydis* involviert sind, wird eine der Fragen sein, die in nächster Zukunft geklärt werden sollen. In der Nullmutante von Kin4 (Schuberth, 2000), dem C-terminalen Kinesin aus *U. maydis*, wurden häufig Spindeln in der Nähe des Knospenhalses auf der Seite der Mutterzelle gefunden (eigene unveröffentlichte Beobachtungen) und in einer t-SNARE-Mutante (Wedlich-Söldner *et al.*, 2000) werden keine engen Knospenhäse mehr ausgebildet. Diese beiden Mutanten sollten sich daher für die weitere Analyse des Kernhüllenabbaus eignen und klären helfen, welche Bedeutung der Passage des Knospenhalses beim Abbau der Kernhülle in *U. maydis* zukommt.

Möglicherweise gibt der eben beschriebene Defekt der Kin4-Mutante einen Hinweis auf eine Rolle von Kin4 während der Kernbewegung im Bereich des Knospenhalses. Kin4 ist höchstwahrscheinlich wie Dynein ein minus-gerichteter Motor, während der Interphase lokalisiert es aber im Kern. Sobald am Knospenhals die Kernporen aufgelöst werden, könnte Kin4 aktiv werden und es wäre denkbar, dass Dynein durch Zugkräfte an der Kernhülle den Transport des Zellkerns bis zum Knospenhals übernimmt und die DNA dann von Kin4 aus den Resten der Kernhülle in die Tochterzelle weitertransportiert wird.

3.4 Funktionen von Dynein während der Mitose in *U. maydis*

Der Abbau der Kernhülle vor der Mitose erlaubt die Beteiligung von Dynein an Transportprozessen und der Organisation der Mikrotubuli innerhalb der Mitose-Spindel. Tatsächlich konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass Dynein in *U. maydis* entlang der Spindel-Mikrotubuli lokalisiert und verschiedene Funktionen während der Mitose erfüllt.

Für Dynein als einen minus-gerichteten Mikrotubuli-Motor, der Mikrotubuli miteinander vernetzen (Amos, 1989) und deren Stabilität modifizieren kann, sind während der Mitose verschiedene Funktionen denkbar bzw. bereits in anderen Organismen gezeigt worden (Abb. 36). Eine Lokalisation im Zellkortex (Abb. 36A; Busson *et al.*, 1998) könnte für die beobachteten Defekte bei der Spindelpolkkörpertrennung und der Verlängerung der Anaphase-Spindel zuständig sein. Defekte bei der Spindelverlängerung sind auch in einer Dyneinmutante von *Nectria haematococca* beobachtet worden und es konnte gezeigt werden, dass hauptsächlich Dynein-abhängige Zugkräfte an astralen Mikrotubuli für die Spindelverlängerung in *N. haematococca* verantwortlich sind (Inoue *et al.*, 1998). Defekte beim Aufbau einer bipolaren Mitose-Spindel konnten in Pilzen bisher nicht beobachtet werden (Li *et al.*, 1993; Inoue *et al.*, 1998), traten aber in Säugetier-Zellen auf (Vaisberg *et al.*, 1993). Möglicherweise reicht für diese Funktion die Lokalisation von Dynein außerhalb des Kerns nicht aus. GFP-Dyn1 konnte in dieser Arbeit bereits an punktförmigen Prophase-Spindeln nachgewiesen werden und könnte dort die Spindelpolkörper-Trennung unterstützen. Die Lokalisation an den Spindelpolen (Abb. 38B) wird üblicherweise mit einer Funktion beim Fokussieren durch Crosslinken und Zusammenschieben der Minus-Enden der Spindel-Mikrotubuli erklärt (Gaglio *et al.*, 1997; Heald *et al.*, 1997). Dafür konnten in Dyneinmutanten von *U. maydis* keine Hinweise gefunden werden. In V-förmigen und Dreiecks-Spindeln waren die Mikrotubuli zwar mit drei Polen verbunden, dort aber jeweils gut fokussiert.

In Vertebraten-Zellen ist Dynein an den Kinetochoren gefunden worden (Abb. 36C; Pfarr *et al.*, 1990; Steuer *et al.*, 1990) und sorgt dort für die Anheftung einer ausreichenden Anzahl von Mikrotubuli, für den polgerichteten Transport von Chromosomen (King *et al.*, 2000; Sharp *et al.*, 2000b) und Kinetochor-Komponenten und erfüllt dabei wichtige regulatorische Aufgaben (Howell *et al.*, 2001). Es ist nicht zweifelsfrei bekannt, wo sich in mitotischen *U. maydis*-Zellen die Kinetochore befinden. DAPI-Färbung der DNA zeigt eine zweigeteilte „Wolke“ um die Mitose-Spindel. Im balkenförmigen Bereich der Spindel-Mikrotubuli ist

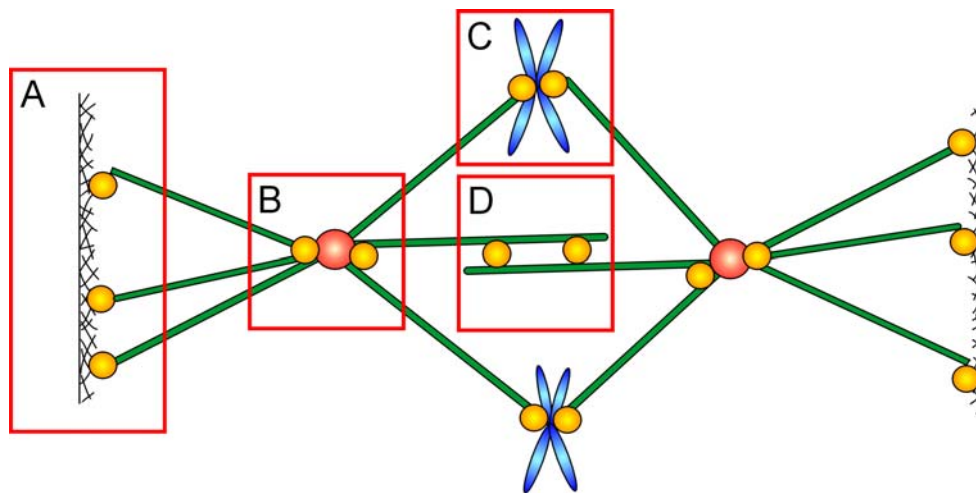


Abbildung 36: Mögliche Funktionen von Dynein in der Mitose-Spindel.

A: Am Kortex verankertes Dynein (gelb) könnte astrale Mikrotubuli (grün) binden und entweder durch Destabilisierung des Plus-Endes oder durch Wandern zum Minus-Ende Zugkräfte auf die Spindelpole (rot) ausüben. Das würde bei der Spindelpolkörper-Trennung helfen, die Positionierung der Spindel ermöglichen oder die Verlängerung der Spindel während der späten Anaphase unterstützen.

B: An den Spindelpolen (rot) könnte Dynein (gelb) Mikrotubuli-Minus-Enden (grün) fokussieren. Zudem könnte Dynein den Transport verschiedenster Komponenten zu den Spindelpolen vermitteln.

C: Dynein (gelb) an den Kinetochoren könnte die Bindung von Mikrotubuli (grün) sicherstellen und bei erfolgreicher Bindung Kinetochor-Proteine oder die Chromosomen (blau) entlang der Kinetochor-Mikrotubuli zu den Polen (rot) transportieren. Außerdem könnte durch die Destabilisierung gebundener Kinetochor-Mikrotubuli ebenfalls die polwärts-gerichtete Bewegung der Chromosomen erreicht werden.

D: Die Mittelzone der Spindel ist der Überlappungsbereich der Spindel-Mikrotubuli (grün). Hier könnte Dynein (gelb) für die Bündelung der Spindel-Mikrotubuli sorgen. Durch ein Dynein-getriebenes Aneinandergleiten der Mikrotubuli in der Mittelzone würde eine Verkürzung der Spindel erfolgen. Zudem würde eine destabilisierende Wirkung auf die Plus-Enden der Mikrotubuli eine Verkürzung der Spindel verursachen. Eine Stabilisierung würde im Gegenzug zur Verlängerung der Spindel-Mikrotubuli führen und damit Dyneins Wirkung am Kortex unterstützen.

keine DNA zu finden. Eine Anordnung in einer Metaphase-Platte wie es aus tierischen Zellen bekannt ist, konnte in *U. maydis* nicht beobachtet werden. Nup107 lokalisiert in Säuger-Zellen ebenfalls an den Kinetochoren (Belgareh *et al.*, 2001), in *U. maydis* verteilt sich Nup107-YFP während der Mitose über einen vergleichbaren Bereich wie die DNA. Das Erkennen von Einzelsignalen für alle 46 Kinetochore ist außerhalb des lichtmikroskopischen Auflösungsgrenze. Dynein konnte nicht im Bereich der DNA-Wolke detektiert werden, lokalisiert also vermutlich nicht an den Kinetochoren.

Die Lokalisation von GFP-Dyn1 in der Mittelzone der Anaphase-Spindel spricht wahrscheinlich auch nicht für eine Kinetochor-Lokalisation. Eine Erklärung dieser Lokalisation wird durch die beobachteten Mutantenphänotypen allerdings auch nicht ersichtlich. Möglicherweise haben andere mitotisch wirksame Motoren eine redundante Funktion in der Spindelmitte, sodass sich ein Fehlen von Dynein in der Spindel-Mitte nicht auswirkt. Ein potentieller Kandidat für diesen redundanten Motor wäre Kin4, das ebenfalls in

der Spindelmittelzone lokalisiert wurde (eigene unveröffentlichte Beobachtungen) und dessen Homologes, Kar3, in *S. cerevisiae* für die Vernetzung der Mikrotubuli und die Erhaltung der Spindellänge in der Metaphase sorgt (Hildebrandt & Hoyt, 2000). Es gibt Hinweise für eine Beteiligung von Dynein an der Bündelung und dem Aneinandergleiten von Mikrotubuli in Interphase-Zellen von *U. maydis* (Schulz, 2000), deshalb liegt die Vermutung nahe, dass Dynein auch während der Mitose an der Mikrotubuli-Bündelung mitwirkt.

Während der Anaphase befinden sich in der Mitte der Spindel die Plus-Enden der überlappenden Spindel-Mikrotubuli (Abb. 36D). Es wurde vermutet, dass Mikrotubuli-Polymerisationen und -Depolymerisationen für den Ablauf der Mitose von entscheidender Bedeutung sind (Inoue und Salmon, 1995). GFP-Dyn1 konnte wie andere pilzliche Dyneine an den Plus-Enden von Interphase-Mikrotubuli lokalisiert werden (Xiang *et al.*, 2000, eigene unveröffentlichte Beobachtungen). Zudem moduliert Dynein die Stabilität von Mikrotubuli in *U. maydis* und anderen Pilzen (Carminati und Stearns, 1997; Schulz, 2000; Han *et al.*, 2001; Yamamoto *et al.*, 2001) und könnte eine ähnliche Funktion auch während der Mitose erfüllen. Bei einem Ausfall von Dynein traten lange Interphase-Mikrotubuli auf, analog würden in Dyneinmutanten lange Metaphase-Spindeln erwartet werden. Das wurde nicht beobachtet, könnte aber wiederum durch Kin4 ausgeglichen werden, dessen destabilisierende Wirkung auf astrale Mikrotubuli in *U. maydis* gezeigt werden konnte (Schuberth, 2000). Zudem wäre denkbar, dass Dynein nicht direkt auf die Mikrotubuli-Dynamik wirkt, sondern notwendige Faktoren am Plus-Ende positioniert und während der Interphase destabilisierende Faktoren bindet, während innerhalb der Mitose-Spindel stabilisierende Faktoren unterstützt werden.

Die Überexpression der C-terminalen Domäne von Dyn2 zeigte einen Einfluss auf die Mikrotubuli-Dynamik in Interphase-Zellen von *U. maydis*. Dabei waren die „Rescue“- und die Katastrophenfrequenz in der gleichen Weise verändert wie in den konditionellen Dyneinmutanten. Das könnte durch das „Wegfangen“ von Mikrotubuli-destabilisierenden Faktoren oder die Verdrängung des Dynein-Komplexes von den Mikrotubuli-Plus-Enden erfolgen. Letztere Möglichkeit wird durch Hinweise auf eine Interaktion von C311 mit dem C-Terminus von β -Tubulin unterstützt (Proll, 2002), der am Plus-Ende der Mikrotubuli exponiert sein soll (Nogales *et al.*, 1999). Die Veränderungen der dynamischen Instabilität führten in FB1rC311GT-Zellen zu langen Interphase-Mikrotubuli, aber auch verlängerte astrale Mikrotubuli wurden beobachtet. Ein Einfluss auf die Morphologie oder Länge der Spindel konnte allerdings nicht beobachtet werden. Das lässt den Schluss zu, dass Dynein-vermittelte Veränderungen der Mikrotubuli-Dynamik innerhalb der Mitose-Spindel keine

wesentliche Rolle spielen oder dass spezifische Faktoren zusammen mit Dyn2 an den Spindel-Mikrotubuli wirken, die nicht von C311 gebunden werden. Genauere Aussagen über die Wirkungsweise von Dynein an den Mikrotubuli-Enden können erst gemacht werden, wenn die dabei involvierten Komponenten aufgedeckt worden sind.

3.5 Struktur und Mikrotubuli-Bindung des Dynein-Komplexes in *U. maydis*

Die Erfüllung vielfältiger zellulärer Aufgaben zeigt, dass die ungewöhnliche Organisation der schweren Dynein-Kette in *U. maydis* keine Einschränkung ihrer Funktion verursacht, obwohl die Mikrotubuli-Bindestelle und das ATP-Hydrolyse-Zentrum von zwei verschiedenen Polypeptiden, Dyn1 und Dyn2, bereitgestellt werden und die in dieser Arbeit durchgeführten Immunpräzipitationsexperimente und Dichtegradienten-Zentrifugationen eine sehr instabile Interaktion von Dyn1 und Dyn2 aufzeigten. Der Komplex dissoziierte während der Dichtegradienten-Zentrifugation und der Anteil interagierender Proteine während der Immunpräzipitation von Dyn1 und Dyn2 betrug schätzungsweise nur 1/20 der eingesetzten Proteine. Im Gegensatz dazu schien die Dimerisierung von Dyn1 und die Bindung assoziierter Polypeptide deutlich fester zu erfolgen, da Dyn1 als Teil eines großen Komplexes (etwa 21S) im Dichtegradienten migrierte. Die labile Verbindung von Dyn1 und Dyn2 überrascht, da nach dem vorherrschenden Dynein-Modell (Abb. 37) die Zugkräfte von der Kontaktstelle mit

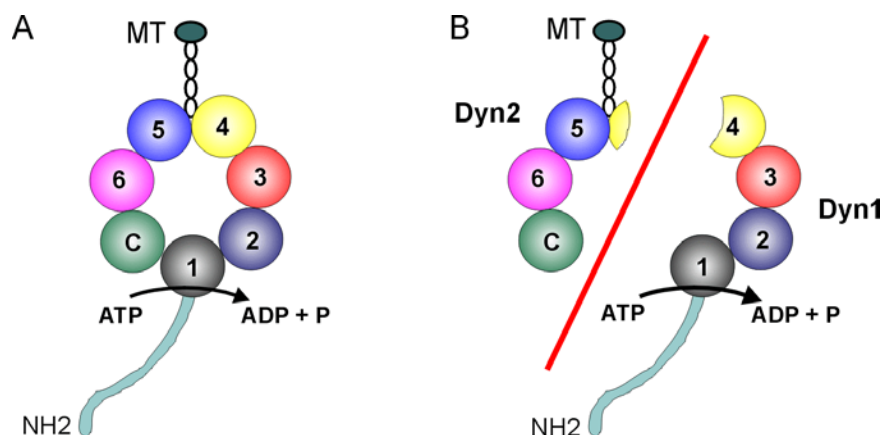


Abbildung 37: Modell der schweren Dyneinkette (modifiziert nach King, 2000).

A: Der Dynein-Motorkopf wird von den C-terminalen 2/3 der schweren Kette gebildet und enthält 6 globuläre AAA-Domänen (1-6). Im ersten AAA-Modul befindet sich die ATP-Hydrolyse-Stelle, zwischen dem 4. und 5. Modul der Mikrotubuli-Binde-„Stalk“ (MT). Das „Cargo“ wird vermutlich über assoziierte Ketten am elongierten N-terminalen Bereich gebunden.

B: In *U. maydis* ist die schwere Dynein-Kette innerhalb des 4. „AAA-Repeats“ getrennt, ATP-Hydrolyse und „Cargo“-Bindung erfolgen also an Dyn1, während die Mikrotubuli-Bindung durch Dyn2 erfolgt.

dem Mikrotubulus (an MT in Abb. 37) zum „Cargo“ (an NH₂ in Abb. 37) über Dyn2 und Dyn1 vermittelt werden müssen.

In elektronenmikroskopischen Aufnahmen konnte beobachtet werden, dass cytoplasmatisches Dynein Mikrotubuli vernetzen kann. Dabei wurden Mikrotubuli an beiden elongierten Strukturen des Dynein-Komplexes gebunden (Amos, 1989), am N-terminalen Schwanzbereich (NH₂ in Abb. 37) und an dem später als Mikrotubuli-Bindestelle identifizierten „Stalk“ (MT in Abb. 37; Gee *et al.*, 1997; Koonce, 1997; Samsó *et al.*, 1998). Entsprechend konnte in dieser Arbeit eine Mikrotubuli-Bindung des teilweise gereinigten Dyn1-Komplexes gezeigt werden die höchstwahrscheinlich über assoziierte Ketten im Schwanzbereich von Dyn1 vermittelt wurde. Diese Bindung konnte durch ATP- und Mg²⁺-Zugabe nicht gelöst werden, was für eine Interaktion als „Cargo“ spricht und möglicherweise für das Gleiten von Mikrotubuli entlang des Kortex oder der Oberfläche anderer Mikrotubuli notwendig ist. Natürlich könnte die Mikrotubuli-Bindung des Dyn1-Komplexes auch für eine bisher unentdeckte weitere Mikrotubuli-Bindestelle im Dynein-Motorkopf sprechen. Die Beobachtung, dass ein flagelläres Dynein mit nur einem Motorkopf ein prozessiver Motor ist (Sakakibara *et al.*, 1999), unterstützt die Hypothese, dass Dynein mehrere Mikrotubuli-Bindestellen enthält. Für cytoplasmatische Dyneine konnten Bindungsstellen am C-Terminus von α -Tubulin und β -Tubulin aufgezeigt werden (Paschal *et al.*, 1989). Zudem führt das Fehlen der C-terminalen Aminosäuren von Tubulinen zu einer um ein Vielfaches verminderten Prozessivität von Dynein *in vitro* (Wang und Sheetz, 2000). Vermutlich interagieren positiv geladene Aminosäuren von Dynein elektrostatisch mit den negativ geladenen C-terminalen Tubulin-Domänen (Paschal *et al.*, 1989). Die so vermittelten schwachen Wechselwirkungen müssen nicht unbedingt ATP-abhängig reguliert sein, sind aber für eine prozessive Bewegung scheinbar notwendig und könnten zur *in vitro*-Bindung von Dyn1 an Mikrotubuli geführt haben.

Der Dynein-Motorkopf muss aber auch eine ATP-abhängige Mikrotubuli-Bindestelle besitzen, die die Bewegung entlang der Mikrotubuli-Oberfläche vermittelt. Für den Dynein-Motorkopf aus Ratte wurde ein solches ATP-abhängiges Mikrotubuli-Bindevverhalten gezeigt (Koonce und Samsó, 1996) und als Kontaktstelle mit dem Mikrotubulus wurde der oben bereits erwähnte „Stalk“ identifiziert (Gee *et al.*, 1997; Koonce, 1997; Samsó *et al.*, 1998). Dyn2 enthält den homologen Bereich zu dieser Mikrotubuli-Bindestelle. Zwischen den Aminosäuren 82-175 und 296-391 werden mit Hilfe von Coils (Lupas *et al.*, 1991) die beiden erwarteten Coiled-coil-Bereiche vorhergesagt. Zudem enthält Dyn2 an der Mikrotubuli-

```

          *      200      *      220      *      240
Um : PAVQDAQASVSNIRKQHLTEVRSMGNPPLPVKNAMESVCIIILGHKIESWKTVAIIRRDDEIA
Dd : PAII EAQEA VSTIKKHLDEIKSLPKPPPTPVKLAMEAVCLMLGGKKLEWADIRKKIMEPNFIT
Rn : PAVIEAQNAVKSTIKKQHLVEVRSMANPPAAVKLALESICLLLGESTTDWKQIRSTIMRENFIP
Dm : PAVIDAQA AVKSI R KQQLVEVRTMANPPSVVKLALESICLLLGENATDWKSTIFAVIMRENFIN
Nc : PAVEEAKASVSNIRKQHLTEVRSMGNPPQGVRLAMDAVCTLLGHRINDWKAVQGIILRKDDFIA
An : PAVLEAQKSVSNIRKQHLTEVRSMGNPPAGVRLALEAVCTLLGHKVDSEKTIQGIIVRRDDEIA

          *      260      *      280      *      300      *
Um : SIVNEDTDRQMTIRQIREKMIROYLSKPGYDFATIDRASKACGPLAKWVIAQVRFSEILDRVGP
Dd : SIINYDTKKMMPKIREAITKGYLEDPGFDFYETVNRASKACGPLVKWATAQTYTSEILDRIKP
Rn : TIVN-FSAEEISDAIREKMKKNYMSNPSYNYEIVNRASLACGPMVKWAI AQIENYADMLKRVEP
Dm : SIVSNFGTENITDDVREKMKSKYLSNPDYNF EKVNRSASMACGPMVKWAI AQIEYADMLKRVEP
Nc : SILMFDNAKQMTKGLRNKMRNDFLSNPEFTFEKVNRSASKACGPLVQWVAQVNYFDILDRVGP
An : SIVNYDNEKQMTKNHRLKMQNEFFSKEDFTYERVNRASKACGPLVQWVEPQVNYSAIILDRVGP

```

Abbildung 38: Alignment der Mikrotubuli-Kontaktstellen verschiedener cytoplasmatischer Dyneine.

Die Mikrotubuli-Bindestelle der schweren Dyneinkette besteht aus zwei helikalen Coiled-coil-Bereichen und einer etwa 130 Aminosäuren großen globulären Domäne. Der Sequenzvergleich beginnt an dem konservierten Prolin (Aminosäure 185 in Dyn2 von *U. maydis*), das wahrscheinlich das Ende des ersten helikalen Bereichs darstellt und endet an Prolin 310, wo die zweite helikale Region beginnt. Die farblich hervorgehobenen Aminosäuren zeigten nach Mutation zu Alanin keine (rot) oder eine verminderte Bindung (orange) der *Dictyostelium*-DHC an Mikrotubuli bzw. ließen sich durch ATP-Zugabe nur schlecht ablösen (gelb; Koonce und Tikhonenko, 2000). Dyn2 aus *U. maydis* enthält alle konservierten Aminosäuren für die Mikrotubuli-Bindung. Die verwendeten Proteine sind aus: Um, *Ustilago maydis*; Dd, *Dictyostelium discoideum*; Rn, *Rattus norvegicus*; Dm, *Drosophila melanogaster*; Nc, *Neurospora crassa*; An, *Aspergillus nidulans*.

Kontaktstelle zwischen diesen helikalen Bereichen Aminosäuren, die für die Mikrotubuli-Bindung von *Dictyostelium*-Dynein als wichtig befunden worden sind (Abb. 38, Koonce und Tikhonenko, 2000). Trotzdem konnte im Mikrotubuli-Bindeassay keine effektive Mikrotubuli-Bindefähigkeit für Dyn2 gefunden werden. Dabei ist zu beachten, dass Dyn2 nach den Ergebnissen aus der Dichtegradienten-Zentrifugation höchstwahrscheinlich als Monomer im Proteinextrakt vorgelegen hat. Eine denkbare Erklärung für das Fehlen der Fähigkeit als Monomer an Mikrotubuli zu binden, ist ein Schutzmechanismus der Zelle. Da Dyn2 keine ATP-Bindestelle enthält, wäre ein Binden von monomerem Dyn2 an Mikrotubuli irreversibel oder zumindest nicht an eine ATP-Hydrolyse koppelbar. Das wäre sicherlich nicht vorteilhaft für die Zelle und damit ist ein Mechanismus vorstellbar, durch den eine Mikrotubuli-Bindung von monomer vorliegendem Dyn2 entweder durch eine veränderte Konformation oder durch die Interaktion mit einem anderen Protein verhindert wird.

