



**Das Num1-Protein in *Ustilago maydis*: Regulation intrazellulärer
Transportvorgänge durch einen globalen Spleißing-Faktor**

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades eines
DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN
(Dr. rer. nat.)

Fakultät für Chemie und Biowissenschaften am
Karlsruher Institut für Technologie (KIT) – Universitätsbereich

Genehmigte Version

Dipl. Biol. Nikola Kellner
aus Werl

September 2012

Dekan: Prof. Dr. Martin Bastmeyer

Referent: Prof. Dr. Jörg Kämper

Co-Referent: Prof. Dr. Peter Nick

Tag der mündlichen Prüfung: 19.10. 2012

Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation mit dem Titel „Das Num1-Protein in *Ustilago maydis*: Regulation intrazellulärer Transportvorgänge durch einen globalen Spleißing-Faktor“ selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt sowie mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich gekennzeichneten Quellen und Hilfsmittel bedient habe. Wörtlich oder inhaltlich übernommene Stellen wurden als solche kenntlich gemacht.

Weiterhin habe ich die Satzungen zur guten wissenschaftlichen Praxis des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT) in der gültigen Fassung vom 09. Juli 2010 und der Universität Karlsruhe (TH) vom 15. Januar 2002 beachtet.

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

(Ort, Datum)

(Nikola Kellner)

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von Mai 2009 bis September 2012 in der Abteilung Genetik des Instituts für Angewandte Biowissenschaften am Karlsruher Institut für Technologie (KIT) – Universitätsbereich unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Jörg Kämper durchgeführt.

Teile dieser Arbeit wurden zur Veröffentlichung eingereicht:

Kellner N., Heibel K., Obhof T., Finkernagel F. and Kämper J. (2013) The SPF27-homologue Num1 connects splicing and cytoplasmic transport in *Ustilago maydis*. (*submitted*)

Inhaltsverzeichnis

Erklärung	i
Summary	vii
Zusammenfassung	ix
Abkürzungen und Fachbegriffe	xi
Abbildungsverzeichnis	xiii
Tabellenverzeichnis	xv
1. Einleitung	1
1.1 Polares Wachstum ist für verschiedenste Entwicklungsvorgänge von zentraler Bedeutung	1
1.2 Das Zytoskelett in filamentösen Pilzen	2
1.3 <i>Ustilago maydis</i>	6
1.3.1 <i>Ustilago maydis</i> als Modellsystem	7
1.3.2 Der Lebenszyklus von <i>U. maydis</i>	9
1.3.3 Kontrolle der sexuellen Entwicklung durch die Paarungstyp-Loci	11
1.3.4 Die <i>b</i> -vermittelte Genregulationskaskade	14
1.4 Schnallenbildung und Zellkernverteilung	15
1.5 Das Num1 Protein ist notwendig für das polare Hyphenwachstum	17
1.6 Aufbau und Funktionen des Spleißosom-assoziierten Prp19/CDC5L-Komplexes	19
1.7 Zielsetzung der Arbeit	21
2. Resultate	23
2.1 Bioinformatische Analyse des Num1-Proteins in <i>Ustilago maydis</i>	23
2.2 Funktionelle Charakterisierung des Num1-Proteins	25
2.2.1 Das Num1-Protein ist nicht notwendig für Zellfusion, Bildung von Dikaryen oder Proliferation innerhalb der Pflanze	26
2.2.2 Die induzierte Expression eines verkürzten Num1-Proteins hat keinen Phänotyp	28
2.2.3 Das Num1-Protein wird für das polare Hyphenwachstum sowie die Bildung von Septen benötigt	30
2.2.4 Die Deletion der Zellkern-Lokalisierungssequenz führt zum Verlust der Funktionalität von Num1	31
2.2.5 Der N-Terminus des Num1-Proteins ist essentiell für die Funktionalität	32
2.3 Zellbiologische Untersuchungen von Strukturelementen des Zytoskeletts	34
2.3.1 Das Num1-Protein hat keinen Einfluss auf die Organisation des Mikrotubuli- und Actin-Zytoskeletts	34

2.3.2	Der Einfluss von Num1 auf die Motorproteine Kinesin 1 und Dynein	35
2.3.3	Die Motilität Sec4-markierter sekretorischer Vesikel ist nicht Num1-abhängig	36
2.3.4	Num1 ist notwendig für die Motilität früher Endosomen	37
2.4	Num1 beeinflusst die Zellteilung und den Zellzyklus	39
2.5	Untersuchungen von Num1-homologen Proteinen	40
2.5.1	Die Expression des humanen BCAS2-Proteins führt zur teilweisen Komplementation des $\Delta num1$ -Phänotyps	40
2.5.2	Num1 besitzt ein funktionelles Homolog (AN4244) in <i>Aspergillus nidulans</i>	41
2.6	Funktionelle Analyse von Num1-Interaktionspartnern	44
2.6.1	Um03539 und Um11510 sind nicht notwendig für das polare Wachstum	44
2.6.2	Um00933 ist ein Pathogenitätsfaktor mit Num1-ähnlichem Phänotyp	46
2.6.3	Um10958 ist eine Komponente des Spindelpolkkörpers in <i>U. maydis</i>	48
2.7	Num1 interagiert mit Dnm1, einem mitochondrialen Spaltungsfaktor	49
2.7.1	Num1 hat keinen Einfluss auf die Morphologie, Fusion oder den Transport von Mitochondrien	50
2.7.2	Neue Funktion von Dnm1 bei endosomalen Transportprozessen	53
2.8	Num1 interagiert mit dem Kin1-Motorprotein	54
2.8.1	<i>num1</i> - und <i>kin1</i> -Deletionsstämme haben überlappende Phänotypen	56
2.8.2	Die Lokalisierung der zytoplasmatischen Num1-Population ist abhängig von Kin1	57
2.8.3	Die Doppeldeletion von <i>num1</i> und <i>kin1</i> zeigt additive Effekte	58
2.9	Num1 ist eine Komponente des evolutionär konservierten Spleißosom-assoziierten Prp19/CDC5L-Komplexes	60
2.9.1	Num1 beeinflusst die zelluläre Antwort auf DNA-Schädigung	62
2.9.2	Num1 hat einen Einfluss auf die Intron-Retention während des Spleißens	63
2.10	Untersuchungen zum mRNA-Transport	65
2.11	Num1 beeinflusst die Effizienz des Spleißens auf globaler Ebene	68
3.	Diskussion	77
3.1	Num1 als strukturelle und funktionelle Komponente des Spleißosom-assoziierten konservierten Prp19/CDC5L-Komplexes	77
3.1.1	Num1 ist ein globaler Spleißing-Faktor	80
3.1.2	Spleißing-Defekte als Ursache für die pleiotropen Phänotypen in $\Delta num1$ -Stämmen	83
3.1.3	Num1 beeinflusst die Zellzyklus-Regulation und DNA-Reparatur	86
3.2	Das Num1-Protein besitzt unterschiedliche zytoplasmatische Funktionen	89
3.2.1	Num1 interagiert mit Komponenten des Spindelpolkkörpers	89
3.2.2	Num1 interagiert mit Dnm1, einem mitochondrialen Spaltungsfaktor	91
3.2.3	Num1 und das Kin1-Motorprotein fungieren in einem gemeinsamen Komplex	93
3.2.4	Putative Funktionen des Num1/Kin1-Komplexes	96

3.3	Die Num1 Funktion ist zwischen Basidio- und Ascomyzeten konserviert	98
3.4	Num1 als Bindeglied zwischen Spleißen und Transportvorgängen	99
4.	Material und Methoden	107
4.1	Material und Bezugsquellen	107
4.1.1	Chemikalien, Puffer, Lösungen, Enzyme, Kits und Medien	107
4.1.2	Stämme	110
4.1.3	Nukleinsäuren, Oligonukleotide und Plasmide	114
4.2	Mikrobiologische, genetische und zellbiologische Methoden	121
4.2.1	<i>E. coli</i>	121
4.2.2	<i>S. cerevisiae</i>	122
4.2.3	<i>U. maydis</i>	123
4.2.4	<i>A. nidulans</i>	125
4.3	Fluoreszenzmikroskopie und Färbemethoden	126
4.4	Molekularbiologische Standardmethoden	130
4.4.1	Isolierung von Nukleinsäuren	130
4.4.2	Handhabung und <i>in vitro</i> -Modifikationen von Nukleinsäuren	132
4.4.3	Auftrennung und Nachweis von Nukleinsäuren	134
4.5	Biochemische Methoden	136
4.5.1	Gewinnung von Proteinextrakten aus <i>U. maydis</i>	136
4.5.2	Auftrennung von Proteinen (SDS-PAGE)	137
4.5.3	Silbernitrat-Färbung von Proteingelen	137
4.5.4	Nachweis von immobilisierten Proteinen (Western-Analyse)	138
4.5.5	Co-Immunopräzipitation	139
4.5.6	Tandem-Affinitäts-Aufreinigung von Proteinen (TAP-Tag Methode)	140
4.6	Polymerase-Kettenreaktion- (PCR-) basierte Techniken	142
4.6.1	Generierung von Gen-Deletionskonstrukten für <i>U. maydis</i>	143
4.6.2	Real Time PCR (qRT-PCR) Analysen	144
4.7	<i>in silico</i> Methoden	145
5.	Literaturverzeichnis	147
6.	Anhang	175
6.1	Untersuchungen von Num1-Proteininteraktionen <i>in vivo</i> : BiFC-Analysen	175
6.2	Num1 ist Teil eines größeren Komplexes	178
6.3	Untersuchungen zum humanen Num1-Homolog hBCAS2	180
6.4	Qualitätskontrollen zur mRNA-Seq Analyse	182
6.5	Digitale Datensätze	185

Summary

The phytopathogenic basidiomycete *Ustilago maydis* is the causative agent of smut disease on corn. Throughout its lifecycle *U. maydis* displays different morphological stages. During the vegetative growth phase haploid yeast-like cells, termed sporidia, proliferate by budding. Sexual development is initiated by the fusion of two compatible sporidia, resulting in filamentously growing dikaryotic hyphae, which are entirely dependent on their host plant for all subsequent steps of development. Growth as a dikaryon concomitantly requires an elaborate coordination of cell cycle, migration and distribution of the two genetically distinct nuclei inside the hyphae as well as polar hyphal growth.

Within this study the Num1 protein was identified to fulfill pivotal functions during these processes. Num1 is homologous to SPF27, a core component of the evolutionary conserved Prp19/CDC5L complex (NTC), which is an integral component of the spliceosome multiprotein-complex. By regulating spliceosome activation and essential conformational changes of the spliceosome during the splicing reactions, the NTC contributes to splicing efficiency and fidelity. Additionally, the complex is known to be involved in several other cellular processes e.g. cell cycle checkpoint control, the cellular response to DNA damage as well as the formation and export of mRNP-particles out of the nucleus.

Using the Yeast Two-Hybrid system and Co-immunoprecipitation, we identified Cef1 and Prp19, two further conserved components of the NTC, as Num1 interactors, indicating that the Num1 protein is a functional constituent of this complex in *U. maydis*.

Deletion of the *num1*-gene leads to pleiotropic phenotypes concerning polar hyphal growth; moreover, the $\Delta num1$ -mutation affects the regulation of cell cycle and cell division as well as survival upon UV irradiation. By means of a genome-wide mRNA-Seq analysis it could be demonstrated that splicing is impaired on a global level in *num1*-deletion strains, as 80% of all intron-containing transcripts displayed an increased rate of intron-retention. Analysis of the splicing efficiency of various transcripts revealed that aberrant splicing has impacts on various cellular processes like the organization of the cytoskeleton, cell cycle regulation or DNA-damage repair and might indirectly account for the different phenotypes of the $\Delta num1$ -mutant. One prominent candidate gene that might account for pleiotropic phenotypes is *Rbf1*, the central regulator on top of a transcriptional cascade, coordinating morphology and pathogenic development, since all four introns of the *rbf1*-transcript are significantly retained.

Apart from the NTC components, several proteins with putative functions during vesicle-mediated transport processes were identified as Num1 interactors; in particular the conventional kinesin 1 motor protein Kin1 was shown to physically interact with Num1. Both *num1*- and *kin1*-deletion strains exhibit identical phenotypes with respect to filamentous and polar apical growth, the morphology of vacuoles, the subcellular distribution of the Dynein motorprotein as well as the motility of early endosomes, strongly corroborating a genetic interaction between Num1 and Kin1. Additional Num1 interacting partners include *Nma1*, a microtubule-associated protein. *num1*- and *nma1*-deletion strains

again uncovered overlapping phenotypes, which substantiate the role of Num1 during microtubule-based transport processes.

The investigation of the Num1-homolog AN4244 in *Aspergillus nidulans* revealed that besides the sequence homology the protein also acts similar on the functional level. The potential functional interrelation between AN4244 and the KinA motorprotein indicates that the function of the Num1 protein with respect to polar hyphal growth and intracellular transport processes might be conserved.

Collectively, these data implicate a previously unidentified connection between a component of the splicing machinery and cytoplasmic (Kin1-dependent) transport processes in *U. maydis*. Further results imply a role of Num1 during mRNA-transport processes, which might constitute a novel functional interconnection between the two disparate processes of splicing and trafficking.

Zusammenfassung

Der phytopathogene Basidiomyzete *Ustilago maydis* ist der Erreger des Maisbeulenbrandes. *U. maydis* durchläuft während seines Lebenszyklus unterschiedliche morphologische Stadien. In der vegetativen Wachstumsphase vermehren sich haploide Zellen, sogenannte Sporidien, durch Hefe-artige Sprossung. Die sexuelle Entwicklungsphase beginnt mit der Fusion zweier kompatibler Sporidien, wodurch eine filamentös wachsende, dikaryotische Hyphe entsteht, die für das weitere Wachstum auf die Wirtspflanze angewiesen ist. Das Wachstum als dikaryotisches Filament erfordert eine präzise Koordination der Zellzyklus-Regulation, Migration und Verteilung der beiden genetisch verschiedenartigen Zellkerne innerhalb der Hyphe sowie des polaren Hyphenwachstums.

In der vorliegenden Studie wurde das Num1-Protein mit wesentlichen Funktionen innerhalb dieser Prozesse charakterisiert. Num1 ist homolog zum humanen SPF27-Protein, einer zentralen Komponente des evolutionär konservierten Prp19/CDC5L-Komplexes (NTC), der als integraler Bestandteil des Spleißosom-Multiprotein-Komplexes für dessen Aktivierung sowie für essentielle Konformations-Änderungen während der Spleißing-Reaktionen erforderlich ist. Neben der Regulation der Effizienz und der Genauigkeit des Spleißens ist der NTC in zusätzliche zelluläre Prozesse involviert, wie der Zellzyklus-Kontrolle, der Reparatur von DNA-Schäden sowie der Bildung und dem Export von mRNP-Partikeln aus dem Zellkern. Mit Hilfe des Hefe-Zwei-Hybrid Systems und Co-Immunopräzipitation konnten Prp19 und Cef1, zwei weitere Kern-Komponenten des NTC, als Num1-Interaktionspartner identifiziert werden, was die Funktion des Num1-Proteins als funktionellen Bestandteil dieses Komplexes in *U. maydis* sichert.

Die Deletion des *num1*-Gens in *U. maydis* führt zu pleiotropen Phänotypen bezüglich des polaren Hyphenwachstums; die $\Delta num1$ -Mutation beeinflusst darüber hinaus die Regulation von Zellzyklus und Zellteilungsprozessen sowie die Überlebensrate der Zellen nach Bestrahlung mit UV-Licht.

Durch eine Genom-weite mRNA-Seq Analyse konnte gezeigt werden, dass in *num1*-Deletionsmutanten das Spleißen auf globaler Ebene beeinträchtigt ist, da in fast 80% aller Intronhaltigen Transkripte die Intron-Retentionsrate erhöht war. Durch Analyse der Spleißing-Effizienz verschiedener Gene konnte gezeigt werden, dass sich das aberrante Spleißen in der $\Delta num1$ -Mutante indirekt auf diverse zelluläre Prozesse wie die Organisation des Zytoskeletts, Zellzyklus-Regulation oder DNA-Reparatur auswirken und ursächlich für die unterschiedlichen Phänotypen sein kann. Ein herausragender Kandidat, der für die pleiotropen Phänotypen verantwortlich sein könnte ist Rbf1, der zentrale Regulator an der Spitze einer komplexen Transkriptions-Kaskade zur Regulation der Hyphenmorphologie und pathogenen Entwicklung, da alle vier Introns des *rbf1*-Transkripts in $\Delta num1$ -Stämmen signifikant erhalten bleiben.

Neben den Komponenten des NTC wurden mehrere Proteine als Num1-Interaktionspartner identifiziert, für die eine Rolle während Vesikel-vermittelter Transport-Prozesse postuliert wurde. Das

konventionelle Kinesin Motorprotein Kin1 war dabei von besonderem Interesse, da es in Langstreckentransport-Prozesse und das polare Hyphenwachstum von *U. maydis* involviert ist. Die physikalische Interaktion mit Kin1 konnte in dieser Arbeit verifiziert werden. Sowohl *num1*- als auch *kin1*-Deletionsstämme weisen identische Phänotypen bezüglich des polaren Wachstums, der Vakuolen-Morphologie, der Dynein-Lokalisierung sowie der Motilität von Endosomen auf, was eine genetische Interaktion der beiden Proteine indiziert. Ein weiterer Num1-Interaktionspartner ist Nma1, ein Mikrotubuli-assoziiertes Protein. *num1*- und *nma1*-Deletionsstämme weisen wiederum überlappende Phänotypen auf, was eine Rolle von Num1 bei Mikrotubuli-basierten Transportprozessen untermauert.

Die Untersuchung des Num1-homologen AN4244-Proteins in *Aspergillus nidulans* zeigte, dass sich die Proteine neben der Sequenzhomologie auch funktionell ähnlich verhalten. Die potentielle Beziehung zwischen AN4244 und dem KinA-Motorprotein deutet darauf hin, dass die Funktion von Num1 in Bezug auf das polare Hyphenwachstum und intrazelluläre Transportvorgänge konserviert ist. Insgesamt signalisieren diese Daten einen bislang unbekanntem Zusammenhang zwischen einer Komponente der Spleißing-Maschinerie und zytoplasmatischen (Kin1-abhängigen) Transport-Prozessen in *U. maydis*. Weitere Ergebnisse implizieren eine Rolle von Num1 bei mRNA-Transport Prozessen, was eine neuartige funktionelle Verknüpfung zwischen den ungleichartig erscheinenden Prozessen „Spleißen“ und „Transport“ darstellen könnte.

Abkürzungen und Fachbegriffe

A	Adenin	g	Gramm
Abb.	Abbildung	G	Guanin
Ade	Adenin	GFP	grün fluoreszierendes Protein
Amp	Ampicillin	GTP	Guanosintriphosphat
Amp ^R	Ampicillin-Resistenz	GTPase	Guanosintriphosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat	h	Stunde
AS	Aminosäure	H/His	Histidin
bE	“bEast”	HA	Hämagglutinin
BLAST	“basic local alignment search tool”	HD	Homeodomäne
bp	Basenpaar	HRP	Meerrettich-Peroxidase
BSA	Rinderserum-Albumin	Hyg	Hygromycin
bW	“bWest”	Hyg ^R	Hygromycin-Resistenz
C	Kohlenstoff oder Cytosin	H ₂ O _{bid.}	zweifach destilliertes Wasser
ca.	circa	Kan	Kanamycin
cAMP	zyklisches Adenosin Monophosphat	Kan ^R	Kanamycin-Resistenz
Cbx	Carboxin	kb	Kilobasenpaar(e) = 1000 bp
Cbx ^R	Carboxin-Resistenz	kDa	Kilodalton = 1000 Dalton
cDNA	komplementäre DNA	l	Liter
cm	Zentimeter	L/Leu	Leucin
CM	Komplex-Medium	M	Mol oder Molar
CoIP	Co-Immunopräzipitation	mA	Milli-Ampere
C-terminal	Carboxy-terminal	MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
DAPI	4',6-Diamidin-2'- Phenylindoldihydrochlorid	MAPs	Mikrotubuli-assoziierte Proteine
DIC	differenzielle Phasenkontrast- Mikroskopie	Mb	Megabasenpaar(e) = 1.000.000 bp
DIG	Digoxigenin	Met	Methionin
DMSO	Dimethyl-Sulfoxid	mg	Milligramm
DNA	Desoxyribonukleinsäure	min	Minute
DNase	Desoxyribonuklease	ml	Milliliter
dpi	Tage nach Infektion	mM	Millimolar
Drop-out	Aminosäuremischung für Hefe- Medien	MM	Minimalmedium
DSB	DNA-Doppelstrangbrüche	mRNA	„messenger“ RNA
DSP	Dithiobis[SuccinimidylPropionat]	msec	Millisekunde
dATP (A)	Desoxyadenosintriphosphat	MTOC	Mikrotubuli-organisierendes Zentrum
dCTP (C)	Desoxycytidintriphosphat	N	beliebiges Nukleotid (A, C, G oder T) oder Stickstoff
dGTP (G)	Desoxyguanosintriphosphat	Nat	Nourseothricin
dNTP (N)	Desoxynukleosidtriphosphat	Nat ^R	Nourseothricin-Resistenz
dTTP (T)	Desoxythymidintriphosphat	ng	Nanogramm
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	NLS	Zellkern-Lokalisierungssequenz
EE	frühe Endosomen	nm	Nanometer
eGFP	verstärkte Version von GFP	nt	Nukleotid(e)
EJC	„Exon Junction Complex“	NTC	„NineTeen-Complex“
EST	„expressed sequence tag“	N-terminal	Amino-terminal
f.c.	finale Konzentration	OD ₆₀₀	optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm
FISH	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung	ORF	offener Leserahmen
<i>et al.</i>	und andere	P _{xy}	Promotor
		p.a.	für die Analyse

PBS	Phosphat-gepufferte Saline	T	Thymin oder Tryptophan
PCR	Polymerase-Kettenreaktion	TAP	Tandem-Affinitäts-Aufreinigung
PD	Kartoffel-Dextrose-Medium	TE	Tris-HCl/EDTA
PEG	Polyethylenglykol	TEMED	Tetramethylethylendiamin
pers.	persönlich(e)	Tris	Trihydroxymethylaminomethan
Phleo	Phleomycin	Trp	Tryptophan
Phleo ^R	Phleomycin-Resistenz	U	Unit (Enzymaktivität)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid	ÜN	über Nacht
Primer	Startoligonukleotid für die DNA-Polymerase	Upm	Umdrehungen pro Minute
RFP	rot fluoreszierendes Protein	UV	ultraviolettes Licht
RNA	Ribonukleinsäure	V	Volt
RNAi	RNA-Interferenz	(v/v)	Volumen pro Volumen
RNase	Ribonuklease	WGA	Weizenkeim-Agglutinin
RNA-Seq	RNA-Sequenzierung	WT	Wildtyp
RT	Raumtemperatur oder reverse Transkriptase	(w/v)	Gewicht pro Volumen
sec	Sekunde	YFP	gelb fluoreszierendes Protein
SD	„synthetic drop-out“	Δ	Deletion
SDS	Natriumdodecyl-Sulfat	μg	Mikrogramm
SDS-PAGE	Natriumdodecyl-Sulfat Polyacrylamidgel-Elektrophorese	μl	Mikroliter
		μm	Mikrometer

