

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Vererbung und Positionierung von Mitochondrien:
Analyse der Interaktion von Mitochondrien mit
Mikrotubuli im filamentösen Pilz
*Neurospora crassa***

von
Florian Fuchs
aus
Stuttgart

München
2004

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von §13 Abs. 3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom 29.01.1998 von Prof. Dr. Dr. W. Neupert (Fachvertreter Prof. Dr. R. P. Jansen) betreut.

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbstständig, ohne unerlaubte Hilfsmittel erarbeitet.

München, den 28.09.2004

Dissertation eingereicht am: 13.08.2004

1. Gutachter: Prof. Dr. Dr. W. Neupert
2. Gutachter: Prof. Dr. R. P. Jansen

Tag der mündlichen Prüfung: 28.09.2004

1 Inhaltsverzeichnis

1	Inhaltsverzeichnis.....	3
2	Abkürzungen	8
3	Einleitung.....	11
3.1	Das Zytoskelett als essenzieller Bestandteil eukaryotischer Zellen	11
3.2	Molekulare Motoren des Zytoskeletts	12
3.2.1	Mikrotubuli-assoziierte Motorenzyme.....	13
3.2.1.1	Kinesin.....	13
3.2.1.2	Dynein	16
3.3	Interaktionsmodelle für Kinesin-vermittelten Vesikeltransport	16
3.4	Verwendung einfacher Modellorganismen zum Studium der Funktion von Kinesin	19
3.5	Motorvermittelter Transport von Mitochondrien	22
3.5.1	Funktion von Mitochondrien	22
3.5.2	Lokalisation und Morphologie von Mitochondrien.....	23
3.5.3	Transport von Mitochondrien	24
3.5.4	Aufrechterhaltung mitochondrialer Gestalt und Positionierung	26
3.6	Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit.....	27
4	Material und Methoden.....	29
4.1	Methoden der Molekularbiologie.....	29
4.1.1	Verwendete Plasmide	29
4.1.2	Verwendete Oligonukleotide	30
4.1.3	Isolierung und Reinigung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	31
4.1.4	Konzentrationsbestimmung von DNA.....	32
4.1.5	Amplifizierung von DNA-Fragmenten mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	32
4.1.6	Enzymatische Modifikationen von DNA.....	33
4.1.6.1	Restriktionsverdau von DNA.....	33
4.1.6.2	Dephosphorylierungen von DNA-Fragmenten mit alkalischer Phosphatase.....	33
4.1.6.3	Ligation von DNA-Fragmenten mit T4-Ligase	33
4.1.6.4	Zwischenklonierung von DNA-Fragmenten.....	33
4.1.7	Reinigung und Analyse von DNA	34
4.1.7.1	Phenolextraktion und Ethanol-fällung	34
4.1.7.2	Gelelektrophorese von DNA	34
4.1.7.3	Isolierung von DNA aus Agarosegelen	35
4.1.8	Transformation von Mikroorganismen mit Plasmid-DNA	35
4.1.8.1	Präparation von elektrokompenten <i>E. coli</i> -Zellen.....	35

4.1.8.2	Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen durch Elektroporation.....	35
4.1.9	Klonierung der verwendeten Plasmide.....	36
4.2	Methoden der Hefegenetik	39
4.2.1	Kultivierung von <i>S. cerevisiae</i>	39
4.2.2	Transformation von Hefe.....	40
4.3	Molekularbiologische Arbeiten mit <i>N. crassa</i>.....	41
4.3.1	Kultivierung von <i>N. crassa</i>	41
4.3.2	Gewinnung von Konidien.....	41
4.3.3	Anzucht von Hyphen.....	42
4.3.4	Konservierung der Hyphen durch Silikattrocknung.....	42
4.3.5	Herstellung von Sphäroplasten.....	42
4.3.6	Transformation von Sphäroplasten.....	43
4.3.7	Erzeugung von homokaryotischen Stämmen.....	43
4.3.7.1	Initiierung von Mikrokonidien.....	44
4.3.7.2	Kreuzung von <i>N. crassa</i>	44
4.3.8	Isolation genomischer DNA aus <i>N. crassa</i>	45
4.3.9	Transfer von DNA auf Nylon-Membranen.....	45
4.3.10	Analyse von DNA-Blots durch Hybridisierung mit Digoxigenin-markierten DNA- Sonden.....	46
4.3.11	Herstellung der <i>nkin2</i> -Disruptionstämmen.....	49
4.3.12	Verwendete Neurosporastämme.....	50
4.4	Methoden der Zellbiologie.....	50
4.4.1	Gewinnung von Gesamtzellprotein aus <i>N. crassa</i>	50
4.4.2	Isolation von Mitochondrien aus <i>N. crassa</i>	51
4.4.3	Aufreinigung von Mitochondrien mittels Saccharosegradientenlauf.....	52
4.4.4	Isolierung von mitochondrialen Außenmembranvesikeln.....	52
4.5	Methoden der Proteinchemie.....	53
4.5.1	Reinigung rekombinanter Proteine mit His-Anhang aus <i>E. coli</i>	53
4.5.2	Reinigung rekombinanter Proteine mit GST-Anhang aus <i>E. coli</i>	54
4.5.3	Reinigung von Proteinen aus Einschlusskörpern.....	54
4.5.4	Denaturierende Fällung von Proteinen mit Trichloressigsäure.....	55
4.5.5	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford.....	55
4.5.6	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen (SDS-PAGE).....	56
4.5.7	Silberfärbung nach Blum.....	56
4.5.8	Coomassiefärbung von Proteingelen.....	58
4.5.9	Transfer von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen.....	58
4.6	Immunologische Methoden.....	58
4.6.1	Gewinnung polyklonaler Antiseren.....	58
4.6.1.1	Auswahl der verwendeten Antigene.....	59
4.6.2	Kopplung von Antikörpern an eine Säulenmatrix.....	60

4.6.3	Affinitätsreinigung von Antikörpern	60
4.6.4	Immunologischer Nachweis von Proteinen auf Nitrozellulose-Membranen	61
4.6.5	Immunfällung von Proteinen	62
4.6.5.1	Immunfällung unter stringenten Bedingungen.....	62
4.6.5.2	Koimmunfällung unter milden Bedingungen	62
4.7	Biochemische Methoden	63
4.7.1	Isolation von Tubulin.....	63
4.7.2	Polymerisierung von Mikrotubuli.....	64
4.7.3	Herstellung von Rhodamin-gefärbten Tubulin	64
4.7.4	Biochemisches <i>in vitro</i> -Bindungstestsystem	66
4.8	Mikroskopische Methoden	69
4.8.1	Fluoreszenzmikroskopie	69
4.8.2	Interaktionsanalyse von Mitochondrien und Mikrotubuli mittels Fluoreszenzmikroskopie.....	70
4.8.3	Beobachtung von Hyphenwachstum und intrazellulärer Transportvorgänge	70
4.8.4	Organellenfärbung mit Hilfe von fluoreszierenden Farbstoffen	70
4.9	Geräte, Chemikalien und Enzyme	71
4.9.1	Geräte.....	71
4.9.2	Chemikalien und Verbrauchsmaterial.....	72
5	Ergebnisse	74
5.1	Expression von GFP in Mitochondrien des filamentösen Pilzes <i>Neurospora crassa</i>	74
5.1.1	Herstellung eines Plasmides zur Visualisierung von Mitochondrien mit GFP (<i>Green Fluorescent Protein</i>) in <i>N. crassa</i>	74
5.1.2	Herstellung eines mtGFP-exprimierenden <i>Neurospora</i> -Stammes	76
5.2	<i>In vitro</i>-Testsysteme zum Studium der Interaktion von Mitochondrien von <i>N. crassa</i> und Mikrotubuli.....	78
5.2.1	Entwicklung eines biochemischen <i>in vitro</i> -Testsystems zur Analyse der Interaktion von Mitochondrien und Mikrotubuli	78
5.2.2	Fluoreszenzbasiertes Testsystem zur Bindung von Mitochondrien an Mikrotubuli	79
5.3	Biochemische Grundlagen der Interaktion von Mitochondrien und Mikrotubuli	81
5.3.1	Die Bindung von Mitochondrien an Mikrotubuli wird von ATP-abhängigen Proteinen vermittelt.	81
5.3.2	Die Interaktion von Mitochondrien und Mikrotubuli wird durch peripher mit der mitochondrialen Außenmembran assoziierten Proteinen vermittelt	82
5.3.3	Die Bindung von Mitochondrien an Mikrotubuli wird in <i>N. crassa</i> nicht von Mmm1 vermittelt.	84
5.4	Beteiligung Kinesin-verwandter Proteine an der Interaktion von Mitochondrien mit Mikrotubuli.....	85
5.4.1	Das <i>nkin2</i> -Gen	86
5.4.2	Das <i>nkin3</i> -Gen	89

5.4.3	Subzelluläre Lokalisation von Nkin2 und Nkin3.....	89
5.4.4	Charakterisierung der Assoziation von Nkin2 mit der mitochondrialen Außenmembran	91
5.4.5	Nkin2 ist an der Interaktion von Mitochondrien mit Mikrotubuli beteiligt	92
5.4.6	Herstellung einer <i>Δnkin2</i> -Deletionsmutante	95
5.4.6.1	Erzeugung eines heterokaryotischen <i>Δnkin2</i> -Stammes	95
5.4.6.2	Isolierung eines homokaryotischen <i>Δnkin2</i> -Stammes	98
5.4.7	Phänotypische Analyse der <i>Δnkin2</i> -Disruptionsmutante	100
5.4.8	Phänotypische Untersuchung des <i>Δnkin2</i> -Disruptionsstamms mit Hilfe von organellenspezifischen Fluoreszenzfarbstoffen.....	101
5.4.9	Die Deletion von <i>nkin2</i> besitzt Einfluss auf die Bewegung von Mitochondrien	103
5.4.10	Kompensation des Verlustes von Nkin2 durch Überexpression von Nkin3 als Zeichen funktioneller Redundanz der Unc104-Kinesine aus <i>Neurospora</i>	104
5.4.11	Die Expression von Nkin3 in der <i>Δnkin2</i> -Mutante ist strikt reguliert und vom Hyphenwachstum abhängig.....	106
5.4.12	In der <i>Δnkin2</i> -Mutante wird die Interaktion von Mitochondrien mit Mikrotubuli von Nkin3 vermittelt	107
5.5	Durchmusterung einer Hefedeletionsdatenbank nichtessenzieller Gene nach Mutanten mit veränderter Mitochondrienmorphologie	110
6	Diskussion	114
6.1	Die molekulare Maschinerie des Mikrotubuli-abhängigen Mitochondrientransports in <i>Neurospora</i>.....	114
6.1.1	Die Beteiligung eines Kif1ba-homologen Motorproteins an der Interaktion von Mitochondrien mit Mikrotubuli in <i>Neurospora</i>	114
6.1.2	Nkin3 vermittelt die Positionierung von Mitochondrien entlang von Mikrotubuli nach Depletion von Nkin2	115
6.1.3	Weshalb besitzt <i>Neurospora</i> zwei Motorproteine, die eine Interaktion von Mitochondrien mit dem Zytoskelett vermitteln können?.....	116
6.1.4	Wodurch wird die Wahl des für die Positionierung von Mitochondrien eingesetzten Motorproteins bestimmt?.....	117
6.1.5	Werden physiologisch wichtige Transportprozesse durch redundante Motorproteine vermittelt?	118
6.1.6	Mögliche Interaktionsmodelle des Kinesin-vermittelten Transportes von Mitochondrien in <i>Neurospora</i>	119
6.1.7	Die Rolle von Mmm1 in der Aufrechterhaltung der mitochondrialen Morphologie in <i>Neurospora</i>	122
6.2	Einsatz von GFP-Fusionsproteinen zur spezifischen Visualisierung von subzellulären Strukturen in <i>Neurospora</i>	123
6.3	Funktion der im Rahmen dieser Arbeit identifizierten Mutanten an der mitochondrialen Morphogenese in <i>S. cerevisiae</i>	124
6.3.1	Die Funktion von <i>MDM34/MMM2</i> in der mitochondrialen Morphogenese	124

6.3.2	Die Rolle von <i>TOM7</i> in der Morphogenese von Mitochondrien	125
6.3.3	<i>MDM37/PCP1/RBD1</i> spielt eine Rolle in der Regulation der Funktion von Mgm1 und besitzt deshalb Einfluss auf die mitochondrialen Morphogenese.....	125
7	Zusammenfassung.....	127
8	Anhang.....	129
9	Literaturverzeichnis.....	141

2 Abkürzungen

°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	ATP-hydrolysierendes Enzym
bp	Basenpaare
Ben	Benomyl
BSA	Rinderserumalbumin
bidest.	zweifach destilliert
CIP	Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm
cm	Zentimeter
DAPI	4'-6-Diamidino-2-Phenylindol
DDM	Dodecylmaltosid
ddNTP	Didesoxinucleosidtriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat
dTTP	Desoxythymintriphosphat
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
dest.	destilliert
DIG	Digoxigenin
Di(OC ₆) ₃	3,3'-Dihexyloxacarbocyanine iodid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DTT	Dithiotreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
xg	Vielfaches der Erdbeschleunigung
GDP	Guanosindiphosphat
GFP	Grün-Fluoreszierendes-Protein
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethanolsulfat
his	Histidin
HygB	Hygromycin B
IgG	Immunglobulin G
IDF	Intermediate Density Fraction
IM	Innenmembran
IMS	Intermembranraum
IP	Immunopräzipitation
IPTG	Isopropyl-β-thiogalactopyranosid
kDa	kilo-Dalton
KIF	Kinesin Superfamilie

KPi	Kaliumphosphat
LB	Nährmedium nach Luria und Bertani
β-ME	β-Mercaptoethanol
M	Mol
mA	Milliampere
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mt	mitochondrial
MOPS	N-Morpholinoethansulfonsäure
MW	Molekulargewicht
Myo	Myosin
<i>N. crassa</i>	<i>Neurospora crassa</i>
Nkin	<i>Neurospora</i> kinesin
Ni-NTA	Nickel-Nitriloacetat
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
OM	Außenmembran
OMV	Außenmembranvesikel
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Pan	Panthotenat
PAS	PolyA-Sepharose
PBS	Phosphat-gepufferter-Lösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PI	Präimmenserum
PITC	Phenylisothiocyanat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RNA	Ribonucleinsäure
RNase	Ribonuclease
RT	Raumtemperatur
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SEM	Saccharose-EDTA-MOPS-Puffer
STI	Sojabohnen-Trypsin-Inhibitor
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Essigsäure-EDTA-Puffer
TBE	Tris-Borsäure-EDTA-Puffer
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
Tim	Komponenten der Proteintranslokase der mitochondrialen Innenmembran
Tom	Komponenten der Proteintranslokase der mitochondrialen Außenmembran
TOM	Translokase der mitochondrialen Außenmembran
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-ethylendiamin
TX-100	Triton X-100
U	Unit
Upm	Umdrehungen pro Minute

UTP	Uridintriphosphat
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
WT	Wildtyp
YPD	Hefemedium aus Hefeextrakt, Pepton und Dextrose
YPG	Hefemedium aus Hefeextrakt, Pepton und Glucose
μl	Mikroliter

3 Einleitung

Die Vielzahl der innerhalb der eukaryotischen Zelle ablaufenden biochemischen Prozesse ist auf eine Reihe unterschiedlicher Kompartimente verteilt. Diese Prozesse sind innerhalb der Zelle auf bestimmte Kompartimente begrenzt. Die Kompartimentierung von metabolischen Prozessen bildete sich während der Evolution aus, um eine optimale Funktion und Regulation des Stoffwechsels zu ermöglichen. Die Kompartimente sind von Lipidmembranen umgeben. Dabei unterscheidet man Kompartimente, die von einer einfachen Membran umgeben sind (wie z.B. Endoplasmatisches Retikulum, Golgi-Apparat, Peroxisomen und Lysosomen), und solche, die einen komplexeren Aufbau besitzen (z.B. Zellkern, Mitochondrien und Chloroplasten). Die Proteinsynthese erfolgt hauptsächlich im Zytosol. Der Transport der im Zytosol synthetisierten, kernkodierten Proteine in die Zielkompartimente erfolgt durch spezifische Transportsysteme. Mitochondrien und Chloroplasten besitzen ein eigenes Genom und eine eigene Proteinsynthesemaschinerie. Proteine, welche auf der mitochondrialen DNS (mtDNS) kodiert sind, können von den Mitochondrien selbst synthetisiert werden. Der prozentuale Anteil der von den Mitochondrien selbst synthetisierten Proteine beträgt beispielsweise in der Bäckerhefe nur ca. 1 %. Die restlichen in den Mitochondrien lokalisierten Proteine sind kernkodiert und werden aus dem Zytosol in die Mitochondrien importiert.

3.1 Das Zytoskelett als essenzieller Bestandteil eukaryotischer Zellen

Eukaryotische Zellen besitzen die Fähigkeit, die in ihrem Zellinneren enthaltenen Komponenten räumlich zu organisieren. Darüber hinaus können viele Zellen verschiedene Formen annehmen und koordinierte Bewegungen durchführen. Alle genannten Fähigkeiten werden durch das Zytoskelett ermöglicht. Bei der eukaryotischen Zelle lassen sich sehr dynamische und zielgerichtete Bewegungsvorgänge in Form von Organellentransport mikroskopisch beobachten und unterscheiden. Diese Prozesse sind für die Gesamtfunktion einer Zelle von großer Wichtigkeit. Hierbei liefert das Zytoskelett die für die genannten Prozesse benötigte Maschinerie. Dabei ist es nicht nur für die räumliche Organisation der Zellkompartimente verantwortlich, sondern es vermittelt auch den Stoffaustausch zwischen den Organellen.

Drei Proteinfilamenttypen bilden das Zytoskelett: die Intermediärfilamente, die Mikrotubuli und die Aktinfilamente. Eukaryotische Zellen enthalten in der Regel ein mit dem Zellkern assoziiertes Organisationszentrum. Von diesem ausgehend organisieren sich

die Mikrotubuli strahlenförmig mit ihrem dynamischen Plus-Ende zur Plasmamembran hin. Mikrotubuli übernehmen oft den Transport über weite Strecken und sind für die Lokalisation von Golgikomplex und ER verantwortlich. Darüber hinaus besitzen sie eine wichtige Funktion in der Kompartimentierung des endolysosomalen Weges. Das Aktinzytoskelett spielt bei der Endozytose und Sekretion, sowie bei Membranfusionsereignissen eine Rolle und ist vorrangig in der Zellperipherie und entlang von Membranen lokalisiert. Intermediärfilamente durchziehen das gesamte Zytoplasma mit einem Netzwerk, welches den Zellkern umhüllt und sich von dort aus in die Zellperipherie erstreckt. Dieser Filamenttyp ist zudem häufig in der Zellmembran verankert und an der Zell-Zell-Verbindung beteiligt.

In jüngerer Zeit finden sich immer mehr Hinweise auf stark überlappende und interagierende Bereiche und Funktionen der unterschiedlichen Filamentsysteme (Gavin, 1997; Goode *et al.*, 2000). Diese Interaktionen sind teilweise vom Zelltyp abhängig. Der Vesikeltransport im Axon als Beispiel erfolgt im Wesentlichen entlang von Mikrotubuli (Goldstein und Yang, 2000, Deacon *et al.*, 2003). Jedoch gibt es zunehmend Hinweise auf einen mikrofilamentabhängigen Transport von Vesikeln im Axon (DePina und Langford, 1999; Schah und Cleveland, 2002; Brown *et al.*, 2004). Morris und Hollenbeck konnten zeigen, dass die bidirektionale Motilität von Mitochondrien innerhalb von Neuronen das Resultat eines ausbalancierten Gleichgewichtes von Bewegungen entlang beider Filamentsysteme ist (Morris und Hollenbeck, 1993; Morris und Hollenbeck, 1995).

3.2 Molekulare Motoren des Zytoskeletts

Molekulare Motoren sind biologische Maschinen, welche für die meisten Formen von Bewegung in Zellen verantwortlich sind. Im Zytoplasma lassen sich drei Arten von molekularen Motoren unterscheiden: Myosine benutzen das Aktinzytoskelett, wohingegen Kinesine und Dyneine entlang des Mikrotubuliskeletts ihre Aufgaben verrichten. Vertreter dieser drei Familien bilden eine Grundausstattung von molekularen Motoren, welche bei dem Transport von Membranvesikeln involviert sind (Abb. 1).

Bei Kinesin bewirkt die Hydrolyse von ATP eine kleine Konformationsänderung konservierter Strukturelemente in unmittelbarer Nähe der ATP-Bindungsstelle. Diese Konformationsänderung führt zu weiteren koordinierten Strukturveränderungen in der Mikrotubulibindungsstelle, welche durch Wechselwirkung mit strukturellen Elementen des C-Terminus mechanisch verstärkt werden. Bei konventionellen Kinesinen bestehen die als „Halsbereich“ bezeichneten strukturellen Elemente des C-Terminus aus einem 10

Aminosäuren kurzen Abschnitt, welcher entweder an der Motordomäne andockt oder frei vorliegt. Es wird angenommen, dass die Beweglichkeit des Halsbereiches im Zusammenspiel mit einer Drehung von Elementen der Motordomäne die Kinesinbewegung antreibt (Vale und Milligan, 2000; Schliwa und Woehlke, 2001). Chemische Energie wird auf diese Weise in gerichtete Bewegung umgesetzt.

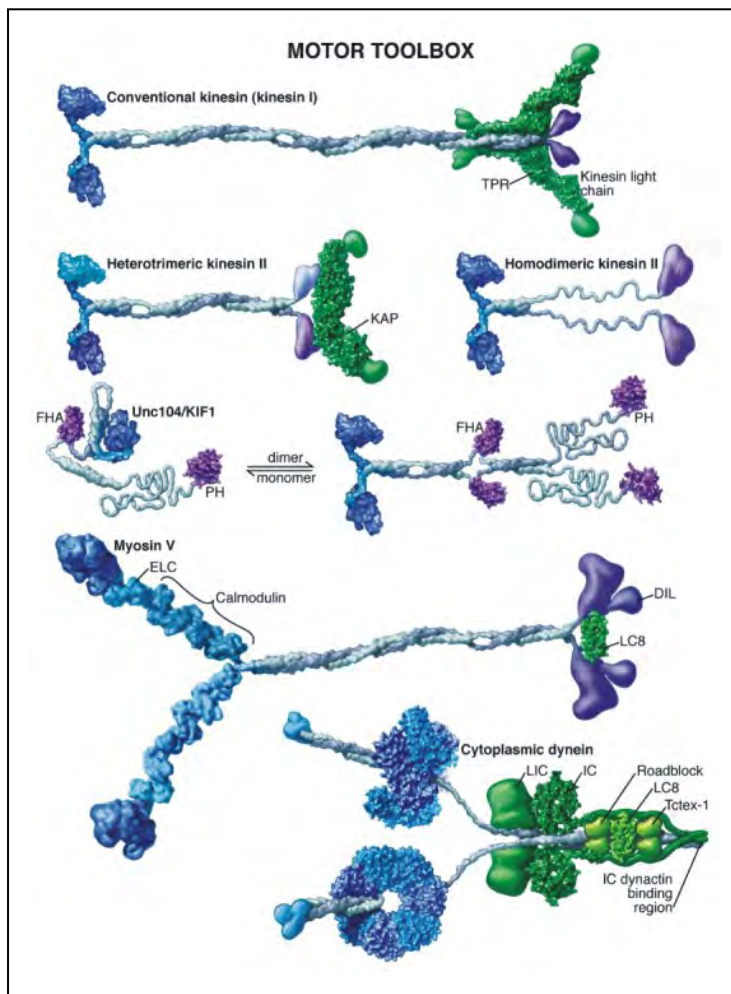


Abb. 1. „Toolbox“ molekularer Motoren (Vale, 2003)

Die dargestellten Strukturen wurden aus atomarer Röntgenstrukturaufklärung abgeleitet. Die fünf dargestellten Membranvesikel-transportierenden Motoren stellen die Grundausrüstung an molekularen Motoren dar, welche bei dem Transport von Vesikeln und Organellen involviert sind. Vertreter der jeweiligen Motorfamilie sind schon in einfachen Eukaryoten enthalten, wobei die Komplexität dieser Motoren in höheren Eukaryoten aufgrund von Genverdopplung und Gensplicing stark erhöht ist. Katalytische Einheiten der Motordomäne sind blau, Schwanzdomänen, welche Funktionen in der Bindung des zu transportierenden Objektes besitzen, sind lila dargestellt. Zur Darstellung des Aufbaus aus unterschiedlichen Domänen ist Dynein in einer Mischung aus blau und lila illustriert. Der Unc104-Motor kann sowohl als Monomer als auch als Dimer vorliegen, was durch das Gleichgewicht symbolisiert ist.

3.2.1 Mikrotubuli-assoziierte Motorenzyme

3.2.1.1 Kinesin

Das konventionelle Kinesin wurde 1985 entdeckt. Nachdem seine Bedeutung im axonalen Transport belegt worden war (Brady, 1985; Vale *et al.*, 1985), konnten schnell weitere Funktionen von Kinesin aufgedeckt werden. Die Lokalisation von konventionellem Kinesin in der mitotischen Spindel (Scholey *et al.*, 1985) diente zum Beispiel als Beleg für

eine Beteiligung von Kinesin an Prozessen der Mitose. Seit dieser Anfangszeit der Kinesinforschung hat die Zahl der bekannten Kinesine beständig zugenommen. Die hochkonservierte Motordomäne bildet das Element, welches die Kinesin-Superfamilie definiert. Zusätzliche Elemente außerhalb der Motordomäne werden zur Dimerisation von Kinesinmonomeren und zur Interaktion mit verschiedenen Proteinen benötigt.

Konventionelles Kinesin aus Tieren ist ein Heterotetramer aus zwei schweren und zwei leichten Ketten. Ursprünglich wurde das konventionelle Kinesin als KHC (*kinesin heavy chain*) bezeichnet, wohingegen Kinesine, welche keine schweren Ketten enthalten, als KRPs (*Kinesin-related proteins*) bezeichnet wurden. Die Motordomäne von konventionellen Kinesinen ist im N-terminalen Bereich der schweren Kette des konventionellen Kinesins lokalisiert (Yang *et al.*, 1990). Mit dem C-Terminus der schweren Kette, welche den „Schwanzbereich“ enthält, können die leichten Ketten interagieren. Sie werden für die Bindung des zu transportierenden Objekts an das Motorprotein benötigt und besitzen einen regulatorischen Einfluss auf die Aktivität der Motordomäne (Verhey *et al.*, 1998; Stock *et al.*, 1999; Seiler *et al.*, 2000). Darüber hinaus wurde vorgeschlagen, dass sie die Spezifität der zu transportierenden Fracht festlegen (Khodjakov *et al.*, 1998). C-terminal der Motordomäne befindet sich der „Halsbereich“. Er umfasst ca. 40 Aminosäuren und hat regulatorische Einflüsse auf die Bewegungsrichtung und -geschwindigkeit des Motorproteins (Endow, 1999; Case *et al.*, 2000).

Der modulare Aufbau von Kinesin – bestehend aus Motordomäne, Hals und Schwanzbereich – ermöglicht eine große Variation in der Zusammensetzung des Motorproteins, wodurch sich Kinesine in 14 Familien gruppieren lassen (Dagenbach und Endow, 2004). Die Anzahl der Kinesine dieser Familien ist von Organismus zu Organismus unterschiedlich. Einen aktuellen Überblick über die Kinesin-Superfamilie zeigt die Abb. 2.

Innerhalb der Kinesin-Superfamilie wird die Zuordnung einzelner Kinesine zu einer Kinesin-Familie durch die Homologie der Motordomäne begründet (Hirokawa *et al.*, 1998). Die Mehrheit der Kinesine lässt sich als molekularer Motor mit zum Plus-Ende der Mikrotubuli gerichteter Bewegung beschreiben. Sie besitzen eine N-terminal oder zentral gelegene Motordomäne. Zusätzlich zu diesen Motoren gibt es eine weit geringere Anzahl an Kinesinen mit C-terminal gelegener Motordomäne, welche eine zum Minus-Ende der Mikrotubuli gerichtete Bewegung besitzen (Hirokawa, 1998; Hirokawa *et al.*, 1998).

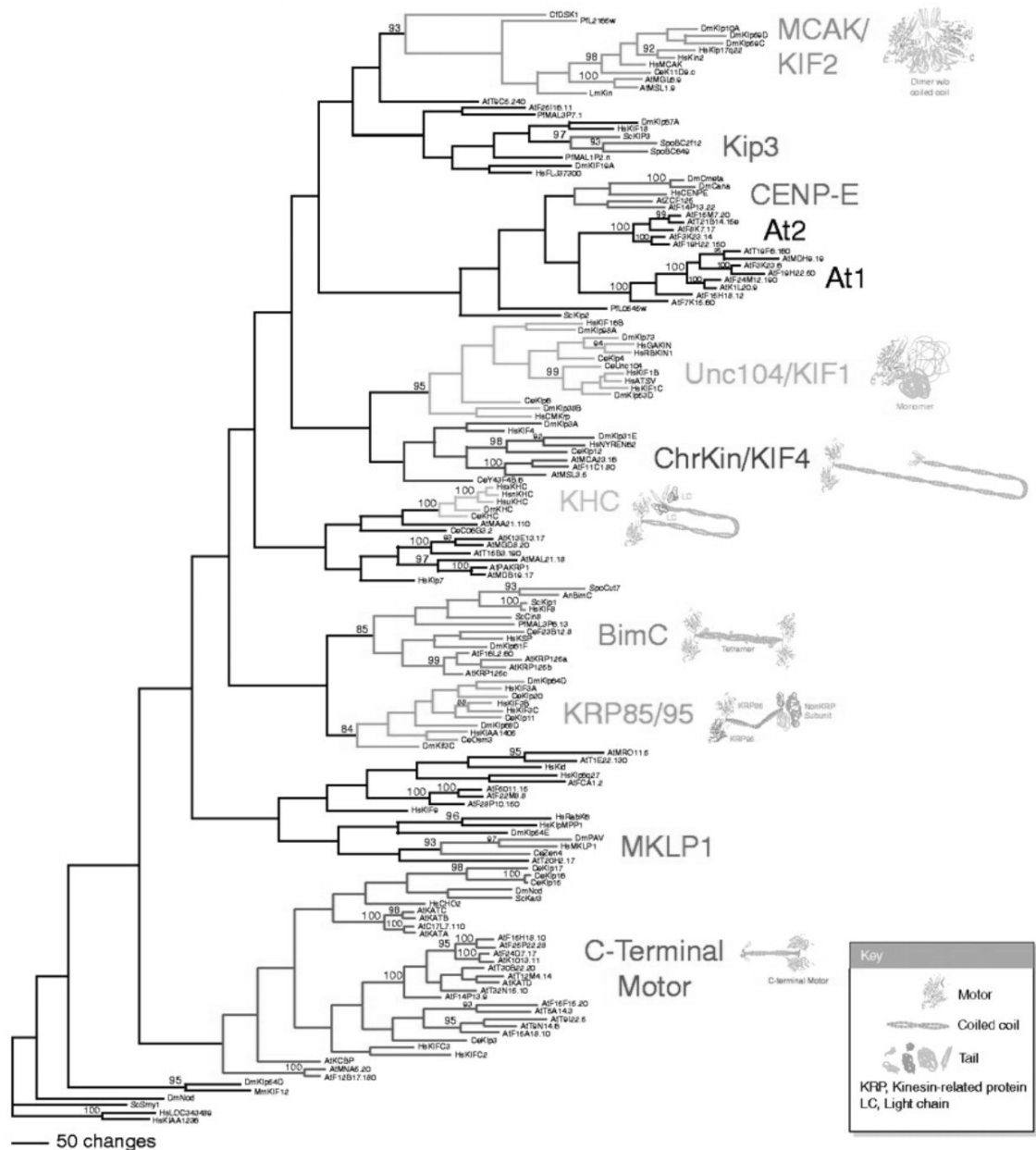


Abb. 2. Phylogenetischer Stammbaum der Kinesin-Superfamilie. Stand: Januar 2004. (Dagenbach und Endow, 2004)

Für einen aktuellen Überblick siehe: <http://www.blocks.fhrc.org/~kinesin/>.

Einige Kinesine sind monomere Motoren (Okada und Hirokawa, 1999), die meisten bilden jedoch Homo- (Bloom *et al.*, 1988) oder Heterooligomere (Cole, 1999), welche sich aufgrund verschiedener Strukturen im Schwanzbereich ausbilden können (Cole und Scholey, 1995). Nur wenige der Kinesine sind vollständig charakterisiert und ihre zellulären Aufgaben ermittelt. Ihre Funktionen reichen von der Beteiligung an der Spindelelongation (Heck, 1999; Sharp *et al.*, 2000) über den Transport von Organellen, mRNA und

Proteinkomplexen (Hirokawa, 1998; Brendza *et al.*, 2000) bis zum Transport von Chromosomen. Mitglieder einzelner Kinesin-Familien üben – soweit bekannt – gruppenspezifische Funktionen aus und sind durch die gleiche Proteinzusammensetzung charakterisiert. Zum Beispiel sind Kinesine der MCAK/KIF2-Familie an der Spindelentstehung und der Aufrechterhaltung während der Mitose beteiligt, wohingegen Kinesine der BimC-Familie zusammen mit Dynein an der Anaphase in der Mitose beteiligt sind (Kashina *et al.*, 1997). Kinesine der Unc104-Familie fungieren ausschließlich als Organellentransporter (Bloom, 2001a).

3.2.1.2 Dynein

Dynein wurde erstmals als ATPase in *Tetrahymena cilia* identifiziert (Gibbons und Rowe, 1965). Die Entdeckung seiner Eigenschaft als molekularer Motor folgte wesentlich später (Paschal *et al.*, 1987). Dynein ist aus zwei schweren Ketten, die die Motoraktivität besitzen, und einer Vielzahl mittelschwerer und leichter Ketten meist unbekannter Funktion aufgebaut.

Axonemale Dyneine erzeugen durch Bewegung von Mikrotubuli die Cilien- und Flagellenbewegung, wohingegen zytoplasmatische Dyneine an intrazellulären Transportvorgängen beteiligt sind, wie z.B. dem Kerntransport in filamentösen Pilzen oder Neuronen (Bloom, 2001b; Vallee *et al.*, 2001). In der Bäckerhefe ist zytoplasmatisches Dynein an der Positionierung der mitotischen Spindel und dem Transport von Membranvesikeln beteiligt (Hirokawa, 1998; Wedlich-Söldner *et al.*, 2002a).

Im Gegensatz zu der Vielzahl von Kinesin-Familien mit ihren vielfältigen zellulären Funktionen existieren von Dynein nur sehr wenige Familien. Die Evolution hat im Falle von Dynein offenbar eine andere Strategie verfolgt, um den Anforderungen verschiedenster Transportvorgänge gerecht zu werden. Diese Strategie besteht in der Interaktion des zytoplasmatischen Dyneins mit einer Vielzahl von heterogenen Untereinheiten, Bindungspartnern und assoziierten Proteinen. Einer Reihe von Dynein-Untereinheiten wird eine Rolle als Adaptermolekül zwischen Motor und zu transportierender Fracht zugeschrieben, und es gibt indirekte Hinweise auf spezifische zelluläre Funktionen in Abhängigkeit von Dynein und der mit ihm assoziierten Untergruppen (Susalka und Pfister, 2000; Vallee *et al.*, 2004).

3.3 Interaktionsmodelle für Kinesin-vermittelten Vesikeltransport

Vor einigen Jahren sah man die Vielfalt unterschiedlicher Kinesine als Folge evolutionärer Anpassung. Diese beinhaltete zum einen Genduplikation in Form der

konservierten Motordomäne und zum anderen die Variation unterschiedlicher Schwanzbereiche, um den gestiegenen Ansprüchen zellulärer Funktion zu entsprechen. Da alle Kinesine die konservierte Motordomäne enthielten, kann eine definierte zelluläre Funktion nur über eine spezifische Interaktion des C-terminalen Schwanzbereiches mit einem bestimmten Protein erreicht werden. Da Kinesine vielfältige zelluläre Funktionen aufweisen, sollte auch eine Vielzahl an Proteinen existieren, die mit den Kinesinen wechselwirken können.

Das Verständnis der Rolle von Kinesin im Transport von Organellen und Vesikeln setzt tief gehende Einblicke in die Regulation des Transportes und die Bindung des zu transportierenden Objektes an den molekularen Motor voraus. In beiden Fällen spielen Proteinbereiche außerhalb der Motordomäne und interagierende Proteine eine wesentliche Rolle. In den letzten Jahren wurden große Anstrengungen unternommen, Proteine zu identifizieren, welche mit dem Schwanzbereich von Kinesinen interagieren. Die identifizierten Proteine könnten dann als Verbindungsstück zwischen Motorprotein und dem zu transportierenden Objekt dienen.

Kinektin war das erste identifizierte Protein, welches konventionelles Kinesin mit Vesikeln des endoplasmatischen Retikulums verband (Kumar *et al.*, 1995). Die Genome von *Drosophila melanogaster* und *Caenorhabditis elegans* enthalten kein Kinektin-Homolog, weshalb Kinektin kein universeller Kinesinrezeptor sein kann. In der Folgezeit konnten weitere Interaktoren von Kinesin entdeckt werden (Klopfenstein *et al.*, 2000; Goldstein, 2001). Beispiele dafür sind der Nervenwachstumsfaktor *trk* (Kamal *et al.*, 2001), die Interaktionsproteine der JNK (Jun N-terminale Kinase), JIP1/2 und JIP3 (Verhey *et al.*, 2001), das Adaptorprotein β -Adaptin (Nakagawa *et al.*, 2000), das Fototransduktionsprotein Opsin (Marszalek *et al.*, 2000), das Amyloidvorläuferprotein APP (Kamal *et al.*, 2000) sowie das NMDA (N-Methyl-D-Aspartate) Bindeprotein *mlin-10* (Setou *et al.*, 2000). JIP1/2, β -Adaptin und *mlin-10* verbinden Motorproteine (konventionelles Kinesin, Kif13 und Kif17) mit vesikulären integralen Transmembranproteinen. Transmembranproteine wie Opsin oder APP stellen eine direkte Verbindung zwischen Kinesin oder auch Dynein mit dem Transportgut her.

Ein weiterer direkter – wenn auch sehr viel unspezifischer – Mechanismus für eine Interaktion mit Membranvesikeln, konnte für ein Mitglied der Unc104-Familie monomerer Kinesine belegt werden (Klopfenstein *et al.*, 2002). Bei diesem Mechanismus erfolgt die Bindung des Kinesins an die Vesikelmembran durch eine Interaktion der „PH (Pleckstrin homologe)“-Domäne mit der Phospholipiddoppelschicht der Vesikelmembran. Die

Membran muss Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat enthalten, damit sich die Interaktion ausbildet. Nach der aktuellen Vorstellung bewirkt die Interaktion mit Lipidrafts einen Zusammenschluss einzelner monomerer Kinesine, was wiederum die treibende Kraft für den Transport bildet (Klopfenstein *et al.*, 2002).

Als Ursache der bisher nur unzureichend erfolgten Zuordnung von zellulären Funktionen zu spezifischen Motorproteinen lässt sich im Falle des konventionellen Kinesins die Existenz mehrerer Isoformen von schweren und leichten Ketten anführen. Des Weiteren wird die Zuordnung durch das redundante Auftreten vieler Motoren (Cottingham und Hoyt, 1997), aber auch durch die Interaktion des Schwanzbereiches eines Motorproteins mit Proteinen anderer Motorfamilien erschwert. Als Beispiel kann das konventionelle Kinesin der Maus angeführt werden, welches *in vivo* mit Myosin VA interagiert. Diese beiden Motoren kolokalisieren innerhalb der Zelle. Eine Koordination mikrotubuliabhängigen Transports und aktinabhängiger Bewegungsprozesse würde durch diese direkte Interaktion verschiedener Motoren möglich (Huang *et al.*, 1999). Dieser Komplex kann unter anderem zur Koordination aufeinander folgender Transportprozesse entlang von Mikrotubuli und Mikrofilamenten dienen. Eine Zusammenfassung möglicher Interaktionen zwischen Motorprotein und zu transportierender Fracht findet sich in Abb. 3.

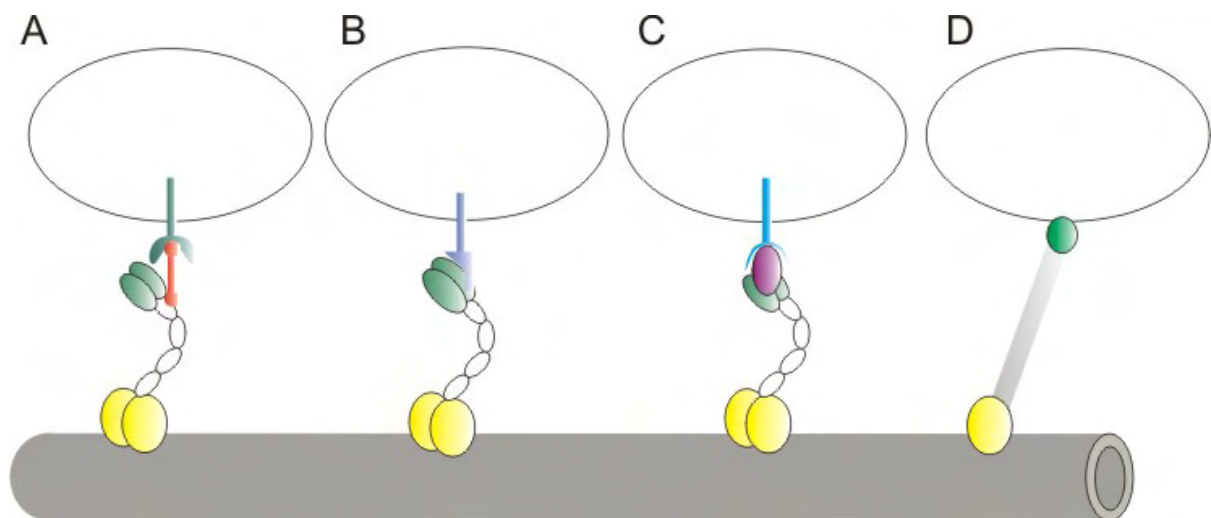


Abb. 3. Mögliche Motor-Fracht-Interaktionen

(A) Interaktion mit einem Transmembranrezeptor und der schweren Kette des konventionellen Kinesins, vermittelt durch ein Verknüpfungsprotein. (B) Interaktion zwischen einem Transmembranrezeptor und den leichten Ketten des konventionellen Kinesins. (C) Interaktion mit einem Transmembranrezeptor und den leichten Ketten des konventionellen Kinesins, ebenfalls vermittelt über ein Hilfsprotein. (D) Interaktion zwischen Phospholipiden der Vesikelmembran und der PH-Domäne von Vertretern der Kinesin Unc104-Familie.

3.4 Verwendung einfacher Modellorganismen zum Studium der Funktion von Kinesin

Viele biologische Fragestellungen lassen sich gut in einfachen Modellorganismen studieren, welche für zellbiologische, biochemische und genetische Methoden leicht zugänglich sind. Aufgrund der evolutionären Konservierung der grundlegenden zellbiologischen Prozesse lassen sich die gewonnenen Erkenntnisse sehr oft auf höhere Eukaryoten und den Menschen übertragen.

Die Hefe *S. cerevisiae* ist in vielfältiger Hinsicht ein exzellenter Modellorganismus, mit dem verschiedenste Fragestellungen untersucht werden können. Durch die vollständige Sequenzierung des Genoms ist der komplette Satz molekularer Motoren bekannt. Genetische Studien und zellbiologische Untersuchungen halfen die Beteiligung molekularer Motoren an der Exo- und Endozytose und der Meiose und Mitose zu verstehen. Das Hefegenom enthält sechs Kinesine, von denen alleine fünf an Bewegungsvorgängen in der Meiose und Mitose beteiligt sind. Die Entstehung und die Aufrechterhaltung der mitotischen Spindel werden durch das Zusammenspiel entgegengesetzt wirkender Kinesinmotoren reguliert. Zum Beispiel lassen sich Defekte in der Mitose, welche durch Mutationen in Vertretern der BimC-Familie resultieren, durch Deletion von Kinesinen der KAR3-Familie aufheben. Für die Vererbung von Organellen notwendige Transportvorgänge laufen in der Hefe entlang des Aktin-Zytoskeletts ab (Jacobs *et al.*, 1988; Simon und Pon, 1996). Aufgrund des nur sehr schwach ausgeprägten Mikrotubulsystems, dessen Ausdehnung schon wegen der geringen Größe der Zelle limitiert ist, ist die Bäckerhefe für das Studium des Organellentransports bzw. des gerichteten Langstreckentransports entlang von Mikrotubuli nicht geeignet.

Hinsichtlich dieser Fragestellung können filamentöse Pilze als Modellorganismen eingesetzt werden. Das Wachstum von filamentösen Pilzen findet in Form von stark elongierten Hyphen statt, wobei der Einbau von neuem Zellmaterial vorwiegend an der Hyphenspitze erfolgt (Gow und Gadd, 1994). In Analogie zum Axon findet hier ein Langstreckentransport vom Syntheszentrum im subapikalen Bereich zum Wachstumsort statt. Über den molekularen Mechanismus dieser intrazellulären Bewegung ist bis jetzt sehr wenig bekannt. Durch Untersuchungen mit Zytoskelettinhibitoren konnte ein Bild entwickelt werden, welches den höheren Eukaryotenzellen gleicht. Der gerichtete Langstreckentransport von Kernen, Vesikeln und Organellen ist eine wichtige Funktion, die im Wesentlichen ein Mikrotubuli-abhängiger Prozess ist und von Kinesin-Familienmitgliedern ausgeübt wird (Oakley und Morris, 1980; Steinberg und Schliwa,

1993). Das Aktinzytoskelett hingegen kontrolliert vorrangig die Organisation der Hyphenspitze und die Etablierung der Zellpolarität (Bachewich und Heath, 1998; Heath *et al.*, 2000; Brent Heath *et al.*, 2003). Die Aufrechterhaltung dieser Polarität scheint wiederum vom Mikrotubuli-Zytoskelett beeinflusst zu sein (Riquelme *et al.*, 1998).

Die Analyse der Genome verschiedener filamentöser Pilze ermöglichte eine Einteilung von Kinesin-verwandten Proteinen in wenigstens 10 Familien (Schoch *et al.*, 2003). Mit Ausnahme der Kinesin-Familien KRP85/95 und MCAK enthalten filamentöse Pilze alle der auch in höheren Eukaryoten vorkommenden Klassen.

Konventionelles Kinesin in höheren Eukaryoten, filamentösen Pilzen und der Spalthefe kann eine Vielzahl von Vesikeln und Organellen transportieren (Lehmler *et al.*, 1997; Seiler *et al.*, 1997; Steinberg *et al.*, 1998; Wu *et al.*, 1998; Brazer *et al.*, 2000). Der Verlust des konventionellen Kinesins in filamentösen Pilzen führt zu einer Vielzahl von Phänotypen. In *N. crassa* ist ein Defekt in der Kernverteilung und dem Transport von sekretorischen Vesikeln zu beobachten, in *Ustilago maydis* ist die Bildung von Vakuolen gestört, und die Deletion von konventionellem Kinesin in *Aspergillus nidulans* führt zu einem Defekt im gerichteten Wachstum und der Kernverteilung (Steinberg *et al.*, 1998; Wu *et al.*, 1998; Suelmann und Fischer, 2000a; Requena *et al.*, 2001).

Im Gegensatz zu höheren Organismen besitzt das konventionelle Kinesin filamentöser Pilze keine leichten Ketten. Aus diesem Grunde muss die Interaktion von schwerer Kette und Schwanzregion in konventionellen Kinesinen filamentöser Pilze einem anderen Mechanismus folgen als im Kinesin höherer Eukaryoten (Steinberg und Schliwa, 1995; Steinberg, 2000). Kinesine filamentöser Pilze zeigen *in vitro* eine vier- bis fünffach höhere Bewegungsgeschwindigkeit und eine höhere Prozessivität als tierische Vertreter (Grummt *et al.*, 1998; Kirchner *et al.*, 1999; Lakämper *et al.*, 2003). Eine weitere Besonderheit des konventionellen Kinesins in *N. crassa* besteht in dem direkten Anschluss des Halsbereiches an die Motordomäne. Diese Domäne ist im Gegensatz zu den Kinesinen höherer Organismen nicht für eine Dimerisation ausreichend (Kallipolitou *et al.*, 2001).

Filamentöse Pilze unterscheiden sich durch ihr Wachstumsverhalten von der Bäckerhefe. Daher sind Kinesine, welche in der Bäckerhefe nicht vorkommen, potenzielle Kandidaten für den gerichteten Langstreckentransport von Organellen und Vesikeln. In höheren Organismen sind Vertreter der Unc104-Familie an dem Transport von Mitochondrien oder Golgi-Vesikeln beteiligt (Nangaku *et al.*, 1994; Dörner *et al.*, 1998; Bloom, 2001a). Von dieser Kinesin-Familie sind in den Genomen filamentöser Pilze zwei eigenständige Gruppen enthalten (Schoch *et al.*, 2003). Zu der einen Gruppe gehört Nkin2,

ein ca. 206 kDa großes Protein, welches im Rahmen der vorliegenden Arbeit funktionell untersucht wurde. Dieses Protein enthält ein der PH-Domäne ähnliches Motiv, welches eine Bindung zwischen Fracht und molekularen Motor vermitteln könnte (Klopfenstein *et al.*, 2002) und ein „FHA (Forkhead-associated)“-Motiv. Dieses Motiv ist im Allgemeinen an der Signaltransduktion und der Vermittlung von Protein-Protein-Wechselwirkungen beteiligt.

Nkin2 besitzt eine hohe Homologie zu dem Mitochondrienmotor Kif1Ba aus Maus (Nangaku *et al.*, 1994) und dem Unc104-Homologen Umkin3, dem eine Beteiligung im Transport von Endosomen in *U. maydis* nachgewiesen werden konnte (Wedlich-Söldner *et al.*, 2002a). Das zweite Kinesin der Unc104-Familie in *N. crassa*, Nkin3, ist 75 kDa groß und wurde ebenfalls im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht. Seine Motordomäne weist relative hohe Homologie zu Kif1c aus *Mus musculus* auf. Nkin3 besitzt jedoch im Vergleich zu diesem Kinesin einen auffällig kurzen C-Terminus. Homologe von Nkin3 sind nur in filamentösen Pilzen zu finden. Die Kinesine dieser Gruppe besitzen keine PH- oder FHA-Motive, sodass es sich um eine eigenständige Gruppe von Kinesinen innerhalb der Unc104-Familie handelt. Mitglieder dieser beiden Gruppen sind gute Kandidaten für Motorproteine, die den Langstreckentransport von Organellen in filamentösen Pilzen vermitteln.

Eine weitere Kinesin-Familie, welche nicht in der Bäckerhefe, aber in filamentösen Pilzen vorkommt, ist eine Familie mit Homologie zur KIF21-Familie von Säugern. Vertreter dieser Familie sind jedoch in filamentösen Pilzen noch nicht charakterisiert, sodass über eine Rolle dieser Kinesine im gerichteten Langstreckentransport nur spekuliert werden kann.

Die weiteren Kinesine der filamentösen Pilze gruppieren in Familien mit Funktionen in der Meiose und Mitose. Zu diesen gehören Vertreter der BimC-Familie, die eine Funktion in der Abtrennung des Spindelpolkörpers und des Zentrosoms während der Mitose besitzen (Kashina *et al.*, 1997). Die Abb. 4 zeigt ein Modell verschiedener Funktionen der am Organellentransport beteiligten molekularen Motoren in filamentösen Pilzen.

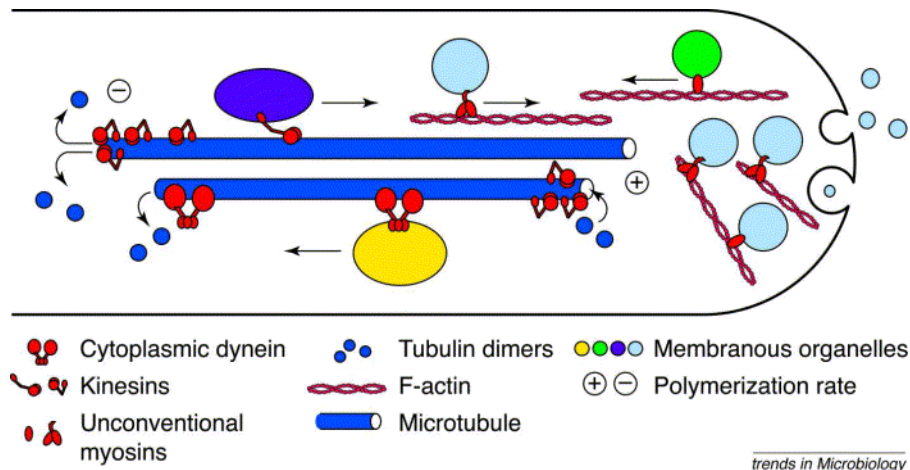


Abb. 4. Hypothetisches Modell der Funktion molekularer Motoren in filamentösen Pilzen (Steinberg, 2000)

Kinesin und Dynein transportieren Vesikel und Organellen entlang polarer Mikrotubuli in entgegengesetzter Richtung. Mit plus wird das schnell polymerisierende Ende des Mikrotubulus, mit minus das langsam depolymerisierende Ende des Mikrotubulus bezeichnet. Myosin transportiert Vesikel entlang des Aktinfilamentsystems. Motorproteine können ebenfalls mikrotubulidepolymerisierende Eigenschaften besitzen.

3.5 Motorvermittelter Transport von Mitochondrien

3.5.1 Funktion von Mitochondrien

Neben ihrer Rolle im Energiestoffwechsel sind Mitochondrien an einer Vielzahl weiterer wichtiger zellulärer Funktionen beteiligt. Eine für die Lebensfähigkeit aller eukaryotischen Zellen essenzielle Funktion besteht in der Assemblierung von Fe/S-Clusterverbindungen (Lill und Kispal, 2000). Darüber hinaus besitzen Mitochondrien neben den Atmungskettenenzymen weitere Enzyme, welche z.B. am Fettsäureabbau, bei Schritten des Harnstoffzyklus oder der Synthese des Hämoleküls beteiligt sind (Scheffler, 2001). Man nimmt an, dass Mitochondrien zudem die lokale Konzentration von Ca^{2+} in Axonen puffern können, und so eine entscheidende Funktion in der Aufrechterhaltung synaptischer Plastizität besitzen (Zucker, 1999).

Die Rolle von Mitochondrien in der Regulation des programmierten Zelltodes ist Gegenstand aktueller Forschung (Bernardi, 1999; Bernardi *et al.*, 2001). So konnte nachgewiesen werden, dass Mitochondrien – durch die Freisetzung von Cytochrom c, AIF (Apoptose induzierender Faktor), Diablo/Smac und CAD (Caspase aktivierte DNase) ins Zytosol – Apoptose einleiten können. Diese Proteine binden spezifisch an zytosolische Rezeptoren und aktivieren dann Caspasen. Diese aktivierten Enzyme, welche zur Klasse der Proteasen gehören, leiten dann den apoptotischen Signalweg ein. AIF und CAD werden in den Zellkern transportiert und führen dort zum Abbau von Chromatin (Wallace, 1999).

In einem Nebenprozess der oxidativen Phosphorylierung entstehen reaktive Sauerstoffverbindungen (ROS), wodurch Mitochondrien einem erhöhten zellulären Stress ausgesetzt sind und ihre Lebensdauer herabgesetzt wird (Wallace, 1999). Die zelluläre Stressantwort und Zellalterung sind über redoxensitive Transkriptionsfaktoren wie NF κ B miteinander verknüpft. Das Freisetzen von freien Radikalen aus den Mitochondrien in das Zytosol steigt mit zunehmendem Alter an, und die zelluläre Antwort auf diese Freisetzung gleicht der einer Infektion. Die stressinduzierte Genexpression führt schließlich zu einer chronischen Entzündung, was wiederum ein Charakteristikum vieler altersbedingter Krankheiten ist, in denen die effektive Redoxkontrolle nicht mehr gewährleistet ist (Sohal *et al.*, 1995).

3.5.2 Lokalisation und Morphologie von Mitochondrien

Mitochondrien sind essenzielle Organellen eukaryotischer Zellen. Sie produzieren durch oxidative Phosphorylierung Energie in Form von ATP und sind deshalb innerhalb der Zelle spezifisch an Orten mit hohem Energiebedarf lokalisiert. Beispiele sind die Lokalisation von Mitochondrien in der Nähe von Aktin-Myosin-Komplexen in Muskelzellen oder an den Flagellen von Spermazellen. Ein weiteres Beispiel ist der Transport der Mitochondrien vom Zellkörper durch das Axon zur Synapse in Nervenzellen.

Da Zellorganellen nicht de novo entstehen können, müssen sie sich durch Wachstum und Teilung bereits existierender Organellen vermehren. Diesem Prozess sind auch Mitochondrien unterworfen (Warren und Wickner, 1996). Mitochondrien sind durch Membranen in verschiedene Kompartimente aufgeteilt. Diese werden als Außenmembran, Intermembranraum, Innenmembran und Matrixraum bezeichnet. Die Innenmembran lässt sich darüber hinaus in zwei physiologisch unterschiedliche Unterkompartimente differenzieren (Frey *et al.*, 2002). Die innere Grenzmembran bezeichnet die Abschnitte der Innenmembran, welche in engem Kontakt zur Außenmembran stehen. Mit Cristae werden die röhren- oder lamellenförmigen Ausstülpungen der Innenmembran bezeichnet, welche in den Matrixraum hineinragen. Bereits Mitte des vorigen Jahrhunderts erlaubte die Technik der Elektronenmikroskopie die Sichtbarmachung dieser Organellenstruktur (Palade, 1953).

Lange Zeit ging man davon aus, dass Mitochondrien eukaryotischer Zellen in der Regel eine nierenförmige Gestalt besitzen und in der Zelle frei verteilt vorliegen. Erst die Anwendung von spezifischen Farbstoffen in lebenden Zellen und die Technik der konfokalen Mikroskopie zeigte, dass die Gestalt der Mitochondrien von Zelle zu Zelle stark variieren kann. Die Vielfalt der Formen reicht von kleinen, kugelförmigen Organellen bis hin zu einem lang gestreckten, verzweigten schlauchförmigen Netzwerk (Rizzuto *et al.*,

1998). Dieses Netzwerk ist kein starres Gebilde, sondern äußerst dynamisch und fortwährend Teilungs- und Fusionsvorgängen unterworfen (Bereiter-Hahn und Voth, 1994; Hermann und Shaw, 1998; Yaffe, 1999).

3.5.3 Transport von Mitochondrien

Die molekularen Mechanismen der Positionierung von Mitochondrien sind nur unzureichend verstanden. In der Literatur lassen sich Berichte sowohl über einen Aktinzytoskelett-abhängigen Transport als auch über einen Mikrotubuli-gestützten Mechanismus finden (Nangaku *et al.*, 1994; Langford, 1995; Pereira *et al.*, 1997; Tanaka *et al.*, 1998; Ligon und Steward, 2000).

Die meisten Erkenntnisse über Aktin-abhängigen Transport von Mitochondrien konnten anhand von Untersuchungen in der Bäckerhefe gewonnen werden. In diesem Organismus ist die Positionierung und der Transport von Mitochondrien von dem Aktinzytoskelett abhängig (Hermann und Shaw, 1998). Temperatursensitive Mutationen in Genen, welche das Aktinzytoskelett depolymerisieren oder destabilisieren, führen zum Aggregieren von Mitochondrien und zur Inhibierung mitochondrialer Bewegung und Vererbung (Drubin *et al.*, 1993; Lazzarino *et al.*, 1994; Simon *et al.*, 1995). Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen belegten zudem eine Kolokalisation von Mitochondrien und dem Aktinzytoskelett (Drubin *et al.*, 1993; Lazzarino *et al.*, 1994; Mulholland *et al.*, 1994). In *in vitro* Versuchen konnten isolierte Mitochondrien an Aktinfilamente gebunden werden. Diese Interaktion der Organellen mit dem Zytoskelett erfolgt in ATP-abhängiger Weise und wird von peripher mit der Außenmembran von Mitochondrien verbunden Proteinen vermittelt (Lazzarino *et al.*, 1994). Darüber hinaus konnte eine ATP-abhängige Motoraktivität auf der Außenmembran von Mitochondrien nachgewiesen werden (Simon *et al.*, 1995; Boldogh *et al.*, 1998). Diese mitochondriale Motoraktivität weist alle Eigenschaften auf, die man bei einer Beteiligung von Myosin-verwandten Motorproteinen erwarten würde. In einer Studie konnte eine Interaktion zwischen einer GTPase und einem Klasse V Myosin (Myo2) nachgewiesen werden, welche für die Verteilung von Mitochondrien in Hefe entscheidend ist (Itoh *et al.*, 2002). Diese Studie impliziert daher die Beteiligung von Myo2 an dem Transport von Mitochondrien in Hefe. Dagegen spricht allerdings die Beobachtung, dass sowohl Deletionsmutanten der bekannten Klasse V Myosine als auch eine Doppelmutante der *MYO2* und *MYO4*-Gene, keinen Phänotyp hinsichtlich der Bewegung oder Positionierung von Mitochondrien aufweisen (Simon *et al.*, 1995). Demzufolge ist die Identität der ATP-abhängigen Motoraktivität noch unklar. Eine andere Studie postulierte die Möglichkeit einer von der

Aktinpolymerisation abhängigen Bewegung von Hefemitochondrien unter Mitwirkung des Arp2/3-Komplexes (Boldogh *et al.*, 2001).