3.6 Schlussfolgerungen und Ausblick

In dieser Arbeit konnte die Vermutung bestätigt werden, dass in *U. maydis* eine Polarisierung des Mikrotubuli-Cytoskeletts während des Knospenwachstums erfolgt. Dadurch liegt nahe, dass dem minus-gerichteten, Dynein-abhängigen Transport zum Knospenhals eine große Bedeutung für das polare Wachstum von *U. maydis* zukommt. Der Dynein-Komplex übernimmt in *U. maydis* eine Vielzahl zellulärer Aufgaben, die den Transport des Zellkerns,

früher Endosomen und des Endoplasmatischen Retikulums beinhalten (Straube *et al.*, 2001; Wedlich-Söldner *et al.*, 2002a; Wedlich-Söldner *et al.*, 2002b). Zudem ist Dynein an der Trennung der Spindelpolkörper und der Verlängerung der Anaphase-Spindel während der Mitose beteiligt. Nicht zuletzt moduliert Dynein das Mikrotubuli-Cytoskelett, unterstützt dessen Polarisierung während des Knospenwachstums, bündelt und bewegt Mikrotubuli und verändert deren Stabilität (Schulz, 2000; Straube *et al.*, 2001). Damit ist cytoplasmatisches Dynein in *U. maydis* ein vielseitiges Transportmolekül, was zudem weitreichende Veränderungen seiner „Transportwege“ verursacht.

Diese Arbeit wirft eine Vielzahl neuer Fragen auf. Eine zentrale Bedeutung für die Polarisierung des Mikrotubuli-Cytoskeletts haben die PTS, über deren Zusammensetzung und Entstehung fast nichts bekannt ist. Die Isolation spezifischer Komponenten des polaren MTOCs wäre ein entscheidender Schritt zur Erforschung dieser Struktur und wird möglicherweise generelle Prinzipien nicht-centrosomaler Mikrotubuli-organisierender Zentren aufdecken. Die Zellzyklus-Regulation der verschiedenen Nukleationsstellen in *U. maydis* könnte ebenfalls konservierte Mechanismen aufdecken, mit denen MTOCs aktiviert werden und die Mikrotubuli-Nukleation im Cytoplasma unterdrückt wird. *U. maydis* eignet sich für diese Untersuchungen als Modellsystem sehr gut, da der Zugriff auf die genomische Sequenz und die leichte genetische Manipulierbarkeit eine schnelle Isolation und Funktionsanalyse interessanter Gene ermöglichen.

Zwei zentrale Fragen, die während dieser Arbeit berührt, aber nicht beantwortet werden konnten, sind die nach der biologischen Ursache für die Kettentrennung der DHC in *U. maydis* und den strukturellen Voraussetzungen und regulatorischen Mechanismen, die die funktionelle Vielseitigkeit cytoplasmatischen Dyneins in *U. maydis* erlauben und steuern. Welchen Vorteil die Kettentrennung möglicherweise für *U. maydis* hat, kann mit weiteren Fusionskonstrukten oder der heterologen Expression vollständiger DHCs vielleicht geklärt werden. Gleichzeitig kann auch die Untersuchung der Expressionskontrolle von Dyn1 und Dyn2 interessante Ergebnisse liefern. Beide Proteine wurden mit vergleichbarem Proteinlevel exprimiert, aber ob und wie diese gleichmäßige Expression gesteuert wird, ist nicht bekannt. Für die Untersuchung der funktionellen Diversität von Dynein und dabei involvierter Faktoren ist die Herstellung weiterer Mutanten nötig, in denen nur eine spezifische oder eine Klasse von Dynein-Funktionen gestört ist.

Es wird eine große Herausforderung sein, die dynamischen Umstrukturierungen des Cytoskeletts vollständig zu verstehen und die damit verbundene räumliche und zeitliche Regulation von Dynein und seinen assoziierten Faktoren aufzudecken.

4 Material und Methoden

4.1 Material und Bezugsquellen

4.1.1 Medien, Lösungen, Enzyme und Kits

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien waren p. a. Qualität und wurden von den Firmen Sigma, Merck, Fluka, Riedel-de-Haën und Roth bezogen.

Standard-Puffer und Lösungen wurden nach Ausubel *et al.*, 1987 und Sambrooke *et al.*, 1989 hergestellt, Spezielle Puffer, Lösungen und Medien sind unter den jeweiligen Methoden aufgeführt.

Restriktionsenzyme wurden von New England Biolabs (NEB) bezogen, alle übrigen Enzyme von Roche mit den Ausnahmen *Taq*-DNA-Polymerase (Laborpräparation A. Brachmann und G. Weinzierl) und *Pfu*-DNA-Polymerase (Promega oder Qiagen).

Folgende Kits wurden standardmäßig verwendet: JetQuick PCR Purification Kit (Genomed) zur Aufreinigung von PCR-Produkten, JETquick General DNA Clean-Up Kit (Genomed) zur Aufreinigung von Plasmiden vor der Sequenzierung, TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen) zur Klonierung von PCR-Produkten, NEBlot Kit (New England Biolabs) zur radioaktiven Markierung von DNA-Fragmenten, DIG High Prime (Roche) zur Digoxigenin-Markierung von DNA-Fragmenten, BigDye Kit (ABI) zur fluoreszenzmarkierten Sequenzierung, Microspin S-200 und S-300 Säulen (Amersham Pharmacia Biotech) zur Aufreinigung von radioaktiv markierten DNA-Sonden. Weiteres verwendetes Material ist unter den jeweiligen Methoden beschrieben.

4.1.2 Antikörper

Tabelle II: verwendete primäre Antikörper

Antigen	Spezies	Herstellung/Vertrieb	verwendete Konzentration
HA	Maus	Sigma	1:20.000 (WB)
Myc	Maus	Sigma	1:2.000 (WB)
FLAG	Maus	Sigma	1:1.000 (WB)
Ro1	Kaninchen	M. Plamann	1:100 (IF), 1:1.000 (WB)
G9	Maus	T. Horio	1:5.000 (WB)
MPM-2	Maus	DAKO	1:100 (IF)
α -Tubulin	Maus	Oncogene	1:200 (IF), 1:5.000 (WB)
GFP	Maus	Roche	1:3.000 (WB)
GFP	Kaninchen	Clontech	1:200 (IF)
C311	Ratte	siehe Abschnitt 4.4.7	1:500 (WB)
N460	Kaninchen	siehe Abschnitt 4.4.7	-

WB, Western Blot; IF, Immunfluoreszenz

Tabelle III: verwendete sekundäre Antikörper

Antigen	gekoppelt mit	Spezies	Hersteller/Vertrieb
IgG aus Maus	Meerrettichperoxidase	Ziege	Promega
IgG aus Kaninchen	Meerrettichperoxidase	Ziege	Promega
IgG aus Ratte	Meerrettichperoxidase	Ziege	Zymed
IgG aus Maus	Cy3	Ziege	Jackson/Dianova
IgG aus Kaninchen	Cy2	Affe	Jackson/Dianova

4.1.3 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden von den Firmen Sigma ARK Scientific, Metabion und MWG synthetisiert, die Nukleotidsequenz ist jeweils vom 5'- in Richtung 3'-Ende angegeben (Tabelle IV).

Tabelle IV: Verwendete Oligonukleotide.

Name	Sequenz	Verwendungszweck
AS TUBG1	CTGGATCCAGTTGCGCTTGTGGAA	Klonierung von pSLB-crg-Tub2-hom
ER2	CATCGGCCGTTACAGCTCGTCGTGCTTGTACAGCTC GTCCAT	Klonierung von pER3 und pER4
ER4	CATCGGCCGTTACAGCTCGTCCTTGTACAGCTCGTC CAT	
ER5	AGACATGTTGCTCCCTGTGCCGCTGCTGCTCGGCCT GCTCGGCCTGGCCGCCCATGGTGAGCAAGGGCG AGG	
AB2	GCATTCTGATGAACGAGCCTC	Klonierung von pSLH-N1287 und pSLH-1312
ASDyn1	CGCCATGCATCTAACTACCGCTGCGATCATG	
ASDyn2	CGCCATGCATCTACGAGGCCGAACCTCGAC	
ASDyn3	TGACCATGGGTAGTGGGAGCGGAG	
ASDyn4	GAGGATCCATACTACGATGCACGC	Klonierung von C311
AS16	CATGATCATATGGGTAGTGGGAGCGGAGG	
AS02	AATTCGTCATGATCTTTTACCCATACGATG	Vervielfältigung des dreifachen HA-Epitops
AS04	CGAGGTCGACAGCGTAATCTGGAACG	
AS24	CTCGAGATTAATAGCGTAATCTGGAACG	
Dyn7	CGTTCCCGACACTGG	Klonierung von pSLH-Dyn1-4FLAG-hom
AS06	TCGCCCCGGTCCCAGCAGAACATGATGCT	
AB4	CTGCGCGTTTCTGTTCGG	Klonierung von pUCH-tef-3HA-Dyn2-hom
AS05	CATCGTCGACGTAGTCCACGTCG	
AS23	CGTCCATGGTGGACTTGAGACGCAG	Klonierung von pUCH-3HA-Dyn2-hom
AB12	GTTGGCCGTCAGTCTCGG	
AS33	TCGGTACCCAAGTCAATGCGCGAAGCCAGCGAGC	Einführen der Mutationen in C311
AS34	GCCTAGGTTGTTGCTGAACGACG	
AS35	CCCTAGGCGAGAAGAGCAGTCC	
AS36	GCTTCCGGGTCCCAGTTCTTGCCCTGGTTCCAGAC	
AS37	GCGGTGGGCGCCTGCCAGAAGCGGTAC	
AB17	CCAAATGGTGCATTTCGC	
IS1	GACAATGTTCCCGATCAG	
AS14	CGTGCAAGTAAGGCGTGCGG	
AS44	TCGACGCGTTACTTGATTTGTGCCTCACGG	
AS45	GCGAGCTCGGGAGCGGAGGCGCTC	
AS46	GTGACGCGTCTACGATGCACGCAAAGCG	
AS47	GCGTCGACCATCAGTCGCCTCGTCAC	
AS48	GAGACGCGTTAATCGCCGATGATGGTGCTC	
AS54	TGGTTGCCATATGGGTGAATCACGTACGGAG	Klonierung von pSLB-Peb1-YFP-hom
AS55	CGTACCATGGCGCCGAACATCTCATCTCGTCCG	
AS56	GTTCTGCATGCGCGTACGTGCCGAATG	
AS57	AGAATGAAGCTTCGCTCACTACCAACATC	
AS58	TTGGAAGCATATGTGGCTTACAAGCATTTCTG	Klonierung von pSLB-Nup107-YFP-hom
AS59	GCGATCCATGGCGCCCGATTCTACAGCCTTCTGAA AG	
AS60	ATCGTGCATGCACCATCGCATCTGATAAC	
AS61	GACGTGATCGAATTGAGCTG	
uni24	ACGACGTTGTAAAACGACGGCCAG	Sequenzierung von Inserts in BS(+) SK, pUC19, pSL1180, pNEB193 und pCR-Topo
rev 24	TTCACACAGGAAACAGCTATGACC	

4.1.4 Verwendete Plasmide und Plasmidkonstruktionen

Sämtliche Plasmide tragen eine Ampicillin-Resistenzkassette zur Selektion in *E. coli*. Alle Klonierungsschritte wurden durch Restriktionsanalyse überprüft, alle eingebrachten PCR-Amplifikate wurden sequenziert.

Tabelle V: Ausgangsplasmide

Plasmid	Kurzbeschreibung	Resistenz	Referenz
pUC19		-	Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985
pBS(+) _{SK}		-	Stratagene
pSP72		-	Promega
pCR-TOPO		-	Invitrogen
pNEB193		-	New England Biolabs
pSL1180		-	Pharmacia
pET15b			Novagen
pNEB-Ble(+)	<i>Phsp70-ble-TtrpC</i>	B	Brachmann, 2001
pNEB-Ble(-)	<i>Phsp70-ble-TtrpC</i>	B	Brachmann, 2001
pSL-Ble(+)	<i>Phsp70-ble-TtrpC</i>	B	Brachmann, 2001
pSL-Ble(-)	<i>Phsp70-ble-TtrpC</i>	B	Brachmann, 2001
pNEB-Cbx(+)	<i>Pip-ip^R-Tip</i>	C	Brachmann, 2001
pNEB-Cbx(-)	<i>Pip-ip^R-Tip</i>	C	Brachmann, 2001
pSL-Cbx(+)	<i>Pip-ip^R-Tip</i>	C	Brachmann, 2001
pSL-Cbx(-)	<i>Pip-ip^R-Tip</i>	C	Brachmann, 2001
pNEB-Nat(+)	<i>Pgap1-nat1-TcycI</i>	N	Brachmann, 2001
pNEB-Nat(-)	<i>Pgap1-nat1-TcycI</i>	N	Brachmann, 2001
pSL-Nat(+)	<i>Pgap1-nat1-TcycI</i>	N	Brachmann, 2001
pSL-Nat(-)	<i>Pgap1-nat1-TcycI</i>	N	Brachmann, 2001
pNEB-Hyg(+)	<i>Phsp70-hph-Thsp70</i>	H	Brachmann, 2001
pNEB-Hyg(-)	<i>Phsp70-hph-Thsp70</i>	H	Brachmann, 2001
pSL-Hyg(+)	<i>Phsp70-hph-Thsp70</i>	H	Brachmann, 2001
pSL-Hyg(-)	<i>Phsp70-hph-Thsp70</i>	H	Brachmann, 2001
pNEBUH	<i>Phsp70-hph-Thsp70, Uars</i>	H	Weinzierl, 2001
pGE25	<i>Psc-hph</i>	H	Weinzierl, 2001
pCU4	<i>Potef-sgfp-Tnos, cbx^R</i>	C	Brachmann, 2001
pMF29	<i>Ptef-his-prf1-myc</i>	H	Michael Feldbrügge, unveröffentlicht
pMPY-3xHA	<i>3HA</i>	-	C. Koch, pers. Mitteilung
pflag4°	<i>4FLAG</i>	-	Reichmann, pers. Mitteilung
p123	<i>Potef-egfp-Tnos, cbx^R</i>	C	Christian Aichinger, unveröffentlicht
p123-YFP	<i>Potef-yfp-Tnos, cbx^R</i>	C	Roland Wedlich-Söldner, unveröffentlicht
p194	<i>Pcrg</i>	C	Christian Aichinger, unveröffentlicht
pTZ-Dyn1-10,5	<i>Pdyn1-dyn1-Tdyn1</i>	-	Enard, 1998
pWE81	<i>hyg^R, Pdyn1-gfp-dyn1</i>	H	Enard, 1998
pWE83	<i>hyg^R, Pcrg-dyn1</i>	H	Enard, 1998
pDyn2-MunI	<i>Pdyn2-dyn2-Tdyn2</i>	-	Berner, 1999
pDyn2-NsiI	<i>Pdyn2-dyn2-Tdyn2</i>	-	Berner, 1999
pSLB-crg-Dyn2-hom	<i>ble^R, Pcrg-dyn2</i>	B	Berner, 1999
pSLH-Dyn2-Myc	<i>Pdyn2-dyn2-3myc, hyg^R</i>	H	Roland Wedlich-Söldner, unveröffentlicht
pSLH-Dyn2-GFP	<i>Pdyn2-dyn2-gfp, hyg^R</i>	H	Roland Wedlich-Söldner, unveröffentlicht
pSL-F1	<i>dyn1⁹¹³⁹⁻⁹⁵⁷⁶-dyn2⁴⁰⁻⁶⁸²</i>	-	Roland Wedlich-Söldner, unveröffentlicht

pGEH-Dyn1-2A	<i>Pdyn1-dyn1-dyn2</i>	H	Roland Wedlich-Söldner, unveröffentlicht
pTub2- <i>PstI</i>	<i>Ptub2-tub2-Ttub2</i>	-	Brill, 1998
potefGFP _{Tub1}	<i>Potef-egfp-tub1, cbx^R</i>	C	Steinberg <i>et al.</i> , 2001
potefCFP _{Tub1}	<i>Potef-cfp-tub1, hyg^R</i>	H	Wedlich-Söldner <i>et al.</i> , 2002b
pcrgTub2GFP	<i>Pcrg-tub2-egfp, cbx^R</i>	C	Brill, 1998
pER3-CFP	<i>Potef-cal^S-cfp-HDEL, cbx^R</i>	C	Lubica Adamikova, unveröffentlicht
pM765-MCS	<i>myoII⁻²²⁹⁵</i>	-	F. Jon Kull, pers. Mitteilung

ble-Gen aus *Streptoalloteichus hindustanus*; *trpC*-Terminator aus *Aspergillus nidulans*; *nat1*-Gen aus *Streptomyces noursei*; *gap1*-Promotor aus *U. maydis*; *cyc1*-Terminator aus *S. cerevisiae*; *hph*-Gen aus *E. coli*; *hsp70*-Promotor und *hsp70*-Terminator aus *U. maydis*; *ip*-Lokus aus *U. maydis*; *sc*-Promotor aus *S. cerevisiae*; *cal^S*-Signalpeptid von Calreticulin aus Ratte; *crg*-Promotor aus *U. maydis*; *otef*-Promotor aus *U. maydis*; *tub1*-Gen α -Tubulin aus *U. maydis*; *tub2*-Gen γ -Tubulin aus *U. maydis*; *Uars* autonom replizierende Sequenz aus *U. maydis*; *myoII*-Gen aus *D. discoideum*.

Außerdem wurden verwendet:

λ gt10 cDNA-Bank (Schauwecker *et al.*, 1995)

cDNA-Bank des Stammes FBD11 (*ala2 b1b2*) nach Wachstum auf aktivkohlehaltigem Vollmedium. Erstellt mit dem cDNA Bank-Kit von Amersham.

Freireplizierende cDNA-Bank (G. Weinzierl, 2001)

Freireplizierende cDNA-Bank einer Kreuzung der Stämme FB1 (*a1 b1*) und FB2 (*a2 b2*) nach Wachstum auf aktivkohlehaltigem Vollmedium (für 12, 24 und 48 Stunden). Erstellt in Anlehnung an den cDNA Library Kit von Clontech.

In dieser Arbeit hergestellte Plasmide

pSLB-crg-Tub2-hom (327)

Dieses Plasmid wurde für die Herstellung des Stammes FB1rTub2 verwendet. Es wurde in einer 4-Fragment-Ligation hergestellt: pSL1180 wurde mit *NcoI* und *PstI* geöffnet. Die 5' untranslatierte Region (UTR) von *tub2* wurde durch eine PCR aus pTub2-*PstI* mit den Oligonukleotiden rev24 und AS TUBG1 isoliert. Dabei wurde eine *BamHI*-Schnittstelle am 3'-Ende eingeführt. Verdau des PCR-Produktes mit *PstI* und *BamHI* resultierte in einem 599 bp langen Fragment. Die Phleomycin-Resistenzkassette wurde aus pSL-Ble(+) mit *BamHI* und *KpnI* ausgeschnitten. Ein 4809 bp langes *NcoI-KpnI*-Fragment aus pcrgTub2GFP enthielt den *crg*-Promotor und *tub2*. pSLB-crg-Tub2-hom wurde für die homologe Integration mit *XcmI* und *SpeI* verdaut. Das 7782 bp lange Fragment wurde in *U. maydis* transformiert.

pCU-otef-Tub2-GFP (387)

Dieses Plasmid dient der konstitutiven Expression eines Fusionsproteins aus Tub2 und GFP. Ein 2561 bp langes DNA-Fragment, das bereits die fusionierten Leserahmen von *tub2* und *eGFP* gefolgt vom *nos*-Terminator enthielt, wurde aus pcrgTub2GFP mit *NdeI* und *EcoRI* ausgeschnitten und in den mit *NdeI* und *EcoRI* geöffneten Vektor pCU4 kloniert, in dem der *otef*-Promotor (Spellig *et al.*, 1996) und die Carboxin-Resistenzkassette enthalten sind. pCU-otef-Tub2-GFP wurde für die Integration in den *cbx*-Lokus von *U. maydis* mit *SspI* linearisiert.

pSLB-Peb1-YFP-hom (1717)

Dieses Plasmid ermöglicht die C-terminale Fusion von Peb1 mit YFP durch homologe Rekombination und wurde in einer 5-Fragment-Ligation hergestellt. pSL1180 wurde dazu mit *NdeI* und *HindIII* geöffnet. Die

gesamte kodierende Sequenz von *peb1* wurde aus genomischer DNA des Stammes 521 durch PCR mit den Oligonukleotiden AS54 und AS55 vervielfältigt. Dabei wurden eine *NdeI*-Schnittstelle am Start-Codon und eine *NcoI*-Schnittstelle anstelle des Stop-Codons eingefügt. Die Auswahl der verwendeten Oligonukleotide richtete sich nach der genomischen Sequenz von *U. maydis*, die durch die Bayer CropScience AG zur Verfügung gestellt wurde. Die kodierende Sequenz von YFP wurde zusammen mit dem *nos*-Terminator als 1034 bp langes *NcoI*-*BglII*-Fragment aus p123-YFP isoliert. Die Phleomycin-Resistenz-Kassette wurde als 2449 bp langes *BglII*-*SphI*-Fragment aus pNEB-Ble(-) geschnitten. 513 bp der 3' UTR wurden mit AS56 und AS57 aus genomischer 521-DNA vervielfältigt. Dabei wurden eine *SphI*- und eine *HindIII*-Schnittstelle an den Enden eingefügt.

pER3 (286)

Dieses Plasmid trägt die kodierende Sequenz für eGFP, das im Endoplasmatischen Retikulum lokalisiert wird. Für die Klonierung wurde p123 mit *NcoI* und *NotI* verdaut. Dabei wurde die kodierende Sequenz von eGFP entfernt. Eine PCR mit den Oligonukleotiden ER5 und ER2 und Plasmid p123 als Matrize stellte die kodierende Sequenz von eGFP fusioniert mit den erforderlichen Signalsequenzen an N- und C-Terminus her. Gleichzeitig wurde das PCR-Produkt mit Restriktionsschnittstellen für *AflIII* und *EagI* versehen, die eine gerichtete Integration in den geöffneten p123 erlaubten.

pER4 (295)

Dieses Plasmid wurde parallel zu pER3 (siehe oben) hergestellt. Abweichend wurden für die PCR die Oligonukleotide ER5 und ER4 verwendet.

pER-YFP (1558)

Dieses Plasmid trägt die kodierende Sequenz für das gelbfluoreszierende Protein YFP (Clontech), das im Endoplasmatischen Retikulum lokalisiert wird. YFP und GFP unterscheiden sich nur durch wenige Punktmutationen voneinander. Für den Austausch des fluoreszierenden Proteins wird aus pER3 also alles bis auf 674 bp aus der Mitte des Leserahmens von eGFP übernommen. Dafür musste dieser Bereich in drei Fragmente zerlegt werden, ein 155 bp langes *BsrGI*-*NsiI*-Fragment, ein 5408 bp langes *NsiI*-*BamHI*-Fragment und ein 116 bp langes *BamHI*-*BanI*-Fragment. Diese wurden dann mit einem 674 bp langen *BanI*-*BsrGI*-Fragment aus p123-YFP ligiert. Für die Integration von pER-YFP in den *cbx*-Lokus von *U. maydis* wurde es zunächst mit *SspI* linearisiert.

pSLB-Nup107-YFP-hom (1727)

Dieses Plasmid ermöglicht die C-terminale Fusion von Nup107 mit YFP durch homologe Rekombination und wurde in einer 5-Fragment-Ligation hergestellt. pSL1180 wurde dazu mit *NdeI* und *HindIII* geöffnet. Die C-terminalen 500 bp der kodierenden Sequenz von *nup107* wurden aus genomischer DNA des Stammes 521 durch PCR mit den Oligonukleotiden AS58 und AS59 vervielfältigt. Dabei wurden eine *NdeI*-Schnittstelle am 5'-Ende und eine *NcoI*-Schnittstelle anstelle des Stop-Codons eingefügt. Die Auswahl der verwendeten Oligonukleotide richtete sich nach der genomischen Sequenz von *U. maydis*, die durch die Bayer CropScience AG zur Verfügung gestellt wurde. Die kodierende Sequenz von YFP wurde zusammen mit dem *nos*-Terminator als 1034 bp langes *NcoI*-*BglII*-Fragment aus p123-YFP isoliert. Die Phleomycin-Resistenz-Kassette wurde als 2449 bp langes *BglII*-*SphI*-Fragment aus pNEB-Ble(-) geschnitten. 575 bp der 3' UTR wurden mit AS60 und AS61 aus genomischer 521-DNA vervielfältigt. Dabei wurden eine *SphI*- und eine *HindIII*-Schnittstelle an den Enden eingefügt.

pUCH-Dyn2-3Myc-hom (617)

Dieses Plasmid diente der Markierung von Dyn2 am C-Terminus mit einem dreifachen Myc-Epitop. Es wurde durch Ligation folgender 5 Fragmente hergestellt: pUC18 wurde mit *SphI* und *SacI* geöffnet. Ein 1743 bp langes *SphI*-*NsiI*-Fragment aus pSLH-Dyn2-Myc enthält den 3'-Bereich der kodierenden Sequenz von *dyn2* fusioniert mit dem dreifachen Myc-Epitop. Aus p123 wurde der *nos*-Terminator als 299 bp langes *PstI*-*BglII*-Fragment

isoliert. Die Hygromycin-Resistenz-Kassette wurde mit *Bgl*III und *Spe*I aus pSL-Hyg(+) geschnitten. Als 3'-Flanke für die homologe Integration wurde ein 642 bp langes *Avr*II-*Sac*I-Fragment aus pDyn2-*Mun*I verwendet.

pUCB-Dyn2-3Myc-hom (686)