Abbildungsverzeichnis

Einleitung		
Abbildung 1	Das Mikrotubuli-Zytoskelett und assoziierte Motorproteine	Seite 3
Abbildung 2	Schematische Darstellung der dem polaren Hyphenwachstum zugrunde liegenden Prozesse	Seite 6
Abbildung 3	Ähnlichkeiten zwischen <i>U. maydis</i> und <i>H. sapiens</i>	Seite 8
Abbildung 4	Der Lebenszyklus von <i>U. maydis</i>	Seite 10
Abbildung 5	Der <i>a</i> -Paarungstyp-Locus	Seite 12
Abbildung 6	Der <i>b</i> -Paarungstyp-Locus	Seite 13
Abbildung 7	Schematische Darstellung der zentralen Faktoren innerhalb der <i>b</i> -vermittelten Regulationskaskade	Seite 15
Abbildung 8	Schematische Darstellung der Zellkernverteilung in Basidiomyzeten am Beispiel von <i>Coprinus cinereus</i>	Seite 16
Abbildung 9	Subzelluläre Lokalisierung des Num1:3eGFP-Fusionsproteins	Seite 18
Resultate		
Abbildung 10	Phylogenetische Analyse von Num1-homologen Proteinen	Seite 24
Abbildung 11	Bioinformatische Analyse des Num1 Proteins	Seite 25
Abbildung 12	Untersuchungen zum Wachstums- und Kreuzungsverhalten, sowie der Pathogenität von $\Delta num1$ -Deletionsstämmen	Seite 27
Abbildung 13	Fluoreszenzmikroskopische Beobachtung von Kreuzungen kompatibler $\Delta num1$ -Deletionsstämmen während der pathogenen Entwicklung von <i>U. maydis</i>	Seite 28
Abbildung 14	Die induzierte Expression eines verkürzten Num1-Proteins (Num1 ₁₋₁₀₃) hat keinen Phänotyp in Bezug auf die Hyphenmorphologie, Zellkernwanderung oder Dikaryon-Bildung	Seite 29
Abbildung 15	Mikroskopische Analyse der Filamentmorphologie in <i>num1</i> -Deletionsstämmen	Seite 30
Abbildung 16	Komplementationsanalysen von <i>num1</i> -Deletionsstämmen	Seite 32
Abbildung 17	Der N-Terminus des Num1-Proteins ist essentiell für die Funktionalität	Seite 33
Abbildung 18	Fluoreszenzmikroskopische Analyse verschiedener Zytoskelett-Elemente in Abhängigkeit von Num1	Seite 35
Abbildung 19	Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Dynein-Lokalisierung in Abhängigkeit von Num1	Seite 36
Abbildung 20	Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Sekretions-Maschinerie in Abhängigkeit von Num1	Seite 37
Abbildung 21	Fluoreszenzmikroskopische Analyse früher Endosomen in Abhängigkeit von Num1	Seite 38
Abbildung 22	Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Zellkernverteilung in AB31 und AB31 $\Delta num1$	Seite 40
Abbildung 23	Komplementationsanalyse mit dem humanen BCAS2-Protein	Seite 41
Abbildung 24	Phänotypische Analyse von Deletionsmutanten des <i>num1</i> -Homologs AN4244 in <i>Aspergillus nidulans</i>	Seite 42
Abbildung 25	Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Vakuolenmorphologie in Deletionsmutanten des <i>num1</i> -Homologs AN4244 in <i>A. nidulans</i>	Seite 42
Abbildung 26	Mikroskopische Analyse der Zellkernverteilung in Deletionsmutanten des <i>num1</i> -Homologs AN4244 in <i>A. nidulans</i>	Seite 43
Abbildung 27	Fluoreszenz-mikroskopische Analyse der Dynein-Lokalisierung in Deletionsmutanten des <i>num1</i> -Homologs AN4244 in <i>A. nidulans</i>	Seite 44
Abbildung 28	Pathogenität von Deletionsstämmen ausgewählter Num1-Interaktionspartner	Seite 45
Abbildung 29	Fluoreszenzmikroskopische Analyse von AB33 $\Delta um03539$ - und AB33 $\Delta um11510$ -Deletionsstämmen	Seite 46
Abbildung 30	Fluoreszenzmikroskopische Analyse eines AB33 $\Delta um00933$ -Deletionsstammes	Seite 47
Abbildung 31	Subzelluläre Lokalisierung eines Um00933:3eGFP-Fusionsproteins	Seite 48
Abbildung 32	Subzelluläre Lokalisierung eines Um10958:3eGFP-Fusionsproteins	Seite 48
Abbildung 33	Funktionelle Charakterisierung der Num1/Dnm1-Interaktion	Seite 50
Abbildung 34	Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Mitochondrien-Morphologie in Abhängigkeit von Num1	Seite 51
Abbildung 35	Untersuchungen zur Mitochondrienfusion	Seite 52
Abbildung 36	Dnm1 ist notwendig für die Vakuolenmorphologie, aber nicht für das polare Wachstum	Seite 53
Abbildung 37	Phänotypische Analysen von <i>num1/dnm1</i> -Doppeldeletionsmutanten	Seite 53

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 38	<i>in vivo</i> Co-Immunopräzipitation von Num1 und Kin1	Seite 55
Abbildung 39	Bestimmung der Num1-Interaktionsdomäne für Kin1	Seite 55
Abbildung 40	Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Vakuolenmorphologie in <i>num1</i> - und <i>kin1</i> -Deletionsstämmen	Seite 56
Abbildung 41	Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Num1-Lokalisierung in Abhängigkeit von Kin1	Seite 58
Abbildung 42	Pathogenitätsstudien von <i>num1</i> - und <i>kin1</i> -Deletionsstämmen	Seite 58
Abbildung 43	Phänotypische Analyse von <i>num1/kin1</i> -Doppeldeletionsmutanten	Seite 59
Abbildung 44	Das Num1-Protein interagiert mit Komponenten aus dem NTC in <i>U. maydis</i>	Seite 61
Abbildung 45	Co-Lokalisierung von Num1 mit Cef1 und Prp19	Seite 61
Abbildung 46	Untersuchungen zur Sensitivität von <i>num1</i> -Deletionsmutanten gegenüber DNA-schädigenden Agenzien	Seite 63
Abbildung 47	Untersuchungen zum mRNA-Spleißen mittels qRT-PCR	Seite 64
Abbildung 48	Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Rrm4-Dynamik in Abhängigkeit von Num1	Seite 65
Abbildung 49	Quantifizierung der Rrm4-Dynamik	Seite 66
Abbildung 50	Fluoreszenzmikroskopische Analyse zur Co-Lokalisierung von Rrm4- und Pab1-Partikeln in Abhängigkeit von Num1	Seite 67
Abbildung 51	qRT-PCR Analyse der <i>bW</i> -, <i>rbf1</i> - und <i>num1</i> -Genexpression	Seite 69
Abbildung 52	Num1 hat einen globalen Effekt auf die Intron-Retention	Seite 70
Abbildung 53	Bioinformatische Analysen zur Intron-Retention	Seite 71
Abbildung 54	Unterschiedliche Intron-Retentionsraten in AB31 Δ <i>num1</i>	Seite 72
Abbildung 55	Die <i>num1</i> -Deletion führt zu erhöhter Intron-Retention im <i>rbf1</i> -Gen	Seite 75
Diskussion		
Abbildung 56	Schematische Übersicht der Protein-Protein Interaktionen innerhalb des Prp19/CDC5L-Komplexes	Seite 78
Abbildung 57	Putative Funktion des Num1-Proteins beim mRNA-Export	Seite 101
Abbildung 58	Mikrotubuli-basierter mRNA-Transport während des filamentösen Wachstums von <i>U. maydis</i>	Seite 102
Abbildung 59	Zusammenfassung der putativen Num1-Funktionen im Zellkern und im Zytoplasma	Seite 105
Anhang		
Abbildung 60	BiFC-Analyse der Num1/Kin1- Num1/Um10958- und Num1/Um00933-Proteininteraktionen	Seite 176
Abbildung 61	Untersuchungen zur Lokalisierung der Num1/Kin1-Interaktion in der BiFC-Analyse	Seite 177
Abbildung 62	TAP-Tag Analyse des Num1/Kin1-Komplexes	Seite 179
Abbildung 63	Qualitätskontrollen der für die mRNA-Sequenzierung eingesetzten RNA	Seite 182
Abbildung 64	Graphische Darstellung zur Änderung der Genexpression von AB31 Δ <i>num1</i> vs. AB31	Seite 183
Abbildung 65	Intron-Retention und Genexpression im <i>um04095</i> -Gen	Seite 184
Abbildung 66	Induzierte Genexpression eines metabolischen Gen-Clusters	Seite 184

Tabellenverzeichnis

Einleitung		
Tabelle 1	Übersicht der im Hefe-Zwei-Hybrid System isolierten Klone	Seite 18
Tabelle 2	NTC-Kernkomponenten aus <i>S. cerevisiae</i> und homologe Proteine	Seite 20
Resultate		
Tabelle 3	Quantifizierung der Phänotypen von AB31- und AB31 Δ num1-Filamenten 12 Stunden nach Induktion des bE/bW-Heterodimers	Seite 31
Tabelle 4	Quantifizierung der Endosomen-Motilität	Seite 39
Tabelle 5	Zusammenfassung der Phänotypen von <i>kin1</i> - und <i>num1</i> -Deletionsstämmen	Seite 57
Tabelle 6	Num1 hat einen Effekt auf die Intron-Retention von Transkriptionsfaktoren	Seite 74
Diskussion		
Tabelle 7	Gene für Schlüsselproteine aus Zellzyklusregulations- und DNA-Reparatur-Wegen werden in AB31 Δ num1 weniger effizient gespleißt	Seite 87
Methoden		
Tabelle 8	In dieser Arbeit verwendete Enzyme	Seite 107
Tabelle 9	In dieser Arbeit verwendete <i>U. maydis</i> Ausgangsstämme	Seite 110
Tabelle 10	In dieser Arbeit hergestellte <i>U. maydis</i> Stämme	Seite 111
Tabelle 11	In dieser Arbeit verwendete <i>A. nidulans</i> Ausgangsstämme	Seite 113
Tabelle 12	In dieser Arbeit hergestellte <i>A. nidulans</i> Stämme	Seite 113
Tabelle 13	In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide	Seite 114
Tabelle 14	In dieser Arbeit verwendete Ausgangsplasmide	Seite 117
Tabelle 15	In dieser Arbeit hergestellte Plasmide	Seite 118
Tabelle 16	In dieser Arbeit verwendete Antikörper	Seite 138
Tabelle 17	Verwendete Enzyme und Proteine und für die TAP-Tag Aufreinigung	Seite 142
Anhang		
Tabelle 18	mRNA-Seq Statistik	Seite 183

1. Einleitung

1.1 Polares Wachstum ist für verschiedenste Entwicklungsvorgänge von zentraler Bedeutung

Ein weit verbreitetes Phänomen innerhalb der Biologie ist die Festlegung und Aufrechterhaltung einer definierten Polaritätsachse. Zelluläre Asymmetrie und Polaritätsdetermination sind nicht nur in unizellulären Organismen wie der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* von Bedeutung für Wachstum und Entwicklung (Slaughter *et al.*, 2009), sondern ziehen sich durch alle Reiche bis hin zur Embryonalentwicklung und Körperorganisation von Vielzellern. Die Bildung von asymmetrischen Körperachsen wurde besonders gut während der Oogenese und Entwicklung der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* und des Nematoden *Caenorhabditis elegans* untersucht (Pellettieri und Seydoux, 2002).

Die Grundprinzipien, die diesen komplexen Prozessen zugrunde liegen sind evolutionär zwischen niederen Eukaryoten bis hin zum Menschen konserviert (McCaffrey und Macara, 2009; Munro und Bowerman, 2009; Nelson, 2009; Wang, 2009). Eine besonders ausgeprägte Form von polarem Wachstum ist das Spitzenwachstum filamentöser Pilze. Kennzeichnend für diese Gruppe von Organismen ist das Wachstum als lang gestreckte Hyphen, die ausschließlich durch apikale Expansion der Zellspitzen wachsen und in ein weitläufiges Myzel verzweigen und differenzieren können, was den Pilzen die Kolonisierung von organischen Substraten wie Boden oder Gewebe ermöglicht (Wessels, 1993). Somit spielen filamentöse Pilze als Destruenten von totem Pflanzenmaterial eine zentrale Rolle im globalen Ökosystem. Arbuskuläre Mykorrhiza-Pilze sind darüber hinaus in der Lage mit vielen Pflanzen eine mutualistische Symbiose einzugehen (Genre *et al.*, 2005), wobei das polare Wachstum der Hyphen für die erfolgreiche Kolonisierung der Wurzel benötigt wird. Invasives Hyphenwachstum kann aber auch zu parasitären Beziehungen mit anderen Organismen führen und ist essentiell für die Pathogenität phytopathogener Pilze, wie *Magnaporthe grisea* (Caracuel-Rios und Talbot, 2007; Deising *et al.*, 2000) oder *Ustilago maydis* (Banuett, 1995; Bölker, 2001), deren Virulenz auf der Fähigkeit beruht, die Wirtspflanze durch polares, filamentöses Hyphenwachstum zu infizieren und innerhalb des Pflanzengewebes zu proliferieren. Viele Pflanzen-, Tier- und Humanpathogene Pilze sind dimorph und besitzen je nach Lebensart verschiedene Morphologie-Formen. Die Fähigkeit, vom knospenden, Hefe-ähnlichen Wachstum zum polaren, filamentösen Hyphenwachstum zu wechseln ist eng mit der Virulenz der Erreger assoziiert (Brand, 2012). So ist die Pathogenität des humanpathogenen *Candida albicans* unabdingbar an die Bildung filamentöser Hyphen geknüpft (Sudbery, 2011). Beispielsweise sind *C. albicans* Mutanten, die nicht mehr in der Lage sind filamentös zu wachsen, im Maus-Modell nicht mehr pathogen (Lo *et al.*, 1997). Auch in *Cryptococcus neoformans*, der wie *C. albicans* häufig als Krankheitserreger bei immunsupprimierten Patienten

auftritt, ist der Wechsel zum polaren, filamentösen Hyphenwachstum eng mit der Pathogenität des Pilzes verbunden (Kozubowski und Heitman, 2012).

Das Spitzenwachstum filamentöser Pilze ist bezüglich ihrer phänotypischen Morphologie mit Neuronen des Nervensystems höherer Eukaryoten zu vergleichen. Die hoch polarisierten Neuronen sind durch lange Axone gekennzeichnet, entlang derer die Reizweiterleitung bis zu den Synapsen erfolgt (Caceres *et al.*, 2012). Eine weitere Form hoch polarisierten Wachstums findet sich bei Wurzelhaaren und Pollenschläuchen von Pflanzen, polaren tubulären Auswüchsen aus Trichoblasten (Wurzelhaar-bildende epidermale Wurzelzellen) bzw. Pollenkörnern, die ähnlich wie die Neuronen ausschließlich via polarem Spitzenwachstum elongieren (Hepler *et al.*, 2001).

Trotz der evolutionären Distanz zwischen den Pilzen und den hohen Eukaryoten sind die zellulären Mechanismen des gerichteten, polaren Wachstums hoch konserviert (Abb. 3A). Für alle hier beschriebenen Zellformen, den Neuronen, den polarisierten Pflanzenzellen, aber auch den filamentösen Pilzhyphen ist ein extensiver intrazellulärer Membrantransport von essentieller Bedeutung für das polare Wachstum der Zellen. Sekretorische Vesikel, die unter anderem Bausteine und Enzyme für die Synthese von Membran- und Zellwandmaterial enthalten (Bartnicki-Garcia, 2006), werden kontinuierlich vom Zellkörper ausgehend zu der wachsenden Zellspitze transportiert und im Zuge der Exozytose in die Plasmamembran inkorporiert, was zur Expansion der Zellspitze führt. Diese Transportprozesse beruhen auf Actin und Mikrotubuli, sowie den mit diesen Elementen assoziierten Motorproteinen. Eine präzise Koordination dieser Zytoskelett-Elemente ist unerlässlich um die Polarität der Zelle zu etablieren und zu erhalten (Campanoni und Blatt, 2007; Fischer *et al.*, 2008; Harris, 2006; Hirokawa und Takemura, 2005; Nakata und Hirokawa, 2003; Palanivelu und Preuss, 2000; Samaj *et al.*, 2006; Steinberg, 2007a; Takeshita und Fischer, 2011).

1.2 Das Zytoskelett in filamentösen Pilzen

Anhand von Modellorganismen der Zellbiologie wie den Ascomyzeten *Aspergillus nidulans* und *Neurospora crassa* sowie dem Basidiomyceten *Ustilago maydis* wurden die Strukturelemente des Zytoskeletts filamentöser Pilze eingehend untersucht. Der hohe Homologiegrad der involvierten Proteine erlaubt es die grundlegenden Mechanismen der intrazellulären Transportvorgänge und damit einhergehende infektiions- oder pathogenitätsrelevante Entwicklungsvorgänge auf höhere eukaryotische Organismen zu übertragen. Das polare, filamentöse Wachstum von Pilzzellen wird durch Membran-Dynamiken wie Endo- und Exozytose sowie gerichteten Vesikel- und Endosomen-Transport vermittelt. Für die korrekte Hyphenmorphologie ist eine ausgewogene Regulation von Endo- und Exozytose an der Hyphenspitze essentiell (Shaw *et al.*, 2011; Wedlich-Söldner *et al.*, 2000). Eine lokale Exozytose von sekretorischen Vesikeln wird durch distinkte Mikrodomänen am apikalen Zellpol gefördert, welche spezifische Lipide, wie Sphingolipide und Ergosterol, enthalten (Harris *et al.*, 2005; Steinberg, 2007b; Takeshita *et al.*, 2012). Das zentrale Element für das polare Wachstum der Hyphenspitze ist der sog. Spitzenkörper, eine pleomorphe, dynamische Struktur

innerhalb der Hyphenspitze, der als Speicherorgan für sekretorische Vesikel fungiert (Abb. 1A) (Bartnicki-Garcia, 2002; Fischer, 2006; Gierz und Bartnicki-Garcia, 2001). Neben dem Polarisom, einem Multiprotein-Komplex, bestehend aus Signalmolekülen wie kleinen GTPasen, Forminen, die Actin-Filamente ausbilden, und Exozyst-Komponenten, sind Mikrotubuli mit dem Spitzenkörper assoziiert (Harris, 2006; Riquelme *et al.*, 2011; Steinberg, 2007a). Weiterhin indiziert das Vorhandensein von Ribosomen im Spitzenkörper eine lokale Proteinsynthese in der Hyphenspitze (Grove und Bracker, 1970; Riquelme *et al.*, 2002).

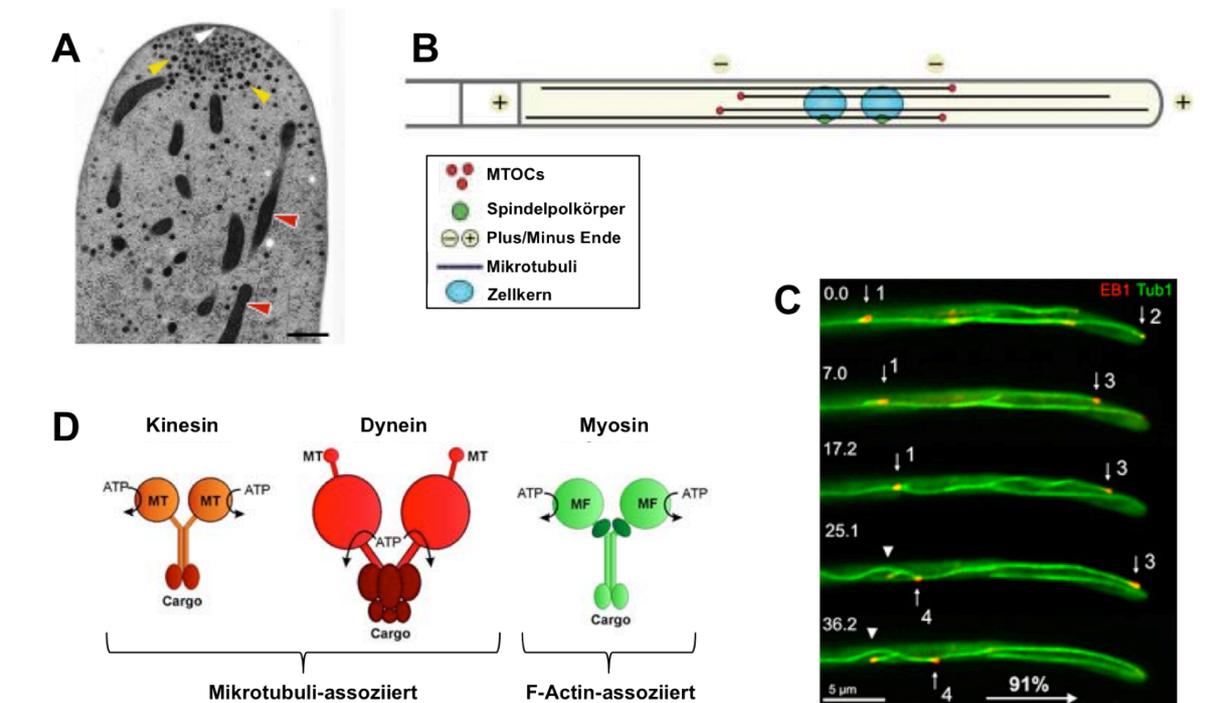


Abbildung 1: Das Mikrotubuli-Zytoskelett und assoziierte Motorproteine. (A) Transmissions-Elektronenmikroskopische Aufnahme einer *N. crassa* Hyphenspitze. In der Wachstumsregion akkumulieren Vesikel (gelbe Pfeilspitze), von denen einige mit der Plasmamembran fusionieren (weiße Pfeilspitzen), Mitochondrien (rote Pfeilspitzen) und Mikrotubuli. Längenmaßstab – 0,8 μ m. Abbildung aus (Riquelme *et al.*, 2011). (B) Schematische Darstellung der Anordnung und Polarität der Mikrotubuli in einer Hyphe. Die Mikrotubuli entspringen an MTOCs, von wo aus die Plus-Enden zur Hyphenspitze und zum basalem Septum gerichtet sind. Abbildung modifiziert nach (Steinberg, 2007d). (C) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von Mikrotubuli in *U. maydis* (mittels α -Tubulin (Tub1)-GFP visualisiert) im distalen Hyphenbereich. Die wachsenden Plus-Enden wurden durch den Plus-End Marker EB1 markiert. Über 90% der Plus-Enden sind in Richtung der Hyphenspitze orientiert, was darauf hindeutet, dass Kinesin Motorproteine maßgeblich am apikalen Wachstum und der Zell-Expansion beteiligt sind. Abbildung aus (Schuchardt *et al.*, 2005). (D) Organisation der Motorproteine. Die molekularen Motoren können in drei Klassen eingeteilt werden: Mikrotubuli-assozierte Kinesine und Dyneine sowie Actin-assozierte Myosine. Meist bestehen sie aus einem Homodimer aus schweren Ketten (hell) und einer variablen Anzahl an leichten Ketten (dunkel), die oft auch eine regulatorische Funktion besitzen. Die schwere Kette bildet die globuläre Motordomäne, die entweder Mikrotubuli (MT) oder F-Actin Filamente bindet. ATP-Spaltung führt zu Konformationsänderungen innerhalb der beiden Motordomänen, was zu einer hoch koordinierten Bewegung entlang der fibrillären Zytoskelett-Elemente führt. Abbildung modifiziert nach (Steinberg, 2007c).

Mikrotubuli sind die Hauptkomponenten für den intrazellulären Langstreckentransport. Sie bestehen aus einer regelmäßigen Anordnung von α - und β -Tubulin Heterodimeren, was ihnen eine distinkte Polarität verleiht (Nogales *et al.*, 1999). Durch Addition von Tubulin-Dimeren an ihrem Plus-Ende werden sie verlängert (Desai und Mitchison, 1997). Mikrotubuli entstehen an sog. Mikrotubuli-Organisations Zentren (MTOCs), die meist in der Nähe des Zellkerns, aber auch in der Zellperipherie

lokalisieren und zu verschiedenen Stadien des Zellzyklus aktiviert werden können (Straube *et al.*, 2003; Zekert *et al.*, 2010). In *A. nidulans* und *U. maydis* ist ein Großteil der Plus-Enden in Richtung der Hyphenspitze gerichtet (Konzack *et al.*, 2005; Schuchardt *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2003) (Abb. 1B+C), wohingegen in der Zellmitte auch antiparallele Mikrotubuli-Bündel detektierbar sind. In *N. crassa* Hyphenspitzen existieren ausschließlich unterschiedliche Polaritäten der Mikrotubuli (Mourino-Perez *et al.*, 2006). Zusätzlich zu den Mikrotubuli ist das Actin-Zytoskelett essentiell für das Hyphenwachstum filamentöser Pilze (Fuchs *et al.*, 2005; Upadhyay und Shaw, 2008; Virag und Griffiths, 2004).