Die Mitochondrienbewegung in dem filamentösen Pilz *A. nidulans* erfolgt ebenfalls entlang des Aktinzytoskeletts. Die Positionierung von Mitochondrien wird durch mikrotubulidestabilisierende Substanzen nicht beeinflusst (Suelmann und Fischer, 2000a). In Photorezeptorzellen der Heuschrecke *Schistocerca gregaria* erfolgt die Mitochondrienbewegung ebenfalls Aktin-abhängig, da sie sich durch Aktinzytoskelett-depolymersierende Substanzen inhibieren lässt (Sturmer und Baumann, 1996).

Im Gegensatz zur Mitochondrienbewegung in diesen Organismen ist die Mitochondrienbewegung in *Schizosaccharomyces pombe* von einem intakten Mikrotubulizytoskelett abhängig (Yaffe *et al.*, 1996). Der Transport von Mitochondrien in filamentösen Pilzen erfolgt unter Verwendung unterschiedlicher Zytoskelettsysteme. In vielen Vertretern filamentöser Pilze konnte – aufgrund der Verwendung von mikrotubulidestabilisierenden Substanzen – die Beteiligung des Mikrotubulizytoskeletts an der Verteilung von Mitochondrien belegt werden. Zu diesen zählen *Fusarium acuminatum*, *Nectria haematococca*, *Neurospora crassa* und *Allomyces macrogynus* (Howard und Aist, 1980; Aist und Bayles, 1991; Steinberg und Schliwa, 1993; McDaniel und Roberson, 2000). Nur in *N. haematococca* ist das beteiligte Motorprotein bekannt. Da Deletionsmutanten, denen das Gen für das konventionelle Kinesin fehlt, einen mitochondrienfreien Bereich nahe der Hyphenspitze aufweisen, wird angenommen, dass dieses Motorprotein am Transport der Mitochondrien beteiligt ist (Wu *et al.*, 1998).

In *N. crassa* ist der Mitochondrientransport entlang des Zytoskeletts zu einem gewissen Anteil untersucht. In diesem Organismus wurde die intrazelluläre Bewegung von Mitochondrien mit Hilfe von Differenzial-Interferenz-Kontrastmikroskopie und computerunterstützter Videoauswertung untersucht. Die in Hyphen, Protoplasten, Zellfragmenten und einer zellwandlosen Mutante untersuchten Mitochondrien bewegten sich in einer gerichteten Weise mit einer Durchschnittsgeschwindigkeit von 1,4 $\mu\text{m/s}$. Die Destabilisierung des Mikrotubulizytoskeletts durch Nocodazol führte zu einem Verlust der gerichteten Mitochondrienbewegung (Steinberg und Schliwa, 1993), wohingegen aktindestabilisierende Substanzen keinen Einfluss auf die Mitochondrienbewegung haben (Prokisch *et al.*, 2000). Das konventionelle Kinesin Nkin und das in den Transport von Mitochondrien involvierte konventionelle Kinesin von *N. haematococca* besitzen eine Aminosäureidentität von 77 %. Trotz dieser großen Homologie ist das konventionelle

Kinesin in *N. crassa* nicht an dem Transport von Mitochondrien beteiligt (Seiler *et al.*, 1999).

In tierischen Zellen erfolgt der Transport von Mitochondrien vorwiegend entlang von Mikrotubuli. Hier konnte die Beteiligung mehrerer Kinesinisoformen (*KIF1B*, *KLP67A*, *KIF5B*) nachgewiesen werden (Nangaku *et al.*, 1994; Pereira *et al.*, 1997; Khodjakov *et al.*, 1998; Tanaka *et al.*, 1998). Kif1b kolokalisiert mit Mitochondrien *in vivo* und ist bei Subfraktionierung von Zellen in der Mitochondrienfraktion angereichert. Das isolierte Protein kann zudem in *in vitro* Experimenten Mitochondrien entlang von Mikrotubuli bewegen (Nangaku *et al.*, 1994). Deletion einer Isoform des konventionellen Kinesins (*KIF5B*) führt zu einem Aggregieren von Mitochondrien in der Nähe des Zellkerns (Tanaka *et al.*, 1998). Diese Isoform des konventionellen Kinesins kolokalisiert in Säugetierzelllinien mit Mitochondrien (Khodjakov *et al.*, 1998). Auch in *Drosophila* konnte eine Kolokalisation von Kinesin (*KLP67A*) mit Mitochondrien beschrieben werden (Pereira *et al.*, 1997).

3.5.4 Aufrechterhaltung mitochondrialer Gestalt und Positionierung

Eine fehlerhafte Positionierung von Mitochondrien muss nicht zwangsläufig das Resultat einer eingeschränkten Motorfunktionalität sein, sondern kann auch auf den Verlust der Interaktion von Motorprotein und Fracht zurückzuführen sein.

Anhand von Mutanten mit veränderter mitochondrialer Morphologie, den „mdm (*mitochondrial distribution and morphology*)“-Mutanten, wurde eine Reihe von Genen identifiziert, die für die normale Verteilung und Gestalt von Mitochondrien wichtig sind (McConnell *et al.*, 1990; Burgess *et al.*, 1994; Sogo und Yaffe, 1994; Hermann *et al.*, 1997). Zu den identifizierten Proteinen gehören die Außenmembranproteine Mdm10 und Mdm12 (Sogo und Yaffe, 1994; Berger *et al.*, 1997; Boldogh *et al.*, 1998) und Mmm1 (für "maintenance of mitochondrial morphology") (Burgess *et al.*, 1994). Die Deletion der für Mdm10 und Mmm1 kodierende Gene führt zur Ausbildung von Riesenmitochondrien, die nicht mehr in der Lage sind, an Aktinfilamente zu binden (Boldogh *et al.*, 1998). Nachfolgende Untersuchungen führten zur Annahme, dass Mmm1 zusammen mit Mdm10 und Mdm12 einen Rezeptorkomplex für aktinbindende Proteine bildet und die Vererbung von mtDNS und Mitochondrien durch Interaktion mit dem Zytoskelettsystem vermittelt (Hobbs *et al.*, 2001; Boldogh *et al.*, 2003). Nullmutanten des *mmm-1* Gens zeigen in *N. crassa* einen temperatursensitiven Wachstumsdefekt. Sie enthalten abnormal große Mitochondrien (Prokisch *et al.*, 2000). Dieser Phänotyp ähnelt sehr dem der $\Delta mmm1$ -Deletionsmutante in Hefe. Da Mitochondrien in *N. crassa* jedoch nicht entlang der

Mikrofilamente sondern entlang von Mikrotubuli transportiert werden, kann der resultierende Mitochondrienphänotyp nicht durch den Verlust der Bindung zum Aktinzytoskelett erklärt werden. Mmm1 scheint vielmehr eine generelle Rolle im Erhalt der Mitochondrienmorphologie zu spielen (Prokisch *et al.*, 2000; Fuchs *et al.*, 2002; Koch *et al.*, 2003).

Neben diesen Außenmembranproteinen sind auch Proteine, welche an der Fusion und Teilung von Mitochondrien beteiligt sind, für die Aufrechterhaltung der Mitochondrienmorphologie und der Vererbung von Mitochondrien wichtig (Jensen *et al.*, 2000; Osteryoung, 2001; Shaw und Nunnari, 2002; Westermann, 2002). Um die mitochondriale Vererbung vollständig zu verstehen, reicht die Kenntnis der an dem Transport von Mitochondrien beteiligten Motorproteine nicht aus. Zusätzlich müssen alle Komponenten identifiziert werden, die die mitochondriale Morphogenese und die Interaktion mit dem Zytoskelett vermitteln.

3.6 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Doktorarbeit war es, molekulare Komponenten, die den Transport und die Positionierung von Mitochondrien in dem Modellorganismus *N. crassa* vermitteln, zu identifizieren und zu charakterisieren.

Es war bereits bekannt, dass Mikrotubuli in *N. crassa* – ähnlich wie in Säugetierzellen – eine wichtige Rolle für den Mitochondrientransport spielen (Steinberg und Schliwa, 1993; Prokisch *et al.*, 2000). Daher ist dieser filamentöse Pilz ein geeigneter Modellorganismus, um die Interaktion von Mitochondrien mit Mikrotubuli zu untersuchen. Weder das Motorprotein noch andere an diesem Prozess beteiligte Proteine waren zu Beginn der Arbeit bekannt.

Um die beteiligten Proteine identifizieren zu können, sollten zunächst *in vitro*-Testsysteme etabliert werden, mit denen sich die Interaktion von Mitochondrien mit Mikrotubuli untersuchen lässt. Dabei wurde ein biochemischer Ansatz verfolgt, bei dem die Interaktion isolierter Mitochondrien mit gereinigten Mikrotubuli nach Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation nachgewiesen werden sollte. Mit diesem Testsystem sollten die biochemischen Grundlagen dieser Interaktion aufgeklärt und eine mögliche Rolle neu identifizierter Proteine belegt werden.

Die Färbung von Mitochondrien mit GFP (*Green-Fluorescent-Protein*), welches mit einer mitochondrialen Präsequenz fusioniert ist, hat sich als sehr nützlich für das Studium der mitochondrialen Dynamik in Hefe und in Säugerzellen erwiesen (Rizzuto *et al.*, 1998;

Westermann und Neupert, 2000). Zu Beginn dieser Arbeit war – trotz zahlreicher Versuche verschiedener Arbeitsgruppen – die erfolgreiche Expression von GFP in *N. crassa* nicht beschrieben. Es sollte ein Expressionssystem entwickelt werden, mit dem sich die Mitochondrien in *N. crassa* mit GFP färben lassen. Mit diesem System sollte das Verhalten der Mitochondrien *in vivo* untersucht werden. Darüber hinaus sollte die Interaktion GFP-markierter Mitochondrien mit fluoreszenzgefärbten Mikrotubuli *in vitro* untersucht werden.

Zeitgleich zu diesen Arbeiten lief die Sequenzierung des *Neurospora*-Genoms durch ein internationales Forscherteam, welche kürzlich vollendet wurde (Galagan *et al.*, 2003). Die Genom-Daten sollten die Grundlage bilden, um gezielt nach Motorproteinen zu suchen, die die Bindung der Mitochondrien an Mikrotubuli vermitteln. Eine Rolle dieser Motorproteine sollte anschließend durch die *in vitro*-Testsysteme und durch die Erstellung und funktionelle Charakterisierung von Mutanten belegt werden.

Da der Transport von Mitochondrien nicht nur von Motorproteinen abhängt sondern auch mit Fusions- und Teilungsprozessen der Mitochondrienmembran verknüpft ist, bestand ein weiteres Ziel der Doktorarbeit darin, neue unbekannte Komponenten der Mitochondrienmorphogenese in *S. cerevisiae* zu finden. Zu diesem Zweck sollte eine Deletionsmutanten-Bibliothek verwendet werden, die die ca. 4800 nichtessenziellen Gene der Hefe umfasst (Giaever *et al.*, 2002). Diese Deletionsmutanten sollten in einem gemeinsamen Projekt innerhalb der Arbeitsgruppe hinsichtlich anormaler Form und Verteilung der Mitochondrien untersucht werden.

4 Material und Methoden

4.1 Methoden der Molekularbiologie

4.1.1 Verwendete Plasmide

Name des Plamids	Verwendungszweck	Erstmalige Verwendung
pCRII-Topo	Subklonierung	-
pBluescript Ks(-)	Standardklonierungsvektor	-
pQE60	Expressionsvektor	-
pETGEXCT	Expressionsvektor	(Sharrocks <i>et al.</i> , 1994)
pGEM3Su9 (1-69)	-	(Rapaport <i>et al.</i> , 1998)
pFF6	Expression von GFP in <i>N. crassa</i>	(Fuchs <i>et al.</i> , 2002)
pFF7	Expression von GFP in <i>N. crassa</i>	(Fuchs <i>et al.</i> , 2002)
pFF8	Expression von GFP in <i>N. crassa</i>	(Fuchs <i>et al.</i> , 2002)
pFF9	Expression von GFP in <i>N. crassa</i>	(Fuchs <i>et al.</i> , 2002)
pFF10	Expression eines GST-Fusionsproteins zur Antigenherstellung.	Diese Arbeit
pFF11	Expression eines GST-Fusionsproteins zur Antigenherstellung	Diese Arbeit
pFF12	Expression eines Hexahistidinpeptidfusionsproteins zur Antigenherstellung	Diese Arbeit
pFF13	Herstellung eines Plasmids zur Disruption von Nkin2 mittels homologer Rekombination	Diese Arbeit
pFF14	Herstellung eines Plasmids zur Disruption von Nkin2 mittels homologer Rekombination	Diese Arbeit
pFF15	Herstellung eines Plasmids zur Disruption von Nkin2 mittels homologer Disruption	Diese Arbeit

Tab. 1. In der Arbeit verwendete Plasmide

4.1.2 Verwendete Oligonukleotide

Name	Sequenz	Verwendungszweck
F1a-1 (29-mer)	AAA TCT AGA GAT ATC TTG GAA CGG CCC GG	Klonierung pFF6
F1a-2 (27-mer)	AAA GGA TCC GGC GTA GGT GCG GGC CTG	Klonierung pFF6
F1a-3 (29-mer)	AAA AGT CGA CGT GGT GAG CGT GTA AGT GC	Klonierung pFF7
F1a-4 (30-mer)	AAA GGG CCC TAC TGT GAT CCG CAA ATT CAG	Klonierung pFF7
NotI-Hyg (31-mer)	AAA GCG GCC GCA GGG AAT AAG GGC GAC ACG G	Klonierung pFF8 und pFF14
Hyg-NotI (31-mer)	AAA GCG GCC GCT GCC GAT TTC GGC CTA TTG G	Klonierung pFF8 und pFF14
NKIF1A (33-mer)	AAA AGC TTG GAT CCA TGT GTT TAT TCC ACC ACC	Klonierung pFF10
NKIF1B (28-mer)	AAA AGA TCT CGC ATT CGT ACC CGT GCC G	Klonierung pFF11
NKIF1C (38-mer)	AAA GGA TCC GAA TTC TCA TAT GAT ATT AGT CCT CAC CC	Klonierung pFF10 und pFF11
KIF1B-Nco (27-mer)	GGG CCA TGG AGG ACG CCA ATG CCC GCA	Klonierung pFF12
KIF1B-b (30-mer)	AAA AGA TCT GGC TTT CGC TTC AAG AGG ATG	Klonierung pFF12
Fmm3 (42-mer)	AAT AGG CCG AAA TCG GCA GTG CAT TCA GGG ATA CCC AAT GGG	Klonierung pFF13
Fmm4 (18-mer)	CAA CGT AGT AAC CCG TTG	Klonierung pFF13

Fmm1-Xba (27-mer)	GGG TCT AGA CGT CTG GAG TCT CGA CCG	Klonierung pFF15
Fmm2-Xho (27-mer)	GGG CTC GAG TCC GGA CGC GAT CAC AGC	Klonierung pFF15
Fmm7 (18-mer)	GTG CAT TCA GGG ATA CCC	Southern-Blot-Sonde
Fmm8 (20-mer)	CGG ATG AAT ACA TAC CTA TG	Southern-Blot-Sonde
Fmm36 (26-mer)	CAA CAA CTA CAC TAC ACA CAA GCC AC	Southern-Blot-Sonde
Fmm37 (23-mer)	GTC GCC TGG CCG ACG GTA ATC GC	Southern-Blot-Sonde

Tab. 2. Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide

4.1.3 Isolierung und Reinigung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte nach der Methode der alkalischen Lyse (Birnboim und Doly, 1979). Bei der Präparation größerer Mengen an DNA (Midi-Präp) wurde die DNA zusätzlich über eine Anionen-Austausch-Säule gereinigt.

Reinigung in kleinem Maßstab:

Für die Präparation kleiner Mengen Plasmid-DNA wurden Bakterien aus 1,5 ml einer Übernachtskultur in LB-Amp (Luria-Bertani-Medium: 10 g/l Bacto-Trypton, 5 g/l Bacto-Hefe-Extrakt, 10 g/l NaCl, supplementiert mit 100 mg/l Ampicillin) für 2 min in der Tischzentrifuge abzentrifugiert und in 300 µl E1 (50 mM Tris/HCl pH 8,0, 10 mM EDTA, RNase 100 µg/ml) resuspendiert. Durch Zugabe von 300 µl E2 (200 mM NaOH, 1,0 % (w/v) SDS) und Inkubation bei Raumtemperatur über 5 min wurden die Zellen lysiert. Zur Neutralisierung wurden 300 µl E3 (3,1 M Kaliumacetat pH 5,5) zugesetzt, gemischt und 10 min bei 14000 Upm in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Die DNA wurde dann durch Zugabe von 600 µl Isopropanol und anschließender Zentrifugation präzipitiert. Zur Entfernung von ausgefällten Salzen wurde die Plasmid-DNA einmal mit 70 % Ethanol gewaschen. Nach dem Trocknen der DNA wurde diese in 30-50 µl Wasser bzw. TE-Puffer (10 mM Tris/HCl pH 8,0, 1 mM EDTA) resuspendiert.

Reinigung in großem Maßstab:

Für die Präparation größerer Mengen Plasmid-DNA (bis ca. 0,2 mg) wurde der „Jetstar“-Kit der Firma Genomed verwendet. Eine Anionenaustauschsäule wurde mit 10 ml Lösung E4 (0,6 M NaCl, 100 mM Natriumacetat, pH 5,0, 0,15 % Triton X-100) äquilibriert. Währenddessen wurden die Bakterien aus 50 ml einer Übernachtskultur in LB-Medium mit Ampicillin durch 5 min Zentrifugation bei 3000 xg sedimentiert. Die Zellen wurden in 4 ml Lösung E1 (50 mM Tris/HCl, pH 8,0, 10 mM EDTA) resuspendiert und anschließend durch Zugabe von 4,5 ml Lösung E3 (3,2 M Kaliumacetat, pH 5,5) neutralisiert. Nach 10 min Zentrifugation bei 15000 xg wurde der Überstand auf die äquilibrierte Säule gegeben. Es wurde mit 20 ml Lösung E5 (0,8 M NaCl, 100 mM Natriumacetat, pH 5,0) gewaschen und mit 5 ml Lösung E6 (1,25 M NaCl, 100 mM Tris/HCl, pH 8,5) eluiert. Die DNA wurde durch Zugabe von 3,5 ml Isopropanol und Zentrifugation (15000 xg, 30 min, 4°C) aus dem Eluat gefällt, mit 70 % Ethanol gewaschen, an der Luft getrocknet und in 100 µl Wasser oder TE-Puffer (10 mM Tris/HCl pH 8,0, 1 mM EDTA) resuspendiert.

4.1.4 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration der DNA wurde durch Messung der Absorption bei 260 nm bestimmt. Eine OD (optische Dichte) entspricht 50 µg/ml doppelsträngiger DNA bzw. 33 µg einzelsträngiger DNA.

4.1.5 Amplifizierung von DNA-Fragmenten mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Bei der Polymerase-Kettenreaktion oder PCR wird durch den wiederholten Ablauf von Strangtrennung, Bindung zweier spezifischer Oligonukleotide (Primer) und DNA-Synthese mit hitzestabiler DNA-Polymerase eine exponentielle Synthese von DNA-Molekülen aus Desoxynukleosidtriphosphaten erreicht (Saiki *et al.*, 1988). Ein typischer Reaktionsansatz von 100 µl enthielt: 2 µl einer Lösung mit einer Mischung aller 4 Desoxyribonukleotide (je 10 mM), 10 µl 10 x PCR-Puffer (100 mM Tris/HCl pH 8,8, 15 mM MgCl₂, 500 mM KCl, 1 % (v/v) Triton X-100), ca. 1 µg jeden Primers, ca. 10 ng Plasmid-DNA bzw. 100 ng genomischer DNA als Matrize und 5 U Taq-DNA-Polymerase. Ein typischer Temperaturverlauf der PCR sah folgendermaßen aus: Im ersten Schritt der PCR wurde der Ansatz zum Denaturieren der Matrize auf 95°C aufgeheizt, diese Temperatur wurde im ersten Zyklus für 5 min, in jeden weiteren für 1 min gehalten. Im zweiten Schritt wurde für 1 min auf eine Temperatur von 50-60°C abgekühlt, um die Anlagerung der Primer an den Matrizenstrang zu erlauben. Im dritten Schritt wurde der Ansatz auf die Synthesetemperatur von 72°C aufgeheizt. Je nach Länge des zu amplifizierenden Fragmentes wurde diese

Temperatur für 1 bis 5 min gehalten. Nachdem der Zyklus 30-35 Mal durchlaufen war, wurde die amplifizierte DNA auf einem Agarosegel analysiert.

4.1.6 Enzymatische Modifikationen von DNA

4.1.6.1 Restriktionsverdau von DNA

DNA wurde mit Enzymen der Firma New England Biolabs gemäß den Angaben des Herstellers in den entsprechend mitgelieferten Puffern bei einer Enzymkonzentration von 2-3 U pro µg DNA verdaut. Plasmid-DNA wurde längstens für 2 h verdaut, genomische DNA oder PCR-Produkte wurden über Nacht geschnitten.

4.1.6.2 Dephosphorylierungen von DNA-Fragmenten mit alkalischer Phosphatase

Vor einer Ligation wurden die 5'-Phosphatgruppen der linearisierten Vektormoleküle mit alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm (Calf Intestine Phosphatase, CIP) entfernt, um den unerwünschten Effekt einer Religation (interner Ringschluss) von Vektoren bei Ligationsreaktionen zu verhindern. Dazu wurden 30 µg linearisierte Vektor-DNA in 100 µl CIP-Puffer (1 mM ZnCl₂, 1 mM MgCl₂, 50 mM Tris/HCl, pH 9,0, 10 mM Spermidin) resuspendiert und mit 1 U Enzym versetzt. Der Probenansatz wurde dann zunächst 15 min bei 37°C und anschließend 15 min bei 56°C inkubiert. Dann wurde erneut 1 U Enzym zugegeben und nochmals wie zuvor inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 70 µl H₂O, 10 µl 10 % SDS und 20 µl 10 x STE-Puffer (1 M NaCl, 10 mM EDTA, 0,1 M Tris/HCl, pH 8,0) und Erwärmung bei 65°C beendet. Die dephosphorylierte Vektor-DNA wurde anschließend durch präparative Agarose-Gelelektrophorese gereinigt.

4.1.6.3 Ligation von DNA-Fragmenten mit T4-Ligase

Um zwei DNA-Fragmente mit der aus dem Phagen T4 isolierten DNA-Ligase zu verknüpfen, wurden 50-100 ng DNA des linearisierten Vektors mit einem etwa vierfachen Überschuss des gewünschten DNA-Fragmentes in dem vom Hersteller (Gibco/BRL) mitgelieferten 5 x Puffer (0,25 M Tris/HCl pH 7,6; 50 mM MgCl₂; 5 mM ATP; 5 mM DTT; 25 % (v/v) PEG-8000) und der entsprechenden Menge Wasser gemischt. Der Ansatz wurde mit 0,5 U T4-Ligase in einem Volumen von 10 µl 2 h bei 25°C oder über Nacht bei 16°C inkubiert.

4.1.6.4 Zwischenklonierung von DNA-Fragmenten

Die geringe Aktivität einiger Restriktionsenzyme an Enden von durch PCR erzeugten DNA-Fragmenten führt häufig zu unvollständigen Schnitten, wodurch die

Klonierungseffizienz drastisch verringert wird. PCR-Produkte wurden daher ohne Restriktionsverdau in die kommerziell erhältlichen linearisierten Vektoren pCRII-Topo (Invitrogen) oder pGEM-T (Promega) kloniert, die an den 3'-Enden überhängende Thymidinnukleotide enthalten. Durch Taq-Polymerase amplifizierte PCR-Produkte tragen an den 5'-Enden überhängende Adenosinnukleotide und können deshalb direkt in diese Vektoren kloniert werden. Die Ligation erfolgte nach Herstellerangaben 5-60 min bei Raumtemperatur. PCR-Fragmenten, welche mittels Pfu-Polymerase hergestellt wurden, wurden die Adenosinnukleotidüberhänge an den 5'-Enden durch eine Nachbehandlung mit 1 U Taq-Polymerase für 10-30 min bei 72°C angehängt.

4.1.7 Reinigung und Analyse von DNA

4.1.7.1 Phenolextraktion und Ethanolfällung

Verunreinigungen von DNA-Präparationen durch Proteine, welche sich an der Grenzschicht der wässrigen Phase zur phenolischen Phase befinden, wurden durch Phenolextraktion entfernt. Dazu wurde die wässrige Phase mit dem gleichen Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) vermischt und anschließend mit Chloroform ausgeschüttelt. Zur Konzentrierung und Entsalzung der DNA wurde anschließend eine Ethanolfällung durchgeführt. Hierzu wurde die DNA-Lösung auf eine Konzentration von 0,3 M Natriumazetat, pH 5,2 eingestellt, mit dem 2,5-fachen Volumen Ethanol versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Die gefällte DNA wurde anschließend durch Zentrifugation für 30 min bei 15000 xg und 4°C isoliert. Nach Waschen mit 70 % (v/v) Ethanol und Trocknen wurde die DNA in Wasser oder TE-Puffer (10 mM Tris/HCl pH 8,0, 1 mM EDTA) resuspendiert.

4.1.7.2 Gelelektrophorese von DNA

DNA-Fragmente wurden in horizontalen Agarosegelen nach ihrer Größe aufgetrennt. Zum Auftrag wurde die DNA mit 5 x Auftragspuffer (30 % (v/v) Glycerin, 0,25 % Bromphenolblau, 0,25 % Xylencyanol) versetzt. Die Konzentration der Agarose betrug je nach der Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente 0,7-2 %.

Die Elektrophorese erfolgte in 1 x TAE-Puffer (50 x TAE: 242 g/l Tris-Base, 57,1 ml/l Eisessig, 50 mM EDTA, pH 8,0) bei einer Feldstärke von bis zu 13 V/cm. Um die DNA unter UV-Licht sichtbar zu machen, wurde der Agaroselösung vor der Polymerisation, Ethidiumbromid (0,5 µg/ml) zugesetzt.

4.1.7.3 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

DNA-Fragmente, die durch Restriktionsverdau oder PCR erzeugt worden waren, wurden zunächst durch Gelelektrophorese (4.1.7.2) aufgetrennt und anschließend mit einem sterilen Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Die Isolierung der DNA erfolgte dann mit Hilfe des Gelextraktionskits der Firma Qiagen. Hierzu wurden die DNA-Fragmente nach Herstellerangabe gelöst und mit Qiaquick®-Säulen isoliert.

4.1.8 Transformation von Mikroorganismen mit Plasmid-DNA

4.1.8.1 Präparation von elektrokompenten *E. coli*-Zellen

E. coli Zellen wurden in LB-Medium (Luria-Bertani-Medium: 10 g/l Bacto-Trypton, 5 g/l Bacto-Hefe-Extrakt, 10 g/l NaCl) bei 37°C bis zur logarithmischen Wachstumsphase kultiviert und anschließend 30 min auf Eis abgekühlt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (JA 10 Beckman, 4400 xg, 5 min, 2°C) geerntet und das Zellpellet im Kühlraum mit 500 ml, 250 ml und schließlich 50 ml kaltem 10 %igem (v/v) Glycerin gewaschen.

Die elektrokompenten *E. coli*-Zellen wurden in 500 µl 10 %igem (v/v) Glycerin resuspendiert, aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei -80°C aufbewahrt.

4.1.8.2 Transformation von *E. coli*-Zellen durch Elektroporation

1 µg Plasmid-DNA bzw. 1 µl Ligationsansatz wurde mit 40 µl auf Eis aufgetaute, kompetente *E. coli*-Zellen vermischt. Dieser Ansatz wurde in eine vorgekühlte Transformationsküvette überführt und in einem Elektroporationsgerät der Fa. Bio-Rad (Gene Pulser) durch einen Stromstoß transformiert (2,5 kV, 400 Ω, 25 µF, Zeitkonstante 7,5-9 msec). Anschließend wurde der Ansatz sofort mit 1 ml SOC-Medium (2 g/l Bacto-Trypton, 5 g/l Bacto-Hefe-Extrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM Glucose) versetzt und 30-60 min bei 37°C geschüttelt. Die Bakterien wurden durch kurze Zentrifugation in der Tischzentrifuge gesammelt, in 100 µl Medium resuspendiert, auf eine LB-Amp-Platte (LB mit 2 % Agar und 100 mg/l Ampicillin) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

4.1.9 Klonierung der verwendeten Plasmide

pFF6 (pBS-GFP):

Das DNA-Fragment, welches die für das mGFP-Allel kodierende Sequenz enthält, wurde mit BamHI/ EcoRI aus dem Plasmid pGEM3Su9(1-69)-GFP5 (Fuchs *et al.*, 2002) herausgeschnitten und in den mit BamHI/ EcoRI geschnittenen Vektor pBluescript Ks(-) ligiert.

pFF7 (pBs-mtGFPa):

Mit den Primern F1a-1 und F1a-2 und genomischer DNA aus *Neurospora* als Matrize, wurde durch PCR ein 1450 bp großes Fragment des *atp-1*-Gens erhalten, welches die Promotorregion sowie die für die mitochondriale Präsequenz der Alpha-Untereinheit der F₁-ATP-Synthase kodierende Sequenz einschließt. Am 5'-Ende enthielt das Fragment eine BamHI- und am 3'-Ende eine XbaI-Schnittstelle, die beide in den Primern enthalten waren. Das Fragment wurde mit den beiden Restriktionsenzymen geschnitten und reisoliert. Anschließend wurde es mit dem BamHI/ XbaI geschnittenen Plasmid pFF6 ligiert, in *E. coli* MH1 transformiert und die richtige Orientierung durch Restriktionsanalyse überprüft.

F1a-1: 5'-AAA TCT AGA GAT ATC TTG GAA CGG CCC GG-3'

F1a-2: 5'-AAA GGA TCC GGC GTA GGT GCG GGC CTG-3'

pFF8 (pBs-mtGFPb):

Mit Hilfe der Primer F1a-3 und F1a-4 und genomischer DNA aus *Neurospora* als Matrize, wurde ein 778 bp langes DNA-Fragment amplifiziert, welches für den 3'-Bereich des Proteins sowie den Terminationsbereich des *atp-1*-Gens kodiert. Das resultierende Fragment wurde mit Sall/ ApaI geschnitten und in das mit Sall/ ApaI geschnittene Plasmid pFF7 ligiert. Nach der Transformation in *E. coli* MH1 wurde das Plasmid pFF8 mittels Restriktionsanalyse überprüft.

F1a-3: 5'-AAA AGT CGA CGT GGT GAG CGT GTA AGT GC-3'

F1a-4: 5'-AAA GGG CCC TAC TGT GAT CCG CAA ATT CAG-3'

pFF9 (pNc-mtGFP):

Unter Verwendung der Primer NotI-Hyg und Hyg-NotI wurde die 1500 bp große Hygromycin-Resistenz- Kasette, welche auf dem Vektor pCB1179 (Sweigard, 1997) kodiert ist, durch PCR amplifiziert. Anschließend wurde die Sequenz mit NotI geschnitten, in das mit NotI linearisierte Plasmid pFF8 ligiert, in *E. coli* MH1 transformiert sowie der korrekte Orientierung des Fragments durch Restriktionsanalyse überprüft.

NotI-Hyg: 5'-AAA GCG GCC GCA GGG AAT AAG GGC GAC ACG G-3'

Hyg-NotI: 5'-AAA GCG GCC GCT GCC GAT TTC GGC CTA TTG G-3'

pFF10 (pETGEXCT-Nkin3-Full):

Für die Expression eines Fusionsproteins aus NKin3 und eines N-terminal fusionierten GST-Anhang in *E. coli* wurde eine 1846 bp umfassende Sequenz des *nkin3*-Gens, unter Verwendung genomischer DNA aus *Neurospora* als Matrize, durch PCR amplifiziert. Hierfür wurden die Primer NKIF1A und NKIF1C eingesetzt. Das NKin3 kodierende DNA-Fragment wurde mit BamHI geschnitten, mittels des Qiagen PCR-Purification Kits gereinigt, und in den mit BamHI linearisierten Vektor pETGEXCT (Sharrocks, 1994) ligiert. Hierdurch wurde das Fragment am 5'-Ende mit der GST-Sequenz fusioniert. Das resultierende Plasmid wurde in *E. coli* MH1 transformiert und die Orientierung mittels Restriktionsanalyse überprüft.

NKIF1A: 5'-AAA AGC TTG GAT CCA TGT GTT TAT TCC ACC ACC-3'

NKIF1C: 5'-AAA GGA TCC GAA TTC TCA TAT GAT ATT AGT CCT CAC CC-3'

pFF11 (pETGEXCT-Nkin3-C-Term.):

Für die Expression des C-Terminalen Bereichs von Nkin3 (Aminosäuren 379-616) mit N-Terminal fusionierten GST-Anhang in *E. coli* wurde eine 711 bp lange DNA-Sequenz, unter Verwendung der Primer NKIF1A und NKIF1B, aus genomischer DNA von *Neurospora* amplifiziert. Das Produkt wurde mit BglII geschnitten und in den mit BamHI linearisierten Vektor pETGEXCT ligiert. Das Plasmid wurde dann in *E. coli* MH1 transformiert und mittels Restriktionsanalyse überprüft.

NKIF1A: 5'-AAA AGC TTG GAT CCA TGT GTT TAT TCC ACC ACC-3'

NKIF1B: 5'-AAA AGA TCT GGC TTT CGC TTC AAG AGG ATG-3'

pFF12 (pQE60-Nkin2 (aa372-aa602)-his₆):

Das Plasmid dient der Expression eines Fusionsproteins aus einem C-Terminal der Motordomäne gelegenen Bereich von Nkin2 und eines mit diesem C-Terminal fusionierten Hexahistidin-Peptids (-his₆). Hierzu wurde die DNA-Sequenz, welche für die Aminosäuren 372-666 von Nkin2 kodiert, unter Verwendung der Primer KIF1B-Nco, KIF1B-b und genomischer DNA aus *Neurospora* als Matrize, amplifiziert. Das ca. 900 bp große DNA-Fragment wurde mit NcoI und BglII geschnitten, gereinigt und in einem NcoI/ BglII geschnittenen pQE60-Vektor ligiert. Hierdurch bilden die für das Hexahistidin-Peptid kodierende Sequenz und die *nkin2*-Sequenz einen Leserahmen. Das Plasmid pFF12 wurde anschließend in *E. coli* XL1-Blue transformiert.

KIF1B-b: 5'-AAA AGA TCT GGC TTT CGC TTC AAG AGG ATG-3'

KIF1B-Nco: 5'-GGG CCA TGG AGG ACG CCA ATG CCC GCA-3'

pFF13 (pCRII Topo-Nkin2 Downstream):

Dieses Plasmid bildet das Ausgangsplasmid einer dreistufigen Klonierungsstrategie mit dem Ziel, ein Plasmid zu erhalten, welches ein Hygromycin-Resistenzgen anstelle des Volllängenkinesins *nkin2*, homolog im Genom von *Neurospora* integriert.

In diesem ersten Schritt wurde mit Hilfe der Primer Fmm3 und Fmm4 sowie genomischer DNA aus *Neurospora* als Matrize, ein DNA-Fragment von 2000 Basenpaaren durch PCR amplifiziert. Dieses enthält die DNA-Sequenz von 74-2074 Basen downstream des *nkin2*-Gens. Der PCR-Ansatz wurde auf einem Agarosegel aufgetrennt, das DNA-Fragment ausgeschnitten und eluiert. Die gereinigte DNA-Sequenz wurde anschließend in den Subklonierungsvektor pCRII-Topo ligiert, in *E. coli* XL1-Blue transformiert und mittels Restriktionsanalyse überprüft.

Fmm3: 5'-AAT AGG CCG AAA TCG GCA GTG CAT TCA GGG ATA CCC AAT GGG-3'

Fmm4: 5'-CAA CGT AGT AAC CCG TTG -3'

pFF14 (pCRII Topo-Hyg-Nkin2 Downstream):

In diesem zweiten Schritt wurde die kodierende Sequenz der Hygromycin-Resistenz-Kassette, welche auf dem Plasmid pCB1179 enthalten ist, unter Verwendung der Primer NotI-Hyg und Hyg-NotI, durch PCR amplifiziert. Das PCR-Fragment wurde über die in den Primern eingebaute Restriktionsschnittstelle NotI, in das mit NotI geschnittene Plasmid pFF13 eingebaut und in *E. coli* XL1-Blue transformiert.

NotI-Hyg: 5'-AAA GCG GCC GCA GGG AAT AAG GGC GAC ACG G-3'

Hyg-NotI: 5'-AAA GCG GCC GCT GCC GAT TTC GGC CTA TTG G-3'

pFF15 (pNkin2Disruption):

In dem abschließenden dritten Schritt der Klonierungsstrategie, wurde unter Verwendung der Primer Fmm1-Xba und Fmm2-Xho, eine DNA-Sequenz von 2041 Basenpaaren aus einem Bereich von 2220-179 Basen upstream des Startkodons des *nkin2*-Gens, durch PCR amplifiziert. Dieses DNA-Fragment wurde mit den Restriktionsenzymen XbaI/ XhoI geschnitten und in das mit XbaI/ XhoI geschnittene Plasmid pFF14 ligiert. Nach der Transformation in *E. coli* XL1-Blue und der Überprüfung des Plasmids mittels Restriktionsanalyse, konnte das Plasmid mit SacI linearisiert werden und mit dem linearisierten Plasmid eine Transformation von *Neurospora* durchgeführt werden.

Fmm1-Xba: 5'-GGG TCT AGA CGT CTG GAG TCT CGA CCG-3'

Fmm2-Xho: 5'-GGG CTC GAG TCC GGA CGC GAT CAC AGC-3'

4.2 Methoden der Hefegenetik (Guthrie und Fink, 1991; Rose *et al.*, 1990)

4.2.1 Kultivierung von *S. cerevisiae*

Das Standardmedium war YPD (10 g Hefeextrakt, 20 g Bacto-Pepton, H₂O dest. ad. 900 ml, pH 5,5 mit 10 M KOH einstellen, nach dem Autoklavieren: + 67 ml 30 % Glucose zusetzen). Zur Selektion auf mitochondriale Funktion wurde YPG-Medium (10 g Hefeextrakt, 20 g Bacto-Pepton, H₂O dest. ad 900 ml, pH 5,5 mit 10 M KOH einstellen, nach dem Autoklavieren 100 ml 30 % Glycerin zusetzen) verwendet. Die Standardtemperatur für die Kultivierung von Hefezellen war 30°C.

Die Kultivierung von Flüssigkulturen erfolgte unter Schütteln bei 120 bis 160 Upm/min in Erlenmeyerkolben. Zur Herstellung von Agarplatten wurde den Medien 2% Bacto-Agar zugesetzt. Für die Isolierung von Mitochondrien wurde Hefe in Laktat-Medium (3 g Hefeextrakt, 1 g Glucose, 1 g KH_2PO_4 , 1 g NH_4Cl , 0,5 g $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, 0,5 g NaCl , 1,1 g $\text{MgSO}_4 \times 6 \text{H}_2\text{O}$, 0,3 ml 1 % FeCl_3 , 22 ml 90 % Milchsäure, H_2O dest. ad 1 l, pH 5,5 mit 10 M KOH einstellen) kultiviert. Atmungsdefiziente Hefestämme wurden in Laktat-Medium mit 1% Galaktose oder in YPD-Medium kultiviert. Die Kultur wurde immer im logarithmischen Wachstum gehalten. Die Hefestämme wurden bis zu zwei Monate auf Agarplatten bei 4°C gelagert.

4.2.2 Transformation von Hefe

DNA (2 mg/ml) aus Lachsspermien wurde 5 min lang bei 95°C denaturiert und anschließend sofort auf Eis gekühlt. 50 µl einer Suspension kompetenter Zellen wurden 5 min bei 3000 Upm in einer Tischzentrifuge zentrifugiert und der Überstand verworfen. Den Hefezellen wurden folgende Substanzen zugegeben: 240 µl PEG 3350 (50% (v/v)), 36 µl 1 M Lithiumacetat, 25 µl einzelsträngige Lachsspermien-DNA (2 mg/ml), 50 µl steriles Wasser, in dem 0,1 bis 10 µg der zu transformierenden DNA gelöst war. Der Ansatz wurde 1 min lang kräftig gemischt und unter leichtem Schütteln 30 min bei 30°C inkubiert. Darauf folgte eine 20- bis 25-minütige Inkubation bei 42°C. Nun wurden die Hefezellen 15 s bei 8000 Upm abzentrifugiert und in sterilem Wasser resuspendiert.

Die Selektion transformierter Zellen erfolgte über Auxotrophiemarker auf SD-Platten (2 % Laktat, 0,67 % Stickstoffbasis aus Hefe (ohne Aminosäuren), pH 5,5 mit 10 M KOH einstellen.) oder über Geneticinresistenz auf YPD-Platten, die 500 µg/ml Geneticin (G418) enthielten. Bei der Selektion auf G418 wurden die Zellen nach der Transformation zunächst in 1 ml YPD-Flüssigmedium aufgenommen und 2 bis 3 h bei 30°C inkubiert, um die Expression des Geneticin-Resistenzgens zu erlauben.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Teil einer Sammlung von Hefestämmen durchmustert. Diese Hefe-Bibliothek bestand aus 4794 homozygoten, diploiden Deletionsmutanten und war das Resultat einer weltweiten Kooperation von Hefelabors (Giaver *et al.*, 2002; Winzeler *et al.*, 1999). Eine Auflistung sämtlicher Stämme befindet sich auf der Webpage der Firma Research Genetics (ftp://ftp.resgen.com/pub/deletions/Homo_diploids_061101.txt). Für weitere Untersuchungen der Deletionsmutanten der Hefe-Bibliothek wurden die haploiden Stämme der Stammsammlung EUROSCARF verwendet (<http://www.uni-frankfurt.de/fb15/mikro/euroscarf/>).

4.3 Molekularbiologische Arbeiten mit *N. crassa*

4.3.1 Kultivierung von *N. crassa*

Die Kultivierung von *N. crassa* erfolgte im Wesentlichen nach Davis und de Serres (Davis und de Serres, 1970).

Verwendete Medien:

Vollmedium: 2 % 50 x Vogels Minimalmedium, 1 % (w/v) Glycerin, 1 % (w/v) Zucker, 0,2 % (w/v) Hefeextrakt, 0,1 % Caseinhydrolysat

Minimalmedium: 930 ml H₂O, 20 ml 50 x Vogels Minimalmedium (Vogel, 1964) und 40 ml 1,4 M Saccharose; einzelne Komponenten separat autoklaviert.

50 x Vogels Minimalmedium: 150 g Na₃-Citrat x H₂O, 250 g KH₂PO₄, 100 g NH₄NO₃, 10 g MgSO₄, 5 g CaCl₂, 5 ml Spurenelementlösung, 2,5 ml Biotinlösung gelöst in einem Liter H₂O

Spurenelementlösung: 50 g Zitronensäure, 50 g Zinksulfat, 10 g Fe ((NH₄) SO₄), 2,5 g CuSO₄, 0,5 g MnSO₄ x H₂O; 0,5 g Na₂MoO₄, 0,5 g H₃BO₃ (wasserfrei) gelöst in 1 l H₂O

Biotinlösung: 100 ml Ethanol, 100 ml H₂O, 20 mg Biotin

STC : 91 g Sorbitol, 25 ml 1 M Tris pH 8, 1 M CaCl₂, ad 500 ml H₂O dest.

PTC: 200 g PEG 4000, 1 M Tris pH 8,

10 x FIGS: 100 g Sorbose, 2,5 g Fructose, 2,5 g Glucose, ad 500 ml H₂O dest.

Boden-Agar: 10 ml 50 x Vogels, 7,5 g Agar, 440 ml H₂O dest. nach dem Autoklavieren

50 ml 10 x FIGS und Resistenzmarker zusetzen (Hygromycin B, BASTA)

Zum Ansetzen der Bodenplatten für die BASTA-Selektion, wurde Vogels ohne Stickstoffquelle verwendet.

Top-Agar: 10 ml 50 x Vogels, 91 g Sorbitol, 14 g Agar, ad 450 ml H₂O dest., autoklavieren

50 ml 10 x Figs zusetzen und in 10-15 ml Aliquots portionieren.

Sorboseplatten: 2 % (v/v) 50 x Vogels, 2 % (w/v) Sorbose, 2 % (w/v) Agar

4.3.2 Gewinnung von Konidien

Die Anzucht der Konidien erfolgte in 250 ml Erlenmeyerkolben auf Voll- bzw. Minimalmedium (4.3.1) mit 2 % (w/v) Agar. Das Medium wurde entweder mit Myzel, oder mit Konidien suspension angeimpft. Alternativ war zudem die Anzucht mit silikatgetrockneten Hyphen möglich.

Zunächst wurde der angeimpfte Erlenmeyerkolben 3-7 Tage im Dunkeln bei 30°C inkubiert. Um die Bildung und Reifung der Konidien zu initiieren, folgte weitere Inkubation über 3-5 Tage bei Raumtemperatur und Lichteinwirkung.

Im Falle des Stammes mit GFP-markierten Mitochondrien wurde ohne Lichteinwirkung inkubiert, um vorzeitiges Ausbleichen des GFP zu verhindern. Das Ernten der Konidien erfolgte durch Abschwemmen mit sterilem Wasser. Um abgelöste Hyphen von den Konidien abzutrennen, wurde die Suspension durch sterile Watte filtriert. Die Konzentration der Konidiensuspension wurde durch Auszählen unter einem Lichtmikroskop bestimmt.

4.3.3 Anzucht von Hyphen

Die Kultivierung von *N. crassa* erfolgte standardmäßig für 15 h bei 25°C in Minimalmedium, das mit 2×10^9 Konidien/l Kultur angeimpft wurde. Um gutes Wachstum zu garantieren und den Befall der Kultur durch Bakterien zu verhindern, wurde sterile Luft in die Kulturen eingeblasen und diese beleuchtet. Die Anzucht des Stammes mit GFP-gefärbten Mitochondrien erfolgte wiederum ohne Lichteinwirkung.

4.3.4 Konservierung der Hyphen durch Silikattrocknung

Die aus einem Anzuchtkolben gewonnenen Konidien wurden mit 10 ml steriler Milch (10 % (w/v) Milchpulver in Wasser) geerntet und durch sterile Watte filtriert. Anschließend wurden dreimal je 1 ml dieser Suspension mit etwa 1 g sterilem Kieselgel vermischt und zwei bis drei Wochen in einem Exsikkator getrocknet. Die Kulturen wurden bei 4°C oder -70°C gelagert.

4.3.5 Herstellung von Sphäroplasten

Zur Transformation der *N. crassa* Stämme wurden zunächst Sphäroplasten hergestellt. Hierzu wurde Minimalmedium mit 2×10^9 /l frisch gewachsener Konidien inokuliert. Anschließend wurde die Kultur solange inkubiert bis 90 % aller Konidien ausgekeimt waren (4-6 h). Die Auskeimzeit ist eine kritische Komponente bei diesem Prozess, weil zu lange Hyphenschläuche schnell abbrechen und so die Ausbeute verschlechtert wird.

Anschließend wurden die Hyphenschläuche pelletiert, einmal mit eiskaltem Wasser gewaschen und in 10 ml 1 M Sorbitol resuspendiert. Zur Herstellung der Sphäroplasten wurde die Hyphenzellwand mit Novozym 234 (3 mg/ml) verdaut und 30 min bei 30°C geschüttelt. Im Anschluss an den Verdau wurden die Protoplasten zweimal mit 1 M Sorbitol und STC-Puffer gewaschen und zuletzt in 15 ml STC, 4 ml PTC und 200 µl DMSO aufgenommen. Die Sphäroplastensuspension wurde aliquotiert, langsam bei -20°C eingefroren und bei -70°C gelagert.

4.3.6 Transformation von Sphäroplasten

Die Transformation von *N. crassa* erfolgte nach etablierten Methoden. (Vollmer und Yanofsky, 1986; Staben *et al.*, 1989). Zur Transformation wurden 100 µl Sphäroplastensuspension langsam auf Eis aufgetaut, mit einer Mischung aus 5 µl DNA (entspricht ca. 1-5 µg), 2 µl 50 mM Spermidin/HCl und 5 µl Heparin (5 mg/ml in STC) versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Der Transformationsansatz wurde dann mit 1 ml PTC versetzt, kräftig vermischt und 20 min bei Raumtemperatur belassen. Dann wurde die Suspension mit ca. 55°C warmen Top-Agar gemischt und auf Bottom-Agar-Platten ausplattiert. Je nach Konstrukt wurde dem Bottom-Agar-Platten Hygromycin B (150 µg/ml) oder BASTA (0,3 g/l) zugesetzt. Die Platten wurden zwei bis fünf Tage bei 30°C inkubiert und die gewachsenen Klone zur weiteren Untersuchung auf Schrägagarröhrchen transferiert.

4.3.7 Erzeugung von homokaryotischen Stämmen

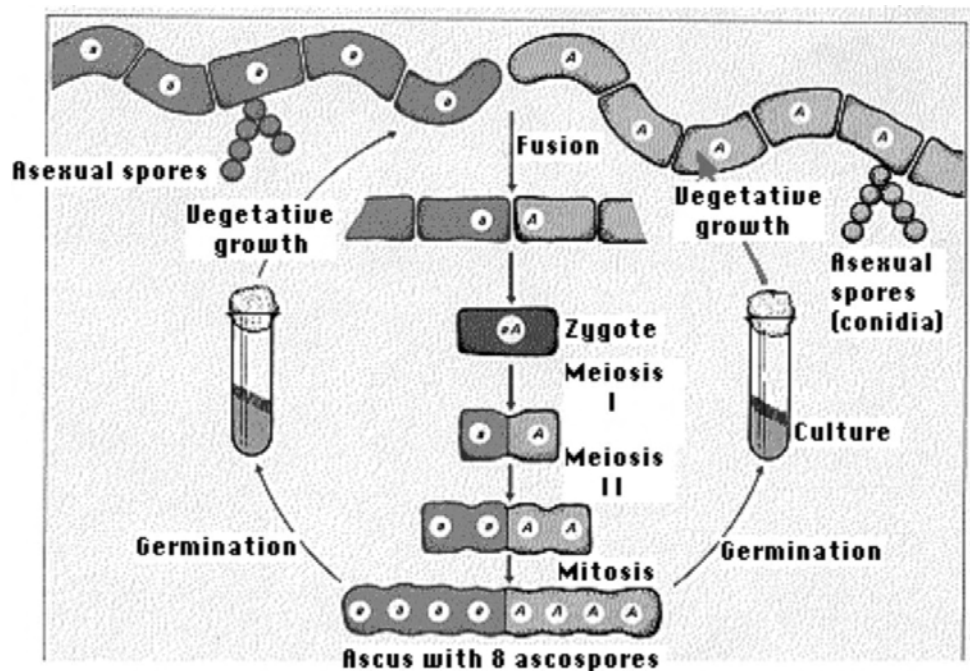


Abb. 5. Asexueller Lebenszyklus von *Neurospora crassa* (Bild bezogen von <http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/N/Neurospora.gif>)

Stämme unterschiedlichen Geschlechtes, hier als Typ A und Typ a bezeichnet fusionieren und bilden einen Ascus. Die gebildete diploide Zelle bildet nach Meiose vier haploide Zellen aus. Die haploiden Zellen wiederum durchlaufen eine mitotische Teilung, wodurch acht Ascosporen gebildet werden.

Aufgrund des asexuellen Lebenszyklus von *N. crassa* enthalten Hyphen bis zu acht Kerne bzw. Ascus. Nach einer Transformation enthält die Hyphe nicht nur transformierte Kerne. Es entstehen sog. Heterokaryoten.

Zur Erzielung von Disruptionsmutanten ist die Selektionierung von homokaryotischen Stämmen notwendig. Hierzu bieten sich zwei Methoden an, die Kreuzung oder die Initiierung und Gewinnung von Mikrokonidien.

4.3.7.1 Initiierung von Mikrokonidien

Durch Wachstum von heterokaryotischen Stämmen auf einem jodacetathaltigen Medium (1 mM Endkonzentration) wurden Hyphen zur Bildung von einkernigen Mikrokonidien angeregt, aus denen dann homokaryotische Stämme angezogen werden konnten (Ebole und Sachs, 1990).

Die Ausbildung der Mikrokonidien erfolgte für sieben bis zehn Tage bei Raumtemperatur auf Mikrokonidien-Medium (0,1 x SC, 0,5 % Saccharose, 2 % Agar, 1 mM Iodoacetat). Anschließend wurden die gebildeten Mikrokonidien mit sterilem Wasser abgeschwemmt. Unter diesen Bedingungen wird jedoch ebenfalls ein geringer Anteil an Makrokonidien ausgebildet. Um diese Makrokonidien von den Mikrokonidien abzutrennen, wurde ein steriler Filter (Millex-SV, Millipore) einer Porengröße von fünf µm verwendet.

Die Methode der Mikrokonidieninitiierung konnte hinsichtlich der Gewinnung eines homokaryotischen mtGFP-exprimierenden Stammes erfolgreich eingesetzt werden. Hierzu wurden die Mikrokonidien zwei bis drei Tage bei 30°C auf Sorbose/Hyg Platten inkubiert. Zur Verifizierung der Hygromycin B-Resistenz des Stammes, wurde der Stamm mehrfach auf Hygromycin B-haltigem (150 µg/ml Endkonzentration) Flüssigminimalmedium überimpft.

4.3.7.2 Kreuzung von *N. crassa*

Zur Kreuzung von zwei Stämmen wurde der eine Stamm auf Kreuzungsmedium (2 % corn meal agar, 2 % Vogels, 2 % Saccharose) bei 25 °C inkubiert bis die gesamte Platte bewachsen ist und sich braune Protoperithetien gebildet haben. Die Bildung der Protoperithetien wurde mikroskopisch verfolgt (Zeiss Stereomikroskop Stemi SV 6). Anschließend wurde der zweite Kreuzungspartner als Konidien suspension gleichmäßig auf der Platte verteilt.

Nach einer Inkubationszeit von fünf bis sieben Tagen unter Lichtausschluss, bilden sich braune Peritethien, die sich nach 10 Tagen schwarz färben.

Stellt man die Platte dann ans Licht, so werden nach kurzer Zeit die Ascosporen herausgeschleudert und fangen sich in den an dem Deckel befindlichen kondensierten Wassertropfen. Die Ascosporen können in diesen Wassertropfen aufgefangen, auf eine Hartagarplatte (4 % Agar) überführt und auf dieser durch Ausplattieren vereinzelt werden. Die einzelnen Ascosporen wurden dann mit einer Impfnadel in Schrägagarröhrchen überführt. Damit eine hohe Keimungseffizienz der Ascosporen erzielt wird, musste man die Ascosporen dann noch 30 min bei 65°C einem Temperaturschock aussetzen.

4.3.8 Isolation genomischer DNA aus *N. crassa*

Die Gewinnung genomischer DNA aus *N. crassa* erfolgte nach etablierter Methode (Lee *et al.*, 1988). Hierzu wurden Hyphen aus Flüssigmedium geerntet, diese gewaschen und anschließend mit 1 g Seesand pro g Hyphen versetzt. Durch Übergießen mit flüssigem Stickstoff wurden die Hyphen schockgefroren, in einem Mörser zu einem groben Pulver zerrieben und in einem Eppendorfgefäß mit 750 µl Aufschlusspuffer (50 mM Tris/HCl pH 8,0, 50 mM EDTA, 3 % SDS, 1 % β-Mercaptoethanol) versetzt. Nach Homogenisierung der Suspension durch kräftiges Mischen wurde 2 h bei 65°C inkubiert. Zur Abtrennung der Proteine wurde der Ansatz zunächst mit 700 µl Chloroform/Phenol (1:1) versetzt und anschließend die wässrige Phase nochmals mit Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) extrahiert. Die DNA wurde durch Zugabe des 0,7-fachen Volumens an Isopropanol präzipitiert, anschließend pelletiert, in 300 µl TE-Puffer, der RNase (0,1 mg/ml) enthielt, aufgenommen und 10 min bei 65°C inkubiert. Zur weiteren Reinigung wurde die DNA durch Zugabe von 30 µl Natriumacetat und 600 µl Ethanol ausgefällt, mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen, getrocknet und in 100 µl TE aufgenommen. 5 µl dieser Proben wurden anschließend zum Testverdau eingesetzt.

4.3.9 Transfer von DNA auf Nylon-Membranen

Southern-Blot: Mit diesem Verfahren wurden DNA-Fragmente, die durch Gelelektrophorese nach ihrer Größe aufgetrennt wurden, aus der Gelmatrix auf eine Trägermembran (Biodyne A Nylonmembran, Pall-Gelman) unter Beibehaltung des Trennmusters übertragen und immobilisiert. 10-15 µg genomischer DNA aus *N. crassa* wurden mit geeigneten Restriktionsenzymen geschnitten und in einem 0.7 %igem Agarosegel aufgetrennt.

Zum besseren Transfer hochmolekularer Fragmente wurde die DNA durch Inkubation des Gels in 0,25 M HCl für 10 Min durch Depurinierung fragmentiert. Die zweimalige 30 minütige Inkubation des Gels in 1,5 M NaCl, 0,5 N NaOH, denaturierte die DNA. Nach einer zweimaligen Neutralisation für 30 min in 1,5 M NaCl, 1 M Tris/HCl, pH 7,4 erfolgte anschließend der Aufbau des Southern-Kapillartransfers.

Als Transferpuffer wurde 20 x SSC (3 M NaCl, 0,3 M Na-Citrat, pH 6,6, 20 % SDS) verwendet. Nach mindestens 12 Stunden wurde der Transfer unterbrochen, die Nylonmembran kurz in 6 x SSC gewaschen, an der Luft getrocknet und durch ein Backen für 2 Stunden bei 80°C irreversibel gebunden.

4.3.10 Analyse von DNA-Blots durch Hybridisierung mit Digoxigenin-markierten DNA-Sonden (Southern, 1975)

Zur Erkennung identischer DNA-Sequenzen wurden Hybridisierungen durchgeführt. Dabei ist eine DNA-Probe auf einer Membran immobilisiert, die Zweite molekular markiert (Sonde). Letzterer wird die Gelegenheit zur Anlagerung an die identischen Sequenzen der immobilisierten DNA gegeben. Die hybridisierte Sonde kann anschließend aufgrund ihrer Markierung nachgewiesen werden.

Die Hybridisierung und Detektion mit Digoxigenin (DIG)-markierten Sonden erfolgte im Wesentlichen nach der Vorschrift von Roche Diagnostics: Hierbei wird eine DNA-Sonde mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion amplifiziert, wobei 1/3 des dTTP durch dUTP mit kovalent gebundenem DIG (DIG-dUTP, Roche Diagnostics) ersetzt ist. Nach der Hybridisierung erfolgt der Nachweis der Sonden durch Anlagerung eines gegen DIG-gerichteten Antikörpers, der an seinem Ende das Enzym alkalische Phosphatase trägt. Das Enzym dephosphoryliert das Substrat CDP-Star bzw. CSPD. Die Dephosphorylierung des Substrates führt zu einem metastabilen Phenolat-Anion, das beim Zerfall Licht der Wellenlänge von 477 nm emittiert und detektiert werden kann. Wie bei den radioaktiv markierten Sonden kann mit dem Auflegen von Röntgenfilmen diese Lichtaussendung sichtbar gemacht werden.

Nichtradioaktive Markierung von DNA mit Digoxigenin

Für die Amplifikation der DIG-markierten Sonde wurden der DIG Probe Synthesis Kit von Roche Diagnostics verwendet. Ein 5 µl-Ansatz enthielt neben 5 µl PCR-Puffer und 5 µl dNTP-Mix (mit je 2 mM dNTP) jeweils 50 pmol Oligonukleotide, 0,1 µg Matrizen-DNA.

Verwendete Sonden:

Als Basis wurde ein Bereich von 3000 Basen downstream und upstream der genomischen DNA-Sequenz von *nkin2*, welche aus der *Neurospora*-Genomdatenbank stammt, verwendet, d.h. der Basenpaarbereich von 1 bis 3000 entspricht dem DNA-Bereich upstream des ATG- Startkodons. Der Sequenzbereich von 8750-11750 entspricht dem Bereich Downstream des Stoppkodons.

Sonde 1 (Upstream *nkin2*-Gen): Die Sequenz des Bereichs von 2221-2640 wurde unter Verwendung der Primer Fmm36/ Fmm37 und dem Plasmid pFF15 als Matrize, durch PCR amplifiziert.

Fmm36: 5'-CAA CAA CTA CAC TAC ACA CAA GCC AC-3'

Fmm37: 5'-GTC GCC TGG CCG ACG GTA ATC GC-3'

Sonde 2 (Downstream *nkin2*-Gen): Die Sequenz des Bereichs von 8863-9270 wurde mit der Primern Fmm7/Fmm8 und dem Plasmid pFF15 als Matrize, durch PCR amplifiziert.