Dieses Plasmid unterscheidet sich von pUCH-Dyn2-3myc-hom lediglich durch die Resistenz-Kassette. Die Hygromycin-Kassette wurde aus pUCH-Dyn2-3myc-hom durch Verdau mit *Not*I entfernt und durch die Phleomycin-Kassette aus pSL-Ble(+) ersetzt.

pUCN(-)-Dyn2-3Myc-hom (690)

Dieses Plasmid unterscheidet sich von pUCH-Dyn2-3myc-hom lediglich durch die Resistenz-Kassette. Die Hygromycin-Kassette wurde aus pUCH-Dyn2-3myc-hom durch Verdau mit *Not*I entfernt und durch die Nourseothricin-Kassette aus pSL-Nat(+) ersetzt. Für die homologe Integration in den *dyn2*-Lokus von *U. maydis* wurde pUCN(-)-Dyn2-3Myc-hom mit *Bsg*I verdaut und das 3501 bp lange Fragment für die Transformation verwendet.

pUCH-tef-3HA-Dyn2-hom (676)

Dieses Plasmid ermöglicht die Markierung des N-Terminus von Dyn2 mit einem dreifachen HA-Epitop und wurde durch eine 7-Fragment-Ligation hergestellt. Das HA-Dyn2-Fusionskonstrukt ist dabei unter Kontrolle des konstitutiven *tef*-Promotors. pUC18 wurde mit *Bam*HI und *Eco*RI geöffnet. Ein 1448 bp langes *Bgl*III-*Mlu*I-Fragment aus pDyn2-*Nsi*I diente als 5'-Flanke für die homologe Integration. Die Hygromycin-Resistenz-Kassette wurde als *Mlu*I-*Avr*II-Fragment verwendet. Der *tef*-Promotor wurde als 486 bp langes Fragment mit *Xba*I und *Nco*I aus pMF29 isoliert. Der HA-Marker wurde mittels PCR mit AS02 und AS04 aus Plasmid pMPY-3xHA mit Restriktionsstellen für *Bsp*HI und *Sal*I versehen. Verdau mit diesen Enzymen resultierte in einem 100 bp langen Fragment, das eine dreifache Folge des HA-Epitops kodiert. Mit einer zweiten PCR wurde am Startcodon von Dyn2 eine *Sal*I-Schnittstelle erzeugt. Dafür wurden die Oligonukleotide AS05 und AB4 verwendet. Der Verdau des PCR-Produktes mit *Sal*I und *Pst*I führte zu einem 470 bp langem Fragment, das die kodierende Sequenz des N-Terminus von Dyn2 enthält. Für eine Verlängerung der 3'-Flanke wurde ein 1344 bp langes *Pst*I-*Eco*RI-Fragment aus pDyn2*Nsi*I verwendet.

pUCH-3HA-Dyn2-hom (983, 1053)

Dieses Plasmid führt nach homologer Integration zur Markierung von Dyn2 mit einem dreifachen HA-Epitop am N-Terminus. Das Fusionskonstrukt ist dabei unter Kontrolle eines 1715 bp langen Fragments des endogenen *dyn2*-Promotors. Die Klonierung erfolgte als 5-Fragment-Ligation. Dabei wurden aus Plasmid pUCH-tef-3HA-Dyn2-hom die 5'-Flanke und der Selektionsmarker als 4405 bp langes *Sph*I-*Nsi*I-Fragment und die 3'-Flanke und das Plasmid-Rückgrat als *Sal*I-*Sph*I-Fragment von 4396 bp Länge übernommen. Das Promotorfragment setzt sich aus einem 1466 bp langem *Pst*I-*Mlu*I-Fragment aus pDyn2-*Nsi*I und einem *Mlu*I-*Nco*I-verdauten PCR-Produkt zusammen. Bei dieser PCR wurden die Oligonukleotide AB12 und AS23 verwendet und eine *Nco*I-Schnittstelle am Startcodon von *dyn2* erzeugt. Der dreifache HA-Marker wurde wie bei pUCH-tef-3HA-Dyn2-hom als 100 bp langes *Bsp*HI-*Sal*I-verdautes PCR-Fragment verwendet.

pSLH-3HA-Dyn1-hom (881)

Dieses Plasmid wurde zur N-terminalen Markierung von Dyn1 mit dem dreifachen HA-Epitop verwendet. Das Fusionskonstrukt steht unter Kontrolle eines 1,6 kb langen Fragments des *dyn1*-Promotors. pWE81 bildete die Basis für diese Klonierung. Die kodierende Sequenz von eGFP wurde durch einen dreifachen HA-Marker ersetzt. Dafür wurden aus pWE81 das Plasmid-Rückgrat, beide Flanken für die homologe Rekombination und ein Teil der Hygromycin-Resistenz-Kassette als 7103 bp langes *Nde*I-*Rsr*II-Fragment und der restliche Teil des Selektionsmarkers sowie das *dyn1*-Promotor-Fragment als 3278 bp langes *Rsr*II-*Nco*I-Fragment isoliert. Der dreifache HA-Marker wurde durch PCR mit AS02 und AS24 aus pMPY-3xHA gewonnen und mit *Bsp*HI und *Ase*I verdaut.

pSLH-Dyn1-4FLAG-hom (503)

Dieses Plasmid diente der Markierung von endogenem Dyn1 am C-Terminus mit dem FLAG-Marker und wurde in einer 5-Fragment-Ligation hergestellt. pSL-Hyg(+) wurde mit *SphI* und *BglII* geöffnet. Als homologer Bereich für die Integration durch Rekombination wurde ein 2274 bp langes *SphI-MfeI*-Fragment aus pTZ-Dyn1-10,5 und ein 664 bp langes *MfeI*- und *XmaI*-verdautes PCR-Produkt verwendet. Diese PCR erfolgte mit den Oligonukleotiden Dyn7 und AS06 an pTZ-Dyn1-10,5 und erzeugte eine *XmaI*-Erkennungssequenz anstelle des Stopcodons von *dyn1*. Eine vierfache Abfolge des FLAG-Epitops wurde mit *XmaI* und *NotI* aus Plasmid pflag⁴ isoliert. Der nos-Terminator wurde als 311 bp langes *NotI-BglII*-Fragment aus p123 isoliert. pSLH-Dyn1-4FLAG-hom wurde vor der Transformation in der homologen Flanke mit *PflMI* geöffnet.

pSLB-crg-Dyn1-hom (330)

Dieses Plasmid wurde zur Herstellung von FB1rDyn1 verwendet und durch Integration einer Phleomycin-Resistenzkassette in pWE83 hergestellt. Dafür wurde die Resistenzkassette mit *StuI* und *PmlI* aus pSL-Ble(+) ausgeschnitten und in den *SmaI*-geöffneten pWE83 integriert. Für die homologe Integration in den *dyn1*-Lokus von *U. maydis* wurde pSLB-crg-Dyn1-hom mit *EcoRI* und *PvuI* verdaut und das 8548 bp lange Fragment für die Transformation verwendet.

pGEH-Dyn1-2B (25)

Dieses Plasmid enthält eine Fusion der Leserahmen von *dyn1* und *dyn2* unter Kontrolle des *dyn1*-Promotors und wurde durch Ligation folgender 5 Fragmente hergestellt: pGE25 wurde mit *EcoRI* und *HindIII* geöffnet. 1,6 kb der Promotorsequenz und 9141 bp der kodierenden Sequenz von *dyn1* wurden mit *EcoRI* und *BsiWI* aus pTZ-Dyn1-10,5 isoliert. Die Übergangsstelle von Dyn1 zu Dyn2 wurde durch Fusion zweier PCR-Produkte in Plasmid pSL-F1 hergestellt und als 1091 bp langes *BsiWI-AvrII*-Fragment entnommen. Die kodierende Sequenz und 230 bp 3'-UTR von *dyn2* wurde als 2564 bp langes *AvrII-SphI*- und 1784 bp *SphI-HindIII*-Fragment kloniert. Für die ektopische Integration in *U. maydis* wurde pGEH-Dyn1-2B mit *SspI* linearisiert.

pGEH-Dyn1-2A-3Myc (854)

Überwiegende Bereiche von GEH-Dyn1-2A wurden in zwei Fragmenten übernommen: Die kodierenden Bereiche und die Hygromycin-Resistenzkassette waren weitestgehend in einem 17217 bp langen *SspI-SbfI*-Fragment enthalten. Ein 2012 bp langes *HindIII-SspI*-Fragment enthielt das Plasmidrückgrat. Die C-terminale Sequenz von *dyn2* fusioniert an einen dreifachen Myc-Marker und der nos-Terminator wurden als 1391 bp langes *SbfI-HindIII*-Fragment aus pUCH-Dyn2-3Myc-hom entnommen. Für die ektopische Integration von pGEH-Dyn1-2A-3Myc in *U. maydis* wurde es zuvor mit *XbaI* linearisiert.

pGEH-3HA-Dyn1-2A-3Myc (1155)

Dieses Plasmid enthält eine Fusion von Dyn1 und Dyn2, die am N-Terminus mit einem dreifachen HA-Epitop und am C-Terminus mit einem dreifachen Myc-Epitop markiert ist. Das Plasmid wurde durch Ligation von 4 Fragmenten hergestellt. Ein 530 bp langes *HindIII-BstEII*-Fragment, ein 13342 bp langes *BstEII-XbaI*-Fragment und ein 4126 bp langes *XbaI-EcoRI*-Fragment stammten aus Plasmid pGEH-Dyn1-2A-3Myc und enthielten gemeinsam den überwiegenden Teil der kodierenden Bereiche des Fusionskonstruktes, sowie die Terminator- und Selektionsmarker-Sequenzen. Aus pSLH-3HA-Dyn1-hom wurden der *dyn1*-Promotor, der dreifache HA-Marker und die ersten 1029 bp der kodierenden *dyn1*-Sequenz als 2736 bp langes *EcoRI-HindIII*-Fragment entnommen. Für die ektopische Integration von pGEH-3HA-Dyn1-2A-3Myc in *U. maydis* wurde vor der Transformation mit *XbaI* linearisiert.

pGEH-3HA-Dyn1-2B-3Myc (1275)

Dieses Plasmid enthält eine Fusion von Dyn1 und Dyn2, die am N-Terminus mit einem dreifachen HA-Epitop und am C-Terminus mit einem dreifachen Myc-Epitop markiert ist und basiert auf pGEH-3HA-Dyn1-2A-3Myc und pGEH-Dyn1-2B. Aus pGEH-3HA-Dyn1-2A-3Myc wurde ein 8614 bp langes *SbfI-BstEII*-Fragment

entnommen und mit dem 12111 bp langen BstEII-SbfI-Fragment aus pGEH-Dyn1-2B ligiert. Für die ektopische Integration von pGEH-3HA-Dyn1-2B-3Myc in *U. maydis* wurde vor der Transformation mit *XbaI* linearisiert.

pNEBUH-crg-C311 (373)

Dieses Plasmid dient der kontrollierten Überexpression der C-terminalen Domäne von Dyn2. Es wurde in einer Ligation von drei Fragmenten hergestellt: pNEBUH wurde mit *KpnI* und *BamHI* geöffnet. Der regulierbare *crg*-Promotor wurde mit *KpnI* und *NcoI* aus p194 isoliert. Die kodierende Sequenz von C311 wurde durch eine PCR mit den Oligonukleotiden ASDyn3 und ASDyn4 isoliert und mit Schnittstellen für *NcoI* und *BamHI* versehen.

pNEBH-crg-C311 (532)

Dieses Plasmid dient der kontrollierten Überexpression der C-terminalen Domäne von Dyn2. Es unterscheidet sich von pNEBUH-crg-C311 nur durch das Fehlen der autonomen Replikationssequenz (ARS). Diese wurde durch Verdau von pNEBUH-crg-C311 mit *SspI* und Religation des 12802 bp langen Fragments entfernt.

pET15b-C311

Dieses Plasmid dient der bakteriellen Expression der C-terminalen Domäne von Dyn2. Dafür wurde der bakterielle Expressionsvektor pET15b mit *NdeI* und *BamHI* geöffnet. Die kodierende Sequenz der C-terminalen 311 Aminosäuren von Dyn2 wurde durch PCR mit AS16 und ASDyn4 mit Schnittstellen für *NdeI* und *BamHI* versehen und konnte so gerichtet in pET15b integriert werden.

pET15b-N460 (929)

Dieses Plasmid diente der Expression eines Polypeptids, das die Mikrotubuli-Bindestelle aus Dyn2 enthalten soll (Koonce, 1997) in *E. coli*. Dafür wurde der bakterielle Expressionsvektor pET15b mit *NdeI* und *XhoI* geöffnet. Der kodierende Bereich wurde in zwei Teilen als 677 bp langes *NdeI-AvrII*- und 700 bp langes -Fragment integriert, die beide aus Plasmid pSLB-crg-Dyn2-hom isoliert wurden.

pM765-KLAUS(1540)

Dieses Plasmid dient der Expression eines Fusionsproteins aus der Motordomäne eines Myosins und der C-terminalen Domäne von Dyn2 in *Dictyostelium discoideum*. Dieses Fusionsprotein soll für die Röntgenstrukturanalyse eingesetzt werden. Dabei dient der Myosin-Anteil, dessen dreidimensionale Struktur bekannt ist, zur Lösung des Phasenproblems. Die kodierende Sequenz der C-terminalen 311 Aminosäuren von Dyn2 wurde mittels PCR unter Verwendung der Oligonukleotide AS45 und AS46 isoliert und mit Schnittstellen für *SacI* und *MluI* versehen. Verdau des PCR-Produkts mit diesen beiden Enzymen ermöglichte dann die Integration in den *MluI-SacI*-geöffneten pM765-MCS.

pM765-HUGO337 (1501)

Dieses Plasmid dient der Expression eines Fusionsproteins aus der Motordomäne eines Myosins und der MT-Bindedomäne von Dyn2 in *D. discoideum*. Dieses Fusionsprotein soll für die Röntgenstrukturanalyse eingesetzt werden. Dabei dient der Myosin-Anteil, dessen dreidimensionale Struktur bekannt ist, zur Lösung des Phasenproblems. Die kodierende Sequenz der Aminosäuren H68 bis D405 von Dyn2 wurde mittels PCR unter Verwendung der Oligonukleotide AS47 und AS48 isoliert und mit Schnittstellen für *SalI* und *MluI* versehen. Verdau des PCR-Produkts mit diesen beiden Enzymen ermöglichte dann die Integration in den *MluI-XhoI*-geöffneten pM765-MCS.

pM765-HUGO441 (1495)

Dieses Plasmid dient der Expression eines Fusionsproteins aus der Motordomäne eines Myosins und der MT-Bindedomäne von Dyn2 in *D. discoideum*. Dieses Fusionsprotein soll für die Röntgenstrukturanalyse eingesetzt werden. Dabei dient der Myosin-Anteil, dessen dreidimensionale Struktur bekannt ist, zur Lösung des Phasenproblems. Die kodierende Sequenz der N-terminalen 441 Aminosäuren von Dyn2 wurde in zwei

Fragmenten als 1097 bp langes *Sall*-*Bsr*GI-Fragment aus pUCH-tef-3HA-Dyn2-hom und als *Bsr*GI-*Mlu*I-verdautes PCR-Produkt (Oligonukleotide AS14 und AS44) in den *Mlu*I-*Xho*I-geöffneten pM765-MCS kloniert.

pSLH-N1287 (344)

Dieses Plasmid dient der Expression der N-terminalen 1287 Aminosäuren von Dyn2 unter Kontrolle eines 1,6 kb *dyn2*-Promotorfragments. Ein 11135 bp langes *Nsi*I-*Sph*I-Fragment aus pSLH-Dyn2-Myc (R. Wedlich-Söldner, unveröffentlicht) enthielt neben dem Plasmid-Rückgrat und der Hygromycin-Resistenzkassette auch das *dyn2*-Promotorfragment und 3241 bp der kodierenden Sequenz von *dyn2*. Die restlichen 620 bp kodierende Sequenz wurden mittels PCR mit den Oligonukleotiden AB2 und ASDyn1 ebenfalls aus pSLH-Dyn2-Myc isoliert und mit einem Stopcodon und einer *Nsi*I-Schnittstelle am 3'-Ende versehen. Dem Verdau des PCR-Produkts mit *Sph*I und *Nsi*I folgte die Ligation mit dem Plasmid-Fragment. pSLH-N1287 wurde vor der Transformation mit *Spe*I verdaut.

pSLH-N1312 (358)

Dieses Plasmid dient der Expression der N-terminalen 1312 Aminosäuren von Dyn2 unter Kontrolle eines 1,6 kb *dyn2*-Promotorfragments. Ein 11135 bp langes *Nsi*I-*Sph*I-Fragment aus pSLH-Dyn2-Myc enthielt neben dem Plasmid-Rückgrat und der Hygromycin-Resistenzkassette auch das *dyn2*-Promotorfragment und 3241 bp der kodierenden Sequenz von *dyn2*. Die restlichen 695 bp kodierende Sequenz wurden mittels PCR mit den Oligonukleotiden AB2 und ASDyn2 ebenfalls aus pSLH-Dyn2-Myc isoliert und mit einem Stopcodon und einer *Nsi*I-Schnittstelle am 3'-Ende versehen. Dem Verdau des PCR-Produkts mit *Sph*I und *Nsi*I folgte die Ligation mit dem Plasmid-Fragment. pSLH-N1312 wurde vor der Transformation mit *Spe*I verdaut.

p123-C311-GFP (447)

Dieses Plasmid erlaubt die konstitutive Expression eines Fusionsproteins aus der C-terminalen Domäne von Dyn2 und eGFP. Aus p123 wurde ein 5569 bp langes *Not*I-*Nco*I-Fragment isoliert, das neben dem Plasmid-Rückgrat und der Carboxin-Resistenzkassette auch den *otef*-Promotor und den *nos*-Terminator enthielt. Das Fusionskonstrukt wurde in zwei Teilen kloniert: Aus pNEBUH-crg-C311 wurde ein 376 bp langes Fragment der kodierenden *dyn2*-Sequenz mit *Nco*I und *Kpn*I entnommen. Ein 1295 bp langes *Kpn*I-*Not*I-Fragment aus pSLH-Dyn2-GFP enthielt die restliche kodierende C311-Sequenz fusioniert an eGFP. p123-C311-GFP wurde vor der Integration in den *cbx*-Lokus von *U. maydis* mit *Ssp*I linearisiert.

pNEBH-Dyn2 (1239)

Dieses Plasmid enthält 1,6 kb des *dyn2*-Promotors, die gesamte kodierende *dyn2*-Sequenz und ca. 1 kb der 3' UTR von *dyn2* und diente als Ausgangsplasmid und Kontrolle für verschiedenste Mutationen in Dyn2. Die genomische Sequenz von *dyn2* wurde als 7440 bp *Bgl*II-*Sma*I-Fragment aus pDyn2-*Mun*I in den *Bam*HI-*Pme*I-geöffneten pNEB-Hyg(+) kloniert.

pNEBH-Dyn2 Δ TT (1287)

Dieses Plasmid basiert auf pNEBH-Dyn2 und enthält eine Deletion von 20 Aminosäuren der C-terminalen Domäne von Dyn2. Aus pNEBH-Dyn2 wurden ein 12099 bp langes *Ppu*MI-*Bsi*WI-Fragment und ein 625 bp langes *Bsi*WI-*Kpn*I-Fragment übernommen. Eine PCR mit den Oligonukleotiden AB17 und AS33 führte zu einem 605 bp langen Produkt, bei dem die Nukleotide 4243 bis 4302 der kodierenden Sequenz von *dyn2* deletiert waren. Verdau mit *Kpn*I und *Ppu*MI führte zu einem 251 bp langen Fragment, das in einer 3-Fragment-Ligation mit den beiden Fragmenten aus pNEBH-Dyn2 vereinigt wurde. Das Plasmid pNEBH-Dyn2 Δ TT wurde vor der Transformation in *U. maydis* mit *Ssp*I linearisiert.

pNEBH-Dyn2 Δ F A (1292)

Dieses Plasmid basiert auf pNEBH-Dyn2 und enthält eine Deletion von 11 Aminosäuren der C-terminalen Domäne von Dyn2. Eine PCR mit den Oligonukleotiden IS1 und AS36 führte zur Deletion der Nukleotide 4501

bis 4533 der kodierenden Sequenz von *dyn2*. Verdau des PCR-Produkts erfolgte mit *Bsi*WI und *Ppu*MI. Anschließend erfolgte die Ligation mit dem 12099 bp langen *Ppu*MI-*Bsi*WI-Fragment aus pNEBH-Dyn2. Das Plasmid pNEBH-Dyn2 Δ FA wurde vor der Transformation in *U. maydis* mit *Ssp*I linearisiert.

pNEBH-Dyn2 Δ GL (1300)

Dieses Plasmid basiert auf pNEBH-Dyn2 und enthält eine Deletion von 24 Aminosäuren der C-terminalen Domäne von Dyn2. Aus pNEBH-Dyn2 wurde das 12099 bp lange *Ppu*MI-*Bsi*WI-Fragment übernommen. Die Deletion der Nukleotide 4384 bis 4455 der kodierenden Sequenz von *dyn2* erfolgte durch zwei PCR-Reaktionen mit den Oligonukleotiden IS1 und AS34 sowie AS33 und AB17. Dabei wurden mit den Oligonukleotiden AS34 und AS33 durch stille Mutationen *Avr*II-Erkennungsstellen an den Deletionsstellen eingeführt. Verdau der PCR-Produkte erfolgte mit *Bsi*WI und *Avr*II bzw. *Avr*II und *Ppu*MI. Eine 3-Fragment-Ligation führte zu pNEBH-Dyn2 Δ GL, welches vor der Transformation in *U. maydis* mit *Ssp*I linearisiert wurde.

pNEBH-Dyn2REGA (1327)

Dieses Plasmid basiert auf pNEBH-Dyn2 und enthält Mutationen der hochkonservierten Aminosäuren R1356G und E1357A in der C-terminalen Domäne von Dyn2. Die Punktmutationen C4066G, A4068C, A4070C und G4071C wurden während einer dreistufigen Mutagenese-PCR mit den Oligonukleotiden IS1, AS37 und AB17 eingeführt. Das PCR-Produkt wurde mit *Bsi*WI und *Ppu*MI verdaut und mit dem 12099 bp langen *Ppu*MI-*Bsi*WI-Fragment aus pNEBH-Dyn2 ligiert. Das Plasmid pNEBH-Dyn2REGA wurde vor der Transformation in *U. maydis* mit *Ssp*I linearisiert.

pNEBHN-Dyn2 (1347)

Dieses Plasmid dient der Herstellung von Kontrollstämmen, um die Effekte von durch homologe Rekombination in den *dyn2*-Lokus eingeführte Mutationen untersuchen zu können. Für seine Herstellung wurde Plasmid pNEBH-Dyn2 mit *Nsi*I nach dem *dyn2*-Terminator geöffnet. Aus pUCN(-)-Dyn2-3Myc-hom wurde mit *Nsi*I ein 2116 bp langes Fragment geschnitten, das die Nourseothricin-Resistenz-Kassette und eine weitere Kopie des *dyn2*-Terminators enthielt. Beide Fragmente wurden ligiert. Vor der Transformation in *U. maydis* wurde pNEBHN-Dyn2 mit *Dra*I verdaut. Die Verwendung von 2 Selektionsmarkern in diesem Konstrukt erlaubte eine Selektion gegen Transformanten mit ektopischen Integrationen, welche eine Hygromycin-Resistenz enthalten.

pNEBHN-Dyn2REGA (1377)

Dieses Plasmid dient der Einführung der REGA-Mutation in das endogene *dyn2*-Gen durch homologe Rekombination. Für seine Herstellung wurde Plasmid pNEBH-Dyn2REGA mit *Nsi*I nach dem *dyn2*-Terminator geöffnet. Aus pUCN(-)-Dyn2-3Myc-hom wurde mit *Nsi*I ein 2116 bp langes Fragment geschnitten, das die Nourseothricin-Resistenz-Kassette und eine weitere Kopie des *dyn2*-Terminators enthielt. Beide Fragmente wurden ligiert. Vor der Transformation in *U. maydis* wurde pNEBHN-Dyn2REGA mit *Dra*I verdaut. Die Verwendung von 2 Selektionsmarkern in diesem Konstrukt erlaubte eine Selektion gegen Transformanten mit ektopischen Integrationen, welche eine Hygromycin-Resistenz enthalten.

pNEBH-3HA-Dyn2 (1512)

Dieses Plasmid ermöglicht die Expression von HA-markiertem Dyn2 nach ektopischer Integration und diente zur Herstellung von Kontrollstämmen zur Untersuchung der Expressionsstärke von Dyn2-Mutanten-Allelen. Aus pNEBH-Dyn2 wurde ein 10638 bp langes *Bsr*GI-*Age*I-Fragment übernommen und mit einem 2496 bp langen *Age*I-*Bsr*GI-Fragment aus pUCH-3HA-Dyn2-hom ligiert. Vor der Transformation in *U. maydis* wurde pNEBH-3HA-Dyn2 mit *Ssp*I linearisiert.

pNEBH-3HA-Dyn2 Δ TT (1517)

Dieses Plasmid ermöglicht die Expression von HA-markiertem Dyn2 Δ TT nach ektopischer Integration und diente zur Untersuchung der Expressionsstärke dieses Dyn2-Mutanten-Allels. Aus pNEBH-Dyn2 Δ TT wurde ein

10578 bp langes *BsrGI-AgeI*-Fragment übernommen und mit einem 2496 bp langen *AgeI-BsrGI*-Fragment aus pUCH-3HA-Dyn2-hom ligiert. Vor der Transformation in *U. maydis* wurde pNEBH-3HA-Dyn2 Δ TT mit *SspI* linearisiert.

pNEBH-3HA-Dyn2 Δ FA (1525)

Dieses Plasmid ermöglicht die Expression von HA-markiertem Dyn2 Δ FA nach ektopischer Integration und diente zur Untersuchung der Expressionsstärke dieses Dyn2-Mutanten-Allels. Aus pNEBH-Dyn2 Δ FA wurde ein 10605 bp langes *BsrGI-AgeI*-Fragment übernommen und mit einem 2496 bp langen *AgeI-BsrGI*-Fragment aus pUCH-3HA-Dyn2-hom ligiert. Vor der Transformation in *U. maydis* wurde pNEBH-3HA-Dyn2 Δ FA mit *SspI* linearisiert.

pNEBH-3HA-Dyn2 Δ GL (1530)

Dieses Plasmid ermöglicht die Expression von HA-markiertem Dyn2 Δ GL nach ektopischer Integration und diente zur Untersuchung der Expressionsstärke dieses Dyn2-Mutanten-Allels. Aus pNEBH-Dyn2 Δ GL wurde ein 10566 bp langes *BsrGI-AgeI*-Fragment übernommen und mit einem 2496 bp langen *AgeI-BsrGI*-Fragment aus pUCH-3HA-Dyn2-hom ligiert. Vor der Transformation in *U. maydis* wurde pNEBH-3HA-Dyn2 Δ GL mit *SspI* linearisiert.

pNEBH-3HA-Dyn2REGA (1535)

Dieses Plasmid ermöglicht die Expression von HA-markiertem Dyn2 Δ REGA nach ektopischer Integration und diente zur Untersuchung der Expressionsstärke dieses Dyn2-Mutanten-Allels. Aus pNEBH-Dyn2 Δ REGA wurde ein 10638 bp langes *BsrGI-AgeI*-Fragment übernommen und mit einem 2496 bp langen *AgeI-BsrGI*-Fragment aus pUCH-3HA-Dyn2-hom ligiert. Vor der Transformation in *U. maydis* wurde pNEBH-3HA-Dyn2 Δ REGA mit *SspI* linearisiert.

