

**Die Rolle der Mikrotubuli und der mikrotubuli-
abhängigen Transportprozesse im polaren
Wachstum von *Ustilago maydis***

Dissertation

zur

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

dem Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Isabel Manns
aus Rotenburg a.d. Fulda

Marburg / Lahn 2005

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation angenommen
am: 27.06.2005.

Erstgutachter: PD Dr. Gero Steinberg
Zweitgutachter: Prof. Dr. Michael Bölker

Tag der mündlichen Prüfung am: 06.07.2005.

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von Januar 2003 bis Januar 2005 am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie in der Abteilung Organismische Interaktionen unter Betreuung von Herrn PD Dr. Gero Steinberg durchgeführt.

Teile dieser Arbeit werden veröffentlicht, sind eingereicht in:

Fuchs, U.; Manns, I.; Steinberg, G. (2005) The cytoskeleton has essential roles in dimorphic transition in the plant pathogen *Ustilago maydis*. *Molecular Biology of the Cell*, 16 (6) 2746-58.

Schuchardt, I.; Aßmann, D.; Straube, A.; Thines, E.; Schuberth, C.; Steinberg, G. (2005) MyosinV, Kinesin-1 and Kinesin-3 cooperate in long-distance transport in hyphal growth of the fungus *Ustilago maydis*. *Molecular Biology of the Cell*, in Revision.

Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation mit dem Titel „Die Rolle der Mikrotubuli und der mikrotubuli-abhängigen Transportprozesse im polaren Wachstum von *Ustilago maydis*“ selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

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

(Ort, Datum)

Isabel Manns

Zusammenfassung

In dem phytopathogenen Pilz *Ustilago maydis* kommt es im Verlaufe der Entwicklung zu einem Wechsel vom hefeartigen Knospen der Sporidien zum filamentösen Wachstum der Hyphen. Dieser Wechsel erfolgt nach der erfolgreichen Erkennung zweier kompatibler Sporidien, durch ein Pheromon/ Pheromonrezeptorsystem, welches zur Ausbildung von Konjugationshyphen führt, die nach ihrer Fusion zu einem dikaryotischen Filament verschmelzen, welches dann in der Lage ist, die Pflanze zu penetrieren. Für diese Vorgänge ist das gerichtete polare Wachstum der Pilzhyphe von großer Bedeutung. Voraussetzung für das polare Wachstum ist die gerichtete Anlieferung von Zellwand- und Membranbestandteilen, die mit Hilfe molekularer Motoren entlang des Zytoskeletts, in Richtung der expandierenden Wachstumsspitze transportiert werden müssen. Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich mit der Rolle des Zytoskeletts und seiner assoziierten Motoren im polaren Wachstum von *Ustilago maydis*. Es konnte gezeigt werden, dass das Aktin-Zytoskelett im polaren Wachstum aller Entwicklungsstadien von essenzieller Bedeutung ist, wohingegen die Mikrotubuli nur in der Mitose und im Hyphenwachstum eine Rolle spielen, für die Bildung der Konjugationshyphen werden sie nicht benötigt. Um ein besseres Verständnis von der Aufgabe der Mikrotubuli im Hyphenwachstum zu bekommen, wurde die Orientierung der Mikrotubuli mit Hilfe des Mikrotubuli-Plus-End Markers Peb1-YFP bestimmt. In Hyphen sind 86% der Plus-Enden in Richtung der wachsenden Spitze orientiert. Daraus ergab sich eine besondere Bedeutung für den plus-gerichteten Transport entlang von Mikrotubuli, der von Kinesinen vermittelt wird. Eine Durchmusterung des Genoms von *U.maydis* führte zur Identifizierung von 10 Kinesinen, die sieben Familien zugeordnet werden konnten. Deletionsmutanten dieser Kinesine zeigten mit Ausnahme von *kin2* und *kin3* keinen Phänotyp. Die Deletion von *kin2* und *kin3* resultierte in Hyphen mit ähnlichen morphologischen Defekten, die auf eine Fehlverteilung der frühen Endosomen zurückzuführen ist. Es konnte aber auch gezeigt werden, dass die Endosomen innerhalb der Hyphe bidirektional von Kin3 und Dynein in einem Gleichgewicht transportiert werden. Kin2 wiederum transportiert Dynein an die Plus-Enden und sorgt dafür, dass immer genug Dynein für den minusgerichteten Endosomen Transport vorhanden ist. Aus diesem Grund führte auch die Deletion von Kin2 zu einer Fehlverteilung der Endosomen in Hyphen. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass in Sporidien und Hyphen eine Interaktion zwischen dem mikrotubuli- und dem aktin-abhängigen Transport besteht, und dass diese Interaktion auf einer Kooperation des Kinesin-1 und des Klasse V Myosins aus *U.maydis* basieren. Die Deletion beider Motoren führt zu apolaren Sporidien und Hyphen, und die polare Lokalisation von Kin2 ist Myo5 abhängig.

Summary

The phytopathogenic development of *Ustilago maydis* is characterised by a dimorphic switch from a yeast to hyphal growth form. This transition starts when two compatible yeast like sporidia recognize each other, form conjugation hyphae and fuse. Consequently they form a dikaryotic filament which is able to penetrate the host plant maize. During all these developmental stages the fungus grows in a polar fashion. This directed growth is mediated by the delivery of cell wall- and growth components alongside the microtubule cytoskeleton in the direction of the growing tip .

The following thesis concentrates on the role of the cytoskeleton and its associated motors for polar growth of *Ustilago maydis*. The actin cytoskeleton is essential for polar growth of all developmental stages whereas microtubules are important for mitosis and hyphal growth, but not for conjugation tube formation. The expression of a plus-end binding protein Peb1YFP in hyphae, revealed that 86% of the plus ends are oriented towards the growing tip, suggesting that plus end-directed kinesins support polar growth. The Screening of the *Ustilago maydis* genome led to the identification of 10 kinesins, which belong to seven different Kinesin-families. Deletion mutants of the kinesins with a potential role in vesicle transport have no phenotype with the exception of *kin2* and *kin3*. The deletion of these two kinesins results in bipolar growing hyphae with similar morphological defects. This might be due to a distribution defect of early endosomes. It could then be shown, that early endosomes are moved bidirectionally by the motor proteins Kin3 and dynein in a balance within the hyphae. Kin2 on the other hand is needed for the delivery of dynein to the plus ends of the microtubules. Therefore the deletion of *kin2* also results in a distribution defect of early endosomes within the hyphae. However, it seems that the delivery of dynein over short distances is supported by other motors. In an additional study it would be shown, that a cooperation between the actin and microtubule based transport processes exists and that this cooperation depends on Kinesin-1 and a class V myosin from *Ustilago maydis*. The deletion of both motors leads to an apolar morphology in sporidia and hypha, furthermore the localisation of Kin2 is Myo5 dependent.

Abkürzungen und Fachbegriffe

Aa	Aminosäuren
Abb.	Abbildung
α	bei Antikörpern: anti-
Amp	Ampicillin
ATP	Adenosintri-phosphat
Ben	Benomyl
ble ^R	Phleomycin-Resistenz-Kassette
bp	Basenpaar(e)
<i>cbx</i> -Locus	Genort der Eisen-Schwefel-Untereinheit der Succinatdehydrogenase aus <i>U. maydis</i>
<i>cbx</i> ^R	Carboxin-Resistenz-Kassette
CFP	cyan fluoreszierendes Protein
CM	Komplettmedium
CM-A	Komplettmedium mit 1% Arabinose
CM-G	Komplettmedium mit 1% Glucose
<i>arg</i> -Promotor	Promotor des Arabinase-Gens aus <i>U. maydis</i>
C-terminal	carboxy-terminal
DAPI	4',6'-Diamidino-2-Phenylindol
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
DIC	„Differential Interference Contrast“
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleotide
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eGFP	“enhanced green fluorescent protein” = verstärktes GFP
EGTA	Ethylenglykoltetraessigsäure
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GTP	Guanosintri-phosphat
h	Stunde
hyg ^R	Hygromycin-Resistenz-Kassette
kb	Kilobasenpaar
kD	Kilodalton
Kin1	Kinesin-7 aus <i>Ustilago maydis</i>
Kin2	Kinesin-1 aus <i>Ustilago maydis</i>
Kin3	Kinesin-3 aus <i>Ustilago maydis</i>
Kin4	Kinesin-4 aus <i>Ustilago maydis</i>
Kin5	Kinesin-5 aus <i>Ustilago maydis</i>
Kin6	Kinesin-6 aus <i>Ustilago maydis</i>
Kin7	orphan Kinesin aus <i>Ustilago maydis</i>
Kin8	Kinesin-8 aus <i>Ustilago maydis</i>

Kin9	Kinesin-7 aus <i>Ustilago maydis</i>
Kin10	Kinesin-14 aus <i>Ustilago maydis</i>
LatA	Latrunculin A
min	Minute
ml	Milliliter
µl	Microliter
µm	Micrometer
µM	Micromolar
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
ms	Millisekunden
MT	Mikrotubulus
MTOC	Mikrotubuli-organisierendes Zentrum
Myo5	Myosin der Klasse V aus <i>Ustilago maydis</i>
nat ^R	Nourseothricin-Resistenz-Kassette
N-terminal	amino-terminal
OD	Optische Dichte
ORF	„open reading frame“
<i>otef</i> -Promotor	Promotor des Translations-Elongationsfaktors 1 aus <i>U. maydis</i> , durch 14 Tetracyclin-Operatorsequenzen 8-fach verstärkt
PAA	Polyacrylamid
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
Peb1	Mikrotubuli-Plus-Enden-bindendes Protein aus <i>U. maydis</i>
PEG	Polyethylenglykol
PIPES	Piperazin-N-N'-bis-(2-ethansulfonat)
RFP	rot fluoreszierendes Protein
RT	Raumtemperatur
sek	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
TAE	Tris-Acetat + Na ₂ EDTA
TBE	Tris-Borat + Na ₂ EDTA
TE	Tris-HCl + Na ₂ EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylendiamin
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
Tub1	α-Tubulin aus <i>U. maydis</i>
U	„Unit“ = Enzymeinheit
Upm	Umdrehungen pro Minute
wt	Wildtyp
xg	Vielfaches der Erdbeschleunigung
YFP	gelb fluoreszierendes Protein
Yup1	t-SNARE aus <i>Ustilago maydis</i>

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG	I
ABKÜRZUNGEN UND FACHBEGRIFFE	III
INHALTSVERZEICHNIS	V
1 EINLEITUNG	1
1.1 Polares Wachstum	1
1.2 Die Bedeutung molekularer Motoren für das Wachstum der pilzlichen Hyphe	2
1.3 <i>Ustilago maydis</i> – Phytopathogen und Modellorganismus.....	5
1.4 Ziel der Arbeit	9
2 ERGEBNISSE	11
2.1 Bedeutung des Aktin- und Mikrotubuli-Zytoskeletts für das polare Wachstum von <i>Ustilago maydis</i>	11
2.1.1 Aktin ist essenziell für das Wachstum und die Morphologie haploider Sporidien und Hyphen von <i>Ustilago maydis</i>	11
2.1.2 Die Bildung von Konjugationshyphen ist nicht Mikrotubuli abhängig	13
2.1.3 Filamentöses Längenwachstum braucht Mikrotubuli.....	15
2.2 Orientierung der Mikrotubuli in Hyphen.....	17
2.2.1 Die Plus-Enden der Mikrotubuli sind in Hyphen zur Wachstumsspitze hin ausgerichtet.....	18
2.3 Kinesine von <i>Ustilago maydis</i>	20
2.3.1 Das Genom von <i>Ustilago maydis</i> kodiert für 10 Kinesine.....	20
2.3.2 Phänotypische Analyse der Kinesin Deletionsstämmen.....	25
2.4 Die Aufgaben von <i>kin2</i> und <i>kin3</i> im filamentösen Wachstum...	28
2.4.1 Eine <i>kin2</i> , <i>kin3</i> Doppelmutante zeigt keinen zusätzlichen Phänotyp	28
2.4.2 Die Deletion von <i>kin2</i> und <i>kin3</i> haben keinen Einfluss auf die Mikrotubuli-Organisation und -Orientierung in Hyphen.....	30
2.4.3 Verteilung Yop-GFP markierter Endosomen in Hyphen.....	33
2.4.4 Die Endosomenbewegung in <i>kin2</i> Deletionsstämmen ist vom Entwicklungsstadium abhängig	39

2.4.5	Dynein Lokalisation an Mikrotubuli Plus-Enden in Hyphen ist <i>kin2</i> -abhängig.....	41
2.4.6	Eine <i>kin2</i> Rigormutation führt zu einer verminderten Dynein Motilität.....	43
2.4.7	Endosomen und Dynein interagieren in wachsenden Hyphenspitzen.....	46
2.5	Wird die Polarität der Zelle durch eine Kooperation zwischen Aktin und Mikrotubuli aufrechterhalten ?	48
2.5.1	Die Zerstörung des Mikrotubuli Zytoskeletts in <i>myo5</i> -Deletionsstämmen führt zu apolaren Zellen	49
2.5.2	Die Deletion von <i>kin2</i> und <i>myo5</i> führt zu apolaren Zellen	50
2.5.3	Die Sekretion von Invertase und alkalischer Phosphatase sind sowohl in <i>kin2</i> -, als auch in <i>myo5</i> -Deletionsstämmen gestört	52
2.5.4	Die Kin2-Lokalisation ist von Aktin und <i>myo5</i> abhängig	54
3	DISKUSSION	57
3.1	Bedeutung des Aktin- und Mikrotubuli-Zytoskeletts für das polare Wachstum von <i>Ustilago maydis</i>.....	57
3.2	Mikrotubuli Organisation in Hyphen von <i>Ustilago maydis</i>	59
3.3	Kinesine in <i>Ustilago maydis</i>.....	60
3.3.1	Das Genom von <i>Ustilago maydis</i> kodiert für 10 Kinesine.....	60
3.3.2	Kin2 und Kin3 spielen eine Rolle im Hyphenwachstum.....	62
3.4	Die Rolle der Endosomen im Hyphenwachstum	64
3.4.1	Kin3 und Dynein sind für den bidirektionalen Transport der frühen Endosomen in Hyphen verantwortlich	64
3.4.2	Kin2 unterstützt den retrograden Endosomentransport, durch die Anlieferung von Dynein in die Hyphenspitze	66
3.4.3	Die Anlieferung von Dynein an die Plus-Enden der Mikrotubuli ist nicht ausschließlich <i>kin2</i> abhängig	68
3.5	Wird die Polarität der Zelle durch eine Kooperation zwischen Aktin und Mikrotubuli aufrechterhalten ?	70
3.6	Schlussfolgerungen und Ausblick.....	73
4	MATERIAL UND METHODEN.....	75
4.1	Material und Bezugsquelle	75
4.1.1	Medien, Lösungen, Enzyme und Kits	75
4.1.2	Antikörper	76
4.1.3	Oligonukleotide.....	76

4.1.4	Plasmide und Plasmidkonstruktionen.....	77
4.1.5	In dieser Arbeit hergestellte Plasmide	78
4.1.6	E. coli Stämme	82
4.1.7	U. maydis Stämme	82
4.2	Mikrobiologische, genetische und zellbiologische Methoden ..	85
4.2.1	Escherichia coli	85
4.2.2	Ustilago maydis	87
4.3	Molekularbiologische Standardmethoden	92
4.3.1	Isolierung von Nukleinsäuren	92
4.3.2	Bestimmung der DNA-Konzentration	95
4.3.3	In vitro Modifikationen von Nukleinsäuren	95
4.3.4	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	97
4.3.5	TOPO-TA-Klonierung von PCR-Produkten	99
4.3.6	Nachweis von Nukleinsäuren	99
4.3.7	Sequenz- und Strukturanalyse	101
4.4	Biochemische Methoden	102
4.4.1	Isolierung von Proteinen.....	102
4.4.2	Auftrennung und Nachweis von Proteinen	103
5	LITERATURVERZEICHNIS	106
	DANKSAGUNG	119
	LEBENS LAUF	120

1 Einleitung

1.1 Polares Wachstum

Polares, gerichtetes Wachstum kommt in vielen eukaryotischen Zellen vor. Es spielt in der Entwicklung von Neuronen genauso eine Rolle wie in der von pflanzlichen Wurzelhaaren und Pollenschläuchen (Kost et al., 1999; Sebok et al., 1999). Die Polarität wird in den Zellen durch den gerichteten Transport von Proteinen an die Zelloberfläche vermittelt (Nelson, 1992). Wichtig für die, mit dem polaren Wachstum verbundenen Transportprozesse sind das Aktin- und Mikrotubuli-Zytoskelett (Nelson, 1991) und ihre assoziierten Motoren (Steinberg, 1998). Im polaren Wachstum von Neuronen zum Beispiel spielt der Mikrotubuli-abhängige Langstreckentransport eine bedeutende Rolle. Dabei kommt es zum bidirektionalen Transport von Organellen zwischen der Wachstumsspitze und dem Zellkörper (Grafstein and Forman, 1980). Dieser bidirektionale Transport wird in Axonen von den Mikrotubuli-abhängigen Motoren Kinesin und zytoplasmatischem Dynein vermittelt (Hirokawa et al., 1998; Vale, 2003). Mikrotubuli sind polare Strukturen mit einem Plus- und einem Minus-Ende (Desai and Mitchison, 1997), Kinesine bewegen sich in Richtung des Plus-Endes und zytoplasmatisches Dynein in minus Richtung (Abb.1). Wodurch sie die Bewegung in entgegengesetzte Richtungen in den Axonen ermöglichen (Heidemann et al., 1981). In Axonen konnte in den letzten Jahren eine Vielzahl sich bidirektional bewegendender Organellen (Endosomen, Mitochondrien, Vesikel) gefunden werden (Bananis et al., 2004) (Hollenbeck, 1996), so dass davon ausgegangen wird, dass es sich um einen weit verbreiteten Mechanismus handelt. Wie in diesem bidirektionalen Transport die entgegengesetzten Motoren reguliert werden, ist noch nicht besonders gut verstanden. Es gibt aber Hinweise darauf, dass Motoren entgegengesetzter Transportrichtung voneinander abhängen (Brady et al., 1990; Martin et al., 1999). Des Weiteren existieren zwei verschiedene Modelle über die Kinesin/Dynein Regulation, die zum einen davon ausgehen, dass beide Motoren gleichzeitig binden, oder aber jeweils nur der, der gerade gebraucht wird (Gross et al., 2002; Welte, 2004). Untersuchungen in

tierischen Zellen sprechen eher für die parallele Bindung beider Motoren an ein Organell (Bananis et al., 2003; Murray et al., 2002). Es liegen jedoch auch Hinweise auf eine direkte Interaktion zwischen Dynein und konventionellen Kinesinen vor (Ligon et al., 2004). Das Aktin-Zytoskelett und seine assoziierten Motoren, die Myosine (Abb.1), spielen in Axonen hauptsächlich eine Rolle im Kurzstreckentransport. In Axonen konnte gezeigt werden, dass der Langstreckentransport von Vesikeln zunächst entlang von Mikrotubuli erfolgt, und sie anschließend die kurzen Strecken Aktin-abhängig zurücklegen (Brown, 1999; Kuznetsov et al., 1992). Eine Interaktion zwischen Myosin-V und Kinesin-1 wurde für Maus-Melanozyten und Tintenfisch-Axone beschrieben (Huang et al., 1999; Stafford et al., 2000). Es gibt sogar Hinweise auf die Ausbildung eines Heteromotorkomplexes bestehend aus Kinesin-1 und MyosinV (Langford, 2002), die den schnellen Vesikeltransport entlang von Axonen vermitteln.

1.2 Die Bedeutung molekularer Motoren für das Wachstum der pilzlichen Hyphe

Ein den Axonen vergleichbar ausgeprägtes Spitzen- oder polares Wachstum kann bei pilzlichen Hyphen beobachtet werden. Filamentöse Hyphen wachsen durch eine kontinuierliche Verlängerung an der Hyphenspitze. Dabei hat die Hyphe einen Durchmesser, der von der Spezies und dem Entwicklungsstadium, aber auch von der Wachstumsrate und –Richtung abhängig ist (McKerracher, 1987). Dieses stark gerichtete Wachstum ermöglicht es dem Pilz seine Umwelt zu erforschen, und wie z. B. bei Pflanzenpathogenen, Oberflächen zu penetrieren. Das Spitzenwachstum ist verbunden mit der lokalen Synthese von Zellwandmaterial und der Ausdehnung des Zytoplasmas und der sich in ihm befindlichen Organellen (Heath and Heath, 1978). Dies geschieht durch den vektoriellen Transport von sekretorischen Vesikeln zur wachsenden Spitze hin. Es wird vermutet, dass es sich bei diesen Vesikeln um Bestandteile des sekretorischen Weges handelt, die extrazelluläre Enzyme wie Invertasen und alkalische Phosphatasen transportieren (Heath, 1995). Des Weiteren wird angenommen, dass diese Vesikel vom Golgi-Apparat aus kommend in der Spitze akkumulieren und den sogenannten

„Spitzenkörper“ (Bartnicki-Garcia et al., 1995a) ausbilden. Der Spitzenkörper stellt eine Art Speicherorganell dar, von dem aus die Hyphenspitze mit sekretorischen Vesikeln versorgt wird (Bartnicki-Garcia, 1996). Durch das Wachstum an der Hyphenspitze entsteht vom Spitzenkörper aus ein Exozytose-Gradient, der die Form der Hyphenspitze und des folgenden Hyphenschlauches bestimmt (Bartnicki-Garcia, 1973; Bartnicki-Garcia et al., 1995b). Das polare Wachstum ist eng Verknüpft mit dem Zytoskelett und seinen assoziierten Motoren (Abb.1).

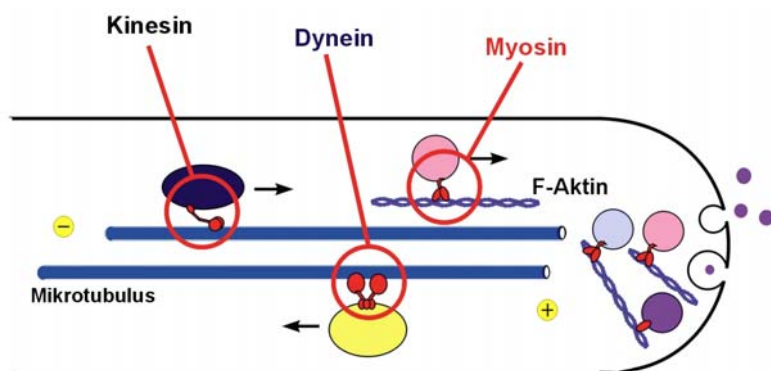


Abbildung 1:
Modell der möglichen Organisation des Zytoskeletts und der assoziierten molekularen Motoren
 Kinesine transportieren Vesikel entlang der Mikrotubuli in Richtung der Plus-Enden, Dynein in die entgegengesetzte Richtung. Der Transport entlang von Aktin wird durch Myosine vermittelt. (zur Verfügung gestellt von Dr.G. Steinberg).

Die Rolle Mikrotubuli-abhängiger Motoren wurde in den letzten Jahren in verschiedenen filamentösen Pilzen untersucht (Lehmler et al., 1997; Seiler et al., 1999; Wu et al., 1998) (Han et al., 2001; Straube et al., 2001), wobei das konventionelle Kinesin der Kinesin-1 Familie am besten untersucht ist. In Hyphen sind diese Kinesine am polaren Wachstum, der Sekretion, der Organisation der Vakuolen und dem Transport der Mitochondrien beteiligt (Wu et al., 1998; Lehmler et al. 1997; Seiler et al., 1997; Steinberg et al., 1998). In *Aspergillus nidulans* übt das konventionelle Kinesin *KinA* einen Einfluss auf die Stabilität der Mikrotubuli aus, und Nullmutanten zeigten ein reduziertes Hyphenwachstum (Requena et al., 2001). Eine Funktion im polaren Wachstum von Hyphen in *Aspergillus nidulans* besitzt das vor kurzem isolierte *KipA*, ein Kinesin der Kinesin-7 Familie (Konzack et al., 2004). Die Deletion dieses Kinesins führte zum Verlust des gerichteten Hyphenwachstums aufgrund der Fehllokalisierung des Spitzenkörpers (Konzack et al., 2004). In *Dictyostelium discoideum* sowie *Ustilago maydis*, und anderen filamentösen Pilzen wurde neben den

konventionellen Kinesinen, auch Kinesine der Unc104/Kif1-Klasse gefunden (Klopfenstein et al., 2002; Schoch et al., 2003), welche am Transport von Organellen beteiligt sind (Pollock et al., 1999) (Wedlich-Söldner et al., 2002b). Der minus gerichtete Transport entlang von Mikrotubuli wird von Dynein vermittelt. Die Deletion von Dynein führt in filamentösen Pilzen zu Defekten in der Zellkernverteilung (Inoue et al., 1998; Minke et al., 1999; Xiang et al., 1995). In *Nectria haematococca* ist es auch für die Verankerung von Interphase Kernen sowie für die Bildung von astralen Mikrotubuli wichtig (Inoue et al., 1998). Der retrograde Transport von Vesikeln und Vakuolen ist ebenfalls Dynein abhängig (Seiler et al., 1999), genauso wie die Organisation und Stabilität des Spitzenkörpers (Riquelme et al., 2000). In *Aspergillus nidulans* konnte gezeigt werden, dass Dynein an den Plus-Enden der Mikrotubuli akkumuliert (Han et al., 2001) und dass sein Fehlen einen Einfluss auf die Mikrotubuli-Dynamik hat. In mitotischen Zellen von *S. cerevisiae* hingegen kommt es zu einer Akkumulation von Dynein an den Plus-Enden der astralen Mikrotubuli (Lee et al., 2003; Sheeman et al., 2003), welches nach der Verankerung mit dem Zellkortex aktiviert wird und den Mikrotubulus durch die gerichtete minus Bewegung am Zellkortex entlangzieht, und damit die Spindelbewegung ermöglicht (Lee et al., 2003). Die Funktion des Dyneins an den Plus-Enden der Mikrotubuli in *Aspergillus nidulans* ist noch nicht sehr gut verstanden, es konnte aber gezeigt werden, dass konventionelles Kinesin für die Lokalisation von Dynein an den Plus-Enden der Mikrotubuli gebraucht wird (Zhang et al., 2003). Aktin-abhängige Transportprozesse sind am besten in den Hefen *Saccharomyces cerevisiae* und *Schizosaccharomyces pombe* untersucht. Über die Rolle von Myosinen im Hyphenwachstum gibt es bislang nur einige Arbeiten in *Ustilago maydis* (Weber et al., 2003), *Candida albicans* (Oberholzer et al., 2002; Woo et al., 2003) und *Aspergillus nidulans* (Osherov et al., 1998; Takeshita et al., 2002). Es konnte gezeigt werden, dass Myosine der Klasse I eine Rolle im polaren Wachstum und der Endozytose spielen (Goodson et al., 1996; Osherov et al., 1998). Klasse II Myosine sind wichtig für die Zytokinese (May 1997). Die best untersuchte Klasse der Myosine sind die der Klasse V, sie unterstützen das polare Wachstum (Govindan et al., 1995; Johnston et al., 1991) durch den vektoriellen Transport von exozytotischen Vesikeln zur Wachstumsspitze hin (Pruyne et al., 1998). Eine Rolle von Klasse V Myosinen im Transport von Vesikeln ist in den Hefen *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* (Johnston et al., 1991; Schott et al., 1999; Win et al., 2001) sowie höheren Eukaryoten beschrieben (Langford, 2002). In

Candida albicans wird das Klasse I Myosin für die Bildung von Hyphen und die Knospenbildung (Oberholzer et al., 2002) benötigt, wohingegen das Klasse V Myosin in der Kernverteilung und dem auswachsen des Promycels von Bedeutung zu sein scheint (Woo et al., 2003).

In filamentösen Pilzen konnte bislang noch keine Interaktion zwischen dem Aktin- und Mikrotubuli-abhängigen Transport gezeigt werden, obwohl ähnlich wie in den Axonen auch im polaren Wachstum der Hyphen ein Bedarf an der Kooperation zwischen Kinesinen und Myosinen im Lang- und Kurzstreckentransport bestehen sollte. Diese Annahme wird zusätzlich durch die Existenz von Myosinen der Klasse V und den Kinesinen der Kinesin-1 und Kinesin-3 Familie in filamentösen Pilzen unterstützt (Schoch, et al., 2003; Steinberg et al., 1995; Weber et al., 2003; Wedlich-Soldner et al., 2002).

1.3 *Ustilago maydis* – Phytopathogen und Modellorganismus

Der Basidiomycet *Ustilago maydis*, ein fakultativ biotropher Pflanzenparasit ohne Fruchtkörper, ist der Erreger des Maisbeulenbrandes. Der Pilz infiziert alle oberirdischen Teile der Maispflanze und induziert die Ausbildung von großen Tumoren. Die Entwicklung der Tumore in denen die Sporen heranreifen findet in den Blütenständen statt, die anstelle des Maiskolbens nur mit schwarzen Sporen gefüllt sind. Der Lebenszyklus des dimorphen Pilzes *Ustilago maydis* (Abb.2) kann in eine saprophytische und in eine biotrophe Wachstumsphase unterteilt werden. In der saprophytischen Phase vermehren sich haploide Sporidien hefeartig durch Knospung an den Zellpolen. Die pathogene Entwicklung beginnt mit der Erkennung zweier kompatibler Sporidien, die sich in ihrem Paarungsloci unterscheiden und als Folge Konjugationshyphen ausbilden (Bölker et al., 1992; Spellig et al., 1994). Nach erfolgter Fusion der beiden Konjugationshyphen kommt es zur Ausbildung einer dikaryotischen Hyphe (Snetselaar et al., 1996). Die im Zellzyklus arretierten Hyphen verlängern sich an ihrer Spitze. Diese ist in der Lage die Pflanzenoberfläche mit Hilfe einer Appressorien-ähnliche Struktur zu penetrieren (Snetselaar and Mims, 1992). Während der biotrophen Phase wächst der Pilz innerhalb der Pflanze überwiegend intrazellulär (Snetselaar and Mims, 1992), dabei werden Tumore induziert, in denen es zur starken

Proliferation des Pilzes kommt. Nachdem die Karyogamie erfolgt ist differenzieren sich die sporogenen Hyphen zu unreifen Teliosporen. Die reifen Teliosporen sind von einer dunkel pigmentierten Hülle umgeben, die den ganzen Tumor füllen. Nach dem Aufbrechen des Tumors werden die Sporen über Wind und Regen verbreitet. Unter geeigneten Bedingungen keimen diese Sporen als Promycel, in dem Meiose stattfindet, aus und aus diesem entstehen dann wieder haploide Sporidien.

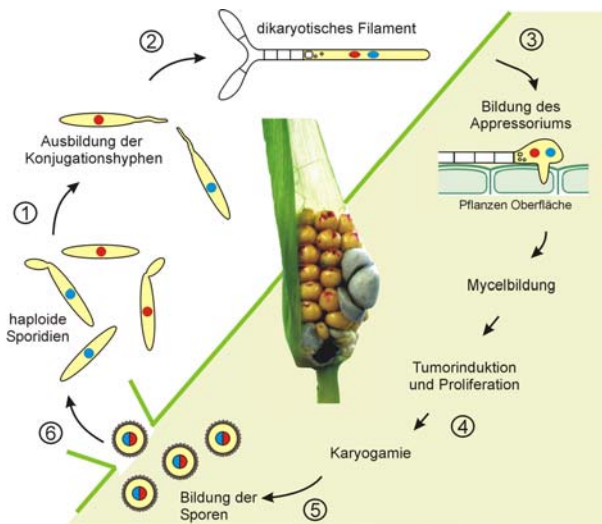


Abbildung 2: Lebenszyklus von *Ustilago maydis*

Haploide Sporidien vermehren sich vegetativ durch Knospung (1). Nach der Fusion zweier kompatibler Sporidien kommt es zur Ausbildung des dikaryotischen Filaments (2), das über eine Appressorien-ähnliche Struktur in die Pflanze eindringt (3). Im Tumor (Mitte) kommt es zur starken Proliferation des Pilzmycels (4), bis sich sporogene Hyphen abrunden und Teliosporen abschnüren (5). Nach erfolgter Auskeimung auf geeignetem Substrat unter Ausbildung des Promycels kommt es zum erneuten Abschnüren haploider Sporidien (6).
(modif. nach Gero Steinberg)

Ustilago maydis lässt sich unter Laborbedingungen gut in Flüssig- und Festmedium kultivieren und auch die Bildung von Konjugationshyphen und dikaryotischen Hyphen ist unter diesen Bedingungen möglich. Daher ist es möglich die Regulation des Dimorphismus zu untersuchen. Die Bildung von Konjugationshyphen lässt sich durch synthetisches Pheromon induzieren, die von filamentösen Hyphen durch Kreuzung kompatibler Stämme auf aktivkohlehaltigem Medium. Für die Bildung der filamentösen Hyphe ist es wichtig, dass die Kerne unterschiedliche Allele des multiallelischen *b*-Locus tragen und somit für unterschiedliche bE und bW Homöodomänen-Proteine kodieren (Gillissen et al., 1992; Kämper et al., 1995). In dem künstlich hergestellten Stamm AB33 lässt sich das Hyphenwachstum durch die Induktion eines aktiven bE/bW-Heterodimers hervorrufen (Brachmann et al., 2001). Für Untersuchungen zur Pathogenität stehen außerdem noch solopathogene haploide Stämme (Bölker et al., 1995) zur Verfügung. In den letzten Jahren hat sich *Ustilago maydis* aufgrund seiner leichten Kultivierbarkeit unter Laborbedingungen

und der verfügbaren molekularbiologischen Methoden auch als Modellorganismus für phytopathogene Pilze etabliert (Basse and Steinberg, 2004). Durch die Verfügbarkeit des Genoms von *Ustilago maydis*, welches vor kurzem durch eine Kooperation zwischen der Bayer Crop Science AG, dem WICGR und der Exelixis Inc. sequenziert wurde, erleichtert die Identifikation bislang unbekannter Gene. Vor allem für zytologische Untersuchungen eignet sich *Ustilago maydis* gut. In den letzten Jahren zeigte sich, dass *Ustilago* ein hervorragendes Modell zur Untersuchung des Zytoskeletts darstellt (Steinberg et al., 2001; Wedlich-Söldner et al., 2000; Straube et al., 2003). Die meisten zytologischen Untersuchungen bezogen sich auf die hefeartig wachsende Sporidie. Über die Bedeutung des Zytoskeletts während der Konjugationshyphenbildung und im Wachstum der filamentösen Hyphen ist bislang noch nicht sehr viel bekannt. *Ustilago maydis* ist durch seinen Dimorphismus gekennzeichnet, der wie andere Human- oder Pflanzenpathogene einen Wechsel vom hefeartigen zum hyphenartigen Wachstum durchläuft (Gow, 1995a). Es wird angenommen, dass für diesen Prozess Zytoskelett-abhängiger Membrantransport wichtig ist (Gow, 1995b). Bisher existieren nur einige Studien aus *Candida albicans*, einem Humanpathogen, zur Rolle des Zytoskeletts im dimorphen Übergang (Akashi et al., 1994; Yokoyama et al., 1990). Für *Candida albicans* wurde gezeigt, dass sowohl Mikrotubuli als auch Aktin essenziell für das polare Wachstum der Hyphe sind und eine Interaktion von Mikrotubuli und Aktin für den Erhalt der Zellpolarität wichtig ist. Bei *Ustilago maydis* ist der Übergang vom hefeartigen zum Hyphenwachstum mit einem Zellzyklusarrest verbunden (Garcia-Muse et al., 2003). Aus diesem Grund läßt sich die Rolle des Zytoskeletts in polaren Wachstumsprozessen besonders gut studieren. Aus vorangegangenen Arbeiten ist bereits bekannt, dass der Transport von Zytoskelett-abhängigen molekularen Motoren eine wichtige Funktion für das pilzliche Wachstum und Morphogenese übernimmt. So führte die Deletion des Mikrotubuli-abhängigen Motors *kin2* (konventionelles Kinesin) zu Veränderungen im Hyphenwachstum und reduzierter Pathogenität, was auf Defekte in der Sekretion (Lehmler et al., 1997) und der Formation basaler Vakuolen (Steinberg et al., 1998) hindeutet. In einer früheren Studie konnte gezeigt werden, dass der bidirektionale Transport früher Endosomen in haploiden Sporidien von *Ustilago maydis* durch die in einem Gleichgewicht arbeitenden Mikrotubuli-abhängigen Motoren Kin3 und Dynein vermittelt wird (Wedlich-Söldner et al., 2002b). Die Deletion

von *kin3* führte in Sporidien zu Defekten bei der Zelltrennung (Wedlich-Söldner et al., 2002b) und in Hyphen zu morphologischen Veränderungen (Wedlich-Söldner, 2001).

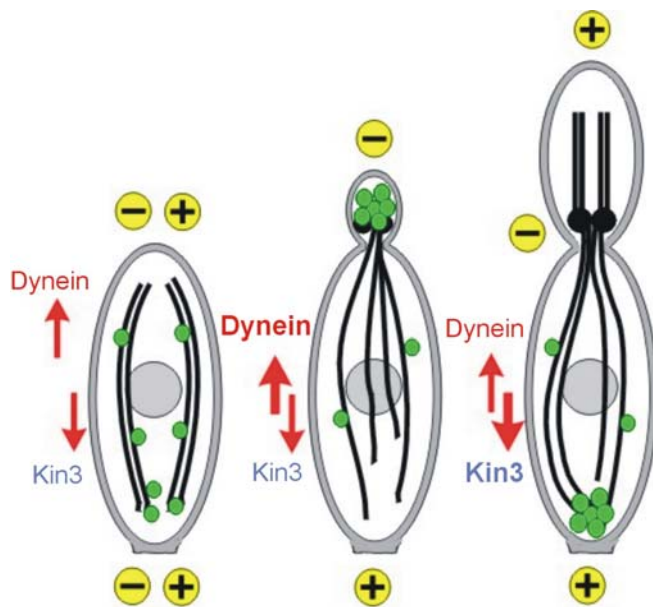


Abbildung 3:

Modell zur Endosomenverteilung in haploiden Sporidien von *Ustilago maydis*

Frühe Endosomen werden von den mikrotubuli-abhängigen Motoren Kin3 und Dynein transportiert.

Ihre Verteilung innerhalb des Zellzyklus hängt von der Stärke der Aktivität des jeweiligen Motors ab.

(aus Wedlich-Söldner et al. 2003)

Neben mikrotubuli-abhängigen Transportprozessen, die von Kinesinen und Dyneinen vermittelt werden, spielen in *Ustilago maydis* auch Aktin-abhängige Motoren, die Myosine, eine Rolle. Das Aktin-Zytoskelett von *Ustilago maydis* wurde für haploide Sporidien beschrieben und umfasst neben "patches" auch filamentartige Strukturen, die bis in die Knospe reichen (Banuett and Herskowitz, 2002). Dies lässt auf eine Rolle der Myosine, für das polare Wachstum und die Morphogenese schließen. Das Genom von *Ustilago maydis* enthält drei Myosine, je eines der Klassen I, II und V sowie eine Myosin-Chitinsynthase (Weber et al., 2003). Für das Myosin der Klasse V konnte gezeigt werden, dass es für die Bildung der Konjugationshyphen, sowie für das Hyphenwachstum und die Pathogenität wichtig ist (Weber et al., 2003). Myo5 ist in *Ustilago maydis* zwar für die Morphogenese von Sporiden und Hyphen wichtig, scheint jedoch keine essenzielle Rolle im polaren Wachstum oder bei der Hyphenbildung zu spielen.

1.4 Ziel der Arbeit

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Frage nach der Rolle des Zytoskeletts für die verschiedenen polaren Wachstumsprozesse in dem dimorphen Pilz *Ustilago maydis* (vgl. Abbildung 2). Während der Entwicklung von der haploiden Sporidie zur filamentösen Hyphe durchläuft *Ustilago maydis* einen morphologischen Wechsel.

Es sollte untersucht werden, wie wichtig zum einen das MT-Zytoskelett und zum anderen das Aktin-Zytoskelett für die einzelnen Entwicklungsstadien sind. Die Organisation der Mikrotubuli ist bislang nur für die haploiden Sporidien bekannt (Straube et al., 2003), deshalb war es wichtig zunächst die Orientierung der Mikrotubuli in Hyphen zu bestimmen, um anschließend der Frage nach ihrer Bedeutung im polaren Wachstum nachzugehen. Die Rolle des Zytoskeletts ist stark mit der Funktion der assoziierten molekularen Motoren verknüpft. Aus vorangegangenen Untersuchungen ergab sich eine Bedeutung für das konventionelle Kinesin Kin2 (Lehmler et al., 1997) und das Unc104/Kif1-ähnliche Kin3 (Wedlich-Söldner, 2001) im Hyphenwachstum. Inwieweit Kinesine anderer Klassen, eine Rolle im polaren Wachstum spielen ist noch nicht bekannt. Deshalb sollten in einem Screen alle im Genom von *Ustilago maydis* vorhandenen Kinesine ermittelt werden, von denen im Anschluss Deletionsstämme hergestellt und näher charakterisiert werden sollten.

In Sporidien konnte gezeigt werden, dass Endosomen, deren Verteilung von Kin3 und cytoplasmatischen Dynein abhängt, eine Funktion im polaren Wachstum, der bipolaren Knospung und der Zelltrennung (Wedlich-Söldner et al., 2000) haben. In filamentösen Hyphen ist über die Bedeutung der Endosomen und der Endozytose bisher sehr wenig bekannt. Aus diesem Grund sollte der Einfluss der Endosomen im Zusammenspiel mit dem Mikrotubuli-Zytoskelett und den assoziierten Motoren, auf das hyphige Wachstum von *Ustilago maydis* näher untersucht werden.

2 Ergebnisse

2.1 Bedeutung des Aktin- und Mikrotubuli-Zytoskeletts für das polare Wachstum von *Ustilago maydis*

Ustilago maydis ist ein dimorpher Pilz, der im Laufe seiner pathogenen Entwicklung vom hefeartigen Wachstum zum filamentösen Wachstum wechselt. Über die Rolle des Aktin- und Mikrotubuli-Zytoskeletts in diesem Entwicklungsprozess ist bislang sehr wenig bekannt. Um herauszufinden welche Bedeutung das Aktin- und Mikrotubuli-Zytoskelett im polaren Wachstum der verschiedenen Entwicklungsstadien (Abb:1 polares Wachstum) besitzt, wurden Studien mit den Zytoskelett-Inhibitoren Benomyl, Latrunculin A, und, in Kontrollexperimenten, mit dem Lösungsmittel DMSO durchgeführt. Benomyl führt zur depolymerisierung der Mikrotubuli und Latrunculin A inhibiert die Aktin-polymerisierung (Coue et al., 1987).

2.1.1 Aktin ist essenziell für das Wachstum und die Morphologie haploider Sporidien und Hyphen von *Ustilago maydis*

Zunächst wurde der Einfluss der Zytoskelett-Inhibitoren auf das polare Wachstum und die Morphologie von haploiden Sporidien getestet, die sich durch Knospung vermehren. Dazu wurden Zellen aus Flüssigkulturen für 6h mit verschiedenen Konzentrationen (0,1-20 μM) des jeweiligen Inhibitors versetzt (vergl. Material Methoden), und anschließend auf morphologische Defekte untersucht. Die Behandlung der Zellen mit verschiedenen Drogenkonzentrationen sollte Aufschluss darüber geben, wie sensitiv der Pilz auf den jeweiligen Inhibitor reagiert. Nach Zugabe des Lösungsmittels DMSO, welches als Kontrolle diente, wuchsen die Sporidien unverändert durch polare Knospung (Abb.4A). Die Behandlung mit Latrunculin A (LatA) führte in 20% der Sporidien schon ab einer

Konzentration von 0,5 μM (Abb.4D) zu einer Inhibition des Wachstums und zur Ausbildung morphologischer Defekte (Abb.4B). Diese durch Anschwellen der Zellen gekennzeichneten Defekte, traten ab einer Konzentration von 2,5 μM Latrunculin A in nahezu allen Zellen auf.

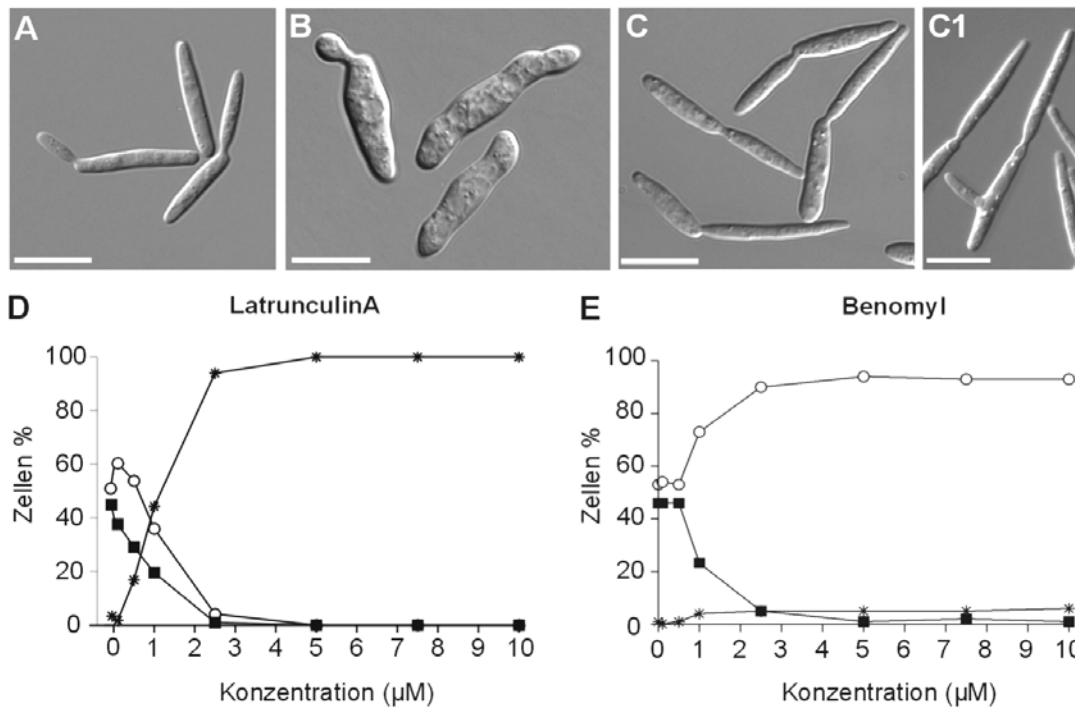


Abbildung 4: Der Einfluss von Zytoskelett-Inhibitoren auf das Wachstum von haploiden Sporidien

A: Die Sporidien haben ein zigarrenförmiges Erscheinungsbild und teilen sich durch polare Knospung.
B: Nach Zugabe von 10 μM Latrunculin A, welches zur Zerstörung des Aktin-Zytoskeletts führt, schwellen die Sporidien an und haben Defekte in der Zellteilung.
C: Die Zerstörung des Mikrotubuli-Zytoskeletts durch 20 μM Benomyl (Straube et al., 2003) resultiert in langen Tochterzellen, die nicht mehr in der Lage sind sich zu teilen, was auf einen Zellzyklus Arrest hinweist. **C1:** Des weiteren kommt es in einigen Zellen zur lateralen Knospung. Balken: 10 μm .
D und E: Die Behandlung mit steigenden Konzentrationen (0.1-20 μM) der Zytoskelett-Inhibitoren Benomyl und Latrunculin A zeigt, dass schon sehr geringe Konzentrationen von Latrunculin A (IC_{50} : $\sim 1.3 \mu\text{M}$) zu morphogenetischen Defekten in haploiden Sporidien führen. Die Zugabe von 2.5 μM Benomyl reicht schon aus, um $\sim 90\%$ der Zellen zu arretieren und bei den restlichen Zellen zu einer aberranten Zellmorphologie zu führen.
 -■- Zellen ohne Knospe; -○- knospende Zellen; -*-* aberrante Zellen. Die Ergebnisse resultieren aus drei unabhängigen Experimenten mit n=100 Zellen/Messpunkt. (Die Abbildung wurde in Zusammenarbeit mit Dr. G. Steinberg erstellt.)