Fmm7: 5'-GTG CAT TCA GGG ATA CCC-3'

Fmm8: 5'-CGG ATG AAT ACA TAC CTA TG-3'

Hybridisierung mit DIG-markierten Sonden

Nach dem Transfer der DNA auf Nylonmembranen (siehe Abschnitt Southern-Blot) erfolgte zunächst eine 3-stündige Prähybridisierung bei 42°C in Standardhybridisierungspuffer (5 x SSC, 50 % Formamid, 0,1 % Natrium-Laurylsarcosin, 0,02 % SDS, 2 % Blockreagenz). Im Anschluss daran wurde die Membran über Nacht bei 42°C mit der in Standardhybridisierungspuffer gelösten DIG-markierten Sonde inkubiert.

Zum Entfernen unspezifisch an die Membran gebundener DNA wurde die Membran zunächst zweimal 5 min bei Raumtemperatur mit Waschlösung 1 (2 x SSC, 0,1 % SDS) gewaschen, es folgte eine zweimalige Inkubation über 15 min bei 68°C in Waschlösung 2 (0,5 x SSC, 0,1 % SDS).

Nachweis DIG-markierter Sonden:

Zum Nachweis der DIG-markierten Sonde auf der Nylonmembran wurde diese kurz mit dem Puffer P1 (150 mM NaCl, 0,3 % Tween 20, 100 mM Maleinsäure, pH 7,5) gewaschen, anschließend wurde die Membran durch Inkubation für 1 h in Blocklösung (1 % (w/v) Blockreagenz in Puffer P1) abgesättigt. Es folgte die Dekoration mit dem DIG-spezifischen Antikörper. Dazu wurde der Antikörper 1:10000 in Blocklösung verdünnt und für 1 h mit der Membran inkubiert. Danach wurde die Membran zweimal mit dem Puffer P1 gewaschen.

Für die Aktivierung der an den Antikörper gekoppelten alkalischen Phosphatase wurde die Membran anschließend für 5 min in Puffer P3 (100 mM NaCl, 100 mM Tris/HCl, pH 9,5) äquilibriert, es folgte eine Inkubation für 5 min mit dem Substrat CSPD, welches 1:100 in Puffer P3 verdünnt war. Danach wurde überschüssige Lösung von der Membran entfernt und zur Verstärkung des Signals weitere 10 min bei 37°C inkubiert. Die Chemilumineszenzreaktion lief bei RT ab und wurde durch einen Röntgenfilm (Fuji NewRX) detektiert.

Zum Ablösen der an die Membran gebundenen Sonden wurde die Membran zunächst kurz in H₂O (bidest) gewaschen und anschließend die Sonde in der NaOH/SDS-Lösung (0,2 M NaOH, 1 % (w/v) SDS) für zweimal 15 min bei 37°C von der Membran gelöst.

Nach dem Waschen in 2 x SSC für 5 min konnte die Membran entweder getrocknet oder sofort für das nächste Hybridisierungsexperiment eingesetzt werden.

4.3.11 Herstellung der *nkin2*-Disruptionsstämme

Zur Herstellung des heterokaryotischen *nkin2*-Disruptionstammes wurde der heterokaryotische Stamm HP1 (Nargang *et al.*, 1995) mit dem Plasmid pFF15 transformiert und HygromycinB-resistente Einzelstämme isoliert. Von diesen Stämmen wurde genomische DNA isoliert und die Insertion des Disruptionskonstruktes in den *nkin2*-Genlocus mittels Southern-Blot überprüft. Ein Stamm welcher die korrekte Insertion besaß, wurde für weitere Untersuchungen verwendet und mit Dis34 bezeichnet. Durch Anzucht des Stammes in Minimalmedium supplementiert mit 0,2 mg/ml Histidin und 400 µM FPA konnte auf den disruptierten Karyon selektioniert werden. Zur Herstellung des homokaryotischen Disruptionstammes wurde der Stamm Dis34 mehrfach auf Selektivmedium inkubiert und somit der disruptierte Karyon forciert. Anschließend wurden Konidien initiiert und diese Konidien zur Isolierung von Einzelstämmen, auf Sobose-haltigem Minimalmedium, supplementiert mit 0,2 mg/ml Histidin ausgestrichen. Diese Einzelstämme wurden anschließend auf ihre Wachstumsbedürfnisse untersucht. Stämme welche nur in Minimalmedium supplementiert mit Histidin, nicht aber mit 10 µg/ml Panthotenat wachsen konnten, sind homokaryotische *nkin2*-Disruptionsstämme. Sie wurden anschließend mittels Western-Blot und Southern-Blot überprüft.

4.3.12 Verwendete Neurosporastämme

Name des Stamms	Genotyp	Herstellung	Verwendungszweck
St. Lawrence WT74A			Wildtyp, eingesetzt zu Transformations und Kreuzungszwecken
WT93a			Wildtyp s.o.
NcGFP9		Transformation von St. Lawrence WT74A mit pFF9 (Fuchs <i>et al.</i> , 2002)	Visualisierung GFP-gefärbter Mitochondrien <i>in vivo</i> , Verhalten isolierter Mitochondrien <i>in vitro</i>
HP1	<i>his-3 mtrR a</i> <i>pan-2 BmlR a</i>	(Nargang <i>et al.</i> , 1995)	Stamm eingesetzt zur Disruption von essenziellen Genen in <i>N. crassa</i>
Dis34	<i>nkin2::hyg^R</i> <i>his⁻ pan⁺ ben^S fpa^R</i> <i>nkin2⁺</i> <i>his⁺ pan⁻ ben^S fpa^R</i>	Transformation von HP1 mit pFF15	„Sheltered Disruption“ von <i>nkin2</i> , heterokaryotischer Stamm
His-27	<i>nkin2::hyg^R</i> <i>his⁻ pan⁺ ben^S fpa^R</i>	Isolierter Stamm nach Mikrokonidisierung des Stamms Dis34	Sheltered Disruption von <i>nkin2</i> , Homokaryotischer Stamm
<i>mmm-1</i> ^{Rip23}		(Prokisch <i>et al.</i> , 2000)	Rip Knockout Mutante von <i>mmm1</i>

Tab. 3. Liste der in dieser Arbeit verwendeten *N. crassa* Stämme

4.4 Methoden der Zellbiologie

4.4.1 Gewinnung von Gesamtzellprotein aus *N. crassa*

Zur Isolierung von Gesamtzellprotein wurden Hyphen, alternativ ein Myzel, mit Hilfe von flüssigem Stickstoff schockgefroren und in einem Mörser zerrieben. Nach Verdunsten

des Stickstoffs wurden pro Gramm Myzel 1 ml SEM-Puffer (250 mM Saccharose, 1 mM EDTA, 10 mM Mops, pH 7,2) mit 1 mM PMSF und 1 % SDS dazugegeben. Der Zellextrakt wurde durch Zentrifugation (5 min, 4000 xg, 4°C) von unlöslichen Bestandteilen befreit und durch SDS-PAGE sowie anschließender Immundekoration analysiert. Zur Gewinnung von Gesamtzellprotein aus Konidien wurde eine andere Aufschlussmethode verwendet. Für diesen Aufschluss wurden 30 OD (optischen Dichte) Konidien abgenommen, diese mit 100 µl 1 x Laemmli-Aufschlusspuffer versetzt und ein 1/2 Volumen Glassbeads zugesetzt. Der Ansatz wurde fünf Minuten bei 95°C gekocht und anschließend weitere fünf Minuten kräftig durchmischt. Danach wurden 400 µl 1 x Laemmli-Aufschlusspuffer zugesetzt und 10 min bei 12000 Upm in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und je nach Konzentration zwischen 10-20 µl auf einem denaturierenden Gel durch Elektrophorese aufgetrennt.

4.4.2 Isolation von Mitochondrien aus *N. crassa*

Zur Präparation kleinerer Mengen an Mitochondrien wurden 20 g Hyphen (aus einer 2 l Kultur) mit 20 g Seesand und 20 ml SEM (250 mM Saccharose, 10 mM Mops, pH 7,2 und 1 mM EDTA) mit 1 mM PMSF ca. 1 min in einem Mörser zerrieben. Nach Zugabe weiterer 40 ml SEM mit 1 mM PMSF und Zerreiben des Homogenisats über insgesamt 5 min, wurden die Mitochondrien durch differenzielle Zentrifugation aus dem Homogenisat abgetrennt. In den ersten beiden Zentrifugationsschritten (jeweils 5 min, 3000 xg, 4°C, Beckmann JA 10) verbleiben die Mitochondrien im Überstand. In der dritten Zentrifugation (12 min, 17000 xg, 4°C, Beckmann JA 20) sedimentieren sie. Die Mitochondrien wurden in 20 ml SEM-Puffer (250 mM Saccharose, 10 mM Mops, pH 7,2 und 1 mM EDTA) resuspendiert und erneut sedimentiert (12 min, 17000 xg, 4°C, Beckmann JA 20), in 1 ml SEM-Puffer aufgenommen und die Konzentration mittels Bradford-Assay (4.5.5) ermittelt. Die Ausbeute betrug etwa 0,3 mg mitochondriales Protein pro Gramm Hyphen (Feuchtwicht).

Die Gewinnung größerer Mengen an Mitochondrien, wie sie für die Präparation von Außenmembranvesikeln notwendig sind, folgte dem gleichen Protokoll, die Hyphen wurden jedoch nicht von Hand, sondern in einer Zelmühle (Sebald und Neupert, 1979) aufgebrochen. 1000-2000 g Hyphen aus einer 100 l-Kultur wurden in 3 l SEM-Puffer mit 1 mM PMSF aufgenommen, mit 1500-3000 g Quarzsand versetzt und in einem Mixer (Waring Blender) zerkleinert. Der erhaltene Brei wurde zuerst in einer gröberen und anschließend in einer feineren Zelmühle homogenisiert. Aus dem Zellhomogenisat wurden die Mitochondrien (ca. 5-10 mg/g Hyphen) durch Zentrifugation abgetrennt wie oben beschrieben.

4.4.3 Aufreinigung von Mitochondrien mittels Saccharosegradientenlauf

Zur Untersuchung zur Lokalisierung von Proteinen wurden Mitochondrien wie unter (2.4.2) beschrieben isoliert und über einen Saccharose-Stufen-Gradienten weiter aufgereinigt (Rowley *et al.*, 1994). Die Mitochondrien wurden auf einen Gradienten mit 20 %, 30 %, 40 %, 50 % und 60 % Saccharose (w/w) in 10 mM Mops/KOH pH 7,2, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF) geladen und zentrifugiert (240000 xg, 15 min, 4°C, Beckman SW 41-Rotor). Die Mitochondrien in der Bande zwischen der 40 % und der 50 % Saccharose-Phase wurden gesammelt, durch Zentrifugation (12000 xg, 10 min, 4°C) konzentriert, mit SEM-Puffer (250 mM Saccharose, 10 mM Mops/KOH, pH 7,2) gewaschen, erneut zentrifugiert und in SEM-Puffer resuspendiert.

4.4.4 Isolierung von mitochondrialen Außenmembranvesikeln

Die Präparation von Außenmembranvesikeln erfolgte nach etablierter Methode (Mayer *et al.*, 1993). Isolierte Mitochondrien von *N. crassa* (aus 100 l Kultur) wurden bei einer Proteinkonzentration von 20 mg/ml in 250 mM Saccharose, 2,5 mM EDTA, 10 mM Mops/KOH, pH 7,2, 1 mM PMSF aufgenommen und 10 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Mitochondriensuspension mit 10 Volumina eines eiskalten hypotonen Schwellpuffers (5 mM KPi, pH 7,2, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF) verdünnt und für 30 min unter Rühren bei 4°C inkubiert. Die Mitochondrienmembranen wurden durch Zentrifugation (17700 xg, 45 min, 4°C) reisoliert und erneut in Schwellpuffer resuspendiert. In einem automatischen Glass-Teflon-Homogenisator wurden während 40 min bei 4°C, Teile der Außenmembran von den Mitoplasten abgeschert. Jeweils 20 ml Homogenisat wurden auf einem Stufengradienten aufgetragen (10 ml 0,9 M Saccharose und 9 ml 0,25 M Saccharose in OMP (1 mM EDTA, 10 mM Mops/KOH, pH 7,2 und 1 mM PMSF) und in einem Beckman SW 28 Rotor zentrifugiert (14100 xg, 1 h, 4°C).

Während intakte Mitochondrien, Mitoplasten und Bruchstücke der Innenmembran sedimentieren, sammelte sich die mitochondriale Außenmembran zusammen mit einer Fraktion mittlerer Dichte (IDF), einer Mischung aus Außen- und Innenmembran, an der Grenzschicht zwischen 0,25 M und 0,9 M Saccharose an. Diese Schicht wurde mit der Pipette abgesaugt und auf eine Saccharosekonzentration von 0,9 M eingestellt. Jeweils 14 ml der Probe wurden mit 20 ml 0,72 M Saccharose in OMP und mit 3 ml OMP (ohne Saccharose) überschichtet.

In der folgenden Flotationszentrifugation (141000 xg , 10 h, 4°C, Beckman SW 28) sammeln sich die Außenmembranvesikel aufgrund ihrer geringen Dichte an der Grenzschicht zwischen 0,72 M Saccharose und OMP ohne Saccharose an. Verunreinigungen wie die IDF oder das endoplasmatische Retikulum besitzen eine höhere Dichte und bleiben in der Schicht zwischen 0,72 M und 0,9 M Saccharose zurück. Die Außenmembranvesikel wurden erneut mittels einer Pipette abgenommen und mit 50 mM Kaliumacetatpuffer, pH 7,0, im Verhältnis 1:2 verdünnt. Durch eine anschließende Zentrifugation (257000 xg , 1 h, 4°C, Beckman SW 41 Rotor) wurden die Außenmembranvesikel sedimentiert und in 3-5 ml 50 mM Kaliumacetat, pH 7,0 resuspendiert. Die isolierten Außenmembranvesikel wurden entweder frisch verwendet oder in flüssigen Stickstoff eingefroren und bei -70°C gelagert.

4.5 Methoden der Proteinchemie

4.5.1 Reinigung rekombinanter Proteine mit His-Anhang aus *E. coli*

Das Hexahistidinpeptid-Fusionsprotein Nkin2 (aa372-aa602)-His₆, kodiert auf dem Plasmid pFF12, wurde in *E. coli* exprimiert und mittels Ni-NTA-Chromatographie unter nativen Bedingungen gereinigt. Hierfür wurde eine 400 ml Kultur mit Bakterien, welche das Expressionsplasmid enthielten, angeimpft und in LB-Amp (4.1.8.2) bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 angezogen. Anschließend wurde die Expression des rekombinanten Proteins für 4 h durch Zugabe von 0,5–2 mM IPTG induziert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (3000 g, 10 min, 4°C, Beckman JA 10 Rotor) geerntet, in 15 ml Puffer A (200 mM NaCl, 10 mM Imidazol, 50 mM Natriumphosphat, pH 8,0, 10 % (v/v) Glycerol), der 1 mM PMSF enthielt, resuspendiert. Nach Zugabe von 10 mg/ml Lysozym und Inkubation auf Eis über 30 min wurden die Zellen durch Beschallung (Makrospitze, Stufe 5, 50 % Duty Cycle, 10 Impulse von je 10 sec, durch 10 sec Intervalle unterbrochen) aufgeschlossen.

Das Zellysate wurde zentrifugiert (17500 xg, 15 min, 4°C, Beckman JA 20 Rotor), und anschließend das im Überstand befindliche rekombinante Protein auf eine 3-ml-Säule mit Ni-NTA-Agarose, die vorher mit 3 Säulenvolumina Puffer A äquilibriert worden war, geladen. Ungebundenes Material wurde durch Waschen der Säule mit 5 Säulenvolumina Puffer A entfernt, die Elution des rekombinanten Proteins erfolgte durch einen linearen Gradienten über 15 ml von 0 bis 60 % Puffer B (200 mM NaCl, 300 mM Imidazol, 50 mM Natriumphosphat, pH 8,0, 10 % (v/v) Glycerol). Das auf diese Weise gewonnene lösliche Protein wurde als Antigen für die Gewinnung eines polyklonalen Antikörpers gegen Nkin2 (4.1.9) eingesetzt.

4.5.2 Reinigung rekombinanter Proteine mit GST-Anhang aus *E. coli*

Zur Expression von Proteinen mit GST-Anhang wurden *E. coli* des Stammes BL21 verwendet, die das Plasmid pETGEXCT (Sharrocks et al., 1994) enthielten, in das die cDNA des entsprechenden Proteins kloniert wurde. Eine 400 ml *E. coli* Kultur wurde in LB-Amp mit Chloramphenicol (34 µg/ml) bei 37°C unter Schütteln bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 angezogen. Anschließend wurde die Expression des rekombinanten Proteins für 3 h durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (3000 xg, 10 min, 4°C, Beckman JA 10 Rotor) geerntet, in 15 ml Puffer A (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,2 mM Natriumphosphat, 1,9 mM Kaliumphosphat, pH 7,4), der 1 mM PMSF enthielt, resuspendiert. Die Zellen wurden durch Beschallung (Makrospitze, Stufe 5, 50 % Duty Cycle, 10 Impulse von je 10 sec, durch 10 sec Intervalle unterbrochen) aufgeschlossen. Das Zellysate wurde anschließend zentrifugiert (17500 xg, 15 min, 4°C, Beckman JA 20 Rotor).

Der Überstand enthält lösliches rekombinantes Protein. Proteine, welche Einschlusskörper bilden, verbleiben im Membranpellet.

4.5.3 Reinigung von Proteinen aus Einschlusskörpern

Das GST-Fusionsprotein Nkin3-Full, kodiert auf dem Plasmid pFF10, sowie das GST-Fusionsprotein NKin3-C-Term., kodiert auf dem Plasmid pFF11, bilden nach Expression in LB-Amp/Chloramphenicol, Einschlusskörper aus denen sie aufgereinigt werden müssen.

Eine 400 ml Kultur mit Bakterien, die das jeweilige Expressionsplasmid besitzen, wurde in LB-Amp mit Chloramphenicol (34 µg/ml) bei 37°C unter Schütteln bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 angezogen. Anschließend wurde die Expression des rekombinanten Proteins für 3 h durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert.

Die Zellen wurden durch Zentrifugation (3000 xg, 10 min, 4°C, Beckman JA 10 Rotor) geerntet. Das Bakterienpellet wurde anschließend in 10 ml H₂O aufgenommen und nach Zugabe von 10 ml 2 x Lysepuffer (20 mM NaP_i pH 7,2, 60 mM NaCl, 0,5 % Tween 20, 20 mM β-Mercaptoethanol) resuspendiert. Danach wurde Lysozym bis zu einer Endkonzentration von 0,1 mg/ml zugesetzt. Zum Verdau der Bakterienzellwand wurde dann 30 min auf Eis inkubiert. Nach der Lysozyminkubation wurde der Ansatz im Sonifizierer (12 x 10 s, 4°C, Stufe 4, Duty 80 %) beschallt. Im Anschluss wurden zwei ml 5 M NaCl dem Ansatz zugesetzt und zentrifugiert (JA 20 Rotor, 15000 Upm, 4°C). Der Überstand wurde aufgehoben und das Pellet in 20 ml Lösung 2 (20 mM Tris pH 7,4, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 % Triton X-100) resuspendiert. Es folgte ein Beschallen der Suspension (3 x 10 s, 4°C, Stufe 5, Duty 40 %). Erneut wurde 30 min bei 4°C und 15000 Upm unter Verwendung eines JA20 Rotors zentrifugiert. Nicht aufgeschlossenes Bakterienpellet wurde dann in 20 ml Lösung 3 (20 mM Tris pH 7,4, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF) aufgenommen. Es folgte ein weiterer Aufschluss- und Reinigungsschritt durch Beschallen (3 x 10 s, 4°C, Stufe 5, Duty 40 %) und zentrifugieren (30 min, 4°C, 15000 Upm, JA 20). Zum Abschluss wurde das Bakterienpellet in 1 ml Lösung 5 (7 M Harnstoff, 50 mM Tris pH 7,4) aufgenommen. Die erhaltenen Proteinlösungen wurden als Antigenlösung zur Herstellung von Antikörpern gegen Nkin3 (4.6.1) verwendet.

4.5.4 Denaturierende Fällung von Proteinen mit Trichloressigsäure

Proteine wurden nach Zugabe von Trichloressigsäure (10 % (w/v) Endkonzentration) während einer nachfolgenden Inkubation von mindestens 30 min auf Eis gefällt. Die Proben wurden zentrifugiert (Sigma Kühlzentrifuge, 14000 Upm, 4°C, 30 min), zweimal mit eisgekühltem Aceton gewaschen und in Laemmli-Auftragspuffer (2 % (w/v) SDS, 5 % (v/v) β-Mercaptoethanol, 10 % (v/v) Glycerin, 0,2 % Bromphenolblau, 60 mM Tris/HCl pH 6,8) aufgenommen.

4.5.5 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford (Bradford, 1976)

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach der von Bradford 1976 beschriebenen Methode, unter Verwendung des "BioRad-Proteinassay". Bei dieser Methode bindet der Farbstoff Coomassie G-250 an Proteine, wodurch das Absorptionsspektrum des Farbstoffes von 465 nm auf 595 nm verschoben wird. Die Proteinproben wurden mit einer 1:5-Verdünnung des Farbstoffkonzentrates gemischt und 5-15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei 595 nm gemessen. Zur Quantifizierung wurde zuvor eine Eichkurve mit Proteinen bekannter IgG-Konzentration erstellt.

4.5.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen (SDS-PAGE)

Proteine wurden durch diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unter Verwendung von BioRad-Minigelapparaturen aufgetrennt. Das Sammelgel hatte eine Abmessung von 5 x 72 x 0,75 mm und das Trenngel von 55 x 72 x 0,75 mm. Die Endkonzentration von Acrylamid betrug 9 bis 16 % (m/v). Die Proben wurden in 1 x Auftragspuffer (2 % SDS, 5 % (w/v) β -Mercaptoethanol, 10 % (v/v) Glycerin, 0,2 % Bromphenolblau, 60 mM Tris, pH 6,8) gelöst und vor dem Auftrag für 4 min auf 95°C erhitzt.

Die Elektrophorese erfolgte in vertikalen Kammern bei konstantem Stromfluss von 20 mA. Nach Beendigung der Gelelektrophorese wurden die aufgetrennten Proteine entweder mittels Silber- oder Coomasiefärbung (4.5.7-4.5.8) sichtbar gemacht oder zur immunologischen Detektion auf Nitrozellulosemembran transferiert (4.5.9).

Trenngellösung:

16 % (m/v) Acrylamid/ 0,10 % (m/v) Bisacrylamid (für Proteine mit einer molekularen Masse unterhalb 60 kDa) ;

11 % (m/v) Acrylamid/0,08 % (m/v) Bisacrylamid (für Proteine mit einer molekularen Masse über 60 kDa) 375 mM Tris/HCl, pH 8,8; 0,1 % (m/v) SDS; 0,1 % (m/v) APS; 0,01 % (v/v) TEMED.

Sammelgellösung: 5 % (m/v) Acrylamid; 0,03 % (m/v) Bisacrylamid; 60 mM Tris/HCl, pH 6,8; 0,1 % (m/v) SDS; 0,1 % (m/v) APS; 0,01 % (v/v) TEMED.

Bodengellösung: 20 % (m/v) Acrylamid; 0,13 % (m/v) Bisacrylamid; 375 mM Tris/HCl, pH 8,8; 0,1 % (m/v) SDS; 0,1 % APS (m/v); 0,01 % (v/v) TEMED.

10 x Laufpuffer: 0,5 M Tris/HCl pH 8,3; 3,8 M Glycin; 1 % (m/v) SDS.

4.5.7 Silberfärbung nach Blum (Blum *et al.*, 1987)

Die Nachweisgrenze dieser Methode liegt bei 1 ng pro Protein. Bei der Silberfärbung von Proteinen werden die Proteine zuerst im Gel fixiert und dann in einer Silbernitratlösung geschüttelt. Einige Silberionen werden von den Proteinen gebunden und durch Reduktion in Silberkeime umgewandelt. Mithilfe eines starken Reduktionsmittels werden die im Gel enthaltenen Silberionen zu metallischem Silber reduziert. Dieser Vorgang läuft in der Nähe von Silberkeimen sehr viel schneller ab als im übrigen Gel und daher färben sich die Proteinbanden schnell dunkelbraun bis schwarz.

Die Entwicklung beinhaltet eine Änderung des pH-Wertes, wodurch unlösliche Silbersalze gebildet werden können. Zur Entfernung dieser an der Geloberfläche haftenden Silbersalze muss das Gel mit Wasser gewaschen werden. Damit nicht alle Silberionen im Gel

Material und Methoden

zu metallischen Silber reduziert werden, muss die Entwicklung rechtzeitig gestoppt werden, was man normalerweise durch eine starke pH-Wert-Änderung mit verdünnter Essigsäure erzielt.

Das hier vorliegende Protokoll (Tab. 4) ermöglicht die Durchführung einer hochsensitiven und kontrastreichen Silberfärbung, bei gleichzeitiger Minimierung der Hintergrundfärbung.

Vorgang	Eingesetzte Lösung	Zeitdauer
Fixierung der im Gel aufgetrennten Proteinbanden:	30 % (v/v) Ethanol 10 % (v/v) Essigsäure	Mindestens 1 h
Waschen des Gels:	50 % (v/v) Ethanol	3 x 20 min
Quellen des Gels:	H ₂ O monodest.	5 min
Imprägnieren der in dem Gel enthaltenen Proteine:	0,02 % (w/v) Natriumthiosulfat	1 min
Waschen des Gels:	H ₂ O monodest.	1 x 20 sec
Binden von Silberionen an Proteine:	0,2 % (w/v) Silbernitrat 0,05 % (v/v) Formaldehyd (37 %)	20 min
Waschen des Gels zur Entfernung nicht gebundener Silberionen:	H ₂ O monodest.	2 x 30 sec
Reduktion der Silberionen:	6 % (w/v) Kaliumcarbonat 0,05 % (v/v) Formaldehyd (37 %)	Bis zur gewünschten Färbung
Entfernung des Reduktionsmittels:	H ₂ O monodest.	2 x 30 sec
Abstoppen der Entwicklungsreaktion:	30 % (v/v) Ethanol 10 % (v/v) Essigsäure	Mindestens 1 h
Waschen der entwickelten Proteinbanden:	50 % (v/v) Methanol	Keine Zeitbegrenzung

Tab. 4. Arbeitsschritte zur Silberfärbung von Proteinen nach Blum

4.5.8 Coomassiefärbung von Proteingelen

Die zu färbenden Gele wurden in eine Färbelösung aus 40 % Methanol, 10 % Essigsäure und 0,1 % (w/v) Coomassie Blue G 250 eingelegt. Je nach Frische der Färbelösung dauerte das Färben 10 min bis über Nacht. Anschließend wurden die Gele in einer Entfärbelösung aus 40 % Methanol und 10 % Essigsäure entfärbt, bis ein optimaler Kontrast zwischen Proteinbande und Gelhintergrund erzielt werden konnte.

4.5.9 Transfer von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen

Um Proteine nach der elektrophoretischen Auftrennung immunologisch nachweisen zu können, wurden sie nach dem Semi-Dry-Verfahren (Kyhse-Anderson, 1984) auf Nitrozellulosemembranen transferiert. Hierzu wurden das Gel, die Nitrozellulosemembran und das Whatman-Papier in Blotpuffer getränkt (20 mM Tris, 150 mM Glycin, 20 % (v/v) Methanol, 0,2 % (w/v) SDS) und in definierter Reihenfolge aufgeschichtet. 4 Lagen Whatman-Papier wurden auf die untere Graphitelektrode gelegt, über die die Nitrozellulosemembran, das Gel und 4 weitere Whatman-Papiere geschichtet wurden. Die einen Proteintransfer behindernden Luftblasen wurden durch vorsichtiges Rollen eines Glasstabes über die einzelnen Schichten entfernt. Zuletzt wurde die obere Graphitelektrode aufgelegt und mit Gewichten beschwert. Der Transfer der Proteine erfolgte bei 75 mA pro Gel über 1,5 h. Um die transferierten Proteine sichtbar zu machen, wurde die Membran in Ponceau S-Färbelösung (0,2 % (w/v) Ponceau S in 3 % (w/v) TCA) geschwenkt und mit entsalztem Wasser leicht entfärbt.

4.6 Immunologische Methoden

4.6.1 Gewinnung polyklonaler Antisera

Für die Erzeugung polyklonaler Antikörper wurden Kaninchen immunisiert, denen nach 10-14 Tagen das antikörperenthaltende Serum entnommen wurde. Als Antigene dienten rekombinante Proteine, die in *E. coli* exprimiert wurden (4.5.1-4.5.2).

300 µl (maximal 200 µg Antigen) der Antigenlösung wurden für die Erstinjektion mit 300 µl "Titer Max" (CytRX) versetzt. Für die nachfolgenden Injektionen, die im Abstand von vier bis sechs Wochen erfolgten, wurden 300 µl Antigenlösung mit 300 µl Freudschen Adjuvans (inkomplett) vermischt.

Die Injektion des Antigens erfolgte subkutan nahe der Lymphknoten in der Achselregion der Kaninchen. Zehn bis vierzehn Tage nach der Folgeinjektion wurden aus der Ohrvene des Kaninchens 20-25 ml Blut entnommen und zur Gerinnung des Blutes 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erfolgter Gerinnung wurde das Serum durch 2 Zentrifugationsschritte (3000 Upm, 5 min Heraeus Bactifuge und 12000 Upm, 15 min, Beckman JA 20 Rotor) gewonnen und für 20 min bei 56°C inkubiert um das Komplementsystem zu inaktivieren. Das Serum wurde in Portionen geteilt und bei -20°C gelagert.

Das Kaninchen wurde zuerst zweimal im Abstand von zwei Wochen immunisiert, bevor die erste Blutung vorgenommen wurde. Anschließend wurde das Antigen alle 4-6 Wochen injiziert.

4.6.1.1 Auswahl der verwendeten Antigene

Da zum Zeitpunkt der erstmaligen Entdeckung eines Kinesin-ähnlichen Proteins (Nkin2) mit starker Homologie zu *KIF1Ba*, die Sequenzierung des *Neurospora*-Genoms noch nicht abgeschlossen war, konnte die Lage eventuell vorkommender Introns nicht eindeutig bestimmt werden. C-Terminal der Motordomäne von Nkin2 befindet sich eine hochkonservierte Coiled-coil Region. Da die Lage eines Introns in dieser hochkonservierten Region nicht anzunehmen ist, wurde diese Region zur Herstellung eines Antigens ausgewählt. Zur Herstellung eines für Nkin2 spezifischen Antigens, wurde das Expressionsplasmid pFF12 (4.1.9) verwendet. Das Fusionsprotein konnte gemäß der in 4.5.1 beschriebenen Methode exprimiert, gereinigt und als Antigen eingesetzt werden.

Im Falle der Gewinnung eines polyklonalen Antikörpers gegen NKin3 wurden die Expressionsplasmide pFF10 und pFF11 zur Herstellung der Antigene verwendet. Unter Verwendung des mittels des Expressionsplasmids pFF10 erhaltenen Antigens, konnte ein polyklonales Antiserum, welches gegen das Volllängenprotein gerichtet ist, erhalten werden. Das Antigen, welches unter der Verwendung von pFF11 erhalten werden konnte, ermöglicht hingegen die Gewinnung eines polyklonalen Antiserums, welches gegen den C-Terminalen Bereich des Proteins gerichtet ist.

4.6.2 Kopplung von Antikörpern an eine Säulenmatrix

Zur Kopplung von Antikörpern an eine Säulenmatrix wurde zuerst das Säulenmaterial vorbehandelt. Hierzu wurden pro 1,5 mg des zu koppelnden Antigens 0,24 g CNBr- (Cyanbromid) aktivierte Sepharose in 10 ml einer 1 mM HCl-Lösung resuspendiert. In dieser Suspension konnte das Säulenmaterial während einer 10 minütigen Inkubation im Überkopfschüttler bei Raumtemperatur quellen. Im Anschluss wurde das Säulenmaterial noch dreimal mit je 10 ml einer 1 mM HCl-Lösung gewaschen. Während dieser Behandlung des Säulenmaterials wurde das Antigen in 3 ml einer Pufferlösung (0,1 M NaHCO₃, pH 8,3, 0,5 M NaCl, 1 mM PMSF, 1 mM EDTA) verdünnt. Von dieser Proteinlösung wurde 10 µl für einen Gelauftrag zurückbehalten.

Zur Kopplung des Antigens an das Säulenmaterial wurde das vorbehandelte Säulenmaterial mit der Proteinlösung versetzt und 1 ½ Stunden im Überkopfschüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Kopplung wurden zur Überprüfung der Kopplungseffizienz 10 µl des Überstands abgenommen und zusammen mit dem vor der Kopplung abgenommenen 10 µl der Proteinlösung mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die Kopplungseffizienz konnte dann durch Anfärben des Proteins mit Coomassie bestimmt werden. Nach dreimaligem Waschen mit je 3 ml Puffer (0,1 M NaHCO₃, 0,5 M NaCl) und 5 ml Pufferlösung (0,1 M Tris/HCl pH 8), wurde die Säule zur Absättigung von freien Bindungsgruppen 2 h bei Raumtemperatur stehen gelassen. Abschließend erfolgte dreimaliges Waschen der Säule mit je 5 ml Puffer (0,5 M NaCl, 0,1 M Natriumacetat pH 4,0) und 5 ml Pufferlösung (0,5 M NaCl, 0,1 M Tris/HCl pH 8,0). Zur Aufbewahrung im Kühlschrank wurde das Säulenmaterial in Pufferlösung (0,1 M Tris/HCl, pH 8,0 (mit 10 mM Natriumazid versetzt)) gelagert.

4.6.3 Affinitätsreinigung von Antikörpern

Die antigenspezifischen Antikörper wurden mit Hilfe einer Antigensäule aus dem Serum aufgereinigt. Zur Herstellung der Affinitätssäule wurde das Antigen an BrCN-aktivierter Sepharose 4B (Amersham Pharmacia) gekoppelt (4.6.2). Die Affinitätsreinigung erfolgte in modifizierter Form nach Harlow und Lane (Harlow und Lane, 1988)

Zu Beginn der Antikörperreinigung wurde die Affinitätssäule mit den folgenden Puffern gewaschen: 10 Säulenvolumina 10 mM Tris/HCl, pH 7,5; 10 Säulenvolumina 100 mM Glycin/HCl, pH 2,5; 10 Säulenvolumina 10 mM Tris/HCl, pH 8,8; 10 Säulenvolumina 100 mM Natriumphosphat, pH 11,5; und 10 Säulenvolumina 10 mM Tris/HCl, pH 7,5.

5 ml des Antiserums wurden mit 20 ml 10 mM Tris/HCl, pH 7,5 verdünnt und mit PMSF (Endkonzentration 1 mM) versetzt. Mit Hilfe einer peristaltischen Pumpe (Amersham Pharmacia) wurde das verdünnte Antiserum dreimal mit einer Fließgeschwindigkeit von 1 ml/min auf die vorbereitete Affinitätssäule aufgetragen. Anschließend wurde die Affinitätssäule mit 20 Säulenvolumina 10 mM Tris/HCl, pH 7,5; 20 Säulenvolumina 10 mM Tris/HCl, pH 7,5, 500 mM NaCl; 20 Säulenvolumina 10 mM Tris/HCl, pH 7,5 und 10 Säulenvolumina 100 mM Zitronensäure/NaOH, pH 4,0, gewaschen.

Die Elution erfolgte durch Zugabe von 10 Säulenvolumina 100 mM Glycin/HCl, pH 2,5 und anschließend 10 Säulenvolumina 100 mM Natriumphosphat, pH 11,5. Die Eluate wurden in 1 ml Fraktionen in vorbereiteten Reaktionsgefäßen aufgefangen, die 120 µl 1 M Tris-Base (für die Glycinelution) bzw. 100 µl 1 M Glycin, pH 2,5 (für die Phosphatelution) enthielten. Dadurch wurde die anschließende Neutralisierung der Eluate erleichtert. Mittels Bradford-Assay wurden die antikörperenthaltenden Fraktionen ermittelt, vereinigt und für die Immundekorationen verwendet. Zum Abschluss wurde die Affinitätssäule mit 10 ml Puffer (10 mM Tris/HCl, pH 7,5) gewaschen und unter 10 mM Tris/HCl, pH 7,5 (versetzt mit 0,05 % Natriumazid) bei 4°C gelagert.

4.6.4 Immunologischer Nachweis von Proteinen auf Nitrozellulose-Membranen (Western-Blot)

Es wurden polyklonale Seren gegen Nkin2 und Nkin3 eingesetzt. Aus der Arbeitsgruppe von Prof. Schliwa wurde freundlicherweise ein monoklonales Antiserum gegen β -Tubulin (monoklonaler Antikörper WA 93) und NKin zur Verfügung gestellt. Weitere verwendete Antiseren (Anti-Tim54, Anti-Tom40, Anti-Tom70 und Anti-Porin) stammten aus der Seren-Sammlung des Neupert-Labors.

Um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen, wurden die Nitrozellulosemembranen nach dem Proteintransfer (4.5.9) bei 4°C 1 h in TBS-Puffer mit 5 % (m/v) Magermilchpulver geschwenkt. Es folgte eine Immundekoration bei 4°C über Nacht mit einem spezifischen Antiserum, das je nach Titer zwischen 1:20 und 1:5000 in TBS mit 5 % (m/v) Magermilchpulver verdünnt war. Danach wurden die Membranen 10 min in TBS-Puffer, ebenfalls 10 min in 0,05% (v/v) Triton X-100 in TBS und wieder 10 min in TBS-Puffer gewaschen. Um die gebundenen Antikörper nachzuweisen, wurden gegen ImmunglobulinG von Kaninchen gerichtete Antikörper verwendet, an die Meerrettich-Peroxidase gekoppelt war. Diese Antikörper wurden 1:10.000 in TBS-Puffer mit 5% (m/v) Magermilchpulver verdünnt und die Membranen 60 min mit dieser Lösung inkubiert. Anschließend wurde erneut gewaschen und die gebundene Peroxidase mit einem auf Chemolumineszenz basierenden

Detektionssystem (ECL, Amersham) nachgewiesen. Die Membranen wurden mit der Lumineszenz-Lösung inkubiert und zwischen 1 s und 10 min auf Röntgenfilmen exponiert.

Für die Immundekoration von Nkin wurde die Nitrozellulosemembran in einer TBS/0,05 % Tween-Lösung geschüttelt, die 2 % BSA enthielt. Für die Immundekoration wurde eine TBS/0,05 % Tween-Lösung mit 1 % BSA verwendet, die das Serum in einer 1:250-Verdünnung enthielt. Für die nachfolgenden Waschschrte wurde eine TBS/0,05 % Tween-Lösung verwendet.

4.6.5 Immunfällung von Proteinen

4.6.5.1 Immunfällung unter stringenten Bedingungen

Für die Immunfällung wurden zunächst Antikörper an Protein A-Sepharose (PAS) gekoppelt. 20 µl PAS wurden zweimal mit TBS und dann mit dem gewünschten Lysepuffer gewaschen. 30 ml Antiserum wurden dann mit den äquilibrierten PAS für mindestens 1 h unter Schütteln inkubiert und anschließend einmal mit dem gewünschten Lysepuffer gewaschen.

100 µg Mitochondrien wurden in 60 µl SDS-Puffer (1 % SDS, 100 mM Tris/HCl pH 7,4, 10 mM PMSF) resuspendiert, um Mitochondrien für die Immunfällung zu Solubilisieren, und für 10 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Das Solubilisat wurde 20-fach mit TBS/0,5 % Triton X-100 verdünnt und zentrifugiert (TLA55 Rotor, 45000 Upm, 2°C, 30 min). Der Überstand wurde auf die mit TBS/0,5 % Triton X-100 gewaschenen PAS gegeben, an die die Antikörper gekoppelt worden waren. Zur Bindung des Antigens wurde 1 h im Überkopfschüttler bei 4°C inkubiert und anschließend zweimal mit TBS/0,5 % Triton X-100 und einmal mit 10 mM Tris/HCl pH 7,4 gewaschen.

Die Elution der adsorbierten Proteine erfolgte durch Schütteln für 15 min bei Raumtemperatur in Laemmli-Auftragspuffer. Die Proben wurden anschließend durch SDS-PAGE (4.5.6), Proteintransfer auf Nitrocellulosemembran (4.5.9) und Western-Blot (4.6.4) analysiert.

4.6.5.2 Coimmunfällung unter milden Bedingungen

Gesamtzellextrakt, Mitochondrien bzw. Außenmembranvesikel mit einer Proteinkonzentration von 0,2-1 mg/ml wurden in Digitonin-Puffer (1 % (w/v) Digitonin, 250 mM Saccharose, 1 mM EDTA, 10 mM Mops/KOH, pH 7,4) im Überkopfschüttler solubilisiert. Nach dem Abtrennen von unlöslichem Material (25.000 xg, 2°C, 15 min) wurde der Überstand als Ausgangsmaterial für die Immunfällung eingesetzt.

Dazu wurden spezifische Antiseren oder auch IgGs im Überkopfschüttler in 300 µl Digitonin-Puffer bei 4°C an Protein-A Sepharose (PAS; 100 µl affinitätsgereinigtes Antiserum bzw. 70 µg IgG pro Milligramm PAS) vorgebunden. Die Protein-A-Sepharose mit den gebundenen Antikörpern wurde abzentrifugiert (Eppendorf Tischzentrifuge, 30 sec) und mit den Digitonin-Extrakten aus Gesamtzellextrakt, Mitochondrien bzw. Außenmembranvesikeln inkubiert (Überkopfschüttler, 1 h, 4°C). Die an die Protein-A-Sepharose gebundenen Immunkomplexe wurden abzentrifugiert (Eppendorf Tischzentrifuge, 30 sec), zweimal mit Digitonin-Puffer und zweimal mit 10 mM Tris/HCl, pH 7,5 gewaschen und erneut abzentrifugiert. Anschließend wurden die Immunkomplexe mit Laemmli-Auftragspuffer dissoziiert, für 5 min bei 56°C inkubiert und mittels SDS-PAGE und Immundekoration analysiert.

Um eine Überlagerung der resultierenden Banden durch schwere oder leichte IgG-Ketten zu vermeiden, wurde dem Laemmli-Auftragspuffer H₂O₂ (0,05 %) zugesetzt, außerdem enthielt der Puffer kein β-Mercaptoethanol, somit wurde eine Dissoziation der IgGs in schwere und leichte IgG-Ketten verhindert.

4.7 Biochemische Methoden

4.7.1 Isolation von Tubulin

Die Isolierung von Tubulin erfolgte modifiziert nach E.M. Mandelkow (Mandelkow *et al.*, 1985).

Durch mehrere temperaturabhängige Polymerisations- bzw. Depolymerisationszyklen lassen sich Tubulin und mikrotubulibindende Proteine von den übrigen Zellbestandteilen trennen. Tubulin kann dann mittels einer Kationenaustauschchromatographie bis zur Homogenität gereinigt werden.

Zur Isolierung von Tubulin wurden 700 g Schweinehirn nach dem Entfernen von Adern und Bindegewebe mit PBS (PBS (10 x) : 1 g/l MgCl₂, 2 g/l KCl, 2 g/l KH₂PO₄, 80 g/l NaCl, 11,5 g/l NaH₂PO₄) gespült, mit 700 ml Puffer A (100 mM Pipes pH 6,9, 1 mM EGTA, 100 µM ATP, 1 mM DTT, 1 mM MgSO₄) in einem Küchenmixer (Braun) homogenisiert und zentrifugiert (Rotor JA 14 Beckmann, 14000 Upm, 65 min, 4°C). Der Überstand (S1) wurde mit einem Viertel Volumen Glycerin und 1,5 mM ATP versetzt und 20 min bei 35°C im Wasserbad polymerisiert. Anschließend wurde die Mikrotubuli in vorgewärmten Rotoren (Beckmann 35, 35000 Upm, 60 min, 30°C) pelletiert (P2), in 100 ml Puffer B (500 mM Pipes pH 6,9, 1 mM EGTA, 100 µM ATP, 1 mM DTT, 1 mM MgSO₄) resuspendiert und 25 min auf Eis depolymerisiert. Der nach einer weiteren Zentrifugation (Rotor 42.1 Beckmann,

36000 Upm, 30 min, 4°C) enthaltene Überstand (S3) wurde wieder 20 min bei 35°C mit 1,5 mM ATP polymerisiert und im vorgewärmten Rotor 42.1 (33000 Upm, 60 min, 30°C) zentrifugiert. Diese Pellets (P4) wurden in flüssigen Stickstoff schockgefroren und konnten über Monate bei -70°C gelagert werden.

Zur weiteren Reinigung wurden die Pellets in 50 ml Puffer B resuspendiert und nach 25 min auf Eis im Rotor 42.1 (36000 Upm, 30 min, 4°C) zentrifugiert. Der Überstand (S5) wurde mit 10 % DMSO und 1,5 mM ATP versetzt, 20 min bei 35°C polymerisiert und im warmen Rotor 42.1 sedimentiert (33000 Upm, 60 min, 30°C). Die Pellets wurden in 10 ml Puffer C (100 mM Pipes pH 6,9, 1 mM EGTA, 100 µM ATP, 1 mM DTT, 1 mM MgSO₄) resuspendiert und zur Depolymerisierung 30 min auf Eis gelagert. Nach der folgenden Zentrifugation (Beckman Rotor 70.1 Ti, 34200 Upm, 30 min, 4°C) wurde die Tubulin-Lösung (S7) auf eine Phosphozellulosesäule (P11, Whatman) aufgetragen und mit einer Fließgeschwindigkeit von 20 ml/h fraktionsweise eluiert. Mittels Bradford-Test (4.5.5) wurden die Tubulin enthaltenen Fraktionen detektiert, die Fraktionen vereinigt, portioniert und nach Zugabe von 0,1 M GTP in flüssigen Stickstoff schockgefroren.

Die verwendete P11-Phosphozellulose wurde nach Herstellerangabe aktiviert, in 3 Säulenvolumina Puffer C (ohne ATP und DTT) aufgenommen und in eine Säule gepackt. Zum Äquilibrieren wurde die Säule mit 3 Säulenvolumina Puffer C (ohne ATP und DTT), 5 Säulenvolumen Puffer C (10 mM MgSO₄) und 2 Säulenvolumen Puffer C gewaschen.

4.7.2 Polymerisierung von Mikrotubuli

Zur Polymerisation von Mikrotubuli wurde säulengereinigtes Tubulin auf Eis aufgetaut und zentrifugiert (TLA-100 Beckmann, 80000 Upm, 10 min, 4°C) um aggregiertes Tubulin abzutrennen. Der Überstand wurde mit 1 mM GTP versetzt und 30 min bei 37°C im Heizblock polymerisiert. Nach 12 min wurde 20 µM Taxol zugesetzt um die Mikrotubuli zu stabilisieren.

Zur Reinigung der Mikrotubuli wurden diese anschließend über ein 40 %iges Saccharosekissen geschichtet und durch dieses pelletiert (TLA-100 Beckman, 80000 Upm, 10 min, 25°C). Nach der Zentrifugation wurde das Pellet zweimal gewaschen und dann in Puffer (10 mM Mops pH 7,2, 1 mM EDTA, 4 mM MgCl₂, 250 mM Saccharose, 20 µM Taxol) aufgenommen. Die Konzentration der Mikrotubuli wurde spektrometrisch bestimmt.

4.7.3 Herstellung von Rhodamin-gefärbten Tubulin

Das Protokoll zur Färbung von Tubulin erfolgte in modifizierter Form von Arshad Desai (Mitchison Lab).

Benötigte Lösungen:

Kissen 1 Lösung: 0,1 M HEPES pH 8,6, 1 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 60 % (v/v) Glycerin

Färbepuffer: 0,1 M HEPES pH 8,6, 1 mM EGTA, 40 % (v/v) Glycerin

Quench-Lösung: 2 x BRB 80, 100 mM KGlutamat, 40 % (v/v) Glycerin

Kissen 2 Lösung: 60 % (v/v) Glycerin in BRB 80

10 x IB-Lösung: 500 mM KGlutamat, 5 mM MgCl₂, pH Wert der 1 x Lösung ca. pH 7,0

Zum Färben des Tubulins mit Tetramethylrhodamin wurde 120 mg Tubulin in einem 50 ml Falcon auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden 600 µl BRB 80 und MgCl₂ bis zu einer Endkonzentration von 4 mM zugefügt. Als nächstes wurde GTP bis zu einer Endkonzentration von 1 mM zugesetzt und 5 min auf Eis inkubiert. Nach diesem Schritt wurde auf 37°C erwärmt und 1/3 des Volumens an Glycerin zugegeben. Nach kräftigem Durchmischen wurde das Tubulin für 40 min bei 37°C polymerisiert. In 2 Beckman 50.2 Ti Ultrazentrifugationsröhrchen wurden je 20 ml der Kissen 1 Lösung vorgelegt und das polymerisierte Tubulin auf dieses Kissen geschichtet. Es folgt eine Zentrifugation über 1 h bei 45000 Upm und 37°C in einem Beckmann Ti50.2 Rotor. Kurz vor Abschluss der Zentrifugation wurde das Carboxy-TMRhodamine (C1171, Molecular Probes) mit einer Endkonzentration von 100 mM wasserfreiem DMSO gelöst. Der Fluorophor wurde dann bis zu einer Endkonzentration von 4 mM in den auf 37°C vorgewärmten Färbepuffer verdünnt und gut vermischt.

Die Verknüpfungsreaktion von Fluorophor und Tubulin läuft über eine Zeitspanne von 30 min bei 37°C ab. Zwischenzeitlich wurde alle 3 min kräftig gemischt. Nach 30 min wurde das gleiche Volumen an Quenchlösung zum Färbeansatz zugesetzt, und gut gemischt. Kurz vor Abschluss der Färbereaktion wurde 1 ml der vorgewärmten Kissen 2-Lösung in TLA100.3 Ultrazentrifugationsröhrchen vorgelegt und mit 2 ml des abgestoppten Färbeansatzes überschichtet. Es folgte eine Zentrifugation über 30 min bei 70000 Upm und 37°C unter Verwendung eines TLA100.3 Rotors. Während der Zentrifugation wurde ein kleiner Glasdouncer und 10 ml IB-Puffer auf Eis kaltgestellt. Nach der Zentrifugation wurde die obere Kissenschicht und die Interphase abgenommen, zweimal mit Wasser gewaschen und anschließend 0,5 ml eiskalter IB-Puffer in das Zentrifugationsröhrchen gefüllt. Das Pellet wurde dann in dem IB-Puffer resuspendiert und in den Glasdouncer überführt. Das Zentrifugationsröhrchen wurde nochmal mit 0,5 ml IB-Puffer ausgewaschen und die Puffer-Lösung im Glasdouncer vereinigt.

Eine 30 minütige Inkubation auf Eis ermöglichte ein effizientes Depolymerisieren des Tubulins durch leichtes Douncen über nahezu den gesamten Zeitraum. Zur Entfernung von nicht depolymerisiertem Tubulin wurde das Tubulin anschließend bei 2°C und 100000 Upm über 10 min im TL100.3 zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen und BRB 80, sowie MgCl₂ bis zu einer Endkonzentration von 4 mM und GTP bis zu einer Endkonzentration von 1 mM zugesetzt. Nach 5 min Inkubation auf Eis, wurde 1/3 des Volumens an reinem Glycerin zugesetzt, kräftig gemischt und bei 37°C über 45 min polymerisiert. In 2 TL100.3 Zentrifugationsröhrchen wurden dann 0,7 ml der Kissen 2-Lösung vorgelegt und anschließend mit den polymerisierten Mikrotubuli.

Es folgte eine Zentrifugation bei 37°C und 70000 Upm über 30 min unter Verwendung eines TL100.3 Rotors. Nach der Zentrifugation wurde das Pellet zweimal mit Wasser gewaschen und der Überstand komplett abgenommen. Anschließend wurde es noch mit 1-2 ml 1 x BRB 80 gewaschen um rückständiges Glycerin zu entfernen. Die Zentrifugationsröhrchen wurden dann auf Eis mit 150 µl eiskaltem IB-Puffer versetzt und die Mikrotubuli in dem Puffer resuspendiert. Anschließend wurden die Zentrifugationsröhrchen mit 150 µl IB-Puffer ausgewaschen, die Waschlösung mit den in IB-Puffer resuspendierten Mikrotubuli vereinigt und 20-25 min bis zur vollständigen Depolymerisation des Tubulins auf Eis gelagert.

Von der Tubulinlösung wurde dann eine 1:100-Verdünnung angesetzt und die Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm gemessen. Im Anschluß daran wurde die Tubulinlösung nochmal über 5 min einer Zentrifugation bei 100000 Upm und 2°C und Verwendung eines TL100 Rotors unterzogen. Erwünscht war eine Absorption der verdünnten Tubulinlösung von 0,2 Absorptionseinheiten. Wenn erforderlich wurde die Lösung mit IB-Puffer verdünnt und anschließend a`3 ml Aliquots portioniert, schockgefrohren und bei -70°C gelagert.

Zur Herstellung von rhodamingefärbten Mikrotubuli wurden gefärbte Mikrotubuli mit nichtgefärbten Mikrotubuli im Verhältnis 1:1 gemischt. Die Polymerisation der Mikrotubuli erfolgte dann gemäß der obengenannten Vorgehensweise.

4.7.4 Biochemisches *in vitro*-Bindungstestsystem

Dieser Versuchsansatz ermöglicht die Analyse der Interaktion zwischen Mikrotubuli und Mitochondrien des filamentösen Pilzes *N. crassa*. Die in diesem Ansatz eingesetzten Mitochondrien sind frei von endogenen Tubulin.

Zur Bindung von Mitochondrien an Mikrotubuli wurden 100 µg Mitochondrien mit 100 µg Taxol-stabilisierter Mikrotubuli eingesetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Unter

Standardbedingungen wurde dem Puffer (10 mM MOPS, pH 7,2, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 4 mM MgCl₂, 250 mM Saccharose, 20 µM Taxol) 20 U/ml Apyrase zugesetzt. Nach der Inkubation von Mikrotubuli mit Mitochondrien, wurden die Proben durch Zusatz von 650 µl 2,5 molarer Saccharoselösung auf eine Saccharosekonzentration von 1,8 M eingestellt und auf den Boden des SW 60-Ultrazentrifugationsröhrchens geladen.

Die Proben wurden dann mit 2 ml Puffer (10 mM MOPS, pH 7,2, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 4 mM MgCl₂, 1,7 M Saccharose) und abschließend mit 1 ml Puffer (10 mM MOPS, pH 7,2, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 4 mM MgCl₂, 250 mM Saccharose) überschichtet. Es folgte eine Ultrazentrifugation (Beckman SW 60 Rotor, 200000 xg, 4 h, 4°C).

Diese Methode ist in der folgenden Abb. 6 schematisch dargestellt. Nach der Zentrifugation wurde der Gradient folgendermaßen geerntet. Zuerst wurde eine 900 µl Fraktion abgenommen und verworfen. Anschließend wurden vier Fraktionen zu je 500 µl und eine zu 1 ml abgenommen. Sedimentiertes Material am Boden des Zentrifugationsröhrchens wurde in SEM-Puffer resuspendiert. Die in den Fraktionen enthaltenen Proteine wurden mittels TCA gefällt (4.5.4) und mittels Coomassie Färbung oder Western-Blot analysiert. Das Verhalten der Mitochondrien während des Versuches wurde durch Einsatz eines polyklonalen Antikörpers gegen Porin, das der Mikrotubuli mittels des monoklonalen β-Tubulin-Antikörpers WA3 kontrolliert. Die Western-Blot-Signale wurden mittels Densitometrie (Pharmacia Image Scanner und Image Master 1D Elite software) ausgewertet.

Um Adenin- oder Guaninnukleotid-abhängige Bindung der Mitochondrien an Mikrotubuli zu untersuchen, wurde dem Versuchansatz anstelle von Apyrase 2 mM ATP, ADP, GTP oder GDP zugesetzt. Nach der Inkubation von Mitochondrien und Mikrotubuli auf Eis erfolgte das Laden des Saccharosedichte-Gradienten und Durchführung des Experimentes wie oben beschrieben. Des Weiteren wurde der Einfluß von vorbehandelten Mitochondrien auf die Ausbildung der Interaktion zwischen Mitochondrien und Mikrotubuli untersucht. Beispielsweise wurden Mitochondrien mit einer konzentrierten 1 M KCl-Salzlösung vorbehandelt. Hierfür wurden Mitochondrien 30 min in Puffer (10 mM MOPS, pH 7,2, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 4 mM MgCl₂, 250 mM Saccharose, 1 M KCl) bei 4°C unter Rotieren des Versuchsansatzes inkubiert, 12 min zentrifugiert (Sigma Kühlzentrifuge, 12000 xg, 4°C) zweimal mit SEM-Puffer (250 mM Saccharose, 1 mM EDTA, 10 mM MOPS, pH 7,2) gewaschen und abschließend in SEM-Puffer zu einer Endkonzentration von 10 mg/ml aufgenommen. Die reisolierten Mitochondrien wurden dann unter ATP-Depletionsbedingungen mit Mikrotubuli inkubiert und die Interaktion wie zuvor beschrieben untersucht.

In einem anderen Ansatz wurden Mitochondrien mit Trypsin vorbehandelt. Zum Trypsinverdau wurden isolierte Organellen im Puffer (10 mM MOPS, pH 7,2, 1mM EDTA, 1 mM PMSF, 4 mM MgCl₂, 250 mM Saccharose, 100 µg/ml Trypsin) 20 min auf Eis inkubiert. Zum Abstoppen der Proteasebehandlung wurde STI (Sojabohnen Trypsin Inhibitor, Endkonzentration 1 mg/ml) zugesetzt und weitere 15 min auf Eis inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit, in der die enzymatische Aktivität der Protease abgestoppt wurde, wurden die trypsinbehandelten Mitochondrien mit Mikrotubuli unter ATP-Depletionsbedingungen auf Eis inkubiert und das Experiment wie oben beschrieben durchgeführt.

Um die Abhängigkeit der Interaktion zwischen Mitochondrien und Mikrotubuli nach Antikörpervobehandlung der Mitochondrien zu untersuchen, wurden 100 µg *N. crassa* WT-Mitochondrien mit je 500 ng affinitätsgereinigten Antikörper 30 min auf Eis vorbehandelt. Nach der Inkubation wurden die Mitochondrien zentrifugiert, der Überstand abgenommen, die Mitochondrien einmal in SEM-Puffer gewaschen und nach einer erneuten Zentrifugation in SEM-Puffer resuspendiert. Nach der Reisolation wurden die Mitochondrien wie für die anderen Experimente beschrieben zur Interaktionsstudie eingesetzt. Für die Antikörpervobehandlung von Mitochondrien der *Ankin2*-Deletionsmutante, wurde 1 µg affinitätsgereinigtes Antiserum eingesetzt und analog der oben beschriebenen Methode verfahren.

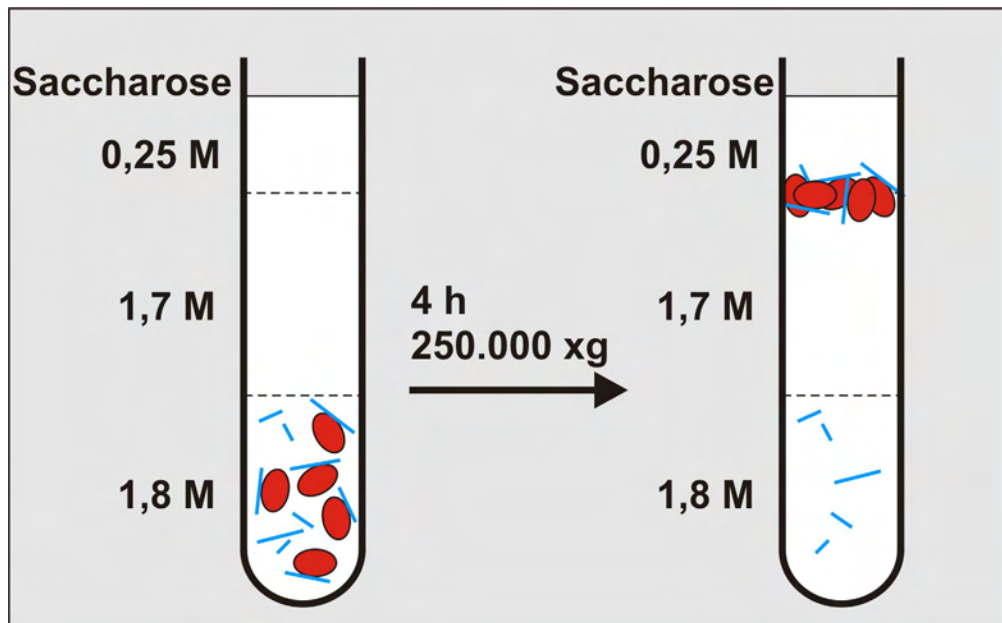


Abb. 6. Flotationsexperiment zur Analyse der Interaktion von Mitochondrien mit Mikrotubuli

Mitochondrien (rote Ellipsen) wurden unter verschiedenen Bedingungen mit Mikrotubuli (blaue Stäbchen) inkubiert und einer Saccharose-Dichtegradienten-Ultrazentrifugation unterzogen. Nach dieser Ultrazentrifugation wurden Fraktionen des Gradienten abgenommen. Die in diesen Fraktionen enthaltenen Proteine wurden mit SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend analysiert (Fuchs et al., 2002).

