

# Vergleichende Untersuchungen der molekularen Mechanismen der Endozytose in langsam und schnell wachsenden Zellen

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades

**Doctor rerum naturalium**

(Dr. rer. nat.)

Fachbereich Biologie/Chemie der Universität Osnabrück

vorgelegt von

Doris Nordmann

Osnabrück, März 2015



# Inhalt

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1	Bedeutung der Endozytose für zellbiologische Prozesse	1
1.2	Clathrin-abhängige Endozytose	3
1.3	Clathrin-unabhängige Endozytose	5
1.4	Endozytose in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	9
1.5	<i>Ashbya gossypii</i> als Modellsystem	14
1.6	Polares Wachstum und Endozytose in <i>Ashbya gossypii</i>	16
1.7	Ziele der Arbeit	18
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>19</b>
<b>2.1</b>	<b>Material</b>	<b>19</b>
2.1.1	Chemikalien, Verbrauchsmaterialien, Kits	19
2.1.2	Enzyme	19
2.1.3	Stämme und Medien	20
2.1.3.1	<i>A. gossypii</i> Stämme und Medien	20
2.1.3.2	<i>S. cerevisiae</i> Stämme und Medien	22
2.1.3.3	<i>E. coli</i> Stämme und Medien	23
2.1.4	Plasmide	24
2.1.5	Oligonukleotide	27
<b>2.2</b>	<b>Methoden</b>	<b>29</b>
2.2.1	DNA-Analyse	29
2.2.1.1	Präparation von Plasmid-DNA	29
2.2.1.2	Präparation von genomischer DNA	29
2.2.1.3	Polymerasekettenreaktion (PCR)	30
2.2.1.4	Restriktion, Dephosphorylierung und Ligation von Nukleinsäuren	30
2.2.1.5	Auftrennung von DNA Fragmenten mittels Agarose-Gelelektrophorese	30
2.2.1.6	Isolation von DNA Fragmenten aus Agarose-Gelen	31
2.2.2	Transformation	31
2.2.2.1	Transformation von <i>Ashbya gossypii</i>	31
2.2.2.2	Transformation von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	31
2.2.2.3	Transformation von <i>Escherichia coli</i>	32

<b>2.3 Makroskopische Analysen</b>	<b>32</b>
2.3.1 Makroskopische Analysen von <i>Ashbya gossypii</i> Mutanten	32
2.3.1.1 Bestimmung der Wachstumsrate	32
2.3.1.2 Bestimmung der Lyserate	32
2.3.2 Makroskopische Analyse von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Mutanten	33
2.3.2.1 Wachstumskurven	33
<b>2.4 Mikroskopische Analysen</b>	<b>33</b>
2.4.1 „Life cell imaging“	33
2.4.2 Auflicht-Fluoreszenzmikroskopie	34
2.4.3 „Total Internal Reflection Fluorescence“ (TIRF) –Mikroskopie	34
2.4.4 Visualisierung von Zellstrukturen mit Hilfe von Farbstoffen	35
2.4.5 Bildbearbeitung	36
2.4.6 Auswertung der TIRF-Aufnahmen zur Analyse der Fluoreszenzsignale	37
<b>3 ERGEBNISSE</b>	<b>38</b>
<b>3.1 Charakterisierung des endozytischen Prozesses in <i>Ashbya gossypii</i></b>	<b>38</b>
3.1.1 Fluoreszenzmikroskopische Analyse einzelner endozytischer Komponenten	40
3.1.1.1 Quantitative Analysen der endozytischen Ereignisse	45
3.1.1.2 Kolokalisierungsstudien mit endozytischen Proteinen	58
3.1.2 Deletion endozytischer Komponenten	67
3.1.2.1 Makroskopische Untersuchung des Wachstums der Deletionsmutanten	67
3.1.2.2 Mikroskopische Analyse des Hyphenwachstum in den Deletionsmutanten	69
3.1.2.3 Quantitative Analysen der endozytischen Ereignisse in den Deletionsstämmen	72
3.1.2.4 Lipidaufnahme in den Deletionsmutanten	77
3.1.3 Signalabhängige Internalisierung von Wsc1 in <i>A. gossypii</i>	78
<b>3.2 Untersuchungen zur Funktion von Clathrin in <i>Ashbya gossypii</i></b>	<b>81</b>
3.2.1 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen der Clathrin-Strukturen	81
3.2.2 Integrität der Zellwand in Clathrin-Deletionsmutanten	84
3.2.3 Komplementation von $\Delta Scclc1$ mit <i>CLC1</i> aus <i>A. gossypii</i>	86
<b>4 DISKUSSION</b>	<b>94</b>
<b>4.1 Dynamik des endozytischen Prozesses</b>	<b>94</b>
<b>4.2 Der Zusammenhang zwischen Wachstumsgeschwindigkeit und Endozytoserate in <i>A. gossypii</i></b>	<b>97</b>
<b>4.3 Bedeutung der Endozytose für das polare Hyphenwachstum</b>	<b>99</b>
<b>4.4 Die Funktion von Clathrin in <i>A. gossypii</i></b>	<b>104</b>

## Inhaltsverzeichnis

---

5	ZUSAMMENFASSUNG	109
6	SUMMARY	110
7	LITERATURVERZEICHNIS	111
8	ANHANG	123
9	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	125
10	DANKSAGUNG	126
11	EIDESSTÄTTLICHE ERKLÄRUNG	127



# 1 Einleitung

Für Zellen ist es unerlässlich ihre Umwelt wahrzunehmen und auf äußere Reize oder Veränderungen zu reagieren. Die Plasmamembran, sowie die Zellwand bei Pilzen und Pflanzen, grenzt das Zellinnere bzw. Zytoplasma von der externen Umgebung ab. Die Kommunikation über diese Barriere wird durch Proteine gewährleistet, die die Plasmamembran bzw. Zellwand durchspannen. Die Regulierung der Protein- und Lipidzusammensetzung der Plasmamembran und die Aufnahme und Verarbeitung extrazellulären Materials ist daher für die Zelle entscheidend, um auf Umweltreize zu reagieren. Ein unter Eukaryonten evolutionär konservierter Prozess zur regulierten Aufnahme von Plasmamembranbestandteilen und extrazellulärem Material ist die Endozytose (De Duve, 1963; Doherty und McMahon, 2009). Hierbei kommt es zu einer Einstülpung und anschließender Abschnürung eines Teils der Plasmamembran unter Bildung eines Vesikels. Extrazelluläres Material sowie die in der Plasmamembran enthaltenen Proteine werden so ohne Freisetzung ins Zytoplasma in der Zelle transportiert. Die endozytischen Vesikel verschmelzen vorwiegend mit Endosomen, die als Sortierstationen dienen (Trowbridge et al., 1993). Von dort aus wird das aufgenommene Material an verschiedene Zellkompartimente weitergeleitet und verarbeitet. Membranständige Proteine können über Recyclingschritte und Exozytose, dem physiologischen Gegenstück zur Endozytose, zurück an die Plasmamembran gelangen oder werden zum Abbau zu Lysosomen bzw. Vakuolen transportiert (Bonifacino und Rojas, 2006; Maxfield und McGraw, 2004).

## 1.1 Bedeutung der Endozytose für zellbiologische Prozesse

Neben der Nährstoffaufnahme spielt die Endozytose eine bedeutende Rolle bei der Übermittlung und Verarbeitung extrazellulärer Signale, da auch membranständige Rezeptoren und ihre Liganden auf diesem Weg internalisiert werden. Das Entfernen von Rezeptoren von der Plasmamembran durch Endozytose ist ein grundlegender Mechanismus der Zelle, um die Signalstärke abzuschwächen und erlaubt dadurch eine Anpassung an die Umgebung (Disanza et al., 2009). In Verbindung mit der Exozytose sorgt sie zudem für eine asymmetrische Verteilung der Membranproteine (Osmani et al., 2010). Auf diese Weise trägt sie entscheidend zur Erzeugung und Erhaltung der Zellpolarität bei, wodurch eine Begrenzung spezifischer Signalwege auf bestimmte Zellbereiche ermöglicht wird (Scita und Di Fiore, 2010).

Die Erhaltung der Polarität ist essentiell für eine Vielzahl von Zellfunktionen, wie z.B. die Zellmigration (Sigismund et al., 2012). Bei diesem Prozess muss die Zelle extrazelluläre Signale in ihrer Umgebung ortsspezifisch wahrnehmen, um die Orientierung der Zelle, z.B. entlang eines chemischen Gradienten festzulegen. Eine polarisierte Verteilung von Plasmamembranproteinen und die davon abhängige, stetige Umgestaltung des Zytoskeletts ermöglichen die gerichtete Bewegung (Le Clainche und Carlier, 2008; Pollard, 2003). Ein ähnliches Prinzip liegt auch dem Wachstum filamentös wachsender Organismen, wie dem in dieser Arbeit verwendeten Modelorganismus *A. gossypii* zugrunde.

Die zentrale Rolle der Endozytose bei der Kommunikation der Zelle mit ihrer Umgebung hat zur Folge, dass eine Vielzahl von Krankheiten mit Fehlern im endozytischen Prozess oder seiner Regulation zusammenhängen (Sigismund et al., 2012). Ein Beispiel hierfür ist z.B. die gestörte Internalisierung von Rezeptoren, die vermutlich mehreren Kennzeichen von Tumorzellen zugrunde liegt (Hanahan und Weinberg, 2011). So können invasives Wachstum oder die anhaltenden Erzeugung wachstumsfördernder Signale durch einen Defekt in der Endozytose verursacht werden, da grundlegende Funktionen bei der Signalübertragung, wie Signalstärke, Ortsspezifität und Kinetik der Signale durch Endozytose beeinflusst werden (Hanahan und Weinberg, 2011; Mosesson et al., 2008). Defekte in diesem Prozess besitzen somit ein großes Potential die Transformation gesunder Zellen zu Krebszellen zu fördern.

Auch bei den hoch spezialisierten Neuronen, bei denen die Feinregulation von Abgabe und Aufnahme der Neurotransmitter entscheidend für die Verarbeitung von Nervenimpulsen ist, können Defekte im endozytischen System verschiedene Krankheiten nach sich ziehen (Cosker und Segal, 2014). So vermutet man z.B. einen Zusammenhang zwischen einer erhöhten Endozytoserate und der vermehrten Produktion und Sekretion von  $\beta$ -Amyloid-Peptiden, was zur neurodegenerativen Krankheit Alzheimer führt (Cataldo et al., 1997; Nixon et al., 2000; Wu und Yao, 2009).

Virale Infekte stehen ebenfalls mit der Endozytose in Zusammenhang, da sich die Mehrheit der Tier-Viren die zelleigenen Aufnahmemechanismen zu Nutze macht, um in ihre Wirtszelle zu gelangen. Der vesikuläre Transport ermöglicht den Viren zudem ein schnelles Erreichen des Zielorts in der Wirtszelle (Marsh und Helenius, 2006).

Auch anorganische Materialien, in Form von Nanopartikeln werden zum Teil durch Endozytose in die Zelle aufgenommen und gelangen dadurch in die Nahrungskette (Zhao et al., 2011). Um

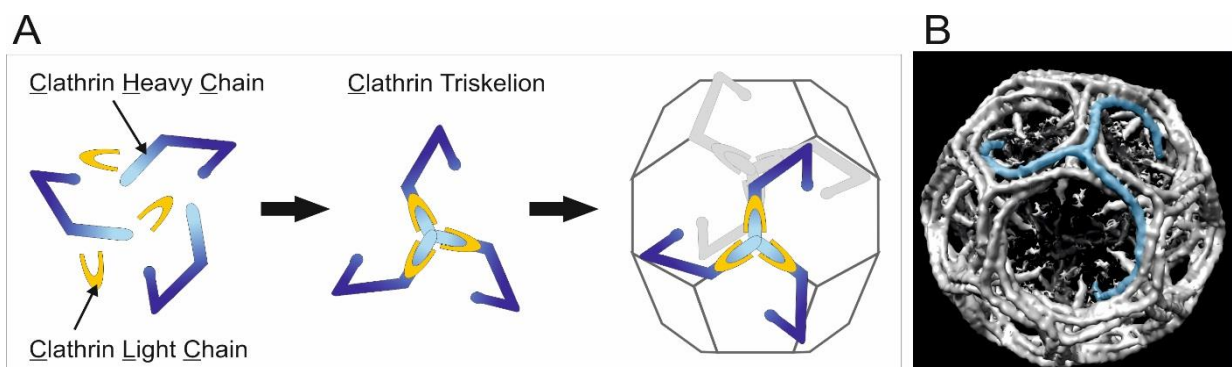


das toxische Potential dieses Materials einzuschätzen, spielt die Kenntnis über den Aufnahmemechanismus eine große Rolle.

Bei komplexen Organismen, insbesondere bei Säugern, ist eine Vielzahl von endozytischen Mechanismen bekannt. Diese unterscheiden sich in der beteiligten Proteinmaschinerie, der Form der Vesikel, der Kinetik der Vesikelbildung, sowie in den internalisierten Cargomolekülen, deren Selektionsmechanismus und Zielort (Conner und Schmid, 2003; Doherty und McMahon, 2009; Mayor und Pagano, 2007). Ein weitreichendes Verständnis dieser Mechanismen ist für viele biologische Fragestellungen von Bedeutung.

## 1.2 Clathrin-abhängige Endozytose

Der bekannteste endozytische Mechanismus ist die Clathrin-abhängige Endozytose (CME, clathrin mediated endocytosis), bei der Clathrin einen charakteristischen Mantel um das entstehende Vesikel bilden (Abbildung 1). Clathrin-Moleküle bilden Heterohexamere aus jeweils drei schweren Untereinheiten (CHC, Clathrin Heavy Chain) und drei leichten Untereinheiten (CLC, Clathrin Light Chain) (Brodsky et al., 2001). CHCs sind dabei die strukturgebenden Elemente und bilden durch Trimerisierung die charakteristische Form eines Triskelions (Dreibeins) aus. CLCs binden, in der Nähe der Verbindungsstelle zwischen den schweren Untereinheiten an jeweils eine CHC und haben eine regulatorische Funktion. Clathrin-Triskelia lagern sich wiederum zu einer charakteristischen, konvexen Gitterstruktur aus Penta- und Hexagonen zusammen. Sie erzeugen einen Mantel um das entstehende Vesikel und tragen zur Stabilisierung der Membrankrümmung bei (Hinrichsen et al., 2006).



**Abbildung 1 A: Modell zur Bildung des Clathrin-Mantels.** Jeweils drei leichte und drei schwere Clathrin-Untereinheiten bilden das Clathrin-Triskelion. Clathrin-Triskelia lagern sich zu einer konvexen Gitterstruktur an. Diese bilden den charakteristischen Mantel um das entstehende Vesikel. Modifiziert nach Edeling et al. (2006); Kirchhausen (2000); Wilbur et al. (2010).

**B: Rekonstruktion eines Clathrin-Gitters aus Kryo-Elektronenmikroskopie.** (Quelle: Mazuraan/CC BY-SA 4.0; [http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Clathrin\\_cage\\_viewed\\_by\\_croelectron\\_microscopy.jpg](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Clathrin_cage_viewed_by_croelectron_microscopy.jpg))

Die Anordnung der Clathrin-Moleküle zu einem polyedrischen Gitter ist energetisch begünstigt und wird durch verschiedene Adapterproteine induziert. Diese fungieren als Kontaktstelle zwischen Clathrin-Mantel, Cargo-Molekülen und der Membran (Kirchhausen, 2000; Owen et al., 2004). Die Cargo-Moleküle der CME sind äußerst vielfältig, was sich in der Menge der verschiedenen Endozytosesignale widerspiegelt. Membranständige Rezeptoren, die konstitutiv internalisiert werden enthalten häufig spezifische Signalsequenzen, die von den Adapterproteinen gebunden werden (Traub, 2009). Bei der regulierten Endozytose wird die Bindung an die Adapterproteine durch Konformationsänderungen der Cargo-Proteine ausgelöst, welche häufig durch Liganden induziert werden. Auch posttranslationale Modifikationen wie die Ubiquitinierung können die Aufnahme durch CME einleiten (Kölling und Hollenberg, 1994; Sorkin und von Zastrow, 2009).

Unter Eukaryonten ist die CME stark konserviert und wurde sowohl in einzelligen Organismen wie *S. cerevisiae*, als auch in hoch spezialisierten Zellen höherer Eukaryonten nachgewiesen. (Holstein et al., 1994; Kanaseki und Kadota, 1969; Mueller und Branton, 1984; Pearse, 1976; Shapiro und Webster, 1989). In höheren Organismen ist die CME ein essentieller Prozess und der Verlust der Funktionen von Clathrin oder zentralen Adapterproteinen ist letal (Bazinet et al., 1993; Inoue et al., 2007; Mitsunari et al., 2005). Viele einzellige Organismen, wie auch *S. cerevisiae*, sind dagegen nicht auf Clathrin angewiesen. Diese zeigen bei Störungen der CME aber Wachstumsdefekte oder eine verminderte Endozytoserate, wobei viele der beobachteten Phänotypen auch mit einer Funktionsstörung im intrazellulären Transport zusammenhängen könnten (Hung et al., 2004; Lemmon und Jones, 1987; Payne und Schekman, 1985; Seeger und Payne, 1992; Tan et al., 1993). Weitere Unterschiede in der CME zwischen einzelligen und höheren Organismen sind die Bedeutung von Aktin für den Prozess und die Menge und Spezifität der Adapterproteine (Galletta et al., 2010; Mooren et al., 2012; Morgan et al., 2002). Die Beteiligung des Zytoskeletts in Form von punktförmigen Aktinstrukturen (Aktin-Patches) ist notwendig, wenn für die Internalisierung des Vesikels viel Kraft aufgewandt werden muss. Dies ist insbesondere bei Pflanzen und Pilzen der Fall, da Turgordruck und Zellwand der Einstülpung entgegenwirken (Aghamohammadzadeh und Ayscough, 2009; Šamaj et al., 2005). Die CME in Säugerzellen ist von Phosphoinositol-4,5-bisphosphat (PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>) in der Membran abhängig (Haucke, 2005). Die GTPase Dynamin bindet an diese Lipide und ist ein entscheidender Faktor für

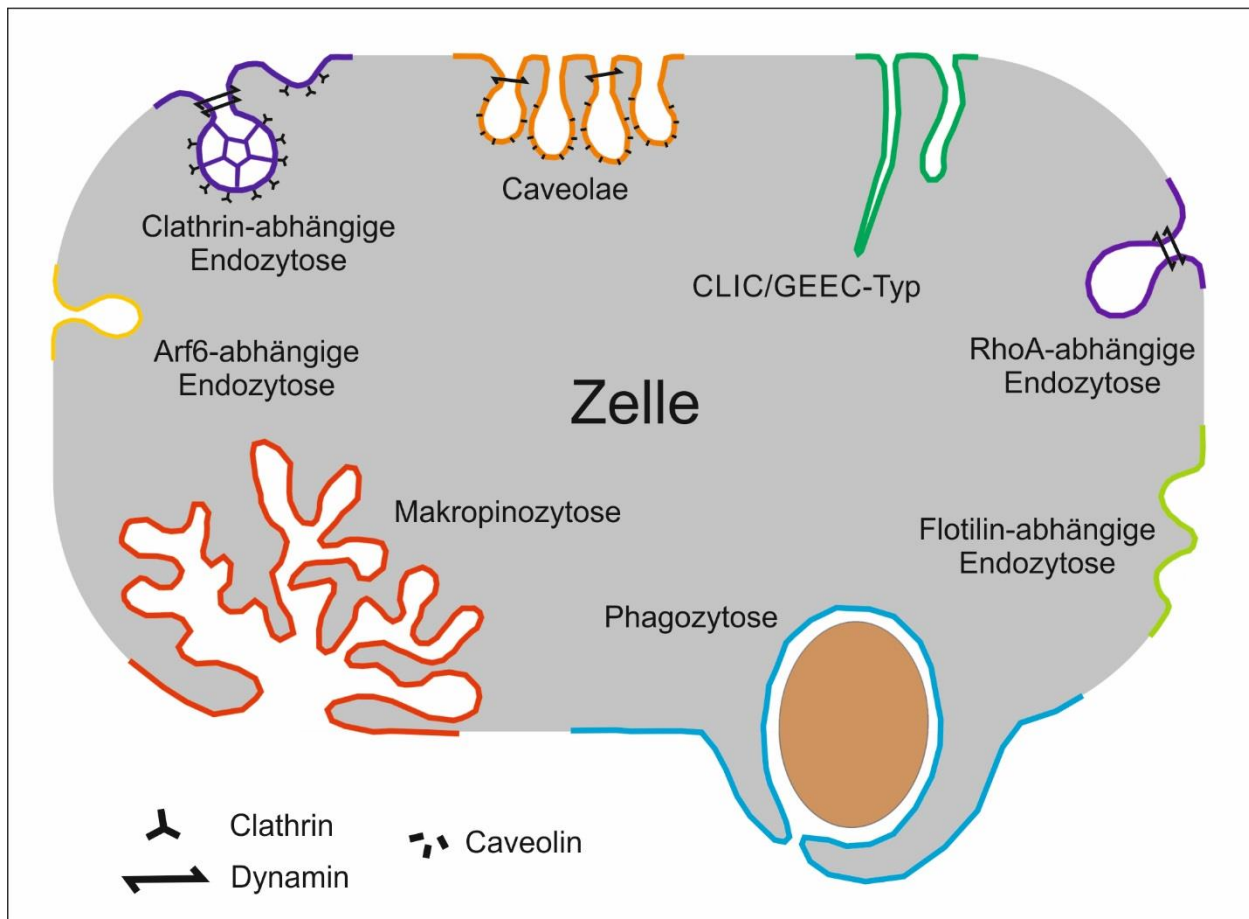
die Abtrennung der Vesikel von der Plasmamembran (Marks et al., 2001). Das Dynamin-ähnliche Protein Vps1 aus *S. cerevisiae* ist zwar an der CME in Hefe beteiligt, ist jedoch nicht essentiell für den Prozess. (Smaczynska-de Rooij et al., 2012).

Die Funktion von Clathrin bei der Bildung von Vesikeln ist nicht auf die Plasmamembran und somit auf die Endozytose beschränkt. So spielt das Protein ebenfalls eine Rolle bei intrazellulären Transportprozessen wie der Organisation der Proteine am *trans*-Golgi-Netzwerk (TGN) oder den Endosomen (Brodsky, 2012). Die spezifische Funktion von Clathrin wird durch Adapterproteine bestimmt, die sich zwischen den verschiedenen Zellkompartimenten unterscheiden.

Der grundlegende Mechanismus der CME und die beteiligte Proteinmaschinerie sind bereits gut untersucht und werden im Kapitel 1.4 am Beispiel der CME in *S. cerevisiae* genauer beschrieben.

### 1.3 Clathrin-unabhängige Endozytose

Insbesondere in Säugerzellen wurden verschiedene Wege der Clathrin-unabhängigen Endozytose (CIE, clathrin independent endocytosis) entdeckt, über die eine Vielzahl unterschiedlicher Cargo-Moleküle internalisiert wird (Maldonado-Báez et al., 2013; Mayor und Pagano, 2007). Aber auch in anderen Organismen, wie *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*, *Dictyostelium discoideum*, sowie Pflanzenzellen konnte CIE bereits nachgewiesen werden (Bandmann und Homann, 2012; Cardelli, 2001; Glodowski et al., 2007; Windler und Bilder, 2010). Im Vergleich zur CME ist über die Mechanismen der CIE und deren Regulation allerdings wenig bekannt. Im Gegensatz zur CME in Säugern ist Aktin eine essentielle Komponente. Auch der Cholesterolgehalt der Membran und die Regulation durch kleine G-Proteine spielen für viele CIE-Wege eine Rolle. Abbildung 2 zeigt ein Übersichtsmodell der verschiedenen Endozytosewege in Säugerzellen. Im folgenden Abschnitt werden die wichtigsten Wege genauer beschrieben.



**Abbildung 2: Übersicht über die verschiedenen Endozytosewege einer Säugerzelle, modifiziert nach Doherty und McMahon (2009).** Für eine detaillierte Beschreibung der einzelnen Wege siehe Kapitel 1.2 und 1.3.

### Caveolae

Der am besten charakterisierte CIE-Weg ist die Internalisierung durch Caveolae. Hierbei handelt es sich um Membraneinstülpungen mit einem Durchmesser von ca. 50 bis 100 nm (Stan, 2005; Yamada, 1955). Die Bildung von Caveolae ist mit einer spezifischen Membranzusammensetzung aus Cholesterol und Sphingolipiden assoziiert, weshalb sie auch als spezialisierte „lipid rafts“ bezeichnet werden (Chidlow und Sessa, 2010; Simons und Toomre, 2000). Sie sind mit Proteinen der Caveolin- Familie angereichert, die einen Mantel um die Membraneinstülpung bilden. Caveoline dienen als Strukturelemente und regulieren zusammen mit spezifischen Adapterproteinen, den Cavinen (Cavins), die Organisation und Funktion der Caveolae (Parton et al., 2006). Besonders häufig treten sie in Epithelzellen, Endothelzellen, Fibroblasten und Adipozyten auf. In den Membranclustern der Caveolae reichern sich Rezeptoren an, wodurch sich die Signalübertragung innerhalb der Caveolae verstärkt. Durch die Bildung von *trans-*

Endothelkanälen, tragen Caveolae außerdem zum Transport von Makromolekülen (Transzytose) bei (Parton und Simons, 2007). Die Abschnürung der Vesikel erfolgt vermutlich durch die GTPase Dynamin, jedoch ist nicht eindeutig geklärt wie die Membrankrümmung erzeugt wird (Oh et al., 1998). Möglicherweise könnten intrinsische Faktoren wie Chiralität und Drehung der Moleküle in den Membranclustern zu einer initialen Membrankrümmung führen, die durch Caveolin- und Cavin-Proteine stabilisiert wird (Chidlow und Sessa, 2010; Sarasij et al., 2007). Die Bedeutung der Caveolae bei der Endozytose spezifischer Cargomoleküle ist bisher unklar, da Caveolin-assoziierte Cargos meist auch durch andere Mechanismen internalisiert werden können. Caveolae könnten allerdings bei der Regulation der Lipidzusammensetzung eine Rolle spielen. Nach der Abschnürung von der Plasmamembran fusionieren sie entweder mit speziellen Caveosomen oder mit Rab5-gekennzeichneten Endosomen (Parton und Simons, 2007).

### *CLIC/GEEC-Typ der Endozytose*

Mit einem glycosylphosphatidylinositol-Anker an die Membran gebundene Proteine werden überwiegend über den CLIC/GEEC-Typ der Endozytose internalisiert (clathrin- and dynamin-independent carriers/ glycosyl phosphatidylinositol-anchored protein enriched early endosomes) (Sabharanjak et al., 2002). Dieser Mechanismus ist weder Clathrin- noch Dynamin-abhängig, aber auf cholesterolhaltige Membrancluster und die Aktivität des kleinen G-Proteins Cdc42 angewiesen (Chadda et al., 2007). Letzteres gehört zur Familie der Rho-GTPasen, bei denen es sich um wichtige Regulatoren des Aktin-Zytoskeletts handelt (Etienne-Manneville und Hall, 2002). Die internalisierten GPI-APs (glycosyl phosphatidylinositol-anchored proteins) sind in den für diesen Endozytoseweg charakteristischen GEECs (glycosyl phosphatidylinositol-anchored protein enriched early endosomes) angereichert und fusionieren nicht mit den durch Rab5-gekennzeichneten Endosomen. So können sie den Transport zum Golgi-Apparat umgehen und gelangen durch Recycling schneller zurück an die Membran (Sabharanjak et al., 2002). Tubuläre Einstülpungen der Plasmamembran mit einem Durchmesser von ca. 40 nm sind charakteristisch für den CLIC/GEEC-Weg. Zugehörige Mantel- oder Adapterproteine sind bisher nicht identifiziert. Analog zu den Caveolae könnte die initiale Membrankrümmung durch die spezifische Membranstruktur erzeugt werden, wodurch Proteine rekrutiert werden, die eine weitere Krümmung ermöglichen (Sarasij et al., 2007).

### *RhoA-abhängige Endozytose*

Die RhoA-abhängige Endozytose wurde bei Untersuchungen zur Internalisierung des Interleukin-2-Rezeptors entdeckt und wird daher auch als IL-2R-Weg bezeichnet, obwohl auch andere Cargo-Moleküle über diesen Weg aufgenommen werden (Lamaze et al., 2001). Auch dieser CIE-Weg ist abhängig von cholesterolhaltigen Membranclustern und die Abschnürung der Vesikel erfolgt durch Dynamin. Noch nicht geklärt ist, ob die GTPase RhoA diesen Prozess durch die Organisation des Aktin-Zytoskeletts reguliert oder auch an der Cargo-Selektion beteiligt ist. In *S. cerevisiae* wird die Existenz eines CIE-Wegs vermutet, der vom RhoA-Homolog Rho1 abhängig ist, was eine evolutionäre Konservierung dieses Endozytoseweges nahe legt (Prosser und Wendland, 2012).

### *Phagozytose und Makropinozytose*

Die Aufnahme von Partikeln mit einer Größe von über 0,5 µm erfolgt über den Mechanismus der Phagozytose, während bei der Makropinozytose größere Volumina extrazellulärer Flüssigkeit aufgenommen werden (Doherty und McMahon, 2009; Kirkham und Parton, 2005). Beide Prozesse involvieren die Aufnahme größerer Mengen der Plasmamembran und darin enthaltener Proteine. Phagozytose ist ein entscheidender Prozess bei der Immunantwort der Zelle auf Pathogene sowie der Verarbeitung apoptotischer Partikel (Flannagan et al., 2012). Kleine G-Proteine wie Cdc42, Rac1 und RhoA und weitere, Aktin-regulierende Proteine sind an der notwendigen Umgestaltung des Aktinzytoskeletts und der Membran beteiligt (Brandt et al., 2007; Chimini und Chavrier, 2000; Hoppe und Swanson, 2004; May et al., 2000; Yamada et al., 2007). Die Makropinozytose ist abhängig vom Cholesterolgehalt der Membran und der GTPase Rac1. Die Membran erhält dabei typischerweise eine mehrfach gefaltete Struktur, was ähnlich wie bei der Phagozytose eine umfangreiche Umgestaltung des Aktinzytoskeletts erfordert (Grimmer et al., 2002). Beide Mechanismen sind charakteristisch für Säugerzellen wie Makrophagen und Neutrophilen, konnten aber auch in anderen Organismen wie der Amöbenart *Dictyostelium discoideum* nachgewiesen werden (Cardelli, 2001). Das Vorkommen dieser Endozytosewege in Pflanzen und Pilzen ist allerdings unwahrscheinlich, da die Zellwand die notwendige Umgestaltung der Membran verhindern würde.

### *Arf6- und Flotilin-abhängige Endozytose*

Die GTPase Arf6 und das Caveolin-ähnliche, membranassoziierte Protein Flotillin werden ebenfalls mit einem individuellen CIE-Weg in Verbindung gebracht (Frick et al., 2007; Glebov et al., 2006). Flotilline akkumulieren in spezifischen Membrandomänen, die sich ähnlich wie Caveolae nur vereinzelt von der Membran abschnüren. Die Ähnlichkeit zu Caveolin1 lässt eine Funktion bei der Regulation des Lipidgehalts in der Membran vermuten. Ob Flotillin einen eigenständigen CIE-Weg kennzeichnet oder als Membranorganisator „upstream“ des CLIC/GEEC-Weges fungiert ist allerdings noch unklar.

Einige Cargo-Moleküle wie die GPI-APs CD59 und CD55 oder die alpha-Untereinheit des Interleukin-Rezeptors sind in Arf6-positiven Endosomen angereichert, die sich von den GEEC-Endosomen unterscheiden (Brown et al., 2001; Radhakrishna und Donaldson, 1997). Arf6 ist dabei allerdings nicht direkt an der Internalisierung der Cargo-Moleküle beteiligt, sondern reguliert den post-endozytischen Transport. Wie der CLIC/GEEC- Weg ist die Arf6-assoziierte Endozytose vom Cholesterolgehalt der Membran abhängig (Naslavsky et al., 2004).

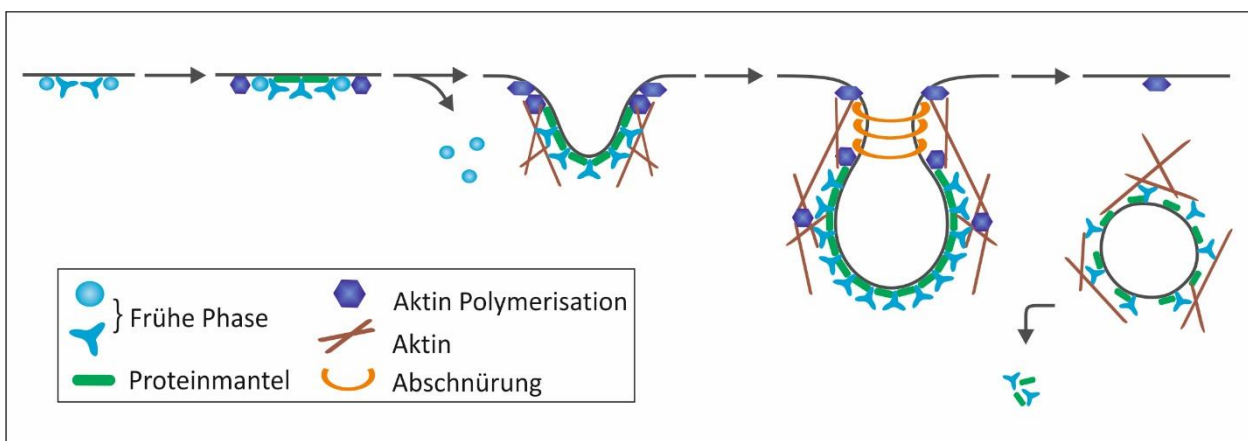
Der Nutzen der verschiedenen Endozytosewege für die Zelle ist nicht eindeutig geklärt, könnte aber eine spezifischere Regulation von Signalwegen ermöglichen oder mit Unterschieden in der Aufnahmegeschwindigkeit oder dem Lipidumsatz zusammenhängen (Doherty und McMahon, 2009). Durch die Ansteuerung unterschiedlicher Zielkompartimente bei verschiedenen Endozytosewegen ergibt sich außerdem eine weitere Möglichkeit der Regulation einzelner Rezeptoren. So werden EGF-Rezeptoren (EGFR, epidermal growth factor receptor) z.B. bevorzugt über CME aufgenommen und recycelt. Bei einer hohen EGF-Konzentration an der Zelloberfläche werden sie aber auch durch CIE-Wege internalisiert, was jedoch zum Abbau der Rezeptoren führt (Sigismund et al., 2008). Auch kompensatorische Effekte zwischen den verschiedenen Wegen könnten bei der Entwicklung mehrerer Aufnahmewege eine Rolle gespielt haben (Damke et al., 1995).

### **1.4 Endozytose in *Saccharomyces cerevisiae***

In *S. cerevisiae* ist bisher nur die CME als Mechanismus der endozytischen Internalisierung eindeutig bestätigt (Boettner et al., 2011a; Weinberg und Drubin, 2012). Neben Clathrin ist Aktin

eine essentielle Komponente dieses Mechanismus und erforderlich bei der Einstülpung der Vesikel entgegen des Turgordrucks (Aghamohammadzadeh und Ayscough, 2009). Die gut etablierten gentechnischen Methoden für *S. cerevisiae* und die Anwendung von „live-cell-imaging“ Methoden wie der „Total Internal Reflection Fluorescence“-Mikroskopie (TIRF-Mikroskopie) ermöglichten einen rapiden Fortschritt in der Identifizierung der beteiligten Komponenten. Mittlerweile sind ca. 60 Proteine bekannt, die sich gemäß ihrer Funktion und Ankunftszeit an der Endozytosestelle verschiedenen Gruppen zuordnen lassen und zumeist konservierte Homologe in Säugerzellen aufweisen (Weinberg und Drubin, 2012).

Die CME in *S. cerevisiae* lässt sich grob in vier Phasen einteilen: 1. Initiierung und frühe Phase, 2. Reifung des Proteinmantels, 3. Aktin-Polymerisation und 4. Abschnürung des Vesikels und Abbau des Proteinmantels. Der Ablauf der Endozytose und die Funktionen der wichtigsten bzw. für diese Arbeit relevanten Proteine sind in Abbildung 3 dargestellt. Der folgende Abschnitt gibt einen Überblick über die bisherigen Kenntnisse zur CME in *S. cerevisiae*.



**Abbildung 3: Schematische Darstellung der Clathrin abhängigen Endozytose in Hefe, modifiziert nach Boettner et al. (2011a) und Weinberg und Drubin (2012).** Nach der Initiierung erfolgt der Aufbau des Proteinmantels. Durch die Rekrutierung von Aktin-polymerisierenden Proteinen bildet sich ein verzweigtes Aktin-Zytoskelett um das entstehende Vesikel und die Einstülpung der Membran beginnt. Zur Abschnürung des Vesikels werden die gegenüberliegenden Bereiche der Membran in räumliche Nähe gebracht. Nach der Freisetzung des Vesikels ins Zytoplasma werden der Proteinmantel und das Aktin-Netzwerk abgebaut und das endozytische Vesikel kann mit anderen Zellkompartimenten verschmelzen.

### *Initiierung und frühe Phase*

Zu den ersten detektierbaren Proteinen an der Endozytosestelle gehören Ede1, Syp1 und Clathrin (Newpher et al., 2005; Stimpson et al., 2009; Suzuki et al., 2012). Ede1 (Eps15- Homolog) ist ein



Ubiquitin bindendes Protein und wichtig für die Rekrutierung vieler späterer Faktoren (Dores et al., 2010). Syp1 (FCHo1/2- Homolog) unterstützt die polarisierte Lokalisation der Endozytosestellen in den Tochterzellen. Es gehört zu den F-BAR-Proteinen (FCHo2-Bin/Amphiphysin/Rvs), welche in der Regel eine Membrankrümmung hervorrufen können (Boettner et al., 2009; Suetsugu et al., 2010). Elektronenmikroskopische Studien zeigten jedoch, dass die Membran an der Endozytosestelle in der frühen Phase relativ flach bleibt (Idrissi und Geli, 2013; Reider et al., 2009; Stimpson et al., 2009). Der genaue Mechanismus zur Initiierung der Endozytose ist bisher nicht eindeutig geklärt. Obwohl die Deletionen von Clathrin, Ede1 oder Syp1 eine Veränderung im Endozytoseverhalten verursachen, sind sie nicht essentiell für diesen Prozess und können somit nicht allein für die Initiierung des Prozesses verantwortlich sein (Payne et al., 1988; Stimpson et al., 2009). PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> wird zwar für die Einstülpung der Membran benötigt, spielt aber bei der Auswahl der Endozytosestelle keine Rolle. Eine Rekrutierung der frühen endozytischen Faktoren durch spezifische Lipidsignale kann aber nicht ausgeschlossen werden (Homma et al., 1998; Sun und Drubin, 2012; Ziólkowska et al., 2012). Cargo-Moleküle begünstigen den Fortschritt der Endozytose, kommen aber als Initiatoren nicht in Frage, da ihre Akkumulation erst kurz nach der Ankunft der frühen Proteine stattfindet (Carroll et al., 2012; Toshima et al., 2006).

### *Reifung des Proteinmantels*

Während dieser Phase werden weitere Komponenten des Proteinmantels durch die frühen Faktoren rekrutiert und der Proteinmantel erweitert. 1-2 Minuten nach den frühen Faktoren gelangt Sla2 (Hip1/R-Homolog) an die Endozytosestelle (Kaksonen et al., 2005). Da es sowohl eine Phosphatidylinositol-bindende ANTH-Domäne (AP180 N-terminal homology), als auch eine Aktin-bindende THATCH-Domäne (talin/Hip1/R/Sla2-actin-tethering C-terminal homology) besitzt, verbindet es während der Endozytose die Membran mit dem Aktin-Zytoskelett (Legendre-Guillemain et al., 2002; Picco et al., 2015; Sun et al., 2005). Zusätzlich kann die zentrale Region von Sla2 mit CLC1 (clathrin light chain) interagieren, wodurch die Wechselwirkung mit Aktin inhibiert wird (Boettner et al., 2011b; Wilbur et al., 2008). Dies könnte die Anlagerung von Aktin an das sich bildende Vesikel auf die Clathrin-freie Halsregion des sich bildenden Vesikels beschränken und eine Möglichkeit zur Regulation der Aktin-induzierten Zugkräfte bieten. Kurz nach Sla2 erreichen die Clathrin-Adapterproteine Ap1801/2 (AP180/CALM- Homologe) und Ent1/2 (Epsin- Homologe), sowie die Mantelproteine Sla1 (intersectin- Homolog) und End3

(Eps15- Homolog) die Endozytosestelle (Boettner et al., 2011a; Kaksonen et al., 2003; Kaksonen et al., 2005). Auch die Homologen Proteine des AP2-Komplexes gelangen etwa zu diesem Zeitpunkt an die endozytische Membran, spielen aber im Gegensatz zu Säugerzellen nur eine untergeordnete Rolle (Huang et al., 1999). Die Adapterproteine Ap1801/2 und die Epsine Ent1/2 haben teilweise überlappende Funktionen. Sie binden an PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> und dienen der selektiven Cargo-Auswahl und der Stabilisation des endozytischen Netzwerks (Maldonado-Báez et al., 2008). Sla1 interagiert mit Cargo-Molekülen über die Aminosäuresequenz NPFxD (x steht für eine beliebige Aminosäure). Diese dient als Signalsequenz zur Internalisierung und kommt z.B. in dem Zellwandstressensor Wsc1 oder dem  $\alpha$ - Faktor- Rezeptor Ste2 vor (Di Pietro et al., 2010; Howard et al., 2002; Piao et al., 2007). In dieser Phase erreichen auch die ersten Aktin-polymerisierenden Proteine Pan1 (Intersectin- Homolog) und Las17 (WASP- Homolog) die endozytische Membran und leiten durch ihre Aktivität als „nucleation promoting factor“ (NPF) die Bildung des Aktin-Netzwerks und den Übergang in die nächste Phase ein (Sun et al., 2006).

### *Aktin-Polymerisation*

Für die notwendige Zugkraft zur Einstülpung der Membran entgegen dem Turgordruck, ist ein verzweigtes Aktin-Netzwerk notwendig, welches durch den Arp2/3-Komplex aufgebaut wird (Aghamohammadzadeh und Ayscough, 2010; Moreau et al., 1997). Mit den Motorproteinen Myo3 und Myo5 und dem Aktin-bindenden Protein Abp1 erreichen drei weiteren NPFs neben Pan1 und Las17 das sich bildende Vesikel, wodurch eine exakte Regulation des Aktin-Netzwerks gewährleistet wird (Jonsdottir und Li, 2004; Kaksonen et al., 2003; Sun et al., 2006). Die Aktivität der NPFs wird durch hinzukommende und bereits vorhandene Faktoren reguliert. So sind Syp1 und Sla1 z.B. Inhibitoren für Las17 und verhindern die Aktin- Polymerisation während der frühen Phase. Während der Einstülpung werden sie wiederum durch die nun rekrutierten Proteinen Bzz1 (F-BAR-Protein, Syndapin-Homolog), und Vrp1 (WIP-Homolog) inhibiert (Boettner et al., 2009; Soulard et al., 2005). Proteine wie Sac6 (Fimbrin- Homolog) und Scp1 (Transgelin-Homolog) fördern die Bündelung der Aktinfilamente und steigern dadurch die Zugkraft (Goodman et al., 2003).

### *Abschnürung des Vesikels und Abbau des Proteinmantels*

Im letzten Schritt der Endozytose wird das entstehende Vesikel von der Membran getrennt. Hierzu müssen die sich gegenüberliegenden Membranen der Halsregion in unmittelbare Nähe

gebracht werden, damit sie fusionieren können. Dies wird durch die membrankrümmende Eigenschaft der N-BAR-Proteine (N-terminale BAR-Domäne) Rvs161 und Rvs167 (Amphiphysin-Homologe) ermöglicht (Youn et al., 2010). Das Dynamin-Homologe Vps1 wirkt zwar an diesem Prozess mit, spielt aber im Gegensatz zu den Amphiphysinen nur eine geringe Rolle (Smaczynska-de Rooij et al., 2012). Um die Fusion der Membranen zu realisieren wird durch die Amphiphysine und andere PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>-bindende Proteine wie Sla2, Ap1801/2 und Ent1/2 die Zusammensetzung der Lipide innerhalb der endozytischen Membran verändert (Liu et al., 2006). Geladene Lipide wie PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> konzentrieren sich in der Halsregion und werden dort vor einer Dephosphorylierung durch Sjl1/2 (Synaptojanin-Homologe) geschützt. Die so entstehende Lipidphasen-Trennung erzeugt eine Spannung in der Membran, die zu einer weiteren Reduktion des Abstands der gegenüberliegenden Membranen führt und die Fusion unterstützt. Nach der Freisetzung des Vesikels werden die Mantelproteine und PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> durch die Kinasen Ark1 und Prk1 dephosphoryliert (Cope et al., 1999). Der Proteinmantel löst sich auf und die Proteine werden unter Mitwirkung der GTPase Arf3 und der GTPase-aktivierenden Proteine Gts1 und Lsb1 abgebaut (Toret et al., 2008). Schließlich wird durch die Aktin-bindenden Proteine Cof1 (Cofilin-Homolog), Aip1 und Crn1 (Coronin-Homolog) das Aktin-Zytoskelett abgebaut (Lin et al., 2010).

Der Prozess der CME ist hoch komplex und die Funktion einiger beteiligter Proteine noch nicht genauer bekannt. Die Koordination der bisher identifizierten ca. 60 Proteine und der Mechanismus zur Rekrutierung der Cargo-Moleküle sind daher nicht vollständig aufgeschlüsselt. Die geringe Anzahl der essentiellen Proteine deutet auf redundante Funktionen vieler Komponenten hin.

Etwa 85% der Proteine aus *S. cerevisiae* weisen Homologien zu Proteinen aus Säugern auf, was von einer starken evolutionären Konservierung des Prozesses zeugt (Weinberg und Drubin, 2012). Zusammen mit den gut etablierten gentechnischen Methoden macht dies die Hefe zu einem attraktiven Modelorganismus, um den Mechanismus der CME zu analysieren. Die Übertragbarkeit der Ergebnisse ist allerdings auf die grundsätzlichen Prinzipien der CME beschränkt. In *S. cerevisiae* ist der Ablauf des Prozesses relativ konstant aber in Säugern gibt es je nach Zelltyp Unterschiede in der Dynamik, der Organisation der endozytischen Strukturen und dem Bedarf an Aktin und demnach eine der Funktion der Zelle entsprechende Anpassung des Prozesses.

Ein wesentlicher Nachteil bei der Untersuchung der CME in *S. cerevisiae* ist die Konzentration der endozytischen Ereignisse in der Tochterzelle, da deren geringe Größe die Auflösung einzelner Ereignisse erschwert (Weinberg und Drubin, 2012). Der Zusammenhang zwischen Endozytose und dem Aufbau und der Erhaltung einer Zellpolarität lässt sich im Hefemodell ebenfalls nur schwer untersuchen, da sie hauptsächlich isotrop wächst und die Feinregulation der Zellpolarität eine geringere Rolle spielt als bei filamentös wachsenden Organismen oder stark polarisierten Zellen wie z.B. Neuronen. Zur Untersuchung der Bedeutung der Endozytose während des schnellen, polaren Wachstums eignen sich daher besonders filamentös wachsende Pilze wie *Neurospora crassa*, *Aspergillus nidulans* oder der für diese Arbeit verwendete Ascomycet *Ashbya gossypii* (Knechtle et al., 2003; Peñalva, 2010; Riquelme et al., 2011). Ein besonderer Vorteil von *A. gossypii* ist dabei die nahe Verwandtschaft zu *S. cerevisiae*, die einen direkten Vergleich der Mechanismen in beiden Organismen ermöglicht (Philippsen et al., 2005).

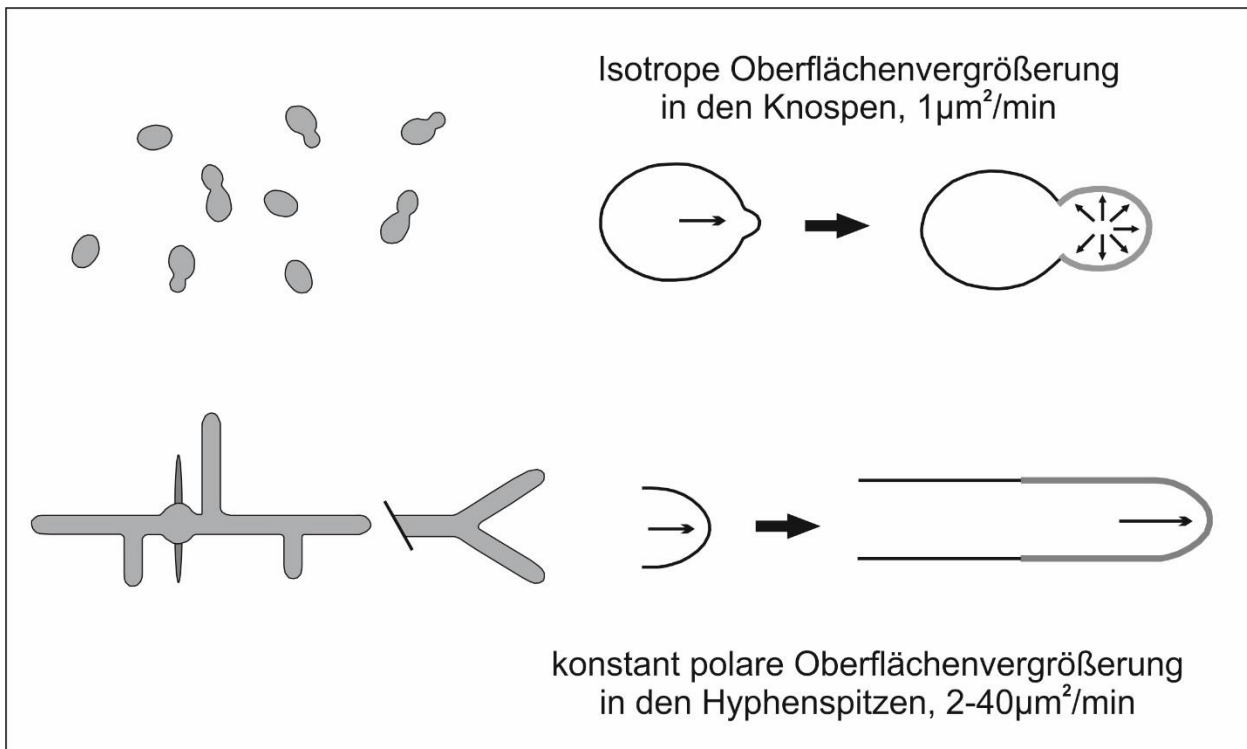
### 1.5 *Ashbya gossypii* als Modellsystem

*A. gossypii*, auch bekannt als *Eremothecium gossypii* oder *Nematospora gossypii*, ist ein filamentös wachsender Ascomycet der Familie *Saccharomycetaceae*. Der pflanzenpathogene Pilz wurde 1926 erstmals von Baumwolle isoliert und verursacht die sogenannte Stigmatomykose, was zu Beginn des 20. Jahrhunderts zu erheblichen Ernteaufällen beim Baumwoll- und Zitrusfruchtanbau führte (Ashby und Nowell, 1926; Prillinger et al., 1997). *A. gossypii* ist ein natürlicher Überproduzent des Vitamins B<sub>2</sub> (Riboflavin), und wird seit der Mitte des 20. Jahrhunderts zur industriellen Produktion des Vitamins als Nahrungsergänzungsmittel oder Farbstoff eingesetzt (Stahmann et al., 2001; Wickerham et al., 1946). Mit der Analyse des Genoms und den daraus resultierenden Kenntnissen über die molekulare Genetik und Zellbiologie wurde *A. gossypii* als Modelorganismus für die Molekularbiologie interessant. Das *Ashbya*-Genom-Projekt offenbarte eine nahe Verwandtschaft zur Bäckerhefe *S. cerevisiae*. So besitzen 95% der Gene aus *A. gossypii* Homologe in *S. cerevisiae* mit einer mehrheitlich syntenischen Anordnung und man geht heute davon aus, dass sich die beiden Ascomyceten vor etwa 100 Millionen Jahren aus einem gemeinsamen Vorfahren entwickelten (Altmann-Jöhl und Philippsen, 1996; Dietrich et al., 2004). In der *S. cerevisiae*-Linie kam es zu einer Duplikation des gesamten Genoms, allerdings verloren viele der so entstandenen Genpaare eine der beiden Kopien, wodurch das heutige *S. cerevisiae*-Genom mit ca. 6000 Genen auf 16 Chromosomen und

etwa 500 Genpaaren entstand. In der *A. gossypii*-Linie kam es wahrscheinlich zum Verlust eines Chromosoms durch den Bruch eines Centromers und anschließender Fusion der Chromosomenfragmente mit zwei weiteren Chromosomen. So umfasst das heutige *A. gossypii*-Genom etwa 9 Millionen Basenpaare auf 7 Chromosomen mit ca. 4800 Genen und ist somit sehr kompakt (Dietrich et al., 2004; Gordon et al., 2009; Kellis et al., 2004).

Trotz der nahen Verwandtschaft weisen *S. cerevisiae* und *A. gossypii* einen völlig unterschiedlichen Wachstumsmodus auf (Philippsen et al., 2005; Schmitz und Philippsen, 2011). *S. cerevisiae* ist ein einzelliger Organismus und vermehrt sich durch Knospung (vgl. Abbildung 4). Abgesehen von einer kurzen Phase polaren Wachstums während der Bildung der Tochterzelle, wächst die Bäckerhefe isotrop (Pruyne und Bretscher, 2000). Der Lebenszyklus umfasst sowohl eine haploide, als auch eine durch Paarung der haploiden Zellen eingeleitete diploide Phase. Die Reduktion zu haploiden Kernen erfolgt durch Sporulation (Herskowitz, 1988). *A. gossypii* wächst dagegen ausschließlich polar durch stetige Verlängerung der Hyphen an den Spitzen und steigender Wachstumsgeschwindigkeit (Knechtle et al., 2003). Die mehrkernigen Hyphen werden in regelmäßigen Abständen durch Septen unterteilt, wobei die Zellkompartimente aber durch Septenporen verbunden bleiben. Die Bildung der Septen verläuft bis auf die Zellseparation homolog zur Zytokinese in Hefe (Kaufmann und Philippsen, 2008; Walther und Wendland, 2003). Im frühen Stadium bilden sich zunächst nur laterale Verzweigungen. Ab einer Wachstumsgeschwindigkeit von 80  $\mu\text{m}/\text{h}$  wechselt das Verzweigungsmuster jedoch zum sogenannten „tip splitting“ oder apikalen Verzweigung (Schmitz et al., 2006). Durch das konstante Spitzenwachstum bildet sich ein Myzel mit einer Wachstumszone im äußeren Rand (Ayad-Durieux et al., 2000). Im Gegensatz zur Hefe ist der Lebenszyklus von *A. gossypii* recht simpel und umfasst ausschließlich eine haploide Wachstumsphase ohne sexuelle Vermehrung sowie die Bildung einkerniger, vegetativer Sporen in den älteren Teilen des Myzels (Wendland und Walther, 2005).