Aktiver Transport von Vesikeln und anderen Wachstums Komponenten erfolgt mit Hilfe von Mechanoenzymen entlang des Actin- und Mikrotubuli-Zytoskeletts (Abb. 1D). Vier Myosin-Motorproteine sind mit filamentösem Actin (F-Actin) assoziiert, wobei das Myosin-5 Motorprotein in das polare Hyphenwachstum involviert ist (Schuchardt *et al.*, 2005; Weber *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2011b), indem es beispielsweise Chitin-Synthasen enthaltende Vesikel an die Hyphenspitze transportiert (Sanchez-Leon *et al.*, 2011; Schuster *et al.*, 2012; Weber *et al.*, 2006). Im Gegensatz zu Actin und Myosin, welche primär für den Kurzstreckentransport verantwortlich sind, vermitteln Mikrotubuli und die damit assoziierten Kinesin- und Dynein-Motorproteine Langstreckentransport-Prozesse. In filamentösen Asco- und Basidiomyceten sind 10-11 Kinesine und ein Dynein-Motorprotein für den Mikrotubuli-basierten Transport verantwortlich (Fuchs *et al.*, 2005; Schoch *et al.*, 2003; Steinberg, 2007d; Xiang und Plamann, 2003). Aufgrund der polaren Anordnung der Mikrotubuli unterstützen die Motorproteine das polare Wachstum der Hyphen, indem sie Vesikel und andere Organellen zur apikalen Wachstumsregion befördern. Einige Motorproteine gelten als Schlüsselkomponenten für die pilzliche Morphogenese, da Defekte von Komponenten der beschriebenen Transportprozesse generell zu reduzierten Wachstumsraten bis hin zur Letalität führen können (Harris, 2006; Ramos-Garcia *et al.*, 2009; Riquelme *et al.*, 2000; Seiler *et al.*, 1999; Steinberg, 2007a). Mutationen im konventionellen Kinesin-1 sowie Kinesin-3 führen zu verringertem Wachstum und gestörter Hyphenmorphologie in *A. nidulans* (Requena *et al.*, 2001; Zekert und Fischer, 2009) und *N. crassa* (Fuchs und Westermann, 2005; Seiler *et al.*, 1997). In *U. maydis* sind diese Proteine (Kin1 und Kin3) darüber hinaus während des filamentösen Wachstums signifikant induziert und die einzigen Motorproteine, die einen Einfluss auf die polare, filamentöse Hyphenmorphologie haben (Schuchardt *et al.*, 2005). Diese beiden Kinesine fehlen im Genom von *S. cerevisiae* wo der vesikuläre Transport primär entlang des Actin-Zytoskeletts verläuft (Lillie und Brown, 1994), was ihre Funktion beim Langstreckentransport unterstützt.

Neben der Zellteilung besteht eine Hauptaufgabe der Mikrotubuli und deren assoziierten molekularen Motoren im bi-direktionalen Transport von Vesikeln und frühen Endosomen, was zum filamentösen Wachstum der Pilze beiträgt (Abb. 2). Die Motilität dieser Organellen wird durch Kinesin-3/Unc-104- und Dynein-Motorproteine gesteuert (Abenza *et al.*, 2009; Lenz *et al.*, 2006; Wedlich-Söldner *et al.*, 2002; Zekert und Fischer, 2009; Zhang *et al.*, 2010). Der apikal-gerichtete endosomale Transport in

U. maydis wird primär durch das Kin3-Motorprotein vermittelt (Baumann *et al.*, 2012; Schuchardt *et al.*, 2005; Schuster *et al.*, 2011b; Schuster *et al.*, 2011c; Wedlich-Söldner *et al.*, 2002). Neuere Ergebnisse deuten jedoch drauf hin, dass auch das konventionelle Kinesin Kin1 an direkten vesikulären Transportprozessen beteiligt ist, da die effiziente Sekretion von Chitin-Synthase enthaltenden Vesikeln Kin1-, aber nicht Kin3-abhängig ist (Schuster *et al.*, 2012). Auch in *N. crassa* gibt es Hinweise für einen Nkin-abhängigen Transport von sekretorischen Vesikeln, da es in $\Delta Nkin$ -Hyphen nicht zur Ausbildung des Spitzenkörpers kommt. Damit einhergehend führt die *Nkin*-Deletion zu einer Inhibition der Proteinsekretion ins Kulturmedium (Seiler *et al.*, 1997) und die daraus resultierende unkoordinierte Insertion von Zellwandmaterial führt wahrscheinlich zu den beobachteten morphogenetischen Effekten. Das Dynein-Motorprotein transportiert die Organellen im Gegenzug retrograd in Richtung der Minus-Enden oder MTOCs (Abb. 2A). Dynein und einige regulatorische Proteine, die die Dynein-Aktivität kontrollieren, wie Dynactin und Lis1, akkumulieren an den Plus-Enden der Mikrotubuli in der Hyphenspitze, wo sie als Reservoir für den retrograden Membrantransport dienen (Lenz *et al.*, 2006; Schuster *et al.*, 2011a; Zhang *et al.*, 2010). Durch die Visualisierung der beteiligten Motorproteine und ihrer transportierten Fracht, wie Yup1-positive Vesikel oder Vesikel, die das endosomale Markerprotein Rab5-, eine kleine GTPase, enthalten, konnte kürzlich gezeigt werden, dass für den bi-direktionalen Membrantransport und die Motilität von frühen Endosomen ein präzise reguliertes Netzwerk kooperativer und kompetitiver Aktivität der erwähnten Motorproteine erforderlich ist (Ashwin *et al.*, 2010; Schuster *et al.*, 2011a; Schuster *et al.*, 2011b; Schuster *et al.*, 2011c). Dynein kann nicht nur an den Plus-Enden auf die Endosomen geladen werden, sondern kann seine Fracht auch während des Kin3-abhängigen Transportvorgangs aufnehmen und somit die Kinesin-3 Aktivität kontrollieren (Abb. 2B) (Schuster *et al.*, 2011a; Schuster *et al.*, 2011c). Das konventionelle Kinesin (KinA in *A. nidulans*, Nkin in *N. crassa* und Kin1 in *U. maydis*) ist für das „Recycling“ des Dynein-Motors zu den Mikrotubuli Plus-Enden verantwortlich, indem es diesen anterograd zur Hyphenspitze transportiert (Lenz *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2010) (Abb. 2A).

Eine weitere Funktion Mikrotubuli-basierter, endosomaler Transportprozesse ist der Transport von mRNA-enthaltenden Ribonukleoprotein-Partikeln (mRNPs) (Baumann *et al.*, 2012; Becht *et al.*, 2006). RNA-bindende Proteine, die beispielsweise für die Regulation der Stabilität oder für den Transport von mRNA benötigt werden, können einen erheblichen Einfluss auf das polare Wachstum, Morphologie und Pathogenität von filamentösen Pilzen haben (Vollmeister und Feldbrügge, 2010; Zarnack und Feldbrügge, 2007). Durch die Analyse von RNA-bindenden Proteinen in *U. maydis* konnten zwei Faktoren identifiziert werden, Khd4 und Rrm4, die einen Einfluss auf das filamentöse Hyphenwachstum haben (Becht *et al.*, 2006; Becht *et al.*, 2005). Rrm4 ist essentiell für den Langstrecken-Transport von mRNAs, ein Prozess der evolutionär konserviert ist (Zarnack und Feldbrügge, 2007; Zarnack und Feldbrügge, 2010). Der Rrm4-abhängige Transport von mRNAs, die für Polaritätsfaktoren kodieren, sowie die lokale Translation der entsprechenden Proteine sind

wesentliche Prozesse zur Aufrechterhaltung der Polaritätsachse im Filament. Eine Zusammenfassung der Transport-Ereignisse ist in Abbildung 2C schematisch dargestellt.

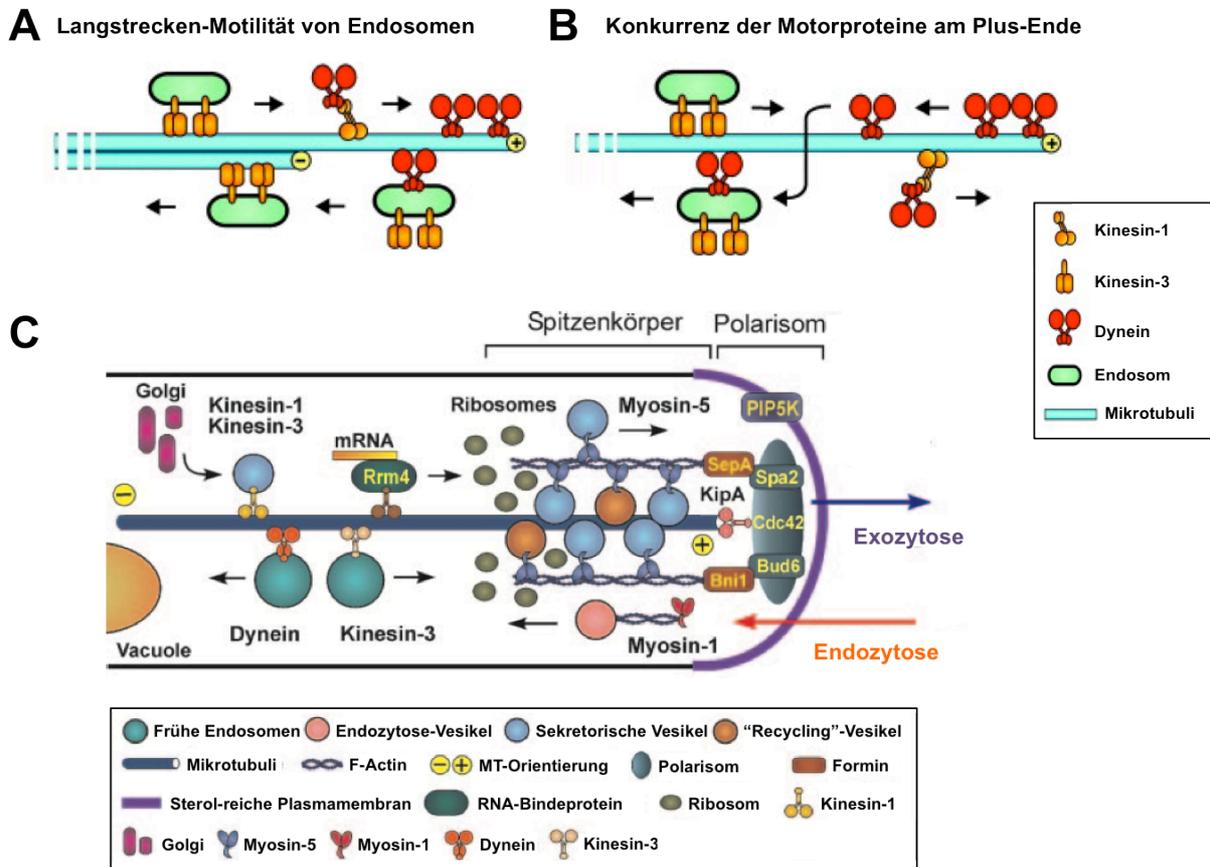


Abbildung 2: Schematische Darstellung der dem polaren Hyphenwachstum zugrunde liegenden Prozesse. (A) Langstrecken-Motilität von Endosomen. Der anterograde Transport wird durch das Kin3-Motorprotein gesteuert. Kinesin-1 vermittelt den Plus-Enden gerichteten Transport von Dynein, das wiederum Endosomen in Richtung Zellmitte transportiert. Nach 10-20 μm übernimmt Kinesin-3 diese Transportfunktion und sorgt für den Transport entlang antiparalleler Mikrotubuli-Bündel. **(B)** Die Konkurrenz der Motorproteine führt zu bidirektionalem Transport. Kinesin-3 transportiert Endosomen zu den Plus-Enden der Mikrotubuli. Das über Kinesin-1 transportierte Dynein wird entweder am Plus-Ende frei oder kann die Organellen unterwegs aufgreifen bevor sie an der Hyphenspitze abgesetzt werden. Abbildungen modifiziert nach (Steinberg, 2011). **(C)** Modell für das Spitzenwachstum einer Pilzhyphe. Sterol-reiche Membran-Domänen sind an der Hyphenspitze konzentriert, wodurch die Endozytose erleichtert wird. Der apikal gerichtete Transport exozytotischer Vesikel erfolgt über die Komponenten des Zytoskeletts; die Langstreckentransport-Prozesse erfolgen hauptsächlich über Kinesin-1 und Kinesin-3. Über Kinesin-3 gelangt auch mRNA an die Hyphenspitze, wo die lokale Translation an apikalen Ribosomen erfolgt. Abbildung modifiziert nach (Steinberg, 2007a).

1.3 *Ustilago maydis*

U. maydis zählt phylogenetisch zu den Basidiomyceten (Ständerpilzen) und ist einer der bekanntesten Vertreter der 1.500 Mitglieder umfassenden Brandpilze (Ustilaginomycotina). Mit wenigen Ausnahmen, wie dem humanpathogenen *Malassezia furfur*, handelt es sich bei den Brandpilzen um Pflanzenparasiten, die vornehmlich Poaceen und Cyperaceen parasitieren und als Wirtspflanzen unter anderem landwirtschaftlich relevante Kulturpflanzen wie Gerste, Weizen, Hafer, Zuckerrohr oder Mais befallen (Begerow *et al.*, 2006). Die sexuelle Reproduktion der Brandpilze (siehe 1.3.3) ist eng an die biotrophe Entwicklung gekoppelt und unerlässlich für einen erfolgreichen Infektionsprozess

(Bakkeren *et al.*, 2008). Die Vermehrung der Pilze findet vornehmlich innerhalb des pflanzlichen Meristems statt. Die Infektion ist meist systemisch, Symptome treten typischerweise nur an den Blütenständen auf. Dort kommt es zu einer massiven Vermehrung des Myzels und schließlich entstehen tumorartige Gallen, die die stark melanierten Brand- oder Teliosporen enthalten. Durch das Aufplatzen der Gallen kann es zu einem verbrannten Aussehen der infizierten Pflanzenteile kommen. Die freigesetzten Sporen können weitere Pflanzen in der Umgebung infizieren.

U. maydis besitzt ein enges Wirtsspektrum und befällt ausschließlich Mais (*Zea mays*) beziehungsweise die als Urform des Kulturmais diskutierte Teosinte (*Euchlena mexicana*). Nach der Infektion kommt es zur Ausprägung der charakteristischen Krankheitssymptome. Im Gegensatz zu anderen Brandpilzen werden alle oberirdischen Teile der Pflanze befallen, wobei die Infektion jedoch lokal beschränkt bleibt (Bölker, 2001; Doebley, 1992). Neben den Gallen an Kolben, Blättern und Stängeln sind infizierte Pflanzen meist durch auffällige Chlorosen und Anthozyanbildung im Blattgewebe gekennzeichnet (Abb. 4B). Die schwarzen Brandsporen sind namensgebend für die hervorgerufene Krankheit, den Maisbeulenbrand (Brefeld, 1875; Christensen, 1963). Mit *U. maydis* infizierte Maiskolben sind essbar und werden unter anderem in Mexiko unter dem Namen Cuitlacoche vertrieben (Ruiz-Herrera und Martinez-Espinoza, 1998; Valverde *et al.*, 1995). Abgesehen von dieser Ausnahme wird *U. maydis* zumeist als Ernteschädling angesehen, wobei die ökonomische Bedeutung eher gering eingeschätzt wird. Durch die Verwendung teilweise resistenter Maisvarietäten kommt es nur zu minimalen Ernteeinbußen (Allen *et al.*, 2011; Martinez-Espinoza *et al.*, 2002).

1.3.1 *Ustilago maydis* als Modellsystem

In den letzten Jahren hat sich *U. maydis* als bedeutender Modellorganismus für biotrophe, phytopathogene Pilze etabliert und wurde kürzlich zu den zehn relevantesten pilzlichen Pathogenen der molekularen Pflanzenpathologie gezählt (Dean *et al.*, 2012). Trotz seiner wirtschaftlich nachrangigen Bedeutung wurde eine Vielzahl von genetischen, molekular- und zellbiologischen Techniken entwickelt, die *U. maydis* zu einem idealen Modell für die Untersuchung von diversen zellulären Entwicklungsprozessen machen. Typisch für alle Brandpilze ist der dimorphe Lebenszyklus (siehe 1.3.2), der unter kontrollierten Labor- und Gewächshausbedingungen in wenigen Wochen vollzogen werden kann (Banuett, 1995). Die haploiden Sporidien können auf künstlichen Medien angezogen werden und sind gut zugänglich für eine genetische Manipulation. Maispflanzen können im Keimling-Stadium infiziert werden und erlauben nach nur sieben Tagen eine Bewertung der Pathogenität der injizierten Stämme. Die Charakterisierung der Paarungstyp-Loci (siehe 1.3.3) führte zur Entwicklung sog. solopathogener Stämme (Bölker *et al.*, 1995; Kämper *et al.*, 2006), die auch ohne einen kompatiblen Kreuzungstyp-Partner den Lebenszyklus komplett durchlaufen können. Homologe Rekombination verläuft in *U. maydis* äußerst effizient (Brachmann *et al.*, 2004; Holloman *et al.*, 2008; Kahmann und Kämper, 2004; Kronstad *et al.*, 1989; Wang *et al.*, 1988) und durch die Verwendung von vier dominanten Selektionsmarkern (Gold *et al.*, 1994; Keon *et al.*, 1991; Kojic und

Holloman, 2000) wird die gezielte genetische Manipulation des Genoms erleichtert (Basse und Steinberg, 2004; Brachmann *et al.*, 2004; Kämper, 2004). Regulierbare Promotor-Systeme erlauben zusätzlich die Untersuchung essentieller Gene (Banks *et al.*, 1993; Bottin *et al.*, 1996; Brachmann *et al.*, 2004). Zur Visualisierung von Genexpression und der Lokalisierung von subzellulären Strukturen sind diverse fluoreszente Proteine für die Lebendzell-Mikroskopie verfügbar (Böhmer *et al.*, 2009; Steinberg und Perez-Martin, 2008). 2006 wurde die zweifache Sequenzierung des 20,5 Mb Genoms und dessen manuelle Annotierung fertig gestellt (Kämper *et al.*, 2006), was revers-genetische Untersuchungen ermöglicht. Auf diese Weise konnten beispielsweise diverse Gen-Cluster identifiziert werden, von welchen sekretierte Effektor-Proteine kodiert werden, die eine wesentliche Rolle bei der Kolonisierung der Wirtspflanze spielen (Djamei *et al.*, 2011; Döhlemann *et al.*, 2011; Döhlemann *et al.*, 2009; Kämper *et al.*, 2006). Aus Genom-Analysen ging zusätzlich hervor, dass *U. maydis* einen höheren Verwandtschaftsgrad zum Menschen als zur Bäckerhefe aufweist (Abb. 3B), denn zahlreiche Proteine sind *U. maydis* und *H. sapiens* gemein, fehlen jedoch in *S. cerevisiae* (Münsterkötter und Steinberg, 2007). Dazu zählen Proteine aus zellulären Prozessen wie dem Langstreckentransport und Motorprotein-vermittelter Mikrotubuli-Organisation (Abb. 3A), Mitose oder homologer Rekombination (Banuett *et al.*, 2008; Holloman, 2011; Steinberg und Perez-Martin, 2008).

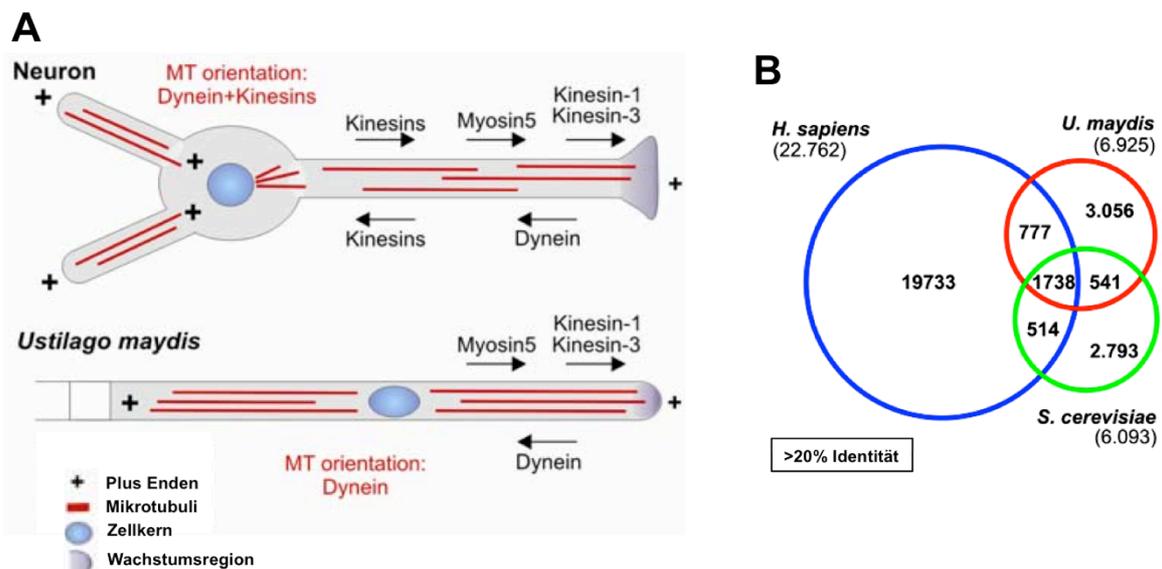


Abbildung 3: Ähnlichkeiten zwischen *U. maydis* und *H. sapiens*. (A) Ähnlich wie Neuronen in höheren Eukaryoten wachsen Pilzhyphen via Spitzenwachstum am apikalen Zellpol. Der Langstreckentransport zur Wachstumsregion ist Mikrotubuli-basiert (rot) und ein ähnliches Zusammenspiel an Motoproteinen ist für den bidirektionalen Transport zuständig. Abbildung aus (Steinberg und Perez-Martin, 2008). (B) Sequenz-Vergleich der vorhergesagten Proteome von *U. maydis*, *S. cerevisiae* und *H. sapiens* mit 20%-iger Identität über die gesamte Länge. *U. maydis* besitzt eine große Anzahl von Genen (777), die >20% Identität zu *H. sapiens*, aber <20% Identität zu *S. cerevisiae* aufweisen. In Klammern ist die Anzahl der vorhergesagte Gene jedes Organismus angegeben. Abbildung modifiziert nach (Münsterkötter und Steinberg, 2007), Quelle: gerosteinberg.com

Medizinische Relevanz erreichte *U. maydis* durch die Arbeiten am BRCA2-Homolog. Defekte im BRCA2-Protein können zu einer vererbaren Anfälligkeit gegenüber Brust- und Eierstockkrebs führen (Shivji und Venkitaraman, 2004). In *U. maydis* konnten die mechanistischen Grundlagen dazu aufgeklärt werden (Kojic und Holloman, 2012; Kojic *et al.*, 2002). In dieser Hinsicht kann die

Verwendung von *U. maydis* als Modellorganismus zu wichtigen Erkenntnissen bezüglich essentieller Prozesse führen, die auf höhere Eukaryoten und den Menschen übertragen werden können.

1.3.2 Der Lebenszyklus von *Ustilago maydis*

Charakteristisch für die Brandpilze sind die unterschiedlichen Stadien des Lebenszyklus, die mit verschiedenen Morphologien einhergehen (Abb. 4). In *U. maydis* bilden die vegetativen Sporidien die haploide, Hefe-ähnliche Form, die durch eine zigarrenförmige Morphologie gekennzeichnet ist (Abb. 4 (1)). In dieser Phase wächst der Pilz rein saprophytisch und ist nicht in der Lage seine Wirtspflanze zu infizieren. Die infektiöse Form wird etabliert, wenn zwei kompatible, haploide Stämme auf der Pflanzenoberfläche fusionieren (Abb. 4 (2)), wodurch ein hetero-dikaryotisches Filament entsteht (Snetselaar und Mims, 1992; Snetselaar und Mims, 1993). Dieser Prozess wird über ein tetrapolares Paarungstyp-System gesteuert, das durch den biallelischen *a*-Locus sowie den multiallelischen *b*-Locus spezifiziert wird (Bölker, 2001; Feldbrügge *et al.*, 2004; Kahmann und Kämper, 2004; Kahmann *et al.*, 1996) (siehe 1.3.3). Nach der gegenseitigen Perzeption zweier kompatibler Sporidien durch ein auf Pheromon/Pheromon-Rezeptor basierendes Zell-Zell-Erkennungssystem werden sog. Konjugationshyphen ausgebildet, die entlang des Pheromon-Gradienten aufeinander zuwachsen und an den Hyphenspitzen miteinander fusionieren (Snetselaar *et al.*, 1996; Spellig *et al.*, 1994).