4.8 Mikroskopische Methoden

4.8.1 Fluoreszenzmikroskopie

Eine detaillierte Analyse der Morphologie von Mitochondrien in Hefe- und *Neurospora*-Zellen, erfolgte mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops. Die Mitochondrien wurden mit fluoreszierenden Proteinen oder Farbstoffen sichtbar gemacht. Erfolgte die Beobachtung der Mitochondrien über einen längeren Zeitraum z.B. zur Aufnahme von Bildern, wurde die Zellsuspension durch Zugabe 1 % (m/v) Low Melting Point Agarose auf dem Objektträger fixiert.

Fluoreszenz- und Phasenkontrastaufnahmen wurden an einem Zeiss Axioplan Mikroskop mit einem Plan-Neofluar 100x/1,30 Öl-Objektiv (Carl Zeiss GmbH, Jena) erstellt. Es wurde eine 100 W Quecksilber-Lampe verwendet. Für die Analyse von mtGFP wurde Filtersatz No. 09 verwendet (Anregung: 450 bis 490 nm, Emission: >515 nm) (Heim und Tsien, 1996). Für Rhodamin-B-Hexylester wurde Filtersatz No. 15 verwendet (Anregung: 534 bis 558 nm, Emission: >590 nm) (Matz et al., 1999). Die Färbungen mit DAPI und Cell-Tracker-Blue wurden mit Filtersatz No. 01 durchgeführt (Anregung: 353 bis 377 nm, Emission:> 397 nm).

4.8.2 Interaktionsanalyse von Mitochondrien und Mikrotubuli mittels Fluoreszenzmikroskopie

In diesem fluoreszenzbasierten Testsystem zur Bindung von Mitochondrien an Mikrotubuli wurden rhodaminmarkierte Mikrotubuli verwendet. Zur Herstellung dieser Mikrotubuli siehe 4.7.3.

Rhodaminmarkierte Mikrotubuli wurden mit isolierten GFP-gefärbten Mitochondrien unter ATP-Depletionsbedingungen (4.7.4) inkubiert. In verschiedenen Ansätzen wurde analog zum biochemischen *in vitro*-Bindungsassay (4.7.4) die ATP-Abhängigkeit und das Verhalten von mit spezifischen Antikörpern vorbehandelten Mitochondrien untersucht (4.7.4). Die Auswertung der Versuche erfolgte unter Verwendung des unter 4.8.1 beschriebenen Axioplan Mikroskop.

4.8.3 Beobachtung von Hyphenwachstum und intrazellulärer Transportvorgänge

Objektträger wurden mit Minimalmedium, dem zur Verfestigung und um den Brechungsindex der Zellwand zu minimieren 15 % Gelatine zugesetzt war, dünn beschichtet. Alternativ war dem Medium anstelle der Gelatine 2 % Agar zugesetzt, jedoch konnte festgestellt werden, dass der Agar einen wesentlich höheren Hintergrund erzeugt, als die Gelatine. Die beschichteten Objektträger wurden dann mit Konidien suspension angeimpft und bei Raumtemperatur über Nacht in einer Feuchtkammer inkubiert. Am Beobachtungstag wurden die ausgebildeten Hyphen mit einem Tropfen flüssigen Minimalmedium überschichtet und vorsichtig mit einem Deckglas abgeschlossen. Für die anschließende Quantifizierung der Organellenbewegung von auf dem Objektträger gewachsener Hyphen wurden nur aktiv wachsende Hyphen ausgewählt. Die Quantifizierung der Hyphenbewegung und des Organellentransportes erfolgte mit Hilfe von computer-unterstützter Videomikroskopie. Verwendet wurde ein Axiophot-Mikroskop (Carl Zeiss GmbH, Jena), sowie eine hochauflösende monochrome Kamera (Modell Orca ER 1394) der Firma Hamamatsu (Herrsching). Zur Aufzeichnung des Hyphenwachstums und der Organellenbewegung wurde die Software SimplePCI der Firma Compix verwendet.

4.8.4 Organellenfärbung mit Hilfe von fluoreszierenden Farbstoffen

In Analogie zur Beobachtung der Organellenbewegung von Mitochondrien konnten andere Zellbestandteile wie Kerne, Endosomen oder Vakuolen mit spezifischen Fluoreszenzfarbstoffen angefärbt und beobachtet werden. Hierzu wurde dem das die

ausgewachsene Hyphe bedeckende Minimalmedium, eine entsprechende Menge an Fluoreszenzfarbstoff zugesetzt. Die Inkubationszeiten der einzelnen Proben variieren stark. In der nachfolgenden Tabelle sind die jeweiligen Gebrauchskonzentrationen angegeben.

Subzelluläre Struktur	Endkonzentration an Farbstoff
Mitochondrien	Rhodamin-B-hexylester (10 µg/ml)
Vakuolen	Cell Tracker Blue (10 µM)
Kerne	DAPI (2.5 µg/ml)
Endocytose und Spitzenkörper	FM4-64 (1 µg/ml)
ER	Di(OC ₆) ₃ (1 µM)

Tab. 5. Auflistung der in der Arbeit verwendeten Proben zur spezifischen Visualisierung von Zellorganellen

Alle verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe wurden von Molecular Probes (Eugene, Oregon) erworben.

4.9 Geräte, Chemikalien und Enzyme

4.9.1 Geräte

Abimed, Düsseldorf: Kolbenhubpipetten

Agfa-Gevaert, München: Röntgenfilm-Entwicklungsmaschine Gevomatic 60

Appligene, Heidelberg: Imaging-System The ImagerTM

Carl Zeiss, Jena GmbH: Axioplan Fluoreszenzmikroskop, Stereomikroskop Axiophot, Stereomikroskop Stemi SV6,

Beckman, München: Kühlzentrifuge J2-21 und Ultrazentrifugen Optima TLX und Optima MX-E, L8-50M/E und L8-M, Rotoren, Zentrifugationsröhrchen

Bender und Hobein, München: Vortex-Mixer

Branson, Heusenstamm: Ultraschallgerät Sonifier B-15

Braun, Melsungen: Schüttelwasserbäder

Consort, Freiburg: Spannungsgeräte für die Elektrophorese

Eppendorf, Hamburg: Photometer, Multipette, Schüttler, Thermostate, Tischzentrifugen (5415D)

Heraeus Christ, Osterode: Tischzentrifuge Bactifuge., Brutschränke, Inkubatoren

Hamamatsu: Hochauflösungskamera Orca ER 1394

Ika, Staufen: Magnetrührer

Julabo, Seelbach: Wasserbadthermostat

Memmert, Hannover: Wärmeschränke

Pharmacia, Freiburg: Spannungsgeräte für Gelelektrophorese und Immunoblots, Densitometer

Ultrascan XL, FPLC- und HPLC-Anlagen, Chromatographiesäulen Superose 6

Sartorius, Mainz: Feinwaagen, Ultrafiltrationsapparatur, Sterilfilter

Schütt, Göttingen: Autoklav Bioclav.

Shimadzu, Kyoto, Japan: Photometer UV-120-02 und UV-240

Sigma, München: Kühlzentrifuge 3K30

Werkstatt des Instituts, München: Semi-Dry-Blot-Apparaturen, Elektrophoresekammern, Überkopfschüttler

4.9.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Agfa-Gevaert, München: Entwickler, Fixierer für Röntgenfilme

ARK-Sigma, Darmstadt: Oligonukleotide

Amersham-Buchler, Braunschweig: ECL-Immunoblot-Detektionssystem,

Biometra, Göttingen: Reagenzien für Polymerase-Kettenreaktion (PrimeZyme)

Biorad, München: Reagenzien zur Proteinbestimmung, Anti-Kaninchen-IgG-gekoppelte Meerrettich-Peroxidase

Boehringer, Mannheim: dNTPs, Ethidiumbromid, Kreatinkinase, Kreatinphosphat, NTPs, PCR DIG Probe Synthesis Kit, Restriktionsenzyme, Tris

Braun, Melsungen: Kanülen, Spritzen

Clontech, Heidelberg: *E. coli*-Stämme

DIFCO, Detroit, USA: Bacto-Agar, Pepton, Trypton, Hefeextrakt

EUROSCARF, Frankfurt: Vektoren und Hefestämme

Fluka, Buchs, USA: Trichloressigsäure

Fuji, Düsseldorf: Röntgenfilme

Genomed, Bad Oeynhausen: Jetstar-Reagenzien und Säulen zur Plasmidisolierung

Gerbu, Gaiberg: Acrylamid, Ampicillin, DTT, NADH

GIBCO-BRL, Eggenstein: Agarose, T4-Ligase, Restriktionsenzyme

ICN Pharmaceuticals, Eschwege: [³⁵S]Methionin (1100 bis 1400 Ci/mmol)

Invitrogen, Groningen: pCRII-Topo-Vektor

Kodak, München: Röntgenfilme BioMax

Molecular Probes, Eugene, USA: Rhodamin-B-Hexylester, DAPI, Tetramethylrhodamin, Cell-Tracker-Blue, Di(OC)₆

Nestlé-Alete, München: Magermilchpulver

NEB, Schwalbach: Restriktionsenzyme

Promega, Heidelberg: RNasin, pGEM-Vektoren (pGEM4)

Qiagen, Homburg: Gel Extraktion Kit, *E. coli* XL1-Blue

Research Genetics, Huntsville, USA: Hefestammsammlung

Riedel de Haen, Seelze: Kaliumacetat

Roche: Dig Easy Hyp, CDP-Star, Dig Wash and Block Puffer Set, DIG-Luminiscent-Detection Kit

Sarstedt, Bad Homburg: Reaktionsgefäße, Pipettenspitzen, Rührchen

Schleicher & Schüll, Dassel: Nitrozellulose-Membranen 0,2 µm, Faltenfilter, Filterpapier, Sterilfilter

Serva, Heidelberg: Bisacrylamid, Bromphenolblau, Coomassie Brillant Blau R-250,

Ethanol, Harnstoff, HEPES, Ponceau S, Raffinose, Saccharose

(Sucrose), SDS, Spermidin, TEMED

Sigma, München: Aminosäurereste, Ammoniumperoxodisulfat, MOPS,

Glycerin, Lachsspermien-DNA, β-Mercaptoethanol, Mineralöl

Molekulargewichtsstandards für SDS-PAGE, PMSF, Triton X-100,

Stratagene, Heidelberg: pBluescript II KS

United States Biochemical, Cleveland, USA: Pepton, Trypton, Yeast Nitrogen Base (ohne Aminosäurereste)

Whatman, Maidstone, England: DE52-Zellulose, P11 Säulenmaterial

Alle übrigen Chemikalien wurden von der Firma Merck, Darmstadt, bezogen.

5 Ergebnisse

5.1 Expression von GFP in Mitochondrien des filamentösen Pilzes *Neurospora crassa*

5.1.1 Herstellung eines Plasmides zur Visualisierung von Mitochondrien mit GFP (*Green Fluorescent Protein*) in *N. crassa*

Zu Beginn dieser Arbeit konnte die Gestalt und die Bewegung von Mitochondrien in *N. crassa* nur mit wenigen mikroskopischen Methoden verfolgt werden. Hierzu zählten die Elektronenmikroskopie (Alberghina *et al.*, 1974; Grad *et al.*, 1999), computerunterstützte Lichtmikroskopie (Steinberg und Schliwa, 1993), sowie die Verwendung von verschiedenen fluoreszierenden Farbstoffen (Minke *et al.*, 1999; Prokisch *et al.*, 2000). Diese Methoden lieferten erste Ergebnisse zur Interaktion von Mitochondrien aus *N. crassa* mit dem Zytoskelett. Um das dynamische Verhalten von Mitochondrien sowohl *in vitro* als auch *in vivo* über einen längeren Zeitraum fluoreszenzmikroskopisch verfolgen zu können, war die Entwicklung einer verbesserten Färbemethode notwendig, wie z.B. die Färbung von Mitochondrien durch Expression eines GFP-Fusionsproteins. Hierzu sollte ein Plasmid hergestellt werden, welches die Expression eines GFP-Proteins in Mitochondrien ermöglicht. Zur Selektionierung von Transformanten sollte das Plasmid zudem mit einem Resistenzmarker ausgestattet werden.

Die Färbung von Mitochondrien mit GFP-Proteinen, die mit einer mitochondrialen Zielsteuerungssequenz fusioniert sind, wurde für eine Reihe experimenteller Systeme beschrieben, wie z.B. Hefe (Westermann und Neupert, 2000) und Säugerzellen (Rizzuto *et al.*, 1996). In *Neurospora* waren jedoch zahlreiche Versuche zur Verwendung von GFP als Fluoreszenzmarker fehlgeschlagen (Freitag *et al.*, 2001; Holger Prokisch und Martha Merrow, persönliche Mitteilung; eigene unpublizierte Ergebnisse). Aus Untersuchungen in *Arabidopsis* war bekannt, dass eine erfolgreiche GFP-Expression in der Pflanze nur unter Verwendung eines speziellen GFP-Allels erzielt werden konnte, welches für den „Codon Usage“ von *Arabidopsis* optimiert war (Haseloff *et al.*, 1997). Da vergleichbare GFP-Allele bereits zur Expression in den Pilzen *Ustilago maydis* (Spellig *et al.*, 1996) und *Aspergillus nidulans* (Suelmann *et al.*, 1997) erfolgreich eingesetzt worden waren, wurde das *mgfp5*-Allel (Siemering *et al.*, 1996) zur Expression von GFP in *N. crassa* ausgewählt. Dieses Allel ist nicht nur kodonoptimiert, sondern es erlaubt auch die korrekte Faltung des GFP-Fusionsproteins bei höheren Temperaturen. Um eine mikroskopisch detektierbare Expression

des Fusionsproteins zu erzielen, wurden regulatorische Elemente eines hoch abundanten mitochondrialen Proteins, der Alpha-Untereinheit der F₁-ATP-Synthase, ausgewählt. Dieses Protein wird in *N. crassa* durch das *atp-1*-Gen (Bowman und Knock, 1992) kodiert. Die genomische Sequenz enthält fünf Introns, von denen je eines in der Präsequenz bzw. nahe der Terminationssequenz lokalisiert ist. Da eine expressionssteigernde Wirkung von Introns mehrfach beobachtet wurde (siehe z.B. (Brinster *et al.*, 1988; Buchmann und Berg, 1988; Choi *et al.*, 1991; Palmiter *et al.*, 1991; Korb *et al.*, 1993)), wurden das erste und das letzte Intron des *atp-1*-Gens in das Expressionsplasmid aufgenommen.

Das durch das Plasmid pNc-mtGFP kodierte Protein mtGFP (Abb. 7) enthält die Präsequenz der Alpha-Untereinheit der F₁-ATP-Synthase, in welcher die Prozessierungsstelle enthalten ist, die von der mitochondrialen Matrix-Prozessierungs-Peptidase erkannt wird. Des Weiteren sind zwei Aminosäuren der Alpha-Untereinheit der F₁-ATP-Synthase und sieben weitere Aminosäuren, welche aus Klonierungsgründen eingefügt wurden, an GFP fusioniert. Neben der Expressionskassette für mtGFP enthält das Plasmid eine Kassette mit einem Resistenzgen gegen Hygromycin B.

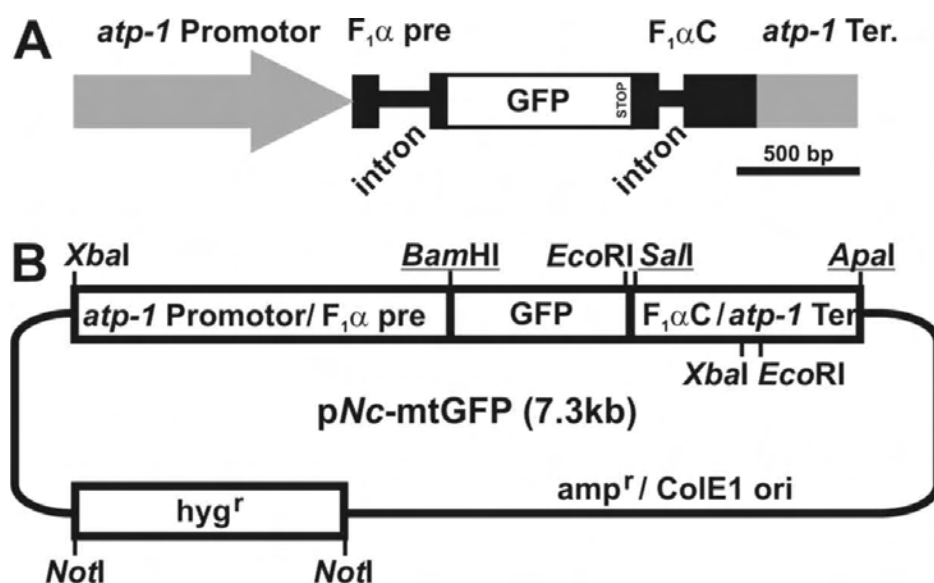


Abb. 7. Plasmid zur GFP-Markierung von Mitochondrien in *N. crassa*

(A) Struktur der mtGFP-Expressionskassette. Die ein Stopkodon enthaltende kodierende Sequenz für GFP ist durch einen weißen Kasten dargestellt. Regulatorische Elemente des *atp-1*-Gens sind in grau, Introns durch schwarze Balken dargestellt. F₁α pre bezeichnet die für die mitochondriale Präsequenz kodierende Region des *atp-1*-Gens. F₁αC bezeichnet den Bereich des *atp-1*-Gens, welcher für den C-Terminus des F₁α-Proteins kodiert. Dieser Bereich wird im Expressionskonstrukt nicht translatiert. *atp-1 ter.* bezeichnet den Bereich des *atp-1*-Gens, welcher die Terminationssequenz des Gens enthält.

(B) Plasmidkarte von pNc-mtGFP. Funktionelle Elemente des Expressionskonstrukts sind aufgeführt. Die Ampicillin-Resistenzkassette *amp*^r und der Replikationsursprung für *E. coli*, *ColE1 ori*, sind dem pBluescript Vektor entnommen.

5.1.2 Herstellung eines mtGFP-exprimierenden *Neurospora*-Stammes

Die Herstellung eines Stammes mit GFP-markierten Mitochondrien sollte eine fluoreszenzmikroskopische Beobachtung der Mitochondrien in diesem Organismus ermöglichen. Des Weiteren sollten isolierte Mitochondrien dieses Stammes in einem fluoreszenzbasierten *in vitro*-Testsystem für die Interaktion mit fluoreszenzmarkierten Mikrotubuli eingesetzt werden. Zur Herstellung von genetisch veränderten Stämmen in *Neurospora* werden Späroblasten hergestellt und diese mit Plasmid-DNA transformiert. Da Sphäroblasten mehrere (bis zu drei) Kerne enthalten, führt eine Transformation von Sphäroblasten mit Plasmid-DNA zur Bildung eines heterokaryotischen Stamms, d.h. die Kerne weisen einen nicht-einheitlichen Genotyp auf. Eine stabile Expression des GFP-Fusionsproteins ist allerdings nur in einem homokaryotischen Stamm gewährleistet, in dem alle Kerne das mtGFP-Gen enthalten. Für die Isolierung eines homokaryotischen Stammes wurde der transformierte Stamm auf jodazetathaltigem Medium angezogen. Hierdurch wurde die Bildung von Mikrokonidien induziert, die durch Mitose entstehen und nur einen Zellkern enthalten.

Nach Transformation von Sphäroblasten des *N. crassa* Wildtypstammes St. Lawrence 74A mit dem Plasmid pNc-mtGFP (3.1.1) wurden 27 Hygromycin B-resistente Stämme erhalten. 25 dieser Stämme wiesen nach weiterer Anzucht in Hygromycin B-haltigem Flüssigmedium eine eindeutige Fluoreszenzfärbung der Mitochondrien auf. Die Expression von GFP in diesen Stämmen war allerdings auf wenige Zellen bzw. einzelne Hyphen beschränkt. Um eine gleichmäßige Expression von GFP-markierten Mitochondrien zu erzielen, wurde ein Stamm mit starker mitochondrialer Fluoreszenz ausgewählt und mehrfach (insgesamt fünfmal) auf Hygromycin B-haltigem Flüssigmedium angezogen. Hierdurch wurde die Anzahl der Kerne mit dem die Resistenz vermittelnden Expressionsplasmid erhöht. Anschließend wurden Mikrokonidien isoliert, um einen homokaryotischen Stamm mit GFP-gefärbten Mitochondrien zu erhalten. Die Mikrokonidien wurden dann auf Hygromycin B-haltigem Sorbosemedium ausplattiert und einzelne Klone isoliert. Hierdurch konnte ein Stamm isoliert werden, von dem ca. 90% der Zellen GFP-markierte Mitochondrien enthielten. In diesem Stamm war die Fluoreszenzfärbung ausschließlich auf die Mitochondrien beschränkt, und eine Hintergrundfluoreszenz war nicht zu beobachten.

Abb. 8 zeigt GFP-markierte Mitochondrien in unterschiedlichen Stadien des Lebenszyklus des Pilzes. In Konidiosporen, auskeimenden Konidiosporen, Hyphen und Hyphenverzweigungspunkten liegen Mitochondrien in Form von lang gestreckten Organellen vor.

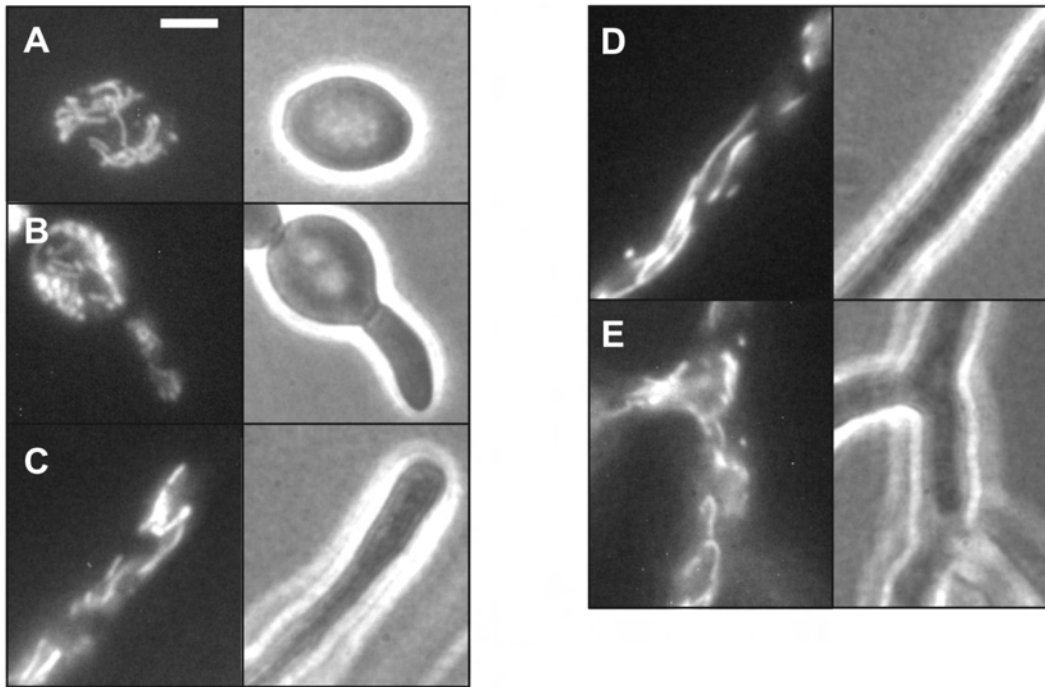


Abb. 8. GFP-gefärbte Mitochondrien in lebenden Zellen von *N. crassa*

Konidien eines mtGFP-exprimierenden Stammes wurden über unterschiedlich lange Zeitspannen in flüssigem Minimalmedium bei 30°C angezogen und mittels Fluoreszenz- (links) oder Phasenkontrastmikroskopie (rechts) beobachtet.

(A) Konidien vor dem Auskeimen von Hyphen; (B) auskeimende Konidien; (C) Hyphenspitze nach vierstündiger Inkubation; (D) Hyphe nach Übernachtinkubation; (E) Hyphenverzweigungspunkt nach Übernachtinkubation. Der Längenstandard entspricht 5 μm .

Dieses Ergebnis verdeutlicht, dass es möglich ist, ein GFP-Fusionsprotein – unter Verwendung endogener regulatorischer Elemente – zur Anfärbung intrazellulärer Strukturen in *N. crassa* einzusetzen. Parallel zu den hier vorgestellten Arbeiten wurde die Expression von GFP im Zytoplasma von *Neurospora* beschrieben (Freitag *et al.*, 2001), die allerdings nur unter Verwendung von starken nicht-endogenen Promotoren möglich war.

5.2 *In vitro*-Testsysteme zum Studium der Interaktion von Mitochondrien von *N. crassa* und Mikrotubuli

5.2.1 Entwicklung eines biochemischen *in vitro*-Testsystems zur Analyse der Interaktion von Mitochondrien und Mikrotubuli

Ein Ziel dieser Doktorarbeit war es, die Mitochondrien-Mikrotubuli-Interaktion *in vitro* zu untersuchen. Das zu entwickelnde Testsystem sollte eine Charakterisierung der mitochondrialen Komponenten ermöglichen, die für die Bindung von Mitochondrien an Mikrotubuli notwendig sind. Des Weiteren sollten mit Hilfe dieses Systems Motorproteine identifiziert werden, die an dem Transport von Mitochondrien entlang von Mikrotubuli in *N. crassa* beteiligt sind.

Nach der Isolierung von Mitochondrien aus einem *Neurospora*-Wildtyp-Stamm wurde zunächst über Western-Blot überprüft, dass kein endogenes Tubulin an isolierte Mitochondrien gebunden ist (Abb. 9).

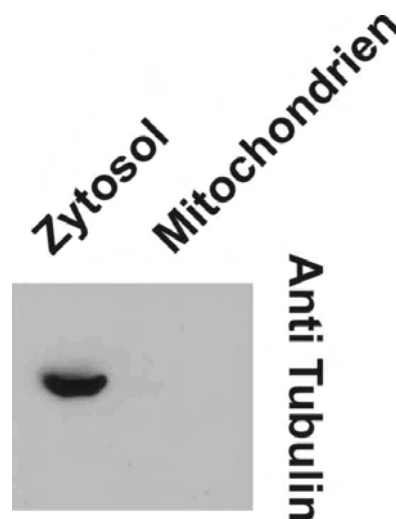


Abb. 9. Isolierte Mitochondrien aus *Neurospora* sind frei von endogenem Tubulin

50 μ g Zytosol und Mitochondrien wurden mit SDS-PAGE aufgetrennt und mit Antikörper gegen β -Tubulin (WA3; freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Manfred Schliwa) dekoriert.

Mitochondrien wurden unter verschiedenen Bedingungen mit Taxol-stabilisierten Mikrotubuli inkubiert. Da eine Beteiligung von Adeninnukleotid-abhängigen Motorproteinen, wie z.B. Kinesinen, erwartet wurde, wurden unter Standardbedingungen ADP und ATP durch Apyrase enzymatisch entfernt. Anschließend wurde der Versuchsansatz an den Boden eines Saccharose-Dichtegradienten geladen. In der nachfolgenden Ultrazentrifugation steigen die Mitochondrien in einen ihrer Dichte entsprechenden Bereich des Saccharose-Gradienten auf. Die einzelnen Fraktionen wurden durch SDS-PAGE und Coomassiefärbung oder Immunoblot

daraufhin untersucht, ob Tubulin an den Mitochondrien gebunden war. Der schematische Aufbau des Versuchs ist in Abb. 6 dargestellt. Abb. 10 zeigt ein Beispiel für ein solches Experiment, in dem die Proteine der Fraktionen des Gradienten nach SDS-PAGE mit Coomassie angefärbt wurden (hier wurde eine größere Mikrotubulimenge eingesetzt als in den weiter unten beschriebenen Experimenten, in denen Tubulin durch Immunoblot nachgewiesen wurde). Als Kontrolle wurde eine Gradientenzentrifugation von Mitochondrien in Abwesenheit von Mikrotubuli durchgeführt. Dieses Testsystem ermöglicht die Identifizierung spezifischer Parameter der Bindung von Mikrotubuli an Mitochondrien.

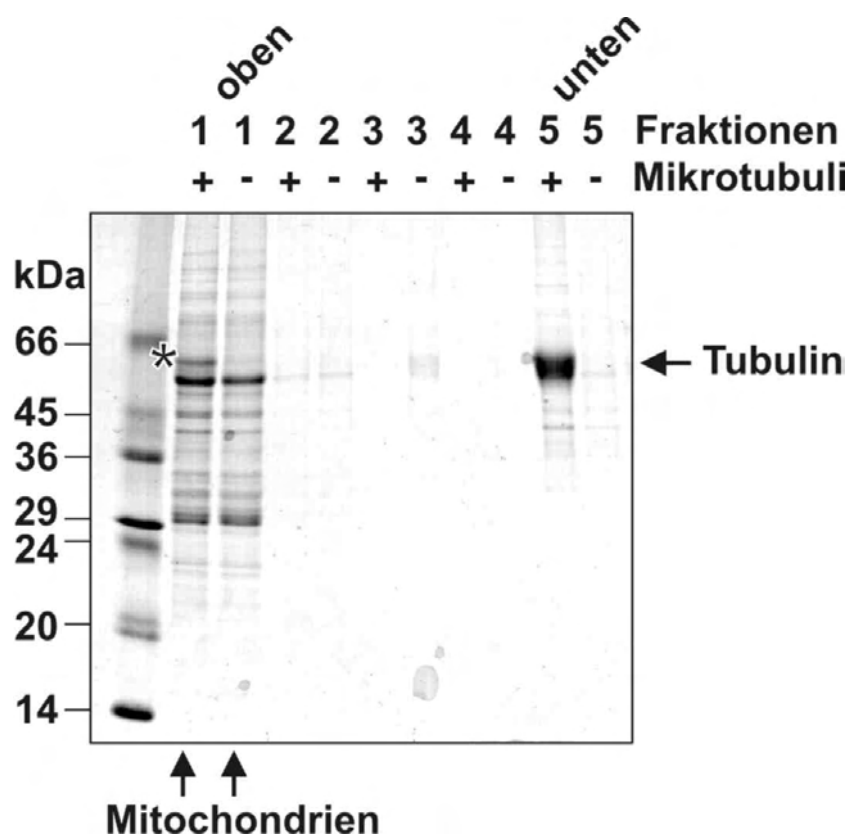


Abb. 10. Interaktion zwischen Mikrotubuli und Mitochondrien *in vitro*

Mitochondrien wurden mit einem Überschuss an Mikrotubuli inkubiert und anschließend in einem Saccharose-Dichtegradienten einer Ultrazentrifugation unterzogen. Die in den abgenommenen Fraktionen enthaltenen Proteine wurden durch TCA (Trichloressigsäure) gefällt, in Probenauftragspuffer aufgenommen, in einer SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Coomasiefärbung sichtbar gemacht. An Mitochondrien gebundenes Tubulin ist mit einem Stern markiert. Das überschüssige nicht gebundene Tubulin verbleibt nach der Zentrifugation am Boden des Gradienten. Eine zweite Probe wurde in der gleichen Weise in Abwesenheit von Mikrotubuli behandelt.

5.2.2 Fluoreszenzbasiertes Testsystem zur Bindung von Mitochondrien an Mikrotubuli

Mit Hilfe des mtGFP-exprimierenden Stammes sollte ein alternatives fluoreszenzbasiertes Testsystem zur Interaktion von Mitochondrien mit Mikrotubuli

entwickelt werden. Dazu sollte die Interaktion von isolierten mtGFP-markierten Mitochondrien mit rhodaminmarkierten Mikrotubuli unter verschiedenen Versuchsbedingungen untersucht werden.

Isolierte, mtGFP-markierte Mitochondrien kollabieren zu runden sphärischen Organellen (Abb. 11 A). Diese Beobachtung konnte bereits bei der Mitochondrienisolierung aus Hefe gemacht werden (persönliche Mitteilung, B. Westermann). Es ist wahrscheinlich, dass dieser morphologische Effekt auf einem Verlust der Interaktion von Mitochondrien mit dem Zytoskelett während der Organellenpräparation beruht und somit unabhängig von der Art des interagierenden Zytoskelettyps ist.

Bei Zugabe von Mikrotubuli war in Abwesenheit von ATP eine spezifische Bindung der Organellen zu beobachten (Abb. 11 B). Die Bedingungen für eine effiziente Interaktion waren dieselben wie im biochemischen Testsystem.

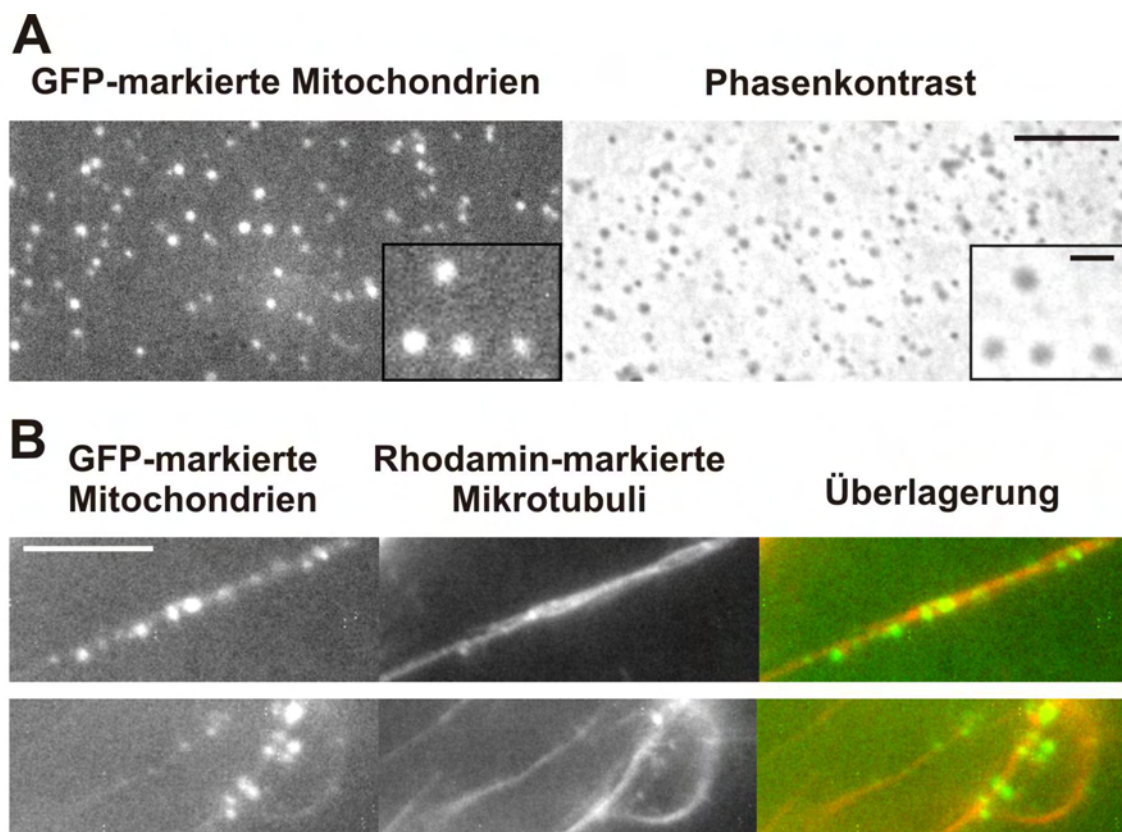


Abb. 11. Verhalten isolierter Mitochondrien

(A) Isolierte Mitochondrien des mtGFP-exprimierenden Stammes. Das linke Bild zeigt eine fluoreszenzmikroskopische Aufnahme, das rechte Bild die Aufnahme mittels Phasenkontrastmikroskopie. Hervorgehoben ist ein vergrößerter Ausschnitt aus der Bildmitte. Der Längenstandard entspricht 5 μm , im Bildausschnitt 1 μm .

(B) Isolierte Mitochondrien des mtGFP-exprimierenden Stammes wurden mit rhodaminmarkierten Mikrotubuli unter ATP-Depletionsbedingungen inkubiert und mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Der Längenstandard entspricht 5 μm .

5.3 Biochemische Grundlagen der Interaktion von Mitochondrien und Mikrotubuli

5.3.1 Die Bindung von Mitochondrien an Mikrotubuli wird von ATP-abhängigen Proteinen vermittelt.

Nachdem die Bindung von Mikrotubuli an Mitochondrien *in vitro* etabliert war, sollten im Folgenden die Eigenschaften dieser Interaktion charakterisiert werden. Die Beteiligung von Kinesin-ähnlichen Motorproteinen in höheren Organismen (Kif1b α , Kif5b, Klp67a) und die Beobachtung des Mikrotubuli-vermittelten Transports von Mitochondrien in *N. crassa* (Steinberg und Schliwa, 1993) sind Hinweise auf eine mögliche Beteiligung eines Kinesin-verwandten Proteins bei der Assoziation von Mitochondrien und Mikrotubuli in *N. crassa*.

Aus diesem Grunde sollte eine Adeninnukleotid-abhängige Bindung zwischen Mitochondrien und Mikrotubuli untersucht werden. Wenn Kinesin-verwandte Proteine an der Interaktion beteiligt sind, sollte ATP einen negativen Einfluss auf eine stabile Bindung haben, weil sich Kinesine bei Hydrolyse von ATP von den Mikrotubuli lösen. Zur Klärung dieser Frage wurden isolierte Mitochondrien mit Mikrotubuli unter Standardbedingungen (ATP-Depletionsbedingungen) oder in Anwesenheit von ATP oder ADP inkubiert und untersucht (Abb. 12).

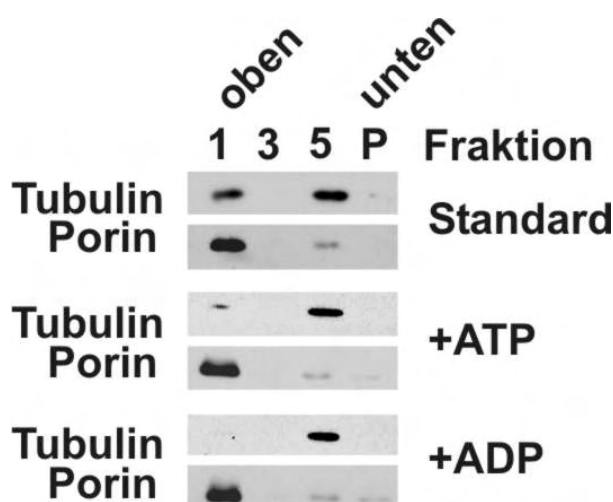


Abb. 12. Die Interaktion von Mitochondrien und Mikrotubuli ist Adeninnukleotid-abhängig

Isolierte Mitochondrien des Wildtypstammes WT74A wurden wie in 4.7.4 beschrieben mit Mikrotubuli 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte eine Ultrazentrifugation in einem Saccharose-Dichtegradienten sowie das Ernten von Fraktionen. Die Analyse der Fraktionen erfolgte im Western Blot unter Verwendung von spezifischen Antikörpern. Fraktion 1 enthält die im Dichtegradienten aufgestiegenen Mitochondrien, welche mit einem polyklonalen Antikörper gegen das mitochondriale Außenmembranprotein Porin nachgewiesen wurden. Der Gehalt an Tubulin wurde mittels eines monoklonalen Antikörpers detektiert. Fraktion 3, entnommen aus der Mitte des Gradienten, enthält keine detektierbaren Proteine. Fraktion 5 enthält nicht aufgestiegenes Protein. P bezeichnet die unterste Fraktion des Gradienten.

In diesen Versuchen zeigte sich, dass unter ATP-Depletionsbedingungen ein signifikanter Anteil (40-60 %) der eingesetzten Mikrotubuli an die Mitochondrien gebunden wird. Die gebundenen Mikrotubuli steigen mit den Mitochondrien in den oberen Bereich des Saccharosedichtegradienten auf. In Gegenwart von ATP oder ADP (Abb. 13) findet keine stabile Bindung von Mikrotubuli und Mitochondrien statt. Diese Ergebnisse belegen die Beteiligung von Adeninnukleotid-abhängigen Faktoren an der Assoziation von Mitochondrien und Mikrotubuli.

5.3.2 Die Interaktion von Mitochondrien und Mikrotubuli wird durch peripher mit der mitochondrialen Außenmembran assoziierten Proteinen vermittelt

Für die Interaktion von Mitochondrien mit dem Zytoskelett wird eine Beteiligung von Proteinen, die mit der mitochondrialen Außenmembran assoziiert sind, angenommen (Shaw und Nunnari, 2002). Die Identität mitochondrialer Proteine, welche die Interaktion mit dem Zytoskelett in *N. crassa* vermitteln, ist unbekannt.

Zum Nachweis einer Beteiligung von Proteinen der mitochondrialen Außenmembran an der Interaktion zwischen Mitochondrien und Mikrotubuli in *N. crassa* wurden zwei Versuche durchgeführt. Zum einen wurde untersucht, ob Mitochondrien, welche mit Trypsin vorbehandelt wurden, in der Lage sind, Mikrotubuli zu binden. Hierdurch sollte die Beteiligung assoziierter und integraler Außenmembranproteine an der Interaktion von Mitochondrien und Mikrotubuli belegt werden. Zum anderen sollten die beteiligten Proteine näher analysiert werden. Diesbezüglich sollte geklärt werden, ob peripher an der mitochondrialen Außenmembran gebundene Proteine, die durch einen Hochsalzwaschschritt von der Außenmembran entfernt werden können, die Wechselwirkung zwischen Mitochondrien und Mikrotubuli vermitteln.

Es wurden isolierte Mitochondrien des Wildtypstammes WT74A wie in 4.7.4 beschrieben mit Trypsin vorbehandelt. Nach Zugabe von Trypsininhibitoren und Reisolierung der vorbehandelten Mitochondrien wurden diese mit Mikrotubuli für 30 min auf Eis inkubiert. In einem zweiten Ansatz wurden Mitochondrien mit einer konzentrierten Salzlösung (1M KCl) extrahiert und anschließend durch Zentrifugation pelletiert. Nach Abnahme des Salzextraktes wurden sie in Reaktionspuffer gewaschen, in SEM-Puffer aufgenommen und mit Mikrotubuli auf Eis inkubiert.

Die weitere Ultrazentrifugation im Saccharose-Dichtegradienten erfolgte wie zuvor in (Abb. 12) beschrieben. Das Ergebnis dieser Versuche zeigt die Abb. 13.

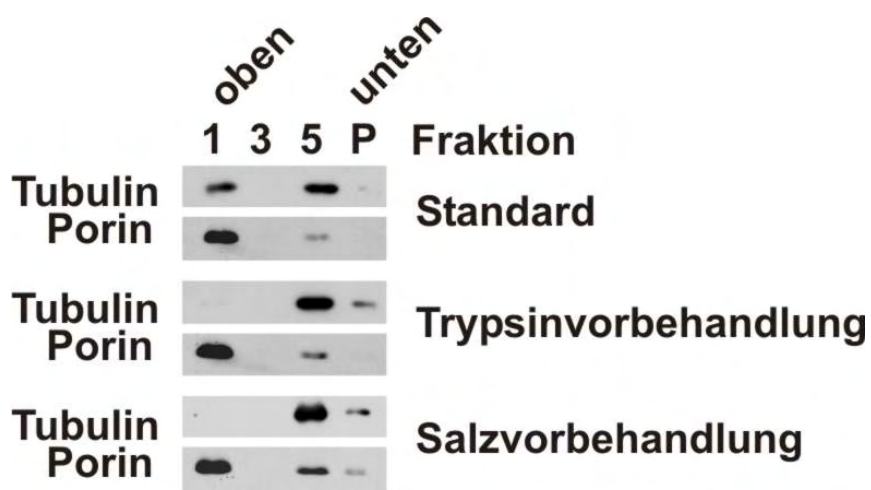


Abb. 13. Die Bindung der Mitochondrien an Mikrotubuli wird von Außenmembran-assoziierten Proteinen vermittelt

Isolierte Mitochondrien wurden mit Mikrotubuli 30 min auf Eis unter ATP-Depletionsbedingungen inkubiert. Anschließend erfolgte eine Ultrazentrifugation in einem Saccharose-Dichtegradienten sowie das Ernten von Fraktionen. Die Analyse der Fraktionen erfolgte im Western-Blot unter Verwendung von spezifischen Antikörpern wie für Abb. 12 beschrieben. Im zweiten Ansatz wurden Mitochondrien eingesetzt, die zuerst mit Trypsin vorbehandelt wurden und nach Stoppen des Trypsinverdaus, reisoliert wurden. Der dritte Ansatz enthielt Mitochondrien, welche mit einer konzentrierten Salzlösung (1 M KCl) behandelt und nach Reisolierung und Abnahme des Salzextraktes mit den Mikrotubuli inkubiert wurden.

Trypsinvorbehandelte Mitochondrien verhalten sich während der Ultrazentrifugation wie unbehandelte Mitochondrien und steigen ihrer Dichte entsprechend in den oberen Bereich des Saccharose-Gradienten auf. In dieser Fraktion kann kein Tubulin im Western-Blot nachgewiesen werden. Die Bindung der Mitochondrien an Mikrotubuli geht also durch die Proteasebehandlung verloren.

Das Waschen von Mitochondrien mit einem Hochsalzpuffer führt zu einem vergleichbaren Ergebnis. Es findet keine Interaktion zwischen Mitochondrien und Mikrotubuli statt. Die Mikrotubuli verbleiben am Boden des Stufengradienten.

Dieser Versuch bestätigt die Annahme, wonach Proteine, die peripher mit der mitochondrialen Außenmembran assoziiert sind, eine Rolle bei der Bindung von Mitochondrien an Mikrotubuli spielen. Mitochondrien, die mit Trypsin vorbehandelt wurden, sind nicht mehr in der Lage, die Assoziation mit Tubulin auszubilden, weil Proteine, welche die Interaktion vermitteln, von der Peptidase Trypsin abgebaut werden.

5.3.3 Die Bindung von Mitochondrien an Mikrotubuli wird in *N. crassa* nicht von Mmm1 vermittelt.

Nullmutanten von Mmm1 in *S. cerevisiae* und *Neurospora* besitzen stark vergrößerte, nahezu unbewegliche Mitochondrien (Boldogh *et al.*, 1998; Prokisch *et al.*, 2000). Aufgrund der Arbeiten in Hefe wurden postuliert, dass Mmm1 benötigt wird, um aktinbindende Proteine an die Außenmembran von Mitochondrien zu rekrutieren (Boldogh *et al.*, 1998; Boldogh *et al.*, 2003). Es sollte untersucht werden ob Mitochondrien der *mmm-1*-RIP-Mutante von *N. crassa* (*mmm-1*^{Rip23}) noch mit Mikrotubuli interagieren können. Deshalb wurden Mitochondrien dieses Stammes mit Mikrotubuli in Abwesenheit oder Anwesenheit von ATP inkubiert und mit Hilfe des Bindungsassays untersucht.

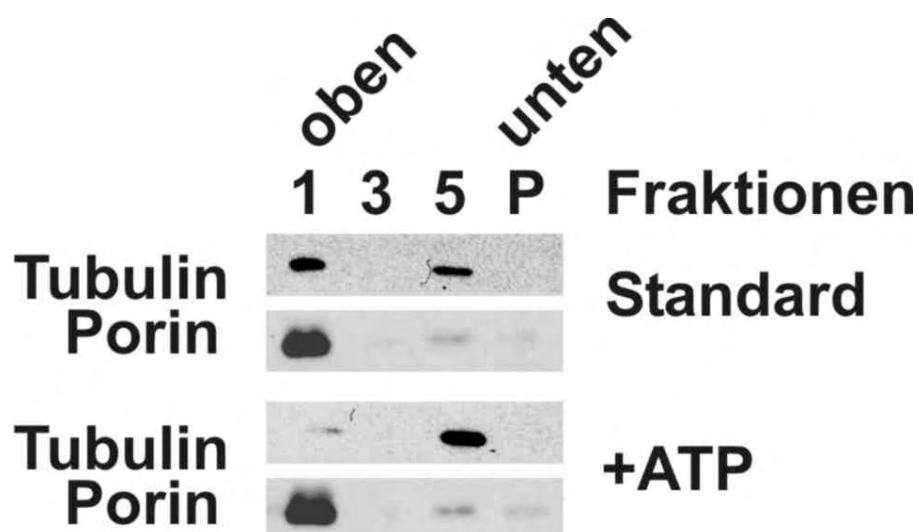


Abb. 14. Interaktionsstudie von Mitochondrien einer *mmm-1*-RIP-Mutante mit Mikrotubuli

Isolierte Mitochondrien der *mmm-1*-RIP-Mutante wurden wie in 4.7.4 beschrieben in Abwesenheit oder in Anwesenheit von ATP mit Mikrotubuli für 30 min auf Eis inkubiert. Nach der Inkubation erfolgten eine Ultrazentrifugation im Saccharose-Dichtegradient und das Sammeln von Fraktionen. Die in den Fraktionen enthaltenen Proteine wurden mit TCA präzipitiert, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Western-Blot, wie für Abb. 12 beschrieben, analysiert.

Unter ATP-Depletionsbedingungen können Mitochondrien der *mmm-1*-RIP-Mutante mit Mikrotubuli interagieren, sodass die an die Mitochondrien gebundenen Mikrotubuli während der Ultrazentrifugation in den oberen Bereich des Gradienten aufsteigen (Abb. 14). Diese Bindung wird ebenfalls – wie im Falle von Mitochondrien des Wildtypstammes (zum Vergleich siehe Abb. 12) – in ATP-abhängiger Weise vermittelt, weil die Anwesenheit von ATP eine vollständige Inhibierung der Bindungsaffinität von Mitochondrien an Mikrotubuli

bewirkt (Abb. 14). Mmm1 wird also für das Binden von Mitochondrien an Mikrotubuli in *Neurospora* nicht benötigt.

5.4 Beteiligung Kinesin-verwandter Proteine an der Interaktion von Mitochondrien mit Mikrotubuli

Die Interaktion von Mitochondrien mit Mikrotubuli *in vitro* weist Charakteristika auf, die auf eine Beteiligung von Kinesin-verwandten Motorproteinen schließen lassen. Zu Beginn dieser Arbeit war nur ein Kinesin in *N. crassa* identifiziert worden. Dieses als Nkin bezeichnete Motorprotein gehört zur Gruppe der konventionellen Kinesine und ist wahrscheinlich das am häufigsten vorkommende Kinesin in *N. crassa* (persönliche Mitteilung Prof. Schliwa). Die zelluläre Funktion dieses Motorproteins ist bereits eingehend charakterisiert worden (Steinberg und Schliwa, 1993; Steinberg und Schliwa, 1995; Seiler *et al.*, 1997). Aufgrund dieser Arbeiten kann eine Beteiligung von Nkin an dem Transport von Mitochondrien entlang von Mikrotubuli ausgeschlossen werden.

Die Sequenzierung des *N. crassa*-Genoms wurde kürzlich abgeschlossen (Galagan *et al.*, 2003). Durch Sequenzvergleiche mit der Kinesinmotordomäne konnten im Laufe der Arbeit 10 Kinesin-verwandte Proteine im Genom von *Neurospora* identifiziert werden. Diese Kinesine lassen sich aufgrund ihres Aufbaus aus verschiedenen Domänen unterschiedlichen Kinesinfamilien zuordnen. Da man aus der Zuordnung zu einer Kinesinfamilie Rückschlüsse auf die zelluläre Funktion des entsprechenden Proteins treffen kann, lassen sich potenzielle Kandidaten des Organellentransports aufgrund der zugeordneten Kinesinfamilie auswählen. Die nachfolgende Abb. 15 zeigt einen Homologiestammbaum und eine Zuordnung der gefundenen Kinesin-ähnlichen Proteine zu den einzelnen Kinesin-Familien.

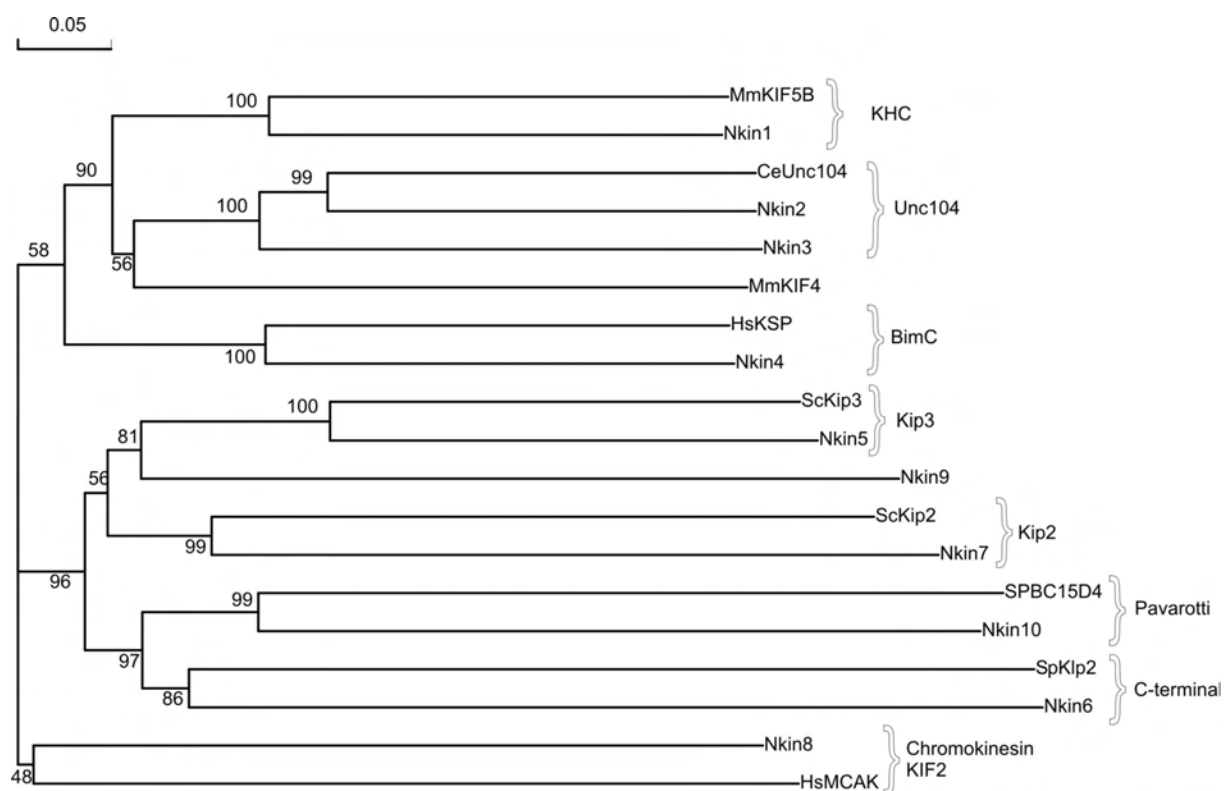


Abb. 15. Klassifizierung von Kinesin-ähnlichen Proteinen in *N. crassa*

Aus der Aminosäuresequenz der Motordomäne der unterschiedlichen Kinesin-ähnlichen Proteine der *Neurospora*-Genomdatenbank (<http://www.broad.mit.edu/annotation/fungi/neurospora/>) abgeleiteter Kinesinstammbaum und Klassifizierung der Proteine in die jeweilige Kinesin-Familie. Verwendet wurde das Programm DNAMan (Lynnon BioSoft, Vaudreuil, Canada).

Wie anhand der Abb. 15 ersichtlich, befinden sich unter den neuen Kinesin-verwandten Proteinen zwei Mitglieder der Unc104/KIF1-Familie. Da zu dieser Kinesin-Familie viele an dem Transport von Organellen beteiligte Motorproteine gehören (Hirokawa, 1998; Bloom, 2001a), stellen beide Proteine potentielle Kandidaten für mitochondriale Motorproteine dar und wurden im Rahmen dieser Arbeit untersucht. Diese beiden Motorproteine sind im Folgenden als Nkin2 und Nkin3 bezeichnet.

5.4.1 Das *nkin2*-Gen

Das *nkin2*-Gen (*Neurospora* Kinesin 2) konnte während des Genom-Sequenzierungsprojektes von *Neurospora* durch Sequenzvergleich mit der hochkonservierten Motordomäne von Nkin identifiziert werden. Nkin2 ist ein ca. 206 kDa großes Protein, dessen Motordomäne starke Homologie zu Kif1ba aufweist, einem Kinesin, dem eine Rolle beim Transport von Mitochondrien in Mauszellen zugeschrieben wurde (Nangaku *et al.*, 1994). Die abgeleiteten Aminosäuresequenzen der Motordomänen der beiden Proteine weisen eine Identität von 41,8 % auf (Abb. 16).

Ergebnisse

KIF1bMSGASVKVAVRVRPFNSRETSKESKCIIQMQGNSTSLINPKNPKKEAP	47
Nkin2	MAPGMAPMGGGGNIKVVVRCRPFNAREHDRGAQCIVEMRDNOTVLTTPPDAVVKGGKQDG	60
KIF1b	KSFSFDYSYWSHTSPEDPCFASQNRVYNDI GKEMLLHAFEGYNVCI FAYGQTGAGKSYTM	107
Nkin2	QKIFAFDRSYWSFDKNAPNYAGQDQLHEDLGKPLLDNAFOGYNNCIFAYGQTGSGKSYSM	120
KIF1b	MGKQEESQAVIIPQLCEELFEKINDNCNEEMSYS.VEVSYMEIYCERVRDLLNPKNKGNL	166
Nkin2	MGYGKDAG..IIPMICQDMFKRINDMQQDKNLRCTVEVSYLEIYNERVRDLLNPANKGNL	178
KIF1b	RVREHPLLGPYVEDLSKLAVTSYTDIADLMDAGNKARTVAATNMNETSSRSHAVFTIVFT	226
Nkin2	KVREHPSTGPYVEDLAKLVVGSFQETEHLMDEGNKARTVAATNMNETSSRSHAVFTLMLT	238
KIF1b	QKKQDPETNLSTEKVSKISLVDLAGSERADSTGAKGTRLKEGANINKSLITLTKVVISALA	286
Nkin2	QKRFDPETKMEMEKAAKISLVDLAGSERATSTGATGARLKEGAEINRSLSTLGRVIAALA	298
KIF1b	EVSKKKKKTDFI...PYRDSVLTWLLREN LGNSRTAMVAALSPADINYDETLSTLRYA	342
Nkin2	DLSTGKKKKGSAAGQVPYRDSVLTWLLKDSLGGNSMTAMIAALSPADINYDETLSTLRYA	358
KIF1b	DRAKQIKCNAVINEDPNAKLVRELKEEVTRIKDILRAQGLGDIIDTSMGSLTSSPSSCSL	402
Nkin2	DSAKRIKNHAVVNEDANARMIRELKEELAQLRSKLGNGCVVGDTHVPGEEVYAEGTFLEK	418
KIF1b	NSQVGLTSVTSIQERIMS	420
Nkin2	QI.....	420

Abb. 16. Homologievergleich der Aminosäuresequenzen von Nkin2 und Kif1 α aus *M. musculus*

Aminosäuresequenzvergleich der Kinesin-Motordomänen von Nkin2 (AA 19-365) und des Mitochondrienmotors Kif1 α (AA 1-362) aus Maus. Zur Darstellung wurde das Programm DNAMAN (Lynnon BioSoft, Vaudreuil, Canada) verwendet.

Die Aminosäuresequenz des Nkin2-Proteins weist neben der Kinesin-Motordomäne (AA 62-365) weitere charakterisierte Proteinmotive auf (Abb. 17). Hierzu zählt eine FHA-Domäne, welche an Phosphothreoninreste bindet und an Protein-Protein-Wechselwirkungen beteiligt ist (Durocher *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2000; Westerholm-Parvinen *et al.*, 2000; Durocher und Jackson, 2002). Des Weiteren besitzt Nkin2 eine PH-Domäne (Lemmon und Ferguson, 1998). Diese vermittelt eine Interaktion mit Phospholipiden und besitzt somit eine wichtige Rolle in der Interaktion von Motorproteinen mit Membranen der zu transportierenden Fracht.



Abb. 17. Domänenstruktur von Nkin2

Nkin2 besitzt eine Kinesinmotordomäne, welche die Aminosäuren 62-365 umfasst. Ca. 150 Aminosäuren hinter dem Ende der Motordomäne befindet sich eine FHA-(*Forkhead associated domain*)-Domäne. Am C-Terminus des Proteins befindet sich eine PH-(*Pleckstrin Homology*)-Domäne.

Der modulare Aufbau dieses Kinesins entspricht somit dem des *Dictyostelium* Unc104-Homologs (DdUnc104). Für dieses Kinesin konnte gezeigt werden, dass die PH-Domäne die Interaktion von Motorprotein und Vesikeln vermittelt (Klopfenstein *et al.*, 2002). Diese Interaktion ist von der Anwesenheit von PtdIns(4,5)P₂ in der Vesikelmembran abhängig (Klopfenstein *et al.*, 2002).

Die größte Homologie über die Gesamtlänge des Proteins weist ein hypothetisches Protein aus *Gibberella moniliformis* (Datenbanknummer AY 230443) auf (Abb. 18).