Durch die Möglichkeit der genetischen Manipulation mittels homologer Rekombination und die Entwicklung einer effizienten Transformationsmethode und mehrerer Selektionsmarker für *A. gossypii* wurde die Analyse dieses Organismus auf molekularer Ebene ermöglicht (Steiner et al., 1995; Wendland et al., 2000; Wright und Philippsen, 1991). Zusammen mit dem kompakten Genom, den haploiden Zellkernen, dem einfachen Lebenszyklus und der nahen Verwandtschaft zu *S. cerevisiae* macht dies *A. gossypii* zu einem idealen Modelorganismus für polares Wachstum.



**Abbildung 4: Unterschiede in Morphologie und Oberflächenwachstum zwischen *S. cerevisiae* und *A. gossypii*.** *S. cerevisiae* vermehrt sich durch Knospung. Neue Knospen wachsen durch isotrope Oberflächenvergrößerung. *A. gossypii* wächst ausschließlich filamentös und entwickelt durch Verzweigung ein Myzel. Mit steigender Wachstumsgeschwindigkeit wechselt das Verzweigungsmuster von lateral zu apikal. *A. gossypii* wächst ausschließlich an der Hyphenspitze und weist somit eine konstant polare Oberflächenvergrößerung auf. Modifiziert nach Schmitz und Philippsen (2011).

## 1.6 Polares Wachstum und Endozytose in *Ashbya gossypii*

Von der Bildung der ersten Keimröhre bis zum reifen Myzel nimmt die Wachstumsgeschwindigkeit der Hyphen bis zu einer Maximalgeschwindigkeit von etwa  $200\ \mu\text{m}/\text{h}$  stetig zu (Ayad-Durieux et al., 2000; Knechtle et al., 2003). Die Oberflächenvergrößerung steigt dabei auf bis zu  $40\ \mu\text{m}^2\ \text{min}^{-1}$  und ist damit im Vergleich zu einer sich bildenden Tochterzelle in *S. cerevisiae* ca. 40-fach erhöht (Karpova et al., 2000; Kohli et al., 2008b). Um den Aufbau der Zellwand zu gewährleisten, müssen in den schnell wachsenden Hyphen vermutlich über 1000 Vesikel in der exozytischen Zone an den Hyphenspitzen prozessiert werden (Collinge und Trinci, 1974). Ältere Bereiche der Zellwand und der Membran entfernen sich durch das konstante Spitzenwachstum stetig von der Wachstumszone. Um die Polarität der Hyphen zu erhalten, ist es notwendig Polaritätsfaktoren in der Membran und auch

überschüssiges Membranmaterial in den subapikalen Bereichen zu entfernen. Dies geschieht durch Endozytose und ist ein entscheidender Prozess beim polaren Hyphenwachstum.

Die bisherigen Kenntnisse zur Endozytose in *A. gossypii* basieren überwiegend auf den Beobachtungen der Aktin-Patches, die auch in *S. cerevisiae* Endozytosestellen repräsentieren (Knechtle et al., 2003; Knechtle et al., 2006; Kohli et al., 2008b). Neben den langen Aktin-Kabeln, die den schnellen Vesikeltransport zur Spitz ermöglichen und den an den Septen lokalisierten Aktin-Ringen bilden die Aktin-Patches die dritte der in *A. gossypii* vorkommenden Aktinstrukturen. Durch markiertes Phalloidin können diese Aktinstrukturen fluoreszenzmikroskopisch sichtbar gemacht werden (Knechtle et al., 2003). Aktin-Patches zeigen eine ringförmige Anordnung in der Nähe der Hyphenspitze. Diese endozytische Zone ist räumlich von der sich an der Spitze befindlichen exozytische Zone getrennt. Mit steigender Wachstumsgeschwindigkeit wird sie lateral verbreitert und entfernt sich weiter von der Hyphenspitze (Kohli et al., 2008b). Der subapikale Aktinring konnte auch in anderen filamentösen Pilzen wie *Neurospora crassa* und *Aspergillus nidulans* beobachtet werden und ist ein charakteristisches Merkmal bei der Organisation der Wachstumszonen beim polaren Hyphenwachstum (Araujo-Bazán et al., 2008; Delgado-Álvarez et al., 2010; Taheri-Talesh et al., 2008).

Ein wesentlicher Nachteil bei der Analyse des endozytischen Verhaltens mittels Aktin-Patches ist die notwendige Fixierung der Zellen für die Markierung mit Phalloidin. Untersuchungen zur Dynamik sind dadurch nicht möglich und eine Verfälschung des Lokalisierungsmusters kann nicht gänzlich ausgeschlossen werden.

Um einen genaueren Einblick in den Mechanismus und die Dynamik der Endozytose zu erhalten, ist es unentbehrlich den Prozess in lebenden Zellen zu untersuchen. Dies wird durch die Markierung von Proteinen mit fluoreszierenden Proteinen und „live-cell-imaging“ Methoden wie die TIRF-Mikroskopie ermöglicht. Durch den hohen Grad an Homologie zu *S. cerevisiae* bietet *Ashbya* als Modelorganismus die Möglichkeit zu komparativen Studien, was zu einem weitreichenden Verständnis der Regulation des schnellen, polaren Wachstums beiträgt.

### 1.7 Ziele der Arbeit

Die Endozytose ist ein wichtiger Bestandteil bei der Erzeugung und der Erhaltung von Zellpolarität in eukaryotischen Zellen, da sie zu einer asymmetrischen Verteilung von Membranproteinen beiträgt. Filamentös wachsende Pilze zeigen eine extreme Form der Zellpolarität, da diese während des Hyphenwachstums konstant aufrechterhalten wird.

In dieser Arbeit soll anhand des Modellorganismus *A. gossypii* die Bedeutung der Endozytose für das polare Wachstum genauer untersucht werden. Hierbei sollte insbesondere der Einfluss der Wachstumsgeschwindigkeit auf den endozytischen Prozess analysiert werden. Verschiedene aus *S. cerevisiae* bekannte Homologe endozytischer Proteine wurden durch „live-cell-imaging“-Methoden untersucht, um die Dynamik des Prozesses zu visualisieren. Die Deletion einzelner Komponenten soll außerdem Aufschluss über deren Funktion und Bedeutung während der Endozytose in *A. gossypii* geben. Die nahe Verwandtschaft mit *S. cerevisiae* und das bereits vorhandene Wissen über den Prozess der Endozytose in dem einzelligen Organismus, ermöglicht einen direkten Vergleich des endozytischen Prozesses bei verschiedenen Wachstumsmodi. Unterschiede zwischen den beiden Organismen geben somit Hinweise auf die Anpassung der Endozytose an schnelles, polares Wachstum auf molekularer Ebene. Ein besonderes Augenmerk wird hierbei auf die Bedeutung des Mantelproteins Clathrin für die Endozytose in *A. gossypii* gelegt.



## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien, Verbrauchsmaterialien, Kits

Die verwendeten Chemikalien und Verbrauchsmaterialien wurden von den Firmen Applichem (Darmstadt, Deutschland), BD (Franklin Lakes, NJ, USA), Boehringer Ingelheim (Ingelheim, Deutschland), Difco (Heidelberg, Deutschland), Eppendorf (Hamburg, Deutschland), Formedium (Hunstanton, England), Greiner BioOne (Frickenhausen, Deutschland), Merck (Darmstadt, Deutschland), Omnilab (Bremen, Deutschland), Roche (Mannheim), Roth (Karlsruhe, Deutschland), Riedel-de Haën (Seelze), Serva (Heidelberg, Deutschland), Roth (Karlsruhe, Deutschland), Sigma-Aldrich (St. Louis, USA), und bezogen.

Während der Arbeit wurden folgende Kits verwendet:

„High Pure Plasmid Isolation Kit“ (Roche), „High Pur PCR Product Purification Kit“ (Roche, Mannheim), „GeneJET Plasmid Miniprep Kit“ (Thermo Scientific, St. Leon-Rot), „GeneJET Gel Extraction Kit“ (Thermo Scientific, St. Leon-Rot). Die Nutzung erfolgte, soweit nicht anders angegeben, nach Angaben des Herstellers.

#### 2.1.2 Enzyme

Die verwendeten Restriktionsenzyme wurden von der Firma Thermo Scientific bezogen. Zur Herstellung von Plasmiden wurden außerdem folgende Enzyme verwendet: „T4-DNA Ligase“, „FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase“, „Klenow Fragment“ (Thermo Scientific, St. Leon-Rot). Für die Amplifikation von DNA-Fragmenten wurden folgende Enzyme verwendet: „DreamTaq DNA Polymerase“, „Phusion High-Fidelity DNA Polymerase“ (Thermo Scientific) sowie der „High Fidelity PCR Enzyme Mix“ (Roche). Zur Aufreinigung der Sporen von *A. gossypii* wurden die Enzyme „Zymolyase-20T“ (MP Biomedicals Solon, Ohio, USA) und „Glucanex“ (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) eingesetzt.

## 2.1.3 Stämme und Medien

### 2.1.3.1 *A. gossypii* Stämme und Medien

Die in dieser Arbeit verwendeten *A. gossypii* Stämme sind in Tabelle 1 aufgeführt.

**Tabelle 1: In dieser Arbeit verwendete und konstruierte *A. gossypii* Stämme.**

Name	Genotyp	Quelle
$\Delta/\Delta t$	<i>Agleu2Δ Agthr4Δ</i>	Altmann-Jöhl und Philippsen, 1996
Myo3/5-GFP	<i>AgMYO3/5-GFP-NAT1; Agleu2Δ Agthr4Δ</i>	Philippsen, pers. Mitteilung
Rvs167-GFP	<i>AgRVS167-GFP-GEN3; Agleu2Δ Agthr4Δ</i>	Philippsen, pers. Mitteilung
DAA10	<i>AgMYO3/5-GFP-NAT1; AgRVS167-mCherry-GEN3; Agleu2Δ Agthr4Δ</i>	diese Arbeit
DAA11	<i>AgMYO3/5-GFP-NAT1; AgCHC1-mCherry-GEN3; Agleu2Δ Agthr4Δ</i>	diese Arbeit
DAA12	<i>AgCHC1-GFP-NAT1; Agleu2Δ Agthr4Δ</i>	diese Arbeit
DAA13	<i>AgCHC1-GFP-NAT1; AgRVS167-mCherry-GEN3; Agleu2Δ Agthr4Δ</i>	diese Arbeit
DAA15	<i>AgCHC1-mCherry-GEN3; Agleu2Δ Agthr4Δ</i>	diese Arbeit
DAA22	<i>AgMYO3/5-GFP-NAT1; Agclc1Δ::GEN3; Agleu2Δ Agthr4Δ</i>	diese Arbeit
DAA24	<i>Agchc1Δ::GEN3; Agleu2Δ Agthr4Δ</i>	diese Arbeit
DAA33	<i>AgMYO3/5-mCherry-LEU2; Agleu2Δ Agthr4Δ</i>	diese Arbeit
DAA34	<i>AgMYO3/5-GFP-NAT1; AgCLC1-mCherry-GEN3; Agleu2Δ Agthr4Δ</i>	diese Arbeit
DAA36	<i>AgMYO3/5-GFP-NAT1; AgCLC1-mCherry-LEU2; Agede1Δ::LEU2; Agleu2Δ Agthr4Δ</i>	diese Arbeit
DAA37	<i>AgMYO3/5-GFP-NAT1; AgSLA1-mCherry-LEU2; Agleu2Δ Agthr4Δ</i>	diese Arbeit
DAA38	<i>AgMYO3/5-mCherry-LEU2; AgRVS167-GFP-NAT1; Agleu2Δ Agthr4Δ</i>	diese Arbeit
DAA39	<i>AgEDE1-EGFP-NAT1; AgMYO3/5-mCherry-LEU2; Agleu2Δ Agthr4Δ</i>	diese Arbeit
DAA40	<i>Agsyp1Δ::GEN3; AgMYO3/5-GFP-NAT1; Agleu2Δ Agthr4Δ</i>	diese Arbeit
DAA41	<i>AgMYO3/5-GFP-NAT1; AgABP1-mCherry-LEU2; Agleu2Δ Agthr4Δ</i>	diese Arbeit
DAA42	<i>AgCHC1-GFP-NAT1; AgABP1-mCherry-LEU2;</i>	diese Arbeit

## 2 Material und Methoden

	<i>Agleu2Δ Agthr4Δ</i>	
DAA43	<i>AgEDE1-EGFP-NAT1</i> ; <i>Agleu2Δ Agthr4Δ</i>	diese Arbeit
DAA46	<i>AgEDE1-EGFP-NAT1, AgCLC1-mCherry-GEN3</i> ; <i>Agleu2Δ Agthr4Δ</i>	diese Arbeit
DAA47	<i>AgWSC1-EGFP-LEU2</i> ; <i>Agleu2Δ Agthr4Δ</i>	diese Arbeit
DAA48	<i>Agwsc1<sub>ΔNPFDD</sub>-EGFP-LEU2</i> ; <i>Agleu2Δ Agthr4Δ</i>	diese Arbeit
VWA11	<i>AgWSC1-EGFP-LEU2; AgCHC1-mCherry-GEN3</i> <i>Agleu2Δ Agthr4Δ</i>	diese Arbeit *
JWA8	<i>AgAp1801/2-EGFP-GEN3; AgSla1-mCherry-LEU2</i> <i>Agleu2Δ Agthr4Δ</i>	diese Arbeit **
JWA7	<i>AgApLas17-EGFP-GEN3; AgSla1-mCherry-LEU2</i> <i>Agleu2Δ Agthr4Δ</i>	diese Arbeit **
JWA4	<i>AgLas17Δ::GEN3</i> ; (heterokayotisch) <i>Agleu2Δ Agthr4Δ</i> ;	diese Arbeit **
<i>Δsla1, Myo3/5-GFP</i>	<i>AgslaΔ::GEN3; AgMYO3/5-GFP-NAT1</i> ; <i>Agleu2Δ Agthr4Δ</i>	P. Philippsen, pers. Mitteilung
<i>Δrvs167, Myo3/5-GFP</i>	<i>Agrvs167Δ::GEN3; AgMYO3/5-GFP-NAT1</i> ; <i>Agleu2Δ Agthr4Δ</i>	P. Philippsen, pers. Mitteilung
VWA12	<i>Agabp1Δ::GEN3</i> ; <i>Agleu2Δ Agthr4Δ</i>	diese Arbeit *
JWA6	<i>Agap1801/2Δ::GEN3</i> ; <i>Agleu2Δ Agthr4Δ</i>	diese Arbeit **

\* Stämme wurden in Zusammenarbeit mit Verena Warnsmann, im Rahmen einer von mir betreuten Masterarbeit, konstruiert.

\*\* Stämme wurden in Zusammenarbeit mit Jan Wezel, im Rahmen einer von mir betreuten Masterarbeit, konstruiert.

A. *gossypii* Stämme wurden soweit nicht anders beschrieben bei 30°C inkubiert. Folgende Medien zur Anzucht wurden verwendet:

- Vollmedium (AFM):
  - 1% Pepton
  - 1% Hefeextrakt
  - 0,1% Myo-Inositol
  - 2% Glukose
  
- Minimalmedium (ASC):
  - 0,17% Yeast Nitrogen Base w/o amino acids
  - 0,17% Synthetic complete mixture (Kaiser)
  - Drop-Out -Leu
  - 0,1% Myo-Inositol
  - 2% Glukose

- 0,7% L-Glutamic acid potassium salt monohydrate

- 0,7% L-Aspartic acid potassium salt

Der pH-Wert wurde mit KOH auf 6,2 eingestellt.

- Agarose Medium zur  
Mikroskopie:
  - 25% ASC
  - (0,006% Leucin)
  - 2% Glukose
  - 0,5% Agarose

Zur Selektion wurden den Medien die Antibiotika Geneticinsulfat (G418) (Roth) oder clonNAT (WERNER BioAgents, Jena) in den Endkonzentrationen 0,2 mg/ml hinzugefügt.

Zur Herstellung von Platten wurde dem Medium 1,5% Agar zugegeben.

### 2.1.3.2 *S. cerevisiae* Stämme und Medien

Die in dieser Arbeit verwendeten *S. cerevisiae* Stämme sind in Tabelle 2 aufgeführt.

**Tabelle 2: In dieser Arbeit verwendete bzw. konstruierte *S. cerevisiae*-Stämme.**

Name	Genotyp	Quelle
DHD5	<i>MAT a/α ura3-52/ura3-52 leu2-3,112/ leu2-3,112 his3-11,15/ his3-11,15</i>	Kirchrath et al., 2000
BY4741	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	Brachmann et al., 1998
BY4742	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0</i>	Brachmann et al., 1998
BY4743	<i>MATa/MATα his3Δ1/his3Δ1 leu2Δ/leu2Δ0 met15Δ0/MET15 LYS2/lys2Δ0 ura3Δ0/ura3Δ0</i>	Brachmann et al., 1998
MKY100	<i>MATa his3-Δ200 leu2-3, 112 ura3-52 lys2-801</i>	M. Kaksonen, pers. Mitteilung
MKY267	<i>MATa his3-Δ200 leu2-3, 112 ura3-52 lys2-801 clc1::NAT1</i>	M. Kaksonen, pers. Mitteilung
DAY13	<i>MKY100 + clc1::AgCLC1-EGFP-LEU2</i>	diese Arbeit
DAY14	<i>MKY100+ clc1 214-702::AgCLC1-EGFP-LEU2</i>	diese Arbeit

*S. cerevisiae* Stämme wurden soweit nicht anders beschrieben bei 30°C inkubiert. Folgende Medien zur Anzucht wurden verwendet:

- Vollemedium (YEPD):
  - 2% Peptone
  - 1% Hefeextrakt
  - 2% Glukose
  
- Minimalmedium (SC):
  - 0,067% Yeast Nitrogen Base w/o amino acids
  - 0,06% CSM -HIS –LEU –TRP -URANukleotidbasen und Aminosäuren wurden gemäß der angegebenen Konzentrationen nach Zimmermann (1975) hinzugefügt. Der pH-Wert wurde mit NaOH auf 6,2 eingestellt.
  
- Sporulationsmedium:
  - 1% Kaliumacetat
  - 3% Agar

Zur Selektion wurden den Medien das Antibiotikum Geneticinsulfat (G418) (Roth) in den Endkonzentrationen 0,2 mg/ml hinzugefügt. Zur Herstellung von Platten wurde dem Medium 1,5% Agar zugegeben.

### 2.1.3.3 *E. coli* Stämme und Medien

In dieser Arbeit wurde der Stamm DH5 $\alpha$  (*F'glnV44 thiA-1  $\Delta$ (argF-lac) U169 deoR endA1 gyrA96 hsdR17 recA1 supE44 ( $\emptyset$ 80lacZ $\Delta$ M15) Nalr*) von Stratagene (La Jolla, California) für molekularbiologische Arbeiten verwendet.

Die Anzucht erfolgte bei 37°C in Vollmedium (1% Tryptone 0,5% Hefe Extrakt, 0,5% NaCl). Zur Selektion auf Plasmide wurde dem Medium Ampicillin mit der Endkonzentration 100  $\mu$ g/ml zugegeben. Zur Herstellung von Platten wurde dem Medium 1,5% Agar hinzugefügt.

### 2.1.4 Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Vektoren oder Plasmide sind in Tabelle 3 aufgeführt. Plasmide die im Zuge dieser Arbeit konstruiert wurden sind in Tabelle 4 beschrieben.

**Tabelle 3: In dieser Arbeit verwendete Vektoren und Plasmide.**

Name	Beschreibung	Quelle
pAGT100	<i>E. coli</i> Vektor mit MCS und <i>NAT1</i> Marker	Kaufmann, 2009
pAGT101	<i>E. coli</i> Vektor mit MCS und <i>GFP</i> Kasette mit <i>NAT1</i> Marker für C-terminale Fusionen	Kaufmann, 2009
pAGT120	<i>E. coli</i> Vektor mit MCS und <i>LEU2</i> Marker	Kaufmann, 2009
pAGT140	<i>E. coli</i> Vektor mit MSC und <i>GEN3</i> Marker	Kaufmann, 2009
pAGT201	<i>E. coli</i> Vektor mit MCS und <i>yEGFP</i> Kasette mit <i>NAT1</i> Marker für C-terminale Fusionen	Kaufmann, 2009
pAGT211	<i>E. coli</i> Vektor mit MCS und <i>mCherry</i> Kasette mit <i>NAT1</i> Marker für C-terminale Fusionen	Kaufmann, 2009
pAGT221	<i>E. coli</i> Vektor mit MCS und <i>yEGFP</i> Kasette mit <i>LEU2</i> Marker für C-terminale Fusionen	Kaufmann, 2009
pAGT231	<i>E. coli</i> Vektor mit MCS und <i>mCherry</i> Kasette mit <i>LEU2</i> Marker für C-terminale Fusionen	Kaufmann, 2009
pAGT241	<i>E. coli</i> Vektor mit MCS und <i>yEGFP</i> Kasette mit <i>GEN3</i> Marker für C-terminale Fusionen	Kaufmann, 2009
pAGT251	<i>E. coli</i> Vektor mit MCS und <i>mCherry</i> Kasette mit <i>GEN3</i> Marker für C-terminale Fusionen	Kaufmann, 2009
pFA6a-GFP(S65T)-KanMX6	<i>E. coli</i> Vektor mit MCS und <i>GFP</i> Kasette mit <i>KanMX</i> Marker für C-terminale Fusionen	Longtine et al., 1998
pHPS250	<i>CEN/ARS</i> Vektor mit <i>LEU2</i> Marker und <i>lacZ'</i> für Blau/Weiß-Selektion, Insert: <i>AgRHO1b-GFP</i>	Schmitz, pers. Mitteilung
pHPS797	<i>CEN/ARS</i> Vektor mit <i>URA3</i> Marker und <i>lacZ'</i> für Blau/Weiß-Selektion, Insert: <i>AgWSC1</i>	Schmitz, pers. Mitteilung
pMAT-WSC1ΔNPFDD	synthetisch hergestelltes <i>Agwsc1</i> <sub>Δ1000-1014</sub>	GeneArt®

## 2 Material und Methoden

pUC21	<i>E. coli</i> Vektor mit MCS zur und Blau/Weiß- Selektion	Vieira und Messing, 1991
YCplac111	<i>CEN/ARS</i> Vektor mit <i>LEU2</i> Marker und <i>lacZ</i> <sup>-</sup> für Blau/Weiß- Selektion	Gietz und Sugino, 1988
YCplac33	<i>CEN/ARS</i> Vektor mit <i>URA3</i> Marker und <i>lacZ</i> <sup>-</sup> für Blau/Weiß- Selektion	Gietz und Sugino, 1988

**Tabelle 4: Für diese Arbeit konstruierte Plasmide.**

Name	Rückgrat	Insertion	Konstruktion
pDA10	pAG11667 ( <i>AgCHC1</i> - C-Terminus)	<i>mCherry-GEN3</i>	Amplifikation der <i>mCherry-GEN3</i> Kasette mit den Oligonukleotiden B10.03/B10.02 von pAGT251, homologe Rekombination mit pAG11667
pDA11	pAG11667 ( <i>AgCHC1</i> - C-Terminus)	<i>GFP-NAT1</i>	Amplifikation der <i>GFP-NAT1</i> Kasette mit den Oligonukleotiden B10.01/B10.02 von pAGT101, homologe Rekombination mit pAG11667
pDA12	pAG18435 ( <i>AgRVS167</i> )	<i>mCherry-GEN3</i>	Amplifikation der <i>mCherry-GEN3</i> Kasette mit den Oligonukleotiden B10.04/B10.05 von pAGT251, homologe Rekombination mit pAG18435
pDA13	pUC21	<i>AgCHC1-mCherry-GEN3</i>	Umklonierung von <i>AgCHC1-mCherry-GEN3</i> aus pDA10 über <i>EagI</i> und <i>SpeI</i>
pDA14	pBSII	<i>AgCHC1-GFP-NAT1</i>	Umklonierung von <i>AgCHC1-GFP-NAT1</i> aus pDA11 über <i>EagI</i> und <i>SpeI</i>
pDA15	pUC21	<i>AgRVS167-mCherry-GEN3</i>	Umklonierung von <i>AgRVS167-mCherry-GEN3</i> aus pDA12 über <i>EagI</i> und <i>XhoI</i>
pDA22	pAG11667 ( <i>AgCHC1</i> - C-Terminus)	<i>mCherry-LEU2</i>	Amplifikation der <i>mCherry-LEU2</i> Kasette mit den Oligonukleotiden 11.065/11.026 von pAGT231, homologe Rekombination mit pAG11667
pDA23	pUC21	<i>AgCHC1-mCherry-LEU2</i>	Umklonierung von <i>AgCHC1-mCherry-LEU2</i> aus pDA22 über <i>EagI</i>
pDA26	YCplac111	<i>ScCHC1</i>	Amplifikation von <i>ScCHC1</i> mit den Oligonukleotiden 11.094/11.102 von genomischer DNA aus DHD5, Klonierung über <i>SalI</i> und <i>SmaI</i>
pDA27	pAG4878 ( <i>AgCHC1</i> - N-Terminus)	<i>ScCHC1</i> ohne Promotor	Amplifikation von <i>ScCHC1</i> mit den Oligonukleotiden 12.003/12.004 von pDA26, homologe Rekombination mit pAG4878
pDA28	YCplac33	<i>AgEDE1</i> -C-Terminus	Amplifikation von <i>AgEDE1</i> mit den Oligonukleotiden 11.052/11.105 von genomischer DNA aus $\Delta\Delta t$ , Klonierung über <i>BamHI</i> und <i>SphI</i>

## 2 Material und Methoden

pDA29	pDA28	<i>mCherry-LEU2</i>	Amplifikation der <i>mCherry-LEU2</i> Kasette von pAGT231, homologe Rekombination mit pDA28
pDA31	pAGT221		Restriktion mit <i>SacI</i> und <i>BglI</i> , Ligation mit Oligonukleotid 12.001
pDA32	pAGT231		Restriktion mit <i>SacI</i> und <i>BglI</i> , Ligation mit Oligonukleotid 12.001
pDA33	pAGT251		Restriktion mit <i>SacI</i> und <i>EcoRV</i> , Ligation nach Klenow-Polymerase Behandlung
pDA36	pHPS797	<i>AgWSC1</i>	Umklonierung von <i>AgWSC1</i> aus pHPS801 über <i>Sall</i> und <i>BstEII</i>
pDA37	pDA36	<i>EGFP-LEU2</i>	Amplifikation der <i>EGFP-LEU2</i> Kasette mit den Oligonukleotiden 11.031/11.032 aus pDA31, homologe Rekombination mit pDA36
pDA38	pUC21	<i>AgWSC1-EGFP-LEU2</i>	Umklonierung von <i>AgWSC1-EGFP-LEU2</i> aus pDA37 über <i>EagI</i>
pDA39	pDA38	<i>AgWSC1ΔNPFDD</i>	Umklonierung von <i>AgWSC1ΔNPFDD</i> aus pMAT- <i>WSC1ΔNPFDD</i> über <i>Kpn2I</i> und <i>PacI</i>
pDA40	YCplac111	<i>ScCLC1</i>	Amplifikation von <i>ScCLC1</i> mit den Oligonukleotiden 12.087/12.086 von genomischer DNA aus DHD5, Klonierung über <i>SacI</i> und <i>BamHI</i>
pDA41	pDA40	<i>mCherry-GEN3</i>	Amplifikation der <i>mCherry-GEN3</i> Kasette mit den Oligonukleotiden von pDA33, homologe Rekombination mit pDA40
pDA42	pAGT120	<i>ScCLC1-mCherry</i>	Umklonierung von <i>ScCLC1-mCherry</i> aus pDA41 über <i>SacI</i> und <i>BglII</i>
pDA43	pDA40	<i>ScCLC1</i>	Amplifikation von <i>ScCLC1</i> mit den Oligonukleotiden 12.086/12.087 von genomischer DNA aus DHD5, Klonierung über <i>PacI</i> und <i>BsaAI</i>
pDA44	pDA43	<i>ScCLC1-C-Terminus-mCherry-LEU2</i>	Umklonierung von <i>ScCLC1-C-Terminus-mCherry-LEU2</i> aus pDA42 über <i>HindIII</i>
pDA45	YCplac111	<i>AgCLC1</i>	Amplifikation von <i>AgCLC1</i> mit den Oligonukleotiden B10.12/B10.13 von genomischer DNA aus $\Delta I/\Delta t$ , Klonierung über <i>Sall</i> und <i>EcoRI</i>
pDA46	pDA45	<i>EGFP-GEN3</i>	Amplifikation der <i>EGFP-GEN3</i> Kasette mit den Oligonukleotiden 11.092/11.093 von pAGT241, homologe Rekombination mit pDA45
pDA47	pAGT120	<i>AgCLC1-EGFP</i>	Umklonierung von <i>AgCLC1-EGFP</i> aus pDA45 über <i>BglII</i> und <i>SmaI</i> (pAGT120) bzw. <i>BglII</i> und <i>BsaAI</i> (pDA45)
pDA48	pDA47	<i>ADH1-Terminator-KanMX</i>	Umklonierung des <i>ADH1-Terminators</i> mit KanMX Marker aus pFA6a-GFP(S65T)-KanMX6 über <i>PsiI</i> und <i>AscI</i> (pDA47) bzw. <i>EcoRV</i> und <i>AscI</i> (pFA6a-GFP(S65T)-KanMX6)



## 2.1.5 Oligonukleotide

Die für diese Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Microsynth (Balgach, Schweiz) bezogen und sind in Tabelle 5 aufgeführt.

**Tabelle 5: Für diese Arbeit verwendete Oligonukleotide; Sequenzen sind in 5' - 3' Richtung angegeben.**

Nummer	Bezeichnung	Sequenz
B10.01	chc1-GFP_nat_F1	AGGTCAGCCACTTCTACTACCAATGGTGCGGCGGGTTTCAACTTTAAA ACGACGGCCAGTGAATTCCG
B10.02	chc1-GFP_nat_F2	AAGCCTACACATGAGAACCGCCCAAATGTAGCAACAAAACTATCAT GATTACGCCAAGCTTGC
B10.03	chc1-mch_GEN_F1	AGGTCAGCCACTTCTACTACCAATGGTGCGGCGGGTTTCAACTTTGGT GACGGTGCTGGTTTAATTAAC
B10.04	RVS167-mch_GEN_F1	GGCCGTGAAGGCCTCTTTCCAGCTAACTACGTCGCACTGAAGCACGGT GACGGTGCTGGTTTAATTAAC
B10.05	RVS167-mch_GEN_F2	TTAATTACTGTTGGCCGCCATTTCTTTTGCAGGCCGAGAAACAGCCATG ATTACGCCAAGCTTGC
B10.06	chc1_I1	GTGGTCATTTCCAGGATTC
B10.07	chc1_G4	CTGATACGGGAATGCCGTTG
B10.08	RVS167_I1	CTACTCCGAGCCTTCTCTACG
B10.09	RVS167_G4	TGCCGGACTACTGAACTAC
B10.10	Clc1_F1	CGCAACAGAATGTCCTTGAACCTTGAACGGTCGCGGTCTCCCAACAAA ACGACGGCCAGTGAATTCCG
B10.11	Clc1_F2	CCGTCTGAGTAGGTGACTGGACTTACGACCGTGCAACTCTAAACACAT GATTACGCCAAGCTTGC
B10.12	Clc1_G1	GTGAGCTGGCTGTTCAACTG
B10.13	Clc1_G4	AAGGCATCGTCTGCTCTC
B10.14	Clc1_I1	GTTCTGAGCCATTCCGAAG
B10.15	Clc1_I2	TTTATGGCCTCCGCTGTAG
10.042	AgCHC1-G4	GGTGAAGAAAGCGAAGAAGG
10.043	AgRVS167-G4	TTTGTGTTGCCGGACTACTG
10.056	seqCHC-1f	GTTGGCATCCCAGAAGTAC
10.057	seqCHC-2f	AGGAGGCATCGAACTATGAG
10.058	seqCHC-3f	TTATTCGAGGCCGGATTAGG
10.059	seqCHC-4f	GACTACAAGGCTCTCCAAAG
10.060	seqCHC-mCh-5f	ACCGCCAATCAGCAAACACTAC
10.061	seqCHC-mCh-6f	GCTGGCCTGTTGAACAAGTC
11.020	CHC1_I1	GTGGTCATTTCCAGGATTC
11.026	chc1-GFP_nat_F2	AAGCCTACACATGAGAACCGCCCAAATGTAGCAACAAAACTATCAT GATTACGCCAAGCTTGC
11.051	EDE1_for_SphI	AACGTGCATGCACAAGCAGCGATTTGTGAGG
11.052	EDE1_rev_SphI	AACGTGCATGCGACCGGCTGTACGAGAAATG
11.053	EDE1_L2_F1	AAGTGGAACTGGAAGCCGCTACTAACATGCTTCTGGACGGTAGCCGA CGGATCGGTGACGGTGCTG
11.054	EDE1_L2_F2	GAATACTACTATATTCTGCCTAAAAAGTATGACAAGAACCACGCACATG ATTACGCCAAGCTTGC
11.069	AgCHC1_NS1	AGGCCTAGAGACTACTCGGGGCTGCATAGAGAGCGGCTAACTAGCCG ACGGCCAGTGAATTCGAG
11.072	AgCHC1_G1	CAGGGACGAACGCGACTAAC

## 2 Material und Methoden

11.073	AgCHC1_I2	CCCAGCACCTCGTCATTCAG
11.092	CLC1_F1	TTGCGGCTGAAGGGCCAGGAGCATGTTCCAGGAGCAGCTCGCGGCGC TTCGTACGCTGCAGGTCG
11.093	CLC1_F2	AATCTAGTCTTGTTAATACTATTGTATATACTCCCGAATATACGGCATGA TTACGCCAAGCTTGC
11.094	ScCHC1_Sall_for	ACTGGTCGACGTGATGATGAGCGGAATGAG
11.095	EDE1_I1	CAGTGGGTAACGACGAATGG
11.096	RVS167_I1_neu	TTCCTACGGCTCCTCTAGTG
11.097	RVS167_seq	AGAAGCATCCGAGCAGTATC
11.098	WSC1_seq_1	CAGGGACTACTGCCTATGTG
11.099	WSC1_seq_2	TCGACTACGAGGAGGCTATG
11.100	WSC1_seq_3	TACATAGCCTCCTCGTAGTC
11.101	WSC1_seq_4	CGCCTGGATACTGCTTACAC
11.102	ScCHC1_Smal_rev	ACTGCCCCGGGCTTACTGGGTTTCACCAGCA
11.103	ABP1_seq_2	GGGATGAGGACGACCTGAAC
11.104	ABP1_seq_3	GACGAACACGAGGAGAGTAG
11.105	EDE1_seq_1	TATCTCGGCCGTATCCCTG
11.106	EDE1_seq_2	CCTTCTCCGCAAGGTAATC
11.107	EDE1_seq_3	GAAGGAAGTGGACGACTACC
11.108	EDE1_seq_4	GACGAAGCTGTGAGTGATAC
12.001	Insert_Sacl_BgIII	GATCAGCT
12.003	ScCHC1woP_for	ATAGAGAGCGGCTAACTAGCAGTGCTGAGCATCGACGCACAGATCAT GAGTGACCTACCCATTGA
12.004	ScCHC1woP_rev	GCTGGAGCTCCACCGGGTGGCGGCCGCTCTAGAACTAGTGGATCGG GACTGCTTACTGGGTTTC
12.005	ScCHC1AgP_F1	TTGATGCTGATGAACAGCGGATGAACGTTCAACCCACAGGATTTTCG TACGCTGCAGGTCGACG
12.006	ScCHC1AgP_F2	AAAAAAAAAATACACGATGGGGTACAGCAAACGAATTATTTTATCCAT GATTACGCCAAGCTTGC
12.015	MYO3/5_F2	ATATGAACTAAGCTTCTATCACAGTTATTGTCTAGGCGCTTAGATCATG ATTACGCCAAGCTTGC
12.016	MYO3/5_G1	TATCACATCAGGCGGCTCG
12.017	MYO3/5_G4	TCAAAGAGCTCGTCCAATG
12.018	MYO3/5_I1	TCGCCTTCTGCTCCTCTC
12.019	MYO3/5_F1	CGCCATGAGGACTCAGGCAGTGACGACAATGCCGATGATGACTGGCG GATCGGTGACGGTGCTGG
12.036	Myo_I2	AGGAAGAGTACGCAAAGGAG
12.037	ScCHCAgP_seq1	GGTGTCGCTACCAACCTAC
12.071	EDE1_NS1	ATTATAAGCGGAATACAGATACTGAACGCAAGCAGTTCACAAGCGCC AGTGAATTCGAGCTCGG
12.072	ScCHCAg-P_seq2	AGACGTTTCGAGGTCAGTATG
12.073	ScCHCAg-P_seq3	CAATAGCGTCTTCCATAGC
12.074	ScCHCAg-P_seq4	ACAGCAGCCTGATAATCTCC
12.075	ScCHCAg-P_seq5	CAGGGATACCAACGGAGATG
12.076	ScCHCAg-P_seq6	GCCACCTGTAATACGGTCTG
12.077	ScCHCAg-P_seq7	CGCCTGGTGGTGCTTGAATG
12.086	ScCLC1+P_Sacl_for	ACTGGAGCTCCCAATTCGCCCTTGACTG
12.087	ScCLC1+T_rev	GCAACAAATTGCGGTGCATC
12.109	ENT1-2_NS1	ATGTCGAAACAATTGTTGCGCAGTGCCAAGAACGTGGTGAATGGGCCA GTGAATTCGAGCTCGG
12.110	ENT1-2_F2	GGAGGTGTTGTTATTTATATGGGGGAGGACATGCCTATGATGAGTCAT GATTACGCCAAGCTTGC
12.111	ENT1-2_G1	TCGTTGGCGTTATGCAAAGC
12.112	ENT1-2_G4	GGGTTCAACTCCGACTAAG

12.201	ScCLC1-mCh_F1	GAAATTCTTTTGGAGATTGAAAGGTAACGCGAAGGCTCCCGGTGCTCGG ATCGGTGACGGTGTCTGG
12.202	ScCLC1-mCh_F2	AGTTGTCTTGATAAATGAATTTACAGTATGAATTAGTTATTTACTCATGA TTACGCCAAGCTTGC
12.203	Int_ScCLC1_F1	ACCGTCTGAGTAGGTGACTGGACTTACGACCGTGCAACTCTAAACATG TCAGAGAAATTCCTCC
12.204	Int_ScCLC1_F2	GGGTCAGCCGCGAGCTGCTCCTGGAACATGCTCCTGGCCCTTCAGCAT GATTACGCCAAGCTTGC
12.205	ScCLC1_I1	GCCTCGCCATTGTCATTACC
13.011	ENT1-2_I1	CCCAGGGTACTGGCTACAAG
13.023	Int_AgCLC1_F1	AGCAGTTGAAGGACGCCGCCGTTTCACTAGATACATATATATATAATG GCCAACGACTACTCTTC
13.024	Int_AgCLC1+ScSB_F1	GATGACGAAATTAGGGATTTTGAAGAGCAATTTCCAGATATCAACGCC AACGACTACTCTTCAAG
13.051	ScCLC1_I2	TCCGCAATGGCGCAGTCTC
13.052	CLC1_I1	GTTCTGAGCCCATTCGCAAG
13.053	CLC1_I2	TTTATGGCCTCCGCTGTAG

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 DNA-Analyse

#### 2.2.1.1 Präparation von Plasmid-DNA

Die Präparation von Plasmiden aus *E. coli* erfolgte entweder mit Hilfe des „GeneJET Plasmid Miniprep Kit“ (Thermo Scientific), nach Anweisungen des Herstellers oder durch alkalische Lyse nach Sambrook, 2001.

Die Präparation von Plasmiden aus *S. cerevisiae* erfolgte mit Hilfe des „High Pure Plasmid Isolation Kit“ (Roche). Um die Zellen aufzuschließen, wurden sie in Lösung I resuspendiert, mit 0,2 g Glasperlen versetzt und 10 min bei 4°C geschüttelt. Die weitere Behandlung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

#### 2.2.1.2 Präparation von genomischer DNA

Zur Präparation genomischer DNA aus *A. gossypii* oder *S. cerevisiae* wurde eine stecknadelkopfgröße Menge frisches Myzel mit 200 µl Extraktionspuffer (50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl pH8, 0,5% Triton-X-100) und ca. 100 mg Glasperlen versetzt. 100 µl Phenol/CIA (Roti-Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol) wurden hinzugegeben. Der Zellaufschluss erfolgte bei 4°C auf dem Schüttler. Nach anschließender Zentrifugation bei 13000 rpm und 4°C

wurde die wässrige Phase mit der genomischen DNA in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Der DNA-Gehalt wurde mit Hilfe des „Qubit fluorometer“ (Invitrogen) ermittelt.

### 2.2.1.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Zur Amplifikation von DNA-Fragmenten für Klonierungen wurde die „Phusion High-Fidelity DNA Polymerase“ (Thermo Scientific) oder der „High Fidelity PCR Enzyme Mix“ (Roche) verwendet. Die PCR-Reaktion wurde nach den Anweisungen des Herstellers der eingesetzten Polymerase durchgeführt.

Zur Überprüfung von Transformanten mittels PCR wurde die „DreamTaq DNA Polymerase“ (Thermo Scientific) eingesetzt. Hierbei wurde eine stecknadelkopfgroße Menge frisches Zellmaterial als „Template“ eingesetzt. Vor Zugabe der Polymerase wurde der PCR-Mix für 10 min auf 98°C erhitzt. Weitere Schritte erfolgten nach den Anweisungen des Herstellers der Polymerase.

Die Aufreinigung von PCR-Produkten erfolgte mit Hilfe des „High Pure PCR Product Purification Kit“ (Roche) nach Angaben des Herstellers.

### 2.2.1.4 Restriktion, Dephosphorylierung und Ligation von Nukleinsäuren

Die Restriktion, Dephosphorylierung und Ligation von Nukleinsäuren erfolgte mit den in Kapitel 2.1.4 aufgeführten Enzymen nach Angaben des jeweiligen Herstellers.

### 2.2.1.5 Auftrennung von DNA Fragmenten mittels Agarose-Gelelektrophorese

DNA Fragmente wurden zur Analyse mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Abhängig von der Größe der Fragmente wurden Agarosekonzentrationen von 0,8 % bis 4 % (in TAE Puffer; 40 mM Tris-HCl pH 8.3, 20 mM Essigsäure, 1 mM EDTA) eingesetzt. Die Trennung erfolgte für 35 min bei 120 V. Als Größenstandard wurde der „GeneRuler DNA Ladder Mix“ (Thermo Scientific) eingesetzt. Nach der Elektrophorese wurde die DNA 20 min in einer Ethidiumbromidlösung (1 µg/ml) gefärbt und durch UV-Licht sichtbar gemacht.

### 2.2.1.6 Isolation von DNA Fragmenten aus Agarose-Gelen

Zur Isolation von DNA Fragmenten aus Agarose-Gelen wurden die entsprechenden Fragmente nach der Auftrennung aus dem Gel herausgeschnitten und mit Hilfe des „GeneJET Gel Extraction Kit“ (Thermo Scientific) gereinigt. Die Anwendung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

## 2.2.2 Transformation

### 2.2.2.1 Transformation von *Ashbya gossypii*

Die Transformation von *A. gossypii* erfolgte mittels der Methode des PCR-basierten „gene targeting“ wie in Wendland et al. (2000) beschrieben oder durch direkte Transformation mit Plasmid-DNA. Zur Herstellung der PCR-Fragmente für die Transformation kamen verschiedene Vektoren der pAGT-Serie (Kaufmann, 2009, vgl. Tabelle 3) zum Einsatz. Bei Selektion auf Antibiotika wurden die Zellen nach der Elektroporation für 5 bis 6 Stunden bei 30°C in AFM-Medium inkubiert und anschließend auf die Selektionsplatten gegeben.

Die Sporenpräparation erfolgte in Anlehnung an das Protokoll von Wright und Philippsen (1991) mit folgenden Änderungen: für den Verdau des Myzels wurden 50 µl Zymolyase (10 mg/ml) und 100 µl „Glucanex“ (20 mg/ml) zu 1 ml Zellsuspension gegeben. Der Ansatz wurde 20 bis 45 min bei 37°C inkubiert. Die Sporen wurden mit Hilfe eines Mikromanipulators („MSM System“, Singer Instruments, Watchet, UK) vereinzelt.

### 2.2.2.2 Transformation von *Saccharomyces cerevisiae*

Die Transformation von *S. cerevisiae* erfolgte mittels der Lithium-Acetat Methode nach Gietz et al. (1995). Bei Selektion auf Antibiotika erfolgte die Regeneration über Nacht in YEPD Medium bei Raumtemperatur.

Zur Sporulation von diploiden Stämmen wurden die Zellen für 3 bis 5 Tage auf Kalium-Acetat Platten inkubiert. Eine kleine Menge Zellen wurde in sterilem Wasser resuspendiert und mit 4 µl Zymolyase (10 mg/ml) versetzt, um die Wände der Asci aufzuschließen. Nach 10 minütiger Inkubation bei 37°C und anschließendem Waschen in sterilem Wasser wurden die Tetraden mit Hilfe eines Mikromanipulators („MSM System“, Singer Instruments) vereinzelt.

### 2.2.2.3 Transformation von *Escherichia coli*

Die Transformation von *E. coli* wurde mit der Rubidiumchlorid-Methode nach Hanahan (1983) durchgeführt.

## 2.3 Makroskopische Analysen

### 2.3.1 Makroskopische Analysen von *Ashbya gossypii* Mutanten

#### 2.3.1.1 Bestimmung der Wachstumsrate

Um die Wachstumsrate der verschiedenen *A. gossypii* Mutanten zu bestimmen, wurden Wachstumstests auf Festmedium durchgeführt. Dazu wurde eine kleine Menge frisches Myzel in die Mitte einer Agar-Platte gesetzt und für 7 Tage inkubiert. Die Platten wurden täglich fotografiert. Der Durchmesser der Kolonien wurde mit Hilfe der MetaMorph v7.7.6.0" Software (Molecular Devices, Sunnyvale, USA) berechnet und mit den Werten des Wildtyps verglichen.

#### 2.3.1.2 Bestimmung der Lyserate

Die Quantifizierung der Zelllyse bei den verschiedenen *A. gossypii* Stämme erfolgte nach der in (Kohli et al., 2008a) beschriebenen Methode. Frisches Myzel wurde in die Mitte einer AFM-Platte gegeben und bei 30°C inkubiert. Die erste Inkubationsphase wurde an die Wachstumsgeschwindigkeit der Mutanten angepasst und lag somit bei 4 Tagen. Anschließend wurden die Platten für weitere 14 Stunden bei 30°C, 37°C oder 25°C inkubiert. Nach dieser Inkubationsphase erfolgte die Überschichtung mit 10 ml Indikatoragarose (1% Agorose, 0,05 M Glycine-HCl-Puffer (pH 9,5), 10 mM BCIP (5-bromo-4-chloro-3-Indonylphosphat-Dinatriumsalz). Die bei Zelllyse freigesetzte alkalische Phosphatase spaltet die in der Indikatoragarose enthaltene chromogene Substanz BCIP, was zu einer Blaufärbung führt. Nach 90 min bei Raumtemperatur wurden die Platten fotografiert. Die mittlere Signalintensität des blauen Kanals des RGB-Bildes im zentralen Myzelbereich (1 cm<sup>2</sup>) wurde mit Hilfe der MetaMorph-Software ermittelt.

### 2.3.2 Makroskopische Analyse von *Saccharomyces cerevisiae* Mutanten

#### 2.3.2.1 Wachstumskurven

Das Wachstumsverhalten der verschiedenen *S. cerevisiae* Stämme wurde durch die Bestimmung der optischen Dichte von Flüssigkulturen mittels Photometer ermittelt. Hierzu wurden über Nacht Vorkulturen der entsprechenden Stämme angezogen und vor der Messung in 50 ml YEPD auf eine OD<sub>600</sub> von 0,2 angeimpft. Die OD<sub>600</sub> wurde in 60 bzw. 30 minütigem Abstand für insgesamt 10 Stunden gemessen.

### 2.4 Mikroskopische Analysen

#### 2.4.1 „Life cell imaging“

Um die dynamischen Prozesse in den Hyphen von *A. gossypii* zu analysieren, wurden die Zellen während des Wachstums auf Nährmedium beobachtet. Dazu wurden die Objektträger mit Agarose-Medium (vgl. 2.1.3.1) beschichtet. Frisches Myzel wurde auf das Agarose-Medium gegeben und mit Deckgläschen vor dem Mikroskopieren bei 30°C inkubiert.

Für Aufnahmen während der schnellen Wachstumsphase wurden die Stämme zunächst auf Agar-Platten angezogen. Zur Mikroskopie wurde eine etwa stecknadelkopfgroße Menge Myzel vom Rand der Kolonie entnommen und auf das Agarose Medium gegeben. Nach Verschluss des Präparats mit dem Deckglas und Fixierung des Deckglases mit Klebstoff wurden die Präparate für 3 bis 4 Stunden inkubiert.

Für die Aufnahmen während der langsamen Wachstumsphase wurde frisches Myzel aus einer Sporensuspension in flüssigem Medium angezogen. Die Anzucht erfolgte über Nacht bei 25°C, um ein zu starkes Wachstum und damit den Übergang in die schnelle Wachstumsphase zu vermeiden. 1 ml des frischen Myzels wurde in ein 1,5 ml Reagiergefäß überführt und zweimal mit Minimalmedium (ASC) gewaschen (1 min, 1000 rpm). Anschließend wurden ca. 5 µl der Suspension auf das Agarose-Medium gegeben, wobei darauf geachtet wurde, dass genug Myzel aufgenommen wurde. Nach Verschluss der Probe mit Deckglas und Klebstoff wurden die Präparate 1 bis 2 Stunden bei 30°C inkubiert.

*S. cerevisiae* Stämme wurden für fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen in SC-Medium angezogen und, sofern nicht anders angegeben, in der logarithmischen Wachstumsphase mikroskopiert. Die Vorbereitung der Präparate erfolgte analog zur langsamen Wachstumsphase bei *A. gossypii*.

### 2.4.2 Auflicht-Fluoreszenzmikroskopie

Zur Auflicht-Fluoreszenzmikroskopie wurde ein „Axioplan 2“ Mikroskop mit einem „Plan-Apochromat 100x/1.45 NA Oil DIC“ Objektiv (Carl Zeiss AG, Feldbach, Schweiz) mit entsprechenden Filtersets (Chroma, Rockingham, USA) und synchronisierter „CoolSNAP HQ“ Kamera (Roper Scientific, Tucson, USA) genutzt. Als Lichtquelle diente ein LED-basierter „SPECTRA light engine“ (Lumencore, Beaverton, USA). Das Mikroskop wurde mit Hilfe der „MetaMorph v7.7.0.0“ Software (Molecular Devices) bedient. Für Hellfeld Aufnahmen wurde der DIC (differential interference contrast) genutzt.

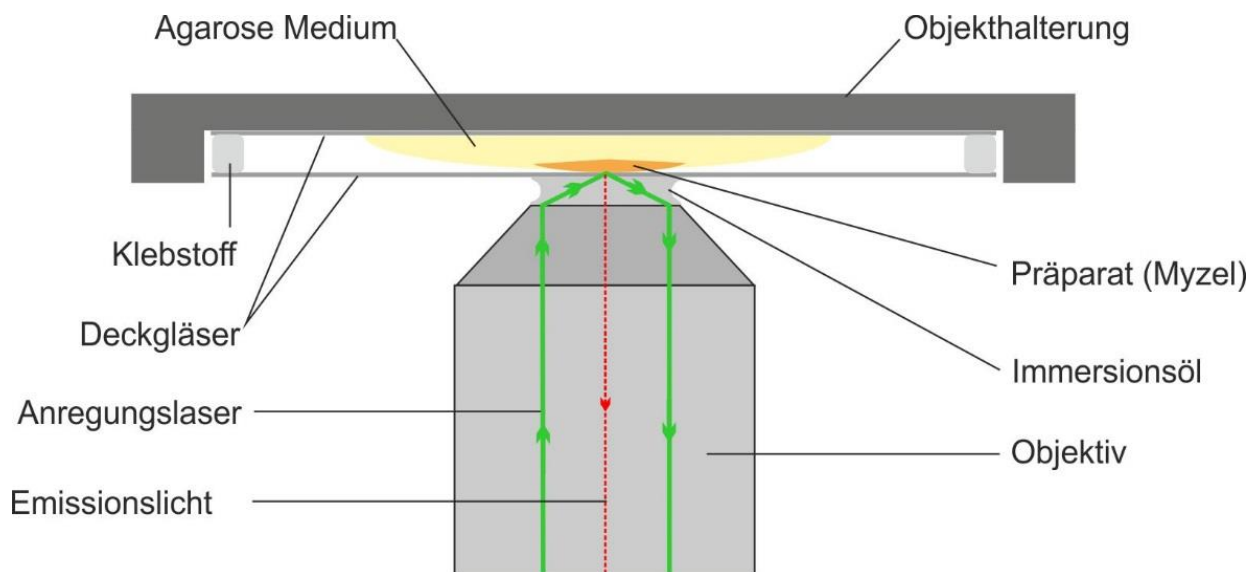
Die Dekonvolution der Fluoreszenzbilder wurde mit der Software „Huygens Essential“ (Scientific Volume Imaging) durchgeführt.