Im Vergleich dazu zeigten nur 6,47% der mit Benomyl (Ben) behandelten Zellen (Abb.4E) morphologische Defekte, wie z.B. laterales oder bipolares Knospen (Abb.4C1). Dies weist

darauf hin, dass Ben nur einen geringen Einfluss auf die Morphologie hat. Die Behandlung mit Benomyl führte hauptsächlich zu einer Anhäufung von Zellen, mit grossen Tochterzellen (Abb.4C), was auf eine Arretierung der Zellen in der Mitose zurückzuführen sein könnte, die nach der Behandlung mit Benomyl in vielen Zellen auftritt (Jordan, 1998).

2.1.2 Die Bildung von Konjugationshyphen ist nicht Mikrotubuli abhängig

Im Weiteren wurde die Rolle des Zytoskeletts in polar wachsenden Konjugationshyphen untersucht. Dazu wurden in Flüssigkulturen wachsende Zellen mit synthetischem Pheromon versetzt. Dies führte zu einem Zellzyklusarrest (Garcia-Muse et al., 2003) und nach 5-6h zur Ausbildung von langen Konjugationshyphen (Abb. 5A). Um nicht in die initiale Phase der Konjugationshyphenbildung einzugreifen, wurden haploide Sporidien zunächst für 1.5h mit synthetischem Pheromon behandelt (vergl. Material Methoden) und erst anschließend für weitere 7h mit den Zytoskelett-Inhibitoren versetzt. Die Bildung der Konjugationshyphen war schon ab einer Konzentration von 0,1 μM Latrunculin A gestört (Abb.5B). Die Zellen zeigten die gleichen Defekte wie auch schon die Sporidien, nach Latrunculin A Behandlung, zuvor (Abb.5B rechts). Im Gegensatz dazu bildeten selbst mit 20 μM Benomyl behandelte Zellen noch Konjugationshyphen aus (Abb.5C). Diese waren allerdings kürzer als die Konjugationshyphen in der Kontrolle (Abb.5A) und der Anteil derer, die sich lateral verzweigten, stieg auf bis zu 30% (Abb.5C, Pfeile). Um zu zeigen, dass die Mikrotubuli bei einer Konzentration von 20 μM Benomyl wirklich zerstört sind, wurden Pheromon stimulierte Zellen des Stammes FB1GT mit 10 μM Benomyl behandelt. Danach waren keine GFP markierten Mikrotubuli mehr sichtbar (Abb.5D, unten). Diese Ergebnisse lassen die Schlussfolgerung zu, dass Mikrotubuli für das Wachstum von Konjugationshyphen nicht essenziell sind.

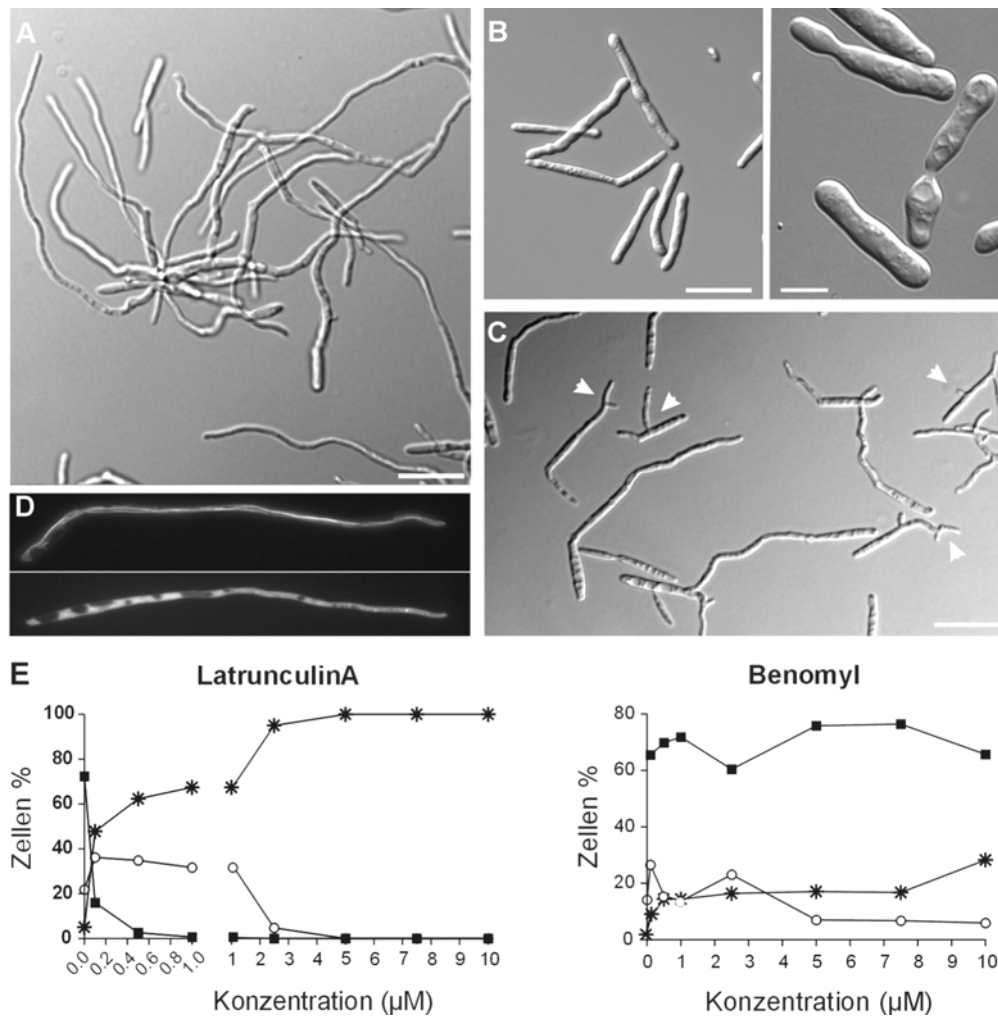


Abbildung 5: Der Einfluss von Zytoskelett-Inhibitoren auf das Wachstum von Konjugationshyphen

A: Durch die Zugabe von synthetischem Pheromon bilden Sporidien nach 5-6h lange Konjugationshyphen aus, die unter natürlichen Bedingungen mit einer kompatiblen Zelle zu einem dikaryotischen Filament fusionieren würden. Balken: 20 µm.

B: Zellen aus einer wachsenden Kultur wurden zunächst für 1.5h mit synthetischem Pheromon inkubiert, und anschließend für weitere 6-7h mit dem Aktin-Inhibitor Latrunculin A behandelt. Die Zellen waren nicht in der Lage Konjugationshyphen auszubilden, sondern zeigten schon bei einer Konzentration von 0.1 µM LatA morphogenetische Defekte. Balken: 20 µm und 5 µm.

C: Im Gegensatz dazu waren Zellen nach der Zerstörung des Mikrotubuli-Zytoskeletts durch 20 µM Benomyl noch in der Lage Konjugationshyphen zu bilden, die allerdings bei erhöhter Benomyl-Konzentration häufiger (bis zu 30%) laterale Verzweigungen aufwiesen (Pfeile). Balken: 20µm

D: Konjugationshyphen des Stammes FB1GT, der GFP markiertes Tubulin exprimiert, wurden für 30min mit 10 µM Benomyl (unteres Bild), und in einer Kontrolle mit DMSO (oberes Bild) behandelt, um zu beweisen, dass schon bei einer Benomyl-Konzentration von 10 µM keine Mikrotubuli mehr vorhanden sind. Balken: 5µm.

E: Die Behandlung mit steigenden Konzentrationen (0.1-20 µM) der Zytoskelett-Inhibitoren Benomyl und Latrunculin A zeigt, dass schon sehr geringe Konzentrationen von Latrunculin A (IC_{50} : ~1.3 µM) zu morphogenetischen Defekten und einem Ausbleiben der Konjugationshyphen-Bildung führen. Trotz der Zugabe von bis zu 20 µM Benomyl bildeten 60-70% der Zellen Konjugationshyphen, die bei steigenden Benomyl-Konzentrationen vermehrt auch laterale Verzweigungen aufwiesen.

■-Konjugationshyphen; ○- unstimulierte Zellen; ★- aberrante Zellen. Die Ergebnisse resultieren aus drei bzw. zwei unabhängigen Experimenten mit n=130 Zellen/Messpunkt. Die Abbildung wurde in Zusammenarbeit mit Dr. G. Steinberg erstellt.

2.1.3 Filamentöses Längenwachstum braucht Mikrotubuli

Nach der Fusion zweier kompatibler Konjugationshyphen kommt es zur Ausbildung des infektiösen dikaryotischen Filaments. Dieses zeichnet sich durch ausgeprägtes Hyphenwachstum aus. Für die Untersuchungen zur Bedeutung des Zytoskeletts im Hyphenwachstum wurde der Stamm AB33 (Brachmann et al., 2001) verwendet, bei dem der *bE1/bW2* Heterodimer unter Kontrolle des induzierbaren *nar*-Promotors (Banks et al., 1993) steht. Die Induktion des *bE1/bW2* Transkriptionsfaktors führt zum filamentösen Wachstum langer Hyphen (b-Hyphen), die an ihrem Ende leere Abschnitte zurücklassen (Abb.6A Pfeil). Auch hier wurden die Zytoskelett Inhibitoren nicht parallel zur Induktion des Promotors zugegeben. AB33 Zellen wurden zunächst für 2.5 h in NM-Medium inkubiert und anschließend für weitere 7h mit entsprechenden Konzentrationen (Material Methoden) der Inhibitoren behandelt. Im Einklang mit den vorherigen Resultaten aus Sporidien und Konjugationshyphen konnten nach der Zugabe von Latrunculin A keine filamentösen Hyphen ausgebildet werden. Die Zellen zeigten auch hier schon bei sehr niedrigen Konzentrationen (ab 0,1 μM LatA) morphologische Defekte (Abb.6B). Bei der Behandlung mit Benomyl verhielten sich die Hyphen ähnlich wie die Konjugationshyphen. Es konnten zwar Hyphen ausgebildet werden, diese waren aber schon bei einer Konzentration ab 1,0 μM Benomyl stark verkürzt oder bipolar (Abb. 6C, Pfeil). Die Gesamtlänge (inklusive Mutterzelle) der mit 20 μM Benomyl behandelten Hyphen betrug im Durchschnitt $44,66 \mu\text{m} \pm 8,6 \mu\text{m}$ im Vergleich zu Kontrollhyphen mit $95,1 \mu\text{m} \pm 9,9 \mu\text{m}$. In Hyphen ohne Mikrotubuli konnten auch keine leeren Abschnitte im basalen Bereich beobachtet werden, dafür waren aber leere Abschnitte an der Spitze älterer Hyphen sichtbar (Abb. 6C, kleines Bild). Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass Mikrotubuli für die Ausbildung kurzer Hyphen (von ca. 50 μm Länge) von geringer Bedeutung sind. Für die Ausbildung langer Hyphen scheinen Mikrotubuli hingegen von großer Bedeutung zu sein.

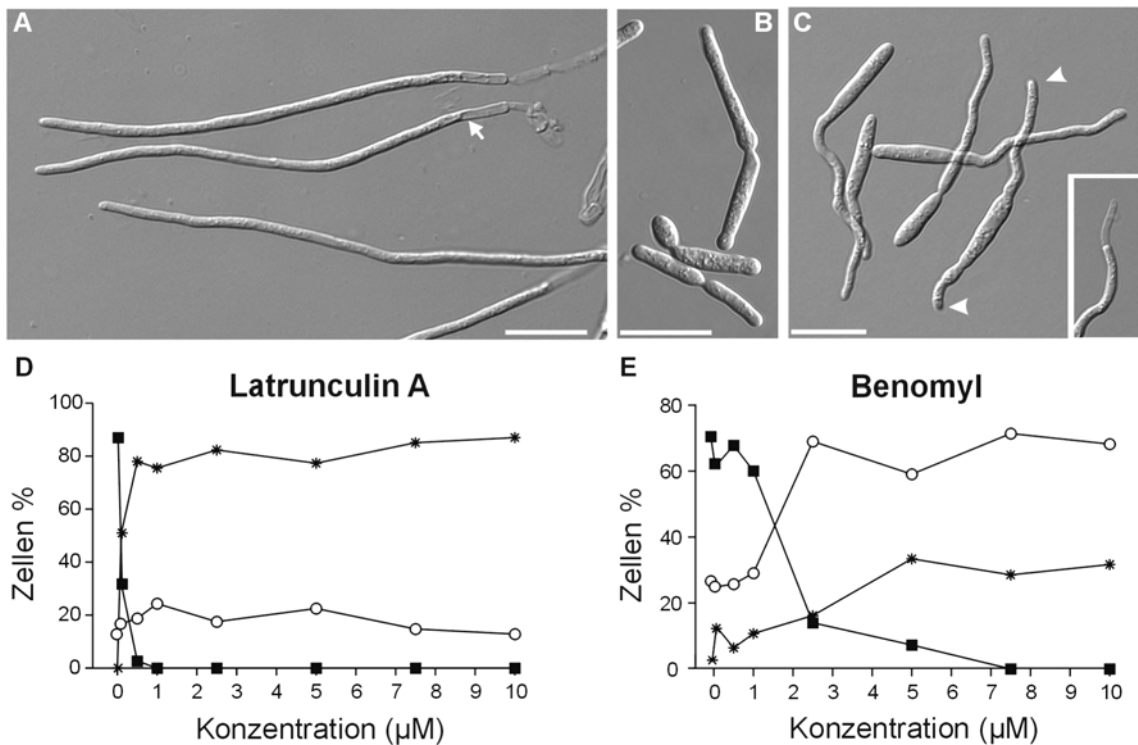


Abbildung 6: Der Einfluss von Zytoskelett-Inhibitoren auf das Wachstum von b-abhängigen Hyphen

A: Unter natürlichen Bedingungen führt die Fusion zweier kompatibler Zellen zur Ausbildung des aktiven bE/bW Heterodimers, welches für das filamentöse Wachstumsprogramm verantwortlich ist. In dem hier verwendeten Stamm AB33 werden beide *b-Gene* (*bE1/bW2*) unter Kontrolle des *nar*-Promotors exprimiert (Brachmann et al., 2001). Die Bildung des Heterodimers, und die damit verbundene Hyphenbildung, kann durch einen Wechsel der Nitratquelle induziert werden. Dies führt nach ~5h zur Ausbildung langer b-abhängiger Hyphen, die an ihren Enden leere Abschnitte (Pfeil) bilden. Balken: 20 μm .

B: AB33 Zellen wurden für 2.5h in NM-Medium inkubiert, um die Filamentbildung zu induzieren. Im Anschluss wurden sie weitere 6h mit dem Aktin-Inhibitor Latrunculin A behandelt. Hierbei kam es schon bei einer Konzentration von 0.1 μM LatA zur Bildung morphologisch aberranter Zellen. Es wurde keine Hyphenbildung beobachtet.

C: Vor der Behandlung mit Benomyl wurden die AB33 Zellen ebenfalls in NM-Medium vorinkubiert. Danach wurden die Zellen zusätzlich noch für weitere 6h mit Benomyl behandelt. Dieses resultierte zwar in der Ausbildung von filamentösen Hyphen, die allerdings kürzer als die Wildtyp-Hyphen waren, bipolare Filamente ausbildeten (Pfeile) und an ihren Spitzen leere Abschnitte formten (kleines Bild). Balken: 20 μm .

D: Die Behandlung mit steigenden Konzentrationen (0.1-10 μM) der Zytoskelett-Inhibitoren Benomyl und Latrunculin A zeigt, dass schon sehr geringe Konzentrationen von Latrunculin A (IC_{50} : ~0.1 μM) zu morphogenetischen Defekten und einem Ausbleiben der Hyphenbildung führen. In der Gegenwart von bis zu 10 μM Benomyl bildeten zwar ~70% der Zellen Hyphen, diese waren aber kürzer und führten bei steigenden Benomyl-Konzentrationen zu bipolaren Filamenten und leeren Abschnitten an den Spitzen.

—■— lange Filamente und leere Abschnitte; —○— kurze Filamente; —*— aberrante Zellen/Hyphen. Die Ergebnisse resultieren aus drei unabhängigen Experimenten mit n=150 Zellen/Messpunkt. Die Abbildung wurde in Zusammenarbeit mit Dr. G. Steinberg erstellt.

2.2 Orientierung der Mikrotubuli in Hyphen

Die, im vorangegangenen Kapitel beschriebenen Ergebnisse lassen auf eine Rolle der Mikrotubuli im Hyphenwachstum schließen. Da eine Hyphenlänge von ca. 50 μm nicht überschritten werden kann, stellt sich die Frage ob Mikrotubuli eine besondere Bedeutung im Langstreckentransport besitzen und es deshalb zu einem verkürzten Hyphenwachstum kommt. Um die Rolle der Mikrotubuli und der mit ihnen assoziierten molekularen Motoren innerhalb des Hyphenwachstums besser verstehen zu können, sollte die Orientierung der Mikrotubuli in der Hyphe bestimmt werden.

Dazu wurde Peb1, das Homolog zu EB1 aus *Ustilago maydis*, welches an Plus-Enden von wachsenden Mikrotubuli bindet (Straube et al 2003), mit YFP fusioniert und in dem filamentös wachsenden Stamm AB33 exprimiert. Die Bewegungsrichtung der Peb1-YFP Signale ermöglichte anschließend die Bestimmung der Plus-Enden innerhalb der Hyphe. Zusätzlich wurde noch ein Peb1-RFP-Konstrukt in dem Stamm AB33GFPTub1 exprimiert, welches eindeutig zeigte, dass auch in Hyphen die Peb1-RFP-Signale an den distalen Enden der Mikrotubuli lokalisieren (Abb.7).

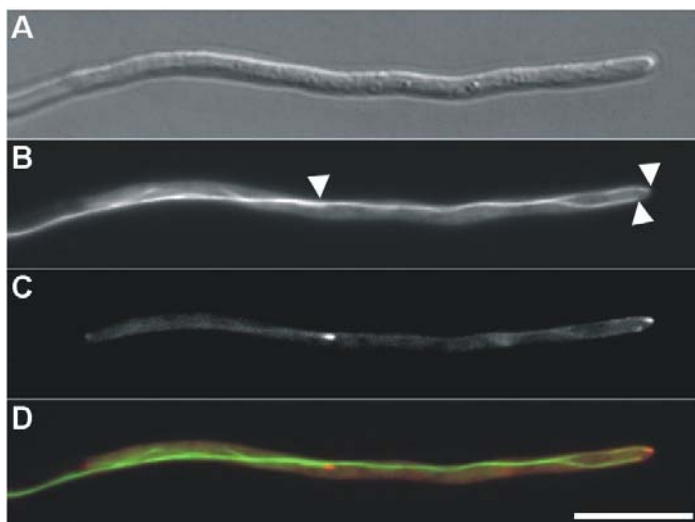


Abbildung 7: Peb1 lokalisiert an den distalen Enden der Mikrotubuli in *b*-abhängigen Hyphen

A: In *b*-abhängigen Filamenten werden die Peb1-RFP und GFP-Tub1 Fusionskonstrukte exprimiert.

B,C,D: An distalen Enden der Mikrotubuli (GFP-Tub1 in B, Pfeile) lokalisiert Peb1-RFP als heller Punkt (C). Die Überlagerung zeigt deutlich, dass die Peb-RFP-Signale an den Enden der Mikrotubuli erscheinen (D). Balken: 10 μm .

2.2.1 Die Plus-Enden der Mikrotubuli sind in Hyphen zur Wachstumsspitze hin ausgerichtet

Der Stamm AB33Peb1YFP wurde für 5-6h in NM-Medium inkubiert, was zur Induktion des Hyphenwachstums führte. Anschließend wurde die Bewegungsrichtung der Peb1-YFP Signale innerhalb der Spitze in einem Bereich von 30 µm Länge gezählt (Abb.8A, RegionD). Im distalen Bereich der Hyphe wurde die Richtung der Signale ebenfalls über eine Strecke von 30 µm Länge bestimmt (Abb.8A, RegionB). Zur Bestimmung der Lage der Mikrotubuli im Bereich des Zellkerns wurde zusätzlich noch ein Konstrukt in den Stamm AB33Peb1YFP eingebracht, welches die Kern-DNA anfärbt. Dabei handelte es sich um Histon4 welches C-terminal mit CFP fusioniert wurde (Straube et al., 2005). His4-CFP bindet an die genomische DNA und ermöglichte so die Bestimmung der Lage des Zellkerns und die parallele Analyse der Peb1-YFP Signale in einem Bereich von 15 µm vor und hinter dem Kern (Abb.8A, RegionC). Die Auswertung der gezählten Peb1-YFP Signale ergab im apikalen Bereich, dass 86% (107/18 Signale; n=26) der Plus-Enden zur Spitze hin orientiert sind (Abb.8E). Im basalen Bereich der Hyphe sind die Mikrotubuli genau entgegengesetzt orientiert, dort zeigen 90% (10/90; n=26) der Plus-Enden zum Septum hin (Abb.8E). Um den Zellkern liegt eine bidirektionale Verteilung der Signale vor, dort weisen 48% (97/102; n=39) zur Spitze und 52% zum Septum (Abb.8E). Die Peb1-YFP Signale passieren den Zellkern in den meisten Fällen, was nahelegt, dass der Spindelpolkörper in Hyphen inaktiv ist und nicht als „Mikrotubuli-Organisierendes-Zentrum“ fungiert.

In dikaryotischen Filamenten, die aus der Kreuzung zweier kompatibler Wild-typstämme resultierten, und in Konjugationshyphen, in denen der Stamm FB2Peb1YFP mit synthetischem Pheromon stimuliert wurde, konnte eine ähnliche Orientierung der Mikrotubuli im Apex beobachtet werden. 91,1% (174/17 Signale aus n=33 Hyphen) der Signale in dikaryotischen Filamenten und 83,3% (80/16 Signale aus n=27 Konjugationshyphen) der Signale in Konjugationshyphen weisen in Richtung der wachsenden Spitze.

Die Orientierung der Mikrotubuli-Plus-Enden in Hyphen lässt auf eine grosse Bedeutung von Plus-End-gerichteten Transportvorgängen, wie ihn Kinesine vermitteln, im Spitzenwachstum der Hyphen schließen. Dynein welches im Minus-End-gerichteten Transport fungiert, scheint für Prozesse im Zentrum der Zelle wichtiger zu sein.

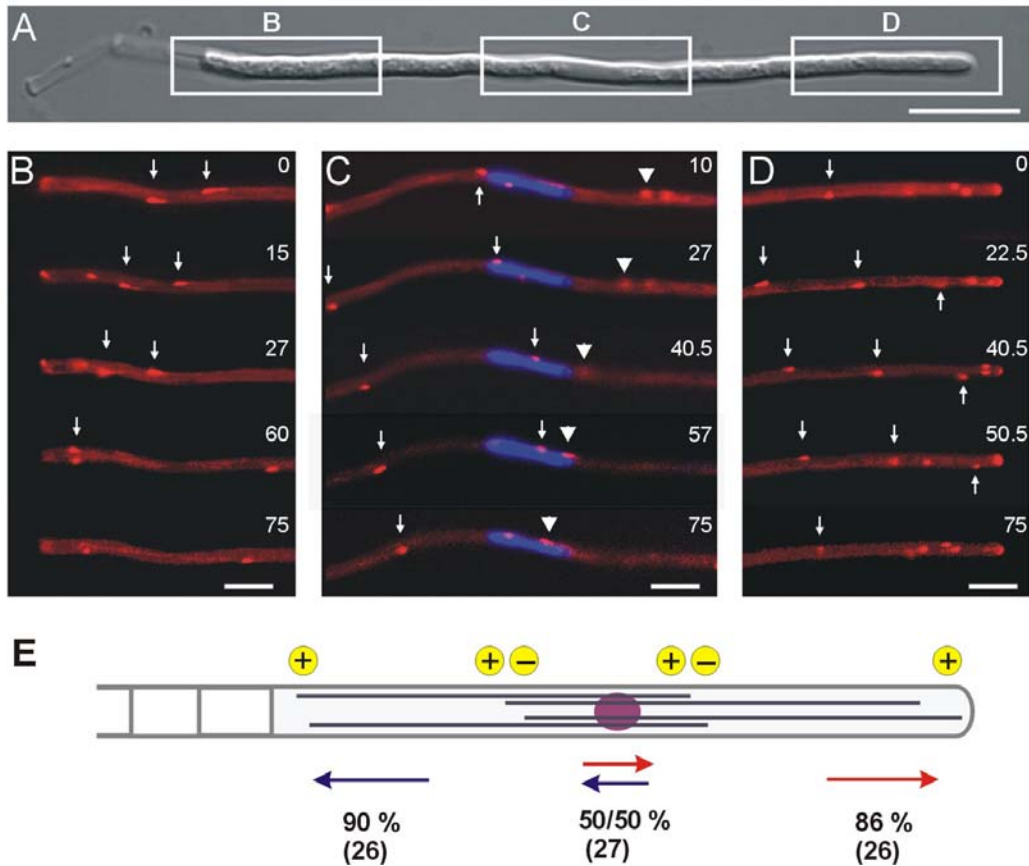


Abbildung 8: Orientierung der Mikrotubuli in *b*-abhängigen Hyphen

A: In *b*-abhängigen Filamenten wird das Peb1-YFP Fusionskonstrukt exprimiert. Zur genaueren Analyse der Hyphe wurde diese in drei (B-D) 30 μ m lange Abschnitte unterteilt.

B: Die Expression von Peb1-YFP markiert hier die wachsenden Mikrotubuli-Plus-Enden in der basalen Region der Hyphe nahe dem Septum über einen definierten Zeitraum (Pfeile). Die Aufnahmezeit ist in Sekunden angegeben.

C: Zusätzlich zu Peb1-YFP wurde als Kernmarker noch Histon4-CFP exprimiert, um die Orientierung der Plus-Enden am Zellkern zu analysieren (unterschiedliche Bewegungsrichtung durch Pfeil und Pfeilspitzen markiert). Die Aufnahmezeit ist in Sekunden angegeben.

D: Peb1-YFP markierte wachsende Mikrotubuli-Plus-Enden innerhalb der Hyphenspitze (Pfeile). Balken: 5 μ m. Die Aufnahmezeit ist in Sekunden angegeben.

E: Die quantitative Analyse aller Peb1-YFP markierten Plus-Enden aus 26/27 Hyphen ergab, dass 86/90% der Plus-Enden in Richtung der Zellpole orientiert sind, wohingegen um den Zellkern eine bipolare Orientierung der Mikrotubuli vorliegt (50% in beiden Richtungen). Die Mikrotubuli werden nicht vom Spindelpolkörper aus polymerisiert. Die Abbildung wurde in Zusammenarbeit mit Dr. G. Steinberg erstellt.

2.3 Kinesine von *Ustilago maydis*

Die oben beschriebene Orientierung der Mikrotubuli lässt sich eine wichtige Rolle für die Kinesine, als plus-end-gerichtete, mikrotubuli-assoziierte Motoren in wachsenden Hyphen schließen. In früheren Studien aus *Neurospora crassa* und *Ustilago maydis* konnte bereits gezeigt werden, dass konventionelle Kinesine wichtig für die Anlieferung von sekretorischen Vesikeln sind (Lehmler et al., 1997; Seiler et al., 1997) und in *Ustilago maydis* auch eine Rolle in der Bildung der basalen Vakuole spielen (Steinberg et al., 1998). Für ein weiteres Kinesin aus *Ustilago maydis*, ein Unc104/Kif1A-ähnliches, wurde in der Deletionsmutante ein morphogenetischer Defekt im dikaryotischen Filament beschrieben (Wedlich-Söldner, unveröffentlicht). Diese Kinesine schienen allerdings keine Rolle im polaren Wachstum der Hyphen zu spielen. Um der Rolle von Kinesin Motoren im polaren Hyphenwachstum nachzugehen, wurde die (vom Whitehead Institut) veröffentlichte genomische Sequenz von *Ustilago maydis* nach weiteren Kinesinen durchmustert.

2.3.1 Das Genom von *Ustilago maydis* kodiert für 10 Kinesine

Das vor kurzem veröffentlichte Genom von *Ustilago maydis* (siehe Material Methoden) wurde mit Sequenzen charakteristischer Kinesine verschiedener Familien aus Vertebraten und Pilzen durchmustert (Sequenzen siehe Material Methoden). Dies resultierte in der Identifikation von 10 potenziellen Kinesinen, die anhand der vorhergesagten Motordomänen (e^{-15} – e^{-175} SMART, siehe Material Methoden sieben Familien zugeordnet werden konnten (Lawrence et al., 2004) (Abb.9, Tabelle1). Die Länge der Motordomänen variierte zwischen 348-498 AS (Abb.11). Kin1 wurde schon im Rahmen einer vorangegangenen Studie beschrieben und veröffentlicht (Lehmler et al., 1997). Es wurde der Klasse der CENP-E-ähnlichen-Kinesine zugeordnet, zu der auch die pilzlichen Kip2-ähnlichen Kinesine ScKip2p, SpoTea2 und AnKipA (Abb.9/10) gezählt werden. Das Genom von

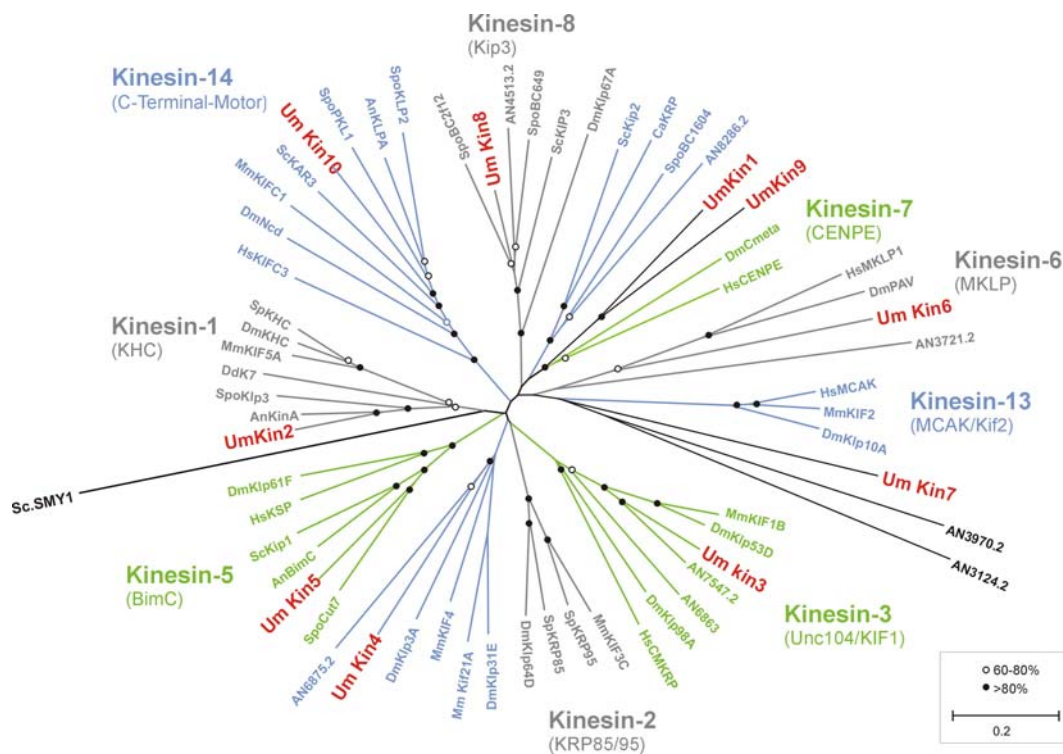


Abbildung 9: Phylogenetischer Stammbaum der Kinesine aus *Ustilago maydis* verglichen mit Vertretern aus allen Kinesin-Familien

Das Genom von *Ustilago maydis* kodiert für 10 Kinesine, die sieben verschiedenen Kinesin-Familien zugeordnet werden konnten (Lawrence et al., 2004). Der Stammbaum basiert auf dem Vergleich der Motordomänen von pilzlichen und tierischen Kinesinen mit denen aus *Ustilago maydis* (vergl. Material Methoden). Hs: *Homo sapiens*, Mm: *Mus musculus*, Dm: *Drosophila melanogaster*, Sp: *Strongylocentrotus purpuratus*, Dd: *Dictyostelium discoideum*, An: *Aspergillus nidulans*, Ca: *Candida albicans*, Spo: *Schizosaccaromyces pombe*, Sc: *Saccharomyces cerevisiae*, Cc: *Cryptococcus cinerea*, Nc: *Neurospora crassa*, Um: *Ustilago maydis*. Accession-Nummern: *Homo sapiens*: HsKSP, P52732; HsKIFC3, AAH01211; HsCENP-E, Q02224; HsMKLP1, Q02241; HsMCAK, AAC27660. *Mus musculus*: MmKIFC1, BAA19676; MmKIF5a, AAC79803; MmKIF3C, O35066; MmKIF1B, Q60575; MmKIF4, P33174; MmKif21a, AAF17083; MmKlp174, CAA70845; MmKIF2, P28740. *Drosophila melanogaster*: DmKlp61F, P46863; DmNcd, P20480; DmKHC, P17210; DmCana, AAF32356; DmCmeta, AAF32355; DmKlp67A, AAB49460; DmKlp64D, AAF50786; DmKlp98A, AAF56718; DmKlp53D, AAF57957; DmKlp3A, AAD34774; DmKlp31E, AAF63388; DmPAV-KLP, CAA12181; DmKlp10A, AAF48003. *Strongylocentrotus purpuratus*: SpKRP85, P46872; SpKRP95, P46871; SpKHC, CAA40175. *Dictyostelium discoideum*: DdK7, AAB07748. *Aspergillus nidulans*: AnBimC, P17120; AnKlpA, P28739; AnKinA, CAC19836; AnKipA, CAF22223; AnKipB, CAF06507; AN7547.2, XM_411684; AN6863, XM_411000; AN6875.2, XM_411012; AN3721.2, XM_407858; AN3970.2, XM_408107; AN3124.2, XM_407261. *Candida albicans*: CaKrp, CAA2200Kip2. *Schizosaccaromyces pombe*: SpoCut7, CAA40738; SpoKlp2, AL136235; SpoPkl1, Q92376; SpoTea2, CAA22353; SpoKlp5, O14343; SpoKlp6, AA19043; SpoKlp3, AAF14525. *Saccharomyces cerevisiae*: ScKip1, P28742; ScKar3, P17119; ScKip2, P28743; ScKip3, P53086; ScSmy1, P32364; ScCIN8, P27895. *Cryptococcus neoformans*: CnKLP4, hypotheticalEAL18971. *Neurospora crassa*: NcKLP4, XM_331824 Kip2. *Ustilago maydis*: UmKin1, U92844; UmKin2, U92845; UmKin3, AF480346; UmKin4, XM_400772; UmKin5, XM_402340; UmKin6, XM_402342; UmKin7, XM_404042; UmKin8, XM_399175; UmKin9, XM_402139; UmKin10, AJ605564.

Balken: 0,2 Austausch pro Aminosäure, Bootstrap-Werte: Offene Kreise 60-80, geschlossene Kreise >80.

Ustilago maydis besitzt in dieser Familie ein weiteres Kinesin, Kin9, welches 45% Sequenzidentität innerhalb der Motordomäne und 17% über die Gesamtlänge des offenen

Leserahmens zu Kin1 hat. Da Kin1 und Kin9 weder eindeutig zu den CENP-E -noch zu den Kip2-ähnlichen der anderen Pilze dieser Familie gruppierten, wurde ein gesonderter Stammbaum für diese Familie gerechnet. Dazu wurde noch ein zusätzliches Kinesin aus dem Basidiomyceten *Cryptococcus neoformans* identifiziert. Der Stammbaum ergab, dass die Vertreter der CENP-E- Familie aus den Basidiomyceten enger verwandt mit denen der tierischen CENP-E sind, als mit den Kip2-ähnlichen der Ascomyceten (Abb.10). Allerdings weisen Kin1 und Kin9 die typische interne Motordomäne auf, wie sie die anderen pilzlichen Vertreter in dieser Familie haben, im Gegensatz zu den tierischen CENP-E-ähnlichen, die eine N-terminale Motordomäne besitzen (Schoch et al., 2003) (Abb.11).

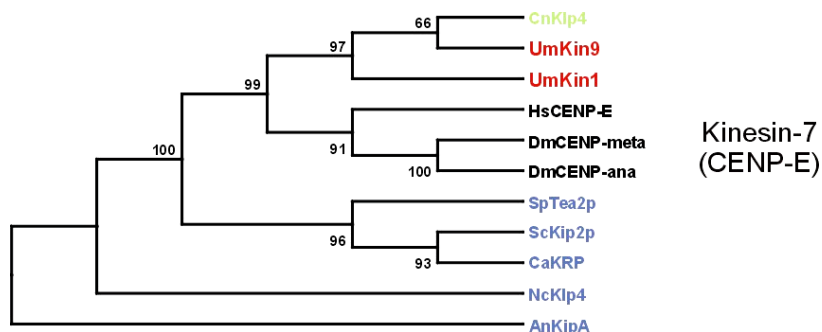


Abbildung 10: Phylogenetischer Stammbaum der Vertreter der Kinesin-7-Familie

UmKin1 und UmKin8 gruppieren mit einem anderen Vertreter der Basidiomyceten näher an den tierischen CENP-E-Kinesinen als an denen der Ascomyceten.

Accession-Numbers: *Cryptococcus neoformans*: CnKLP4, hypotheticalEAL18971; *Ustilago maydis*: UmKin1, U92844, UmKin8, XM_399175, *Homo sapiens*: HsCENP-E, Q02224, *Drosophila melanogaster*: DmCana, AAF32356; DmCmeta, AAF32355 SpoTea2, CAA22353, *Saccharomyces cerevisiae*: ScKip2, P28743, *Neurospora crassa*: NcKLP4, XM_331824, *Aspergillus nidulans*: AnKipA, CAF22223, *Candida albicans*: CaKrp, CAA2200Kip2. Bootstrap-Werte sind an den Verzweigungspunkten angegeben. Balken: 0,2 Austausch pro Aminosäure

Kin2, der Vertreter der Kinesin-1 Familie (nach Lawrence et al., 2004), und Kin3, ein Kinesin-3, wurden schon analysiert und veröffentlicht (Lehmler et al., 1997; Wedlich-Söldner et al., 2002). Des Weiteren wurde Kin4 ein Kinesin-4 Homolog identifiziert, welches innerhalb der Motordomäne 37% Identität zu Kif21A aus Maus, allerdings nur geringe Identitäten im Schwanzbereich, aufweist. Den Kinesinen dieser Familie wurden bisher Funktionen im neuronalen Vesikeltransport (Peretti et al., 2000) zugewiesen. Kin6 wurde der Kinesin-6 Familie zugeordnet, auch wenn seine Motordomäne nur eine geringe

Identität von 29% zum Maus-Homolog aufweist. *Ustilago maydis* besitzt auch ein BimC-Homolog, Kin5, welches innerhalb der Motordomäne zu 47% identisch zu Maus Eg5 ist (Tab.1). Außerdem besitzt es die charakteristische BimC-box innerhalb des C-Terminus (AS 1035-1049; 50% Identität nach Drummond et al., 1998) (Abb.8). Kin8 wurde mit 49% Identität innerhalb der Motordomäne, als Vertreter der Kinesin-8-Familie, der Kip3-ähnlichen, identifiziert. Innerhalb der Kinesine gibt es auch eine Familie, deren Vertreter ihr Transportgut in minus Richtung, entlang von Mikrotubuli, transportieren. Diese Kinesine der Kinesin-14-Familie besitzen im Gegensatz zu den bisher genannten Kinesinen eine C-Terminale Motordomäne (Schuberth und Steinberg, unveröffentlicht) (Abb.11). *Ustilago maydis* besitzt ein solches Kinesin, Kin10, welches eben genau diese C-terminale Motordomäne besitzt (Schuberth und Steinberg, unveröffentlicht) (Abb.11). Eine weitere Gemeinsamkeit ist ein konservierter Bereich von 14AS (AS 372-385; Hirokawa et al., 1998) der auch in Kin10 gefunden wurde. Keine eindeutige Zuordnung lies sich im Bezug auf Kin7 treffen. Dieses Kinesin wurde zwar bei der Suche nach einem MCAK-ähnlichen der Kinesin-13-Familie gefunden, zeigte aber nur eine schwache Homologie zu dieser Gruppe. Die Vertreter dieser Familie besitzen als Charakteristikum eine interne Motordomäne, die mit ihrer Funktion in der Regulation der Mikrotubuli-Stabilisierung zusammenhängt (Ogawa et al 2004). Kin7 besitzt keine interne, sondern eine N-Terminale Motordomäne (Abb.11), und diese zeigt auch nach der Entfernung möglicher Insertionen (AS 1-9; AS 23-32) nur eine 25%ige Identität zu Maus Kif2. Auch der Stammbaum gruppiert Kin7 nicht direkt in die Kinesin-13-Familie, sondern eher in eine Gruppe, in der sich auch zwei *Aspergillus nidulans* Kinesine befinden, die keiner eindeutigen Familie zugeordnet werden können. In anderen Pilzen sind bisher keine Vertreter dieser Familie gefunden worden. Aus diesem Grund wurde Kin7 keiner speziellen Familie zugeordnet, sondern als „nicht gruppierbar“ klassifiziert.

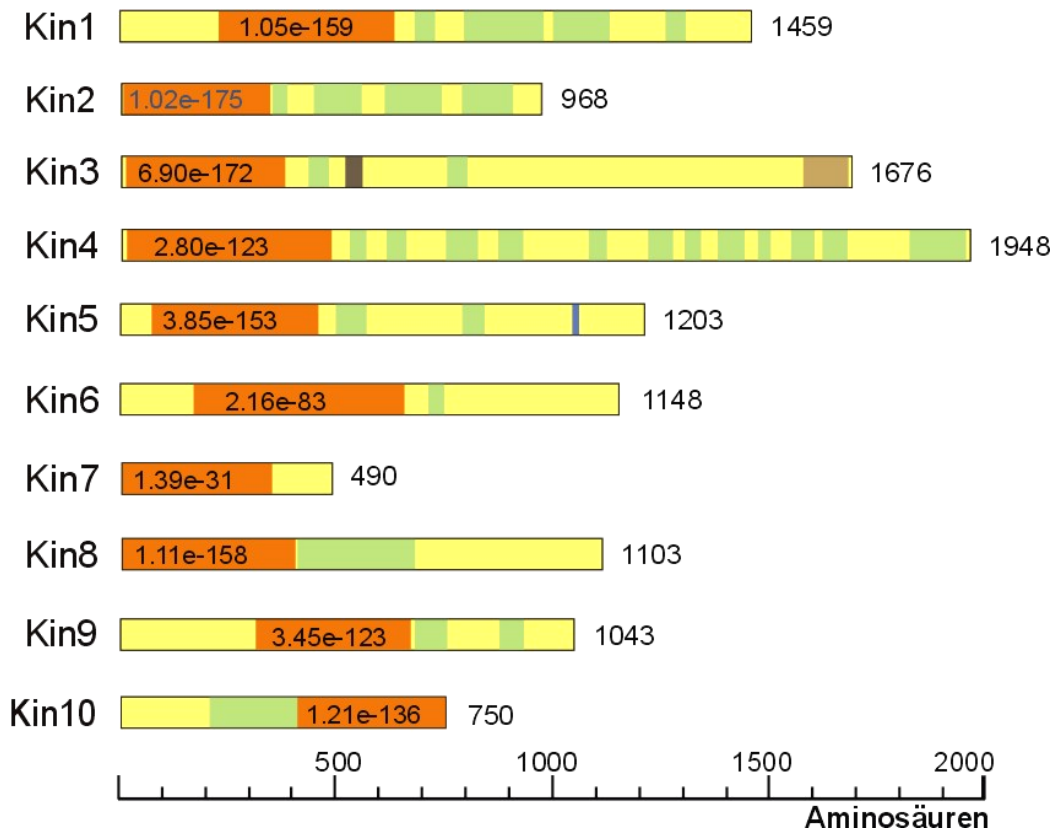


Abbildung 11: Domänenvergleich der Kinesine aus *Ustilago maydis*

Vorhersage der Domänenstruktur der Kinesine aus *Ustilago maydis* (vergl. Material Methoden).

Die für die Kinesine typischen Motordomänen (rot) liegen meistens im N-terminalen Bereich, mit Ausnahme des C-terminalen Kinesins der Kinesin-10 Familie. Des weiteren sind die für die Interaktion wichtigen coiled-coil Domänen (grün) vorhanden, und im Fall des BimC-ähnlichen Kinesins die BimC-Box (blau). Das Kinesin der Kinesin-3 Familie besitzt zusätzlich noch eine PH- (hellbraun) und eine FHA-Domäne (dunkelbraun). E-Values der Motordomänen nach SMART Vorhersage sind angegeben.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das Genom von *Ustilago maydis* 10 Kinesine enthält. Neun Kinesine können bestimmten Familien und somit auch potenziellen Funktionen zugeordnet werden. Drei Kinesine (Kin5, Kin6, Kin10) haben eine mitotische Funktion. Bei Kin2 und Kin3 handelt es sich um Kinesine mit einer Rolle im Vesikeltransport (Lehmler et al., 1997; Wedlich-Söldner et al., 2002b). Für die Familien der Kinesine Kin1, Kin4, Kin8 und Kin9 wurden mögliche Funktionen im Membrantransport und der Mitose/Meiose beschrieben (Schoch et al., 2003). Ein Kinesin, Kin7, konnte keiner der bekannten Kinesin-Familien zugeordnet werden.