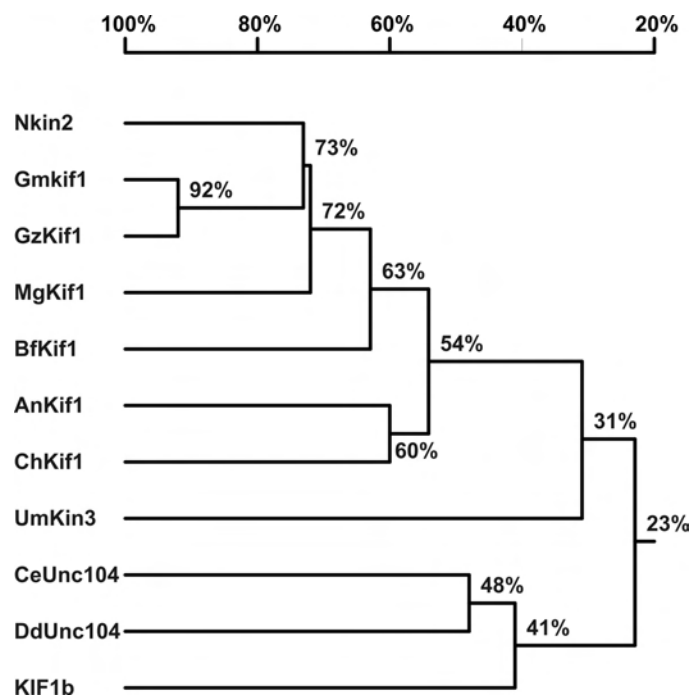


Abb. 18. Identitätsvergleich verschiedener Nkin2-Homologe aus *D. discoideum*, *C. elegans* und verschiedenen filamentösen Pilzen

Vergleich der Aminosäuresequenz von Nkin2 und homologen Proteinen. Ein vollständiges Alignment der Proteinsequenzen sowie die zu den Proteinsequenzen gehörenden Datenbanknummern sind im Anhang (Abb. 36) zu finden. Verwendet wurde das Programm DNAMAN (Lynnon BioSoft, Vaudreuil, Canada). An = *Aspergillus nidulans*; Bf = *Botryotinia fuckeliana*; Ce = *Caenorhabditis elegans*; Ch = *Cochliobolus heterostrophus*; Dd = *Dictyostelium discoideum*; Gm = *Gibberella moniliformis*; Gz = *Gibberella zeae*; Mg = *Magnaporthe griseae*; Um = *Ustilago maydis*.

5.4.2 Das *nkin3*-Gen

Das *nkin3*-Gen (*Neurospora Kinesin 3*) kodiert für ein 677 Aminosäuren langes Motorprotein. Sein Aufbau weist bis auf die Kinesinmotordomäne keine Ähnlichkeit zu bekannten Proteindomänen auf. Die Kinesinmotordomäne von Nkin3 besitzt die größte Homologie zu Kif1c in *Homo sapiens*. Im Vergleich zu Kif1c in Säugern (Dörner *et al.*, 1998) besitzt dieses Motorprotein einen auffällig verkürzten C-Terminus. Weitere Kif1c-Homologe mit ähnlich verkürztem C-Terminus sind nur in filamentösen Pilzen zu finden (Schoch *et al.*, 2003). Anhand von phylogenetischen Studien (Abb. 19) nimmt man an, dass Nkin3 und homologe Proteine anderer filamentöser Pilze innerhalb der KIF1C-Familie eine Unterfamilie verkürzter Unc104-Kinesine bilden (Schoch *et al.*, 2003). Zelluläre Funktionen dieser Familienmitglieder sind nicht bekannt.

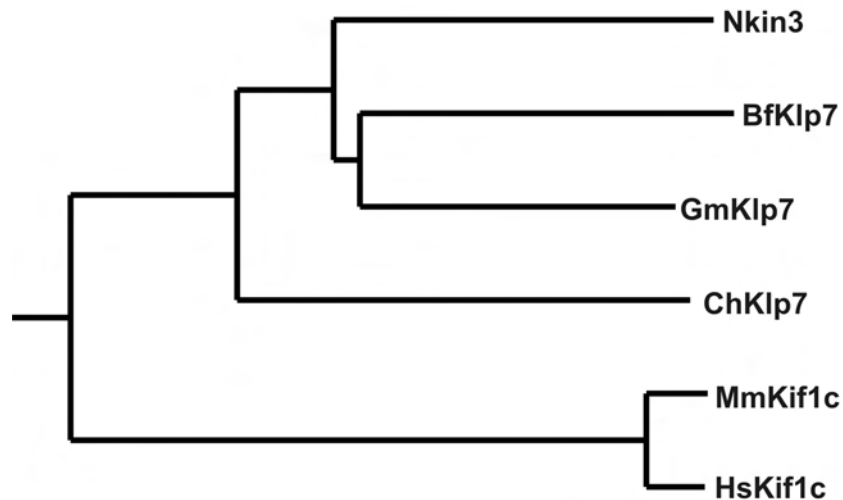


Abb. 19. Phylogenetischer Stammbaum von HsKif1c, MmKif1c, Nkin3 und weiteren Homologen aus filamentösen Pilzen

Zur Erstellung dieses Stammbaums wurde das Programm DNAMAN (Lynnon BioSoft, Vaudreuil, Canada) verwendet. Ein vollständiges Alignment der Aminosäuresequenzen ist im Anhang (Abb. 37) zu finden. Bf = *Botryotinia fuckeliana*; Ch = *Cochliobolus heterostrophus*; Gm = *Gibberella moniliformis*; Hs = *Homo sapiens*; Mm = *Mus musculus*.

5.4.3 Subzelluläre Lokalisation von Nkin2 und Nkin3

Kif1ba kolokalisiert mit Mitochondrien in Zellkulturen von Maus. Darüber hinaus ist dieses Motorprotein in der Lage, Mitochondrien *in vitro* entlang von Mikrotubuli zu

transportieren. Aus diesen Gründen wurde postuliert, dass Kif1b α beim Transport von Mitochondrien in Mauszellen involviert ist (Nangaku *et al.*, 1994).

Zur Bestimmung der subzellulären Lokalisation von Nkin2 und Nkin3 wurden Subfraktionen aus Gesamtzellextrakt (Abb. 20, Spur 1), postmitochondrialem Überstand (Abb. 20, Spur 2), isolierter Mitochondrien (Abb. 20, Spur 3), mittels Saccharosegradientengereinigte Mitochondrien (Abb. 20, Spur 4), sowie Außenmembranvesikel (Abb. 20, Spur 5) von *Neurospora* präpariert und mittels Western-Blot auf die Verteilung von Nkin2 und Nkin3 untersucht. Verwendet wurden spezifisch gegen Nkin2 bzw. Nkin3 gerichtete Antikörper.

In der Abb. 20 ist die subzelluläre Lokalisation von Nkin2 und Nkin3 im Wildtypstamm 74A dargestellt. Nkin3 kann im Gesamtzellextrakt und in dem postmitochondrialen Überstand nachgewiesen werden, so dass die Lokalisation von Nkin3 der Lokalisation des konventionellen Kinesins Nkin gleicht. Nkin2 hingegen fraktioniert wie das integrale Außenmembranprotein Tom40. Es ist in der Fraktion gereinigter Mitochondrien und der der Außenmembranvesikel stark angereichert. Vergleicht man den Proteingehalt in der Fraktion der Außenmembranvesikel mit dem der Fraktion der gereinigten Mitochondrien, so nimmt der Proteingehalt von Nkin2 weniger stark zu als der von Tom40. Diese Beobachtung könnte durch eine periphere Assoziation des Motorproteins mit der mitochondrialen Außenmembran und damit auf einen Verlust an Protein während der Präparation der Außenmembranvesikel zurückzuführen sein.

Als Kontrolle für die Fraktionierung zellulärer Membranen wurde der Gehalt des peroxisomalen Proteins Pex14 in den einzelnen Fraktionen bestimmt. Mitochondrien, die durch differenzielle Zentrifugation präpariert wurden, enthielten einen signifikanten Anteil an Pex14 (Abb. 20, Spur 3). Diese Verunreinigung der Mitochondrien war in Saccharosegradientengereinigten Mitochondrien nicht mehr festzustellen (Abb. 20, Spur 4). Diese Fraktion enthält also hochgereinigte Mitochondrien, die weitgehend frei von anderen Organellen sind. Das Fraktionierungsverhalten anderer Zellorganellen, wie z.B. Endosomen, ER etc., konnte nicht kontrolliert werden, da keine geeigneten Antikörper zur Verfügung standen.

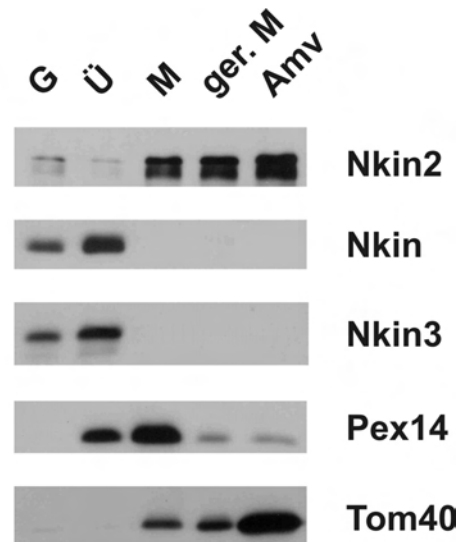


Abb. 20. Subzelluläre Lokalisation von Nkin2 und Nkin3 in *N. crassa*

Flüssigminimalmedium wurde mit Konidien des Wildtypstammes angeimpft und über 16 h bei 25°C inkubiert. Nach dem Ernten der Hyphen wurden diese aufgeschlossen und eine Fraktion des Gesamtzellextrakt (G) abgenommen. Der restliche Gesamtzellextrakt wurde nach einer differenziellen Zentrifugation in Mitochondrienpräparation (M) und Überstand der Mitochondrienpräparation (Ü) aufgeteilt. Ein Teil der Mitochondrienpräparation wurde mittels eines Saccharosegradientenlaufs aufgereinigt (ger. M) und der andere Teil zur Isolierung von Außenmembranvesikeln (Amv) verwendet. Die Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit spezifischen Antikörpern gegen Nkin, Nkin2, Nkin3, Pex14 und Tom40 dekoriert.

Der Immunoblot subzellulärer Fraktionen mit spezifischen Antikörpern gegen Nkin2 zeigt eine Kolokalisation von Nkin2 mit Mitochondrien. Nkin2 könnte aus diesem Grund eine wichtige Rolle im Transport von Mitochondrien entlang des Zytoskeletts in *N. crassa* spielen. Nkin2 ist zudem zu einem geringen Anteil im postmitochondrialen Überstand enthalten. Es ist deshalb wahrscheinlich, dass Nkin2 neben einer möglichen Rolle im Transport von Mitochondrien weitere Transportaufgaben in *N. crassa* besitzt.

5.4.4 Charakterisierung der Assoziation von Nkin2 mit der mitochondrialen Außenmembran

Die zuvor beschriebene Lokalisation von Nkin2 deutet auf eine periphere Assoziation mit der Außenmembran hin. Daher sollte die Interaktion von Nkin2 mit der Außenmembran von Mitochondrien im Detail analysiert werden. Ein peripher mit Mitochondrien assoziiertes Motorprotein sollte sich durch einen Hochsalzwaschschritt von der mitochondrialen Außenmembran entfernen lassen.

Zum Nachweis einer peripheren Assoziation von Nkin2 mit der mitochondrialen Außenmembran wurden Mitochondrien mit einer konzentrierten Salzlösung (1 M KCl) behandelt. Nach Zentrifugation, Abnahme des Salzextraktes und Reisolierung der salzgewaschenen Mitochondrien konnten peripher an die mitochondriale Außenmembran gebundene Proteine von integralen Membranproteinen getrennt werden.

Die Abb. 21 belegt das Ablösen von Nkin2 von der mitochondrialen Außenmembran durch Waschen von Mitochondrien mit einer konzentrierten Salzlösung (1 M KCl). Tom40, ein integrales Membranprotein, kann unter diesen Bedingungen nicht von der Außenmembran entfernt werden. Durch diesen Versuch konnte die periphere Assoziation von Nkin2 mit der Außenmembran von Mitochondrien in *N. crassa* nachgewiesen werden.

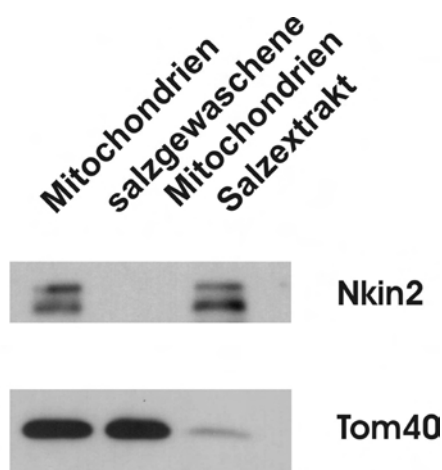


Abb. 21. Nkin2 ist peripher mit der mitochondrialen Außenmembran assoziiert

Isolierte Mitochondrien wurden mit einem konzentrierten Salzpuffer gewaschen, die Mitochondrien durch Zentrifugation pelletiert und der Salzextrakt abgenommen. Die salzgewaschenen Mitochondrien wurden in SEM-Puffer gewaschen und nach einer weiteren Zentrifugation in SEM-Puffer reisoliert. Anschließend wurden gleiche Proteinmengen von Mitochondrien, salzgewaschenen Mitochondrien und Salzextrakt aufgetragen und der Gehalt an Nkin2 in den jeweiligen Fraktionen bestimmt. Als Kontrolle wurde mit einem spezifischen Antikörper gegen Tom40 dekoriert.

5.4.5 Nkin2 ist an der Interaktion von Mitochondrien mit Mikrotubuli beteiligt

Die bisherige Charakterisierung der Interaktion von Mitochondrien und Mikrotubuli legt eine Beteiligung von Kinesinen nahe. Die hohe Homologie von Nkin2 zu Kif1b α , die Kolokalisation von Nkin2 mit Mitochondrien und dessen periphere Assoziation mit dem Organell liefern Hinweise für eine Beteiligung von Nkin2 an der Interaktion von Mitochondrien mit Mikrotubuli. Um diese Hinweise zu untermauern, sollte die Funktion von

Nkin2 auf isolierten Mitochondrien durch eine Vorbehandlung mit Antikörpern inhibiert und anschließend die Bindung der Mitochondrien an Mikrotubuli *in vitro* getestet werden.

Die Vorbehandlung der Mitochondrien erfolgte mit spezifischen Antikörpern gegen beide Vertreter der Unc104/KIF1-Familie, Nkin2 und Nkin3. Als Negativkontrolle fungierte eine Vorbehandlung von Mitochondrien mit Antikörpern gegen das mitochondriale Innenmembranprotein Tim54. Nach der Antikörperbehandlung und dem Entfernen von nicht gebundenen Antikörpern wurden die Mitochondrien und Mikrotubuli unter ATP-Depletionsbedingungen inkubiert und im biochemischen *in vitro*-Interaktionsassay untersucht.

Mitochondrien, welche mit Antikörpern gegen Nkin3 und Tim54 vorbehandelt wurden, können unter ATP-Depletionsbedingungen mit Mikrotubuli interagieren und verhalten sich wie Mitochondrien ohne Antikörper-Präinkubation (Abb. 22). Dagegen wird nach einer Vorbehandlung von Mitochondrien mit Antikörpern gegen Nkin2 keine Bindung von Mikrotubuli an Mitochondrien beobachtet.

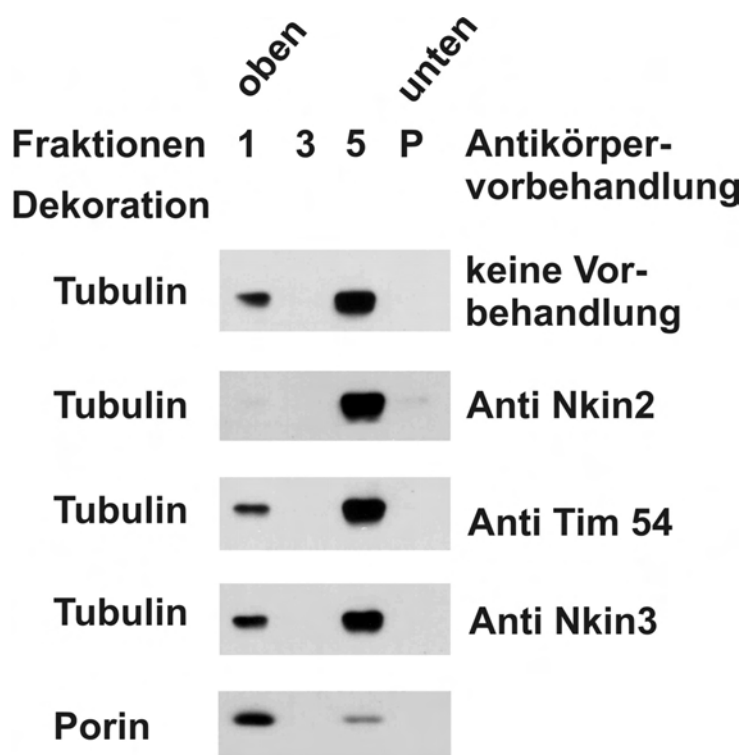


Abb. 22. *In vitro*-Interaktionsstudie zwischen Taxol-stabilisierten Mikrotubuli und antikörpervorbehandelten Wildtyp-Mitochondrien von *N. crassa*

100 µg Mitochondrien des Wildtypstammes WT74A wurden mit 500 ng affinitätsgereinigtem Antiserum vorbehandelt. Nach einem Waschschrift erfolgte eine Inkubation der reisolieren vorbehandelten Mitochondrien mit Mikrotubuli unter ATP-Depletionsbedingungen. Das weitere Vorgehen erfolgte wie unter Abb. 12 beschrieben. Das Vorkommen von Mikrotubuli in den einzelnen Gradientenfraktionen wurde durch Immunoblot gegen Tubulin nachgewiesen.

Dieses Ergebnis zeigt, dass der spezifisch gegen Nkin2 gerichtete Antikörper in der Lage ist, *in vitro* die Bindung von Wildtypmitochondrien an Mikrotubuli effektiv zu inhibieren. Antikörper, welche gegen Nkin3 oder Tim54 gerichtet sind, haben keinen Einfluss auf die Interaktion von Mitochondrien des Wildtypstammes mit Mikrotubuli. Diese Beobachtung impliziert, dass Nkin2 die Bindung von Mitochondrien an Mikrotubuli direkt vermittelt.

Um dieses Ergebnis zu bestätigen, wurde das gleiche Experiment unter Einsatz des mikroskopischen Testsystems (4.8.2) wiederholt. In diesem Versuch (Abb. 23) wurden Mitochondrien des mtGFP-exprimierenden Stammes mit Antikörpern gegen Nkin2 oder Nkin3 vorbehandelt und anschließend mit rhodamingefärbten Mikrotubuli unter ATP-Depletions-Bedingungen inkubiert.

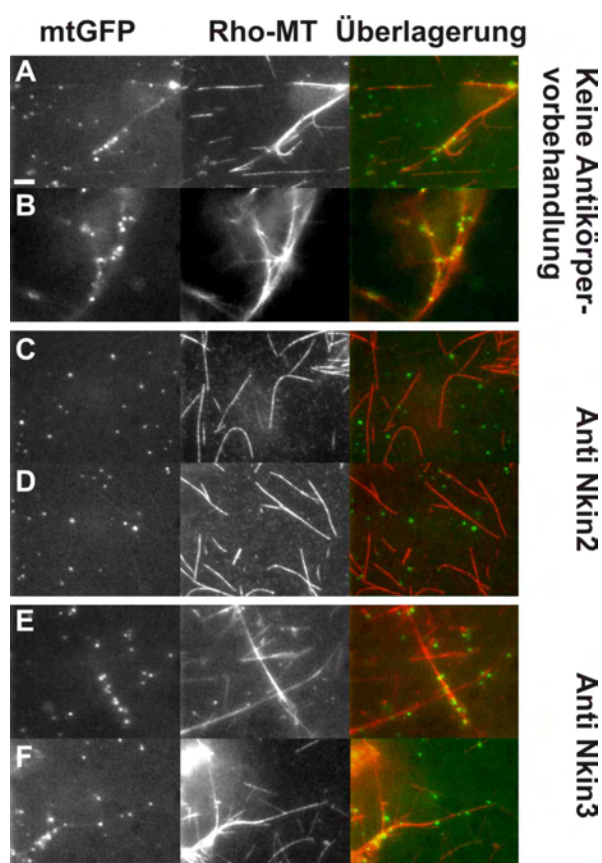


Abb. 23. Interaktion antikörpervorbehandelter Mitochondrien des mtGFP-exprimierenden Stammes mit rhodamingefärbten Mikrotubuli

Die linke Bildreihe (mtGFP) zeigt Einzelkanalaufnahmen von GFP-gefärbten WT-Mitochondrien, die unter Standardbedingungen mit rhodamingefärbten Mikrotubuli inkubiert wurden. Die mittlere Bildreihe (Rho-MT) zeigt eine Einzelkanalaufnahme der rhodamingefärbten Mikrotubuli des jeweiligen Versuchansatzes, und die rechte Bilderreihe zeigt die Überlagerung der beiden Kanäle. Die Bilderserien A und B zeigen Versuche, in denen unbehandelte Mitochondrien unter Standardbedingungen mit Mikrotubuli inkubiert wurden. In den Versuchen C und D wurden die Mitochondrien zuerst mit Antikörpern gegen Nkin2 vorbehandelt und dann unter ATP-Depletionsbedingungen mit Mikrotubuli inkubiert. In den Versuchansätzen E und F wurden die Mitochondrien vor der Inkubation mit Mikrotubuli mit Antikörpern gegen Nkin3 vorbehandelt. Der Längenstandard entspricht 5 µm.

Ähnlich wie im biochemischen Interaktionsassay bewirkt die Präinkubation von Mitochondrien des mtGFP-exprimierenden Stammes mit Antikörpern gegen Nkin2 eine Inhibierung der Interaktion von Mitochondrien mit Mikrotubuli. Im Gegensatz dazu können Mitochondrien, welche mit Antikörper gegen Nkin3 vorbehandelt wurden, weiterhin eine Interaktion mit Mikrotubuli ausbilden. Demzufolge spielt Nkin2 eine wichtige und spezifische Rolle in der Interaktion von Mitochondrien mit Mikrotubuli.

5.4.6 Herstellung einer $\Delta nkin2$ -Deletionsmutante

5.4.6.1 Erzeugung eines heterokaryotischen $\Delta nkin2$ -Stammes

Alle *in vitro* erhaltenen Ergebnisse sprechen für eine Beteiligung von Nkin2 an der Interaktion zwischen Mitochondrien und Mikrotubuli. Diese Annahme sollte durch die Charakterisierung einer Deletionsmutante von *nkin2 in vivo* unterstützt werden. Da der Transport von Mitochondrien und ihre Positionierung eine essenzielle Voraussetzung für die optimale Funktion von Zellen ist, war anzunehmen, dass an diesem Prozess beteiligte Proteine für den Lebenszyklus des Pilzes essenziell sind.

Für die Herstellung dieser $\Delta nkin2$ -Deletionsmutante wurde ein Plasmid (pFF15) hergestellt, welches über homologe Rekombination die Insertion des Disruptionskonstruktes in den *nkin2*-Genlocus ermöglicht. Mittels Southern-Blot sollte anschließend die erfolgreiche Insertion des Markergens in den *nkin2*-Genlocus der Transformanten überprüft werden. Da Sphäroblasten zwischen einem und drei Kerne enthalten, führt eine Transformation von Sphäroblasten mit Plasmid-DNA zur Herstellung eines heterokaryotischen Stammes. Da dieser Stamm nach der Transformation Kerne unterschiedlichen Genotyps besitzt, sollte mittels meiotischer Kreuzung ein homokaryotischer Stamm erhalten werden. Hierfür wurden nach Kreuzen des transformierten Stammes mit einem Wildtypstamm entgegengesetzten Paarungstyps Ascosporen isoliert, die durch Meiose entstehen und nur einen Zellkern enthalten. Es war jedoch nicht möglich, auf diese Weise einen homokaryotischen Stamm mit disruptiertem *nkin2*-Gen zu erhalten. Aus diesem Grunde wurde zu diesem Zeitpunkt angenommen, dass das *nkin2*-Gen essenziell für die Lebensfähigkeit von *N. crassa* ist.

Deshalb wurde in einem zweiten Ansatz mit der „Sheltered Disruption“-Methode (Nargang *et al.*, 1995), welche die Disruption essenzieller Gene in *N. crassa* ermöglicht, die Herstellung einer $\Delta nkin2$ -Nullmutante durchgeführt. Bei dieser Methode wird ein Heterokaryon verwendet, welcher 2 Kerne mit unterschiedlichen Auxotrophiemarkern enthält (Abhängigkeit vom Zusatz von Histidin bzw. Panthothenat zum Medium). Das Verhältnis dieser beiden Kerne zueinander kann durch die Wahl des zur Anzucht des Stammes

verwendeten Mediums beeinflusst werden. Die Transformation des Stammes mit dem Plasmid pFF15 führt entweder zur Transformation des Histidin-benötigenden Kerns oder des Panthothenat-benötigenden Kerns. Eine Unterscheidung dieser beiden Möglichkeiten ist durch die Anzucht der Stämme auf unterschiedlichen Medien und der anschließenden funktionellen Kontrolle des zu disruptierenden Gens möglich. Anzumerken ist, dass der Panthothenat-benötigende Kern zusätzlich eine Resistenz gegenüber Benomyl vermittelt. Eine Selektion auf diesen Kern, erfolgt dementsprechend durch den Zusatz von Benomyl. Da Benomyl aber mikrotubulidestabilisierende Eigenschaften besitzt, wäre ein Verlust an mitochondrialen Transport nicht nur auf den Verlust des beteiligten Motorenzyms, sondern auch auf den Verlust der beteiligten Zytoskelettkomponente rückführbar gewesen. Eine eindeutige Beweisführung wäre somit nicht möglich geworden.

Wie in der nachfolgenden Abb. 24 zu sehen ist, wurde durch die Transformation dieses Stammes mit dem Plasmid pFF15 ein Heterokaryon erhalten, in dem der Histidin-benötigende Kern transformiert worden ist. Der transformierte heterokaryotische Stamm wurde mit Dis34 bezeichnet. Abb. 24 A zeigt eine Southern-Blot-Analyse des erhaltenen Heterokaryons. Dieser spaltet unter nichtselektiven Wachstumsbedingungen in das *nkin2*-Wildtypallel (*nkin2* *Wt*) und das disruptierte *nkin2*-Allel (*nkin2* *Dis*) auf. Nach dreitägiger Anzucht des Stammes unter selektiven Wachstumsbedingungen in His- (Histidin) und Fpa- (P-Fluoro-DL-Phenyl-Alanin) haltigem Medium, ist nur noch das disruptierte *nkin2*-Allel zu detektieren. Diese Beobachtung wird durch die Western-Blot-Analyse bestätigt. Nkin2 kann nach Wachstum in Flüssigmedium, welches Fpa und His enthält, nicht mehr auf Mitochondrien nachgewiesen werden (Abb. 24 B).

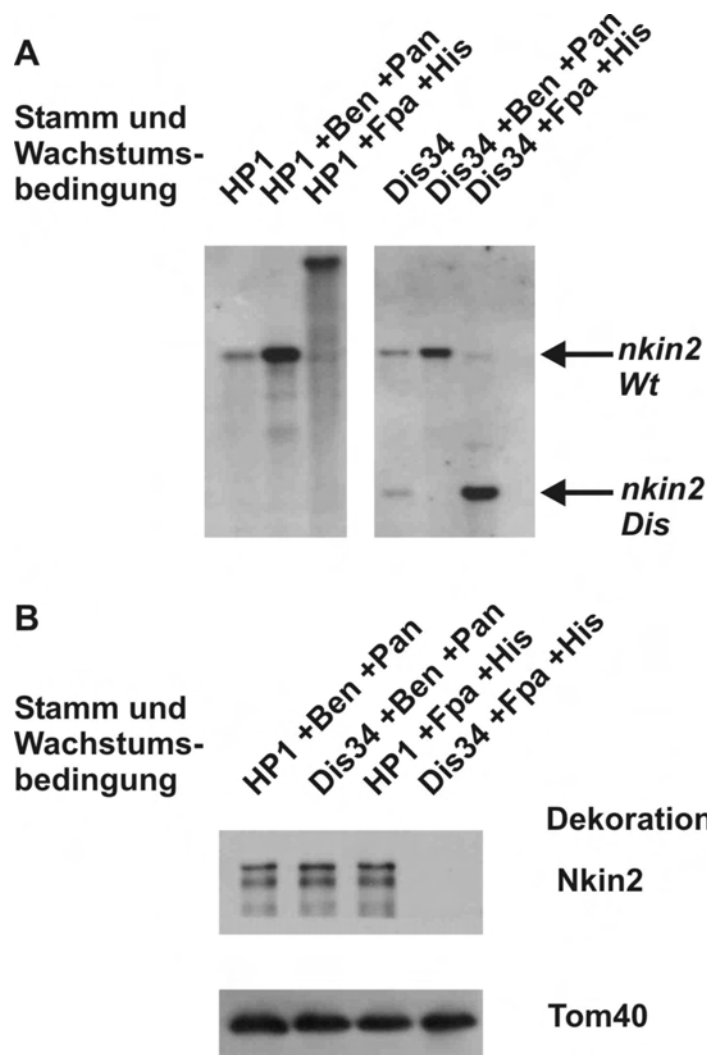


Abb. 24. Verhältnis von disruptiertem und nichtdisruptiertem *nkin2*-Allel im heterokaryotischen Stamm Dis34 in Abhängigkeit der Wachstumsbedingungen

(A) Southern-Blot-Analyse des Wildtypstammes HP1 und des heterokaryotischen $\Delta nkin2$ -Stammes Dis34 in Abhängigkeit der Wachstumsbedingungen; (B) Western-Blot-Analyse des Wildtypstammes HP1 und des Heterokaryons Dis34 in Abhängigkeit der Wachstumsbedingungen. Konidien des Wildtypstammes HP1 sowie des Heterokaryons Dis34 wurden 72h bei 25°C unter Lichteinwirkung und Luftzufuhr bei den jeweiligen Medienzusammensetzungen inkubiert, das Myzelium geerntet und die Mitochondrien nach Sebald (Sebald und Neupert, 1979) isoliert. 50 µg Mitochondrien wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und mit Antikörper gegen Nkin2 und Tom40 dekoriert.

Dieses Ergebnis war für die Herstellung eines Stammes mit disruptiertem *nkin2*-Gen in zweierlei Hinsicht wichtig. Zum einen ist in dem heterokaryotischen Stamm Dis34 der Kern, welcher die Fpa-Resistenz vermittelt und Histidin benötigt, mit dem Disruptionsplasmid transformiert worden. Die Analyse eines Phänotyps in Abhängigkeit des Verlustes von Nkin2 kann deshalb durch Anzucht des Stammes in Medium supplementiert mit Histidin und P-Fluoro-DL-Phenyl-Alanin erfolgen. Zum anderen ist der Proteingehalt von Nkin2 bei der

Selektion auf den Kern, welcher das disruptierte *nkin2*-Allel trägt, niedriger als man es für ein essenzielles Gen erwarten würde (Frank Nargang, persönliche Mitteilung).

5.4.6.2 Isolierung eines homokaryotischen *Δnkin2*-Stammes

Die starke Abnahme des Nkin2-Proteingehalts im heterokaryotischen *Δnkin2*-Stamm Dis34 durch Anzucht auf selektivem Medium legt nahe, dass es sich bei Nkin2 um ein Protein handelt, welches für das Wachstum von *Neurospora* nicht essenziell ist. Aus diesem Grunde wurde versucht, einen homokaryotischen *Δnkin2*-Stamm zu isolieren.

Um den Anteil der Kerne, welche das disruptierte *nkin2*-Allel tragen, zu erhöhen, wurde der heterokaryotische Stamm Dis34 mehrfach auf Histidin/Fpa-haltigem Selektionsmedium überimpft. Da *N. crassa* unter normalen Wachstumsbedingungen neben den Makrokonidien auch zu einem geringen Anteil Mikrokonidien ausbildet, sollte diese Eigenschaft des Pilzes hinsichtlich der Gewinnung eines homokaryotischen *nkin2*-Disruptionsstammes ausgenutzt werden. Durch das mehrmalige Überimpfen auf Selektionsmedium wurde die Wahrscheinlichkeit der Ausbildung von Mikrokonidien, die ausschließlich das disruptierte *nkin2*-Allel enthalten, erhöht. Diese Konidien wurden anschließend geerntet, auf Sorbosemedium vereinzelt und Einzelstämme isoliert. Danach wurden die Nährstoffbedürfnisse der einzelnen Stämme durch Anzucht auf unterschiedlichen Medien bestimmt.

Da homokaryotische Stämme mit disruptiertem *nkin2*-Gen ausschließlich auf histidinhaltigen Medien wachsen, konnten diese leicht identifiziert werden. Anschließend wurden die Stämme mittels Southern- und Western-Blot verifiziert. Für die Southern-Blot-Analyse wurde genomische DNA der verschiedenen Stämme isoliert, diese mit Restriktionsenzymen geschnitten und in einem Agarosegel aufgetrennt. Anschließend erfolgte ein Transfer der DNA auf eine Trägermembran und die Detektion unter Verwendung von Digoxigenin-markierten DNA-Sonden. Beispiele dieser Southern- und Western-Blot-Analysen sind in der Abb. 25 aufgeführt.

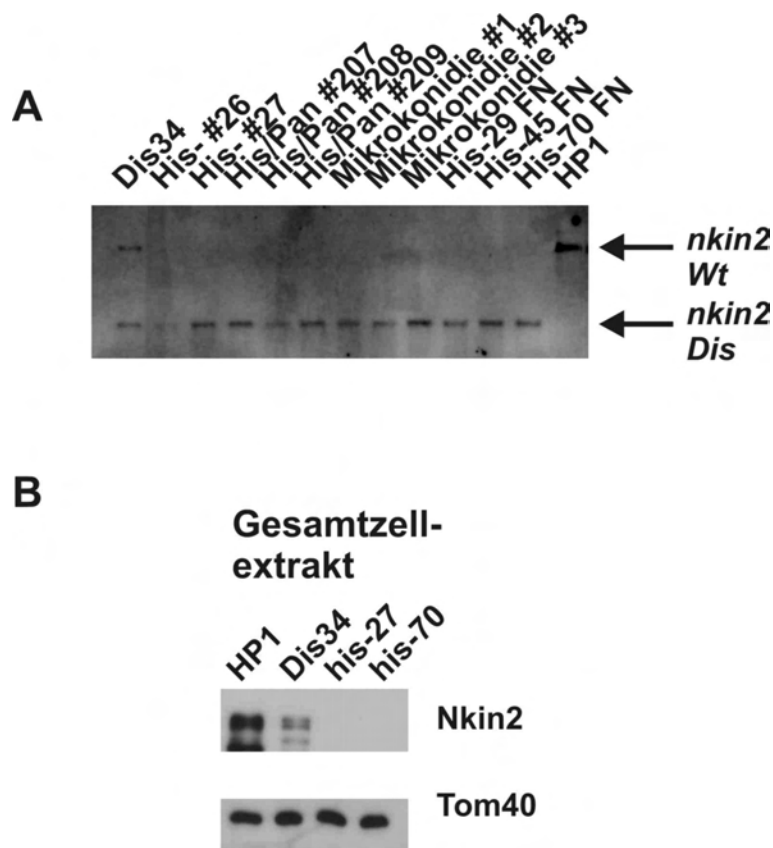


Abb. 25. Southern- und Western-Blot-Analyse homokaryotischen $\Delta nkin2$ -Stämme

(A) Southern-Blot-Analyse vom Wildtypstamm HP1, dem heterokaryotischen Disruptionsstamm Dis34, sowie einiger homokaryotischer Disruptionsstämme. Diese Stämme wurden 16 h bei 25°C in flüssigem Minimalmedium, dem Histidin zugesetzt worden war, angezogen. Genomische DNA der verschiedenen Stämme wurde unter Verwendung der Restriktionsenzymen *Eco*RI und *Sac*I geschnitten, die Detektion erfolgte unter Verwendung der digoxigeninmarkierten Sonde 2 (4.3.10). Die erwarteten Banden von Wildtyp-Allel und disruptiertem Allel von *nkin2* sind durch Pfeile gekennzeichnet. (B) Western-Blot-Analyse von Gesamtzell-extrakten verschiedener Stämme. Jeweils 50 µg Gesamtzell-extrakt des jeweiligen Stammes wurden mit spezifischen Antikörpern gegen Nkin2 und Tom40 dekoriert.

Durch Southern-Blot-Analyse (Abb. 25 A) konnten eindeutige homokaryotische *nkin2*-Disruptionsstämme nachgewiesen werden, die ausschließlich das disruptierte *nkin2*-Allel (*nkin2* Dis) enthielten. Zwei dieser homokaryotischen Stämme wurden auf das Vorkommen von Nkin2 im Western-Blot untersucht (Abb. 24 B). Zum Vergleich wurde die Proteinmenge von Nkin2 im Wildtypstamm und im heterokaryotischen Disruptionsstamm Dis34 bestimmt. Der heterokaryotische Stamm Dis34 enthielt bereits deutlich geringere Mengen an Nkin2 als der Wildtypstamm HP1. In den homokaryotischen $\Delta nkin2$ -Stämmen his-27 und his-70 ist Nkin2 nicht mehr detektierbar. Da diese Stämme dennoch lebensfähig sind, kann Nkin2 kein essenzielles Protein sein.

5.4.7 Phänotypische Analyse der *Δnkin2*-Disruptionsmutante

Aufgrund der Ergebnisse der *in vitro*-Testsysteme kann man auf eine Funktion von Nkin2 beim Mitochondrientransport entlang von Mikrotubuli schließen (Abb. 23). Zur Verifizierung dieser Annahme wurde der Phänotyp der Nullmutante charakterisiert. Da der Verlust des konventionellen Kinesins Nkin einen starken Wachstumsdefekt zur Folge hat, sollte zuerst geklärt werden, ob die Disruption von *nkin2* einen ähnlichen Wachstumsphänotyp zur Folge hat.

Diesbezüglich wurde das Wachstum der *Δnkin2*-Disruptionsmutante im Vergleich zum Wildtypstamm in „Racetubes“ untersucht. Mit Hilfe dieser länglichen Glasgefäße lässt sich das Hyphenwachstum in Abhängigkeit der Zeit und somit die Geschwindigkeit des gerichteten Wachstums messen. Die Racetubes wurden mit Minimalmedium befüllt, dem Histidin zugesetzt wurde. Das Wachstum der Stämme wurde bei verschiedenen Temperaturen analysiert. Das lineare Hyphenwachstum unterschiedlicher *Δnkin2*-Stämme im Vergleich zum Wildtypstamm HP1 ist in der Abb. 26 aufgeführt.

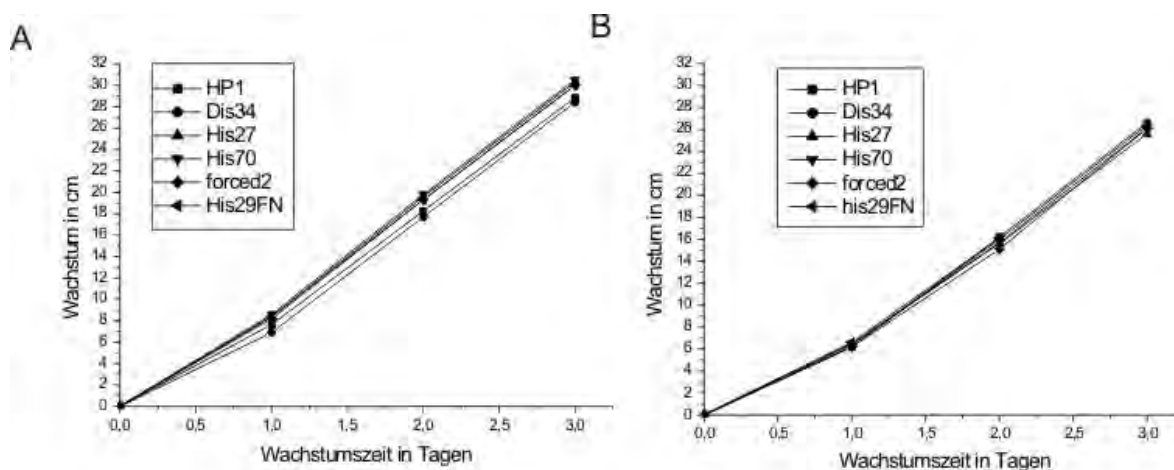


Abb. 26. Wachstumskurve verschiedener Stämme in Abhängigkeit von Zeit und Temperatur

Racetubes, die Minimalmedium supplementiert mit Histidin enthielten, wurden mit Konidien verschiedener Stämme angeimpft und über die angegebene Zeit bei 30°C inkubiert; (B) Racetubes wurden bei 37°C inkubiert. HP1 = Wildtyp-Stamm; Dis34 = heterokaryotischer *Δnkin2*-Stamm; His27, His70, forced2 und His29FN = verschiedene homokaryotische *Δnkin2*-Stämme

Die *Δnkin2*-Disruptionsmutante zeigt keinen veränderten Wachstumsphänotyp, weder bei 15°C, noch bei 25°C, bei 30°C oder bei 37°C. Um zu analysieren, ob die mitochondriale Funktion in der *Δnkin2*-Disruptionsmutante beeinflusst ist, wurde das Wachstum auf nichtfermentierbarem Medium in Racetubes untersucht. Hier zeigte sich ebenfalls keine

Wachstumsveränderung im Vergleich zum Wildtypstamm. Hieraus lässt sich schließen, dass die mitochondriale Atmungsfunktion in der *Ankin2*-Deletionsmutante nicht beeinflusst ist.

5.4.8 Phänotypische Untersuchung des *Ankin2*-Disruptionstamms mit Hilfe von organellenspezifischen Fluoreszenzfarbstoffen

Da die phänotypische Wachstumsanalyse keine Erkenntnisse hinsichtlich einer Funktion von *Nkin2* gebracht hatte, sollte die *Ankin2*-Deletionsmutante mit organellenspezifischen Fluoreszenzfarbstoffen untersucht werden. Es wurde beschrieben, dass die Deletion des konventionellen Kinesins in *N. haematococca* zu einer Abwesenheit von Mitochondrien in der Hyphenspitze führt (Wu *et al.*, 1998), weshalb besonderes Augenmerk auf Auffälligkeiten der Mitochondrienverteilung in der Hyphenspitze gelegt wurde. *Nkin2* besitzt zudem hohe Homologie zu einem Kinesin in *U. maydis*, welches eine Funktion im Transport von Endosomen besitzt (Wedlich-Söldner *et al.*, 2002b). Aus diesem Grund sollte die Frage geklärt werden, ob *Nkin2* Funktionen in der Endozytose besitzen könnte.

Zur Anfärbung der Mitochondrien wurde der Farbstoff Rhodamin-B-Hexylester verwendet. Zusätzlich wurde die Verteilung von Kernen (durch DAPI-Färbung) und Vakuolen (Färbung mit Cell Tracker Blue) untersucht. FM4-64 wurde eingesetzt, um endozytotische Vorgänge in der Deletionsmutante zu analysieren.

Die Abb. 27 zeigt Hyphen und Hyphenspitzen, welche mit den unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen angefärbt wurden. Die *Ankin2*-Disruptionssmutante besitzt wie der Wildtyp einen sehr gut ausgeprägten Spitzenkörper (Abb. 28). Endozytotische Vorgänge sind von der Disruption von *nkin2* nicht beeinflusst. Die Aufnahme des Farbstoffs FM4-64 durch Endozytose und die Endosomenbewegung in der Mutante entsprechen der des Wildtyp. Die Kern- sowie die Vakuolenverteilung, welche durch Anfärben mit DAPI bzw. Cell Tracker Blue visualisiert wurde (Abb. 27), ist ebenfalls nicht betroffen. Die Mitochondrienverteilung ist allerdings entgegen den Erwartungen nicht beeinträchtigt. Die Mitochondrien in Hyphen der *nkin2*-Deletionsmutante erscheinen jedoch im Verhältnis zum Wildtyp teilweise etwas länger und dicker (Abb. 27 B), was ebenfalls in Phasenkontrastmikroskopie-Aufnahmen gezeigt werden kann (Abb. 28).

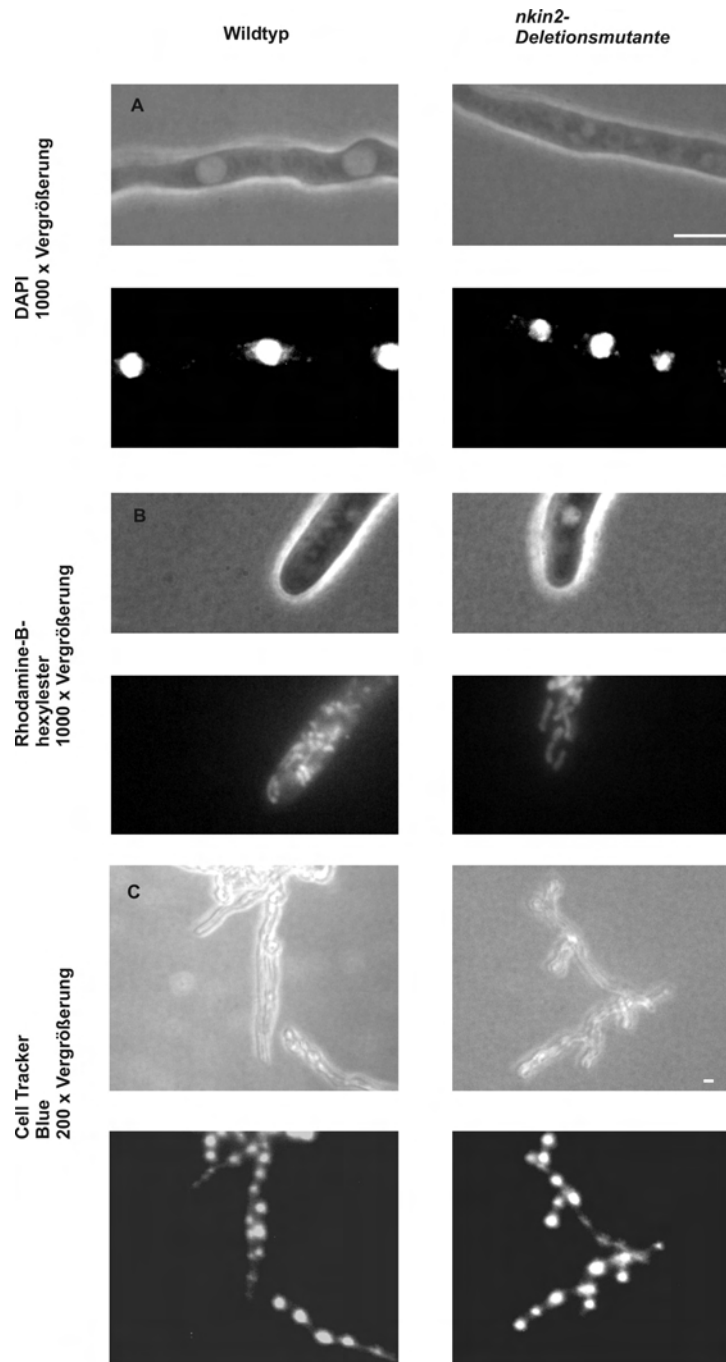


Abb. 27. Organellenverteilung in der $\Delta nkin2$ -Disruptionsmutante im Vergleich zum Wildtypstamm

In den linken Bilderserien, ist die Organellenverteilung im Wildtyp, in den rechten Bilderserien, die der *nkin2*-Deletionsmutante. Die obere Aufnahme enthält jeweils das zur unten aufgeführten Fluoreszenzaufnahme korrespondierende Phasenkontrastbild. Die Kernverteilung, welche durch das Anfärben mit DAPI visualisiert werden kann ist in der Abbildung A, die Verteilung der Mitochondrien in B und die der Vakuolen in C dargestellt. Der Längenstandard in A und C entspricht jeweils 5 μm .

Die Analyse der Organellenverteilung in der *nkin2*-Nullmutante lässt keine Rückschlüsse auf die Art der von Nkin2 transportierten „Fracht“ zu, da Form und Verteilung der untersuchten Organellen im Vergleich zum Wildtyp nicht auffällig verändert sind.

5.4.9 Die Deletion von *nkin2* besitzt Einfluss auf die Bewegung von Mitochondrien

Die fluoreszenzmikroskopische Analyse der Zellorganellen zeigt nur Momentaufnahmen. Nachdem auf diese Weise in der *Δnkin2*-Deletionsmutante keine signifikanten Unterschiede zum Wildtyp nachweisbar waren, wurde versucht, intrazelluläre Bewegungsvorgänge während des Hyphenwachstums in detaillierterer Weise zu analysieren.

Hierzu wurde computerunterstützte Phasenkontrast-Mikroskopie eingesetzt. In diesem Experiment wurden gelatinebeschichtete Objektträger mit Konidien der jeweils zu untersuchenden Stämme angeimpft, und das Hyphenwachstum sowie intrazelluläre Transportvorgänge mikroskopisch verfolgt.

Die Analyse der Transportvorgänge innerhalb der *Δnkin2*-Disruptionsmutante im Vergleich zum Wildtypstamm ermöglichte zwei Beobachtungen. Zu einem frühen Zeitpunkt des Auskeimens (sechs bis sieben Stunden nach dem Animpfen des Mediums) weist die *Δnkin2*-Deletionsmutante Unterschiede bezüglich der Mitochondrienmorphologie und Bewegung auf. Die Mitochondrien der Mutante sind wesentlich länger und dicker als die des Wildtyps. Sie sind zudem weitgehend parallel angeordnet und weisen kaum Querbewegungen auf (Abb. 28). Interessanterweise ist die Vorwärtsbewegung der Mitochondrien ebenso schnell wie das Wachstum der Hyphenspitze. Im Wildtypstamm können hingegen ungleichmäßige Vorwärts- und Rückwärtsbewegungen der Mitochondrien beobachtet werden. Des Weiteren ist das Hyphenwachstum der Mutante zu diesem Zeitpunkt, also über eine Zeitdauer von zwei-drei Stunden, nur halb so schnell wie das des Wildtyps. Betrachtet man die Transportvorgänge innerhalb der Hyphe nur wenige Stunden später (10-14 Stunden nach Animpfen der Kulturen), so sind keine Unterschiede mehr feststellbar.

Die detaillierte Analyse der Transportvorgänge innerhalb auswachsender Hyphen weist somit in der Tat, einen Phänotyp als Resultat der Deletion von *nkin2* und damit verbunden, einer eingeschränkten Motilität der Mitochondrien aus. Hierdurch wird erneut die Wichtigkeit von *nkin2* an dem gerichteten Mitochondrientransport verdeutlicht.

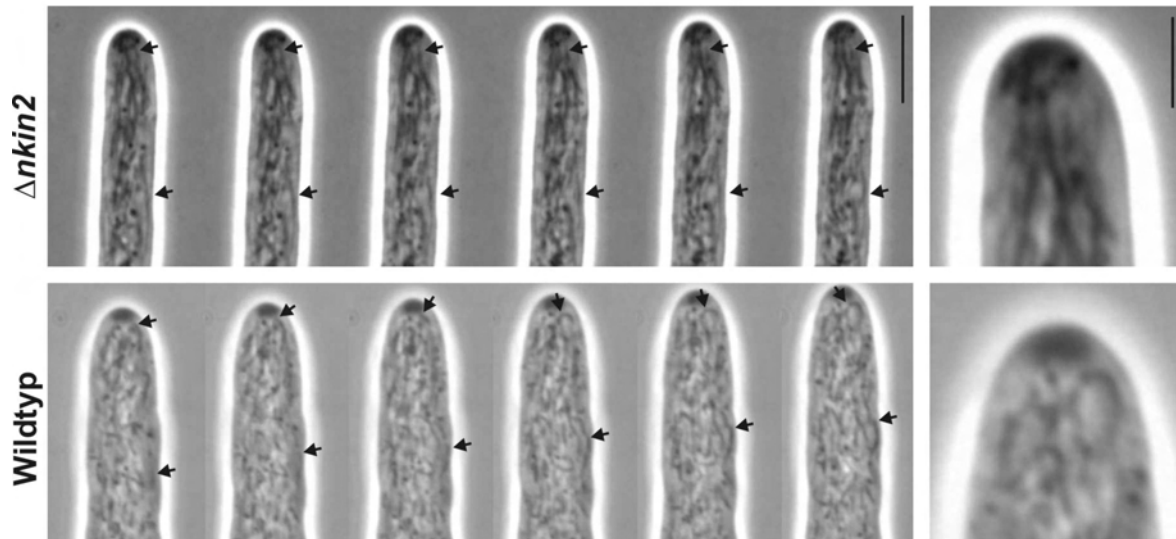


Abb. 28. Hyphenwachstum und intrazelluläre Bewegung von Mitochondrien und Vesikeln nach Deletion von *nkin2*

Die obere Bilderserie zeigt Aufnahmen des Hyphenwachstums der $\Delta nkin2$ -Mutante 7 h nach Animpfen der mit Medium beschichteten Objektträger mit Konidien. Die untere Bilderserie zeigt Phasenkontrast-Aufnahmen des Hyphenwachstums zu diesem Zeitpunkt in dem Wildtypstamm. Die Pfeile weisen auf die Bewegung einzelner ausgesuchter Mitochondrien hin. Der Längenstandard entspricht 5 μm , in dem vergrößerten Bildausschnitt 2 μm .

5.4.10 Kompensation des Verlustes von Nkin2 durch Überexpression von Nkin3 als Zeichen funktioneller Redundanz der Unc104-Kinesine aus *Neurospora*

Da die $\Delta nkin2$ -Mutante einem dem Wildtyp sehr ähnlichen Phänotyp aufweist, führte dieses zu der Fragestellung, ob der Verlust von Nkin2 einfach toleriert wird, oder aber eine weitere Komponente diesen Verlust ausgleichen kann. Mögliche Komponenten waren ebenfalls in den Klassen der Kinesine zu suchen, welche Funktionen im Organellentransport aufweisen. Kandidaten waren das schon gut charakterisierte Nkin und das uncharakterisierte Nkin3, neben Nkin2 der zweite Vertreter der Unc104-Familie. Die Antwort auf diese Frage sollte durch Analyse des Proteingehaltes subzellulärer Fraktionen, sowohl des homokaryotischen Disruptionsstammes als auch des heterokaryotischen Disruptionsstammes ermöglicht werden.

Hierzu wurden die einzelnen Stämme in Flüssigmedium, supplementiert mit Histidin, angezogen und anschließend Subfraktionen der unterschiedlichen Stämme präpariert. In diesen wurde dann der Gehalt verschiedener Proteine mittels Western-Blot untersucht. Die Dekoration des Proteingehaltes von Nkin und Tom40 sollte in diesen Experimenten als Kontrolle dienen, weil sie von der Deletion von Nkin2 nicht beeinflusst sein sollten. Abb. 29 zeigt das Ergebnis des Experimentes und die Analyse des Proteingehaltes in subzellulären

Ergebnisse

Fractionen verschiedener Stämme nach 16-stündiger Anzucht. Zusätzlich wurde der Proteingehalt von Nkin2 in dem heterokaryotischen Stamm Dis34 durch Inkubation unter Selektivbedingungen sukzessiv erniedrigt. Hierdurch sollte ebenfalls die Detektion der Überexpression eines Proteins als Antwort auf den Verlust von Nkin2 möglich sein. Das Ergebnis dieses Experimentes ist in der Abb. 30 dargestellt.

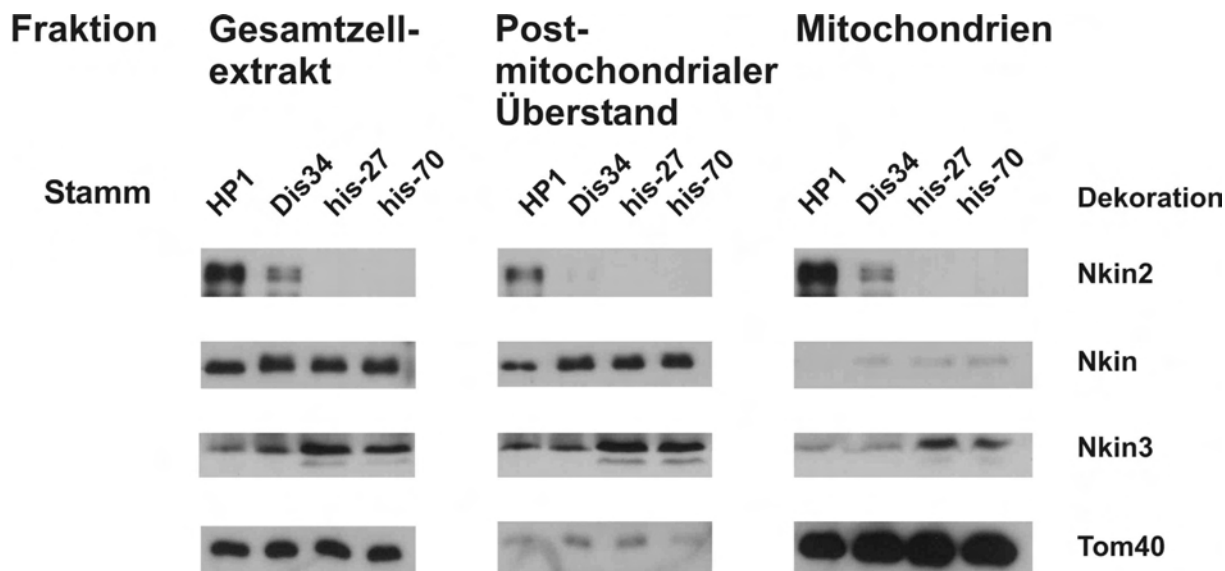


Abb. 29. Proteingehalt von Nkin und Nkin3 in Abhängigkeit der Deletion von Nkin2

In diesem Versuch wurden Zellfraktionen des heterokaryotischen Stammes HP1, des heterokaryotischen Disruptionsstammes Dis34 sowie der homokaryotischen Disruptionsstämme his-27 und his-70 aufgetragen und hinsichtlich des Proteingehaltes von Nkin2, Nkin, Nkin3 und Tom40 verglichen. Die unterschiedlichen Stämme wurden für 16 h bei 25°C in Minimalmedium mit Histidin angezogen. Aufgetragen wurden jeweils 50 µg Gesamtzelleextrakt, postmitochondrialer Überstand und isolierte Mitochondrien. Die Dekoration dieser Zellfraktionen erfolgte mit spezifischen Antiseren gegen Nkin, Nkin2, Nkin3 und Tom40.

Nkin3 lässt sich in Proteinextrakten unter Wildtypbedingungen nur schwach detektieren (Abb. 29). Der Gehalt an Nkin3 ist in dem heterokaryotischen *nkin2*-Disruptionsstamm Dis34 im Vergleich zum Wildtypstamm nach der Anzucht über 16 Stunden auf Selektionsmedium nicht erhöht, weil Nkin2 zu diesem Zeitpunkt noch zu detektieren ist (Abb. 29 und Abb. 30). Demhingegen ist der Proteingehalt von Nkin3 zu diesem Zeitpunkt in den homokaryotischen Disruptionsstämmen his-27 und his-70 sehr stark erhöht (Abb. 29). Solange noch ein Grundgehalt an Nkin2 in dem heterokaryotischen Stamm Dis34 enthalten ist, wird Nkin3 nicht hochreguliert (siehe unterschiedliche Proteingehalte in den Inkubationstagen eins bis drei, Abb. 30). Nkin2 kann erst nach einer 72-stündigen Inkubation des heterokaryotischen Disruptionsstammes Dis34 unter Selektivbedingungen nicht mehr im

Immunoblot nachgewiesen werden (Abb. 30). Ab diesem Zeitpunkt ist die Expression von Nkin3 hochreguliert. Es zeigt sich außerdem, dass zum Zeitpunkt der Überexpression von Nkin3 das Protein mit Mitochondrien kolokalisiert (Abb. 29 und Abb. 30). Die Erhöhung in der Expression von Nkin3 ist hierbei von der subzellulären Lokalisation unabhängig. Im Vergleich zu dem Proteingehalt von Nkin3 bleibt dagegen der Proteingehalt von Nkin und Tom40 in den subzellulären Fraktionen unverändert (Abb. 29 und Abb. 30). Diese Beobachtungen sprechen für eine Überexpression von Nkin3 in *nkin2*-Mutanten als Antwort auf den Verlust von Nkin2.