### 2.4.3 „Total Internal Reflection Fluorescence“ (TIRF) –Mikroskopie

Bei der TIRF-Mikroskopie gelangt das Anregungslicht maximal 200 nm weit in das Präparat, wodurch nur Fluorophore im äußeren Bereich der Proben angeregt werden. Der Vorteil dieser Technik liegt in der Eliminierung störender Hintergrundfluoreszenz oder Signalen von zellinternen Strukturen. Sie eignet sich daher zur Beobachtung von Proteinen bzw. Prozessen in der Nähe der Plasmamembran bzw. Zellwand. Die Limitierung der Anregungstiefe wird durch das Prinzip der Totalreflektion erreicht. Das Prinzip und der für die Aufnahmen verwendete Versuchsaufbau sind in Abbildung 5 dargestellt. Das Anregungslicht des Lasers gelangt durch das Objektiv auf die Probe. Der Einfallswinkel des Lichts wird dabei so gewählt, dass es an der Grenzfläche von Deckglas und wässriger Phase aufgrund der unterschiedlichen Brechungsindizes total reflektiert wird. Die wässrige Phase wird in diesem Versuchsaufbau durch die Probe und das Agarose Medium gebildet. Das Überschreiten des kritischen Winkels zur Totalreflektion wird durch das Immersionsöl und eine hohe numerische Apertur (hier 1,45) ermöglicht. Durch die Totalreflektion wird an der Grenzfläche zwischen Deckglas und wässriger Phase ein evaneszentes



Feld gebildet, das etwa 200 nm weit in die Probe eindringt. Je näher die Fluorophore also an der Grenzfläche lokalisiert sind, desto stärker ist die Intensität des Anregungslichts



**Abbildung 5: Versuchsaufbau und Prinzip der TIRF-Mikroskopie mit inversem Mikroskop.** Das Anregungslicht des Lasers gelangt durch das Objektiv auf die Probe. Dabei wird der Einfallswinkel des Anregungslichts so gewählt, dass der Lichtstrahl an der Phasengrenze von Deckglas und wässriger Phase (hier Präparat bzw. Agarose Medium) durch die unterschiedlichen Brechungsindizes total reflektiert wird. Das Erreichen dieses kritischen Winkels wird durch das Immersionsöl ermöglicht. Bei der Totalreflektion an der Grenzphase entsteht ein sogenanntes evaneszentes Feld, das etwa 200 nm weit in die Probe eindringt. Dadurch werden nur Fluorophore angeregt, die sich nah an der Grenzfläche befinden. Das Emissionslicht der Probe wird durch das Objektiv eingefangen.

Für TIRF-Aufnahmen wurden Deckgläser mit den Maßen 35 x 64 mm und einer Stärke von 1,5 als Objektträger genutzt. Das Präparat wurde mit einem identischen Deckglas abgedeckt und an 2 Seiten mit Klebstoff verschlossen. Die weitere Vorbereitung der Proben für das „life cell imaging“ erfolgte wie in Kapitel 2.4.1 beschrieben.

Das Mikroskop wurde mit der Software „Andor iQ2“ gesteuert. Soweit nicht anders angegeben erfolgten die Aufnahmen in einem zeitlichen Abstand von 1 s über eine Dauer von 60 bis 150 s. Für die gleichzeitige Beobachtung von zwei unterschiedlichen Proteinen wurde ein „Dual-View“ System (OPTICAL INSIGHTS, Suwanee, USA) genutzt.

### 2.4.4 Visualisierung von Zellstrukturen mit Hilfe von Farbstoffen

Für die Visualisierung der verschiedenen Zellstrukturen in *A. gossypii* mit Hilfe der unterschiedlichen Farbstoffe wurde frisches Myzel angezogen. Dazu wurden 2 ml Medium mit 50 µl Sporensuspension oder zerkleinertem Myzel angeimpft und über Nacht bei 30°C inkubiert.

### Färbung von Aktin

Für die Färbung von Aktinstrukturen wurde der Farbstoff Rhodamin-Phalloidin (life technologies™) verwendet. Zur Fixierung wurden 100 µl des Myzels zunächst mit 4% Formaldehyd versetzt und 1 h inkubiert. Der Ansatz wurde zweimal mit 0,1 M Natriumphosphatpuffer gewaschen (3 min, 3000 rpm) und in 50 µl des Puffers aufgenommen. 2,5 µl Rhodamin-Phalloidin-Lösung (3,3 µM) und 2,5 µl Triton X-100 (1%) wurden zugegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz dreimal mit Wasser gewaschen (1 min, 1000 rpm) und in 100 µl 0,1 M Natriumphosphatpuffer aufgenommen.

### Färbung von Chitin

Chitin wurde mit Hilfe des Farbstoffes „Calcofluor White“ (CFW; Sigma-Aldrich) angefärbt. Zu 100 µl Kultur wurde 1 µl „CFW“ (10 mg/ml) zugegeben. Der Ansatz wurde für 5 min im Dunkeln inkubiert, zweimal mit Wasser gewaschen (1 min, 1000 rpm) und in 100 µl Wasser aufgenommen.

### Färbung von Lipiden

Für die Färbung von Lipiden bzw. Membranen wurde der Farbstoff „FM4-64“ (life technologies™) verwendet. Zu 100 µl der Kultur wurden 10 µl „FM4-64“ (10 mM) gegeben und bei Raumtemperatur inkubiert. Die Inkubationsphase wurde an die Visualisierung verschiedener Lipidstrukturen angepasst und lag zwischen 1 min (Plasmamembran) und 2 h (Vakuolenmembran). Nach der Inkubation wurde der Ansatz zweimal mit ASC- Medium gewaschen (1 min, 1000 rpm) und vor dem Mikroskopieren auf Eis gehalten.

### 2.4.5 Bildbearbeitung

Die Bilder wurden zur Dekonvolution mit der Software „Huygens Essential“ (Scientific Volume Imaging, Hilversum, Niederlande) bearbeitet. Für die weitere Bearbeitung kamen verschiedene Funktionen der MetaMorph- Software zum Einsatz. Für die Bildüberlagerung zweier unterschiedlicher Farbkanäle wurde die „Overlay Images“- Funktion aus MetaMorph genutzt. Um die „Dual-View“- Aufnahmen in separate Bilder aufzutrennen wurde die „Split View“-Funktion genutzt. Die Skalierung der Bilder erfolgte über die „Scale Image“-Funktion.

### 2.4.6 Auswertung der TIRF-Aufnahmen zur Analyse der Fluoreszenzsignale

Die Lokalisierung und das Tracking einzelner Fluoreszenzsignale wurde mit der Open Source Software ImageJ (download: <http://rsb.info.nih.gov/ij/>), mittels einer für dieses Arbeit angefertigten grafischen Benutzeroberfläche (engl.: Graphical User Interface, GUI) basierend auf in ImageJ enthaltenen Routinen und online erhältlichen Plugins, durchgeführt. Die Erstellung des GUI erfolgte durch Rainer Kurre (Abteilung Biophysik, Universität Osnabrück).

Für die Lokalisierung der Fluoreszenzsignale in Bezug zum Zellkörper wurde die Distanz zur Hyphenspitze gemessen. Hierzu wurde die Lage des Zellkörpers mittels der unbearbeiteten Fluoreszenzbilder bestimmt. Die Ausrichtung der Hyphen wurde manuell definiert und die Hyphen wurden horizontal ausgerichtet. Die Identifizierung der Position der Hyphenspitze erfolgte über die Bestimmung des Zellkörpers in den Fluoreszenzbildern. Ein vor der Zeitrafferaufnahme aufgenommenes Hellfeldbild wurde zur Bestimmung des Versatzes der Hyphenspitze im Vergleich zum ersten Bild der Zeitrafferaufnahme genutzt. Die Lokalisierung und das Tracking der Fluoreszenzsignale erfolgten in den mittels Dekonvolution bearbeiteten Fluoreszenzaufnahmen (vgl. Kapitel 2.4.2).

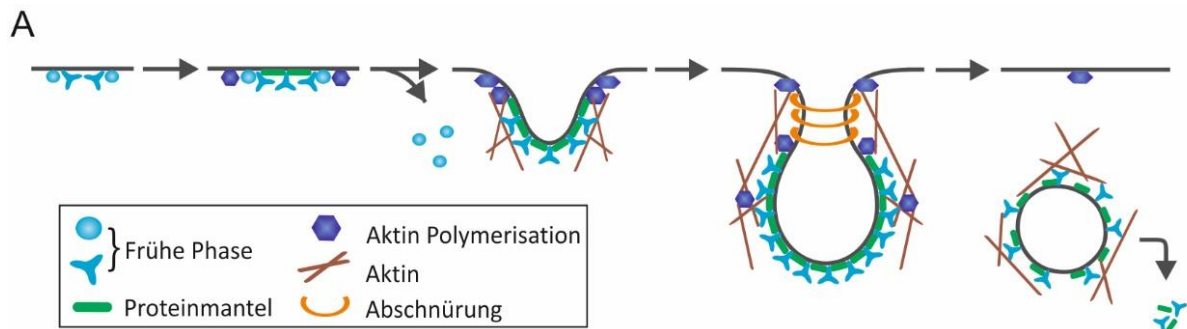
## 3 Ergebnisse

### 3.1 Charakterisierung des endozytischen Prozesses in *Ashbya gossypii*

Durch die Analyse der Aktin-Patches in *A. gossypii* konnte bereits gezeigt werden, dass sich der endozytische Prozess größtenteils auf einen Bereich in der Nähe der Hyphenspitze beschränkt und somit räumlich von der Exozytose an der Hyphenspitze getrennt ist. Dieser subapikale Ring aus Aktin-Patches entfernt sich mit zunehmender Wachstumsgeschwindigkeit weiter von der Spitze (Kohli et al., 2008b). Die Betrachtung der Aktin-Patches gibt allerdings nur ein sehr eingeschränktes Bild des Prozesses wieder, da die Zellen für die Aktin-Färbung fixiert werden müssen. Dies ist für die Analyse dynamischer Prozesse wie der Endozytose ein großer Nachteil. Ebenfalls lässt sich eine Verfälschung der Aktin-Strukturen durch den Prozess der Fixierung nicht vollständig ausschließen.

In einer vorangegangenen Arbeit wurde das Myosin I Motorprotein Myo3/5 mit GFP markiert und mittels „live-cell-imaging“ analysiert. Die Lebenszeiten der Myo3/5-Signale wiesen im Vergleich zu den homologen Proteinen Myo3 und Myo5 aus *S. cerevisiae* kürzere Lebenszeiten auf (Peter Philippsen, persönliche Mitteilung). Dies deutet auf eine höhere Geschwindigkeit des Prozesses in *A. gossypii* hin, lässt aber keine Aussage über die Geschwindigkeit oder den Ablauf des gesamten endozytischen Prozesses zu. Diese ersten Ergebnisse führten jedoch zu der Hypothese, dass sich bei schnellem Wachstum und der damit verbundenen gesteigerten Oberflächenvergrößerung auch die Endozytoserate erhöht, um die Polarität der Hyphen zu gewährleisten. Dies könnte sowohl durch einen schnelleren Ablauf des endozytischen Prozesses, als auch durch eine höhere Anzahl an endozytischen Ereignissen pro Fläche geschehen.

Um ein genaueres Bild der Endozytose in *A. gossypii* zu erhalten, sollten im ersten Teil dieser Arbeit endozytische Proteine aus den verschiedenen Phasen der Endozytose mit Fluoreszenzproteinen markiert und mittels „live-cell-imaging“ analysiert werden. Für die Auswahl der Proteine diente die bereits gut charakterisierte Clathrin-abhängige Endozytose aus *S. cerevisiae* als Arbeitsvorlage (vgl. Abbildung 6). Da für *A. gossypii* alle Homologen aus *S. cerevisiae* annotiert sind, wurden zunächst die Homologen zu bekannten, endozytischen Proteinen aus *S. cerevisiae* zusammengestellt. Das Resultat ist in Abbildung 6B tabellarisch dargestellt.

**B**

<i>S. cerevisiae</i>	<i>A. gossypii</i>
<b>Initiierung und frühe Phase</b>	
<i>EDE1</i>	* <i>ABR149W</i>
<i>SYP1</i>	<i>AEL147W</i>
<i>CHC1</i>	* <i>AER359W</i>
<i>CLC1</i>	* <i>AGR309C</i>
<b>Reifung des Proteinmantels</b>	
<i>YAP1801</i>	°* <i>AEL209W</i>
<i>YAP1802</i>	
<i>SLA2</i>	—
<i>APL1</i>	<i>ADR342C</i>
<i>APL3</i>	<i>ADL302W</i>
<i>APM4</i>	<i>ADR315W</i>
<i>APS2</i>	<i>AFR370C</i>
<i>PAL1</i>	<i>ACR128C</i>
<i>ENT1</i>	° <i>ACL157C</i>
<i>ENT2</i>	
<i>SLA1</i>	* <i>AGR170W</i>
<i>PAN1</i>	<i>ADR018C</i>
<i>LAS17</i>	* <i>AGR285W</i>
<i>END3</i>	<i>AER416C</i>
<i>LSB3</i>	° <i>AEL017W</i>
<i>LSB4</i>	
<i>LSB5</i>	<i>AFR709C</i>
<b>Aktin Polymerisation</b>	
<i>ARP2</i>	<i>ADR316W</i>

<i>S. cerevisiae</i>	<i>A. gossypii</i>
<i>ARP3</i>	<i>AFR419C</i>
<i>MYO3</i>	°* <i>AEL306C</i>
<i>MYO5</i>	
<i>ABP1</i>	* <i>AGL237C</i>
<i>BZZ1</i>	<i>ACR266W</i>
<i>VRP1</i>	<i>ABR038C</i>
<i>SAC6</i>	<i>AGR069C</i>
<i>SCP1</i>	<i>ADR409W</i>
<i>SCD5</i>	<i>ADR356C</i>
<b>Abschnürung und Abbau</b>	
<i>RVS161</i>	<i>AER193W</i>
<i>RVS167</i>	* <i>AFR140C</i>
<i>ARK1</i>	° <i>ADL217W</i>
<i>PRK1</i>	
<i>VPS1</i>	<i>ABL001W</i>
<i>SJL1</i>	<i>ADL002W</i>
<i>SJL2</i>	<i>AFL228W</i>
<i>GTS1</i>	<i>ACL055W</i>
<i>LSB1</i>	° <i>AFR320W</i>
<i>LSB2</i>	
<i>COF1</i>	<i>ADR235W</i>
<i>AIP1</i>	<i>ABL043W</i>
<i>APP1</i>	<i>ACL081C</i>
<i>AKL1</i>	<i>AGR027C</i>
<i>ARF3</i>	<i>ACL078W</i>

**Abbildung 6: A:** Schematische Darstellung des endozytischen Prozesses in Hefe, nach Boettner et al. (2011a) und Weinberg und Drubin (2012).

**B:** Tabellarischer Vergleich der endozytischen Gene aus *S. cerevisiae* mit Homologen aus *A. gossypii*. Die Gene sind entsprechend der Funktion der codierten Proteine den verschiedenen Phasen der Endozytose zugeordnet. Mit Ausnahme von *SLA2* weisen alle der 46 überprüften Gene aus *S. cerevisiae* ein Homologes in *A. gossypii* auf, wobei es sich in sechs Fällen um duplizierte Gene handelt, die nur durch ein Homologes in *A. gossypii* repräsentiert werden. Die duplizierten Gene wurden mit ° markiert. Die für die fluoreszenzmikroskopischen Analysen ausgewählten Homologe aus *A. gossypii* sind mit \* markiert.

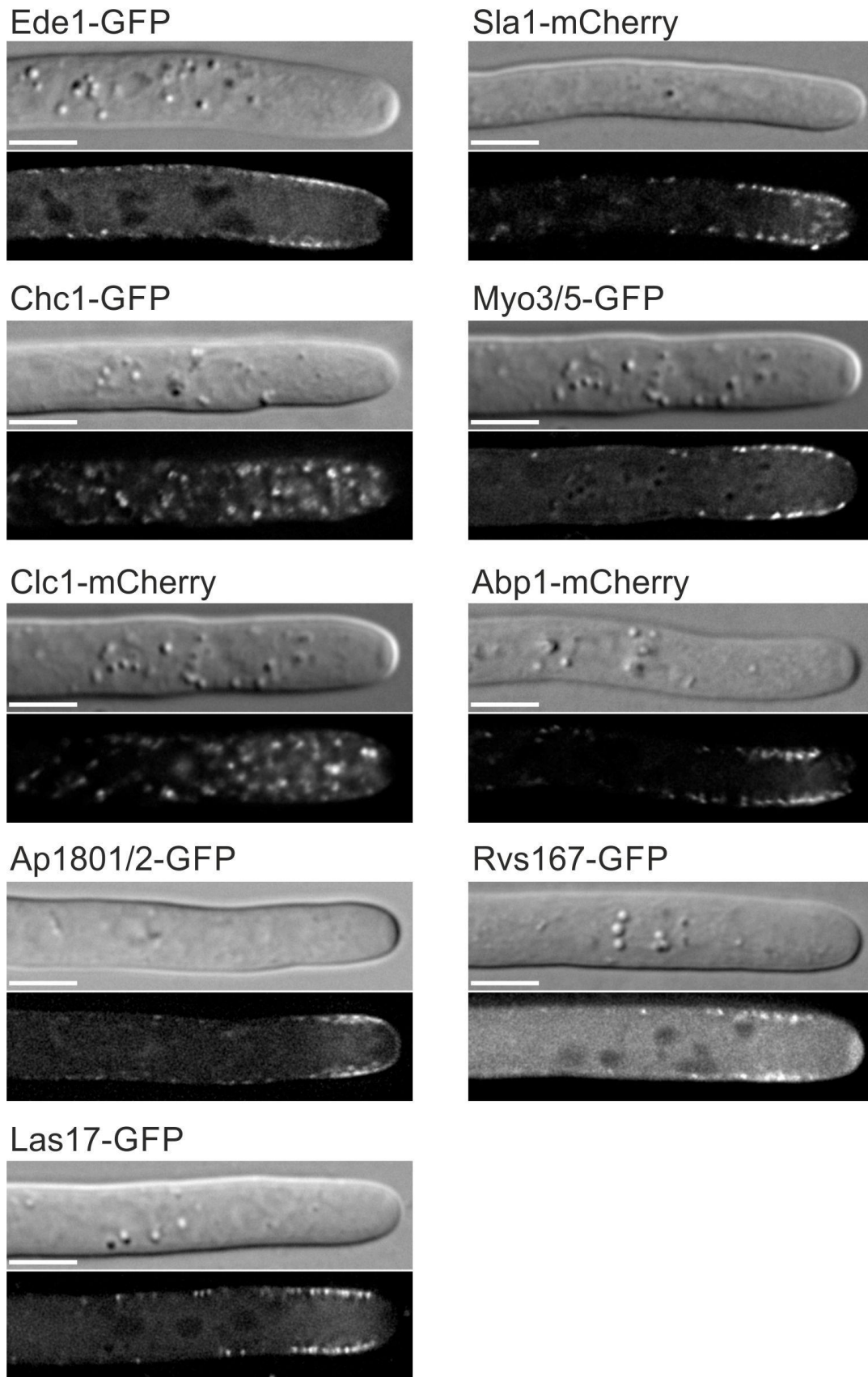
Von den insgesamt 46 getesteten Proteinen wiesen 45 ein Homologes in *A. gossypii* auf. In sechs Fällen werden jeweils zwei Gene aus *S. cerevisiae* durch ein Homologes in *A. gossypii* repräsentiert, was durch eine Genom-Duplikation in der *S. cerevisiae*-Linie zu erklären ist (Dietrich et al., 2004; Kellis et al., 2004). Einzige Ausnahme ohne Homologes in *A. gossypii* ist *SLA2*, welches in Hefe eine wichtige Funktion bei der Regulation der Aktin-vermittelten Einstülpung der Membran aufweist (Boettner et al., 2011b). Von den in Abbildung 6B aufgelisteten Proteinen wurden neun Homologe aus *A. gossypii* aus den verschiedenen Phasen der Endozytose für die fluoreszenzmikroskopische Analyse ausgewählt und C-terminal mit GFP oder mCherry markiert (vgl. Tabelle 6). Die Fusion der Zielproteine mit den Fluoreszenzproteinen erfolgte über die Methode des PCR-basierten „gene targeting“ wie in Kapitel 2.2.2 beschrieben. Um die zeitliche Abfolge des Prozesses zu verfolgen, wurden Stämme hergestellt, in denen jeweils zwei dieser Proteine mit verschiedenen Fluoreszenzproteinen markiert sind.

**Tabelle 6: Für die Fluoreszenzmikroskopie ausgewählte Proteine der verschiedenen Phasen des endozytischen Prozesses.**

Initiierung und frühe Phase	Ede1, Chc1, Clc1
Reifung des Proteinmantels	Ap1801/2, Las17, Sla1
Aktin-Polymerisation	Myo3/5, Abp1
Abschnürung und Abbau	Rvs167

### 3.1.1 Fluoreszenzmikroskopische Analyse einzelner endozytischer Komponenten

Zunächst wurden die Stämme mittels Epi-Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 7 dargestellt. Die Aufnahmen wurden während der schnellen Wachstumsphase angefertigt ( $>80 \mu\text{m/h}$ ) und es wurde auf die mittlere Ebene fokussiert. Die Signale der markierten Proteine weisen eine punktförmige Struktur auf. Sie konzentrieren sich auf einen Bereich unterhalb der Hyphenspitze, wobei die Spitze keine oder nur wenige Fluoreszenzsignale aufweist. Mit zunehmender Entfernung zur Spitze nimmt die Anzahl der Signale deutlich ab. Dieses Lokalisierungsmuster gleicht den Resultaten der Aktin-Patch-Analyse mittels Phalloidin-Färbung.



**Abbildung 7: Epi-Fluoreszenzmikroskopie der neun ausgewählten Proteine.** Der obere Teil der Bilder zeigt die dazugehörige Hyphe im DIC-Modus. Die Wachstumsgeschwindigkeit der Hypphen war  $> 80 \mu\text{m}/\text{h}$ . Die Fokusebene lag im mittleren Bereiche der Hyphe. Maßstab  $5 \mu\text{m}$ .

Mit Ausnahme von Chc1 und Clc1 befindet sich der Hauptteil der Signale an der Plasmamembran, was mit der vermuteten Funktion bei der Endozytose übereinstimmt. Insbesondere im Stamm mit Rvs167-GFP ist eine starke zytoplasmatische Hintergrundfluoreszenz zu erkennen (vgl. Abbildung 7-I). Schwächere Signale werden dadurch möglicherweise überdeckt. Während das Lokalisierungsmuster von Chc1 und Clc1 zueinander sehr ähnlich ist, zeigt es im Vergleich zu den anderen Proteinen deutliche Unterschiede. Es handelt sich ebenfalls um punktförmige Strukturen, allerdings erscheinen sie etwas größer, als die Signale der anderen untersuchten Proteine. Des Weiteren ist die Mehrheit der Signale an zellinternen Strukturen lokalisiert. Die Zuordnung einzelner Signale zur Plasmamembranregion ist nicht möglich aber die bei den anderen Proteinen beobachtete Akkumulation von Signalen im Randbereich der Zelle ist nicht zu erkennen. Dies deutet darauf hin, dass Clathrin bei der frühen Phase der Endozytose, die an der Plasmamembran abläuft, in *A. gossypii* keine Rolle spielt. Aus Untersuchungen mit den Clathrin-Homologen aus Hefe ist allerdings bekannt, dass die hohe Intensität der internen Signale die schwächeren Signale an der Plasmamembran überdecken kann. Von endozytischen Ereignissen stammende Fluoreszenzsignale werden bei Anwendung von Epi-Fluoreszenzmikroskopie demnach möglicherweise nur schwer detektiert.

Um einen Verlust der endozytischen Signale durch hohe zytoplasmatische Hintergrundfluoreszenz oder starke interne Signale auszuschließen wurden die weiteren Analysen mittels „Total Internal Reflection Fluorescence“ Mikroskopie (TIRFM) durchgeführt (vgl. Abbildung 5). Bei dieser Methode gelangt das Anregungslicht nur etwa 200 nm tief in die Probe, wodurch nur Moleküle in der Nähe der Plasmamembran belichtet werden und die Hintergrundfluoreszenz auf ein Minimum begrenzt wird. Die detektierten Fluoreszenzsignale stammen dadurch ausschließlich vom äußeren Bereich der Zelle und repräsentieren mit hoher Wahrscheinlichkeit endozytische Ereignisse.

Für die mikroskopischen Analysen wurde zwischen schneller und langsamer Wachstumsphase unterschieden, um einen möglichen Zusammenhang zwischen Endozytoserate und Oberflächenvergrößerung der Hyphen zu untersuchen. Die Zuteilung zur schnellen Wachstumsphase erfolgte ab einem Wert von über 80  $\mu\text{m}/\text{h}$ . Ab dieser Geschwindigkeit wechselt das Verzweigungsmuster der Hyphen von lateral zu apikal wodurch eine klare Veränderung im Wachstumsmodus vorliegt (Schmitz et al., 2006). Die Unterscheidung der beiden Wachstumsphasen ermöglicht außerdem einen genaueren Vergleich zu den aus der Literatur bekannten Daten zur Endozytose in Hefezellen. Diese sind bezüglich der

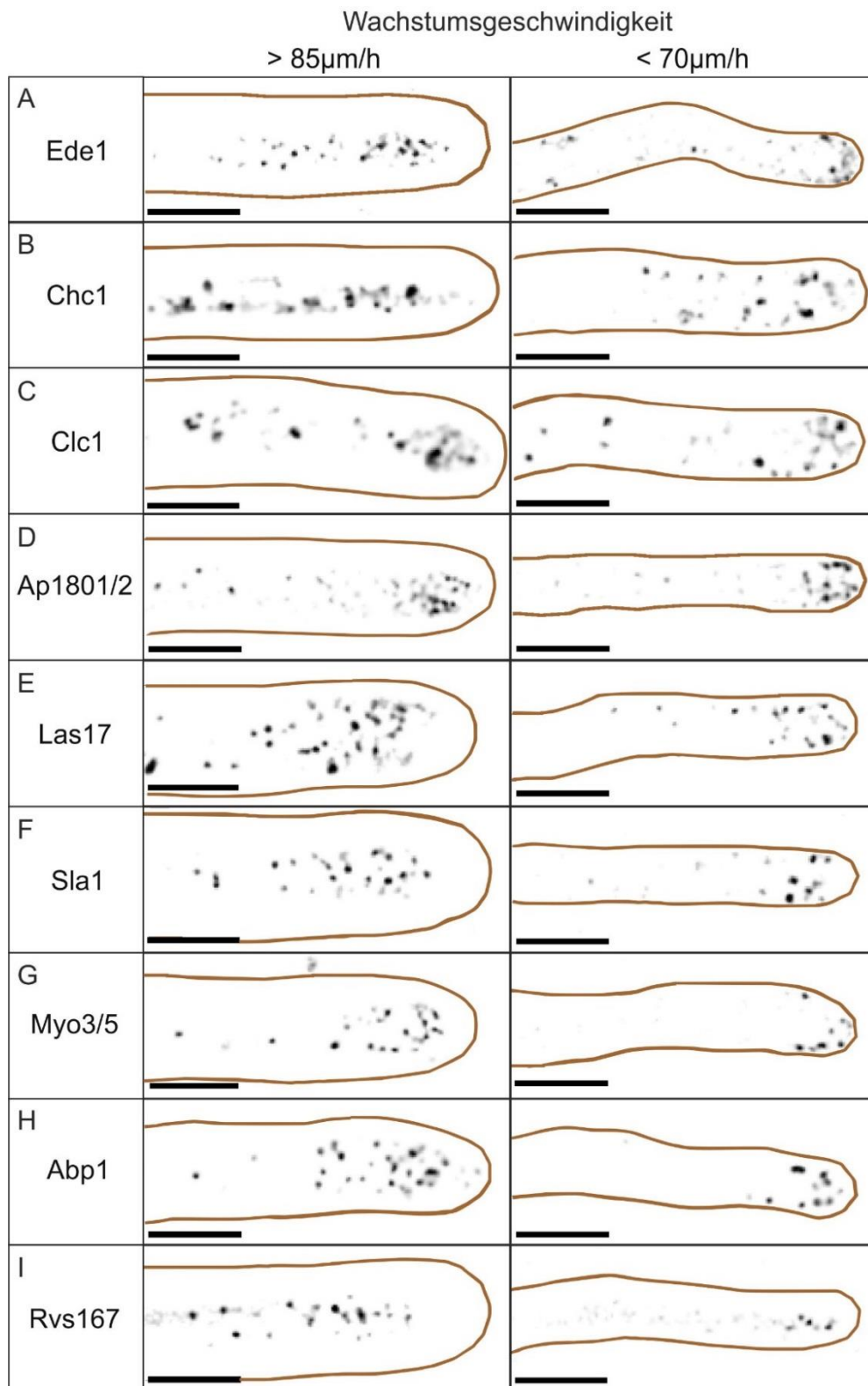


Oberflächenvergrößerung eher mit den langsam wachsenden Hyphen zu vergleichen. Die so erhaltenen Ergebnisse könnten Aufschluss darüber geben, ob Veränderungen im endozytischen Prozess auf das konstante, polare Wachstum zurückzuführen sind oder womöglich nur eine Anpassung an die schnellere Wachstumsgeschwindigkeit darstellen.

In Abbildung 8 sind repräsentative Beispiele der durch TIRF-Mikroskopie erhaltenen Bilder dargestellt. Die Fokusebene liegt hier auf dem am Deckglas liegenden, lateralen Bereich der Hyphen, wodurch eine Aufsicht auf die Zellen entsteht. Die Dichte der detektierten Signale nimmt dadurch deutlich ab und einzelne Ereignisse sind so leichter voneinander zu trennen.

Beim Vergleich der unterschiedlichen Wachstumsphasen wird deutlich, dass sich die Signale während des schnellen Wachstums weiter von der Hyphenspitze entfernen und sich der Bereich mit einer Anhäufung an Signalen in Richtung der Längsachse verbreitert. Die Anzahl der punktförmigen Signale nimmt mit höherer Wachstumsgeschwindigkeit zu, was die Hypothese zu einem Zusammenhang zwischen Wachstumsgeschwindigkeit und Endozytoserate unterstützt. Wie auch bei den Aufnahmen aus der Epi-Fluoreszenzmikroskopie unterscheidet sich auch hier das Signalmuster der beiden Clathrin Untereinheiten Chc1 und Clc1 von den übrigen untersuchten Proteinen. Viele der punktförmigen Signale sind größer und der Signalbereich ist auf der Längsachse der Hyphe weiter ausgedehnt.

Des Weiteren sind bei den Aufnahmen der Clathrin-Untereinheiten mehr verschwommenen Signale sichtbar, die wahrscheinlich von zellinternen Strukturen knapp unter der Membran stammen und außerhalb der Fokusebene liegen. Im Vergleich zur Epi-Fluoreszenzmikroskopie werden bei der TIRF-Technik aber weit weniger Clathrin-Signale detektiert. Eine Verschiebung des Signalbereichs und die Zunahme der Signalanzahl mit erhöhter Wachstumsgeschwindigkeit sind allerdings ebenfalls bei Chc1 und Clc1 zu beobachten.



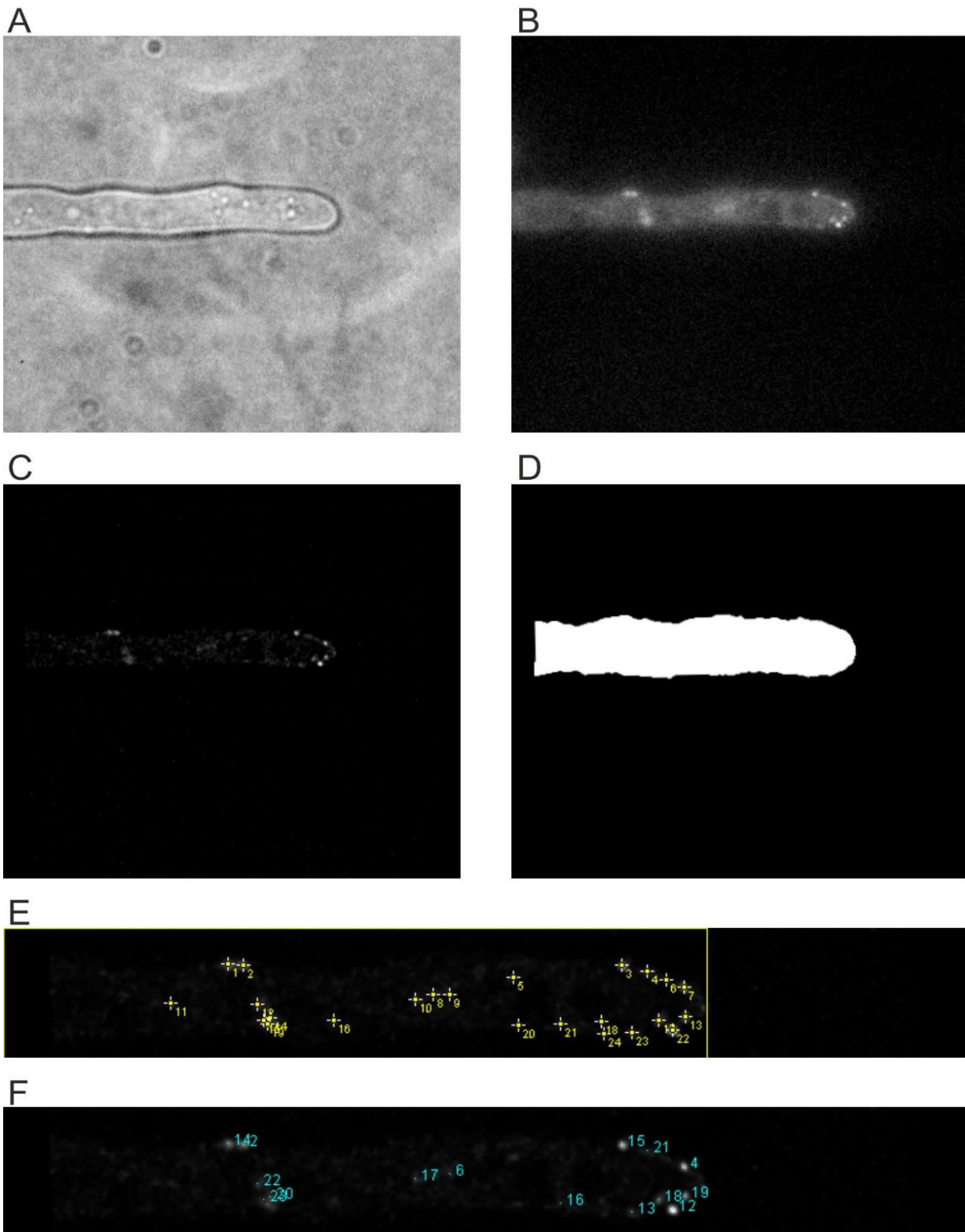
**Abbildung 8: TIRF-Mikroskopie der neun ausgewählten Proteine bei schnellem und langsamem Hyphenwachstum.** Die Aufnahmen wurden zur Verbesserung der Darstellung farblich invertiert. Durch die Limitierung der Anregung auf einen ca. 200 nm-tiefen Bereich, werden ausschließlich Signale von dem am Deckglas liegenden, äußeren Bereich der Hyphen detektiert. Die Fokusebene liegt auf dem Zellkortex. Die braunen Linien geben die aus den dazugehörigen Hellfeld-Bildern ermittelte Umrandung der Hyphen an. Linke Spalte: Fluoreszenzsignale der angegebenen Proteine bei einer Wachstumsgeschwindigkeit über 85 µm/h. Rechte Spalte: Fluoreszenzsignale der Proteine bei einer Wachstumsgeschwindigkeit unter 70 µm/h. Maßstab: 5 µm.

### 3.1.1.1 Quantitative Analysen der endozytischen Ereignisse

Im nächsten Schritt wurden die Ergebnisse aus den Fluoreszenzmikroskopischen Analysen der Einzelbilder quantitativ ausgewertet. Um die Dynamik des Prozesses zu erfassen wurden einzelne Hyphen über einen Zeitraum von 60 bis 120 Sekunden beobachtet, wobei jede Sekunde ein Bild aufgenommen wurde. Für die Ermittlung der Wachstumsgeschwindigkeit der Hyphen wurde jeweils vor und nach den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen ein Hellfeldbild erstellt. Die Zeitrafferaufnahmen wurden mit Hilfe eines zu diesem Zweck entwickelten Programms ausgewertet (vgl. Kapitel 2.4.6). Für diese Auswertung wurden von jeder Zeitrafferaufnahme sowohl die Originalbilder, als auch die durch Dekonvolution bearbeiteten Bilder, sowie ein Hellfeldbild benötigt. In Abbildung 9 sind repräsentative Beispiele der für die Auswertung benötigten (A, B, C) und durch das Programm erzeugten Bilder (D, E, F) dargestellt.

Mit Hilfe der unbearbeiteten Aufnahmen und des Hellfeldbildes wurden der Umriss der Hyphen und die Lage der Hyphenspitze berechnet, um die Position der Signale in der Hyphe zu ermitteln. Das dekonvolvierte Bild wurde für die quantitativen Analysen der endozytischen Ereignisse genutzt. Die Signale werden zum einen auf Position und Anzahl analysiert (Abbildung 9E), zum anderen wird die Zeitspanne ermittelt, über die ein einzelnes Ereignis detektiert wird. Letztere wird, analog zur Literatur, im Folgenden als „Lebenszeit“ des endozytischen Signals bezeichnet. Hierbei wurden nur Ereignisse miteinbezogen, die eine Lebenszeit von mindestens 2 s aufwiesen. Dadurch sollten Verfälschungen der Werte durch bewegliche Signale, die zufällig in die Nähe der Plasmamembran gelangen und nicht die Bildung eines Endozytoseereignisses repräsentieren, minimiert werden.

Für die quantitativen Analysen wurden pro Protein und Wachstumsphase jeweils zehn Zeitrafferaufnahmen einzelner Hyphen ausgewertet. In den Abbildungen der folgenden Kapitel wurden die Proteine entsprechend der, durch die *S. cerevisiae*-Erkenntnisse prognostizierten, zeitlichen Reihenfolge angeordnet.



**Abbildung 9: Repräsentative Beispiele der für die Auswertung benötigten und durch das Programm erzeugten Bilder zur quantitativen Analyse der Fluoreszenzsignale einzelner endozytischer Komponenten. A, B, C:** Für die Auswertung benötigte Bilder der zu untersuchenden Hyphe. **A:** Hellfeldbild. **B:** Originalbild aus den mit TIRF-Mikroskopie erstellten Zeitrafferaufnahmen. **C:** Durch Dekonvolution bearbeitetes Bild aus B. **D, E, F:** Durch das Programm erzeugte Bilder zur Auswertung der endozytischen Signale. **D:** Aus dem Originalbild berechneter Hyphenumriss. Mit Hilfe des Hellfeldbildes wurde außerdem die Position der Hyphenspitze festgelegt. Dies ermöglicht die Erfassung der Position einzelner Signale in der Hyphe. **E, F:** Vergrößerter Ausschnitt aus Bild C. **E:** Ergebnis der Auswertung zur Position und Anzahl der einzelnen Signale mittels bearbeitetem Bild aus C. Die Anzahl

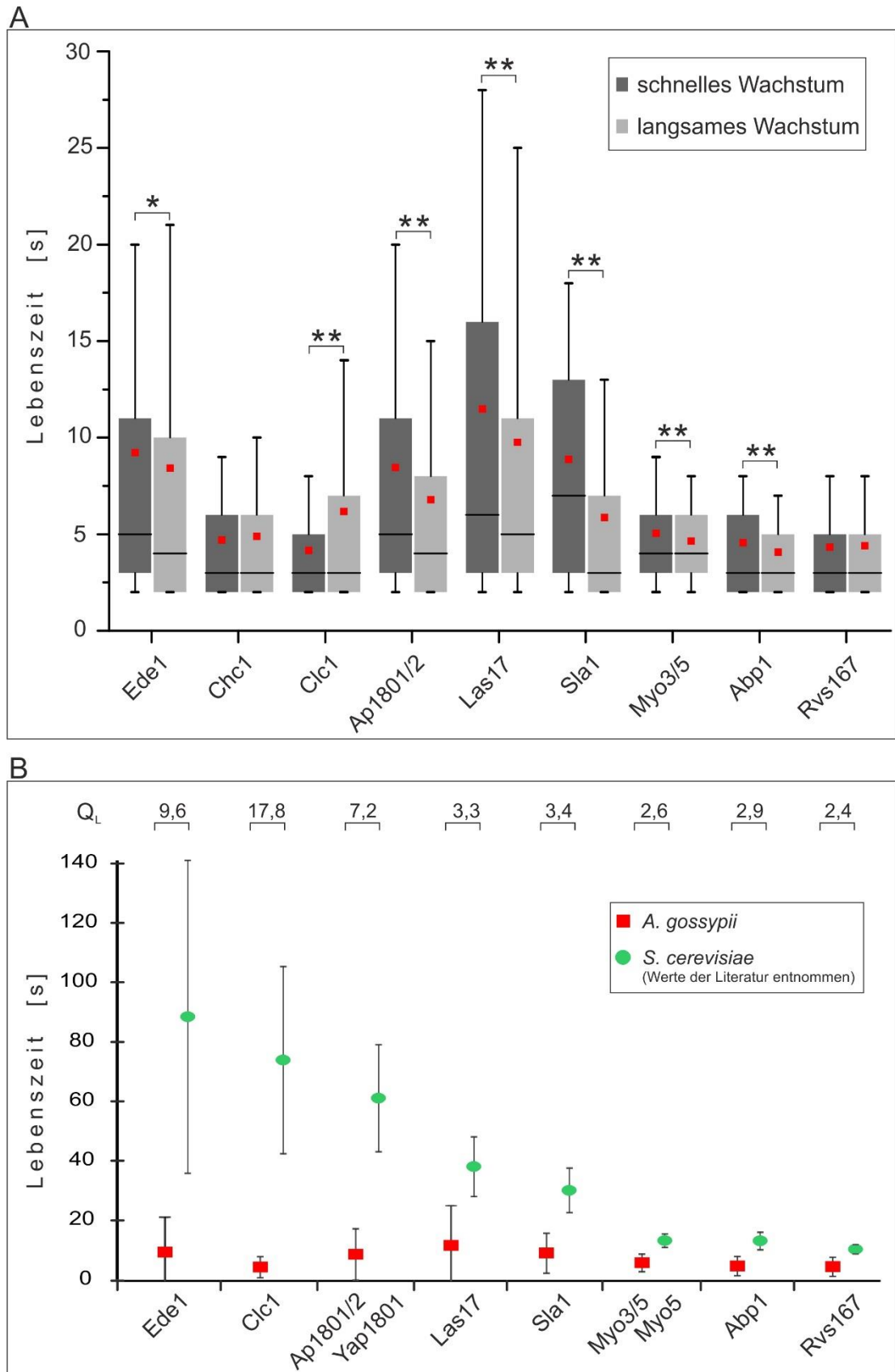
der Ereignisse pro Aufnahme, sowie deren Entfernung zur Hyphenspitze werden ermittelt. Die Zählung der Signale erfolgt hier für jedes Bild separat. Die Lage der Hyphenspitze ist durch die gelbe Linie gekennzeichnet. **F:** Entsprechendes Beispielbild aus der Analyse der Lebenszeit der endozytischen Signale. Die Nummerierung erfolgt hier über die gesamte Dauer der Zeitrafferaufnahme. Signale die in mehreren Aufnahmen hintereinander zu sehen sind, werden als ein Ereignis gezählt. Signale die nur in einem einzigen Bild detektiert wurden (Lebenszeit < 2 s), wurden von der Auswertung ausgenommen.

### 3.1.1.1.1 Dynamik endozytischer Proteine

Die Lebenszeit der verschiedenen Proteine gibt Aufschluss über die Geschwindigkeit der einzelnen Schritte des endozytischen Prozesses. Da Proteine aus den verschiedenen Phasen der Endozytose untersucht wurden, lässt sich ebenfalls eine Aussage über die Dauer des gesamten Prozesses treffen.

Zur Untersuchung der Fragestellung, ob die Wachstumsgeschwindigkeit der Hyphen die Geschwindigkeit des endozytischen Prozesses beeinflusst, wurden die Proteine sowohl in der langsamen, als auch in der schnellen Wachstumsphase beobachtet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 10A zusammengefasst. Für jedes Protein wurden pro Wachstumsphase zehn Zeitrafferaufnahmen einzelner Hyphen ausgewertet. Die Anzahl der für die Analyse ausgewerteten Ereignisse pro Protein lag dabei zwischen 967 und 1994 Ereignissen in der schnellen Wachstumsphase und zwischen 408 und 1595 Ereignissen in der langsamen Wachstumsphase. Die Ergebnisse wurden als Box-Plot dargestellt, wobei die Länge der Box den jeweiligen Interquartilsabstand angibt und somit dem Bereich, in dem 50% der Messwerte liegen, entspricht. Die Whisker wurden zur Angabe des 10%- bzw. 90%-Quantils genutzt und schließen dadurch die mittleren 80% der gemessenen Werte ein. Des Weiteren wurden sowohl Median als auch Mittelwert im Diagramm angegeben, um einen Überblick über die Verteilung der Daten zu erhalten. Die Ergebnisse der Untersuchungen zur Lebenszeit der endozytischen Komponenten sind in Abbildung 10 dargestellt.

Die längste durchschnittliche Lebenszeit mit einem Mittelwert von 11,5 s wurde beim WASP-Homolog Las17 während des schnellen Wachstums gemessen. Las17 wurde, wie Ap1801/2 und Sla1, der Phase „Reifung des Proteinmantels“ zugeordnet. Ap1801/2 und Sla1 zeigten bei schnellem Wachstum Mittelwerte von 8,5 s bzw. 8,9 s und weisen somit ebenfalls eine vergleichsweise lange Lebenszeit auf. Die Varianzen innerhalb der einzelnen Messungen waren bei allen drei Proteinen sehr hoch, was durch die Länge des Interquartilsabstand und die Whisker deutlich wird.



**Abbildung 10: Lebenszeiten endozytischer Komponenten.** **A:** Lebenszeiten der neun getesteten endozytischen Proteine aus *A. gossypii* bei schnellem und langsamem Hyphenwachstum. Ergebnisse sind als Box-Plot dargestellt. Die Boxen geben die Länge des Interquartilabstands an und beinhalten somit die mittleren 50% der Messwerte. Die Whisker geben das 10%- bzw. 90%-Quantil an und umfassen die mittleren 80% der Messwerte. Die Länge der Box

und Whisker gibt die Varianz innerhalb einer Messreihe wieder. Rote Quadrate kennzeichnen den Mittelwert, die schwarzen Linien geben den Median an. Sternchen (\*) markieren signifikante Unterschiede zwischen schnellem und langsamem Wachstum (\*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,005$ ). Für jedes Protein wurden pro Wachstumsphase 10 Zeitrafferaufnahmen einzelner Hyphen ausgewertet. Die Anzahl der ausgewerteten Ereignisse lag dabei zwischen 408 und 1994 Ereignissen. **B:** Vergleich der Lebenszeiten endozytischer Proteine aus *A. gossypii* mit entsprechenden Homologen aus *S. cerevisiae*. Die für *A. gossypii* angegebenen Werte entsprechen den Mittelwerten aus A bei schnellem Wachstum. Die angegebenen Werte für *S. cerevisiae* wurden der Literatur entnommen (Jonsdottir und Li (2004); Kaksonen et al. (2003); Kaksonen et al. (2005); Stimpson et al. (2009); Suzuki et al. (2012).) Die Werte der *S. cerevisiae*-Daten wurden zum Teil von Graphiken abgelesen, daher sind leichte Abweichungen zu den Originalwerten nicht auszuschließen. Für die *A. gossypii*-Proteine Myo3/5 und Ap1801/2 wurde jeweils nur eins der zwei möglichen Homologen aus *S. cerevisiae* angegeben (Yap1801 bzw. Myo5). Die Fehlerbalken geben die Standardabweichungen an. In der Graphik sind die Werte des Quotienten der Lebenszeiten von *S. cerevisiae*-Proteinen zu *A. gossypii*-Proteinen angegeben ( $Q_L$ ).

Das zur frühen Phase gehörende Protein Ede1 zeigte mit einem Mittelwert von 9,2 s während des schnellen Wachstums die zweithöchste Lebenszeit mit einer relativ hohen Varianz innerhalb der Messung. Da aus *S. cerevisiae* bekannt ist, dass Ede1 die Endozytosestelle vor Beginn der Membraneinstülpung verlässt (Stimpson et al., 2009; Toshima et al., 2006), gibt der für Ede1 erhaltene Wert vermutlich auch in *A. gossypii* Auskunft über die Zeitspanne zwischen Initiierung und Membraneinstülpung. Die beiden Clathrin-Untereinheiten Chc1 und Clc1, die auch zur frühen Phase gezählt werden, wiesen dagegen deutlich kürzere Lebenszeiten auf (4,7 s bzw. 4,2 s) und sind eher mit den Proteinen der beiden späteren Phasen vergleichbar. Dieses Ergebnis ist im Vergleich zu den Daten aus *S. cerevisiae* überraschend, da die homologen Clathrin-Proteine in Hefe bis zur Abschnürung des Vesikels an der Endozytosestelle bleiben und somit eine sehr lange Lebenszeit aufweisen (vgl. Abbildung 10B).

Bei den Proteinen der späteren Phasen „Aktin-Polymerisation“ und „Abschnürung“ wurden mit Mittelwerten von 5,1 s (Myo3/5), 4,6 s (Abp1) und 4,3 s (Rvs167) ebenfalls sehr kurze Lebenszeiten gemessen. Auch die Varianz der Messwerte fiel hier deutlich geringer aus, was darauf hindeutet, dass der Prozess ab einem bestimmten Zeitpunkt immer etwa gleichschnell abläuft. Die hohen Varianzen bei den beiden früheren Phasen lassen hingegen vermuten, dass der Ablauf der Endozytose durch weitere Faktoren beeinflusst wird, wodurch sich die Zeitspanne zwischen Initiierung und Abschnürung zwischen verschiedenen endozytischen Ereignissen erheblich unterscheiden kann. Die Proteine mit langer durchschnittlicher Lebenszeit und hoher Varianz geben demnach die zeitbestimmenden Schritte der Endozytose an.

Beim Vergleich der verschiedenen Wachstumsgeschwindigkeiten fällt auf, dass die Protein-Lebenszeiten während des langsamen Wachstums bei sechs der neun getesteten Proteine signifikant kürzer sind als während des schnellen Wachstums (vgl. Abbildung 10A, \* =  $p < 0,05$ ,

\*\* =  $p < 0,005$ ). Die Ausnahmen sind die beiden Clathrin-Untereinheiten, bei denen entweder kein signifikanter Unterschied zwischen den Wachstumsgeschwindigkeiten vorliegt (Chc1) oder die Lebenszeit während des langsamen Wachstums länger ist (Clc1). Bei Rvs167 wurde ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Geschwindigkeiten festgestellt. Die Varianz der Messwerte bei niedriger Wachstumsgeschwindigkeit entspricht tendenziell den für hohe Wachstumsgeschwindigkeiten ermittelten Werten, fällt aber mit Ausnahmen von Ede1 und den Clathrin-Untereinheiten etwas geringer aus.

Die kürzeren Lebenszeiten während des langsamen Wachstums deuten darauf hin, dass die Endozytose bei geringerer Wachstumsgeschwindigkeit schneller abläuft, als bei höherer Wachstumsgeschwindigkeit. Dieses Ergebnis spräche gegen die zu Beginn der Arbeit aufgestellte Hypothese einer, zusammen mit der Oberflächenvergrößerung der Hyphen, steigenden Endozytoserate. Bei Betrachtung der Median-Werte von Ede1, Ap1801/2, Las17 und Sla1 fällt auf, dass sie bei langsamem Wachstum deutlich unter den Median-Werten bei schnellem Wachstum liegen. Bei niedriger Geschwindigkeit wurden demnach deutlich mehr sehr kurze Ereignisse gemessen, was vermutlich zu der Verschiebung der Mittelwerte zur kürzeren Lebenszeit hin beigetragen hat. Es bleibt hier allerdings unklar, ob diese sehr kurzen Ereignisse vollständig abgeschlossene, endozytische Ereignisse darstellen. Es ist auch denkbar, dass es in diesen Fällen vor Abschluss des Prozesses zur Auflösung der Endozytosestelle und damit zum Abbruch des Prozesses gekommen ist.

Im nächsten Schritt sollen die für *A. gossypii* gemessenen Protein-Lebenszeiten mit den Werten der Homologen Proteine aus *S. cerevisiae* verglichen werden. Das Ergebnis ist in Abbildung 10B dargestellt. Die Werte der *A. gossypii*-Proteine in Abbildung 10B entsprechen den in Abbildung 10A angegebenen Mittelwerten bei schnellem Wachstum. Die Werte der Hefe-Proteine wurden der Literatur entnommen (Jonsdottir und Li, 2004; Kaksonen et al., 2003; Kaksonen et al., 2005; Stimpson et al., 2009; Suzuki et al., 2012).