2.3.2 Phänotypische Analyse der Kinesin Deletionsstämme

Die Orientierung der Mikrotubuli Plus-Enden in Richtung der stark wachsenden Hyphenspitze und die damit verbundene Rolle von Plus-End gerichteten Motoren, wie den Kinesinen sollte im Folgenden näher untersucht werden. Dafür wurden die Kinesine ausgewählt, denen aufgrund ihrer phylogenetischen Zuordnung keine klare mitotische Funktion zugeordnet werden konnte, und die somit eine mögliche Rolle im polaren Wachstum spielen könnten. Kin5 und Kin6 wurden aus diesem Grund von den näheren Untersuchungen ausgeschlossen.

Von den verbliebenen Kinesinen sollten, Deletionsmutanten in den Hintergründen FB2 und AB33 hergestellt werden, um die Rolle der Kinesine im polaren Wachstum von Sporidien, Konjugationshyphen und Hyphen in *Ustilago maydis* zu untersuchen.

In früheren Arbeiten zeigten $\Delta kin1$ -Mutanten keinen Phänotyp im polaren Wachstum (Lehmler et al., 1997), dies könnte auf das Vorhandensein von Kin9- und somit auf eine mögliche Redundanz der beiden Motoren- zurückzuführen sein könnte. Deshalb wurde neben der *kin9* Deletionsmutante auch eine *kin1/kin9* Doppel-deletionsmutanten hergestellt werden. Bei den anderen bisher veröffentlichten Kinesinen Kin2 und Kin3, führte nur die Deletion von Kin3 in Sporidien zu Zelltrennungdefekten (Wedlich-Söldner et al., 2002b) und in Filamenten zu bipolarem Wachstum (Wedlich-Söldner, 2001). Die Deletion von Kin2 hatte nur Einfluss auf Pathogenität, Wachstum und die Morphologie in dikaryotischen Filamenten (Lehmler et al., 1997; Steinberg et al., 1998). Die Deletion von Kin10 in Sporiden (Christian Schuberth, unveröffentlicht) blieb ohne morphologischen Phänotyp. Es fehlten also noch die Deletionsmutanten von *kin4*, *kin7*, *kin8*, *kin9* sowie die Doppelmutante *kin1/kin9*. Für diese Kinesine wurden in Zusammenarbeit mit Daniela Aßmann Deletionskonstrukte hergestellt, im Fall von *kin7* musste ein *crg*-Konstrukt (pcrgKin7) hergestellt werden, (siehe Material Methoden) und in FB2 und AB33 transformiert. Die Transformanten wurden durch Southern-Blot- und PCR-Analyse auf Abwesenheit des Wildtypallels überprüft (nicht gezeigt).

Mindestens zwei der erhaltenen positiven Transformanten wurden zuerst auf ihre morphologischen Phänotypen in haploiden Sporidien untersucht. Dabei konnten in den

Kinesin- Deletionsmutanten weder Defekte in der Zellmorphologie noch in Zellteilung oder –Wachstum beobachtet werden (Abb.12).

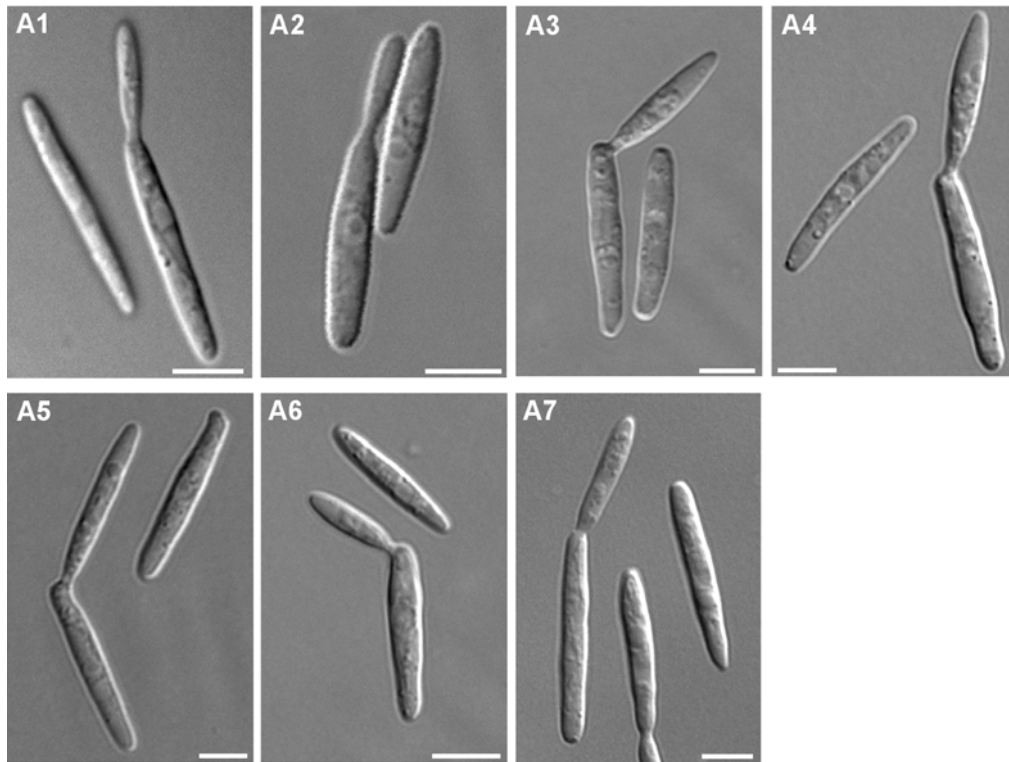


Abbildung 12: Haploide Sporidien von FB2, FB2 Δ kin1, FB2 Δ kin4, FB2 Δ kin9, FB2 Δ kin1/9, FB2 Δ kin8, FB2rkin7

FB2 Δ kin1 (A2) FB2 Δ kin4 (A3) FB2 Δ kin9 (A4) FB2 Δ kin1/9 (A5) FB2 Δ kin8 (A6) und FB2rkin7 (A7) zeigten im Vergleich zum FB2 Wildtyp (A1) keinen Unterschied. Der Stamm FB2rkin7 wurde unter reprimierenden Bedingungen in CM-glu angezogen. Balken: 5 μ m.

Inwieweit die Bildung oder das Wachstum von Konjugationshyphen gestört sind, wurde durch die Zugabe von synthetischem Pheromon zu Flüssigkulturen der jeweiligen Deletionsmutante (siehe Material Methoden) getestet. Die Konjugationshyphenbildung war in den Deletionsmutanten nicht gestört und sie zeigten auch keinen morphologischen Phänotyp (Abb.13).

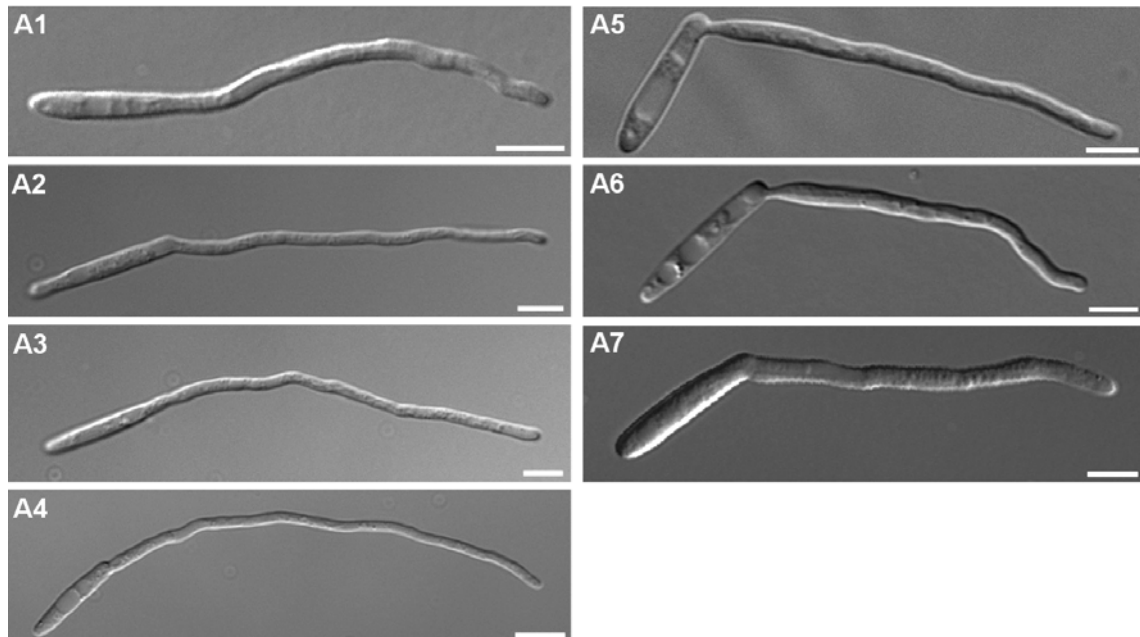


Abbildung 13: Konjugationshyphen von FB2, FB2 Δ kin1, FB2 Δ kin4, FB2 Δ kin9, FB2 Δ kin1/9, FB2 Δ kin8, FB2rkin7

Nach 6h Inkubation mit synthetischem Pheromon zeigten Konjugationshyphen der Deletionsstämme FB2 Δ kin1 (A2) FB2 Δ kin4 (A3) FB2 Δ kin9 (A4) FB2 Δ kin1/9 (A5) FB2 Δ kin8 (A6) und FB2rkin7 (A7) im Vergleich zum FB2 Wildtyp (A1) keinen Unterschied. Der Stamm FB2rkin7 wurde unter reprimierenden Bedingungen in CM-glu angezogen. Balken: 5 μ m.

Als letztes wurde der Einfluss der Kinesine auf das filamentöse Wachstum der Hyphen getestet. Die AB33-Deletionsstämme wurden in NM-Medium überführt und das Hyphenwachstum induziert. Die Hyphen der Deletionsstämme verhielten sich im Bezug auf Wachstum und Morphologie genauso wie der AB33-Kontroll-Stamm (Abb.14).

Abschließend ist also festzustellen, dass keines der neu identifizierten Kinesine eine wichtige Rolle im polaren Wachstum von Sporidien und Hyphen spielt. Sogar die Kinesine Kin1 und Kin9 aus der CENP-E-Familie, die in anderen Pilzen einen Wachstums-Phänotyp haben (Konzack et al.,2004), zeigten in *Ustilago maydis* keinen Phänotyp. Das nur die Deletion der Kinesine Kin2 und Kin3 zu Defekten im filamentösen Wachstum von Hyphen führte, läßt den Schluss zu, dass es sich bei diesen beiden Vertretern bekannter Organellen- und Vesikel-transportierender Kinesine um die Bedeutendsten im filamentösen Wachstum von *Ustilago maydis* handelt. Der Frage nach dem Zusammenhang zwischen den Kin2- und Kin3-abhängigen Transportvorgängen und dem filamentösen Wachstum der Hyphen, wurde im Weiteren nachgegangen.

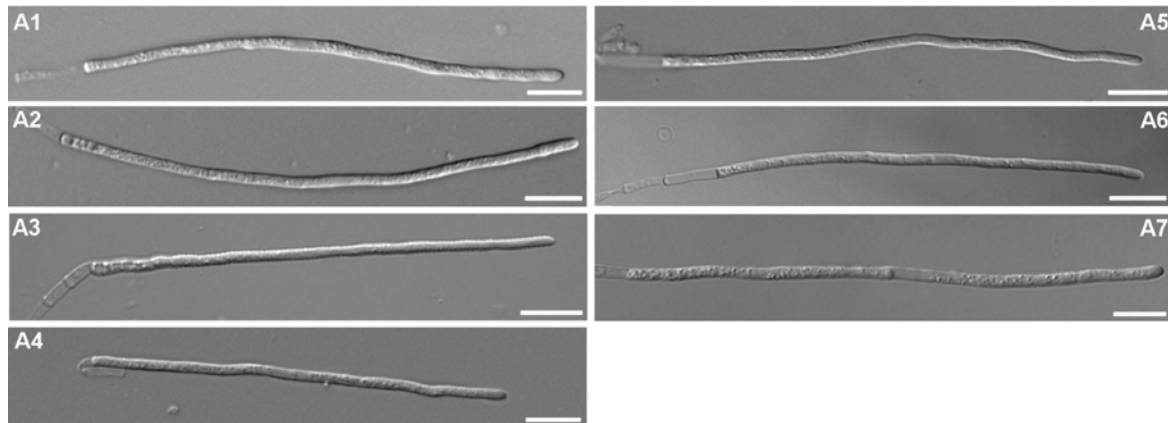


Abbildung 14: Deletion der Kinesine in *b*-abhängigen Hyphen

AB33 Δ kin1 (A2) AB33 Δ kin4 (A3) AB33 Δ kin9(A4) AB33 Δ kin1/9 (A5) AB33 Δ kin8 (A6) und AB33rkin7 (A7) zeigten im Vergleich zum AB33 Wildtyp (A1) keinen Unterschied. Die Hyphenbildung in dem Stamm AB33rkin7 wurde unter reprimierenden Bedingungen in NM-glu induziert. Balken:10 μ m. Die Abbildung wurde in Zusammenarbeit mit Dr. G. Steinberg erstellt.

2.4 Die Aufgaben von *kin2* und *kin3* im filamentösen Wachstum

2.4.1 Eine *kin2*, *kin3* Doppelmutante zeigt keinen zusätzlichen Phänotyp

Nachdem nur Kin2 und Kin3 eine Rolle im filamentösen Wachstum zu spielen scheinen, und ihre Deletion zu einem ähnlichen Phänotyp führte (Abb.15A/B), war die Herstellung einer *kin2/kin3* Doppelmutante der erste Schritt zu einem besseren Verständnis ihrer Funktionen. Hierzu wurde das Plasmid, welches *kin3* unter Kontrolle des regulierbaren *crg*-Promotors (Bottin et al., 1996) trägt, in den Stamm AB33 Δ kin2 transformiert. Die homologe Rekombination in das Genom wurde durch Southern-Analysen überprüft. Zusätzlich sollten haploide Sporidien dieses Stammes, die in CM-glu Medium, also unter „AUS“-Bedingungen, angezogen wurden, den gleichen Zelltrennungsdefekt besitzen, wie er auch für haploide Δ *kin3*-Mutanten beschrieben (Wedlich-Söldner et al., 2002b) wurde.

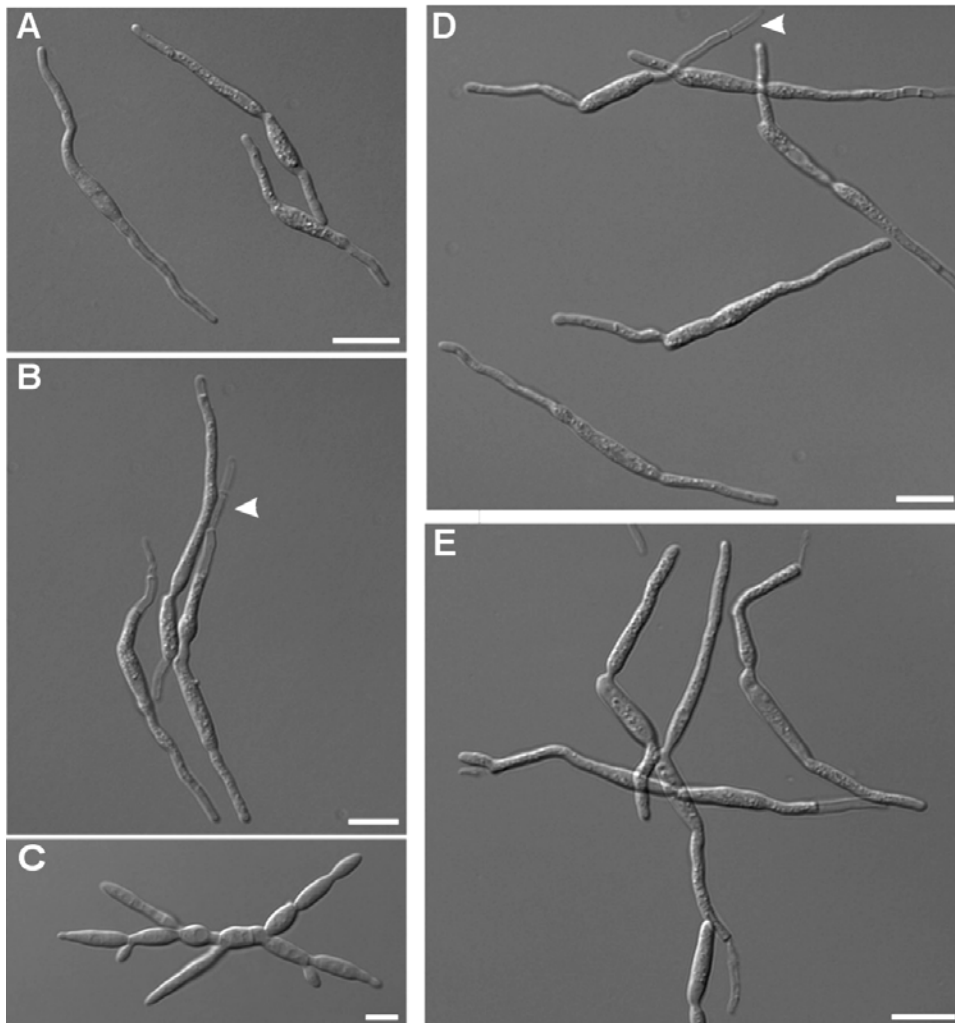


Abbildung 15: Deletion der Klasse- 1 und -3 Kinesine in AB33

AB33 Δ kin2 (**A**), AB33 Δ kin3 (**B**) und AB33 Δ kin2rkin3 (**D**) b-Hyphen sind zwar noch in der Lage Hyphen auszubilden, diese sind aber bipolar und im Fall von AB33 Δ kin2 auch ohne leere Abschnitte. Die Hyphen von AB33 Δ kin3 sind auch bipolar, aber sie bilden noch leere Abschnitte (**B**, **Pfeil**). In der AB33 Δ kin2rkin3 Doppelmutante zeigen die Sporidien in CM-glu einen ähnlichen „Bäumchenphänotyp“ wie die von FB2 Δ kin3 (**C**). Die b-Hyphen von AB33 Δ kin2rkin3 zeigen in NM-glu keinen zusätzlichen Phänotyp, sie bilden genau wie die AB33 Δ kin3 Hyphen leere Abschnitte aus (**D**, **Pfeile**). Den gleichen Phänotyp wie die Deletion von *kin2* und *kin3* zeigen b-Hyphen, in denen Mikrotubuli durch 10 μ M Benomyl zerstört wurden (**E**). Balken: 10 μ m und 5 μ m (C).

Dieses war der Fall (Abb.15C), allerdings waren die Sporidien zusätzlich noch dicker und manchmal auch verkürzt. Überführte man nun diesen Stamm in NM-glu Medium, um die Filamentbildung zu induzieren, zeigten die Hyphen nach 5-8h einen vergleichbaren bipolaren Wachstumsphänotyp mit verkürzten Hyphen, wie AB33 Δ kin3- oder AB33 Δ kin2-Hyphen (Abb.15A; 15B; 15D). Die doppelt Deletionshyphen bildeten aber im

Gegensatz zu $\Delta kin2$ -Hyphen, genau wie die AB33 $\Delta kin3$ -Hyphen leere Abschnitte an ihren Enden (Abb.15B; 15D, Pfeilspitzen). Das Fehlen dieser leeren Abschnitte wurde schon zuvor für $\Delta kin2$ -Hyphen beschrieben, und auf einen Defekt von Kin2 im retrograden Vakuolentransport zurückgeführt (Steinberg et al., 1998). Erstaunlicherweise ähneln diese Phänotypen aber auch dem Phänotyp von AB33-Hyphen, die für mindestens 8h in der Gegenwart von 10 μ M Benomyl (Abb.15E), mit einem vollständig zerstörten Mikrotubuli-Zytoskelett gewachsen sind. Zusammenfassend läßt sich sagen, dass sowohl die Deletion von *kin2* oder *kin3* als auch die Deletion beider Kinesine zum gleichen Phänotyp führt, woraus man schließen kann, dass beide Kinesine innerhalb des gleichen Transportweges agieren, denn wenn sie in unterschiedlichen Transportwegen aktiv wären, hätte die Deletion der einzelnen schon zu verschiedenen Phänotypen führen können, und die von Beiden zusammen zu einer Verstärkung des Phänotyps der Einzeldelentionsmutante.

Im Folgenden sollte nun näher untersucht werden welchen Einfluss Kin2 und Kin3 auf die Mikrotubuli haben könnten oder inwieweit sie im Transport entlang der Mikrotubuli kooperieren.

2.4.2 Die Deletion von *kin2* und *kin3* haben keinen Einfluss auf die Mikrotubuli-Organisation und -Orientierung in Hyphen

Die Ähnlichkeit der Phänotypen in den verschiedenen Deletionsmutanten könnte darauf zurückzuführen sein, dass die fehlenden Kinesine die Organisation oder die Orientierung der Mikrotubuli so stark verändern, wie es auch eine vollständige Zerstörung des Mikrotubuli-Zytoskelettes, zur Folge hätte. Um die Organisation der Mikrotubuli zu überprüfen, wurde das Plasmid *potefGFPTub1* welches das GFP-Tubulin1 (α -Tubulin)-Fusionsprotein unter Kontrolle des konstitutiven *otef*-Promotors exprimiert, in die Stämme AB33 $\Delta kin2$, AB33 $\Delta kin3$ und AB33 $\Delta kin2rkin3$ transformiert. In den resultierenden Stämmen AB33 $\Delta kin2$ GT, AB33 $\Delta kin3$ GT und AB33 $\Delta kin2rkin3$ GT zeigte die Expression des GFPTub1-Fusionsproteins, dass die Organisation der Mikrotubuli in diesen Stämmen nicht gestört war (Abb.16).

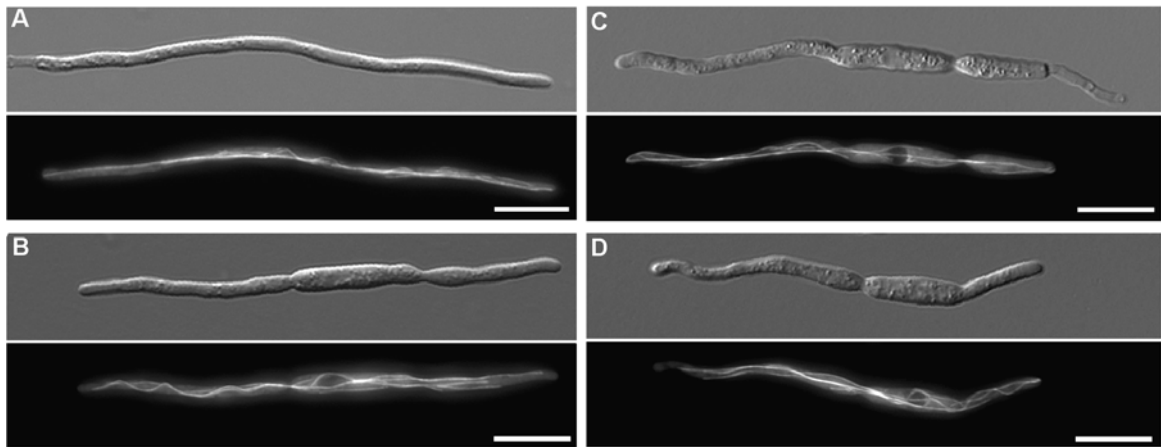


Abbildung 16: Mikrotubuli-Zytoskelett in $\Delta kin2$ -/ $\Delta kin3$ - und $\Delta kin2rkin3$ -Mutanten

A: Das Mikrotubuli-Zytoskelett wurde durch die Expression von GFP-Tub1 in Hyphen des Stammes AB33 sichtbar gemacht. Die Mikrotubuli reichen vom basalen Septum bis in die Wachstumsspitze.

B, C, D: Die Expression des GFP-Tub1-Konstruktes in Hyphen von AB33 $\Delta kin2$ (B), AB33 $\Delta kin3$ (C) und AB33 $\Delta kin2rkin3$ (D) zeigte keine Veränderungen in der Mikrotubuli-Organisation im Vergleich zu AB33. Balken: 10 μ m.

Um auszuschließen, dass die Deletion von *kin2* und *kin3* die Orientierung der Mikrotubuli beeinflusst, wurde das Peb1YFP-Fusionkonstrukt, welches an Mikrotubuli-Plus-Enden lokalisiert (Straube et al., 2003), in den Stämmen AB33 $\Delta kin2$ und AB33 $\Delta kin3$ exprimiert. Die Bewegungsrichtung der Peb1-YFP-Signale wurde in Hyphen nach 6-8h Wachstum in NM-glu bestimmt (Abb.17A/B/D/E). In AB33 $\Delta kin2$ bewegten sich 91% der Signale (Abb.17C), in AB33 $\Delta kin3$ 89% der Signale (Abb.17F) in Wachstumsrichtung der Hyphe. Diese Werte stimmen mit denen der AB33-Hyphen überein (vergl. Abb.8).

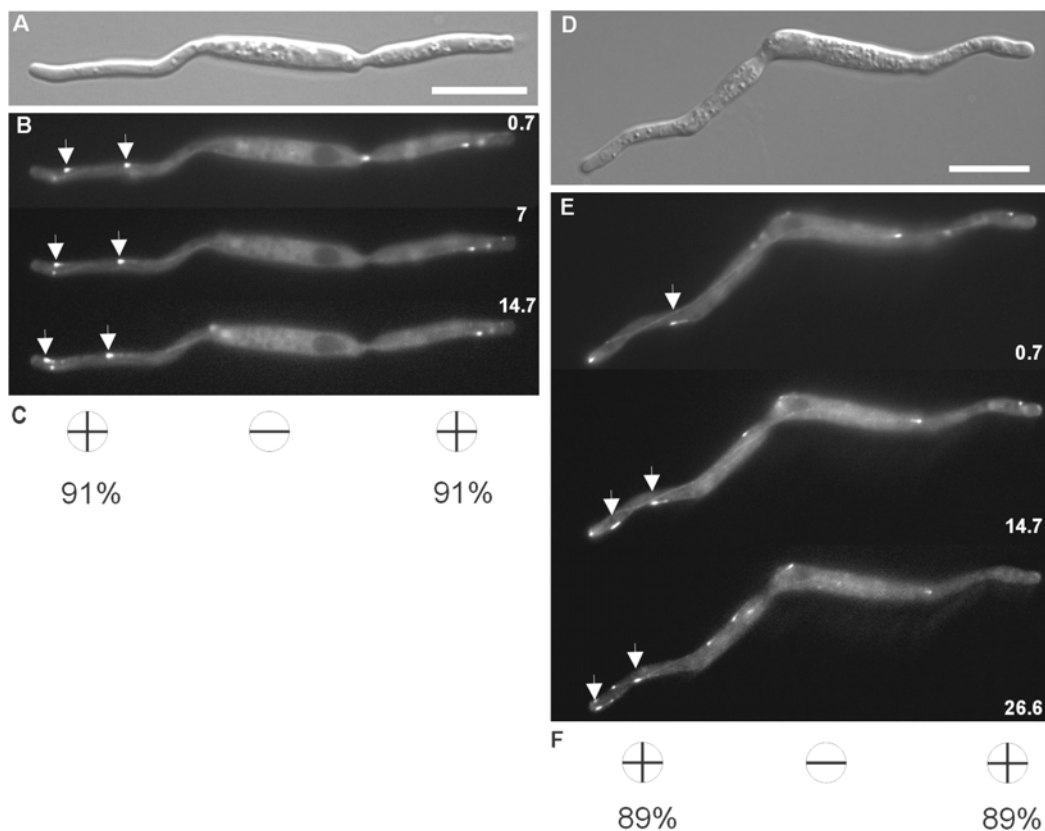


Abbildung 17: Mikrotubuli-Orientierung in $\Delta kin2$ - und $\Delta kin3$ -Hyphen

A und D: Die Stämme AB33 $\Delta kin2$ -Peb1YFP und AB33 $\Delta kin3$ -Peb1YFP wurden für 6-8h Stunden in NM-glu angezogen bis die typischen bipolaren $\Delta kin2/ \Delta kin3$ -Phänotypen zu beobachten waren. Balken: 10 μm .

B und E: Durch die Expression von Peb1-YFP wurden die wachsenden Plus-Enden der Mikrotubuli sichtbar (Straube et al. 2003) (bewegende Peb1-YFP-Signale mit Pfeilen markiert). Die Aufnahmezeit ist in Sekunden angegeben.

C und F: Die Quantifizierung der Bewegungsrichtung der Peb1-YFP-Signale zeigte, dass sich 91% bzw. 89% der Signale zur Wachstumsspitze hin orientieren (mit "+" markiert). Die Analyse erfolgte an 21/12 Hyphen in denen 131/59 (119 Spitze/12 Mitte bzw. 54/5) Signale gezählt wurden.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass die Deletion von *kin2* und *kin3* sowohl auf die Organisation als auch auf die Orientierung der Mikrotubuli keinen Einfluss hat. Die Wachstumsdefekte der $\Delta kin2$ - und $\Delta kin3$ -Mutantenhypen sind somit wohl eher auf eine Störung im anterograden Transport zurückzuführen.

2.4.3 Verteilung Yup-GFP markierter Endosomen in Hyphen

In den vorangegangenen Kapiteln konnte gezeigt werden, dass das Fehlen von Kin2 oder Kin3, auch bei einem intakten Mikrotubuli-Zytoskelett, zu einem reduzierten Wachstum der Hyphe führt. Dies bedeutet, dass Kin2 und Kin3 wahrscheinlich im gleichen Transportweg aktiv sind, oder dass beide am Transport eines wichtigen Transportguts beteiligt sind, wo der Ausfall eines Kinesins dem Ausfall Beider gleichkommt. Um dieser Frage nachzugehen, wurden Yup1GFP markierte frühe Endosomen, die als Transportgut von Kin3 bekannt sind (Wedlich-Söldner et al., 2002), als Marker verwendet. In früheren Arbeiten wurde gezeigt, dass frühe Endosomen von Kin3 bewegt werden, und dass diese Endosomen für das Hyphenwachstum wichtig sind (Wedlich-Söldner, 2001; Wedlich-Söldner et al., 2000). Im Weiteren sollte daher untersucht werden inwieweit Kin3 und Dynein, die am Transport der frühen Endosomen in haploiden Sporidien beteiligt sind (Wedlich-Söldner et al., 2002b), diese auch in Hyphen transportieren. Zusätzlich sollte die Rolle von Kin2 in diesem Transportprozess näher untersucht werden.

2.4.3.1 Yup-GFP bewegt sich entlang von Mikrotubuli

In einem ersten Versuch sollte überprüft werden, ob sich Yup1GFP-markierte frühe Endosomen auch in Filamenten entlang von Mikrotubuli bewegen. Dazu wurde das Plasmid *potefYup1GFP*, welches den an *gfp* fusionierten *yup1* ORF unter der Kontrolle des *otef*-Promotors trägt, in den Stamm AB33RFP₂Tub1 transformiert. Dieser Stamm ermöglichte die gleichzeitige Betrachtung von Yup1GFP-markierten Endosomen und von RFP-Tub1 exprimierenden Mikrotubuli. In der Tat bewegten sich die GFP-markierten frühen Endosomen entlang der RFP-markierten Mikrotubuli (Abb.18B/C). Dieses Ergebnis wurde dadurch bestätigt, dass sich die GFP-markierten frühen Endosomen in diesem Stamm nach 30minütiger Behandlung mit 20 µM Benomyl nicht mehr bewegten (Abb.18E). Die Zerstörung von Aktin nach 30minütiger Behandlung mit Latrunculin A führte nicht zu einer Beeinträchtigung der Bewegung der Endosomen (Abb.18F). Aus diesen Beobachtungen konnte der Schluß gezogen werden, dass sich frühe Endosomen auch in Hyphen ausschließlich entlang von Mikrotubuli bewegen.

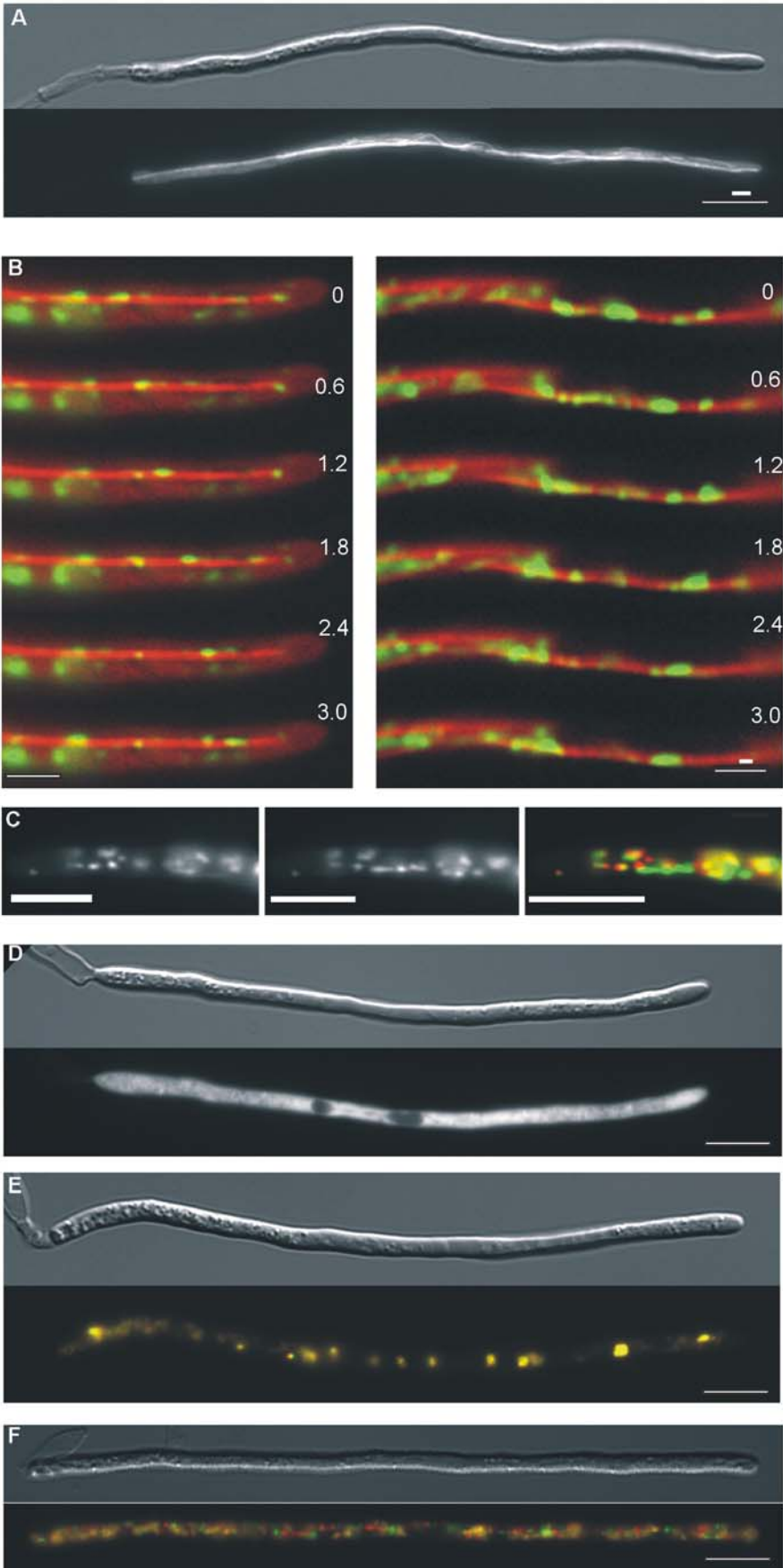


Abbildung 18: Endosomen lokalisieren entlang von Mikrotubuli

A: GFP-Tub1 markierte Mikrotubuli im Stamm AB33 nach 6h Wachstum unter induzierenden Bedingungen (NM-glu). Balken: 10 μm .

B: Endosomen wurden mit Hilfe des spezifischen Membranrezeptors Yup1 markiert, welcher mit GFP fusioniert wurde (Wedlich-Söldner et al., 2002). Diese Endosomen bewegen sich entlang von Mikrotubuli, die durch die Expression von RFP-Tub1 sichtbar gemacht wurden. Die Aufnahmezeit ist in Sekunden angegeben. Balken: 3 μm .

C: Die Bewegung der Endosomen wurde durch die Überlagerung von zwei einzelnen Bildern aus der Filmsequenz, die rot (T1) und grün (T2) eingefärbt wurden, sichtbar gemacht. Die meisten Endosomen bewegen sich, was man durch die roten und grünen Punkte sehen kann. Einige Punkte sind gelb gefärbt, was dafür spricht, dass sich nicht alle Endosomen bewegen. Balken: 3 μm .

D: Die Behandlung von Hyphen mit 20 μM Benomyl, in denen GFP-Tub1 exprimiert wird, führt nach 30min zu einer vollständigen Zerstörung der Mikrotubuli (unteres Bild). Balken: 10 μm .

E: Die Zerstörung der Mikrotubuli durch Benomyl in dem Stamm AB33Yup1GFP resultiert in dem Verlust der Beweglichkeit aller Endosomen. Dieses kann durch die Überlagerung zweier Bilder (T1 rot, T2 grün), sichtbar gemacht werden, da durch die Überblendung von rot und grün alle sich nicht bewegenden Endosomen gelb erscheinen. Balken: 10 μm .

F: Wird in AB33Yup1GFP das Aktin-Zytoskelett durch die Behandlung mit 50 μM Latrunculin A zerstört, resultiert dieses nicht in einem Verlust der Endosomenbeweglichkeit, was durch das Vorhandensein von rot und grün gefärbten Endosomen bestätigt wird. Balken: 10 μm . Aufnahmezeit in Sekunden. Die Abbildung wurde in Zusammenarbeit mit Dr. G. Steinberg erstellt.

2.4.3.2 Motilität von Endosomen in *a*- und *b*-abhängigen Filamenten hängt von Kin3 und Dynein ab.

In Sporidien ist die bidirektionale Bewegung der Endosomen entlang der Mikrotubuli von dem in Plus-End-Richtung transportierenden Kin3 und dem minus- gerichteten Dynein abhängig (Wedlich-Söldner 2002). Um den Einfluss von Kin3 und Dynein auf die Bewegung der Endosomen im Filament zu untersuchen, wurde zum einen der Stamm AB33 Δ kin3Yup1GFP (von Roland Wedlich-Söldner hergestellt) verwendet zum anderen sollte der Stamm AB33Dyn2^{ts}Yup1GFP durch die Transformation des vorhandenen *dyn2ts*-Konstrukt (Wedlich-Söldner et al., 2002a) hergestellt werden. Da dieses nach mehreren Versuchen nicht möglich war wurde das Konstrukt *pcrgDyn1* in den Stamm AB33Yup1GFP transformiert. Dieses trägt das *dyn1*-Gen unter Kontrolle des induzierbaren *crg*-Promotors (Bottin et al., 1996). Die erfolgreiche homologe Rekombination wurde in den Transformanten, die kein Wachstum auf Glukose-Platten zeigten, anschließend durch eine Southern-Analyse bestätigt. Der Kontrollstamm AB33Yup1GFP wurde für mindestens 5h in NM-glu inkubiert. Die Endosomen zeigten ein bidirektionales Bewegungsmuster und eine gleichmäßige Verteilung über die gesamte

Hyphe (Abb.19A). In AB33 Δ kin3Yup1GFP-Hyphen, war nach 16h Wachstum in NM-Medium kaum noch Endosomen-Motilität zu beobachten, zusätzlich waren Endosomen-Akkumulationen in der zentralen Mutterzelle sichtbar (Abb.19B), wo sich sehr wahrscheinlich der Großteil der Mikrotubuli-Minus-Enden befindet (vergl.1.4.3). Die Motilität der Endosomen wurde mit Hilfe einer Filmsequenz ausgewertet, indem die Anzahl der sich bidirektional bewegenden Partikel 10 μ m hinter dem Apex über einen definierten Zeitraum (28sek.) bestimmt wurde (Abb.19F). Die Motilität der Endosomen war im Vergleich zum Wildtyp (anterograd: $6,43 \pm 2,6$; retrograd: $6,06 \pm 2,37$), auf etwa ein Zehntel reduziert (a: $0,35 \pm 0,49$; r: $0,64 \pm 0,84$) (Abb.19F), wobei der Anteil des minus-gerichteten Transports höher war, was auf die Aktivität von Dynein schließen lässt. Der Stamm AB33crgDyn1Yup1GFP wurde zur Induktion der Hyphenbildung für ca. 6h in NM-ara Medium inkubiert. Um die Expression von Dyn1 zu inhibieren, wurde der Stamm für weitere 22h in NM-glu- Medium inkubiert. Die Endosomen konzentrieren sich in diesem Stamm im Apex der Hyphe, was auf ein Fehlen des minus-gerichteten Motors schließen ließ (Abb.19C). Zu diesem Zeitpunkt war die Motilität der Endosomen allerdings nur um die Hälfte reduziert (a: $3,52 \pm 1,57$; r: $2,52 \pm 1,30$) (Abb.19F), was nicht auf eine alleinige Funktion von Dynein als minus-gerichteten Motor sprechen würde. Da aber das Dynein in diesem Stamm unter der Kontrolle des *crg*-Promotors exprimiert wurde, und diese Promotoren in glukose-haltigem Medium nicht immer vollständig ausgeschaltet sind, wurde eine Northern-Analyse mit den Stämmen AB33 und AB33rDyn1YupGFP durchgeführt (nicht gezeigt). Die Stämme wurden in arabinose- und glukose-haltigem Medium angezogen und im Anschluss für die Isolierung von RNA verwendet. Als Nachweis für die Induktion/Repression von Dyn1 wurde der Blot mit einer spezifischen *dyn1*-Sonde beprobt. Der Blot zeigte, dass auch in glukose-haltigem Medium noch Transkript gebildet wurde (nicht gezeigt). Deshalb konnte nicht ausgeschlossen werden, dass dieses noch translatiert wurde und somit der Zelle noch restliches Dynein zur Verfügung stand. Das würde auch die erhöhte Endosomen Motilität erklären.

Um ein genaueres Bild von der Rolle des Dyneins im Endosomen-transport in Hyphen zu bekommen, wurde das Yup1-GFP Fusionsprotein unter dem *otef*-Promotor in dem Stamm FB2Dyn2ts exprimiert, in dem sich bereits ein temperatursensitives *dyn2ts*-Allel befand (Wedlich-Söldner 2002b).

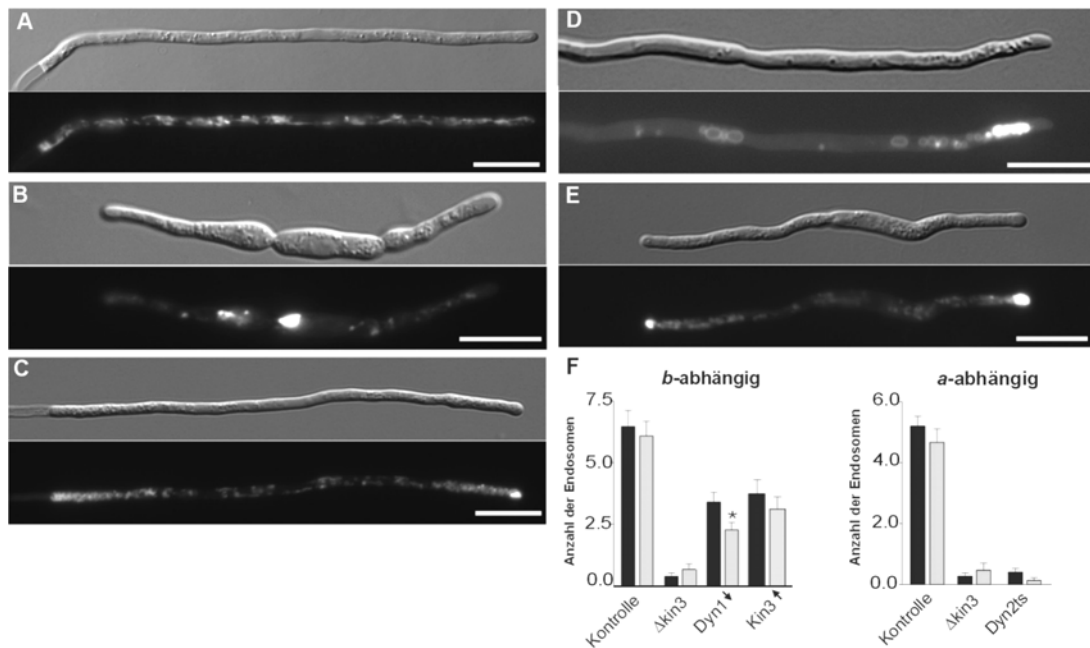


Abbildung 19: Lokalisation der Endosomen ist von Kin3 und Dynein abhängig

A: In AB33Yup1GFP Hyphen, die unter induzierenden Bedingungen in NM-glu angezogen wurden, sind die Endosomen gleichmäßig über die ganze Hyphe verteilt. Balken: 10 μ m.

B: In dem Stamm AB33 $\Delta kin3$ Yup1GFP führt die Deletion von *kin3* zur Ausbildung bipolarer Hyphen (vergl. Abb.14) und zu einer Akkumulation der Endosomen in der Nähe des Kerns der Mutterzelle, wo die Minus-Enden der Mikrotubuli lokalisieren. Balken: 10 μ m.

C: In AB33rDyn1Yup1GFP wurden nach 22h Wachstum in NM-glu normale Hyphen gebildet, in denen es aber zu einer Konzentration von Yup-GFP-markierten Endosomen nahe des basalen Septums und des Apex kam, wo sich die Plus-Enden der Mikrotubuli befinden. Balken: 10 μ m.

D: Die Endosomen akkumulierten in *a*-abhängigen Hyphen (nach 6h Inkubation mit Pheromon) des temperatur-sensitiven Stammes FB2dyn^{ts}Yup1GFP, nach 2h Wachstum bei restriktiver Temperatur (32°C) verstärkt in der Hyphenspitze. In diesem Stamm war die Konzentration in der Spitze ausgeprägter als in der AB33rDyn1Yup1GFP-Hyphe, was wahrscheinlich auf den *crg*-Promotor zurückzuführen ist. Balken: 10 μ m.