4.1.5 *E. coli*-Stämme

Für sämtliche Klonierungen wurden die Stämme DH5 α (Hanahan, 1985) und TOP10 (Invitrogen) verwendet, bei denen es sich um Derivate des *E. coli*-Stammes K12 handelt. Genotyp DH5 α : F' *endA1, hsdR, hsdM, sup44, thi-1, gyrA1, gyrA96, relA1, recA1, lacZ* Δ M15. Genotyp TOP10: F' *mcrA, Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC), Φ 80lacZ Δ M15, Δ lacX74, deoR, recA1, araD139, Δ (ara-leu)7697, galU, galK, rpsL(Str^R), endA1, nupG*. Für die Proteinexpression wurde der Stamm BL21-CodonPlus(DE3)-RIL verwendet, bei dem es sich um ein Derivat von *E. coli* B handelt, dem sowohl die Lon-Protease als auch die OmpT-Protease fehlen, die Proteine während der Reinigung abbauen könnten. Genotyp: F' *ompT hsdS(r_B⁻ m_B⁻) dcm⁺ Tet^r gal λ (DE3) endA Hte [argU ileY leuW Cam^r]*.

4.1.6 *U. maydis*-Stämme

Tabelle VI: Ausgangsstämme; verwendete Stämme, die nicht in dieser Arbeit hergestellt worden sind.

Stamm	Genotyp	Resistenz	Referenz
FB1	<i>a1 b1</i>	-	Banuett und Herskowitz, 1989
FB2	<i>a2 b2</i>	-	Banuett und Herskowitz, 1989
FB6a	<i>a2 b1</i>	-	Banuett und Herskowitz, 1989
FB6b	<i>a1 b2</i>	-	Banuett und Herskowitz, 1989
521	<i>a1 b1</i>	-	Banuett und Herskowitz, 1989
FBD11	<i>a1a2 b1b2</i>	-	Banuett und Herskowitz, 1989
FB1GT	<i>a1 b1 /potefGFPTub1</i>	C	Schulz, 2000

FB1ERG	<i>al b1</i> /pER3	C	Isabella Weber, unveröff.
FB1rDyn2	<i>al b1 Pcr-g-dyn2, ble^R</i>	B	Berner, 1999
FB1rDyn1GT	<i>al b1 Pcr-g-dyn1, ble^R /potefGFPTub1</i>	B, C	Schulz, 2000
FB1rDyn2GT	<i>al b1 Pcr-g-dyn2, ble^R /potefGFPTub1</i>	B, C	Schulz, 2000
FB1Dyn2 ^{ts} GT	<i>al b1 dyn2::dyn2ts, nat^R /potefGFPTub1</i>	N, C	Schulz, 2000
FB1GDyn1	<i>al b1 hyg^R, gfp-dyn1</i>	H	Enard, 1998

Resistenzen: C, Carboxin; B, Phleomycin; H, Hygromycin.

/, ektopische Integration des nachfolgenden Plasmids; ::, homologer Austausch; P, Promotor; -, Fusion; *ble^R*, Phleomycin-Resistenzkassette, *hyg^R*, Hygromycin-Resistenzkassette.

Tabelle VII: In dieser Arbeit hergestellte Stämme

Stamm	Genotyp	Resistenz	Ausgangsstamm
FB1rDyn1	<i>al b1 Pcr-g-dyn1, ble^R</i>	B	FB1
FB1HDyn1	<i>al b1 hyg^R, dyn1::3HA-dyn1</i>	H	FB1
FB1Dyn1F	<i>al b1 dyn1::dyn1-4FLAG, hyg^R</i>	H	FB1
FB1HDyn2	<i>al b1 hyg^R, dyn2::3HA-dyn2</i>	H	FB1
FB2HDyn2	<i>a2 b2 hyg^R, dyn2::3HA-dyn2</i>	H	FB2
FB2Dyn2M	<i>a2 b2 dyn2::dyn2-3Myc, nat^R</i>	N	FB2
FB2HDyn1/Dyn2M	<i>a2 b2 hyg^R, dyn1::3HA-dyn1 dyn2::dyn2-3Myc, nat^R</i>	N, H	FB2Dyn2M
FB1Dyn1-2M	<i>al b1</i> /pGEH-Dyn1-2A-3Myc	H	FB1
FB1rDyn2/Dyn1-2AM	<i>al b1 Pcr-g-dyn2, ble^R /pGEH-Dyn1-2A-3Myc</i>	B, H	FB1rDyn2
FB1rDyn1/HDyn1-2BM	<i>al b1 Pcr-g-dyn1, ble^R /pGEH-3HA-Dyn1-2B-3Myc</i>	B, H	FB1rDyn1
FB1rDyn2/HDyn1-2BM	<i>al b1 Pcr-g-dyn2, ble^R /pGEH-3HA-Dyn1-2B-3Myc</i>	B, H	FB1rDyn2
FB2EBY	<i>a2 b2 peb1-yfp, ble^R</i>	B	FB2
FB2EBYCT	<i>a2 b2 peb1-yfp, ble^R /potefCFPTub1</i>	B, H	FB2EBY
FB1rTub2	<i>al b1 Pcr-g-tub2, ble^R</i>	B	FB1
FB1rTub2GT	<i>al b1 Pcr-g-tub2, ble^R /potefGFPTub1</i>	B, C	FB1rTub2
FB1rTub2/T2G	<i>al b1 Pcr-g-tub2, ble^R /potefTub2GFP</i>	B, C	FB1rTub2
FB2NupY	<i>a2 b2 nup107-yfp, ble^R</i>	B	FB2
FB2NupYERC	<i>a2 b2 nup107-yfp, ble^R /pER3-CFP</i>	B, C	FB2NupY
FB2NupYCT	<i>a2 b2 nup107-yfp, ble^R /potefCFPTub1</i>	B, H	FB2NupY
FB1ERYCT	<i>al b1</i> /pER3-YFP / potefCFPTub1	C, H	FB1 (Cotrafo)
FB1rDyn2T2G	<i>al b1 Pcr-g-dyn2, ble^R /potefTub2GFP</i>	B, C	FB1rDyn2
FB2Dyn ^{ts} NupYERC	<i>a2 b2 dyn2::dyn2ts, nat^R nup107-yfp, ble^R /pER3-CFP</i>	B, C, N	FB2NupYERC
FB2Dyn ^{ts} NupYCT	<i>a2 b2 dyn2::dyn2ts, nat^R nup107-yfp, ble^R /potefCFPTub1</i>	B, H, N	FB2NupYCT
FB1rDyn2ERYCT	<i>al b1 Pcr-g-dyn2, ble^R /pER3-YFP / potefCFPTub1</i>	B, C, H	FB1rDyn2 (Cotrafo)
FB1rDyn2/Dyn2	<i>al b1 Pcr-g-dyn2, ble^R /pNEBH-Dyn2</i>	B, H	FB1
FB1rDyn2/ΔTT	<i>al b1 Pcr-g-dyn2, ble^R /pNEBH-Dyn2ΔTT</i>	B, H	FB1
FB1rDyn2/ΔFA	<i>al b1 Pcr-g-dyn2, ble^R /pNEBH-Dyn2ΔFA</i>	B, H	FB1
FB1rDyn2/ΔGL	<i>al b1 Pcr-g-dyn2, ble^R /pNEBH-Dyn2ΔGL</i>	B, H	FB1
FB1rDyn2/REGA	<i>al b1 Pcr-g-dyn2, ble^R /pNEBH-Dyn2REGA</i>	B, H	FB1
FB1Kon	<i>al b1 dyn2::dyn2, nat^R</i>	N	FB1
FB1REGA	<i>al b1 dyn2::dyn2REGA, nat^R</i>	N	FB1
FB1KonGT	<i>al b1 dyn2::dyn2, nat^R /potefGFPTub1</i>	N, C	FB1Kon
FB1REGAGT	<i>al b1 dyn2::dyn2REGA, nat^R /potefGFPTub1</i>	N, C	FB1REGA

FB1KonERC	<i>al b1 dyn2::dyn2, nat^R /pER3-CFP</i>	N, C	FB1Kon
FB1REGAERC	<i>al b1 dyn2::dyn2REGA, nat^R /pER3-CFP</i>	N, C	FB1REGA
FB1rDyn2/HDyn2	<i>al b1 Pcr-g-dyn2, ble^R /pNEBH-3HA-Dyn2</i>	B, H	FB1
FB1rDyn2/HΔTT	<i>al b1 Pcr-g-dyn2, ble^R /pNEBH-3HA-Dyn2ΔTT</i>	B, H	FB1
FB1rDyn2/HΔFA	<i>al b1 Pcr-g-dyn2, ble^R /pNEBH-3HA-Dyn2ΔFA</i>	B, H	FB1
FB1rDyn2/HΔGL	<i>al b1 Pcr-g-dyn2, ble^R /pNEBH-3HA-Dyn2ΔGL</i>	B, H	FB1
FB1rC311GT	<i>al b1 /pNEBH-crg-C311 /potefGFPTub1</i>	C, H	FB1GT
FB1rC311ERG	<i>al b1 /pNEBH-crg-C311 /pER3</i>	C, H	FB1ERG
FB1C311G	<i>al b1 /p123-C311-GFP</i>	C	FB1

Resistenzen: C, Carboxin; B, Phleomycin; H, Hygromycin, N, Nourseothricin.

/, ektopische Integration des nachfolgenden Plasmids; ::, homologer Austausch; P, Promotor; -, Fusion; *ble^R*, Phleomycin-Resistenzkassette, *hyg^R*, Hygromycin-Resistenzkassette, *nat^R*, Nourseothricin-Resistenzkassette.

Sämtliche Transformanten wurden durch Southern-Analyse bestätigt. In fast allen Fällen wurden mindestens zwei unabhängige Transformanten hergestellt und für die weiteren Experimente hergenommen.

4.2 Mikrobiologische Methoden

4.2.1 Kultivierung von *Escherichia coli*

Für die Kultivierung von *E. coli* wurden dYT- und LB-Flüssigmedien und YT-Festmedium verwendet (Ausubel *et al.*, 1987; Sambrooke *et al.*, 1989). Medienzusätze wurden, soweit nicht anders vermerkt, in folgenden Konzentrationen eingesetzt: Ampicillin (100 µg/ml), Chloramphenicol (34 µg/ml), Kanamycin (40 µg/ml), Tetracyclin (25 µg/ml) und X-Gal (40 µg/ml).

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. Glycerinkulturen wurden in Reaktionsgefäßen durch Mischung einer exponentiell wachsenden Kultur 1:1 mit dYT-Glycerin angesetzt und bei -80°C gelagert. Glycerinkulturen wurden vor weiteren Arbeiten zuerst auf YT-Amp Festmedien ausgestrichen.

YT-Festmedium (Sambrooke *et al.*, 1989):

8 g Trypton
5 g Hefe-Extrakt
5 g NaCl
16 g Bacto-Agar (Difco)
mit ddH₂O auf 1 l aufgefüllt

dYT-Medium (Sambrooke *et al.*, 1989):

16 g Trypton
10 g Hefe-Extrakt
5 g NaCl
mit ddH₂O auf 1 l aufgefüllt

LB-Medium (Sambrooke *et al.*, 1989):

10 g Trypton
5 g Hefe-Extrakt
10 g NaCl
mit ddH₂O auf 1 l aufgefüllt

dYT-Glycerin (Sambrooke *et al.*, 1989):

16 g Trypton
10 g Hefe-Extrakt
5 g NaCl
800 ml 87 % Glycerin
mit ddH₂O auf 1 l aufgefüllt

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 der OD₆₀₀ die

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.

4.2.2 Kultivierung von *Ustilago maydis*

Für die Kultivierung von *U. maydis* wurden folgende Medien verwendet:

YEPS_L-Medium (modifiziert nach Tsukuda *et al.*, 1988):

- 10 g Yeast Extract
- 10 g Pepton
- 10 g Saccharose
- mit H₂O auf 1 l aufgefüllt

CM-Vollmedium (Holliday, 1974; Banuett und Herskowitz, 1989):

- 1,5 g NH₄NO₃
- 2,5 g Casamino Acids
- 0,5 g DNA
- 1 g Yeast Extract
- 10 ml Vitamin-Lösung (siehe unten)
- 62,5 ml Salz-Lösung (siehe unten)
- mit H₂O auf 980 ml aufgefüllt
- mit NaOH auf pH 7,0 eingestellt und autoklaviert
- nach dem Autoklavieren:
- 20 ml 50% (w/v) Glucose-Lösung zugesetzt (f. c. 1%)

NM Nitrat-Minimalmedium (Holliday, 1974):

- 3 g KNO₃
- 62,5 ml Salz-Lösung (siehe unten)
- mit H₂O auf 980 ml aufgefüllt
- mit NaOH auf pH 7,0 eingestellt und autoklaviert
- nach dem Autoklavieren:
- 20 ml 50% (w/v) Glucose-Lösung zugesetzt (f. c. 1%)

AM Ammonium-Minimalmedium (Holliday, 1974):

- 3 g (NH₄)₂SO₄
- 62,5 ml Salz-Lösung (siehe unten)
- mit H₂O auf 980 ml aufgefüllt
- mit NaOH auf pH 7,0 eingestellt und autoklaviert
- nach dem Autoklavieren:
- 20 ml 50% (w/v) Glucose-Lösung zugesetzt (f. c. 1%)

Salz-Lösung (Holliday, 1974):

- 16 g KH₂PO₄
- 4 g Na₂SO₄
- 8 g KCl
- 4 g MgSO₄ x 7 H₂O
- 1,32 g CaCl₂ x 2 H₂O
- 8 ml Spurenelement-Lösung
- mit H₂O auf 1 l aufgefüllt und sterilfiltriert

Spurenelement-Lösung (Holliday, 1974):

- 60 mg H₃BO₃
 - 140 mg MnCl₂ x 4 H₂O
 - 400 mg ZnCl₂
 - 40 mg NaMoO₄ x 2 H₂O
 - 100 mg FeCl₃ x 6 H₂O
 - 40 mg CuSO₄ x 5 H₂O
- Mit H₂O auf 1 l aufgefüllt und sterilfiltriert

Vitamin-Lösung (Holliday, 1974):

- 100 mg Thiamin
 - 50 mg Riboflavin
 - 50 mg Pyridoxin
 - 200 mg Kalziumpantothenat
 - 500 mg p-Aminobenzoessäure
 - 200 mg Nikotinsäure
 - 200 mg Cholinchlorid
 - 1000 mg myo-Inositol
- Mit H₂O auf 1 l aufgefüllt und sterilfiltriert

Für Medien mit Arabinose als einziger Kohlenstoffquelle (CM-A) wurde nach dem Autoklavieren Arabinose statt Glucose in einer Endkonzentration von 1% zugegeben. Für Festmedien wurde Bacto-Agar in einer Endkonzentration von 2% zugegeben. Medienzusätze wurden, soweit nicht anders vermerkt, in folgenden Konzentrationen eingesetzt: Carboxin (2 µg/ml), Hygromycin (200 µg/ml), ClonNAT (150 µg/ml) und Phleomycin (40 µg/ml). Im Fall der Selektion mit Phleomycin auf Festmedien muss zusätzlich Tris-Cl, pH 8,0 in einer Endkonzentration von 100 mM zugesetzt werden, da ansonsten das Antibiotikum wegen der Ansäuerung des Mediums durch *U. maydis* inaktiviert wird.

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.

Medien-Wechsel von Stämmen

Die Verwendung von regulierbaren Promotoren ermöglichte das kontrollierte An- und Abschalten bestimmter Gene und Allele durch Wechsel des Anzuchtmediums. Reprimierende Bedingungen sind die Verwendung von Glucose als einzige Kohlenstoffquelle (CM-G) im Fall des *crg1*-Promotors und Ammonium-Ionen (AM oder CM) als einzige Stickstoffquelle im Fall des *nar1*-Promotors. Induzierende Bedingungen sind Arabinose als einzige Kohlenstoffquelle (CM-A) im Fall des *crg1*-Promotors und Nitrat-Ionen als einzige Stickstoffquelle (NM) im Fall des *nar1*-Promotors. Die Stämme wurden aus Vorkulturen im entsprechenden Flüssigmedium angeimpft und bis zu OD₆₀₀ ≈ 0,5 bei 29°C und 200 Upm inkubiert. Die Zellen wurden in ein 15 ml-PP-Röhrchen überführt und abzentrifugiert (3.000 Upm, 5 min, RT, Biofuge Stratos), der Überstand abgenommen und die Zellen im gleichen Volumen frischen Mediums mit den neuen Bedingungen resuspendiert. Dann konnte die erforderliche Menge der Zellsuspension in einem Schikanekolben mit Flüssigmedium überimpft werden. Die Kulturen wurden bei 29°C und 200 Upm für die gewünschte Zeit inkubiert. Bei der Zellernte wurden die Kulturen schnell auf 0°C heruntergekühlt und die weiteren Schritte auf Eis bzw. die Zentrifugationsschritte bei 4°C durchgeführt.

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 der OD₆₀₀ die 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 1-5 x 10⁷ Zellen/ml.

4.2.3 Transformation von *U. maydis*

Dieses Protokoll ist modifiziert nach Schulz *et al.*, 1990 und Gillissen *et al.*, 1992. Von einer auf Platte wachsenden Kultur wurde eine 4 ml YEPS-Flüssigkultur angesetzt und für 8-10 h bei 28°C geschüttelt. Diese Vorkultur wurde anschließend 1/300 in 50 ml frischem YEPS_I-Medium verdünnt und bei 28°C bis zu einer Zelldichte von 1-2 x 10⁷ Zellen/ml (bis maximal OD₆₀₀ = 1,0) geschüttelt. Nach Erreichen des optimalen Zelltiters wurden die Zellen durch Zentrifugieren (3.200 Upm, 10 min, 4°C, Heraeus Varifuge 3.0R) geerntet, einmal mit 25 ml SCS gewaschen und in 2 ml SCS mit 2,5 bis 5 mg/ml Novozym resuspendiert. Die in diesem Puffer bei Raumtemperatur ablaufende Protoplastierung kann mikroskopisch verfolgt werden, da die zigarrenförmigen Zellen nach Lyse der Zellwand eine kugelige Form einnehmen. Nach vollständiger Protoplastierung (5-15 min) wurden 10 ml SCS zugegeben und die Protoplasten durch 10minütige Zentrifugation bei 2.300 Upm (4°C, Heraeus Varifuge 3.0R) pelletiert. Um das Novozym vollständig zu entfernen, wurde dieser Waschgang dreimal wiederholt. Anschließend wurde mit 10 ml STC gewaschen und das Pellet danach in einem Volumen von 0,5 ml eiskaltem STC aufgenommen. Die so behandelten Protoplasten können 3-4 h auf Eis oder aliquotiert bei -80°C mehrere Monate aufbewahrt werden.

Zur integrativen Transformation wurden 50 µl Protoplasten mit 1-5 µl linearisierter Plasmid-DNA (ca. 5 µg) 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 kurz zuvor mit Top-Agar überschichteten Regenerationsagarplatte ausgestrichen. Nach 2 bis 5 Tagen Inkubation bei 28°C wurden die gewachsenen Kolonien mit sterilen Pipettenspitzen auf Antibiotikum-haltigen CM-Platten, vereinzelt. Potentielle Transformanten wurden mittels Ganz-Zell-PCR vorselektiert und abschließend durch Southern-Blot Analyse verifiziert.

SCS:	Regenerationsagar (Schulz <i>et al.</i> , 1990):
20 mM Na-Citrat, pH 5,8	a) Top-Agar:
1 M Sorbitol	1,5% (w/v) Bacto-Agar
in H ₂ O _{bid.} , sterilfiltriert	1 M Sorbitol
	in YEPS-Medium (Tsukuda <i>et al.</i> , 1988)
STC:	b) Bottom-Agar:
10 mM Tris-Cl, pH 7,5	wie a), zusätzlich doppelt konzentriertes Antibiotikum
100 mM CaCl ₂	
1 M Sorbitol	CM-Regenerationsagar
in H ₂ O _{bid.} , sterilfiltriert	a) Top-Agar:
	1,5% (w/v) Bacto-Agar
STC/PEG:	1 M Sorbitol
15 ml STC	in CM-Medium (Holliday, 1974) mit 2% Glucose oder 2% Arabinose
10 g PEG4000	b) Bottom-Agar:
	wie a), zusätzlich doppelt konzentriertes Antibiotikum

4.3 Molekularbiologische Methoden

4.3.1 Isolierung von Nukleinsäuren

Minipräparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Isolierung erfolgte durch "Lyse durch Kochen" nach Sambrooke *et al.*, 1989. 1,5 ml einer *E. coli*-Übernachtskultur wurden pelletiert (13.000 Upm, 30 sec, RT, Heraeus Biofuge). Das Zellpellet wurde in 350 µl STET resuspendiert, nach Zugabe von 25 µl Lysozym/RNase-Lösung geschüttelt und anschließend 50 sec bei 95°C in einem Eppendorf-Heizblock inkubiert. Die lysierten Zellen und die denaturierte genomische DNA wurden 15 min bei 13.000 Upm abzentrifugiert (Heraeus Biofuge) und danach mit einem sterilen Zahnstocher aus der wässrigen Plasmid-Lösung entfernt. Die Reinigung der Plasmid-DNA erfolgte durch Fällung mit 45 µl 3 M Na-Acetat, pH 5,3 und 420 µl Isopropanol bei RT für 5 min und anschließender Zentrifugation für 10 min bei 13.000 Upm (Heraeus Biofuge). Das Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen und nach Trocknen in 100 µl TE-Puffer aufgenommen.

STET:

- 50 mM Tris-HCl, pH 8,0
- 50 mM Na₂-EDTA
- 8% (w/v) Saccharose
- 5% (v/v) Triton X-100
- in ddH₂O

Lysozym/RNase-Lösung:

- 100 µg/ml RNase
- 10 mg/ml Lysozym
- 10 mM Tris-Cl, pH 8,0
- in ddH₂O

TE-Puffer:

- 10 mM Tris-HCl, pH 7,9
- 1 mM Na₂-EDTA
- in ddH₂O

Maxipräparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Isolierung erfolgte durch Alkalische Lyse. 200 ml einer *E. coli*-Übernachtskultur wurden pelletiert (4.000 Upm, 30 min, 4°C, SLA-3000). Das Zellpellet wurde in 5 µl ddH₂O resuspendiert. Alkalische Lyse erfolgte durch Zugabe von 10 ml Lösung II, mischen durch vorsichtiges Schwenken und Inkubation für 5 min bei RT. Zur Neutralisation wurden dann 7,5 ml Lösung III zugegeben. Wieder wurde durch vorsichtiges Schwenken gemischt. Die lysierten Zellreste und die denaturierte genomische DNA wurden durch Filtrieren durch einen Faltenfilter (Schleicher & Schüll) abgetrennt. Fällung der Nukleinsäuren aus dem Filtrat erfolgte durch Inkubation mit 12 ml Isopropanol in einem 30 ml-Glasröhrchen (Corex) für 10 min bei RT und anschließende Zentrifugation (10.000 Upm, 30min, 4°C, SS-34). Das Pellet wurde in 500 µl ddH₂O aufgenommen und in ein 1,5 ml-Röhrchen überführt. RNA wurde durch Zugabe von 500 µl 5M LiCl, dreimaliges Invertieren und Zentrifugation (13.000 Upm, 10min, RT, Heraeus Biofuge) gefällt. Der Überstand wurde auf zwei 1,5 ml-Reaktionsgefäß verteilt, mit 50 µl 8M LiCl und 1,1 ml absolutem Ethanol versetzt und 10 min bei RT inkubiert. Die Plasmid-DNA wurde abzentrifugiert (13.000 Upm, 10min, RT, Heraeus Biofuge), mit 70% Ethanol gewaschen und nach Trocknen in 300 µl TE-Puffer mit 10 µg/ml RNase aufgenommen.