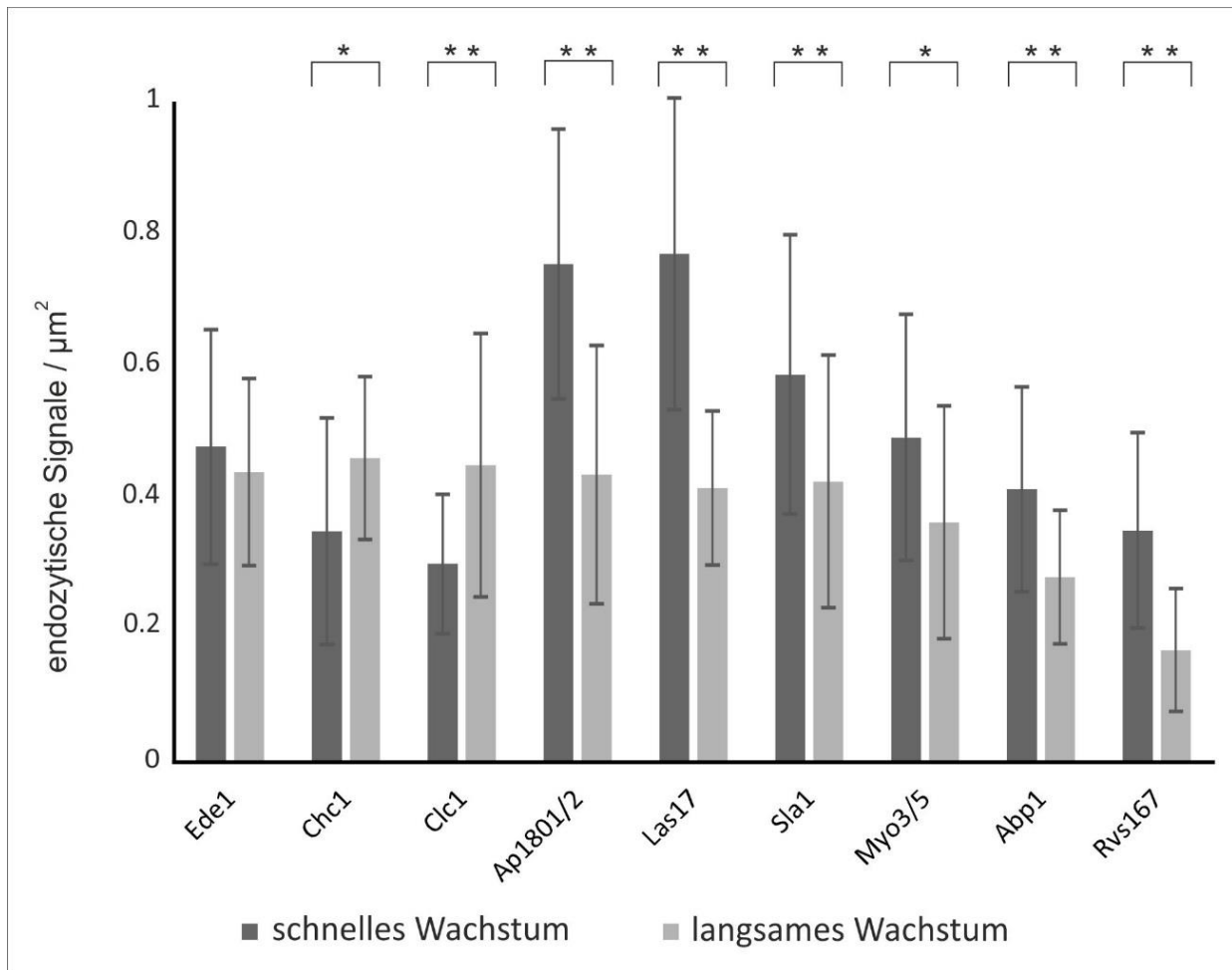
Der Vergleich der Proteine aus *A. gossypii* mit den Homologen aus *S. cerevisiae* zeigt, dass die Lebensdauer der Signale in *A. gossypii* in allen neun Fällen stark verkürzt ist. Die in der Graphik angegebenen Quotienten der Lebenszeiten ( $Q_L$  = Lebenszeiten der *S. cerevisiae*-Proteine zu den *A. gossypii*-Proteinen) veranschaulichen, dass insbesondere die frühen Proteine starke Unterschiede zwischen den beiden Spezies aufweisen. Der deutlichste Unterschied zwischen *S. cerevisiae* und *A. gossypii* ist auch hier bei Clathrin (Clc1) zu sehen, hier ist die Lebenszeit des



Homologen Proteins aus Hefe 17,8-mal länger. Die Lebenszeit von Ede1 in Hefe ist etwa 9,6-fach länger als die des Homologen in *A. gossypii*. Bei den Proteinen der späteren Phasen nimmt dieser Wert deutlich ab. Während der  $Q_L$ -Wert von Yap1801 / Ap1801/2 mit 7,2 noch relativ hoch ist, liegen die  $Q_L$ -Werte der beiden anderen Proteine dieser Phase, Las17 und Sla1, nur noch bei ca. 3. Die Proteine der beiden letzten Phasen weisen mit  $Q_L$ -Werten zwischen 2,4 und 2,9 die geringsten Unterschiede in der Lebenszeit zwischen den beiden Spezies auf. Die Beschleunigung des Prozesses in *A. gossypii* gegenüber *S. cerevisiae* ist somit zwar in allen Phasen erkennbar, ist aber bei den frühen Proteinen besonders ausgeprägt.

#### 3.1.1.1.2 Anzahl der endozytischen Ereignisse

Neben der Beschleunigung des endozytischen Prozesses, ist die Erhöhung der Anzahl endozytischer Ereignisse eine weitere Möglichkeit die Endozytoserate zu erhöhen. Um dies zu untersuchen wurde für jedes der neun markierten Proteine die Anzahl der Signale während der unterschiedlichen Wachstumsphasen ermittelt. Da die Dauer der Zeitrafferaufnahmen zwischen den einzelnen Proteinen variiert, wurden hierzu nur die Fluoreszenzbilder zum Zeitpunkt 0 s, 30 s und 60 s ausgezählt. Insgesamt wurden 10 Hyphen pro Protein und Wachstumsgeschwindigkeit ausgewertet. Die erhaltenen Werte der einzelnen Messreihen sind somit aus je 30 Einzelwerten gemittelt. Es wurden nur Signale gezählt, die in den vorderen 10  $\mu\text{m}$  der Hyphenspitze lokalisiert waren, da durch die vorangegangenen Untersuchungen bereits bekannt war, dass sich hier der Hauptanteil der Signale befindet. Zudem gab es Unterschiede in der Länge der aufgenommenen Hyphen, was eine Begrenzung des gewerteten Bereichs zwingend notwendig macht. Die auf dem Deckglas aufliegende und somit durch die Mikroskopie-Technik belichtete Fläche der Hyphen war im Mittel 3  $\mu\text{m}$  breit. Folglich wurde pro Hyphe eine Fläche von ca. 30  $\mu\text{m}^2$  ausgezählt. Zur besseren Vergleichbarkeit mit den aus der Literatur bekannten Daten aus *S. cerevisiae*, wurde die Anzahl der Signale pro 1  $\mu\text{m}^2$  berechnet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 11 zusammengefasst.



**Abbildung 11: Anzahl der endozytischen Signale der neun verschiedenen Proteine bei schnellem und langsamem Hyphenwachstum.** Pro Messreihe wurden die Fluoreszenzbilder zu den Zeitpunkten 0 s, 30 s und 60 s von 10 Zeitrasteraufnahmen ausgewertet. Eine Messreihe gibt somit die Mittelwerte aus 30 Einzelbildern an. Es wurden nur die ersten 10  $\mu\text{m}$  der Hyphenspitzen ausgezählt. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichungen der Messreihen wieder. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die Anzahl der Signale pro  $1 \mu\text{m}^2$  angegeben. Sternchen (\*) markieren signifikante Unterschiede zwischen schnellem und langsamem Wachstum (\*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,005$ ).

Die hier gemessenen Werte korrelieren mit den Werten für die Lebensdauer der Proteine. Dies war zu erwarten, da die Signale pro Bild gezählt wurden und langlebigere Proteine, im Gegensatz zu Proteinen mit kurzer Lebenszeit, auf mehreren Bildern hintereinander zu sehen sind. Während der schnellen Wachstumsphase konnte die höchste Anzahl an endozytischen Ereignissen mit 0,76 bzw. 0,77 Signalen /  $\mu\text{m}^2$  bei den Proteinen Ap1801/2 und Las17 gezählt werden. In beiden Fällen handelt es sich um Komponenten, die der Phase „Reifung des Proteinmantels“ zugeordnet werden und in *S. cerevisiae* zeitlich gesehen in der Mitte des Prozesses an den Ort der Endozytose gelangen (Weinberg und Drubin, 2012). Die Anzahl der gemessenen Signale nimmt mit einer späteren Ankunft an der Endozytosestelle und der damit verbundenen kürzeren Lebenszeit immer weiter ab (Sla1, Myo3/5, Abp1, Rvs167). Die drei untersuchten Proteine Ede1, Chc1 und Clc1, die in Hefe zur frühen Phase der Endozytose gezählt werden, wiesen eine im Vergleich zu

Las17 und Ap1801/2 geringere Anzahl an Signalen auf. Wie bereits in Kapitel 3.1.1.1.1 erwähnt verlässt das Ede1-Homologe aus *S. cerevisiae* etwa zu Beginn der Membraneinstülpung die Endozytosestelle, wodurch sich auch die geringere Anzahl an Signalen im Vergleich zu den Proteinen der mittleren Phase erklären ließe. Die geringere Anzahl der Clathrin-Signale korreliert mit den in Kapitel 3.1.2.1 gemessenen kurzen Lebenszeiten für die beiden Untereinheiten. In Bezug auf die bekannte Funktionsweise in *S. cerevisiae* ist dieses Ergebnis aber überraschend. Die Clathrin-Homologen in *S. cerevisiae* sind während des gesamten Prozesses an der Endozytosestelle lokalisiert und weisen somit eine der längsten Lebenszeiten an der Membran auf. Demnach wäre eine hohe Anzahl von Signalen zu erwarten gewesen. Die geringe Anzahl und die kurze Lebenszeit von Signalen in *A. gossypii* lassen vermuten, dass die Funktionsweise von Clathrin in *A. gossypii* von der bekannten Funktionsweise in *S. cerevisiae* abweicht.

Der Vergleich der beiden unterschiedlichen Wachstumsgeschwindigkeiten zeigt, dass die Anzahl der endozytischen Signale bei 6 der 9 getesteten Proteine während des langsamen Wachstums deutlich geringer ist (Abbildung 11, \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,005$ ). Bei dem frühen Protein Ede1 wurde ebenfalls eine leichte Verminderung der Signalanzahl während des langsamen Wachstums festgestellt, der Unterschied ist allerdings nicht signifikant.

Im Gegensatz zu den sieben anderen Proteinen zeigten die beiden Clathrin-Untereinheiten beim Vergleich der beiden Wachstumsgeschwindigkeiten ein umgekehrtes Verhältnis. Hier konnte bei langsamem Wachstum eine höhere Anzahl an Signalen in der Hyphenspitze gezählt werden. In den Beispielbildern in Abbildung 8B und C ist allerdings zu erkennen, dass sich die Signale, insbesondere während des schnellen Wachstums, auf einen größeren Bereich verteilen, als bei den anderen sieben Proteinen. Da bei dieser Untersuchung nur die ersten 10  $\mu\text{m}$  der Hyphenspitzen ausgezählt wurden, ist es möglich, dass ein großer Anteil der Clathrin-Signale bei schnellem Wachstum nicht mitgezählt wurde. Ob dieser niedrigere Wert bei den Clathrin-Signalen durch die Lokalisierung der Signale in der Hyphe bedingt ist, wird in Kapitel 3.1.1.1.3 genauer analysiert.

Aus *S. cerevisiae* sind Werte für die Signalanzahl von Sla1 und Abp1 bekannt (Kaksonen et al., 2005; Suzuki et al., 2012). Für Sla1 wurde eine Anzahl von ca. 0,44 und für Abp1 ein Wert von ca. 0,26 Signalen pro 1  $\mu\text{m}^2$  ermittelt. Diese Werte sind vergleichbar mit den in *A. gossypii* gemessenen Werten der entsprechenden Homologen bei langsamem Wachstum. Während des schnelleren Wachstums ist die Dichte an endozytischen Ereignissen demnach deutlich höher als in *S. cerevisiae*.

#### 3.1.1.1.3 Lokalisierung endozytischer Proteine in der Hyphenspitze

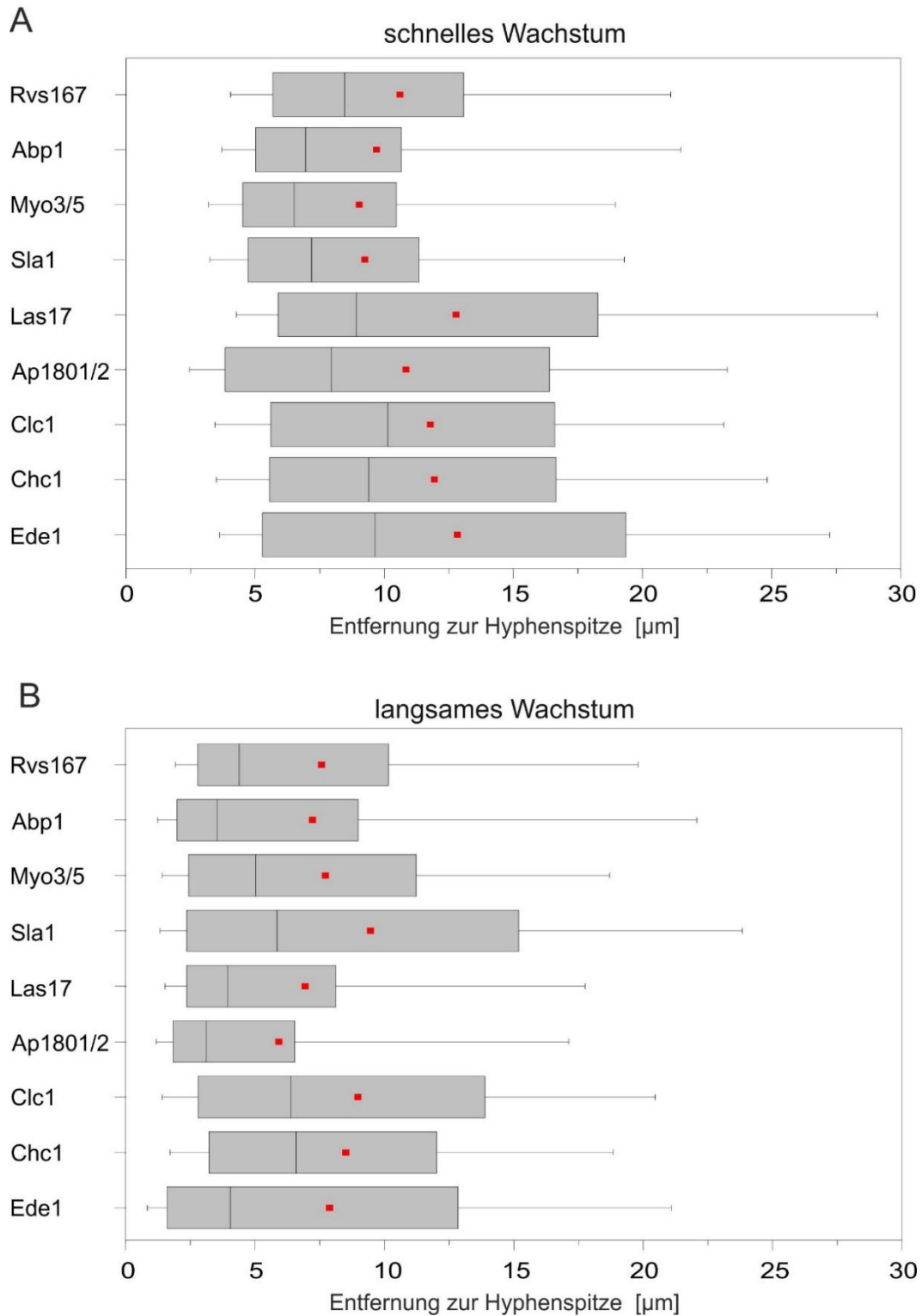
Durch die Analyse der Aktin-Patches konnte bereits gezeigt werden, dass sich die Lage der endozytischen Zone mit zunehmender Wachstumsgeschwindigkeit weiter von der Hyphenspitze entfernt. Wegen der für die Aktin-Färbung notwendigen Fixierung der Zellen ist eine Messung der dazugehörigen Wachstumsgeschwindigkeiten allerdings nicht möglich. Durch Untersuchungen zur Endozytose in *S. cerevisiae* ist bekannt, dass Aktin zeitlich gesehen erst zum Ende des Prozesses an die Endozytosestelle rekrutiert wird. Dies lässt vermuten, dass die Lokalisierung der Aktin-Patches mit der Lokalisierung der Proteine aus den späten Phasen der Endozytose vergleichbar ist. Ob die für die Aktin-Patches ermittelte Lage in der Hyphenspitze auch auf die Proteine der frühen Phasen übertragbar ist, blieb bisher fraglich.

Im nächsten Schritt wurde die Lokalisierung der ausgewählten neun endozytischen Proteine, bei unterschiedlicher Wachstumsgeschwindigkeit, mittels „live-cell-imaging“ untersucht. Für jede Messreihe wurden zehn Zeitrafferaufnahmen einzelner Hyphen wie in 3.1.1.1 beschrieben ausgewertet. Die Ermittlung der Position der einzelnen Signale in der Hyphe erfolgte wie bei der Analyse der Signalanzahl für jedes Bild separat (vgl. Abbildung 9E), das heißt ein endozytisches Signal wird hier entsprechend seiner Lebenszeit mehrfach in die Auswertung miteinbezogen. Die Anzahl der ausgewerteten Signale lag dadurch zwischen 13701 und 45334 Signalen in der schnellen Wachstumsphase und zwischen 8952 und 25170 Signalen in der langsamen Wachstumsphase. Die Ergebnisse sind in Abbildung 12 und Abbildung 13 dargestellt.

In Abbildung 12 sind die Ergebnisse mittels Box-Plot-Darstellung zusammengefasst. Die x-Achse kennzeichnet hier die Entfernung von der Hyphenspitze. Die Boxen geben die Länge des Interquartilsabstands an. Die Whisker kennzeichnen das 10 %- bzw. 90 %-Quantil. Rote Quadrate und schwarze Linien stellen den Mittelwert und den Median dar.

Beim Vergleich der beiden Wachstumsgeschwindigkeiten wird deutlich, dass sich die endozytische Zone bei schnellem Wachstum weiter von der Hyphenspitze entfernt. Bei schnellem Wachstum wurden Mittelwerte zwischen 9 und 12,8  $\mu\text{m}$  berechnet, während die Mittelwerte während des langsamen Wachstums zwischen 5,9 und 9  $\mu\text{m}$  liegen. Demnach verschiebt sich die endozytische Zone, bedingt durch die Wachstumsgeschwindigkeit, im Durchschnitt um ca. 3  $\mu\text{m}$ . Diese Verschiebung ist bei den Proteinen allerdings unterschiedlich stark ausgeprägt. Die größte Differenz zwischen den Wachstumsgeschwindigkeiten wurde bei Las17 festgestellt (5,9  $\mu\text{m}$ ). Mit Mittelwerten von 4,1  $\mu\text{m}$  und 4,9  $\mu\text{m}$  wiesen Ede1 und Ap1801/2

ebenfalls eine über dem Durchschnitt liegende Verschiebung auf. Bei Myo3/5 fiel die Differenz zwischen den Mittelwerten mit 1,3  $\mu\text{m}$  sehr gering aus und bei Sla1 zeigte sich hinsichtlich der Mittelwerte kein Unterschied in der Lage der endozytischen Signale.

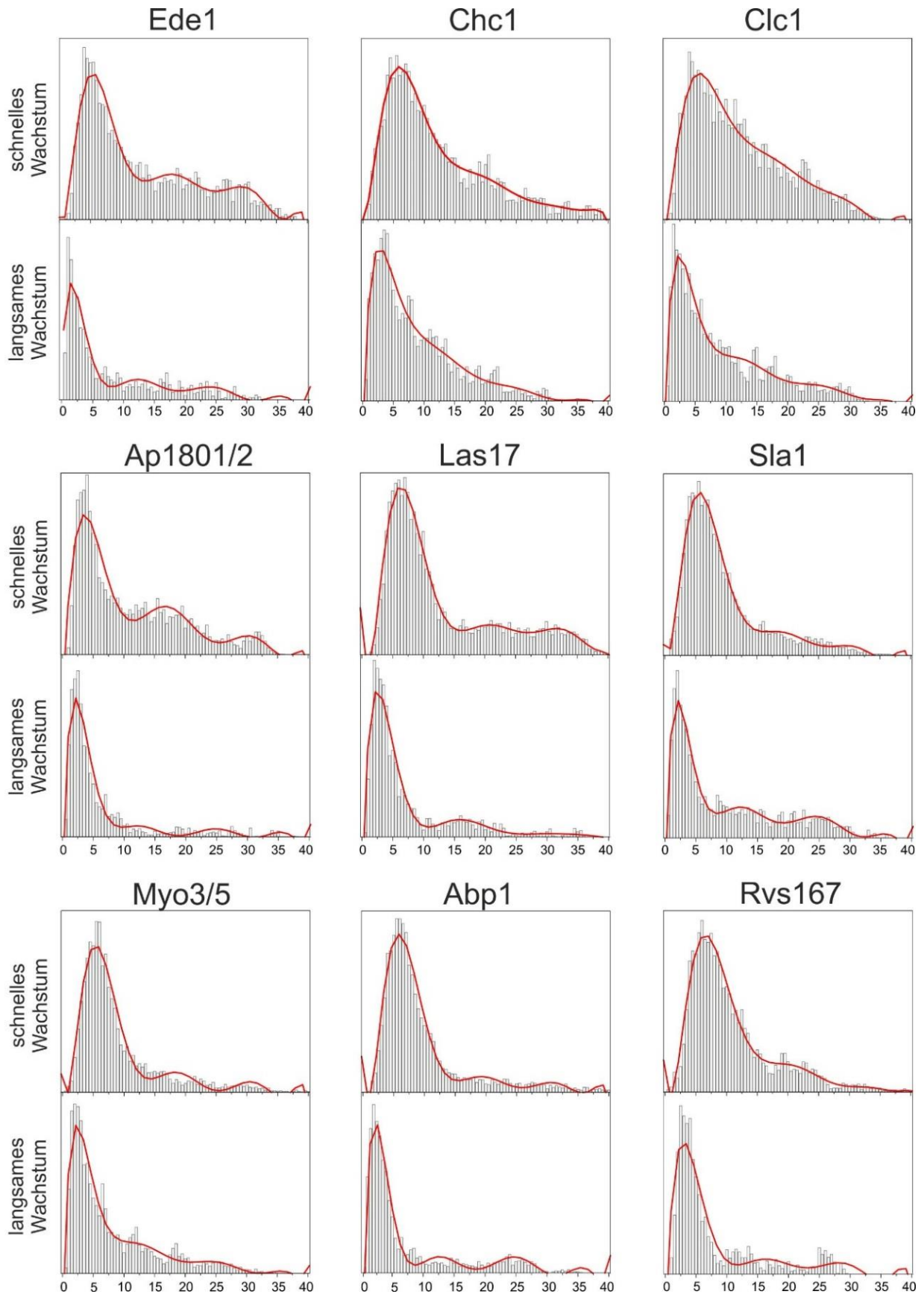


**Abbildung 12: Position der endozytischen Signale der neun endozytischen Proteine in der Hyphe.** Die Ergebnisse der einzelnen Messungen wurden mittels Box-Plot dargestellt. Die x-Achse gibt die Entfernung zur Hyphenspitze an. Die Boxen geben die Länge des Interquartilabstands an und beinhalten somit die mittleren 50% der Messwerte. Die

Whisker geben das 10%- bzw. 90%-Quantil an und umfassen die mittleren 80% der Messwerte. Die Länge der Box und Whisker gibt die Varianz innerhalb einer Messreihe wieder. Rote Quadrate kennzeichnen den Mittelwert, die schwarzen Linien geben den Median an. **A**: Position der endozytischen Signale bei schnellem Wachstum. **B**: Position der endozytischen Signale bei langsamem Wachstum. Für jedes Protein wurden pro Wachstumsphase 10 Zeitrifferaufnahmen ausgewertet. Die Ermittlung der Position der Signale erfolgte für jedes Bild separat. Endozytische Ereignisse, die entsprechend ihrer Lebenszeit auf mehreren Bildern zu sehen waren, wurden mehrfach in die Auswertung miteinbezogen. Die Anzahl der ausgewerteten Einzelsignale lag daher zwischen 8952 und 45334 Signalen.

Die Verteilung der Signale entlang der Längsachse der Hyphe ist bei allen getesteten Proteinen relativ breit. Dies wird durch die Boxen und Whisker im Diagramm veranschaulicht. Bei Sla1 gab es bei langsamem Wachstum eine deutlich breitere Verteilung, wodurch der Eindruck einer, im Vergleich zu den anderen Proteinen, gegensätzlichen Verschiebung der Signalzone entsteht. Dies kann aber bei Betrachtung der dazugehörigen Histogramme widerlegt werden (Abbildung 13).

Die Histogramme ermöglichen einen detaillierteren Blick auf die Häufigkeitsverteilung der Messwerte. Wie in Abbildung 12 gibt die x-Achse die Entfernung zur Hyphenspitze an. Die Peaks der polynomischen Ausgleichslinien zeigen den Bereich der Hyphen mit der größten Dichte an Signalen an. Diese weichen teilweise stark von den in Abbildung 12 dargestellten Mittelwerten ab, was insbesondere bei Sla1 deutlich wird. Während die errechneten Mittelwerte hier keinen Unterschied zwischen schnellem und langsamem Wachstum zeigten, wird bei Betrachtung der Maxima ersichtlich, dass die Wachstumsgeschwindigkeit auch bei Sla1 eine Verschiebung der Signalzone bewirkt. Die durchschnittliche Verschiebung der endozytischen Zone liegt aber auch bei Betrachtung der Maxima bei ca. 3  $\mu\text{m}$ . Durch die Histogramme wird außerdem deutlich, dass im vordersten Bereich der Hyphenspitze (ca. 1  $\mu\text{m}$ ) keine bzw. sehr wenige Signale detektiert wurden. Dieser signalfreie Bereich dehnt sich während des schnellen Wachstums etwas aus. Die Breite der Peaks zeigt, dass sich die Signalzonen der Proteine bei schnellem Wachstum ausweiten. Diese Ausweitung ist bei den beiden Clathrin-Untereinheiten besonders stark ausgeprägt, was durch den flachen Abfall der polynomischen Trendlinie ersichtlich wird. Insbesondere bei schnellem Wachstum beträgt die Distanz der Signale zur Hyphenspitze häufig mehr als 10  $\mu\text{m}$ . Die bereits in Kapitel 3.1.1 und 3.1.1.1.2 vermutete, breitere Verteilung der Clathrin-Signale wird somit durch die quantitative Messung bestätigt.



**Abbildung 13: Histogramme zur Position der endozytischen Signale in den vorderen 40  $\mu\text{m}$  der Hyphenspitze.** Die Intervalllänge zwischen den in Gruppen zusammengefassten Werten beträgt 0,5  $\mu\text{m}$  (Breite der Balken). Die x-Achse gibt die Entfernung von der Hyphenspitze in  $\mu\text{m}$  an. Da die Anzahl der für die Histogramme ausgezählten Signale bei

den verschiedenen Messreihen unterschiedlich war, wurden der y-Achse keine Werte zugeordnet. Sie soll lediglich die relative Häufigkeit anzeigen. Die Histogramme für schnelles und langsames Wachstum eines Proteins sind zur besseren Vergleichbarkeit untereinander angeordnet. Die rote Linie zeigt die polynomische Anpassung der Messwerte (polynomische Anpassung 9. Grades).

Die relativ hohe Anzahl an Ede1-Signalen in den hinteren Bereichen der Hyphenspitze ist überraschend, da Ede1 in *S. cerevisiae* zu den Proteinen der frühen Phase gehört. Außerdem ist bekannt, dass es in *S. cerevisiae* vor Beendigung des endozytischen Prozesses von der Endozytosesetelle verschwindet. Die breitere Signalzone von Ede1 in *A. gossypii* spiegelt sich allerdings auch in den Beispielbildern in Abbildung 7 und Abbildung 8 wider.

Abgesehen von den beiden Clathrin-Untereinheiten sind nur sehr geringe Unterschiede zwischen den Proteinen erkennbar. Eine klare Zuordnung zu den verschiedenen Phasen ist durch diese Analyse daher nicht möglich. Durch die hohe Geschwindigkeit der Endozytose in *A. gossypii* (vgl. Kapitel 3.1.1.1.1) ist allerdings denkbar, dass sich die Position der Endozytosestelle trotz der hohen Wachstumsgeschwindigkeit nicht sichtbar verändert. Dadurch wäre auch eine Unterscheidung der Signalzonen der einzelnen Proteine ausgeschlossen. Mit Hilfe der in Kapitel 3.1.1.1.1 ermittelten Lebenszeiten der Proteine und der im folgende Kapitel 3.1.1.2 durchgeführten Kolokalisierungsstudien soll eine genauere Aussage über die Gesamtdauer des endozytischen Prozesses ermöglicht werden.

Insgesamt bestätigt die Analyse zur Lokalisierung der endozytischen Proteine mittels „live-cell-imaging“ die durch Aktin-Färbung erhaltenen Ergebnisse. Sowohl die Verschiebung, als auch die Verbreiterung der endozytischen Zone konnten verifiziert werden. Die in dieser Arbeit durchgeführte Analyse zeigte darüber hinaus, dass sich die Lage der endozytischen Zone während des schnellen Wachstums um ca. 3  $\mu\text{m}$  nach hinten verlagert. Des Weiteren wurde bei den Clathrin-Untereinheiten eine leichte Abweichung vom Lokalisierungsmuster der übrigen Proteine festgestellt. So liegt der Signalbereich der Clathrin-Untereinheiten im Vergleich zu den übrigen Proteinen etwas weiter von der Hyphenspitze entfernt. Die Histogramme zeigten zudem, dass die Clathrin-Signale etwas breiter in diesem Bereich verteilt sind.

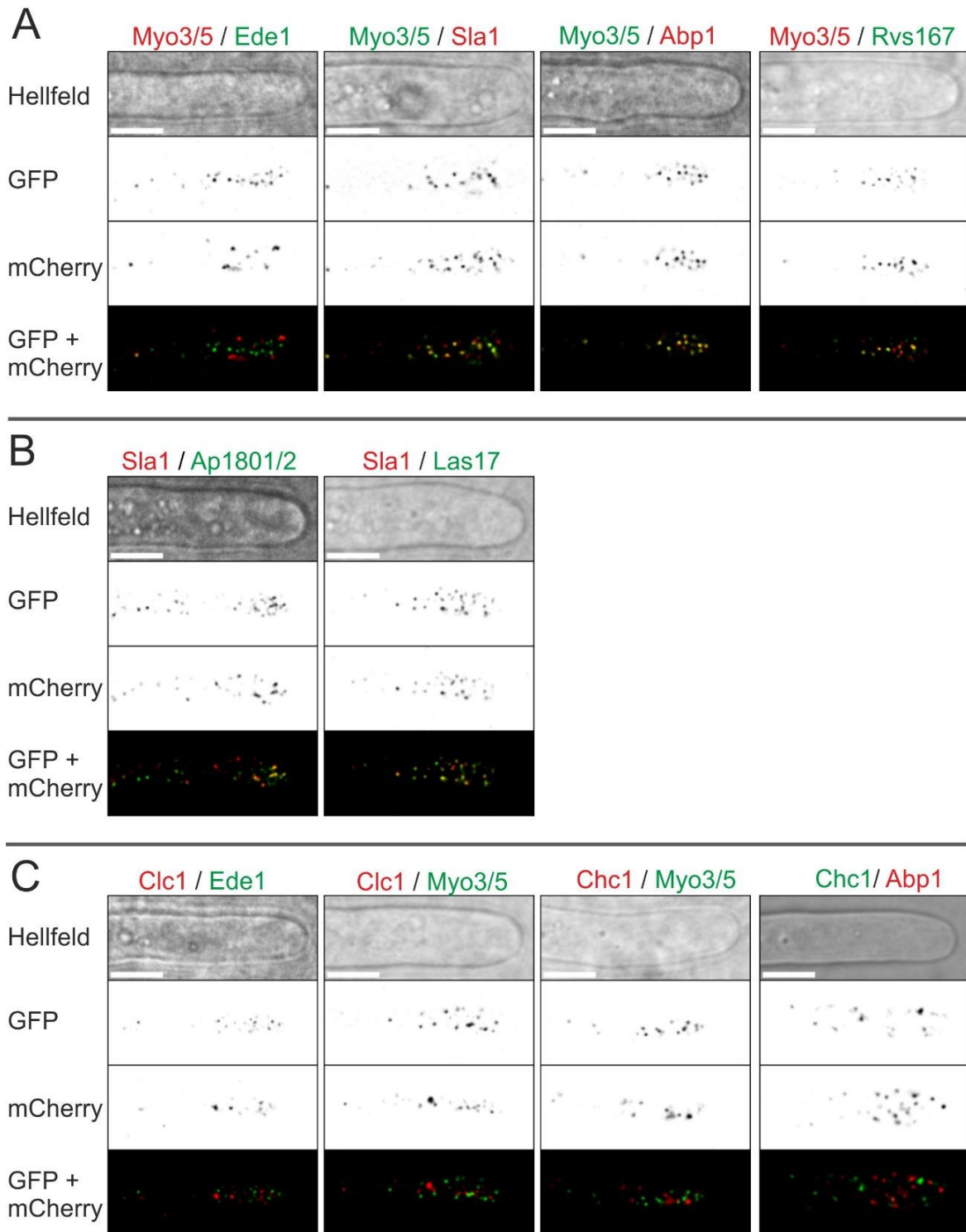
#### 3.1.1.2 Kolokalisierungsstudien mit endozytischen Proteinen

In den vorangegangenen Analysen wurden die Proteine separat betrachtet. So konnten Daten zur Lebenszeit, Anzahl und Lokalisierung der einzelnen Proteine erfasst werden. In den folgenden



Kolokalisierungsstudien wurden die Fluoreszenzsignale von jeweils zwei der neun ausgewählten Proteine gemeinsam betrachtet. So konnte die zeitliche Abfolge des Auftretens der Proteine am Ort der Endozytose festgestellt werden. Des Weiteren war es durch diese Analysen möglich zu ermitteln, mit welcher Zeitdifferenz die Proteine an der Endozytosestelle erscheinen. Dadurch kann, in Verbindung mit den Daten zur Lebenszeit, eine genauere Aussage über die Dauer des Gesamtprozesses getroffen werden.

Für die Kolokalisierungsstudien wurden Stämme konstruiert, in denen jeweils eins der neun Proteine mit GFP und ein weiteres mit mCherry markiert ist. Wie bei den vorherigen Analysen wurden mittels TIRF-Mikroskopie und „live-cell-imaging“ Zeitrafferaufnahmen angefertigt. Die Aufnahmen wurden mit Hilfe eines „Dual-View“-Aufsatzes angefertigt. Dieser ermöglicht, durch die Aufteilung des Strahlengangs auf zwei verschiedene Filter, eine simultane Erfassung beider Fluoreszenzsignale. Die Proteine Myo3/5, Sla1 und Clathrin (Clc1 oder Chc1) wurden als Referenzproteine ausgewählt, das heißt in jedem der Stämme mit einer Doppelmarkierung war mindestens eins dieser Proteine markiert. Dies sollte einen besseren Vergleich bei der Auswertung der zeitlichen Abstände ermöglichen. Für die Kolokalisierungsstudien wurden Hyphen in der schnellen Wachstumsphase betrachtet. In Abbildung 14 sind repräsentative Beispielbilder der einzelnen Stämme zu sehen. Es wurden jeweils das Hellfeldbild, die Fluoreszenzbilder der beiden Kanäle und die Überlagerung der Fluoreszenzsignale dargestellt. Abbildung 14A zeigt Aufnahmen mit Myo3/5 als Referenzprotein. Bei den Proteinen Sla1, Abp1 und Rvs167 konnte eine klare Kolokalisierung mit Myo3/5 festgestellt werden. Diese Proteine sind somit über einen bestimmten Zeitraum zusammen mit Myo3/5 an der Endozytosestelle lokalisiert. Die Überlagerung von Ede1 mit Myo3/5 zeigte allerdings keine Kolokalisierung. Dieses Ergebnis schließt die Beteiligung beider Proteine am selben endozytischen Prozess aber nicht aus. Da Ede1 in *S. cerevisiae* die Endozytosestelle zu Beginn der Membraneinstülpung verlässt, ist es denkbar, dass es sich in *A. gossypii* vor dem Erscheinen von Myo3/5 von der Endozytosestelle entfernt. Es ist demnach möglich, dass beide Proteine am endozytischen Prozess beteiligt sind, aber zu unterschiedlichen Zeitpunkten an der Endozytosestelle aktiv sind. Abbildung 14B zeigt Beispielbilder zur Kolokalisierung von Sla1 mit den beiden anderen Proteinen der gleichen Phase (Reifung des Proteinmantels). Sowohl mit Ap1801/2, als auch mit Las17 ist ein hoher Grad an Kolokalisierung zu erkennen.

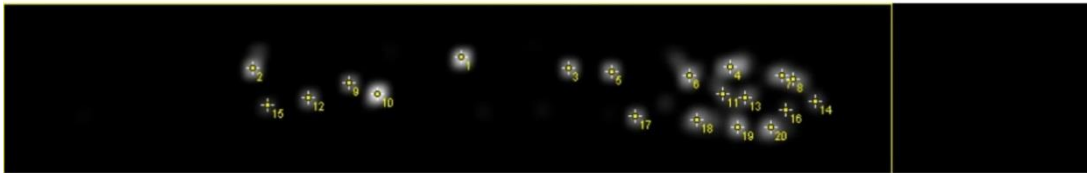


**Abbildung 14: Repräsentative Beispielbilder der Kollokalisierungsstudien der verschiedenen Stämme.** Insgesamt wurden zehn Stämme untersucht. In jedem Stamm sind zwei der neun ausgewählten Proteine mit Fluoreszenzproteinen markiert (GFP oder mCherry). Myo3/5, Sla1 und Clathrin (Clc1 oder Chc1) wurden als Referenzproteine ausgewählt. In jedem der 10 Stämme ist mindestens eins dieser Referenzproteine markiert. Für jedes Beispiel sind das Hellfeldbild, die Fluoreszenzbilder der beiden Kanäle und die Überlagerung der Fluoreszenzkanäle dargestellt. Zur Veranschaulichung wurden die Farben der Fluoreszenzbilder der einzelnen Kanäle invertiert. In den Überlagerungen sind GFP-Signale grün und mCherry-Signale rot dargestellt. Kollokalisierung der Proteine wird durch gelbe Farbe gekennzeichnet. **A:** Kollokalisierungsstudien mit Myo3/5 als Referenzprotein. **B:** Kollokalisierungsstudien mit Sla1 als Referenzprotein. **C:** Kollokalisierungsstudien mit Clathrin als Referenzprotein. Maßstab: 5 µm.

In Abbildung 14C sind die Ergebnisse zur Kolokalisierung mit Clathrin als Referenzprotein zu sehen. Da die beiden Untereinheiten Clc1 und Chc1 ein hohes Maß an Kolokalisierung aufweisen (vgl. Abbildung 1), können sie hier als ein Referenzprotein zusammengefasst werden. Clathrin wurde sowohl mit einem Protein aus der frühen Phase (Ede1), als auch mit Proteinen der Phase der „Aktin-Polymerisation“ (Myo3/5 und Abp1) getestet. Bei keinem der drei Proteine konnte eine Kolokalisierung festgestellt werden. Dieses Ergebnis stellt eine Beteiligung von Clathrin am gleichen endozytischen Prozess in Frage.

Im nächsten Schritt sollte der Grad der Kolokalisierung quantitativ bestimmt werden. Hierzu wurden die Zeitrafferaufnahmen der Kolokalisierungsstudien mit Hilfe des in Kapitel 2.4.6 beschriebenen Programms ausgewertet. Dieses erfolgte analog zu der in Kapitel 3.1.1.1 beschriebenen Methode. Die Fluoreszenzaufnahmen beider Kanäle werden zunächst separat ausgewertet (vgl. Abbildung 9E). Anschließend wird aus den Ergebnissen der Positionsbestimmung der Signale ein binäres hergestellt. Die binären Bilder aus beiden Kanälen werden dann als roter und grüner Kanal übereinandergelegt. Aus dem Überlagerungsbild kann dann der prozentuale Anteil der überlagerten Signale bestimmt werden (vgl. Abbildung 15C).

A: Las17-GFP



B: Sla1-mCherry



C: Überlagerung Las17 / Sla1



**Abbildung 15: Repräsentative Beispiele der vom Programm erzeugten Bilder für die quantitative Auswertung der Kolokalisierung.** Beispiel aus der Proteinkombination Las17/Sla1. Die gelbe Linie markiert die Position der Hyphenspitze. **A:** Positionsbestimmung der endozytischen Signale aus Kanal 1 (GFP). **B:** Positionsbestimmung der endozytischen Signale aus Kanal 2 (mCherry). **C:** Aus A und B wurden binäre Bilder erstellt, die dann als roter und grüner Kanal übereinandergelegt wurde. Grün: Las17-GFP-Signale aus A; rot: Sla1-mCherry-Signale aus B; gelb: Überlagerung der Signale aus A und B.

### 3 Ergebnisse

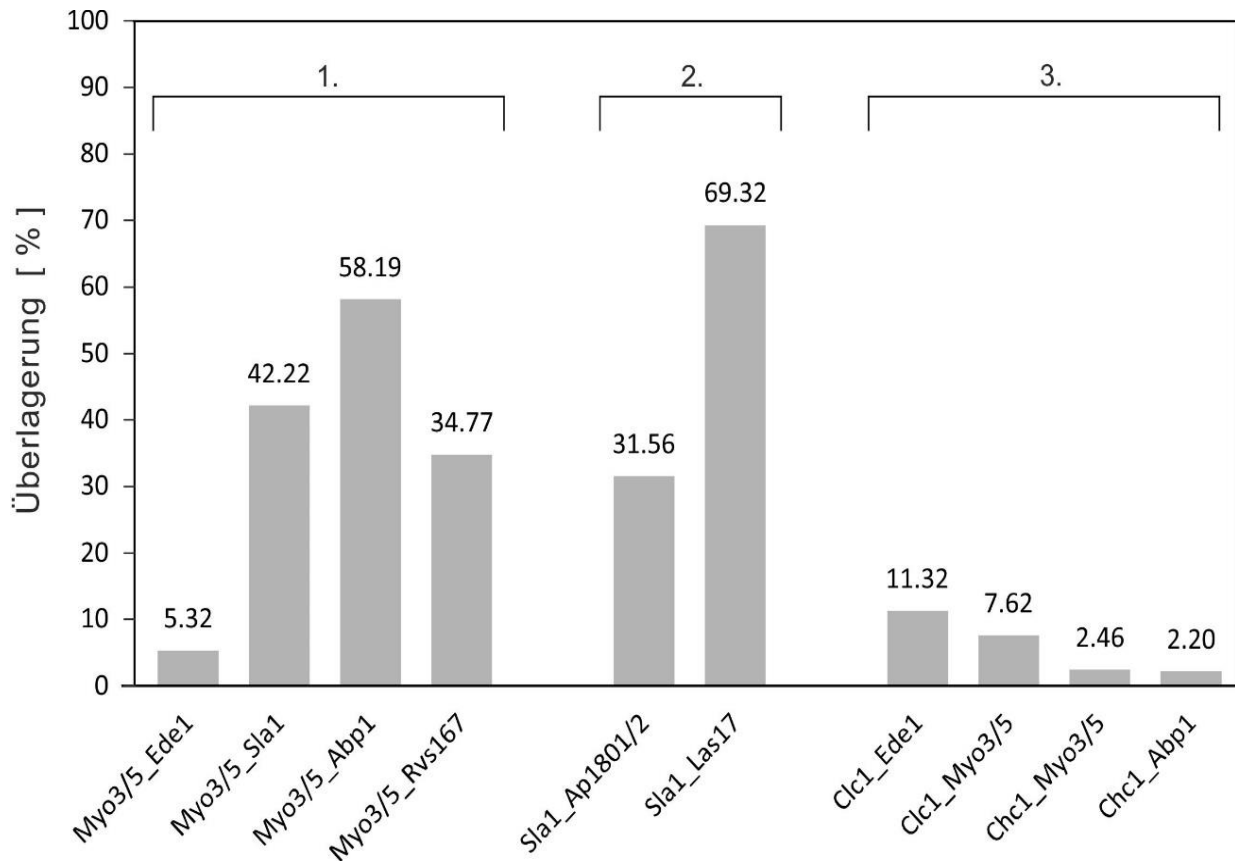
Der Grad der Kolo­kalisierung der jeweiligen Proteinpaare wurde sowohl mit den GFP-markierten Proteinen, als auch mit den mCherry-Proteinen als Referenzprotein berechnet. Anschließend wurde daraus der Mittelwert berechnet. In Tabelle 7 sind die Ergebnisse der Berechnung für die einzelnen Proteinpaare dargestellt. Der Grad der Kolo­kalisierung gibt Aufschluss darüber, inwiefern sich das Auftreten der beiden Proteine an der Endozytosestelle zeitlich überschneidet.

**Tabelle 7: Grad der Kolo­kalisierung der verschiedenen Proteinpaare in %.**

Proteinpaar	n *	Mittelwert [%]	Mittelwert [%]	Mittelwert [%] Referenzkanal 1 und 2
		Referenzprotein 1 (GFP)	Referenzprotein 2 (mCherry)	
1. Ede1-GFP 2. Myo3/5-mCherry	238	6,20 +/- 11,58	4,43 +/- 7,64	5,32 +/- 9,84
1. Myo3/5-GFP 2. Sla1-mCherry	288	42,90 +/- 19,31	41,53 +/- 18,64	42,22 +/- 18,97
1. Myo3/5-GFP 2. Abp1-mCherry	386	60,85 +/- 18,90	55,52 +/- 18,56	58,19 +/- 18,91
1. Rvs167-GFP 2. Myo3/5-mCherry	134	36,83 +/- 28,39	32,71 +/- 22,96	34,77 +/- 25,85
1. Ap1801/2-GFP 2. Sla1-mCherry	353	31,66 +/- 23,41	31,47 +/- 21,22	31,56 +/- 22,31
1. Las17-GFP 2. Sla1-mCherry	397	63,76 +/- 11,72	74,87 +/- 12,70	69,32 +/- 13,42
1. Ede1-GFP 2. Clc1-mCherry	267	8,76 +/- 10,57	13,88 +/- 17,33	11,32 +/- 14,57
1. Myo3/5-GFP 2. Clc1-mCherry	408	8,26 +/- 11,63	6,97 +/- 9,46	7,62 +/- 10,61
1. Myo3/5-GFP 2. Chc1-mCherry	356	2,46 +/- 6,82	2,45 +/- 6,97	2,46 +/- 6,89
1. Chc1-GFP 2. Abp1-mCherry	441	2,47 +/- 4,44	1,97 +/- 5,13	2,20 +/- 4,80

\* Anzahl der ausgewerteten Einzelbilder.

Die Ergebnisse der quantitativen Analyse der Kolo­kalisierung sind graphisch in Abbildung 16 dargestellt. Sie sind anhand der Referenzproteine gruppiert.



**Abbildung 16: Quantitative Analyse der Kolokalisierung zwischen den verschiedenen endozytischen Proteinen.** Die Ergebnisse sind anhand der Referenzproteine gruppiert. Es wird der prozentuale Anteil an überlagerten Signalen angegeben. 1. Kolokalisierung mit Myo3/5. 2. Kolokalisierung mit Sla1. 3.: Kolokalisierung mit Clathrin (Clc1 oder Chc1).

In Gruppe 1 zeigte die Kombination Myo3/5 und Abp1 mit ca. 58% den höchsten Grad an Kolokalisierung. Dies ist nicht verwunderlich, da beide Proteine der Phase der „Aktin-Polymerisation“ zugeordnet werden. Eine ebenfalls deutliche Kolokalisierung von ca. 42% konnte bei der Kombination Myo3/5 und Sla1 gemessen werden. Die Überlagerung mit Rvs167, einem Protein der Abschnürungsphase, fiel dagegen mit ca. 35% niedriger aus. Wie schon in Abbildung 14A, konnte auch mit der automatisierten Auswertung keine Kolokalisierung zwischen Myo3/5 und Ede1 festgestellt werden. Der mit ca. 5% sehr geringe Anteil an gemessener Kolokalisierung ist vermutlich durch zufällige Ereignisse begründet. Da die optische Auflösungsgrenze bei der Fluoreszenzmikroskopie bei ca. 200 nm liegt (Abbe, 1873; Rayleigh, 1907), werden zum Teil auch nah beieinander liegende Signale als Überlagerung wahrgenommen.

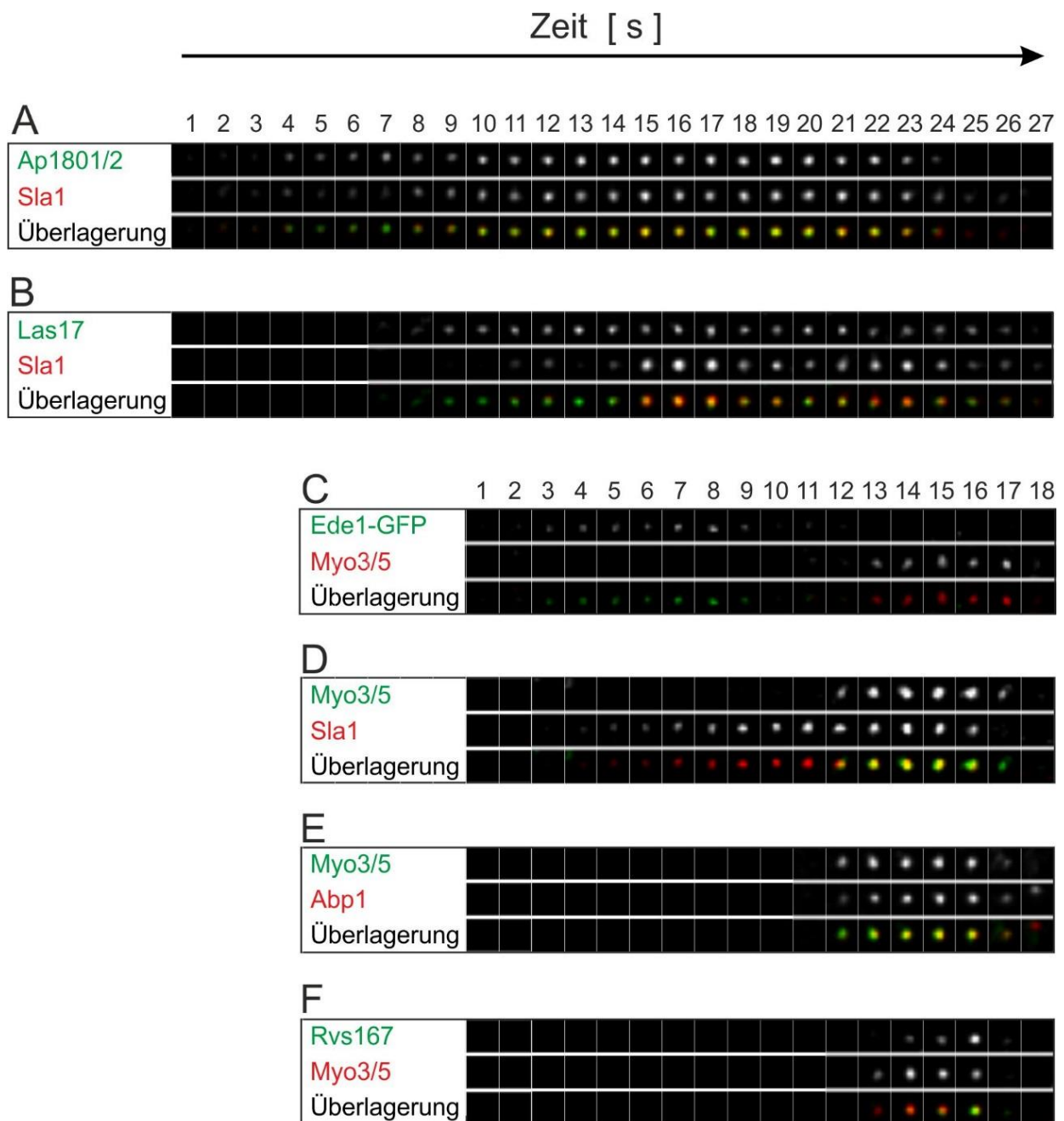
In Gruppe 2 mit Sla1 als Referenzprotein wurde sowohl mit Ap1801/2 als auch mit Las17 eine Kolokalisierung festgestellt. Alle drei Proteine wurden der Phase der „Reifung des Proteinmantels“ zugeordnet. Die Kombination Sla1 und Las17 zeigte mit ca. 69% einen besonders

hohen Wert und insgesamt den höchsten gemessenen Grad an Überlagerung. Das Auftreten von Sla1 an der Endozytosestelle überschneidet sich demnach also stark mit dem von Las17. Mit ca. 32% zeigte aber auch Ap1801/2 noch eine deutliche Kolokalisierung mit Sla1.

In der Gruppe mit Clathrin als Referenzprotein wurden insgesamt sehr niedrige Werte erhalten. Der bei den Kombinationen Chc1 / Myo3/5 und Chc1 / Abp1 gemessene Grad an Kolokalisierung kann mit Werten von ca. 2% auf zufällige Überlagerungsereignisse zurückgeführt werden. Die Kombination Clc1 und Myo3/5 zeigte mit ca. 8% einen etwas höheren Wert, als die Kombination Chc1 und Myo3/5. Es ist unklar ob dieser geringe Unterschied auf zufällige Ereignisse zurückzuführen ist, oder tatsächlich existiert. Der etwas höhere Anteil von ca. 11% bei der Kombination Clc1 und Ede1 könnte eventuell mit dem Lokalisierungsmuster der beiden Proteine zusammenhängen. Sowohl Ede1, als auch Clathrin wiesen eine höhere Anzahl an Signalen im hinteren, subapikalen Bereich auf, als Myo3/5. Dies würde die Wahrscheinlichkeit einer zufälligen Überlagerung erhöhen (vgl. Abbildung 13).

Ein Nachteil dieser Auswertungsmethode besteht im Fehlen einer negativ-Kontrolle. Da diese ein vergleichbares Lokalisierungsmuster wie die getesteten Proteine aufweisen müsste, ist die Auswahl einer geeigneten Kontrolle schwierig und entfiel daher in dieser Studie. Bei Werten von über 30% lässt sich allerdings stark auf eine Kolokalisierung schließen.

Als nächstes sollte die Reihenfolge des Erscheinens an der Endozytosestelle für die neun getesteten Proteine genauer untersucht werden. Hierzu wurden einzelne endozytische Ereignisse aus den „Dual-View“-Zeitrafferaufnahmen betrachtet. Um Zeitserien einzelner Ereignisse zu erstellen, wurden Ausschnitte der gleichen Position aus beiden Kanälen vergrößert und entsprechend der zeitlichen Abfolge nebeneinander gelegt. Das Ergebnis ist in Abbildung 17 dargestellt. In Abbildung 17A und B sind die Kombinationen mit Sla1 als Referenzprotein dargestellt. Bei Sla1 und Ap1801/2 zeigte sich eine Kolokalisierung über eine Dauer von 22 s. Ap1801/2 erscheint hier 1 s eher als Sla1, allerdings bleibt Sla1 für 2 s länger sichtbar als Ap1801/2. Der Unterschied zwischen Sla1 und Las17 ist hier etwas deutlicher. Sla1 erscheint ca. 4 s nach Las17, beide Proteine verlassen die Endozytosestelle aber zum gleichen Zeitpunkt. Kolokalisierung wurde für eine Dauer von 17 s festgestellt. Der Vergleich der beiden Zeitserien dieser Gruppe legt also nahe, dass die drei Proteine in folgender Reihenfolge an der Endozytosestelle erscheinen 1. Las17, 2. Ap1801/2, 3. Sla1.



**Abbildung 17: Zeitserien einzelner endozytischer Ereignisse** . Die Signale aus beiden Kanälen und die Überlagerung der Signale sind untereinander angeordnet. Position und Zeitpunkt der Ausschnitte sind jeweils für beide Kanäle identisch. Der Abstand zwischen den Ausschnitten beträgt 1 s. Zur Übersicht wurde die Zeit (in Sekunden) über den Bildern angegeben. Die Abbildungen wurden entsprechend der Referenzproteine gruppiert. **A, B:** Zeitserien mit Sla1 als Referenzprotein. **C-F:** Zeitserien mit Myo3/5 als Referenzprotein.