E: Die Überexpression von Kin3 in dem Stamm AB33rKin3YupGFP führt nach Wachstum unter induzierenden Bedingungen (CM-ara) auch zu einer Akkumulation der Endosomen im Apex der bipolaren Hyphe. Dies ist auf die verstärkte Aktivität des Mikrotubuli plus-end-gerichteten Kin3 zurückzuführen (vergl. Abb.16: EB1 in $\Delta kin3$ -Hyphen). Balken: 10 μ m.

F: Motilitätsmessungen der Endosomen wurden in Hyphen (der Stämme A-E) an einem Punkt 10 μ m hinter dem Apex durchgeführt. Dabei wurde die Anzahl der sich Bewegenden Partikel in jeder Richtung (anterograd/retrograd), über einen Zeitraum von 28 Sekunden bestimmt. Die Balken entsprechen dabei den Mittelwerten aus n=16 Hyphen (b-abhängige) und n=12 Hyphen (a-abhängig).

Schwarze Balken = anterograder Transport, graue Balken = retrograder Transport.

Der biallelische *a*-Locus von *Ustilago maydis* kodiert für ein Pheromon/Rezeptor-System, welches nach der Erkennung zweier kompatibler Sporidien für die Ausbildung der Konjugationshyphen (*a*-Filamente) verantwortlich ist.

Zur Untersuchung des Dynein-abhängigen Endosomentransports in Hyphen, wurde in dem Stamm FB2dyn2tsYup1GFP zunächst die Bildung von *a*-abhängigen Filamenten, durch die Stimulierung mit synthetischem Pheromon bei permissiver Temperatur, induziert

(vergl. Material Methoden). Diese Hyphen wurden anschließend für 2h bei restriktiver Temperatur inkubiert. In diesen *a*-abhängigen Hyphen kam es genauso wie in *b*-abhängigen Filamenten zu einer Akkumulation der Endosomen im Apex (Abb.19D), die aber nicht direkt in der Spitze zu detektieren war, sondern ein wenig dahinter. Worauf diese Lokalisation zurückzuführen ist, ist noch nicht verstanden. Zusätzlich war aber hier kaum noch eine Bewegung der Endosomen detektierbar (Abb.19F, rechts). Die Motilität der Endosomen war unter restriktiven Bedingungen auch auf ca. ein Zehntel reduziert ($0,45\pm 0,52$; $0,18\pm 0,40$), wobei es im *dyn2ts*-Stamm mehr Restbewegung in Richtung der Plus-Enden gab (Abb.19F, rechts). Um sicher zu gehen, dass sich die Endosomen in *a*-abhängigen Hyphen genauso verhielten, wie in *b*-abhängigen, wurden die Motilitätsmessungen auch an *a*-abhängigen Filamenten der Kontrolle und des $\Delta kin3$ -Stammes durchgeführt (Abb.19F, rechts). Dieses führte zu vergleichbaren Ergebnissen wie in den *b*-abhängigen Filamenten (Abb.19F, rechts).

Wenn nun Kin3 und Dynein auch in Hyphen in einem Gleichgewicht arbeiten, müsste die Überexpression von Kin3 zu einer Verschiebung des Gleichgewichts in Richtung Plus-End gerichteten Transports führen. Um diese Annahme zu bestätigen wurde *kin3* unter dem stark induzierbaren *crg*-Promotor in dem Stamm AB33Yup1GFP exprimiert. Der Wechsel der Kohlenstoffquelle von Glukose nach Arabinose führte zur Überexpression von *kin3* (nicht gezeigt). Diese Überexpression resultierte tatsächlich in der gleichen Lokalisation der Endosomen, wie auch in *dyn2ts*-Hyphen (Abb.19E). Interessanterweise zeigten diese Hyphen auch den gleichen bipolaren Wachstumsphänotyp, wie $\Delta kin3$ -Hyphen (Abb.19E).

Anhand der Ergebnisse über die Organisation und Motilität der Endosomen lässt sich also sagen, dass die frühen Endosomen auch in Hyphen, von Kin3 in Richtung der Mikrotubuli-Plus-Enden und von Dynein in die entgegengesetzte Richtung transportiert werden. Des Weiteren scheint das Hyphenwachstum von der Verteilung der frühen Endosomen abzuhängen, denn eine Akkumulation sowohl im Apex der Hyphe als auch in der Mutterzelle führt zu bipolaren Hyphen mit verkürzten Filamenten. Da auch *kin2*-Deletionshyphen diesen Wachstumsphänotyp besitzen, sollte im Weiteren die Rolle von Kin2 im Transport der frühen Endosomen untersucht werden.

2.4.4 Die Endosomenbewegung in *kin2* Deletionsstämmen ist vom Entwicklungsstadium abhängig

In den vorangegangenen Untersuchungen stellte sich heraus, dass Kin2 und Kin3 für das Hyphenwachstum von besonderer Bedeutung sind, und dass die Deletion jedes einzelnen oder der beiden Kinesine zusammen zum gleichen Wachstumsphänotyp führt. Um nun festzustellen ob und wie die beiden Motoren interagieren könnten, sollte im Folgenden die Rolle von Kin2 im Endosomentransport näher untersucht werden. Als erstes wurde der Stamm AB33 Δ kin2YupGFP hergestellt, in dem das Yup1-GFP-Fusionsprotein unter dem *otef*-Promotor exprimiert wurde. Sporidien dieses Stammes, zeigten eine normale Endosomen Verteilung (Abb.20A/B) und nur leicht reduzierte Bewegung ($3,38 \pm 2,0$; $1,5 \pm 1,15$) (Abb.20C), wobei der retrograde Transport (plus-gerichtet) signifikant ($P=0,013$) reduziert war. Induzierte man durch einen Medienwechsel von CM nach NM die Hyphenbildung, kam es nach 5h zu einer Fehlverteilung der Endosomen, die außerdem kaum noch Bewegung zeigten ($0,0625 \pm 0,25$; $0,1875 \pm 0,403$) (Abb.20E). Die Endosomen akkumulierten, wie schon zuvor in *dyn2ts*-Mutanten-Hyphen in der wachsenden Hyphenspitze (Abb.20D), was auf eine verstärkte Aktivität von Kin3 in Δ kin2-Hyphen hinwies. Um zu überprüfen ob die Akkumulation auf die Aktivität von Kin3 zurückzuführen ist, wurde *potefYup1GFP* in den Stamm AB33 Δ kin2rkin3 transformiert. Der resultierende Stamm AB33 Δ kin2rkin3-Yup1GFP, der das *kin3*-Gen unter Kontrolle des *crg*-Promotors exprimiert, ermöglichte die Untersuchung der Endosomenverteilung in Abhängigkeit von Kin2 und Kin3. Die Inkubation des Stammes in NM-glu führte dazu, dass *kin3* nicht mehr exprimiert werden konnte (Abb.20G, Spur 3). In dieser konditionellen Mutante war der Δ kin2-Deletionseffekt nicht mehr sichtbar, und die Endosomen lokalisierten wieder im Zentrum der Mutterzelle, wie auch in der Δ kin3-Hyphe (Abb.20F), wohingegen die Inkubation in NM-ara, was zur Überexpression von Kin3 führt (Abb. 20G, Spur 2) wieder zur Akkumulation der Endosomen im Apex führt (vergl. Abb.19E).

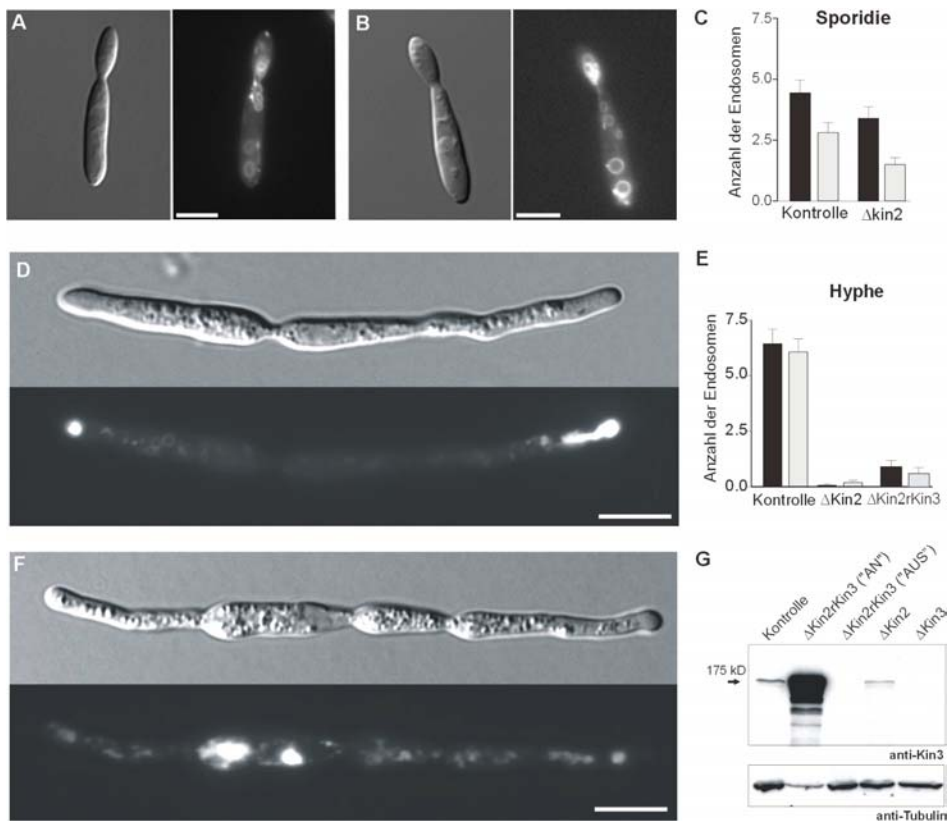


Abbildung 20: Kin2 ist am Transport von Endosomen in der Hyphe beteiligt

A: Verteilung Yup-GFP markierter Endosomen in haploiden Sporidien von AB33YupGFP. Balken: 5µm.

B: Eine ähnliche Verteilung liegt in haploiden Sporidien von AB33 $\Delta kin2$ YupGFP vor. Balken: 5µm.

C: Quantitative Analyse der Endosomenbewegung in haploiden Sporidien von AB33YupGFP (Kontrolle) und AB33 $\Delta kin2$ YupGFP ($\Delta kin2$). Die Anzahl der Yup-GFP-markierten Vesikel, die sich über einen definierten Zeitraum (28 Sekunden) in anterograder und retrograder Richtung innerhalb der Sporidie bewegen, wurde bestimmt. Die Balken entsprechen dem Mittelwert aus 16/17 Zellen. Anterograd (schwarz), retrograd (grau). Die Sternchen markieren den signifikanten Unterschied (P=0,013).

D: In AB33 $\Delta kin2$ YupGFP-Hyphen akkumulieren Yup-GFP-markierte Partikel nach 8h Wachstum in NM-glu an den Zellpolen. Balken: 10 µm.

E: Quantitative Analyse der Endosomenbewegung in b-Hyphen von AB33YupGFP (Kontrolle) und AB33 $\Delta kin2$ YupGFP ($\Delta kin2$) nach 8h Wachstum in NM-glu bzw. von AB33 $\Delta kin2rkin3$ YupGFP nach 16h in NM-glu. Die Anzahl der Yup-GFP markierten Vesikel, die sich über einen definierten Zeitraum (28 Sekunden) in anterograder und retrograder Richtung an einem Punkt 10µm hinter dem Apex bewegen. Die Balken entsprechen dem Mittelwert aus 16/10 Hyphen. Anterograd (schwarz), retrograd (grau).

F: In AB33 $\Delta kin2rkin3$ Yup-GFP lokalisieren die Yup-GFP markierte Endosomen nach 16h Wachstum in NM-glu in der zentralen Mutterzelle. Balken: 10 µm.

G: Der Western-Blot aus Proteinextrakten der Stämme AB33YupGFP (Kontrolle), AB33 $\Delta kin2$ YupGFP ($\Delta kin2$), AB33 $\Delta kin3$ YupGFP ($\Delta kin3$) nach 8h Wachstum in NM-glu sowie des Stammes AB33 $\Delta kin2rkin3$ Yup-GFP ($\Delta kin2rkin3$) nach Anzucht unter reprimierenden (NM-glu) und induzierenden Bedingungen (NM-ara). Mit Hilfe des anti-Kin3-Antikörpers konnte in AB33YupGFP und AB33 $\Delta kin2$ YupGFP nur eine schwache Kin3 Expression nachgewiesen werden. In dem Stamm AB33 $\Delta kin3$ YupGFP und in dem unter reprimierenden Bedingungen angezogenen Stamm AB33 $\Delta kin2rkin3$ Yup-GFP konnte hingegen keine Kin3 Expression detektiert werden. Die Induktion von Kin3 in dem Stamm AB33 $\Delta kin2rkin3$ Yup-GFP nach Wachstum in NM-ara führte zu einem sehr starken Kin3-Expressions-Signal. Als Ladekontrolle wurde die Tubulin-Bande abgebildet, die mit Hilfe des anti-Tubulin Antikörpers nachgewiesen wurde.

Die Abhängigkeit der Endosomenlokalisierung von der Aktivität von Kin3, läßt den Schluss zu dass die Deletion von *kin2* nur einen indirekten Einfluss auf den Kin3-abhängigen Transport hat. Dieses wurde noch dadurch bestätigt, dass Western-Analysen in $\Delta kin2$ -Hyphen zu keiner Hochregulierung von Kin3 führten (Abb.20G, Spur 4). Kin2 scheint also keinen direkten Einfluss auf die Aktivität von Kin3 zu haben, trotzdem führt seine Deletion zu dem gleichen Lokalisationsmuster wie die Überexpression von Kin3, dass legt die Vermutung nahe, dass Kin2 eher den minus-gerichteten Transport verringert, und dadurch das Motorengleichgewicht stört.

2.4.5 Dynein Lokalisation an Mikrotubuli Plus-Enden in Hyphen ist *kin2*-abhängig

Aus *Aspergillus nidulans* ist bekannt, dass das konventionelle Kinesin KinA für die Akkumulation von zytoplasmatischem Dynein an Mikrotubuli-Plus-Enden benötigt wird (Zhang 2002). In *Ustilago maydis* könnte Kin2 auch für die Anlieferung von Dynein an die Plus-Enden der Mikrotubuli verantwortlich sein. Um dieses zu überprüfen, wurde *dyn2* N-terminal mit einem dreifachen *gfp* fusioniert (freundlicherweise von Anne Straube zur Verfügung gestellt) und homolog in das Genom von AB33 und AB33 $\Delta kin2$ integriert. Die homologe Rekombination wurde durch Southern-Analysen bestätigt.

In AB33 waren GFP₃-Dyn2-Signale an wachsenden Plus-Enden von Mikrotubuli zu beobachten (Abb.21A), was durch eine zusätzliche Expression von RFP-Tub1 in AB33GFP₃-Dyn2 und AB33 $\Delta kin2$ GFP₃-Dyn2 bestätigt wurde (Abb.21B). Die GFP₃-Dyn2-Signale in der subapikalen Region der Hyphe waren allerdings nicht so stark wie die Peb1-YFP-Signale in vergleichbaren Hyphen. Am stärksten war das Dynein-Signal aber an den Mikrotubuli-Plus-Enden, die in den wachsenden Apex der *b*-Hyphe hereinreichten (Abb.21B). Dies spricht was für eine besondere Bedeutung des Dyneins in diesem stark expandierenden Bereich. Im Gegensatz dazu waren im Apex von $\Delta kin2$ -Hyphen keine GFP₃-Dyn2-Signale zu finden, obwohl in diesen Hyphen die Mikrotubuli bis in die Spitze reichten (Abb.21C/D). Es waren lediglich Signale zu detektieren, die von der zentralen Mutterzelle aus bis in den subapikalen Bereich der Hyphe verteilt waren (Abb.21C/D).

Diese Signale zeigten Motilität entlang der Mikrotubuli, waren aber nicht ausschließlich an den Plus-Enden fokussiert (Abb.21D4), sondern auch über den gesamten Mikrotubulus verteilt. Die Fehlverteilung von Dynein in Abhängigkeit von Kin2 spricht dafür, dass Dynein über Kin2 an die Plus-Enden der Mikrotubuli gelangen könnte. Außerdem müssen zusätzliche Motoren am Transport von Dynein beteiligt sein, die zwar für die Verteilung von Dynein im Bereich der Mutterzelle zuständig sind, aber deren Aktivität nicht für den Transport in den apikalen Bereich ausreicht. Die Anlieferung von Dynein in die wachsende Hyphenspitze scheint aber essenziell für den retrograden Transport der Endosomen zu sein.

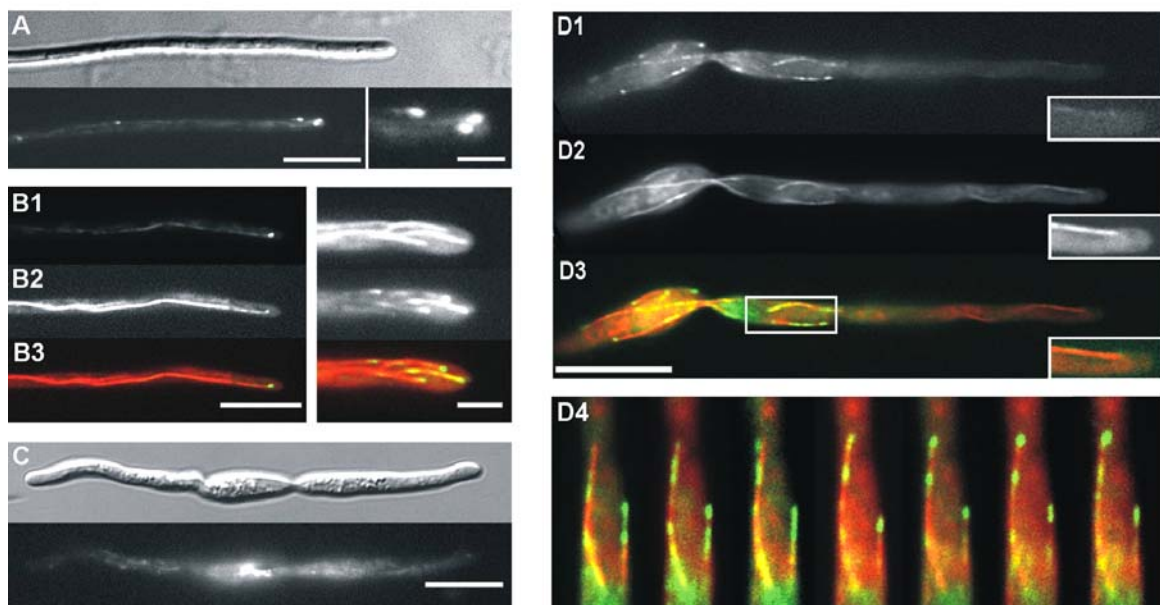


Abbildung 21: Dynein Lokalisation in AB33 und AB33 Δ kin2 b-Hyphen

A: GFP₃Dyn2-Signale lokalisieren als Punkte verstärkt im Apex von AB33 GFP₃Dyn2-Hyphen nach Wachstum in NM-glu. Balken: 10 μ m, 2 μ m.

B: Die Überlagerung der GFP₃Dyn2 Signale (D1) mit RFP markierten Mikrotubuli (D2) zeigte, dass Dyn2 an Plus-Enden von Mikrotubuli (D3) lokalisiert. Balken: 10 μ m und 3 μ m.

C: Die Expression von GFP₃Dyn2 in AB33 Δ kin2 GFP₃Dyn2-Hyphen nach ca. 8h Wachstum in NM-glu führte zu einer Lokalisation der Signale im Bereich der zentralen Mutterzelle. Im Apex war kein starkes Signal zu beobachten. Balken: 10 μ m.

D: GFP₃Dyn2 Signale (D1) und RFP-Tub1 (D2) kolokalisieren zwar in AB33 Δ kin2- GFP₃Dyn2-RT (D3), Die Kolokalisation beschränkt sich allerdings auf den Bereich der zentralen Mutterzelle. Die GFP₃Dyn2 Signale sind dort sowohl über die Mikrotubuli verteilt, als auch an den Plus-Enden konzentriert (D4, weißer Kasten). Es kommt aber nicht zur Detektion von Dyn2 an Mikrotubuli-Plus-Enden im Apex (Einschub D1-D3). Balken: 10 μ m. Die Abbildung wurde von Dr. G. Steinberg erstellt.

2.4.6 Eine *kin2* Rigormutation führt zu einer verminderten Dynein Motilität

Die Lokalisation von Dynein in Wildtyp- und $\Delta kin2$ -Hyphen lässt die Vermutung zu, dass Kin2 für die Anlieferung von Dynein an die Plus-Enden der Mikrotubuli zuständig ist. Dort könnte dann die Beladung des Dyneins stattfinden, und der Transport des Frachtgutes in Minus Richtung beginnen. Die Kin2-abhängige Anlieferung von Dynein scheint aber nur im Langstreckentransport von Bedeutung zu sein, denn im Bereich der Mutterzelle erfolgt die Dyneinanlieferung zu den Spitzen der Mikrotubuli noch. Diese Beobachtung deckt sich mit der aus haploiden Sporidien, wo Dynein auch in Abwesenheit von Kin2 noch an den Plus-Enden der Mikrotubuli lokalisiert, zusätzlich aber auch entlang der Mikrotubuli zu detektieren ist (Abb.22A). In $\Delta kin2$ Sporidien ist auch eine Beweglichkeit der Dynein-Signale zu beobachten (Abb.22B). Um zu untersuchen ob Dynein wirklich direkt von Kin2 transportiert wird, wurde eine *kin2*- Rigorkonstrukt (freundlicherweise von Anne Straube zur Verfügung gestellt) verwendet. In einer Rigormutante wird eine Punktmutation in die ATP-Hydrolysestelle der Motordomäne eingeführt. Der Motor kann noch an Mikrotubuli binden, aber kaum noch ATP spalten (Meluh und Rose et al.,1990). Dieses resultiert in einer festen Verankerung des Motors an den Mikrotubuli. In einem früheren Versuch konnte mit einer Kin3-Rigormutante (Kin3^{G105E}) bereits gezeigt werden, dass Endosomen das direkte Transportgut von Kin3 in Sporidien sind (Wedlich-Söldner et al., 2002b). In Übereinstimmung zu den in Kapitel 1.4.3.2. beschriebenen Ergebnissen, führt die Expression von Kin3^{G105E} auch in Hyphen zu einer Lokalisierung der Endosomen entlang von Mikrotubuli (nicht gezeigt). Für die Rigormutation in Kin2 wurde der gleiche Aminosäureaustausch in der Motordomäne gewählt (G96E) wie für Kin3. Für den Fall, dass Kin2 Dynein transportiert, sollte die Überexpression von rKin2^{G96E} in dem Stamm FB2RFP₃Dyn1-GT dazu führen, dass die GFP₃Dyn2-Signale "perlschnurartig" entlang der Mikrotubuli zu detektieren sind. In Sporidien, die in CM-glu angezogen kein rKin2^{G96E} exprimierten, lokalisierten die GFP₃Dyn2-Signale genauso an den Enden der Mikrotubuli wie in Hyphen (Abb. 22C, Glu). Die Überexpression von rKin2^{G96E} (Abb.22, Western) führte nach 16h Wachstum in CM-ara zu einer "perl-

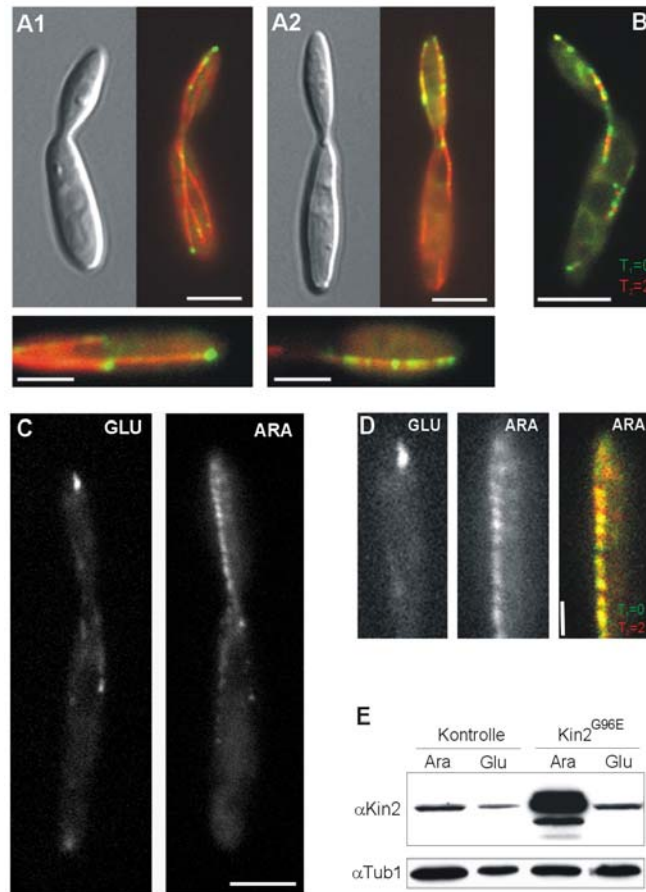


Abbildung 22: Die Expression eines Kin2-Rigorkonstruktes in AB33GFP₃Dyn2

A1: Die Überlagerung der GFP₃Dyn2 Signale mit RFP markierten Mikrotubuli in dem Stamm AB33GFP₃Dyn2RFPTub1 zeigte, dass Dyn2 an Plus-Enden von Mikrotubuli lokalisiert. Balken: 5 μ m und 3 μ m.

A2: In dem Stamm AB33 Δ kin2GFP₃Dyn2RFPTub1 zeigt die Überlagerung der GFP₃Dyn2 Signale mit RFP markierten Mikrotubuli, dass Dynein mehr über die gesamten Mikrotubuli verteilt ist, und nicht mehr so stark am Ende konzentriert ist. Balken: 5 μ m und 3 μ m.

B: Aus einer Filmsequenz des Stammes AB33 Δ kin2GFP₃Dyn2 wurden zwei Bilder verschiedener Zeitpunkte (T₁ und T₂), die 2sek. auseinanderliegen rot und grün eingefärbt und anschließend übereinandergelegt. Dadurch konnte die Bewegung der Dynein-Signale sichtbar gemacht werden, die bei Bewegung als rote und grüne, bei Bewegungsstillstand als gelbe Signale erscheinen. Balken:

C: Der Stamm FB2RFP₃Dyn1-GT-crgKin2^{G96E} zeigte nach Wachstum in CM-glu (GLU) unter reprimierenden Bedingungen bei vorhandenem Kin2 ein starkes Dynein-Signal an den Enden der Mikrotubuli. Balken: 5 μ m. Bei Wachstum in CM-ara (ARA) unter induzierenden Bedingungen in Anwesenheit des Kin2-Rigorkonstruktes waren die Dynein-Signale "perlschnurartig" aufgereiht, und nicht mehr nur als ein Punkt sichtbar. Balken: 5 μ m.

D: Zeigt in einer Vergrößerung die Lokalisation des Dyneins in Anwesenheit von endogenem Kin2 (GLU) als einen einzelnen Punkt. Nach Induktion des Kin2-Rigorkonstruktes (ARA) kommt es zu einer "perlschnurartigen" Lokalisation von Dynein, welches nach der Überlagerung zweier Bilder aus einer Sequenz (T₁ und T₂, siehe oben) zeigt, dass sich die Dynein-Signale nicht mehr bewegen (ARA, rechts). Balken: 1.5 μ m.

E: Der Western-Blot aus Proteinextrakten der Stämme FB2RFP₃Dyn1-GT (Kontrolle), FB2RFP₃Dyn1-GT-crgKin2^{G96E} nach 16h Wachstum in CM-ara/CM-glu. Mit Hilfe des anti-Kin2-Antikörpers konnte in der Kontrolle nur eine schwache Kin2 Expression nachgewiesen werden. In dem Stamm FB2RFP₃Dyn1-GT-crgKin2^{G96E} wurde unter reprimierenden Bedingungen (GLU) auch nur die schwache Kin2 Expression, die auf das endogene Kin2 zurückgeht, nachgewiesen. Unter induzierenden Bedingungen in CM-ara (ARA) konnte eine starke Kin2 Expression detektiert werden. Als Ladekontrolle wurde die Tubulin-Bande abgebildet, die mit Hilfe des anti-Tubulin Antikörpers nachgewiesen wurde. Die Abbildung wurde in Zusammenarbeit mit Dr. G. Steinberg erstellt.

schnurartigen“ Lokalisation von Dynein (Abb.22C, Ara), was darauf hindeutet, dass dies aus der festen Verankerung von Kin2 entlang der Mikrotubuli resultiert. Die Bewegung von Dynein, resultiert nach der Überlagerung von zwei verschiedenfarbig eingefärbten (rot/grün) Bildern verschiedener Zeitpunkte in roten und grünen Punkten. Bei einem Stillstand der Bewegung käme es zu einer direkten Überlagerung von Grün und Rot, die in Gelb resultierte.

In Sporidien, die das Kin2-Rigorkonstrukt überexprimieren, sind hauptsächlich gelbe Punkte zu detektieren, was auf einen Verlust der Beweglichkeit der Dynein-Signale hinweist. Überraschenderweise führte die Induktion von rKin2^{G96E} in haploiden Sporidien des Stammes AB33Yup1GFP nach 16h Inkubation in CM-ara, zu einer Akkumulation der Yup1-GFP markierten Endosomen an den Zellpolen (Abb.23A), sowie es auch in haploiden Sporidien des dyn2^{ts}-Stammes der Fall ist. In rKin2^{G96E} exprimierenden Sporidien ist kaum noch eine Bewegung der Endosomen zu beobachten (Abb.23B). Im Gegensatz dazu konnte dieser Effekt nicht in $\Delta kin2$ Sporidien beobachtet werden (Abb.23B), was dafür spricht, dass es unter normalen Bedingungen in Sporidien noch einen weiteren Motor geben muss, der das Fehlen von Kin2 ausgleichen kann. Diese Sicherung scheint im Langstreckentransport von Hyphen nicht zu existieren. Diese Ergebnisse belegen zum einen, dass Dynein direkt von Kin2 transportiert wird, darüber hinaus zeigen die Ergebnisse aus den $\Delta kin2$ - Sporidien aber auch, dass in Sporidien noch eine weitere Transportmöglichkeit für Dynein existieren muss. Diese zusätzliche oder alternative Transportmöglichkeit scheint aber nur auf kurzen Strecke von Bedeutung zu sein, da in der Hyphe der Dynein Transport zur Spitze nicht mehr funktioniert.

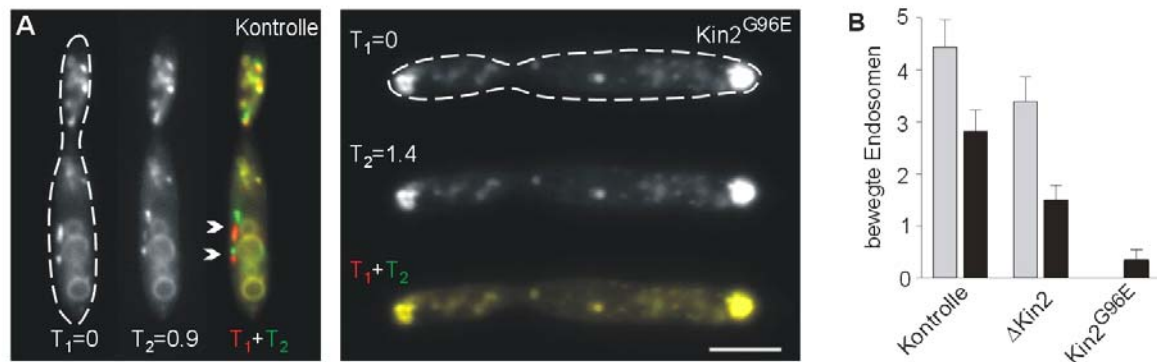


Abbildung 23: Die Expression eines Kin2-Rigorkonstruktes in AB33Yup1-GFP

A: In dem Stamm AB33Yup1GFP-crgKin2^{G96E}, der unter reprimierenden Bedingungen angezogen wurde (Links), resultiert die Überlagerung zweier Bilder einer Filmsequenz (T_1 und T_2) in roten und grünen Signalen (Pfeile), was auf eine Bewegung der Yup1-GFP-markierten Endosomen hinweist. Die Anzucht dieses Stammes in CM-ara, was zur Induktion des Kin2-Rigorkonstruktes führt, läßt die Signale an den Zellpolen akkumulieren, und es sind keine roten und grünen Signale mehr sichtbar, nur noch unbewegliche gelbe Punkte an den Zellpolen. Balken: 5 μ m

B: Die quantitative Analyse der Beweglichkeit der Yup1GFP-markierten Endosomen in Sporidien der Stämme AB33Yup1GFP (4,43 \pm 2,1; 2,81 \pm 1,64), AB33 Δ kin2Yup1GFP (3,38 \pm 2,0; 1,5 \pm 1,15) und AB33Yup1GFP-crgKin2^{G96E} (0 \pm 0 und 0,3 \pm 0,51) zeigte, dass die Expression des Kin2-Rigorkonstruktes nahezu zum vollständigen Verlust der Endosomenbewegung führte. Dabei repräsentiert der graue Balken die anterograde Bewegung und der schwarze die der retrograden Bewegung (Mittelwerte dargestellt). Die Abbildung wurde in Zusammenarbeit mit Dr. G. Steinberg erstellt.

2.4.7 Endosomen und Dynein interagieren in wachsenden Hyphenspitzen

Im vorangegangenen Abschnitt konnte gezeigt werden, dass die Lokalisation von Dynein im apikalen Bereich der Hyphe von Kin2 abhängig ist. Des Weiteren kam es in Δ kin2-Hyphen zum Erliegen des Dynein-abhängigen Endosomen Transports, was für eine mögliche Bedeutung der Dyneinakkumulation im Rücktransport der ankommenden Endosomen spricht. Dynein könnte vielleicht ein Reservoir für den minus- gerichteten Organellentransport darstellen, und an den Plus-Enden der Mikrotubuli könnte zum Beispiel die Beladung der Endosomen mit Dynein stattfinden. Um diese These zu überprüfen, wurde zunächst analysiert, wie sich die Endosomen im Apex verhalten. Für den Fall der Richtigkeit der Hypothese müssten sich die Endosomen bis in die Hyphenspitze bewegen, um dort mit Dynein beladen werden zu können. Für diese

Untersuchung wurde der Stamm AB33Yup1GFP-RT benutzt, der die Beobachtung Yup-GFP- markierter Endosomen entlang von RFP-Tub-markierten Mikrotubuli ermöglichte.

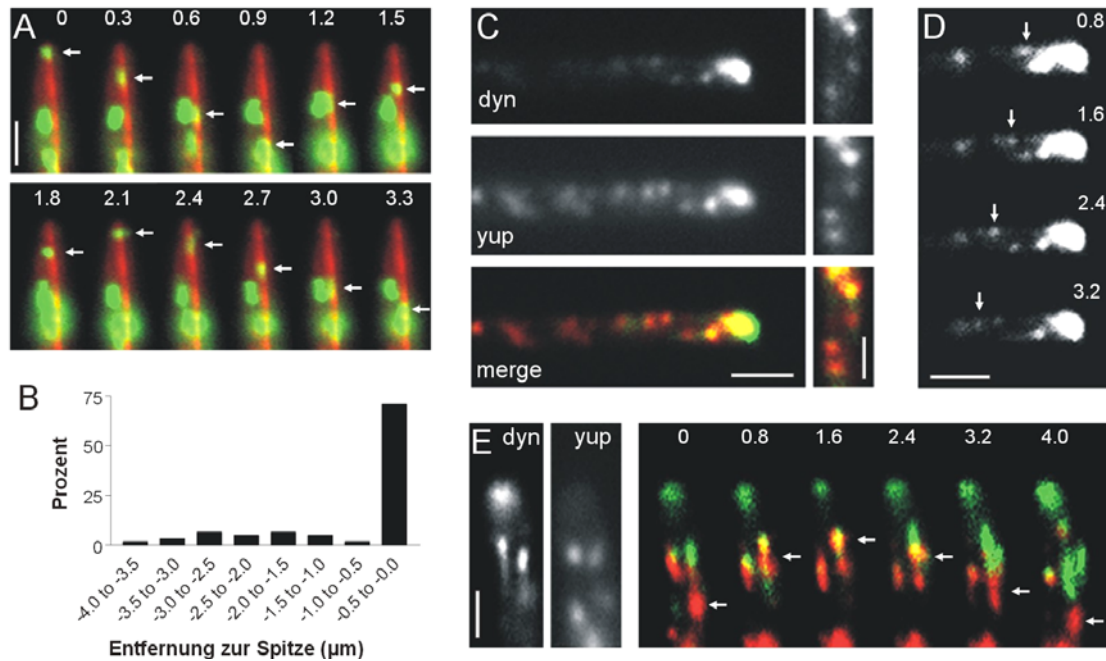


Abbildung 24: Dynein und Endosomen kolokalisieren im Apex der Hyphe

A: Endosomen (Yup1-GFP, grün) bewegen sich bis zum Ende der Mikrotubuli (RFP-Tub1, rot), bevor sie die Richtung ändern (durch Pfeile markiert). Aufnahmezeit in Sekunden. Balken: 2 μm .

B: Quantitative Analyse der Bewegung der Endosomen. Dabei wurde bestimmt, in welcher Entfernung zur Mikrotubuli-Spitze die Endosomen ihre Richtung ändern. 70% der Endosomen erreichen das Ende des Mikrotubulus bevor sie die Richtung ändern. Es wurden ~62 Partikel in $n > 20$ Hyphen gemessen.

C: Überlagerung von Endosomen (Yup1-RFP₂ rot) und Dynein (GFP₃Dyn2 grün) im Apex von AB33Yup1RFP₂-GFP₃Dyn2-Hyphen nach 5-6h Wachstum in NM-glu. Balken: 2 μm (links) und 1 μm (rechts).

D: GFP₃Dyn2-Signale zeigen eine starke Akkumulation innerhalb der AB33Yup1RFP₂-GFP₃Dyn2-Hyphenspitze, aus der sich einzelne GFP₃Dyn2-Partikel lösen und in Richtung der Mikrotubuli-Minus-Enden bewegen. Balken: 2 μm . Aufnahmezeit in Sekunden.

E: Überlagerung von GFP₃Dyn2 (E1, grün) und Yup1-RFP₂ (E2, rot) zeigt, dass Endosomen erst mit dem Dynein Kontakt aufnehmen müssen, bevor sie die Richtung ändern. Balken: 2 μm . Aufnahmezeit in Sekunden. Die Abbildung wurde von Dr. G.Steinberg erstellt.

In Hyphenspitzen die aus einem 6-8h Wachstum in NM-glu resultierten, wurde in einer quantitativen Analyse bestimmt, wie viele der Yup1-GFP-markierten Endosomen sich bis an die Spitze der RFP-Tub1-markierten Mikrotubuli bewegten, bevor sie eine Richtungsänderung zum Minus-Ende hin vornahmen. Dazu wurde die Anzahl der Richtungsänderungen der Endosomen in einem Bereich bis 4 μm hinter der Hyphenspitze bestimmt (in Zusammenarbeit mit Dr. G. Steinberg) (Abb.24A/B). 75% der Endosomen nahmen einen Richtungswechsel erst nach dem Erreichen der Spitze vor (Abb.24B).

Dieses Ergebnis bestätigt die Vermutung, dass die Endosomen erst bis zur Spitze der Mikrotubuli kommen müssen, bevor sie in die andere Richtung laufen können. Der Stamm AB33GFP₃Dyn2-Yup1RFP wurde durch die Transformation des Plamids potefYup1RFP₂ (freundlicherweise von Uta Fuchs zur Verfügung gestellt) hergestellt, um eine Interaktion von Endosomen und Dynein zeigen zu können. Die Bilder zeigen wie Endosomen und Dynein in der Spitze kolokalisieren (Abb.24C1-C3/E). Man kann auch sehen, dass Endosomen erst mit dem Dynein in Kontakt kommen müssen bevor sie die Richtung ändern (Abb.24D). Diese Beobachtungen unterstützen die anfängliche Hypothese, dass es sich bei der Dyneinakkumulation im Apex um eine Art Beladungsstelle für Endosomen handeln könnte.

2.5 Wird die Polarität der Zelle durch eine Kooperation zwischen Aktin und Mikrotubuli aufrechterhalten ?

Das Mikrotubuli-Zytoskelett scheint in *Ustilago maydis* nicht alleine für die Aufrechterhaltung der Polarität in den verschiedenen Differenzierungsstadien verantwortlich zu sein. Wie in Kapitel 1.4.1 beschrieben, sind Hyphen, denen die beiden wichtigsten mikrotubuli-abhängigen Motoren fehlen, noch in der Lage polar zu wachsen, wie solche denen das vollständige Mikrotubuli-Zytoskelett fehlt. Es muss also noch weitere, mikrotubuli-unabhängige Komponenten geben, die für die Polarität wichtig sind. Die Deletion von *myo5*, des Klasse-V-Myosins aus *Ustilago maydis*, führt zu morphologischen Defekten, sowohl in der Sporidie als auch in der Hyphe (Weber et al., 2003). Allerdings können diese Zellen immer noch polar wachsen. Für den axonalen Transport konnte gezeigt werden, dass Partikel in der Lage sind, sich zunächst entlang von Mikrotubuli zu bewegen, um dann auf Aktin-Filamente zu wechseln (Kuznetsov 1992). Unter diesen Umständen kann eine Kooperation zwischen dem mikrotubuli- und dem aktin-abhängigen Transport stattfinden, und Vesikel oder Organellen, die entlang von beiden transportiert werden, müssten mit verschiedenen Motoren bestückt sein. Inwieweit

und ob überhaupt, diese Kooperation vielleicht auch im polaren Wachstum von *Ustilago maydis* eine Rolle spielt, soll im Folgenden näher analysiert werden.

2.5.1 Die Zerstörung des Mikrotubuli Zytoskeletts in *myo5*-Deletionsstämmen führt zu apolaren Zellen

Für die Untersuchung der Interaktion zwischen Mikrotubuli und Aktin sollte in einem ersten Ansatz der Einfluss des Mikrotubuli-Inhibitors Benomyl (und in den Kontrollen vergleichbare Mengen DMSO) auf das polare Wachstum von $\Delta myo5$ -Hyphen getestet werden. Dazu wurde der Stamm AB33 $\Delta Myo5$ durch die Transformation des Plasmids pSL $\Delta Myo5$ -Hyg (Weber et al., 2003) in den Stamm AB33, hergestellt. Die Transformanten wurden anschließend mittels Southern-Analyse auf homologe Rekombination in das Genom überprüft. Nach 16h Inkubation in NM-glu-Medium war der $\Delta Myo5$ -Deletionsstamm in der Lage Hyphen zu bilden, wenn auch diese morphologische Defekte aufwies (Abb.25A), die ähnlich zu denen der Sporidien waren. Für die Inhibitorversuche wurde der Stamm AB33 $\Delta Myo5$ in CM-glu angezogen und anschließend die Hyphenbildung für 2.5h in NM-glu induziert. Danach wurde die Kultur für weitere 16h mit 10 μ M Benomyl versetzt. Das Fehlen der Mikrotubuli führte in den Deletionsmutanten zur Bildung runder Zellen, die nicht mehr in der Lage waren polar zu wachsen (Abb.25C). Dieses Resultat war ein erster Hinweis darauf, dass auch in *Ustilago maydis* eine Kooperation zwischen Mikrotubuli und Aktin existiert. Auf welcher Ebene sich diese Kooperation abspielt, soll im folgenden Kapitel näher betrachtet werden.

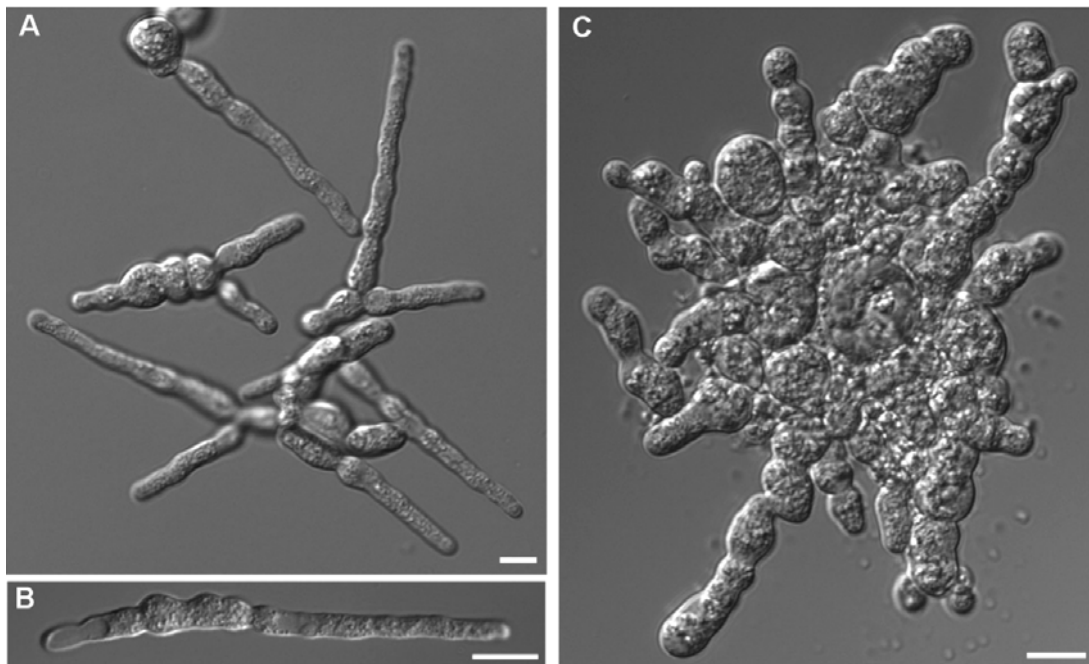


Abbildung 25: AB33Δmyo5 Zellen brauchen zur Aufrechterhaltung der Polarität Mikrotubuli

A und B: AB33Δmyo5 zeigt nach 16h Wachstum unter induzierenden Bedingungen in NM-glu Zell-Aggregate, in denen die Zellen im Zentrum rund erscheinen und die Zellen in der Peripherie zu polaren Filamenten auswachsen. Es werden auch Hyphen ausgebildet, die in der Lage sind leere Abschnitte zu bilden (B). Balken: 5µm und 10µm. **C:** Nach der Zugabe von 10 µM Benomyl zu einer wachsenden AB33Δmyo5 (nach 2.5h Wachstum in NM-glu ohne Benomyl)-Kultur, für 16h, werden die zuvor noch polar wachsenden Zellen in der Peripherie rund. Balken: 5µm.