In der prä-Penetrationsphase elongiert das dikaryotische Filament (Abb. 4 (3)) durch Spitzenwachstum; Zytoplasma akkumuliert im apikalen Kompartiment, wohingegen die älteren, distalen Kompartimente stark vakuolisieren und durch charakteristische leere Kompartimente gekennzeichnet sind, die durch sog. Retraktionssepten abgeschnürt werden (Banuett und Herskowitz, 1994). Die Organisation dieses neuen morphogenetischen Programms erfordert einen Arrest des Zellzyklus. Mit dem Wechsel vom Hefe-artigen zum filamentösen Wachstum arretieren die Zellen in der G2-Phase (Garcia-Muse *et al.*, 2003; Mielnichuk *et al.*, 2009). Auf der Pflanzenoberfläche stoppt in Reaktion auf ein bislang nicht identifiziertes Signal das polare Wachstum der Hyphe, und die Spitze schwillt zu einer spezialisierten Infektionsstruktur, dem Appressorium (Abb. 4 (4)), an, das sog. Infektionshyphen für die Penetration des pflanzlichen Gewebes ausbildet. Die Plasmamembran der Pflanzenzelle wird dabei eingestülpt und umschließt daraufhin die intrazellulären Pilzhypen. Dadurch wird eine biotrophe Interaktionszone zwischen Pathogen und Wirtspflanze etabliert, in der Signal-Austausch und Nährstoffaufnahme stattfinden (Abb. 4 (5)). Nach der Penetration der Pflanzenoberfläche kommt es zur Aufhebung des G2 Zellzyklus-Arrestes, wodurch die Proliferation des Dikaryons innerhalb der Wirtspflanze erst ermöglicht wird (Banuett und Herskowitz, 1996). Die regulatorischen Schaltkreise, die diesen Prozessen zugrunde liegen, werden ausführlich in den Abschnitten 1.3.4 und 1.4 beschrieben. Die gleichmäßige Verteilung der beiden genetisch verschiedenen Zellkerne im Dikaryon durch eine synchrone mitotische Kernteilung wird mit Hilfe der für die Basidiomyceten charakteristischen Schnallenzellen gewährleistet (Banuett und Herskowitz,

1996; Scherer *et al.*, 2006) (siehe 1.4). In diesen frühen Stadien des intra- und interzellulären Wachstums lokalisiert der Pilz vornehmlich in nährstoffreichen Geweben der Maispflanze, wie den Phloem-Bündeln.

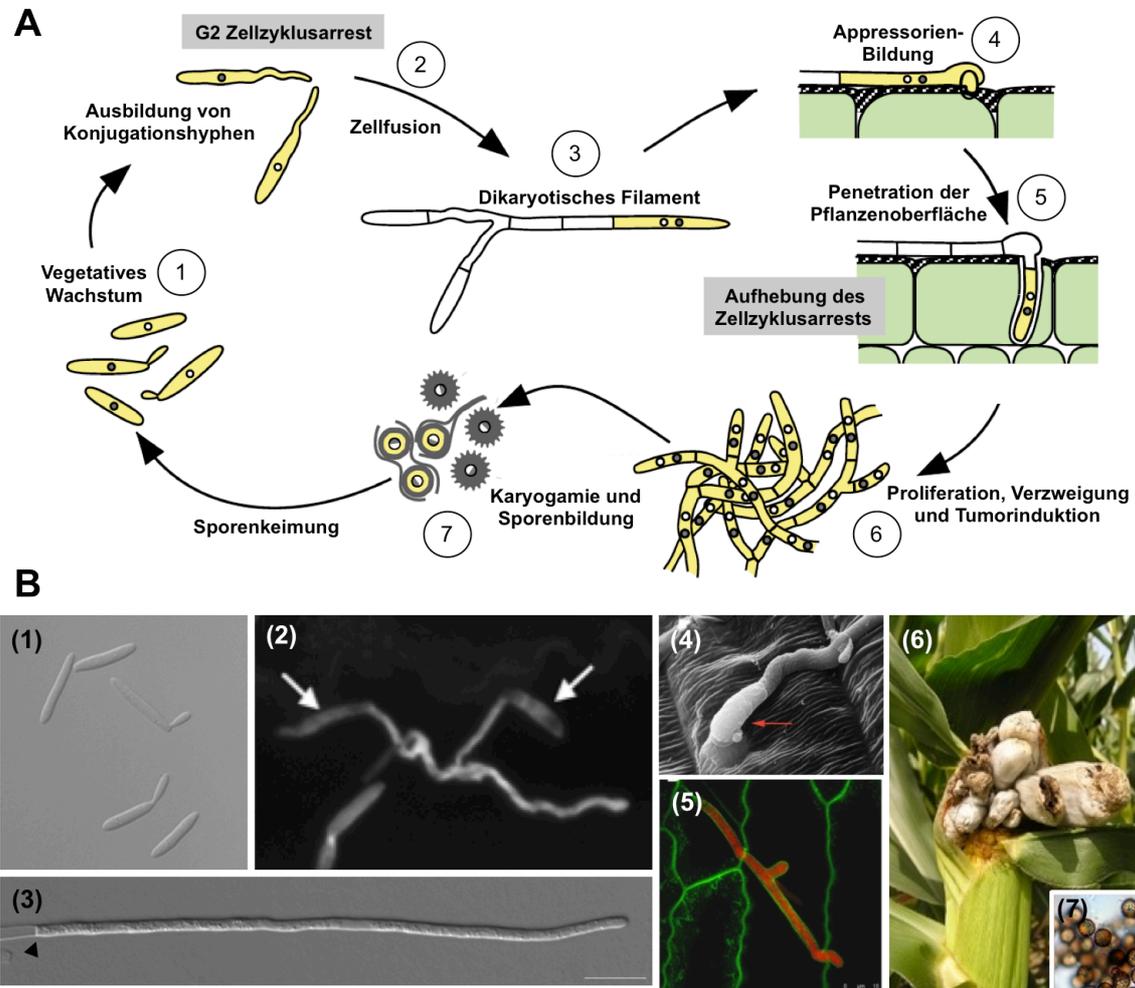


Abbildung 4: Der Lebenszyklus von *U. maydis*. (A) Schematische Darstellung der verschiedenen Entwicklungsstufen. Abbildung modifiziert nach (Kämper *et al.*, 2006). Für die Schritte (4) bis (7) ist die Wirtspflanze unerlässlich. (B) Mikroskopische Aufnahmen der unterschiedlichen Entwicklungsstadien. (1) Die haploiden Sporidien vermehren sich hefeartig durch Knospung. (2) Auf der Pflanzenoberfläche können zwei kompatible Sporidien (durch Pfeile markiert) fusionieren. Abbildung aus (Heimel, 2010). (3) Filamentös wachsende Hyphe nach Induktion des filamentösen Wachstums in axenischer Kultur. Die Pfeilspitze zeigt auf das Retraktionsseptum. (4) Penetration der Pflanzenoberfläche mit Hilfe eines Appressoriums. (Raster-Elektronenmikroskopische (REM) Aufnahme von Karen Snetselaar, Quelle: <http://staging.sju.edu/>) (5) Intrazelluläre Proliferation im pflanzlichen Gewebe; die *U. maydis* Hyphe (rot) ist komplett von der Plasmamembran der Pflanze (grün) umschlossen, die Pflanzenzelle bleibt intakt. Abbildung aus (Döhlemann *et al.*, 2009). (6) Infizierter Maiskolben. Die weißen, tumorartigen Gallen wurden jeweils aus einem Maiskorn gebildet und beinhalten die schwarzen Teliosporen, die nach dem Aufplatzen der Tumore freigesetzt werden. Abbildung zur Verfügung gestellt von Kai Hofmann. (7) Ausdifferenzierte Teliosporen (Quelle: <http://padil.gov.au/>).

Fünf bis sechs Tage nach der Infektion kommt es zu massiver Proliferation und Verzweigung des Myzels, sowie einer erhöhten Teilungsrate und Hypertrophie der pflanzlichen Zellen. Letzteres führt zu Bildung der Tumore (Abb. 4 (6)), in denen die Sporogenese von *U. maydis* stattfindet. Dabei fragmentieren Teile der Hyphe und differenzieren nach der Karyogamie zu den diploiden Teliosporen (Abb. 4 (7)), die aus den Tumoren freigesetzt werden (Banuett und Herskowitz, 1996; Snetselaar und

Mims, 1993). Die Sporen stellen die Verbreitungsform von *U. maydis* dar und können durch Wind, Regen, Insekten oder andere Vektoren verbreitet werden bzw. im Boden überdauern. Unter geeigneten Wachstumsbedingungen keimen diese aus, und der diploide Zellkern unterzieht sich einer Meiose. Von einem Promyzelium werden anschließend durch sukzessive Sprossung haploide Sporidien frei, was den Lebenszyklus komplettiert (Christensen, 1963). Bisläng ist es nicht möglich, den Lebenszyklus unter *in vitro* Bedingungen zu rekonstituieren, was darauf hindeutet, dass für eine erfolgreiche Infektion und Kolonisierung spezifische Signale von der Wirtspflanze unerlässlich sind.

1.3.3 Kontrolle der sexuellen Entwicklung durch die Paarungstyp-Loci

Wie in allen Brandpilzen ist die pathogene Wachstumsphase von *U. maydis* eng an die sexuelle Entwicklung gekoppelt. Die Paarungstyp-Loci steuern den Eintritt in die sexuelle Entwicklungsphase und gewährleisten genetische Vielfalt (Casselton und Olesnicky, 1998). In tetrapolaren Systemen existieren zwei Paarungstyp-Loci, die meist als *A*- und *B*-Locus bezeichnet werden und typischerweise für ein Pheromon/Pheromon-Rezeptorsystem sowie Homeodomänen-Transkriptionsfaktoren kodieren (Morrow und Fraser, 2009). In *U. maydis* kodiert der biallelische *a*-Locus für ein Pheromon/Pheromon-Rezeptorsystem, über das die Zell/Zellerkennung und die anschließende Zellfusion gesteuert werden (Bölker *et al.*, 1992). Nach der Zellfusion steht die weitere sexuelle und pathogene Entwicklung unter der Kontrolle des multiallelischen *b*-Locus, der für die Homeodomänenproteine *bEast* (*bE*) und *bWest* (*bW*) kodiert (Gillissen *et al.*, 1992; Schulz *et al.*, 1990). Die Expression kompatibler *bE/bW*-Allele ist sowohl notwendig, als auch hinreichend für die Induktion und Vollendung der pathogenen Entwicklung von *U. maydis* (Bölker *et al.*, 1995; Kämper *et al.*, 2006).

Der *a*-Locus steuert die Zellerkennung und Zellfusion.

Das Pheromon *Mfa* („mating factor a“) sowie der Pheromon-Rezeptor *Pra* („pheromone receptor a“) werden vom biallelischen *a*-Locus kodiert (Abb. 5A). Das Pheromon-Vorläuferpeptid *Mfa1* umfasst 40 Aminosäuren, das *Mfa2* Peptid 38 Aminosäuren. Aus diesen Vorläufern entstehen nach post-translationalen Modifikationen die 13- bzw. neun Aminosäuren langen Lipopeptid-Pheromone, die an ihrem Carboxy-Terminus farnesyliert und methyliert sind (Spellig *et al.*, 1994). Der *a2*-Locus umfasst zusätzlich zu den Genen *mfa2* und *pra2* die Gene *lga2* und *rga2* (Mahlert *et al.*, 2009; Urban *et al.*, 1996a), deren Genprodukte in Mitochondrien lokalisieren. Dort fungieren sie bei mitochondrialen Fusionsdynamiken und vermitteln die *a2*-abhängige uniparentale Vererbung mitochondrialer DNA während der sexuellen Entwicklung (Bortfeld *et al.*, 2004; Fedler *et al.*, 2009; Mahlert *et al.*, 2009). Die Pheromone eines Paarungstyps können vom Pheromon-Rezeptor eines kompatiblen Paarungstyps perzipiert werden und mit diesem interagieren (Bölker *et al.*, 1992). Die Pheromon-Rezeptoren *Pra1* und *Pra2* gehören zur Familie der Ste3p-ähnlichen Pheromon-Rezeptoren aus *Saccharomyces*

cerevisiae. Sie umfassen 357- bzw. 420 Aminosäuren und bilden jeweils sieben Transmembran-Domänen aus, die an heterotrimere G-Proteine gekoppelt sind (Bölker *et al.*, 1992).

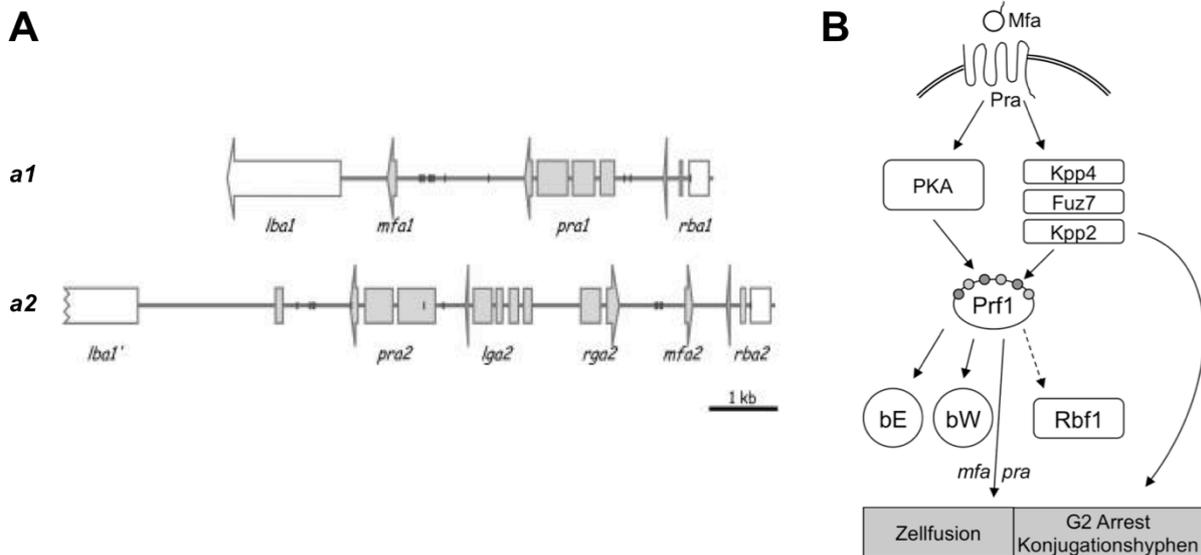


Abbildung 5: Der a-Paarungstyp-Locus. (A) Schematische Darstellung der Gene im a-Locus. Der *a1*-Locus kodiert für das Pheromon-Vorläuferprotein Mfa1 sowie den Pheromon-Rezeptor Pra1. Der *a2*-Locus beinhaltet neben den Genen *mfa2* und *pra2* zusätzlich die Gene *lga2* und *rga2*. Abbildung modifiziert nach (Schirawski *et al.*, 2005). **(B)** Schematische Darstellung der durch Pheromonstimulation induzierten Signaltransduktions-Kaskaden. Durch die Bindung des Pheromons Mfa an den Pheromon-Rezeptor Pra werden die durch Phosphorylierung vermittelten Signaltransduktions-Kaskaden ausgelöst. In Folge bindet der durch den Phosphotransfer aktivierte Transkriptionsfaktor Prf1 an sog. Pheromon-Response Elemente auf DNA-Ebene, was weitere Schritte der pathogenen Entwicklung induziert. Der G2-Zellzyklusarrest und die Ausbildung von Konjugationshyphen werden durch Kpp2, jedoch unabhängig von Prf1, reguliert. Abbildung aus (Heimel, 2010).

Die Perzeption des Lipopeptid-Pheromons durch den Pheromon-Rezeptor löst eine Reihe morphologischer Veränderungen aus. So kommt es zur Ausbildung von polar wachsenden Konjugationshyphen, die entlang des Pheromon-Gradienten aufeinander zuwachsen und schließlich an den Hyphenspitzen fusionieren (Snetselaar *et al.*, 1996; Spellig *et al.*, 1994). Gleichzeitig erfolgt der Arrest des Zellzyklus (Garcia-Muse *et al.*, 2003). Auf molekularer Ebene wird durch die Bindung des Pheromons während des Matings eine komplexe Signal-Kaskade ausgelöst, die zur Aktivierung von Pheromon-Response-Elementen (PREs) in den regulatorischen Regionen Mating-spezifischer Gene führt (Urban *et al.*, 1996b). Das Signal wird über zwei konservierte Signalwege weitergeleitet; zum einen über den cAMP-abhängigen Protein Kinase A-Weg (PKA) und zum anderen über das Mitogen-aktivierte Protein Kinase (MAPK) Modul (Abb. 5B). Die zentralen Komponenten der MAPK-Kaskade sind Kpp4, Fuz7 sowie Kpp2 und führen zum G2-Zellzyklusarrest, sowie zur Ausbildung von Konjugationshyphen. In Folge der Pheromon-induzierten Aktivierung dieser beiden Kaskaden treffen die Signale auf einen zentralen Transkriptionsfaktor, Prf1 (Kaffarnik *et al.*, 2003). Da Prf1 essentiell für das Mating ist, wird es als zentraler Regulator für die weitere pathogene Entwicklung angesehen. Prf1 wird differentiell von der cAMP-abhängigen Protein Kinase Adr1, sowie von der MAPK Kpp2 phosphoryliert. In Abhängigkeit seines Phosphorylierungsstatus wird daraufhin die Expression einer unterschiedlichen Anzahl abwärts gelegener Gene induziert. Zu den Zielgenen von Prf1 zählen *prf1*

selbst, die *a*-Locus Gene *mfa* und *pra*, die *b*-Locus Gene *bE* und *bW* (Hartmann *et al.*, 1996; Urban *et al.*, 1996a), sowie *rbf1*, das für einen C2H2-Zinkfinger Transkriptionsfaktor kodiert (Zarnack *et al.*, 2008).

Der *b*-Locus als zentraler Schalter der pathogenen Entwicklung

Nach der Zellfusion ist *U. maydis* für alle weiteren Schritte des Entwicklungszyklus auf seine Wirtspflanze angewiesen. Der *b*-Locus kontrolliert nach der Fusion zweier kompatibler Sporidien sämtliche für die Pathogenität essentiellen Schritte, wie die Etablierung des infektiöns-kompatiblen Hetero-Dikaryons und die Kolonisierung der Pflanze (Gillissen *et al.*, 1992; Kämper *et al.*, 1995), weshalb er als zentraler Schalter für den Übergang von der saprophytischen in die biotrophe, pathogene Phase gilt. Im Gegensatz zum biallelischen *a*-Locus liegt der *b*-Locus in mindestens 19 verschiedenen Allelen vor und umfasst zwei Gene, *bEast* (*bE*) und *bWest* (*bW*), die von einem gemeinsamen Promotor-Element gegenläufig zueinander transkribiert werden. Ihre Genprodukte von 473 bzw. 645 Aminosäuren Länge weisen trotz geringer Sequenzhomologie einen ähnlichen strukturellen Aufbau auf (Abb. 6A). Für die DNA-Bindung sind die zentral gelegenen Homeodomänen verantwortlich. Während die Carboxy-terminalen Bereiche der einzelnen *b*-Allele untereinander eine große Sequenzhomologie aufweisen, sind ihre Amino-terminalen Bereiche hoch variabel. Die variablen Bereiche sind essentiell für die Hetero-Dimerisierung von *bE* und *bW*, die jedoch nur stattfinden kann, wenn beide Komponenten von unterschiedlichen Allelen stammen (Kämper *et al.*, 1995). Fusionieren zwei Sporidien mit identischem *b*-Locus, so kann kein funktionelles *bE/bW*-Heterodimer gebildet werden und die weitere pathogene Entwicklung wird unterbunden (Abb. 6B).

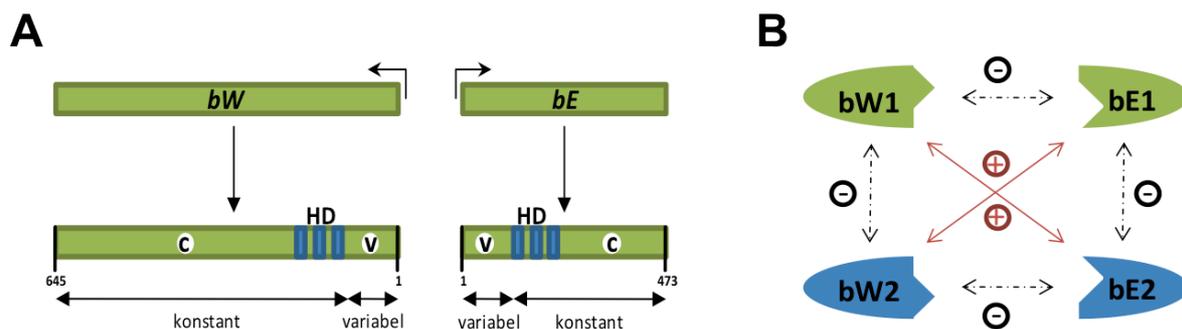


Abbildung 6: Der *b*-Paarungstyp-Locus. (A) Schematische Darstellung der Gene im *b*-Locus. *bE* und *bW* werden gegenläufig zueinander von einem gemeinsamen Promotor transkribiert. Daraus resultieren die beiden Genprodukte, *bE* und *bW*, die jeweils einen konstanten, C-terminalen Bereich, in dem die Homeodomäne liegt, sowie einen variablen N-terminalen Bereich aufweisen. (B) Allel-spezifische Dimerisierung von *bE* und *bW*. Nur wenn beide Proteine von unterschiedlichen Allelen stammen, kommt es zur Heterodimerisierung und somit zu einem funktionellen Transkriptionsfaktor. Abbildung modifiziert nach (Brachmann, 2001).

1.3.4 Die *b*-vermittelte Genregulationskaskade

In Folge der Fusion zweier kompatibler, haploider Sporidien wird ein aktives bE/bW-Heterodimer gebildet, das als Transkriptionsfaktor fungiert und sog. *b*-Bindestellen in den Promotorregionen von *b*-abhängig regulierten Genen erkennt (Brachmann, 2001; Romeis *et al.*, 2000). Die Bildung des Heterodimers führt zur Induktion des filamentösen Wachstums und Zellzyklus-Arrest und leitet die pathogene Entwicklungsphase ein.

In verschiedenen Studien konnten zunächst 22 Gene als *b*-reguliert identifiziert werden (Brachmann *et al.*, 2003; Brachmann *et al.*, 2001; Flor-Parra *et al.*, 2007; Flor-Parra *et al.*, 2006; Romeis *et al.*, 2000; Schauwecker *et al.*, 1995; Scherer *et al.*, 2006). *U. maydis* Stämme, die unter Verwendung von regulierbaren Promotoren induzierbare *bE1/bW2*-Kombinationen exprimieren (Brachmann *et al.*, 2001), wurden verwendet, um ein globales und zeitlich aufgelöstes Bild aller Gene zu erlangen, die über den bE/bW-Komplex reguliert werden. Der Einsatz dieser *b*-induzierbaren Stämme in Kombination mit der Affymetrix Microarray-Technologie für Genom-weite Transkriptionsanalysen führte zur Identifizierung von 345 *b*-abhängig exprimierten Genen, deren Expression binnen 12 Stunden nach der Bildung des aktiven bE/bW-Heterodimers differenziell reguliert wird (Heimel *et al.*, 2010b). Eine funktionelle Klassifizierung dieser deregulierten Gene deutete darauf hin, dass verschiedene zelluläre Prozesse, wie Zellzyklus-Koordination und Mitose, Morphogenese und Pathogenität während des Umschaltens vom vegetativen Wachstum zum filamentösen, pathogenen Wachstum beeinflusst werden (Heimel *et al.*, 2010b). Der Großteil der *b*-abhängig regulierten Gene weist jedoch keine *b*-Bindestellen in ihren Promotor-Regionen auf, was auf eine indirekte Regulation über eine bE/bW-Heterodimer induzierte transkriptionelle Signal-Kaskade schließen lässt (Abb. 7).