Die Abbildung 17C-F zeigen die Kombinationen mit Myo3/5 als Referenzprotein. Bei der Kombination Ede1 und Myo3/5 konnte kein endozytisches Ereignis mit einer Überlagerung der Signale gefunden werden. Es zeigte sich aber, dass an den Positionen, die Ede1-Signale zeigten, zu einem späteren Zeitpunkt auch Myo3/5 Signale detektierbar waren. Ein solches Beispiel ist in Abbildung 17C dargestellt. Da aber zu keinem Zeitpunkt eine Überlagerung der Signale stattfand

kann keine sichere Aussage über den zeitlichen Abstand zwischen dem Auftreten von Myo3/5 und Ede1 getroffen werden. Auch die Beteiligung am gleichen endozytischen Ereignis kann dadurch nicht mit Sicherheit bestätigt werden. Die Kombinationen D-F in Abbildung 17 zeigen eine klare Kolokalisierung zwischen den jeweiligen Proteinpaaren. Sla1 gelangt hier ca. 8 s vor Myo3/5 an die Endozytosestelle, verlässt sie allerdings 1 s früher. Es ergibt sich eine Überlagerungsdauer von 5 s. Die Kombination Myo3/5 und Abp1 zeigten für die gesamte Dauer ihres Auftretens Kolokalisierung. Rvs167 erreicht die Endozytosestelle ca. 1 s nach Myo3/5 und bleibt für 1 s länger hier lokalisiert. Die Dauer der Kolokalisierung beträgt hier ca. 3 s. Der Vergleich aller sechs Zeitserien lässt folgende Reihenfolge der Proteine vermuten: 1. Las17, 2. Ap1801/2, 3. Sla1, 4. Myo3/5 und Abp1 und 6. Rvs167. Den Kenntnissen aus *S. cerevisiae* zufolge, wäre Ede1 noch vor Las17 einzuordnen, allerdings lässt die fehlende Kolokalisierung in dieser Studie eine eindeutige Einordnung von Ede1 nicht zu. Für die beiden Clathrin-Untereinheiten wurden keine Zeitserien einzelner Ereignisse erstellt, da keine Kolokalisierung festgestellt wurde. Es konnten auch keine Ereignisse gefunden werden, die wie bei der Kombination Myo3/5 und Ede1 bezüglich der Position korrelierten.

Die Lebenszeiten der beiden Referenzproteine weisen leichte Unterschiede in den verschiedenen Zeitserien auf. Die Variabilität der Lebenszeit wurde jedoch schon in Kapitel 3.1.1.1.1 aufgezeigt. Da hier nur jeweils ein Ereignis für jede Kombination gezeigt wurde, kann der Grad der Überlagerung von den Ergebnissen der quantitativen Bestimmung der Kolokalisierung abweichen. Die Zeitserien geben daher eher Aufschluss über die Reihenfolge der Proteine, als über die durchschnittliche Dauer der Kolokalisierung. So deutet die quantitative Bestimmung der Kolokalisierung in der Gruppe mit Sla1 als Referenz z.B. darauf hin, dass Ap1801/2 noch vor Las17 an der Endozytosestelle erscheint.



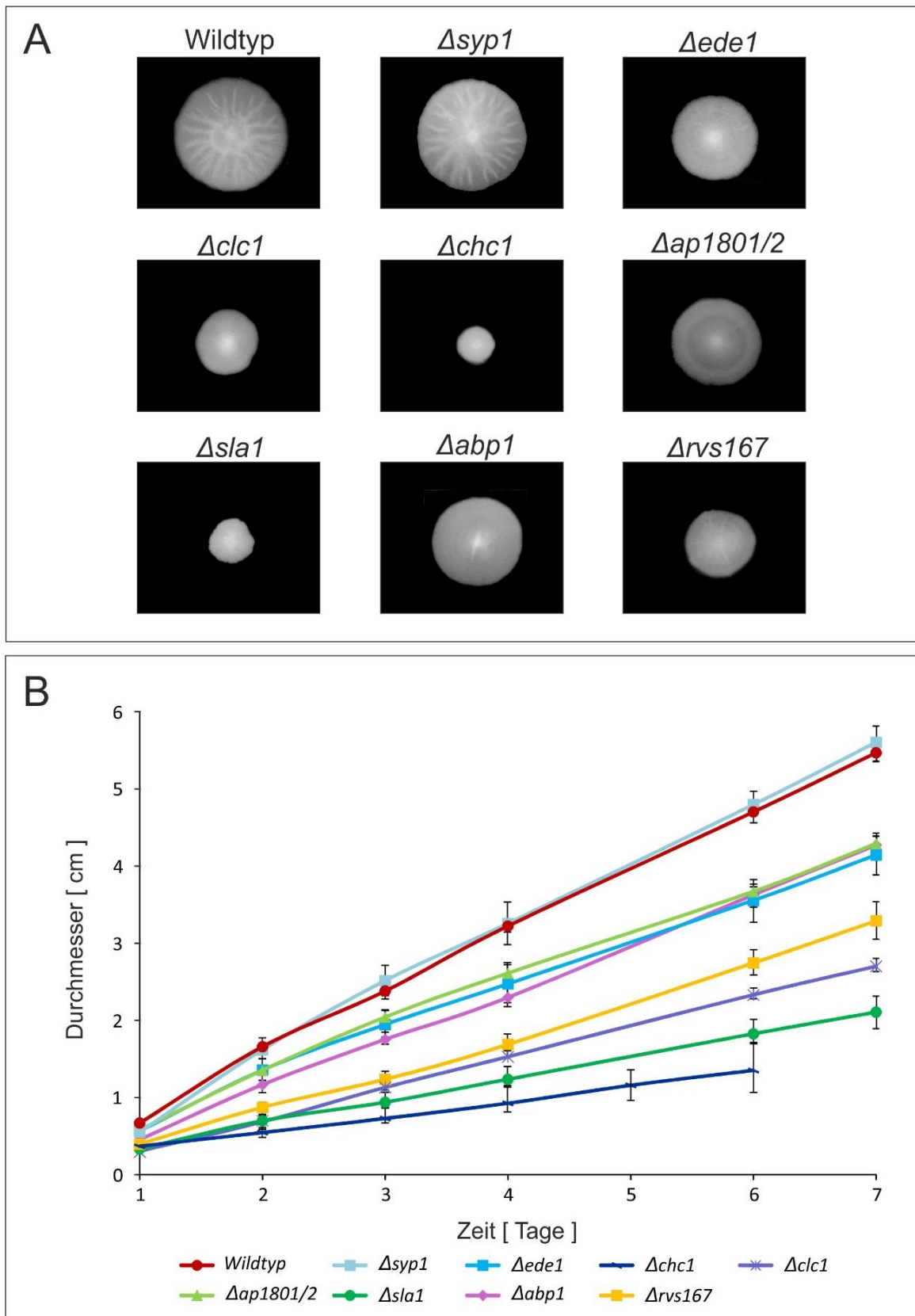
### 3.1.2 Deletion endozytischer Komponenten

In den vorherigen Untersuchungen wurden Komponenten des endozytischen Prozesses mit Fluoreszenzproteinen markiert und mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Die Ergebnisse spiegeln das Verhalten der Proteine im Wildtyp wider. Dynamik und Lokalisierung der Fluoreszenzsignale geben Aufschluss darüber, ob die untersuchten Proteine an der Endozytose in *A. gossypii* beteiligt sind. Eine Aussage über die Relevanz einzelner Proteine für den Gesamtprozess kann anhand dieser Studien allerdings nicht getroffen werden. Ebenso blieb bisher unklar, inwiefern Störungen in der Endozytose das Wachstumsverhalten der Hyphen beeinflussen. Um diesen Fragen nachzugehen, wurden Stämme mit Deletionen einzelner endozytischer Komponenten hergestellt. Zur Herstellung der Deletionsmutanten wurde die Methode des „PCR-based gene targeting“ angewandt (Wendland et al., 2000).

Die zur Deletion ausgewählten Gene entsprechen größtenteils den in Kapitel 3.1.1 untersuchten Proteinen. Zusätzlich wurde *SYP1* deletiert, welches den Kenntnissen aus *S. cerevisiae* zufolge, der frühen Phase der Endozytose zugeordnet wird. Die Deletion von *Myo3/5* wurde bereits in einer vorangegangenen Arbeit untersucht (Helfer, 2001) und entfiel daher in dieser Studie. Die Deletion von *LAS17* war letal, wodurch keine Untersuchungen zum Phänotyp durchgeführt werden konnten.

#### 3.1.2.1 Makroskopische Untersuchung des Wachstums der Deletionsmutanten

Zunächst wurden die Phänotypen der Deletionsmutanten makroskopisch untersucht. Hierzu wurde die Wachstumsgeschwindigkeit der Stämme anhand des Kolonie-Durchmessers auf Agar-Platten ermittelt. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Abbildung 18 dargestellt. Die Wachstumsgeschwindigkeiten wurden mit Hilfe des Koloniedurchmessers des sechsten Inkubationstags berechnet. Der Wildtyp erreichte nach sechs Tagen einen Durchmesser von etwa 4,7 cm. Die Wachstumsgeschwindigkeit betrug hier im Mittel ca. 165  $\mu\text{m}/\text{h}$ . Mit Ausnahme von  $\Delta\text{syp1}$  wiesen alle Deletionsmutanten eine verringerte Wachstumsgeschwindigkeit auf. Mit einem mittleren Koloniedurchmesser von ca. 3,6 cm konnte bei den Stämmen  $\Delta\text{ap1801/2}$ ,  $\Delta\text{abp1}$  und  $\Delta\text{ede1}$  eine leichte Verringerung der Wachstumsgeschwindigkeit festgestellt werden (ca. 126  $\mu\text{m}/\text{h}$ ).

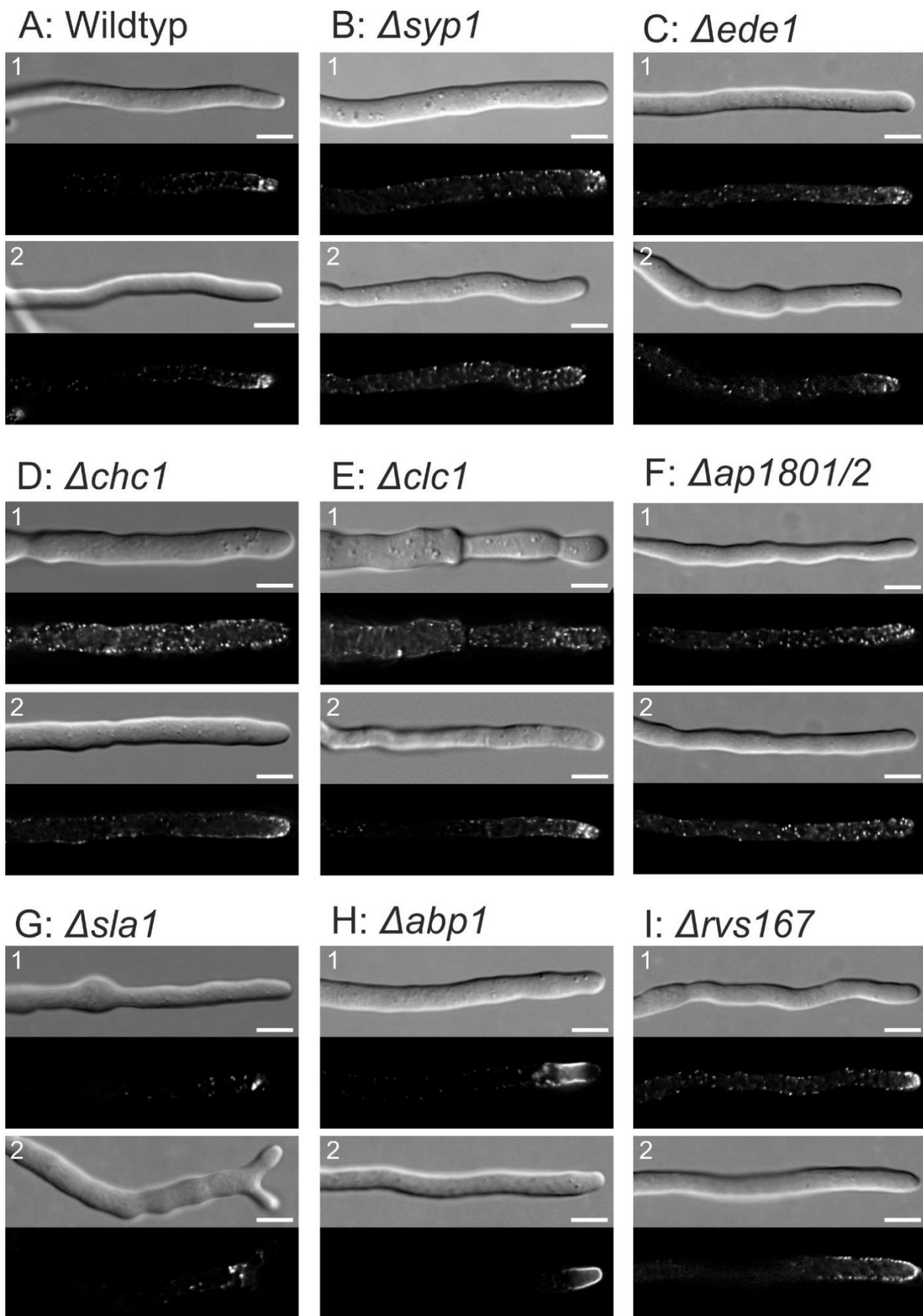


**Abbildung 18: Wachstum der Deletionsmutanten auf Agar-Platten.** Die Inkubation erfolgte auf Agar-Platten (Vollmedium) und wurde 7 Tage dokumentiert. **A:** Repräsentative Bilder der Deletionsstämmen und des Wildtyps nach 6 Tagen Wachstum. **B:** Koloniedurchmesser der Deletionsstämmen im Vergleich zum Wildtyp. Der Durchmesser wurde täglich dokumentiert. Jede Messung wurde 3-mal durchgeführt. Fehlerbalken kennzeichnen Unterschiede zwischen den einzelnen Messungen.

Bei  $\Delta rvs167$  zeigte sich, mit einem Koloniedurchmesser von ca. 2.7 cm und einer Wachstumsgeschwindigkeit von etwa 95  $\mu\text{m}/\text{h}$ , ein etwas stärkerer Wachstumsdefekt. Aus Abbildung 18 wird ersichtlich, dass die Deletionen der beiden Clathrin-Untereinheiten ein unterschiedliches Wachstumsverhalten hervorriefen, wobei der Phänotyp von  $\Delta chc1$  mit einer Wachstumsgeschwindigkeit von 47  $\mu\text{m}/\text{h}$  etwas stärker ausfiel, als bei  $\Delta clc1$  mit ca. 81  $\mu\text{m}/\text{h}$ . Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass Chc1 das strukturgebende Element des Clathrins ist, und ihm daher eine entscheidendere Funktion zukommt, als der kleinen Untereinheit Clc1, bei der eine regulatorische Funktion angenommen wird.  $\Delta sla1$  lag mit einer Wachstumsgeschwindigkeit von ca. 63  $\mu\text{m}/\text{h}$  zwischen den Werten der beiden Clathrin-Untereinheiten.

#### 3.1.2.2 Mikroskopische Analyse des Hyphenwachstum in den Deletionsmutanten

Im nächsten Schritt wurde der Einfluss der Deletionen auf die Morphologie der Hyphen genauer analysiert. Einzelne Hyphen wurden hierzu mikroskopisch untersucht. Zusätzlich zu den Hellfeld-Aufnahmen wurden die Aktin-Patches mit Hilfe von Rhodamin-Phalloidin angefärbt (vgl. Kapitel 2.4.4). In *A. gossypii*, wie auch in anderen Pilzen akkumulieren Aktin-Patches in den Wachstumszonen der Zelle und weisen somit eine polare Verteilung in der Zelle auf (Araujo-Bazán et al., 2008; Marks et al., 1986; Pruyne und Bretscher, 2000; Smith et al., 2001, 1986; Wendland und Philippsen, 2001). Es konnte gezeigt werden, dass ein Verlust der Zellpolarität häufig mit dem Verlust der polaren Verteilung der Aktin-Patches korreliert (Ayscough et al., 1997; Knechtle et al., 2006; Schmitz et al., 2006). Da Aktin-Patches endozytische Ereignisse markieren, kann der Einfluss der Deletion einzelner endozytischer Komponenten auf den Gesamtprozess mit Hilfe dieser Färbung visualisiert werden. Der Vergleich mit den dazugehörigen Hellfeldbildern gibt zudem Aufschluss über den Zusammenhang zwischen Endozytose und polarem Wachstum. In Abbildung 19 sind Aufnahmen einzelner Hyphen und die dazugehörigen Aktin-Färbungen dargestellt. Es wurden jeweils zwei repräsentative Beispiele der Deletionsmutanten (Abbildung 19B-I) und des Wildtyps (Abbildung 19A) ausgewählt.



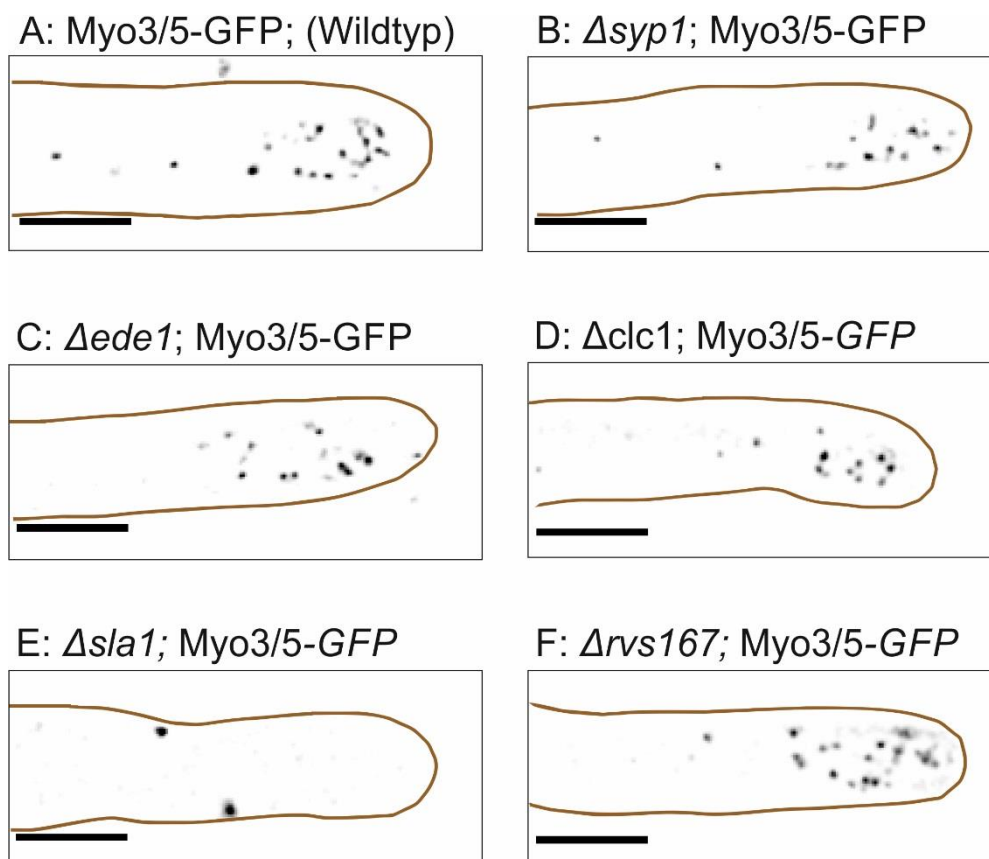
**Abbildung 19: Einfluss der Deletion endozytischer Komponenten auf die Hyphenmorphologie.** Für jeden Stamm sind zwei repräsentative Hellfeldaufnahmen und die dazugehörige Aktin-Färbung dargestellt. Das Myzel wurde für die Rhodamin-Phalloidin-Färbung fixiert. Maßstab: 10 µm.

Wie sich bereits in Kapitel 3.1.2.1 zeigte, haben die einzelnen Deletionen unterschiedlich starke Auswirkungen auf die Wachstumsgeschwindigkeit der Stämme. Die Phänotypen äußerten sich zudem häufig nur in einem Teil der Hyphen. So zeigte sich zum Beispiel in den Stämmen *Δsyp1*, *Δede1* und *Δap1801/2* eine überwiegend normale Verteilung der Aktin-Patches (Abbildung 19, B-1, C, F-1). In einem Teil der Hyphen konnte allerdings eine leichte Depolarisierung der Aktin-Patches festgestellt werden (Abbildung 19, B-2, F-2). Wie aus den Hellfeldbildern ersichtlich wird wiesen diese drei Stämme teilweise leichte Unregelmäßigkeiten in der Hyphenmorphologie auf (Abbildung 19, B-2, C-2, F). In den Stämmen *Δsla1*, *Δabp1*, und *Δrvs167* waren die beobachteten Phänotypen ausgeprägter. Der Stamm *Δsla1* zeigte hinsichtlich der Aktin-Verteilung die stärkste Abweichung vom Wildtyp. Hier bildeten sich nur sehr wenig Aktin-Patches, die darüber hinaus in größeren Strukturen akkumulierten (Abbildung 19, G). Das Hyphenwachstum war in diesem Stamm ebenfalls stark beeinträchtigt, was durch die Verdickungen entlang Hyphen sichtbar wird. Diese deuten auf einen zeitweiligen Verlust der Polarität der Hyphen hin. In dem Stamm *Δabp1* zeigte sich eine starke Akkumulation von Aktin am Zellkortex. Der Bereich der Aktin-Anreicherung befand sich häufig kurz hinter der Hyphenspitze (Abbildung 19, H-1), war aber teilweise auch direkt an der Spitze lokalisiert (H-2). Die Fluoreszenzsignale in diesen Bereichen waren sehr stark, sodass Signale aus den hinteren Bereichen der Hyphen größtenteils überdeckt wurden und dadurch auf den Bildern nicht sichtbar sind. Die Akkumulation von Aktin am Zellkortex könnte auf einen Defekt bei der Einstülpung oder Abschnürung der Membran während der Endozytose zurückzuführen sein. Die Hyphenmorphologie scheint dadurch aber kaum beeinflusst zu werden. In *Δrvs167* zeigten einige Hyphen eine dem Wildtyp entsprechende Lokalisierung der Aktin-Patches (Abbildung 19, I-1). Der überwiegende Anteil der Hyphen wies allerdings eine Ausdehnung des Aktin-Bereiches entlang des Zellkortex auf. Bei den Deletionsmutanten der Clathrin-Untereinheiten (*Δchc1* und *Δclc1*) konnten ebenfalls starke Abweichungen vom Wildtyp beobachtet werden, wobei sich die Phänotypen der beiden Deletionsstämmen sehr ähnelten. Viele der Hyphen zeigten deutliche Verdickungen entlang der Längsachse. In diesen Hyphen waren die Aktin-Patches gleichmäßig über die Hyphe verteilt, was auf einen Verlust der Polarität hindeutet (Abbildung 19, D-1, E-1). In einigen Hyphen konnte das polare Wachstum aber zumindest über einen gewissen Zeitraum aufrechterhalten werden. In diesen Hyphen waren die Aktin-Patches wie im Wildtyp an der Hyphenspitze lokalisiert (Abbildung 19, D-2, E-2). Neben der verringerten Wachstumsgeschwindigkeit (vgl. Abbildung 18) wiesen die Deletionsstämmen auch Veränderungen in der Hyphenmorphologie auf. Diese waren wie die

Wachstumsdefekte unterschiedlich stark ausgeprägt. Mit Ausnahme von *Ede1* konnte bei den Deletionsmutanten auch eine Veränderung in der Verteilung der Aktin-Patches festgestellt werden. Diese äußerte sich in den Stämmen  $\Delta syp1$ ,  $\Delta ap1801/2$ ,  $\Delta chc1$  und  $\Delta clc1$  durch eine Depolarisierung der Aktin-Patches.

### 3.1.2.3 Quantitative Analysen der endozytischen Ereignisse in den Deletionsstämmen

Die im vorherigen Kapitel durchgeführte Färbung der Aktin-Patches deutete bereits darauf hin, dass der endozytische Prozess in einigen Deletionsmutanten beeinträchtigt ist. Im nächsten Schritt wurden die Auswirkungen einzelner Deletionen auf die Dynamik und die Lokalisierung endozytischer Ereignisse quantitativ ausgewertet. Dazu wurden die Myo3/5-GFP-Signale in den Deletionsstämmen  $\Delta syp1$ ,  $\Delta ede1$ ,  $\Delta clc1$ ,  $\Delta sla1$  und  $\Delta rvs167$  beobachtet. In Abbildung 20 sind repräsentative Beispiele der mittels TIRF-Mikroskopie detektierten Myo3/5-GFP-Signale in den fünf Deletionsmutanten im Vergleich zum Wildtyp dargestellt.



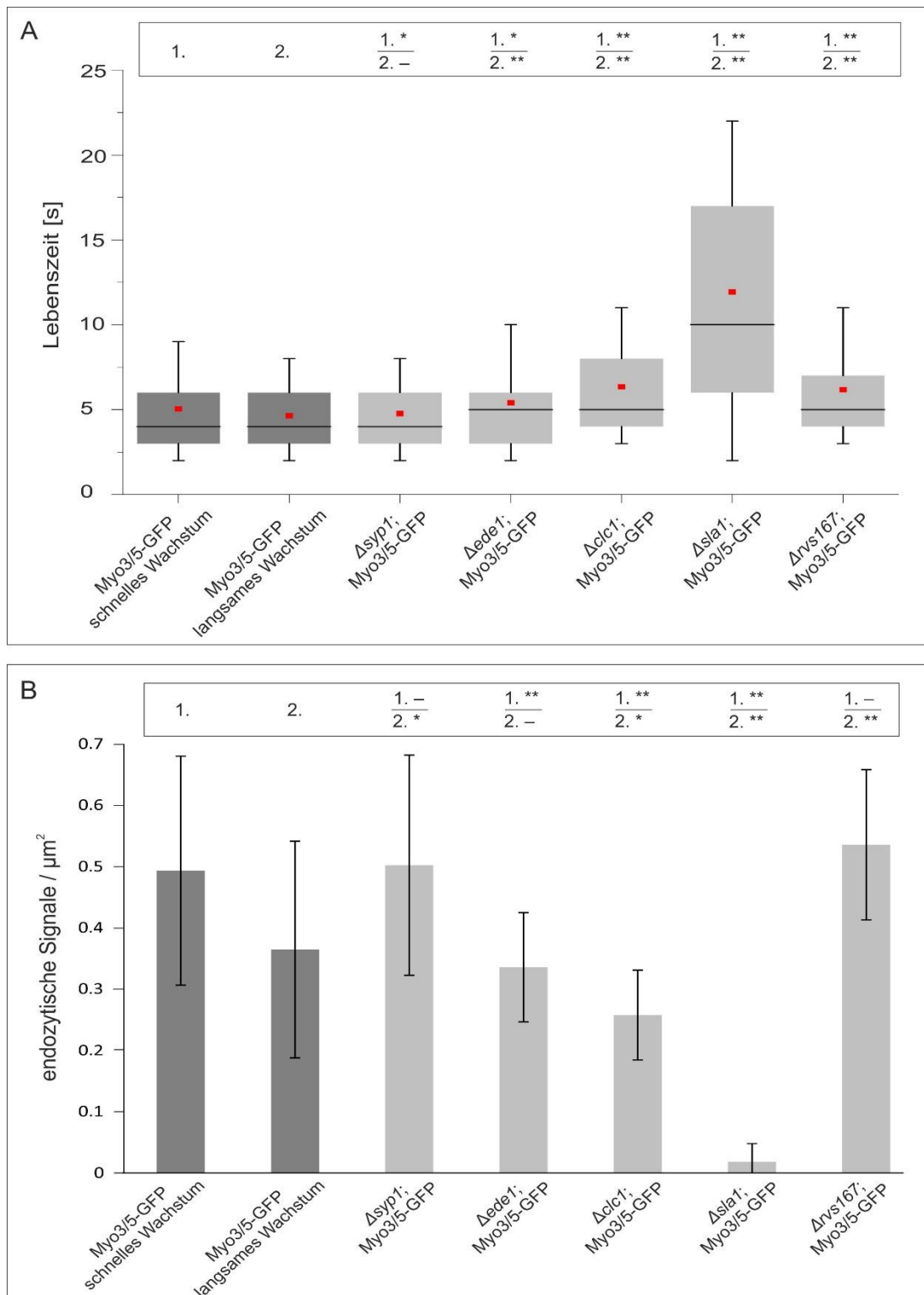
**Abbildung 20: Repräsentative Beispiele der TIRF-Mikroskopie der Myo3/5-GFP-Signale in den fünf Deletionsstämmen im Vergleich zum Wildtyp.** Die Fokusebene liegt auf dem Zellkortex. Die braunen Linien geben die aus den dazugehörigen Hellfeld-Bildern ermittelte Umrandung der Hyphen an. **A:** Myo3/5-Signale im Wildtyp bei schnellem Wachstum. **B-F:** Myo3/5-Signale in den Deletionsstämmen bei der jeweiligen maximalen Wachstumsgeschwindigkeit der Stämme. Maßstab: 5  $\mu\text{m}$ .

Für jeden Deletionsstamm wurden die Signale aus zehn Hyphen ausgewertet. Die Analyse erfolgte analog zu den in Kapitel 3.1.1.1 besprochenen Untersuchungen. Die Präparation der Proben wurde wie in Kapitel 2.4.1, für die Aufnahmen während der schnellen Wachstumsphase, vorgenommen. Aufgrund der Wachstumsdefekte wiesen die Deletionsstämme während der Aufnahmen allerdings unterschiedliche Wachstumsgeschwindigkeiten auf. In *Δsyp1* und *Δede1* wurden durchschnittliche Wachstumsgeschwindigkeiten von 80 bzw. 72 μm/h gemessen. Die Werte liegen somit an der Grenze zum Übergang in die schnelle Wachstumsphase. Die Stämme *Δclc1*, *Δsla1* und *Δrvs167* waren mit durchschnittlichen Wachstumsgeschwindigkeiten von 34, 28 und 52 μm/h mit der langsamen Wachstumsphase im Wildtyp zu vergleichen

Für den Stamm *Δsla1* wird aus dem Beispielbild bereits eine deutliche Abweichung zum Wildtyp ersichtlich. Hier sind nur zwei Signale im gesamten Bildausschnitt zu erkennen, die zudem in einer deutlich höheren Entfernung zur Hyphenspitze lokalisiert sind. Die Myo3/5-Signale in diesem Stamm wiesen eine hohe Protein-Dichte auf, was durch die Helligkeit des Signals erkenntlich wurde. Des Weiteren schien der Durchmesser der Signale etwas größer zu sein, als beim Wildtyp. Dieses Ergebnis deckt sich mit den Beobachtungen aus der Aktin-Färbung. Bei den anderen Deletionen werden mögliche Unterschiede zum Wildtyp durch die Betrachtung der Beispielbilder nicht ersichtlich. Die Myo3/5-GFP-Signale in den Deletionsstämmen wurden daher entsprechend der Analysen in Kapitel 3.1.1.1 hinsichtlich der Lebenszeit, der Anzahl und der Lokalisierung quantitativ analysiert. In Abbildung 21 sind die Ergebnisse zur Lebenszeit und Anzahl der Myo3/5-Signale in den Deletionsmutanten dargestellt. Die erhaltenen Werte wurden mit den Werten des Wildtyps aus beiden Wachstumsphasen verglichen. Signifikante Abweichungen von diesen Werten sind in der Graphik gekennzeichnet (\* =  $p < 0,01$ , \*\* =  $p < 0,001$ ). Für den Wildtyp wurden Lebenszeiten von 5,0 s (schnelles Wachstum) bzw. 4,6 s (langsames Wachstum) gemessen (vgl. Kapitel 3.1.1.1.1). Hinsichtlich der Dynamik der Myo3/5-Signale zeigten sich beim Stamm *Δsla1* die stärksten Abweichungen vom Wildtyp. Die Lebenszeit der Signale war mit einem Mittelwert von 11,9 s deutlich erhöht (Abbildung 21A). Bei den Stämmen *Δclc1* und *Δrvs167* ist mit Mittelwerten von 6,3 s bzw. 6,2 s eine Verlängerung der Lebenszeit ebenfalls klar erkenntlich, fiel aber wesentlich geringer aus, als bei *Δsla1*. Die Mutante *Δede1* zeigte mit einem Mittelwert von 5,4 s noch eine leichte aber signifikante Verlängerung der Lebenszeit der Myo3/5-Signale. Der für *Δsyp1* erhaltene Wert lag mit 4,8 s zwischen den beiden für den Wildtyp erhaltenen Mittelwerten. Da die durchschnittliche Wachstumsgeschwindigkeit der für die Analysen

### 3 Ergebnisse

untersuchten Hyphen im Stamm  $\Delta syp1$  mit  $80 \mu\text{m}/\text{h}$  an der Grenze zwischen langsamer und schneller Wachstumsphase lag, entspricht die Dynamik der Myo3/5-Signale dem Wildtyp.



**Abbildung 21 : A: Lebenszeiten der Myo3/5-GFP-Signale in den Deletionsmutanten im Vergleich zum Wildtyp.** Ergebnisse sind als Box-Plot dargestellt. Die Boxen geben die Länge des Interquartilabstands an und beinhalten somit die mittleren 50% der Messwerte. Die Whisker geben das 10%- bzw. 90%-Quantil an und umfassen die mittleren 80% der Messwerte. Die Länge der Box und Whisker gibt die Varianz innerhalb einer Messreihe wieder. Rote



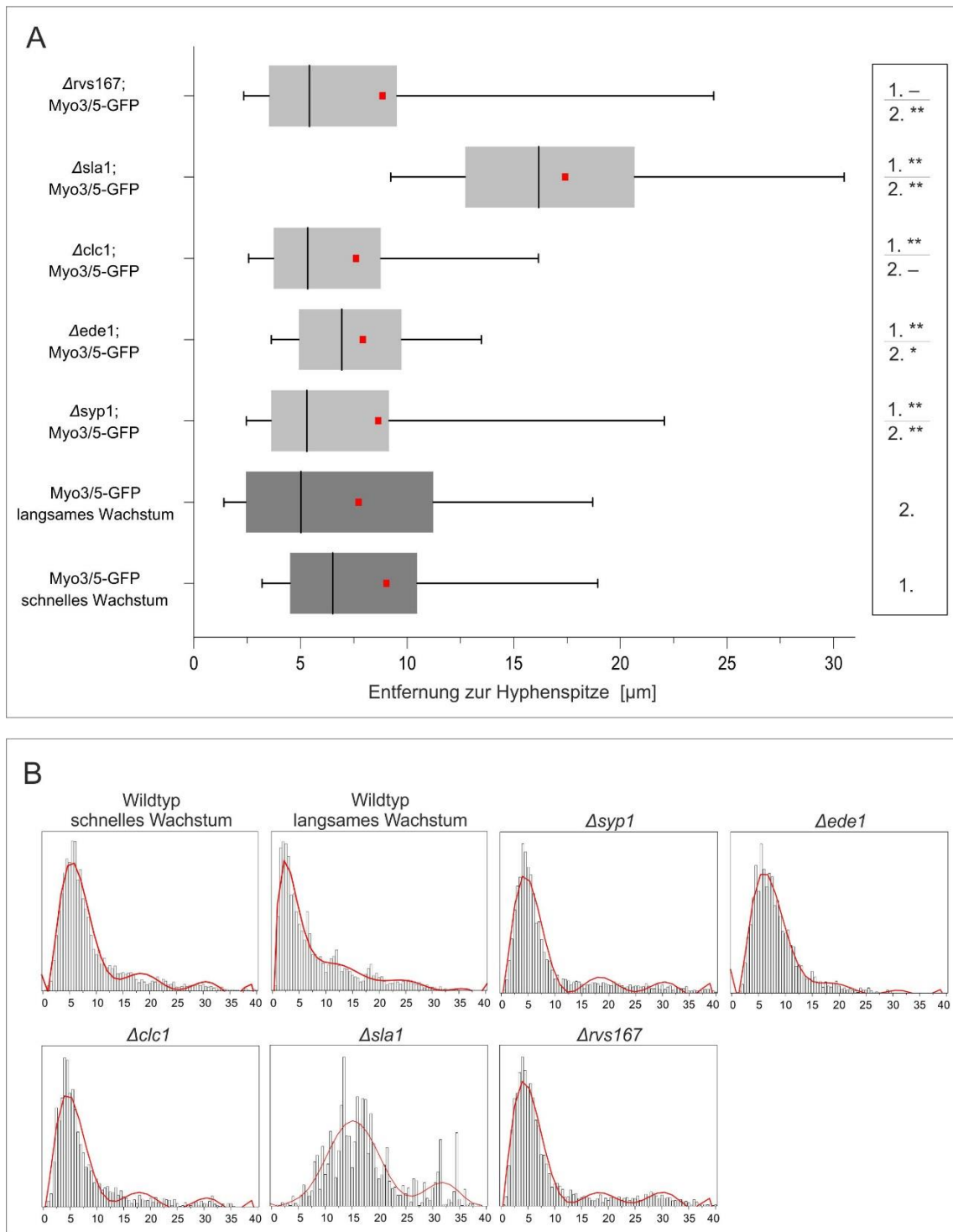
Quadrate kennzeichnen den Mittelwert, die schwarzen Linien geben den Median an. Sternchen (\*) markieren signifikante Unterschiede zum Wildtyp bei schnellem (1.) bzw. langsamem (2.) Wachstum (\*:  $p < 0,01$ ; \*\*:  $p < 0,001$ ). **B: Anzahl der Myo3/5-GFP-Signale in den Deletionsmutanten im Vergleich zum Wildtyp.** Pro Messreihe wurden die Fluoreszenzbilder zu den Zeitpunkten 0 s, 30 s und 60 s von 10 Zeitrafferaufnahmen ausgewertet. Eine Messreihe gibt somit die Mittelwerte aus 30 Einzelbildern an. Es wurden nur die ersten 10  $\mu\text{m}$  der Hyphenspitzen ausgezählt. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichungen der Messreihen wieder. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die Anzahl der Signale pro 1  $\mu\text{m}^2$  angegeben. Sternchen (\*) markieren signifikante Unterschiede zum Wildtyp bei schnellem (1.) bzw. langsamem (2.) Wachstum (\*:  $p < 0,01$ ; \*\*:  $p < 0,001$ ).

Auch bei der Anzahl der Myo3/5-Signale zeigte  *$\Delta sla1$*  eine starke Diskrepanz zu den Wildtyp-Werten (Abbildung 21B). So war die Anzahl der Signale mit einem Durchschnittswert von 0,02 Signalen pro  $\mu\text{m}^2$  drastisch reduziert. Für den Stamm  *$\Delta clc1$*  konnte mit 0,26 Signalen pro  $\mu\text{m}^2$  ebenfalls eine leichte, aber signifikante Verringerung in der Signalanzahl festgestellt werden. Die für  *$\Delta syp1$*  und  *$\Delta rvs167$*  erhaltenen Werte (0,50 und 0,54 Signalen pro  $\mu\text{m}^2$ ) wiesen keinen signifikanten Unterschied zu den Wildtyp-Werten bei schnellem Wachstum auf. Die Signalanzahl von  *$\Delta dede1$*  (0,34 Signalen pro  $\mu\text{m}^2$ ) ähnelte dagegen dem Wildtyp während des langsamen Wachstums.

Wie bereits bei der Lebenszeit und der Signalanzahl zeigte  *$\Delta sla1$*  auch bei der Position der Myo3/5-Signale die stärkste Abweichung vom Wildtyp (Abbildung 22). Die Entfernung der Signale zur Hyphenspitze betrug im Mittel bei 17,4  $\mu\text{m}$ . Im Vergleich zum Mittelwert des Wildtyps bei schnellem Wachstum ergab dies eine Verschiebung um etwa 8,4  $\mu\text{m}$  in den hinteren Bereich der Hyphe. Durch das Histogramm wird zudem die relativ hohe Streuung der Signale entlang der Längsachse ersichtlich.

Die Deletionsmutanten  *$\Delta syp1$* ,  *$\Delta dede1$* ,  *$\Delta clc1$*  und  *$\Delta rvs167$*  wiesen dagegen keine wesentlichen Unterschiede zum Wildtyp auf. Die Position der Signale im Stamm  *$\Delta rvs167$*  zeigte eine hohe Übereinstimmung mit der schnellen Wachstumsphase, während die Werte von  *$\Delta clc1$*  denen der langsamen Wachstumsphase entsprachen. Die Werte der Stämme  *$\Delta syp1$*  und  *$\Delta dede1$*  konnten keiner der beiden Wachstumsphasen zugeordnet werden, sondern lagen zwischen den Wildtyp-Werten für schnelles und langsames Wachstum.

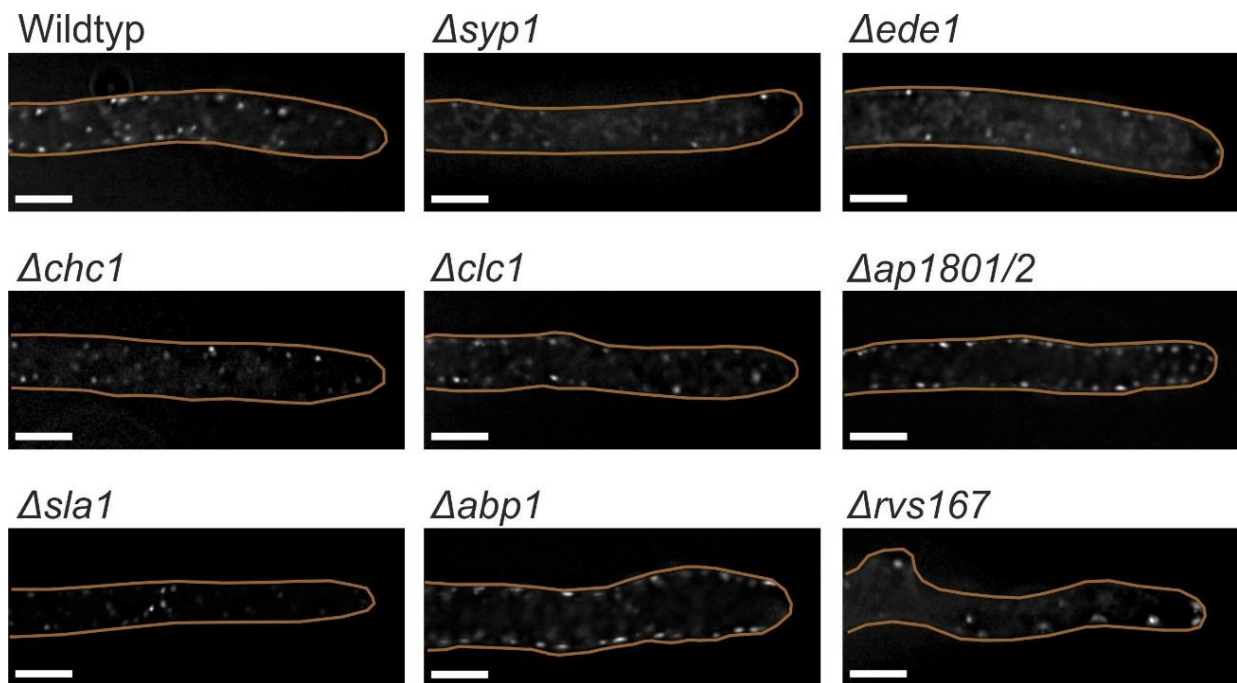
### 3 Ergebnisse



**Abbildung 22: Position der Myo3/5-GFP-Signale in den Deletionsmutanten im Vergleich zum Wildtyp.** **A:** Die Ergebnisse der einzelnen Messungen wurden mittels Box-Plot dargestellt. Die x-Achse gibt die Entfernung zur Hyphenspitze an. Die Boxen geben die Länge des Interquartilabstands an und beinhalten somit die mittleren 50% der Messwerte. Die Whisker geben das 10%- bzw. 90%-Quantil an und umfassen die mittleren 80% der Messwerte. Die Länge der Box und Whisker gibt die Varianz innerhalb einer Messreihe wieder. Rote Quadrate kennzeichnen den Mittelwert, die schwarzen Linien geben den Median an. Sternchen (\*) markieren signifikante Unterschiede zum Wildtyp bei schnellem (1.) bzw. langsamem (2.) Wachstum (\*:  $p < 0,01$ ; \*\*:  $p < 0,001$ ). **B:** Histogramme zur Position der Myo3/5-GFP-Signale in den vorderen 40  $\mu\text{m}$  der Hyphenspitze. Die Intervalllänge zwischen den in Gruppen zusammengefassten Werten beträgt 0,5  $\mu\text{m}$  (Breite der Balken). Die x-Achse gibt die Entfernung von der Hyphenspitze in  $\mu\text{m}$  an. Die y-Achse gibt die relative Häufigkeit der Signale an. Die rote Linie zeigt die polynomische Anpassung der Messwerte (polynomische Anpassung 9. Grades).

## 3.1.2.4 Lipidaufnahme in den Deletionsmutanten

Um mögliche Störungen oder Verzögerungen im endozytischen Prozess zu erkennen, wurde die Aufnahme des Lipidfärbemittels FM4-64 in den Deletionsmutanten überprüft (Abbildung 23).



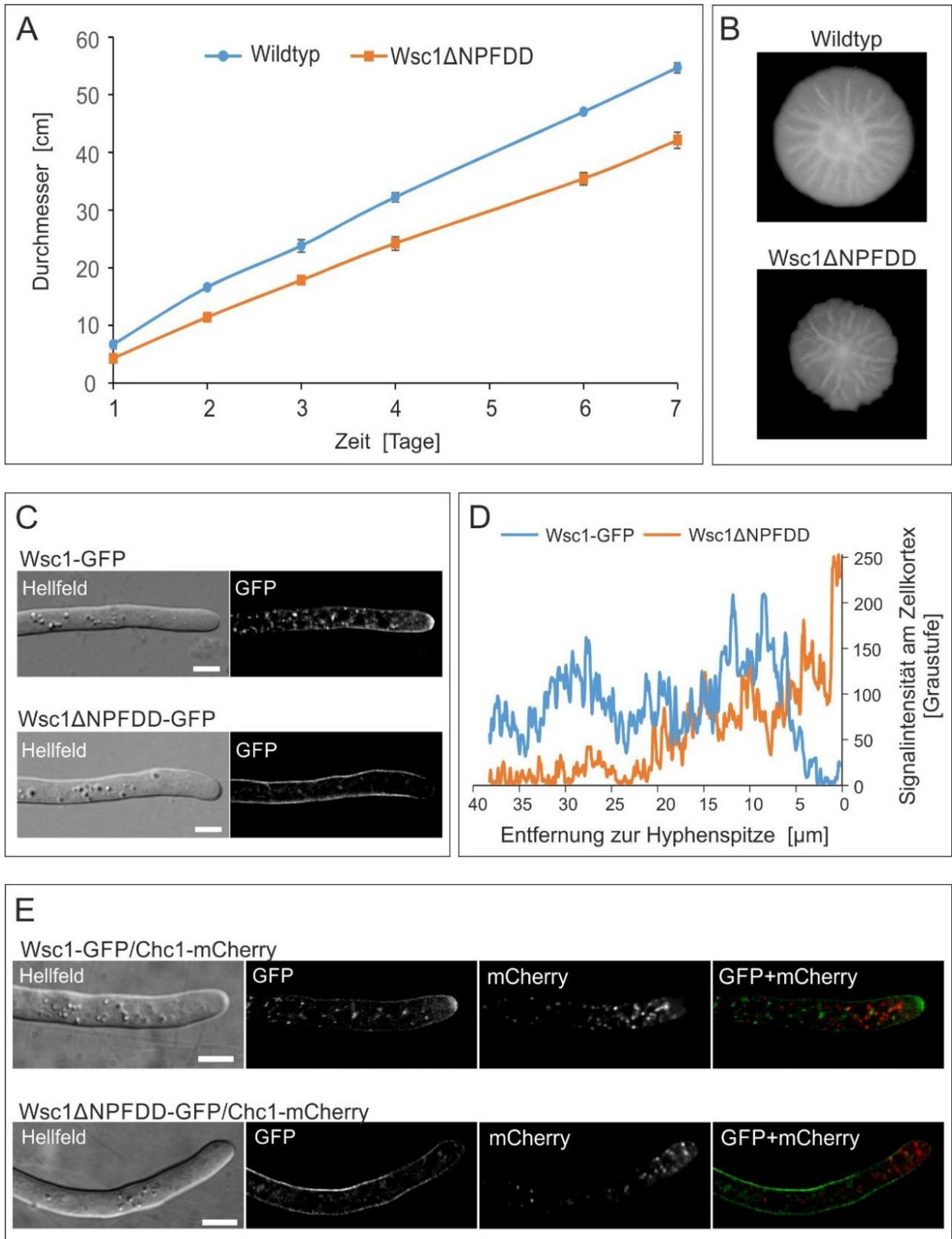
**Abbildung 23: Aufnahme des Lipidfarbstoffes FM4-64 in den Deletionsstämmen im Vergleich zum Wildtyp.** Frisches Myzel der Stämme wurde für eine Minute mit FM4-64 inkubiert, zweimal mit eiskaltem Medium gewaschen und anschließend direkt mikroskopiert. Die Zeit zwischen dem ersten Waschschrift und den Aufnahmen betrug ca. 4-7 Minuten. Die braunen Linien kennzeichnen den Hyphenumriss. Maßstab: 5  $\mu$ m.

Bei dieser Untersuchung konnten keine signifikanten Unterschiede zum Wildtyp festgestellt werden. Dies könnte aber auf die Präparationsmethode zurückzuführen sein. Da die Aufnahme des Farbstoffs innerhalb weniger Sekunden geschieht, müsste die Aufnahme ab dem Zeitpunkt der FM4-64-Zugabe dokumentiert werden. Durch die Notwendigkeit mehrerer Waschschriffe und die gegebene Mikroskoptechnik konnte dies allerdings nicht gewährleistet werden. Mögliche Unterschiede in den ersten 30 bis 60 Sekunden nach Zugabe des Farbstoffes konnten daher nicht detektiert werden. Die Aufnahmetests zeigten aber, dass die Internalisierung der Plasmamembran-Lipide insgesamt kaum beeinträchtigt war. In allen Deletionsstämmen konnte der Farbstoff bereits nach drei bis sechs Minuten an zellinternen Strukturen detektiert werden. Unterschiede in der Anzahl und Intensität der Signale könnten auf die Versuchsmethodik zurückzuführen sein.

### 3.1.3 Signalabhängige Internalisierung von Wsc1 in *A. gossypii*

In *S. cerevisiae* wird der Zellwandstress-Sensor Wsc1 mittels Clathrin-abhängiger Endozytose internalisiert. Die Aminosäuresequenz NPFDD (N=Asparagin, P=Prolin, F=Phenylalanin, D=Aspartat) dient dabei als Signalsequenz. Diese bindet an Sla1 woraufhin die Internalisierung des Rezeptors erfolgt (Piao et al., 2007). Die konstante Internalisierung des Rezeptors außerhalb der Wachstumszonen führt zu einer polarisierten Lokalisierung von Wsc1 an den wachsenden Knospen und am Knospenhals. Bei einer Deletion der Signalsequenz NPFDD wird der Sensor nicht mehr endozytiert und verteilt sich gleichmäßig in der gesamten Zellwand (Piao et al., 2007; Straede und Heinisch, 2007; Wilk et al., 2010). *A. gossypii* besitzt ein Homologes zu Wsc1 aus *S. cerevisiae*, das ebenfalls die Signalsequenz NPFDD enthält. Bisher war allerdings unklar ob die Endozytose von Rezeptoren in *A. gossypii* ebenfalls durch spezifische Signalsequenzen vermittelt wird. Dies sollte im nächsten Schritt anhand des Zellwandstress-Sensors Wsc1 untersucht werden (Abbildung 24). Hierzu wurde ein Stamm hergestellt, in dem die Signalsequenz NPFDD im Wsc1 deletiert wurde (Wsc1 $\Delta$ <sub>334-338</sub>, wird im Folgenden als Wsc1 $\Delta$ NPFDD bezeichnet). Um die Lokalisierung des mutierten Wsc1 im Vergleich zum Wildtyp-Wsc1 zu verfolgen, wurden darüber hinaus Stämme hergestellt, in denen Wsc1 bzw. Wsc1 $\Delta$ NPFDD mit dem Fluoreszenzprotein GFP fusioniert wurde.

Wie in Abbildung 24A und B zu erkennen ist, zeigte der Stamm mit dem mutierten Wsc1 einen klaren Wachstumsdefekt. Die Wachstumsgeschwindigkeit auf Agar-Platten war ca. 25% niedriger als beim Wildtyp. Die Lokalisierung des mutierten Wsc1 wies deutliche Unterschiede zum Wildtyp auf (Abbildung 24C und D). Im Wildtyp konnte eine Häufung an Signalen im Bereich der Hyphenspitze festgestellt werden. Die Signalintensität im Zellkortex ließ mit weiterer Entfernung zur Spitze deutlich nach. Außerhalb der Wachstumszone an der Hyphenspitze wird Wsc1 demnach durch Endozytose vom Zellkortex entfernt. Im hinteren Bereich der Hyphe lassen sich größere punktförmige Wsc1-GFP-Signale erkennen. Diese könnten von zellinternen Strukturen stammen, in denen Wsc1 nach der Internalisierung abgebaut oder recycelt wird. Im Gegensatz zum Wildtyp-Wsc1 wird der Sensor ohne die Signalsequenz NPFDD nicht endozytiert und verteilt sich relativ gleichmäßig in der Zellwand der gesamten Hyphe. Im Vergleich zum „Wildtyp“ wurde allerdings nur sehr wenig Fluoreszenz in der Hyphenspitze detektiert (vgl. Abbildung 24D).