2.5.2 Die Deletion von *kin2* und *myo5* führt zu apolaren Zellen

In der Maus wurde eine direkte Interaktion zwischen Myosin Va und einem Kinesin1-Homolog nachgewiesen (Huang et al., 1999) werden. Ausgehend von der im vorrangegangenen Kapitel gefundenen Interaktion zwischen dem Mikrotubuli-Zytoskelett und Aktin-abhängigen Motor Myo5 sollte im Folgenden untersucht werden, ob es sich dabei vielleicht um die direkte Interaktion zwischen Myo5 und dem Kinesin-1 aus *Ustilago maydis*, Kin2 handelt. In den bereits vorhandenen *myo5* Deletionsmutanten wurde Kin2

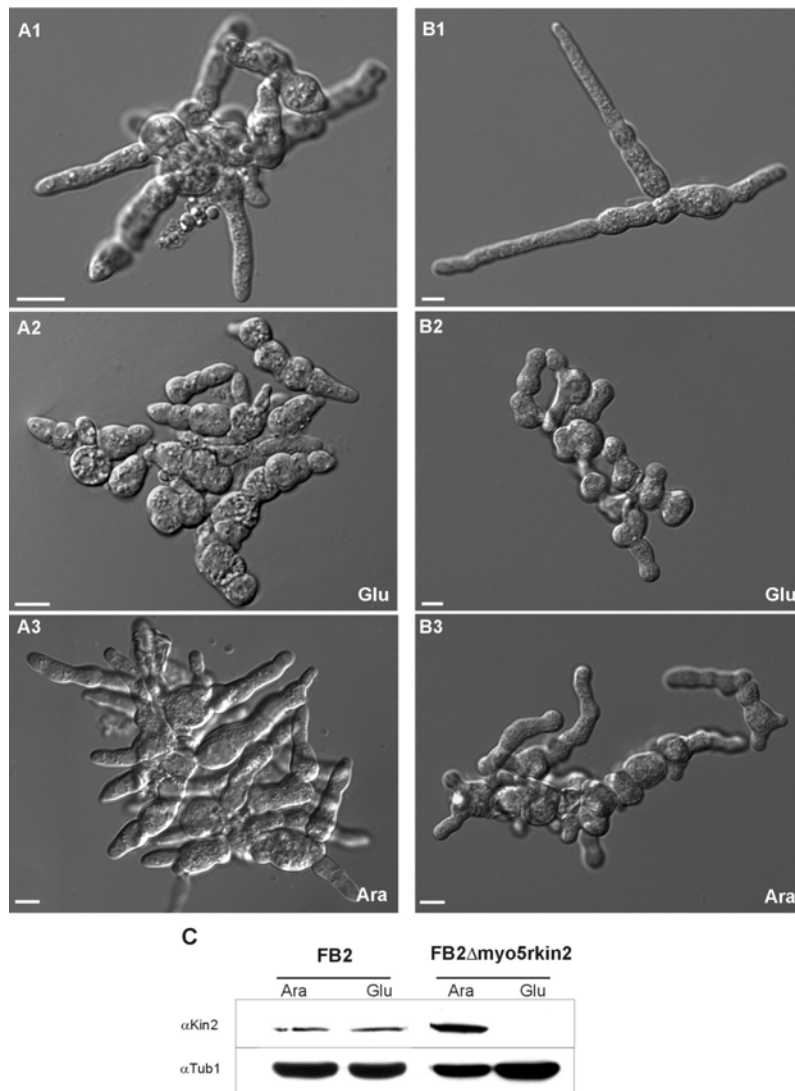


Abbildung 26: $\Delta myo5kin2$ Doppelmutanten sind apolar

A1 und B1: FB2 $\Delta myo5$ und AB33 $\Delta myo5$ Zellen als Beispiel für den $\Delta myo5$ -Phänotyp. Balken:

A2 und B2: FB2 $\Delta myo5kin2$ - und AB33 $\Delta myo5kin2$ -Zellen nach 16h Wachstum unter reprimierenden Bedingungen in CM-glu- oder NM-glu-Medium. Den Deletionsmutanten fehlen die polaren äußeren Zellen, diese sind in der doppelt Deletionsmutante kurz und rund, und sehen eher aus wie die Zellen im Zentrum der Aggregate. Balken: 5 μm .

A3 und B3: Die Überexpression von Kin2 in Arabinose haltigem Medium unter induzierenden Bedingungen führt in FB2 $\Delta myo5kin2$ -Zellen zur Aufhebung des Phänotyps unter reprimierenden Bedingungen. Die Zellen sehen aus wie der $\Delta myo5$ Phänotyp, und sind wieder in der Lage polar zu wachsen. In AB33 $\Delta myo5kin2$ kann die Überexpression von Kin2 den Deletions-Phänotyp nur partiell retten. Die peripheren Zellen sind zwar ein wenig länger, jedoch nicht so lang wie die Hyphen in AB33 $\Delta myo5$. Balken: 5 μm .

C: Der Western-Blot aus Proteinextrakten des Wildtypstammes FB2 und von FB2 $\Delta myo5kin2$ nach Wachstum unter reprimierenden (Glu) und induzierenden (Ara) Bedingungen. Mit Hilfe des anti-Kin2 Antikörpers konnte eine schwache Kin2 Expression im Wildtyp sowohl in glukose-haltigem als auch in arabinose-haltigem Medium nachgewiesen werden. In FB2 $\Delta myo5kin2$ wird Kin2 unter induzierenden Bedingungen (Ara) stark exprimiert, unter reprimierenden (Glu) Bedingungen hingegen ist kein Kin2 zu detektieren. Als Ladekontrolle wurde die Tubulin-Bande abgebildet, die mit Hilfe des anti-Tubulin Antikörpers nachgewiesen wurde. unter Kontrolle des *crg*-Promotors exprimiert.

Dazu wurde das *crgKin2*-Konstrukt (freundlicherweise von Anne Straube zur Verfügung gestellt) in *FB2ΔMyo5* und *AB33ΔMyo5* transformiert, und die erfolgreiche homologe Rekombination durch Southern-Analyse überprüft. Des Weiteren wurde die Expression von *Kin2* unter Induktions- und Repressionsbedingungen in einer Western-Analyse nachgewiesen (Abb.26C). Die Überexpression von *Kin2* im *Δmyo5* Hintergrund konnte den Phänotyp nicht komplementieren, der Phänotyp ähnelte eher dem der *Δmyo5*-Stämme (Abb.26A3/B3). Die Repression von *Kin2* resultierte in dem gleichen apolaren Wachstumsphänotyp, wie zuvor die Deletion des Mikrotubuli-Zytoskeletts (Abb.26A2/B2). Diese Resultate sprechen für eine Interaktion von *Myo5* und *Kin2* im polaren Wachstum von *Ustilago maydis*.

2.5.3 Die Sekretion von Invertase und alkalischer Phosphatase sind sowohl in *kin2*-, als auch in *myo5*-Deletionsstämmen gestört

Konventionelle Kinesine und Myosine der Klasse V sind am Transport sekretorischer Vesikel beteiligt (Seiler et al., 1997; Johnston 1991). Aus diesem Grund wurde als nächstes die Sekretion der Markerenzyme Invertase und saure Phosphatase in den Stämmen *FB2*, *FB2ΔKin2*, *FB2ΔMyo5*, *FB2ΔMyo5rKin2* bestimmt (vergl. Material Methoden). Dazu wurde zunächst die Proteinmenge nach einem Zellaufschluss mittels eines Bradford-Assays bestimmt (Bradford, 1976) und mit der OD_{600} der Ausgangskultur korreliert, um in den folgenden Sekretionsassays immer vergleichbare Zellmengen der verschiedenen Stämme einzusetzen. Daraus ergab sich, dass die *Δmyo5* Deletionsstämme bei gleicher OD_{600} die doppelte Proteinmenge lieferten, was wahrscheinlich aus dem „zellhaufenartigen“ Wachstum des Stammes resultiert. Die Sekretion der Invertase war in den *Δkin2* Mutanten um 56,68% reduziert, wohingegen die *Δmyo5* Mutanten eine Steigerung der Invertase Sekretion um 95% zeigten (Abb.27). Eine Erklärung für dieses Phänomen existiert zum aktuellen Zeitpunkt nicht. In *S. cerevisiae* zeigten *myo2-66* Mutanten keine Veränderung in der Invertase Sekretion (Govindan 1995). Bei der

Sekretion saurer Phosphatase kam es sowohl in den *Δmyo5*-, als auch in den *Δkin2*-Deletionsstämmen zu einer Reduktion der Sekretion, bei *Δkin2* auf 51,72%, bei *Δmyo5* sogar auf 34,79%, was für eine Beteiligung beider Motoren am Transport dieses Enzymes spricht. Das es auch in der Doppelmutante *Δmyo5rkin2* zu einer Reduktion der sauren Phosphatase-Sekretion um 40,54% kam, lässt darauf schließen, dass beide Motoren im gleichen Transportweg agieren, und damit nicht in separaten, was zu einer Verstärkung des Sekretionsdefektes geführt hätte.

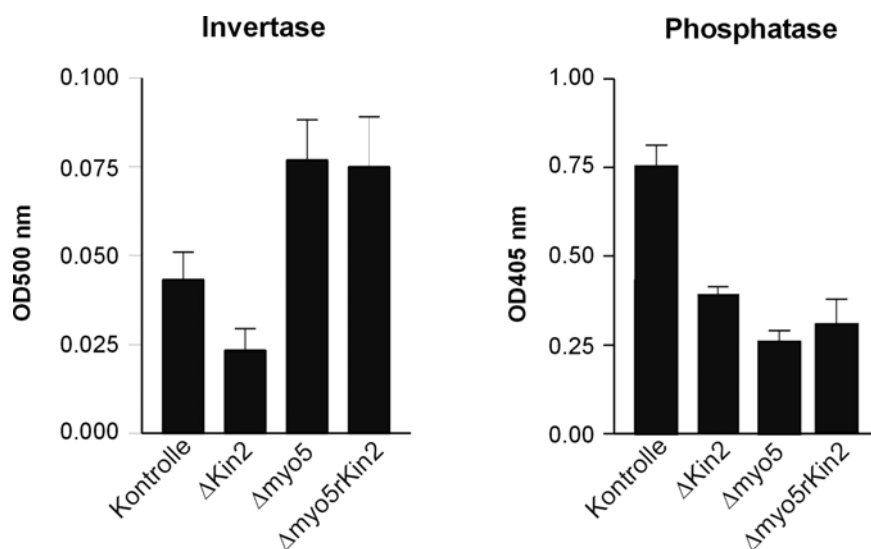


Abbildung 27: Sekretion von Invertase und Phosphatase in *kin2* und *myo5* Deletionsmutanten

Die Sekretion von Invertase wurde anhand der Menge gebildeter Glukose in einem colorimetrischen Test bei OD₅₀₀ gemessen. Dabei entsprechen die Balken dem Mittelwert aus n=5-6 Ansätzen. Kontrolle (FB2): 0,043 ± 0,017; FB2*Δkin2*: 0,023 ± 0,014; FB2*Δmyo5*: 0,082 ± 0,027; FB2*Δmyo5rkin2*: 0,075 ± 0,032.

Die sekretierte Phosphatase wurde mit einem colorimetrischen Test bestimmt, in dem das durch die Phosphatase gebildete Nitrophenon anhand seiner gelben Farbe bei OD₄₀₅ gemessen wurde. Die Balken entsprechen dem Mittelwert aus n=6-9 Ansätzen. Kontrolle (FB2): 0,757 ± 0,177; FB2*Δkin2*: 0,392 ± 0,063; FB2*Δmyo5*: 0,264 ± 0,08; FB2*Δmyo5rkin2*: 0,307 ± 0,17.

Als Kontrollstamm diente FB2, bei den weiteren Stämmen handelt es sich um FB2*Δkin2*, FB2*Δmyo5* und FB2*Δmyo5rkin2*. Die Standardfehler sind angegeben.

Zusätzlich wurden die Sekretionsassays auch in den Stämmen FB2, FB2*Δkin3*- und FB2*Δkin3Δkin2* durchgeführt. Hier sollte untersucht werden, ob auch Kin3 an der Sekretion der Markerenzyme beteiligt ist. Die Ergebnisse zeigten im *Δkin3* Deletionsstamm keine Veränderung in der Invertase Sekretion (Abb.28), allerdings war die

Sekretion der sauren Phosphatase um die Hälfte reduziert (Abb.28). Der $\Delta kin3\Delta kin2$ Doppelmutante zeigte bei der Sekretion der sauren Phosphatase den gleichen Sekretionsdefekt, wie die $\Delta kin3$ Mutante (Abb.27). Überraschenderweise scheint also auch Kin3 am Transport der sauren Phosphatase beteiligt zu sein, und den Sekretionsdaten in der Doppelmutante zufolge, deutet das auch hier auf den gleichen Transportweg hin.

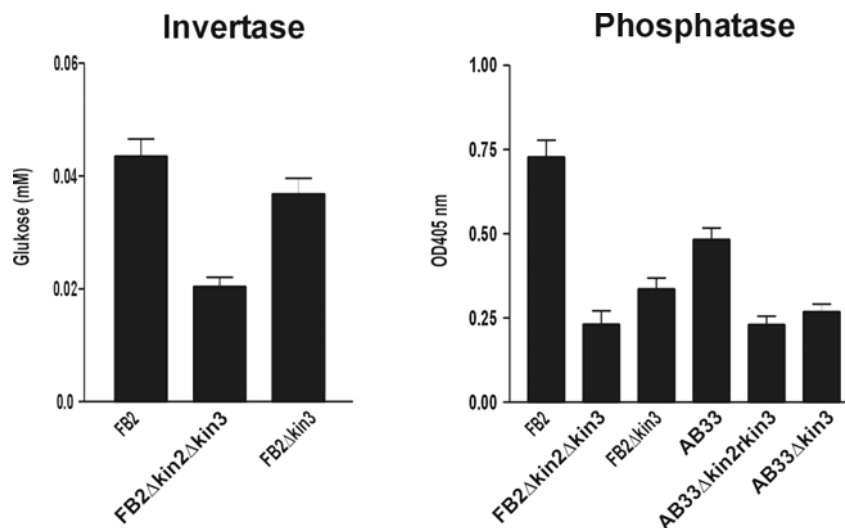


Abbildung 28: Invertase und saure Phosphatase Sekretion in Abhängigkeit von Kin3

Die Sekretion von Invertase wurde anhand der Menge gebildeter Glukose (in mM) gemessen. Dabei entsprechen die Balken dem Mittelwert aus n=6-8 Versuchen. FB2: 0,218±0,04; FB2 $\Delta kin2\Delta kin3$: 0,102±0,02; FB2 $\Delta kin3$: 0,183±0,037.

Die sekretierte Phosphatase wurde mit einem colorimetrischen Test bestimmt, in dem das durch die Phosphatase gebildete Nitrophenon anhand seiner gelben Farbe gemessen wurde. Die Balken entsprechen dem Mittelwert aus n=5-7 Versuchen. FB2: 0,728±0,11; FB2 $\Delta kin2\Delta kin3$: 0,224±0,127; FB2 $\Delta kin3$: 0,337±0,103; AB33: 0,483±0,083; AB33 $\Delta kin2rkin3$: 0,23±0,061; AB33 $\Delta kin3$: 0,268±0,056.

Als Kontrollstämme dienten FB2- und AB33-Wildtyp, bei den weiteren Stämmen handelt es sich um FB2 $\Delta kin3$, FB2 $\Delta kin2\Delta kin3$, AB33 $\Delta kin3$ und AB33 $\Delta kin2rkin3$. Die Standardfehler sind angegeben.

2.5.4 Die Kin2-Lokalisation ist von Aktin und *myo5* abhängig

Eine Lokalisationsstudie von Kin2 und Myo5 in der Hyphe sollte weiteren Aufschluss über ihre Funktion und Interaktion geben. Dafür wurden Myo5 und Kin2 mit einem dreifachen GFP fusioniert und unter Kontrolle des natürlichen Promotors in AB33, AB33 $\Delta kin2$ und AB33 $\Delta myo5$ exprimiert. GFP₃-Myo5 lokalisierte, wie auch schon in früheren Arbeiten beschrieben (Weber et al., 2003), als ein Punkt in der Spitze der Hyphe (Abb.29A). In $\Delta kin2$ Hyphen lokalisierte GFP₃-Myo5 zwar immer noch im Apex, allerdings nicht mehr

als fokussierter Punkt (Abb.29B). Dieses konnte auch schon in früheren Studien beobachtet werden, wo die Abhängigkeit des GFP-Myo5 Signals von Mikrotubuli untersucht wurde (Weber et al., 2003). Auch hier kam es zu einem verteilten GFP-Myo5 Signal im Apex. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass Mikrotubuli und Kin2 für die fokussierte Organisation von Myo5 in der Hyphenspitze verantwortlich sind.

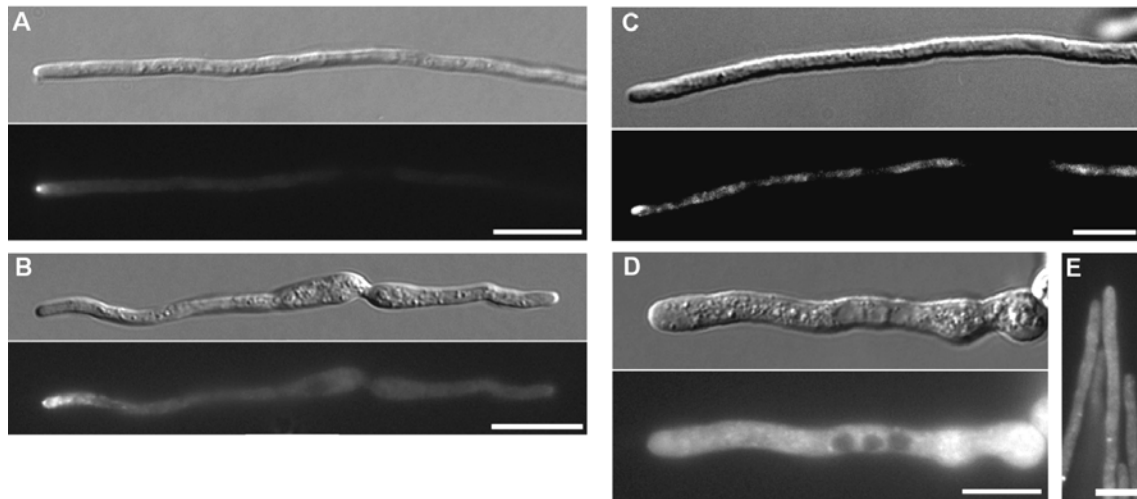


Abbildung 29: Lokalisation von Kin2 und Myo5 in *b*-abhängigen Hyphen

A: Die Expression von GFP₃Myo5 in AB33 zeigt ein starkes punktuell Signal in der Hyphenspitze. Balken: 10µm.

B: In AB33Δkin2-GFP₃Myo5-Hyphen lokalisiert GFP₃Myo5 in einer der beiden Hyphenspitzen. Dort ist das Signal allerdings nicht so stark auf einen Punkt fixiert, sondern über einen weiteren Bereich hinter der Spitze verteilt. Dieses konnte schon in früheren Studien beobachtet werden (Weber et al.,2003) Balken: 10µm.

C: Lokalisiert man GFP₃Kin2 in AB33, beobachtet man neben einer cytoplasmatischen Lokalisation ein verstärktes Signal im Apex. Balken: 10µm.

D: In AB33Δmyo5-GFP₃Kin2 Hyphen kann diese apikale Lokalisation nicht beobachtet werden, das GFP₃Kin2 Signal ist über die gesamte Hypha verteilt. Balken: 10µm

E: Behandelt man AB33GFP₃Kin2 Hyphen mit dem Aktin-Inhibitor Latrunculin A wird das gleiche fehlende, apikale Signal beobachtet, was die Abhängigkeit der Kin2-Lokalisation von Aktin bestätigt. Balken: 10µm. Die Abbildung wurde in Zusammenarbeit mit Dr. G. Steinberg erstellt.

Die Lokalisation von GFP₃-Kin2 sieht der von Myo5 ähnlich. Im Vergleich zu Myo5 war das GFP₃-Kin2 Signal im Apex stärker konzentriert (Abb.29C), zeigte aber auch eine leichte zytoplasmatische Färbung. Dieses stimmt mit Beobachtungen überein, die schon in einer früheren Studie beschrieben wurden (Lehmler et al., 1997). Die Spitzenlokalisation von GFP₃-Kin2 ist aber von Myo5 abhängig, da im Apex von Δmyo5 Hyphen kein GFP₃-

Kin2 Signal mehr detektierbar war (Abb.29D). Die Lokalisation hat sich in diesen Hyphen in den subapikalen Bereich verschoben (Abb.29D), was darauf hindeutet, dass der Langstreckentransport von Kin2 zum Apex hin von Myo5 abhängt. Dieses konnte durch zusätzliche Inhibitorstudien mit dem Stamm AB33GFP₃-Kin2 bestätigt werden. Zerstörte man das Mikrotubuli-Zytoskelett in Hyphen von AB33GFP₃-Kin2, so konnte nur in 45,7% der Hyphen eine Veränderung des GFP₃-Kin2-Signals im Apex beobachtet werden (Abb.30). Die Deletion von Aktin nach Zugabe von Latrunculin A, führte nur noch in 26,5% der Hyphen zu einem GFP₃-Kin2 Signal im Apex (Abb.29E; Abb.30).

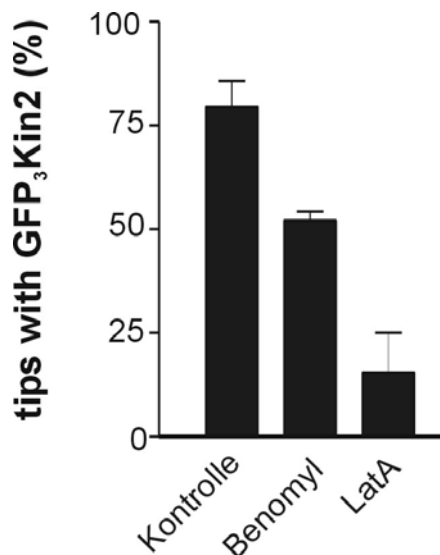


Abbildung 30: Lokalisation von GFP₃Kin2

In einer quantitativen Analyse wurde die Abhängigkeit der GFP₃Kin2-Lokalisation von den Zytoskelett-Inhibitoren Benomyl und Latrunculin A in dem Stamm AB33GFP₃Kin2 untersucht. Als Kontrolle wurde das Lösungsmittel DMSO verwendet. In zwei Experimenten wurden, nach Zugabe von 50 µM LatA oder 20 µM Benomyl für 30min, n=30-46 Hyphen auf ein GFP₃Kin2-Signal im Apex hin ausgewertet. Die Balken entsprechen dem Mittelwert (in %), mit Angabe des Standardfehlers. Die Abbildung wurde in Zusammenarbeit mit Dr. G. Steinberg erstellt.

Diese Ergebnisse lassen also den unerwarteten Schluss zu, dass Kin2 nur im Apex der Hyphe für eine Konzentration von Myo5 (oder assoziierten Vesikeln) an einem bestimmten Punkt wichtig ist und nicht wie erwartet eine Funktion in der Langstreckenlieferung hat. Im Gegensatz dazu scheint Myo5 im Transport von Kin2 (oder assoziierten Vesikeln) zum Apex eine Funktion auszuüben.

3 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der bidirektionale Transport früher Endosomen in Hyphen von *Ustilago maydis* nicht ausschließlich von dem Kinesin-3, Kin3, und cytoplasmatischen Dynein abhängig ist. In Hyphenspitzen erfolgt die Anlieferung von Dynein an die Plus-Enden der Mikrotubuli in Abhängigkeit des Kinesin-1, Kin2. In haploiden Sporidien ist Kin2 allerdings nicht allein am Transport von Dynein an die Plus-Enden der Mikrotubuli beteiligt. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass Kin2 und Myo5, ein Myosin der Klasse V, im polaren Wachstum von *Ustilago maydis* interagieren. Diese Ergebnisse wurden mit Dr. Gero Steinberg diskutiert und werden im Folgenden beschrieben.

3.1 Bedeutung des Aktin- und Mikrotubuli-Zytoskeletts für das polare Wachstum von *Ustilago maydis*

Ustilago maydis ist ein dimorpher Pilz, der seine Morphologie im Laufe seines Entwicklungszyklus vom apathogenen hefeartigen Wachstum der Sporidie zur filamentös wachsenden pathogenen Hyphe ändert. Diesen morphologischen Wechsel durchlaufen die meisten pathogenen Pilze als Reaktion auf äußere Signale, als filamentöse Hyphe ist der Pilz in der Lage in verschiedenste Gewebe einzudringen oder Substrate zu besiedeln (Gow et al., 1995). Der Wechsel vom hefeartigen Sporidienwachstum zum filamentösen Wachstum ist mit der extremen Verlängerung der Hyphenspitze verbunden. Es wird angenommen, dass das Zytoskelett an diesem Prozess beteiligt ist (Heath et al., 1990). Studien, die in den letzten Jahren an filamentösen Pilzen durchgeführt wurden konnten zeigen, dass das Fehlen des Zytoskeletts zu Beeinträchtigungen im Hyphenwachstum führten (Horio et al., 2004; Akashi et al., 1994). Aus diesem Grund wurden in *Ustilago maydis* Untersuchungen mit Zytoskelett- Inhibitoren durchgeführt, die Aufschluss über die

Rolle des Aktin- und Mikrotubuli-Zytoskeletts im polaren Wachstum von haploiden Sporidien, Konjugationshyphen und filamentösen Hyphen geben sollten.

Das Aktin-Zytoskelett scheint in allen Entwicklungsstadien von essenzieller Bedeutung zu sein, da Zellen nach einer Behandlung mit dem Aktin-Inhibitor Latrunculin A starke morphogenetische Defekte zeigten, und auch nicht in der Lage waren Filamente auszubilden. In den Pilzen ist Aktin in Form von Filamenten und „patches“ vorhanden (Pruyne and Bretscher, 2000) (Adams and Pringle, 1984) (Banuett and Herskowitz, 2002). Die „patches“ konzentrieren sich in *S. cerevisiae* an den Knospungspunkten kurz vor der Ausbildung einer neuen Knospe (Kopecka et al., 2001), und in filamentösen Pilzen konzentrieren sich die „patches“ an den aktiv wachsenden oder gerade auswachsenden Hyphenspitzen. Es wird angenommen, dass die Filamente für die Anlieferung von Vesikeln, die mit Membran- und Zellwandmaterial gefüllt sind, in Richtung der Wachstumszone, verantwortlich sind (Ayscough et al., 1997; Harold, 1990). Die Entdeckung von Myo5 als Organellen- und Vesikel-Transporter in anderen Organismen (Govindan et al., 1995; Langford, 2002) sowie die Bedeutung von Myo5 im filamentösen Wachstum von *Ustilago maydis* (Weber et al., 2003) bestätigen diese Vermutungen. Das es in *Ustilago maydis* in *myo5* Deletionshyphen noch zu polarem Wachstum kommt, könnte auf das Vorhandensein von zwei weiteren Myosinen zurückzuführen sein. In *Ustilago maydis* konnten noch ein Klasse I und II Myosin identifiziert werden (unveröffentlichte Daten), wobei Klasse I Myosine eine Funktion in der Endozytose und der Aktinorganisation ausüben (Oberholzer et al., 2002) (Jonsdottir and Li, 2004). In *S. cerevisiae* sind Aktin-Filamente im Gegensatz zu Aktin-Patches nicht essenziell für die Ausbildung von Konjugationshyphen, (Read et al., 1992). Eine weitere wichtige Funktion scheinen die Aktin-Patches in der Endozytose zu haben (Apodaca, 2001; Engqvist-Goldstein and Drubin, 2003; Munn, 2000). Da es in *Ustilago maydis* Hinweise auf eine Bedeutung der Endozytose im polaren Hyphenwachstum gibt (Wedlich-Söldner et al., 2000), könnte der Grund für die Bedeutung des Aktin-Zytoskeletts in *Ustilago maydis* auf seine Rolle in der Exozytose und Endozytose zurückzuführen sein.

Konjugationshyphen und filamentöse Hyphen von *Ustilago maydis* sind im Zellzyklus arretiert, weshalb sich hier die Rolle der Mikrotubuli im polaren Wachstum besonders gut studieren lässt. In *Aspergillus nidulans* sind Hyphen, nach der Zerstörung der Mikrotubuli noch in der Lage polar zu wachsen, allerdings ist ihre Wachstumsgeschwindigkeit auf 10%

reduziert (Horio and Oakley, 2004). Diese Ergebnisse ließen den Rückschluss zu, dass der Langstreckentransport in *Aspergillus nidulans* mikrotubuli-abhängig ist (Horio and Oakley, 2004). In *Ustilago maydis* scheinen Mikrotubuli für das polare Wachstum von Konjugationshyphen und filamentösen Hyphen nicht wichtig zu sein. In der Gegenwart von Benomyl wurden polar wachsende Hyphen gebildet, die allerdings im Vergleich zum Wildtyp kürzer waren. Die Hyphen von *Ustilago maydis* können eine Länge von bis zu 160µm (Steinberg et al., 1998) erreichen. Die Länge der ohne Mikrotubuli gebildeten Filamente betrug im Durchschnitt 45µm, die der Wildtyp Filamente 95µm. Diese Länge entspricht dem gemessenen Abstand zwischen dem Zellkern und der Hyphenspitze von 47µm (Fuchs et al., 2005). Aus diesen Beobachtungen könnte man den Schluss ziehen, dass die Länge der Hyphen von dem Einwandern des Kerns abhängt (Fuchs et al., 2005). Diese Schlussfolgerung wird durch Versuche in Dynein-Mutanten von *Ustilago maydis* unterstützt, in denen das Hyphenwachstum bei einer Länge von 50-60µm stoppt, und bei denen Zellwanderungsdefekte festgestellt werden konnte (Fuchs et al., 2005). In Wurzelhaaren von *Arabidopsis thaliana* konnte ein ähnlicher Zusammenhang zwischen der Kernwanderung und dem Spitzenwachstum hergestellt werden (Ketelaar et al., 2002).

3.2 Mikrotubuli Organisation in Hyphen von *Ustilago maydis*

Der im vorangegangenen Kapitel beschriebene Einfluss der Mikrotubuli auf das Längenwachstum der Hyphen könnte, neben dem Kernwanderungsaspekt, auf einen reduzierten Transport in Richtung der stark expandierenden Hyphenspitze zurückzuführen sein. Mikrotubuli sind polare Strukturen, an deren Plus-Enden es im Gegensatz zu den Minus-Enden zu einem verstärkten Wachstum kommt (Desai and Mitchison, 1997). In Axonen sind die Plus-Enden der Mikrotubuli einheitlich in Richtung der Synapse orientiert (Heidemann et al., 1981). Aus diesem Grund sind die Plus-End gerichteten Kinesine die wichtigsten Motoren im anterograden Transport der Axonen (Brady et al., 1990; Gindhart et al., 1998). Neuronen und pilzliche Hyphen sind schlauch-ähnliche, an ihren Spitzen schnell wachsende, polarisierte Strukturen. Wie die Mikrotubuli in pilzlichen Hyphen

organisiert sind, ist bisher noch nicht genau untersucht worden. Es gibt aber Hinweise aus *Allomyces macrogynus* für die Existenz eines Mikrotubuli-Organisierenden-Zentrums im Apex von Hyphen (Vargas et al., 1993). Für das bessere Verständnis der Rolle der Mikrotubuli und des damit verbundenen mikrotubuli-abhängigen Transports, wurde die Organisation der Mikrotubuli-Plus-Enden in Hyphen von *Ustilago maydis* bestimmt. Die Auswertung der wachsenden mit Peb1-YFP markierten (Straube et al., 2003) Mikrotubuli-Plus-Enden zeigte, dass 86% bzw. 90% der Peb1-Punkte in Richtung des Apex bzw. des basalen Septums orientiert sind. Das bestätigen Beobachtungen aus *Aspergillus nidulans*, in denen sich GFP-markierte Mikrotubuli in Richtung der Spitze verlängerten (Han et al., 2001), und GFP-markiertes Kinesin an Plus-Enden von apikalen Mikrotubuli lokalisierte (Konzack et al., 2004). Des Weiteren zeigten frühere Studien an konventionellen Kinesin Mutanten in *Neurospora crassa*, dass die Deletion dieses Kinesins zu Sekretionsdefekten führte (Seiler et al., 1997). Die Orientierung der Mikrotubuli in *Ustilago maydis* Hyphen legt die Vermutung nahe, dass ähnlich wie in Axonen, der kinesin-abhängige Transport eine grundlegende Rolle im polaren Wachstum der Hyphen spielt.

3.3 Kinesine in *Ustilago maydis*

3.3.1 Das Genom von *Ustilago maydis* kodiert für 10 Kinesine

Die Durchmusterung des vor kurzem veröffentlichten *Ustilago maydis* Genoms mit Sequenzen bekannter Kinesine der repräsentativen Familien aus Pilzen und Tieren führte zur Identifizierung von 10 Kinesinen. Dies ist die durchschnittliche Anzahl von Kinesinen, die bisher auch in filamentösen Pilzen anderer Spezies gefunden wurde, während in den Hefen *Saccharomyces cerevisiae* und *Schizosaccharomyces pombe*, weniger Kinesine gefunden wurden (Schoch et al., 2003). Die in *Ustilago maydis* identifizierten Kinesine konnten sieben Familien zugeordnet werden (nach Lawrence et al., 2004). Bei anderen

filamentösen Pilzen wurden die Kinesine neun verschiedenen Familien zugeteilt (reviewed in Schoch et al., 2003). Im Gegensatz dazu wurden in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* nur sechs Kinesine identifiziert (Hildebrandt and Hoyt, 2000), von denen keines den Familien der Kinesin-1 und Kinesin-3 Klasse angehört, die als Membrantransporter bekannt sind und in den filamentösen Pilzen vorkommen (Steinberg and Schliwa, 1995) (Lehmler et al., 1997; Wu et al., 1998) (Wedlich-Soldner et al., 2002). Diese Kinesine wurden auch in Amöben gefunden (Klopfenstein et al., 2002; Kollmar and Glockner, 2003), was dafür spricht das Kinesin-1 und Kinesin-3 Organellentransporter mit einem frühen Ursprung sind. In *Ustilago maydis* konnte auch ein Kinesin-4 identifiziert werden, welches nur in filamentösen Pilzen, nicht aber in Hefen, vorkommt (nach Schoch). Dieses Kinesin ist vermutlich am anterograden Transport von Vesikeln in Neuronen beteiligt (Peretti et al., 2000). Überraschenderweise führte die Deletion dieses Kinesins in *Ustilago maydis* zu keinem erkennbaren Phänotyp im polaren Sporidien- oder Hyphenwachstum, was darauf schließen lässt, dass diese Kinesine in Pilzen keine wichtige Rolle im Spitzenwachstum haben. Die im Genom von *Ustilago maydis* identifizierten Vertreter der Kinesin-7 Familie (CENP-E), Kin1 und Kin9 ließen sich nicht eindeutig klassifizieren. Das liegt daran, dass die Kinesin-7 Familie in zwei Klassen unterteilt werden kann. Die tierischen Vertreter dieser Klasse fungieren in der Chromosomen Segregation (Yen et al., 1991) und spielen eine Rolle im Spindel-Kontrollpunkt während der Metaphase (Musacchio and Hardwick, 2002). Im Gegensatz dazu sind die pilzlichen Vertreter dieser Familie, wie Tea2p aus *Schizosaccharomyces pombe* und KipA aus *Aspergillus nidulans* wichtig für das polare Wachstum (Browning et al., 2000; Konzack et al., 2004). Tea2p oder Kip2p konnten an zytoplasmatischen Mikrotubuli lokalisiert werden (Miller et al., 1998); (Browning et al., 2000) aber nicht im Zellkern (Hildebrandt and Hoyt, 2000) wie HsCENP-E (Yen et al., 1992). Kin1 und Kin9 aus *Ustilago maydis* gruppieren in der phylogenetischen Analyse zusammen mit einem möglichen Kinesin-7 aus dem Basidiomyceten *Cryptococcus neoformans* näher an den tierischen CENP-E Kinesinen als an den pilzlichen. Die Position der Motordomäne innerhalb der Kinesin-7-Familie weist Unterschiede zwischen den pilzlichen und den tierischen Kinesinen auf. Interessanterweise handelt es sich bei den Motordomänen von Kin1 und Kin9 um Interne-Motordomänen, wie es in den pilzlichen CENP-E Kinesinen typisch ist (Schoch et al., 2003). Im Gegensatz zu den anderen Pilzen, zeigen weder die *kin1*, *kin9* noch die *kin1/kin9*

Doppeldeletionsmutante einen Phänotyp im polaren Wachstum oder Morphologie von Sporidien oder Hyphen, was gegen eine Rolle im polaren Wachstum spricht. Lokalisationsstudien von Kin1 und Kin9 müssten durchgeführt werden um eine genauere Vorstellung von ihrer Funktion zu bekommen. Des Weiteren wurden bei der Durchmusterung des Genoms von *Ustilago maydis* noch Kin8 ein Kinesin-8 der Kip3-Familie und ein nicht-gruppierbares Kinesin, Kin7 identifiziert. Die Deletion dieser beiden Kinesine führte ebenfalls zu keinerlei morphologischen Phänotypen. Das die Deletion der neu identifizierten Kinesine ohne morphologischen Phänotyp blieb, kann nicht darauf zurückgeführt werden, dass diese im Wildtyp nicht exprimiert werden, wie eine durchgeführte Realtime PCR-Analyse zeigte (Manns et al., 2005). Die Kinesine zeigen allerdings, mit Ausnahme von Kin2 und Kin3 kein hohes Expressionslevel in Sporidien und Hyphen (Manns et al., 2005), was darauf schließen lässt, dass die Kinesine vielleicht nicht an entscheidenden Prozessen innerhalb der Zelle beteiligt sind. Das Ausbleiben von Phänotypen könnte auf die große Anzahl von Kinesinen zurückzuführen sein, die einer funktionalen Redundanz der Motoren resultieren könnte.

3.3.2 Kin2 und Kin3 spielen eine Rolle im Hyphenwachstum

Aus vorangegangenen Studien war bereits bekannt, dass das Kinesin der Kinesin-1 Familie, Kin2 und das der Kinesin-3 Familie ähnliche Kin3 im Hyphenwachstum von *Ustilago maydis* von Bedeutung sind (Lehmler et al., 1997) (Wedlich-Söldner 2001). Die Rolle der Kinesin-1 Familie wurde seit ihrer ersten Isolierung aus Hirngewebe (Brady, 1995; Vale et al., 1985) und Seegurken Eiern (Scholey et al., 1985) in vielen verschiedenen Studien untersucht. Die Mitglieder der Kinesin-1-Familie sind als Membrantransporter in vielen Organismen bekannt (Allan, 1995). Kinesine der Kinesin-3 Familie, wurden als erstes in neuronalen Zellen von *C.elegans* gefunden (Otsuka et al., 1991), dort kam es in Nullmutanten dieser Kinesine zu einer Fehlverteilung der synaptischen Vesikel (Hall and Hedgecock, 1991). Mittlerweile wurden Kinesine der Kinesin-3 Familie auch in anderen Organismen und Zelltypen gefunden, wo sie als Transporter verschiedenster Organellen

beschrieben wurden (Vale, 2003). Kinesin-1 und Kinesin-3 Vertreter aus Pilzen haben eine Funktion im Membran-Transport (Klopfenstein et al., 2002; Lehmler et al., 1997; Seiler et al., 1997). In Hyphen von *Ustilago maydis* zeigen die beiden Kinesine Kin2 und Kin3 einen ähnlichen bipolaren Phänotyp mit verkürzten Hyphen, die im Fall der Deletion von Kin2 auch nicht mehr in der Lage sind leeren Abschnitte zu bilden (Steinberg et al., 1998). In Hyphen von *Ustilago maydis* ist die Expression beider Kinesine hoch reguliert (Manns et al., 2005), was auf eine Funktion während des filamentösen Wachstums hindeutet. Erstaunlicherweise führt die Deletion beider Kinesine zu keinen zusätzlichen morphologischen Defekten. Die Hyphen der Doppelmutante zeigen das gleiche bipolare Wachstum, wie die $\Delta kin2$ - und $\Delta kin3$ -Hyphen. Die Abwesenheit des Mikrotubuli-Zytoskeletts resultierte auch im gleichen bipolaren Wachstumsphänotyp. Dieses könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Organisation der Mikrotubuli in Abwesenheit der Kinesine stark beeinträchtigt ist. Nachdem die Organisation der Mikrotubuli in den Deletionshyphen nicht gestört ist, könnte der Wachstumsdefekt auf eine Störung im Kinesin-abhängigen Transport zurückzuführen sein. Die Bestimmung der Mikrotubuli-Orientierung in $\Delta kin2$ - und $\Delta kin3$ -Deletionshyphen zeigte, dass die Plus-Enden der Mikrotubuli, genau wie in den AB33 *b*-Hyphen, in Richtung der wachsenden Hyphenspitze weisen. Dieses Ergebnis unterstützt die Vermutung, dass ein Fehlen der Kinesine Auswirkungen auf das Spitzenwachstum in Hyphen haben könnte. Da die Deletion von *kin2* und *kin3* zusammen, in Hyphen zu keinem additiven oder veränderten Phänotyp führt, könnte man daraus schließen, dass beide am gleichen Transportprozess beteiligt sind. Es könnte sein, dass beide am Transport des gleichen Transportguts beteiligt sind, und deshalb die Deletion des Einen gleichbedeutend mit der Deletion des anderen ist. Konventionelle Kinesine sind in Hyphen von *Neurospora crassa* und *Ustilago maydis* am polaren Transport von sekretorischen Vesikeln und der damit verbundenen Bildung einer apikalen Vesikelakkumulation beteiligt (Seiler et al., 1997; Lehmler et al., 1997). Die Position der als Spitzenkörper bezeichneten Vesikelakkumulation wird mit dem gerichteten Wachstum der Hyphe in Verbindung gebracht (Bartnicki-Garcia et al., 1995a; Riquelme et al., 1998). Aus diesem Grund wird angenommen, dass Kin2 am gerichteten Transport von sekretorischen Vesikeln in Richtung Wachstumsspitze beteiligt ist. Kinesine aus der Kinesin-3 (Unc104)- Familie sind bisher als nur als Transporter synaptischer

Vesikel oder von Mitochondrien beschrieben (Hall and Hedgecock, 1991) (Nangaku et al., 1994) in Pilzen wurden diese Kinesine bisher nur in *Dictyostelium discoideum* und *Ustilago maydis* näher untersucht (Klopfenstein et al., 2002; Wedlich-Söldner et al., 2002b). In haploiden Sporidien von *Ustilago maydis* ist Kin3 für den Transport früher Endosomen zuständig, die eine Funktion in der Zellteilung und dem bipolaren Knospen während des Sporidienwachstums haben (Wedlich-Söldner et al., 2000; Wedlich-Söldner et al., 2002).

3.4 Die Rolle der Endosomen im Hyphenwachstum

Die bidirektionale Bewegung der frühen Endosomen in haploiden Sporidien von *Ustilago maydis* wird durch die Aktivität von Kin3 und cytoplasmatischen Dynein vermittelt, welche in einem Gleichgewicht agieren (Wedlich-Söldner et al., 2002). Es gibt Hinweise aus Fibroblasten Zellen, dass das cytoplasmatische Kopplungsprotein CLIP-170 für die Beladung der Mikrotubuli mit Endosomen verantwortlich ist. CLIP-170 bindet an Endosomen, um diese anschließend an den Plus-Enden der Mikrotubuli auf den mikrotubuli-abhängigen Motor Dynein zu übertragen (Rickard and Kreis, 1996). Inwieweit ein Endosomen/Dynein Plus-End Beladungsmechanismus auch in *Ustilago maydis* vorhanden ist oder eine Rolle spielt, war Gegenstand dieser Arbeit.

3.4.1 Kin3 und Dynein sind für den bidirektionalen Transport der frühen Endosomen in Hyphen verantwortlich

Die Deletion von *kin3* führte in *Ustilago maydis* zur Ausbildung bipolarer verkürzter Hyphen (vergl. 1.3.2 und (Wedlich-Söldner, 2001)). Dieser Phänotyp ähnelt dem von Hyphen, in denen die Mikrotubuli mit Hilfe von Benomyl zerstört wurden. Da aber sowohl die Mikrotubuli-Organisation, als auch die Mikrotubuli-Orientierung in den *kin3*-Deletionshyphen nicht gestört waren, muss es eine andere Ursache, als eine gestörte

Mikrotubuli-Organisation, für die morphologischen Defekte geben. Diese Ursache könnte in der Störung des mikrotubuli-abhängigen Kin3-Transports in Richtung der sich im Apex befindenen Mikrotubuli-Plus-Enden begründet sein. Da aus haploiden Sporidien bereits bekannt ist, dass frühe Endosomen von Kin3 entlang von Mikrotubuli transportiert werden (Wedlich-Söldner, 2002), wurde untersucht, ob dieser Endosomentransport entlang der Mikrotubuli auch in der Hyphe von Bedeutung ist. In AB33-Hyphen von *Ustilago maydis* bewegen sich die Yup1-GFP-markierten Endosomen bidirektional entlang von Mikrotubuli. Diese Bewegung ist in Abwesenheit der Mikrotubuli, nach der Zerstörung dieser durch Benomyl, nicht mehr vorhanden. Aus diesem Grund kann davon ausgegangen werden, dass sich die frühen Endosomen ausschließlich entlang von Mikrotubuli bewegen. Die bereits beschriebene Orientierung der Mikrotubuli, die mit ihren Plus-Enden in Richtung der Wachstumsspitze und des basalen Septums zeigen, lässt darauf schließen, dass neben den Mikrotubuli plus-gerichteten Motoren, wie den Kinesinen, auch das minus-gerichtete Dynein am Transport der frühen Endosomen beteiligt sein muss. Die Deletion von *kin3* führt zu einer Akkumulation der frühen Endosomen innerhalb der zentralen Mutterzelle, wo nach der zuvor erfolgten Analyse der Orientierung der Mikrotubuli in den Deletionshyphen, die Minus-Enden der Mikrotubuli liegen. Das Fehlen von Dynein lässt die frühen Endosomen im Apex und am basalen Septum akkumulieren. Im Langstreckentransport der frühen Endosomen innerhalb der Hyphen spielt also, genauso wie im Kurzstreckentransport der haploiden Sporidien (Wedlich-Söldner et al., 2002b) die Aktivität der beiden mikrotubuli-abhängigen Motoren, Kin3 und Dynein eine Rolle. Für den Fall, dass die Fehlverteilung der Endosomen in Hyphen zu dem bipolaren Phänotyp in *Δkin3*-Hyphen führt, könnte es sein, dass vielleicht auch Kin2 am Endosomentransport beteiligt ist, da der Phänotyp der *Δkin2*-Hyphe sehr ähnlich aussieht (vergl. 1.3.2). In haploiden Sporidien führte die Deletion von Kin2 nur zu einer geringen Veränderung in der Endosomen-Motilität, wohingegen die Deletion in Hyphen zu einer starken Akkumulation der Endosomen im Apex der Hyphen führte, und die Motilität der frühen Endosomen stark reduziert war. Diese Beobachtung lässt auf eine unterschiedliche Funktion von Kin2 im Wachstum von haploiden Sporidien und filamentösen Hyphen schließen.