90% der Gene, die nach der Aktivierung von bE/bW eine veränderte Expression aufweisen, werden durch den C2H2-Zinkfinger Transkriptionsfaktor Rbf1 reguliert, einer der wenigen Zielfaktoren, die direkt über das Heterodimer gesteuert werden (Heimel *et al.*, 2010b). Die Deletion von *rbf1* führt zum Verlust der Pathogenität und des *b*-induzierten, filamentösen Wachstums; die Überexpression hingegen induziert filamentöses Wachstum und Zellzyklus-Arrest auch ohne ein aktives bE/bW-Heterodimer. Mit Rbf1 konnte somit der zentrale Regulator der Transkriptionskaskade ermittelt werden. Weiter abwärts in der b/Rbf1-induzierten Kaskade befindet sich eine Reihe von weiteren Transkriptionsfaktoren, die kollektiv zur Zellzyklus-Regulation sowie zum dimorphen Wechsel vom haploiden, Hefe-artigen Wachstum zum polaren Wachstum des Filaments beitragen.

Ein Rbf1-abhängig regulierter Faktor ist Biz1, ein Zinkfinger-Transkriptionsfaktor, der über die Repression des Zyklins Clb1 in den G2-Zellzyklus-Arrest involviert ist. Darüber hinaus wird Biz1 für die Induktion von Appressorien benötigt (Flor-Parra *et al.*, 2006) und reguliert die Expression von mehreren „Cluster“-Genen, die für eine Vielzahl an sekretierten, pathogenitäts-relevanten Proteinen kodieren. Die Deletion von *biz1* führt aus diesem Grund zur vollständigen Reduktion der Tumorbildung (Vranes, pers. Mitteilung). Zwei weitere durch Rbf1 induzierte Transkriptionsfaktoren sind die Homeodomänen-Proteine Hdp1 und Hdp2, die an Zellzyklus-Kontrolle und pathogener

Entwicklung beteiligt sind. Hdp1 hat wie Biz1 einen Einfluss auf die mitotischen Zykline Clb1 und Pcl12 (Pothiratana, 2007). Die Deletion von *hdp1* oder *pcl12* führt zu reduziertem filamentösem Wachstum, jedoch nicht zum Verlust der Pathogenität. Hdp2 hingegen ist essentiell für die pathogene Entwicklung von *U. maydis*, da die Deletion von *hdp2* zum Verlust der Appressorien-Bildung führt (Goos, 2007; Scherer, pers. Mitteilung).

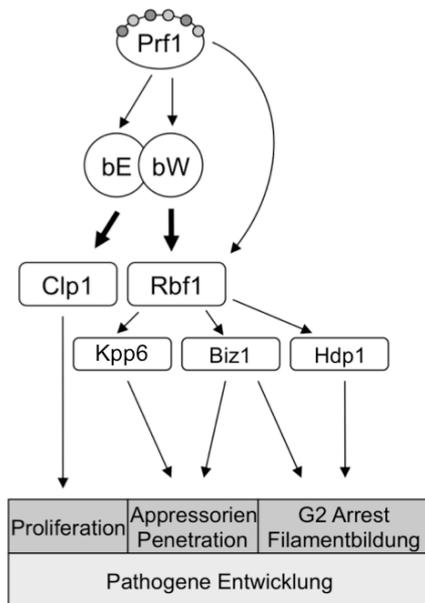


Abbildung 7: Schematische Darstellung der zentralen Faktoren innerhalb der b-vermittelten Regulationskaskade. Das bE/bW-Heterodimer ist nach der Zellfusion die Schlüsselkomponente für die Regulation der sexuellen, pathogenen Entwicklung. Neben dem Clp1-Protein, das für die *in planta* Proliferation benötigt wird, wird Rbf1 direkt durch das bE/bW-Heterodimer reguliert. Rbf1 gilt als zentraler transkriptioneller Regulator, der über den Transkriptionsfaktor Biz1 und die MAP-Kinase Kpp6 Appressorien-Bildung und Pflanzen-Penetration steuert, und über das Zusammenwirken von Biz1 und Hdp1 den G2 Zellzyklusarrest reguliert. Abbildung modifiziert nach (Heimel *et al.*, 2010b).

Weiterhin steuert Rbf1 die Expression der MAPK Kpp6, über die Gene reguliert werden, die für eine effiziente Penetration der Pflanzenoberfläche benötigt werden. Die Deletion von *kpp6* führt zu verminderter Pathogenität, da $\Delta kpp6$ -Mutanten zwar Appressorien bilden, diese jedoch in ihrer Fähigkeit, die Pflanzenoberfläche zu penetrieren, eingeschränkt sind (Brachmann, 2003). Weiter abwärts in der Regulationskaskade befinden sich Gene, die ausschließlich während des Wachstums innerhalb der Pflanze induziert werden und für eine erfolgreiche Kolonisierung der Wirtspflanze benötigt werden. Dazu zählt Fox1, ein Transkriptionsfaktor, der während der biotrophen Phase *in planta* exprimiert wird (Zahiri *et al.*, 2010). Fox1 reguliert wiederum mehrere Effektor-Proteine, die einen Einfluss auf die pathogene Entwicklung und die Unterdrückung der Pflanzen-Abwehr nehmen, was die reduzierte Virulenz und verminderte Tumor-Bildung in *fox1*-Deletionsstämmen erklärt.

1.4 Schnallenbildung und Zellkernverteilung

Das Wachstum als heterodikaryotische Hyphe erfordert eine präzise Positionierung der genetisch verschiedenartigen Zellkerne innerhalb der Zelle. Insbesondere während der Mitose ist eine zeitlich exakt abgestimmte Koordinierung der Zellkern-Migration, der Regulation des Zellzyklus, Septierung und polarem Wachstum der Hyphe von besonderer Bedeutung. In Basidiomyzeten wird dies durch die Ausbildung von sog. Schnallenzellen erreicht, die bereits eingehend in *Schizophyllum commune* und *Coprinus cinereus* untersucht wurden (Kamada, 2002; Kües, 2000). Der komplexe Ablauf dieses

Entwicklungsprozesses wird durch die Paarungstyp-Loci, *A* und *B*, gesteuert. Die Zellfusion und der gegenseitige Austausch der Zellkerne stehen unter der Kontrolle des durch den *B*-Locus kodierten Pheromon/Pheromon-Rezeptorsystems (ähnlich zum *a*-Locus von *U. maydis*). Nach der Etablierung des Heterodikaryons sind die Kernwanderung, die synchrone Teilung beider Kerne und die Septierung abhängig von kompatiblen *A*-Genen, die analog zu den *b*-Genen von *U. maydis* für Homeodomänen-Transkriptionsfaktoren kodieren. Schnallenzellen werden an der apikal gelegenen Hyphenzelle an der Stelle des künftigen Septums gebildet. Die beiden Zellkerne unterziehen sich dort einer synchronen Kernteilung. Vom ersten sich teilenden Paar wandert ein Kern in die Schnallenzelle ein, während der andere in Richtung Hyphenspitze gelangt (Abb. 8). Durch kontrollierte Septierung und Fusion der Schnallenzelle mit dem distalen Hyphenkompartiment wird der dikaryotische Zustand gewährleistet. In *C. cinereus* ist das Clp1-Protein notwendig und ausreichend, um die Schnallenbildung zu induzieren (Inada *et al.*, 2001).

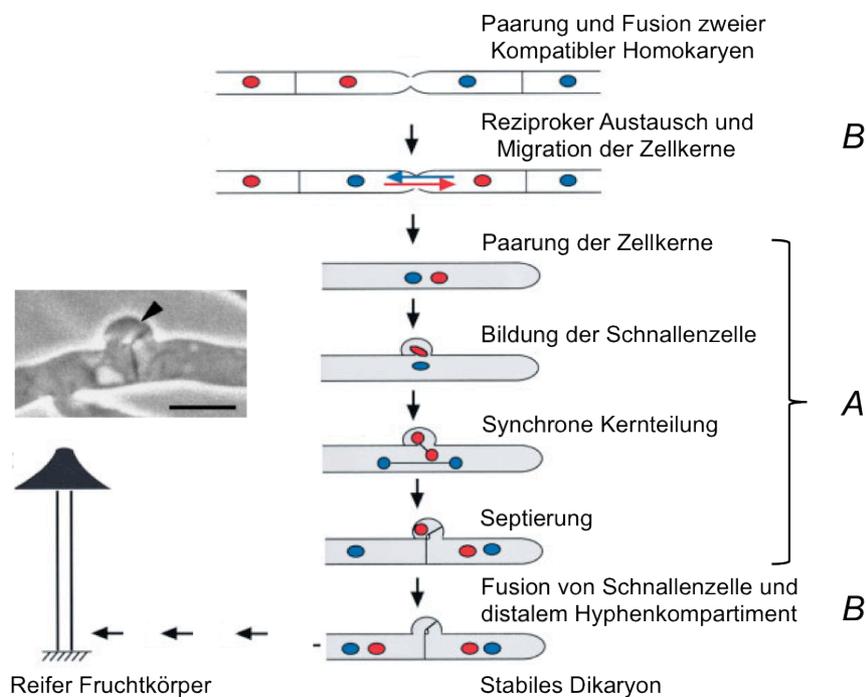


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Zellkernverteilung in Basidiomyceten am Beispiel von *Coprinus cinereus*. Nach der Fusion zweier kompatibler Stämme kommt es zum reziproken Austausch der Zellkerne, was zur Bildung eines Dikaryons mit den typischen Schnallenstrukturen (Pfeilspitze in der Phasenkontrast-Aufnahme, Längenmaßstab = 5 µm) führt. Einzelheiten siehe Text. Die Schnallenbildung ist abhängig von den Paarungstyp-Loci, *A* und *B*. Abbildung modifiziert nach (Kamada, 2002).

In *U. maydis* findet die Schnallenbildung ausschließlich während der biotrophen Entwicklung innerhalb der Pflanze statt. Wie in *C. cinereus* ist das Clp1-Protein essentiell für die Entwicklung der Schnallenzellen (Scherer *et al.*, 2006). *clp1*-Deletionsstämme können die Wirtspflanze zwar noch penetrieren, mitotische Zellteilungen, die Entwicklung des Dikaryons und damit die frühen Schritte der biotrophen Interaktion sind jedoch blockiert (Scherer *et al.*, 2006). *clp1* zählt zu den wenigen direkt durch das bE/bW-Heterodimer regulierten Genen. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass das Clp1-Protein neben bWest mit Rbf1, dem zentralen Regulator der pathogenen Entwicklung, interagiert

(Heimel *et al.*, 2010a). Die Interaktion von Clp1 mit bW führt zum Verlust der *b*-abhängigen Funktionen, wie dem G2-Zellzyklus-Arrest und filamentösem Wachstum, und in Folge zur globalen Repression der *b*-abhängigen Genregulation. Die Interaktion mit Rbf1 hingegen hat die Repression der *a*-abhängigen Pheromon-Antwort zur Folge. Durch das koordinierte Zusammenspiel von Clp1 mit bW und Rbf1 werden die *a*- UND *b*-abhängigen Funktionen des Zellzyklus-Arrests reguliert, was die Re-Initiation des Zellzyklus nach der Penetration der Pflanzenoberfläche und damit die weitere biotrophe Entwicklung *in planta* ermöglicht (Heimel *et al.*, 2010a).

1.5 Das Num1-Protein ist notwendig für das polare Hyphenwachstum

Um weitere Einblicke in die komplexen Prozesse, die der Bildung und Aufrechterhaltung des dikaryotischen Zustands zugrunde liegen, zu erlangen, wurde anhand eines Kandidatengen-Ansatzes die Funktion von Genen analysiert, für die eine putative Funktion während der Zellkern-Migration und/oder der Determination der Zellpolarität wahrscheinlich ist. In *C. cinereus* wurde das Num1-Protein als wichtiger Faktor für diese Prozesse identifiziert. *C. cinereus* wächst im Gegensatz zu *U. maydis* ausschließlich als filamentöse Hyphe; das Mating wird durch die Anastomose (Fusion) zweier Hyphen mit kompatiblen Allelen der beiden Paarungstyp-Loci initiiert, gefolgt von der Wanderung je eines „Donor“-Zellkerns in das „Akzeptor“-Myzelium, was zur Bildung eines heterodikaryotischen Filaments führt (Kamada, 2002; Kües, 2000). Isoliert wurde das *num1*-Gen von *C. cinereus* durch ein Mutagenese-Experiment, in dem Mutanten identifiziert wurden, die einen Defekt bei der Zellkernwanderung während der Anastomose kompatibler haploider Stämme aufwiesen (Makino und Kamada, 2004). Die so identifizierten Stämme konnten in Kreuzungen mit kompatiblen Testerstämmen zwar noch einen Zellkern in das Partnermyzelium abgeben, jedoch konnten sie ihrerseits keine Zellkerne empfangen und der dikaryotische Zustand konnte in den entstandenen Mutanten nicht etabliert werden. Die molekulare Charakterisierung der *num1*-Mutation ergab, dass es sich um ein dominant-negatives Allel handelte (*num1-1*), das zu einer verkürzten Version des Num1-Proteins führt. Mittels BLASTp-Analyse wurde in *U. maydis* ein Protein mit etwa 40%-iger Sequenzhomologie (Um01682) ermittelt (<http://mips.helmholtz-muenchen.de/genre/proj/ustilago/>), das darüber hinaus Ähnlichkeiten zum humanen SPF27/BCAS2-Protein (Breast Cancer Amplified Sequence 2) aufweist. Dies wird in verschiedenen humanen Brustkrebs-Zelllinien verstärkt exprimiert (Nagasaki *et al.*, 1999) und gilt außerdem als transkriptioneller Co-Aktivatoren des Östrogen-Rezeptors (Qi *et al.*, 2005) sowie als negativer Regulator des p53 Tumorsuppressors (Kuo *et al.*, 2009), was eine erhöhte Disposition gegenüber Brustkrebs wahrscheinlich macht. In der klinischen Diagnostik wird das Gen als Brustkrebsmarker verwendet. Anhand von massenspektrometrischen Analysen wurde gezeigt, dass das SPF27/BCAS2-Protein mit dem Spleißosom assoziiert ist (Neubauer *et al.*, 1998); inzwischen gilt das Protein als Kernkomponente des Prp19/CDC5L-Komplexes (NTC), der essentiell für die Regulation der spleißosomalen Konformationen ist und maßgeblich zur Effizienz und Genauigkeit während der Spleißing-Vorgänge beiträgt (Hogg *et al.*, 2010) (siehe 1.6).

Erste Untersuchungen zur molekularen Funktion des Num1-Proteins in *U. maydis* ergaben, dass es sich um einen Pathogenitätsfaktor handelt, da die Deletion des Gens zum vollständigen Verlust der Tumorbildung führte (Heimel, 2010). Durch die fluoreszenzmikroskopische Analyse eines Num1:3eGFP-Fusionsproteins konnte gezeigt werden, dass das Protein wie das humane Homolog (Maass *et al.*, 2002) prädominant im Zellkern lokalisiert (Kellner, 2009). Zusätzlich konnten distinkte Foci im Zytoplasma der untersuchten Zellen detektiert werden (Abb. 9).

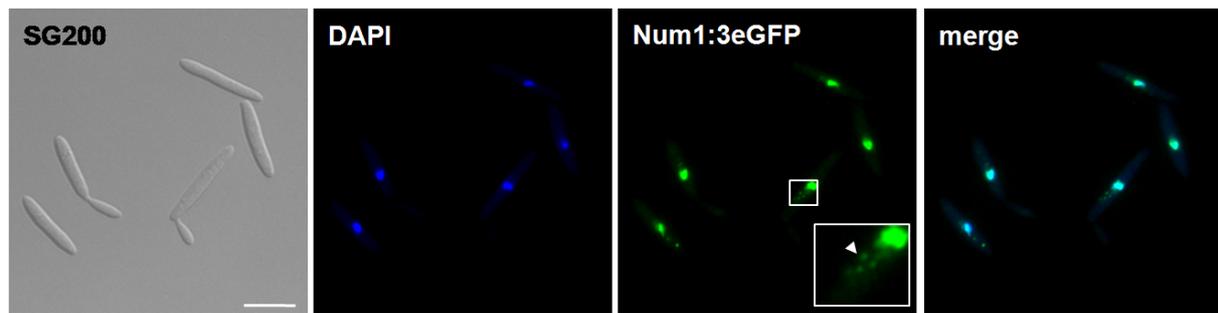


Abbildung 9: Subzelluläre Lokalisierung des Num1:3eGFP-Fusionsproteins. Haploide Sporidien wurden während der exponentiellen Wachstumsphase fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Gezeigt sind eine DIC-Durchlichtaufnahme, das DAPI- und GFP-Fluoreszenzsignal, sowie die Überlagerung beider Kanäle. Das Num1-Protein lokalisiert prädominant im Zellkern. Zusätzlich können jedoch distinkte Foci im Zytoplasma detektiert werden (Pfeilspitze). Der Längenmaßstab entspricht 5 µm.

Tabelle 1: Übersicht der im Hefe-Zwei-Hybrid System isolierten Klone.

Nr.	Accession ^a	Beschreibung ^b	Mögliche Funktion ^c
3	um03539	konserviertes, hypothetisches Protein (BAR Domäne)	Protein-Transport
14	um00933	konserviertes, hypothetisches Protein	Vesikel-vermittelter Transport
15	um12306	Med7 – aus RNA polymerase II Mediator Komplex	Transkriptions-Regulation
17	um10158	Adapter-ähnlicher Protein Komplex 1 beta 1 Untereinheit (Adaptin)	Vesikel-vermittelter Transport, Endozytose (Clathrin Adapter Komplex)
18	um11510	konserviertes, hypothetisches Protein (BRO1 Domäne)	Protein-Transport
19	um05042.2	konserviertes, hypothetisches Protein	unbekannt
20	um04218	Kin1 – Kinesin 1 Motor Protein	Langstreckentransport, Dynein-Lokalisierung, CHS Sekretion
22	um10174	konserviertes, hypothetisches Protein (Hamartin Domäne)	unbekannt
24	um10958	Kinetochore-assoziiert 2 (HEC)	Chromosomen-Segregation
25	um05908	konserviertes, hypothetisches Protein	unbekannt
27	um00523	Cdc36 – Transkriptionsfaktor	Transkription
30	um02361	ATPase Inhibitor, mitochondrieller Vorläufer	Elektronen-Transfer
31	um10672.2	hypothetisches Protein	unbekannt
32	um05378	Dnm1 –mitochondrieller Spaltungsfaktor	Teilung von Zellorganellen (Mitochondrien), Endozytose, Endosomen-Transport
33	um04411	Cef1 –G2/M Transition benötigt	Spleißing, Zellzyklus-Regulation

^a - Bezeichnung der gemäß der MUMDB (<http://mips.helmholtz-muenchen.de/genre/proj/ustilago>) vorhergesagten und durch BLASTp-Analyse identifizierten offenen Leserahmen

^b - Name des Proteins bzw. Name des ähnlichsten bekannten Proteins gemäß MUMDB (<http://mips.helmholtz-muenchen.de/genre/proj/ustilago>)

^c - Putative Funktion der isolierten Proteine

In gelb dargestellt sind Proteine mit einer putativen Funktion während Vesikel-vermittelter Transportprozesse oder Endozytose, in blau hervorgehoben ist Cef1 als weitere Kernkomponente aus dem Spleißosom-assoziierten NTC.

Die Identifizierung putativer Num1-Interaktionspartner durch eine Hefe-Zwei-Hybrid Analyse (Fields und Song, 1989) sollte zusätzlichen Aufschluss bezüglich der molekularen Funktion des Num1-Proteins liefern. In Übereinstimmung mit einer möglichen Funktion innerhalb des Spleißosom-assoziierten NTC wurde das Cef1-Protein als Num1 Interaktionspartner isoliert, dessen Homologe Cef1p aus *S. cerevisiae*, Cdc5 aus *Schizosaccharomyces pombe* und CDC5L aus *H. sapiens* ebenfalls als Komponenten des NTC bekannt und essentiell für das prä-mRNA Spleißen sind (Grote *et al.*, 2010; Ohi und Gould, 2002). Darüber hinaus wurden mehrere mit Num1 interagierende Proteine isoliert, für die eine Rolle bei Vesikel-vermittelten Transportprozessen postuliert wurde (Tabelle 1). Die Interaktion mit dem Kin1-Motorprotein konnte *in vitro* durch Co-Immunopräzipitation verifiziert werden (Kellner, 2009). Vorläufige Untersuchungen deuteten darauf hin, dass *num1*- und *kin1*-Deletionsstämme überlappende Phänotypen in Bezug auf die Vakuolenmorphologie und das polare, filamentöse Hyphenwachstum aufweisen, was eine genetische Interaktion und eine gemeinsame Funktion dieser beiden Proteine während des polaren Hyphenwachstums impliziert.

1.6 Aufbau und Funktionen des Spleißosom-assoziierten Prp19/CDC5L-Komplexes

Prä-mRNA Spleißen ist ein essentieller Vorgang bei der eukaryotischen Genexpression. Introns werden dabei aus der unreifen mRNA entfernt und die Exons präzise ligiert. Durch diese post-transkriptionelle Prozessierung wird ein reifes Transkript generiert, das anschließend translatiert werden kann. Das Spleißosom katalysiert zwei sequenzielle trans-Esterifizierungs-Reaktionen, die eine präzise Erkennung von konservierten RNA-Sequenzen innerhalb der Intron-Regionen sowie erhebliche Konformationsänderungen innerhalb der beteiligten Komponenten erfordern (Wahl *et al.*, 2009; Will und Luhrmann, 2011). Es besteht aus fünf snRNP („small nuclear ribonucleoprotein“-) Partikeln, von denen jedes aus einer snRNA („small nuclear RNA“) und einem distinkten Set an Proteinen aufgebaut ist; zusätzlich ist eine Vielzahl weiterer Faktoren mit dem Kern-Spleißosom assoziiert, die Schlüsselrollen bei der Zusammensetzung, Reorganisation, Aktivierung oder Regulation des Spleißing-Prozesses einnehmen (Wahl *et al.*, 2009; Will und Luhrmann, 2011). Der Prp19/CDC5L-Komplex („NineTeen-Complex“, NTC) ist ein integraler Bestandteil aktiver Spleißosomen und essentiell für beide Schritte der Intron-Exzision. Der NTC und NTC-assoziierte Proteine werden an das Spleißosom rekrutiert, wo sie Konformationen und Dynamiken der Kern-Spleißosom Komponenten regulieren (Chan und Cheng, 2005; Chan *et al.*, 2003; Fabrizio *et al.*, 2009). RNA-RNA- sowie RNA-Protein Interaktionen werden durch den Komplex stabilisiert, was zu Genauigkeit und Effizienz des Spleißens beiträgt (Gahura *et al.*, 2009; Hogg *et al.*, 2010; Villa und Guthrie, 2005).