**Abbildung 24: Untersuchungen zur signalabhängigen Endozytose von Wsc1.** **A,B:** Wachstumsgeschwindigkeit des Stammes Wsc1ΔNPFDD im Vergleich zum Wildtyp. Die Inkubation erfolgte auf Agar-Platten (Vollmedium) und wurde 7 Tage dokumentiert. **A:** Koloniedurchmesser der Stämme wurde täglich dokumentiert. Jede Messung wurde 3-mal durchgeführt. Fehlerbalken kennzeichnen Unterschiede zwischen den einzelnen Messungen. **B:** Myzel des Stammes Wsc1ΔNPFDD und des Wildtyps nach 6 Tagen Wachstum. **C,D:** Lokalisierung von Wsc1-GFP und Wsc1 ΔNPFDD-GFP. **C:** Repräsentative Aufnahmen der Lokalisierung von Wsc1-GFP und Wsc1 ΔNPFDD-GFP und dazugehörige

### 3 Ergebnisse

---

Hellfeldbilder. Maßstab: 10  $\mu\text{m}$ . **D**: Signalintensität von Wsc1-GFP und Wsc1  $\Delta\text{NPFDD}$ -GFP am Zellkortex der Hyphen. Die x-Achse gibt die Entfernung zur Hyphenspitze an. Die Signalintensität wurde anhand der Graustufen mit Hilfe der MetaMorph-Software ermittelt. **E**: Untersuchungen zur Kolo­kalisierung von Wsc1-GFP und Wsc1  $\Delta\text{NPFDD}$ -GFP mit Chc1-mCherry. Die Aufnahmen in den beiden Fluoreszenzkanälen erfolgte im Abstand von 1 s. Maßstab: 10  $\mu\text{m}$ .

Die Untersuchung zur Kolo­kalisierung von Wsc1-GFP bzw. Wsc1 $\Delta\text{NPFDD}$ -GFP mit Chc1-mCherry zeigte keine erkennbaren Unterschiede zwischen den beiden Stämmen (vgl. Abbildung 24E). Weder bei Wsc1-GFP noch bei Wsc1 $\Delta\text{NPFDD}$ -GFP konnte eine Kolo­kalisierung mit den Clathrin-Signalen beobachtet werden. Die Clathrin-Signale im Stamm Wsc1 $\Delta\text{NPFDD}$ -GFP scheinen etwas näher an der Hyphenspitze positioniert zu sein, dies ist allerdings vermutlich mit der verminderten Wachstumsgeschwindigkeit zu erklären. Insgesamt konnte durch die Untersuchungen gezeigt werden, dass auch in *A. gossypii* eine signalabhängige Endozytose stattfindet. Der Zellwandstress-Sensor Wsc1 ist, wie in *S. cerevisiae*, in der Wachstumszone lokalisiert und wird in lateralen Bereichen durch Endozytose aus der Zellwand entfernt. Während man davon ausgeht, dass Wsc1 in *S. cerevisiae* durch die Clathrin-abhängige Endozytose endozytiert wird (Piao et al., 2007; Wilk et al., 2010), scheint Clathrin für die Internalisierung von Wsc1 in *A. gossypii* keine Rolle zu spielen.

## 3.2 Untersuchungen zur Funktion von Clathrin in *Ashbya gossypii*

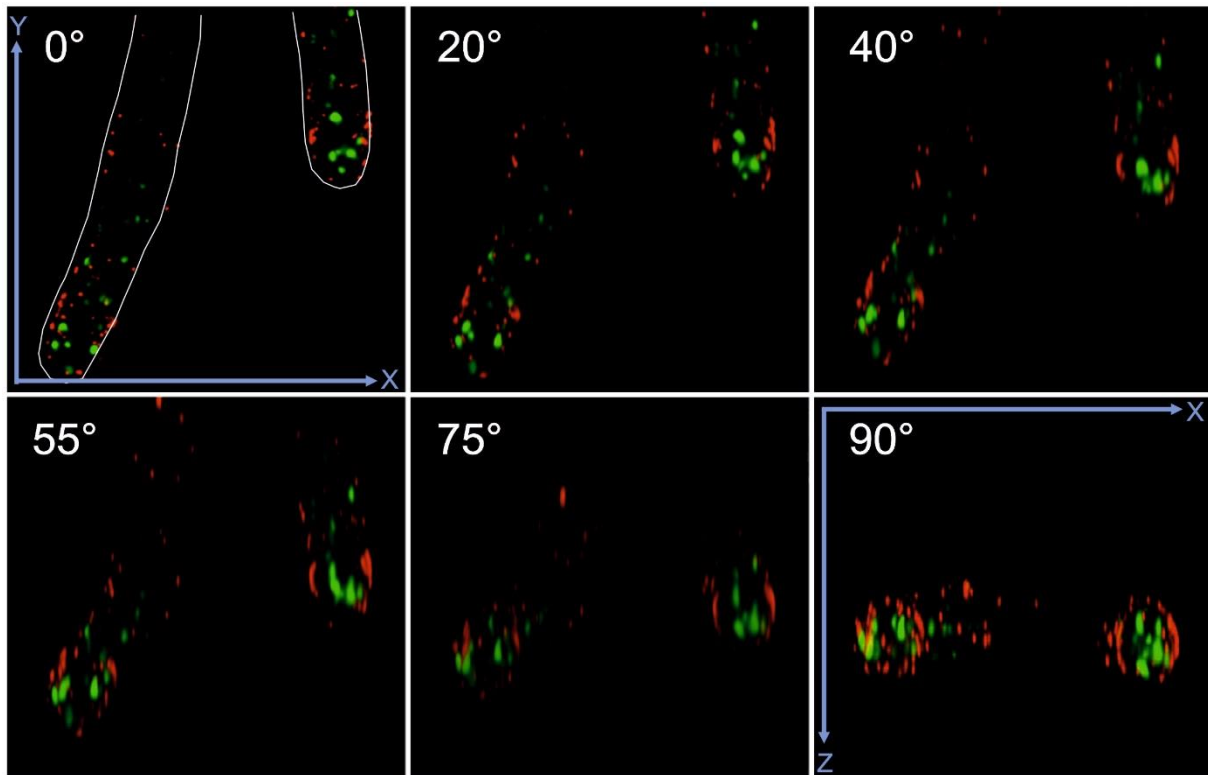
In *S. cerevisiae* ist Clathrin, ähnlich wie in Säugerzellen, an den Plasmamembraneinstülpungen am Zellkortex lokalisiert und bildet zusammen mit weiteren Proteinen einen Mantel während der Vesikelbildung (Kaksonen et al., 2005; Kukulski et al., 2012; Newpher und Lemmon, 2006; Newpher et al., 2005). Es konnte gezeigt werden, dass die Deletion von Clathrin zu einer 50%igen Reduktion der Aufnahme des  $\alpha$ -Faktors führte (Chu et al., 1996; Payne et al., 1988). Clathrin spielt demnach eine wichtige Rolle bei der Endozytose in Hefe, ist aber nicht essentiell.

Die in Kapitel 3.1 beschriebenen Ergebnisse zur Charakterisierung des endozytischen Prozesses in *A. gossypii* stellen die Funktion von Clathrin bei der Endozytose in *A. gossypii* infrage. Insbesondere die Abwesenheit von Clathrin-Signalen am Zellkortex und die fehlende Kolokalisierung mit anderen Komponenten des endozytischen Prozesses deuten darauf hin, dass Clathrin am endozytischen Prozess nicht beteiligt ist.

Der starke Wachstumsdefekt zeigte allerdings, dass es für das normale Hyphenwachstum eine wichtige Rolle spielt. Mit Hilfe der im folgenden Kapitel durchgeführten Untersuchungen soll die Funktion von Clathrin in *A. gossypii* genauer definiert und die Unterschiede zu *S. cerevisiae* herausgestellt werden.

### 3.2.1 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen der Clathrin-Strukturen

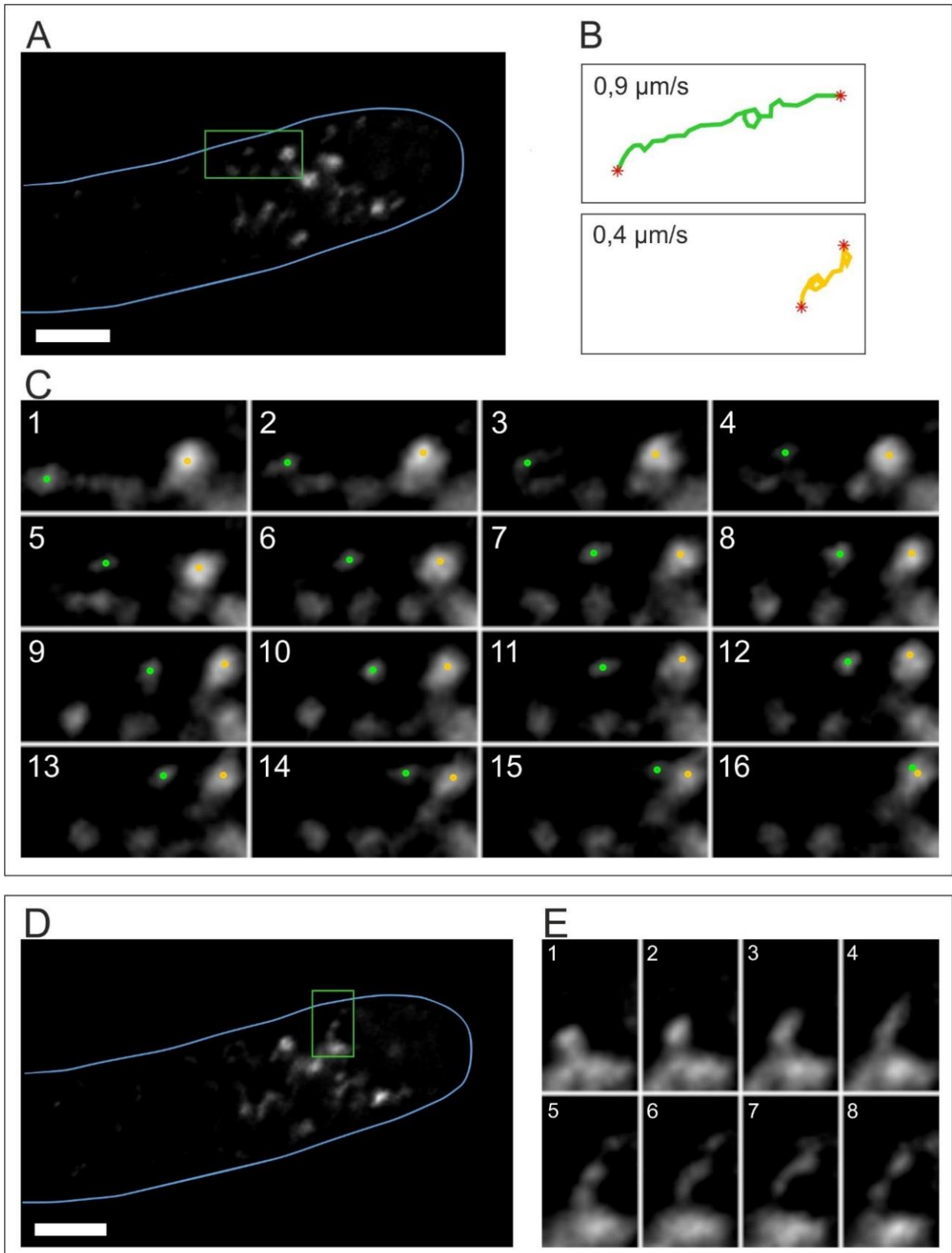
Die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen in Kapitel 3.1 deuteten bereits darauf hin, dass Clathrin überwiegend an Strukturen in der Hyphenmitte lokalisiert ist und somit ein unterschiedliches Lokalisierungsmuster aufweist, als die übrigen untersuchten Proteine. Um dies zu verifizieren wurde eine 3D-Rekonstruktion einer fluoreszenzmikroskopischen Aufnahme angefertigt (Abbildung 25). Hierzu wurde ein Stamm mit den markierten Proteinen Myo3/5-mCherry und Chc1-GFP untersucht. Die Drehung um 90° ermöglicht eine Aufsicht auf die Hyphenspitze. Aus diesem Winkel bilden die Myo3/5-mCherry-Signale eine ringförmige Struktur entlang der Plasmamembran. Die Clathrin-Signale sind dagegen eindeutig in der Hyphenmitte lokalisiert und somit klar von den Myo3/5-Signalen getrennt.



**Abbildung 25: 3D-Rekonstruktion einer fluoreszenzmikroskopischen Aufnahme der Proteine Myo3/5-mCherry (rot) und Chc1-GFP (grün).** Die weißen Linien im Startbild (oben rechts) kennzeichnen die Umrisslinien zweier Hyphen. Die Rekonstruktion wurde mittels einer Z-Serien-Aufnahme angefertigt. Gezeigt sind selektierte Winkel einer Drehung um die x-Achse. Der Grad der Drehung ist in den Bildern angegeben. Die blauen Pfeile kennzeichnen jeweils 2 Achsen bei 0° bzw. 90°.

Im nächsten Schritt wurden die Clathrin-Signale genauer untersucht. Wie auch schon in den vorherigen Untersuchungen zu erkennen war, variierten die Clathrin-Strukturen stark in Größe und Form (vgl. Abbildung 7 und Abbildung 25). Mit Hilfe einer Zeitrafferaufnahme wurden die Bewegungen der Clathrin-Strukturen verfolgt (vgl. Abbildung 26). Die Bewegungen ließen sich grob in zwei Muster einteilen. Der überwiegende Teil der beobachteten Strukturen legte während der Dauer der Aufnahme nur eine relativ kurze Strecke zurück und die Bewegung fand in einem eher kleinen Radius um den Ausgangspunkt statt (vgl. Abbildung 26B, gelbe Spur). Einige Clathrin-Strukturen bewegten sich allerdings mit einer deutlich höheren Geschwindigkeit und legten während der Aufnahmedauer eine weitere Strecke zurück (vgl. Abbildung 26B, grüne Spur). Bei diesen hochdynamischen Strukturen handelte es zumeist um Strukturen mit geringerem Durchmesser. Des Weiteren konnte beobachtet werden, dass einzelne Strukturen häufig miteinander verschmolzen oder sich aus tubulären Strukturen separate Clathrin-Signale bildeten (vgl. Abbildung 26E). Insgesamt zeigten sich eine hohe Dynamik und ein komplexes Bewegungsverhalten der Clathrin-Strukturen.



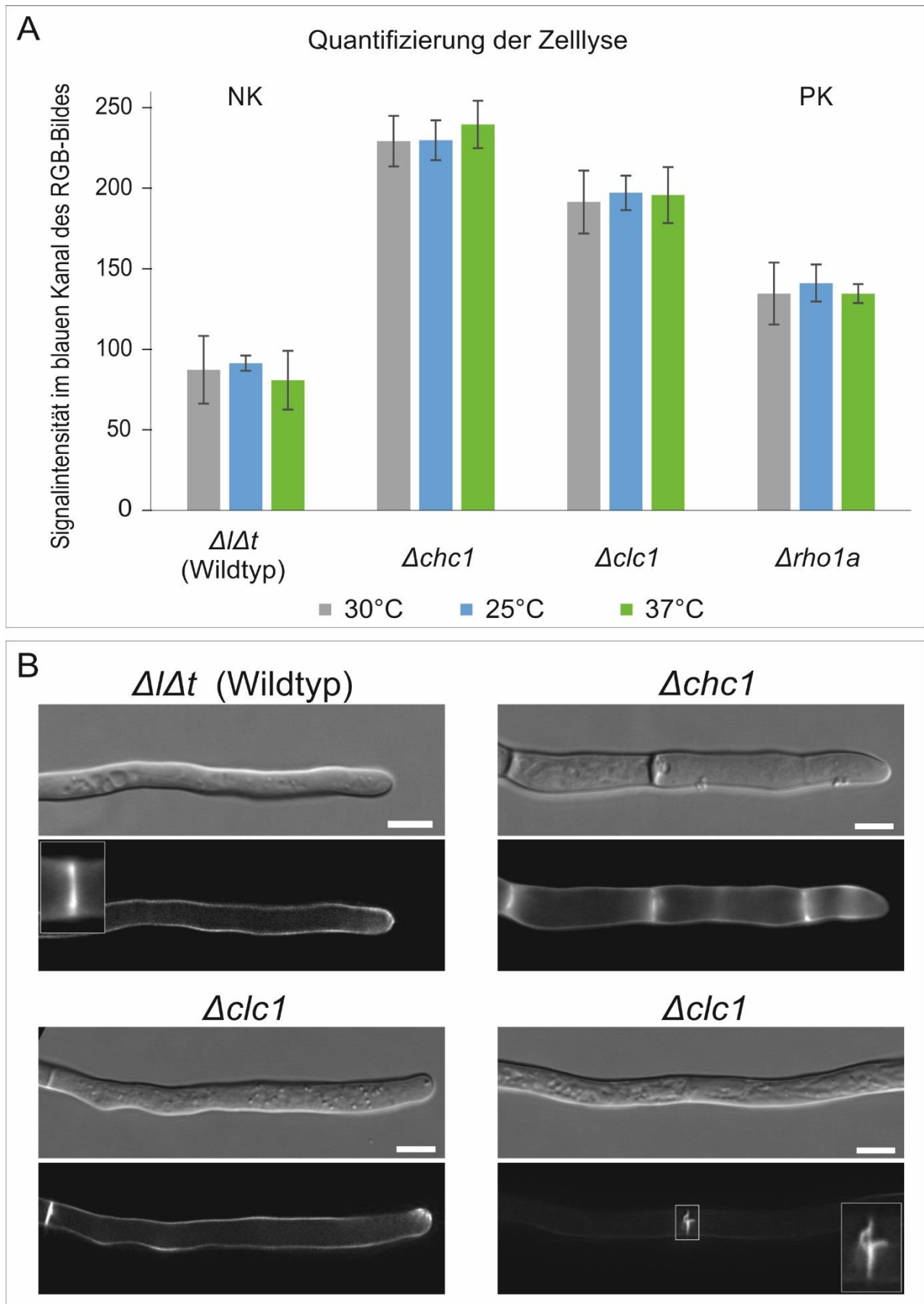


**Abbildung 26: Dynamik von Clathrin-Strukturen.** Repräsentative Ausschnitte aus einer Zeitrafferaufnahme des Stammes Chc1-GFP. Die Aufnahmen wurden mittels Epi-Fluoreszenzmikroskopie angefertigt. **A-C:** Bewegung zweier Clathrin-Strukturen. **A:** Übersicht über die Hyphe. Die blaue Linie kennzeichnet den Hyphenumriss. Der grüne Kasten kennzeichnet den für C verwendeten Bildausschnitt. Maßstab: 5 $\mu\text{m}$ . **B:** Bewegungsspur und durchschnittliche Geschwindigkeit der beiden beobachteten Clathrin-Strukturen aus C. Rote Sternchen markieren Start- und

Endpunkte der Spur. **C**: Zeitserie des Bildausschnittes aus A. Der Zeitabstand zwischen den einzelnen Bildern beträgt 0,5 s. Gelbe und grüne Punkte markieren die Clathrin-Strukturen, aus denen die Bewegungsspuren in B erstellt wurden. **D und E**: Bildung von tubulären Clathrin-Strukturen. **D**: Übersicht über die Hyphe. Die blaue Linie kennzeichnet den Hyphenumriss. Der grüne Kasten kennzeichnet den für E verwendeten Bildausschnitt. Maßstab: 5µm. **E**: Zeitserie des Bildausschnittes aus D. Der Zeitabstand zwischen den einzelnen Bildern beträgt 0,25 s.

#### 3.2.2 Integrität der Zellwand in Clathrin-Deletionsmutanten

Bei der Untersuchung der Deletionsmutanten in Kapitel 3.1.2.2 konnte bereits festgestellt werden, dass sowohl die Deletion von *CHC1*, als auch von *CLC1* Unregelmäßigkeiten in der Zellmorphologie aufweisen. In den Hellfeldbildern äußerte sich dies als Verdickungen entlang der Hyphe. Die depolarisierte Verteilung der Aktin-Patches in diesen Hyphen deutete auf einen zumindest zeitweiligen Verlust der Polarität der Hyphen hin. Eine weitere mögliche Erklärung für die unregelmäßige Morphologie der Hyphen wären Defekte im Zellwandaufbau. Um dies zu überprüfen wurde im nächsten Schritt die Zellintegrität der Clathrin-Deletionsstämme getestet. Da Zellwanddefekte häufig mit einer erhöhten Lyserate der Zellen einhergeht wurde zunächst die Zellyse quantifiziert (vgl. Kapitel 2.3.1.2). Das Ergebnis des Lysetests ist in Abbildung 27A dargestellt. Als Negativkontrolle (NK) wurde der Wildtyp-Stamm  $\Delta/\Delta$  eingesetzt. Als Positivkontrolle (PK) diente der Stamm *Δrho1a*, bei dem bereits ein Zellysephänotyp nachgewiesen wurde (Kohli et al., 2008a). Wie sich aus dem Diagramm entnehmen lässt, liegt die Lyserate der Clathrin-Deletionsmutanten deutlich über der Lyserate der hier gewählten Positivkontrolle. Im Vergleich zum Wildtyp ist die Zellyse des Stammes *Δchc1* um einen Faktor von ca. 2,7 erhöht. Die Lyserate des Stammes *Δclc1* liegt im Vergleich zum Wildtyp etwa 2,3-fach höher und fällt somit etwas geringer aus als beim Stamm *Δchc1*. Dieser Test zeigte, dass beide Clathrin-Deletionsstämme einen ausgeprägten Lysephänotyp aufwiesen, was auf Defekte im Zellwandaufbau hinweist. Eine einfache Möglichkeit die Zellwand zu visualisieren ist die Chitin-Färbung mit Hilfe des Farbstoffes Calcofluor White. Aus Studien in *S. cerevisiae* ist bekannt, dass Chitin, neben dem Hauptbestandteil Glucan, eine weitere Komponente des Polysaccharid-Netzwerks der Zellwand ist (Klis et al., 2002). Unter normalen Bedingungen ist der Chitin-Anteil der Zellwand nur sehr gering (0,1-0,2%). Bei Schwächungen der Zellwand durch Defekte in der Glucan-Synthese, kann der Chitin-Anteil allerdings bis auf 20% steigen, um die Stabilität der Zellwand zu erhöhen (Dallies et al., 1998). In Abbildung 27B sind repräsentative Beispiele der Chitin-Färbung der Clathrin-Deletionsstämme im Vergleich zum Wildtyp dargestellt.



**Abbildung 27: Untersuchungen zur Zellintegrität in den Clathrin-Deletionsmutanten.** A: Quantifizierung der Zellyse in den Deletionsstämmen. Die Freisetzung der alkalischen Phosphatase wurde mittels Indikator-Agarose (BCIP) sichtbar gemacht. Die Intensität der Blaufärbung gibt Aufschluss über die Lyserate. Der Wildtyp-Stamm  $\Delta/\Delta t$  diente

als Negativkontrolle (NK), der Stamm  $\Delta\rho1a$  diene als Positivkontrolle (PK) (vgl. (Kohli et al., 2008a)). Die Lyserate wurde bei 30°C, 25°C und 37°C ermittelt. Die Werte wurden aus zwei Test gemittelt (n=2). **B:** Chitin-Färbung in den Clathrin-Deletionsstämmen im Vergleich zum Wildtyp. Das Chitin wurde mit Hilfe des Farbstoffes Calcofluor White visualisiert. Es wurden drei repräsentative Beispiele der Chitin-Färbung und der entsprechenden DIC-Bilder in den Stämmen  $\Delta chc1$  (oben rechts) oder  $\Delta clc1$  (unten) ausgewählt. Weiß umrandete Kästen zeigen vergrößerte Ausschnitte der Septen im Wildtyp und  $\Delta clc1$ . Maßstab: 10  $\mu\text{m}$ .

Im Wildtyp ist Chitin relativ gleichmäßig in der Zellwand der Hyphen verteilt. Häufig findet man eine leichte Akkumulation von Chitin im Bereich der Hyphenspitze. An den Septen wird ebenfalls Chitin angelagert (Ayad-Durieux et al., 2000). Die Deletionsmutanten wiesen leichte Unregelmäßigkeiten in der Chitin-Verteilung auf, wobei die beobachteten Phänotypen in den beiden Deletionsstämmen sehr ähnlich waren. In Hyphen mit großem Durchmesser und Verdickungen entlang der Längsachse, zeigte sich häufig eine ungleichmäßige Verteilung von Chitin in der Zellwand (Abbildung 27, oben rechts, im Stamm  $\Delta chc1$ ). Ebenso wiesen einige Hyphen eine starke Akkumulation von Chitin an der Hyphenspitze auf (Abbildung 27, unten links, im Stamm  $\Delta clc1$ ). An den Septen ließ sich darüber hinaus vielfach eine anormal Struktur erkennen (Abbildung 27, unten rechts, im Stamm  $\Delta clc1$ ).

Die hohe Lyserate der Clathrin-Deletionsstämme deutete bereits auf einen Defekt in der Zellwandbiosynthese hin. Dies wird durch die Ergebnisse der Chitin-Färbung unterstützt. Die Unregelmäßigkeiten in der Chitin-Verteilung könnten eine Folge eines Rettungsmechanismus der Zellen sein, bei dem Schwächungen der Zellwand durch verstärkte Einlagerung von Chitin ausgeglichen werden sollen.

#### 3.2.3 Komplementation von $\Delta Sccl1$ mit $CLC1$ aus *A. gossypii*

Die bisherigen Untersuchungen deuteten darauf hin, dass Clathrin bei der Endozytose in *A. gossypii* keine Rolle spielt. Dies wäre ein bedeutender Unterschied zur Clathrin-Funktion im nah verwandten Organismus *S. cerevisiae*. Beim Vergleich der homologen, endozytischen Proteine aus *A. gossypii* und *S. cerevisiae* zeigte sich, dass *A. gossypii* kein Homologes für das Protein Sla2 aus Hefe besitzt (vgl. Abbildung 6). In *S. cerevisiae* interagiert Sla2 sowohl mit Clc1, als auch mit dem Aktin-Zytoskelett. Die Bindung zum N-Terminus von Clc1 inhibiert die Bindung zum F-Aktin. Dieser Mechanismus dient wahrscheinlich dazu, die Anlagerung von Aktin auf die Halsregion des wachsenden Vesikels zu beschränken und die Richtung der durch Aktin entstehenden Zugkraft zu regulieren (Boettner et al., 2011b). Beim Sequenzvergleich der beiden



N-Terminus mit *AgCLC1*. Das zweite Konstrukt enthielt somit die Sla2-Bindedomäne (SB) aus *S. cerevisiae* (vgl. Abbildung 29).

### 1.: $\Delta Scclc1::AgCLC1$



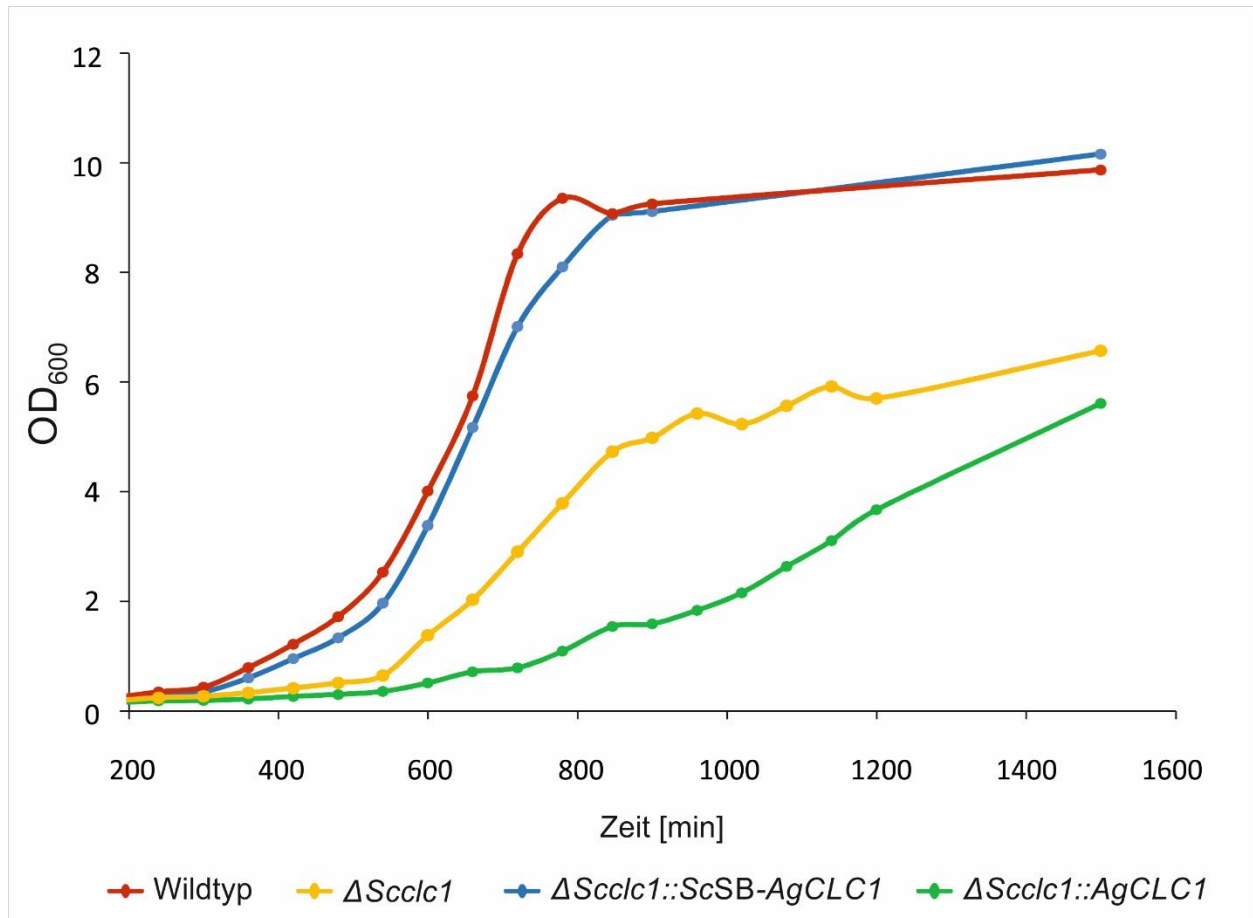
### 2.: $\Delta Scclc1::ScSB-AgCLC1$



**Abbildung 29: Gen-Konstrukte für die Komplementationsstudien.** Die Herstellung der Konstrukte erfolgte zunächst auf Plasmiden. Die Konstrukte wurden über homologe Rekombination ins Genom des Deletionsstammes  $\Delta scclc1$  integriert. Promotor- und Terminatorbereiche des *ScCLC1*-Locus ( $P_{sc}$ ,  $T_{sc}$ ) dienten als homologe Bereiche für die Rekombination. Für das zweite Konstrukt wurde der N-Terminus aus *S. cerevisiae* (*ScCLC1*<sub>1-213</sub>), der die Sla2-Bindedomäne (SB) enthält, mit dem *AgCLC1*-Gen fusioniert. Die *KanMX*-Kassette ermöglichte die Selektion der Transformanten über die Resistenz gegen das Antibiotikum G418.

Der Phänotyp des Stammes  $\Delta Scclc1$  wurde bereits in verschiedenen Publikationen beschrieben. In den Deletionsmutanten konnte ein Anstieg der Generationszeit und eine verringerte Endozytoserate festgestellt werden (Chu et al., 1996; Silveira et al., 1990). Die Zellen wiesen darüber hinaus ein anormales Knospungsverhalten auf und waren etwas größer, als die des Wildtyps (Ni und Snyder, 2001). In den nachfolgenden Untersuchungen sollte überprüft werden, ob der Phänotyp des Stammes  $\Delta Scclc1$  durch die Integration von *AgCLC1* komplementiert wird. Im ersten Schritt wurde das Wachstum der beiden Komplementationsstämme im Vergleich zu den beiden Kontrollstämmen (Wildtyp und  $\Delta Scclc1$ ) überprüft. Hierzu wurden die vier Stämme in 25 ml Flüssigmedium, mit einer  $OD_{600}$  von ca. 0,1 angeimpft. Die  $OD_{600}$  wurde stündlich für insgesamt 24 Stunden dokumentiert, um eine Wachstumskurve zu erstellen (Abbildung 30). Wie aus dem Diagramm hervorgeht wiesen die beiden Komplementationsstämme ein sehr unterschiedliches Wachstumsverhalten auf. Der Stamm, der nur das *AgCLC1*-Gen enthielt, wuchs mit einer Generationsszeit von 2,5 h sogar langsamer als der Kontrollstamm  $\Delta Scclc1$ . Das Wachstum des Kontrollstammes stagnierte allerdings früher, wodurch sich die Werte der Stämme  $\Delta Scclc1$  und  $\Delta Scclc1::AgCLC1$  im Verlauf der Messung angleichen. Die Endwerte der beiden Stämme blieben ebenfalls deutlich unter dem des Wildtyps. Der Stamm, der zusätzlich

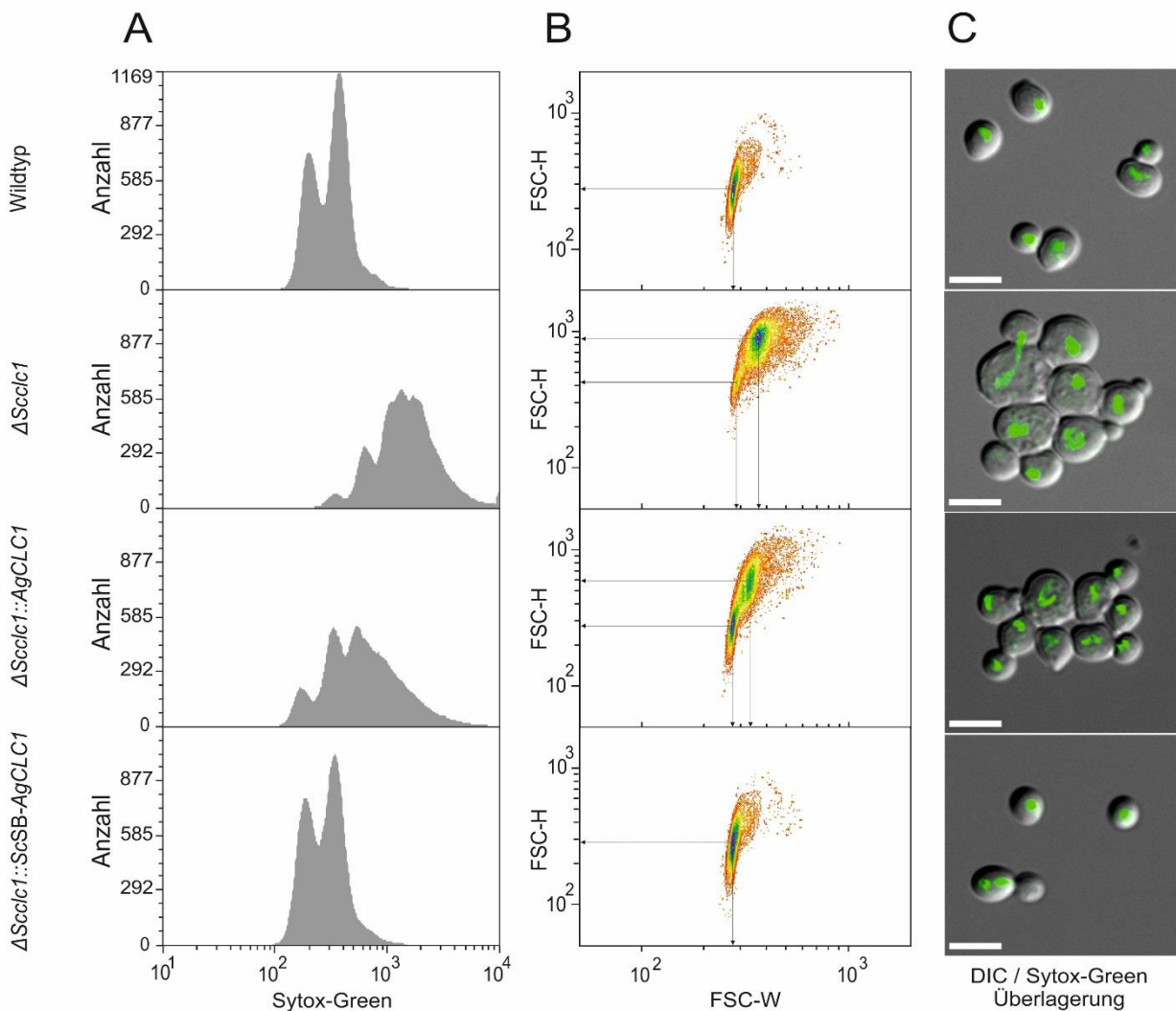
zum *AgCLC1* auch die Sla2-Bindedomäne aus *S. cerevisiae* enthielt wuchs dagegen ähnlich schnell wie der Wildtyp und erreichte einen vergleichbaren Endwert.



**Abbildung 30: Wachstumskurven der Komplementationsstämme im Vergleich zum Wildtyp und zum Stamm  $\Delta Scclc1$ .** Die Stämme wurden in Flüssigmedium (YEPE) mit einer  $OD_{600}$  von 0,1 angeimpft und für 24 Stunden inkubiert. Die  $OD_{600}$  wurde stündlich gemessen.

Um die Unterschiede zwischen den Stämmen genauer zu definieren wurden die Zellen mittels Durchflusszytometrie mit Hilfe eines FACS-Gerätes analysiert (FACS= fluorescence-activated cell sorting). Hierfür werden die Zellkerne mit einem Fluoreszenzfarbstoff angefärbt und die Fluoreszenz einzelner Zellen wird gemessen. Die Signalintensität gibt Aufschluss über den DNA-Gehalt der Zellen. Zusätzlich kann die relative Form und Größe der Zellen der verschiedenen Stämme untereinander anhand des Streulichts bestimmt werden. Die Ergebnisse der FACS-Analyse der vier Hefe-Stämme ist in Abbildung 31 dargestellt.





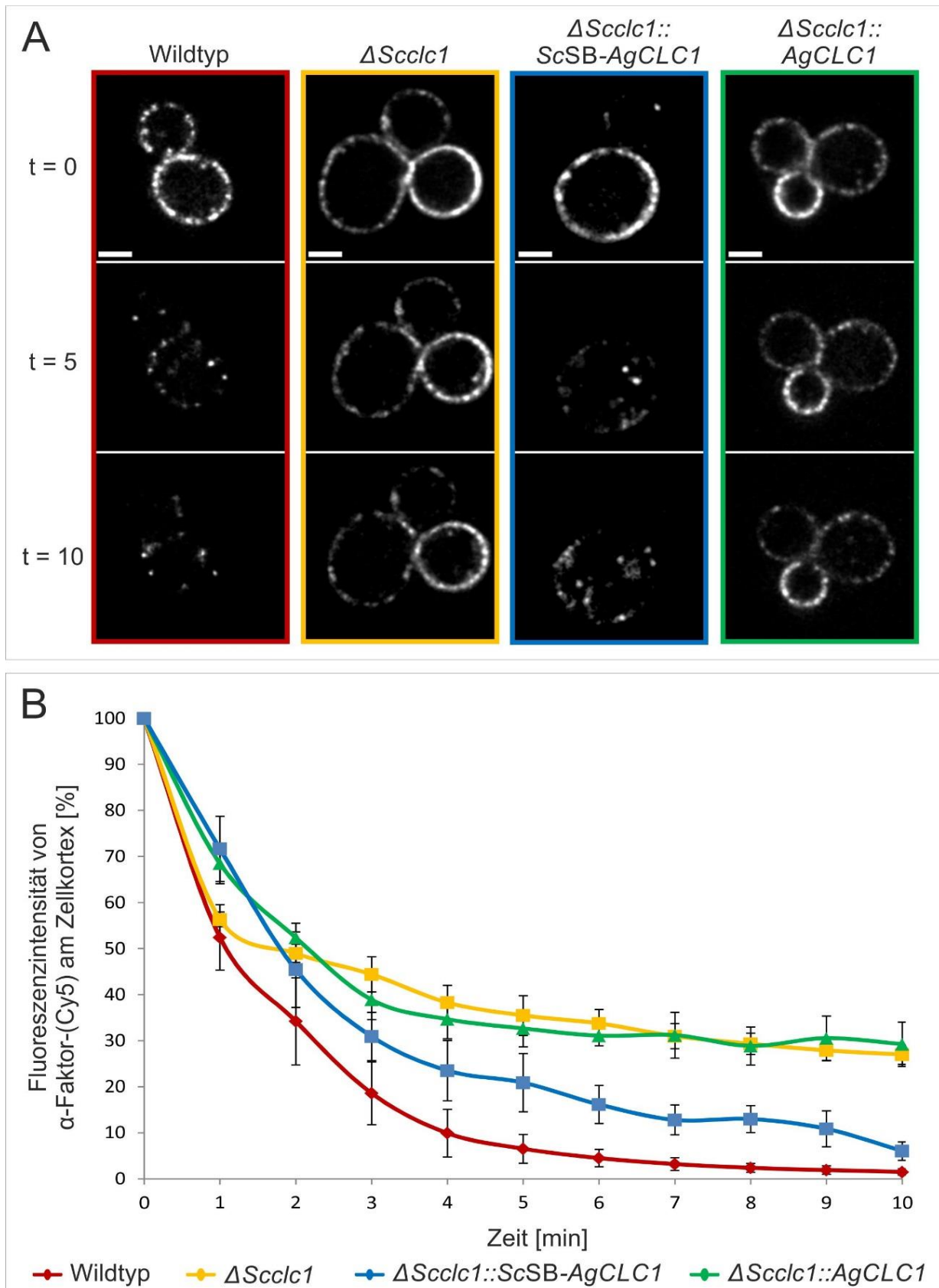
**Abbildung 31: Durchflusszytometrie der Hefestämme mittels FACS-Analyse.** Für die Messung wurden die Zellkerne mit dem Fluoreszenzfarbstoff „Sytox-Green“ angefärbt. **A:** Fluoreszenzintensitäten der gemessenen Zellen. Y-Achse: Anzahl der Zellen, X-Achse: logarithmische Auftragung der Fluoreszenzintensität. Diese gibt Aufschluss über den DNA-Gehalt der Zelle. **B:** Messung der Zellform mittels Streulicht. Y-Achse: Höhe des Signals, X-Achse: Breite des Signals, (FSC= Forward-Scatter). Die Anzahl der Messwerte wird durch den Farbverlauf dargestellt (blau: hohe Anzahl an Messwerten, rot: niedrige Anzahl an Messwerten). Häufungen von Messwerten wurden durch Pfeile markiert. **C:** Mikroskopische Analyse der für die Messung eingesetzten Zellen der verschiedenen Stämme. Hellfeld- und Fluoreszenzaufnahme wurden als Überlagerung dargestellt. Die Fluoreszenzsignale der Zellkerne wurden grün eingefärbt.

Zunächst wurde der DNA-Gehalt der Zellen ermittelt (Abbildung 31A). Für Wildtyp-Zellen, die während der logarithmischen Wachstumsphase gemessen werden ergibt sich hierbei ein typisches Muster mit zwei Spitzen. Die zweite Spitze spiegelt dabei die Zellen wieder, die die Synthese-Phase des Zellzyklus bereits durchlaufen haben und deren DNA-Gehalt sich dadurch verdoppelt hat. In den Stämmen  $\Delta Sccl1$  und  $\Delta Sccl1::AgCLC1$  zeigte sich allerdings ein vollkommen anderes Bild. Es wurden deutlich höhere Werte gemessen, was durch die Verschiebung der Kurve nach rechts ersichtlich wird. Zudem ergab die Messung keine klaren



Spitzen sondern eine eher breite Verteilung der Werte, was zunächst auf eine Aneuploidie hindeutete. Der Stamm  $\Delta Sccl1::ScSB-AgCLC1$  zeigte dagegen eine dem Wildtyp vergleichbare Verteilung der Messwerte. In Abbildung 31B sind die Ergebnisse der Analyse der Zellmorphologie dargestellt. Hierbei wird die Menge und Intensität des durch die Zellen erzeugten Streulichts gemessen. Dieses gibt Aufschluss über Höhe und Breite der Zellen. Im Diagramm wurden Höhe (y-Achse) und Breite (x-Achse) gegeneinander aufgetragen. Durch die eher runde Form der Hefezellen liegen die Werte für Breite und Höhe meist nah beieinander, wodurch eine Häufung der Messwerte in der Mitte des Diagrammes entsteht. Dieses Muster ist sowohl im Wildtyp, als auch im Stamm  $\Delta Sccl1::ScSB-AgCLC1$  zu erkennen. Die leichte Ausdehnung entlang der y-Achse wird wahrscheinlich durch die Messmethode zu erzeugt. Die Werte der Stämme  $\Delta Sccl1$  und  $\Delta Sccl1::AgCLC1$  waren im Durchschnitt höher als im Wildtyp. Zudem zeigten sich hier zwei Populationen, mit unterschiedlicher Zellgröße (Abbildung 31B, durch Pfeile gekennzeichnet). Eine dieser Populationen entsprach dabei in etwa den Wildtyp-Werten, wohingegen die andere deutlich größere Zellen enthielt. Im Anschluss an die FACS-Analyse wurden die Zellen mikroskopisch untersucht (Abbildung 31C). Hierbei zeigte sich in den Stämmen  $\Delta Sccl1$  und  $\Delta Sccl1::AgCLC1$  eine starke Agglomeration der Zellen. Zusätzlich wiesen einige Zellen auch einen größeren Durchmesser auf als beim Wildtyp. Die Agglomeration könnte die starken Abweichungen bei der Messung des DNA-Gehalts hervorrufen. So werden die Zellen während der FACS-Messung vermutlich nicht vollständig vereinzelt, wodurch pro Einzelmessung eine unregelmäßige Anzahl an Zellen ausgemessen wird. Dies könnte ebenfalls die hohen Werte bei der Messung der Zellgröße erklären.

Im nächsten Schritt wurde die Endozytosefähigkeit der Komplementationsstämme im Vergleich zu den beiden Kontrollstämmen überprüft. Für diese Untersuchung wurde das mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy5 markierte Pheromon  $\alpha$ -Faktor verwendet (Arlt et al., 2015). Die Internalisierung des  $\alpha$ -Faktors wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie für zehn Minuten verfolgt. Hierzu wurde die Fluoreszenzintensität am Zellkortex gemessen. Das Ergebnis der Tests in Abbildung 32 dargestellt. Nach der Zugabe bindet der  $\alpha$ -Faktor zunächst an den Rezeptor Ste2 im Zellkortex, wodurch die Endozytose des Pheromons induziert wird (vgl. Abbildung 32A, t=0). Im Wildtyp ist die Internalisierung bereits nach wenigen Minuten fast vollständig abgeschlossen und der Hauptteil des  $\alpha$ -Faktors befindet sich in zellinternen Strukturen, bei denen es sich vermutlich um endosomale Kompartimente handelt.



**Abbildung 32: Internalisierung von  $\alpha$ -Faktor-Cy5 in den Komplementationsstämmen  $\Delta Scclc1::AgCLC1$  und  $\Delta Scclc1::ScSB-AgCLC1$  im Vergleich zum Wildtyp und zum Stamm  $\Delta Scclc1$ . Hierzu wurden einzelne Zellen für 10 Minuten mittels Fluoreszenzmikroskopie beobachtet. Im Abstand von einer Minute wurden Aufnahmen angefertigt und die Fluoreszenzintensität am Zellkortex wurde gemessen. Durch die Endozytose des markierten  $\alpha$ -Faktors**

nimmt die Fluoreszenz ab. **A:** Repräsentative Aufnahmen der Zellen zu den Zeitpunkten 0, 5 und 10 Minuten nach Zugabe des  $\alpha$ -Faktors. Die farbliche Umrandung kennzeichnet die dazugehörige Kurve im Diagramm (B). Maßstab. 2  $\mu\text{m}$ . **B:** Messung der Fluoreszenzintensität am Zellkortex für 10 Minuten nach Zugabe von  $\alpha$ -Faktor-Cy5. Fluoreszenzintensität wurde in Prozent angegeben. Die Fluoreszenzintensität der Zellen zum Zeitpunkt  $t=0$  wurde als 100% angenommen. Für jeden Stamm wurden 7 Zellen analysiert.

Aus der Literatur ist bekannt, dass die Endozytoserate des  $\alpha$ -Faktors in Clathrin-Deletionsmutanten um ca. 50% reduziert ist (Chu et al., 1996; Payne et al., 1988). Ein ähnlicher Phänotyp spiegelt sich auch in dieser Untersuchung wider. Zehn Minuten nach dem Start der Messung liegt die Fluoreszenzintensität im Stamm  $\Delta Sccl1$  noch bei ca. 30% vom Startwert. Wie bei den vorherigen Untersuchungen zeigte der Stamm  $\Delta Sccl1::AgCLC1$  ein ähnliches Verhalten wie der Deletionsstamm  $\Delta Sccl1$ . Auch hier findet keine vollständige Internalisierung des  $\alpha$ -Faktors statt und der Endwert liegt wie bei  $\Delta Sccl1$  bei etwa 30%. Beim Stamm  $\Delta Sccl1::ScSB-AgCLC1$  ist die Endozytoserate im Vergleich zum Deletionsstamm dagegen deutlich erhöht. Die Internalisierung verläuft zwar etwas langsamer als im Wildtyp, die Werte nähern sich aber zum Ende der Messung den Wildtyp-Werten an. So ist der Endwert im Stamm  $\Delta Sccl1::ScSB-AgCLC1$  mit ca. 6% bereits ähnlich niedrig, wie der des Wildtyps (ca. 1,5%).

Insgesamt zeigten die Untersuchungen, dass der Phänotyp des Deletionsstammes  $\Delta Sccl1$  durch die Integration des  $AgCLC1$ -Gens nicht komplementiert wird. Die Integration des chimären Gens, das zusätzlich zum  $AgCLC1$  die Sla2-Bindedomäne (SB) aus *S. cerevisiae* enthielt, verhielt sich dagegen bezüglich des Wachstums und der Zellmorphologie wie der Wildtyp. Die Internalisierung des  $\alpha$ -Faktors verlief etwas langsamer als im Wildtyp, der Endozytosedefekt ist allerdings im Vergleich zum Deletionsstamm stark minimiert.

## 4 Diskussion

Die Endozytose wird seit mittlerweile 50 Jahren in den verschiedensten eukaryotischen Organismen studiert. Die aus dem einzelligen Modellorganismus *S. cerevisiae* gewonnenen Erkenntnisse zur Clathrin-abhängigen Endozytose verhalfen dabei zu einem umfangreichen Wissen über diesen Prozess. *S. cerevisiae* bot ein einfaches genetisches System zur Identifizierung vieler der heute bekannten Komponenten des Prozesses (Boettner et al., 2011a; Weinberg und Drubin, 2012). Bei der Übertragung auf komplexere Systeme mit einer ausgeprägten Zellpolarität, wie zum Beispiel Neuronen, ist der Erkenntnisgewinn aus Hefe allerdings limitiert, da sich die Phasen des polaren Wachstums auf die Knospung und Paarung beschränkt (Pruyne und Bretscher, 2000). Zudem erschwert die geringe Größe der Zellen die Untersuchung des endozytischen Prozesses an Orten des polaren Wachstums wie der Knospe (Newpher, 2006; Newpher et al., 2005). Ein weiterer Punkt, der anhand von *S. cerevisiae* nur schwer zu erforschen ist, ist der Einfluss der Wachstumsgeschwindigkeit auf den endozytischen Prozess, da der Einzeller mit einer Oberflächenvergrößerung von maximal  $1 \mu\text{m}^2$  pro Minute im Gegensatz zu nah verwandten Pilzen wie *A. gossypii* oder *N. crassa* nur sehr langsam wächst (Schmitz und Philippsen, 2011; Trinci, 1974). Um die Bedeutung der Endozytose für die Zellpolarität und den Zusammenhang zwischen Wachstumsgeschwindigkeit und Endozytoserate zu analysieren eignen sich daher besonders filamentös wachsende Pilze, wie der in dieser Arbeit verwendete Modellorganismus *A. gossypii*. Die Arbeit mit diesem Organismus profitiert zudem von der nahen Verwandtschaft zur Bäckerhefe, die sich auch in der endozytischen Proteinmaschinerie widerspiegelt. So besitzt *A. gossypii*, mit Ausnahme von Sla2, Homologe zu allen bekannten endozytischen Proteinen aus *S. cerevisiae*, was auf eine hohe Kongruenz der endozytischen Mechanismen in den beiden Organismen hindeutete. Dies ermöglicht den Vergleich des endozytischen Prozesses bei den unterschiedlichen Wachstumsmodi der beiden Organismen.

### 4.1 Dynamik des endozytischen Prozesses

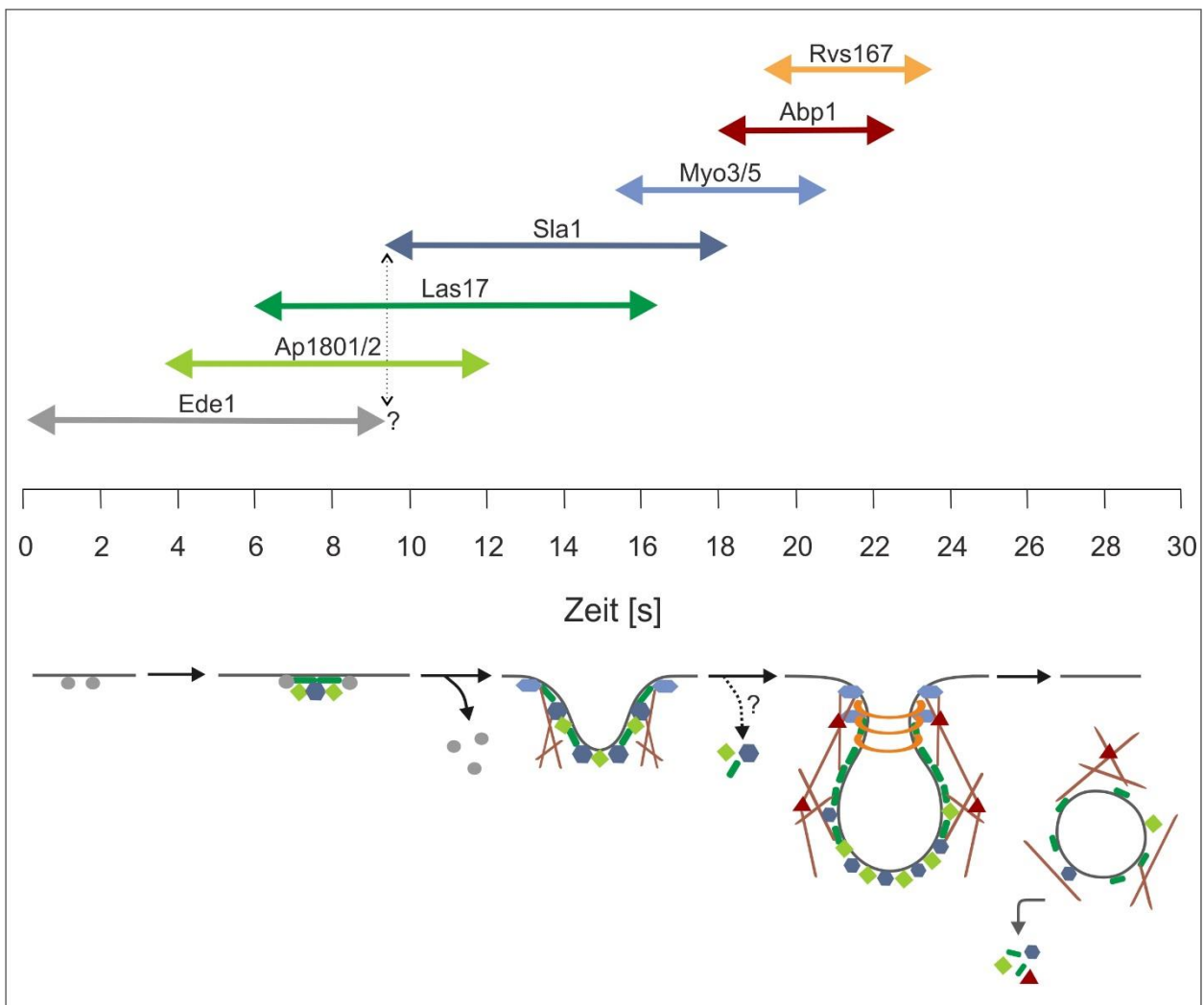
Die Lokalisierung der getesteten Proteine an der Plasmamembran ist eine Voraussetzung für die Funktion bei der Endozytose. Dies konnte mit Ausnahme der beiden Clathrin-Untereinheiten für die getesteten Proteine bestätigt werden. Die Kolokalisierungsstudien zeigten zudem, dass die Reihenfolge des Erscheinens der Proteine an der Endozytosestelle überwiegend mit dem aus

*S. cerevisiae* bekannten Ablauf übereinstimmt. Bei Chc1 und Clc1 konnte allerdings keine Kolokalisierung mit den anderen getesteten Proteinen festgestellt werden. Die fluoreszenzmikroskopischen Analysen der Clathrin-Untereinheiten legen nahe, dass Clathrin am endozytischen Prozess in *A. gossypii* nicht beteiligt ist. Die Funktion von Clathrin in *A. gossypii* wurde daher genauer untersucht und wird in Kapitel 4.4 diskutiert.