MAXI Lösung II:

0,2 M NaOH
1 % SDS
in ddH₂O

MAXI Lösung III:

3 M KAc, pH 4,8
in ddH₂O

TE-Puffer:

10 mM Tris-HCl, pH 7,9
1 mM Na₂-EDTA
in ddH₂O

DNA-Isolierung aus *U. maydis*

Diese Methode ist modifiziert nach Hoffman und Winston, 1987. Dabei wurden 2 ml einer Übernachtskultur in YEPS_L-Flüssigmedium zusammen mit 0,3 g Glasperlen in einem 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß pelletiert (13.000 Upm, 30 sec, RT, Heraeus Biofuge), der Überstand abgegossen und das Pellet in 400 µl *Ustilago*-Lysispuffer und 500 µl TE-Phenol/Chloroform aufgenommen. Die Proben wurden für 15 min auf einem Vibrax-VXR Schüttler (IKA) geschüttelt. Nach Phasentrennung (13.000 Upm, 15 min, RT, Heraeus Biofuge) wurden 400 µl des Überstands in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und mit 1 ml absolutem Ethanol gefällt. Nach Zentrifugation (13.000 Upm, 1min, RT, Heraeus Biofuge) wurde das Pellet in 50 µl TE mit 20 µg/ml RNase A aufgenommen, bei 50°C resuspendiert und bei 4°C aufbewahrt.

Ustilago-Lysispuffer:

50 mM Tris-Cl, pH 7,5
50 mM Na₂-EDTA
1% (w/v) SDS
in ddH₂O

TE-Phenol/Chloroform:

Mischung aus gleichen Teilen Phenol (mit TE-Puffer äquilibriert) und Chloroform

Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde photometrisch bestimmt. Bei einer Schichtdicke von 1 cm entspricht OD₂₆₀ = 1 einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA, 33 µg/ml einzelsträngiger DNA, bzw. 40 µg/ml RNA.

Als Maß für die Reinheit der Desoxyribonukleinsäuren diente der Quotient aus OD₂₆₀ zu OD₂₈₀. Für reine DNA und RNA sollte er bei etwa 1,8 liegen. Niedrigere Werte weisen auf Verunreinigungen mit Proteinen hin, höhere Werte auf Verunreinigungen mit Salzen oder Zuckern. Die Messungen erfolgten in einem Lambda Bio UV-Spektralphotometer (Perkin Elmer).

4.3.2 *in vitro*-Modifikationen von Nukleinsäuren

Restriktionsspaltungen

Restriktionsendonukleasen des Typ II erkennen spezifische DNA-Sequenzen und schneiden die DNA innerhalb dieser Bereiche. Diese Erkennungssequenzen sind zumeist palindromisch und zwischen 4 und 8 bp lang. Der sequenzspezifische Verdau von Plasmid-DNA erfolgte durch Aufnahme der DNA im entsprechenden Restriktionspuffer, Zugabe von 1 bis 2 U Enzym pro μg eingesetzter DNA und Inkubation von mindestens 1 h, besser über Nacht bei der vom Hersteller angegebenen Temperatur. Die Inkubation erfolgt im Brutschrank. Bei einigen Enzymen ist es notwendig BSA mit einer Endkonzentration von 100 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ zum Reaktionsansatz zu geben. Ein Teil der Restriktionsenzyme kann durch 20 min Erhitzen auf 65 °C inaktiviert werden.

Herstellung von stumpfen Enden („blunt ends“) mit Mung-Bean-Nuklease

Die Mung-Bean-Nuklease (NEB) baut einzelsträngige DNA ab und kann daher zur Herstellung von „blunt ends“ aus 5`- oder 3`-überhängenden Enden verwendet werden. Hierzu wird die DNA im Mung-Bean-Nuclease-Puffer gelöst. Es kann auch ein anderer Restriktionspuffer benutzt werden. Es wird 1/10 Volumen ZnSO_4 -Lösung zugegeben und 0,25 Einheiten Enzym pro μg DNA. Es wird für 30 min bei 30 °C inkubiert. Durch Zugabe von SDS bis zu einer Endkonzentration von 0,01% wird das Enzym inaktiviert.

Mung-Bean-Nuclease-Puffer (10x):

- 500 mM NaCl
- 100 mM Tris-HCl, pH 7,9
- 100 mM MgCl_2
- 10 mM DTT

Dephosphorylierung von 5`- und 3`-Enden von DNA-Molekülen

Um zu verhindern, dass geöffnete Vektoren mit sich selbst ligieren und ohne das einzubauende Insert rezirkularisieren, können zuvor mit Hilfe der Alkalischen Phosphatase (Roche) Phosphatgruppen am Ende der DNA-Moleküle entfernt werden. Dazu sollte die DNA im entsprechenden Reaktionspuffer gelöst sein, kann aber auch direkt nach dem Restriktionsverdau eingesetzt werden. Es wird 1 μl Alkalische Phosphatase zugegeben, 15 min bei 60 °C inkubiert, dann erneut 1 μl Alkalische Phosphatase zugegeben und noch einmal 15 min bei 60°C inkubiert. Inaktivierung des Enzyms erfolgt durch Zugabe von 1 Volumen Phenol/Chloroform, 1 min Mischen durch Vortexen. Phasentrennung wird durch Zentrifugation (13.000 Upm, 10 min, Biofuge Pico) erreicht. Die wässrige Phase kann dann abgenommen werden und für die Auftrennung im Agarose-Gel mit Lade-Puffer versetzt werden.

AP-Reaktionspuffer (10x):

- 100 mM Tris-HCl, pH 8,3
- 10 mM MgCl_2
- 10 mM ZnCl_2
- in ddH_2O

DNA-Fällung

Soll DNA in einer Lösung angereichert werden oder in einen anderen Puffer überführt werden, fällt man sie. Dies kann mit Ethanol oder Isopropanol erfolgen. Zu der DNA-Lösung werden 1/10 Volumen 3 M Na-acetat, pH 4,8 und 2,5 Volumen absoluter Ethanol oder 0,7 Volumen Isopropanol gegeben. Es wird durch Invertieren

gründlich gemischt und für 30 min im Kühlschrank inkubiert. Die gefällte DNA wird abzentrifugiert (15 bis 30 min, 20000 Upm, 4 °C, Biofuge Stratos). Der Überstand wird verworfen und der Niederschlag mit 70 % Ethanol gewaschen. Der leicht getrocknete DNA-Niederschlag kann dann im gewünschten Puffer aufgenommen werden. Zur Erleichterung des Lösens kann auf 55°C erwärmt werden.

Auftrennung von Nukleinsäuren im Agarose-Gel

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten werden meist neutrale Gele aus Agarose verwendet. Sie erlauben eine Trennung von Fragmenten mit einer Länge von 70 bp bis zu einer Größe von 50 kb Länge, wobei die Auflösung je nach Agarose-Konzentration etwa 0,5 % der Fragmentgröße betragen kann. Als Laufpuffer und als Lösungsmittel für die Agarose wird 1x TAE oder 0,5x TBE verwendet. Die DNA-Lösung wird vor dem Auftragen mit 1/5 Volumen Auftragspuffer versetzt.

Die Gelelektrophorese wird bei analytischen TBE-Gelen mit bis zu 150 V und bei präparativen TAE-Gelen mit nicht mehr als 80 V durchgeführt.

Die Färbung der DNA mit Ethidiumbromid erfolgt während der Elektrophorese durch den dem Gel zugesetzten Farbstoff. Manche Anwendungen machen eine Zugabe von 10 µl Ethidiumbromid-Lösung (Roth) zum Laufpuffer nötig. Die DNA-Banden werden auf dem UV-Tisch durch Fluoreszenz des interkalierten Ethidiumbromids sichtbar.

Als Marker wurde mit *Pst*I oder *Bst*EII restringierte λ-DNA verwendet.

Auftragspuffer (6x):

50 % (w/v) Sucrose
0,25 % (w/v) Bromphenolblau
10 mM Tris-HCl, pH 7,9
1 mM Na₂-EDTA
in ddH₂O

TBE-Puffer (0,5x):

50 mM Tris-Borat, pH 7,9
1 mM Na₂-EDTA
in ddH₂O

TAE-Puffer (1x):

40 mM Tris-acetat
1 mM Na₂-EDTA
in ddH₂O

Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

Die entsprechende Bande wird auf dem UV-Tisch mit dem Skalpell markiert. Es ist darauf zu achten, dass die Strahlungsintensität niedrig eingestellt und die Dauer der Bestrahlung der DNA möglichst kurz gehalten wird. Die Bande wird dann in einem möglichst geringen Agarose-Volumen ausgeschnitten und in eine abgeschnittene 1 ml-Pipettenspitze mit Filtereinsatz (Precision Tips, Biozym) überführt. Dann wird die Spitze in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß gesetzt und 5 min bei 8000 Upm zentrifugiert. Nun werden 100 µl TE auf den Agarose-Block gegeben und erneut zentrifugiert. Das Filtrat wird dann mit 1/10 Volumen 7,5 M NH₄Acetat und 1 Volumen Isopropanol versetzt und 30 min bei -20°C inkubiert. Die DNA wird dann pelletiert (20.000 Upm, 30 min, 4°C, Biofuge Stratos), mit 500 µl 70 %igem Ethanol gewaschen und in 10 mM Tris-HCl, pH 8,0 aufgenommen. Um das Lösen der DNA zu beschleunigen und DNasen zu inaktivieren, wird 20 min bei 55°C und 700 Upm in einem Heizblock (Eppendorf) inkubiert.

Ligation von DNA-Fragmenten

Ein Ligationsansatz enthält die äquimolare Mischung aller restringierter und gereinigter DNA-Fragmente in einem Volumen von 8µl. Dazu werden 1 µl 10x Ligase-Puffer und 1µl T4-Ligase (Roche) gegeben. Es wird durch auf- und abpipettieren gemischt und über Nacht bei 16°C im Wasserbad inkubiert.

Ligase-Puffer (10x):

- 666 mM Tris-HCl, pH 7,5
- 50 mM MgCl₂
- 10 mM ATP
- 10 mM DTT
- in ddH₂O

4.3.3 RbCl-Transformation von *E. coli*

Dieses Protokoll ist modifiziert nach Cohen *et al.*, 1972. Zur Herstellung transformationskompetenter Bakterienzellen wurden 100 ml LB-Medium, dem je 10 mM MgCl₂ und MgSO₄ zugesetzt war, mit 1 ml einer frischen DH5 α -Übernachtskultur angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ \approx 0,5 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 bis zu 10 μ l Plasmidlösung (1-5 ng DNA) bzw. Ligationsansatz versetzt und 45 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock von 1 min bei 42°C wurde der Transformations-Ansatz zur Expression der durch das eingebrachte Plasmid vermittelten Antibiotikaresistenz mit 500 μ l dYT-Medium versetzt und 30 min bei 37°C horizontal mit 200 Upm geschüttelt. Anschließend wird 1 min bei 5000 Upm pelletiert, 400 μ l des Überstandes abgenommen und die Zellen in der restlichen Flüssigkeit resuspendiert, 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.

RF1-Lösung:

- 100 mM RbCl
- 50 mM MnCl₂ x 4 H₂O
- 30 mM K-Acetat
- 10 mM CaCl₂ x 2 H₂O
- 15 % (v/v) Glycerin
- in ddH₂O
- mit Essigsäure auf pH 5,8 einstellen und sterilfiltrieren.

RF2-Lösung:

- 10 mM MOPS
- 10 mM RbCl
- 75 mM CaCl₂ x 2 H₂O
- 15% (v/v) Glycerin
- in ddH₂O
- mit NaOH auf pH 5,8 einstellen und sterilfiltrieren.

4.3.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Methode der Polymerase-Ketten-Reaktion beruht auf dem natürlichen Vervielfältigungsmechanismus der DNA. Damit können bestimmte DNA-Segmente, deren benachbarte Sequenzen bekannt sind, spezifisch amplifiziert werden. Gegen diese beiden Regionen werden komplementäre Oligonukleotide (Primer) eingesetzt. Als DNA-Polymerase werden die hitzebeständige *Taq*-Polymerase oder eine *Pfu*-Polymerase verwendet. Letztere besitzt zusätzlich zur Polymerase-Aktivität auch noch eine Endonuklease-Aktivität, die eine Fehlerkorrektur bei der Synthese erlaubt und so fehlerfreie PCR-Produkte ermöglicht.

Die Polymerase-Ketten-Reaktion fand vielfältige Anwendung in dieser Arbeit. Sie ist eine sehr sensitive Nachweismethode für spezifische DNA-Sequenzen und eignet sich daher zum Durchmustern transformierter Organismen ebenso, wie für die Detektion heterologer Sequenzen mit übereinstimmenden flankierenden Bereichen. Sie wird benutzt, um Fragmente für die Klonierung mit den entsprechenden Restriktionsschnittstellen

bereitzustellen. Dafür werden Oligonukleotide verwendet, die im 5'-Bereich nicht vollständig mit der Vorlagen-DNA übereinstimmen, sondern die Erkennungssequenz einer bestimmten Restriktionsendonuklease enthalten. Zudem können mit PCR-Anwendungen spezifische Punktmutationen in DNA-Moleküle eingebracht werden.

Standard-PCR-Ansätze

Ein typischer PCR-Ansatz (Innis *et al.*, 1990) enthielt etwa 10 ng Vorlagen-DNA (Template), die beiden Oligonukleotide in einer Endkonzentration von 1 µM, dNTPs in einer Endkonzentration von 200 µM (d.h. je 200 µM dATP, dCTP, dGTP und dTTP), außerdem der Reaktionspuffer und MgCl₂ mit einer Endkonzentration von 1,5 mM. Standardmäßig wurden die Reaktionen in einem Volumen von 50 µl durchgeführt, zur Vermeidung von Kontaminationen wurden Pipettenspitzen mit Filtereinsatz benutzt. Die *Taq*-Polymerase sollte erst nach dem initialen Denaturierungsschritt zugegeben werden. Für einen 50 µl-Ansatz empfiehlt es sich, 2 U Enzym einzusetzen. PCR-Ansätze mit *Pfu* DNA-Polymerase wurden in der Regel genauso durchgeführt, allerdings in dem entsprechenden Reaktionspuffer.

Die Reaktion erfolgt im Thermocycler (PTC 200, MJ Research). Es wird zunächst für drei Minuten bei 94 °C denaturiert, dann erfolgen 35 Zyklen mit jeweils 45 sec Denaturierung bei 94°C, 45 sec Annealing bei 60°C und 1 min Elongation bei 72°C, mit einer abschließenden Elongationsphase von 10 min bei 72°C. Je nach verwendeten Oligonukleotiden oder Länge des Amplifikats wurde die Hybridisierungstemperatur bzw. die Elongationszeit entsprechend angepasst.

10x PCR-Puffer (<i>Taq</i> DNA-Polymerase)::	dNTP mix
500 mM Tris-HCl, pH 9,1	10 mM dATP
140 mM (NH ₄) ₂ SO ₄	10 mM dCTP
20 % DMSO	10 mM dGTP
1% Tween-20	10 mM dTTP
	in ddH ₂ O
10x PCR-Puffer (<i>Pfu</i> DNA-Polymerase, Promega):	
200 mM Tris-HCl, pH 8,8	
100 mM KCl	
100 mM (NH ₄) ₂ SO ₄	
20 mM MgSO ₄	
1 mg/ml nuclease-free BSA	
1% TritonX-100	

Spezifische Mutagenese mittels PCR

Diese Methode wurde modifiziert nach Picard *et al.*, 1994. Es werden drei Oligonukleotide benötigt, die oberhalb und unterhalb der Mutagenesestelle bindenden Upstream- und Downstream-Primer und den Mutagenese-Primer, der komplementär zur Zielsequenz ist und die Mutation beinhaltet. Die Polymerase-Ketten-Reaktion erfolgt in drei Stufen.

Im ersten Schritt (10 Zyklen) wird der Mega-Primer synthetisiert. Es werden 3,6 fmol Template, 10 pmol des Mutagenese-Primers und 10 pmol des Upstream-Primers eingesetzt.

Dann werden 50 pmol Downstream-Primer zugegeben. Weitere 10 Zyklen Reaktion erfolgen. Dabei geht die Synthese des Mega-Primers weiter. Es wird aber auch mutante DNA ausgehend von Mega- und Downstream-Primer gebildet. Zudem wird die Vorlagen-DNA zwischen Upstream- und Downstream-Primer vervielfältigt.

Für den letzten Schritt, der wieder für 10 Zyklen erfolgt, werden 50 pmol Upstream-Primer zugegeben. Nun kommt es zur allgemeinen DNA-Amplifikation in der Reaktionsmischung. Sowohl die Ausgangs-DNA als auch die mutante DNA werden vervielfältigt.

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

Zur einfachen Überprüfung von Transformanten kann man eine PCR direkt aus *U. maydis*-Zellen 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-Ansätzen bestand in einer längeren initialen Denaturierungszeit (5-10 min), 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, idealerweise als zwei Tage alte Kolonie von einer PD-Platte, (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 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. Aus diesem Grund wurden diese Analysen so durchgeführt, dass sich im Fall einer erfolgreichen Transformation kein Amplifikat ergeben sollte, dagegen im Wildtyp eine Bande erkennbar war. Mit allen Klonen, die im Ansatz kein Amplifikat zeigten, wurde weitergearbeitet. Durch diese Vorgehensweise gehen potentiell richtige Transformanten, bei denen die PCR-Reaktion nicht funktioniert hat, nicht verloren. Abschließend wurden die Transformanten durch Southern-Analyse bestätigt. Es wurden folgende Kombinationen an Oligonukleotiden eingesetzt:

Techniken zur Bestimmung von mRNA-Enden

Für die Bestimmung von 5'- und 3'-Enden von mRNA-Molekülen wurden verschiedene Techniken angewendet. Am einfachsten war dabei die Amplifikation der Enden aus cDNA-Bibliotheken, wie z. B. der λgt10-Bank oder der freireplizierenden cDNA-Bank. Während bei der ersten die Orientierung der inserierten Fragmente nicht festgelegt ist, sind die cDNA-Moleküle in der zweiten Bibliothek für Volllänge-Fragmente angereichert und gerichtet kloniert. Die Amplifikationen wurden in jeweils zwei Schritten durchgeführt, wobei die erhaltenen Fragmente aus der ersten Reaktion in einem zweiten Ansatz mit intern gelegenen Oligonukleotiden reamplifiziert wurden. In Fällen, in denen sich kein eindeutiges Bandenmuster zeigte, wurden die aufgetrennten Fragmente auf Nylonmembranen transferiert und mit einer Gen-spezifischen Sonde hybridisiert. Die Oligonukleotide für die Amplifikationen waren im Fall der λgt10-Bank OAN180 und OAN181 bzw. OAN182 und OAN183, im Fall der freireplizierenden cDNA-Bank OGW54 und OGW55 bzw. OGW56 und OGW57.

TOPO-TA-Klonierung von PCR-Produkten

Die Taq-Polymerase hängt template-unabhängig ein einzelnes Desoxyadenosin an die 3'-Enden von PCR-Produkten. Der linearisierte Vektor pCR[®]2.1-TOPO (Invitrogen[®]) enthält überhängende 3'-Desoxythymidin-Reste. Dadurch können PCR-Produkte sehr effizient in den Vektor eingebaut werden. Das TOPO-Cloning[™]-Kit von Invitrogen[®] nutzt die Ligase-Aktivität der Topoisomerase aus.

2,5 µl eines gereinigten PCR-Produktes werden mit 0,5 µl pCR[®]-TOPO-Vektor versetzt, vorsichtig gemischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wird kurz zentrifugiert und das Gefäß auf Eis gesetzt.

Ein Gefäß kompetenter Zellen wird auf Eis aufgetaut, mit dem TOPO-Reaktionsansatz versetzt und vorsichtig gemischt. Es wird 45 min auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgt für 60 s bei 42 °C im Wasserbad. Dann werden die Zellen 2 min auf Eis gekühlt. Es werden 500 µl dYT-Medium zugegeben und das verschlossene Gefäß horizontal bei 37 °C und 200 Upm für 30 min bebrütet. Der gesamte Transformationsansatz wird dann auf eine YT-Platte mit Ampicillin und X-Gal verteilt und über Nacht bei 37 °C kultiviert. Nach 12 Stunden werden die weißen oder leicht blauen Kolonien gepickt, in Flüssigmedium angezogen und die Plasmide präpariert.

4.3.5 Nachweis von Nukleinsäuren im Southern Blot

Herstellung einer Digoxigenin-markierten Sonde

Sonden werden durch Einbau von Digoxigenin-11-dUTP während der PCR markiert. Ein Ansatz enthält 10 bis 100 pg Plasmid-DNA oder 100 ng genomische DNA, 5 µl PCR-Puffer, 3 µl MgCl₂, 5 µl PCR DIG Probe Synthesis Mix, je 20 pmol der beiden Primer und 0,5 µl Taq DNA Polymerase. Es wird mit Reinstwasser auf 50 µl aufgefüllt.

Die Reaktion erfolgt im Thermocycler PTC200 (MJ Research) analog zur Standard-PCR. Das Produkt sollte dann über ein Agarose-Gel gereinigt werden.

PCR DIG Probe Synthesis Mix:

- 2 mM dATP
- 2 mM dCTP
- 2 mM dGTP
- 1,3 mM dTTP
- 0,7 mM alkali-labile DIG-11-dUTP, pH 7,0

Transfer und Nachweis der DNA (Southern, 1975)

Von jedem Transformanten werden 1 bis 5 µg vollständig restringierte genomische DNA in einem Agarose-Gel aufgetrennt. Als Vergleich wird restringierte Wildtyp-DNA mit auf das Gel geladen. Die Elektrophorese sollte bei nicht mehr als 50 V erfolgen, um eine schöne Auftrennung der Banden zu erreichen. Das Gel kann dann auf dem UV-Tisch zusammen mit einem Lineal fotografiert werden, um später die Markerbanden zuordnen zu können.

Das Gel wird nun in eine Schale gelegt. Durch kontrollierte Säurebehandlung kann DNA depuriniert werden. Das bietet sich aber nur an, wenn Fragmente größer als 10 kb übertragen werden müssen. Das Gel wird dafür bei Raumtemperatur für maximal 10 min in 250 mM HCl geschüttelt. Das Gel wird dann mit 0,4M NaOH neutralisiert, gleichzeitig wird die DNA denaturiert. Der Transfer der DNA vom Gel auf die HybondTM-N⁺-Membran (Amersham Life Science) erfolgt durch einen Kapillarblot mit 0,4M NaOH als Transferlösung über Nacht. Die DNA wird durch UV-Bestrahlung mit 1200 mJ/cm² im UV-Crosslinker auf der noch feuchten Membran fixiert. Die Membran wird dann auf Whatman-Papier an der Luft getrocknet.

Der Filter wird nun in ein Hybridisierungsröhrchen gesteckt. Es ist darauf zu achten, dass die DNA-Seite nach innen zeigt. Dann werden 10 bis 20 ml Hybridisierungslösung (65°C) eingefüllt. Das Röhrchen wird über Nacht bei 65°C unter Kreisen inkubiert. Die Dig-markierte Sonde (ca. 10 µl des PCR-Ansatzes mit ddH₂O auf 1 ml aufgefüllt) wird 10 min bei 99°C denaturiert, dann sofort auf Eis abgekühlt und der Hybridisierungslösung zugesetzt. Die Hybridisierung erfolgt bei 65°C über Nacht. Dann wird zweimal für 15 min mit 50 ml Southern-Waschpuffer bei 65°C gewaschen. Die Membran wird für die Detektion in eine Schale gelegt, langsam bei Raumtemperatur geschwenkt und mit den folgenden Lösungen inkubiert:

Zweimal 5 min in Dig-Waschpuffer.

30 min Dig2.

30 min in Antikörperlösung.

Dreimal 20 min in Dig-Waschpuffer.

5 min in Dig3.

In einem aufgeschnittenen Polyethylenschlauch wird die Membran nun für 5 min mit 5 ml Chemolumineszenz-Lösung inkubiert. Dann wird sie kurz zwischen Whatman-Papier getrocknet und in noch feuchtem Zustand luftblasenfrei in eine Plastikfolie eingeschweißt. Nach fünfminütiger Inkubation bei 37 °C wird die

eingeschweißte Membran zusammen mit einem Film in eine lichtdichte Kassette überführt. Normalerweise reichen Expositionszeiten von wenigen Sekunden bis 120 min aus. Der Film wird entwickelt.