Namensgebend für den NTC ist das Prp19p-Protein aus *S. cerevisiae*, das als erste Komponente aus dem Komplex als essentieller Spleißing-Faktor identifiziert wurde (Cheng *et al.*, 1993; Vijayraghavan

et al., 1989). Eine weitere Kern-Komponente aus dem NTC ist Cef1p, ein Homolog des *S. pombe* Cdc5-Proteins, das bereits in vielen Spezies untersucht wurde, darunter *H. sapiens* (Bernstein und Coughlin, 1998), *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans* (Ohi *et al.*, 1998), *Arabidopsis thaliana* (Hirayama und Shinozaki, 1996) und *Xenopus laevis* (Stukenberg *et al.*, 1997). Cdc5-Proteine sind evolutionär hoch konserviert, da *D. melanogaster*, *C. elegans* und *H. sapiens* *cdc5*-cDNAs in der Lage waren die temperatursensitive Letalität von *S. pombe* *cdc5-120* Mutanten zu komplementieren. Das Protein konnte wie Prp19 im Komplex mit Spleißosom-Komponenten identifiziert werden und *CEF1/cdc5*-Mutanten können in *S. cerevisiae* bzw. *S. pombe* den ersten katalytischen Schritt beim Spleißen nicht ausführen (Burns *et al.*, 1999; McDonald *et al.*, 1999). Insgesamt besteht der NTC in *S. cerevisiae* aus acht Kern-Komponenten, Prp19p, Cef1p, Syf1p, Syf2p, Syf3p, Snt309p, Isy1p und Ntc20p (Tabelle 2), die den Spleißing-Defekt in *PRP19*-Mutanten komplementieren können (Fabrizio *et al.*, 2009; Tarn *et al.*, 1994). Der gesamte NTC ist evolutionär zwischen Hefe und Mensch konserviert. *S. cerevisiae*-, *S. pombe*- und Säugerzellen enthalten eine nahezu identische Zusammensetzung und Funktion des Komplexes (Ajuh *et al.*, 2000; Grote *et al.*, 2010; Ohi und Gould, 2002) (Tabelle 2, siehe auch Abb. 56A). Das Num1/SPF27-Protein ist interessanterweise eine Ausnahme, da es im Genom von *S. cerevisiae* nicht vertreten ist, jedoch durch ein funktionelles Äquivalent, das Snt309p-Protein (Chen *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 1999; Ohi *et al.*, 2002), substituiert wurde.

Tabelle 2: NTC-Kernkomponenten aus *S. cerevisiae* und homologe Proteine

<i>S. cerevisiae</i>	<i>H. sapiens</i>	<i>S. pombe</i>	<i>U. maydis</i>
Prp19p	hPrp19	Prp19/Cwf8	Prp19
Cef1p	CDC5L	Cdc5	Cef1
Prp46p	PLR1	SpPrp5	Um11036
(Snt309p)	SPF27/BCAS2	Cwf7	Num1
Syf1p	hSyf1/XAB2	Cwf3	Um03842
Syf2p	GCIP-IP	Syf2	unbekannt
Isy1p	hIsy1/KIAA1160	Cwy12	Um01323
Ntc20p	unbekannt	unbekannt	unbekannt

Weitere NTC-assoziierte Proteine sind lose und dynamisch mit dem Komplex verbunden (Ren *et al.*, 2011) und verleihen ihm zusätzliche Funktionen. Neben der Funktion beim prä-mRNA Spleißen sind der NTC und NTC-assoziierte Proteine in weitere zelluläre Prozesse involviert. Cdc5-Proteine mit Homologien zu *S. pombe* Cdc5 und *S. cerevisiae* Cef1p wurden ursprünglich als Zellzyklus-Faktoren („cell division cycle“) isoliert, die für den Übergang von der G2- in die Mitose-Phase benötigt werden (Bernstein und Coughlin, 1998; Nasmyth und Nurse, 1981; Ohi *et al.*, 1994). Zusätzlich zu ihrer Spleißing-assoziierten Funktion ist Cdc5 also essentiell für die Regulation des eukaryotischen Zellzyklus (Ben-Yehuda *et al.*, 2000; Bernstein und Coughlin, 1998; Burns und Gould, 1999; Gräub *et al.*, 2008; Russell *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2009). Prp19 wurde bereits 1980 als Pso4 in einem Screen für Mutanten isoliert, die Sensitivität gegenüber DNA-schädigenden Agenzien verleihen (Henriques und Moustacchi, 1980). Dementsprechend spielen Prp19-Proteine neben dem Spleißen offenbar auch

eine direkte Rolle bei der Reparatur von DNA-Schäden spielen, eine weitere Funktion des NTC, die zwischen Hefe und Mensch konserviert ist (Beck *et al.*, 2008; Brendel *et al.*, 2003; Grey *et al.*, 1996; Lu und Legerski, 2007; Zhang *et al.*, 2005). Weitere NTC-assoziierte Funktionen schließen Transkriptionsregulation (David *et al.*, 2011) sowie Bildung und Export von mRNP- (Ribonukleoprotein) Partikeln aus dem Zellkern (Chanarat *et al.*, 2012; Chanarat *et al.*, 2011) mit ein; zusätzlich sind weitere Prozesse entdeckt worden, die nicht direkt mit mRNA-Prozessierung verbunden sind, wie Protein-Turnover (Löscher *et al.*, 2005; Sihn *et al.*, 2007), Zellalterung (Kleinridders *et al.*, 2009; Voglauer *et al.*, 2006), Resistenz gegenüber phytopathogenen Krankheitserregern (Monaghan *et al.*, 2009), Zytoskelett-Struktur (Burns *et al.*, 2002) sowie Transport-Prozesse (Dellago *et al.*, 2011; Lleres *et al.*, 2010; Vincent *et al.*, 2003), die von NTC-Komponenten reguliert werden können (siehe auch Diskussion).

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Das Umschalten vom Hefe-artigen Wachstum zur filamentösen Wuchsform ist ein zentraler Prozess für die pathogene Entwicklung von *U. maydis* und das Wachstum in der Wirtspflanze. Mit dem Num1-Protein konnte in vorangegangenen Untersuchungen ein essentieller Faktor für das polare Hyphenwachstum identifiziert werden. Aus Interaktionsstudien ging hervor, dass Num1 mit dem konventionellen Kinesin Motorprotein Kin1 interagiert und funktionell eng mit diesem zusammen wirkt. Das zentrale Ziel der vorliegenden Arbeit bestand in der Charakterisierung der molekularen Funktion des Num1-Proteins insbesondere in Bezug auf Zellkern-Migration und zelluläre (Kin1-abhängige) Transport-Mechanismen, sowie der Regulation des Zellzyklus während des filamentösen Hyphenwachstums von *U. maydis*. Um eine Konservierung der Num1 Funktion zu untersuchen wurden Num1-homologe Proteine wie das AN4244-Protein des Ascomyzeten *Aspergillus nidulans* vergleichend in die Analysen mit einbezogen. Zusätzliche Funktionen des Num1-Proteins konnten nicht ausgeschlossen werden, weshalb die funktionelle Charakterisierung der weiteren Num1-Interaktionspartner ergänzende Rückschlüsse auf die molekulare Funktion des Proteins liefern sollte. Aus Sequenzvergleichen geht hervor, dass Num1 Teil des evolutionär konservierten, Spleißosom-assoziierten NTC ist. Aus diesem Grund bestand ein wesentlicher Aspekt der Arbeit in der Analyse der putativen Komponenten dieses Komplexes in *U. maydis*, sowie einer Genom-weiten Transkriptomanalyse, um den Einfluss von Num1 auf das prä-mRNA Spleißen zu untersuchen. Das Ziel war es zu verstehen, ob die Funktionen von Num1 als Komponente der Spleißing-Maschinerie sowie als Motorprotein-assoziiertes Protein unabhängig voneinander ausgeübt werden, oder ob eine mögliche funktionelle Verbindung zwischen beiden Prozessen existiert.

2. Resultate

Das Num1-Protein (Um01682) wurde anhand eines Kandidatengen-Ansatzes ermittelt, um die komplexen Entwicklungsprozesse zur Regulation der Bildung von Schnallenzellen, der Etablierung und Aufrechterhaltung des dikaryotischen Hyphenwachstums sowie der Proliferation innerhalb der Pflanze besser verstehen zu können. Das Wachstum als Dikaryon erfordert eine präzise Koordination der Zellzyklus-Regulation, der Migration und Verteilung der Zellkerne innerhalb der Hyphe sowie des polaren Wachstums des Filaments. Num1 wurde ursprünglich im Basidiomyceten *Coprinus cinereus* als Faktor für die Zellkernmigration und Polaritäts-Determination identifiziert (Makino und Kamada, 2004). In vorangegangenen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass das Num1-Protein in *U. maydis* eine Rolle während des polaren Hyphenwachstums spielt. Neben dem Kin1-Motorprotein wurden vielfältige Num1-Interaktionspartner isoliert, welche darauf hindeuten, dass das Protein eine putative Funktion während intrazellulärer Transportprozesse ausübt (Kellner, 2009). Das Num1-Protein ist evolutionär konserviert und mit BCAS2/SPF27 besitzt es ein humanes Homolog, das als Komponente innerhalb des Spleißosom-assoziierten NTC bekannt ist. In der vorliegenden Arbeit wurde das Num1-Protein in Bezug auf mögliche Funktionen während des mRNA-Spleißens, aber auch bei Transportprozessen funktionell charakterisiert. Mögliche Mechanismen, die diese beiden ungleichartig erscheinenden Prozesse vereinen können, werden im Anschluss diskutiert.

2.1 Bioinformatische Analyse des Num1-Proteins in *Ustilago maydis*

Das *U. maydis num1*-Gen kodiert für ein potentiell Protein, das 39% Identität und 63% Ähnlichkeit zu Num1 aus *C. cinereus* aufweist ($E = 6 \cdot 10^{-47}$, NCBI BLAST <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Das Protein ist evolutionär konserviert und homologe Proteine treten mit Ausnahme von *Saccharomyces cerevisiae* und verwandten Saccharomycetales in allen eukaryotischen Reichen auf (Abb. 10).

Der vorhergesagte offene Leserahmen des *num1*-Gens ist Intron-los und kodiert für ein Protein von 279 Aminosäuren (AS) (Abb. 11), das eine konservierte BCAS2- (Breast Cancer Amplified Sequence 2) Domäne mit bislang unbekannter Funktion enthält (AS 66-273, PFAM, $E = 1,04 \cdot 10^{-72}$). Proteine, die diese Sequenz beinhalten, sind als BCAS2-Proteine annotiert, da das entsprechende Gen in verschiedenen humanen Brustkrebszelllinien verstärkt exprimiert wird (Nagasaki *et al.*, 1999). Das vorhergesagte *U. maydis* Protein enthält innerhalb der BCAS2-Domäne ein klassisches, basisches Zellkern-Lokalisierungs-Signal (NLS) (S-K-K-R-K-L (AS 266-271), <http://elm.eu.org/>, (Chelsky *et al.*, 1989)). Die N-terminalen 65 Aminosäuren umfassen einen Bereich ohne bekannte Motive oder Domänen und sind spezifisch für *U. maydis* und die nah verwandten Basidiomyceten *Ustilago hordei* (<http://mips.helmholtz-muenchen.de/genre/proj/MUHDB/>) und *Sporisorium reilianum* (<http://mips.helmholtz-muenchen.de/genre/proj/sporisorium/>).

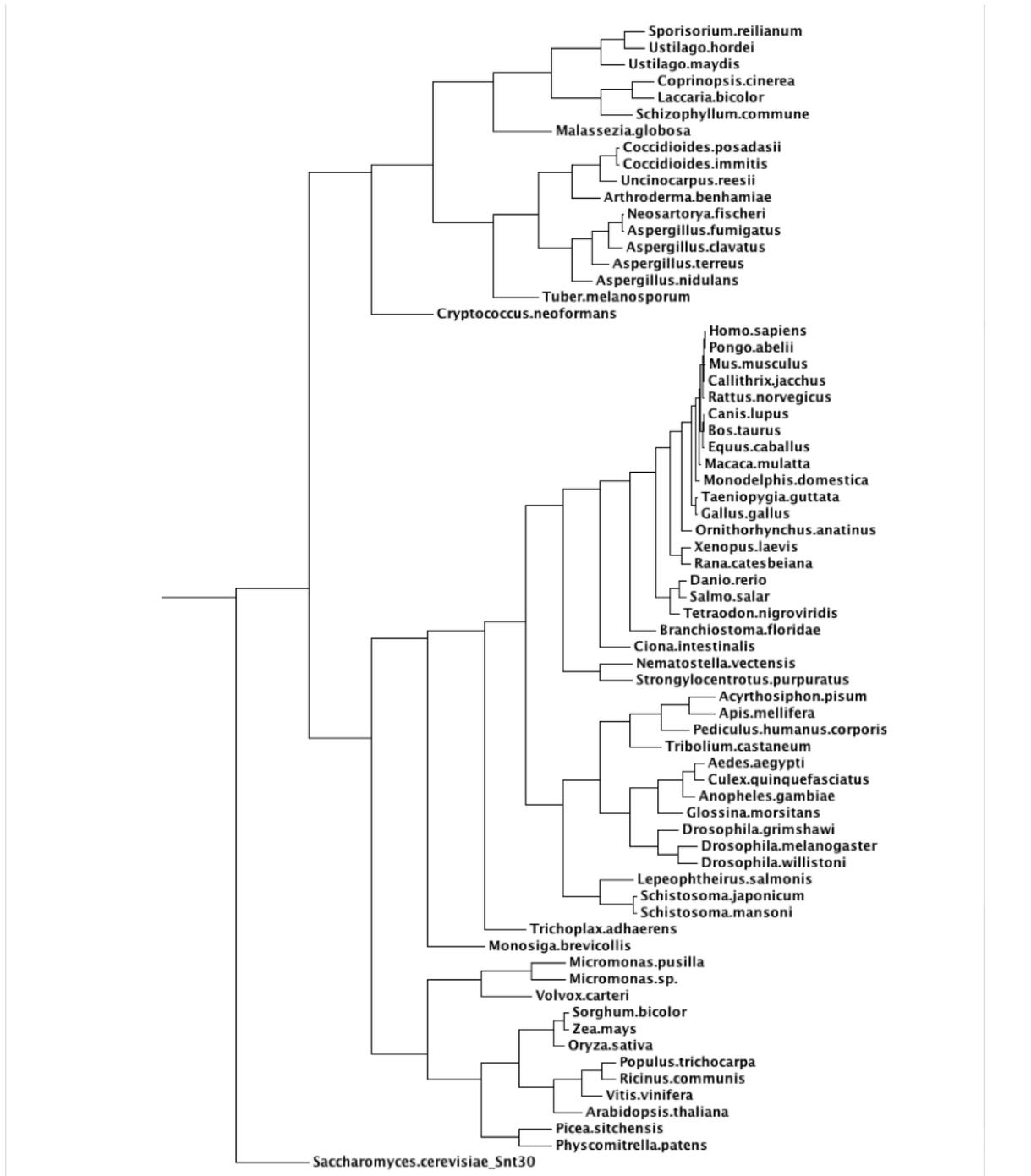


Abbildung 10: Phylogenetische Analyse von Num1-homologen Proteinen. Für eine komparative phylogenetische Analyse der Num1-homologen Proteine wurden die 65 Sequenzen mit der größten Ähnlichkeit zum *U. maydis* Num1-Protein per BLASTp-Analyse gewonnen. Die Sequenz des *Saccharomyces cerevisiae* Snt309p-Proteins wurde als Außengruppe in die Analyse mit einbezogen. Die Sequenzen wurden mit der MAFFT Software (Version 6) und dem G-INS-i Algorithmus abgeglichen. Der phylogenetische Stammbaum wurde anhand der „minimum linkage clustering“ Methode berechnet.

Stamm, der auch ohne Kreuzungstyp-Partner in der Lage ist, die Wirtspflanze Mais zu infizieren und dadurch als solopathogen bezeichnet wird. Der Stamm AB31 kann verwendet werden, um analog zum Wachstum des Dikaryons nach der Fusion von zwei kompatiblen Sporidien auf der Pflanzenoberfläche die Ausbildung von filamentös wachsenden Hyphen in axenischer Kultur zu beobachten. Die *bE1*- und *bW2*-Gene werden in diesem Stamm unter Kontrolle des über die Kohlenstoffquelle regulierbaren P_{crg1} -Promotors (Bottin *et al.*, 1996) exprimiert. Die Induktion des Promotors in Arabinose-haltigem Medium führt zu filamentösem Wachstum der haploiden Zellen in Flüssigkultur (Brachmann *et al.*, 2001; Heimel *et al.*, 2010b).

2.2.1 Das Num1-Protein ist nicht notwendig für Zellfusion, Bildung von Dikaryen oder Proliferation innerhalb der Pflanze

Um das Wachstumsverhalten von *num1*-defizienten Stämmen in axenischer Kultur zu untersuchen, wurden AB31- und AB31 Δ *num1*-Sporidien in verschiedenen Medien kultiviert. Durch Messen der optischen Dichten der Kulturen wurden Wachstumskurven aufgezeichnet. Die Deletion von *num1* führte jedoch nicht zu einem verminderten Wachstum (Abb. 12A). Der Einfluss von *num1* auf das Kreuzungsverhalten zweier kompatibler haploider Sporidien wurde getestet, indem 1:1 Mischungen von FB1 Δ *num1*- und FB2 Δ *num1*-Sporidien auf aktivkohlehaltige Medien appliziert wurden. Kommt es zur Fusion der Sporidien und dadurch initiiertem filamentösem Wachstum erscheinen die Kolonien flauschig („fuzzy“). Dieser *fuz*⁺-Phänotyp ist vom *fuz*⁻-Phänotyp nicht filamentös wachsender Kulturen gut zu unterscheiden (Christensen, 1963; Teertstra *et al.*, 2006). Abb. 12B zeigt, dass die Deletion von *num1* keinen Einfluss auf das Kreuzungsverhalten und die Bildung von Dikaryen hat. Des Weiteren wurde untersucht, ob die Deletion von *num1* eine Auswirkung auf die pathogene Entwicklung hat. In vorangegangenen Studien war das Num1-Protein als Pathogenitätsfaktor beschrieben worden; die Infektion mit *num1*-Deletionsstämmen führte zum Verlust der Tumorbildung der infizierten Pflanzen (Heimel, 2010). Dieses Ergebnis konnte im Verlauf dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Es wurden Maispflanzen (*Zea mays*) mit SG200 Δ *num1*- oder mit einer Mischung aus kompatiblen FB1 Δ *num1*- und FB2 Δ *num1*-Stämmen sowie mit den entsprechenden Wildtyp-Kontrollstämmen infiziert. Sieben Tage nach der Inokulation der Stämme wurden die Pflanzen auf Krankheitssymptome untersucht. Die *num1*-Deletion führte nicht zu einem vollständigen Verlust der Tumorbildung, jedoch wiesen die Pflanzen weniger und verkleinerte Tumore auf, als die mit den Wildtyp-Stämmen infizierten Pflanzen (Abb 12C, siehe auch Abb. 42).

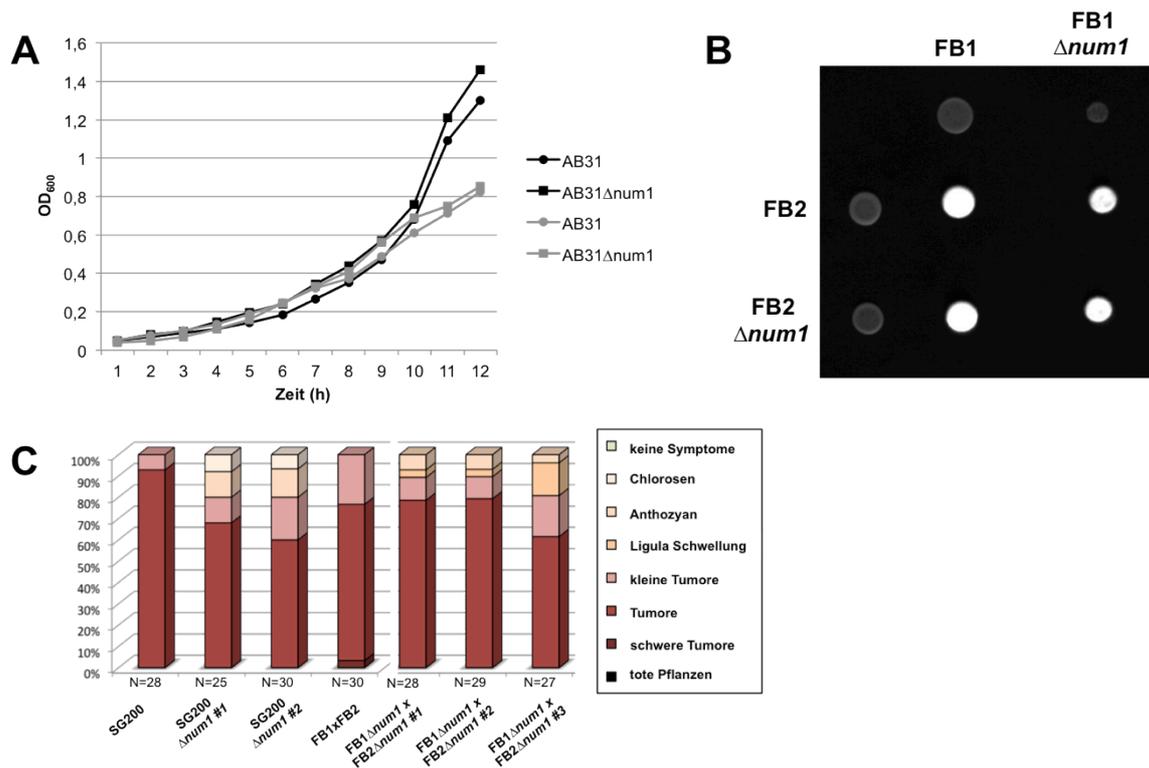


Abbildung 12: Untersuchungen zum Wachstums- und Kreuzungsverhalten, sowie der Pathogenität von *num1*-Deletionsstämmen. (A) Um das Wachstumsverhalten von haploiden Sporidien in axenischer Kultur zu untersuchen wurden Wachstumskurven von AB31 und AB31Δ*num1*-Kulturen in YEPS_{light} Vollmedium (schwarz) sowie Nitrat-Minimalmedium (grau) angefertigt. Es sind keine Änderungen bezüglich der Wachstumsraten haploider Sporidien zu erkennen. **(B)** Die angegebenen haploiden Stämme wurden alleine oder als kompatible 1:1 Mischung auf CM-Aktivkohlemedium getropft. FB1 und FB2 wurden als Wildtyp-Kontrollen in die Analysen mit einbezogen. Die Platten wurden für zwei Tage bei 22°C inkubiert. Durch die Bildung eines weißen Myzels wird deutlich, dass die Deletion von *num1* keine Auswirkung auf die Bildung von dikaryotischen Hyphen hat. **(C)** Pathogenität von *num1*-Deletionsstämmen. Sieben Tage alte Maispflanzen wurden mit den angegebenen Stämmen inokuliert. Weitere sieben Tage nach Inokulation wurden die Krankheitssymptome der infizierten Maispflanzen quantifiziert. Die Symptome der einzelnen Pflanzen wurden nach (Kämper *et al.*, 2006) je nach Stärke in verschiedene Kategorien unterteilt (s. Kasten). N steht für die Anzahl der ausgewerteten Pflanzen.

Zusätzlich zur Aufzeichnung der Tumorrates wurde die Proliferation von *num1*-defizienten Stämmen innerhalb des pflanzlichen Gewebes untersucht. Dazu wurde eine Mischung aus kompatiblen FB1Δ*num1*- und FB2Δ*num1*-Stämmen in sieben Tage alte Maispflanzen inokuliert und die Bildung von Schnallenzellen sowie der Verteilung der Zellkerne innerhalb der Hyphen wurde fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Es wurden Stämme verwendet, welche zur Visualisierung der Zellkerne ein NLS:eGFP-Fusionsprotein unter Kontrolle des *in planta* induzierten P_{mig2_5}-Promotors und zur besseren Visualisierung der Hyphen innerhalb der Pflanzenzellen zusätzlich zytoplasmatisch lokalisiertes RFP unter Kontrolle des konstitutiv aktiven P_{oter}-Promotors exprimierten (Heimel, pers. Mitteilung). Zu Beginn der Infektion hat die *num1*-Deletion keine Auswirkung auf die Bildung von Schnallenzellen *per se* und auch die Verteilung der Zellkerne mit Hilfe der Schnallenzellen erfolgte gleichmäßig auf jedes Kompartiment, wie auch in entsprechenden Infektionen mit Wildtyp-Stämmen (nicht gezeigt). Ab drei Tagen nach Inokulation waren jedoch oftmals unregelmäßig verteilte Zellkerne sowie stark vakuolierte oder fragmentierte Hyphen zu beobachten (Abb. 13).