Beim Vergleich der Dynamik des endozytischen Prozesses in den beiden Organismen konnte eine deutliche Verringerung der Protein-Lebenszeiten in *A. gossypii* beobachtet werden. Da die getesteten Proteine alle Phasen der Endozytose abdecken, kann man davon ausgehen, dass somit in der Summe der gesamte endozytische Prozess deutlich schneller abläuft als in *S. cerevisiae*.

Die Unterschiede in den Lebenszeiten waren bei den Proteinen der frühen Phasen stärker ausgeprägt. Die geringe Lebenszeit bei AgEde1 deutet darauf hin, dass in *A. gossypii* insbesondere die Zeitspanne zwischen Initiierung und Membraneinstülpung verkürzt ist. Der Zeitgewinn bei der Endozytose in *A. gossypii* würde demnach vorrangig in der frühen Phase des Prozesses stattfinden.

Anhand der Daten zur Lebenszeit der einzelnen Proteine und der quantitativen Auswertung der Kolokalisierung konnte die durchschnittliche Überlagerungsdauer der verschiedenen Proteinpaare berechnet werden (vgl. Anhang, Tabelle 1). Diese Daten ermöglichen die Erstellung eines Modells zum zeitlichen Verlauf der Endozytose in *A. gossypii* (Abbildung 33). Dem berechneten Modell zufolge liegt die Dauer eines durchschnittlichen endozytischen Ereignisses, bei schnellem Wachstum, in *A. gossypii* unter 30 Sekunden. Der Prozess läuft demnach deutlich schneller ab, als in *S. cerevisiae*, da hier die Dauer eines Ereignisses mit ein bis zwei Minuten bemessen wurde (Boettner et al., 2011a; Idrissi und Geli, 2013; Kaksonen et al., 2005; Kukulski et al., 2012; Weinberg und Drubin, 2012). Noch nicht ausreichend geklärt ist die zeitliche Positionierung von Ede1. Da bei der Kolokalisierungsstudie keine Überlagerung von Ede1 mit Myo3/5 zu erkennen war, ist anzunehmen, dass Ede1 die Endozytosestelle vor dem Erscheinen von Myo3/5 verlässt. In *S. cerevisiae* konnte gezeigt werden, dass Ede1 und Sla1 in der mittleren Phase der Endozytose gemeinsam an der Endozytosestelle auftauchen (Stimpson et al., 2009). Um Ede1 in den zeitlichen Ablauf einzuordnen wurde daher eine zumindest minimale Überlagerungsphase zwischen Ede1 und Sla1 angenommen. Die Berechnungen legen zudem nahe, dass sich die Komponenten der Phase „Reifung des Proteinmantels“ (Ap1801/2, Las17 und Sla1) bereits vor der Abschnürung vom entstehenden Vesikel lösen.



**Abbildung 33: Modell zum zeitlichen Verlauf der Endozytose in *A. gossypii*.** Das Modell wurde aus den Daten der Lebenszeitmessung und der quantitativen Analyse der Koloalysierung berechnet. Es zeigt die durchschnittliche Dauer eines endozytischen Ereignisses bei schnellem Wachstum. Die Länge der Pfeile kennzeichnet die durchschnittliche Lebensdauer der Proteine und das berechnete Erscheinen und Verschwinden der Proteine im Verlauf des endozytischen Prozesses. Unten: Das aus *S. cerevisiae* bekannte, schematische Modell zum Ablauf des endozytischen Prozesses wurde anhand dieser Daten an die Gegebenheiten in *A. gossypii* angepasst.

Während des schnellen Wachstums konnte in *A. gossypii* eine höhere Anzahl an Ereignissen pro  $\mu\text{m}^2$  gemessen werden, was ein Vergleich mit den aus Hefe bekannten Werten für Sla1 und Abp1 zeigte (Kaksonen et al., 2005; Suzuki et al., 2012). Die Endozytoserate in *A. gossypii* wird im Vergleich zu *S. cerevisiae* demnach sowohl durch die Beschleunigung des Prozesses, als auch durch die höhere Dichte an Ereignissen gesteigert. Dieses Ergebnis unterstützt die zu Beginn der Arbeit aufgestellte Hypothese, dass die Endozytoserate in *A. gossypii* aufgrund der schnelleren Wachstumsgeschwindigkeit im Vergleich zu *S. cerevisiae* erhöht ist.

## 4.2 Der Zusammenhang zwischen Wachstumsgeschwindigkeit und Endozytoserate in *A. gossypii*

Für die Aufrechterhaltung des polaren Wachstums ist es unerlässlich die Wachstumszonen auf die Hyphenspitzen zu beschränken. Membranständige Polaritätsfaktoren müssen daher hinter der Spitzenregion von der Zelloberfläche entfernt werden, was durch die Endozytose gewährleistet wird (Kohli et al., 2008b; Shaw et al., 2011; Upadhyay und Shaw, 2008). Bei der Bildung eines Myzels steigert sich die Wachstumsgeschwindigkeit der Hyphen in *A. gossypii* von anfangs unter 20  $\mu\text{m}/\text{h}$  bis auf ca. 200 $\mu\text{m}/\text{h}$  und der Durchmesser der Hyphen vergrößert sich (Ayad-Durieux et al., 2000; Knechtle et al., 2003). Die Oberflächenvergrößerung liegt in der schnellen Wachstumsphase bei etwa 40  $\mu\text{m}^2/\text{min}$  (Schmitz und Philippsen, 2011).

Die Beschleunigung des Spitzenwachstums hat zur Folge, dass membranständige Polaritätsfaktoren schneller in subapikale Bereiche gelangen. Zu Beginn dieser Arbeit wurde daher vermutet, dass die Wachstumsbeschleunigung eine gesteigerte Endozytoserate erfordert, um die Zellpolarität aufrechtzuerhalten. Dies könnte sowohl durch eine höhere Anzahl an endozytischen Ereignissen, als auch durch die Beschleunigung des endozytischen Prozesses erreicht werden. Um einen möglichen Zusammenhang zwischen Wachstumsgeschwindigkeit und Endozytoserate zu analysieren, wurden verschiedene endozytische Komponenten bei unterschiedlicher Wachstumsgeschwindigkeit fluoreszenzmikroskopisch beobachtet. Die Quantifizierung der endozytischen Ereignisse ergab, dass bei sechs der neun getesteten Proteine die Anzahl der gemessenen Signale pro  $\mu\text{m}^2$  während des schnellen Wachstums deutlich zunahm. Bei der Untersuchung der Dynamik des Prozesses zeigte sich, dass die Mehrzahl der untersuchten Proteine bei langsamem Wachstum eine kürzere Lebenszeit aufwies, als bei schnellem Wachstum. Demnach wird bei Erhöhung der Wachstumsgeschwindigkeit die Endozytoserate durch eine Zunahme an endozytischen Ereignissen, nicht aber durch eine Beschleunigung des Prozesses gesteigert.

Die kürzeren Lebenszeiten bei langsamer Wachstumsgeschwindigkeit sind zunächst überraschend, da eine Beschleunigung des endozytischen Prozesses bei langsamem Wachstum in physiologischer Hinsicht wenig sinnvoll erscheint. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit für die kürzere Lebensdauer bei langsamer Wachstumsgeschwindigkeit wäre, dass es sich bei den kurzlebigen Signalen um Ereignisse handelt, die den Prozess nicht vollständig durchlaufen. Für diese Theorie spricht auch das Ergebnis der Signalquantifizierung. Bei Ede1, dessen Homologe

aus *S. cerevisiae* und Säugern (Eps15) zu den frühen Proteinen gezählt werden (Henne et al., 2010; Kaksonen et al., 2005; Stimpson et al., 2009), wurde kein signifikanter Unterschied in der Anzahl der Signale zwischen den beiden Wachstumsgeschwindigkeiten festgestellt. Dies spricht dafür, dass unabhängig von der Wachstumsgeschwindigkeit zunächst eine etwa gleichbleibende Anzahl an endozytischen Ereignissen initiiert wird. Da die Anzahl der Signale bei den anderen Proteinen während des langsamen Wachstums deutlich geringer ausfällt, ist es wahrscheinlich, dass es an einigen dieser Endozytosestellen zu einem vorzeitigen Abbruch des Prozesses kommt. So wird in langsam wachsenden Hyphen offenbar ein Überschuss an potentiellen Endozytosestellen erzeugt. Dieser Überschuss könnte eine schnelle Anpassung der Endozytoserate bei Erhöhung der Wachstumsgeschwindigkeit ermöglichen. Abgebrochene endozytische Ereignisse konnten auch bei der Clathrin-abhängigen Endozytose in Säugerzellen beobachtet werden (Ehrlich et al., 2004; Loerke et al., 2009). So kommt es hier wahrscheinlich zunächst zu einer relativ willkürlichen Initiierung von Endozytosestellen, dessen Fortschreiten durch die Anwesenheit von Cargo-Molekülen reguliert wird (Ehrlich et al., 2004; Loerke et al., 2009; Mettlen et al., 2010). Der Zeitpunkt des Prozessabbruchs kann dabei variieren, da die verschiedenen Cargo-Moleküle durch unterschiedliche Adapterproteine gebunden werden (Mettlen et al., 2009; Mettlen et al., 2010). Auch für *S. cerevisiae* wird eine Regulation des endozytischen Prozesses durch Cargo-Moleküle angenommen (Carroll et al., 2012; Toshima et al., 2006). Im Gegensatz zu Säugerzellen kommt es allerdings bei Abwesenheit von Cargo-Molekülen nicht zum frühzeitigen Abbau der endozytischen Proteine, sondern zu einem pausieren in der frühen Phase des Prozesses (Carroll et al., 2012). Die in dieser Arbeit erhaltenen Resultate zur Dynamik und Anzahl der endozytischen Ereignisse in *A. gossypii* lassen vermuten, dass auch in *A. gossypii* ein Kontrollpunkt für das Fortschreiten des endozytischen Prozesses vorhanden ist. Da Cargo-Moleküle bei diesem Kontrollmechanismus sowohl in Säugern, als auch in *S. cerevisiae* eine große Rolle spielen, ist es wahrscheinlich, dass die Endozytose auch in *A. gossypii* durch Cargo-Moleküle reguliert wird. Die meisten ungenutzten Endozytosestellen werden dabei vermutlich vor Eintritt in die zweite Phase der Endozytose (Reifung des Proteinmantels) abgebaut, da bei den Proteinen Ap1801/2, Las17 und Sla1 die Anzahl der Signale bei langsamem Wachstum deutlich geringer war, als bei schnellem Wachstum. Trotz der nahen Verwandtschaft zu *S. cerevisiae* scheint der Mechanismus zur Kontrolle des endozytischen Prozesses in *A. gossypii* eher dem, der Säugerzellen zu entsprechen. Diese Strategie ist bei dem stark polaren Wachstum der Hyphen aber durchaus sinnvoll, da ein Abbau der ungenutzten



Endozytosestellen zur Eingrenzung der endozytischen Zone auf den Bereich hinter der Hyphenspitze beitragen könnte.

Ein subapikaler endozytischer Ring konnte auch in anderen filamentös wachsenden Pilzen beobachtet werden (Berepiki et al., 2010; Taheri-Talesh et al., 2008; Upadhyay und Shaw, 2008). Die Untersuchungen beschränken sich allerdings auf die Analyse von Aktin bzw. Aktin-bindenden Proteinen und somit auf eine relativ späte Phase der Endozytose. Mittels einer Aktin-Färbung wurde in *A. gossypii* gezeigt, dass die Wachstumsgeschwindigkeit die Position der endozytischen Zone beeinflusst (Kohli et al., 2008b). Die in dieser Arbeit vorgenommene Analyse zur Lokalisierung endozytischer Komponenten aus verschiedenen Phasen des Prozesses, konnte die durch Aktin-Färbung erhaltenen Ergebnisse grundsätzlich bestätigen. Weder bei schnellem noch bei langsamem Wachstum konnten Signale direkt an der Hyphenspitze detektiert werden. Die in Kohli et al., 2008b beschriebene Trennung von Exo- und Endozytose wird demnach bereits in der frühen Phase der Endozytose etabliert. Die quantitative Auswertung der Signalpositionen zeigte darüber hinaus, dass sich die Endozytosezone um durchschnittlich 3  $\mu\text{m}$  nach hinten verschiebt. Auch eine Verbreiterung des Bereichs konnte beobachtet werden, allerdings fiel diese bei den verschiedenen Proteinen unterschiedlich stark aus.

### 4.3 Bedeutung der Endozytose für das polare Hyphenwachstum

Die Lokalisierung der endozytischen Proteine in einem subapikalen Ring direkt hinter der Hyphenspitze deutet bereits darauf hin, dass die Endozytose eine wichtige Rolle beim polaren Wachstum spielt. Auch in *S. cerevisiae* hat die Deletion von endozytischen Proteinen Auswirkungen auf die Stabilität der Polaritätsachse, was sich an der Veränderung des Knospungsverhalten in homozygot-diploiden Deletionsstämmen erkennbar macht (Jose et al., 2013; Tuo et al., 2013). Die Wachstumsdefekte bei den entsprechenden Deletionsstämmen in *A. gossypii* sind allerdings deutlich schwerwiegender als in *S. cerevisiae*. So ist beispielsweise die Deletion von *LAS17* in *S. cerevisiae*, anders als in *A. gossypii*, nicht letal und die Verringerung der Wachstumsgeschwindigkeit fällt in den Stämmen  $\Delta\text{ede1}$ ,  $\Delta\text{sla1}$ ,  $\Delta\text{abp1}$  deutlich schwächer aus (Gagny et al., 2000; Holtzman et al., 1993; Li, 1997; Tuo et al., 2013).

Die Unregelmäßigkeiten in der Hyphenmorphologie der Deletionstämmen, die sich in Verdickungen entlang der Längsachse äußerten, deuten auf einen temporären Verlust der Zellpolarität hin. Dies spiegelte sich unterschiedlich stark auch in der Verteilung der Aktin-Patches

wider. In den Stämmen  $\Delta syp1$  und  $\Delta ap1801/2$  konnten sowohl Hyphen mit einer depolarisierten, als auch mit einer dem Wildtyp entsprechenden Verteilung der Aktin-Patches beobachtet werden. Die Anzahl der Aktin-Patches scheint durch die Deletionen aber kaum beeinflusst zu werden, was auf eine Funktion bei der korrekten Positionierung der Endozytosestelle in der Hyphe hinweist. In den Stämmen  $\Delta sla1$ ,  $\Delta abp1$  und  $\Delta rvs167$  war die Lokalisierung der Aktin-Patches stärker beeinträchtigt. Insbesondere  $\Delta sla1$  zeigte eine deutliche Veränderung in Anzahl und Lokalisierung der Patches. Dieser Phänotyp passt zu der für Sla1 in *S. cerevisiae* vermuteten Funktion bei der Verbindung des Aktin-Zytoskeletts mit der endozytischen Proteinmaschinerie (Holtzman et al., 1993; Kaksonen et al., 2005; Warren et al., 2002). Auch die aus Hefe bekannten Funktionen für Abp1 und Rvs167 können in dieser Arbeit durch die Aktin-Färbung in den Deletionsstämmen bestätigt werden (Kaksonen et al., 2005). So zeigte sich in  $\Delta abp1$  eine starke Aktin-Akkumulation an der Plasmamembran, was mit einem Defekt bei Aktin-Depolymerisierung zusammenhängen könnte. Die Deletion von *RVS167* führte zu einer Verschiebung der Aktin-Patches in den hinteren Bereich der Hyphe, was vermutlich auf einen Defekt bei der Abschnürung des Vesikels zurückzuführen ist. Die Untersuchungen der Hyphenmorphologie und Aktin-Verteilung in den Deletionsstämmen zeigte, dass auch nach einem temporären Verlust der Polarität ( $\Delta syp1$ ,  $\Delta ap1801/2$ ), oder stärkeren Defekten im endozytischen Prozess ( $\Delta sla1$ ), die Hyphenstruktur in den Deletionsstämmen insgesamt erhalten blieb. Dies deutet darauf hin, dass die Endozytose vor allem bei der Erhaltung der Polaritätsachse eine Rolle spielt, nicht aber bei der Etablierung der Zellpolarität. Untersuchungen aus anderen filamentösen Pilzen unterstützen diese These (Shaw et al., 2011). Neben der Endozytose ist auch die Beschränkung der Exozytose auf die Hyphenspitzen ein entscheidender Faktor für die Zellpolarität und ein exaktes Zusammenspiel von Endo- und Exozytose ermöglichen das konstant polare Wachstum der Hyphen (Araujo-Bazán et al., 2008; Kohli et al., 2008b; Schmitz et al., 2006; Taheri-Talesh et al., 2008).

Die Beobachtung der Myo3/5-GFP-Signale in den Deletionsstämmen gibt Aufschluss darüber, inwiefern die Deletion einzelner Komponenten den Gesamtprozess beeinflusst. Im Stamm  $\Delta ede1$  konnte unter Berücksichtigung der Wachstumsgeschwindigkeit eine Verringerung der Signale festgestellt werden. In Anbetracht der vermuteten Funktion von Ede1 in der frühen Phase des Prozesses, ist dies vermutlich auf Störungen bei der Initiierung der Endozytosestelle zurückzuführen. Obwohl sich Ede1 und Myo3/5 zufolge der Koloalierungsstudien nicht gleichzeitig an der Endozytosestelle aufhalten, konnte auch eine Verlängerung der Lebenszeit der

Signale beobachtet werden. Aus *S. cerevisiae* ist bekannt, dass Ede1 eine Rolle bei der Rekrutierung der Proteine zur Endozytosestelle spielt (Stimpson et al., 2009). Auf diese Weise könnte die Lebenszeit der Myo3/5-Signale indirekt von Ede1 beeinflusst werden.

Im Stamm *Δrvs167* wurde eine Verlängerung der Lebenszeit der Myo3/5-Signale festgestellt. Dieser Phänotyp deckt sich mit den Beobachtungen aus *S. cerevisiae* und wird vermutlich durch eine Verzögerung bei der Abschnürung des Vesikels verursacht (Kaksonen et al., 2005; Youn et al., 2010). Unter Berücksichtigung der eher langsamen Wachstumsgeschwindigkeit dieses Stammes wurde ebenfalls eine Erhöhung in der Anzahl der Signale festgestellt, die bei der angewandten Messmethode vermutlich auf die verlängerte Lebenszeit der Myo3/5-Signale und nicht auf eine höhere Anzahl der Endozytosestellen zurückzuführen ist. Wie bereits bei den Aktin-Patches zeigte sich auch bei den Myo3/5-Signalen, bei Berücksichtigung der Wachstumsgeschwindigkeit, eine leichte Verschiebung der Signalzone in den hinteren Bereich der Hyphe. Diese Verschiebung lässt sich ebenfalls durch den Abschnürungsdefekt erklären, da die Verzögerung des endozytischen Prozesses, zusammen mit dem konstanten Spitzenwachstum dazu führt, dass sich die endozytischen Signale weiter von der Hyphenspitze entfernen.

Analog zu den starken Aktin-Defekten in *Δsla1*, war auch der Effekt auf das Myo3/5-Verhalten besonders stark ausgeprägt. Die Anzahl der Myo3/5-Signale ging drastisch zurück und die wenigen detektierten Signale wiesen deutlich längere Lebenszeiten auf und lagen weiter entfernt von der Hyphenspitze. Die Myo3/5-Signale schienen im Deletionsstamm zudem einen größeren Durchmesser und eine stärkere Intensität aufzuweisen, was ähnlich wie bei den Aktin-Patches, auf eine Agglomeration des Proteins hindeutet. Die endozytischen Defekte der *sla1*-Deletion in *S. cerevisiae* ähneln den für *A. gossypii* beobachteten Defekten, sind allerdings schwächer ausgeprägt. So zeigte Abp1, das wie Myo3/5 zur Phase „Aktin-Polymerisation“ gezählt wird, im *sla1*-Deletionsstamm in *S. cerevisiae* zwar eine längere Lebenszeit, verhielt sich aber ansonsten ähnlich wie im Wildtyp (Kaksonen et al., 2005). Auch eine Akkumulation von Aktin wurde im *sla1*-Deletionsstamm beobachtet, allerdings war die Anzahl der Aktin-Patches nicht so stark reduziert wie in *A. gossypii* (Holtzman et al., 1993). In *S. cerevisiae* trägt Sla1 zur Regulation des Aktin-Zytoskeletts bei, indem es die Aktivität des Arp2/3-aktivierenden Proteins Las17 inhibiert (Rodal et al., 2003). Die Deletion von *SLA1* führt so zu einer erhöhten und wahrscheinlich verfrühten Arp2/3-vermittelten Aktin-Polymerisation an den Endozytosestellen (Feliciano und Di Pietro, 2012; Higgs und Pollard, 2001; Holtzman et al., 1993). Die beobachtete Aktin-Akkumulation in *A. gossypii* sind somit vermutlich ebenfalls auf die fehlende Inhibierung der Aktin-Polymerisation

zurückzuführen. Die Akkumulation von Myo3/5 an den Endozytosestellen könnte eine Folge der erhöhten Aktin-Konzentration an diesen Stellen sein, da zumindest in *S. cerevisiae* gezeigt werden konnte, dass Aktin-Filamente zur Rekrutierung von ScMyo5 beitragen (Sun et al., 2006). Ein Unterschied der phänotypischen Ausprägung der *sla1*-Deletion in *S. cerevisiae* und *A. gossypii* war der Effekt auf die Lokalisierung der Aktin-Patches bzw. der Myo3/5-Signale. So schien die polarisierte Lokalisierung der Aktin-Patches in *S. cerevisiae* kaum beeinträchtigt zu sein (Holtzman et al., 1993), während in *A. gossypii* sowohl Aktin als auch Myo3/5 in den hinteren Bereich der Hyphe verlagert waren. Sla1 hat in *A. gossypii* somit vermutlich eine Funktion bei der korrekten Lokalisierung der Aktin-Patches. Eine Funktion bei der Lokalisierung von Aktin zu Orten des polaren Wachstums ist in *S. cerevisiae* und *Schizosaccharomyces pombe* unter anderem für Sla2 bekannt (Castagnetti et al., 2005; Holtzman et al., 1993). Da in *A. gossypii* kein Homologes von Sla2 existiert, ist es denkbar, dass die Funktion bei der Lokalisierung der Aktin-Patches hier zumindest teilweise durch Sla1 übernommen wurde. Das Aktin-Zytoskelett ist in Pilzen ein entscheidendes Element des endozytischen Prozesses, da es die notwendige Zugkraft für die Membraneinstülpung gegen den Turgordruck aufbaut (Aghamohammadzadeh und Ayscough, 2009; Engqvist-Goldstein und Drubin, 2003). Daher können durch die *sla1*-Deletion bedingte Störungen des Aktin-Zytoskeletts den Ablauf des Prozesses und somit auch die Aktivität des Motorproteins Myo3/5 stark beeinflussen. Da die Abweichungen bei den Aktin-Patches und Myo3/5-Signalen in *A. gossypii* allerdings sehr stark waren, ist es fraglich, ob die Funktionsfähigkeit des endozytischen Prozesses noch gewährleistet ist und es in  $\Delta sla1$  noch zu einer Internalisierung über diesen Endozytoseweg kommen kann.

Die unterschiedlich starken Auswirkungen der Deletion einzelner endozytischer Komponenten in *S. cerevisiae* und *A. gossypii* macht deutlich, dass eine exakt abgestimmte Proteinmaschinerie bei der Endozytose für das polare Hyphenwachstum eine große Rolle spielt. Dies gilt insbesondere während des schnellen Wachstums, da hierzu eine hohe Endozytoserate benötigt wird. So führen auch leichte Verzögerungen des Prozesses, wie z.B. in  $\Delta rvs167$  und  $\Delta ede1$  bereits zur Verminderung der Wachstumsgeschwindigkeit.

Da die Deletionsstämme deutliche Wachstumsdefekte aufwiesen, ist es überraschend, dass in keinem der Stämme eine starke Beeinträchtigung der Lipidaufnahme entdeckt werden konnte. Auch in dem Stamm  $\Delta sla1$ , in dem ein ausgeprägter Defekt des Aktin-Zytoskeletts nachgewiesen wurde, konnte der Lipidfarbstoff FM4-64 bereits nach wenigen Minuten an zellinternen

Strukturen detektiert werden. Feinere Unterschiede wie z.B. eine leichte Verzögerung der Aufnahme waren allerdings aufgrund der Messmethode nicht sichtbar, da das Myzel hierzu direkt nach der Zugabe des Farbstoffes mikroskopiert werden müsste. Da mehrere Waschschrte zur Entfernung des Farbstoffes aus dem Medium notwendig waren, konnte dies aber nicht gewährleistet werden. Auch eine Quantifizierung der Aufnahme lässt sich mittels dieser Methode nur schwer durchführen. Da das Myzel auch nach der Zentrifugation kein festes Pellet bildet, ist es möglich das auch bei sorgfältiger Durchführung der Waschschrte eine unterschiedliche Menge an Farbstoff in der Probe zurückbleibt. Es kann demnach nicht ausgeschlossen werden, dass es in den Deletionsstämmen zu einer geringfügigen Verzögerung in der Lipidaufnahme kommt. Bei einer ähnlichen Versuchsdurchführung konnte in *S. cerevisiae* in den Stämmen  $\Delta abp1$ ,  $\Delta sla1$  und  $\Delta rvs167$  eine Verminderung der FM4-64-Internalisierung festgestellt werden (Tuo et al., 2013). Daher ist anzunehmen, dass die Lipidaufnahme in *A. gossypii* durch die Deletion endozytischer Komponenten weniger beeinträchtigt wird.

Trotz der leichten Ungenauigkeit lässt das Ergebnis des Aufnahmetests die Vermutung zu, dass in *A. gossypii* ein weiterer Mechanismus zur Lipidaufnahme bzw. Endozytose existiert. In Säugerzellen sind mehrere unterschiedliche Endozytosewege bekannt, allerdings ist in *S. cerevisiae* bisher nur die Clathrin-abhängige Endozytose eindeutig nachgewiesen (Mayor und Pagano, 2007; Weinberg und Drubin, 2012). Ein weiterer Rho1-abhängiger Weg in *S. cerevisiae* wird aber vermutet (Prosser et al., 2011). Ein zusätzlicher Endozytosemechanismus könnte die kaum verminderte Lipidaufnahme im Stamm  $\Delta sla1$  erklären, bei dem eine starke Beeinträchtigung des bekannten Mechanismus nachgewiesen wurde. Es wäre denkbar, dass ein solcher Mechanismus relativ unspezifisch agiert oder andere Signalsequenzen erkennt. Für diese Theorie spräche auch das Ergebnis der Wsc1-Analysen. Aus Hefe ist bekannt, dass der Sensor anhand der Signalsequenz NPFDD von Sla1 erkannt und daraufhin durch die Clathrin-abhängige Endozytose internalisiert wird (Piao et al., 2007). Bei einer Deletion dieser Signalsequenz wird er nicht mehr endozytiert und verteilt sich über die gesamte Zelloberfläche. Ein entsprechender Phänotyp konnte auch bei der Deletion der Wsc1-Signalsequenz in *A. gossypii* beobachtet werden. Dies legt nahe, dass Wsc1 in *A. gossypii* durch die gleiche Proteinmaschinerie internalisiert wird wie in *S. cerevisiae*, allerdings spielt Clathrin dabei keine Rolle.

Bei der fluoreszenzmikroskopischen Analyse des Stammes Wsc1 $\Delta$ NPFDD-GFP fiel auf, dass kaum Signale in der Hyphenspitze zu sehen waren. Eine mögliche Erklärung für die Signalunterschiede in der Hyphenspitze und den subapikalen Bereichen hängt mit der Rigidität der Zellwand

zusammen. In *N. crassa* konnte gezeigt werden, dass die Zellwand in den subapikalen Bereichen verstärkt wird und somit starrer wird (Hunsley und Kay, 1976; Trinci und Collinge, 1975). Die sekretierten Proteine können im neu synthetisierten Spitzenbereich vermutlich schneller diffundieren und gelangen so in den subapikalen Bereich. Dort akkumulieren sie bei fehlender Internalisierung aufgrund der Rigidität der Zellwand, wodurch sich die Signalintensität im Gegensatz zur Spitze erhöht. Die Messung der Fluoreszenzintensitäten zeigte allerdings, dass im Stamm *Wsc1ΔNPFDD-GFP* deutlich weniger Signale in der Spitze detektiert werden konnten, als im Wildtyp-Stamm. Dies deutet auf eine verminderte Sekretion des Sensors hin. Es wäre denkbar, dass ein Teil des an der Spitze sekretierten Proteins mittels Recycling durch den Endozytoseweg bereitgestellt wird. Aus Säugerzellen und *S. cerevisiae* ist bekannt, dass einige Plasmamembran-Proteine nach der Internalisierung nicht abgebaut, sondern durch verschiedene Kompartimente wie Endosomen und Trans-Golgi-Netzwerk wieder zur Sekretion bereitgestellt werden (Lewis et al., 2000; Maxfield und McGraw, 2004). Auch für *Wsc1* in *S. cerevisiae* wird angenommen, dass es nach der Internalisierung recycelt wird (Piao et al., 2007). Auf diese Weise könnte ein Defekt in der Endozytose dazu führen, dass weniger *Wsc1* zur Sekretion an der Spitze bereitgestellt wird. Eine reduzierte Sekretion des Sensors könnte auch mit einem indirekten Effekt auf die Regulation von Polaritätsfaktoren zusammenhängen. So wird bei der *Wsc1*-vermittelten Signalweiterleitung im Zellintegritätsweg unter anderem das kleine G-Protein *Rho1* rekrutiert (Levin, 2005). *Rho1* ist ebenfalls eine wichtige Komponente bei der Regulation der gerichteten Sekretion, indem es die polarisierte Lokalisierung der Exozytosemaschinerie steuert (Guo et al., 2001). Eine erhöhte Menge an Sensor in den subapikalen Membranbereichen könnte durch die vermehrte Rekrutierung von *Rho1* ebenfalls die gerichtete Sekretion beeinträchtigen.

### 4.4 Die Funktion von Clathrin in *A. gossypii*

Die Beteiligung von Clathrin bei der Endozytose ist aus den verschiedensten eukaryotischen Organismen bekannt und spielt auch für die Endozytose in *S. cerevisiae* eine wichtige Rolle (Boettner et al., 2011a; Carroll et al., 2012; McMahon und Boucrot, 2011). Zu Beginn dieser Arbeit wurde darum vermutet, dass Clathrin auch in dem mit *S. cerevisiae* nah verwandten Ascomyceten *A. gossypii* ein Element der endozytischen Proteinmaschinerie darstellt. Die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen zeigten aber, dass sich Clathrin in *A. gossypii*

anders als die übrigen getesteten Proteine verhielt. Die Lebenszeit der Clathrin-Signale war sehr kurz, was bereits darauf hindeutete, dass Clathrin in *A. gossypii* nicht wie in Hefe zu den frühen endozytischen Proteinen gehört. Dies wurde durch die Lokalisierung der Signale unterstützt, da der Signalbereich der beiden Clathrin-Untereinheiten im Gegensatz zu den anderen Proteinen etwas weiter entfernt von der Hyphenspitze lag und zudem breiter auf die Hyphe verteilt war. Auch die Veränderung in der Anzahl der Signale in Bezug zur Wachstumsgeschwindigkeit schien bei den beiden Clathrin-Untereinheiten Chc1 und Clc1 anders auszufallen, als bei den übrigen untersuchten Proteinen. Bei den Koloalierungstests konnte weder mit einem Protein der frühen Phase (Ede1) noch mit Proteinen der Phase „Aktin-Polymerisation“ (Myo3/5, Abp1) eine Überlagerung festgestellt werden. In *S. cerevisiae* erreicht Clathrin als eines der ersten Proteine die Endozytosestelle und bleibt wie auch bei der Clathrin-abhängigen Endozytose in Säugerzellen bis zur Abschnürung an der Endozytosestelle detektierbar (Merrifield et al., 2005; Newpher et al., 2005). Hätte Clathrin eine Funktion beim endozytischen Prozess wäre eine Überlagerung mit den anderen endozytischen Proteinen zu erwarten gewesen. Die 3D-Rekonstruktion der fluoreszenzmikroskopischen Signale im Stamm mit markiertem Myo3/5 und Chc1 verdeutlicht, dass Clathrin im Gegensatz zu Myo3/5 nur an internen Strukturen lokalisiert ist und nicht an der Plasmamembran. Die Clathrin-Strukturen wiesen darüber hinaus eine hohe Beweglichkeit auf, was die kurzen Lebenszeiten der Clathrin-Signale erklären könnte. So handelt es sich bei den mittels TIRF-Mikroskopie detektierten Signalen vermutlich um interne Strukturen, die zufällig in die Nähe der Plasmamembran und somit in den Anregungsbereich gelangten.

Obwohl *A. gossypii* einen endozytischen Mechanismus verwendet, der eine ähnliche Proteinmaschinerie aufweist wie die aus *S. cerevisiae* bekannte Clathrin-abhängige Endozytose, zeigten die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen, dass Clathrin daran nicht beteiligt ist. Dieses Ergebnis stellt einen großen Unterschied zu den bisherigen Untersuchungen der Clathrin-Funktion in anderen Organismen dar. Zwar ist Clathrin auch in anderen Organismen an der Vesikel-Bildung an internen Kompartimenten wie dem Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) oder Endosomen beteiligt, allerdings konnte auch immer eine endozytische Funktion bestätigt werden (Brodsky, 2012; Chen et al., 2011; Chia et al., 2013). Es stellt sich daher die Frage, warum die endozytische Funktion von Clathrin in *A. gossypii* nicht vorhanden ist und ob dies dem Pilze eventuell einen Vorteil verschafft. Anhand von Untersuchungen an dem Nematoden *Caenorhabditis elegans* konnte gezeigt werden, dass Clathrin bei der extrem schnellen Endozytose an den Synapsen ebenfalls nicht beteiligt ist (Watanabe et al., 2014). Obwohl Clathrin

das endozytische Vesikel durch seine Gitterstruktur stabilisiert, könnte der komplexe Aufbau des Clathrin-Mantels zeitlich gesehen ein Nachteil bei der schnellen Prozessierung der endozytischen Vesikel sein (Hinrichsen et al., 2006; Miller und Heuser, 1984; Watanabe et al., 2013). In *A. gossypii* könnte ein endozytischer Mechanismus ohne Clathrin zur hohen Geschwindigkeit des Prozesses beitragen.

Die Funktion von Clathrin an diversen zellinternen Kompartimenten wurde bereits in vielen Organismen untersucht. In Säugerzellen und *S. cerevisiae* ist es am retrograden Proteintransport von den Endosomen zum TGN oder am Recycling von Proteinen aus den frühen Endosomen zurück zur Plasmamembran beteiligt (Bonifacino und Rojas, 2006; Johannes und Popoff, 2008; Nothwehr et al., 2000; Watanabe et al., 2014; Zhao und Keen, 2008). Die Lokalisierung der Clathrin-Signale im subapikalen Bereich der Hyphe deckt sich mit der Lokalisierung von Endosomen und TGN in anderen filamentösen Pilzen (Harris, 2013; Peñalva, 2010). Am TGN spielt Clathrin bei der Bildung exozytischer Vesikel und somit bei der Regulation der Sekretion eine Rolle (Brodsky et al., 2001; Robinson und Pimpl, 2014). Die Funktion von Clathrin bei der Sekretion erklärt die in dieser Arbeit beobachteten Zellwanddefekte und die hohe Lyserate der Clathrin-Deletionstämme. Auch in *S. pombe* konnte gezeigt werden, dass bei der Deletion des CLC1-Homologen die Zellwandbiosynthese gestört ist, da der Transport der Glucan-Synthase zur Zelloberfläche defekt ist (de León et al., 2013). Ähnlich wie bei der *clc1*-Deletion in *A. gossypii*, waren die Zellen verformt und wiesen Verdickungen an den Septen auf. Ein Defekt bei der Regulation der Sekretion könnte auch für die depolarisierte Verteilung der Aktin-Patches in den Clathrin-Deletionstämmen verantwortlich sein. Die Exozytose ist ein entscheidender Faktor bei der Etablierung der Zellpolarität, da sie die Sekretion von Polaritätsfaktoren auf die Wachstumszonen beschränkt (Kohli et al., 2008b; Riquelme, 2013; Taheri-Talesh et al., 2008). Defekte in diesem Mechanismus könnten den Aufbau einer Zellpolarität stören und dadurch auch die Endozytose beeinflussen. Da die Lokalisierungsstudien zeigen, dass Clathrin nicht an der Plasmamembran lokalisiert ist, lässt sich vermuten, dass die Clathrin-Deletion die Lokalisierung der Aktin-Patches nicht direkt, sondern durch eine Störung der Sekretion beeinträchtigt.

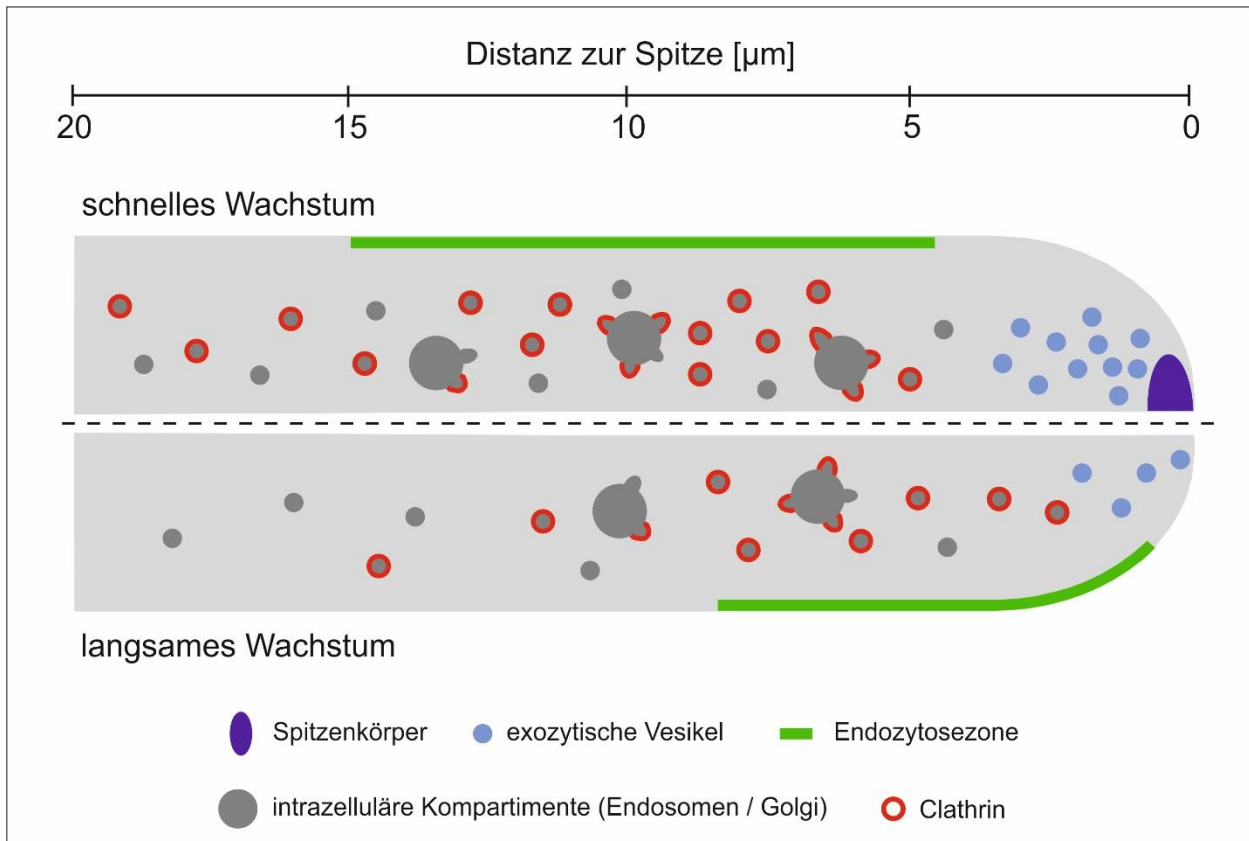
Das Fehlen von Clathrin-Signalen an der Plasmamembran deutet bereits darauf hin, dass Clathrin in *A. gossypii* bei der Endozytose keine Rolle spielt. Dies konnte durch den Komplementationstest in *S. cerevisiae* bestätigt werden. Die Untersuchungen zeigten, dass der Phänotyp des



Deletionsstammes  $\Delta Sccl1$  durch die Integration des *AgCLC1*-Gens nicht komplementiert wurde. Sowohl die Wachstumsdefekte, als auch die verminderte Endozytoserate blieben bestehen. Im Gegensatz dazu verhielt sich der Stamm mit dem chimären Gen, welches zusätzlich die Sla2-Bindedomäne aus *S. cerevisiae* enthielt, fast wie der Wildtyp. So konnten in diesem Stamm keine Defekte im Wachstum oder der Zellmorphologie beobachtet werden. Die Internalisierung des markierten  $\alpha$ -Faktors verlief zwar etwas langsamer als im Wildtyp, der Endozytosedefekt war allerdings im Vergleich zum Deletionsstamm  $\Delta Sccl1$  stark minimiert. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass die unterschiedliche Funktion von Clathrin in *A. gossypii* und *S. cerevisiae* auf eine fehlende Interaktion von Clc1 mit Sla2 zurückzuführen ist, für das in *A. gossypii* kein Homologes existiert. Paradoxerweise führt die Deletion des ScClc1-N-Terminus aber nicht zu einem ähnlichen Phänotyp wie die Deletion des gesamten Gens, sondern kann im Gegenteil sogar die Endozytosedefekte anderer Endozytosemutanten supprimieren (Boettner et al., 2011b). Die Interaktion von Clc1 mit Sla2 ist in *S. cerevisiae* demnach nicht für eine effiziente Endozytose notwendig. Da das chimäre Protein aus *AgClc1* und dem Clc1-N-Terminus aus *S. cerevisiae* aber den Phänotyp des Stammes  $\Delta Sccl1$  komplementiert, wäre es denkbar, dass die Interaktion zwischen Sla2 und Clc1 für eine effiziente Rekrutierung des chimären Proteins zur Endozytosestelle sorgt. Sla2, sowie sein Homologes aus Säugern (Hip1R) bindet sowohl an den N-terminus von Clc1, als auch an Aktin (Chen und Brodsky, 2005; Newpher, 2006). Durch die Studien in *S. cerevisiae* wird vermutet, dass die Bindung von Sla2 an Clc1 die Interaktion von Sla2 mit dem Aktin-Zytoskelett inhibiert (Boettner et al., 2011b). Dadurch wird die Anlagerung von Aktin an das sich bildende Vesikel auf die Halsregion beschränkt. Dieser Mechanismus könnte die Richtung der durch Aktin erzeugten Zugkraft regulieren. Die Suppression der Endozytosemutanten durch das N-terminal verkürzte Clc1 spricht allerdings auch dafür, dass die Beschränkung der Aktin-Anlagerung an das entstehende Vesikel den Prozess verlangsamen könnte. Das Fehlen dieses zusätzlichen Regulationmechanismus in *A. gossypii* könnte daher zu der höheren Geschwindigkeit des endozytischen Prozesses beitragen.

Insgesamt zeigen die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen und der Komplementationstest, dass Clathrin in *A. gossypii* nicht an der Endozytose beteiligt ist. Die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen zur Lokalisierung und Dynamik von Clathrin deuten auf Funktionen beim intrazellulären Transport an Endosomen und TGN hin, die auch aus anderen Organismen bekannt sind. Ein endozytischer Mechanismus ohne Clathrin könnte eine Folge der

Spezialisierung auf das konstant polare und schnelle Wachstum der Hyphen in *A. gossypii* sein. Die Ergebnisse dieser Arbeit ermöglichen die Erstellung eines Modells zum Spitzenwachstum in *A. gossypii* unter Einbeziehung der neuen Erkenntnisse der Clathrin-Funktion (Abbildung 34).



**Abbildung 34: Modell zum Spitzenwachstum in *A. gossypii* in Abhängigkeit zur Wachstumsgeschwindigkeit.** Bei schnellem Wachstum entfernt sich die Endozytosezone weiter von der Hyphenspitze und eine hohe Anzahl exozytischer Vesikel wird generiert. In der schnellen Wachstumsphase bilden die exozytischen Vesikel den Spitzenkörper. Sowohl bei langsamem als auch bei schnellem Wachstum sind Exo- und Endozytose räumlich voneinander getrennt. Clathrin befindet sich an intrazellulären Kompartimenten wie Endosomen und TGN.

## 5 Zusammenfassung

In schnell wachsenden Hyphen des filamentösen Pilzes *Ashbya gossypii* ist die Oberflächenvergrößerung bis zu 40-fach höher, als in den Knospen des nah verwandten Pilzes *Saccharomyces cerevisiae*. Um die Wachstumszonen auf die Hyphenspitzen zu begrenzen, müssen Polaritätsfaktoren wie Rezeptoren und Sensoren, sowie überschüssiges Membranmaterial in subapikalen Bereichen von der Zelloberfläche entfernt werden. Dies wird durch den Prozess der Endozytose erreicht. In *S. cerevisiae* ist der Hauptendozytoseweg die Clathrin- und Aktin-abhängige Endozytose und der Prozess ist bereits gut charakterisiert. *A. gossypii* besitzt Homologe zu fast allen Komponenten dieser endozytischen Maschinerie und ist daher besonders gut geeignet die Anpassung des endozytischen Prozesses an schnelles, polares Wachstum zu untersuchen.

Um die Endozytose während des polaren Hyphenwachstums zu analysieren, wurden neun homologe Proteine des aus *S. cerevisiae* bekannten Endozytosemechanismus mittels „live cell imaging“ und TIRF-Mikroskopie sowohl in langsam, als auch in schnell wachsenden Hyphen untersucht. Hierbei zeigte sich, dass die Endozytoserate in den schnell wachsenden Hyphen in *A. gossypii* im Vergleich zu Hefe-Zellen deutlich erhöht ist. Dies wird sowohl durch die Beschleunigung des endozytischen Prozesses, als auch durch eine erhöhte Anzahl an endozytischen Ereignissen pro  $\mu\text{m}^2$  Zelloberfläche erreicht. Die fluoreszenzmikroskopischen Analysen zeigten zudem, dass sich die Endozytosezone bei hoher Wachstumsgeschwindigkeit um ca. 3  $\mu\text{m}$  in den hinteren Hyphenbereich verlagert.

Ein wesentlicher Unterschied des endozytischen Prozesses in *A. gossypii* im Vergleich zu *S. cerevisiae* ist die Funktion von Clathrin. Clathrin kolokalisierte mit keiner der getesteten endozytischen Komponenten und konnte ausschließlich an zellinternen Strukturen detektiert werden. Dies deutet darauf hin, dass Clathrin bei der Endozytose in *A. gossypii* keine Rolle spielt und seine Funktion auf interne Kompartimente wie die Endosomen oder das Golgi-Netzwerk beschränkt ist. Die Unterschiede in der Clathrin-Funktion zwischen *S. cerevisiae* und *A. gossypii* hängen vermutlich mit einer minimalen Abweichung im Genset endozytischer Komponenten in *A. gossypii* zusammen. So besitzt *A. gossypii* kein Homologes zu *ScSla2*, welches in Hefe sowohl mit *Clc1*, als auch mit dem Aktin-Zytoskelett interagiert. Der Sequenzvergleich der *Clc1*-Proteine aus *S. cerevisiae* und *A. gossypii* zeigt, dass in *AgClc1* die *Sla2*-Bindedomäne fehlt. Mittels eines Komplementationstests konnte nachgewiesen werden, dass die Fusion dieser Bindedomäne an das *AgCLC1*-Gen ausreicht, um die endozytische Funktion von Clathrin in *S. cerevisiae* wieder herzustellen. In *S. cerevisiae* führt die Interaktion von *Sla2* und *Clc1* zu einer verminderten Aktin-Anlagerung an das entstehende Vesikel und dient als Regulationsmechanismus für die Membraneinstülpung. Das Fehlen dieses Mechanismus könnte in *A. gossypii* die Membraneinstülpung durch vermehrte Aktin-Anlagerung beschleunigen und auf diese Weise zur Anpassung an das schnelle Hyphenwachstum beitragen.

## 6 Summary

In a fast spreading mycelium of the filamentous fungus *Ashbya gossypii*, the surface expansion rate of a hypha is up to 40 times higher than that of a growing bud of its close relative *Saccharomyces cerevisiae*. To maintain polarity it is important to restrict the sites of surface growth to hyphal tips and emerging branches. Polarity factors and excessive membrane material have to be internalized subapically. This is achieved by endocytosis. In *S. cerevisiae* the major pathway for endocytosis is clathrin- and actin- dependent; this process has already been well characterized. *A. gossypii* has homologues genes coding for almost all endocytic machinery components and is, therefore, especially suitable to study the adaptation of the endocytic process to fast polar growth.

To investigate endocytosis during polar growth in *A. gossypii*, 9 fluorescently-labeled homologues of the yeast endocytic machinery were monitored either alone or pairwise, with Live-cell imaging and Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy (TIRFM) in fast and slow growing hyphae. In fast growing hyphae endocytosis was significantly increased compared to yeast cells. This was achieved by a faster endocytic process and an increase in the number of endocytic events per  $\mu\text{m}^2$  of the cell surface. Furthermore the endocytic zone was shifted about 3  $\mu\text{m}$  further away from the hyphal tip during fast growth.

A major difference in the process, when compared to that of *S. cerevisiae*, is the role of clathrin for endocytosis. Clathrin does not co-localize with any of the tested proteins and was detected only on internal structures. This suggests that it does not contribute to endocytosis in *A. gossypii*, but solely functions at internal compartments like endosomes or Golgi-network.

These differences to the established model of clathrin dependent endocytosis in *S. cerevisiae* could be caused by a minimal divergence in the gene set coding for endocytic proteins. *A. gossypii* does not have a homologue to *ScSla2* which in yeast interacts with *ScClc1* and actin. The amino acid alignment of *AgClc1* and *ScClc1* showed that the *Sla2*-binding domain is absent in *AgClc1*. A complementation test revealed that the fusion of the *ScSLA2*-binding domain to *AgCLC1* is sufficient to restore the endocytic function of clathrin in *S. cerevisiae*.

In *S. cerevisiae* the interaction of *Clc1* and *Sla2* results in a decreased attachment of actin to the clathrin coated pit and serves as a mechanisms to regulate membrane invagination. The absence of this regulatory step during endocytosis in *A. gossypii* could cause a higher amount of actin attached to the endocytic vesicle and thereby accelerates membrane invagination. Thus the absence of the endocytic function of clathrin could contribute to the adaptation to fast polar growth.