Hybridisierungspuffer:

50 mM Na-Phosphat-Puffer, pH 7,0
50 mM PIPES
100 mM NaCl
1 mM Na₂-EDTA
5% (w/v) SDS
in ddH₂O

Dig2:

2% (w/v) Magermilchpulver
in Dig1

Antikörperlösung:

1:20000 Anti-Digoxigenin-AP F_{ab}-Fragmente (Roche)
in Dig2

Southern-Waschpuffer:

1x SSC
0,1% (w/v) SDS
in ddH₂O

Dig-Waschpuffer:

0,3 % Tween-20
in Dig1

Dig1:

100 mM Maleinsäure
150 mM NaCl
in ddH₂O, mit NaOH pH 7,5 einstellen

Dig3 (frisch ansetzen):

100 mM Tris-HCl, pH 9,5
100 mM NaCl
in ddH₂O

Chemolumineszenz-Lösung:

1:100 CPD-Star (Roche)
in Dig3

4.3.6 Sequenz- und Strukturanalyse

Sequenzierung von DNA

DNA wurde mit einem ABI 377 Sequenzierautomat von Perkin Elmer sequenziert. Vor der automatischen Sequenzierung wurde die DNA mit dem JETquick-Kit (Genomed) aufgereinigt. Die Sequenzreaktion wurde mit 35 Zyklen und unter Verwendung des BigDye-Kits nach Angabe des Herstellers (ABI) durchgeführt. Das Prinzip entspricht der Didesoxy-Methode nach 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 wurde die DNA gefällt. Das getrocknete Pellet wurde in 4 µl Formamid mit 25 mM Na₂-EDTA, pH 8,0 aufgenommen und 5 min bei 95°C aufgeköcht. Ein 1,5 µl Aliquot wurde anschließend auf das Gel aufgetragen. Die Banden wurden nach der Auftrennung in einem Sequenzgel und Anregung durch einen Laser von einer Photozelle detektiert. Die erhaltenen Daten wurden mit der Software des ABI377 Systems auf einem Apple Macintosh ausgewertet und die so erhaltenen Sequenz-Rohdaten konnten zur weiteren Bearbeitung in das Programm SequenceNavigator (ABI) exportiert werden. Während

Sequenz- und Strukturanalyse

Protein-Sequenzen von Tubulinen, EB1-Proteinen und Nup107-Homologen wurden von Pubmed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>) geladen und in ClustalX (Thompson *et al.*, 1997) verglichen und aneinander ausgerichtet. Phylogenetische und molekulare Evolutionsanalysen wurden mit MEGA 2.1 (Kumar *et al.*, 2001) durchgeführt. Stammbäume wurden mit der Methode "Minimale Evolution" konstruiert. Dabei wurde ein "Nearest neighbor joining"-Baum als Startpunkt und 500 oder 1000 Bootstrap-,Replicates" verwendet.

Weitere Sequenzanalysen erfolgten mit:

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

Blast2 (Altschul *et al.*, 1990; Gish und States, 1993; Madden *et al.*, 1996; Altschul *et al.*, 1997) zur Identifikation ähnlicher Proteine oder DNA-Sequenzen in den öffentlichen Datenbanken.

Coils (http://www.ch.embnet.org/software/COILS_form.html, Lupas *et al.*, 1991) zur Identifikation von Coiled-Coil Regionen in einem Protein nach dem Algorithmus von Lupas.

Paircoil (Berger *et al.*, 1995) zur Identifikation von Coiled-Coil Regionen in einem Protein nach dem Algorithmus von Berger.

ClustalX (Thompson *et al.*, 1997) zum Vergleich und aneinander Anpassen (Alignment) mehrerer Protein- oder DNA-Sequenzen.

Genedoc (Nicholas und Nicholas, 1997) zur Bearbeitung von Alignments (Schattierungen, Export als Enhanced Metafile) und Berechnung der Sequenzidentitäten und -ähnlichkeiten.

4.4 Biochemische Methoden

4.4.1 Isolierung von Proteinen

Proteinpräparation aus *U. maydis*

Gesamt-Protein aus *U. maydis* wurde normalerweise aus etwa 200 ml Flüssigkultur bei $OD_{600} \approx 0,5$ durchgeführt. Die Zellen wurden pelletiert (3.000 Upm, 10 min, 4°C, SLA-3000), in 5 ml PME aufgenommen und in ein 15 ml-PP-Röhrchen überführt, dann erneut abzentrifugiert (2.800 Upm, 5 min, 4°C, Biofuge Stratos), mit 2 ml PMEI gewaschen und schließlich in 1 ml PMEI aufgenommen. Diese Suspension wurde in die mit flüssigem Stickstoff vorgekühlten Metallbecher der Zelmühle überführt, in denen sich zwei kleine Metallkugeln befanden. Die Zellen wurden in der Zelmühle zweimal für 5 min bei einer Frequenz von 30 pro Sekunde geöffnet, wobei die Becher dazwischen mit flüssigem Stickstoff gekühlt wurden. Anschließend wurde gewartet, bis die Suspension aufgetaut aber noch kalt war, und in frische Eppendorf-Gefäße auf Eis pipettiert. Unlösliche Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation pelletiert (23.300 Upm, 30 min, 4°C, Biofuge Stratos), der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 6x Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95°C inkubiert. Diese Proben wurden bei -20°C gelagert. Zur Mengenbestimmung wurden vor der Zugabe von Probenpuffer Aliquots abgenommen und mit dem BCA Protein Assay Kit (Pierce) die Proteinkonzentration bestimmt.

PME:

100 mM PIPES, pH 6,9
5 mM MgSO₄
1 mM Na₂-EDTA
5 mM Na₂-EGTA
in ddH₂O

Proteinase-Inhibitoren (100x):

234,4 µg/ml Pefabloc (Roche)
2 Tabletten/ml Complete EDTA-free (Roche)
in ddH₂O

PMEI:

1% Proteinase-Inhibitoren in PME

Probenpuffer (6x):

300 mM Tris-Cl, pH 8,0
30% (v/v) Glycerin
20% (w/v) SDS
0,5 g/l Bromphenolblau
15% (v/v) β-Mercaptoethanol (frisch zugeben)
in ddH₂O

Probenpuffer (1x):

1/6 Probenpuffer in PME

Miniproteinpräparation aus *U. maydis*

Für die Proteinisolation in kleinem Maßstab, die allerdings nur für Proteine bis 100 kD geeignet ist, wurden 2 ml Flüssigkultur bei $OD_{600} \approx 0,5$ in einem 2 ml-Reaktionsgefäß abzentrifugiert (3.000 Upm, 2 min, 4°C, Biofuge pico). Die Zellen wurden mit 500 µl PME gewaschen, in 1x Probenpuffer aufgenommen, mit 0,3 g Glasperlen versetzt, 5 min bei 95°C inkubiert und anschließend für 10 min auf dem Vibrax-VXR Schüttler (IKA) geschüttelt. Unlösliche Zelltrümmer werden durch Zentrifugation (13.000 Upm, 10 min, RT, Biofuge pico) abgetrennt. Der Überstand kann direkt für die Gelelektrophorese eingesetzt werden oder bei -20°C gelagert werden.

4.4.2 Auftrennung und Nachweis von Proteinen

SDS-Gelelektrophorese von Proteinen

Es wurde die Methode der diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese angewendet (Laemmli, 1970). Proteinextrakte werden dabei unter denaturierenden Bedingungen elektrophoretisch ihrer Molekülmasse entsprechend aufgetrennt. Dabei wird zwischen zwei vertikale Glasplatten ein 1 mm dickes Trenngel und darüber ein weitmaschigeres Sammelgel gegossen. Die Proteine werden an der Grenze der Gele aufgrund des pH-Sprungs verdichtet und anschließend nach ihrer Größe aufgetrennt. Durch dieses diskontinuierliche System wird eine höhere Bandenschärfe erzielt. Es wurden in der Regel 100 µg Proteinextrakt in einer Mini Protean 3 Apparatur (Biorad) bei 20 bis 30 mA für 1,5 h aufgetrennt. Je nach Größe der zu untersuchenden Proteine wurden Trenngele mit 5% bis zu 15% Polyacrylamid verwendet. Zur Detektion der Proteinbanden und des Größenmarkers wurden die Gele nach der Auftrennung für 10 min in Coomassie-Färbelösung gefärbt und anschließend in Entfärbe-Lösung entfärbt, bis die Banden gut sichtbar waren.

Proteingel-Laufpuffer:

25 mM Tris-Cl, pH 8,8
200 mM Glycin
0,1% (w/v) SDS
in ddH₂O

Sammelgel:

125 mM Tris-Cl, pH 6,8
5% (w/v) Acrylamid
0,13% (w/v) Bisacrylamid
0,1% (w/v) SDS
0,1% (w/v) Ammoniumpersulfat
0,1% (v/v) TEMED
in ddH₂O

Trenngel:

375 mM Tris-Cl, pH 8,8
5% bis 15% (w/v) Acrylamid
0,27% (w/v) Bisacrylamid
0,1% (w/v) SDS
0,1% (w/v) Ammoniumpersulfat
0,1% (v/v) TEMED
in ddH₂O

Coomassie-Färbelösung:

0,25% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250
50% (v/v) Methanol
7,5% (v/v) Essigsäure
in ddH₂O

Entfärbe-Lösung:

7,5% (v/v) Methanol
7,5% (v/v) Essigsäure
in ddH₂O

Transfer von Proteinen (Western-Blot)

Die im Gel aufgetrennten Proteine wurden mittels eines Naß-Blots auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert. In die Blot-Kammer (Hoefer) wurden 1 l kalter (4°C) Towbin-Puffer vorgelegt. Der Blot wurde in einer Schale mit 0,5 l Towbin-Puffer folgendermaßen zusammengebaut: Auf das schwarze Gitter wurde ein Whatman-Papier (10 x 7,5 cm) gelegt und mit Puffer getränkt. Darauf wurde das Polyacrylamidgel gelegt, gefolgt von der in Towbin-Puffer äquilibrierten Nitrozellulose-Membran und einem weiteren Whatman-Papier. Das weiße Gitter wurde nun auf den Stapel gepresst und das gesamte Sandwich in die Blot-Kammer gesteckt. Bis zu vier Blots wurden auf diese Weise gebaut und hintereinander in die Blot-Kammer gesteckt. An die Kammer wurden 100 V und 400 mA für 30 min (Proteine bis 80 kD) oder 60 min so angelegt, dass die weißen Gitter jeweils zum Pluspol zeigten.

Towbin-Puffer:

- 25 mM Tris-Base
- 129 mM Glycine
- 0,05 % SDS
- 20% Methanol
- in ddH₂O

Nachweis von immobilisierten Proteinen

Der immunologische Nachweis von Proteinen erfolgte mit Hilfe der an die sekundären Antikörper gekoppelten Meerrettich-Peroxidase (HRP). Dazu wurde die Nitrozellulose-Membran nach dem Blot zunächst für 1 h mit 5% Magermilchpulver in TBST geblockt. Anschließend wurde die Membran für 1 h mit dem primären Antikörper, verdünnt in TBST, inkubiert. Die Membran wird dann zweimal mit TBST gespült, 15 min mit 200 ml TBST gewaschen, anschließend noch dreimal 5 min mit TBST gewaschen und dann für 45 min mit dem sekundären Antikörper, verdünnt in TBST mit 1% Magermilchpulver, inkubiert. Abschließend wurde die Membran zweimal mit TBST gespült, 15 min mit 200 ml TBST gewaschen, und anschließend noch dreimal 5 min mit PBS gewaschen. Zur Detektion wurde die ECL-Lösung frisch aus den Komponenten ECL A, B und C sowie Wasserstoffperoxid angesetzt, auf der Membran verteilt, diese nach 1 min kurz abgetrocknet, in einen Plastikbeutel gelegt, damit ein Röntgenfilm belichtet und dieser entwickelt. Je nach Signalstärke waren nach 1 sec bis 1 h Exposition deutliche Banden zu erkennen.

TBST:

- 20 mM Tris-HCl, pH 7,6
- 136 mM NaCl
- 0,7 % Tween-20
- 0,00025 % Thimerosal
- in ddH₂O

PBS:

- 7,9 mM Na₂HPO₄ x 2H₂O
- 14,5 mM KH₂PO₄
- 137 mM NaCl
- 0,5 mM MgCl₂
- 2,7 mM KCl
- in ddH₂O

ECL A:

- 100 mM Tris-HCl, pH 8,0
- in ddH₂O

ECL B:

- 90 mM Coumarinsäure (Sigma C-9008)
- in DMSO, Aliquots bei -20°C lagern

ECL C:

- 250 mM Luminol (FLUKA 09253)
- in DMSO, Aliquots bei -20°C lagern

ECL-Lösung:

- 20 ml ECL A
- 44 µl ECL B
- 100 µl ECL C
- 6 µl H₂O₂

4.4.3 Immunpräzipitation

Die Isolation von Gesamt-Protein aus *U. maydis* erfolgte im Wesentlichen wie oben angegeben (siehe 4.4.1) mit folgenden Modifikationen: Als Ausgangspunkt diente eine Flüssigkultur in 400 ml YEPS oder CM. Anstatt PME wurde Puffer IP1 verwendet, statt PMEI wurde IP2 verwendet. Nur ein 50 μ l-Aliquot des geklärten Proteinüberstandes wird mit 6x Probenpuffer versetzt und bei 95°C aufgeköcht. Der Rest wird für die Immunpräzipitation auf Eis aufbewahrt.

Im Kühlraum werden die Magnetkügelchen vorbereitet. Dafür werden für jeden Ansatz 50 μ l Suspension von Dynabeads Pan Mouse IgG (Dyna) in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß pipettiert, zweimal mit 1 ml PBS-BSA gewaschen und anschließend in 50 μ l PBS-BSA aufgenommen. Nun werden die Dynabeads für 1h mit 4 μ g Antikörpern (monoklonal, Maus) auf dem Drehrad (Eppendorf) bei 4°C inkubiert. Dann wird viermal mit je 1 ml PBS-BSA gewaschen und anschließend in 50 μ l PBS-BSA aufgenommen.

300 μ l des Gesamt-Proteinextraktes werden zu den Dynabeads gegeben und 1h unter Drehen bei 4°C inkubiert. Dann werden die Magnetkügelchen viermal mit IP2 gewaschen, dann 5 sec abzentrifugiert um die letzten Flüssigkeitsreste zu entfernen, in 50 μ l 1x Probenpuffer aufgenommen und 5 min bei 95°C inkubiert. Die Proben können dann entweder sofort aufs Gel aufgetragen werden oder bei -20°C gelagert werden.

IP1:	Proteinase-Inhibitoren (100x):
50 mM Tris-HCl, pH 8,0	234,4 μ g/ml Pefabloc (Roche)
150 mM NaCl	2 Tabletten/ml Complete EDTA-free (Roche)
15 mM MgCl ₂	in ddH ₂ O
1 % NP 40 (w/v)	
0,01 % NaN ₃	PBS-BSA:
in ddH ₂ O	7,9 mM Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O
	14,5 mM KH ₂ PO ₄
IP2:	137 mM NaCl
1% Proteininhibitormix in IP1	0,5 mM MgCl ₂
	2,7 mM KCl
	0,1 % (w/v) BSA
	in ddH ₂ O

4.4.4 Saccharose-Dichtegradient

Die Dichtegradienten-Zentrifugation erlaubt eine Bestimmung der Sedimentationsgeschwindigkeit. Diese ist abhängig von der Größe und der Form des Moleküls oder Molekülkomplexes. Für kugelig geformte Moleküle kann aus der Sedimentationskonstante direkt auf die Molekülmasse geschlossen werden. Ansonsten ist für eine Bestimmung der Form- und Größenparameter zusätzlich eine Gelfiltration nötig. Die Dichtegradienten-Zentrifugation wurde in Anlehnung an Veröffentlichung über die Bestimmung von Sedimentationskonstanten für Dynein-Komplexe anderer Organismen folgendermaßen durchgeführt:

2 ml einer 25 %igen und 2,2 ml einer 10 %igen Saccharose-Lösung in PMEI wurden mit Hilfe eines Gradientenmischers (H. Hölzel, Dorfen) in 4,5 ml UZ-Röhrchen (Beckmann) als kontinuierlicher Dichtegradient gegossen. Diese Gradienten wurden mit bis zu 200 μ l Gesamt-Proteinextrakt überschichtet und für 13h bei 150.000 xg zentrifugiert. Die Gradienten wurden dann mit einer Kanüle am Boden angestochen, die an einen Teflon-Schlauch gekoppelt war, und zu je 7 Tropfen fraktioniert. Das Volumen der Fraktionen wurde ermittelt, alle Proben mit 1/5 Volumen 6x Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 95°C inkubiert.

Für die Bestimmung der Sedimentationskoeffizienten wurde eine Eichkurve ermittelt. Dafür wurden Gradienten mit Thyroglobulin, Katalase, Aldolase und BSA (alle Sigma) beladen, für die Größen- und Formparameter

bekannt waren (Smith, 1973). Die Erstellung der Eichkurve durch lineare Regression, Bestimmung der Sedimentationskoeffizienten und Berechnung der Fehler erfolgte mit Origin 6.0 (Microcal).

PMEI:

100 mM PIPES, pH 6,9
5 mM MgSO₄
1 mM Na₂-EDTA
5 mM Na₂-EGTA
1% Proteinase-Inhibitoren in PME
in ddH₂O

Probenpuffer (6x):
300 mM Tris-Cl, pH 8,0
30% (v/v) Glycerin
20% (w/v) SDS
0,5 g/l Bromphenolblau
15% (v/v) β-Mercaptoethanol (frisch zugeben)
in ddH₂O

Proteinase-Inhibitoren (100x):

234,4 µg/ml Pefabloc (Roche)
2 Tabletten/ml Complete EDTA-free (Roche)

4.4.5 Mikrotubuli-Bindeassay

Diese Methode wurde modifiziert nach Koonce und McIntosh, 1990. Proteinextrakte von FB2HDyn1/Dyn2M wurden wie beschrieben hergestellt (4.4.1) mit folgenden Modifikationen: Als Puffer wurde PMEG benutzt, bei dem es sich um PMEI mit 0,9% (v/v) Glycerol handelt. Zum Klären wurde der Rohextrakt in ein Ultrazentrifugationsröhrchen gefüllt und bei 150.000 xg zentrifugiert. Zu diesem Überstand (S2) wurden dann Apyrase (Sigma) mit einer Endkonzentration von 3 U/ml, 2 mM AMP-PNP (Sigma) und 10 µM Taxol (Sigma) gegeben. Durch Apyrase wird ATP dephosphoryliert und AMP-PNP wirkt als nicht-spaltbares ATP-Analogon. Im Extrakt herrschen dadurch ATP-Mangelbedingungen. Taxol dient der Stabilisierung der Mikrotubuli, die nun dem Extrakt zugesetzt werden sollen. Gereinigtes Tubulin (freundlicherweise von G. Wöhlke, Uni-München, zur Verfügung gestellt) wurde durch Zugabe von 1 mM GTP und 10% DMSO für 30 min bei 35°C polymerisiert. Die Mikrotubuli wurden dann mit 10 µM Taxol stabilisiert und mit einer Endkonzentration von 0,8 mg/ml zum Proteinextrakt gegeben. Während der Inkubation auf dem Drehrad für 1h bei 4°C konnten Motormoleküle an die Mikrotubuli binden. Aufgrund der ATP-Mangel-Bedingungen sollte ihnen ein Ablösen allerdings nicht möglich sein. Die Mikrotubuli wurden dann zusammen mit den Motormolekülen durch Zentrifugation (30 min, 40.000xg, 4°C) pelletiert. Der resultierende Überstand (S3) enthielt alle nicht-gebundenen Proteine. Das Pellet wurde in PMEG mit 0,5 mM AMP-PNP und 10 µM Taxol resuspendiert und durch ein 20%iges Saccharose-Kissen zentrifugiert (30 min, 50.000xg, 4°C). Der Überstand (S4) wurde verworfen. Nun wurden die Motormoleküle von den Mikrotubuli durch Resuspendieren in PMEG mit 10 µM Taxol, 10 mM ATP und 10 mM MgCl₂ und Inkubation für 15 min auf Eis abgelöst. Die Mikrotubuli wurden dann 30 min mit 50.000xg zentrifugiert und erneut mit PMEG+Taxol+MgATP behandelt. Die resultierenden Überstände S5 und S6 sollten jetzt alle aktiven Motormoleküle enthalten. Das Pellet P6 wurde nun in PMEG resuspendiert und wie die gesammelten Proben der Überstände S2 bis S6 mit 6x Probenpuffer versetzt, für 5 min bei 95 °C aufgekocht und der Analyse durch Western Blots unterzogen.

Bei Verwendung partiell gereinigter Proteine aus dem Saccharose-Dichtegradienten wurden die gepoolten Fraktionen wie der Überstand S2 mit Apyrase, AMP-PNP und Taxol versetzt und mit Mikrotubuli inkubiert. Alle weiteren Schritte waren analog zu den oben beschriebenen.

PMEG:

100 mM PIPES, pH 6,9
 5 mM MgSO₄
 1 mM Na₂-EDTA
 5 mM Na₂-EGTA
 0,9 % (v/v) Glycerol
 1% Proteinase-Inhibitoren
 in ddH₂O

Probenpuffer (6x):

300 mM Tris-Cl, pH 8,0
 30% (v/v) Glycerin
 20% (w/v) SDS
 0,5 g/l Bromphenolblau
 15% (v/v) β-Mercaptoethanol (frisch zugeben)
 in ddH₂O

Proteinase-Inhibitoren (100x):

234,4 µg/ml Pefabloc (Roche)
 2 Tabletten/ml Complete EDTA-free (Roche)
 in ddH₂O

4.4.6 Expression und Reinigung von 6xHis-markierten Proteinen

Die auf pET15b (Novagen) basierenden Expressionsvektoren wurden in den *E.coli*-Stamm BL21-CodonPlus™(DE3)-RIL (Stratagene) transformiert. Anzucht der Zellen, Proteinisolation und -reinigung erfolgte in Anlehnung an die Herstellerbeschreibung (pET System Manual, Novagen). Für einen größeren Anteil löslichen Proteins wurden die Kulturen bei 22°C inkubiert. Eine Einzelkolonie wurde in 2 ml LB mit Ampicillin und Chloramphenicol angeimpft und ÜN bei 200 Upm inkubiert. Diese Vorkultur wurde in 400 ml LB mit Ampicillin verdünnt und solange weiter bei 22°C und 200 Upm inkubiert bis eine OD von 0,6 erreicht war. Dann wurde IPTG mit einer Endkonzentration von 1 mM zugegeben und 3 Stunden weiterschüttelt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (5000 Upm, 10 min, 4°C, SLA-3000) geerntet, in 30 ml His-Bindepuffer resuspendiert und in ein 50 ml-PP-Röhrchen überführt. Nach erneutem Zentrifugieren konnte das Pellet bei -80°C gelagert werden. Die Zellen wurden dann in 30 ml His-Bindepuffer aufgenommen und während dreimaligem Passieren der Zellpresse aufgebrochen. Der Zellextrakt wurde durch Zentrifugation (39.000 xg, 20 min, 4°C, SS-34) geklärt. Nun wird 1 ml Nickel-beladenes His-Resin zum Proteinextrakt gegeben und 1 Stunde bei 4°C inkubiert. Der Extrakt wird über ein 2,5 ml-Säulchen (Mobitec) filtriert, wobei das Säulenmaterial in die Säule gepackt wird. Nun wird zunächst mit 10 ml Bindepuffer, dann mit je 10 ml Waschpuffer mit 20 mM und 40 mM Imidazol gewaschen. Die Elution der His-markierten Proteine erfolgte mit 4 ml Elutionspuffer. Entsalzt wurde über eine PD10-Säule (Amersham). Dabei wurden die gereinigten Proteine in PBS überführt.