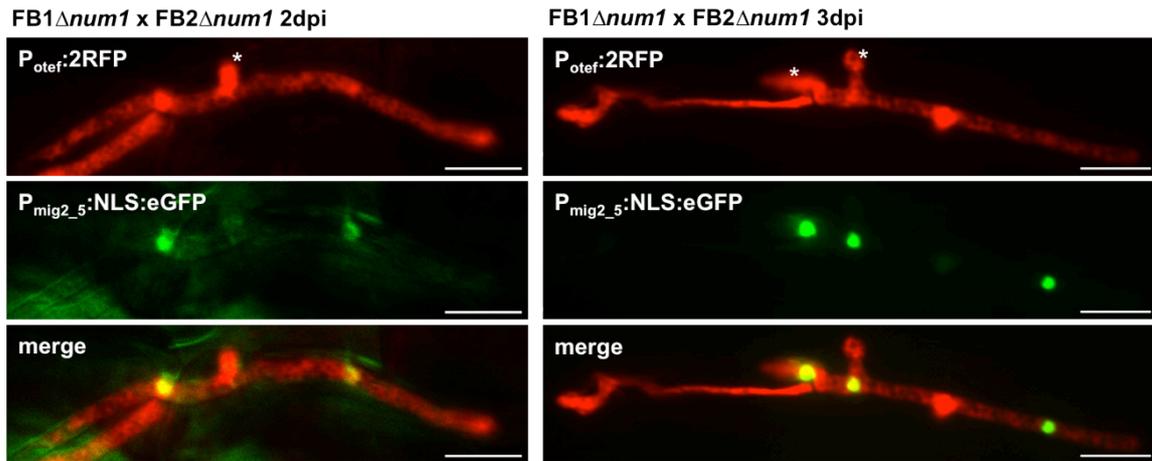


Abbildung 13: Fluoreszenzmikroskopische Beobachtung von Kreuzungen kompatibler *num1*-Deletionsstämmen während der pathogenen Entwicklung von *U. maydis*. Sieben Tage alte Maispflanzen wurden mit einer Mischung aus kompatiblen FB1 Δ *num1*- und FB2 Δ *num1*-Sporidien, die die angegebenen Marker exprimierten, infiziert. Zwei bzw. drei Tage nach Inokulation wurden Blattproben entnommen und fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Gezeigt sind die RFP- und GFP-Fluoreszenzsignale sowie die Überlagerung beider Kanäle. In frühen Entwicklungsstadien ist die Proliferation der FB1 Δ *num1* x FB2 Δ *num1*-Stämme nicht beeinträchtigt, wohingegen ab 3dpi Störungen des Zellzyklus (2 Schnallenzellen), vakuolisierte und fragmentierte Hyphen beobachtet wurden. Schnallenzellen der proliferierenden Hyphen sind durch * markiert. Der Längenmaßstab entspricht 10 μ m.

2.2.2 Die induzierte Expression eines verkürzten Num1-Proteins hat keinen Phänotyp

Im Gegensatz zu *C. cinerea* hat die Δ *num1*-Mutation in *U. maydis* keinen Phänotyp, welcher direkt in Bezug zu einer Veränderung oder Störung der Zellkern-Migration steht. Es ist jedoch zu beachten, dass der Phänotyp in *C. cinerea* nicht aus einer Deletion des *num1*-Gens resultiert, sondern vielmehr die Folge eines dominant-negativen Effekts eines verkürzten *num1*-Allels (*num1-1*) ist, das durch REMI- (Restriktionsenzym-vermittelte Insertions) Mutagenese entstanden ist. Die Insertion resultierte in einem zusätzlichen Stopp-Codon, das zu einem vorzeitigen Abbruch der Translation und somit zu einem verkürzten Num1-Peptid von 59 Aminosäuren führte. Die Expression des Peptids in Wildtyp-Stämmen führte zu dem oben beschriebenen Defekt bezüglich des Zellkerntransportes (Makino und Kamada, 2004). Um eine vergleichbare Situation in *U. maydis* zu simulieren, wurde ein verkürztes *num1*-Allel generiert und unter Kontrolle des starken, mit Arabinose induzierbaren P_{crg1} -Promotors (Bottin *et al.*, 1996) in AB31 exprimiert. Da das Num1-Protein in *U. maydis* einen verlängerten N-Terminus aufweist, handelte es sich bei dem zum *C. cinerea num1-1*-Allel homologen Bereich um eine Sequenz von 103 Aminosäuren. Die induzierte Expression des Num1₁₋₁₀₃-Peptids hatte jedoch keinen Einfluss auf die Bildung oder Morphologie der Filamente oder auf die Migration und Positionierung der Zellkerne innerhalb der Hyphen (Abb. 14A). Um auszuschließen, dass das im Stamm AB31 vorhandene Wildtyp *num1*-Allel ausreichend für eine korrekte Funktion ist, wurde das verkürzte Num1₁₋₁₀₃-Peptid zusätzlich im Δ *num1*-Hintergrund exprimiert und wie oben beschrieben analysiert, was jedoch ebenfalls keine Auswirkungen auf Hyphenmorphologie oder Zellkernmigration hatte (Daten nicht gezeigt). Weiterhin wurde der Einfluss des Num1₁₋₁₀₃-Peptids auf das

Kreuzungsverhalten von *FB1Δnum1*- und *FB2Δnum1*-Sporidien untersucht. Die kompatiblen Stämme zeigten nach Inkubation auf Arabinose-haltigem Aktivkohlemedium zur Induktion des *Num1*₁₋₁₀₃-Peptids keine Unterschiede bezüglich der Zellfusion oder der Bildung von dikaryotischen Hyphen (*fuz*⁺-Phänotyp) im Vergleich zu den verwendeten Ausgangsstämmen (Abb. 14B). Um zu überprüfen ob die verkürzte Version von *Num1* funktionell ist, wurde das *Num1*₁₋₁₀₃-Fragment als Fusionsprotein mit eGFP unter Kontrolle des induzierbaren *P*_{crg1}-Promotors im Stamm SG200 exprimiert. Das GFP-Signal konnte sowohl in Zellkernen, als auch im Zytoplasma des resultierenden Stammes beobachtet werden (Abb. 14C), wohingegen das Volllängen-*Num1*:eGFP-Fusionsprotein fast ausschließlich in Zellkernen zu beobachten war (vgl. Abb. 9).

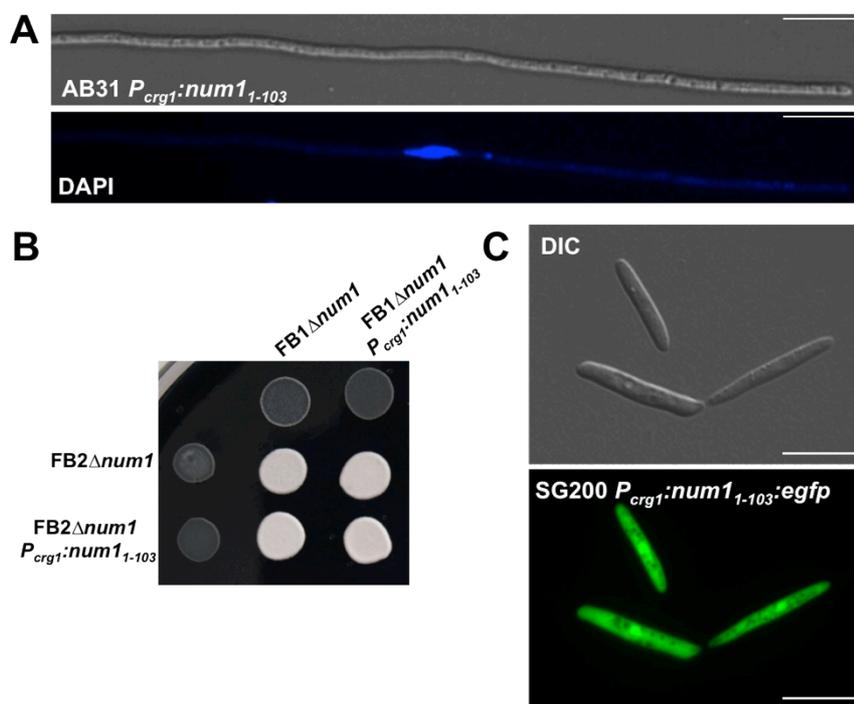


Abbildung 14: Die induzierte Expression eines verkürzten *Num1*-Proteins (*Num1*₁₋₁₀₃) hat keinen Phänotyp in Bezug auf die Hyphenmorphologie, Zellkernwanderung oder Dikaryon-Bildung. (A) Die induzierte Expression des verkürzten *Num1*₁₋₁₀₃-Proteins in AB31 durch Induktion des *P*_{crg1}-Promotors in Arabinose-haltigem Medium führt zu keinerlei morphologischen Unterschieden. Die Filament-Bildung wurde 14 Stunden nach Induktion des bE/bW-Heterodimers sowie des *P*_{crg1}-Promotors mikroskopisch analysiert. Die Filamente wurden zusätzlich mit DAPI angefärbt, um die Positionierung und Migration des Zellkerns innerhalb der Hyphe zu analysieren. Gezeigt sind eine DIC-Durchlichtaufnahme sowie das DAPI-Fluoreszenzsignal. Der Längenmaßstab entspricht 10 μ m. **(B)** Die angegebenen haploiden Stämme wurden alleine oder als compatible 1:1 Mischung auf Arabinose-haltiges CM-Aktivkohlemedium getropft, wodurch der *P*_{crg1}-Promotor induziert wurde. Die Platten wurden für zwei Tage bei 22°C inkubiert. Durch die Bildung eines weißen Myzels wird deutlich, dass die induzierte Expression des verkürzten *Num1*₁₋₁₀₃-Proteins keine Auswirkung auf die Bildung von dikaryotischen Hyphen hat. Abbildung zur Verfügung gestellt von Theresa Obhof. **(C)** 14 Stunden nach Induktion des *P*_{crg1}-Promotors mit Arabinose wurden exponentiell wachsende Sporidien des Stammes SG200 *P*_{crg1}::*num1*₁₋₁₀₃::*egfp* fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Gezeigt sind eine DIC-Durchlichtaufnahme sowie das GFP-Fluoreszenzsignal. Der Längenmaßstab entspricht 10 μ m.

2.2.3 Das Num1-Protein wird für das polare Hyphenwachstum sowie die Bildung von Septen benötigt.

Da dem Num1-Protein während des Hefe-artigen Wachstums keine offensichtliche Funktion zukommt, wurde die Rolle von Num1 während des Übergangs zur filamentösen Wuchsform mit Hilfe des Stammes AB31 untersucht. Nach 12-14 stündiger Induktion des bE/bW-Heterodimers in Arabinose-haltigem Medium bildet AB31 lange, unipolare Filamente mit leeren oder stark vakuolisierten Sektionen am basalen Hyphenende. Durch Einziehen von Septen werden die leeren Kompartimente abgetrennt, sodass nur das apikale Hyphenkompartiment mit Zytoplasma gefüllt ist. AB31 Δ num1-Hyphen wiesen starke Abweichungen von dieser Wuchsform auf (Abb. 15). 95,3% der Filamente zeigten ein irreguläres, kurviges Wachstum und die durchschnittliche Hyphenlänge war mit 68,9 μ m (\pm 15,36) signifikant kürzer als die von Wildtyp-Filamenten mit 121,7 μ m (\pm 15,62) Länge (t-Test $p = 6,35 \times 10^{-46}$). Darüber hinaus war unter den irregulär wachsenden Filamenten eine große Anzahl an bipolar wachsenden (18,13 %) oder verzweigten Hyphen (4,4 %). Außerdem konnten in AB31 Δ num1-Filamenten häufig delokalisierte Septen in der Hyphenmitte beobachtet werden, was in ca. 2,5 % der Fälle in leeren Kompartimenten am apikalen Zellpol resultierte. Das filamentöse Hyphenwachstum sowie die Determination der Polaritätsachse ist in num1-defizienten Zellen also stark gestört. In Tabelle 3 ist die Quantifizierung der Phänotypen von AB31 Δ num1-Filamenten dargestellt.

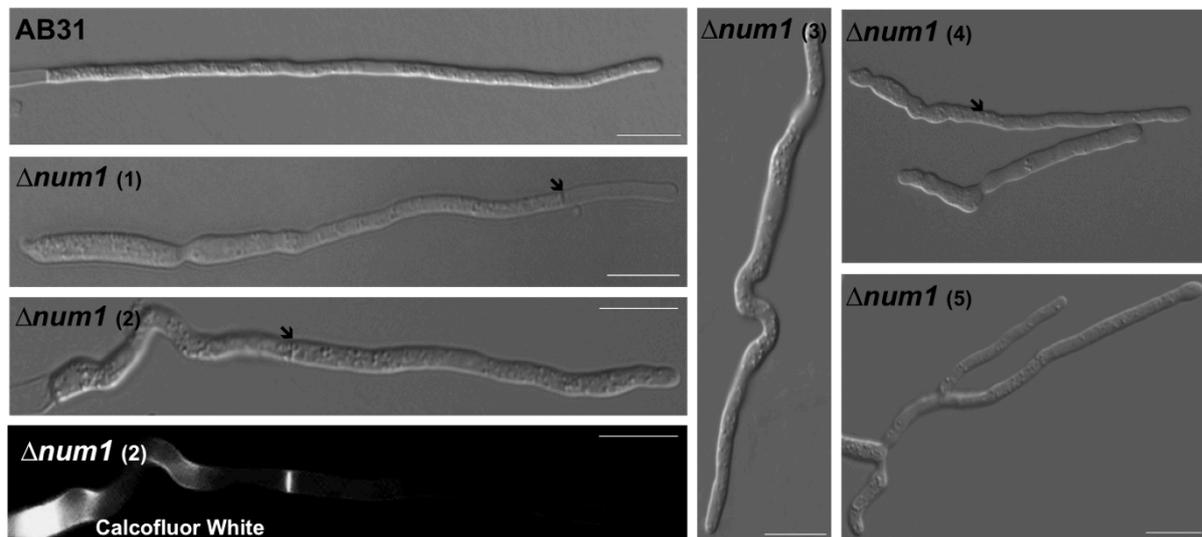


Abbildung 15: Mikroskopische Analyse der Filamentmorphologie in num1-Deletionsstämmen. Die Morphologie von Filamenten eines AB31-Wildtyp- sowie eines AB31 Δ num1-Deletionsstammes wurde 12-14 Stunden nach der Induktion des bE/bW-Heterodimers in Arabinose-haltigem Medium mikroskopisch analysiert. Gezeigt sind DIC-Durchlichtaufnahmen. Im Gegensatz zu Wildtyp-Filamenten sind die Filamente des AB31 Δ num1-Deletionsstammes für gewöhnlich kürzer und dicker und weisen ein gekrümmtes Wachstum auf. Auch bipolare (3) und verzweigte Hyphen (5) können häufig beobachtet werden. Außerdem kommt es zur Bildung von delokalisierten Septen (in (1), (2) und (4) mit $\hat{!}$ markiert), die in einigen Fällen mit leeren Kompartimenten an der Hyphenspitze einhergehen (1). (2) – Calcofluor White Färbung zur besseren Visualisierung des Septums. Der Längenmaßstab entspricht 10 μ m.

Um zu bestätigen, dass die beschriebenen Phänotypen durch die Deletion des *num1*-Gens hervorgerufen werden, wurde die Mutante mit einem Num1:eGFP-Fusionsprotein unter Kontrolle des regulierbaren P_{crg1} -Promotors komplementiert. 14 Stunden nach Induktion des bE/bW-Heterodimers sowie des P_{crg1} -Promotors in Stamm UNK220 ($AB31\Delta num1 P_{crg1}:num1:egfp$) verhielten sich die Filamente wie die langen, unipolaren AB31-Wildtyp Filamente. Kurze, irregulär wachsende, bipolare oder verzweigte Hyphen wurden nicht beobachtet. Die Fluoreszenz des Num1:eGFP-Fusionsproteins konnte fast ausschließlich im Zellkern detektiert werden (Abb. 16A).

Tabelle 3: Quantifizierung der Phänotypen von AB31- und AB31 $\Delta num1$ -Filamenten 12 Stunden nach Induktion des bE/bW-Heterodimers.

	AB31*	AB31$\Delta num1$*
gerade Hyphen	92 % \pm 0,010%	4,7 % \pm 0,029%
unregelmäßige Hyphen (kurz, kurvig)	8 % \pm 0,015%	49,13 % \pm 0,029%
bipolar	0 %	18,13 % \pm 0,026%
verzweigt	0 %	4,4 % \pm 0,011%
delokalisierte Septen	0 %	21,2 % \pm 0,005%
leere Kompartimente an Hyphenspitzen	0 %	2,43 % \pm 0,039%
	N = 375	N = 461
----- Ø Länge der Hyphen**	121,7 μ m \pm 15,63 μ m N = 75	68,9 μ m \pm 15,37 μ m N = 75

* Gezeigt sind Mittelwerte aus jeweils drei biologischen Replikaten.

** t-Test: $p = 6,35 \times 10^{-46}$

2.2.4 Die Deletion der Zellkern-Lokalisierungssequenz führt zum Verlust der Funktionalität von Num1

In vorangegangenen Studien (Kellner, 2009) wurde bereits gezeigt, dass das Num1-Protein prädominant im Zellkern sowohl von Sporidien als auch von filamentös wachsenden Zellen lokalisiert. Zusätzlich konnten aber jeweils auch schwache, fokussierte Signale im Zytoplasma beobachtet werden (Abb. 9). Durch Mutation der im Num1-Protein enthaltenen Zellkern-Lokalisierungs-Sequenz (NLS) wurde überprüft, ob eine Anreicherung der zytoplasmatischen Num1-Population möglich ist, was eine bessere Untersuchung der zytoplasmatischen Lokalisierung und damit die funktionelle Charakterisierung des Proteins erleichtern sollte.

Für die Deletion der NLS wurden die basischen Aminosäuren mutiert und die für Lysin bzw. Arginin kodierenden Basenfolgen mittels PCR-vermittelter Mutagenese durch für Alanin kodierende Basenfolgen ersetzt. Die Dicodeon-Verwendung von *U. maydis* wurde für die Generierung des Oligonukleotids zum Austausch der entsprechenden Aminosäuren beachtet. Die so erzeugte Sequenz wurde zur subzellulären Lokalisierung des Num1 Δ NLS-Proteins als eGFP-Fusionsprotein unter Kontrolle des regulierbaren P_{crg1} -Promotors im Stamm $AB31\Delta num1$ exprimiert. 12 Stunden nach Induktion des bE/bW-Heterodimers sowie des P_{crg1} -Promotors war das GFP-Signal in den Zellkernen und darüberhinaus auch im Zytoplasma der Filamente zu beobachten (Abb. 16B). Im Gegensatz zum Stamm UNK220 konnte jedoch das Num1 Δ NLS:eGFP-Fusionsprotein den Phänotyp der $\Delta num1$ -

Mutation in AB31 $\Delta num1$ nicht komplementieren; die resultierenden Filamente waren kürzer als entsprechende Wildtyp-Filamente, wuchsen irregulär oder bipolar. Die Zellkern-Lokalisierungs-Sequenz ist also essentiell für die Funktion des Num1-Proteins. Da das Num1 Δ NLS:eGFP-Fusionsprotein nicht funktionell ist, kann über seine zytoplasmatische Lokalisierung jedoch keine Aussage getroffen werden.

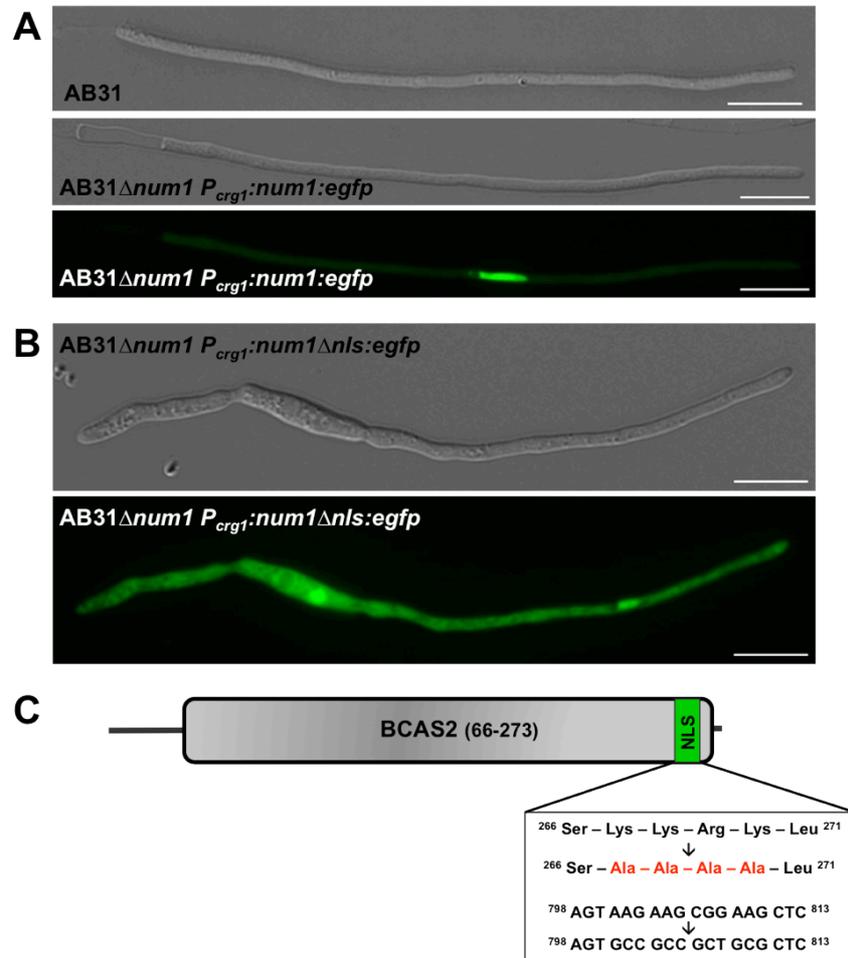


Abbildung 16: Komplementationsanalysen von *num1*-Deletionsstämmen. Filamente von AB31-Wildtyp- sowie AB31 $\Delta num1$ Deletionsstämmen, in die Num1:eGFP-Fusionsproteine unter Kontrolle des induzierbaren P_{crg1} -Promotors eingebracht wurden, wurden 12-14 Stunden nach Induktion des bE/bW-Heterodimers sowie des P_{crg1} -Promotors in Arabinose-haltigem CM-Medium fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Gezeigt sind DIC-Durchlichtaufnahmen sowie die GFP-Fluoreszenzsignale. **(A)** Die Komplementation der *num1*-Deletion mit einem Num1:eGFP-Fusionsprotein führt zur vollständigen Wiederherstellung des Filamentbildung; das GFP-Signal ist fast ausschließlich im Zellkern zu detektieren. **(B)** Ein Num1:eGFP-Fusionsprotein mit mutierter Kernlokalisierungs-Sequenz (NLS) kann den $\Delta num1$ -Phänotyp nicht komplementieren: die resultierenden Stämme zeigen die typische kurvige und bipolare Morphologie der *num1*-Deletionsstämmen. Zusätzlich zum GFP-Signal im Zellkern ist ein deutliches GFP-Signal im Zytoplasma der Filamente zu beobachten. **(C)** Schematische Darstellung des Num1-Proteins mit den Aminosäuren innerhalb der NLS, die jeweils durch einen Alanin-Rest ersetzt wurden. Der Längenmaßstab entspricht 10 μ m.