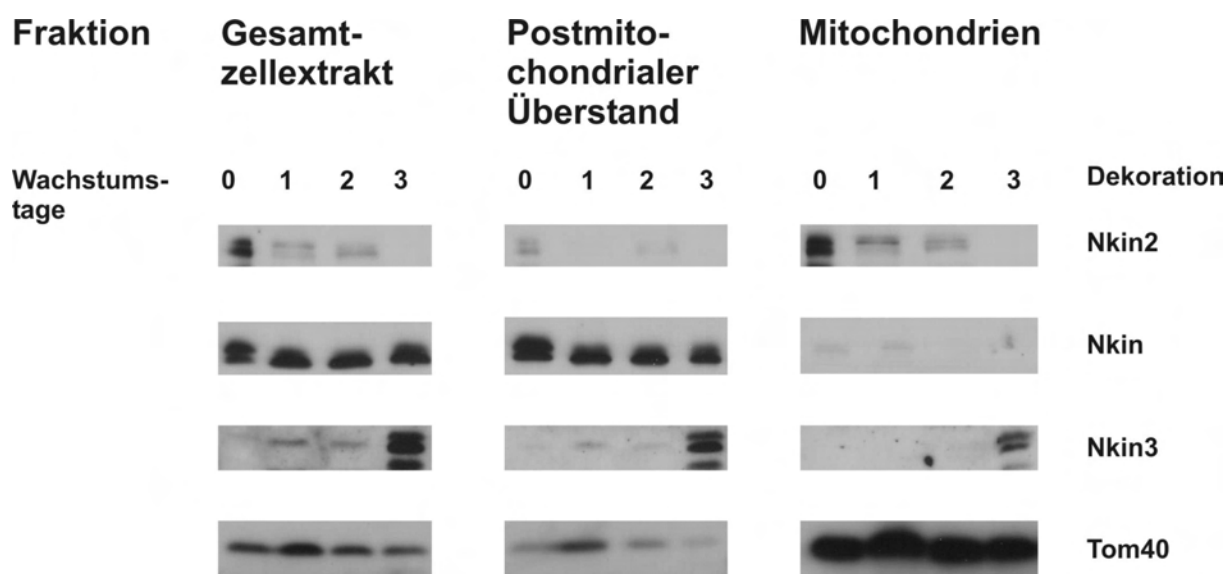


Abb. 30. Proteingehalt von Nkin, Nkin2 und Nkin3 in Zellfraktionen der heterokaryotischen *nkin2*- Deletionsmutante Dis34 in Abhängigkeit von Wachstumsbedingungen

Minimalmedium, welches mit Histidin supplementiert worden war, wurde mit Konidien des heterokaryotischen Disruptionsstammes Dis34 angeimpft und über den angegebenen Zeitraum bei 25°C inkubiert. Anschließend wurden Zellfraktionen präpariert und jeweils 50 µg Gesamtprotein, postmitochondrialer Überstand oder isolierte Mitochondrien aufgetragen. Die Dekoration der Zellfraktionen erfolgte wie für Abb. 29 beschrieben.

5.4.11 Die Expression von Nkin3 in der *Ankin2*-Mutante ist strikt reguliert und vom Hyphenwachstum abhängig

Die Anzucht der heterokaryotischen *Ankin2*-Deletionsmutante unter nichtpermissiven Wachstumsbedingungen und der durch den Verlust von Nkin2 regulierte Proteingehalt von Nkin3 lassen eine Kompensation des Verlustes von Nkin2 durch eine Überexpression von Nkin3 vermuten. Auffällig sind zudem die durch die Videomikroskopie detektierten

Transportdefekte und Morphologieveränderungen der Mitochondrien zu einem frühen Zeitpunkt des Hyphenwachstums (Abb. 28).

Diesbezüglich stellt sich die Frage, ob die Überexpression von Nkin3 auch von den unterschiedlichen Stadien des Lebenszyklus von *N. crassa* abhängig ist. Diese Frage lässt sich durch Analyse des Nkin3-Proteingehaltes in Konidien des HP1- und des homokaryotischen $\Delta nkin2$ -Stammes klären.

Die Dekoration von Nkin3 in Gesamtzellaufschlüssen aus Konidien von HP1 und der $\Delta nkin2$ -Disruptionsmutante (Abb. 31 A) weist keine Unterschiede bezüglich des Proteingehaltes von Nkin3 in Konidien der unterschiedlichen Stämme nach.

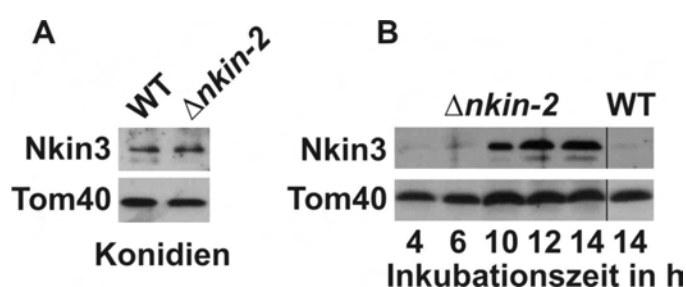


Abb. 31. Proteingehalt von Nkin3 in Gesamtzellaufschlüssen von HP1 (Wildtyp) und his-27 ($\Delta nkin2$ -Disruptionsmutante)

(A) Gesamtzellextrakt wurde aus Konidien von HP1 (Wildtypstamm) und his-27 ($\Delta nkin2$ -Disruptionsmutante) präpariert und der Proteingehalt von Nkin3 im Western-Blot detektiert; (B) Konidien der $\Delta nkin2$ -Disruptionsmutante sowie des Wildtypstammes wurden für die angegebene Zeitdauer in Flüssigkultur bei 25°C inkubiert und der Proteingehalt von Nkin3 nach Ernten der Konidien bzw. der ausgekeimten Hyphen bestimmt. Im Gegensatz zum Proteingehalt von Nkin3 in dem Wildtypstamm HP1 steigt der Proteingehalt von Nkin3 in der $\Delta nkin2$ -Disruptionsmutante zwischen 6-10 Stunden nach dem Inokulieren des Mediums stark an und verbleibt auf diesem Niveau.

Im Gegensatz zum Wildtypstamm HP1 steigt der Gehalt des Nkin3-Proteins in der $\Delta nkin2$ -Disruptionsmutante zwischen sechs- zehn Stunden nach dem Animpfen der Flüssigkultur mit Konidien stark an und verbleibt dann auf diesem erhöhten Niveau (Abb. 31 B). Aufgrund dieses Ergebnisses lässt sich schließen, dass die Überexpression von Nkin3 in der $\Delta nkin2$ -Disruptionsmutante in Abhängigkeit des Hyphenwachstums und somit von der Notwendigkeit des Transportes von Mitochondrien in die Hyphenspitze geregelt ist.

5.4.12 In der $\Delta nkin2$ -Mutante wird die Interaktion von Mitochondrien mit Mikrotubuli von Nkin3 vermittelt

Die Lokalisationsstudie wies auf eine Beteiligung von Nkin2 am Transport von Mitochondrien entlang von Mikrotubuli in *N. crassa* hin. Zusätzlich konnte mit Hilfe des biochemischen Bindungstestsystems auf eine Beteiligung von Nkin2 an der Interaktion

zwischen Mikrotubuli und Mitochondrien geschlossen werden (Abb. 22 und Abb. 23). Die phänotypische und biochemische Untersuchung der *Ankin2*-Deletionsmutante führte dann zu der Annahme einer Kompensation des Verlustes von Nkin2 durch Nkin3 und lässt eine Beteiligung von Nkin3 an der Interaktion von Mitochondrien mit Mikrotubuli in der *Ankin2*-Deletionsmutante vermuten. Diese Annahme sollte durch Einsatz von Mitochondrien der *Ankin2*-Deletionsmutante im *in vitro*-Bindungstestsystem überprüft werden.

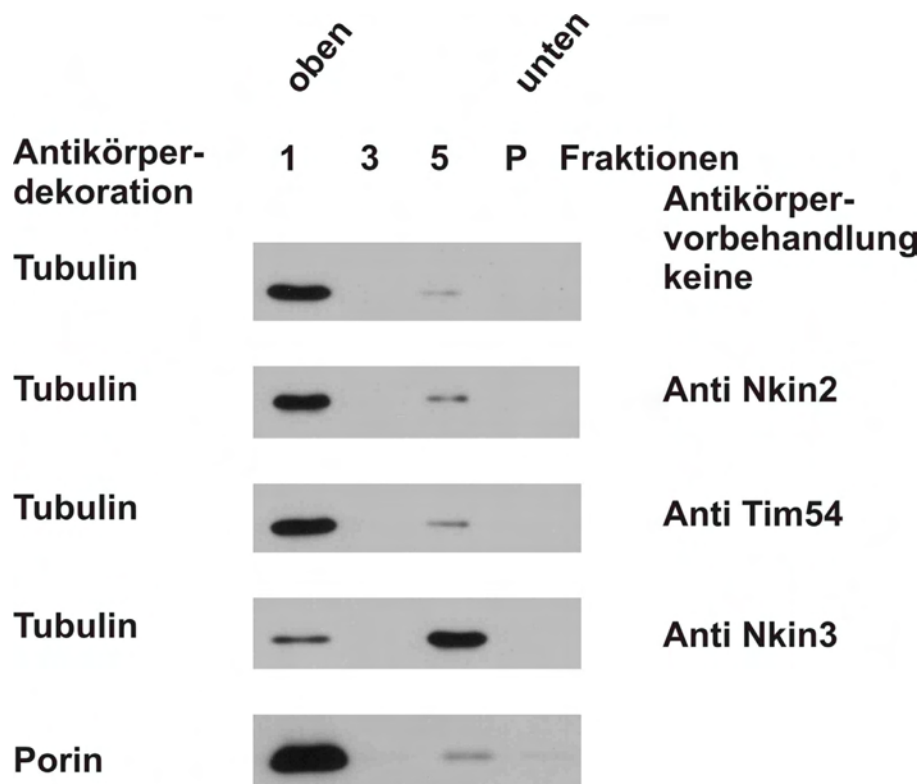


Abb. 32. Interaktion von Mitochondrien der *Ankin2*-Disruptionsmutante in Abhängigkeit einer Antikörpervorbehandlung der Mitochondrien mit unterschiedlichen Antikörpern

Mitochondrien der *Ankin2*-Disruptionsmutante wurden unbehandelt, oder nach Präinkubation mit spezifischen Antikörpern, mit Mikrotubuli unter ATP-Depletionsbedingungen inkubiert. Die weitere Durchführung des Experimentes erfolgte wie unter Abb. 12 beschrieben.

Mitochondrien der *Ankin2*-Disruptionsmutante sind in der Lage, mit Mikrotubuli *in vitro* zu interagieren. Diese Interaktion lässt sich durch Präinkubation der Mitochondrien mit Antikörpern gegen Nkin3 inhibieren (Abb. 32), wohingegen eine Präinkubation der Mitochondrien mit Antikörpern gegen Nkin2 oder Tim54 keinen Einfluss auf die Interaktion hat. Demzufolge wird die Interaktion von Mitochondrien der *Ankin2*-Disruptionsmutante mit Mikrotubuli durch Nkin3 vermittelt.

Ergebnisse

Die in Abb. 32 dargestellte Beobachtung bestätigt die zuvor erhaltenen Ergebnisse, welche eine spezifische Rekrutierung von Nkin3 zu Mitochondrien als Folge der Deletion von *nkin2* vermuten ließen. Nkin3 ist in der Tat in der Lage, bei Abwesenheit von Nkin2 die Interaktion von Mitochondrien und Mikrotubuli zu vermitteln. Abb. 33 zeigt eine Quantifizierung der Inhibierung der Interaktion von Mitochondrien mit Mikrotubuli durch Antikörper gegen Nkin3.

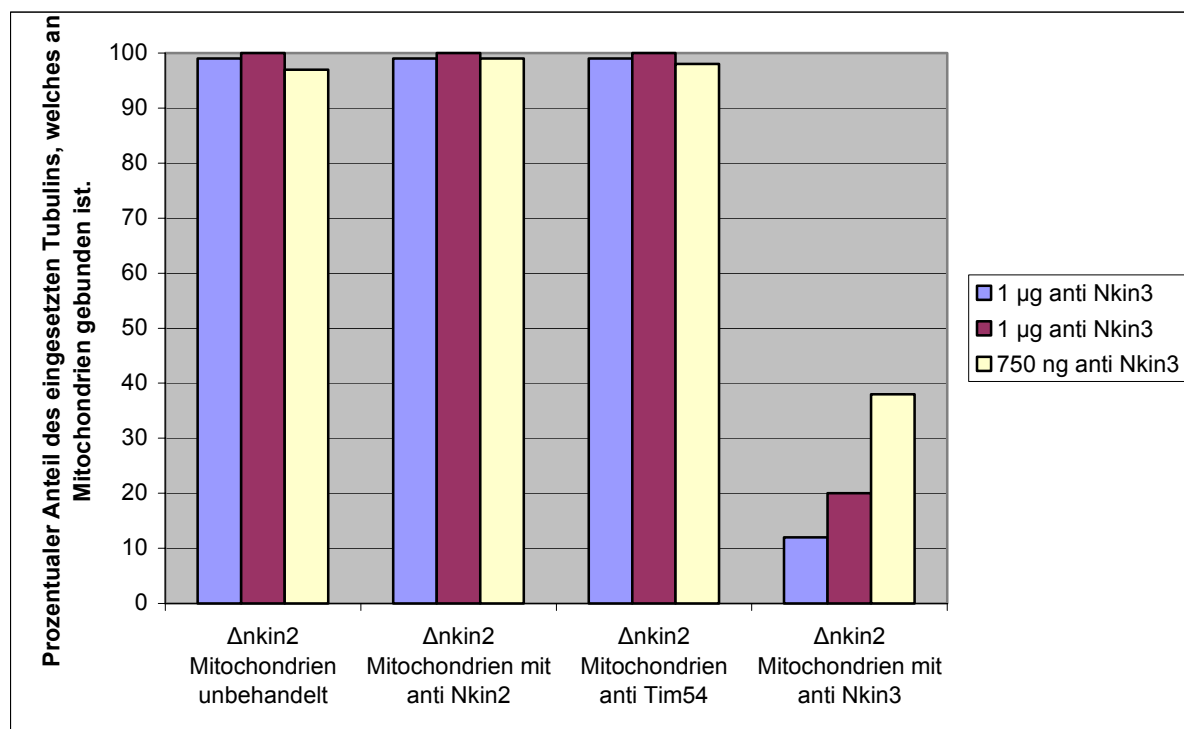


Abb. 33. Quantifizierung der Bindung von Mikrotubuli an $\Delta nkin2$ -Mitochondrien nach Vorbehandlung der Mitochondrien mit Antikörpern gegen Nkin3

Die Durchführung von 3 unabhängigen Experimenten erfolgte wie unter Abb. 32 beschrieben. Die Quantifizierung erfolgte durch Densitometrie (Amersham Image Scanner, Image Master 1D Elite Software, Freiburg).

Eine Vorbehandlung von Mitochondrien der $\Delta nkin2$ -Disruptionsmutante mit Antikörpern gegen Nkin3 hat einen deutlich inhibierenden Einfluss auf die Ausbildung einer Bindung zwischen Mitochondrien und Mikrotubuli. Der Anteil der an die Mitochondrien gebundenen Mikrotubuli ließ sich durch die Antikörpervorbehandlung mit 750 ng anti-Nkin3 Antikörper auf 38 %, durch eine Vorbehandlung mit 1 μ g anti-Nkin3 Antikörper auf 12-20 % der Bindungskapazität der Kontrollen senken (Abb. 33). Eine Vorbehandlung der Mitochondrien mit spezifischen Antikörpern gegen Nkin2 und Tim54 hatte dagegen keinen Einfluss auf die Bindung von Mitochondrien an Mikrotubuli. Vergleichbare Ergebnisse konnten erzielt werden, wenn anstelle der Mitochondrien des homokaryotischen

Disruptionsstammes his-27 Mitochondrien des heterokaryotischen Stammes Dis34 eingesetzt wurden, der zuvor drei Tage unter nichtpermissiven Bedingungen angezogen wurde (nicht gezeigt). Des Weiteren konnten diese Ergebnisse nicht nur unter Verwendung des Antikörpers, welcher gegen den C-Terminus von Nkin3 gerichtet ist, sondern auch durch Verwendung von Antikörpern, welche gegen das Volllängenkinesin Nkin3 gerichtet sind, bestätigt werden.

5.5 Durchmusterung einer Hefedeletionsdatenbank nichtessenzieller Gene nach Mutanten mit veränderter Mitochondrienmorphologie

Zum Zeitpunkt dieser Doktorarbeit waren nur sehr wenige Proteine bekannt, die an der Aufrechterhaltung der normalen Mitochondrienmorphologie in *S. cerevisiae* beteiligt sind. Zu ihnen gehören Dnm1 (Bleazard *et al.*, 1999), Fis1 (Mozdy *et al.*, 2000), Mdv1 (Fekkes *et al.*, 2000; Tieu und Nunnari, 2000; Cervený *et al.*, 2001), Mmm1 (Burgess *et al.*, 1994), Mdm10 (Sogo und Yaffe, 1994), Mdm12 (Berger *et al.*, 1997), Fzo1 (Rapaport *et al.*, 1998; Fritz *et al.*, 2001), Ugo1 (Sesaki und Jensen, 2001) und Mgm1 (Guan *et al.*, 1993; Shepard und Yaffe, 1999; Wong *et al.*, 2000). Das ca. 6300 Gene umfassende Hefegenom enthält eine Vielzahl von Genen unbekannter Funktion. In einer Zusammenarbeit vieler mit Hefe arbeitenden Laboratorien wurde eine Hefestammsammlung hergestellt, welche in Mikrotiterplatten angeordnet Deletionsmutanten verschiedener Gene enthält (Winzeler *et al.*, 1999; Giaever *et al.*, 2002). Diese Stammsammlung umfasst Mutanten von 4794 nichtessenziellen Genen der Bäckerhefe. In einer von der Arbeitsgruppe gemeinsam durchgeführten Durchmusterung dieser Stammsammlung wurde nach neuen Genen gesucht, welche an der Verteilung und Aufrechterhaltung der Mitochondrienmorphologie beteiligt sind (Dimmer *et al.*, 2002). Dafür wurden Hefestämme bis zu Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase auf glukosehaltigem Medium angezogen. Die Analyse der Verteilung von Mitochondrien sowie deren Morphologie erfolgte anschließend durch das Anfärben von Mitochondrien mit dem Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin-B-Hexylester. Dieser Farbstoff wird von Mitochondrien in membranpotentialabhängiger Weise aufgenommen. Deletionsmutanten, welche entweder eine veränderte Mitochondrienmorphologie zeigten oder sich nicht anfärben ließen, wurden in einer weiteren Runde untersucht. In einem abschließenden Screening wurden die Mutanten, welche sich nicht anfärben ließen sowie Mutanten mit reproduzierbarem Morphologiedefekt mit dem Plasmid pVT100U-mtGFP transformiert. Dieses Plasmid ermöglicht die Visualisierung von Mitochondrien durch die Expression eines mitochondrial zielgesteuerten GFP-Proteins (Westermann und Neupert, 2000). Hierdurch konnten ebenfalls

Deletionsmutanten mit niedrigem mitochondrialen Membranpotenzial analysiert werden, die sich mit dem Fluoreszenzfarbstoff nicht anfärben ließen. Alle transformierten Stämme wurden mindestens zweimal untersucht.

Die für die Verteilung von Mitochondrien und deren Morphologie wichtigen Gene, lassen sich in 3 unterschiedliche Klassen zusammenfassen. Gene der Klasse 1 und deren Produkte sind für die Entstehung und Aufrechterhaltung der Mitochondrienmorphologie essenziell. In diesen Deletionsmutanten konnte zu keinem Zeitpunkt eine Wildtyp-ähnliche Mitochondrienmorphologie beobachtet werden. In den Mutanten der Klasse II ist der Phänotyp nur unter bestimmten Bedingungen ausgeprägt, und so lässt sich die netzartige Mitochondrienmorphologie des Wildtypstammes zu einem geringen Anteil nachweisen. Diese Mutanten sind in der Lage, auf nichtfermentierbaren Kohlenstoffquellen zu wachsen und verfügen somit über eine intakte Atmungskette. Mitglieder der Klasse 3 beschreiben Proteine, welche neben der veränderten Mitochondrienmorphologie einen Wachstumsdefekt aufweisen. Zu diesen Proteinen gehören viele Proteine der Atmungskettenkomplexe. Ihre Deletion hat indirekten Einfluss auf die Mitochondrienmorphologie und ist das Resultat einer stark eingeschränkten Organellenfunktionalität.

In dieser Untersuchung konnten alle Proteine gefunden werden, deren Rolle in der Aufrechterhaltung der Mitochondrienmorphologie bereits beschrieben war. Darüber hinaus konnten zehn unbekannte Proteine identifiziert werden, welche an der Morphogenese von Mitochondrien beteiligt sind. Des Weiteren wurden fünf Proteine identifiziert, deren Funktion bereits in anderem Zusammenhang beschrieben worden war, welche jedoch noch nicht mit der Aufrechterhaltung der Mitochondrienmorphologie in Verbindung gebracht wurden. Zusammenfassend sind nach heutigem Kenntnisstand 23 Gene an der Morphogenese von Mitochondrien in der Bäckerhefe beteiligt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden *FIS1*, *MDM34*, *MDM37* und *TOM7* identifiziert. Die veränderte Mitochondrienmorphologie in Deletionsmutanten dieser Gene ist in der folgenden Abb. 34 zu sehen.

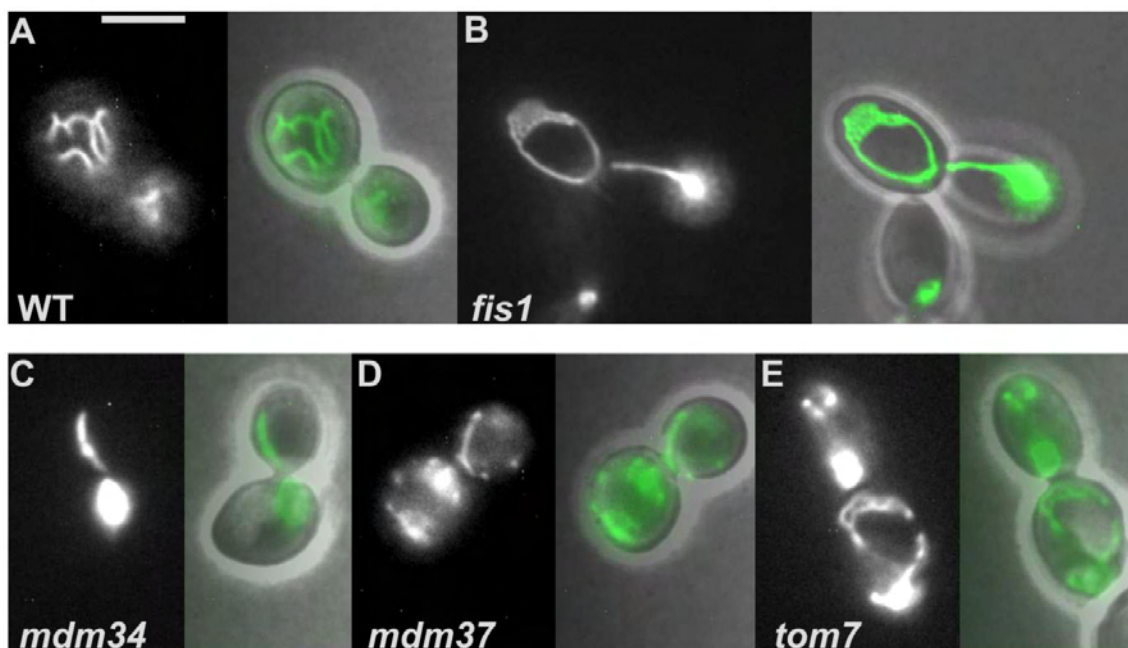


Abb. 34. Die Deletion jedes dieser 4 Gene führt zur Ausbildung unterschiedlicher Phänotypen der Mitochondrienmorphologie

Deletionsstämme der angegebenen Mutanten wurden auf YPD-Medium bei 30°C bis zum Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase angezogen. Die Mitochondrien dieser Stämme wurden durch die Expression eines GFP-Fusionsproteins visualisiert und mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Der Längensstandard entspricht 5 µm.

Die Funktion von *FIS1* in der mitochondrialen Morphogenese ist schon seit langem bekannt. Seine Deletion führt, ähnlich wie die Deletion von *DNM1* oder *MDV1* (Otsuga *et al.*, 1998; Mozdy *et al.*, 2000), zur Ausbildung eines großen ineinander verknüpften mitochondrialen Netzwerks (Abb. 34 B). Es wurde vorgeschlagen, dass dieses Netzwerk aus einem kontinuierlich fortschreitenden Fusionsprozess bei gleichzeitig eingeschränktem Teilungsprozess der Mitochondrien resultiert (Yaffe, 1999; Jensen *et al.*, 2000; Shaw und Nunnari, 2002). Die Deletion von *MDM34* hat hingegen die Ausbildung eines großen kugelförmigen Mitochondriums zur Folge (Abb. 34 C). Der aus der Deletion von *MDM34* resultierende Phänotyp einer veränderten Mitochondrienmorphologie gleicht somit der veränderten Mitochondrienmorphologie, welche aus der Deletion von *MMM1*, *MDM10* oder *MDM12* resultiert. *Mmm2* könnte somit an dem gleichen oder einem ähnlichen Prozeß wie *Mmm1* beteiligt sein.

Hefezellen der *MDM37*-Deletionsmutante weisen hauptsächlich fragmentierte Mitochondrien auf. Darüber hinaus sind teilweise ebenfalls sehr kurze schlauchförmige Mitochondrien zu detektieren (Abb. 34 D). Dieser Phänotyp wurde bereits bei Deletionsmutanten von Komponenten beschrieben, welche an der Fusion von Mitochondrien

Ergebnisse

beteiligt sind (Hermann und Shaw, 1998; Rapaport *et al.*, 1998; Shepard und Yaffe, 1999; Fritz *et al.*, 2001; Sesaki und Jensen, 2001). Der Verlust von *TOM7* führt zu einem Phänotyp, welcher durch eine ungleichmäßige Verteilung von aggregierten Mitochondrien gekennzeichnet ist (Abb. 34 E). Eine Funktion dieser Komponente an der mitochondrialen Formgebung war bisher noch nicht beschrieben worden und es ist zu vermuten, dass *TOM7* einen eher indirekten Einfluss auf die mitochondriale Morphogenese besitzt.

Systematische Bezeichnung des Gens	Gängige Bezeichnung des Gens	Funktion des Proteins
YGL210c	<i>MDM34 (MMM2)</i>	Mitochondriale Morphologie und Vererbung der mtDNS
YGR101w	<i>MDM37 (PCP1, RBD1)</i>	Prozessierung von Ccp1 und Mgm1
YNL070w	<i>TOM7</i>	Komponente der Außenmembran-translokase TOM
YIL065c	<i>FIS1</i>	Teilungsprozess von Mitochondrien

Tab. 6. Für die mitochondriale Morphologie und Vererbung wichtige Gene, die bei der Durchmusterung der Hefemutantenbibliothek im Rahmen dieser Arbeit gefunden wurden.

Eine vollständige Liste aller Mutanten findet sich in Dimmer *et al.*, 2002.

6 Diskussion

6.1 Die molekulare Maschinerie des Mikrotubuli-abhängigen Mitochondrientransports in *Neurospora*

Für die Positionierung der Mitochondrien innerhalb der Zelle werden verschiedene Komponenten benötigt. Sofern der Transport von Mitochondrien aktiv erfolgt, ist zumindest ein Motorprotein beteiligt. Dieses kann die Interaktion mit dem Organell entweder direkt, oder über verknüpfende Proteine vermitteln. Diese Verknüpfungsproteine würden dann als Rezeptoren dienen, die auf der Außenmembran des Organells lokalisiert sind.

6.1.1 Die Beteiligung eines Kif1ba-homologen Motorproteins an der Interaktion von Mitochondrien mit Mikrotubuli in *Neurospora*

In dieser Arbeit wurden verschiedene Testsysteme entwickelt, mit denen die Interaktion von Mitochondrien mit Mikrotubuli beobachtet werden kann. Hierdurch wurde die nukleotidabhängige Bindung von Mitochondrien an Mikrotubuli durch peripher mit der Außenmembran von Mitochondrien assoziierten Proteinen nachgewiesen (Fuchs *et al.*, 2002). Mitochondrien interagieren demzufolge mit Mikrotubuli *in vitro* nur in Abwesenheit bzw. nach Depletion von ATP. Die Beteiligung von Kinesin-ähnlichen Motorproteinen in höheren Organismen (Nangaku *et al.*, 1994; Pereira *et al.*, 1997; Tanaka *et al.*, 1998) sowie die Charakteristika der Interaktion waren Hinweise auf eine Beteiligung eines Kinesin-verwandten Proteins bei der Assoziation von Mitochondrien mit Mikrotubuli in *N. crassa*. Proteine der Kinesinfamilie weisen eine hochkonservierte Motordomäne auf. Durch Sequenzvergleich mit der Kinesinmotordomäne des bereits bekannten konventionellen Kinesins Nkin konnten im Laufe der Arbeit 10 Kinesin-verwandte Proteine im Genom von *Neurospora* identifiziert werden. Eines dieser Kinesin-ähnlichen Proteine (Nkin2) wies besonders hohe Homologie zu Kif1ba auf, welches am Transport von Mitochondrien in Mauszellen beteiligt ist (Nangaku *et al.*, 1994).

Die folgenden Befunde sprechen dafür, dass Nkin2 die Bindung von Mitochondrien an Mikrotubuli vermittelt. Erstens wurde Nkin2 auf der mitochondrialen Außenmembran lokalisiert und ist durch Waschen der Mitochondrien mit einem konzentrierten Salzpuffer von der Außenmembran von Mitochondrien extrahierbar. Zweitens inhibiert dementsprechend eine Vorbehandlung von Mitochondrien mit einer 1 M KCl Salzlösung die Bindung von Mikrotubuli. Drittens wird die Bindung von Mitochondrien an Mikrotubuli durch eine Vorbehandlung der Mitochondrien mit Antikörpern gegen Nkin2 inhibiert, wohingegen

Antikörper gegen andere Kinesin-ähnliche Proteine keinen Einfluss haben. Viertens führt die Deletion von *nkin2* zu einem Defekt des Mitochondrientransportes, der erst durch Überexpression von Nkin3 sublimentiert wird. Aufgrund dieser Beobachtungen wird vorgeschlagen, dass Nkin2, zumindest in Wildtyp-Zellen, die Interaktion von Mitochondrien mit Mikrotubuli vermittelt.

6.1.2 Nkin3 vermittelt die Positionierung von Mitochondrien entlang von Mikrotubuli nach Depletion von Nkin2

Die *Ankin2*-Disruptionsmutante besitzt einen Defekt im Mitochondrientransport, der allerdings nur kurzzeitig detektierbar ist. In einem eng begrenzten Zeitrahmen des Hyphenwachstums weisen die Mitochondrien in der *Ankin2*-Disruptionsmutante eine eingeschränkte Motilität auf. Das Bewegungsmuster der Mitochondrien ähnelt eher einem passiven Transport, da ihre Transportgeschwindigkeit der Wachstumsgeschwindigkeit der Hyphenspitze gleicht. Zu diesem Zeitpunkt könnte der Mitochondrientransport deshalb auf einen Mechanismus zurückgreifen, welcher von Motorproteinen unabhängig ist. Wie in der Spalthefe gezeigt, könnte ein Transport von Mitochondrien durch Assoziation mit Mikrotubuli und deren dynamische Polymerisation erfolgen (Yaffe *et al.*, 2003). Alternativ könnte auch ein Transport von Mitochondrien in Abhängigkeit eines Stroms von Zytoplasma erfolgen (Wanka und Van Zoelen, 2003).

Dieser Phänotyp eines veränderten mitochondrialen Transportes ist über eine Zeitspanne von bis zu 5 Stunden nach Keimen der Konidien zu beobachten. Danach werden die Mitochondrien offenbar aktiv bewegt, da ihre Transportgeschwindigkeit größer als die Geschwindigkeit des Hyphenwachstums ist. Der Verlust von Nkin2 wird in den untersuchten Mutanten mit fortschreitendem Hyphenwachstum innerhalb von 3 h kompensiert. Diese Kompensation geht einher mit Überexpression von Nkin3, einem weiteren Mitglied der am Vesikel- und Organellentransport beteiligten Unc104-Kinesinfamilie. Nkin3 kolokalisiert im Wildtypstamm jedoch nicht mit Mitochondrien, und Antikörperinhibierungsstudien lassen darauf schließen, dass Nkin3 an der Interaktion von Wildtypmitochondrien mit Mikrotubuli nicht beteiligt ist. Im Gegensatz dazu wurde in der *Ankin2*-Disruptionsmutante ein anderes Verhalten von Nkin3 beobachtet. Die Expression von Nkin3 wird als Antwort auf den vollständigen Verlust von Nkin2 in den Zellen deutlich hochreguliert. In Abwesenheit von Nkin2 kolokalisiert Nkin3 mit Mitochondrien. Des Weiteren ist in der *Ankin2*-Disruptionsmutante die Interaktion zwischen Mitochondrien und Mikrotubuli durch den Nkin3-Antikörper inhibierbar. Diese Beobachtungen sprechen dafür, dass Nkin3 den Verlust von Nkin2 kompensiert.

Eine weitere wichtige Beobachtung ist, dass die Expression von Nkin3 in Konidien der *Ankin2*-Disruptionsmutante nicht hochreguliert ist, weshalb Nkin3 erst im Stadium des filamentösen Wachstums in der Lage ist, die Funktion von Nkin2 zu übernehmen. Die Erklärung für diese Beobachtung ist möglicherweise in unterschiedlichen Energiebedürfnissen der Zelle zu suchen. Es ist anzunehmen, dass ähnlich wie in auswachsenden Axonen (Hollenbeck *et al.*, 1985; Martenson *et al.*, 1995; Miller und Sheetz, 2004) die Energiebedürfnisse in der Hyphenspitze durch aktiven Transport von Mitochondrien gedeckt werden müssen. Im Konidienstadium ist der Pilz dagegen nicht auf einen gerichteten Langstreckentransport von Mitochondrien angewiesen. Mit dem Auskeimen der Konidie und fortschreitendem Hyphenwachstum ist er jedoch immer stärker von dem aktiven Langstreckentransport von Mitochondrien zur Deckung seiner Energiebedürfnisse in der Hyphenspitze abhängig. Da Nkin2 diese Funktion nicht mehr übernehmen kann, muss nun die Expression von Nkin3 hochreguliert werden, um die Funktion als Motorprotein im Transport von Mitochondrien zu übernehmen. Über die normale Funktion von Nkin3 in Wildtypzellen kann bisher allerdings nur spekuliert werden.

6.1.3 Weshalb besitzt *Neurospora* zwei Motorproteine, die eine Interaktion von Mitochondrien mit dem Zytoskelett vermitteln können?

In dieser Arbeit wurde eine außerordentlich schnelle Anpassung der Zellen an den Verlust von Nkin2 durch Überexpression von Nkin3 festgestellt. Aus diesem Grunde muss angenommen werden, dass nur geringe zelluläre Änderungen nötig sind, um den Einsatz des einen oder des anderen redundanten Motorproteins zu favorisieren. Diese Redundanz könnte evolutionären Ursprungs sein. Ein schnell zu regulierendes System, welches aus zwei unterschiedlichen Mitgliedern der Unc104-Familie mit redundanter Funktion besteht, könnte sich entwickelt haben, um auf minimale Veränderungen in essenziellen Zellvorgängen reagieren zu können. Die filamentösen Pilze sind aufgrund ihres polarisierten Wachstums auf optimale Funktion im Langstreckentransport von Organellen und Vesikeln angewiesen. Das Vorkommen von Vertretern der Nkin3-Familie ausschließlich in Pilzen könnte eine Folge dieses Bedürfnisses sein. Hierfür spricht, dass nur mit wenigen Ausnahmen alle filamentösen Pilze beide Vertreter der Unc104-Familie und einen konstanten Satz von 10 Kinesin-verwandten Proteinen besitzen (Schoch *et al.*, 2003). In höheren Organismen wie Maus und Ratte ist eine ausgeprägte Spezialisierung zwischen Motorprotein und Transportaufgabe zu verzeichnen. Man nimmt an, dass die Aufspaltung der Kinesine in die einzelnen Kinesin-Familien schon vor der Aufspaltung eukaryotischer Zellen in Pflanzen, Pilze und Metazoen stattgefunden hat (Moore und Endow, 1996). Diese Annahme konnte anhand von

phylogenetischen Untersuchungen unter Verwendung von Kinesinsequenzen aus *Giardia lamblia* und deren Vergleich mit Kinesinsequenzen anderer Eukaryoten bestätigt werden (Iwabe und Miyata, 2002). Ihren Untersuchungen zufolge bildete sich die Spezialisierung von tierischen Motorproteinen der Unc104-Familie und deren Transportaufgaben durch zwei Phasen aktiver Genduplikation aus, welche durch eine relativ lange Ruhephase unterbrochen war (Iwabe und Miyata, 2002; Schoch *et al.*, 2003). Diese Spezialisierung könnte dann wiederum erklären, weshalb Vertreter der verkürzten Unc104- (Nkin3) Familie und ihre redundanten Funktionen in höheren Eukaryoten nicht mehr benötigt werden.

Als Beispiel für die Synthese spezialisierter Motorproteine in Säugerzellen können die zwei verschiedenen *KIF1B*-Gene der Maus angeführt werden, *KIF1B α* und *KIF1B β* (Yang *et al.*, 2001), deren Primärtranskripte in vier unterschiedliche mRNAs gespleißt werden, und die Expression der kodierten Proteine gewebetypabhängig reguliert ist (Nangaku *et al.*, 1994) (Zhao *et al.*, 2001; Mok *et al.*, 2002; Nakamura *et al.*, 2002; Conforti *et al.*, 2003; Matsushita *et al.*, 2004). Kif1b α ist ein Protein von 1150 Aminosäuren, welches an dem gerichteten Transport von Mitochondrien beteiligt ist (Nangaku *et al.*, 1994). Aus dem Primärtranskript von *KIF1B β* werden durch alternatives Spleissen 3 unterschiedliche mRNAs angefertigt. Kif1b β ist ein Protein von 1770 Aminosäuren (Conforti *et al.*, 1999; Gong *et al.*, 1999; Zhao *et al.*, 2001). Die N-terminale Region von Kif1b α und Kif1b β ist konserviert, jedoch ist ihr carboxyterminales Ende komplett unterschiedlich. Im Gegensatz zu Kif1b α ist eine Assoziation von Kif1b β (Conforti *et al.*, 2003) mit synaptischen Vesikeln neuronaler Zellen beschrieben (Zhao *et al.*, 2001; Nakamura *et al.*, 2002). Des Weiteren wird eine mRNA von *KIF1B β* angefertigt, in welcher kurze Aminosäuresequenzen in die konservierte N-terminale Region eingefügt sind und in einer 1816 Aminosäurereste langen Proteinsequenz (Kif1b β 2) resultieren (Gong *et al.*, 1999; Nakamura *et al.*, 2002). Die dritte mRNA von *KIF1B β* , kodiert für ein 1687 aa langes Protein Kif1b β 3, welches am Transport von Lysosomen in nicht-neuronalen Zellen beteiligt ist (Matsushita *et al.*, 2004).

6.1.4 Wodurch wird die Wahl des für die Positionierung von Mitochondrien eingesetzten Motorproteins bestimmt?

Vererbung und Positionierung von Mitochondrien in Säugerzellen aber auch in bestimmten Pilzen, wird von konventionellen Kinesinen vermittelt. Beispielsweise vermittelt Kif5b den Transport von Mitochondrien in *M. musculus* (Tanaka *et al.*, 1998) und Nhkin diesen in *N. haemmatococca* (Wu *et al.*, 1998). Das konventionelle Kinesin in *N. crassa* besitzt eine sehr hohe Identität verglichen mit NhKin. Trotz dieser hohen Konservierung, besitzen beide Kinesine distinkte Transportaufgaben und Nkin ist nicht am Transport von

Mitochondrien entlang von Mikrotubuli beteiligt (Seiler *et al.*, 1997). Neben konventionellen Kinesinen sind auch andere Kinesin-Familien beschrieben, welche die Positionierung von Mitochondrien vermitteln können. In *Mus musculus* konnte die Beteiligung eines Proteins der Unc104-Familie (Kif1b α) am Transport von Mitochondrien biochemisch und mikroskopisch beschrieben werden (Nangaku *et al.*, 1994).

Die in dieser Arbeit gefundenen Daten belegen diese Beteiligung von Unc104-Kinesinen an der Positionierung von Mitochondrien entlang von Mikrotubuli. Insbesondere das am Transport von Wildtypmitochondrien beteiligte Nkin2 besitzt eine hochkonservierte Motordomäne verglichen mit Kif1b α . Demzufolge sind die am Transport von Mitochondrien entlang von Mikrotubuli beteiligten Kinesine auch in phylogenetisch relativ weit voneinander entfernten Organismen hochkonserviert. Zumindest in höheren Eukaryoten könnte eine gewebespezifische Expression der einzelnen Motorproteine festlegen, welches Motorprotein für die Positionierung von Mitochondrien genutzt wird. Alternativ könnte diese Wahl auch durch die jeweilig aktivierten Signalwege, welche in dem Transport von Mitochondrien involviert sind, geregelt werden (Okada *et al.*, 1995; De Vos *et al.*, 1998; Luo *et al.*, 1998).

6.1.5 Werden physiologisch wichtige Transportprozesse durch redundante Motorproteine vermittelt?

In dieser Arbeit wurde erstmalig eine Beteiligung zweier unterschiedlicher Kinesine an dem gerichteten Transport von Mitochondrien belegt. Eine funktionelle Redundanz von Kinesinen unterschiedlicher Kinesinfamilien wurde für andere Systeme schon früher beschrieben. Zum Beispiel wird der NMDA-Rezeptor innerhalb von Neuronen in dynamischer und präziser Weise zu den Dendriten transportiert. Dieser physiologisch sehr wichtige Prozess kann sowohl durch Kif17 (Setou *et al.*, 2000) als auch durch Kif1b α (Mok *et al.*, 2002) vermittelt werden. Die Interaktion der beiden unterschiedlichen Motoren mit dem Rezeptor erfolgt über so genannte PDZ-Interaktionsdomänen (Mok *et al.*, 2002). Diese PDZ-Domänen vermitteln eine Protein-Protein-Wechselwirkung und kommen in vielen Membran-assoziierten Proteinen vor, welche an Signalprozessen beteiligt sind (Ponting *et al.*, 1997). Daneben besitzen viele Kinesine diese Interaktionsdomänen, welche es ihnen ermöglicht mit einer Vielzahl von Proteinen zu interagieren (Mok *et al.*, 2002). Das Auftreten funktioneller Redundanz wird auch innerhalb ein und derselben Kinesinfamilie diskutiert. Beispielsweise wird der Transport synaptischer Vesikel in Neuronen sowohl von Kif1a als auch von Kif1b β vermittelt. Der Mechanismus der spezifischen Rekrutierung des einen oder des anderen Motors ist jedoch noch nicht im Detail bekannt (Nakamura *et al.*, 2002).

Ein weiteres Beispiel funktioneller Redundanz zwischen Motorproteinen ist im Fall von *CIN8* and *KIP1* in *S. cerevisiae* beschrieben. Die von den beiden Genen kodierten Proteine binden an dieselbe Fracht und vermitteln Funktionen in der Mitose (Stearns, 1997). Funktionelle Redundanz von Motorproteinen ist somit ein wichtiges Mittel, um zellulären Veränderungen zu begegnen und die Funktion physiologisch wichtiger Prozesse zu gewährleisten. Die in dieser Arbeit vorgelegten Ergebnisse belegen, dass dem auch Mitochondrien unterworfen sein können.

6.1.6 Mögliche Interaktionsmodelle des Kinesin-vermittelten Transportes von Mitochondrien in *Neurospora*

Nkin2 und Nkin3 besitzen eine redundante Funktion im gerichteten Transport von Mitochondrien, da Nkin2 die Verteilung von Mitochondrien unter Wildtypbedingungen vermittelt, wohingegen Nkin3 diese Aufgabe in Abwesenheit von Nkin2 übernimmt. Betrachtet man den Proteingehalt von Nkin3 in subzellulären Fraktionen der *nkin2*-Mutanten, so ist der Proteingehalt von Nkin3 sowohl in der Mitochondrienfraktion als auch in der Fraktion des postmitochondrialen Überstands stark erhöht. Da Nkin2 ebenfalls zu einem geringen Teil in einer Fraktion des postmitochondrialen Überstands von Wildtypzellen nachgewiesen werden kann, besitzt Nkin2 vermutlich mehrere Aufgaben im Organell- und Vesikeltransport, welche durch Nkin3 übernommen werden können. Alternativ könnte der erhöhte Proteingehalt von Nkin3 in der Fraktion des postmitochondrialen Überstandes auch freies Protein sein, welches während der Organellpräparation von dem Organell gelöst war.

Hinsichtlich des Transportes von Mitochondrien stellt sich die Frage, auf welche Weise die Interaktion der beiden Kinesin-verwandten Motorproteine mit Mitochondrien oder anderen Organellen vermittelt wird. Beide Proteine besitzen, mit Ausnahme der Kinesinmotordomäne, keine gemeinsamen bekannten Proteininteraktionsdomänen. Die Beobachtung einer direkten Beteiligung der PH-Domäne des DdUnc104 am Vesikeltransport *in vitro* (Klopfenstein *et al.*, 2002) und in *in vivo* (Klopfenstein und Vale, 2004) legt nahe, dass auch im Falle von Nkin2 die Interaktion des Proteins mit Mitochondrien über die PH-Domäne vermittelt wird (Abb. 35). Unstrittig ist, dass der PH-Domäne in Vertretern der Unc104-Kinesinfamilie eine wichtige Rolle im Vesikeltransport zukommt, da eine Substitution der PH-Domäne des Unc104-Proteins in *C. elegans* durch andere Lipidbindungsmotive *in vivo* nicht möglich ist (Klopfenstein und Vale, 2004). Das Einführen von Mutationen in die PH-Domäne, welche die Bindungsaffinität zu Phosphatidylinositol(4,5)bisphosphat erniedrigen, führt zudem zu einer eingeschränkten Funktionalität des Kinesins *in vivo* (Klopfenstein und Vale, 2004).

Innerhalb der Unc104-Familie ist die PH-Domäne konserviert. Eine Substitution der PH-Domäne des Unc104-Kinesins aus *C. elegans* durch die des homologen Proteins aus *D. discoideum* ist ohne Funktionalitätsverlust *in vitro* möglich, aber nicht *in vivo* (Klopfenstein *et al.*, 2002; Klopfenstein und Vale, 2004). Neben der Vermittlung der Protein-Lipid-Wechselwirkung könnte die PH-Domäne somit *in vivo* durch Protein-Protein-Wechselwirkung ebenfalls regulatorische Eigenschaften besitzen (Klopfenstein und Vale, 2004). In diesem Zusammenhang steht die Beobachtung, dass die Expression der rekombinant hergestellten PH-Domäne in Neuronen Einfluss auf die Transportrichtung von Mitochondrien besitzt (De Vos *et al.*, 2003). In zukünftigen Experimenten könnte ein Inhibitionsversuch mit einer rekombinant exprimierten PH-Domäne von Nkin2 im biochemischen Interaktionsassay durchgeführt werden, um so die Beteiligung dieser Domäne an der Interaktion des Motorproteins mit Mitochondrien zu verifizieren. Diese Versuche waren im Rahmen der hier vorgelegten Arbeit jedoch nicht mehr möglich.

Für Nkin3 lässt sich der Mechanismus der Interaktion mit Mitochondrien nicht von bekannten Motor/Organell-Interaktionen ableiten, da der C-Terminus von Nkin3 kein bekanntes Proteininteraktionsmotiv besitzt. Die Motordomäne von Nkin3 besitzt große Homologie zu Kif1c in *H. sapiens* (Dörner *et al.*, 1998), Nkin3 hat jedoch einen außergewöhnlichen kurzen C-Terminus. Kif1c bildet ein Dimer und ist am Vesikeltransport vom ER zum Golgi beteiligt. Im Gegensatz dazu bildet Nkin3 keine Oligomere, sondern liegt vermutlich als Monomer vor (persönliche Mitteilung Dr. Günther Wolke). Nkin2 besitzt einen ausgeprägten Coiled-coil-Bereich, dessen Dimerisation die Bildung eines prozessiv arbeitenden Motorproteins ermöglichen würde (Tomishige *et al.*, 2002). Im Gegensatz dazu besitzt Nkin3 keinen ausgeprägten Coiled-coil-Bereich. Demzufolge ist eine kooperative Beteiligung mehrerer Proteine im Transport von Mitochondrien zu vermuten.

Das Binden von Nkin2 und Nkin3 an den gleichen mitochondrialen Rezeptor könnte erklären, weshalb Nkin3 in der konditionalen Mutante derart spezifisch und erst nach vollständigem Verlust von Nkin2 zu Mitochondrien dirigiert wird. Nkin2 würde in diesem Falle eine höhere Bindungsaffinität zu dem Rezeptor der mitochondrialen Außenmembran besitzen als Nkin3. Alternativ könnte für die Interaktion von Nkin3 mit Mitochondrien ein weiterer Faktor benötigt werden, welcher in Abhängigkeit des Verlustes von Nkin2 zu Mitochondrien rekrutiert wird (Abb. 35).

Eine Aufklärung der Frage, auf welche Weise diese Motorproteine mit der mitochondrialen Außenmembran interagieren, war im Rahmen der vorgelegten Arbeit nicht mehr möglich. Ein Erfolg versprechender Ansatz könnte sein, den C-Terminus von Nkin2 und

Nkin3 mit einem Oligopeptid- oder Proteinanhang zu versehen und nachfolgend die Proteine an eine Matrix zu immobilisieren. Mitochondriale Proteine, welche mit dem C-Terminus von Nkin2 oder Nkin3 interagieren, können auf diese Weise durch Affinitätschromatographie isoliert und anschließend identifiziert werden. Es wird in der Zukunft interessant sein, herauszufinden, ob in dem carboxyterminalen Bereich von Nkin3 ein unbekanntes oder aufgrund schwach ausgeprägter Homologie „maskiertes“ Proteininteraktionsmotiv zu finden ist.

Einen weiteren Beitrag zur Aufklärung der funktionellen Redundanz von Nkin2 und Nkin3 könnte die Analyse einer Nkin3-Deletionsmutante sowie die Herstellung einer Doppeldeletionsmutante von Nkin2 und Nkin3 liefern. Diesbezüglich wurde in einer Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Schliwa mit der Disruption von *nkin3* begonnen. Erste Ergebnisse weisen daraufhin, dass der Verlust von Nkin3 ebenfalls zu keinem auffälligen Wachstumsphänotyp führt. Es wird zu klären sein, welche Konsequenzen der Verlust von Nkin3 für die Expression und intrazelluläre Lokalisation von Nkin2 hat.

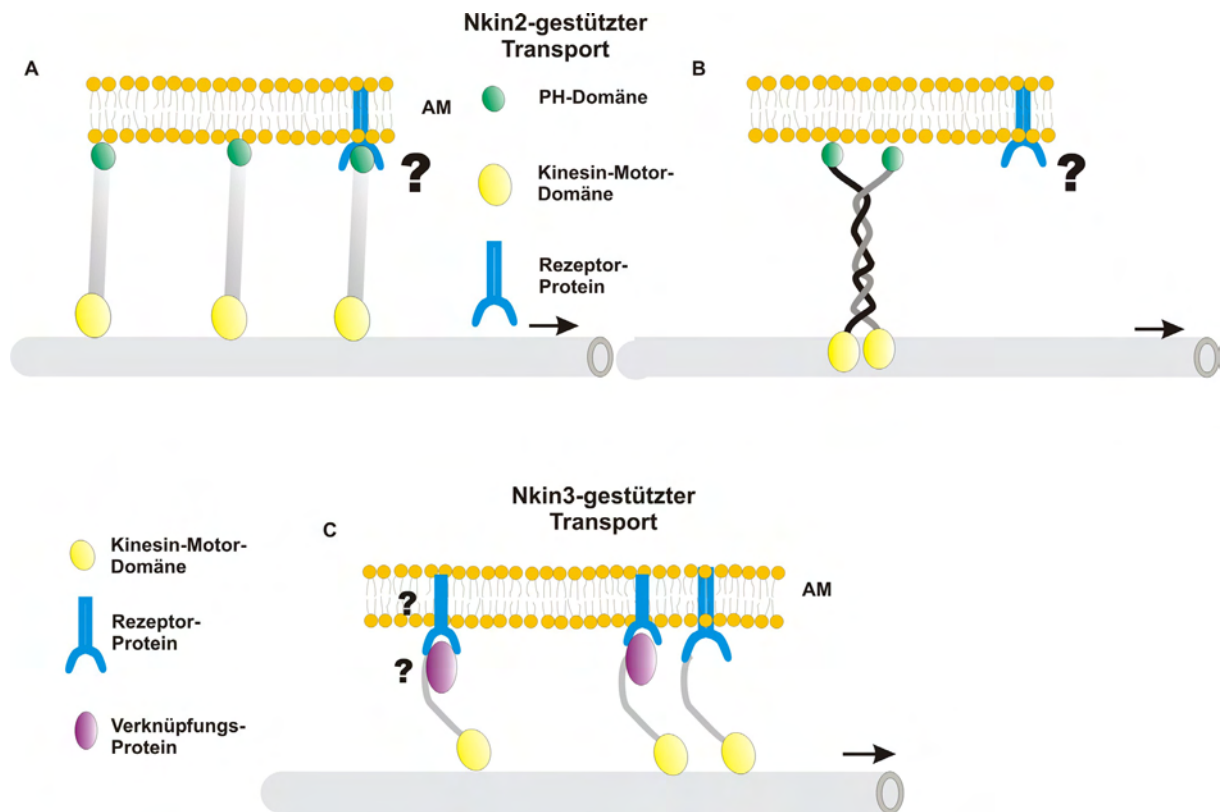


Abb. 35. Modelle zum Mitochondrientransport in *N. crassa*

In Wildtypzellen erfolgt der gerichtete Transport von Mitochondrien entlang des Mikrotubulsystems durch Nkin2. Die Interaktion des Motors mit Mitochondrien wird durch Wechselwirkung der PH-Domäne des Motorproteins mit PtdIns(4,5)P₂-Molekülen der mitochondrialen Außenmembran vermittelt. Der durch diesen Motor vermittelte Transport könnte gemäß (Klopfenstein *et al.*, 2002) zwei unterschiedlichen Mechanismen folgen. Modell (A) beschreibt einen Mechanismus, in dem normalerweise einzeln vorliegende Motoren in Abhängigkeit einer hohen Dichte von PtdIns(4,5)P₂-Molekülen zusammengeführt werden und durch gemeinsame Bewegung die Fracht transportieren. Modell (B) geht von der Annahme aus, dass die Anhäufung monomerer Motoren zu einer Dimerisation einzelner Monomere führt, die durch die Coiled-coil-Region des Motors vermittelt wird. Ein einzelner dimerisierter Motor könnte dann die Fracht in prozessiver Weise transportieren. Diese Prozessivität eines Unc104-Dimers wurde bereits beschrieben (Tomishige *et al.*, 2002). Modell (C) beschreibt einen möglichen durch Nkin3-vermittelten Transport von Mitochondrien. In der Abwesenheit von Nkin2 kann Nkin3 die Interaktion von Mitochondrien mit Mikrotubuli vermitteln. Die Interaktion mit dem mitochondrialen Rezeptor (blaue Gabel) erfolgt entweder direkt oder wird über ein Linkerprotein (violett) vermittelt. Dieses könnte ebenfalls in Abhängigkeit der Deletion von *nkin2* zu Mitochondrien dirigiert werden.

6.1.7 Die Rolle von Mmm1 in der Aufrechterhaltung der mitochondrialen Morphologie in *Neurospora*

Mmm1 war das erste identifizierte Protein, welches an der mitochondrialen Morphogenese in *N. crassa* beteiligt ist (Prokisch *et al.*, 2000). Die Funktion dieses integralen Außenmembranproteins in der mitochondrialen Morphogenese ist konserviert, und die Deletion des Gens wurde bereits in *Neurospora* und Hefe beschrieben. In der Hefe *S.*

cerevisiae führt die Deletion des Gens zur Ausbildung von Riesenmitochondrien (Boldogh *et al.*, 1998). Diese sind nahezu unbeweglich und können *in vitro* nicht mehr an Aktinfilamente binden (Boldogh *et al.*, 1998). Für Mmm1, und seine Interaktionspartner Mdm10 und Mdm12 wurde deshalb eine Rolle in der Rekrutierung von Proteinen postuliert, welche für die Vermittlung der Interaktion zwischen dem Zytoskelett und dem Organell benötigt werden (Boldogh *et al.*, 1998). Interessanterweise weist die Deletion des *mmm1*-Gens in *N. crassa* den gleichen Phänotyp auf, obwohl die Positionierung von Mitochondrien in *S. cerevisiae* entlang von Aktinfilamenten und nicht wie in *N. crassa* entlang von Mikrotubuli erfolgt (Prokisch *et al.*, 2000). Der in *Neurospora* beobachtbare Phänotyp ist nicht auf den Verlust der Interaktion von Mitochondrien mit dem Zytoskelett zurückzuführen, da Mitochondrien der *mmm1*-RIP-Mutante wie Wildtypmitochondrien ATP-abhängig an Mikrotubuli binden (Fuchs *et al.*, 2002; diese Arbeit). Der mitochondriale Phänotyp kann nicht durch die Depolymerisierung von Aktinfilamenten erzeugt werden, was eine weitere entscheidende Beobachtung ist (Prokisch *et al.*, 2000).

Das Binden von Mitochondrien der *mmm1*-RIP-Mutante belegt eindeutig, dass Mmm1 für die Vermittlung der Interaktion zwischen Organell und Zytoskelett in *Neurospora* nicht benötigt wird. Da sich die aus der Deletion des *MMM1*-Gens in Hefe und *Neurospora* resultierenden Phänotypen derart stark ähneln, muss angenommen werden, dass Mmm1 in Hefe ebenfalls keine Rolle in der Vermittlung der Interaktion von Mitochondrien mit dem Zytoskelett spielt. Vielmehr ist auf eine eher allgemeine Rolle von Mmm1 in der Kontrolle der Morphogenese von Mitochondrien zu schliessen. Eine mögliche Rolle von Mmm1 könnte eine Beteiligung an einem Komplex sein, welcher an den Import bestimmter Proteine in Mitochondrien beteiligt ist. Werden diese Proteine aufgrund der Deletion von *MMM1* nicht importiert, könnte ihr Fehlen dann einen Einfluss auf die Morphogenese der Mitochondrien besitzen.

6.2 Einsatz von GFP-Fusionsproteinen zur spezifischen Visualisierung von subzellulären Strukturen in *Neurospora*

Die Markierung von intrazellulären Strukturen mit GFP-Fusionsproteinen war in *Neurospora* lange Zeit nicht möglich. Als Grund führte man eine nicht ausreichend starke Expression der GFP-Fusionsproteine durch Verwendung endogener *Neurospora*-Promotoren an (Freitag *et al.*, 2001). Eine zytosolische Expression von GFP-Fusionsproteinen konnte ebenfalls nur unter Verwendung eines chemisch induzierbaren exogenen Promotors erzielt werden (Freitag *et al.*, 2001).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte die Expression eines zielgesteuerten GFP-Fusionsproteins etabliert und die Annahme einer unzureichenden GFP-Expression unter Verwendung endogener Promotoren widerlegt werden (Fuchs *et al.*, 2002). Es konnte ein Stamm hergestellt werden, mit dessen Hilfe eine Beobachtung des Verhaltens und der Morphologie von Mitochondrien in verschiedenen Stadien des Lebenszykluses des Pilzes *in vivo* beobachtet werden kann. Daneben wurde die mikroskopische Analyse der Interaktion von Mitochondrien mit Mikrotubuli unter Verwendung isolierter Mitochondrien dieses Stammes und des entwickelten mikroskopischen Testsystems möglich.

Diese erfolgreiche Expression eines zielgerichteten GFP-Fusionsproteins war für den weiteren Einsatz zielgerichteter GFP-Fusionsproteine in *Neurospora*, ein wichtiges Ergebnis (persönliche Mitteilung Dr. Michael Freitag). Durch die Anwendung spezieller Plasmide zum gerichteten Austausch von Proteinen durch GFP-Fusionsproteine ist der Einsatz von GFP-Fusionsproteinen in *Neurospora* mittlerweile etabliert (Kapoor *et al.*, 2002; Folco *et al.*, 2003). Aus diesem Grunde sollte es in Zukunft auch in *Neurospora* möglich sein, die intrazelluläre Lokalisation von Proteinen, durch Expression eines GFP-Fusionsproteins zu bestimmen. Diesbezüglich könnte die spezifische Lokalisation von Nkin3 und Nkin2 durch Expression von GFP-Fusionsproteinen überprüft werden. Die Expression von GFP-Fusionsproteinen zur spezifischen Visualisierung intrazellulärer Strukturen könnte in dann in *Neurospora* von ähnlich großem Nutzen wie in *S. cerevisiae* sein (Westermann und Neupert, 2000).

6.3 Funktion der im Rahmen dieser Arbeit identifizierten Mutanten an der mitochondrialen Morphogenese in *S. cerevisiae*

6.3.1 Die Funktion von *MDM34/MMM2* in der mitochondrialen Morphogenese

Die Deletion von *MDM34* führt zur Ausbildung einer kugelförmigen Mitochondrienmorphologie (Dimmer *et al.*, 2002). Diese ähnelt somit der veränderten Mitochondrienmorphologie, welche aus der Deletion von *MMM1*, *MDM10* oder *MDM12* resultiert (Boldogh *et al.*, 1998). Im Rahmen dieser Arbeit konnten keine weiteren Studien durchgeführt werden, um die funktionelle Rolle von *MDM34* in der Morphogenese von Mitochondrien zu klären.