His-Bindepuffer:

20 mM Tris-HCl, pH 7,9
 0,5 M NaCl
 5 mM Imidazol
 in ddH₂O

Elutionspuffer:

20 mM Tris-HCl, pH 7,9
 0,5 M NaCl
 1 M Imidazol
 in ddH₂O

Lade-Puffer:

50 mM NiSO₄
 in ddH₂O

PBS:

7,9 mM Na₂HPO₄ x 2H₂O
 14,5 mM KH₂PO₄
 137 mM NaCl
 0,5 mM MgCl₂
 2,7 mM KCl
 in ddH₂O

Wasch-Puffer:

20 mM Tris-HCl, pH 7,9
 0,5 M NaCl
 20-60 mM Imidazol
 in ddH₂O

4.4.7 Herstellung und Affinitätsreinigung von Antikörpern

Die Immunisierung von Ratten und Kaninchen wurde von der Firma Eurogentec ausgeführt. Für die Herstellung des Antikörpers gegen N460 wurden in zwei New Zealand-Kaninchen viermal im Abstand von 2-4 Wochen je 125 µg gereinigtes 6His-N460 injiziert. Für den C311-Antikörper wurden 2 Ratten viermal mit 50 ng gereinigtem 6His-C311 konfrontiert. Das Ausbluten der Tiere erfolgte 13 Wochen nach der ersten Injektion. Eine simple Reinigungsmethode für Antikörper aus cruden Seren ist die Affinitätsreinigung an auf Nitrocellulose-Membranen immobilisiertem Antigen. Das zumindest teilweise gereinigte Polypeptid wird dazu auf einem SDS-Gel aufgetrennt und auf eine Nitrocellulose-Membran geblottet (siehe 4.4.2). Dann werden die Proteinbanden mit Ponceau auf der Membran angefärbt. Dazu wird die Membran für 2 min mit PonceauS in 3% TCA inkubiert. Dann wird die Membran so lange mit 5% Essigsäure entfärbt, bis die Proteinbanden deutlich zu erkennen sind. Nun wird das gewünschte Protein mit einem sterilen Skalpell aus dem Blot geschnitten. Der Antigen-Streifen wird nun für 1h mit 5% Milch in TBST geblockt, anschließend dreimal mit TBST gewaschen, in kleine Stücke zerschnitten und in ein 2 ml-Reaktionsgefäß überführt. Nun werden 1ml Serum und 1 ml TBST zugegeben und auf dem Drehrad bei 4°C für 4 Stunden oder über Nacht inkubiert. Dann wird das Serum abgenommen und die Streifen erneut dreimal mit TBST gewaschen. Durch Zugabe von 200 µl 100 mM Glycin-HCl, pH 2,5 und 1 min Vortexen werden gebundene Antikörper eluiert. Mit 10 µl 1M Tris-Base wird neutralisiert (pH testen!) und die Antikörperlösung sofort in ein frisches Eppendorf-Gefäß überführt. Dann wird Glycerin mit einer Endkonzentration von 50% zugegeben und bei -20°C gelagert.

4.5 Zellbiologische Methoden

4.5.1 Fixieren und Färben von Zellen

Fixierung von Zellen

Zellen wurden durch Zugabe von 16%iger Formaldehyd-Lösung (EM-Grade, Polyscience) bis zu einer Endkonzentration von 4% direkt zum Medium fixiert. Nach 30 min Inkubation auf einem Drehrad (Eppendorf) wurden die Zellen pelletiert (3.000 Upm, 1 min, RT, Heraeus Biofuge), zweimal mit PBS gewaschen, in PBS aufgenommen und bis zur weiteren Bearbeitung bei 4°C gelagert. Filamentöse Zellen erforderten zur Pelletierung längere Zentrifugation bei höheren Drehzahlen.

PBS:

- 7,9 mM Na₂HPO₄ x 2H₂O
- 14,5 mM KH₂PO₄
- 137 mM NaCl
- 0,5 mM MgCl₂
- 2,7 mM KCl
- in ddH₂O

Herstellung Poly-Lysin-beschichteter Deckgläser

Poly-L-Lysin (Sigma) wurde 1:10 mit bidestilliertem Wasser verdünnt. In die Mitte sauberer Deckgläser wurden jeweils etwa 70 µl der verdünnten Poly-Lysin-Lösung pipettiert. Nach 5 min Inkubation bei RT wurden ein Teil der Lösung wieder abpipettiert, so dass möglichst nur ein dünner Flüssigkeitsfilm übrig blieb. Die Deckgläser werden dann bei 60°C getrocknet und können daraufhin staubgeschützt, z.B. in einer Petrischale, mehrere Monate aufbewahrt werden.

DAPI-Färbung

Etwa 500 μl fixierte Zellen in PBS wurden pelletiert (3.000 Upm, 1 min, RT, Heraeus Biofuge) und in 200 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid}}$ aufgenommen. Diese Zellsuspension wurde auf ein mit Poly-Lysin-beschichtetes Deckglas gegeben und 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde das Deckglas mit den Zellen nach unten für kurze Zeit in eine Petrischale mit PBS gelegt (Waschschritt). 10 μl einer DAPI-Lösung (Sigma D-9542, 1 mg/ml in DMSO) wurden in eine Petrischale mit 10 ml PBS gegeben, das Deckglas mit den Zellen nach unten auf die Flüssigkeit gelegt und so für 10 min bei 60°C inkubiert. Nach zwei weiteren Waschschritten (je 5 min in PBS) wurde das Deckglas auf einen Objektträger gelegt. Das Präparat wurde mit VALAP versiegelt und im Dunkeln bei 4°C aufbewahrt.

VALAP:

- 33% (w/w) Vaseline
- 33% (w/w) Lanolin
- 33% (w/w) Paraffin

4.5.2 Immunfluoreszenz

Formaldehyd-fixierte Zellen werden pelletiert (3.000 Upm, 1 min, RT, Heraeus Biofuge), in 100 μl bidestilliertem Wasser aufgenommen und auf Poly-Lysin-beschichtete Deckgläser getropft. Nach 5 min Inkubation bei RT werden die Deckgläser mit den Zellen nach unten auf die Flüssigkeitsoberfläche einer PBS-gefüllten Petrischale gelegt. Nun werden die Deckgläser für 30 min auf einer Lösung von 3 mg/ml Novozym (NovoNordisk) und Complete Proteinaseinhibitoren (Roche) in PBS inkubiert. Anschließend wird dreimal durch Auflegen auf frisches PBS und Inkubation für 5 min gewaschen. Die Inkubation mit 0,3 % TritonX-100 in PBS erfolgt für genau 1 min und wird erneut von drei PBS-Waschschritten gefolgt. Dann werden die Deckgläser auf einer 2%igen Magermilch-Suspension in PBS geblockt. Der primäre Antikörper wird in 0,2% Magermilchpulver in PBS verdünnt und zu 20-30 μl auf Parafilm getropft. Auf diese Antikörper-Tropfen werden die Deckgläser gelegt und in einer feuchten Kammer für mindestens eine Stunde bei RT oder bei 4°C über Nacht inkubiert. Nach drei PBS-Waschschritten wird auf die selbe Weise mit dem sekundären Antikörper verfahren. Anschließend wird erneut dreimal mit PBS gewaschen. Dann wird jedes Deckglas in die Mitte eines Objektträgers gelegt und mit VALAP versiegelt. Die Präparate können in diesem Zustand in einer feuchten Kammer im Dunkeln bei 4°C aufbewahrt werden.

PBS:

- 7,9 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$
- 14,5 mM KH_2PO_4
- 137 mM NaCl
- 0,5 mM MgCl_2
- 2,7 mM KCl
- in ddH_2O

4.5.3 Mikroskopie und Bildverarbeitung

Für die *in vivo*-Beobachtung von *U. maydis*-Zellen wurden 3 μl einer logarithmisch wachsenden Kultur auf einem Objektträger mit dem gleichen Volumen vorgewärmter 2%iger Low-Melt-Agarose vermischt und sofort mit einem Zeiss Axiophot Mikroskop betrachtet. Für DIC-Mikroskopie und Fluoreszenz-Mikroskopie wurde ein 100faches Plan-Apochromat Objektiv (Zeiss) verwendet. Für die Fluoreszenz-Mikroskopie wurden Filter mit folgendem Anregungs- und Emissionsspektrum eingesetzt: DAPI-Färbung, 365 nm und >397 nm; Rhodamin

und Cy3, 546 nm und >590 nm; GFP und Cy2, 450-490 nm und 515-565 nm; YFP, 500-520 nm und 535-550 nm; CFP, 390-420 nm und >450 nm. Für Kolokalisationsstudien wurde ein spezieller Filtersatz für GFP benutzt, der ein Durchbrechen anderer Signale verhindert (BP 470/20, FT 493, BP 505-530, Zeiss). Bilder wurden mit gekühlten CCD-Kameras (C4742-25, Hamamatsu und CoolSNAP-HQ, Photometrics) aufgenommen, die von den Programmen ImageProPlus (Media Cybernetics) bzw. MetaMorph (Universal Imaging) gesteuert wurden. Nachbearbeitung aller Aufnahmen (Bildausschnitt, Kontrastverstärkung, Maßstabskalierung) erfolgte ebenfalls mit ImageProPlus und MetaMorph. Die Zusammenstellung und Bearbeitung der Abbildungen wurde mit Photoshop 6.0 (Adobe) und Corel Draw 9.0 (Corel) durchgeführt. Berechnungen und statistische Analysen erfolgten mit Excel (Microsoft) und Prism (GraphPad).

Filme von FB2EBY-Zellen wurden mit ImageProPlus aufgenommen und bestanden aus 30 Bildern mit jeweils 1500 ms Expositionszeit bei 40% der Lampen-Intensität. Für die Bewegung von Peb1-YFP wurde jedes einzelne Signal über die gesamte Aufnahmedauer am Bildschirm verfolgt.

Benomyl-Auswasch-Experimente erfolgten in einer einfachen Fließkammer. Dafür wurden Benomyl-behandelte Zellen mit Agarose vermischt und als dünner Film auf ein Deckglas gestrichen. Das Deckglas wurde dann auf einen Objektträger gelegt, auf den als Abstandhalter zwei Linien mit VALAP aufgebracht worden waren. Unter den eingebetteten Zellen befindet sich auf diese Weise ein Hohlraum, durch den Medium gespült werden kann. Ein schnelles Auswaschen von Benomyl unter mikroskopischer Kontrolle wurde dadurch erreicht, dass auf der einen Seite des Deckglases aufgetropftes Medium auf der anderen Seite mit Whatman-Papier aufgesaugt wurde.

Alternativ dazu wurde bei längeren Erholungszeiten die Benomyl-enthaltende Kultur zentrifugiert (3 min, 3000 Upm), die Zellen mit frischem Medium gewaschen, erneut pelletiert und in frischem CM-G aufgenommen. Dann wurde unter Schütteln inkubiert und zur mikroskopischen Beobachtung ein normales Lebendpräparat in Agarose angefertigt.

Die Bestimmung der Kernposition erfolgte in fixierten, mit DAPI gefärbten (siehe 4.5.1) Wildtyp-Zellen. Anhand von Einzelbildern von nicht-knospenden Zellen wurde mit ImageProPlus die Gesamtlänge der Zelle und der Abstand von der Kernmitte zu einem der Zellpole gemessen. Die Abweichung von der Zellmitte wurde als Prozent der Gesamzelllänge errechnet.

Quantifizierung der Spindelpolkörper in V-Spindeln erfolgte in Zellen von FB1rDyn2T2G, die 21h in CM-G gewachsen waren, nach Fixierung mit 1% Formaldehyd und Immunfluoreszenz mit anti-Tubulin- (Oncogene) und anti-Maus-Cy3-Antikörpern (Jackson Laboratories). Im Rhodamin-Kanal wurden V-Spindeln, die vollständig in der Fokusebene lagen, gesucht. Tub2-GFP konnte dann mit dem GFP-Filterset aufgenommen werden. In den digitalen Bildern wurden dann mit ImageProPlus bei höchster Vergrößerung Regionen um die Spindelpolkörper definiert und deren Fläche und integrierte Intensität gemessen. Regionen im Bildhintergrund dienten der Berechnung der Hintergrund-Signale, die von den ermittelten Werten abgezogen wurden. Die so ermittelten Signalstärken konnten dann miteinander ins Verhältnis gesetzt werden und ermöglichten die Bestimmung der Spindelpolkörper-Anzahl. Als Vergleich wurden Spindeln des selben Stammes nach Wachstum unter permissiven Bedingungen (CM-A) aufgenommen und vermessen.

Für die Messung der Mikrotubuli-Dynamiken wurden mit ImageProPlus und der Hamamatsu-Kamera Filme aus 60 Einzelbildern mit einer Expositionszeit von 500 ms aufgenommen. Dabei wurde während der ersten 30 Bilder mit 40% der Lampen-Intensität bestrahlt, die Bilder 31-45 mit 45-50% und die letzten 15 Bilder mit 55-58% Lampen-Intensität. Es wurden Ausschnitte von 600x600 Pixel verwendet. Jedes Präparat wurde maximal 6 min verwendet und dann durch ein frisches ersetzt. Die Quantifizierung der dynamischen Eigenschaften der Mikrotubuli erfolgte mit ImageProPlus anhand von mindestens 30 solcher Filme von zwei unabhängigen Transformanten.

Für dreidimensionale Bilder wurden Bildstapel mit Hilfe einer PiEFOC Piezo elektrische Schnell-Fokussier-Einrichtung (Physik Instrumente Waldbronn) und der CoolSNAP-HQ CCD-Kamera aufgenommen, mit der Deconvolution-Software AutoDeblur (AutoQuant) bearbeitet und mit MetaMorph in Bildstapel umgewandelt, die ein Drehen der Strukturen im Raum suggerieren.

Bildsequenzen über längere Zeiträume hinweg wurden mit der CoolSNAP-HQ CCD-Kamera unter Kontrolle von MetaMorph aufgenommen. Die Belichtungszeiten und Pausen wurden individuell angepasst. Es wurde auf eine möglichst geringe Strahlungsintensität geachtet. Das Zusammenfügen von Einzelbildern erfolgte ebenfalls mit MetaMorph.

4.5.4 FACS-Analyse

1 ml einer Flüssigkultur von *Ustilago maydis* bei einer OD von 0,2 bis 0,5 wird in ein 2 ml-Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen werden pelletiert (3000 Upm, 1 min, RT, Biofuge Pico), in 300 µl ddH₂O resuspendiert und sofort unter Vortexen mit 700 µl Methanol versetzt. Dann werden die Zellen über Nacht bei -20°C fixiert. Die so fixierten Zellen können mehrere Wochen bei -20°C gelagert werden. Für die FACS-Analyse werden von den fixierten Zellen 200 µl entnommen, mit 1 ml 50 mM Natrium-Citrat, pH 7,5 versetzt, pelletiert und in 1 ml Natrium-Citrat-Lösung aufgenommen. Nach Zugabe von 25 µl RNase (10 mg/ml) wird 1h bei RT inkubiert. Dann wird Propidium-Iodid mit einer Endkonzentration von 8 µg/ml zugegeben. Die Analyse im Becton Dickinson FACSCalibur kann sich nun direkt anschließen. Dafür werden die Proben in ein 5 ml-Polystyren-Rundboden-Röhrchen gegeben und an das Gerät angeschlossen. Die Proben müssen solange verdünnt werden, bis das Gerät weniger als 300 Ereignisse pro Sekunde zählt. Dann können Daten erhoben werden. Es wurden jeweils 10.000 Ereignisse gezählt. Da Messungen an verschiedenen Tagen nicht direkt vergleichbar sind, sind bei jeder Messung die relevanten Kontrollen mitgeführt worden. Für Zellen, die mit Propidium-Iodid gefärbt wurden, wird der FL-2-Kanal benutzt. Die Einstellungen des FACSCalibur müssen vor jeder Messung optimiert werden. Als Ausgangspunkt wurden folgende Werte gewählt: FSC: E00 4,59; SSC: 350 2,96; FL2: 721 1,00; FL2-A: 1,00; FL2-W: 3,94.

5 Literaturverzeichnis

- Adames, N. R. und Cooper, J. A. (2000). Microtubule interactions with the cell cortex causing nuclear movements in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol*, **149**, 863-874.
- Alonso, C., Miskin, J., Hernaez, B., Fernandez-Zapatero, P., Soto, L., Canto, C., Rodriguez-Crespo, I., Dixon, L. und Escribano, J. M. (2001). African swine fever virus protein p54 interacts with the microtubular motor complex through direct binding to light-chain dynein. *J Virol*, **75**, 9819-9827.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. und Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*, **215**, 403-410.
- 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**, 3389-3402.
- Amos, L. A. (1989). Brain dynein crossbridges microtubules into bundles. *J Cell Sci*, **93 (Pt 1)**, 19-28.
- Aniento, F., Emans, N., Griffiths, G. und Gruenberg, J. (1993). Cytoplasmic dynein-dependent vesicular transport from early to late endosomes. *J Cell Biol*, **123**, 1373-1387.
- Ausubel, F. M., Brenz, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidmann, J. G., Smith, J. A. und Strukl, K. (1987). *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Inc.: USA.
- Banks, G. R., Shelton, P. A., Kanuga, N., Holden, D. W. und Spanos, A. (1993). The *Ustilago maydis* nar1 gene encoding nitrate reductase activity: sequence and transcriptional regulation. *Gene*, **131**, 69-78.
- Banks, G. R. und Taylor, S. Y. (1988). Cloning of the PYR3 gene of *Ustilago maydis* and its use in DNA transformation. *Mol Cell Biol*, **8**, 5417-5424.
- Banuett, F. (1992). *Ustilago maydis*, the delightful blight. *Trends Genet*, **8**, 174-180.
- Banuett, 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 U S A*, **86**, 5878-5882.
- Beaudouin, J., Gerlich, D., Daigle, N., Eils, R. und Ellenberg, J. (2002). Nuclear envelope breakdown proceeds by microtubule-induced tearing of the lamina. *Cell*, **108**, 83-96.

- Belgareh, N., Rabut, G., Bai, S. W., van Overbeek, M., Beaudouin, J., Daigle, N., Zatsepina, O. V., Pasteau, F., Labas, V., Fromont-Racine, M., Ellenberg, J. und Doye, V. (2001). An evolutionarily conserved NPC subcomplex, which redistributes in part to kinetochores in mammalian cells. *J Cell Biol*, **154**, 1147-1160.
- Berger, B., Wilson, D. B., Wolf, E., Tonchev, T., Milla, M. und Kim, P. S. (1995). Predicting coiled coils by use of pairwise residue correlations. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 8259-8263.
- Berner, A. (1999). Isolierung und Charakterisierung eines zweiten Gens für die schwere Kette von cytoplasmatischem Dynein aus *Ustilago maydis*. Diplomarbeit, LMU, Muenchen.
- Berrueta, L., Kraeft, S. K., Tirnauer, J. S., Schuyler, S. C., Chen, L. B., Hill, D. E., Pellman, D. und Bierer, B. E. (1998). The adenomatous polyposis coli-binding protein EB1 is associated with cytoplasmic and spindle microtubules. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 10596-10601.
- Bottin, A., Kamper, J. und Kahmann, R. (1996). Isolation of a carbon source-regulated gene from *Ustilago maydis*. *Mol Gen Genet*, **253**, 342-352.
- Brachmann, A. (2001). Die frühe Infektionsphase von *Ustilago maydis*: Genregulation durch das bW/bE-Heterodimer. Dissertation, LMU, Muenchen.
- Brachmann, A., Weinzierl, G., Kamper, J. und Kahmann, R. (2001). Identification of genes in the bW/bE regulatory cascade in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol*, **42**, 1047-1063.
- Brill, M. (1998). Isolierung von Cytoskelett-Komponenten aus *Ustilago maydis* zur Analyse des Cytoskeletts *in vivo*. Diplomarbeit, LMU, Muenchen.
- Brunner, D. und Nurse, P. (2000). CLIP170-like tip1p spatially organizes microtubular dynamics in fission yeast. *Cell*, **102**, 695-704.
- Bryan, J. und Wilson, L. (1971). Are cytoplasmic microtubules heteropolymers? *Proc Natl Acad Sci U S A*, **8**, 1762-1766.
- Bullock, S. L. und Ish-Horowicz, D. (2001). Conserved signals and machinery for RNA transport in *Drosophila* oogenesis and embryogenesis. *Nature*, **414**, 611-616.
- Busson, S., Dujardin, D., Moreau, A., Dompierre, J. und De Mey, J. R. (1998). Dynein and dynactin are localized to astral microtubules and at cortical sites in mitotic epithelial cells. *Curr Biol*, **8**, 541-544.
- Carminati, J. L. und Stearns, T. (1997). Microtubules orient the mitotic spindle in yeast through dynein-dependent interactions with the cell cortex. *J Cell Biol*, **138**, 629-641.
- Centonze, V. E. und Borisy, G. G. (1990). Nucleation of microtubules from mitotic centrosomes is modulated by a phosphorylated epitope. *J. Cell Sci.*, **95**, 405-411.

- Chabin-Brion, K., Marceiller, J., Perez, F., Settegrana, C., Drechou, A., Durand, G. und Pous, C. (2001). The Golgi complex is a microtubule-organizing organelle. *Mol Biol Cell*, **12**, 2047-2060.
- Christensen, J. J. (1963). Corn smut induced by *Ustilago maydis*. *Amer Phytopathol Soc Monogr*, **2**.
- 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 U S A*, **69**, 2110-2114.
- Corthesy-Theulaz, I., Pauloin, A. und Rfeffer, S. R. (1992). Cytoplasmic dynein participates in the centrosomal localization of the Golgi complex. *J Cell Biol*, **118**, 1333-1345.
- Desai, A. und Mitchison, T. J. (1997). Microtubule polymerization dynamics. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **13**, 83-117.
- Dick, T., Ray, K., Salz, H. K. und Chia, W. (1996). Cytoplasmic dynein (*ddlc1*) mutations cause morphogenetic defects and apoptotic cell death in *Drosophila melanogaster*. *Mol Cell Biol*, **16**, 1966-1977.
- Douglas, S. E. (1995). DNA Strider. An inexpensive sequence analysis package for the Macintosh. *Mol Biotechnol*, **3**, 37-45.
- Enard, W. (1998). Funktion von cytoplasmatischem Dynein in *Ustilago maydis*. Diplomarbeit, LMU, Muenchen.
- Eshel, D., Urrestarazu, L. A., Vissers, S., Jauniaux, J. C., van Vliet-Reedijk, J. C., Planta, R. J. und Gibbons, I. R. (1993). Cytoplasmic dynein is required for normal nuclear segregation in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 11172-11176.
- Felix, M. A., Antony, C., Wright, M. und Maro, B. (1994). Centrosome assembly in vitro: role of γ -tubulin recruitment in *Xenopus* sperm aster formation. *J. Cell Biol.*, **124**, 19-31.
- Fotheringham, S. und Holloman, W. K. (1989). Cloning and disruption of *Ustilago maydis* genes. *Mol Cell Biol*, **9**, 4052-4055.
- Gaglio, T., Dionne, M. A. und Compton, D. A. (1997). Mitotic spindle poles are organized by structural and motor proteins in addition to centrosomes. *J Cell Biol*, **138**, 1055-1066.
- Gee, M. A., Heuser, J. E. und Vallee, R. B. (1997). An extended microtubule-binding structure within the dynein motor domain. *Nature*, **390**, 636-639.
- Gepner, J., Li, M., Ludmann, S., Kortas, C., Boylan, K., Iyadurai, S. J., McGrail, M. und Hays, T. S. (1996). Cytoplasmic dynein function is essential in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, **142**, 865-878.
- Gibbons, I. R., Gibbons, B. H., Mocz, G. und Asai, D. J. (1991). Multiple nucleotide-binding sites in the sequence of dynein beta heavy chain. *Nature*, **352**, 640-643.

- Gillissen, B., Bergemann, J., Sandmann, C., Schröer, B., Bölker, M. und Kahmann, R. (1992). A two-component regulatory system for self/non-self recognition in *Ustilago maydis*. *Cell*, **68**, 647-657.
- Gish, W. und States, D. J. (1993). Identification of protein coding regions by database similarity search. *Nat Genet*, **3**, 266-272.
- Gold, S. E., Bakkeren, G., Davies, J. E. und Kronstad, J. W. (1994). Three selectable markers for transformation of *Ustilago maydis*. *Gene*, **142**, 225-230.
- Goldstein, L. S. (2001). Molecular motors: from one motor many tails to one motor many tales. *Trends Cell Biol*, **11**, 477-482.
- Habura, A., Tikhonenko, I., Chisholm, R. L. und Koonce, M. P. (1999). Interaction mapping of a dynein heavy chain. Identification of dimerization and intermediate-chain binding domains. *J Biol Chem*, **274**, 15447-15453.
- Han, G., Liu, B., Zhang, J., Zuo, W., Morris, N. R. und Xiang, X. (2001). The *Aspergillus* cytoplasmic dynein heavy chain and NUDF localize to microtubule ends and affect microtubule dynamics. *Curr Biol*, **11**, 719-724.
- Hanahan, D. (1985). Techniques for transformation in *E. coli*. In: DNA cloning, a practical approach, vol. 1, eds. D. Rickwood und B. D. Hames: IRL Press, 109-135.
- Hayles, J. und Nurse, P. (2001). A journey into space. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2**, 647-656.
- Hays, T. S., Porter, M. E., McGrail, M., Grissom, P., Gosch, P., Fuller, M. T. und McIntosh, J. R. (1994). A cytoplasmic dynein motor in *Drosophila*: identification and localization during embryogenesis. *J Cell Sci*, **107 (Pt 6)**, 1557-1569.
- Heald, R., Tournebize, R., Habermann, A., Karsenti, E. und Hyman, A. (1997). Spindle assembly in *Xenopus* egg extracts: respective roles of centrosomes and microtubule self-organization. *J Cell Biol*, **138**, 615-628.
- Heath, I. B. (1980). Variant mitoses in lower eukaryotes: Indicators of the evolution of mitosis? *Int Rev Cytol*, **64**, 1-80.
- Heath, I. B. (1981). Nucleus associated organelles of fungi. *Int. Rev. Cyto.*, **69**, 191-221.
- Heitz, M. J., Petersen, J., Valovin, S. und Hagan, I. M. (2001). MTOC formation during mitotic exit in fission yeast. *J Cell Sci*, **114**, 4521-4532.
- Hoffman, C. S. und Winston, F. (1987). A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *E. coli*. *Gene*, **57**, 267-272.
- Holden, D. W., Kronstad, J. W. und Leong, S. A. (1989). Mutation in a heat-regulated hsp70 gene of *Ustilago maydis*. *Embo J*, **8**, 1927-1934.
- Holliday, R. (1961). The genetics of *Ustilago maydis*. *Genet Res Camb*, **2**, 204-230.