3.4.2 Kin2 unterstützt den retrograden Endosomentransport, durch die Anlieferung von Dynein in die Hyphenspitze

Die Lokalisierung der frühen Endosomen im Apex von *kin2*-Deletionshyphen war überraschend, da es sich bei Kin2 um ein Mitglied der Familie der konventionellen Kinesine handelt, die als plus-gerichtete Motoren bekannt sind (Steinberg et al., 1995 ; Steinberg et al., 1997), handelt. Außerdem haben *kin2*-Deletionshyphen den gleichen bipolaren Wachstumsphänotyp wie *kin3*- Deletionshyphen (vergl. Abb.15), was eine ähnliche Funktion im anterograden Transport von beiden vermuten lässt. Die Akkumulation der frühen Endosomen in $\Delta kin2$ -Hyphenspitzen kann durch die Repression von Kin3 wieder in Richtung der zentralen Mutterzelle verschoben werden, was darauf hinweist, dass die Deletion von *kin2* zu einer Verstärkung der Kin3-Aktivität führt. Diese Vermutung wird dadurch unterstützt, dass Hyphen in denen Kin3 überexprimiert wird, auch eine Akkumulation der frühen Endosomen im Apex zeigen. Allerdings konnte in Western-Analysen der $\Delta kin2$ -Mutanten keine erhöhte Kin3-Expression detektiert werden. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die Deletion von *kin2* in Hyphen zu einer Verschiebung des Gleichgewichts zwischen Kin3- und Dynein-Aktivität zu Gunsten von Kin3 führt. Die Konzentration der frühen Endosomen im Apex von Hyphen konditioneller Dyneinmutanten, weist zusätzlich darauf hin, dass die Verschiebung des Gleichgewichts auf eine Verringerung der Dynein-Motoraktivität zurückzuführen ist. Des Weiteren scheint der bipolare Wachstumsphänotyp der *kin2* und *kin3* Deletions- oder Überexpressionstämmen auf eine Fehlverteilung der frühen Endosomen zurückzuführen sein. In *Aspergillus nidulans* wird das konventionelle Kinesin, KinA für die Lokalisation von cytoplasmatischem Dynein am Plus-Ende der Mikrotubuli benötigt (Zhang et al., 2003). Die Akkumulation der frühen Endosomen im Apex der Hyphen von *kin2*- und *dyn2*-Mutanten legt die Vermutung nahe, dass in *Ustilago maydis* Kin2 für die Anlieferung von Dynein an die Mikrotubuli-Plus-Enden gebraucht wird. In AB33-Hyphen, die das

GFP₃Dyn2 Fusionsprotein exprimieren, lokalisiert Dynein in einem starken Signal an den Plus-Enden der Mikrotubuli. Diese Signale sind im Apex der Hyphen besonders stark konzentriert, was vielleicht auf eine besondere Funktion des Dyneins in der Hyphenspitze hinweist. Im Gegensatz dazu konnte im Apex der *Δkin2*-Hyphen kein GFP₃Dyn2-Signal an den Plus-Enden der Mikrotubuli detektiert werden. In Pilzen kommt es zu einer Konzentration von Dynein an den Plus-Enden der Mikrotubuli, bevor es aktiviert wird (Han et al., 2001; Sheeman et al., 2003). Im Gegensatz dazu akkumuliert in tierischen Zellen Dynactin an den Plus-Enden (Habermann et al., 2001; Vaughan et al., 1999). Durch die Präsenz von inaktivem Dynein an den Plus-Enden scheint die Zelle Zeit zu sparen. Sie muss nicht erst bei Bedarf das Dynein an die Plus-Enden rekrutieren. In *Saccharomyces cerevisiae* lokalisiert Dynein auch schon während der Mikrotubuli-Verlängerung an deren Plus-Enden, bis es nach Kontakt mit dem Kortex aktiviert wird und die Zellkernwanderung innerhalb der Mitose stattfinden kann (Lee et al., 2003; Sheeman et al., 2003).

Die Fehlen der GFP₃Dyn2-Signale an den Plus-Enden der Mikrotubuli in *kin2*-Deletionshyphen bestätigt die angenommene Funktion von Kin2 in der Anlieferung von Dynein an die Plus-Enden der Mikrotubuli, und erklärt damit auch den Einfluss von Kin2 auf den retrograden, minus-gerichteten Transport der frühen Endosomen. In einer weiteren Analyse konnte gezeigt werden, dass sich die meisten frühen Endosomen bis zur Dynein-Akkumulation an den Plus-Enden der Mikrotubuli bewegen, bevor sie eine Richtungsänderung zum Minus-Ende hin vornehmen. Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass es sich bei den Plus-Enden der Mikrotubuli um eine Art "Ladezone" handeln könnte, in der ankommende Vesikel mit dem minus-gerichteten Motor, Dynein beladen werden. Für tierische Zellen existiert ein ähnliches Modell, und hier konnte gezeigt werden, dass Endosomen-assoziiertes CLIP-170 an Plus-Enden von Mikrotubuli bindet und Dynactin rekrutiert, welches anschließend an Dynein bindet (Habermann et al., 2001; Valetti et al., 1999; Vaughan et al., 1999). Es wird angenommen, dass sich CLIP-170 von den Mikrotubuli nach der Bindung oder Aktivierung von Dynein löst und der Endosomentransport beginnen kann. Die Akkumulation von Dynein an den Plus-Enden der Mikrotubuli und die Kolo-kalisation von frühen Endosomen und Dynein an den Plus-Enden deutet darauf hin, dass auch im Endosomentransport von *Ustilago maydis* dieser Mechanismus der Dyneinaktivierung bei Bedarf eine Rolle spielen könnte. Wie die Aktivierung von Dynein genau funktioniert ist noch nicht sehr gut verstanden. In

Saccharomyces cerevisiae, *Aspergillus nidulans* und tierischen Zellen konnte neben den oben erwähnten Dynactin und CLIP-170 ein weiteres +TIP's (plus-end tracking protein) gefunden werden, welches eine mögliche Rolle in der Plus-End Lokalisation von Dynein spielt, Lis-1 oder seine Homologe in *Aspergillus* und Bäckerhefe, NUDF und Pac1p (Coquelle et al., 2002; Sheeman et al., 2003; Tai et al., 2002). In *Ustilago maydis* wurde dieses Lis-1-Homolog auch identifiziert (Anne Straube, persönliche Mitteilung), seine Funktion an den Plus-Enden und in der Plus-End-Bindung und Aktivierung von Dynein werden in zukünftigen Studien näher charakterisiert.

3.4.3 Die Anlieferung von Dynein an die Plus-Enden der Mikrotubuli ist nicht ausschließlich *kin2* abhängig

Der Dynein-Anlieferungsdefekt tritt allerdings nur im Apex der $\Delta kin2$ -Hyphen auf. In kürzeren Mikrotubuli, wo die Plus-Enden im vorderen Bereich der Hyphe enden, lokalisiert Dynein sowohl stärker konzentriert an den Spitzen als auch entlang des gesamten Mikrotubulus wo es sich schnell und bidirektional bewegt. Diese Beobachtung spricht dafür, dass Kin2 nicht alleine für den Transport von Dynein an Mikrotubuli-Plus-Enden wichtig ist, sondern, dass es mit anderen plus-gerichteten Motoren kooperiert. Dafür spricht auch, dass die Deletion von *kin2* in Sporidien nur zu geringen Veränderungen in der Beweglichkeit und Verteilung der frühen Endosomen sowie der Verteilung von Dynein führte. Die Expression eines Kin2-Rigorkonstruktes in haploiden Sporidien, welches in einer festen Bindung des Kinesins an die Mikrotubuli resultiert, führte dazu, dass nahezu keine Dyneinbewegung mehr vorhanden war. Das wiederum spricht dafür, dass Dynein doch ausschließlich von Kin2 transportiert wird. Das in $\Delta kin2$ -Sporidien nur ein geringer Defekt im Transport der frühen Endosomen zu detektieren ist, hängt wohl damit zusammen, dass ein zusätzlich am Dynein-Transport beteiligtes Kinesin in der Lage ist, ausreichende Mengen von Dynein an die Plus-Enden zu liefern. Dieses Kinesin kann aber nur das Fehlen von Kin2 im Kurzstreckentransport ausgleichen, wodurch sich auch erklären lässt, warum das Fehlen von Kin2 nur Auswirkungen auf die Lokalisation von Dynein im Apex der Hyphe hat. Inwieweit Kin2 und das weitere Kinesine im Transport von Dynein

kooperieren ist noch nicht bekannt. Für höhere Organismen konnte bereits gezeigt werden, dass die Dynein Lokalisation von Kinesin-1 Kinesinen abhängig ist (Brendza et al., 2002). In *Ustilago maydis* sind 10 Kinesine identifiziert worden, von denen nur *kin2* und *kin3* Nullmutanten einen Phänotyp haben. Es könnte also sein, dass die anderen Kinesine eine nicht-essenzielle Aufgabe besitzen, oder redundante Funktionen in essenziellen Prozessen haben, wie es bei der Anlieferung von Proteinen an die Mikrotubuli-Plus-Enden der Fall ist. In den Hefen *Saccharomyces cerevisiae* und *Schizosaccharomyces pombe* konnte so eine Funktion für die Kinesine der Kinesin-7-Familie, in der Anlieferung von CLIP170 an die Plus-Enden der Mikrotubuli gefunden werden (Browning et al., 2003; Carvalho et al., 2004). Diese Ergebnisse führen zu dem folgenden Modell (Abb.31). In Hyphen von *Ustilago maydis* ist der Transport früher Endosomen von der Interaktion verschiedenster Kinesine und von Dynein abhängig. Kin3, ein Kinesin-3 transportiert frühe Endosomen entlang von Mikrotubuli, zu deren Plus-Enden, im wachsenden Apex der Hyphe. Das dort vorliegende inaktive Dynein wird nach der Beladung mit frühen Endosomen durch einen noch nicht bekannten Mechanismus aktiviert, und transportiert die Endosomen im Anschluss in Minus-Richtung der Mikrotubuli. Damit der minus-gerichtete Transport stattfinden kann, muß eine Kin2 abhängige Anlieferung von Dynein an die Plus-Enden der Mikrotubuli erfolgen. Die Dynein-Anlieferung von Kin2 spielt nur im Langstreckentransport zur Hyphenspitze eine Rolle, im Kurzstreckentransport scheinen weitere Kinesine die Funktion von Kin2 auszugleichen. Diese Ergebnisse lassen auf einen Zusammenhang zwischen Plus-End-bindenden Proteinen und dem bidirektionalen Transport von Organellen schließen, der in späteren Untersuchungen weitere Aufklärung finden wird.

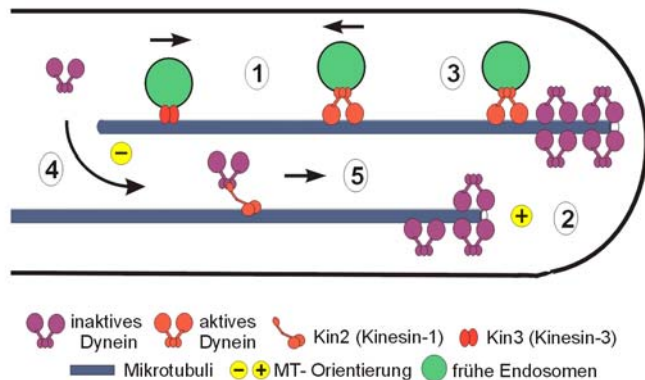


Abbildung 31: Modell der Dynein Anlieferung an die Plus-Enden der Mikrotubuli in Hyphen von *Ustilago maydis*

- 1: Kin3 transportiert frühe Endosomen in Richtung der Plus-Enden der Mikrotubuli.
- 2: Inaktives Dynein ist an den Plus-Enden der Mikrotubuli angereichert.
- 3: Aktiviertes Dynein ist für den Transport der frühen Endosomen in Minus-Richtung verantwortlich.
- 4: Der Richtungswechsel von Organellen könnte zur Entlassung von inaktivem Dynein führen.
- 5: Kin2 sorgt für die Anlieferung von inaktivem Dynein an die Plus-Enden. (Abbildung freundlicherweise von Dr.Gero Steinberg zur Verfügung gestellt.)

3.5 Wird die Polarität der Zelle durch eine Kooperation zwischen Aktin und Mikrotubuli aufrechterhalten ?

Im vorherigen Kapitel wurde die Rolle von Kin2, Kin3 und Dynein im bidirektionalen Transport von frühen Endosomen in Hyphen von *Ustilago maydis* beschrieben. Es konnte aber auch gezeigt werden, dass weder Kin2 noch Kin3 eine essenzielle Funktion im polaren Wachstum der Hyphen haben, sondern lediglich für den Langstreckentransport von größerer Bedeutung sind. Die Deletion der beiden Kinesine führte zu einer Fehlverteilung der frühen Endosomen, die wahrscheinlich die Ursache für das ähnliche bipolare Hyphenwachstum der Deletionsstämme ist. Sogar die Deletion des Mikrotubuli-Zytoskeletts hatte keine Auswirkungen auf das polare Wachstum der Hyphen, sie zeigten die gleichen bipolaren und verkürzten Hyphen wie die Kin2 und Kin3 Deletionsstämme.

Es scheint so, als wären die Mikrotubuli für das polare Wachstum in *Ustilago maydis* nicht von entscheidender Bedeutung. Das polare, filamentöse Wachstum braucht Mikrotubuli unabhängige Komponenten. In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass das Aktin-abhängige Klasse-V-Myosin Myo5 aus *Ustilago maydis* am Hyphenwachstum beteiligt ist (Weber et al., 2003). Aus diesem Grund könnte es auch eine Rolle im anterograden Transport besitzen. In *myo5* Deletionsmutanten führte die Zerstörung des Mikrotubuli-Zytoskeletts zum kompletten Verlust des polaren Wachstums, was darauf hinwies, dass es eine Kooperativität zwischen dem Aktin- und dem mikrotubuli-abhängigen Transport geben muss. In tierischen Zellen, wie auch für *Saccharomyces cerevisiae* wurde gezeigt, dass Myosine der Klasse-V mit Kinesinen der Klasse-1 kooperieren können (Brown, 1999) (Huang et al., 1999). Die gleichzeitige Deletion von *kin2* und *myo5* in *Ustilago maydis* führte sowohl in haploiden Sporidien, als auch in filamentösen Hyphen, zum kompletten Verlust des polaren Wachstums. Dies deutet darauf hin, dass Kin2 und Myo5 unabhängig voneinander Komponenten transportieren, die für das polare Spitzenwachstum benötigt werden (Abb.32, Vesikel sind mit “?” markiert). Allerdings kann Kin2, Myo5 im anterograden Transport nicht ersetzen, so wie es Smy1p, das entfernte Kinesin-1 aus *Saccharomyces cerevisiae*, als “multi-copy-supressor“ von Myo2p tut (Brown, 1999). Das könnte daran liegen, dass Myo5 und Kin2 in *Ustilago maydis* unterschiedliche Komponenten transportieren, die aber bislang noch nicht bekannt sind. In Sekretionstests konnten sowohl *myo5*- als auch *kin2*-Deletionsstämme weniger saure Phosphatase sekretieren, und auch die doppelt-Mutante zeigte keinen zusätzlichen Defekt, was auf eine Rolle beider Motoren im gleichen Transportweg zurückzuführen sein könnte (Abb.32, “PP“ markierte Vesikel). Die Messung der Invertase-Sekretion ergab, dass Kin2 auch am Transport dieses Enzyms beteiligt ist, wohingegen die Rolle von Myo5 hier nicht ganz klar ist, da es in Deletionsstämmen von Myo5 zu einer erhöhten Invertase-Sekretion kam. In *Saccharomyces cerevisiae*, hat Myo2p keinen Einfluss auf die Sekretion der Invertase (Govindan et al., 1995).

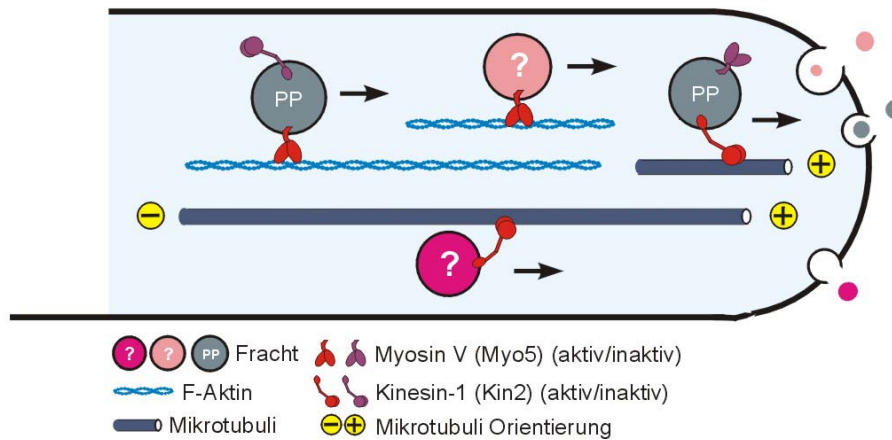


Abbildung 32: Modell der Rolle von Kin2 und Myo5 im polaren Hyphenwachstum

Myosin5 scheint in *Ustilago maydis* für die Anlieferung sekretorischer Vesikel in den Apex von Bedeutung zu sein, wo das zuvor inaktiv gebundene Kin2 aktiviert wird, und für den Transport der Vesikel zur Hyphenspitze sorgt. (Abbildung freundlicherweise von Dr.Gero Steinberg zur Verfügung gestellt.)

In neuronalen Zellen können Vesikel zunächst entlang von Mikrotubuli transportiert werden, um anschließend auf Aktin zu wechseln (Kuznetsov et al., 1992). In Axonen werden Vesikel von Kinesin-1 Kinesinen und Myosinen der Klasse-V transportiert (Rogers and Gelfand, 2000), in Melanozyten von Mäusen und im Hirn von Tintenfischen konnte auch ein Interaktion von konventionellem Kinesin und Myosinen der Klasse-V gezeigt werden (Huang et al., 1999; Stafford et al., 2000). Die Interaktion beider Motoren könnte durch eine gemeinsame Bindung an das gleiche Transportgut möglich sein (Langford, 2002), die es diesem erlaubt, sich mit Hilfe des gebundenen Kinesins entlang der Mikrotubuli zu bewegen, um dann bei Bedarf das Aktin mit Hilfe des Myosins zu benutzen. Das Axon, enthält lange Mikrotubuli und kurze Aktin-Filamente im Apex (LeBeux and Willemot, 1975), deshalb wurde lange Zeit angenommen, dass Kinesine für den Langstreckentransport von Vesikeln verantwortlich sind, wohingegen Myosine im Kurzstreckentransport innerhalb des Apex vermitteln (Langford, 2002). In *Ustilago maydis* lokalisieren sowohl Kin2 als auch Myo5 im Apex der Hyphe. Dabei ist die Lokalisation von Myo5 im Apex nicht mikrotubuli-abhängig (Weber et al., 2003), allerdings haben die Mikrotubuli einen Einfluss auf die punktuelle Myo5-Lokalisation im

Apex. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Konzentration von Kin2 in der Hyphenspitze erstaunlicherweise nicht von der Anwesenheit der Mikrotubuli abhängt. Des Weiteren zeigte die Expression eines YFP-Kin2-Hals-Schwanz-Konstruktes, dass für die Lokalisation von Kin2 im Apex auch nicht die Kin2-Motordomäne benötigt wird (Manns et al., 2005), sondern dass diese Lokalisation von Aktin und Myo5 abhängig ist. Die Beobachtungen lassen darauf schließen, dass Myo5 Vesikel entlang von Aktin zum Apex der Hyphe transportiert werden, an denen inaktives Kin2 gebunden ist (Abb.31). Die Bedeutung von Mikrotubuli und Kin2 für die fokussierte Lokalisation von Myo5 in der Hyphenspitze und der in früheren Studien beobachtete Kin2-abhängige Verlust der apikalen Vesikelakkumulation in Hyphen (Lehmler et al., 1997), könnte dafür sprechen, dass entgegen bisherigen Annahmen, Kin2 für die Aufrechterhaltung des Spitzenkörpers im Apex wichtig ist. Des Weiteren legen die Ergebnisse nahe, dass Myo5 im Langstreckentransport Vesikel zur Hyphenspitze transportieren könnte, die mit Kin2 beladen sind.

3.6 Schlussfolgerungen und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Mikrotubuli keine essentielle Funktion für das polare Wachstum von *Ustilago maydis* haben. Sie werden zwar in der Mitose benötigt, aber im polaren Wachstum der im Zellzyklus arretierten Hyphen, scheinen sie nur einen Einfluss auf die Länge der Hyphen zu haben, was mit der Positionierung des Zellkerns innerhalb der Hyphen zusammenhängen könnte.

Des Weiteren sind die Plus-Enden der Mikrotubuli in Hyphen zur Wachstumsspitze hin ausgerichtet was auf eine wichtige Rolle des plus-gerichteten Mikrotubuli-Transports im Hyphenwachstum hinweist. Dieser plus-gerichtete Transport wird von Kinesinen vermittelt. Im Genom von *Ustilago maydis* konnten 10 Kinesine identifiziert werden, von denen aber nur das konventionelle Kinesin Kin2 und das Unc104/Kif1 ähnliche Kinesin Kin3 eine bedeutende Funktion im Hyphenwachstum haben. Die Deletion dieser beiden Kinesine führte zu einem ähnlichen Wachstumsphänotyp, und zu einer Fehlverteilung der frühen Endosomen, was für eine Bedeutung dieser im Hyphenwachstum spricht. Es konnte

allerdings gezeigt werden, dass Kin2 nicht direkt am Transport der frühen Endosomen beteiligt ist, sondern indirekt über die Anlieferung von Dynein an die Plus-Enden der Mikrotubuli, den minus-gerichteten Transport unterstützt. Diese Tatsache lässt auf eine komplexe Regulation des bidirektionalen Transports der frühen Endosomen schließen, in dessen Prozess die Beladung von Dynein an den Plus-Enden eine wichtige Rolle zu spielen scheint. Neben Kin2 ist noch ein weiteres Kinesin am Transport von Dynein zu den Plus-Enden beteiligt, welches aber nur im Kurzstreckentransport von Bedeutung ist. Die Identifizierung dieses Kinesins, und die Funktion der in *Ustilago maydis* existierenden CLIP-170- und Lis-1-Homologe, die am Plus-Ende der Mikrotubuli die Beladung der Motoren mit Organellen regulieren wird in der Zukunft eine spannende Aufgabe darstellen, für das sich *Ustilago maydis* als Modell hervorragend eignet.

Kin2 ist aber nicht nur am Langstreckentransport von Dynein zu den Plus-Enden der Mikrotubuli in der Hyphenspitze beteiligt. In dieser Arbeit konnte auch gezeigt werden das eine Kooperation zwischen Kin2, und dem Klasse-V Myosin aus *Ustilago maydis*, Myo5, im polaren Wachstum und der Sekretion besteht. Obwohl auch in Axonen schon eine solche Verbindung zwischen konventionellen Kinesinen und Klasse-V Myosinen hergestellt werden konnte, deuten die Ergebnisse aus *Ustilago maydis* auf eine Myo5-abhängige Anlieferung von Kin2 zur Hyphenspitze, und eine Rolle von Kin2 im Kurzstreckentransport innerhalb des Apex hin. Dies würde dafür sprechen, dass Kin2 neben einer Funktion im Langstreckentransport bei der Anlieferung von Dynein, auch eine Funktion im Kurzstreckentransport bei der möglichen Aufrechterhaltung des Spitzenkörpers hat, und dass Myo5 als Langstreckentransporter Vesikel in Richtung der wachsenden Hyphenspitze transportiert. Inwieweit aber Myo5 und Kin2 direkt interagieren oder vielleicht an die gleichen Vesikel binden, soll in zukünftigen biochemischen Analysen näher untersucht werden. Die hier erzielten Ergebnisse verdeutlichen die Komplexität und enge Verknüpfung innerhalb der verschiedenen Transportprozesse innerhalb der Zelle, und die Bedeutung ihrer Regulation während des Wachstums.

4 Material und Methoden

4.1 Material und Bezugsquelle

4.1.1 Medien, Lösungen, Enzyme und Kits

Chemikalien

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

Puffer und Lösungen

Standard-Puffer und Lösungen wurden nach (Ausubel et al., 1987) und (Sambrook et al., 1989) hergestellt, Einzelheiten dazu siehe (Brachmann, 2001). Spezielle Puffer, Lösungen und Medien sind unter den jeweiligen Methoden aufgeführt.

Enzyme

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

Verwendete Kits und sonstiges Material

In dieser Arbeit wurden folgende Kits verwendet: JETsorb (Genomed) zur Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen, JETquick Plasmid Maxi- und Miniprep Kit (Genomed) zur Präparation hochreiner Plasmid-DNA, JETquick PCR Purification Kit (Genomed) zur Aufreinigung von PCR Produkten, JETquick General DNA Clean-up Kit (Genomed) zur Aufreinigung von Plasmiden vor der Sequenzierung, TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen) zur Klonierung von PCR-Produkten, NEBlot Kit (New England Biolabs) zur radioaktiven Markierung von DNA-Fragmenten, PCR-DIG-labeling Mix (Roche) zur Dioxigenin-Markierung von DNA-Fragmenten und PCR-Produkten, Microspin S-300 und S-200 Säulen (Amersham Pharmacia Biotech) zur Aufreinigung von radioaktiv markierten DNA-Sonden. Zusätzlich verwendetes Material ist unter den jeweiligen Methoden beschrieben.

4.1.2 Antikörper

Tabelle 2: Verwendete primäre und sekundäre Antikörper

primäre Antikörper				
Antigen	gekoppelt mit	Spezies	Herstellung/ Vertrieb	verwendete Konzentration
Kin2		Kanninchen	Eurogentec	1:5000
Kin3		Kanninchen		1:8000
α -Tubulin		Maus	Oncogene	1:5000
sekundäre Antikörper				
IgG aus Maus	Meerettichperoxidase	Ziege	Promega	1:4000
IgG aus Kanninchen	Meerettichperoxidase	Ziege	Promega	1:4000

4.1.3 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden von den Firmen Sigma ARK Scientific und Metabion synthetisiert. Die Nukleotidsequenz ist jeweils in 5' - in Richtung 3'-Ende angegeben.

Tabelle 3: Verwendete Oligonukleotide

Name	Sequenz	Verwendungszweck
ODA29	GAGGAGTGTCTGCTCCAG	Klonierung von pCRTOPOKin8-ko
ODA30	CACGGCCTGAGTGGCCGGTGAGGTATGCTGGTGG	
ODA31	GTGGGCCATCTAGGCCGTAGCACTTGAGCCCGTC	
ODA32	GACTCTTGCCGATCTCG	
ODA33	GACGTGTCTGCGCGATT	Klonierung von pCRTOPOKin1-ko
ODA34	CACGGCCTGAGTGGCCGTTTCCTGCAAGGTCGGC	
ODA35	GTGGGCCATCTAGGCCCATGTCTGTGGCCTGACG	
ODA36	GTCGGAGACAACGGATCC	
ODA37	CGACACTCGCGACTCACG	
ODA38	cacggcctgagtgcccttaggcttgcaggcacg	Klonierung von pCRTOPOKin6-ko
ODA39	GTGGGCCATCTAGGCCGATCACACTCACGACTCG	
ODA40	cagcggatagatcgcttc	
ODA51	GAGGAAGCCAGGAGCAAG	Klonierung von pCRTOPOKin9-ko
ODA52	CACGGCCTGAGTGGCCCATGAGCTGATGGCGACG	
ODA53	GTGGGCCATCTAGGCCGGATCTAGGGCCTCAGAC	
ODA54	GGTGAAACTCGGACTGGC	
ODA60	CGTGTGGGTGAGTGTGAC	Amplifizierung von Kin3HygKO-BsiWI-Nsil
ODA61	CCAGTTTCCGCTGCAACC	Klonierung von pPkin2_3GFPKin2-N
UF1	ggacatgtcgactggcgggtgaagtg	
UF2	GAAGTACATATGTCCAACAACATCAAGGTC	
UF3	GTCGAGGTGCGTTGATGATC	crgKin10
ODA68	GTGGGCCATCTAGGCCGATTGCCTCTTCCGACCC	
ODA69	CTAGGCCTGAGTGGCCGGTGCGACACGATCGACC	

ODA70	CCTCCTTGAGCGCTAGAG	crgKin10
ODA47	GGGAGACATGGCAACCTG	crgKin10
IM109	CGTCAAGCTTC gac gat ggc caa gaa gtg	Klonierung von pHisCFP-C
IM199	GTCGGTGACGCTTGGATG	Klonierung von pGFP ₃ Kin2-C
IM200	GGACCCGATGTGGAAACG	
Uni24	acgacgttgtaaacgacgccag	Sequenzierung von Inserts pCR [®] 2.1-TOPO [®]
Rev24	ttcacacaggaacagctatgacc	

4.1.4 Plasmide und Plasmidkonstruktionen

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

Tabelle 4: Ausgangsplasmide

Plasmid	Kurzbeschreibung	Resistenz	Referenz
pUC19		-	(Yanisch-Perron, 1985)
pBS(+)-SK		-	Stratagene
pSP72		-	Promega
pCR-TOPO		-	Invitrogen
pNEB193		-	New England Biolabs
pSL1180		-	Pharmacia
pET15b			Novagen
pNEB-Ble(+)	<i>Phsp70-ble-TtrpC</i>	B	(Brachmann et al., 2001)
pNEB-Ble(-)	<i>Phsp70-ble-TtrpC</i>	B	(Brachmann et al., 2001)
pSL-Ble(+)	<i>Phsp70-ble-TtrpC</i>	B	(Brachmann et al., 2001)
pSL-Ble(-)	<i>Phsp70-ble-TtrpC</i>	B	(Brachmann et al., 2001)
pNEB-Cbx(+)	<i>Pip-ip^R-Tip</i>	C	(Brachmann et al., 2001)
pNEB-Cbx(-)	<i>Pip-ip^R-Tip</i>	C	(Brachmann et al., 2001)
pSL-Cbx(+)	<i>Pip-ip^R-Tip</i>	C	(Brachmann et al., 2001)
pSL-Cbx(-)	<i>Pip-ip^R-Tip</i>	C	(Brachmann et al., 2001)
pNEB-Nat(+)	<i>Pgap1-nat1-Tcyc1</i>	N	(Brachmann et al., 2001)
pNEB-Nat(-)	<i>Pgap1-nat1-Tcyc1</i>	N	(Brachmann et al., 2001)
pSL-Nat(+)	<i>Pgap1-nat1-Tcyc1</i>	N	(Brachmann et al., 2001)

Material und Methoden

pSL-Nat(-)	<i>Pgap1-nat1-Tcyc1</i>	N	(Brachmann et al., 2001)
pNEB-Hyg(+)	<i>Phsp70-hph-Thsp70</i>	H	(Brachmann et al., 2001)
pNEB-Hyg(-)	<i>Phsp70-hph-Thsp70</i>	H	(Brachmann et al., 2001)
pSL-Hyg(+)	<i>Phsp70-hph-Thsp70</i>	H	(Brachmann et al., 2001)
pSL-Hyg(-)	<i>Phsp70-hph-Thsp70</i>	H	(Brachmann et al., 2001)
p123	<i>Potef-egfp-Tnos, cbx^R</i>	C	Christian Aichinger, unveröffentlicht
potefGFPTub1	<i>Potef-egfp-tub1, cbx^R</i>	C	(Steinberg et al., 2001)
pMyo5 ^{IS}	<i>Pmyo5-myo5^{E534K}, cbx^R</i>	C	(Weber et al., 2003)
potefYup1GFP	<i>Potef-yup1-egfp, cbx^R</i>	C	Wedlich-Söldner et al.2002
pcrg-Dyn1-hom	<i>Pcrg-dyn1, nat^R</i>	N	Wedlich-Söldner, unveröffentlicht
pcrgKin3	<i>Pcrg-kin3, nat^R</i>	N	Wedlich-Söldner et al.2002
pEB1YFP	<i>Ppeb1-peb1-yfp, ble^R</i>	B	Straube et al., 2003
potefHisCFP	<i>Potef-his4-cfp, cbx^R</i>	C	Straube et al., 2005
pUMa542 Kin2delta-hyg-topo		H	Michael Feldbrügge, Philip Becht unveröffentlicht
pTZ19::myoV		H	Christian Gruber, unveröffentlicht
pOGmyo5	<i>Potef-egfp-myo5, cbx^R</i>	C	(Weber et al., 2003)
pSLGFP ₃ dyn2hom	<i>Pdyn2-3xgfp-dyn2, hyg^R</i>	H	Manns et al., 2005, eingereicht
potefRFP ₂ Yup1	<i>Potef-2xrfp-yup1, cbx^R</i>	C	Manns et al., 2005, eingereicht
pcrgKin2	<i>Pcrg-kin2, nat^R</i>	N	Manns et al., 2005, eingereicht
pcrgKin2 ^{G96E}	<i>Pcrg-kin2^{G96E}, hyg^R</i>	H	Manns et al., 2005, eingereicht
pRFP ₂ Tub1	<i>Potef-2xrfp-tub1, cbx^R</i>	C	Manns et al., 2005, eingereicht

Resistenzen: C, Carboxin; H, Hygromycin; B, Pleomycin; N, Nourseothricin

ble-Gen aus *Streptoalloteichus hindustanus*; *trpC*-Terminator aus *Aspergillus nidulans*; *nat1*-Gen aus *Streptomyces noursei*; *gap1*-Promotor aus *U. maydis*; *cyc1*-Terminator aus *S. cerevisiae*; *hph*-Gen aus *E. coli*; *hsp70*-Promotor und *hsp70*-Terminator aus *U. maydis*; *ip*-Lokus aus *U. maydis*; *crg*-Promotor aus *U. maydis*; *otef*-Promotor aus *U. maydis*; *tub1*-Gen α -Tubulin aus *U. maydis*; *myo5*-Gen Klasse V Myosin aus *U. maydis*; *dyn2*-Gen Teil der Schweren Kette von Dynein aus *U. maydis*; *kin2*-Gen Kinesin-1 aus *U. maydis*; *pep1*-Gen EB1-Homolog aus *U. maydis*; *yup1*-Gen t-Snare aus *U. maydis*; *his4*-Gen Histon4 aus *U. maydis*

4.1.5 In dieser Arbeit hergestellte Plasmide

pSLPeb1YFP_{hom}-N

Dieses Plasmid ist durch Austausch der Phleomycin-Resistenzkassette durch die Nourseothricin-Resistenzkassette aus pSLpeb1YFP_{hom}_ble entstanden. Die 1476 bp grosse nat-Kassette wurde mit SbfI und

BglII aus dem Vektor pNEBNat+ isoliert. Diese wurde in den mit SbfI und partiell mit BglII geschnittenen 5751 bp grossen pSLpep1YFP-Vektor ligiert, der nur noch das für die homologe Integration notwendige Peb1-YFP-Fusionskonstrukt trägt. Für die homologe Integration in das *U. maydis* Genom wurde das Konstrukt mit HindIII/AvrII verdaut.

pwtHisCFP-C

Dieses Plasmid enthält die codierende Sequenz von CFP fusioniert an den C-Terminus des gesamten *histon4* Gens, welches im Zellkern lokalisiert, unter Kontrolle des natürlichen Promotors. In einer zwei Fragment Ligation wurde der natürliche Promotor von *Histon4* aus genomischer DNA des Stammes 521 durch PCR mit den Oligonukleotiden AS99 und IM109 vervielfältigt. Das erhaltene Produkt wurde mit HindIII und BstEII nachverdaut und mit dem 5,4 kB großen HindIII/BstEII-Fragment aus p123HisCFP ligiert. Für die Integration in das *U. maydis* Genom wurde das Plasmid mit SspI linearisiert.

pGFP₃Myo5-C

Dieses Plasmid enthält die kodierende Sequenz von drei *gfp* fusioniert an den N-Terminus des *myo5* Gens unter Kontrolle des natürlichen Promotors und ist in einer drei Fragment Ligation entstanden. Aus pMGMyo5^{ts} wurde der natürliche Promotor als 2.3 kB großes *MfeI/NcoI*-Fragment isoliert, und anschließend mit dem 2.2 kB *NcoI/NdeI*-Fragment, welches den *otef*-Promotor und die triple kodierende Sequenz von *gfp* enthält, und dem 8.6 kB *NdeI/MfeI*-Fragment mit der kodierenden Sequenz von *myo5* und der Carboxin-Resistenzkassette, aus pOGMyo5C ligiert. Für die Integration in das *U. maydis* Genom wurde das Plasmid mit SspI linearisiert.

pGFP₃Kin2-C

Dieses Plasmid enthält die kodierende Sequenz von drei *gfp* fusioniert an den N-Terminus des *kin2* Gens unter Kontrolle des natürlichen Promotors und ist in einer drei Fragment Ligation entstanden. Dazu wurde der natürliche Promotor und das die triple kodierende Sequenz von *gfp* tragende 4175bp *AgeI/ApaI*-Fragment aus pkin2-3GFPkin2-hom isoliert. Das *kin2* Gen wurde als 2879bp *BamHI/AgeI*-Fragment aus pANNE 3301 geschnitten. Diese Fragmente wurden in den *BamHI/ApaI* geöffneten pSLCbx(-)-Vektor ligiert. Für die Integration in das *U. maydis* Genom wurde das Plasmid mit SspI linearisiert.

pcrgDyn1-H

Dieses Plasmid ist durch Austausch der Nourseothricin-Resistenzkassette durch die Hygromycin-Resistenzkassette aus pcrgdyn1_nat entstanden. Dafür wurde pcrgdyn1_nat mit *NotI* verdaut woraus ein 9388bp-Fragment entstand welches die Nourseothricin-Resistenzkassette nicht mehr enthält. In dieses Fragment wurde die 2.8kB lange mit *NotI* aus pSLHyg+ geschnittene Hygromycin-Resistenzkassette ligiert. Für die homologe Integration in das *U. maydis* Genom wurde das Plasmid mit SspI verdaut.

pSLGFP₃Dyn2-hom-N

Dieses Plasmid ist durch Austausch der Hygromycin-Resistenzkassette durch die Nourseothricin – Resistenzkassette aus pSL3GFPdyn2hyg_hom entstanden. Dafür wurde pSL3GFPdyn2hyg_hom mit *NotI* verdaut, woraus ein 9.8kB-Fragment entstand, welches die Hygromycin-Kassette nicht mehr enthält. In dieses wurde die 1.5 kB lange mit *NotI* aus pSLNat+ geschnittene Nourseothricin-Resistenzkassette ligiert. Für die homologe Integration in das *U. maydis* Genom wurde das Plasmid mit *AflII/SbfI* verdaut.

pSLotefRFP₂Tub1_H

Dieses Plasmid dient der konstitutiven Expression eines Fusionsproteins aus Tub1 und einem zweifachen RFP. Der Vektor pSL-Hyg(-) wurde mit *SphI* und *MfeI* geöffnet. Aus pANNE2855 wurde mit *SphI* und *NdeI* ein 2295bp langes DNA-Fragment, welches den *otef*-Promotor und das zweifache RFP enthielt, ausgeschnitten. Dieses Fragment wurde mit einem 1731bp langen *NdeI/EcoRI*-Fragment, welches auch aus pANNE2855 stammt und den offenen Leserahmen und den *nos*-Terminator von *tub1* trägt in den geöffneten pSL-Hyg(-) Vektor kloniert. Für die Integration in das *U.maydis* Genom wurde das Plasmid mit *AlwNI* verdaut.

pSLPeb1RFP_{hom}-N

Dieses Plasmid ist durch den Austausch eines EB1-YFP –Fragments gegen ein EB1-RFP-Fragment, in einer zwei Fragment Ligation entstanden. Dazu wurde pSLPeb1RFP_{hom}-B mit *BglIII/XhoI* verdaut, woraus ein 1608bp großes Fragment entstand, welches einen Teil des *Peb1* Leserahmens fusioniert mit RFP enthält. Dieses wurde in den 5584bp grossen *BglIII/XhoI* geschnittenen pSLPeb1YFP_{hom}-N- Vektor ligiert, der den *peb1*-Promotor und die Nourseothricin-Resistenzkassette enthält. Für die homologe Integration in das *U.maydis* Genom wurde das Plasmid mit *HindIII/AvrII* verdaut.

pcrgKin10-H

Dieses Plasmid diente der Repression von *kin10*. Dazu wurde in einer drei Fragment Ligation hergestellt. Aus pUMa315_Hyg-Pcrg wurde mit *SfiI* ein 4183bp langes Fragment ausgeschnitten, auf dem sich der *crg*-Promotor und die Hygromycin-Resistenzkassette befanden. 1084bp der 5'-UTR wurden mittels PCR über genomische DNA des Stammes 521 mit den Primern ODA47 und ODA68 amplifiziert. Dabei wurde an das 3'-Endes des PCR-Produktes eine *SfiI*-Schnittstelle eingefügt. Ebenso wurde eine 1031bp lange 5'-Flanke mit dem Primern ODA70 und ODA69 amplifiziert. Die Flanken wurden anschließend in pCR2.1TOPO kloniert. Die 5'-UTR-Flanke wurde mit *SfiI/NotI* aus dem pCR2.1TOPO Vektor ausgeschnitten und zusammen mit dem Hyg-Pcrg-Fragment in den mit *SfiI/NotI* geöffneten pCR2.1TOPO Vektor kloniert, welcher bereits die 5'-Flanke trägt. Für die homologe Integration in das *U.maydis* Genom wurde das Plasmid mit *HindIII* verdaut.

Deletionsmutanten

Diese Plasmide wurden in Anlehnung an die in (Kämper, 2003) veröffentlichte PCR-Knockout-Strategie hergestellt.

pCRTOPOKin1-KO-H

Dieses Plasmid diente der kompletten Deletion des offenen Leserahmens des *kin1*-Gens.

886 bp der 5'-UTR wurden mittels PCR über genomische DNA des Stammes 521 mit den Primern ODA33 und ODA34 amplifiziert. Dabei wurde an das 3'-Endes des PCR-Produktes eine *SfiI*-Schnittstelle eingefügt. Ebenso wurde eine 947 bp lange 3'-Flanke mit dem Primern ODA35 und ODA36 amplifiziert und dabei am 5'-Ende eine *SfiI*-Schnittstelle generiert. Diese mit *SfiI* nachverdauten PCR-Produkte wurden mit einer 2720 bp großen Hygromycin-Resistenzkassette aus pBS-hyg(-) ligiert. Das Ligationsprodukt wurde aus dem Agarosegel eluiert und in pCR[®]2.1-TOPO[®] kloniert. Mittels PCR über pCRTOPOKin1-KO-H mit den äußeren Flankenprimern ODA33 und ODA36 wurde das KO-Konstrukt amplifiziert und nach Fällung direkt in *U. maydis* transformiert.

pCRTOPOKin6-K

Dieses Plasmid wurde nach dem gleichen Schema wie pCRTOPOKin1-KO-H kloniert.

927 bp der 5'-UTR wurden mittels PCR über genomische DNA des Stammes 521 und den Primern ODA39 und ODA40 amplifiziert. Dabei wurde an das 3'-Endes des PCR-Produktes eine *SfiI*-Schnittstelle eingefügt. Ebenso wurde eine 868 bp lange 3'-Flanke mit dem Primern ODA37 und ODA38 amplifiziert und dabei am 5'-Ende eine *SfiI*-Schnittstelle generiert. Diese mit *SfiI* nachverdauten PCR-Produkte wurden mit einer 2720 bp großen Hygromycin-Resistenzkassette aus pBS-hyg(-) ligiert. Das Ligationsprodukt wurde aus dem Agarosegel eluiert und in pCR[®]2.1-TOPO[®] kloniert. Mittels PCR über pCRTOPOKin1-KO-H mit den äußeren Flankenprimern ODA40 und ODA37 wurde das KO-Konstrukt amplifiziert und nach Fällung direkt in *U. maydis* transformiert. Mit diesem Konstrukt wird der komplette offene Leserahmen des *kin6*-Gens durch die Hygromycin-Resistenzkassette ersetzt.

pCRTOPOKin8-KO-N

Dieses Plasmid wurde nach dem gleichen Schema wie pCRTOPOKin1-KO-H kloniert.

952 bp der 5'-UTR wurden mittels PCR über genomische DNA des Stammes 521 und den Primern ODA29 und ODA30 amplifiziert. Dabei wurde an das 3'-Endes des PCR-Produktes eine *SfiI*-Schnittstelle eingefügt. Ebenso wurde eine 1061 bp lange 3'-Flanke mit dem Primern ODA31 und ODA32 amplifiziert und dabei am 5'-Ende eine *SfiI*-Schnittstelle generiert. Diese mit *SfiI* nachverdauten PCR-Produkte wurden mit einer 1437 bp großen Nourseothricin -Resistenzkassette aus pTC-nat(+) ligiert. Das Ligationsprodukt wurde aus dem Agarosegel eluiert und in pCR[®]2.1-TOPO[®] kloniert. Mittels PCR über pCRTOPOKin1-KO-H mit den äußeren Flankenprimern ODA29 und ODA32 wurde das KO-Konstrukt amplifiziert und nach Fällung direkt in *U. maydis* transformiert. Mit diesem Konstrukt wird der komplette offene Leserahmen des *kin6*-Gens durch die Nourseothricin -Resistenzkassette ersetzt.

pCRTOPOKin9-KO-N

Dieses Plasmid wurde nach dem gleichen Schema wie pCRTOPOKin1-KO-H kloniert.