Die spezifische Rolle von *MDM34* an der mitochondrialen Biogenese konnte jedoch durch Studien einer anderen Gruppe belegt werden (Youngman *et al.*, 2004). In der Arbeit dieser Gruppe wurde in einem genetischen Ansatz nach Genen gesucht, deren Mutation in Kombination mit *mmm1-1*, einer temperatursensitiven Mutante des *MMM1*-Gens, zu einem

synthetisch letalen Phänotyp führt (Youngman *et al.*, 2004). *MDM34* konnte in diesem Ansatz identifiziert werden und wurde mit *MMM2* bezeichnet. Ihren Ergebnissen zufolge ist Mdm34/Mmm2 ein Außenmembranprotein und in der Nähe von mtDNS und Mmm1 lokalisiert (Youngman *et al.*, 2004). Die Interaktion von Mmm1 und Mmm2 ist vermutlich nur transient, da die beiden Proteine bei der Auftrennung von mitochondrialen Membranvesikeln unterschiedlich fraktionieren und sie ebenfalls in einem Gelfiltrationslauf solubilisierter Mitochondrien in unterschiedlichen Fraktionen eluieren. Es ist deshalb anzunehmen, dass Mmm1 und Mmm2 unterschiedlichen Komplexen angehören. Die diskrete Funktion von Mmm2 in der Biogenese von Mitochondrien ist allerdings noch nicht geklärt (Youngman *et al.*, 2004).

6.3.2 Die Rolle von *TOM7* in der Morphogenese von Mitochondrien

Tom7 ist eine Komponente der Proteintranslokationsmaschinerie in der Außenmembran von Mitochondrien. Der Verlust von *TOM7* führt zu einem Phänotyp, welcher durch eine ungleichmäßige Verteilung von aggregierten Mitochondrien gekennzeichnet ist. Tom7 ist allerdings mit großer Wahrscheinlichkeit keine Komponente, die eine Interaktion von Mitochondrien mit dem Zytoskelett vermittelt. Seine Topologie in der mitochondrialen Außenmembran ist unbekannt (Honlinger *et al.*, 1995), und der Verlust von *TOM7* führt zu einer stärkeren Assoziation von Tom22 und Tom20 mit der Kernkomponente der Außenmembrantranslokase, Tom40 (Honlinger *et al.*, 1995). Tom7 ist vermutlich nicht aktiv an der Aufrechterhaltung der Mitochondrienmorphologie beteiligt. Die Ausbildung des Phänotyps ist vermutlich das Resultat eines ineffektiven, vielleicht sogar komplett blockierten Importes von bestimmten Komponenten in die Mitochondrien, welche für die Aufrechterhaltung der normalen Mitochondrienmorphologie benötigt werden.

6.3.3 *MDM37/PCP1/RBD1* spielt eine Rolle in der Regulation der Funktion von Mgm1 und besitzt deshalb Einfluss auf die mitochondrialen Morphogenese

Zellen der *Δmdm37*-Deletionsmutante weisen hauptsächlich fragmentierte Mitochondrien auf. Darüber hinaus sind teilweise ebenfalls sehr kurze schlauchförmige Mitochondrien zu beobachten. Dieser Phänotyp wurde bereits bei Deletionsmutanten von Komponenten beschrieben, welche an der Fusion von Mitochondrien beteiligt sind (Hermann und Shaw, 1998; Rapaport *et al.*, 1998; Shepard und Yaffe, 1999; Fritz *et al.*, 2001; Sesaki und Jensen, 2001). Versuche zur Aufklärung der Rolle von *MDM37* in der Biogenese von Mitochondrien waren im Rahmen der hier vorgelegten Arbeit jedoch nicht mehr möglich.

Die spezifische Rolle von MDM37 in der mitochondrialen Morphogenese konnte jedoch durch Studien anderer Arbeitsgruppen belegt werden (Herlan *et al.*, 2003; Sesaki *et al.*, 2003). Mdm37 wird für die Prozessierung der 100 kDa langen Isoform von Mgm1 zur 90 kDa großen Isoform benötigt (Herlan *et al.*, 2004). Die gestörte Mitochondrienmorphologie von *mdm37/pcp1*-Deletionsmutanten ist demzufolge vermutlich auf eine unvollständige Prozessierung der langen Mgm1- zur kurzen Mgm1-Isoform zurückzuführen. Dieser Zusammenhang erklärt auch den Verlust von mitochondrialer DNS in $\Delta pc1$ -Zellen, als Folge des Verlustes an Mgm1-Funktionalität (Herlan *et al.*, 2003). Einen weiteren Hinweis auf die Ausbildung des Phänotyps in Abhängigkeit von Mgm1 liefert die Suppression des Verlustes von mitochondrialer DNA in $\Delta pc1$ -Zellen, durch Deletion von Dnm1 (Sesaki *et al.*, 2003).

7 Zusammenfassung

Vererbung und intrazelluläre Positionierung von Mitochondrien werden in eukaryotischen Zellen durch verschiedenartige Zytoskelett-abhängige molekulare Maschinerien vermittelt. Dabei spielen insbesondere Mikrotubuli eine herausragende Rolle in Säugetierzellen und in einigen Pilzen. Außer einzelnen Motorproteinen, welche an der Interaktion von Mitochondrien mit Mikrotubuli in Säugerzellen beteiligt sind, sind keine weiteren die Interaktion vermittelnden Komponenten bekannt. Ziel der Arbeit war, in dem filamentösen Pilz *Neurospora crassa* als Modellorganismus Proteine zu identifizieren, die an der Interaktion von Mitochondrien mit Mikrotubuli beteiligt sind und diese zu charakterisieren.

Zuerst sollte die biochemische Grundlage der Wechselwirkung zwischen Mitochondrien und Mikrotubuli durch Entwicklung und Einsatz von *in vitro*-Testsystemen aufgeklärt werden. Hierfür wurde ein biochemisches Testsystem entwickelt, in dem isolierte Mitochondrien mit Taxol-stabilisierten Mikrotubuli unter verschiedenen Bedingungen inkubiert werden, um nach Saccharosegradienten-Zentrifugation die Assoziation zwischen Mitochondrien und Mikrotubuli zu analysieren. Zusätzlich sollten die Ergebnisse dieser Versuche in einem fluoreszenzmikroskopischen Testsystem verifiziert werden. Dafür wurde die Expression von mitochondrial zielgesteuertem GFP in *N. crassa* etabliert. Auf diese Weise konnte nicht nur das Verhalten und die Morphologie von Mitochondrien in verschiedenen Stadien des Lebenszyklusses *in vivo* beobachtet werden, sondern isolierte GFP-gefärbte Mitochondrien konnten zudem für eine mikroskopische Interaktionsanalyse mit Rhodamin-gefärbten Mikrotubuli verwendet werden. Unter Einsatz der beiden Testsysteme wurde eine spezifische ATP-abhängige Interaktion zwischen Mitochondrien und Mikrotubuli nachgewiesen, die durch peripher mit der mitochondrialen Außenmembran assoziierte Proteine vermittelt wird.

Diese Ergebnisse deuteten auf eine Beteiligung von Motorproteinen an der Assoziation von Mitochondrien mit Mikrotubuli hin. Deshalb wurde im Genom von *N. crassa* gezielt nach Sequenzen gesucht, die Kinesine kodieren, die diese Rolle übernehmen könnten. Es wurden zwei neue Mitglieder der Unc104-Kinesinfamilie identifiziert und im Rahmen dieser Arbeit charakterisiert. Eines dieser Kinesine, Nkin2, ist peripher mit der Außenmembran von Mitochondrien assoziiert. Unter Verwendung der *in vitro*-Testsysteme wurde die Beteiligung von Nkin2 am Transport von Mitochondrien im Wildtyp belegt. Die Interaktion der Mitochondrien mit Mikrotubuli *in vitro* kann durch eine Präinkubation von

Mitochondrien mit Antikörpern gegen Nkin2 geblockt werden. Um die Funktion von Nkin2 im Mitochondrientransport *in vivo* zu untersuchen, wurden *nkin2*-Deletionsmutanten erstellt und funktionell charakterisiert. Die Deletion von Nkin2 führt *in vivo* zu einem eingeschränkten Mitochondrientransport in auswachsenden Hyphen. Dieser Phänotyp wird durch Überexpression des zweiten neu identifizierten Mitglieds der Unc104-Familie, Nkin3, komplementiert. Zwar ist Nkin3 im Wildtypstamm nicht auf Mitochondrien lokalisiert, es wird aber bei Abwesenheit von Nkin2 hochreguliert und spezifisch an die Mitochondrien rekrutiert. In Abwesenheit von Nkin2 ist Nkin3 essenziell für die Interaktion *in vitro* von Mitochondrien mit Mikrotubuli. Diese Ergebnisse deuten auf eine funktionelle Redundanz von verschiedenen Motorproteinen im Mitochondrientransport in *N. crassa* hin, die in ähnlicher Weise auch in Säugerzellen vorliegen könnte.

Da Transport und Vererbung von Mitochondrien nicht nur von dem beteiligten Motorprotein abhängen, sondern auch mit Fusions- und Teilungsvorgängen der mitochondrialen Membranen verknüpft sind, wurde eine Stammsammlung von Deletionsmutanten nichtessenzieller Gene in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* nach Komponenten mit einer Funktion in der Morphogenese von Mitochondrien durchmustert. Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei neue Gene identifiziert. Die aus der Deletion dieser Gene resultierenden Phänotypen werden beschrieben.

8 Anhang

In der Abb. 36 ist ein Alignment von Nkin2-homologen Proteinen aufgeführt.

Datenbankzugangsnummern (GenBankID):

Nkin2:	NCU06733.1
GzKif1:	FG10189.1
MgKif1:	MG09255.5
ChKif1:	AY230433
AnKif1:	AN7547.2
BfKif1:	AY230422
Umkin3:	AAL87137
DdUnc104:	AF245277
CeUnc104:	M58582
MmKif1 β :	AB011163

Nkin2	M..A.....PG.MAPMGGGGNIKV..V.V...RC..RPFNA....R.EHDRG.AQ..C.I	35
Gmkif1	M.....P....PTGGG.NIKV..V.V...RC..RPFNS....R.EIERG.AK..C.I	30
GzKif1	M.....P....PAGGG.NIKV..V.V...RC..RPFNS....R.EIERN.AQ..C.I	30
MgKif1	M.....C.....	2
BfKif1	M.....K....DA.....QT..V.I...T...P..P.....E...G..H.....	14
AnKif1	M..A.....PAGGG.NIKV..V.V...RV..RPFNS....R.EIERG.AK..C.I	30
ChKif1	MSVASTTSLPEKQHPRPHT.HLRLPHTYTPDFRLLARPLHACPPWRPE.EAATSRSWCDV	58
UmKin3	MADSGNIKVVVVR.....CRPMNSR.....ERNRG.....	24
CeUnc104	MSSVKVAVRVRPFNQR.....EISNT.....	21
DdUnc104	MSSVKVAVRVRPFNSR.....EIARE.....	21
KIF1 β	MSGASVKVAVRVRPFNSR.....ETSKE.....	23
Nkin2	...V.EMRDN.QTVLTTTPP..D..AVVKGG.K.DQ.GQKIFAFDRSYWSFDKN.APNYAG	82
Gmkif1	...V.EMKGN.QTVVTAP...E..G..KGV.K.DG.GPKAFAFDRSYWSFNKD.DPNYAG	74
GzKif1	...V.EMKGN.QTVITAP...E..G..KGV.K.DS.GPKAFAFDRSYWSFNKD.DPNYAG	74
MgKif1Y..	3
BfKif1EAK.S.R.....D..A..KGG.KADT.GQKVFADRSYWSFDKN.DPSYAG	51
AnKif1	...V.QMK.DSQTILTPPPGAEKSR.KGGNKAAAEGPKTFADRSYWSFDKN.APNYAG	83
ChKif1	DPSTGEMKGD.QTILSPANTDVKG..KAA.KAAAEGVKTFAFDRSYWSFDRD.APNYAG	113
UmKin3	ASNLIIEFVDQHQLILSPNEADTKENSKATKK....KSMPE.SFDRAYDEHTE.....	72
CeUnc104	SKCVLQVNGNTTTINGHSINK.....ENFSFNFDHSYWSFARN.DPHFIT	65
DdUnc104	SKCIIEMAGATTAITNPKVPPNT.....SDSVKRFNFDYSYWSHDDH.DADFST	69
KIF1 β	SKCIIQMQGNSTSIINPKNPK.....EAPKSE.SFDYSYWSHTSPEDPCFAS	69

Anhang

Nkin2	QDQLHEDLGKPLLDNAFQGYNNCIFAYGQTGSGKSYSMMGYGKDAG...IIPMICQDMFK	139
Gmkif1	QSNLFDDLGQPLLDNAFQGYNNCIFAYGQTGSGKSYSMMGYGKEIG...IVPLICQDMFR	131
GzKif1	QSNLFDDLGQPLLDNAFQGYNNCIFAYGQTGSGKSYSMMGYGKEIG...IVPMICQEIFK	131
MgKif1GK...D.....YG.....IM...R.....LICQDMFE	19
BfKif1	QDNLHTDLGKPLLDNAFQGYNNCIFAYGQTGSGKSYSMMGYGKDAG...VIPKICQDMFE	108
AnKif1	QDNLFSDLGVPLLDNAFQGYNNCIFAYGQTGSGKSYSMMGYGKEYG...VIPRICQDMFE	140
ChKif1	QDNLHEDLGKPLLDNAFQGYNNCIFAYGQTGSGKSYSMMGYGAEYG...IIPKICQDMFE	170
UmKin3	QDDLQYIGVELLQHAFNGFNFCVFAYGQTGSGKSHSMVGYAQAKG...IIPPLTCARLFE	129
CeUnc104	QKQVYEELGVEMLEHAFEGYNVCIFAYGQTGSGKSYTMMGKANDPEMGIIPRLCNDLFA	125
DdUnc104	QSMVYKDIGEEMLQHSFDGYNVCIFAYGQTGAGKSYTMMGRQEEQQ.EGIIPMICKDLFT	128
KIF1ba	QNRVYNDIGKEMLLHAFEGYNVCIFAYGQTGAGKSYTMMGKQEESSQ.AVIIPQLCEELFE	128

Nkin2	RIND.MQQDKNLRCTVEVSYLEIYNERNVRDLLNPANKGNLKVREHPSTGPYVEDLAKLVV	198
Gmkif1	RIDE.LKKDKTKCTVEVSYLEIYNERNVRDLLNPSTKGNLKVREHPSTGPYVEDLAKLAV	190
GzKif1	RADE.IQKDGKTKCTVEVSYLEIYNERNVRDLLNPSTKGNLKVREHPSTGPYVEDLAKLAV	190
MgKif1	RIGK.LQTDNSKCTVEVSYLEIYNERNVRDLLNPSTKSNLKVREHPSTGPYVEDLAKLAV	78
BfKif1	RIGE.LQQDKHLKCTVEVSYLEIYNERNVRDLLNPSTKGNLKVREHPSTGPYVEDLAKLVV	167
AnKif1	RIRK.IQEDKNLTCTVEVSYLEIYNERNVRDLLNPSTKGNLKVREHPSTGPYVEDLAKLAV	199
ChKif1	RI.KGMQQDKNSTCTVEVSYLEIYNERNVRDLLNPSTKGNLKVREHPSTGPYVEDLAKLVV	229
UmKin3	DINQKTAADPNLKISVEVSYLEIYNEKVRDLLNPKNKNLKVREHPSLGPYVEDLSKLVV	189
CeUnc104	RIDN..NNDKDVQYSVEVSYMEIYCERVKDLLNPNSGNLRVREHPLLGPYVDDLTKMAV	183
DdUnc104	RIQD..TETDDLKYSVEVSYMEIYCERVRDLLNPKNKNLKVREHPLLGPYVEDLSKLVV	186
KIF1ba	RIND..NCNEEMSYSVEVSYMEIYCERVRDLLNPKNKNLKVREHPLLGPYVEDLSKLVV	186

Nkin2	GSFQEIIEHLMDEGNKARTVAATNMNETSSRSHAVFTLMLTQKRFDPEITKMEMEKAAKISL	258
Gmkif1	NEFQEIIEHLMDEGNKARTVAATNMNETSSRSHAVFTLMLTQKKYDADTKMEMEKVAKISL	250
GzKif1	NTFQEIIEHLMDEGNKARTVAATNMNETSSRSHAVFTLMLTQKKIDTDTKMALEKVKAKISL	250
MgKif1	SSFQEIIEHLMDEGNKARTVAATNMNETSSRSHAVFTLMLTQKSFVETNMAMEKVKAKISL	138
BfKif1	SSFQEIENLMDEGNKARTVAATNMNETSSRSHAVFTLMLTQKRLDVETKMAMEKVKAKISL	227
AnKif1	RSFEEIENLMDEGNKARTVAATNMNETSSRSHAVFTLMLTQKRHDAETSMDEKVSRIISL	259
ChKif1	QSFSEIENLMDEGNKARTVAATNMNETSSRSHAVFTLMLTQKRHDVETSMDSGERVAKISL	289
UmKin3	ASYPDIIMNLMDEGNKARTVAATNMNETSSRSHAVFTLVLTQKRFLVQTKLEAEKVSRIISM	249
CeUnc104	CSYHDIENLMDEGNKARTVAATNMNETSSRSHAVFTLVLTQKRHCADSNLDTTEKHSKISL	243
DdUnc104	TDYQDIHDLIDEGNKARTVAATNMNETSSRSHAVFTIIFVTTORRHDLMTNLTTEKVSISL	246
KIF1ba	TSYTDIADLMDAGNKARTVAATNMNETSSRSHAVFTIIFVTTQKKQDPEINLSTTEKVSISL	246

Nkin2	VDLAGSERATSTGATGARLKEGAEINRSLSTLGRVIAALADLST.....GKXXX.GSAA	311
Gmkif1	VDLAGSERATSTGATGARLKEGAEINRSLSTLGRVIAALADLSTG.....GKXXX.G.T	302
GzKif1	VDLAGSERANSTGATGARLKEGAEINRSLSTLGRVIAALADLSTP.....GKXXX.G.S	302
MgKif1	VDLAGSERATSTGATGARLKEGAEINRSLSTLGRVIAALADLST.....GKXXX.GGAT	191
BfKif1	VDLAGSERANSTGATGARLKEGAEINRSLSTLGRVIAALADLSE.....GKXXXV.G.K	279
AnKif1	VDLAGSERANSTGATGARLKEGAEINRSLSTLGRVIAALADAAS.....GKXXX.G.K	309
ChKif1	VDLAGSERAQSTGATGARLKEGAEINRSLSTLGRVIAALADQSS.....GKXXX.A...	338
UmKin3	VDLAGSERANSTGATGARLKEGANINRSLTTLGKVIAALAIASSAVEPVKGAKPKTASL	309
CeUnc104	VDLAGSERANSTGAEGQRLKEGANINKSLTTLGLVVISKLAEEST.....KXXX.SN	293
DdUnc104	VDLAGSERADSTGAKGTRLKEGANINKSLTTLGKVISALAEVSA.....SKKXNT.KK	298
KIF1ba	VDLAGSERADSTGAKGTRLKEGANINKSLTTLGKVISALAEVSK.....KXXX.....	294

Nkin2	G.QVPYRDSVLTWLLKDSLGGNSMTAMIAAISPADINYDETLSTLRYADSAKRIKNHAVV	370
Gmkif1	G.QVPYRDSVLTWLLKDSLGGNSMTAMIAAVSPADINFDLSTLRYADSAKRIKNHAVV	361
GzKif1	G.QVPYRDSVLTWLLKDSLGGNSMTAMIAAVSPADINFDLSTLRYADSAKRIKNHAVV	361
MgKif1	G.QVPYRDSVLTWLLKDSLGGNSMTAMIAAISPADINFDLSTLRYADSAKRIKNHAVV	250
BfKif1	GNQVPYRDSVLTWLLKDSLGGNSMTAMIAAISPADINFDLSTLRYADSAKRIKNHAVV	339
AnKif1	..QVPYRDSVLTWLLKDSLGGNSMTAMIAAISPADINFDLSTLRYADSAKRIKNHAVV	367
ChKif1	..QVPYRDSILTWLLKDSLGGNSMTAMIAAISPADINFDLSTLRYADSAKRIKNHAVV	396
UmKin3	DSFVVPYRDSVLTWLLKDSLGGNSKTAMIAAISPADY..ETLSTLRYADQAKKIKNKAVV	367
CeUnc104	KGVIIPYRDSVLTWLLRENLGNSKTAMLAALSPADINFDLSTLRYADRAKQIVCQAVV	353
DdUnc104	ADFIIPYRDSALTWLLRENLGNSKTAMIAAISPADINYDETLSTLRYADRAKQIVCKAVV	358
KIF1ba	TDFIIPYRDSVLTWLLRENLGNSRTAMVAALSPADINYDETLSTLRYADRAKQIKCNAVI	354

Anhang

Nkin2	NEDANARMIRELKEELAQLRSKL.G....NG...G..VVGD.THVPGEVYAEGTPLEK	418
Gmkif1	NEDANARMIRELKEELSLLRSKL.GNGPVPGG...A..AGG..GLVTG.ETYPEGTPLDQ	412
GzKif1	NEDANARMIRELKEELSLLRGKL.GG...GG...G..PGG..AVVAG.ETYAEGTPLDQ	408
MgKif1	NEDANARMIRELKEELAMLTKL.GGGG.GGG...G..AGSGSAVPPDEIYAEGTPLEQ	303
BfKif1	NEDANARMIRELKEELAQLRGKLTG....GG...GWRRGG..S..PADEIYAEGTPLEK	387
AnKif1	NEDPNARMIRELKDELAQLRAKL.GGGA.AGGATAG..AAG..GVVA.DEVYPPDTPMEK	420
ChKif1	NEDPNARMIRELKEELSKLRSQL.GGGG.GGGG..G..AAGSNGIV..EEQYPPDTPLEK	448
UmKin3	NEDPNAKLIRELKEELELRLTRVSGG....GG.....ADG.....ESNWDPSIPDPK	410
CeUnc104	NEDPNAKLIRELNEEVIKLRHILKDKGIDVT.....DVQETP	390
DdUnc104	NEDANAKLIRELKEEIQKLRDLLKAEGIEVQE.....EDELTK	396
KIF1ba	NEDPNAKLIRELKEEVTRLKDLLRAQGLGDIIDT....SMGSLTSSPSSCSLNSQVGLTS	410
Nkin2	QIVSITTPDG.TVKKVSKAEIAEQLNQSEKLLQDLNQTWEOKLQKTEEIHKEREAALEEL	477
Gmkif1	QMVSITGSDG.VLKKVSKAEIAEQLSQSEKLLTDLNQTWEKLLKTEEIHKEREAALEEL	471
GzKif1	QMVSITGPDG.VLKKVSKAEIAEQLSQSEKLLTDLNQTWEKLLKTEEIHKEREAALEEL	467
MgKif1	QIVSITAADG.TVKKVSKAEIAEQLSQSEKLLTDLNQTWEKLLKTEEIHKEREAALEEL	362
BfKif1	QMVTIVSSDG.AVKKVSKAEITEQLNQSEKLYSDLNQTWEKLLKTEEIHKEREAALEEL	446
AnKif1	QMVSIIQPDG.TIKKVSKAEIVEQLNQSEKLYKDLNQTWEKLLKTEEIHKEREAALEEL	479
ChKif1	QMVSITQADGST.KKVSKAEIAEQLTQSEKLYTELNQTWEKLLKTEEIHKEREAALEEL	507
UmKin3	QVVRVYQTKTG.EIKTVTKAELQEQLEQSEKIMSSLNESWEKLLKTEEIQKEREKALEEL	469
CeUnc104	GKHKKGPK....LPAHVHEQLEKLEQSEKLMAEIGKTWEOKLIHTEEIRKQREELRDM	445
DdUnc104	STVIKSPTKSRNRNGSTTEMAVDQLQASEKLIAEELNETWEKLLKTEEIRVQREAVFAEM	456
KIF1ba	VTSIQERIMSTP....GGEEAIERLKESEKIIEAELNETWEKLLKTEAIRMEREALLAEM	466
Nkin2	GISIEK..GFVGLSTPKKMPHLVNLSDPDLAELVYNLKPCTTIVGNVDTNADHQANIR	535
Gmkif1	GVVSIK..GFVGLHTPKKMPHLVNLSDPDLAELVYNLKPCTTIVGNVDTNADHQANIR	529
GzKif1	GVVSIK..GFVGLHTPKKMPHLVNLSDPDLAELVYNLKPCTTIVGNVDTNADHQANIR	525
MgKif1	GISIEK..GFVGLSTPKKMPHLVNLSDPDLAELVYNLKPCTTIVGNVDTNADHQANIR	420
BfKif1	GISIEK..GFVGLHTPKKMPHLVNLSDPDLAELVYNLKPCTTIVGNVDTNADHQANIR	504
AnKif1	GISIEK..GFVGLSTPKKMPHLVNLSDPDLAELVYNLKPCTTIVGNVDTNADHQANIR	535
ChKif1	GISIEK..GFVGLSTPKKMPHLVNLSDPDLAELVYNLKPCTTIVGNVDTNADHQANIR	564
UmKin3	GISVVK..GNVGVHTPKKMPHLVNLSDPDLAELVYNLKPCTTIVGNVDTNADHQANIR	525
CeUnc104	GLACAEDGTTLGVFSPKKTIPHLVNLSDPDLAELVYNLKPCTTIVGNVDTNADHQANIR	503
DdUnc104	GVAVKEDGITGVFSPKKTIPHLVNLSDPDLAELVYNLKPCTTIVGNVDTNADHQANIR	514
KIF1ba	GVAIREDRCDIGVFSPKKTIPHLVNLSDPDLAELVYNLKPCTTIVGNVDTNADHQANIR	524
Nkin2	LNGSRILHEHCFVFNAA....DGTVTVIIPKEGAAMVNGKRVTE..PTR.LHSGYRVIIG	588
Gmkif1	LNGSRILHDHCTFENAP....DGTVTTLTPSEGASVMINGKRITE..PSQ.LHSGYRVIIG	582
GzKif1	LNGSRILHDHCFVFNAA....DGTVTTLTPSEGASVMINGKRITE..PSQ.LHSGYRVIIG	578
MgKif1	LNGSGILHEHCIFDNAQ....DGTVTTLIPQPGAAMVNGKRIAE..PKQ.LHSGYRVIIG	473
BfKif1	LNCSTRILHEHCTFENV....DNVVTTLTPTEGAAMVNGQVRV.EK.PTR.LRSGFRVIIG	556
AnKif1	LNGSKILLADHCKFENV....DNVVTTLTPTEGAAMVNGQVRV.EK.PTR.LRSGFRVIIG	587
ChKif1	LNGSQILLAEHCNFENV....DGKVTVIIPQEGASVMVNGVRIDK..P.RLLKSGHRIIIG	616
UmKin3	LSCTKILLNKHCMFDHQ....DGLVTVTAMPDSMTMNGKRLAPDEPKR.LRSGYRVIIG	579
CeUnc104	LSGEAILLEHCFINEDG....NVTLTMKPNASCYINGKQVTPP...TVLHTGSRVIIG	555
DdUnc104	LSGSHILKEHCTFENKNS....TVTLLPHKDAIIVNNGRKLVEP...EVLTKGSRVIIG	566
KIF1ba	LSGAHIKEEHCLFRSERSNTGEVIVTLEPCERSETYVNGKRVVHP...VQLRSGNRVIIG	581
Nkin2	DFHIFRFNHPLEAKAERAERAE....QSSLRQSLTANQLQAL...EK..SPNLSPSHN	638
Gmkif1	DFHIFRFNHPMEA...RAERAEPVPERPQ.SLLRHSITASQLQAL...DRG.SPSPSPRPG	634
GzKif1	DFHIFRFNHPMEA...RAERAEPVDRPQ.SLLRHSITASQLQAL...DRG.SPSPSPRPG	630
MgKif1	DFHIFRFNHPMEA...RAERTE....Q.SLLRQSLTASQLQNL...DKATSP.MAAKYG	520
BfKif1	DFHIFRFNHPTEA...RAERAERAE....Q.SLLRHSVTANQLENFKDWDKF.SPSTPRPA	606
AnKif1	DFHIFRFNHPQEA...RAERVE....Q.SLLRHSVTTSQL.A.....SPAPG.K.A	627
ChKif1	DFHIFRFNHPQEA...RAERAERAE...T.SLLRQTVTAGQLGS.....SPSPAPRPG	661
UmKin3	DFHVFRFNHPPEVVRKARDRVRS.....TLALSTG.....	608
CeUnc104	EHHVFRFYNDPQEARQSR.....	572
DdUnc104	KNHVFRFTNPEQARELRDKIETE.....	589
KIF1ba	KNHVFRFNHPPEQARAEREK.....	600

Anhang

Nkin2	HQQ...SLSTAVS..E.G.D.SSRPDSAP.FSRNTKESDW.SFARREAAGAILGTD..	685
Gmkif1	HER...SFSR.VS..EF.G.DIS.RPESPSI.FQRSGRESDW.SLARREAAGAILGSD..	681
GzKif1	HER...SFSR.VS..EF.G.DIS.RPETPSI.FQRNGRESDW.SLARREAAGAILGSD..	677
MgKif1	HAR...SVSKAGS..DF.GAD.S.RPDSPPG.FQRDGRDNDW.SFARREAASAILGSD..	568
BfKif1	HDR...TFSKAISDLDFDG.S.S.RADSPVP..GR.GL.SDW.SLARREAAGAILGTD..	653
AnKif1	HER...NVSKA.S..DL.DWD.SSRADSP.MGFQR.GRESDF.YARREAVSAGMDDP..	674
ChKif1	HDRSYSSISVANS..DF.DPD.SPRAGSPAL.WQR.GRESE.FSYARREALTAWLGPD..	712
UmKin3EAHNETLIDGLPSTRPDSP.....ASGDVDWTYARREYTMAKLNGQNV	652
CeUnc104HNLAATAEQP.	582
DdUnc104N...EAENEVEKTDTOQ.	603
KIF1baTPSAETPSEP.	610
Nkin2	QNFAKLTDEELNALFEDVQARAER.VN..VR..EG.D.EDIESMASYPTREKYLSTGTL	738
Gmkif1	QNLTSLTDEELNALFEDVQARAER.VN..GRE.DG.D.D.SES..SYPIRDKYLSNGTM	732
GzKif1	QNLTSLSDEELNALFEDVQARAER.VN..VRE.DG.D.D.SDS..SYPIREKYLSTGTM	728
MgKif1	QNITNLTDEELNGLFEKLLKEREER.VN..GR..DGED.E.TESMSSYPMREKYLSTGTI	621
BfKif1	QKIAGLSDEELNVLFEDVQARAER.AT..ANL.E..D.D.LDSVTSYPMREKYLSTGTL	705
AnKif1	.RLAHMPDDELDALENVQNVANR..R..G.LLEN.EED.SDSLSSYPIRDKYMSNGTI	726
ChKif1	KRIENLPDEDFEALYEDLSRLRETRKARPESRMISD.EGD.TESMSSYPVREKYASGGTL	770
UmKin3	.NFDNLNEEDLEKLFEDISRARSKK.....SM.GSVLGRPESRASLFD	693
CeUnc104	IDWKYAQQELLDKQGIDLKADMEKK.....	607
DdUnc104	VDWNFAQCELLKQGIDLKAEKRR.....	628
KIF1ba	VDWTFQAQRELLKQGIDMKQEMEKR.....	635
Nkin2	DNFSLDTALTMPSTP.KQ.AETEE.KLGQIRDVMQGLDKQKKEEYKQDKTAEAA.NVE.	793
Gmkif1	DNFSLDTALTMPSTP.KQ.GEPDD.RLKEVREELQNRLEKQKKEEYQDQLKSAAEA.NVE.	787
GzKif1	DNFSLDTALTMPSTP.KQ.GEPDD.RLREVREELQNKLEKQKKEEYQDQLKSAAEA.NVE.	783
MgKif1	DNFSLDTALTIPSTP.RQ.GEGDE.KLREAQEEQSQLEKRRKEEFQGLKTAEEA.NVE.	676
BfKif1	DNFSLDTALTMPSTP.KQ.GEVED.RMREVKEEMQVQLEKQREEFQEQLEIAKTS.NVE.	760
AnKif1	DNFSLDTAITMPGTPRH..GD.EDATLQSVRQDMQRLERQKEQYLDKLRSEASPS.QG	782
ChKif1	DNFSLDTALTMPSTP.HQDGS.E..KMQEIREEMQNKIDQSRDDFQARLK...A.....	817
UmKin3	DNASESASSVIRPYS.....HGALTDSDSIDPWSQAGSEMGMRFSAAGTPIKENAYTGAG	748
CeUnc104	607
DdUnc104	628
KIF1ba	635
Nkin2	VEEIKKEKARMEETLMQLKVDMQKQLEMQRQ.FEDKIEKL..D.PLKR.P..K...AN.	842
Gmkif1	IEEIKQEKVKMEALKEKEDMQKQLNQQRKQ.FEEKIEKM..D.PLKM.P..K...KS.	836
GzKif1	IEEIKQEKVKMEALQELKEDMQKQLNQQRKQ.FEEKMEKM..D.PLKM.P..K...KS.	832
MgKif1	VEEIRKEKARMEDELVTLKAEMQKQLEVQRKT.FEDKIERL..D.PLKR.P..K...AN.	725
BfKif1	VEEIKKEKVRMEETLREVKKEEMLKQLEVQRKE.YEEKLQEL..S.PVKSGP..D...GP.	810
AnKif1	IDELRSEKARMEDALRVAKKEEYEQRLKQ.KEAFETHMKALGHPVP.RI...YE...NG	833
ChKif1	.DE..DAKVELQE.LRAAKEAMQRMKAQ.KEAFORHLKELGHDIPLEIDEDLEIKSANA	872
UmKin3	..AS.....SPALVAASHRETESLRAKVREYEEKLTRMANGSPRLADEP.....	790
CeUnc104MLEMESQYRREKVELEQKMYHOTRE.YESMIENLQKQVDLAQSYISGGGSIWE	659
DdUnc104LDNLEEYKREKLQADQQFEEQRKT.YEARIDALQKQVEEQSMTMSMYSSYSP	680
KIF1baLQEMEILYKKEKEEADLLLEQQR.....LDADSD.....SGDSDSKR	672
Nkin2PK...L..S...ADEIERAKAVVKKWRSRRYVLMABAVLQHAATLKEAQVMS	886
Gmkif1PT...L..SE..E.EIEMAKKTVKTRGRHFVKMAEAVLQNASILKEAQVMS	880
GzKif1PT...L..SD..E.EIETAKSIVKTRGRHFVKMAEAVLQNASILKEAQVMS	876
MgKif1PK...L..SE..A.EIKRAKDVVKHWKNRRYVHMAETLLQNASILKEAQVMS	769
BfKif1PP...L..SE..K.EIVVAEKVAKHWQGRRYVRMAEAVFQNAAILKEAQIMS	854
AnKif1	Y.....PK...L..SP..R.ELEVARSVFRHWSQQNYVRMAEKVLQHASLLKEAQVMS	878
ChKif1	Q.....KEQDAQDAQDER.QLELIRSVLQWRRRKYVTMAETLLQNAAILKEAQVMS	923
UmKin3IEYSDTQKALLRKVLVKKWKAHTKVSMAEDALCKAVLVKEANVIS	834
CeUnc104	G.ERMLTSSLLFPEELKWTSDQKRVVLKAAIKWRYHQFTSVRDDLWGNVIFVKEANVIS	718
DdUnc104	EDFHQEEVDVYTNPMYESCWTAREAGLAAWAFKRWRYHQFTSLRDDLWGNVIFLKEANVIS	740
KIF1ba	S.....CEESWKLTSLREKLP.....	689

Anhang

Nkin2	HELNESVVFQFTIIVDVGHLLCSSYDMVLN..GLTGEG..DDIALETALKPCVGRVIDYK	942
Gmkif1	HELDEHVVFQFAAVDVGHVLCSSYDMVLN..GLTGEG..DDVALEEAHKPCIGIRVVDYK	936
GzKif1	HELDEHVVFQFAAVDVGHVLCSSYDMVLN..GLTGEG..DDVALEQAHKPCIGIRVVDYK	932
MgKif1	QELEEHVSFQFTVVDVGHVLCSSYDMVLN..GLPGE..DDVALEEAPKPCIGRVIDYR	825
BfKif1	HEMDENVVFQFAVDVGHVLCSSYDMVLN..DI..EG..DDFHLEDATKPCIGRVIDYR	908
AnKif1	HIMDKNVVFQFAIVDHGHNMASDYDLVN..GISGD..EDIILDDAKKPCVAVRVMDFK	933
ChKif1	QQMDKRVVFQFCIVDVGHVTPSSYDLV.NM.GIPGE..DDEYLDSSQKPCVGRVIDFK	978
UmKin3	KELAKRVTYQYTIIVDDFPLAVPTSGVEAIA.GLTFEFDVSDPDLASCAKPCMGIKVLDYL	893
CeUnc104	VELKKKVQFQFALLTDTMYSPLPPDLLP....PGED...LTLRPYPKTVVAIQVQDLK	769
DdUnc104	VELKKKVQFQFLLTDTLYSPLPPELASTVAPVHQEDE...FGAPPVSKTLVAVEVTDTK	797
KIF1ba	.PSK.....LQTIVKKCLPSSGKKRE.PIKMYQI...PQRRRLSKDKSWVTISDLK	736

Nkin2	LKTVFESRVQDFTLDVTS PHTSHAIG.....MIKLALPSSARAPTNTLKFNVVMHEM	1053
Gmkif1	LKAVFECRVQDSTLDVLS PYTSHVVG.....I IKLSLEPSHARAPTNTLKFNVVMHEL	1047
GzKif1	LKAVFERRVQDSTLDVLS PYTSHLVG.....I IKLSLEPSHARAPTNTVKNVVMHEL	1043
MgKif1	LRAVFESRVQDFTLDVLS PHTSHVIG.....I IKLSLEPSSARAPSNTLKFNVVMSEM	936
BfKif1	LSAVFESRVQDFTLDVLS PFTMHAIG.....I IKLSLEPSSAKAPSNTLKFNVVMHEM	1019
AnKif1	LTAVFETRVDVDFSDVIS PYTQGVVG.....I IRLSLEPSSAQAPSSTLKFNVVMRDM	1044
ChKif1	LAAVFESRVDFSLDVIS PYTSNPIG.....I IRLSLEPSSAEAPSTTLKFNVGMHEM	1089
UmKin3	LTPLSRQLSAKYRLPLHDRHTAKQIGWCSVSVK FVSLSPVVSARAGGTALPAPSGSRNP	1011
CeUnc104	RFPWFERMVGRFVYLNLLHNVLPIH.....KVAVVNEKGEVKGYLKVAIEPVQKDEV	871
DdUnc104	RFPWFERMVGRSFIYLSNLLYPVPLVH.....KVAIVNERGDVRYGLRIAVQPVLDDES	899
KIF1baNERDSWRAVARVDVWDTVGVGDE	801

Nkin2	IG.....	1055
Gmkif1	VG.....	1049
GzKif1	VG.....	1045
MgKif1	VG.....	938
BfKif1	IG.....	1021
AnKif1	AG.....	1046
ChKif1	VG.....	1091
UmKin3	SSPTSSSCTNGIVNPLVGQ.....KLGFIQILVDAISG	1043
CeUnc104	INQKKGVRQTAKLHFR.....KEDFLKSHKNG.....ETSDSDR....	905
DdUnc104	IDFNNGVVKQSARLVFNEDDAKPKYRALNEKDDVQRYIDNGGLDSKLEELEDVDSGRGIDS	959
KIF1baKIEDMMVTGKGG.....	813

Nkin2FAEREGTEVHAQLFIPGISEEDGIT.....TTQ	1083
Gmkif1FAEREGTXXXXLTFQEHIS.....	1068
GzKif1FAEREGTEVHAQLFIPGISEEDGIT.....TTQ	1073
MgKif1FAEREGTEVHAQLFIPGVSEEDGVT.....TTQ	966
BfKif1FAEREGTEVHGQLFIPASNEGGVT.....TTQ	1049
AnKif1FAEWEGTDVHAQLFVPGISEEGGAT.....TTQ	1074
ChKif1FSEREGTKVHAVLFPVPGISEDESGAT.....TTT	1119
UmKin3	ISSDDFASIHLQVKLSSFAGNELGKDEIYTSIPVDLVN.....	1081
CeUnc104LAFPEHQEEVEFCFRVVVLQAI DVADTYSDVFCQFNFLHRHDEAFSTEP	955
DdUnc104	NSASECHENSEEPGEHLQVGKEFTFRVTVLQATGIGAEYADIFCQFNFLHRHEEAFSTEP	1019
KIF1ba	813

Nkin2	MIRDFDEGPPIRFESVHSMISPLFASQDTS LRVA.IFAKVSAMHLDKLLSWDDMR.....	1136
Gmkif1	MVSNVIMSVDWFGNVQKT.....	1086
GzKif1	MIKDFDEGPPIRFESVHSMISPLIAPKDVTLRVA.IFAKVSAMHLDKLLSWDDMR.....	1126
MgKif1	MISDFDEGPPIRFESVHSMISVPLFGSQGISLRVA.IFAKVSTMHLDKLLSWDDMR.....	1019
BfKif1	MIKDFDEGPPIRFESVHSMISVPMFGPTDVSLRVA.IFAKVSSMHLDKLLSWDDMR.....	1102
AnKif1	MISGFNETPVRFESVHSMISPLTSPRNAALKIC.VYARVTMHLDKLLSWDDMR.....	1127
ChKif1	WITDENESPIRFESVHSMISLPPSPRDTFLRIS.IFAKVTDIHLDMLLSWDDMR.....	1172
UmKin3	QESLAEVRLRRTLSFVLTPEITQWLRTGAAPIE.VYAKLRPHYLVALEQHD SARESEGQQ	1140
CeUnc104	MKNKSKS..PLTFEHTQNLHIKMSKTF LHYLHHFP IIFEVFGHFQPK.....SEQNFERQ	1008
DdUnc104	VKNASAGAPLGFYHVQNI TVPVTKSFIEYLKTPIMFKIFGHYQTHPLHKDAQDFVSRP	1079
KIF1baTDVDD.....	818

Anhang

Nkin2 DAVPTSHSKP..... KGARINESHFYTEGKHDLLARVQI	1170
Gmkif1	1086
GzKif1 DAVPIREDKA..... KASRINESQFFTQEKHDLLSRIQI	1160
MgKif1 DAVPVSRGKQ..... KAARISESHFYTEEKHDLLARVQI	1053
BfKif1 DNIPQPKKKR..... KGARIAESQFYSEEKHDVFAKVQI	1136
AnKif1 DLAEQGAQDQ..... KTPRIAESYFSEERHDVFAKLVQ	1161
ChKif1 DSAEKPKQKR..... RNARLPESEFYTEDTHDIFARIQV	1206
UmKin3	HA..... AAFVPLHDDSRSLTAGQOKTMSNTIKERLSENMERNEERHFILASVQI	1190
CeUnc104	NSALGRRLSTKLTFFQQPSLVISTPVKSKKA..... NAPIQNNNASVSKKHDLVWFVEI	1061
DdUnc104	P..... PRRMLPP... SIPISQFVRS PKF..... GPLPCAPTSTVLAKHDVLFVWFVEI	1123
KIF1ba LKVHIDK... LEDILQEVK..... KQNNMKDEEI	844
Nkin2	LELNEEGDYVP.VEVTQTSELDNGTFQLHQGLQRRVAITVTHSSGDALPWNDATSLRVGK	1229
Gmkif1	1086
GzKif1	MELNENGEYSP.VEVTQTSELDGTGYQLHQGLQRRIGINISHSSGDALPWGGVTAVRVGK	1219
MgKif1	MEMDENGELP.VEVTQTSELDAGTFQLHQGLQRRIAINLSHSSGDALPWDDIMSVKVGK	1112
BfKif1	LELAESGDY.PAVEVIQTSELDQGTFFQLHQGLQRRIAVTLTHNSGDALPWSVDVTGLRVGR	1195
AnKif1	LEMTETGDYLP.VEVVQNSPTEVGTGYQLHQGLQRRISVNLTYSSTEALPWDDLNTNIRVGS	1220
ChKif1	QEITDDGTYP.VEVTQSSVMDQGVYQLHQGLARRIVVNLTHTSGETIQWEGVKSLRMGH	1265
UmKin3	CELDASGEYMP.VPVRASSALDPGSFFLRQGLQRRKLVQLAHDSGRQFLWSRVTKLELAD	1249
CeUnc104	CELANNGEYVPTIVDHAQGLPTHGIFLLHQGIQRRIKITICHE.KGELKWKDCQELVGR	1120
DdUnc104	CELAPNGEYVPSVVEHSDDLPCRGLFLLHQGIQRRIRITIVHEPTTEVKWKDINELVGR	1183
KIF1ba	KVLRN..... KMLKMEKVLPLIGSQ..... EQK... SQGSHKTKEPLVAG.	881
Nkin2	IALLDSAGKTPDMG.S.ASP..PLPLRLVTEPTFRVNANGTRSVTLIGQWDSSSLHNSLLL	1285
Gmkif1	1086
GzKif1	VRLVDSAGKTPDMGAN..EP..DISLKLQSPIFRDNANGTKSLTIYAQWDSSSLHNSLLL	1275
MgKif1	IQLVDHAGKTPDMG.N.ITP..DIAMKLASKPVFRQNANGTRNVMTIGQWDSSSLHNSLLL	1168
BfKif1	IQLVDHIGKSPDLS.SPSTP..PLYLKLKSKPIVKANANGTSNVCIVGKWDSSAHESLLL	1252
AnKif1	VRLLDPWGKIPDQDLQ..TP..DVPLKFIQEPMVKDNADGTSNITLVGQWDSSSLHNSLLL	1276
ChKif1	IRMVDAAGNCPNYG...SPVKEVPVDLISPPTVRNNADGTNVKVFVGRWDSSTAHSQIL	1321
UmKin3	VRLLDLSRGR.VHGGKASDAVQLKTPKQQS...VEFANNGTSQLLELWAWWDSVHDSLHL	1305
CeUnc104	IRAGPEWAGGDD.....VDVLSLGLFPGTFMEFSMDRTRFFQFEAAWDSSSLHNSPLL	1172
DdUnc104	IRNTPESSDEQDED.....ACVLSLGLFPGEALEVPDDRFSFYRFEAAWDSSSLHNSALL	1237
KIF1baANSVS.D.....	887
Nkin2	DRITSEKYRVQMTVSWEINSEKLAEPKIFSLPVAVQVVS.RNFV...RQTSMF..SLWQN	1340
Gmkif1	1086
GzKif1	DRVTQDKYRVQMTICWEISSEKLAEPKFSQKVCVQILSRFV...RQTSMF..ALWQN	1330
MgKif1	DRVTADKYKVMQMSISWEVASEKLAEPKFSMNVCQIMS.RNFV...RQSSLLS..SLWQS	1223
BfKif1	DRVTADKYKVMQMSLSDVKSEKLSRLMTFNMDVCSQIMS.RNFV...RQSSLLS..SLWQS	1307
AnKif1	DRVTAEKYRVQVTVRWDLQSSRLQDPVFSFEIDLTLQVQGRTYI...RQSSMF..NFFST	1331
ChKif1	DRATKDNFRVRATLLFDVMSKLEPMTFSFDLQVQIRGRSYM...RPTSLFSLTNIWNT	1378
UmKin3	NRTTSAGHRVLRISLFEIQVDRCSAPAAFSMDLAVSINGRDAK...PP...GRLMSFIEG	1359
CeUnc104	NRVSNYGDQIYMTLSAYMELDGCAQPAVVTKDLCLLIYARDSKISAASRFCSRSLVGGISK	1232
DdUnc104	NRVSQGGETIYITLSAYLELENCARPAIITKDLMSVIYGRDARTGPRS..LKHLSFGQYR	1295
KIF1ba	NGVSKGE.....SGELGKEE	902
Nkin2	IRIVHSSTGIFTVQMRP.APIKRVGDLWRMS...SQHDYVKGEENLGT.WTPRGVSLVA	1394
Gmkif1	1086
GzKif1	VRFVRSSTGIFTLAMRP.APVKKVGDWLRLN...SQHDYVKGEESL.TSWTPRGVSLVS	1384
MgKif1	VRIVKSTTGIFTMSMRP.APIKRVGDIWRLN...SQHDYVKGEETL.TSWTPRGVSLIS	1277
BfKif1	VRIVHSMTSIYSISVRPVA.VKRAGDLWRMNT...SE.DYVKGEEL.TNWTPRGISLVK	1361
AnKif1	TRVVHSTVRMYSVAVRPVS.AKRAADLWRMN...TQNDYVKGEEFL.TKWAPRKVSLVR	1385
ChKif1	VKIVHSTVGIFSVAIRPTS.VKRATDLWRMN...TKDDYIKGEEQL.AGWTPRGVSLVR	1432
UmKin3	STSMTKTSIAIFEVRLVP.PMMKRPCELWRLD...TGSKYVRGQEMLG.GWKARGVSLVG	1413
CeUnc104	SPEMNRVPGVYQLCLKDGSDSGSPGAIQRRQRRVLDTSAYVRGEEN.LGQWRPRGDSLIF	1291
DdUnc104	NPEANRLTGVYELALRRASEAGSPGVQRRQRRVLDTSSTYVRGEEN.LHGWRPRGDSLIF	1354
KIF1ba	R.....VSQLMN.....GDP.AFRRGR.....LRWMRQEIRFKN	931

Anhang

Nkin2	DYI.SAR.KKRRMMT..ELT.AVQGRLLKGLGF.G.....D..AN.D....L.....S.N	1429
Gmkif1	1086
GzKif1	DFI.MARKKKKR.AADMEVTEAV...LAKLGF DGASMISDKKEPSPEPSPELKPIIPS.D	1438
MgKif1	DFIASKR.KRRR.IA..EVG.AVQNFVRRIGY.P.....Q...PRIQP...L.....T.D	1314
BfKif1	DFI.SARRKRQR.LA..EID.AAQPLLRRIA..S.....S...P.V.P...I.....TIP	1396
AnKif1	DYI.TSRRRRRR.IA..ELN.AA.....K.G.....A.....L.....S..	1408
ChKif1	DFI.NVEKRRRR.VA..EIE.TA....R.S.....V.....L.....S..	1455
UmKin3	DHAALVQRERRR..AEVEGVRATLK.....	1436
CeUnc104	EHQWELEKLTRL...QOVERVRLFLRLR.DRLKGKKNKG.....	1326
DdUnc104	DHQWELEKLTRL...EEVGRMRHLLLR.ERLGMDTNPNTTKTEKDVCLAAARAAT..	1407
KIF1ba	LQQQEITKQLRR...QNVPHRFIPPENRKRPRFPFKSNPK.....	967
Nkin2	GVD...DT.....GDDSD.LP...P.....PKTN..SETDS.....I.AEL.L	1456
Gmkif1	1086
GzKif1	D.DLLNDTPETSQTLDDDDDEQPAEDAPQAEHSEETPQLEAGESETETERQEEARSEIDA	1497
MgKif1	.D...DA.....LDE.D.IP...P.....PKLP...DDIES.....I.NEL.L	1338
BfKif1	APS.IPQVVE....LDPAD.IP...LP.....VSP..P...ATTEN....FPSPLSI	1430
AnKif1	..A...NS.....LT...V.....A...SPPRS.....GR...	1422
ChKif1	..S...KA.....LS...IP.....T...SALAS.....SK...	1470
UmKin3GRS.....A	1440
CeUnc104EARTPVSP.....	1334
DdUnc104SPVHMVIQSPQTP.....	1421
KIF1baHRNSWSPG.....	975
Nkin2	..Q...DDPPEVPE.L.PTPQ.E.....G...P..SP..EDEVAP.RAE.TEQ...	1487
Gmkif1	1086
GzKif1	AEQNGSDVP.E.SEGL.E.DQ.E.....GQEGHPEENGV.EE.VA...SEKSDA.VD	1538
MgKif1	..Q...DTP.EVSQVLS.PA.ETN.....G.EAEPK.TP..TD..AG..SE.GEAGI.	1374
BfKif1D...E.A..L.P.SSVD.....G...NA..LGIHRD..GQFNNEITEK.I.	1459
AnKif1S...T.P..L.R.AQ.E.....P.....D.....RR.VKL.L.	1438
ChKif1D...K.P..L...D.....D...A...QR.A.L.L.	1482
UmKin3	MMRNVDDANAESKEELAAARVVAVWQ.....RAVR.....D.....SKVGVV	1476
CeUnc104CDPVCAIPESIKLD.EKDKGIVGKVLGLIRRKIPMN.KDPPTGNKAQELSDES	1387
DdUnc104VKDPQOIIIPEREYNQREQD.....LMLKCLKLVQGRYTKSEANDTQTQSDVSPS	1470
KIF1baTHIIITEDEVIELRIP.....KDEEGRKENKEESQEKVG	1009
Nkin2EE..QTNSA.ELNQPT....D..STKSP...EYTD.AQTYLL...NR....	1519
Gmkif1	1086
GzKif1	A.....EED.ETVQV.E..EPP...PP.PPPK..P...EY.DEEQTDLL...NK....	1570
MgKif1EP..EP.EA.E..EPTLTISDLAAVK..P...EY.DERESALL...TK....	1407
BfKif1ESAIDTGSIPH..DPS...QE..QEK..PQNQSEY.NPHQTALLQKFTKYFHL	1502
AnKif1Q...KYVDL.W...T.....A.RTDP.....IDV.ILI..RD....	1459
ChKif1Q...RIISL.W..K.T.....K.KA.P.....AEI.IL...NS....	1502
UmKin3	I.....GVQPSINAASAGTCTKTGADGLVGMFAAPSAVDGTNGLGIDNLSASSS....	1526
CeUnc104	NSITSPVSDKSLIKSS.....RS.....SDLLCRQ.....	1412
DdUnc104DEGCADMTVSC.....IS.....SNSMENN.....	1490
KIF1ba	RAASRDVQSAWGTRSQDHIQVSKQHISNQPPPQLRWR.....SNSLNNGQP....	1056
Nkin2	CLK...LWQR.Y..P..D..PT..AKIL...S.PANTD....P.PT...DGY...A.DS	1550
Gmkif1	1086
GzKif1	CLK...LWKK.Y..P..D..PSD.N.IL...S.LTNMA....P.PT...DGL...TTDA	1602
MgKif1	CYE...LLKP.H..P..D..PLQ.A.IL...S.PLNTS....P.PA...NGV...T.EA	1438
BfKif1	CRDPSTTILTPTNIEPPINGSAP.S.LFHTTSFTSNTSRNSPRPSNFSNSLHPSTANS	1560
AnKif1	..N...T.E....P.....PERGA.AF...A.SRGKS...PSSN...N...T.N.	1483
ChKif1	T.N...L.E....P.....PTNGA.AF...A.PRSSS...PSPS...P...T...	1526
UmKin3P.....AKIERTRSTWSSTAPAPAPAPSAP.....	1551
CeUnc104KSKSDQNLASNDDIVDNLGGMKRS.....	1436
DdUnc104KFVIRRRLLCSPDRADAPNGWEAPA.....	1514
KIF1baKTTRCQATAS.....	1066

Anhang

Nkin2IS.DQ.KSTL.EFV....ASVIR.VPKNPVLKGGYLLVPNSDA.TKWN	1590
Gmkif1	1086
GzKif1P.AQ.PTL...V....ATVIR.VPKNPVKLGGYLLMIPNSDS.TRWV	1638
MgKif1P.EE.APRL...V....TTIVK.ATRNPKLMKGGYLLVPSSDS.TRWI	1475
BfKif1	RQTSRSRQTSPIPHAHPKPSIPQHL....ATISQ.IKKNPSVLKAGMLLVPSADS.TKWI	1614
AnKif1DNEE.QGSL...TPRFYATV.OTLPKNPSASKTGILLMPD.DTYTHWA	1525
ChKif1P.....SL...T...ATV.RFIPKNPNLMKASYLLTPD.PTNTRWT	1559
UmKin3AAPAALTAIVALLPRTATTSHRGYLWIPILETITDTV	1588
CeUnc104LSGSRIQLNILVP....EVLEERVGVVSVKKGVMNFLEEK.QGWT	1478
DdUnc104PATQPALPLRLYVP....ELEEIRVSPVVARKGLLNVLHGG.SGWK	1556
KIF1baS.....ESLNSHSGHPTAD.....LQT...FQAK	1087
Nkin2	KRFVELRRPYLHIHSVA..D.GEEVGIVSLRNSRVDSQPGLGLLNDYDYGSGGGFGGS	1647
Gmkif1	1086
GzKif1	KRFVELRRPYLHLHSAT..D.GDEVGLISLRNSRVDSQPGVMGLL...Q.....G..	1682
MgKif1	KRFVELRRPYLHIHSVS..D.GEEVGIVSLRNSRVDSQPGILGLM...E...AGGHG..	1523
BfKif1	RRFVELRRPYLHIHAVAGPNSGEEVNVVGLRNARVDHSPETAKLLRN..ER..QGGSG..	1668
AnKif1	RRFVELRRLPYLHIYSVP..E.GDEINAINLRNARVDHAPDFARLL.....D..	1568
ChKif1	RRYVELRKPYPYLIYST...D.GDEINAINISTARIDHSPQIAKLL.....G..	1601
UmKin3	RRFLVLRPFLHIYESN..AQVDEVMVINVEAVRVEYDENTERLLGK.....	1633
CeUnc104	RRWVIVRRPYILLFRDDR..DLVIRGIINLANARIEHSEDQAMVKV.....	1523
DdUnc104	KRWVIVRRPYVFIYRSEK..DPVERAVLNLATAHVECESDQAMVKI.....	1601
KIF1ba	RHIHQHRQPYCNYNTGG.....QVEGSTA...SCCQKQTDKP.....	1121
Nkin2	DDGYGLLDNLNGNMDNNNRAANGRPSGLLDTIMSGSGSGGRVSNISNISTPQORRSPS.	1706
Gmkif1	1086
GzKif1PT...D...SG...S...Q.....GQ...NGQ.	1694
MgKif1	..Y.....D.....PS...D...DG.....Q.....PQ...SPEQ	1537
BfKif1NAS...R...NSSPA...S...AG...A...Q.....Q...SWS.	1686
AnKif1G.....P.....	1570
ChKif1G.....V.....Q...N.Q.	1606
UmKin3QN.....	1635
CeUnc104	1523
DdUnc104	1601
KIF1ba	1121
Nkin2	ALLISSLWPTFSPLSPNPMTAAGARSSH..S.RLASGGNRTSA.VSLRSN.TSSPASST	1761
Gmkif1	1086
GzKif1EG.P..D.F.TP.....G...H..R.RTGSG..R..V.IS..TIWTG...SG.	1720
MgKif1	AY..DET.P..SPAPRPR.QTS.G...H..R.RTSSG..R..L.IS..SIWTG..FS..	1572
BfKif1NN....G.I.GG...IY.G...YGGRGRSGSG....MGMG...I.MG..YGGR	1716
AnKif1G.....A...D..	1573
ChKif1H.....SN.....S.....A...N..	1612
UmKin3	1635
CeUnc104	1523
DdUnc104	1601
KIF1ba	1121
Nkin2	GTLAATTTTNNNGPLSSSGPSLQQGGLSRLSER.LQAGVFAIYGTDNTWLFAARSEKD	1820
Gmkif1	1086
GzKif1	GN.AS.A...G.G...SG..L..QR...LPDR.MQSAVFAIYGTDNTWLFAARSERD	1760
MgKif1	G..ASRA...NGNG...AG..L..AG...LSER.LQAGVFAIYGTDNTWLFAARSERD	1614
BfKif1	GN.GN.A...NGNG...NG...E.....SRREIETVFAVYGTNNTWLFARASERE	1756
AnKif1	G...S.....S.....QG.....RP.N..VFAVYGPQNTFLFAARTEAQ	1601
ChKif1	G...S.....G.G...AG..V..Y.....K..DV.VFAVFARSNTYIFRARSERE	1643
UmKin3VFAVYTANNSYFFQADSDKD	1655
CeUnc104PNTFSVCTNQRGFLMQMMPGDE	1545
DdUnc104PNTFSVVTKHRGYLLQTLGDKE	1623
KIF1baSHCNQFVTPPMRROQFSAPN..	1141

Anhang

Nkin2	KMDWIWKIDQSYMMTSPSASVAGSRGGSRAGSARGSRVSPSPGARRTSAR.V.SQ..LR	1876
Gmkif1S	1087
GzKif1	KMDWIFRIDQTY.LAG.NDSIPGS..GI.S.SP....Y....PG....S.D.F	1793
MgKif1	KLDWIFRIDQSY.VAS.SAS.A.S..GA.A.SPL.PRHVR.DPN.REDEGDDF.SHGGG.	1661
BfKif1	KVEWIWKIDQGY.FSG.GGGRAGN..GS.GNNSR.GRR...DDG.SGDS.DDVAEVDVD	1805
AnKif1a	KVEWILKIDETY.FSN.NAPRA...GA...TT.....N.R...S...GR	1630
ChKif1	KIEWILRLDQSY.FSS.G..E....GS.....E.E...S...A	1666
UmKin3	RQVWMKLLDGSYNGDAGHVFC	1676
CeUnc104	MYDWLYAINPLMAGQMKLHGNQNTTLKSPTSSSSIAA.....S	1584
DdUnc104	VHDWLYAINPLLAGQIKSRLARRTLEPASQTASQIQATNAANANSASK	1671
KIF1bLKAGRETTV	1150