- Holliday, R. (1974). *Ustilago maydis*. In: Handbook of genetics, ed. R. C. King, New York: Plenum Press.
- Horio, T., Uzawa, S., Jung, M. K., Oakley, B. R., Tanaka, K. und Yanagida, M. (1991). The fission yeast gamma-tubulin is essential for mitosis and is localized at microtubule organizing centers. *J Cell Sci*, **99**, 693-700.
- Howell, B. J., McEwen, B. F., Canman, J. C., Hoffman, D. B., Farrar, E. M., Rieder, C. L. und Salmon, E. D. (2001). Cytoplasmic dynein/dynactin drives kinetochore protein transport to the spindle poles and has a role in mitotic spindle checkpoint inactivation. *J Cell Biol*, **155**, 1159-1172.
- Hyman, A. und Karsenti, E. (1998). The role of nucleation in patterning microtubule networks. *J Cell Sci*, **111**, 2077-2083.
- Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J. und White, T. J. (eds.) (1990). PCR Protocols: a guide to methods and applications. Academic Press: San Diego, USA.
- Inoue, S. und Salmon, E. D. (1995). Force generation by microtubule assembly/disassembly in mitosis and related movements. *Mol Biol Cell*, **6**, 1619-1640.
- Inoue, S., Turgeon, B. G., Yoder, O. C. und Aist, J. R. (1998). Role of fungal dynein in hyphal growth, microtubule organization, spindle pole body motility and nuclear migration. *J Cell Sci*, **111 (Pt 11)**, 1555-1566.
- Jacob, Y., Badrane, H., Ceccaldi, P. E. und Tordo, N. (2000). Cytoplasmic dynein LC8 interacts with lyssavirus phosphoprotein. *J Virol*, **74**, 10217-10222.
- Joshi, H. C. (1994). Microtubule organizing centers and gamma-tubulin. *Curr Opin Cell Biol*, **6**, 54-62.
- Joshi, H. C., Palacios, M. J., McNamara, L. und Cleveland, D. W. (1992). Gamma-tubulin is a centrosomal protein required for cell cycle- dependent microtubule nucleation. *Nature*, **356**, 80-83.
- Kane, P. M., Yamashiro, C. T., Wolczyk, D. F., Neff, N., Goebel, M. und Stevens, T. H. (1990). Protein Splicing converts the yeast TFP1 gene product to the 69-kD subunit of the vacuolar H(+)-adenosine triphosphatase. *Science*, **250**, 651-657.
- Karki, S. und Holzbaur, E. L. (1999). Cytoplasmic dynein and dynactin in cell division and intracellular transport. *Curr Opin Cell Biol*, **11**, 45-53.
- Keating, T. J., Peloquin, J. G., Rodionov, V. I., Momcilovic, D. und Borisy, G. G. (1997). Microtubule release from the centrosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **94**, 5078-5083.
- King, J. M., Hays, T. S. und Nicklas, R. B. (2000). Dynein is a transient kinetochore component whose binding is regulated by microtubule attachment, not tension. *J Cell Biol*, **151**, 739-748.

- King, S. M. (2000). AAA domains and organization of the dynein motor unit. *J Cell Sci*, **113** (Pt 14), 2521-2526.
- Kirschner, M. W. (1978). Microtubule assembly and nucleation. *Int Rev Cytol*, **54**, 1-71.
- Kojic, M. und Holloman, W. K. (2000). Shuttle vectors for genetic manipulations in *Ustilago maydis*. *Can J Microbiol*, **46**, 333-338.
- Koonce, M. P. (1997). Identification of a microtubule-binding domain in a cytoplasmic dynein heavy chain. *J Biol Chem*, **272**, 19714-19718.
- Koonce, M. P. und Knecht, D. A. (1998). Cytoplasmic dynein heavy chain is an essential gene product in *Dictyostelium*. *Cell Motil Cytoskeleton*, **39**, 63-72.
- Koonce, M. P. und McIntosh, J. R. (1990). Identification and immunolocalization of cytoplasmic dynein in *Dictyostelium*. *Cell Motil Cytoskeleton*, **15**, 51-62.
- Koonce, M. P. und Samsó, M. (1996). Overexpression of cytoplasmic dynein's globular head causes a collapse of the interphase microtubule network in *Dictyostelium*. *Mol Biol Cell*, **7**, 935-948.
- Koonce, M. P. und Tikhonenko, I. (2000). Functional elements within the dynein microtubule-binding domain. *Mol Biol Cell*, **11**, 523-529.
- Korinek, W. S., Copeland, M. J., Chaudhuri, A. und Chant, J. (2000). Molecular linkage underlying microtubule orientation toward cortical sites in yeast. *Science*, **287**, 2257-2259.
- Kronstad, J. W. und Leong, S. A. (1989). Isolation of two alleles of the b locus of *Ustilago maydis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**, 978-982.
- Kumar, S., Tamura, K., Jakobsen, I. B. und Nei, M. (2001). MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software. *Bioinformatics*, **17**, 1244-1245.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Lee, L., Tirnauer, J. S., Li, J., Schuyler, S. C., Liu, J. Y. und Pellman, D. (2000). Positioning of the mitotic spindle by a cortical-microtubule capture mechanism. *Science*, **287**, 2260-2262.
- Leguy, R., Melki, R., Pantaloni, D. und Carlier, M. F. (2000). Monomeric gamma -tubulin nucleates microtubules. *J Biol Chem*, **275**, 21975-21980.
- Lewis, M. J. und Pelham, H. R. (1992). Ligand-induced redistribution of a human KDEL receptor from the Golgi complex to the endoplasmic reticulum. *Cell*, **68**, 353-364.
- Li, Y. Y., Yeh, E., Hays, T. und Bloom, K. (1993). Disruption of mitotic spindle orientation in a yeast dynein mutant. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 10096-10100.

- Lupas, A., Van Dyke, M. und Stock, J. (1991). Predicting coiled coils from protein sequences. *Science*, **252**, 1162-1164.
- Madden, T. L., Tatusov, R. L. und Zhang, J. (1996). Applications of network BLAST server. *Methods Enzymol*, **266**, 131-141.
- 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 Res*, **16**, 1829-1836.
- Masuda, H., Sevik, M. und Cande, W. Z. (1992). In vitro microtubule-nucleating activity of spindle pole bodies in fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*: cell cycle-dependent activation in xenopus cell-free extracts. *J Cell Biol*, **117**, 1055-1066.
- McDonald, A. R., Liu, B., Joshi, H. C. und Palevitz, B. A. (1993). Gamma-tubulin is associated with a cortical-microtubule-organizing zone in the developing guard cells of *Allium cepa* L. *Planta*, **191**, 357-361.
- McIntosh, J. R., Hepler, P. K. und Van Wie, D. G. (1969). Model for mitosis. *Nature*, **224**, 695-663.
- Mimori-Kiyosue, Y., Shiina, N. und Tsukita, S. (2000). The dynamic behavior of the APC-binding protein EB1 on the distal ends of microtubules. *Curr Biol*, **10**, 865-868.
- Minke, P. F., Lee, I. H. und Plamann, M. (1999). Microscopic analysis of *Neurospora* ropy mutants defective in nuclear distribution. *Fungal Genet Biol*, **28**, 55-67.
- Mitchison, T. und Kirschner, M. (1984). Dynamic instability of microtubule growth. *Nature*, **312**, 237-242.
- Mocz, G. und Gibbons, I. R. (2001). Model for the motor component of dynein heavy chain based on homology to the AAA family of oligomeric ATPases. *Structure (Camb)*, **9**, 93-103.
- Morrison, E. E., Wardleworth, B. N., Askham, J. M., Markham, A. F. und Meredith, D. M. (1998). EB1, a protein which interacts with the APC tumour suppressor, is associated with the microtubule cytoskeleton throughout the cell cycle. *Oncogene*, **17**, 3471-3477.
- Muresan, V., Joshi, H. C. und Besharse, J. C. (1993). Gamma-tubulin in differentiated cell types: localization in the vicinity of basal bodies in retinal photoreceptors and ciliated epithelia. *J Cell Sci*, **104 (Pt 4)**, 1229-1237.
- Nabi, I. R. (1999). The polarization of the motile cell. *J Cell Sci*, **112**, 1803-1811.
- Neuwald, A. F., Aravind, L., Spouge, J. L. und Koonin, E. V. (1999). AAA+: A class of chaperone-like ATPases associated with the assembly, operation, and disassembly of protein complexes. *Genome Res*, **9**, 27-43.

- Nicholas, K. B. und Nicholas, H., B. Jr. (1997). GeneDoc: a tool for editing and annotating multiple sequence alignments.
- Nogales, E., Whittaker, M., Milligan, R. A. und Downing, K. H. (1999). High-resolution model of the microtubule. *Cell*, **96**, 79-88.
- Oakley, B. R., Oakley, C. E., Yoon, Y. und Jung, M. K. (1990). Gamma-tubulin is a component of the spindle pole body that is essential for microtubule function in *Aspergillus nidulans*. *Cell*, **61**, 1289-1301.
- Oakley, C. E. und Oakley, B. R. (1989). Identification of gamma-tubulin, a new member of the tubulin superfamily encoded by mipA gene of *Aspergillus nidulans*. *Nature*, **338**, 662-664.
- O'Donnell, K. L. und McLaughlin, D. J. (1984). Postmeiotic mitosis, basidiospore development, and septation in *Ustilago maydis*. *Mycologia*, **76**, 486-502.
- Ogawa, K. (1991). Four ATP-binding sites in the midregion of the beta heavy chain of dynein. *Nature*, **352**, 643-645.
- Ogawa, K., Hosoya, H., Yokota, E., Kobayashi, T., Wakamatsu, Y., Ozato, K., Negishi, S. und Obika, M. (1987). Melanoma dynein: evidence that dynein is a general "motor" for microtubule-associated cell motilities. *Eur J Cell Biol*, **43**, 3-9.
- Paschal, B. M., Obar, R. A. und Vallee, R. B. (1989). Interaction of brain cytoplasmic dynein and MAP2 with a common sequence at the C terminus of tubulin. *Nature*, **342**, 569-572.
- Perez, F., Diamantopoulos, G. S., Stalder, R. und Kreis, T. E. (1999). CLIP-170 highlights growing microtubule ends in vivo. *Cell*, **96**, 517-527.
- Peters, R. (1983). Nuclear envelope permeability measured by fluorescence microphotolysis of single liver cell nuclei. *J Biol Chem*, **258**, 11427-11429.
- Peters, R. (1984). Nucleo-cytoplasmic flux and intracellular mobility in single hepatocytes measured by fluorescence microphotolysis. *EMBO J*, **3**, 1831-1836.
- Pfarr, C. M., Coue, M., Grissom, P. M., Hays, T. S., Porter, M. E. und McIntosh, J. R. (1990). Cytoplasmic dynein is localized to kinetochores during mitosis. *Nature*, **345**, 263-265.
- Picard, V., Ersdal-Badju, E., Lu, A. und Bock, S. C. (1994). A rapid and efficient one-tube PCR-based mutagenesis technique using *Pfu* DNA polymerase. *Nucleic Acids Res*, **22**, 2587-2591.
- Proll, C. (2002). Suche nach Proteininteraktionspartnern der Proteinregion C311 von Dyn2 in *Ustilago maydis*. Diplomarbeit, Philipps-Universität, Marburg.
- Raux, H., Flamand, A. und Blondel, D. (2000). Interaction of the rabies virus P protein with the LC8 dynein light chain. *J Virol*, **74**, 10212-10216.

- Rodionov, V. I. und Borisy, G. G. (1997). Self-centring activity of cytoplasm. *Nature*, **386**, 170-173.
- Sakakibara, H., Kojima, H., Sakai, Y., Katayama, E. und Oiwa, K. (1999). Inner-arm dynein c of *Chlamydomonas* flagella is a single-headed processive motor. *Nature*, **400**, 586-590.
- Salina, D., Bodoor, K., Eckley, D. M., Schroer, T. A., Rattner, J. B. und Burke, B. (2002). Cytoplasmic dynein as a facilitator of nuclear envelope breakdown. *Cell*, **108**, 97-107.
- Sambrooke, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbour Laboratory Press.
- Sanso, M., Radermacher, M., Frank, J. und Koonce, M. P. (1998). Structural characterization of a dynein motor domain. *J Mol Biol*, **276**, 927-937.
- Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **74**, 5463-5467.
- Schauwecker, F., Wanner, G. und Kahmann, R. (1995). Filament-specific expression of a cellulase gene in the dimorphic fungus *Ustilago maydis*. *Biol Chem Hoppe Seyler*, **376**, 617-625.
- Schnorrer, F., Bohmann, K. und Nusslein-Volhard, C. (2000). The molecular motor dynein is involved in targeting swallow and bicoid RNA to the anterior pole of *Drosophila* oocytes. *Nat Cell Biol*, **2**, 185-190.
- Schuberth, C. (2000). Untersuchungen zur biologischen Funktion von Kin4, einem Kar3-ähnlichen Kinesin aus *Ustilago maydis*. Diplomarbeit, LMU, Muenchen.
- Schulz, B., Banuett, F., Dahl, M., Schlesinger, R., Schaefer, W., Martin, T., Herskowitz, I. und Kahmann, R. (1990). The B alleles of *Ustilago maydis* whose combinations program pathogenic development code for polypeptides containing a homeodomain-related motif. *Cell*, **60**, 295-306.
- Schulz, I. (2000). Einfluss molekularer Motoren auf Organisation und Dynamik der Interphase-Mikrotubuli in *Ustilago maydis*. Diplomarbeit, LMU, Muenchen.
- Sharp, D. J., Brown, H. M., Kwon, M., Rogers, G. C., Holland, G. und Scholey, J. M. (2000a). Functional coordination of three mitotic motors in *Drosophila* embryos. *Mol Biol Cell*, **11**, 241-253.
- Sharp, D. J., Rogers, G. C. und Scholey, J. M. (2000b). Cytoplasmic dynein is required for poleward chromosome movement during mitosis in *Drosophila* embryos. *Nat Cell Biol*, **2**, 922-930.
- Smith, M. (1973). Molecular weights of proteins and some other materials including sedimentation, diffusion and frictional coefficients and partial specific volume. In: Handbook of Biochemistry, ed. H. A. Sobert, Cleveland, OH: CRC Press, C3-C35.

- Snetselaar, K. M. und Mims, C. W. (1993). Light and electron microscopy of *Ustilago maydis* hyphae in maize. *Mycological Research*.
- Sodeik, B., Ebersold, M. W. und Helenius, A. (1997). Microtubule-mediated transport of incoming herpes simplex virus 1 capsids to the nucleus. *J Cell Biol*, **136**, 1007-1021.
- Southern, E. M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol*, **98**, 503-517.
- 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**, 503-509.
- Steinberg, G. (2000). The cellular roles of molecular motors in fungi. *Trends Microbiol*, **8**, 162-168.
- Steinberg, G., Wedlich-Soldner, 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.
- Steuer, E. R., Wordeman, L., Schroer, T. A. und Sheetz, M. P. (1990). Localization of cytoplasmic dynein to mitotic spindles and kinetochores. *Nature*, **345**, 266-268.
- Straube, A., Enard, W., Berner, A., Wedlich-Soldner, R., Kahmann, R. und Steinberg, G. (2001). A split motor domain in a cytoplasmic dynein. *Embo J*, **20**, 5091-5100.
- Suomalainen, M., Nakano, M. Y., Boucke, K., Keller, S. und Greber, U. F. (2001). Adenovirus-activated PKA and p38/MAPK pathways boost microtubule-mediated nuclear targeting of virus. *Embo J*, **20**, 1310-1319.
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. und Higgins, D. G. (1997). The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res*, **25**, 4876-4882.
- Tirnauer, J. S. und Bierer, B. E. (2000). EB1 proteins regulate microtubule dynamics, cell polarity, and chromosome stability. *J Cell Biol*, **149**, 761-766.
- Tirnauer, J. S., O'Toole, E., Berrueta, L., Bierer, B. E. und Pellman, D. (1999). Yeast Bim1p promotes the G1-specific dynamics of microtubules. *J Cell Biol*, **145**, 993-1007.
- Tran, P. T., Marsh, L., Doye, V., Inoue, S. und Chang, F. (2001). A mechanism for nuclear positioning in fission yeast based on microtubule pushing. *J Cell Biol*, **153**, 397-411.
- 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**, 3703-3709.
- Tynan, S. H., Gee, M. A. und Vallee, R. B. (2000). Distinct but overlapping sites within the cytoplasmic dynein heavy chain for dimerization and for intermediate chain and light intermediate chain binding. *J Biol Chem*, **275**, 32769-32774.

- Urani, C., Chiesara, E., Galvani, P., Marabini, L., Santagostino, A. und Camatini, M. (1995). Benomyl affects the microtubule cytoskeleton and the glutathione level of mammalian primary cultured hepatocytes. *Toxicol Lett*, **76**, 135-144.
- Vaisberg, E. A., Koonce, M. P. und McIntosh, J. R. (1993). Cytoplasmic dynein plays a role in mammalian mitotic spindle formation. *J Cell Biol*, **123**, 849-858.
- Valetti, C., Wetzel, D. M., Schrader, M., Hasbani, M. J., Gill, S. R., Kreis, T. E. und Schroer, T. A. (1999). Role of dynactin in endocytic traffic: effects of dynamitin overexpression and colocalization with CLIP-170. *Mol Biol Cell*, **10**, 4107-4120.
- Valverde, M. E., Paredeslopez, O., Pataky, J. K. und Guevaralara, F. (1995). Huitlacoche (*Ustilago-Maydis*) as a Food Source - Biology, Composition, and Production. *Crit Rev Food Sci*, **35**, 191-229.
- Vaughan, K. T., Tynan, S. H., Faulkner, N. E., Echeverri, C. J. und Vallee, R. B. (1999). Colocalization of cytoplasmic dynein with dynactin and CLIP-170 at microtubule distal ends. *J Cell Sci*, **112 (Pt 10)**, 1437-1447.
- Vaughn, K. C. und Harper, J. D. (1998). Microtubule-organizing centers and nucleating sites in land plants. *Int Rev Cytol*, **181**, 75-149.
- Verde, F., Labbe, J. C., Doree, M. und Karsenti, E. (1990). Regulation of microtubule dynamics by Cdc2 protein kinase in cell-free extracts of *Xenopus* eggs. *Nature*, **343**, 233-238.
- Vorobjev, I. A., Svitkina, T. M. und Borisy, G. G. (1997). Cytoplasmic Assembly of Microtubules in Cultured Cells. *Journal of Cell Science*, **110**, 2635-2645.
- Wang, J., Holden, D. W. und Leong, S. A. (1988). Gene transfer system for the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**, 865-869.
- Wang, Z. und Sheetz, M. P. (2000). The C-terminus of tubulin increases cytoplasmic dynein and kinesin processivity. *Biophys J*, **78**, 1955-1964.
- Waterman-Storer, C. M. und Salmon, E. D. (1997). Actomyosin-based retrograde flow of microtubules in the lamella of migrating epithelial cells influences microtubule dynamic instability and turnover and is associated with microtubule breakage and treadmilling. *J Cell Biol*, **139**, 417-434.
- 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.
- Wedlich-Söldner, R., Schulz, I., Straube, A. und Steinberg, G. (2002a). Dynein Supports Motility of Endoplasmic Reticulum in the Fungus *Ustilago maydis*. *Mol Biol Cell*, **13**, 965-977.

- Wedlich-Söldner, R., Straube, A., Friedrich, M. W. und Steinberg, G. (2002b). A balance of KIF1A-like kinesin and dynein organizes early endosomes in the fungus *Ustilago maydis*. *Embo J*, **21**, 2946-2957.
- Weinzierl, G. (2001). Isolierung und Charakterisierung von Komponenten der b-vermittelten Regulationskaskade in *Ustilago maydis*. Dissertation, Philipps-Universität, Marburg.
- Wilkie, G. S. und Davis, I. (2001). Drosophila wingless and pair-rule transcripts localize apically by dynein-mediated transport of RNA particles. *Cell*, **105**, 209-219.
- Xiang, X., Han, G., Winkelmann, D. A., Zuo, W. und Morris, N. R. (2000). Dynamics of cytoplasmic dynein in living cells and the effect of a mutation in the dynactin complex actin-related protein Arp1. *Curr Biol*, **10**, 603-606.
- Xiang, X., Roghi, C. und Morris, N. R. (1995). Characterization and localization of the cytoplasmic dynein heavy chain in *Aspergillus nidulans*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 9890-9894.
- Yamamoto, A., Tsutsumi, C., Kojima, H., Oiwa, K. und Hiraoka, Y. (2001). Dynamic behavior of microtubules during dynein-dependent nuclear migrations of meiotic prophase in fission yeast. *Mol Biol Cell*, **12**, 3933-3946.
- Yanisch-Perron, C., Vireire, J. und Messing, J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 verctors. *Gene*, **33**, 103-119.
- Yvon, A. M. und Wadsworth, P. (1997). Non-centrosomal microtubule formation and measurement of minus end microtubule dynamics in A498 cells. *J Cell Sci*, **110**, 2391-2401.

Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei Gero für die fruchtbare Zusammenarbeit bedanken, für seine Begeisterung, Diskussionsfreudigkeit und die Freiheiten, die er mir ließ. Die „Forschung an der Weltspitze“ hat viel Spaß gemacht und mir das zellbiologische Denken gelehrt.

Ich danke Regine Kahmann für die Möglichkeit meine Doktorarbeit in Ihrer Abteilung anfertigen zu können und für ihre großzügige Unterstützung unserer Arbeit.

Frau Renkawitz-Pohl danke ich für das Zweitgutachten, Herrn Batschauer und Michael Bölker für die Beteiligung als Mitglieder Prüfungskommission.

Zudem möchte ich allen „Kahmännern und –frauen“ für die schöne und abwechslungsreiche Zeit in München und Marburg danken. Sie alle zu nennen, würde zu weit führen. In besonderer Erinnerung werden aber Irene, Schubi, Tom, Lubi, Harald, Tanja, David, Christoph, Christine, Faramir, Roland, Heine, Abram, Philip, Roland, Julia, Siegi, Gerhard, Alex, Olli, Jörg, Feldi, Georgi, Helle, die Isabellen, Dani, Inga, Gagan, Christiane, der Dreihäuser Philip, Goldlökchen, Heiko, Katrin und und und bleiben.

Mein Dank gilt zudem meiner Familie, meiner Mutter für ihre Wärme und die frühe Bekanntmachung mit den Kleinstlebewesen, meinem Vater für die bedingungslose Unterstützung, meinem großen Schwesterchen für ihre Liebe und meine passgenaue Umnähung und Elly für so viel Sonnenschein.

Danken möchte ich auch Ecki für seine Freundschaft, wegweisende Gespräche, Rettung in der Not und die Offenheit, die uns so nahe bringt.

Zu guter Letzt gilt Daniel mein herzlicher Dank für die Unterstützung und Fürsorge im letzten Jahr, für so viel Verständnis und Geduld mit mir und meiner Arbeit und für seine grenzenlose Liebe, die mir die letzten Monate der Doktorarbeitsphase trotz irrsinnig viel Arbeit nicht nur erträglich, sondern auch noch schön gemacht haben.

Vielen Dank!

Lebenslauf

Personalien		Anne Straube Geboren am 17.07.1975 in Halle/Saale
Schulbildung	1982-1984	Polytechnische Oberschule „Juri Gagarin“, Halle-Neustadt
	1984-1990	Polytechnische Oberschule mit erweitertem Russischunterricht „N. K. Krupskaja“, Halle-Neustadt
	1990-1994	Spezialschule mathematisch-naturwissenschaftlich-technischer Richtung „Ernst Hausmann“, Halle-Neustadt seit 1992: mathematisch-naturwissenschaftliches Gymnasium „Georg Cantor“, Halle/Saale Abschluss: Abitur, Gesamtnote 1,0
Studium	1994-1999	Studium der Biochemie/Molekularbiologie an der Universität Hamburg mit dem Hauptfach Biochemie/Molekularbiologie, Nebenfach Mikrobiologie, Schwerpunkt Molekularbiologie der Pflanzen Abschluß: Diplom in Biochemie, Gesamtnote „sehr gut“
	10/98-3/99	Diplomarbeit am Botanischen Institut der Universität Hamburg Thema: REMI-Mutagenese und Genzerstörung durch homologe Rekombination bei dem gerstepathogenen Pilz <i>Pyrenophora</i> <i>teres</i> . Betreuer: Prof. W. Schäfer
Promotion	1999-2002	Doktorarbeit am Institut für Genetik und Mikrobiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München und an der Philipps- Universität Marburg Thema: Struktur und zelluläre Funktionen von cytoplasmatischem Dynein und Organisation des Mikrotubuli- Cytoskeletts in <i>Ustilago maydis</i> . Betreuer: PD Dr. Gero Steinberg