1031 bp der 5'-UTR wurden mittels PCR über genomische DNA des Stammes 521 und den Primern ODA51 und ODA52 amplifiziert. Dabei wurde an das 3'-Endes des PCR-Produktes eine *Sfi*I-Schnittstelle eingefügt. Ebenso wurde eine 923 bp lange 3'-Flanke mit dem Primern ODA53 und ODA54 amplifiziert und dabei am 5'-Ende eine *Sfi*I-Schnittstelle generiert. Diese mit *Sfi*I nachverdauten PCR-Produkte wurden mit einer 1437 bp großen Nourseothricin -Resistenzkassette aus pTC-nat(+) ligiert. Das Ligationsprodukt wurde aus dem Agarosegel eluiert und in pCR[®]2.1-TOPO[®] kloniert. Mittels PCR über pCRTOPOKin1-KO-H mit den äußeren Flankenprimern ODA51 und ODA54 wurde das KO-Konstrukt amplifiziert und nach Fällung direkt in *U. maydis* transformiert. Mit diesem Konstrukt wird der komplette offene Leserahmen des *kin6*-Gens durch die Nourseothricin -Resistenzkassette ersetzt.

4.1.6 E. coli Stämme

Für sämtliche Klonierungen wurden die Stämme DH5 α (Hanahan, 1985) und TOP10 (Invitrogen) verwendet, bei denen es sich um Derivate des *E. coli*-Stammes K12 handelt. Genotyp DH5 α : F' *endA1*, *hsdR*, *hsdM*, *sup44*, *thi-1*, *gyrA1*, *gyrA96*, *relA1*, *recA1*, *lacZ* Δ M15. Genotyp TOP10: F' *mcrA*, Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*), Φ 80*lacZ* Δ M15, Δ *lacX74*, *deoR*, *recA1*, *araD139*, Δ (*ara-leu*)7697, *galU*, *galK*, *rpsL*(Str^R), *endA1*, *nupG*.

4.1.7 U. maydis Stämme

Tabelle 5: Ausgangsstämme

Stamm	Genotyp	Resistenz	Referenz
FB1	<i>a1 b1</i>	-	(Banuett and Herskowitz, 1989)
FB2	<i>a2 b2</i>	-	(Banuett and Herskowitz, 1989)
521	<i>a1 b1</i>	-	(Banuett and Herskowitz, 1989)
AB33	<i>a2b2 Pnar1:bW2,bE1, ble^R</i>	B	(Brachmann et al., 2001)
FB2 Δ myo5	<i>a2 b2 Δmyo5::hyg^R</i>	H	(Weber et al., 2003)
FB1Dyn2 ^{ts}	<i>a1b1 dyn2::dyn2ts, nat^R</i>	N	(Wedlich-Söldner et al., 2002a)
AB33Yup1GFP	<i>a2b2 Pnar1:bW2,bE1, ble^R /potefYup1GFP</i>	B,C	Manns et al., 2005, eingereicht
AB33 Δ kin3Yup1GFP	<i>a2b2 Pnar1:bW2,bE1, ble^R Δkin3::hyg^R /potefYup1GFP</i>	B,C	Manns et al., 2005, eingereicht

Stamm	Genotyp	Resistenz	Referenz
FB2 Δ kin2	<i>a2 b2 Δkin2::cbx^R</i>	C	(Lehmle et al., 1997)
FB2Peb1YFP	<i>a2b2 eb1-yfp, ble^R</i>	B	(Straube et al., 2003)
AB33RFPTub1GFPYup1	<i>a2b2 Pnar1:bW2,bE1, ble^R /potefRFPTub1/potefGFPYup1</i>	B,C,H	Manns et al., 2005, eingereicht
AB33GFPTub1	<i>a2b2 Pnar1:bW2,bE1, ble^R /potefGFPTub1</i>	B,C	Manns et al., 2005, eingereicht
FB2 Δ kin3	<i>a2 b2 Δkin3::hyg^R</i>	H	(Wedlich-Soldner et al., 2002)
FB2 Δ kin2 Δ kin3	<i>a2 b2 Δkin3::ble^R a2b2Δkin2::hyg</i>	B,H	Manns et al., 2005, eingereicht
FB2rKin2 ^{G96E} _R3D1	<i>a2b2 3xrfp-dyn1, nat^R /pcrgKin2^{G96E}/potefGFPTub1</i>	N,H,C	Manns et al., 2005, eingereicht

Resistenz: C, Carboxin; B, Phleomycin; H, Hygromycin; N, Nourseothricin
 Δ , Deletion des nachfolgenden Gens; /,ektopische Integration des nachfolgenden Plasmids; ;;, homologer Austausch; P, Promotor, -Fusion; ble^R, Phleomycin-Resistenzkassette; cbx^R, Carboxin-Resistenzkassette; hyg^R, Hygromycin-Resistenzkassette; nat^R, Nourseothricin-Resistenzkassette;

Tabelle 6: In dieser Arbeit hergestellte Stämme

Stamm	Genotyp	Resistenz	Ausgangsstamm
FB1_Peb1YFP	<i>a1b1peb1yfp,ble^R</i>	B	FB1
AB33_EB1YFP	<i>a2b2 Pnar1:bW2,bE1, peb1-yfp, ble^R nat^R</i>	B,N	AB33
AB33Peb1YFPHIS4CFP	<i>a2b2 Pnar1:bW2,bE1, peb1-yfp, ble^Rnat^R /pHIS4CFP</i>	B,N,C	AB33Peb1YFP
AB33GFPTub1-Peb1RFP	<i>a2b2 Pnar1:bW2,bE1, peb1-rfp, ble^Rnat^R /potefGFPTub1</i>		
AB33 Δ kin2	<i>a2b2 Pnar1:bW2,bE1,ble^R Δkin2;;hyg^R</i>	B,H	AB33
AB33 Δ kin2rkin3	<i>a2b2 Pnar1:bW2,bE1,ble^R Δkin2;;hyg^R, Pcrgkin3, nat^R</i>	B,H,N	AB33 Δ kin2
AB33 Δ myoV	<i>a2b2 Pnar1:bW2,bE1,ble^R ΔmyoV;;hyg^R</i>	B,H	AB33
AB33 Δ kin2 YUP1GFP	<i>a2b2 Pnar1:bW2,bE1,ble^R Δkin2;;hyg^R /potefYup1GFP</i>	B,H,C	AB33 Δ kin2
AB33 Δ kin2rkin3YUP1GFP	<i>a2b2 Pnar1:bW2,bE1,ble^R Δkin2;;hyg^R, Pcrgkin3,nat^R /potefYup1GFP</i>	B,H,N,C	AB33 Δ kin2rkin3
AB332RFPTub1GFP ₃ MyoV	<i>a2 Pnar1bW2,bE1,ble^R / potefRFP₂Tub1,hyg^R/pGFP₃myoV</i>	B,H,C	AB332RFPTub1
AB33 Δ kin2otefGFPTub1	<i>a2b2 Pnar1:bW2,bE1,ble^R Δkin2;;hyg^R /potefGFPTub1</i>	B,H,C	AB33 Δ kin2
AB33 Δ kin2rKin3otefGFPTub1	<i>a2b2 Pnar1:bW2,bE1,ble^R Δkin2;;hyg^R /potefGFPTub1</i>	B,H,N,C	AB33 Δ kin2rkin3
AB33 Δ kin2wtp3GFPMyoV	<i>a2 Pnar1bW2,bE1,ble^R Δkin2;;hyg^R</i>	B,H,C	AB33 Δ kin2

Stamm	Genotyp	Resistenz	Ausgangsstamm
	/pGFP ₃ -myoV		
FB2ΔmyoVrKin2	<i>a2b2 ΔmyoV;;hyg^R Pcrkin2,nat^R</i>	H,N	FB2Δmyo5
AB33GFP ₃ Kin2	<i>a2 Pnar1bW2,bE1,ble^R /pGFP₃Kin2</i>	B,C	AB33
AB33Δkin2Peb1YFP	<i>a2b2 Pnar1:bW2,bE1,ble^R Δkin2;;hyg^R peb1-yfp,nat^R</i>	B,H,N	AB33Δkin2
AB33Δkin3Peb1YFP	<i>a2b2 Pnar1:bW2,bE1,ble^R Δkin3;;hyg^R peb1-yfp,nat^R</i>	B,H,N	AB33Δkin3
AB33Δkin3otefGFPTub1	<i>a2 Pnar1bW2,bE1,ble^R Δkin3;;hyg^R /potefGFPTub1</i>	B,H,C	AB33Δkin3
AB33Δmyo5rKin2	<i>a2b2 Pnar1:bW2,bE1,ble ΔmyoV;;hyg^R Pcrkin2,nat^R</i>	B,H,N	AB33Δmyo5
FB1Dyn2tsYup1GFP	<i>a1b1 dyn2:: dyn2^{ts}, nat^R /potefYup1GFP</i>	N,C	FB2Dyn2ts
AB33rDyn1Yup1GFP	<i>a2b2 Pnar1:bW2,bE1,ble^R Pcrdyn1,nat^R /potefYup1GFP</i>	B,N,C	AB33Yup1GFP
AB33GFP ₃ Dyn2	<i>a2 Pnar1:bW2,bE1, 3xgfp-dyn2, ble^R, hyg^R</i>	B,H	AB33
AB33Δkin2GFP ₃ Dyn2	<i>a2b2 Pnar1:bW2,bE1 Δkin2;;hyg^R 3xgfpdyn2dyn2,ble^R, nat^R</i>	B,H,N	AB33Δkin2
AB33Δmyo5GFP ₃ Kin2	<i>a2b2 Pnar1:bW2,bE1,ble^R ΔmyoV;;hyg^R /pGFP₃Kin2</i>	B,H,C	AB33Δmyo5
AB33GFP ₃ Dyn2RFPTub1	<i>a2b2 Pnar1:bW2,bE1 3xgfp-dyn2, ble^R, nat^R /potefRFP₂Yup1</i>	B,N,C	AB33GFP ₃ Dyn2
AB33Δkin2GFP ₃ Dyn2RFPTub1	<i>a2b2 Pnar1:bW2,bE1 Δkin2;;hyg^R 3xgfp-dyn2, ble^R, nat^R /potefRFPTub1</i>	B,H,N,C	AB33Δkin2GFP ₃ Dyn2
AB33GFP ₃ Dyn2_RFP ₂ Yup1	<i>a2b2 Pnar1:bW2,bE1 3xgfp-dyn2, hyg^R, ble^R /potefRFP₂Yup1</i>	B, H, C	AB33GFP ₃ Dyn2
AB33rKin2 ^{G96E} Yup1GFP	<i>a2 Pnar1:bW2 PnarbE1 ble^R /pcrgKin2^{G96E} /potefYup1GFP</i>	B,H,C	AB33rYFPKin2 ³³⁶⁻⁹⁶⁸
AB33rKin3Yup1GFP	<i>a2b2 Pnar1:bW2,bE1 Pcrkin3,ble^R,nat^R /potefYup1GFP</i>	B,N,C	AB33Yup1GFP
FB2Δkin1*	<i>a2b2Δkin1;;hyg^R</i>	B,H	FB2
FB2Δkin4*	<i>a2b2Δkin6;;hyg^R</i>	B,H	FB2
FB2Δkin9*	<i>a2b2Δkin8;;nat^R</i>	N	FB2
FB2rKin7*	<i>a2b2, Pcrkin13 nat^R</i>	N	FB2
FB2Δkin8*	<i>a2b2Δkin1;;nat^R</i>	N	FB2
FB2Δkin1Δkin9*	<i>a2b2Δkin1;;hyg^R Δkin8;;nat^R</i>	H,N	FB2Δkin9
AB33Δkin1*	<i>a2b2 Pnar1:bW2,bE1,ble^R Δkin1;;hyg^R</i>	B,H	AB33
AB33Δkin3*	<i>a2b2 Pnar1:bW2,bE1,ble^R Δkin3;;hyg^R</i>	B,H	AB33
AB33Δkin6*	<i>a2b2 Pnar1:bW2,bE1,ble^R Δkin6;;hyg^R</i>	B,H	AB33
AB33rKin7*	<i>a2 Pnar1:bW2 PnarbE1 Pcrkin13 nat^R, ble^R</i>	B,N	AB33

AB33 Δ kin9*	<i>a2b2 Pnar1:bW2,bE1,ble^R ΔKin9;;nat^R</i>	B,N	AB33
Stamm	Genotyp	Resistenz	Ausgangsstamm
AB33 Δ kin8*	<i>a2b2 Pnar1:bW2,bE1,ble^R ΔKin8;;nat^R</i>	B,N	AB33
AB33 Δ kin1 Δ kin9*	<i>a2b2 Pnar1:bW2,bE1,ble^R ΔKin1;;hyg^R ΔKin9;;nat^R</i>	B,H,N	AB33 Δ kin1

Resistenz: C, Carboxin; B, Phleomycin; H, Hygromycin; N, Nourseothricin
 Δ , Deletion des nachfolgenden Gens; /, ektopische Integration des nachfolgenden Plasmids; ;;, homologer Austausch; P, Promotor, -Fusion; ble^R, Phleomycin-Resistenzkassette; cbx^R, Carboxin-Resistenzkassette; hyg^R, Hygromycin-Resistenzkassette; nat^R, Nourseothricin-Resistenzkassette; *, die Stämme entstanden in Zusammenarbeit mit Daniela Aßmann.

Sämtliche Transformanten wurden durch Southern-Analyse bestätigt, mit Ausnahme der Stämme, in die ektopisch potefYup1GFP oder potefGFPTub1 transformiert wurde. In fast allen Fällen wurden mindestens zwei unabhängige Transformanten hergestellt und für die weiteren Experimente hergenommen.

4.2 Mikrobiologische, genetische und zellbiologische Methoden

4.2.1 Escherichia coli

4.2.1.1 Kultivierung von *E. coli*

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

E. coli-Stämme wurden entweder als Schüttelkulturen bei 200 Upm oder auf Festmedien unter aeroben Bedingungen bei 37°C kultiviert. Übernachtskulturen wurden von YT-Amp Festmedien angeimpft. Glycerinkulturen wurden in Reaktionsgefäßen durch Mischung einer exponentiell wachsenden Kultur 1:1 mit dYT-Glycerin angesetzt und bei -80°C gelagert. Glycerinkulturen wurden vor weiteren Arbeiten zuerst auf YT-Amp Festmedien ausgestrichen.

YT-Festmedium (Sambrook 1989) :

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

LB-Medium (Sambrook 1989):

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

dYT-Medium (Sambrook 1989):

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

dYT-Glycerin (Sambrook 1989):

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

4.2.1.2 Bestimmung der Zelldichte bei *E. coli*

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

4.2.1.3 RbCl Transformation von *E. coli*

Dieses Protokoll ist modifiziert nach (Cohen et al., 1972). Zur Herstellung transformationskompetenter Bakterienzellen wurden 100 ml LB-Medium, dem 10 mM MgCl₂ und 10 mM MgSO₄ zugesetzt waren, mit 1 ml einer frischen DH5α-Übernachtskultur angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ ≈ 0,5 bei 37°C und 200 Upm inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation für 15 min bei 3.000 Upm und 4°C (Heraeus Varifuge 3.0R) pelletiert und in 33 ml eiskalter RF1-Lösung resuspendiert. Nach 30 bis 60 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen erneut abzentrifugiert (15 min, 3.000 Upm, 4°C, Heraeus Varifuge 3.0R), der Überstand abgenommen, die Zellen in 5 ml eiskalter RF2-Lösung resuspendiert und 15 min inkubiert. Die Zellsuspension wurde zu je 100 µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Zur Transformation wurden die Zellen auf Eis aufgetaut, jeweils 50 µl mit bis zu 10 µl Plasmidlösung (1-5 ng DNA) bzw. Ligationsansatz versetzt und 45 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock von 1 min bei 42°C wurde der Transformationsansatz zur Expression der durch das eingebrachte Plasmid vermittelten Antibiotikaresistenz mit 500 µl dYT-Medium versetzt und 30 min bei 37°C horizontal mit 200 Upm geschüttelt. Anschließend wurde 1 min bei 5000 Upm pelletiert, 400 µl des Überstandes abgenommen und die Zellen in der restlichen Flüssigkeit resuspendiert, auf YT-Platten mit 100 µg/ml Ampicillin ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Auf diese Weise konnte eine Transformationsrate von 10⁶ Transformanten pro 1 µg eingesetzter Plasmid-DNA erreicht werden

RF1-Lösung

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

RF2-Lösung

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

4.2.2 Ustilago maydis**4.2.2.1 Kultivierung von *U. maydis***

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

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

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

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

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

Salz-Lösung (Holliday, 1974):

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

Spurenelement-Lösung (Holliday, 1974) :

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

NM Nitrat-Minimalmedium (Holliday, 1974):

3 g KNO_3
62,5 ml Salz-Lösung (siehe unten)
mit H_2O auf 980 ml aufgefüllt
mit NaOH auf pH 7,0 eingestellt und autoklaviert
nach dem Autoklavieren:
20 ml 50% (w/v) Glucose-Lösung zugesetzt (f. c. 1%)

AM Ammonium-Minimalmedium(Holliday, 1974):

3 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
62,5 ml Salz-Lösung (siehe unten)
mit H_2O auf 980 ml aufgefüllt
mit NaOH auf pH 7,0 eingestellt und autoklaviert
nach dem Autoklavieren:
20 ml 50% (w/v) Glucose-Lösung zugesetzt (f. c. 1%)

Vitamin-Lösung (Holliday, 1974):

100 mg Thiamin
50 mg Riboflavin
50 mg Pyridoxin
200 mg Kalziumpanthothenat
500 mg p-Aminobenzoesäure
200 mg Nikotinsäure
200 mg Cholinchlorid
1000mg myo-Inositol
mit H_2O auf 1 l aufgefüllt und sterilfiltriert

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

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

4.2.2.2 Induktion regulierbarer Promotoren in *U. maydis*

Die Stämme wurden aus Vorkulturen in CM-Flüssigmedium angeimpft das repräsentierende Bedingungen bot (im Falle des *narI*-Promotors Ammonium-Ionen (AM oder CM) als einzige Stickstoffquelle, im Falle des *crgI*-Promotors Glucose als einzige Kohlenstoffquelle) und bis zu $\text{OD}_{600} \approx 0,5$ bei 28°C und 200 Upm inkubiert. Die Zellen wurden in PP-Röhrchen überführt, abzentrifugiert (3.000 Upm, 5 min, RT, Biofuge Stratos) und im Falle des *narI*-Promotors zweimal mit ddH_2O gewaschen. Anschließend wurden die Zellen im gleichen Volumen frischen Mediums mit den induzierenden Bedingungen resuspendiert, in Schikanekolben überführt und für die gewünschte Zeit bei 28°C inkubiert. Induzierende Bedingungen sind im Falle des *narI*-Promotors Nitrat-Ionen (NM) als einzige Stickstoffquelle, im Falle des *crgI*-Promotors Arabinose als einzige Kohlenstoffquelle.

4.2.2.3 Transformation von *U.maydis*

Dieses Protokoll ist modifiziert nach (Schulz et al., 1990) und (Gillissen et al., 1992). Von einer auf Platte wachsenden Kultur wurde eine 4 ml YEPS-Flüssigkultur angesetzt und für 8-10 h bei 28°C geschüttelt. Diese Vorkultur wurde anschließend 1/300 in 50 ml frischem YEPS_L-Medium verdünnt und bei 28°C bis zu einer Zelldichte von $1-2 \times 10^7$ Zellen/ml (bis maximal OD₆₀₀ = 1,0) geschüttelt. Nach Erreichen des optimalen Zelltiters wurden die Zellen durch Zentrifugieren (3.200 Upm, 10 min, 4°C, Heraeus Varifuge 3.0R) geerntet, einmal mit 25 ml SCS gewaschen und in 2 ml SCS mit 2,5 bis 5 mg/ml Novozym resuspendiert. Die in diesem Puffer bei Raumtemperatur ablaufende Protoplastierung kann mikroskopisch verfolgt werden, da die zigarrenförmigen Zellen nach Lyse der Zellwand eine kugelige Form einnehmen. Nach vollständiger Protoplastierung (5-15 min) wurden 10 ml SCS zugegeben und die Protoplasten durch 10minütige Zentrifugation bei 2.300 Upm (4°C, Heraeus Varifuge 3.0R) pelletiert. Um das Novozym vollständig zu entfernen, wurde dieser Waschgang dreimal wiederholt. Anschließend wurde mit 10 ml STC gewaschen und das Pellet danach in einem Volumen von 0,5 ml eiskaltem STC aufgenommen. Die so behandelten Protoplasten können 3-4 h auf Eis oder aliquotiert bei -80°C mehrere Monate aufbewahrt werden.

Zur integrativen Transformation wurden 50 µl Protoplasten mit 1-5 µl linearisierter Plasmid-DNA (ca. 5 µg) und 1 µl Heparin-Lösung für 10 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 0,5 ml STC/PEG folgte eine weitere Inkubation von 15 min auf Eis. Anschließend wurde der gesamte Transformationsansatz auf einer kurz zuvor mit Top-Agar überschichteten Regenerationsagarplatte ausgestrichen. Nach 2 bis 5 Tagen Inkubation bei 28°C wurden die gewachsenen Kolonien mit sterilen Pipettenspitzen auf Antibiotikum-haltigen CM-Platten, vereinzelt. Potentielle Transformanten wurden mittels Ganz-Zell-PCR vorselektiert und abschließend durch Southern-Blot Analyse verifiziert

SCS:

20 mM Na-Citrat, pH 5,8
1 M Sorbitol
in H₂O_{bid.}, sterilfiltriert

STC:

10 mM Tris-Cl, pH 7,5
100 mM CaCl₂
1 M Sorbitol
in H₂O_{bid.}, sterilfiltriert

STC/PEG:

15 ml STC
10 g PEG4000

Regenerationsagar (Schulz et al., 1990)

a) Top-Agar:

1,5% (w/v) Bacto-Agar
1 M Sorbitol
in YEPS-Medium (Tsukuda et al., 1988)

b) Bottom-Agar:

wie a), zusätzlich doppelt konzentriertes
Antibiotikum

CM-Regenerationsagar

a) Top-Agar:

1,5% (w/v) Bacto-Agar
1 M Sorbitol
in CM-Medium (Holliday et al., 1974) mit 2%
Glucose oder 2% Arabinose

b) Bottom-Agar:

wie a), zusätzlich doppelt konzentriertes
Antibiotikum

4.2.2.4 Pheromonstimulation in Flüssigkultur

Die zu testenden Stämme wurden in CM-Glucose bis zu einer $OD_{600} = 0,6$ angezogen. Jeweils 500 μ l Kultur wurde in ein 2ml Eppendorf-Gefäß überführt und kompatibles Pheromon in DMSO in einer Endkonzentration von 1 μ g/ml oder nur DMSO zugeben. Wenn nicht anders beschrieben wurden die Ansätze bei 20°C auf einem Drehrad oder horizontal schüttelnd bei 200 Upm für 6-8 h inkubiert.

4.2.2.5 Wirkung von Benomyl auf das Wachstum

Die zu untersuchenden Stämme FB2 und AB33 wurden in CM-Flüssigmedium bis zu einer $OD_{600}=0,6$ angezogen. 500 μ l der wachsenden Kultur wurden in 2ml Eppendorfgefäße überführt. Der in DMSO gelöste Mikrotubuli-Inhibitor Benomyl wurde in verschiedenen Konzentrationen zu den wachsenden Zellen gegeben. Im Falle der Untersuchung der Wirkung auf das Konjugationshyphen- und Hyphenwachstum wurden FB2 Zellen zunächst für 1.5h mit dem synthetischen Pheromon a1 bzw. AB33 für 2.5h in NMglu inkubiert bevor Benomyl zugegeben wurde. Anschließend wurden die Zellen für 5h-8h auf dem Drehrad oder horizontal schüttelnd bei 200Upm geschüttelt.

4.2.2.6 Wirkung von Latrunculin A auf das Wachstum

Die zu untersuchenden Stämme FB2 und AB33 wurden in CM-Flüssigmedium bis zu einer $OD_{600}=0,6$ angezogen. 500 μ l der wachsenden Kultur wurden in 2ml Eppendorfgefäße überführt. Der in DMSO gelöste Aktin-Inhibitor LatrunculinA (LatA) wurde in verschiedenen Konzentrationen zu den wachsenden Zellen gegeben. Im Falle der Untersuchung der Wirkung auf das Konjugationshyphen- und Hyphenwachstum wurden FB2 Zellen zunächst für 1.5h mit dem synthetischen Pheromon a1 bzw. AB33 für 2.5h in NMglu inkubiert bevor LatA zugegeben wurde. Anschließend wurden die Zellen für 5h-8h auf dem Drehrad oder horizontal schüttelnd bei 200Upm geschüttelt.

4.2.2.7 Mikroskopie und Bildverarbeitung

Für die *in vivo* von *U. maydis*-Zellen wurde 1 μ l einer logarithmisch wachsenden Kultur auf einen Objektträger getropft auf dem sich eine hauchdünne Agarschicht in Größe eines Deckglasdurchmessers befand und sofort mit einem Zeiss Axioplan II Mikroskop betrachtet. Für DIC-Mikroskopie und Fluoreszenz-Mikroskopie wurde ein 100faches Plan-Apochromat Objektiv (Zeiss) verwendet. Für die Fluoreszenz-Mikroskopie wurden Filter mit folgendem Anregungs- und Emissionsspektrum eingesetzt: Rhodamin, 546 nm und >590 nm; GFP; 450-490 nm und 515-565 nm; YFP, 500-520 nm und 535-550 nm; CFP, 390-420 nm und >450 nm. Parallele Aufnahmen von GFP/RFP-Sequenzen wurden mit Hilfe eines Filterrads (Ludl electronics) aufgenommen, welches mit speziellen Anregungsfiltern GFP:BP 480/25 und DsRed BP 565/25 und einem "dual band mirror" eGFP: FT 480, BP 503-545; DsRed: FT 565, BP 591-647 (AF-Analysetechnik) ausgerüstet ist.

Bilder wurden mit gekühlten CCD-Kameras (C4742-25, Hamamatsu und CoolSNAP-HQ, Photometrics) aufgenommen, die von den Programmen ImageProPlus (Media Cybernetics) bzw. MetaMorph (Universal Imaging) gesteuert wurden. Nachbearbeitung aller Aufnahmen (Bildausschnitt, Kontrastverstärkung, Maßstabskalierung) erfolgte ebenfalls mit ImageProPlus und MetaMorph. Die Zusammenstellung und Bearbeitung der Abbildungen wurden mit Photoshop 6.0 (Adobe) und Corel Draw 9.0 (Corel) durchgeführt. Berechnungen und statistische Analysen erfolgten mit Excel (Microsoft) und Prism (GraphPad).

Zweidimensionale Deconvolution und Z-Achsen-Projektionen wurden mit MetaMorph durchgeführt. Für die Z-Achsen-Projektion wurden Einzelbilder im 100 nm Abständen mit einer Cool-SNAP CCD Kamera und einem PiEFOC Piezo, mit elektronisch gesteuerter Fokussierung (Physik Instrumente), beides angesteuert durch MetaMorph.

Peb1YFP-Signal Zählung: Für die quantitative Analyse der Peb1YFP-Signale innerhalb der Hyphe wurden 50 Bilder mit einer Aufnahmezeit von 1500ms über einem Bereich von 30µm Länge aufgenommen. Die Belichtungsintensität der Fluoreszenzlampe wurde während der Aufnahmen von 50% Schrittweise auf 100% erhöht um ein Ausbleichen der Signale zu verhindern.

Endosomenmessung: Die Anzahl der sich bidirektional bewegendes Yup1GFP-markierten frühen Endosomen wurde 10µm hinter der Hyphenspitze (und in der Mitte von Mutterzellen von Sporidien mit mittlerer Knospengröße) gezählt. Dazu wurden Sequenzen von 40 Bildern mit einer Belichtungszeit von 700ms aufgenommen. Die Anzahl der sich anterograd und retrograd bewegendes Endosomen wurde über die gesamte Länge der Sequenz bestimmt.

4.2.2.8 Invertase-Assay

Die Methode zur Bestimmung sekretierter Invertase ist modifiziert nach (Steinberg et al., 1998)

Dazu wurden *U. maydis* Zellen bei 28°C in YEPD_{high}-Flüssigmedium bis zu einer OD₆₀₀<1 inkubiert. Die Zellen wurden bei 3000Upm 1min abzentrifugiert (Biofuge Pico), und anschließend noch zweimal mit ddH₂O gewaschen. Die OD₆₀₀ wurde mit ddH₂O auf 1.0-1.1 eingestellt.

Anschließend wurden noch 10 ml YEPD zugegeben und die Zellen dann für 3h bei 30°C und 200Upm geschüttelt. Danach wurde die OD₆₀₀ mit ddH₂O (28°C erwärmt) auf 1.0 eingestellt. Als Nullwert diente reines YEPD-Medium. Für die Reaktion wurden 125µl der Zellen mit 250µl 0,2M Na-Acetat (pH4.0, 28°C erwärmt) und 125µl 0,5M Saccharose (28°C erwärmt) gemischt und über Nacht bei 30°C auf einem Schüttler (200Upm) inkubiert. Als Nullwert für die Reaktion wurden 150µl der Zellkultur bei 13000Upm für 1min abzentrifugiert und 125 µl des Überstandes für 4 min bei 100°C gekocht um die Enzyme abzutöten. Diese 125µl wurden dann mit 250µl 0,2M Na-Acetat und 125µl 0,5M Saccharose gemischt, und genauso behandelt wie der Reaktionsansatz. Die Zellen werden bei 13000Upm für 1min pelletiert und 250µl des Überstandes mit 250µl 0,5M KPO₄-Puffer gemischt, um die Reaktion zu stoppen. Anschließend wird der Ansatz noch mal bei 100°C für 4min gekocht. Zum Nachweis der Enzymaktivität im Überstand wird der Umsatz von Saccharose zu Glukose mit einem Glucose-Kit (HUMAN-“Glucose liquicolor”) gemessen. 10µl der Probe wurden mit 1000µl Enzymreagenz gemischt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Glukosekonzentration in der Probe photometrisch bei 500nm gemessen.

YEPD-Medium

10g Yeast-Extrakt
20g Pepton
mit H₂O auf 1000ml aufgefüllt
nach dem Autoklavieren Glukose zugeben
high: +60ml 50%Glukose (f.c.3%)

4.2.2.9 Saure Phosphatase Assay

Die Methode zur Bestimmung sekretierter saurer Phosphatase ist modifiziert nach (Steinberg et al., 1998). Dazu wurden *U. maydis* Zellen bei 28°C in CM-Flüssigmedium bis zu einer OD₆₀₀=0,6 geschüttelt. Diese Zellen wurden bei 3000Upm 3min (Biofuge Stratos) abzentrifugiert und in Minimal-Medium 1mMKPO₄ resuspendiert, und über Nacht bei 30°C und 200Upm geschüttelt. Danach wurden die Zellen abzentrifugiert (3000Upm, 2 min) und in Minimal-Medium ohne Phosphat mit 5% Glucose auf OD₅₉₅=1 eingestellt. In diesem Medium wurde die Kultur für 1.5h bei 30°C inkubiert. In der anschließenden Reaktion sollte der Umsatz von p-nitriphenylphosphat zu Nitrophenon gemessen werden, welches als gelber Niederschlag bei OD₄₀₅ gemessen werden kann. 100 µl der Zellkultur wurden mit 400µl p-nitrophenylphosphat (SIGMA) in einem 2ml Eppendorfgefäß gemischt und bei 30°C für 3h auf dem Schüttler (200Upm) inkubiert. Für den Nullwert wurden 150µl Zellen abzentrifugiert (1400, 2min Biofuge pico) und 100µl Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Dieses wurde für 4 min bei 100°C gekocht und anschließend mit 400µl p-nitrophenylphosphat versetzt und behandelt wie der Reaktionsansatz. Die Ansätze wurden abzentrifugiert (1400, 2min) und die Reaktion durch Mischen von 300µl Reaktionsüberstand und 300µl 500mM KPO₄-Puffer pH 11.0 gestoppt. Die Aktivität der sauren Phosphatase wurde dann anhand des gebildeten Produkts bei OD₄₀₅ gemessen.

4.3 Molekularbiologische Standardmethoden

4.3.1 Isolierung von Nukleinsäuren

4.3.1.1 Minipräparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Isolierung erfolgte durch "Lyse durch Kochen" nach (Sambrook et al., 1989). 1,5 ml einer *E. coli*-Übernachtskultur wurden pelletiert (13.000 Upm, 30 sec, RT, Heraeus Biofuge). Das Zellpellet wurde in 350 µl STET-Puffer resuspendiert, nach Zugabe von 25 µl Lysozym/RNase-Lösung geschüttelt und anschließend 50 sec bei 95°C in einem Eppendorf-Heizblock inkubiert. Die lysierten Zellen und die denaturierte genomische DNA wurden 15 min bei 13.000 Upm abzentrifugiert (Heraeus Biofuge) und danach

mit einem sterilen Zahnstocher aus der wässrigen Plasmid-Lösung entfernt. Die Reinigung der Plasmid-DNA erfolgte durch Fällung mit 45 µl 3 M Na-Acetat, pH 5,3 und 420 µl Isopropanol bei RT für 5 min und anschließender Zentrifugation für 10 min bei 13.000 Upm (Heraeus Biofuge). Das Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen und nach Trocknen in 50 µl TE-Puffer aufgenommen.

STET-Puffer

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

TE-Puffer

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

Lysozym/RNase-Lösung

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

4.3.1.2 Maxipräparation von Plasmid-DNA aus E. coli

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

MAXI Lösung II:

0,2 M NaOH
 1 % SDS
 in ddH₂O

MAXI Lösung III:

3 M KAc, pH 4,8
 in ddH₂O

TE-Puffer:

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

4.3.1.3 DNA-Isolierung aus *U. maydis*

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

***Ustilago*-Lysispuffer**

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

TE-Phenol/Chloroform

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

4.3.1.4 RNA-Isolierung aus Flüssigkulturen

Die Isolierung von Gesamt-RNA erfolgte mit dem [®]Trizol Reagent (Invitrogen). Dazu werden 10-20 ml einer *U.maydis* Übernachtskultur pelletiert (3000Upm, 3min Biofuge Stratos) und in flüssigem Stickstoff gefroren. Das gefrorene Pellet wird in 1 ml Trizol resuspendiert, und in ein 2ml Eppendorfgefäß überführt dazu werden ca. 0,3 g Glasperlen (150-212 microns; Sigma) gegeben. Die Proben werden in einen Kunststoffeinsatz für die Schwingmühle (MM200; Retsch) gestellt, und 5 min bei maximaler Geschwindigkeit aufgeschlossen. Anschließend wurden die Proben mit 200µl Chloroform versetzt und gemischt. Danach wurde für 15 min bei 11000Upm und 4°C zentrifugiert (Biofuge, Stratos) und der wässrige Überstand in ein neues RNase-freies Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die RNA wird durch Zugabe von 500µl 2-Propanol für 15 min bei Raumtemperatur gefällt und anschließend bei 11000Upm für 10 min pelletiert. Nach dem Waschen mit 500µl 70% igem Ethanol wird das Pellet für 20 min bei Raumtemperatur getrocknet und in 50 µl RNase-freiem Wasser (Ambion) resuspendiert (10 min, 55°C). Die RNA wurde bei -80°C gelagert. Zur Kontrolle und Konzentrationsabschätzung wurde 1µl auf einem 1%igen TBE-Agarosegel analysiert und bei 260 nm gemessen.

4.3.2 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde photometrisch bestimmt. Bei einer Schichtdicke von 1 cm entspricht $OD_{260} = 1$ einer Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ doppelsträngiger DNA, 33 $\mu\text{g/ml}$ einzelsträngiger DNA, bzw. 40 $\mu\text{g/ml}$ RNA. Als Maß für die Reinheit der Desoxyribonukleinsäuren diente der Quotient aus OD_{260} zu OD_{280} . Für reine DNA und RNA sollte er bei etwa 1,8 liegen. Niedrigere Werte weisen auf Verunreinigungen mit Proteinen hin, höhere Werte auf Verunreinigungen mit Salzen oder Zuckern. Die Messungen erfolgten in einem Lambda Bio UV-Spektralphotometer (Perkin Elmer).

4.3.3 In vitro Modifikationen von Nukleinsäuren

4.3.3.1 Restriktionsspaltungen

Restriktionsendonukleasen des Typs II erkennen spezifische DNA-Sequenzen und schneiden die DNA innerhalb dieser Bereiche. Diese Erkennungssequenzen sind zumeist palindromisch und zwischen 4 und 8 bp lang.

Der sequenzspezifische Verdau von Plasmid-DNA erfolgte durch Aufnahme der DNA im entsprechenden Restriktionspuffer, Zugabe von 1 bis 2 U Enzym pro μg eingesetzter DNA und Inkubation von mindestens 1 h, besser über Nacht bei der vom Hersteller angegebenen Temperatur. Die Inkubation erfolgte im Brutschrank. Bei einigen Enzymen war es notwendig BSA mit einer Endkonzentration von 100 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ zum Reaktionsansatz zu geben. Einige Restriktionsenzyme konnten durch 20 min Erhitzen auf 65°C inaktiviert werden.

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

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

AP-Reaktionspuffer (10x)

100 mM	Tris-HCl, pH 8,3
10 mM	MgCl ₂
10 mM	ZnCl ₂
in ddH ₂ O	

4.3.3.3 DNA-Fällung

Zur Anreicherung von DNA in einer Lösung oder zum Wechseln des Puffers wurde DNA gefällt. Zu der DNA-Lösung wurden 1/10 Volumen 3 M Na-Acetat, pH 4,8 und 2,5 Volumen absoluter Ethanol gegeben. Es wurde durch Invertieren gründlich gemischt und für 30 min im Kühlschrank inkubiert. Die gefällte DNA wurde abzentrifugiert (15 bis 30 min, 20000 Upm, 4°C, Biofuge Stratos), der Überstand verworfen und der Niederschlag mit 70% Ethanol gewaschen. Der leicht getrocknete DNA-Niederschlag konnte dann im gewünschten Puffer oder geringerem Volumen aufgenommen werden. Zur Erleichterung des Lösens konnte auf 55°C erwärmt werden.

4.3.3.4 Auftrennung von Nukleinsäuren im Agarose-Gel

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten wurden neutrale Gele aus Agarose verwendet. Sie erlaubten eine Trennung von Fragmenten mit einer Länge von 70 bp bis zu einer Größe von 50 kb Länge, wobei die Auflösung je nach Agarose-Konzentration etwa 0,5% der Fragmentgröße betragen kann. Als Laufpuffer und als Lösungsmittel für die Agarose wurde 1 x TAE oder 0,5 x TBE verwendet. Die DNA-Lösung wurde vor dem Auftragen mit 1/5 Volumen Auftragspuffer versetzt. Die Gelelektrophorese wurde bei analytischen TBE-Gelen mit bis zu 150 V und bei präparativen TAE-Gelen mit nicht mehr als 80 V durchgeführt. Die Färbung der DNA mit Ethidiumbromid erfolgte während der Elektrophorese durch den dem Gel zugesetzten Farbstoff. Manche Anwendungen machten eine Zugabe von 10 µl Ethidiumbromid-Lösung (Roth) zum Laufpuffer nötig. Die DNA-Banden wurden auf dem UV-Tisch durch Fluoreszenz des interkalierten Ethidiumbromids sichtbar. Als Marker wurde mit *Pst*I oder *Bst*EII restringierte λ-DNA oder die 1 kb-Leiter (New England Biolabs) verwendet.

Auftragspuffer (6x)

50% (w/v)	Saccharose
0,25% (w/v)	Bromphenolblau
10 mM	Tris-HCl, pH 7,9
1 mM	Na ₂ -EDTA
in ddH ₂ O	

TBE-Puffer (0,5 x)

50 mM	Tris-Borat, pH 7,9
1 mM	Na ₂ -EDTA
in ddH ₂ O	

TAE-Puffer (1 x)

40 mM	Tris-Acetat
1 mM	Na ₂ -EDTA
in ddH ₂ O	

4.3.3.5 Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

Die entsprechende Bande wurde auf dem UV-Tisch mit dem Skalpell markiert. Es war darauf zu achten, dass eine niedrige Strahlungsintensität eingestellt war und die Dauer der Bestrahlung der DNA möglichst kurz gehalten wurde. Die Bande wurde dann in einem möglichst geringen Agarose-Volumen ausgeschnitten und in eine abgeschnittene 1 ml-Pipettenspitze mit Filtereinsatz (Precision Tips, Biozym) überführt. Dann wurde

die Spitze in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß gesetzt und 5 min bei 8000 Upm zentrifugiert. Das Filtrat wurde mit 1/10 Volumen 3 M Na-Acetat und 2,5 Volumen Ethanol versetzt und 30 min bei -20°C inkubiert. Die DNA wurde sodann pelletiert (20.000 Upm, 30 min, 4°C , Biofuge Stratos), mit 500 μl 70%igem Ethanol gewaschen und in 10 mM Tris-HCl, pH 8,0 aufgenommen. Um das Lösen der DNA zu beschleunigen und DNasen zu inaktivieren, wurde 20 min bei 55°C und 700 Upm in einem Heizblock (Eppendorf) inkubiert

4.3.3.6 Ligation von DNA-Fragmenten

Ein Ligationsansatz enthielt die äquimolare Mischung aller restringierter und gereinigter DNA-Fragmente in einem Volumen von 8 μl . Dazu wurden 1 μl 10x Ligase-Puffer und 1 μl T4-Ligase (Roche) gegeben. Durch Auf- und Abpipettieren wurde gemischt und über Nacht bei 16°C im Wasserbad inkubiert.

Ligase-Puffer (10x)

666 mM	Tris-HCl, pH 7,5
50 mM	MgCl ₂
10 mM	ATP
10 mM	DTT

in ddH₂O

Alternativ wurde die T4-Quick-Ligase (NEB) mit entsprechendem mitgeliefertem Puffer verwendet und der Ligationsansatz 10-60 min bei Raumtemperatur inkubiert.

4.3.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

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

Die Polymerase-Kettenreaktion fand vielfältige Anwendung in dieser Arbeit. Sie ist eine sehr sensitive Nachweismethode für spezifische DNA-Sequenzen und eignet sich daher zum Durchmustern transformierter Organismen ebenso, wie für die Detektion heterologer Sequenzen mit übereinstimmenden flankierenden Bereichen. Sie wurde benutzt, um Fragmente für die Klonierung mit den entsprechenden Restriktionsschnittstellen bereitzustellen. Dafür wurden Oligonukleotide verwendet, die im 5'-Bereich nicht vollständig mit der Vorlagen-DNA übereinstimmten, sondern die Erkennungssequenz einer bestimmten Restriktionsendonuklease enthielten.

4.3.4.1 Standard-PCR-Ansätze

Ein typischer PCR-Ansatz (Innis et al., 1990) enthielt etwa 10 ng Vorlagen-DNA (Template), die beiden Oligonukleotide in einer Endkonzentration von 1 μ M, dNTPs in einer Endkonzentration von 200 μ M (d. h. je 200 μ M dATP, dCTP, dGTP und dTTP), außerdem der Reaktionspuffer mit $MgCl_2$ mit einer Endkonzentration von 1,5 mM. Standardmäßig wurden die Reaktionen in einem Volumen von 50 μ l durchgeführt, zur Vermeidung von Kontaminationen wurden Pipettenspitzen mit Filtereinsatz benutzt. Die *Taq*-Polymerase sollte erst nach dem initialen Denaturierungsschritt zugegeben werden. Für einen 50 μ l-Ansatz empfiehlt es sich, 2 U Enzym einzusetzen. PCR-Ansätze mit *Pfu*-DNA-Polymerase wurden in der Regel genauso durchgeführt, allerdings in dem entsprechenden Reaktionspuffer.

Die Reaktion erfolgte im Thermocycler (PTC 200, MJ Research). Es wurde zunächst für 3 min bei 94°C denaturiert, dann erfolgten 35 Zyklen mit jeweils 45 sec Denaturierung bei 94°C, 45 sec Annealing bei 60°C und 1 min Elongation bei 72°C, mit einer abschließenden Elongationsphase von 10 min bei 72°C. Je nach verwendeten Oligonukleotiden oder Länge des Amplifikats wurde die Hybridisierungstemperatur bzw. die Elongationszeit entsprechend angepasst.

dNTP mix

10 mM	dATP
10 mM	dCTP
10 mM	dGTP
10 mM	dTTP
in ddH ₂ O	

10x PCR-Puffer (*Taq*-DNA-Polymerase)

500 mM	DMSO
100 mM	Tris-HCl, pH 8,3
15 mM	$MgCl_2$

10xPCR-Puffer

(*Pfu*-DNA-Polymerase, Promega)

200 mM	Tris-HCl, pH 8,8
100 mM	KCl
100 mM	(NH ₄) ₂ SO ₄
20 mM	MgSO ₄
1 mg/ml	nuclease-free BSA
1%	TritonX-100

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

Zur einfachen Überprüfung von Transformanten kann man eine PCR direkt aus *U. maydis*-Zellen durchführen. Dabei wurden Einzelkolonien in 100 μ l ddH₂O resuspendiert und davon jeweils 1,5 μ l zu einem 50 μ l Reaktionsansatz gegeben. Der einzige Unterschied zu Standard-PCR-Ansätzen bestand in einer längeren initialen Denaturierungszeit (5-10 min), um ein Platzen der *U. maydis*-Zellen zu erreichen. Diese Technik hat sich als zuverlässiges Mittel zur Vorauswahl richtiger Transformanten erwiesen. Folgende Punkte sind jedoch zu beachten: (1) das Zellmaterial sollte frisch sein, idealerweise als zwei Tage alte Kolonie von einer PD-Platte, (2) es sollte nicht zuviel Material eingesetzt werden, idealerweise eine Kolonie mit einem Durchmesser von etwa 1 mm, (3) die Amplifikation von Fragmenten, die länger als 1,5 kb sind, verläuft generell relativ schlecht und nicht immer reproduzierbar, die Amplifikatlängen sollten daher zwischen 200 und 500 bp liegen, (4) die Elongationszeiten müssen für eine erfolgreiche Amplifikation gegenüber Standard-PCR-Ansätzen verdoppelt werden, und (5) kommt es immer wieder zum Ausfall einzelner Reaktionen. Aus diesem Grund wurden diese Analysen so durchgeführt, dass sich im Fall einer

erfolgreichen Transformation kein Amplifikat ergeben sollte, dagegen im Wildtyp eine Bande erkennbar war. Mit allen Klonen, die im Ansatz kein Amplifikat zeigten, wurde weitergearbeitet. Durch diese Vorgehensweise gingen potentiell richtige Transformanten, bei denen die PCR-Reaktion nicht funktioniert hatte, nicht verloren. Abschließend wurden die Transformanten durch Southern-Analyse bestätigt.