Nkin2	F	1877
Gmkif1		
GzKif1		
MgKif1R	1662
BfKif1	VDRELYAD	1814
AnKif1a		
ChKif1		
UmKin3		
CeUnc104		
DdUnc104		
KIF1b		

Abb. 36. Vergleich der Aminosäuresequenz von Nkin2 und homologen Proteinen

Verwendet wurde das Programm DNAMAN (Lynnon BioSoft, Vaudreuil, Canada). An = *Aspergillus nidulans*; Bf = *Botryotinia fuckeliana*; Ce = *Caenorhabditis elegans*; Ch = *Cochliobolus heterostrophus*; Dd = *Dictyostelium discoideum*; Gm = *Gibberella moniliformis*; Gz = *Gibberella zeae*; Mg = *Magnaporthe grisea*; Mm = *Mus musculus*; Um = *Ustilago maydis*

Die folgende Abb. 37 enthält ein Alignment über die Gesamtlänge Nkin3-homologer Proteine

Datenbankzugangsnummern:

Nkin3:	NCU03715.1
GmKlp7:	AY230443
ChKlp7:	AY230432
MmKif1C:	AB001456
HsKif1C:	AB001456

Nkin3MFNLLQLRFR	10
GmKlp7	MGPLGPSPLLLNQSKPVLHIQGTPATAPSNVNDAGKQKIPTREDGEMWVILRHRLHDSID	60
BfKlp7	0
ChKlp7	0
MmKif1C	0
HsKif1C	0
Nkin3	NTIVDIEDTLYDISLEPRLMPNSLDVHQRQTRSNVSTPTLRPRDDTASSFVSKDPGANVR	70
GmKlp7	NANSILMTMALDSRLMPSPSSPSASFYEGRVHSSASTPSLRSRDAALSMPARMEGGGNVK	120
BfKlp7MAIVPRLMPGMGMGVVSTASTPSLRSRRDSVSTARDAA.GNVR	43
ChKlp7MYPLHTTASAPSMRASAEISYAHMSPTPIINDDPGNVK	38
MmKif1C	0
HsKif1C	0

Anhang

Nkin3LRNPIKVSSFP T T S L A M S A G D S T V P L M A M G E V S T A H G R K M E N K L V D D P F V	589
GmKlp7LKNPIPPVAVKPEGEVDEQDKENASEYSEYDDDQYDSESTAYGEDELQEE	623
BfKlp7LKNPIKVEPARTISVGSFTFGNGDELGQHKENRTIDEAINEEEGYEYEF S	444
ChKlp7	RRHLALALGELKNPIVLP P P R E L G T P D F E N G E W L G E G D E V D R S M G A G G D A E A S D D D S D S G	545
MmKif1C	AELNETWEEKLRKTEALRMEREALLAEMGVAVREDGGTVGVFSPKKT P H L V N L N E D P L M S	511
HsKif1C	AELNETWEEKLRKTEALRMEREALLAEMGVAVREDGGTVGVFSPKKT P H L V N L N E D P L M S	511
Nkin3	DSGSGVTSDDDQGLIYGHDDYD T Y E E E D D D D E D T I D L S E K A H D M N E Y M S G L L K D L S M F R	649
GmKlp7	MQQYLQDMGNLRKLMQGD L T R F K N E N S A R M P L G A K E T L	661
BfKlp7	DEDAIDV G A R E E R A S E M Q G F M G D L L K D L N M F R K K I C D D K G R F G R E I T V N V V	496
ChKlp7	YDEGDQHDELAQELQNEAESFLQDLGLFRKKVGS D V E R F G M H E K L A G M M E N G L	598
MmKif1C	ECLLYHIKDG V T R V G Q V D V D I K L T G Q F I R E Q H C L F R S I P Q P D G E V M V T L E P C E G A E T Y V N	571
HsKif1C	ECLLYHIKDG V T R V G Q V D M D I K L T G Q F I R E Q H C L F R S I P Q P D G E V V T L E P C E G A E T Y V N	571
Nkin3	RKIGDDKTRFLDELGVRKPLGVRTNII	676
GmKlp7	661
BfKlp7	496
ChKlp7	598
MmKif1C	GKLVTELLVLKSGNRIVMGKNHVFRFNHPEQARLERERGVPPPPGPPSEPVDWNFAQKEL	631
HsKif1C	GKLVTEPLVLKSGNRIVMGKNHVFRFNHPEQARLERERGVPPPPGPPSEPVDWNFAQKEL	631
Nkin3	676
GmKlp7	661
BfKlp7	496
ChKlp7	598
MmKif1C	LEQQGIDIKLEMEKRLQDLENQYRKEKEEADL L L L E Q Q R L Y A D S D S G E D S D K R S C E E S W R L	691
HsKif1C	LEQQGIDIKLEMEKRLQDLENQYRKEKEEADL L L L E Q Q Q L Y A D S D S G D D S D K R S C E E S W R L	691
Nkin3	676
GmKlp7	661
BfKlp7	496
ChKlp7	598
MmKif1C	ISSLREQLPPTTVQNI V K R C G L P S S G K R R A P R R V Y Q I P Q R R R L Q G K D P R W A T M A D L K M Q A	751
HsKif1C	ISSLREQLPPTTVQTI V K R C G L P S S G K R R A P R R V Y Q I P Q R R R L Q G K D P R W A T M A D L K M Q A	751
Nkin3	676
GmKlp7	661
BfKlp7	496
ChKlp7	598
MmKif1C	VKEICYEVALADFRHGRAEIEALAALKMREL CRT Y G K P E G P G D A W R A V A R D V W D T V G E E E	811
HsKif1C	VKEICYEVALADFRHGRAEIEALAALKMREL CRT Y G K P D G P G D A W R A V A R D V W D T V G E E E	811
Nkin3	676
GmKlp7	661
BfKlp7	496
ChKlp7	598
MmKif1C	GCGGG . GGGSEEGARGAEVEDLRAHIDKLTGILQEVK L Q N S S K D R E L Q A L R D R M L R M E R V	870
HsKif1C	GGGAGSGGGSEEGARGAEVEDLRAHIDKLTGILQEVK L Q N S S K D R E L Q A L R D R M L R M E R V	871
Nkin3	676
GmKlp7	661
BfKlp7	496
ChKlp7	598
MmKif1C	IPLTQDLEDDNDESGLV T W A P P E G P E A V E E T V P N D H S P A V R P T S P P L S S W E R V S R L M E E D	930
HsKif1C	IPLAQDHEDENE E G G E V P W A P P E G S E A A E E A A P S D R M P S A R P P S P P L S S W E R V S R L M E E D	931

Anhang

Nkin3	676
GmKlp7	661
BfKlp7	496
ChKlp7	598
MmKif1C	PAFRRGRLRLWLKQEQLRLQGLQGAGGRGGGLRRPPARFVPPHDCCLRFPFKSNPQHRESW	990
HsKif1C	PAFRRGRLRLWLKQEQLRLQGLQGLWGPGRGVRRPPARFVPPHDCNVRFPFKSNPQHRESW	991
Nkin3	676
GmKlp7	661
BfKlp7	496
ChKlp7	598
MmKif1C	PGMGSGEAPAP.QPPEEVTVPPAPPNRRPPSPRRPHRSRRNSLDGGSRSRGGGSTQPEPQ	1049
HsKif1C	PGMGSGEAPTPLQPPEEVTTPHPATPARRPPSPRRSHHPRRNSLDGGGRSRGAGSAQPEPQ	1051
Nkin3	676
GmKlp7	661
BfKlp7	496
ChKlp7	598
MmKif1C	RLRPQKHNGYPQQPQPSPAQR.PGPRYPPTYTTPPRMRRQRSAPDLKESGAAV	1100
HsKif1C	HFQPKKHNSYPQPPQPYPAQRPPGPRYPPTYTTPPRMRRQRSAPDLKESGAAV	1103

Abb. 37. Alingment von Nkin3 und homologen Proteinen

Zur Darstellung des Alignments wurde ebenfalls das Programm DNAMan verwendet (Lynnon BioSoft, Vaudreuil, Canada). Bf = *Botryotinia fuckeliana*; Ch = *Cochliobolus heterostrophus*; Gm = *Gibberella moniliformis*; Hs = *Homo sapiens*; Mm = *Mus musculus*

9 Literaturverzeichnis

- Aist, J. R. und Bayles, C. J. (1991). Organelle motility within mitotic asters of the fungus *Nectria haematococca*. Eur J Cell Biol **56**: 358-363.
- Alberghina, F. A. M., Trezzi, F. und Signorini, R. C. (1974). The biogenesis of mitochondria in *Neurospora crassa*: ultrastructural changes induced by nutrients. Cell Differentiation **2**: 307-317.
- Bachewich, C. und Heath, I. B. (1998). Radial F-actin array precede new hypha formation in *Saprolegnia*: implications for establishing polar growth and regulating tip morphogenesis. J Cell Sci. **111** (Pt 14): 2005-2016.
- Bereiter-Hahn, J. und Voth, M. (1994). Dynamics of mitochondria in living cells: shape changes, dislocations, fusion, and fission of mitochondria. Microsc Res Tech **27** (3): 198-219.
- Berger, K. L., Sogo und Yaffe, M. P. (1997). Mdm12p, a component required for mitochondrial inheritance that is conserved between budding and fission yeast. J Cell Biol. **136**: 545-553.
- Bernardi, P. (1999). Mitochondria in muscle cell death. Ital J Neurol Sci. **20** (6): 395-400.
- Bernardi, P., Petronilli, V., Di Lisa, F. und Forte, M. (2001). A mitochondrial perspective on cell death. Trends Biochem Sci **26** (2): 112-117.
- Birnboim, H. C. und Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Res. **7** (6): 1513-1523.
- Bleazard, W., McCaffery, J. M., King, E. J., Bale, S., Mozdy, A., Tieu, Q., Nunnari, J. und Shaw, J. M. (1999). The dynamin-related GTPase Dnm1 regulates mitochondrial fission in yeast. Nat Cell Biol. **1**: 298-304.
- Bloom, G. S. (2001a). The UNC-104/KIF1 family of kinesins. Curr. Opin. Cell Biol. **13** (1): 36-40.
- Bloom, G. S., Wagner, M. C., Pfister, K. K. und Brady, S. T. (1988). Native structure and physical properties of bovine brain kinesin and identification of the ATP-binding subunit polypeptide. Biochemistry **27**: 3409-3416.
- Bloom, K. (2001b). Nuclear migration: cortical anchors for cytoplasmic dynein. Curr. Biol. **11**: R326-329.
- Blum, H., Beier, H. und Gross, H. J. (1987). Improved silverstaining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. Electrophoresis **8**: 93-99.
- Boldogh, I., Vojtov, N., Karmon, S. und Pon, L. A. (1998). "Interaction between mitochondria and the actin cytoskeleton in budding yeast requires two integral mitochondrial outer membrane proteins, Mmm1p and Mdm10p." J Cell Biol **141** (6): 1371-1381.
- Boldogh, I. R., Nowakowski, D. W., Yang, H. C., Chung, H., Karmon, S., Royes, P. und Pon, L. A. (2003). A protein complex containing Mdm10p, Mdm12p, and Mmm1p links mitochondrial membranes and DNA to the cytoskeleton-based segregation machinery. Mol Biol Cell **14** (11): 4618-4627.
- Boldogh, I. R., Yang, H. C., Nowakowski, W. D., Karmon, S. L., Hays, L. G., Yates, J. R. und Pon, L. A. (2001). Arp2/3 complex and actin dynamics are required for actin-based mitochondrial motility in yeast. Proc Natl Acad Sci U S A **98** (6): 3162-3167.
- Bowman, E. J. und Knock, T. E. (1992). Structures of the genes encoding the α and β subunits of the *Neurospora crassa* mitochondrial ATP synthase. Gene **114**: 157-163.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. **72**: 248-254.
- Brady, S. T. (1985). A novel brain ATPase with properties expected for the fast axonal transport motor. Nature **317**: 73-75.

- Brazer, S. C., Williams, H. P., Chappell, T. G. und Cande, W. Z. (2000). A fission yeast kinesin affects Golgi membrane recycling. Yeast **16** (2): 149-66.
- Brendza, R. P., Serbus, L. R., Duffy, J. B. und Saxton, W. M. (2000). A function for kinesin I in the posterior transport of oskar mRNA and Stauf protein. Science **289** (5487): 2120-2122.
- Brent Heath, I., Bonham, M., Akram, A. und Gupta, G. (2003). The interrelationships of actin and hyphal growth in the ascomycete *Geotrichum candidum*. Fung. Genet. Biol. **38** (1): 85-97.
- Brinster, R. L., Allen, J. M., Behringer, R. R., Gelinas, R. E. und Palmiter, R. D. (1988). Introns increase transcriptional efficiency in transgenic mice. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **85** (836-840).
- Brown, J. R., Stafford, P. und Langford, G. M. (2004). Short-range axonal/dendritic transport by myosin-V: A model for vesicle delivery to the synapse. J Neurobiol. **58** (2): 175-188.
- Buchmann, A. R. und Berg, P. (1988). Comparison of intron-dependent and intron-independent gene expression. Mol. Cell. Biol. **8**: 4395-4405.
- Burgess, S. M., Delannoy, M. und Jensen, R. E. (1994). *MMM1* encodes a mitochondrial outer membrane protein essential for establishing and maintaining the structure of yeast mitochondria. J Cell Biol **126** (6):1375-1391.
- Case, R. B., Rice, S. S., Hart, C. L., Ly, B. und Vale, R. D. (2000). Role of the kinesin neck linker and catalytic core in microtubule-based motility. Curr. Biol. **10** (3): 157-160.
- Cervený, K. L., McCaffery, J. M. und Jensen, R. E. (2001). Division of mitochondria requires a novel DMN1-interacting protein, Net2p. Mol Biol Cell **12** (2): 309-321.
- Choi, T., Huang, M., Gorman, C. und Jaenisch, R. (1991). A generic intron increases gene expression in transgenic mice. Mol Biol Cell **11**: 3070-3074.
- Cole, D. G. (1999). Kinesin-II, the heterodimeric kinesin. Cell. Mol. Life Sci. **56**: 217-226.
- Cole, D. G. und Scholey, J. M. (1995). Structural variations among the kinesins. Trends Cell Biol. **5**: 259-262.
- Conforti, L., Buckmaster, A., Tarlton, M., Brown, M.C., Lyon, M. F., Perry, V. H. und Coleman, P. (1999). The major brain isoform of kif1b lacks the putative mitochondria-binding domain. Mamm Genome **10** (6): 617-622.
- Conforti, L., Dell'Agnello, C., Calvaresi, N., Tortarolo, M., Giorgini, A., Coleman, M. P. und Bendotti, C. (2003). Kif1Bbeta isoform is enriched in motor neurons but does not change in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. J Neurosci Res **71** (5): 732-739.
- Cottingham, F. R. und Hoyt, M. A. (1997). Mitotic spindle positioning in *Saccharomyces cerevisiae* is accomplished by antagonistically acting microtubule motor proteins. J Cell Biol. **138**: 1041-1053.
- Dagenbach, E. M. und Endow, S. (2004). A new kinesin tree. J Cell Sci. **117** (Pt 1): 3-7.
- Davis, R. H. und de Serres, F. J. (1970). Genetic and microbial research techniques for *Neurospora crassa*. Methods Enzymol. **17A**: 79-143.
- De Vos, K., Goossens, V., Boone, V., Vercammen, V., Vancompernelle, V., Vandenaabeele, V., Haegeman, V., Fiers, V und Grooten, V (1998). The 55-kDa tumor necrosis factor receptor induces clustering of mitochondria through its membrane-proximal region. J Biol Chem **273** (16): 9673-9680.
- De Vos, K. J., Sable, J., Miller, K. E. und Sheetz, M. P. (2003). Expression of phosphatidylinositol (4,5) bisphosphate-specific pleckstrin homology domains alters direction but not the level of axonal transport of mitochondria. Mol Biol Cell **14** (9): 3636-3649.
- DePina, A. S. und Langford, G. M. (1999). Vesicle transport: the role of actin filaments and myosin motors. Microsc Res Tech **47** (2): 93-106.

- Dimmer, K. S., Fritz, S., Fuchs, F., Messerschmitt, M., Weinbach, N., Neupert, W. und Westermann, B. (2002). Genetic basis of mitochondrial function and morphology in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Biol. Cell **13**: 847-853.
- Dörner, C., Ciossek, T., Muller, S., Moller, P. H., Ullrich, A. und Lammers, R. (1998). Characterization of KIF1C, a new kinesin-like protein involved in vesicle transport from the Golgi apparatus to the endoplasmic reticulum. J Biol Chem **273** (32): 20267-20275.
- Drubin, D. G., Jones, H. D. und Wertman, K. F. (1993). Actin structure and function: roles in mitochondrial organization and morphogenesis in budding yeast and identification of the phalloidin-binding site. Mol Biol Cell **4** (12): 1277-1294.
- Durocher, D., Henckel, J., Fersht, A. R. und Jackson, S. P. (1999). The FHA domain is a modular phosphopeptide recognition motif. Mol Cell **4** (3): 387-394.
- Durocher, D. und Jackson, S. P. (2002). The FHA domain. FEBS Lett **513** (1): 58-66.
- Ebbole, D. J. und Sachs, M. S. (1990). A rapid and simple method for isolation of *Neurospora crassa* homokaryons using microconidiation. Fung. Genet. Newsl. **37**: 17-18.
- Endow, S. A. (1999). Determinants of molecular motor directionality. Nat Cell Biol. **1**: E163-E167.
- Fekkes, P., Shepard, K. A. und Yaffe, M. P. (2000). Gag3p, an outer membrane protein required for fission of mitochondrial tubules. J Cell Biol. **151**: 333-340.
- Folco, H. D., Freitag, M., Ramon, A., Temporini, E. D., Alvarez, M. E., Garcia, I., Scazzocchio, C., Selker, E. U. und Rosa, A. L. (2003). Histone H1 is required for proper regulation of pyruvate decarboxylase gene expression in *Neurospora crassa*. Eukaryot Cell **2** (2): 341-350.
- Freitag, M., Ciuffetti, L. M. und Selker, E. U. (2001). Expression and visualization of green fluorescent protein (GFP) in *Neurospora crassa*. Fungal Genet. Newsl. **48**: 15-19.
- Frey, T. G., Renken, C. W. und Perkins, G. A. (2002). Insight into mitochondrial structure and function from electron tomography. Biochim Biophys Acta. **1555** (1-3): 196-203.
- Fritz, S., Rapaport, D., Klanner, E., Neupert, W. und Westermann, B. (2001). Connection of the mitochondrial outer and inner membranes by Fzo1 is critical for organellar fusion. J Cell Biol. **152**: 683-692.
- Fuchs, F., Prokisch, H., Neupert, W. und Westermann, B. (2002). Interaction of mitochondria with microtubules in the filamentous fungus *Neurospora crassa*. J Cell Sci **115** (Pt 9): 1931-1937.
- Galagan, J. E., Calvo, S. E., Borkovich, K. A., Selker, E. U., Read, N. D., Jaffe, D., FitzHugh, W., Ma, L. J., Smirnov, S., Purcell, S., Rehman, B., Elkins, T., Engels, R., Wang, S., Nielsen, C. B., Butler, J., Endrizzi, M., Qui, D., Ianakiev, P., Bell-Pedersen, D., Nelson, M. A., Werner-Washburne, M., Selitrennikoff, C. P., Kinsey, J. A., Braun, E. L., Zelter, A., Schulte, U., Kothe, G. O., Jedd, G., Mewes, W., Staben, C., Marcotte, E., Greenberg, D., Roy, A., Foley, K., Naylor, J., Stange-Thomann, N., Barrett, R., Gnerre, S., Kamal, M., Kamvysselis, M., Mauceli, E., Bielke, C., Rudd, S., Frishman, D., Krystofova, S., Rasmussen, C., Metzenberg, R. L., Perkins, D. D., Kroken, S., Cogoni, C., Macino, G., Catcheside, D, Li, W., Pratt, R. J., Osmani, S. A., DeSouza, C. P., Glass, L., Orbach, M. J., Berglund, J. A., Voelker, R., Yarden, O., Plamann, M., Seiler, S., Dunlap, J., Radford, A., Aramayo, R., Natvig, D. O., Alex, L. A., Mannhaupt, G., Ebbole, D. J., Freitag, M., Paulsen, I., Sachs, M. S., Lander, E. S., Nusbaum, C. und Birren, B. (2003). The genome sequence of the filamentous fungus *Neurospora crassa*. Nature **422** (6934): 859-868.
- Gavin, R. H. (1997). Microtubule-microfilament synergy in the cytoskeleton. Int Rev Cytol. **173**: 207-242.
- Giaver, G., Chu, A. M., Ni, L., Connelly, C., Riles, L., Veronneau, S., Dow, S., Lucau-Danila, A., Anderson, K., Andre, B., Arkin, A. P., Astromoff, A., El-Bakkoury, M., Bangham, R., Benito, R., Bracha, S.t, Campanaro, S., Curtiss, M., Davis, K., Deutschbauer, A., Entia, K. D., Flaherty, P., Foury, F., Garfinkel, D. J., Gerstein, M., Gotte, D., Giuldener, U., Hegemann, J. H., Hempel, S., Herman, Z., Jaramillo, D. F., Kelly, D. E., Kelly, S. L., Kotter, P., LaBonte, D., Lamb, D. C., Lan, N., Liang, H., Liao, H., Liu, L., Luo, C., Lussier, M., Mao, R., Menard, P., Ooi, S. L., Revuelta, J. L., Roberts, C. J., Rose, M. D., Ross-MacDonald, P., Scherens, B., Schimmack, G., Shafer, B., Shoemaker, D. D., Sookhai-Mahadeo, S., Storms, R. K., Strathern, J. N., Valle, G.,

- Voet, M., Volckaert, G., Wang, C. Y., Ward, T. R., Wilhelmy, J., Winzeler, E. A., Yang, Y., Yen, G., Youngman, E., Yu, K., Bussey, H., Boeke, J. D., Snyder, M., Philippsen, P., Davis, R. W. und Johnston, M. (2002). Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. Nature **418**: 387-391.
- Gibbons, P. M. und Rowe, A. J. (1965). Dynein: a protein with adenosine triphosphatase activity from cilia. Science **149**: 424-426.
- Goldstein, L. S. (2001). Molecular motors: from one motor many tails to one motor many tales. Trends Cell Biol. **11** (12): 477-482.
- Goldstein, L. S. und Yang, Z. (2000). Microtubule-based transport systems in neurons: the roles of kinesins and dyneins. Annu. Rev. Neurosci. **23**: 39-71.
- Gong, T. W., Winnicki, R. S., Kohrman, D. C. und Lomax, M. I. (1999). A novel mouse kinesin of the UNC-104/KIF1 subfamily encoded by the Kif1b gene. Gene **239** (1): 117-127.
- Goode, B. L., Drubin, D. G. und Barnes, G. (2000). Functional cooperation between the microtubule and actin cytoskeletons. Curr. Opin. Cell Biol. **12** (1): 63-71.
- Gow, N. A. und Gadd, G. M. (1994). The Growing Fungus. Chapmann and Hall, London.
- Grad, L. I., Descheneau, A. T., Neupert, W., Lill, R. und Nargang, F. E. (1999). Inactivation of the *Neurospora crassa* mitochondrial outer membrane protein TOM70 by repeat-induced point mutation (RIP) causes defects in mitochondrial protein import and morphology. Curr Genet **36**(3): 137-146.
- Grummt, M., Pistor, S., Lottspeich, F. und Schliwa, M. (1998). Cloning and functional expression of a "fast" fungal kinesin. FEBS Lett. **427**: 79-84.
- Guan, K., Farh, L., Marshall, T. K. und Deshenes, R. J. (1993). Normal mitochondrial structure and genome maintenance in yeast requires the dynamin-like produkt of the *MGMI* gene. Curr. Genet. **24**: 141-148.
- Guthrie, C. und Fink, G. R. (1991). Guide to yeast genetics and molecular biology. Methods Enzymol.: 174.
- Harlow, E. und Lane, D. (1988). Antibodies: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Haseloff, J., Siemering, K. R., Prasher, D. C. und Hodge, S. (1997). Removal of a cryptic intron and subcellular localization of green fluorescent protein are required to mark transgenic *Arabidopsis* plants brightly. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **94**: 2122-2127.
- Heath, I. B., Gupta, G. und Bai, S. (2000). Plasma membrane-adjacent actin filaments, but not microtubules, are essential for both polarization and hyphal tip morphogenesis in *Saprolegnia ferax* and *Neurospora crassa*. Fung. Genet. Biol. **30** (1): 45-62.
- Heck, M. M. (1999). Dr. Doolittle and the making of the mitotic spindle. Bioessays **21**: 985-990.
- Heim, R. und Tsien, R. Y. (1996). Engineering green fluorescent protein for improved brightness, longer wavelengths and fluorescence resonance energy transfer. Curr. Biol. **6**: 178-182.
- Herlan, M., Bornhövd, C., Hell, K., Neupert, W. und Reichert, A. S. (2004). Alternative topogenesis of Mgm1 and mitochondrial morphology depend on ATP and a functional import motor. J. Cell Biol. **165** (2): 167-173.
- Herlan, M., Vogel, F., Bornhövd, C., Neupert, W. und Reichert, A. S. (2003). Processing of Mgm1 by the rhomboid-type protease Pcp1 is required for maintenance of mitochondrial morphology and of mitochondrial DNA. J Biol Chem **278** (30): 27781-27788.
- Hermann, G. J., King, E. J. und Shaw, J. M. (1997). The yeast gene, *MDM20*, is necessary for mitochondrial inheritance and organization of the actin cytoskeleton. J Cell Biol. **137**: 141-153.
- Hermann, G. J. und Shaw, J. M. (1998). Mitochondrial dynamics in yeast. Annu Rev Cell Dev Biol **14**: 265-303.
- Hirokawa, N. (1998). Kinesin and dynein superfamily proteins and the mechanism of organelle transport. Science **279** (5350): 519-526.

- Hirokawa, N., Noda, Y. und Okada, Y. (1998). Kinesin and dynein superfamily proteins in organelle transport and cell division. Curr Opin Cell Biol **10** (1): 60-73.
- Hobbs, A. E., Srinivasan, M., McCaffery, J. M. und Jensen, R. E. (2001). Mmm1p, a mitochondrial outer membrane protein, is connected to mitochondrial DNA (mtDNA) nucleoids and required for mtDNA stability. J Cell Biol **152** (2): 401-410.
- Hollenbeck, P. J., Bray, D. und Adams, R. J. (1985). Effects of the uncoupling agents FCCP and CCCP on the saltatory movements of cytoplasmic organelles. Cell Biol Int Rep **9** (2): 193-199.
- Honlinger, A., Keil, P., Nelson, R. J., Craig, E. A. und Pfanner, N. (1995). Posttranslational mitochondrial protein import in a homologous yeast in vitro system. Biol Chem Hoppe Seyler **376** (8): 515-519.
- Howard, R. J. und Aist, J. R. (1980). Cytoplasmic microtubules and fungal morphogenesis: ultrastructural effects of methyl benzimidazole-2-ylcarbamate determined by freeze-substitution of hyphal tip cells. J Cell Biol **87**: 55-64.
- Huang, J. D., Brady, S. T., Richards, B. W., Stenolen, D., Resau, J. H., Copeland, N. G. und Jenkins, N. A. (1999). Direct interaction of microtubule- and actin-based transport motors. Nature **397** (6716): 267-270.
- Itoh, T., Watabe, A., Toh, E. A. und Matsui, Y. (2002). Complex formation with Ypt11p, a rab-type small GTPase, is essential to facilitate the function of Myo2p, a class V myosin, in mitochondrial distribution in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol Cell Biol **22** (22): 7744-7757.
- Iwabe, N. und Miyata, T. (2002). Kinesin-related genes from diplomonad, sponge, amphioxus, and cyclostomes: divergence pattern of kinesin family and evolution of giardial membrane-bounded organelle. Mol Biol Evol **19**(9): 1524-1533.
- Jacobs, C. W., Adams, A. E., Szaniszló, P. J. und Pringle, J. R. (1988). Functions of microtubules in the *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. J Cell Biol. **107**: 1409-1426.
- Jensen, R. E., Hobbs, A. E., Cervený, K. L. und Sesaki, H. (2000). Yeast mitochondrial dynamics: fusion, division, segregation, and shape. Microsc Res Tech **51** (6): 573-583.
- Kallipolitou, A., Deluca, D., Majdic, U., Lakämper, S., Cross, R., Meyhofer, E., Moroder, L., Schliwa, M. und Woehlke, G. (2001). Unusual properties of the fungal conventional kinesin neck domain from *Neurospora crassa*. EMBO J **20**: 6226-6235.
- Kamal, A., Almenar-Queralt, A., LeBlanc, J. F., Roberts, E. A. und Goldstein, L. S. (2001). Kinesin-mediated axonal transport of a membrane compartment containing beta-secretase and presenilin-1 requires APP. Nature **414** (6864): 643-648.
- Kamal, A., Stokin, G. B., Yang, Z., Xia, C. H. und Goldstein, L. S. (2000). Axonal transport of amyloid precursor protein is mediated by direct binding to the kinesin light chain subunit of kinesin-I. Neuron **28**: 449-459.
- Kapoor, M., Curle, C. A., Kalia, S. und Achari, Y. (2002). Minimal promoter for the NAD⁺-specific glutamate dehydrogenase gene of *Neurospora crassa*. Biochem Cell Biol **80** (2): 177-188.
- Kashina, A. S., Rogers, G. C. und Scholey, J. M. (1997). The bimC family of kinesins: essential bipolar mitotic motors driving centrosome separation. Biochim Biophys Acta. **1357**: 257-271.
- Khodjakov, A., Lizunova, E. M., Minin, A. A., Koonce, M. P. und Gyoeva, F. K. (1998). A specific light chain of kinesin associates with mitochondria in cultured cells. Mol Biol Cell **9** (2): 333-343.
- Kirchner, J., Woehlke, G. und Schliwa, M. (1999). Universal and unique features of kinesin motors: insights from a comparison of fungal and animal conventional kinesins. Biol. Chem. **380**: 915-921.
- Klopfenstein, D. R., Tomishige, M., Stuurman, N. und Vale, R. D. (2002). Role of phosphatidylinositol(4,5)bisphosphate organization in membrane transport by the Unc104 kinesin motor. Cell **109** (3): 347-358.

- Klopfenstein, D. R. und Vale, R. D. (2004). The Lipid Binding Pleckstrin Homology Domain in UNC-104 Kinesin is Necessary for Synaptic Vesicle Transport in *C. elegans*. Mol. Biol. Cell: E04-04-0326.
- Klopfenstein, D. R., Vale, R. D. und Rogers, S. L. (2000). Motor Protein Receptors: Moonlighting on other Jobs. Cell **103**: 537-540.
- Koch, K. V., Suelmann, R. und Fischer, R. (2003). Deletion of mdmB impairs mitochondrial distribution and morphology in *Aspergillus nidulans*. Cell Motil Cytoskeleton **55** (2): 114-124.
- Korb, M., Ke, Y. und Johnson, L. F. (1993). Stimulation of gene expression by introns: conversion of an inhibitory intron to a stimulatory intron by alteration of the splice donor sequence. Nucleic Acids Res. **21**: 5901-5908.
- Kumar, J., Yu, H. und Sheetz, M. P. (1995). Kinectin, an essential anchor for kinesin-driven vesicle motility. Science **267** (5205): 1834-1837.
- Kyhse-Anderson, J. (1984). Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. J. Biochem. Biophys. Meth. **10** (203-207).
- Lakämper, S., Kallipolitou, A., Woehlke, G. und Schliwa, M. (2003). Single fungal kinesin motor molecules move processively along microtubules. Biophys J **84**: 1833-1843.
- Langford, G. M. (1995). Actin- and microtubule-dependent organelle motors: interrelationships between the two motility systems. Curr Opin Cell Biol **7**: 82-88.
- Lazzarino, D. A., Boldogh, I., Smith, M. G., Rosand, J. und Pon, L. A. (1994). Yeast mitochondria contain ATP-sensitive, reversible actin-binding activity. Mol Biol Cell **5** (7): 807-818.
- Lee, S. B., Milgroom, M. G. und Taylor, J. W. (1988). A rapid, high yield mini-prep method for isolation of total genomic DNA from fungi. Fungal Genetics Newsl. **35**: 23.
- Lehmler, C., Steinberg, G., Snetselaar, K. M., Schliwa, M., Kahmann, R. und Bolker, M. (1997). Identification of a motor protein required for filamentous growth in *Ustilago maydis*. EMBO J **16**: 3464-3473.
- Lemmon, M. A. und Ferguson, K. M. (1998). Pleckstrin homology domains. Curr Top Microbiol Immunol **228**: 39-74.
- Li, J., G. Lee, I., Van Doren, S. R. und Walker, J. C. (2000). The FHA domain mediates phosphoprotein interactions. J Cell Sci **113 Pt 23**: 4143-4149.
- Ligon, L. A. und Steward, O. (2000). Movement of mitochondria in the axons and dendrites of cultured hippocampal neurons. J Comp Neurol **427**: 340-350.
- Lill, R. und Kispal, G. (2000). Maturation of cellular Fe-S proteins: an essential function of mitochondria. Trends Biochem Sci **25** (8): 352-356.
- Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C. und Wang, X. (1998). Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. Cell **94** (4): 481-490.
- Mandelkow, E. M., Hermann, M. und Rüh, U. (1985). Tubulin domains probed by limited protolysis and subunit-specific antibodies. J Mol Biol. **185**: 311-327.
- Marszalek, J. R., Liu, X., Roberts, E. A., Chui, D., Marth, J. D., Williams, D. S. und Goldstein, L. S. (2000). Genetic evidence for selective transport of opsin and arrestin by kinesin-II in mammalian photoreceptors. Cell **102** (2): 175-187.
- Martenson, C. H., Odom, A., Sheetz, M. P. und Graham, D. G. (1995). The effect of acrylamide and other sulfhydryl alkylators on the ability of dynein and kinesin to translocate microtubules *in vitro*. Toxicol Appl Pharmacol **133**(1): 73-81.

- Matsushita, M., Tanaka, S., Nakamura, N., Inoue, H. und Kanazawa, H. (2004). A novel kinesin-like protein, KIF1Bbeta3 is involved in the movement of lysosomes to the cell periphery in non-neuronal cells. Traffic **5** (3): 140-151.
- Matz, M. V., Fradkov, A. F., Labas, Y. A., Savitsky, A. P., Zaraisky, A. G., Markelov, M. L. und Lukyanov, S. A (1999). Fluorescent proteins from nonbioluminescent *Anthozoa* species. Nat. Biotechnol. **17**: 969-973.
- Mayer, A., Lill, R. und Neupert, W. (1993). Translocation and insertion of precursor proteins into isolated outer membranes of mitochondria. J Cell Biol **121** (6): 1233-1243.
- McConnell, S. J., Stewart, L. C., Talin, A. und Yaffe, M. P. (1990). Temperature-sensitive yeast mutants defective in mitochondrial inheritance. J Cell Biol **111** (3): 967-976.
- McDaniel, D. P. und Roberson, R. W. (2000). Microtubules Are required for motility and positioning of vesicles and mitochondria in hyphal tip cells of *Allomyces macrogynus*. Fungal Genet Biol **31** (3): 233-244.
- Miller, K. E. und Sheetz, M. P. (2004). Axonal mitochondrial transport and potential are correlated. J Cell Sci **117** (13): 2791-2804.
- Minke, P. F., Lee, I. H. und Plamann, M. (1999). Microscopic analysis of *Neurospora* roxy mutants defective in nuclear distribution. Fung. Genet. Biol. **28**: 55-67.
- Mok, H., Shin, H., Kim, S., Lee, J. R., Yoon, J. und Kim, E. (2002). Association of the kinesin superfamily motor protein KIF1Balpha with postsynaptic density-95 (PSD-95), synapse-associated protein-97, and synaptic scaffolding molecule PSD-95/discs large/zona occludens-1 proteins. J Neurosci **22** (13): 5253-5258.
- Moore, J. D. und S. A. Endow (1996). Kinesin proteins: a phylum of motors for microtubule-based motility. Bioessays **18**(3): 207-219.
- Morris, R. L. und Hollenbeck, P. J. (1993). The regulation of bidirectional mitochondrial transport is coordinated with axonal outgrowth. J Cell Sci. **104** (Pt 3): 917-927.
- Morris, R. L. und Hollenbeck, P. J. (1995). Axonal transport of mitochondria along microtubules and F-actin in living vertebrate neurons. J Cell Biol. **131** (5): 1315-1326.
- Mozdy, A., McCaffery, J. M. und Shaw, J. M. (2000). Dnm1p GTPase-mediated mitochondrial fusion is a multi-step process requiring the novel integral membrane component Fis1p. J Cell Biol. **151**: 367-379.
- Mulholland, J., Preuss, D., Moon, A., Wong, A., Drubin, D. und Botstein, D. (1994). Ultrastructure of the yeast actin cytoskeleton and its association with the plasma membrane. J Cell Biol **125** (2): 381-391.
- Nakagawa, T., Setou, M., Seog, D., Ogasawara, K., Dohmae, N., Takio, K. und Hirokawa, N. (2000). A novel motor, KIF13A, transports mannose-6-phosphate receptor to plasma membrane through direct interaction with AP-1 complex. Cell **103**(4): 569-581.
- Nakamura, N., Miyake, Y., Matsushita, M., Tanaka, S., Inoue, H. und Kanazawa, H. (2002). KIF1Bbeta2, capable of interacting with CHP, is localized to synaptic vesicles. J Biochem (Tokyo) **132** (3): 483-491.
- Nangaku, M., Sato-Yoshitake, R., Okada, Y., Noda, Y., Takemura, R., Yamazaki, H. und Hirokawa, N. (1994). KIF1B, a novel microtubule plus end-directed monomeric motor protein for transport of mitochondria. Cell **79** (7): 1209-1220.
- Nargang, F. E., Künkele, K. P., Mayer, A., Ritzel, R. G., Neupert, W. und Lill, R. (1995). 'Sheltered disruption' of *Neurospora crassa* MOM22, an essential component of the mitochondrial protein import complex. Embo J **14** (6): 1099-1108.
- Oakley, B. R. und Morris, N. R. (1980). Nuclear movement is beta-tubulin-dependent in *Aspergillus nidulans*. Cell **19** (1): 255-262.
- Okada, Y. und Hirokawa, N. (1999). A processive single-headed motor: kinesin superfamily protein KIF1A. Science **283** (5405): 1152-1157.

Literaturverzeichnis

- Okada, Y., Sato-Yoshitake, R. und Hirokawa, N. (1995). The activation of protein kinase A pathway selectively inhibits anterograde axonal transport of vesicles but not mitochondria transport or retrograde transport in vivo. J Neurosci **15** (4): 3053-3064.
- Osteryoung, K. W. (2001). Organelle fission in eukaryotes. Curr. Opin. Cell Biol. **4**: 639-646.
- Otsuga, D., Keegan, B. R., Brisch, E., Thatcher, J. W., Hermann, G. J., Bleazard, W. und Shaw, J. M. (1998). The dynamin-related GTPase, Dnm1p, controls mitochondrial morphology in yeast. J Cell Biol **143** (2): 333-349.
- Palade, G. E. (1953). An electron microscope study of mitochondrial structure. J Histochem Cytochem. **1** (4): 188-211.
- Palmiter, R. D., Sandgren, E. P., Avarbock, M. R., Allen, D. D. und Brinster, R. L. (1991). Heterologous introns can enhance expression of transgenes in mice. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **88** (478-482).
- Paschal, B. M., Shpetner, H. S. und Vallee, R. B. (1987). MAP1C is a microtubule-activated ATPase which translocates microtubules in vitro and has dynein-like properties. J Cell Biol. **105**: 1273-1283.
- Pereira, A. J., Dalby, B., Stewart, R. J., Doxsey, S. J. und Goldstein, L. S. (1997). Mitochondrial association of a plus end-directed microtubule motor expressed during mitosis in *Drosophila*. J Cell Biol **136** (5): 1081-1090.
- Ponting, C. P., Phillips, C., Davies, K. E. und Blake, D. J. (1997). PDZ domains: targeting signalling molecules to sub-membranous sites. Bioessays **19** (6): 469-479.
- Prokisch, H., Neupert, W. und Westermann, B. (2000). Role of *mmm1* in maintaining mitochondrial morphology in *Neurospora crassa*. Mol Biol Cell **11** (9): 2961-2971.
- Rapaport, D., Brunner, M., Neupert, W. und Westermann, B. (1998). Fzo1p is a mitochondrial outer membrane protein essential for the biogenesis of functional mitochondria in *Saccharomyces cerevisiae*. J Biol. Chem. **273**: 20150-20155.
- Requena, N., Albert-Segui, C., Winzenburg, E., Horn, C., Schliwa, M., Philippsen, P., Liese, R. und Fischer, R. (2001). Genetic evidence for a microtubule-destabilizing effect of conventional kinesin and analysis of its consequences for the control of nuclear distribution. Mol Microbiol. **42**: 121-132.
- Riquelme, M., Reynaga, P., Gierz, G. und Bartnicki-Garcia, S. (1998). What determines Growth Direction in Fungal Hyphae? Fung. Genet. Biol. **24** ((1/2)): 101-109.
- Rizzuto, R., Brini, M., De Giorgi, F., Rossi, R., Heim, R., Tsien, R. Y. und Pozzan, T. (1996). Double labelling of subcellular structures with organelle-targeted GFP mutants in vivo. Curr Biol **6** (2): 183-188.
- Rizzuto, R., Pinton, P., Carrington, W., Fay, F. S., Fogarty, K. E., Lifshitz, L. M., Tuft, R. A. und Pozzan, T. (1998). Close contacts with the endoplasmic reticulum as determinants of mitochondrial Ca²⁺ responses. Science **280**: 1763-1766.
- Rose, M. D., Winston, F. und Hieter, P. (1990). Methods in Yeast Genetics. Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Rowley, N., Prip-Buus, C., Westermann, B., Brown, C., Schwarz, E., Barrell, B. und Neupert, W. (1994). Mdj1p, a novel chaperone of the DnaJ family, is involved in mitochondrial biogenesis and protein folding. Cell **77** (2): 249-259.
- Saiki, R., Gelfrand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. und Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplifikation of DNA with athermostable DNA polymerase. Science **239** (487-491).
- Schah, J. V. und Cleveland, D. W. (2002). Slow axonal transport: fast motors in the slow lane. Curr. Opin. Cell Biol. **14**: 58-62.
- Scheffler, I. E. (2001). Mitochondria make a come back. Adv Drug Deliv Rev **49** (1-2): 3-26.

- Schliwa, M. und Woehlke, G. (2001). Molecular motors. Switching on kinesin. Nature **411**: 424-425.
- Schoch, C. L., Aist, J. R., Yoder, O. C. und Turgeon, B. G. (2003). A complete inventory of fungal kinesins in representative filamentous ascomycetes. Fung. Genet. Biol. **39**: 1-15.
- Scholey, J. M., Porter M.E., Grissom, P. M. und McIntosh, J. R. (1985). Identification of kinesin in sea urchin eggs, and evidence for its localization in the mitotic spindle. Nature **318** (6045): 483-486.
- Sebald, W. und Neupert, W. (1979). Preparation of *Neurospora crassa* mitochondria. Methods Enzymol. **55**: 144-148.
- Seiler, S., Kirchner, J., Horn, C., Kallipolitou, A., Woehlke, G. und Schliwa, M. (2000). Cargo binding and regulatory sites in the tail of fungal kinesin. Nat Cell Biol. **2** (6): 333-338.
- Seiler, S., Nargang, F. E., Steinberg, G. und Schliwa, M. (1997). Kinesin is essential for cell morphogenesis and polarized secretion in *Neurospora crassa*. EMBO J. **16**: 3025-3034.
- Seiler, S., Plamann, M. und Schliwa, M. (1999). Kinesin and dynein mutants provide novel insights into the roles of vesicle traffic during cell morphogenesis in *Neurospora*. Curr. Biol. **9**: 779-785.
- Sesaki, H. und Jensen, R. E. (2001). *UGO1* encodes an outer membrane protein required for mitochondrial fusion. J Cell Biol **152** (6): 1123-1134.
- Sesaki, H., Southard, S. M., Hobbs, A. E. und Jensen, R. E. (2003). Cells lacking Pcp1p/Ugo2p, a rhomboid-like protease required for Mgm1p processing, lose mtDNA and mitochondrial structure in a Dnm1p-dependent manner, but remain competent for mitochondrial fusion. Biochem Biophys Res Commun **308** (2): 276-283.
- Setou, M., Nakagawa, T., Seog, D. H. und Hirokawa, N. (2000). Kinesin superfamily motor protein KIF17 and mLin-10 in NMDA receptor-containing vesicle transport. Science **288** (5472): 1796-1802.
- Sharp, D. J., Rogers, G. C. und Scholey, J. M. (2000). Microtubule motors in mitosis. Nature **407** (6800): 41-47.
- Sharrocks, A. D. (1994). A T7 expression vector for producing N- and C-terminal fusion proteins with glutathione S-transferase. Gene **138** (1-2): 105-108.
- Shaw, J. M. und Nunnari, J. (2002). Mitochondrial dynamics and division in budding yeast. Trends Cell Biol **12** (4): 178-184.
- Shepard, K. A. und Yaffe, M. P. (1999). The yeast dynamin-like protein, Mgm1p, functions on the mitochondrial outer membrane to mediate mitochondrial inheritance. J Cell Biol **144** (4): 711-720.
- Siemering, K. R., Golbik, R., Sever, R. und Haseloff, J. (1996). Mutations that suppress the thermosensitivity of green fluorescent protein. Curr. Biol. **6**: 1653-1663.
- Simon, V. R. und Pon, L. A. (1996). Actin-based organelle movement. Experientia **52** (12): 1117-1122.
- Simon, V. R., Swayne, T. C. und Pon, L. A. (1995). Actin-dependent mitochondrial motility in mitotic yeast and cell-free systems: identification of a motor activity on the mitochondrial surface. J Cell Biol **130** (2): 345-354.
- Sogo, L. F. und Yaffe, M. P. (1994). Regulation of mitochondrial morphology and inheritance by Mdm10p, a protein of the mitochondrial outer membrane. J Cell Biol. **130**: 1361-1373.
- Sohal, R. S., Sohal, B. H. und Orr, W. C. (1995). Mitochondrial superoxide and hydrogen peroxide generation, protein oxidative damage, and longevity in different species of flies. Free Radic Biol Med **19** (4): 499-504.
- Southern, E. M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J Mol Biol. **98** (3): 503-517.
- Spellig, T., Bottin, A. und Kahmann, R. (1996). Green fluorescent protein (GFP) as a vital marker in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. Mol. Gen. Genet. **252**: 503-509.

- Staben, C., Jensen, B., Singer, M., Pollock, J., Schechtmann, M., Kinsey, J. A. und Selker, E. U. (1989). Use of bacterial hygromycin B resistance gene as a dominant selectable marker in *Neurospora crassa* transformation. Fung. Genet. Newsl. **36**: 79-81.
- Stearns, T. (1997). Motoring to the finish: kinesin and dynein work together to orient the yeast mitotic spindle. J Cell Biol **138** (5): 957-960.
- Steinberg, G. (2000). The cellular roles of molecular motors in fungi. Trends Microbiol. **8**: 162-168.
- Steinberg, G. und Schliwa, M. (1993). Organelle movements in the wild type and wall-less fz;sg;os-1 mutants of *Neurospora crassa* are mediated by cytoplasmic microtubules. J. Cell Sci. **106**: 555-564.
- Steinberg, G. und Schliwa, M. (1995). The *Neurospora* organelle motor: a distant relative of conventional kinesin with unconventional properties. Mol. Biol. Cell **6**: 1605-1618.
- Steinberg, G., Schliwa, M., Lehmler, C., Bolker, M., Kahmann, R. und McIntosh, J. R. (1998). Kinesin from the plant pathogenic fungus *Ustilago maydis* is involved in vacuole formation and cytoplasmic migration. J Cell Sci. **111**: 2235-2246.
- Stock, M. F., Guerrero, J., Cobb, B., Eggers, C. T., Huang, T.-G., Li, X. und Hackney, D. D. (1999). Formation of the Compact Conformer of Kinesin Requires a COOH-terminal Heavy Chain Domain and Inhibits Microtubule-stimulated ATPase Activity. J. Biol. Chem. **274** (21): 14617-14623.
- Sturmer, K. und Baumann, O. (1996). Immunolocalization of kinesin and cytoplasmic dynein in the retina of the locust *Schistocerca gregaria*. Cell Tissue Res **286** (3): 547-549.
- Suelmann, R. und Fischer, R. (2000a). Mitochondrial movement and morphology are dependent on an intact actin cytoskeleton in *Aspergillus nidulans*. Cell Motil. Cytoskel. **45**: 42-50.
- Suelmann, R., Sievers, N. und Fischer, R. (1997). Nuclear traffic in fungal hyphae: *in vivo* study of nuclear migration and positioning in *Aspergillus nidulans*. Mol. Microbiol. **25**: 757-769.
- Susalka, S. J. und Pfister, K. K. (2000). Cytoplasmic dynein subunit heterogeneity: implications for axonal transport. J Neurocytol **29** (11-12): 819-829.
- Sweigard, J., Chumley, F., Carroll, A., Farrall, L., Valent, B. (1997). A series of vectors for fungal transformation. Fung. Genet. Newsl. **44**: 52-53.
- Tanaka, Y., Kanai, Y., Okada, Y., Nonaka, S., Takeda, S., Harada, A. und Hirokawa, N. (1998). Targeted disruption of mouse conventional kinesin heavy chain, kif5B, results in abnormal perinuclear clustering of mitochondria. Cell **93** (7): 1147-1158.
- Tieu, Q. und Nunnari, J. (2000). Mdv1p is a WD repeat protein that interacts with the dynamin-related GTPase, Dnm1p, to trigger mitochondrial division. J Cell Biol. **151**: 353-365.
- Tomishige, M., Klopfenstein, D. R. und Vale, R. D. (2002). Conversion of Unc104/KIF1A kinesin into a processive motor after dimerization. Science **297** (5590): 2263-2267.
- Vale, R. D. (2003). The Molecular Motor Toolbox for Intracellular Transport. Cell **112**: 467-480.
- Vale, R. D. und Milligan, R. A. (2000). The way things move: looking under the hood of molecular proteins. Science **288**: 88-95.
- Vale, R. D., Reese, T. S. und Sheetz, M. P. (1985). Identification of a novel force-generating protein, kinesin, involved in microtubule-based motility. Cell **42** (1): 39-50.
- Vallee, R. B., Tai, C. und Faulkner, N. E. (2001). *LISI*: cellular function of a disease-causing gene. Trends Cell Biol. **11**: 155-160.
- Vallee, R. B., Williams, J. C., Varma, D. und Barnhart, L. E. (2004). Dynein: An ancient motor protein involved in multiple modes of transport. J Neurobiol **58** (2): 189-200.

Literaturverzeichnis

- Verhey, K. J., Lizotte, D. L., Abramson, T., Barenboim, L., Schnapp, B. J. und Rapoport, T. A. (1998). Light Chain-dependent Regulation of Kinesin's Interaction with Microtubules. J. Cell Biol. **143** (4): 1053-1066.
- Verhey, K. J., Meyer, D., Deehan, R., Blenis, J., Schnapp, B. J., Rapoport, T. A. und Margolis, B. (2001). Cargo of Kinesin Identified as JIP Scaffolding Proteins and Associated Signaling Molecules. J Cell Biol. **152** (5): 959-970.
- Vollmer, S. und Yanofsky, C. (1986). Efficient cloning of genes of *Neurospora crassa*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **83**: 4869-4873.
- Wallace, D. C. (1999). Mitochondrial diseases in man and mouse. Science **283**: 1482-1488.
- Wanka, F. und Van Zoelen, E. J. (2003). Cellular organelle transport and positioning by plasma streaming. Cell Mol Biol Lett **8** (4): 1035-1045.
- Warren, G. und Wickner, W. (1996). Organelle inheritance. Cell **84** (3): 395-400.
- 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** (3): 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** (12): 2946-2957.
- Westerholm-Parvinen, A., Vernos, I. und Serrano, L. (2000). Kinesin subfamily UNC104 contains a FHA domain: boundaries and physicochemical characterization. FEBS Lett **486** (3): 285-290.
- Westermann, B. (2002). Merging mitochondria matters: Cellular role and molecular machinery of mitochondrial fusion. EMBO Rep. **3**: 527-531.
- Westermann, B. und Neupert, W. (2000). Mitochondria-targeted green fluorescent proteins: Convenient tools for the study of organelle biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast **16**: 1421-1427.
- Winzler, E. A., Shoemaker, D. D., Astromoff, A., Liang, H., Anderson, K., Andre, B., Bangham, R., Benito, R., Boeke, J. D., Bussey, H., Chu, A. M., Connelly, C., Davis, K., Dietrich, F., Dow, S. W., El-Bakkoury, M., Foury, F., Friend, S. H., Gentalen, E., Giaver, G., Hegemann, J. H., Jones, T., Laub, M., Liao, H., Leibundguth, N., Lockhart, D. J., Lucau-Danila, A., Lussier, M., M'Rabet, N., Menard, P., Mittmann, M., Pai, C., Rebischung, C., Revuelta, J. L., Riles, L., Roberts, C. J., Ross-MacDonald, P., Scherens, B., Snyder, M., Sookhai-Mahadeo, S., Storms, R. K., Veronneau, S., Voet, M., Volckaert, G., Ward, T. R., Wysocki, R., Yen, G. S., Yu, K., Zimmermann, K., Philippsen, P., Johnston, M. und Davis, R. W. (1999). Functional Characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis. Science **285**: 901-906.
- Wong, E. D., Wagner, J. A., Gorisch, S. W., McCaffery, J. M., Shaw, J. M. und Nunnari, J. (2000). The dynamin-related GTPase, Mgm1p, is an intermembrane space protein required for maintenance of fusion competent mitochondria. J Cell Biol. **151**: 341-352.
- Wu, Q., Sandrock, T. M., Turgeon, B. G., Yoder, O. C., Wirsel, S. G. und Aist, J. R. (1998). A fungal kinesin required for organelle motility, hyphal growth, and morphogenesis. Mol Biol Cell **9** (1): 89-101.
- Yaffe, M. P. (1999). Dynamic mitochondria. Nature Cell Biol. **1**: E149-E150.
- Yaffe, M. P., Harata, V., Verde, V., Eddison, V., Toda, V und P. Nurse (1996). Microtubules mediate mitochondrial distribution in fission yeast. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **93**: 11664-11668.
- Yaffe, M. P., Stuurman, N. und Vale, R. D. (2003). Mitochondrial positioning in fission yeast is driven by association with dynamic microtubules and mitotic spindle poles. Proc Natl Acad Sci U S A **100** (20): 11424-11428.
- Yang, H. W., Chen, Y. Z., Takita, J., Soeda, E., Piao, H. Y. und Hayashi, Y. (2001). Genomic structure and mutational analysis of the human *KIF1B* gene which is homozygously deleted in neuroblastoma at chromosome 1p36.2. Oncogene **20** (36): 5075-5083.

Literaturverzeichnis

Yang, J. T., Saxton, W. M., Stewart, R. J., Raff, E. C. und Goldstein, L. S. (1990). Evidence that the head of kinesin is sufficient for force generation and motility in vitro. *Science* **249**: 42-47.

Youngman, M. J., Hobbs, A. E., Burgess, S. M., Srinivasan, M. und Jensen, R. E. (2004). Mmm2p, a mitochondrial outer membrane protein required for yeast mitochondrial shape and maintenance of mtDNA nucleoids. *J Cell Biol.* **164** (5):677-688

Zhao, C., Takita, J., Tanaka, Y., Setou, M., Nakagawa, T., Takeda, S., Yang, H. W., Terada, S., Nakata, T., Takei, Y., Saito, M., Tsuji, S., Hayashi, Y. und Hirokawa, N. (2001). Charcot-Marie-Tooth disease type 2A caused by mutation in a microtubule motor KIF1Bbeta. *Cell* **105** (5): 587-597.

Zucker, R. S. (1999). Calcium- and activity-dependent synaptic plasticity. *Curr Opin Neurobiol* **9** (3): 305-313.

Im Rahmen dieser Arbeit entstanden folgende Veröffentlichungen:

Dimmer, K. S., Fritz, S., Fuchs, F., Messerschmitt, M., Weinbach, N., Neupert, W. und Westermann, B (2002). Genetic basis of mitochondrial function and morphology in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Biol. Cell **13**: 847-853.

Fuchs, F., Prokisch, H., Neupert, W. und Westermann, B (2002). Interaction of mitochondria with microtubules in the filamentous fungus *Neurospora crassa*. J Cell Sci **115** (Pt 9): 1931-1937

Zur Veröffentlichung eingereicht:

Fuchs, F. und Westermann, B. (2004) Role of Unc104/KIF1-related motor proteins in mitochondrial transport in *Neurospora crassa*.

Lebenslauf

Florian Fuchs

- 27.02.1973 geboren als Sohn von Klaus-Dieter-Ernst Fuchs und Monika Fuchs, geb. Bork
- 09/1979-06/1983 Besuch der Pestalozzi-Grundschule Büttelborn
- 07/1983-07/1985 Besuch der Martin Buber Gesamtschule Gross-Gerau
- 08/1985-05/1992 Besuch des Prälat-Diehl-Gymnasiums Gross-Gerau
- 05/1992 Abitur
- 07/1992-06/1993 Wehrdienst Instandsetzungskompanie Hammelburg
- 10/1993-03/1996 Grundstudium der Chemie TU Darmstadt
- 03/1996 Vordiplom der Chemie TU Darmstadt
- 04/1996-08/1999 Hauptstudium Chemie TU Darmstadt; Vertiefungsgebiet Biochemie
- 12/1998-08/1999 Diplomarbeit im Labor von Prof. Dr. H. G. Gassen an der Technischen Universität Darmstadt: „Charakterisierung des Blut-Hirnschranken spezifischen Proteins temp83-5“
- 08/1999 Diplom in Chemie
- Seit 11/1999 Beginn der vorliegenden Dissertation am Institut für Physiologische Chemie der Ludwig-Maximilians-Universität unter der Leitung von Prof. Dr. Dr. W. Neupert

Danksagung

Zu aller erst danke ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Dr. Walter Neupert für die herausfordernden Aufgaben und die hervorragenden Möglichkeiten an seinem Institut, wissenschaftliches Denken und Arbeiten zu erlernen. Herrn Prof. Dr. Benedikt Westermann danke ich ganz herzlich für die erstklassige Anleitung unter der diese Arbeit entstand und die Unterstützung meiner Forschung sowie der Planung von Experimenten. Des Weiteren möchte ich mich speziell bei Herrn Prof. Dr. Ralf-Peter Jansen bedanken, der sich auf so unkomplizierte Art bereiterklärt hat, meine Arbeit gegenüber der Fakultät für Chemie zu vertreten. Zu tiefem Dank verpflichtet bin ich auch Herrn Prof. Dr. Manfred Schliwa und seinen Mitarbeitern, die mich hervorragend in die wissenschaftliche Arbeit mit Kinesinen eingeführt und zu jeder Zeit mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben. Den Gruppenleitern im Neupert-Lab danke ich für anregende Diskussion und das Erlernen, seine Ergebnisse kritisch zu interpretieren. Mein herzlicher Dank gebührt Herrn Dr. Markus Dembowski, mit dem ich am Anfang meiner Doktorarbeit einige Wochenenden produktiv im Labor verbrachte, und der auch nach dem Abschluss seiner Dissertation immer wieder ein Gehör für die täglichen Probleme des Alltags hatte. Besonders danken möchte ich Nicole Bauknecht, Jutta Dierolf, Kai-Stefan Dimmer, Stefan Fritz, Ravi Jagasia, Marlies Messerschmitt und Nadja Weinbach für ihre Hilfsbereitschaft, ihren Musikgeschmack, ihre Unterstützung (nicht nur im Arbeitsalltag) und Diskussionsbereitschaft. Ganz besonders möchte ich mich bei Frau Gabi Ludwig für die äußerst produktive Zusammenarbeit während der Dissertation bedanken. Nicht zu vergessen sind Marc, Christian, „Big M“, Gregor, Thomas Lutz, Stefan Paschen, Simone, Uwe, Dejana und Martin, die mir alle im Laufe der Dissertation in verschiedenen Situationen zur Seite gestanden haben. Regina Lapschansky und Marianne Köber möchte ich danken, dass sie stets bereit waren, mir die besten Arbeitsbedingungen zu ermöglichen. Ein herzlicher Dank auch an Ruth Neumayer und Eva Frischbier, die mir meine Zeit als „Supervisor of the Neupert Bunnies“, so angenehm wie möglich gemacht haben und natürlich an meine Hasen, ohne deren Antikörper diese Arbeit nicht entstanden wäre. Kirsten Heiss danke ich für seine Hilfe bei Computerproblemen, den Mitarbeitern der Werkstatt für ihre unerschöpfliche Geduld und Kreativität, Helga Döge sowie Frau Haug und Frau Farsen für ihre Hilfe in finanziellen Fragen. Zuletzt danke ich Susann und meiner Familie für ihre stetige Unterstützung und Aufmunterung besonders gegen Ende dieser Arbeit.