## 7 Literaturverzeichnis

- Abbe, E.** (1873). Beiträge zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung. *Arch. Für Mikrosk. Anat.* **9**, 413–418.
- Aghamohammadzadeh, S. und Ayscough, K. R.** (2009). Differential requirements for actin during yeast and mammalian endocytosis. *Nat. Cell Biol.* **11**, 1039–1042.
- Aghamohammadzadeh, S. und Ayscough, K. R.** (2010). The yeast actin cytoskeleton and its function in endocytosis. *Fungal Biol. Rev.* **24**, 37–46.
- Altmann-Jöhl, R. und Philippsen, P.** (1996). AgTHR4, a new selection marker for transformation of the filamentous fungus *Ashbya gossypii*, maps in a four-gene cluster that is conserved between *A. gossypii* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet. MGG* **250**, 69–80.
- Araujo-Bazán, L., Peñalva, M. A. und Espeso, E. A.** (2008). Preferential localization of the endocytic internalization machinery to hyphal tips underlies polarization of the actin cytoskeleton in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Microbiol.* **67**, 891–905.
- Arlt, H., Auffarth, K., Kurre, R., Lisse, D., Piehler, J. und Ungermann, C.** (2015). Spatio-temporal dynamics of membrane remodeling and fusion proteins during endocytic transport. *Mol. Biol. Cell* mbc.E14–08–1318.
- Ashby, S. F. und Nowell, W.** (1926). The Fungi of Stigmatomycosis. *Ann. Bot.* **os-40**, 69–84.
- Ayad-Durieux, Y., Knechtle, P., Goff, S., Dietrich, F. und Philippsen, P.** (2000). A PAK-like protein kinase is required for maturation of young hyphae and septation in the filamentous ascomycete *Ashbya gossypii*. *J. Cell Sci.* **113**, 4563–4575.
- Ayscough, K. R., Stryker, J., Pokala, N., Sanders, M., Crews, P. und Drubin, D. G.** (1997). High Rates of Actin Filament Turnover in Budding Yeast and Roles for Actin in Establishment and Maintenance of Cell Polarity Revealed Using the Actin Inhibitor Latrunculin-A. *J. Cell Biol.* **137**, 399–416.
- Bandmann, V. und Homann, U.** (2012). Clathrin-independent endocytosis contributes to uptake of glucose into BY-2 protoplasts: Glucose uptake via clathrin-independent endocytosis. *Plant J.* **70**, 578–584.
- Bazinet, C., Katzen, A. L., Morgan, M., Mahowald, A. P. und Lemmon, S. K.** (1993). The *Drosophila* clathrin heavy chain gene: clathrin function is essential in a multicellular organism. *Genetics* **134**, 1119–1134.
- Berepiki, A., Lichius, A., Shoji, J.-Y., Tilsner, J. und Read, N. D.** (2010). F-Actin Dynamics in *Neurospora crassa*. *Eukaryot. Cell* **9**, 547–557.
- Boettner, D. R., D’Agostino, J. L., Torres, O. T., Daugherty-Clarke, K., Uygur, A., Reider, A., Wendland, B., Lemmon, S. K. und Goode, B. L.** (2009). The F-BAR Protein Syp1 Negatively Regulates WASp-Arp2/3 Complex Activity during Endocytic Patch Formation. *Curr. Biol.* **19**, 1979–1987.
- Boettner, D. R., Chi, R. J. und Lemmon, S. K.** (2011a). Lessons from yeast for clathrin-mediated endocytosis. *Nat. Cell Biol.* **14**, 2–10.
- Boettner, D. R., Friesen, H., Andrews, B. und Lemmon, S. K.** (2011b). Clathrin light chain directs endocytosis by influencing the binding of the yeast Hip1R homologue, Sla2, to F-actin. *Mol. Biol. Cell* **22**, 3699–3714.
- Bonifacino, J. S. und Rojas, R.** (2006). Retrograde transport from endosomes to the trans-Golgi network. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**, 568–579.
- Brachmann, C. B., Davies, A., Cost, G. J., Caputo, E., Li, J., Hieter, P. und Boeke, J. D.** (1998). Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of

- strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast Chichester Engl.* **14**, 115–132.
- Brandt, D. T., Marion, S., Griffiths, G., Watanabe, T., Kaibuchi, K. und Grosse, R.** (2007). Dia1 and IQGAP1 interact in cell migration and phagocytic cup formation. *J. Cell Biol.* **178**, 193–200.
- Brodsky, F. M.** (2012). Diversity of Clathrin Function: New Tricks for an Old Protein. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **28**, 309–336.
- Brodsky, F. M., Chen, C.-Y., Knuehl, C., Towler, M. C. und Wakeham, D. E.** (2001). BIOLOGICAL BASKET WEAVING: Formation and Function of Clathrin-Coated Vesicles. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **17**, 517–568.
- Brown, F. D., Rozelle, A. L., Yin, H. L., Balla, T. und Donaldson, J. G.** (2001). Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and Arf6-regulated membrane traffic. *J. Cell Biol.* **154**, 1007–1018.
- Cardelli, J.** (2001). Phagocytosis and Macropinocytosis in *Dictyostelium*: Phosphoinositide-Based Processes, Biochemically Distinct. *Traffic* **2**, 311–320.
- Carroll, S. Y., Stimpson, H. E., Weinberg, J., Toret, C. P., Sun, Y. und Drubin, D. G.** (2012). Analysis of yeast endocytic site formation and maturation through a regulatory transition point. *Mol. Biol. Cell* **23**, 657–668.
- Castagnetti, S., Behrens, R. und Nurse, P.** (2005). End4/Sla2 is involved in establishment of a new growth zone in *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Cell Sci.* **118**, 1843–1850.
- Cataldo, A. M., Barnett, J. L., Pieroni, C. und Nixon, R. A.** (1997). Increased neuronal endocytosis and protease delivery to early endosomes in sporadic Alzheimer's disease: neuropathologic evidence for a mechanism of increased  $\beta$ -amyloidogenesis. *J. Neurosci.* **17**, 6142–6151.
- Chadda, R., Howes, M. T., Plowman, S. J., Hancock, J. F., Parton, R. G. und Mayor, S.** (2007). Cholesterol-Sensitive Cdc42 Activation Regulates Actin Polymerization for Endocytosis via the GEEC Pathway. *Traffic* **8**, 702–717.
- Chen, C.-Y. und Brodsky, F. M.** (2005). Huntingtin-interacting Protein 1 (Hip1) and Hip1-related Protein (Hip1R) Bind the Conserved Sequence of Clathrin Light Chains and Thereby Influence Clathrin Assembly in Vitro and Actin Distribution in Vivo. *J. Biol. Chem.* **280**, 6109–6117.
- Chen, X., Irani, N. G. und Friml, J.** (2011). Clathrin-mediated endocytosis: the gateway into plant cells. *Curr. Opin. Plant Biol.* **14**, 674–682.
- Chia, P. Z. C., Gunn, P. und Gleeson, P. A.** (2013). Cargo trafficking between endosomes and the trans-Golgi network. *Histochem. Cell Biol.* **140**, 307–315.
- Chidlow, J. H. und Sessa, W. C.** (2010). Caveolae, caveolins, and cavins: complex control of cellular signalling and inflammation. *Cardiovasc. Res.* **86**, 219–225.
- Chimini, G. und Chavrier, P.** (2000). Function of Rho family proteins in actin dynamics during phagocytosis and engulfment. *Nat. Cell Biol.* **2**, E191–E196.
- Chu, D. S., Pishvaei, B. und Payne, G. S.** (1996). The light chain subunit is required for clathrin function in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **271**, 33123–33130.
- Collinge, A. J. und Trinci, A. P. J.** (1974). Hyphal tips of wild-type and spreading colonial mutants of *Neurospora crassa*. *Arch. Microbiol.* **99**, 353–368.
- Conner, S. D. und Schmid, S. L.** (2003). Regulated portals of entry into the cell. *Nature* **422**, 37–44.
- Cope, M. J. T. V., Yang, S., Shang, C. und Drubin, D. G.** (1999). Novel Protein Kinases Ark1p and Prk1p Associate with and Regulate the Cortical Actin Cytoskeleton in Budding Yeast. *J. Cell Biol.* **144**, 1203–1218.

- Cosker, K. E. und Segal, R. A.** (2014). Neuronal Signaling through Endocytosis. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **6**, a020669–a020669.
- Dallies, N., François, J. und Paquet, V.** (1998). A new method for quantitative determination of polysaccharides in the yeast cell wall. Application to the cell wall defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **14**, 1297–1306.
- Damke, H., Baba, T., Blik, A. M. van der und Schmid, S. L.** (1995). Clathrin-independent pinocytosis is induced in cells overexpressing a temperature-sensitive mutant of dynamin. *J. Cell Biol.* **131**, 69–80.
- De Duve, C.** (1963). The lysosome. *Sci. Am.* **208**, 64–72.
- De León, N., Sharifmoghadam, M. R., Hoya, M., Curto, M.-Á., Doncel, C. und Valdivieso, M.-H.** (2013). Regulation of Cell Wall Synthesis by the Clathrin Light Chain Is Essential for Viability in *Schizosaccharomyces pombe*. *PLoS ONE* **8**, e71510.
- Delgado-Álvarez, D. L., Callejas-Negrete, O. A., Gómez, N., Freitag, M., Roberson, R. W., Smith, L. G. und Mouriño-Pérez, R. R.** (2010). Visualization of F-actin localization and dynamics with live cell markers in *Neurospora crassa*. *Fungal Genet. Biol.* **47**, 573–586.
- Dietrich, F. S., Voegeli, S., Brachat, S., Lerch, A., Gates, K., Steiner, S., Mohr, C., Pöhlmann, R., Luedi, P., Choi, S., et al.** (2004). The *Ashbya gossypii* Genome as a Tool for Mapping the Ancient *Saccharomyces cerevisiae* Genome. *Science* **304**, 304–307.
- Di Pietro, S. M., Cascio, D., Feliciano, D., Bowie, J. U. und Payne, G. S.** (2010). Regulation of clathrin adaptor function in endocytosis: novel role for the SAM domain. *EMBO J.* **29**, 1033–1044.
- Disanza, A., Frittoli, E., Palamidessi, A. und Scita, G.** (2009). Endocytosis and spatial restriction of cell signaling. *Mol. Oncol.* **3**, 280–296.
- Doherty, G. J. und McMahon, H. T.** (2009). Mechanisms of Endocytosis. *Annu. Rev. Biochem.* **78**, 857–902.
- Dores, M. R., Schnell, J. D., Maldonado-Baez, L., Wendland, B. und Hicke, L.** (2010). The Function of Yeast Epsin and Ede1 Ubiquitin-Binding Domains During Receptor Internalization. *Traffic* **11**, 151–160.
- Edeling, M. A., Smith, C. und Owen, D.** (2006). Life of a clathrin coat: insights from clathrin and AP structures. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**, 32–44.
- Ehrlich, M., Boll, W., van Oijen, A., Hariharan, R., Chandran, K., Nibert, M. L. und Kirchhausen, T.** (2004). Endocytosis by Random Initiation and Stabilization of Clathrin-Coated Pits. *Cell* **118**, 591–605.
- Engqvist-Goldstein, Å. E. Y. und Drubin, D. G.** (2003). Actin Assembly and Endocytosis: From Yeast to Mammals. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **19**, 287–332.
- Etienne-Manneville, S. und Hall, A.** (2002). Rho GTPases in cell biology. *Nature* **420**, 629–635.
- Feliciano, D. und Di Pietro, S. M.** (2012). SLAC, a complex between Sla1 and Las17, regulates actin polymerization during clathrin-mediated endocytosis. *Mol. Biol. Cell* **23**, 4256–4272.
- Flannagan, R. S., Jaumouillé, V. und Grinstein, S.** (2012). The Cell Biology of Phagocytosis. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* **7**, 61–98.
- Frick, M., Bright, N. A., Riento, K., Bray, A., Merrified, C. und Nichols, B. J.** (2007). Coassembly of Flotillins Induces Formation of Membrane Microdomains, Membrane Curvature, and Vesicle Budding. *Curr. Biol.* **17**, 1151–1156.
- Gagny, B., Wiederkehr, A., Dumoulin, P., Winsor, B., Riezman, H. und Haguener-Tsapis, R.** (2000). A novel EH domain protein of *Saccharomyces cerevisiae*, Ede1p, involved in endocytosis. *J. Cell Sci.* **113**, 3309–3319.

- Galletta, B. J., Mooren, O. L. und Cooper, J. A.** (2010). Actin dynamics and endocytosis in yeast and mammals. *Curr. Opin. Biotechnol.* **21**, 604–610.
- Gietz, R. D. und Sugino, A.** (1988). New yeast-*Escherichia coli* shuttle vectors constructed with in vitro mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites. *Gene* **74**, 527–534.
- Gietz, R. D., Schiestl, R. H., Willems, A. R. und Woods, R. A.** (1995). Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure. *Yeast* **11**, 355–360.
- Glebov, O. O., Bright, N. A. und Nichols, B. J.** (2006). Flotillin-1 defines a clathrin-independent endocytic pathway in mammalian cells. *Nat. Cell Biol.* **8**, 46–54.
- Glodowski, D. R., Chen, C. C.-H., Schaefer, H., Grant, B. D. und Rongo, C.** (2007). RAB-10 Regulates Glutamate Receptor Recycling in a Cholesterol-dependent Endocytosis Pathway. *Mol. Biol. Cell* **18**, 4387–4396.
- Goodman, A., Goode, B. L., Matsudaira, P. und Fink, G. R.** (2003). The *Saccharomyces cerevisiae* Calponin/Transgelin Homolog Scp1 Functions with Fimbrin to Regulate Stability and Organization of the Actin Cytoskeleton. *Mol. Biol. Cell* **14**, 2617–2629.
- Gordon, J. L., Byrne, K. P. und Wolfe, K. H.** (2009). Additions, Losses, and Rearrangements on the Evolutionary Route from a Reconstructed Ancestor to the Modern *Saccharomyces cerevisiae* Genome. *PLoS Genet* **5**, e1000485.
- Grimmer, S., Deurs, B. van und Sandvig, K.** (2002). Membrane ruffling and macropinocytosis in A431 cells require cholesterol. *J. Cell Sci.* **115**, 2953–2962.
- Guo, W., Tamanoi, F. und Novick, P.** (2001). Spatial regulation of the exocyst complex by Rho1 GTPase. *Nat. Cell Biol.* **3**, 353–360.
- Hanahan, D.** (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**, 557–580.
- Hanahan, D. und Weinberg, R. A.** (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* **144**, 646–674.
- Harris, S. D.** (2013). Golgi organization and the apical extension of fungal hyphae: an essential relationship. *Mol. Microbiol.* **89**, 212–215.
- Hauke, V.** (2005). Phosphoinositide regulation of clathrin-mediated endocytosis. *Biochem. Soc. Trans.* **33**, 1285–1289.
- Helfer, H.** (2001). Effects of myosin gene deletions on growth and development of the filamentous fungus *Ashbya gossypii*. *Biozentrum Univ. Basel*.
- Henne, W. M., Boucrot, E., Meinecke, M., Evergren, E., Vallis, Y., Mittal, R. und McMahon, H. T.** (2010). FCHO Proteins Are Nucleators of Clathrin-Mediated Endocytosis. *Science* **328**, 1281–1284.
- Herskowitz, I.** (1988). Life cycle of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.* **52**, 536–553.
- Higgs, H. N. und Pollard, T. D.** (2001). Regulation of actin filament network formation through Arp2/3 complex: Activation by a Diverse Array of Proteins. *Annu. Rev. Biochem.* **70**, 649–676.
- Hinrichsen, L., Meyerholz, A., Groos, S. und Ungewickell, E. J.** (2006). Bending a membrane: How clathrin affects budding. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 8715–8720.
- Holstein, S. E., Drucker, M. und Robinson, D. G.** (1994). Identification of a beta-type adaptin in plant clathrin-coated vesicles. *J. Cell Sci.* **107**, 945–953.
- Holtzman, D. A., Yang, S. und Drubin, D. G.** (1993). Synthetic-lethal interactions identify two novel genes, *SLA1* and *SLA2*, that control membrane cytoskeleton assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* **122**, 635–644.



- Homma, K., Terui, S., Minemura, M., Qadota, H., Anraku, Y., Kanaho, Y. und Ohya, Y.** (1998). Phosphatidylinositol-4-phosphate 5-Kinase Localized on the Plasma Membrane Is Essential for Yeast Cell Morphogenesis. *J. Biol. Chem.* **273**, 15779–15786.
- Hoppe, A. D. und Swanson, J. A.** (2004). Cdc42, Rac1, and Rac2 Display Distinct Patterns of Activation during Phagocytosis. *Mol. Biol. Cell* **15**, 3509–3519.
- Howard, J. P., Hutton, J. L., Olson, J. M. und Payne, G. S.** (2002). Sla1p serves as the targeting signal recognition factor for NPF(1,2)D-mediated endocytosis. *J. Cell Biol.* **157**, 315–326.
- Huang, K. M., D'Hondt, K., Riezman, H. und Lemmon, S. K.** (1999). Clathrin functions in the absence of heterotetrameric adaptors and AP180-related proteins in yeast. *EMBO J.* **18**, 3897–3908.
- Hung, C.-H., Qiao, X., Lee, P.-T. und Lee, M. G.-S.** (2004). Clathrin-Dependent Targeting of Receptors to the Flagellar Pocket of Procyclic-Form *Trypanosoma brucei*. *Eukaryot. Cell* **3**, 1004–1014.
- Hunsley, D. und Kay, D.** (1976). Wall Structure of the *Neurospora* Hyphal Apex: Immunofluorescent Localization of Wall Surface Antigens. *J. Gen. Microbiol.* **95**, 233–248.
- Idrissi, F.-Z. und Geli, M. I.** (2013). Zooming in on the molecular mechanisms of endocytic budding by time-resolved electron microscopy. *Cell. Mol. Life Sci.* **71**, 641–657.
- Inoue, T., Hayashi, T., Takechi, K. und Agata, K.** (2007). Clathrin-mediated endocytic signals are required for the regeneration of, as well as homeostasis in, the planarian CNS. *Development* **134**, 1679–1689.
- Johannes, L. und Popoff, V.** (2008). Tracing the Retrograde Route in Protein Trafficking. *Cell* **135**, 1175–1187.
- Jonsdottir, G. A. und Li, R.** (2004). Dynamics of yeast Myosin I: evidence for a possible role in scission of endocytic vesicles. *Curr. Biol.* **14**, 1604–1609.
- Jose, M., Tollis, S., Nair, D., Sibarita, J.-B. und McCusker, D.** (2013). Robust polarity establishment occurs via an endocytosis-based cortical corralling mechanism. *J. Cell Biol.* **200**, 407–418.
- Kaksonen, M., Sun, Y. und Drubin, D. G.** (2003). A pathway for association of receptors, adaptors, and actin during endocytic internalization. *Cell* **115**, 475–487.
- Kaksonen, M., Toret, C. P. und Drubin, D. G.** (2005). A Modular Design for the Clathrin- and Actin-Mediated Endocytosis Machinery. *Cell* **123**, 305–320.
- Kanaseki, T. und Kadota, K.** (1969). The "vesicle in a basket" A Morphological Study of the Coated Vesicle Isolated from the Nerve Endings of the Guinea Pig Brain, with Special Reference to the Mechanism of Membrane Movements. *J. Cell Biol.* **42**, 202–220.
- Karpova, T. S., Reck-Peterson, S. L., Elkind, N. B., Mooseker, M. S., Novick, P. J. und Cooper, J. A.** (2000). Role of Actin and Myo2p in Polarized Secretion and Growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* **11**, 1727–1737.
- Kaufmann, A.** (2009). A plasmid collection for PCR-based gene targeting in the filamentous ascomycete *Ashbya gossypii*. *Fungal Genet. Biol. FG B* **46**, 595–603.
- Kaufmann, A. und Philippsen, P.** (2008). Of Bars and Rings: Hof1-Dependent Cytokinesis in Multiseptated Hyphae of *Ashbya gossypii*. *Mol. Cell. Biol.* **29**, 771–783.
- Kellis, M., Birren, B. W. und Lander, E. S.** (2004). Proof and evolutionary analysis of ancient genome duplication in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* **428**, 617–624.
- Kirchhausen, T.** (2000). Clathrin. *Annu. Rev. Biochem.* **69**, 699–727.
- Kirchrath, L., Lorberg, A., Schmitz, H. P., Gengenbacher, U. und Heinisch, J. J.** (2000). Comparative genetic and physiological studies of the MAP kinase Mpk1p from *Kluyveromyces lactis* and *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Mol. Biol.* **300**, 743–758.

- Kirkham, M. und Parton, R. G. (2005). Clathrin-independent endocytosis: New insights into caveolae and non-caveolar lipid raft carriers. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* **1745**, 273–286.
- Klis, F. M., Mol, P., Hellingwerf, K. und Brul, S. (2002). Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*.
- Knechtle, P., Dietrich, F. und Philippsen, P. (2003). Maximal polar growth potential depends on the polarisome component AgSpa2 in the filamentous fungus *Ashbya gossypii*. *Mol. Biol. Cell* **14**, 4140–4154.
- Knechtle, P., Wendland, J. und Philippsen, P. (2006). The SH3/PH Domain Protein AgBoi1/2 Collaborates with the Rho-Type GTPase AgRho3 To Prevent Nonpolar Growth at Hyphal Tips of *Ashbya gossypii*. *Eukaryot. Cell* **5**, 1635–1647.
- Kohli, M., Buck, S. und Schmitz, H.-P. (2008a). The function of two closely related Rho proteins is determined by an atypical switch I region. *J. Cell Sci.* **121**, 1065–1075.
- Kohli, M., Galati, V., Boudier, K., Roberson, R. W. und Philippsen, P. (2008b). Growth-speed-correlated localization of exocyst and polarisome components in growth zones of *Ashbya gossypii* hyphal tips. *J. Cell Sci.* **121**, 3878–3889.
- Kölling, R. und Hollenberg, C. P. (1994). The ABC-transporter Ste6 accumulates in the plasma membrane in a ubiquitinated form in endocytosis mutants. *EMBO J.* **13**, 3261–3271.
- Kukulski, W., Schorb, M., Kaksonen, M. und Briggs, J. A. G. (2012). Plasma Membrane Reshaping during Endocytosis Is Revealed by Time-Resolved Electron Tomography. *Cell* **150**, 508–520.
- Lamaze, C., Dujancourt, A., Baba, T., Lo, C. G., Benmerah, A. und Dautry-Varsat, A. (2001). Interleukin 2 Receptors and Detergent-Resistant Membrane Domains Define a Clathrin-Independent Endocytic Pathway. *Mol. Cell* **7**, 661–671.
- Le Clainche, C. und Carlier, M.-F. (2008). Regulation of Actin Assembly Associated With Protrusion and Adhesion in Cell Migration. *Physiol. Rev.* **88**, 489–513.
- Legendre-Guillemain, V., Metzler, M., Charbonneau, M., Gan, L., Chopra, V., Philie, J., Hayden, M. R. und McPherson, P. S. (2002). HIP1 and HIP12 Display Differential Binding to F-actin, AP2, and Clathrin IDENTIFICATION OF A NOVEL INTERACTION WITH CLATHRIN LIGHT CHAIN. *J. Biol. Chem.* **277**, 19897–19904.
- Lemmon, S. und Jones, E. (1987). Clathrin requirement for normal growth of yeast. *Science* **238**, 504–509.
- Levin, D. E. (2005). Cell Wall Integrity Signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **69**, 262–291.
- Lewis, M. J., Nichols, B. J., Prescianotto-Baschong, C., Riezman, H. und Pelham, H. R. B. (2000). Specific Retrieval of the Exocytic SNARE Snc1p from Early Yeast Endosomes. *Mol. Biol. Cell* **11**, 23–38.
- Li, R. (1997). Bee1, a Yeast Protein with Homology to Wiscott-Aldrich Syndrome Protein, Is Critical for the Assembly of Cortical Actin Cytoskeleton. *J. Cell Biol.* **136**, 649–658.
- Lin, M.-C., Galletta, B. J., Sept, D. und Cooper, J. A. (2010). Overlapping and distinct functions for cofilin, coronin and Aip1 in actin dynamics in vivo. *J. Cell Sci.* **123**, 1329–1342.
- Liu, J., Kaksonen, M., Drubin, D. G. und Oster, G. (2006). Endocytic vesicle scission by lipid phase boundary forces. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 10277–10282.
- Loerke, D., Mettlen, M., Yarar, D., Jaqaman, K., Jaqaman, H., Danuser, G. und Schmid, S. L. (2009). Cargo and Dynamin Regulate Clathrin-Coated Pit Maturation. *PLoS Biol* **7**, e1000057.

- Longtine, M. S., McKenzie, A., Demarini, D. J., Shah, N. G., Wach, A., Brachat, A., Philippsen, P. und Pringle, J. R.** (1998). Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast Chichester Engl.* **14**, 953–961.
- Maldonado-Báez, L., Dores, M. R., Perkins, E. M., Drivas, T. G., Hicke, L. und Wendland, B.** (2008). Interaction between Epsin/Yap180 adaptors and the scaffolds Ede1/Pan1 is required for endocytosis. *Mol. Biol. Cell* **19**, 2936–2948.
- Maldonado-Báez, L., Williamson, C. und Donaldson, J. G.** (2013). Clathrin-independent endocytosis: A cargo-centric view. *Exp. Cell Res.* **319**, 2759–2769.
- Marks, J., Hagan, I. M. und Hyams, J. S.** (1986). Growth Polarity and Cytokinesis in Fission Yeast: The Role of the Cytoskeleton. *J. Cell Sci.* **1986**, 229–241.
- Marks, B., Stowell, M. H. B., Vallis, Y., Mills, I. G., Gibson, A., Hopkins, C. R. und McMahon, H. T.** (2001). GTPase activity of dynamin and resulting conformation change are essential for endocytosis. *Nature* **410**, 231–235.
- Marsh, M. und Helenius, A.** (2006). Virus Entry: Open Sesame. *Cell* **124**, 729–740.
- Maxfield, F. R. und McGraw, T. E.** (2004). Endocytic recycling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**, 121–132.
- May, R. C., Caron, E., Hall, A. und Machesky, L. M.** (2000). Involvement of the Arp2/3 complex in phagocytosis mediated by FcγR or CR3. *Nat. Cell Biol.* **2**, 246–248.
- Mayor, S. und Pagano, R. E.** (2007). Pathways of clathrin-independent endocytosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 603–612.
- McMahon, H. T. und Boucrot, E.** (2011). Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **12**, 517–533.
- Merrifield, C. J., Perrais, D. und Zenisek, D.** (2005). Coupling between Clathrin-Coated-Pit Invagination, Cortactin Recruitment, and Membrane Scission Observed in Live Cells. *Cell* **121**, 593–606.
- Mettlen, M., Stoeber, M., Loerke, D., Antonescu, C. N., Danuser, G. und Schmid, S. L.** (2009). Endocytic Accessory Proteins Are Functionally Distinguished by Their Differential Effects on the Maturation of Clathrin-coated Pits. *Mol. Biol. Cell* **20**, 3251–3260.
- Mettlen, M., Loerke, D., Yarar, D., Danuser, G. und Schmid, S. L.** (2010). Cargo- and adaptor-specific mechanisms regulate clathrin-mediated endocytosis. *J. Cell Biol.* **188**, 919–933.
- Miller, T. M. and Heuser, J. E.** (1984). Endocytosis of synaptic vesicle membrane at the frog neuromuscular junction. *J. Cell Biol.* **98**, 685–698.
- Mitsunari, T., Nakatsu, F., Shioda, N., Love, P. E., Grinberg, A., Bonifacino, J. S. und Ohno, H.** (2005). Clathrin Adaptor AP-2 Is Essential for Early Embryonal Development. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 9318–9323.
- Mooren, O. L., Galletta, B. J. und Cooper, J. A.** (2012). Roles for Actin Assembly in Endocytosis. *Annu. Rev. Biochem.* **81**, 661–686.
- Moreau, V., Galan, J. M., Devilliers, G., Haguenaer-Tsapis, R. und Winsor, B.** (1997). The yeast actin-related protein Arp2p is required for the internalization step of endocytosis. *Mol. Biol. Cell* **8**, 1361–1375.
- Morgan, G. W., Hall, B. S., Denny, P. W., Field, M. C. und Carrington, M.** (2002). The endocytic apparatus of the kinetoplastida. Part II: machinery and components of the system. *Trends Parasitol.* **18**, 540–546.
- Mosesson, Y., Mills, G. B. und Yarden, Y.** (2008). Derailed endocytosis: an emerging feature of cancer. *Nat. Rev. Cancer* **8**, 835–850.

- Mueller, S. C. und Branton, D.** (1984). Identification of coated vesicles in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* **98**, 341–346.
- Naslavsky, N., Weigert, R. und Donaldson, J. G.** (2004). Characterization of a Nonclathrin Endocytic Pathway: Membrane Cargo and Lipid Requirements. *Mol. Biol. Cell* **15**, 3542–3552.
- Newpher, T. M.** (2006). Novel Function of Clathrin Light Chain in Promoting Endocytic Vesicle Formation. *Mol. Biol. Cell* **17**, 4343–4352.
- Newpher, T. M. und Lemmon, S. K.** (2006). Clathrin is Important for Normal Actin Dynamics and Progression of Sla2p-Containing Patches During Endocytosis in Yeast: Clathrin Functions During Yeast Endocytosis. *Traffic* **7**, 574–588.
- Newpher, T. M., Smith, R. P., Lemmon, V. und Lemmon, S. K.** (2005). In Vivo Dynamics of Clathrin and Its Adaptor-Dependent Recruitment to the Actin-Based Endocytic Machinery in Yeast. *Dev. Cell* **9**, 87–98.
- Ni, L. und Snyder, M.** (2001). A Genomic Study of the Bipolar Bud Site Selection Pattern in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* **12**, 2147–2170.
- Nixon, R. A., Cataldo, A. M. und Mathews, P. M.** (2000). The endosomal-lysosomal system of neurons in Alzheimer's disease pathogenesis: a review. *Neurochem. Res.* **25**, 1161–1172.
- Nothwehr, S. F., Ha, S.-A. und Bruinsma, P.** (2000). Sorting of Yeast Membrane Proteins into an Endosome-to-Golgi Pathway Involves Direct Interaction of Their Cytosolic Domains with Vps35p. *J. Cell Biol.* **151**, 297–310.
- Oh, P., McIntosh, D. P. und Schnitzer, J. E.** (1998). Dynamin at the Neck of Caveolae Mediates Their Budding to Form Transport Vesicles by GTP-driven Fission from the Plasma Membrane of Endothelium. *J. Cell Biol.* **141**, 101–114.
- Osmani, N., Peglion, F., Chavrier, P. und Etienne-Manneville, S.** (2010). Cdc42 localization and cell polarity depend on membrane traffic. *J. Cell Biol.* **191**, 1261–1269.
- Owen, D. J., Collins, B. M. und Evans, P. R.** (2004). ADAPTORS FOR CLATHRIN COATS: Structure and Function. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **20**, 153–191.
- Parton, R. G. und Simons, K.** (2007). The multiple faces of caveolae. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 185–194.
- Parton, R. G., Hanzal-Bayer, M. und Hancock, J. F.** (2006). Biogenesis of caveolae: a structural model for caveolin-induced domain formation. *J. Cell Sci.* **119**, 787–796.
- Payne, G. S. und Schekman, R.** (1985). A test of clathrin function in protein secretion and cell growth. *Science* **230**, 1009–1014.
- Payne, G. S., Baker, D., van Tuinen, E. und Schekman, R.** (1988). Protein transport to the vacuole and receptor-mediated endocytosis by clathrin heavy chain-deficient yeast. *J. Cell Biol.* **106**, 1453–1461.
- Pearse, B. M.** (1976). Clathrin: a unique protein associated with intracellular transfer of membrane by coated vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **73**, 1255–1259.
- Peñalva, M. Á.** (2010). Endocytosis in filamentous fungi: Cinderella gets her reward. *Curr. Opin. Microbiol.* **13**, 684–692.
- Philippsen, P., Kaufmann, A. und Schmitz, H.-P.** (2005). Homologues of yeast polarity genes control the development of multinucleated hyphae in *Ashbya gossypii*. *Curr. Opin. Microbiol.* **8**, 370–377.
- Piao, H. L., Machado, I. M. und Payne, G. S.** (2007). NPFxD-mediated endocytosis is required for polarity and function of a yeast cell wall stress sensor. *Mol. Biol. Cell* **18**, 57–65.
- Picco, A., Mund, M., Ries, J., Nédélec, F. und Kaksonen, M.** (2015). Visualizing the functional architecture of the endocytic machinery. *eLife* e04535.

- Pollard, T. D.** (2003). The cytoskeleton, cellular motility and the reductionist agenda. *Nature* **422**, 741–745.
- Prillinger, H., Schweigkofler, W., Breitenbach, M., Briza, P., Staudacher, E., Lopandic, K., Molnar, O., Weigang, F., Ibl, M. und Ellinger, A.** (1997). Phytopathogenic filamentous (*Ashbya*, *Eremothecium*) and dimorphic fungi (*Holleya*, *Nematospora*) with needle-shaped ascospores as new members within the *Saccharomycetaceae*. *Yeast* **13**, 945–960.
- Prosser, D. C. and Wendland, B.** (2012). Conserved roles for yeast Rho1 and mammalian RhoA GTPases in clathrin-independent endocytosis. *Small GTPases* **3**, 229–235.
- Prosser, D. C., Drivas, T. G., Maldonado-Baez, L. und Wendland, B.** (2011). Existence of a novel clathrin-independent endocytic pathway in yeast that depends on Rho1 and formin. *J. Cell Biol.* **195**, 657–671.
- Pruyne, D. und Bretscher, A.** (2000). Polarization of cell growth in yeast. *J. Cell Sci.* **113**, 571–585.
- Radhakrishna, H. und Donaldson, J. G.** (1997). ADP-Ribosylation Factor 6 Regulates a Novel Plasma Membrane Recycling Pathway. *J. Cell Biol.* **139**, 49–61.
- Rayleigh, Lord** (1907). On the Dynamical Theory of Gratings. *Proc. R. Soc. Lond. Ser. Contain. Pap. Math. Phys. Character* **79**, 399–416.
- Reider, A., Barker, S. L., Mishra, S. K., Im, Y. J., Maldonado-Báez, L., Hurley, J. H., Traub, L. M. und Wendland, B.** (2009). Syp1 is a conserved endocytic adaptor that contains domains involved in cargo selection and membrane tubulation. *EMBO J.* **28**, 3103–3116.
- Riquelme, M.** (2013). Tip Growth in Filamentous Fungi: A Road Trip to the Apex. *Annu. Rev. Microbiol.* **67**, 587–609.
- Riquelme, M., Yarden, O., Bartnicki-Garcia, S., Bowman, B., Castro-Longoria, E., Free, S. J., Fleißner, A., Freitag, M., Lew, R. R., Mouriño-Pérez, R., et al.** (2011). Architecture and development of the *Neurospora crassa* hypha – a model cell for polarized growth. *Fungal Biol.* **115**, 446–474.
- Robinson, D. G. und Pimpl, P.** (2014). Clathrin and post-Golgi trafficking: a very complicated issue. *Trends Plant Sci.* **19**, 134–139.
- Rodal, A. A., Manning, A. L., Goode, B. L. und Drubin, D. G.** (2003). Negative Regulation of Yeast WASp by Two SH3 Domain-Containing Proteins. *Curr. Biol.* **13**, 1000–1008.
- Sabharanjak, S., Sharma, P., Parton, R. G. und Mayor, S.** (2002). GPI-Anchored Proteins Are Delivered to Recycling Endosomes via a Distinct cdc42-Regulated, Clathrin-Independent Pinocytic Pathway. *Dev. Cell* **2**, 411–423.
- Šamaj, J., Read, N. D., Volkmann, D., Menzel, D. und Baluška, F.** (2005). The endocytic network in plants. *Trends Cell Biol.* **15**, 425–433.
- Sambrook, J.** (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3rd ed. Cold Spring Harbor, N.Y: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sarasij, R. C., Mayor, S. und Rao, M.** (2007). Chirality-Induced Budding: A Raft-Mediated Mechanism for Endocytosis and Morphology of Caveolae? *Biophys. J.* **92**, 3140–3158.
- Schmitz, H.-P. und Philippsen, P.** (2011). Evolution of multinucleated *Ashbya gossypii* hyphae from a budding yeast-like ancestor. *Fungal Biol.* **115**, 557–568.
- Schmitz, H.-P., Kaufmann, A., Köhli, M., Laissue, P. P. und Philippsen, P.** (2006). From function to shape: a novel role of a formin in morphogenesis of the fungus *Ashbya gossypii*. *Mol. Biol. Cell* **17**, 130–145.
- Scita, G. und Di Fiore, P. P.** (2010). The endocytic matrix. *Nature* **463**, 464–473.
- Seeger, M. und Payne, G. S.** (1992). A role for clathrin in the sorting of vacuolar proteins in the Golgi complex of yeast. *EMBO J.* **11**, 2811.

- Shapiro, S. Z. und Webster, P.** (1989). Coated Vesicles from the Protozoan Parasite *Trypanosoma brucei*: Purification and Characterization. *J. Protozool.* **36**, 344–349.
- Shaw, B. D., Chung, D.-W., Wang, C.-L., Quintanilla, L. A. und Upadhyay, S.** (2011). A role for endocytic recycling in hyphal growth. *Fungal Biol.* **115**, 541–546.
- Sigismund, S., Argenzio, E., Tosoni, D., Cavallaro, E., Polo, S. und Di Fiore, P. P.** (2008). Clathrin-Mediated Internalization Is Essential for Sustained EGFR Signaling but Dispensable for Degradation. *Dev. Cell* **15**, 209–219.
- Sigismund, S., Confalonieri, S., Ciliberto, A., Polo, S., Scita, G. und Di Fiore, P. P.** (2012). Endocytosis and Signaling: Cell Logistics Shape the Eukaryotic Cell Plan. *Physiol. Rev.* **92**, 273–366.
- Silveira, L. A., Wong, D. H., Masiarz, F. R. und Schekman, R.** (1990). Yeast clathrin has a distinctive light chain that is important for cell growth. *J. Cell Biol.* **111**, 1437–1449.
- Simons, K. und Toomre, D.** (2000). Lipid rafts and signal transduction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **1**, 31–39.
- Smaczynska-de Rooij, I. I., Allwood, E. G., Mishra, R., Booth, W. I., Aghamohammadzadeh, S., Goldberg, M. W. und Ayscough, K. R.** (2012). Yeast Dynamin Vps1 and Amphiphysin Rvs167 Function Together During Endocytosis. *Traffic* **13**, 317–328.
- Smith, M. G., Swamy, S. R. und Pon, L. A.** (2001). The life cycle of actin patches in mating yeast. *J. Cell Sci.* **114**, 1505–1513.
- Sorkin, A. und von Zastrow, M.** (2009). Endocytosis and signalling: intertwining molecular networks. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10**, 609–622.
- Soulard, A., Friant, S., Fitterer, C., Orange, C., Kaneva, G., Mirey, G. und Winsor, B.** (2005). The WASP/Las17p-interacting protein Bzz1p functions with Myo5p in an early stage of endocytosis. *Protoplasma* **226**, 89–101.
- Stahmann, K., Arst, H. N., Althöfer, H., Revuelta, J. L., Monschau, N., Schlüpen, C., Gätgens, C., Wiesenburg, A. und Schlösser, T.** (2001). Riboflavin, overproduced during sporulation of *Ashbya gossypii*, protects its hyaline spores against ultraviolet light. *Environ. Microbiol.* **3**, 545–550.
- Stan, R. V.** (2005). Structure of caveolae. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* **1746**, 334–348.
- Steiner, S., Wendland, J., Wright, M. C. und Philippsen, P.** (1995). Homologous recombination as the main mechanism for DNA integration and cause of rearrangements in the filamentous ascomycete *Ashbya gossypii*. *Genetics* **140**, 973–987.
- Stimpson, H. E., Toret, C. P., Cheng, A. T., Pauly, B. S. und Drubin, D. G.** (2009). Early-arriving Syp1p and Ede1p function in endocytic site placement and formation in budding yeast. *Mol. Biol. Cell* **20**, 4640–4651.
- Straede, A. und Heinisch, J. J.** (2007). Functional analyses of the extra- and intracellular domains of the yeast cell wall integrity sensors Mid2 and Wsc1. *FEBS Lett.* **581**, 4495–4500.
- Suetsugu, S., Toyooka, K. und Senju, Y.** (2010). Subcellular membrane curvature mediated by the BAR domain superfamily proteins. *Semin. Cell Dev. Biol.* **21**, 340–349.
- Sun, Y. und Drubin, D. G.** (2012). The functions of anionic phospholipids during clathrin-mediated endocytosis site initiation and vesicle formation. *J. Cell Sci.* **125**, 6157–6165.
- Sun, Y., Kaksonen, M., Madden, D. T., Schekman, R. und Drubin, D. G.** (2005). Interaction of Sla2p's ANTH Domain with PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> Is Important for Actin-dependent Endocytic Internalization. *Mol. Biol. Cell* **16**, 717–730.
- Sun, Y., Martin, A. C. und Drubin, D. G.** (2006). Endocytic Internalization in Budding Yeast Requires Coordinated Actin Nucleation and Myosin Motor Activity. *Dev. Cell* **11**, 33–46.

- Suzuki, R., Toshima, J. Y. und Toshima, J.** (2012). Regulation of clathrin coat assembly by Eps15 homology domain-mediated interactions during endocytosis. *Mol. Biol. Cell* **23**, 687–700.
- Taheri-Talesh, N., Horio, T., Araujo-Bazán, L., Dou, X., Espeso, E. A., Peñalva, M. A., Osmani, S. A. und Oakley, B. R.** (2008). The Tip Growth Apparatus of *Aspergillus nidulans*. *Mol. Biol. Cell* **19**, 1439–1449.
- Tan, P. K., Davis, N. G., Sprague, G. F. und Payne, G. S.** (1993). Clathrin facilitates the internalization of seven transmembrane segment receptors for mating pheromones in yeast. *J. Cell Biol.* **123**, 1707–1716.
- Toret, C. P., Lee, L., Sekiya-Kawasaki, M. und Drubin, D. G.** (2008). Multiple Pathways Regulate Endocytic Coat Disassembly in *Saccharomyces cerevisiae* for Optimal Downstream Trafficking. *Traffic* **9**, 848–859.
- Toshima, J. Y., Toshima, J., Kaksonen, M., Martin, A. C., King, D. S. und Drubin, D. G.** (2006). Spatial dynamics of receptor-mediated endocytic trafficking in budding yeast revealed by using fluorescent  $\alpha$ -factor derivatives. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 5793–5798.
- Traub, L. M.** (2009). Tickets to ride: selecting cargo for clathrin-regulated internalization. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10**, 583–596.
- Trinci, A. P. J.** (1974). A Study of the Kinetics of Hyphal Extension and Branch Initiation of Fungal Mycelia. *J. Gen. Microbiol.* **81**, 225–236.
- Trinci, A. P. J. und Collinge, A. J.** (1975). Hyphal Wall Growth in *Neurospora crassa* and *Geotrichum candidum*. *J. Gen. Microbiol.* **91**, 355–361.
- Trowbridge, I. S., Collawn, J. F. und Hopkins, C. R.** (1993). Signal-Dependent Membrane Protein Trafficking in the Endocytic Pathway. *Annu. Rev. Cell Biol.* **9**, 129–161.
- Tuo, S., Nakashima, K. und Pringle, J. R.** (2013). Role of Endocytosis in Localization and Maintenance of the Spatial Markers for Bud-Site Selection in Yeast. *PLoS ONE* **8**, e72123.
- Upadhyay, S. und Shaw, B. D.** (2008). The role of actin, fimbrin and endocytosis in growth of hyphae in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Microbiol.* **68**, 690–705.
- Vieira, J. und Messing, J.** (1991). New pUC-derived cloning vectors with different selectable markers and DNA replication origins. *Gene* **100**, 189–194.
- Walther, A. und Wendland, J.** (2003). Septation and cytokinesis in fungi. *Fungal Genet. Biol.* **40**, 187–196.
- Warren, D. T., Andrews, P. D., Gourlay, C. W. und Ayscough, K. R.** (2002). Sla1p couples the yeast endocytic machinery to proteins regulating actin dynamics. *J. Cell Sci.* **115**, 1703–1715.
- Watanabe, S., Liu, Q., Davis, M. W., Hollopeter, G., Thomas, N., Jorgensen, N. B. und Jorgensen, E. M.** (2013). Ultrafast endocytosis at *Caenorhabditis elegans* neuromuscular junctions. *eLife* **2**, e00723.
- Watanabe, S., Trimbuch, T., Camacho-Pérez, M., Rost, B. R., Brokowski, B., Söhl-Kielczynski, B., Felies, A., Davis, M. W., Rosenmund, C. und Jorgensen, E. M.** (2014). Clathrin regenerates synaptic vesicles from endosomes. *Nature* **515**, 228–233.
- Weinberg, J. und Drubin, D. G.** (2012). Clathrin-mediated endocytosis in budding yeast. *Trends Cell Biol.* **22**, 1–13.
- Wendland, J. und Philippsen, P.** (2001). Cell Polarity and Hyphal Morphogenesis Are Controlled by Multiple Rho-Protein Modules in the Filamentous Ascomycete *Ashbya gossypii*. *Genetics* **157**, 601–610.
- Wendland, J. und Walther, A.** (2005). *Ashbya gossypii*: a model for fungal developmental biology. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**, 421–429.
- Wendland, J., Ayad-Durieux, Y., Knechtle, P., Rebischung, C. und Philippsen, P.** (2000). PCR-based gene targeting in the filamentous fungus *Ashbya gossypii*. *Gene* **242**, 381–391.

- Wickerham, L. J., Flickinger, M. H. und Johnston, R. M.** (1946). The production of riboflavin by *Ashbya gossypii*. *Arch. Biochem.* **9**, 95–98.
- Wilbur, J. D., Chen, C.-Y., Manalo, V., Hwang, P. K., Fletterick, R. J. und Brodsky, F. M.** (2008). Actin Binding by Hip1 (Huntingtin-interacting Protein 1) and Hip1R (Hip1-related Protein) Is Regulated by Clathrin Light Chain. *J. Biol. Chem.* **283**, 32870–32879.
- Wilbur, J. D., Hwang, P. K., Ybe, J. A., Lane, M., Sellers, B. D., Jacobson, M. P., Fletterick, R. J. und Brodsky, F. M.** (2010). Conformation Switching of Clathrin Light Chain Regulates Clathrin Lattice Assembly. *Dev. Cell* **18**, 854–861.
- Wilk, S., Wittland, J., Thywissen, A., Schmitz, H.-P. und Heinisch, J. J.** (2010). A block of endocytosis of the yeast cell wall integrity sensors Wsc1 and Wsc2 results in reduced fitness in vivo. *Mol. Genet. Genomics* **284**, 217–229.
- Windler, S. L. und Bilder, D.** (2010). Endocytic Internalization Routes Required for Delta/Notch Signaling. *Curr. Biol.* **20**, 538–543.
- Wright, M. C. und Philippsen, P.** (1991). Replicative transformation of the filamentous fungus *Ashbya gossypii* with plasmids containing *Saccharomyces cerevisiae* ARS elements. *Gene* **109**, 99–105.
- Wu, F. und Yao, P. J.** (2009). Clathrin-mediated endocytosis and Alzheimer’s disease: An update. *Ageing Res. Rev.* **8**, 147–149.
- Yamada, E.** (1955). The fine structure of the gall bladder epithelium of the mouse. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **1**, 445–458.
- Yamada, H., Ohashi, E., Abe, T., Kusumi, N., Li, S.-A., Yoshida, Y., Watanabe, M., Tomizawa, K., Kashiwakura, Y., Kumon, H., et al.** (2007). Amphiphysin 1 Is Important for Actin Polymerization during Phagocytosis. *Mol. Biol. Cell* **18**, 4669–4680.
- Youn, J.-Y., Friesen, H., Kishimoto, T., Henne, W. M., Kurat, C. F., Ye, W., Ceccarelli, D. F., Sicheri, F., Kohlwein, S. D. und McMahon, H. T.** (2010). Dissecting BAR domain function in the yeast Amphiphysins Rvs161 and Rvs167 during endocytosis. *Mol. Biol. Cell* **21**, 3054–3069.
- Zhao, Y. und Keen, J. H.** (2008). Gyration Clathrin: Highly Dynamic Clathrin Structures Involved in Rapid Receptor Recycling. *Traffic* **9**, 2253–2264.
- Zhao, F., Zhao, Y., Liu, Y., Chang, X., Chen, C. und Zhao, Y.** (2011). Cellular Uptake, Intracellular Trafficking, and Cytotoxicity of Nanomaterials. *Small* **7**, 1322–1337.
- Zimmermann, F. K.** (1975). Procedures used in the induction of mitotic recombination and mutation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat. Res. Mutagen. Relat. Subj.* **31**, 71–86.
- Ziółkowska, N. E., Christiano, R. und Walther, T. C.** (2012). Organized living: formation mechanisms and functions of plasma membrane domains in yeast. *Trends Cell Biol.* **22**, 151–158.



## 8 Anhang

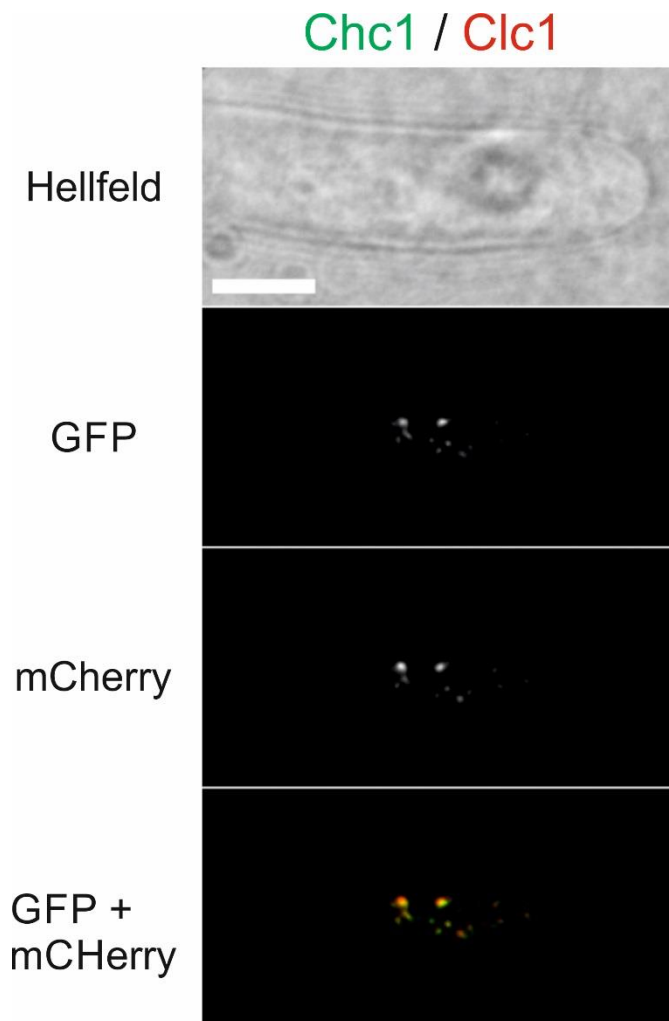


Abbildung Anhang 1: Kolokalisierung von Chc1-GFP und Clc1-mCherry.

**Tabelle Anhang 1: Berechnung der Überlagerungsdauer der Proteinpaare aus Lebenszeit und Grad der Kolokalisierung.** Berechnung erfolgte ohne Berücksichtigung der Standardabweichung.

Proteinpaar	Mittelwert	Mittelwert	Überlagerung [s] <sup>°</sup>	Überlagerung [s] <sup>°°</sup>	Mittelwert Überlagerung [s]
	Lebenszeit Protein 1 [s]	Lebenszeit Protein 2 [s]			
1. Myo3/5-GFP 2. Sla1-mCherry	5,05	8,88	2,17	3,69	2,93
1. Myo3/5-GFP 2. Abp1-mCherry	5,05	4,55	3,07	2,53	2,80
1. Rvs167-GFP 2. Myo3/5-mCherry	4,34	5,05	1,60	1,65	1,63
1. Ap1801/2-GFP 2. Sla1-mCherry	8,45	8,88	2,68	2,79	2,74
1. Las17-GFP 2. Sla1-mCherry	11,48	8,88	7,32	6,64	6,98

<sup>°</sup> und <sup>°°</sup>Berechnung mittels der in Tabelle 7 angegebenen Werte der einzelnen Referenzproteine und der Lebenszeit der einzelnen Proteine.

<sup>°</sup>: Lebenszeit(Referenzprotein 1)\*0,01\*Mittelwert Kolokalisierung (Referenzprotein 1)

<sup>°°</sup>: Lebenszeit(Referenzprotein 2)\*0,01\*Mittelwert Kolokalisierung (Referenzprotein 2)

## 9 Abkürzungsverzeichnis

AFM	Ashbya Vollmedium (Ashbya Full Medium)
Ag	<i>Ashbya gossypii</i>
ASC	Ashbya Minimalmedium (Ashbya Synthetic Complete)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DIC	engl.: differential interference contrast
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
F-Aktin	filamentöses Aktin
G418	Geneticinsulfat
GFP	grün-fluoreszierendes Protein
mCherry	monomeres rot-fluoreszierendes Protein
n	Anzahl der Wiederholungen
PCR	Polymerasekettenreaktion
YEPD	Hefe Vollmedium (yeast extract peptone dextrose)
h	Stunde
s	Sekunde
Sc	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
min	Minute
rpm	Umdrehungen pro Minute (revolutions per minute)
CME	Clathrin-abhängige Endozytose (clathrin-mediated endocytosis)
CIE	Clathrin-unabhängige Endozytose (clathrin independent endocytosis)
TGN	Trans-Golgi-Netzwerk
GTP	Guanosin-Triphosphat
PtdIns(4,5)P <sub>2</sub>	Phosphoinositol-4,5-bisphosphat
CLIC	engl.: clathrin- and dynamin-independent carriers
GEEC	engl.: glycosyl phosphatidylinositol-anchored protein enriched early endosomes
GPI-APs	engl.: glycosyl phosphatidylinositol-anchored proteins
TIRFM	engl.: total internal reflection fluorescence microscopy
NPF	engl.: nucleation promoting factor
MCS	engl.: multiple cloning site

Nukleotide und Aminosäuren sind nach dem Ein-Buchstaben-Code (IUPACIUB Commission on biochemical nomenclature) abgekürzt.

## 10 Danksagung

Vielen Dank...

an Dr. Hans-Peter Schmitz für die Betreuung dieser Arbeit, den Freiraum den ihr mir zur Bearbeitung des Themas gelassen hat sowie für die stetige Diskussionsbereitschaft und Unterstützung.

an Prof. Dr. Jürgen J. Heinisch für die Übernahme des Zweitgutachtens und die Diskussionsbereitschaft.

an Prof. Dr. Peter Philippsen für die schöne Zeit am Biozentrum in Basel, seine Unterstützung und die sehr produktiven und netten Fachgespräche.

an alle jetzigen und ehemaligen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Genetik für das freundliche Arbeitsklima, die ständige Hilfsbereitschaft und die nette Zusammenarbeit.

an viele weiteren Personen „außerhalb“ des Genetik-Labors. Insbesondere Rainer Kurre für die gute Zusammenarbeit bei der Erstellung des Auswertungsprogramms, Markus Staufenbiel und Stefan Wilmes für ihre Hilfe bei Mikroskopiefragen und Henning Arlt für die Ratschläge bei den  $\alpha$ -Faktor-Versuchen.

an meine Freunde für ihre Unterstützung und die Ablenkung vom Unikram wenn es mal notwendig war. Katrin danke ich zudem für das kritische Lesen der Arbeit.

an meine Familie, die mir mein Studium und somit meine Promotion ermöglicht und mich immer unterstützt hat.

an Jörg, der mich stets motiviert und unterstützt, sich mit mir freut und ärgert und immer für mich da ist.

## 11 Eidesstattliche Erklärung

### **Erklärung über die Eigenständigkeit der erbrachten wissenschaftlichen Leistung**

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quellen gekennzeichnet. Bei der Auswahl und Auswertung folgenden Materials haben mir die nachstehend aufgeführten Personen in der jeweils beschriebenen Weise unentgeltlich geholfen.

1. Die Erstellung des Programms zur quantitativen Auswertung der fluoreszenzmikroskopischen Daten erfolgte in Kooperation mit Rainer Kurre (Universität Osnabrück, Abteilung Biophysik).

Weitere Personen waren an der inhaltlichen materiellen Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich hierfür nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistung für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

.....  
(Ort, Datum)

.....  
(Unterschrift)