4.3.5 TOPO-TA-Klonierung von PCR-Produkten

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

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

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

4.3.6 Nachweis von Nukleinsäuren

4.3.6.1 Nachweis von Nukleinsäuren im Southern-Blot

4.3.6.1.1 Herstellung einer Digoxigenin-markierten Sonde

Sonden wurden durch Einbau von Digoxigenin-11-dUTP während der PCR markiert. Ein Ansatz enthielt 10 bis 100 pg Plasmid-DNA oder 100 ng genomische DNA, 5 µl PCR-Puffer, 5 µl PCR DIG Labeling Mix, je 20 pmol der beiden Primer und 0,5 µl *Taq*-DNA-Polymerase. Mit Reinstwasser wurde auf 50 µl aufgefüllt. Die Reaktion erfolgte im Thermocycler PTC200 (MJ Research) analog zur Standard-PCR. Das Produkt wurde über ein Agarose-Gel gereinigt.

PCR DIG Labeling Mix

2 mM	dATP
2 mM	dCTP
2 mM	dGTP
1,9 mM	dTTP
0,1mM	alkali-labile DIG-11-dUTP, pH 7,0
in ddH ₂ O	

4.3.6.1.2 Transfer und Nachweis der DNA (Southern, 1975)

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

Das Gel wurde dann in eine Schale gelegt. Sollten Fragmente größer als 10 kb transferiert werden, wurde die DNA durch kontrollierte Säurebehandlung depuriniert. Dafür wurde das Gel bei Raumtemperatur für maximal 10 min in 250 mM HCl geschüttelt. Das Gel wurde dann mit 0,4M NaOH neutralisiert, gleichzeitig wurde die DNA denaturiert. Der Transfer der DNA vom Gel auf die HybondTM-N+-Membran (Amersham Life Science) erfolgte durch einen Kapillarblot mit 0,4M NaOH als Transferlösung über Nacht. Die DNA wurde durch UV-Bestrahlung mit 1200 mJ/cm² im UV-Crosslinker auf der noch feuchten Membran fixiert, diese dann auf Whatman-Papier an der Luft getrocknet. Daraufhin wurde der Filter in eine Hybridisierungsröhre gesteckt, wobei die DNA-Seite nach innen zeigte. Dann wurde der Filter mit 10 bis 20 ml Southern-Hybridisierungspuffer bei 65°C für ca. 30 min prähybridisiert. Die Dig-markierte Sonde (ca. 10 µl des PCR-Ansatzes mit ddH₂O auf 1 ml aufgefüllt) wurde 10 min bei 99°C denaturiert, dann sofort auf Eis abgekühlt und der Hybridisierungslösung zugesetzt. Die Hybridisierung erfolgte bei 65°C über Nacht. Dann wurde zweimal für 15 min mit 50 ml Southern-Waschpuffer bei 65°C gewaschen. Zur Detektion wurde die Membran in eine Schale gelegt, langsam bei Raumtemperatur geschwenkt und mit den folgenden Lösungen inkubiert:

Zweimal 5 min in Dig-Waschpuffer.

30 min Dig2.

30 min in Antikörperlösung.

Dreimal 20 min in Dig-Waschpuffer.

5 min in Dig3.

In einem aufgeschnittenen Polyethylenschlauch wurde die Membran anschließend für 5 min mit 5 ml Chemolumineszenz-Lösung inkubiert. Dann wurde sie kurz zwischen Whatman-Papier getrocknet und in noch feuchtem Zustand luftblasenfrei in eine Plastikfolie eingeschweißt. Nach fünfminütiger Inkubation bei 37°C wurde die eingeschweißte Membran zusammen mit einem Film in eine lichtdichte Kassette überführt. Normalerweise reichten Expositionszeiten von wenigen Sekunden bis 120 min aus. Der Film wurde entwickelt.

Southern-Hybridisierungspuffer

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

Southern-Waschpuffer:

1 x SSC
 0,1% (w/v) SDS
 in ddH₂O

Dig1

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

Dig2

2% (w/v) Magermilchpulver
 in Dig1

Antikörperlösung

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

Dig-Waschpuffer

0,3% Tween-20
 in Dig1

Dig3 (frisch ansetzen)

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

Chemolumineszenz-Lösung

1:100 CPD-Star (Roche)
 in Dig3

4.3.7 Sequenz- und Strukturanalyse

Die Protein-Sequenzen der Kinesine wurden von Pubmed (URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>) oder der Kinesin-Homepage (URL: <http://www.mrc-lmb.cam.ac.uk/myosin/myosin.html>) geladen, in ClustalX (Thompson et al., 1997) verglichen und aneinander ausgerichtet. Die genomische Sequenz von *U. maydis* wurde zur Verfügung gestellt von der Bayer Crop Science AG und dem Whitehead Institut und können von der folgenden Homepage heruntergeladen werden (URL: http://www.broad.mit.edu/annotation/fungi/ustilago_maydis/).

Die Sequenzen der Kinesine von *Aspergillus nidulans* wurden von der Homepage des Whitehead Instituts (URL: <http://www.broad.mit.edu/annotation/fungi/aspergillus/>) heruntergeladen.

Phylogenetische und molekulare Evolutionsanalysen wurden mit MEGA 2.1 (Kumar et al., 2001) durchgeführt. Stammbäume wurden mit der Methode "Minimale Evolution" konstruiert. Dabei wurde ein "Nearest neighbor joining"-Baum als Startpunkt und 500 oder 1000 Bootstrap-,Replicates" verwendet.

Weitere Sequenzanalysen erfolgten mit:

SEQUENCENAVIGATOR 1.0.1 (ABI) zur Bearbeitung von Sequenzrohdaten und zum Vergleich von DNA-Sequenzen

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

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

BLAST2 (Altschul et al., 1997; Douglas, 1995; Gish and States, 1993) zur Identifikation ähnlicher Proteine oder DNA-Sequenzen in den öffentlichen Datenbanken

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

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

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

4.4 Biochemische Methoden

4.4.1 Isolierung von Proteinen

4.4.1.1 Proteinpräparation aus *U. maydis*

Gesamt-Protein aus *U. maydis* wurde normalerweise aus etwa 200 ml Flüssigkultur bei $OD_{600} \approx 0,5$ durchgeführt. Die Zellen wurden pelletiert (3.000 Upm, 10 min, 4°C, SLA-3000), in 5 ml PB1 aufgenommen und in ein 15 ml-PP-Röhrchen überführt, dann erneut abzentrifugiert (2.800 Upm, 5 min, 4°C, Biofuge Stratos), mit 2 ml PB2 gewaschen und schließlich in 1 ml PB2 aufgenommen. Diese Suspension wurde in die mit flüssigem Stickstoff vorgekühlten Metallbecher der Zelmühle überführt, in denen sich zwei kleine Metallkugeln befanden. Die Zellen wurden in der Zelmühle zweimal für 5 min bei einer Frequenz von 30 pro Sekunde geöffnet, wobei die Becher dazwischen mit flüssigem Stickstoff gekühlt wurden. Anschließend wurde gewartet, bis die Suspension aufgetaut aber noch kalt war, und in frische Eppendorf-Gefäße auf Eis pipettiert. Unlösliche Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation pelletiert (23.300 Upm, 30 min, 4°C, Biofuge Stratos), der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 6x Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95°C inkubiert. Diese Proben wurden bei -20°C gelagert.

PB1

100 mM	PIPES; pH 6,9
5 mM	MgSO ₄
1 mM	Na ₂ -EDTA
5 mM	Na ₂ -EGTA
in ddH ₂ O	

PB2

10 ml	PB1
1 Tablette	Complete Mini EDTA-free (Roche)

Probenpuffer (6x)

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

in ddH₂O

Probenpuffer (1x)

1/6 Probenpuffer in PB1

4.4.1.2 Miniproteinpräparation aus *U. maydis*

Für die Proteinisolation im kleinen Maßstab wurden *U. maydis* Zellen bis zu einer $OD_{600} < 0.8$ inokuliert. Ein Volumen von 3OD Zellen wurde pelletiert (5000Upm, 3min Biofuge Stratos) und anschließend noch einmal mit Puffer IP1 gewaschen.

Das Pellet wird in 100µl IP2 Puffer aufgenommen und mit einem Löffelchen Glasperlen versetzt. Dann in flüssigem N₂ schockfrieren und 10 min bei max. Geschwindigkeit im Vibrax-VXR Schüttler (IKA) schütteln. Diesen Schritt noch einmal wiederholen. Danach die Proteine bei 13000Upm für 5min von Zellresten trennen. Den Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführen, mit 6x Probenpuffer versetzen und für 5 min bei 95°C inkubieren. Anschließend können die Proben bei -20°C aufbewahrt werden.

IP1:

50 mM Tris-HCl, pH 8,0
150 mM NaCl
15 mM MgCl₂
1 % NP 40 (w/v)
0,01 % NaN₃
in ddH₂O

IP2:

1% Proteininhibitormix in IP1

4.4.2 Auftrennung und Nachweis von Proteinen

4.4.2.1 SDS-Gelelektrophorese von Proteinen

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

Proteingel-Laufpuffer: 25 mM Tris-Cl, pH 8,8 200 mM Glycin 0,1% (w/v) SDS in ddH ₂ O	Trenngel: 375 mM Tris-Cl, pH 8,8 5% bis 15% (w/v) Acrylamid 0,27% (w/v) Bisacrylamid 0,1% (w/v) SDS 0,1% (w/v) Ammoniumpersulfat 0,1% (v/v) TEMED in ddH ₂ O
--	---

Sammelgel: 125 mM Tris-Cl, pH 6,8 5% (w/v) Acrylamid 0,13% (w/v) Bisacrylamid 0,1% (w/v) SDS 0,1% (w/v) Ammoniumpersulfat 0,1% (v/v) TEMED in ddH ₂ O	Coomassie-Färbelösung: 0,25% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250 50% (v/v) Methanol 7,5% (v/v) Essigsäure in ddH ₂ O Entfärbe-Lösung: 7,5% (v/v) Methanol 7,5% (v/v) Essigsäure in ddH ₂ O
--	---

4.4.2.2 Transfer von Proteinen (Western-Blot)

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

Towbin-Puffer

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

4.4.2.3 Nachweis von immobilisierten Proteinen

Der immunologische Nachweis von Proteinen erfolgte mit Hilfe der an die sekundären Antikörper gekoppelten Meerrettich-Peroxidase (HRP). Dazu wurde die Nitrozellulose-Membran nach dem Blot zunächst für 1 h mit 5% Magermilchpulver in TBST geblockt. Anschließend wurde die Membran für 1 h mit dem primären Antikörper, verdünnt in TBST, inkubiert. Die Membran wurde dann zweimal mit TBST gespült, 15 min mit 200 ml TBST gewaschen, anschließend noch dreimal 5 min mit TBST gewaschen und dann für 45 min mit dem sekundären Antikörper, verdünnt in TBST mit 1% Magermilchpulver, inkubiert.

Abschließend wurde die Membran zweimal mit TBST gespült, 15 min mit 200 ml TBST gewaschen, und anschließend erneut dreimal 5 min mit PBS gewaschen. Zur Detektion wurde die ECL-Lösung frisch aus den Komponenten ECL A, B und C sowie Wasserstoffperoxid angesetzt, auf der Membran verteilt, diese nach 1 min kurz abgetrocknet, in einen Plastikbeutel gelegt, damit ein Röntgenfilm belichtet und dieser entwickelt. Je nach Signalstärke waren nach 1 sec bis 1 h Exposition deutliche Banden zu erkennen.

TBST:

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

PBS:

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

ECL A:

100 mM Tris-HCl, pH 8,0
in ddH₂O

ECL B:

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

ECL C:

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

ECL-Lösung:

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

5 Literaturverzeichnis

Adams, A. E., and Pringle, J. R. (1984). Relationship of actin and tubulin distribution to bud growth in wild-type and morphogenetic-mutant *Saccharomyces cerevisiae*, *J Cell Biol* 98, 934-45.

Akashi, T., Kanbe, T., and Tanaka, K. (1994). The role of the cytoskeleton in the polarized growth of the germ tube in *Candida albicans*, *Microbiology 140 (Pt 2)*, 271-80.

Allan, V. (1995). Membrane traffic motors, *FEBS Lett* 369, 101-6.

Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs, *Nucleic Acids Res* 25, 3389-402.

Apodaca, G. (2001). Endocytic Traffic in Polarized Epithelial Cells: Role of the Actin and Microtubule Cytoskeleton, *Traffic* 2, 149-159.

Ausubel, F. M., Brenz, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., and Struhl, K. (1987). *Current Protokols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc, USA.

Ayscough, K. R., Stryker, J., Pokala, N., Sanders, M., Crews, P., and 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.

Bananis, E., Murray, J. W., Stockert, R. J., Satir, P., and Wolkoff, A. W. (2003). Regulation of early endocytic vesicle motility and fission in a reconstituted system, *J Cell Sci* 116, 2749-61.

Bananis, E., Nath, S., Gordon, K., Satir, P., Stockert, R. J., Murray, J. W., and Wolkoff, A. W. (2004). Microtubule-dependent movement of late endocytic vesicles in vitro: requirements for Dynein and Kinesin, *Mol Biol Cell* 15, 3688-97.

Banuett, F., and Herskowitz, I. (1989). Different alleles of *Ustilago maydis* are necessary for maintenance of filamentous growth but not for meiosis, *PNAS* 86, 5878-5882.

Banuett, F., and Herskowitz, I. (2002). Bud morphogenesis and the actin and microtubule cytoskeletons during budding in the corn smut fungus, *Ustilago maydis*, *Fungal Genetics and Biology* 37, 149-170.

- Bartnicki-Garcia, S. (1973). Fundamental aspects of hyphal morphogenesis, *Microb Differ Symp Soc Gen Microbiol* 23, 245-267.
- Bartnicki-Garcia, S. (1996). The hypha: unifying thread of the fungal kingdom. In *A century of mycology.*, B. Sutton, ed. (Cambridge UK, Cambridge University Press), pp. 105-133.
- Bartnicki-Garcia, S., Bartnicki, D. D., and Gierz, G. (1995a). Determinants of fungal cell wall morphology: The vesicle supply center, *Can J Bot* 73, 372-378.
- Bartnicki-Garcia, S., Bartnicki, D. D., Gierz, G., Lopez-Franco, R., and Bracker, C. E. (1995b). Evidence that Spitzenkörper behavior determines the shape of a fungal hypha: A test of the hyphoid model, *Exp Mycol* 19, 153-159.
- Basse, C. W., and Steinberg, G. (2004). *Ustilago maydis*, model system for analysis of the molecular basis of fungal pathogenicity, *Mol Plant Pathol*, in Druck.
- Bölker, M., Genin, S., Lehmler, C., and Kahmann, R. (1995). Genetic regulation of mating and dimorphism in *Ustilago maydis*., *Can J Bot* 73, 320-325.
- Bölker, M., Urban, M., and Kahmann, R. (1992). The a mating type locus of *U. maydis* specifies cell signaling components, *Cell* 68, 441-50.
- Bottin, A., Kamper, J., and Kahmann, R. (1996). Isolation of a carbon source-regulated gene from *Ustilago maydis*, *Mol Gen Genet* 253, 342-52.
- Brachmann, A. (2001). Die frühe Infektionsphase von *Ustilago maydis*: Genregulation durch das bW/bE-Heterodimer, Fakultät für Biologie, Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- Brachmann, A., Weinzierl, G., Kamper, J., and Kahmann, R. (2001). Identification of genes in the bW/bE regulatory cascade in *Ustilago maydis*, *Mol Microbiol* 42, 1047-63.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry* 72, 248-54.
- Brady, S. T. (1995). A kinesin medley: biochemical and functional heterogeneity, *Trends Cell Biol* 5, 159-64.
- Brady, S. T., Pfister, K. K., and Bloom, G. S. (1990). A monoclonal antibody against kinesin inhibits both anterograde and retrograde fast axonal transport in squid axoplasm, *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 1061-5.

Brendza, R., Serbus, L., Saxton, W., and Duffy, J. (2002). Posterior localization of dynein and dorsal-ventral axis formation depend on kinesin in *Drosophila* oocytes, *Curr Biol* 12, 1541-1545.

Brown, S. S. (1999). Cooperation between Microtubule- and Actin-based Motor Proteins, *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 15, 63-80.

Browning, H., Hackney, D. D., and Nurse, P. (2003). Targeted movement of cell end factors in fission yeast, *Nat Cell Biol* 5, 812-8.

Browning, H., Hayles, J., Mata, J., Aveline, L., Nurse, P., and McIntosh, J. R. (2000). Tea2p is a kinesin-like protein required to generate polarized growth in fission yeast, *J Cell Biol* 151, 15-28.

Carvalho, P., Gupta, M. L., Jr., Hoyt, M. A., and Pellman, D. (2004). Cell cycle control of kinesin-mediated transport of Bik1 (CLIP-170) regulates microtubule stability and dynein activation, *Dev Cell* 6, 815-29.

Cohen, S. N., Chang, A. C., and Hsu, L. (1972). Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA, *Proc Natl Acad Sci U S A* 69, 2110-4.

Coquelle, F. M., Caspi, M., Cordelieres, F. P., Dompierre, J. P., Dujardin, D. L., Koifman, C., Martin, P., Hoogenraad, C. C., Akhmanova, A., Galjart, N., *et al.* (2002). LIS1, CLIP-170's key to the dynein/dynactin pathway, *Mol Cell Biol* 22, 3089-102.

Coue, M., Brenner, S. L., Spector, I., and Korn, E. D. (1987). Inhibition of actin polymerization by latrunculin A, *FEBS Lett* 213, 316-8.

Desai, A., and Mitchison, T. J. (1997). Microtubule polymerization dynamics, *Annu Rev Cell Dev Biol* 13, 83-117.

Douglas, S. E. (1995). DNA Strider. An inexpensive sequence analysis package for the Macintosh, *Mol Biotechnol* 3, 37-45.

Engqvist-Goldstein, A. E., and Drubin, D. G. (2003). Actin assembly and endocytosis: from yeast to mammals, *Annu Rev Cell Dev Biol* 19, 287-332.

Fuchs, U., Manns, I., and Steinberg, G. (2005). The cytoskeleton has essential roles in dimorphic transition in the plant pathogen *Ustilago maydis*, *Molecular Biology of the Cell* *accepted*.

Garcia-Muse, T., Steinberg, G., and Perez-Martin, J. (2003). Pheromone-induced G2 arrest in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*, *Eukaryot Cell* 2, 494-500.

- Gillissen, B., Bergemann, J., Sandmann, C., Schröer, B., Bölker, M., and Kahmann, R. (1992). A two-component regulatory system for self/non-self recognition in *Ustilago maydis*, *Cell* *68*, 647-657.
- Gindhart, J. G., Jr., Desai, C. J., Beushausen, S., Zinn, K., and Goldstein, L. S. (1998). Kinesin light chains are essential for axonal transport in *Drosophila*, *J Cell Biol* *141*, 443-54.
- Gish, W., and States, D. J. (1993). Identification of protein coding regions by database similarity search, *Nat Genet* *3*, 266-72.
- Goodson, H. V., Anderson, B. L., Warrick, H. M., Pon, L. A., and Spudich, J. A. (1996). Synthetic lethality screen identifies a novel yeast myosin I gene (MYO5): myosin I proteins are required for polarization of the actin cytoskeleton, *J Cell Biol* *133*, 1277-91.
- Govindan, B., Bowser, R., and Novick, P. (1995). The role of Myo2, a yeast class V myosin, in vesicular transport, *J Cell Biol* *128*, 1055-68.
- Gow, N. A. (1995a). Yeast-hyphal dimorphism. In *The Growing Fungus*, N. A. Gow, and G. M. Gadd, eds., pp. 403-422.
- Gow, N. A. R. (1995b). Tip growth and polarity. In *The growing fungus*, N. A. R. Gow, and G. M. Gadd, eds. (London ; New York, Chapman & Hall), pp. 277-299.
- Grafstein, B., and Forman, D. S. (1980). Intracellular transport in neurons, *Physiol Rev* *60*, 1167-283.
- Gross, S. P., Welte, M. A., Block, S. M., and Wieschaus, E. F. (2002). Coordination of opposite-polarity microtubule motors, *J Cell Biol* *156*, 715-24.
- Habermann, A., Schroer, T. A., Griffiths, G., and Burkhardt, J. K. (2001). Immunolocalization of cytoplasmic dynein and dynactin subunits in cultured macrophages: enrichment on early endocytic organelles, *Journal of Cell Science* *114*, 229-240.
- Hall, D. H., and Hedgecock, E. M. (1991). Kinesin-related gene *unc-104* is required for axonal transport of synaptic vesicles in *C. elegans*, *Cell* *65*, 837-47.
- Han, G., Liu, B., Zhang, J., Zuo, W., Morris, N. R., and Xiang, X. (2001). The *Aspergillus* cytoplasmic dynein heavy chain and NUDF localize to microtubule ends and affect microtubule dynamics, *Curr Biol* *11*, 719-24.
- Hanahan, D. (1985). Techniques for transformation of *Escherichia coli*. In *DNA cloning : a practical approach*, D. M. Glover, ed. (Oxford, England ; Washington, D.C., IRL Press), pp. 109-135.

- Harold, F. M. (1990). To shape a cell: an inquiry into the causes of morphogenesis of microorganisms, *Microbiol Rev* *54*, 381-431.
- Heath, I., and Heath, M. (1978). Microtubules and organelle movements in the rust fungus *Uromyces phaseoli* var. *vignae*., *Cytobiologie* *16*, 393-411.
- Heath, I. B. (1995). Integration and regulation of hyphal tip growth, *Can J Bot* *73*, S131-S139.
- Heidemann, S. R., Landers, J. M., and Hamborg, M. A. (1981). Polarity orientation of axonal microtubules, *J Cell Biol* *91*, 661-5.
- Hildebrandt, E. R., and Hoyt, M. A. (2000). Mitotic motors in *Saccharomyces cerevisiae*, *Biochim Biophys Acta* *1496*, 99-116.
- Hirokawa, N., Noda, Y., and Okada, Y. (1998). Kinesin and dynein superfamily proteins in organelle transport and cell division, *Curr Opin Cell Biol* *10*, 60-73.
- Hoffman, C. S., and Winston, F. (1987). A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*., *Gene* *57*, 267-72.
- Hollenbeck, P. J. (1996). The pattern and mechanism of mitochondrial transport in axons, *Front Biosci* *1*, d91-102.
- Holliday, R. (1974). *Ustilago maydis*. *The Handbook of Genetics* (ed.R.C. King). In, R. C. King, ed. (New York, Plenum Press).
- Horio, T., and Oakley, B. R. (2004). The role of microtubules in rapid hyphal tip growth of *Aspergillus nidulans*, *Mol Biol Cell*.
- Huang, J. D., Brady, S. T., Richards, B. W., Stenolen, D., Resau, J. H., Copeland, N. G., and Jenkins, N. A. (1999). Direct interaction of microtubule- and actin-based transport motors, *Nature* *397*, 267-70.
- Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J., and White, T. J., eds. (1990). *PCR Protocols: a guide to methods and applications*. (San Diego, USA, Academic Press).
- Inoue, S., Turgeon, B. G., Yoder, O. C., and Aist, J. R. (1998). Role of fungal dynein in hyphal growth, microtubule organization, spindle pole body motility and nuclear migration, *Journal of Cell Science* *111*, 1555-1566.

- Johnston, G. C., Prendergast, J. A., and Singer, R. A. (1991). The *Saccharomyces cerevisiae* *MYO2* gene encodes an essential myosin for vectorial transport of vesicles, *J Cell Biol* *113*, 539-51.
- Jonsdottir, G. A., and Li, R. (2004). Dynamics of yeast Myosin I: evidence for a possible role in scission of endocytic vesicles, *Curr Biol* *14*, 1604-9.
- Jordan, M. A. a. W., L. (1998). Microtubules and actin filaments: dynamic targets for cancer chemotherapy, *Current Opinion in Cell Biology* *10*, 123-130.
- Kämper, J. (2003). A PCR-based system for highly efficient generation of gene replacement mutants in *Ustilago maydis*, *Mol Genet Genomics* *akzeptiert*.
- Kämper, J., Reichmann, M., Romeis, T., Bolker, M., and Kahmann, R. (1995). Multiallelic recognition: nonself-dependent dimerization of the bE and bW homeodomain proteins in *Ustilago maydis*, *Cell* *81*, 73-83.
- Ketelaar, T., Faivre-Moskalenko, C., Esseling, J. J., de Ruijter, N. C., Grierson, C. S., Dogterom, M., and Emons, A. M. (2002). Positioning of nuclei in *Arabidopsis* root hairs: an actin-regulated process of tip growth, *Plant Cell* *14*, 2941-55.
- Klopfenstein, D. R., Holleran, E. A., and Vale, R. D. (2002). Kinesin motors and microtubule-based organelle transport in *Dictyostelium discoideum*, *J Muscle Res Cell Motil* *23*, 631-8.
- Kollmar, M., and Glockner, G. (2003). Identification and phylogenetic analysis of *Dictyostelium discoideum* kinesin proteins, *BMC Genomics* *4*, 47.
- Konzack, S., Rischitor, P. E., Enke, C., and Fischer, R. (2004). The Role of the Kinesin Motor KipA in Microtubule Organization and Polarized Growth of *Aspergillus nidulans*, *Mol Biol Cell* *in press*.
- Kopecka, M., Gabriel, M., Takeo, K., Yamaguchi, M., Svoboda, A., Ohkusu, M., Hata, K., and Yoshida, S. (2001). Microtubules and actin cytoskeleton in *Cryptococcus neoformans* compared with ascomycetous budding and fission yeasts, *Eur J Cell Biol* *80*, 303-11.
- Kost, B., Lemichez, E., Spielhofer, P., Hong, Y., Tolias, K., Carpenter, C., and Chua, N. H. (1999). Rac homologues and compartmentalized phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate act in a common pathway to regulate polar pollen tube growth, *J Cell Biol* *145*, 317-30.
- Kumar, S., Tamura, K., Jakobsen, I. B., and Nei, M. (2001). MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software, *Bioinformatics* *17*, 1244-5.

- Kuznetsov, S. A., Langford, G. M., and Weiss, D. G. (1992). Actin-dependent organelle movement in squid axoplasm, *Nature* 356, 722-5.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227, 680-5.
- Langford, G. M. (2002). Myosin-V, a versatile motor for short-range vesicle transport, *Traffic* 3, 859-65.
- Lawrence, C. J., Dawe, R. K., Christie, K. R., Cleveland, D. W., Dawson, S. C., Endow, S. A., Goldstein, L. S., Goodson, H. V., Hirokawa, N., Howard, J., *et al.* (2004). A standardized kinesin nomenclature, *J Cell Biol* 167, 19-22.
- LeBeux, Y. J., and Willemot, J. (1975). An ultrastructural study of the microfilaments in rat brain by means of heavy meromyosin labeling. I. The perikaryon, the dendrites and the axon, *Cell Tissue Res* 160, 1-36.
- Lee, W. L., Oberle, J. R., and Cooper, J. A. (2003). The role of the lissencephaly protein Pac1 during nuclear migration in budding yeast, *J Cell Biol* 160, 355-64.
- Lehmlier, C., Steinberg, G., Snetselaar, K. M., Schliwa, M., Kahmann, R., and Bolker, M. (1997). Identification of a motor protein required for filamentous growth in *Ustilago maydis*, *Embo J* 16, 3464-73.
- Ligon, L. A., Tokito, M., Finklestein, J. M., Grossman, F. E., and Holzbaaur, E. L. (2004). A direct interaction between cytoplasmic dynein and kinesin I may coordinate motor activity, *J Biol Chem* 279, 19201-8.
- Lupas, A., Van Dyke, M., and Stock, J. (1991). Predicting coiled coils from protein sequences, *Science* 252, 1162-4.
- Manns, I., Aßmann, D., Straube, A., Thines, E., Schuberth, C., and Steinberg, G. (2005). Myosin-V and conventional kinesin cooperate in long-distance transport in hyphal growth of the fungus *Ustilago maydis*., submitted.
- Manns, I.; Straube, A.; Fuchs, U.; Steinberg, G.(2005) Long-distance early endosome motility requires kinesin-1-dependent microtubule plus-end targeting., eingereicht.
- Marck, C. (1988). 'DNA Strider': a 'C' program for the fast analysis of DNA and protein sequences on the Apple Macintosh family of computers, *Nucleic Acids Res* 16, 1829-36.

- Martin, M., Iyadurai, S. J., Gassman, A., Gindhart, J. G., Jr., Hays, T. S., and Saxton, W. M. (1999). Cytoplasmic dynein, the dynactin complex, and kinesin are interdependent and essential for fast axonal transport, *Mol Biol Cell* 10, 3717-28.
- McKerracher, L. J. a. H., I.B. (1987). Cytoplasmic migration and intracellular organelle movements during tip growth of fungal hyphae., *Exp Mycol* 11, 79-100.
- Miller, R. K., Heller, K. K., Frisen, L., Wallack, D. L., Loayza, D., Gammie, A. E., and Rose, M. D. (1998). The kinesin-related proteins, Kip2p and Kip3p, function differently in nuclear migration in yeast, *Mol Biol Cell* 9, 2051-68.
- Minke, P. F., Lee, I. H., and Plamann, M. (1999). Microscopic analysis of *Neurospora* roopy mutants defective in nuclear distribution., *Fungal Genet Biol* 28, 55-67.
- Munn, A. (2000). The Yeast Endocytic Membrane Transport System, *Microscopy Research and Technique* 51, 547-562.
- Murray, J. W., Bananis, E., and Wolkoff, A. W. (2002). Immunofluorescence microchamber technique for characterizing isolated organelles, *Anal Biochem* 305, 55-67.
- Musacchio, A., and Hardwick, K. G. (2002). The spindle checkpoint: structural insights into dynamic signalling, *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 731-741.
- Nangaku, M., Sato-Yoshitake, R., Okada, Y., Noda, Y., Takemura, R., Yamazaki, H., and Hirokawa, N. (1994). KIF1B, a novel microtubule plus end-directed monomeric motor protein for transport of mitochondria, *Cell* 79, 1209-20.
- Nelson, W. J. (1991). Cytoskeleton functions in membrane traffic in polarized epithelial cells, *Seminars in Cell Biology* 2, 375-385.
- Nelson, W. J. (1992). Regulation of cell surface polarity from bacteria to mammals., *Science* 258, 948-955.
- Nicholas, K. B., and Nicholas, H., B. Jr. (1997). GeneDoc: a tool for editing and annotating multiple sequence alignments.
- Oberholzer, U., Marcil, A., Leberer, E., Thomas, D. Y., and Whiteway, M. (2002). Myosin I is required for hypha formation in *Candida albicans*, *Eukaryot Cell* 1, 213-28.
- Osheroov, N., Yamashita, R. A., Chung, Y. S., and May, G. S. (1998). Structural requirements for in vivo myosin I function in *Aspergillus nidulans*, *J Biol Chem* 273, 27017-25.

Otsuka, A. J., Jeyaprakash, A., Garcia-Anoveros, J., Tang, L. Z., Fisk, G., Hartshorne, T., Franco, R., and Born, T. (1991). The *C. elegans* unc-104 gene encodes a putative kinesin heavy chain-like protein, *Neuron* 6, 113-22.

Peretti, D., Peris, L., Rosso, S., Quiroga, S., and Caceres, A. (2000). Evidence for the involvement of KIF4 in the anterograde transport of L1-containing vesicles, *J Cell Biol* 149, 141-52.

Pollock, N., de Hostos, E. L., Turck, C. W., and Vale, R. D. (1999). Reconstitution of membrane transport powered by a novel dimeric kinesin motor of the Unc104/KIF1A family purified from *Dictyostelium*, *J Cell Biol* 147, 493-506.

Pruyne, D., and Bretscher, A. (2000). Polarization of cell growth in yeast, *J Cell Sci* 113, 365-375.

Pruyne, D. W., Schott, D. H., and Bretscher, A. (1998). Tropomyosin-containing actin cables direct the Myo2p-dependent polarized delivery of secretory vesicles in budding yeast, *J Cell Biol* 143, 1931-45.

Read, E. B., Okamura, H. H., and Drubin, D. G. (1992). Actin- and tubulin-dependent functions during *Saccharomyces cerevisiae* mating projection formation, *Mol Biol Cell* 3, 429-44.

Requena, N., Alberti-Segui, C., Winzenburg, E., Horn, C., Schliwa, M., Philippsen, P., Liese, R., and Fischer, R. (2001). Genetic evidence for a microtubule-destabilizing effect of conventional kinesin and analysis of its consequences for the control of nuclear distribution in *Aspergillus nidulans*, *Mol Microbiol* 42, 121-32.

Rickard, J. E., and Kreis, T. E. (1996). CLIPs for organellemicrotubule interactions, *Trends Cell Biol* 6, 178-83.

Riquelme, M., Gierz, G., and Bartnicki-Garcia, S. (2000). Dynein and dynactin deficiencies affect the formation and function of the Spitzenkorper and distort hyphal morphogenesis of *Neurospora crassa*, *Microbiology* 146 (Pt 7), 1743-52.

Riquelme, M., Reynaga-Pena, C. G., Gierz, G., and Bartnicki-Garcia, S. (1998). What determines growth direction in fungal hyphae?, *Fungal Genet Biol* 24, 101-9.

Rogers, S. L., and Gelfand, V. I. (2000). Membrane trafficking, organelle transport, and the cytoskeleton, *Curr Opin Cell Biol* 12, 57-62.

Sambrook, J., Frisch, E. F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbour, New York, Cold Spring Harbour Laboratory Press).

- Schoch, C. L., Aist, J. R., Yoder, O. C., and Gillian Turgeon, B. (2003). A complete inventory of fungal kinesins in representative filamentous ascomycetes, *Fungal Genet Biol* 39, 1-15.
- Scholey, J. M., Porter, M. E., Grissom, P. M., and McIntosh, J. R. (1985). Identification of kinesin in sea urchin eggs, and evidence for its localization in the mitotic spindle, *Nature* 318, 483-6.
- Schott, D., Ho, J., Pruyne, D., and Bretscher, A. (1999). The COOH-terminal domain of Myo2p, a yeast myosin V, has a direct role in secretory vesicle targeting, *J Cell Biol* 147, 791-808.
- Schultz, J., Copley, R. R., Doerks, T., Ponting, C. P., and Bork, P. (2000). SMART: a web-based tool for the study of genetically mobile domains, *Nucleic Acids Res* 28, 231-4.
- Schultz, J., Milpetz, F., Bork, P., and Ponting, C. P. (1998). SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains, *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 5857-64.
- Schulz, B., Banuett, F., Dahl, M., Schlesinger, R., Schafer, W., Martin, T., Herskowitz, I., and Kahmann, R. (1990). The b alleles of *U. maydis*, whose combinations program pathogenic development, code for polypeptides containing a homeodomain-related motif, *Cell* 60, 295-306.
- Sebok, A., Nusser, N., Debreceni, B., Guo, Z., Santos, M. F., Szeberenyi, J., and Tigyi, G. (1999). Different roles for RhoA during neurite initiation, elongation, and regeneration in PC12 cells, *J Neurochem* 73, 949-60.
- Seiler, S., Nargang, F. E., Steinberg, G., and Schliwa, M. (1997). Kinesin is essential for cell morphogenesis and polarized secretion in *Neurospora crassa*, *Embo J* 16, 3025-34.
- Seiler, S., Plamann, M., and Schliwa, M. (1999). Kinesin and dynein mutants provide novel insights into the roles of vesicle traffic during cell morphogenesis in *Neurospora*, *Curr Biol* 9, 779-85.
- Sheeman, B., Carvalho, P., Sagot, I., Geiser, J., Kho, D., Hoyt, M. A., and Pellman, D. (2003). Determinants of *S. cerevisiae* dynein localization and activation: implications for the mechanism of spindle positioning, *Curr Biol* 13, 364-72.
- Snetselaar, K. M., Bolker, M., and Kahmann, R. (1996). *Ustilago maydis* mating hyphae orient their growth toward pheromone sources, *Fungal Genet Biol* 20, 299-312.
- Snetselaar, K. M., and Mims, C. W. (1992). Sporidial fusion and infection of maize seedlings by the smut fungus *Ustilago maydis*., *Mycologia* 84, 193-203.

Southern, E. M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis, *J Mol Biol* *98*, 503-17.

Spellig, T., Bolker, M., Lottspeich, F., Frank, R. W., and Kahmann, R. (1994). Pheromones trigger filamentous growth in *Ustilago maydis*, *EMBO J* *13*, 1620-7.

Stafford, P., Brown, J., and Langford, G. M. (2000). Interaction of actin- and microtubule-based motors in squid axoplasm probed with antibodies to myosin V and kinesin, *Biol Bull* *199*, 203-5.

Steinberg, G. (1998). Organelle transport and molecular motors in fungi, *Fungal Genet Biol* *24*, 161-77.

Steinberg, G., and Schliwa, M. (1995). The *Neurospora* organelle motor: a distant relative of conventional kinesin with unconventional properties, *Mol Biol Cell* *6*, 1605-18.

Steinberg, G., Schliwa, M., Lehmler, C., Bolker, M., Kahmann, R., and McIntosh, J. R. (1998). Kinesin from the plant pathogenic fungus *Ustilago maydis* is involved in vacuole formation and cytoplasmic migration, *J Cell Sci* *111 (Pt 15)*, 2235-46.

Steinberg, G., Wedlich-Soldner, R., Brill, M., and Schulz, I. (2001). Microtubules in the fungal pathogen *Ustilago maydis* are highly dynamic and determine cell polarity, *J Cell Sci* *114*, 609-22.

Straube, A., Brill, M., Oakley, B. R., Horio, T., and Steinberg, G. (2003). Microtubule organization requires cell cycle-dependent nucleation at dispersed cytoplasmic sites: polar and perinuclear microtubule organizing centers in the plant pathogen *Ustilago maydis*, *Mol Biol Cell* *14*, 642-57.

Straube, A., Enard, W., Berner, A., Wedlich-Soldner, R., Kahmann, R., and Steinberg, G. (2001). A split motor domain in a cytoplasmic dynein, *Embo J* *20*, 5091-100.

Straube, A., Weber, I., and Steinberg, G. (2005). A novel mechanism of nuclear envelope breakdown in a fungus: nuclear migration strips off the envelope, *EMBO Journal* accepted.

Tai, C. Y., Dujardin, D. L., Faulkner, N. E., and Vallee, R. B. (2002). Role of dynein, dynactin, and CLIP-170 interactions in LIS1 kinetochore function, *J Cell Biol* *156*, 959-68.

Takeshita, N., Ohta, A., and Horiuchi, H. (2002). *csmA*, a gene encoding a class V chitin synthase with a myosin motor-like domain of *Aspergillus nidulans*, is translated as a single polypeptide and regulated in response to osmotic conditions, *Biochem Biophys Res Commun* *298*, 103-9.

Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., and Higgins, D. G. (1997). The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools, *Nucleic Acids Res* 25, 4876-82.

Tsukuda, T., Carleton, S., Fotheringham, S., and Holloman, W. K. (1988). Isolation and characterization of an autonomously replicating sequence from *Ustilago maydis*, *Mol Cell Biol* 8, 3703-9.

Vale, R. D. (2003). The molecular motor toolbox for intracellular transport, *Cell* 112, 467-80.

Vale, R. D., Schnapp, B. J., Mitchison, T., Steuer, E., Reese, T. S., and Sheetz, M. P. (1985). Different axoplasmic proteins generate movement in opposite directions along microtubules in vitro, *Cell* 43, 623-32.

Valetti, C., Wetzel, D. M., Schrader, M., Hasbani, M. J., Gill, S. R., Kreis, T. E., and Schroer, T. A. (1999). Role of dynactin in endocytic traffic: effects of dynamitin overexpression and colocalization with CLIP-170, *Mol Biol Cell* 10, 4107-20.

Vargas, M. M., Aronson, J. M., and Roberson, R. W. (1993). The cytoplasmic organization of hyphal tip cells in the fungus *Allomyces macrogynus*, *Protoplasma* 176, 43-52.

Vaughan, K. T., Tynan, S. H., Faulkner, N. E., Echeverri, C. J., and Vallee, R. B. (1999). Colocalization of cytoplasmic dynein with dynactin and CLIP-170 at microtubule distal ends, *J Cell Sci* 112 (Pt 10), 1437-47.

Weber, I., Gruber, C., and Steinberg, G. (2003). A class-V myosin required for mating, hyphal growth, and pathogenicity in the dimorphic plant pathogen *Ustilago maydis*, *Plant Cell* 15, 2826-42.

Wedlich-Söldner, R. (2001) Zelluläre Rolle und molekulare Grundlagen des Endosomentransports in *Ustilago maydis*, Ludwig-Maximilians-Universität, München.

Wedlich-Söldner, R., Bölker, M., Kahmann, R., and Steinberg, G. (2000). A putative endosomal t-SNARE links exo- and endocytosis in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*, *Embo J* 19, 1974-86.

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

Wedlich-Söldner, R., Straube, A., Friedrich, M. W., and Steinberg, G. (2002b). A balance of KIF1A-like kinesin and dynein organizes early endosomes in the fungus *Ustilago maydis*, *Embo J* 21, 2946-57.

Welte, M. A. (2004). Bidirectional transport along microtubules, *Curr Biol* *14*, R525-37.

Win, T. Z., Gachet, Y., Mulvihill, D. P., May, K. M., and Hyams, J. S. (2001). Two type V myosins with non-overlapping functions in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*: Myo52 is concerned with growth polarity and cytokinesis, Myo51 is a component of the cytokinetic actin ring, *J Cell Sci* *114*, 69-79.

Woo, M., Lee, K., and Song, K. (2003). MYO2 is not essential for viability, but is required for polarized growth and dimorphic switches in *Candida albicans*, *FEMS Microbiol Lett* *218*, 195-202.

Wu, Q., Sandrock, T. M., Turgeon, B. G., Yoder, O. C., Wirsal, S. G., and Aist, J. R. (1998). A fungal kinesin required for organelle motility, hyphal growth, and morphogenesis, *Mol Biol Cell* *9*, 89-101.

Xiang, X., Osmani, A. H., Osmani, S. A., Xin, M., and Morris, N. R. (1995). *NudF*, a nuclear migration gene in *Aspergillus nidulans*, is similar to the human *LIS-1* gene required for neuronal migration, *Mol Biol Cell* *6*, 297-310.

Yen, T. J., Compton, D. A., Wise, D., Zinkowski, R. P., Brinkley, B. R., Earnshaw, W. C., and Cleveland, D. W. (1991). CENP-E, a novel human centromere-associated protein required for progression from metaphase to anaphase, *Embo J* *10*, 1245-54.

Yen, T. J., Li, G., Schaar, B. T., Szilak, I., and Cleveland, D. W. (1992). CENP-E is a putative kinetochore motor that accumulates just before mitosis, *Nature* *359*, 536-9.

Yokoyama, K., Kaji, H., Nishimura, K., and Miyaji, M. (1990). The role of microfilaments and microtubules in apical growth and dimorphism of *Candida albicans*, *J Gen Microbiol* *136 (Pt 6)*, 1067-75.

Zhang, J., Li, S., Fischer, R., and Xiang, X. (2003). Accumulation of cytoplasmic dynein and dynactin at microtubule plus ends in *Aspergillus nidulans* is kinesin dependent, *Mol Biol Cell* *14*, 1479-88.

Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Gero für die große Unterstützung, während meiner Arbeit -vor allem zum Schluß, für seine Diskussionsbereitschaft und Zielstrebigkeit und die gute Zusammenarbeit.

Regine Kahmann möchte ich für die Möglichkeit danken, diese Arbeit in Ihrer Abteilung anfertigen zu können, sowie für Ihre Unterstützung.

Ich danke Michael Bölker für die Übernahme des Zweitgutachtens, sowie Frau Renkawitz-Pohl und Herrn Maier für Ihre Bereitschaft meiner Prüfungskommission anzugehören.

Ganz herzlich danken möchte ich den Mitgliedern meines Labors. Anne für ihre vielen Hilfestellungen, Isabella für eine schöne Zusammenarbeit und die vielen Gespräche ohne Worte, Uta für ihr hilfsbereites Wesen, Jan Heiko, Ulrike, und Petra für Ihre Unterstützung und nette Gespräche. Daniela Aßmann möchte ich im besonderen für Ihre tatkräftige Unterstützung bei der Herstellung der Kinesin-Deletionsstämme und für die vielen unterhaltsamen Stunden und die gemeinsame Schwerhörigkeit danken.

Bei den „Kahmännern“ und Feldi, Jörg, Christoph, Kathi, Miro, Mario und Volker möchte ich mich für die angenehme Arbeitsatmosphäre, Ihre stete Hilfsbereitschaft und die fachliche Unterstützung bedanken. Bei Rolf für seine kompetente Betreuung in Sachen Computer.

Für eine schöne Zeit außerhalb des Labors danke ich Isabella, der begeistertsten Spargeleserin, die ich kenne, Uta für gemeinsame Kinoabende, Kathrin für Ihr erfrischendes, herzliches Wesen und Ihre Begeisterungsfähigkeit, Philip, Heiko und Jan F. für Ihre Freude am Kochen und gemütliche Abende.

Vor allem möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mich immer unterstützt haben, und die mir gezeigt haben, dass es noch wichtige Dinge neben der Wissenschaft gibt. Mein größter Dank gilt aber Andreas für sein grenzenloses Verständnis während meiner Arbeit und für die vielen schönen Momente außerhalb des Labors.

Vielen Dank!

Lebenslauf

Persönliche Daten		Isabel Manns Geboren am 05.03.1976 in Rotenburg an der Fulda
Schulbildung	1982-1986	Tannenberg Grundschule in Nentershausen
	1986-1995 1995	Adam-von-Trott Gesamtschule in Sontra Allgemeine Hochschulreife
Studium	1995-2000	Studium der Biologie an der Georg-August-Universität, Göttingen
	2000-2001	Diplomarbeit am Albrecht-von-Haller Institut für Pflanzenwissenschaften (Prof. Held)
	2001	Diplom in Biologie
Promotion	2001-2005	Doktorarbeit am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie, Marburg Thema: „Die Rolle der Mikrotubuli und der mikrotubuli-abhängigen Transportprozesse im polaren Wachstum von <i>Ustilago maydis</i> “ Betreuer: PD Dr. Gero Steinberg