2.2.5 Der N-Terminus des Num1-Proteins ist essentiell für die Funktionalität

Eine weitere Eigenschaft des Num1-Proteins ist der für *U. maydis* spezifische Bereich im N-Terminus. Diese 65 Aminosäuren lange Sequenz umfasst zwar keine Motive oder Domänen aufgrund derer man Rückschlüsse auf eine Funktion des Proteins zulassen könnte. Durch eine Deletion des N-Terminus

wurde dennoch untersucht, ob der Bereich essentiell für die Funktionalität von Num1 ist. Die Aminosäuren 66-279 umfassende Sequenz wurde unter Kontrolle des regulierbaren P_{crg1} -Promotors in Stamm AB31 $\Delta num1$ exprimiert. 14 Stunden nach Induktion des bE/bW-Heterodimers sowie des P_{crg1} -Promotors wurden die Filamente mikroskopisch analysiert. Das um den N-Terminus verkürzte Num1-Protein konnte den $\Delta num1$ -Phänotyp nicht komplementieren; es waren im Unterschied zu langen unipolaren AB31-Wildtyp-Filamenten kurze, irreguläre und bipolare Filamente wie in AB31 $\Delta num1$ zu beobachten (Abb. 17). Um zu überprüfen ob das verkürzte Num1-Protein überhaupt funktionell ist, wurde der Bereich von Aminosäure 66-279 als eGFP-Fusionsprotein unter Kontrolle des P_{crg1} -Promotors im Stamm AB31 exprimiert. Es resultierte ein starkes GFP-Signal des Num1 $_{\Delta 1-65}$:eGFP-Proteins, das vergleichbar zu der in Abb. 16 gezeigten P_{crg1} :Num1:eGFP-Expression fast ausschließlich im Zellkern zu detektieren war (Abb. 17E). Der für *U. maydis* spezifische Bereich von Aminosäure 1-65 ist also essentiell für die Funktionalität des Num1-Proteins.

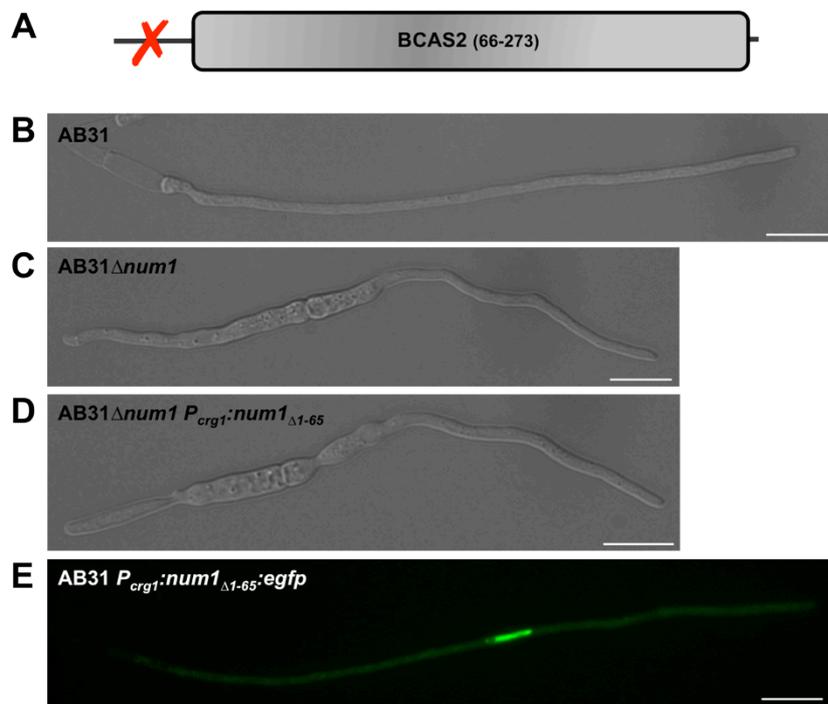


Abbildung 17: Der N-Terminus des Num1-Proteins ist essentiell für die Funktionalität. Die Hyphenmorphologie der angegebenen Stämme wurde 12-14 Stunden nach der Induktion des bE/bW-Heterodimers sowie des P_{crg1} -Promotors in Arabinose-haltigem Medium fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Gezeigt sind DIC-Durchlichtaufnahmen sowie die GFP-Fluoreszenzsignale. **(A)** Schematische Darstellung des Num1-Proteins, dessen N-terminale 65 AS deletiert wurden. **(B)** Typische Morphologie eines AB31 Wildtyp-Stammes. **(C)** Typische Morphologie eines AB31 $\Delta num1$ -Deletionsstammes. **(D)** Komplementationsanalyse des AB31 $\Delta num1$ -Deletionsstammes mit dem um den N-Terminus verkürzten Num1-Protein unter der Kontrolle des induzierbaren P_{crg1} -Promotors. Die verkürzte Version kann den Phänotyp nicht komplementieren: Der resultierende Stamm zeigt die typische kurvige und bipolare Morphologie ähnlich der $num1$ -Deletion. **(E)** Die Expressionskontrolle des verkürzten Num1-Proteins als Fusionsprotein mit eGFP unter der Kontrolle des induzierbaren P_{crg1} -Promotors zeigt, dass das Protein funktionell ist. Der Längenmaßstab entspricht 10 μm .

2.3 Zellbiologische Untersuchungen von Strukturelementen des Zytoskeletts

Das Num1-Protein wurde als essentieller Faktor für das polare Hyphenwachstum identifiziert. In vorangegangenen Studien zur funktionellen Charakterisierung von Num1 konnten bereits mehrere Num1-Interaktionspartner identifiziert werden, für die eine Rolle während zellulären Vesikelvermittelten Transportprozessen wahrscheinlich ist. Darunter fiel auch das Kin1-Motorprotein. Zudem wiesen fragmentierte Vakuolen in *num1*-Deletionsstämmen auf Defekte im Vesikeltransport hin. Somit wurde eine putative Funktion des Proteins während des Langstreckentransports von Vesikeln und/oder weiteren für das polare Hyphenwachstum benötigten Komponenten postuliert (Kellner, 2009). In der vorliegenden Arbeit wurden daher zunächst verschiedene Strukturelemente des Zytoskeletts, wie Mikrotubuli und Actin, während des filamentösen Wachstums untersucht um zu überprüfen, ob Num1 einen direkten Einfluss auf das Zytoskelett *per se* oder die assoziierten Motorproteine hat. Darüber hinaus wurde die Funktion von Num1 im Hinblick auf verschiedene Populationen von Vesikeln und die Sekretionsmaschinerie analysiert.

2.3.1 Das Num1-Protein hat keinen Einfluss auf die Organisation des Mikrotubuli- und Actin-Zytoskeletts

In 2.2.3 wurde beschrieben, dass die Deletion von *num1* zu irregulärer Hyphenmorphologie sowie leeren Zellkompartimenten an der Hyphenspitze führt. Ein derartiger Phänotyp konnte bereits in *U. maydis*-Filamenten beobachtet werden, die zuvor mit 10 μ M Benomyl behandelt wurden, einem Agens, das zur Depolymerisierung des Mikrotubuli-Zytoskeletts führt (Fuchs *et al.*, 2005; Hammerschlag und Sisler, 1972). Um der Frage nachzugehen, ob die in AB31 Δ *num1* beobachteten Phänotypen durch eine veränderte Struktur des Mikrotubuli-Zytoskeletts hervorgerufen werden, wurde ein Tub1:mCherry-Fusionsprotein in AB31 und AB31 Δ *num1* unter Kontrolle des konstitutiv aktiven P_{otef} -Promotors exprimiert. Das *tub1*-Gen (*um01221*) kodiert für α -Tubulin und ist als mCherry-Fusion in der Lage, Mikrotubuli fluoreszenzmikroskopisch sichtbar zu machen. Unterschiede bezüglich der Anordnung oder Abundanz von Mikrotubuli konnten in AB31 Δ *num1* im Vergleich zum AB31 Wildtyp-Stamm jedoch nicht detektiert werden (Abb. 18).

Das Actin-Zytoskelett wurde mit Hilfe der LifeAct-Technologie (Riedl *et al.*, 2008) visualisiert. Als LifeAct wird ein Actin-Marker bezeichnet, der für gewöhnlich die ersten 17 Aminosäuren des ABP140-Proteins aus *S. cerevisiae* umfasst. In *U. maydis* wurden die ersten 20 Aminosäuren des ABP140-Proteins (Um04193.2, „actin filament-binding protein“) an YFP fusioniert und unter Kontrolle des P_{otef} -Promotors konstitutiv exprimiert (Schink, 2010). Mit Hilfe dieses Fusionsproteins waren deutliche Akkumulationen von kortikalem Actin („patches“) entlang der Zellmembran und im Bereich der Zellknospen von sprossenden Tochtorsporidien auch Actin-Filamente („cables“) zu beobachten (Schink, 2010). Während des filamentösen Wachstums waren grundsätzlich weniger

Actin-Filamente zu beobachten; der Aufbau des kortikalen Actin-Zytoskeletts unterschied sich jedoch nicht von AB31 Δ num1- zu AB31-Filamenten (Abb. 18).

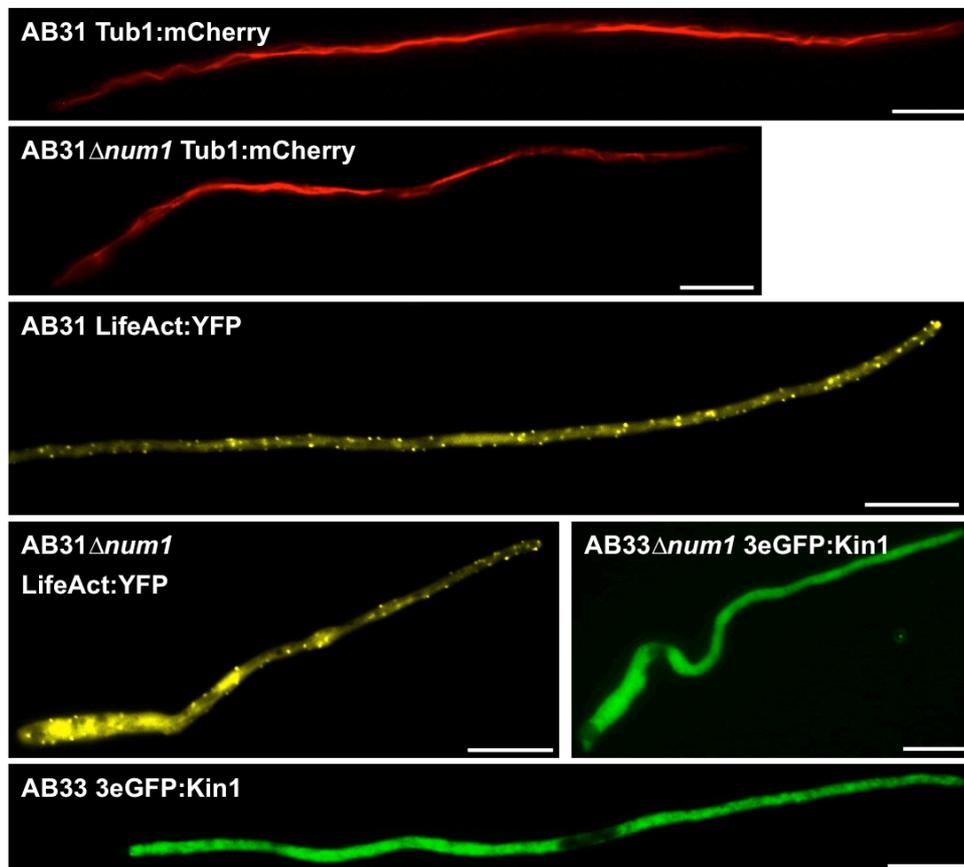


Abbildung 18: Fluoreszenzmikroskopische Analyse verschiedener Zytoskelett-Elemente in Abhängigkeit von Num1. Das Mikrotubuli-Zytoskelett wurde mit Hilfe eines Tub1:mCherry-Fusionsproteins untersucht und zur Visualisierung des Actin-Zytoskeletts wurde ein LifeAct:YFP-Fusionsprotein verwendet. Beide wurden unter der Kontrolle des konstitutiv aktiven P_{otef} -Promotors in AB31 bzw. AB31 Δ num1 exprimiert. Die Kin1-Lokalisierung erfolgte mittels 3eGFP:Kin1-Fusionsproteinen in den Stämmen AB33 und AB33 Δ num1. Die fluoreszenten Zytoskelett-Elemente wurden 12-14 Stunden nach Induktion des bE/bW-Heterodimers in Arabinose-haltigem CM-Medium bzw. Nitrat-haltigem Minimalmedium mikroskopisch analysiert. Gezeigt sind die mCherry-, YFP- und GFP-Signale. Es waren keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Morphologie und Abundanz von Mikrotubuli oder Actin zu beobachten; die zytoplasmatische Lokalisierung von Kin1 in AB33 Δ num1 wies ebenso keine Differenzen im Vergleich zum AB33 Ausgangsstamm auf. Der Längenmaßstab entspricht jeweils 10 µm.

2.3.2 Der Einfluss von Num1 auf die Motorproteine Kinesin 1 und Dynein

Die Interaktion von Num1 mit dem Kin1-Motorprotein (Um04218) wurde in einer dieser Arbeit vorangegangenen Hefe-Zwei-Hybrid Analyse identifiziert und anhand eines *in vitro* Expressionssystem durch Co-Immunopräzipitation verifiziert (Kellner, 2009). Kin1 wird insbesondere für Langstreckentransport-Prozesse benötigt, da es unter anderem das Dynein-Motorprotein entlang des Mikrotubuli-Zytoskeletts zur Hyphenspitze transportiert (Lenz *et al.*, 2006; Schuchardt *et al.*, 2005). Es stellte sich also die Frage, ob Num1 einen direkten Einfluss auf die Lokalisierung von Kin1 hat oder sich aber indirekt auf den Transport von Dynein auswirkt. Für die fluoreszenzmikroskopische Analyse der beiden Motorproteine standen AB33-Stämme zur Verfügung,

in denen das Kin1-Protein (Schuchardt *et al.*, 2005) bzw. das Dyn2-Protein (Lenz *et al.*, 2006) als N-terminale Fusionen mit 3eGFP vorlagen. In AB33 werden die *b*-Gene unter Kontrolle des über die Stickstoffquelle regulierbaren P_{nar1} -Promotors (Banks *et al.*, 1993) exprimiert. Das filamentöse Hyphenwachstum wird durch Zugabe von Ammonium reprimiert und kann in Nitrat-haltigen Medien induziert werden. Sowohl in haploiden Sporidien (nicht gezeigt) als auch während des filamentösen Wachstums in AB33 (Abb. 18) ist das 3eGFP:Kin1-Protein relativ gleichmäßig im Zytoplasma der Zellen verteilt. In AB33 $\Delta num1$ -Filamenten waren keine nachweisbaren Unterschiede bezüglich der Lokalisierung von Kin1 festzustellen.

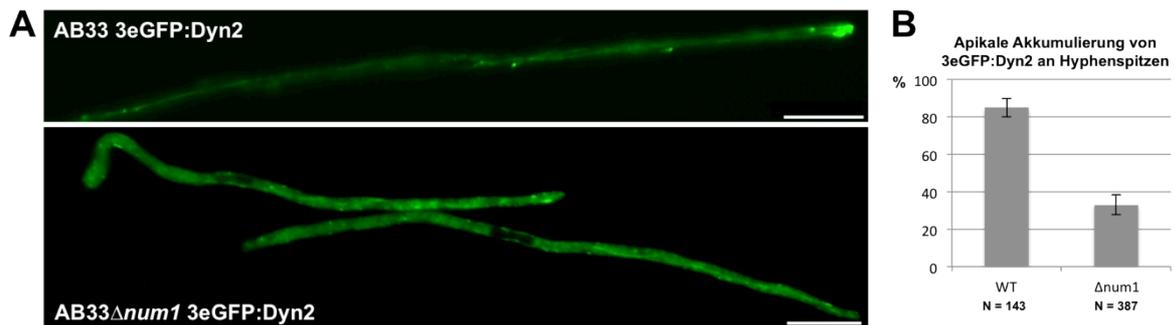


Abbildung 19: Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Dynein-Lokalisierung in Abhängigkeit von Num1. (A) Die Lokalisierung von Dynein wurde anhand eines 3eGFP:Dyn2-Fusionsproteins in den Stämmen AB33 bzw. AB33 $\Delta num1$ 14 Stunden nach Induktion des bE/bW-Heterodimers in Nitrat-haltigem Minimalmedium fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Gezeigt sind die GFP-Signale. In Wildtyp-Stämmen (oben) sind Kometen-ähnliche Strukturen zu beobachten, die an den Hyphenspitzen akkumulieren und von dort retrograd in Richtung Zellmitte transportiert werden. In AB33 $\Delta num1$ -Stämmen (unten) ist die apikale Akkumulierung jedoch signifikant reduziert und es ist eine verstärkte Lokalisierung des GFP-Signals im Zytoplasma der Filamente zu beobachten. Der Längensmaßstab entspricht 10 μ m. (B) Quantifizierung der apikalen Akkumulierung der 3eGFP:Dyn2-Signale an Hyphenspitzen. Gezeigt sind Mittelwerte aus jeweils drei unabhängigen Experimenten. N bezeichnet die Anzahl ausgewerteter Filamente.

Das *dyn2*-Gen (*um04372*) kodiert für die schwere Kette des Dynein Motorproteins (Straube *et al.*, 2001). 3eGFP:Dyn2-Fusionsproteine akkumulieren in AB33 Wildtyp-Filamenten zu Kometen-ähnlichen Strukturen an der Hyphenspitze, von wo aus einzelne Partikel retrograd in Richtung Zellkörper transportiert werden. Da der Dynein-Transport an die Hyphenspitze Kin1-abhängig ist, unterbleibt die apikale Akkumulierung der Dynein-Kometen in *kin1*-Deletionsstämmen vollständig (Lenz *et al.*, 2006). In ähnlicher Weise wurde die Lokalisierung von 3eGFP:Dyn2 durch Num1 beeinflusst. In AB33 $\Delta num1$ war die Rate der Akkumulierung signifikant reduziert und apikale Dynein-Kometen konnten nur in etwa einem Drittel der Filamente beobachtet werden (Abb. 19A+B).

2.3.3 Die Motilität Sec4-markierter sekretorischer Vesikel ist nicht Num1-abhängig

Neben den oben beschriebenen Zytoskelett-Elementen und assoziierten Motorproteinen wurden Komponenten der Sekretions-Maschinerie untersucht. Dazu wurden zum einen Sec4, ein Markerprotein für sekretorische Vesikel und zum anderen Sec3, ein „landmark“-Protein des Exocyst-Komplexes verwendet.

Um den Transport sekretorischer Vesikel zu analysieren, wurde ein Sec4:eGFP-Fusionsprotein verwendet, das unter Kontrolle des konstitutiv aktiven P_{otef} -Promotors in AB31 exprimiert wurde (Freitag *et al.*, 2011). Sec4 (Um03865) ist eine Rab-ähnliche GTPase, die auf schnellen, bidirektional durch die Hyphe transportierten sekretorischen Vesikeln lokalisiert. Während der Transport der Sec4-Vesikel in *S. cerevisiae* entlang von Actin-Filamenten verläuft (Pruyne *et al.*, 1998), konnte für *U. maydis* gezeigt werden, dass der Transport hauptsächlich Mikrotubuli-vermittelt ist und Actin nur für kurze Strecken von der Vesikel-reichen Zone bis an die Plasmamembran benötigt wird (Schink, 2010). In AB31 $\Delta num1$ waren die Sec4:eGFP-Vesikel wie in AB31-Filamenten gleichmäßig über die gesamte Hyphe verteilt (Abb. 20A), eine reduzierte Motilität der Vesikel war nicht zu verzeichnen.

Der Exocyst-Komplex ist ein evolutionär konservierter, oktamerer Protein-Komplex, der essentiell für die polarisierte Exozytose ist. Durch aktive Lokalisierung („tethering“) von post-Golgi-Vesikeln an die Plasmamembran kann der Exocyst-Komplex die SNARE-vermittelte Fusion sekretorischer Vesikel koordinieren (zusammengefasst in (He und Guo, 2009)). Für die Lokalisierung des Exocyst-Komplexes in *U. maydis* wurde ein Sec3:eGFP-Fusionsprotein verwendet. Sec3 (Um01107) markiert dabei wie Exo70 Orte der aktiven Exozytose und lokalisiert in knospenden Sporidien sowie während des filamentösen Wachstums in einer Halbmond-förmigen Anordnung an den Zellspitzen (Schink, 2010). Durch fluoreszenzmikroskopische Analyse von Sec3:eGFP in AB31 und AB31 $\Delta num1$ konnte gezeigt werden, dass Num1 keinen Einfluss auf die Zusammensetzung oder Lokalisierung des Exocyst-Komplexes hat (Abb. 20B).

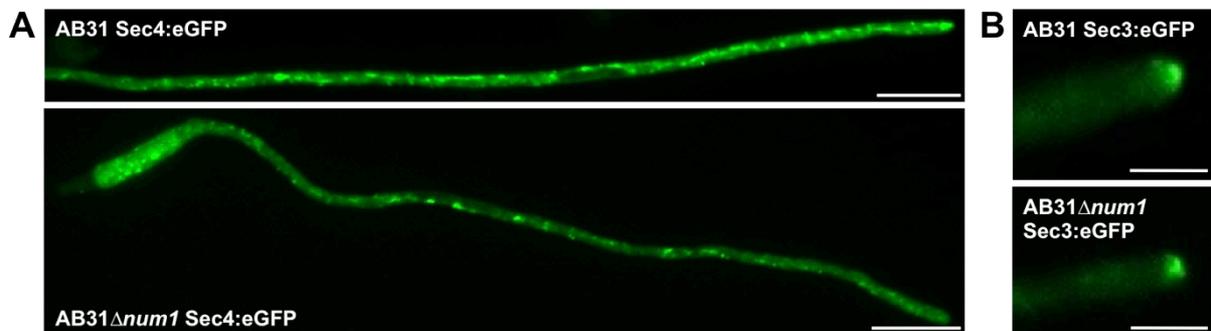


Abbildung 20: Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Sekretions-Maschinerie in Abhängigkeit von Num1. (A) Die Analyse von sekretorischen Vesikeln erfolgte mit Hilfe eines Sec4:eGFP-Fusionsproteins unter Kontrolle des konstitutiv aktiven P_{otef} -Promotors im Stamm AB31. Die angegebenen Stämme wurden 14 Stunden nach Induktion des bE/bW-Heterodimers in Arabinose-haltigem CM-Medium fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Gezeigt sind die GFP-Fluoreszenzsignale. Sec4:eGFP-Fusionsproteine weisen keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf Morphologie oder Motilität in AB31 $\Delta num1$ im Vergleich zum AB31-Wildtyp auf. (B) Der Exocyst-Komplex wurde mit Hilfe eines Sec3:eGFP-Fusionsproteins unter Kontrolle des konstitutiv aktiven P_{otef} -Promotors im Stamm AB31 untersucht. Der Sec3:eGFP-Marker lokalisiert in einer Halbmond-förmigen Anordnung im Bereich der Hyphenspitze. In AB31 $\Delta num1$ sind keine morphologischen Abweichungen im Vergleich zu AB31 zu beobachten. Der Längenmaßstab entspricht 10 μ m.

2.3.4 Num1 ist notwendig für die Motilität früher Endosomen

Um weitere Einblicke in zelluläre Transport-Prozesse zu erlangen, wurde die Motilität von frühen Endosomen (EE) fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Dazu wurde das als Markerprotein für EE

bekanntes Yup1:eGFP-Fusionsprotein im Stamm AB33 verwendet. Yup1 (Um05406) ist ein endosomales t-SNARE-Protein, das in Wildtyp-Filamenten auf schnellen, bidirektional transportierten Vesikeln lokalisiert (Wedlich-Söldner *et al.*, 2000) (siehe Film 1). Die Deletion von *kin1* führt zum vollständigen Verlust des bidirektionalen Transports und die EE akkumulieren an der Hyphenspitze (Lenz *et al.*, 2006). Da der Transport von Yup1-markierten EE über die Motorproteine Kin3 und Dynein vermittelt wird, kann diese Situation durch den Defekt des anterograden Dynein-Transports in $\Delta kin1$ -Hyphen erklärt werden. Die Deletion von *num1* führte zu einem vergleichbaren Szenario: Während die EE in AB33-Filamenten gleichmäßig innerhalb der Hyphe verteilt waren, so akkumulierten diese in AB33 $\Delta num1$ -Filamenten häufig an der Hyphenspitze und an der Basis der Hyphe, sowie im Bereich von delokalisierten Septen (Abb. 21).

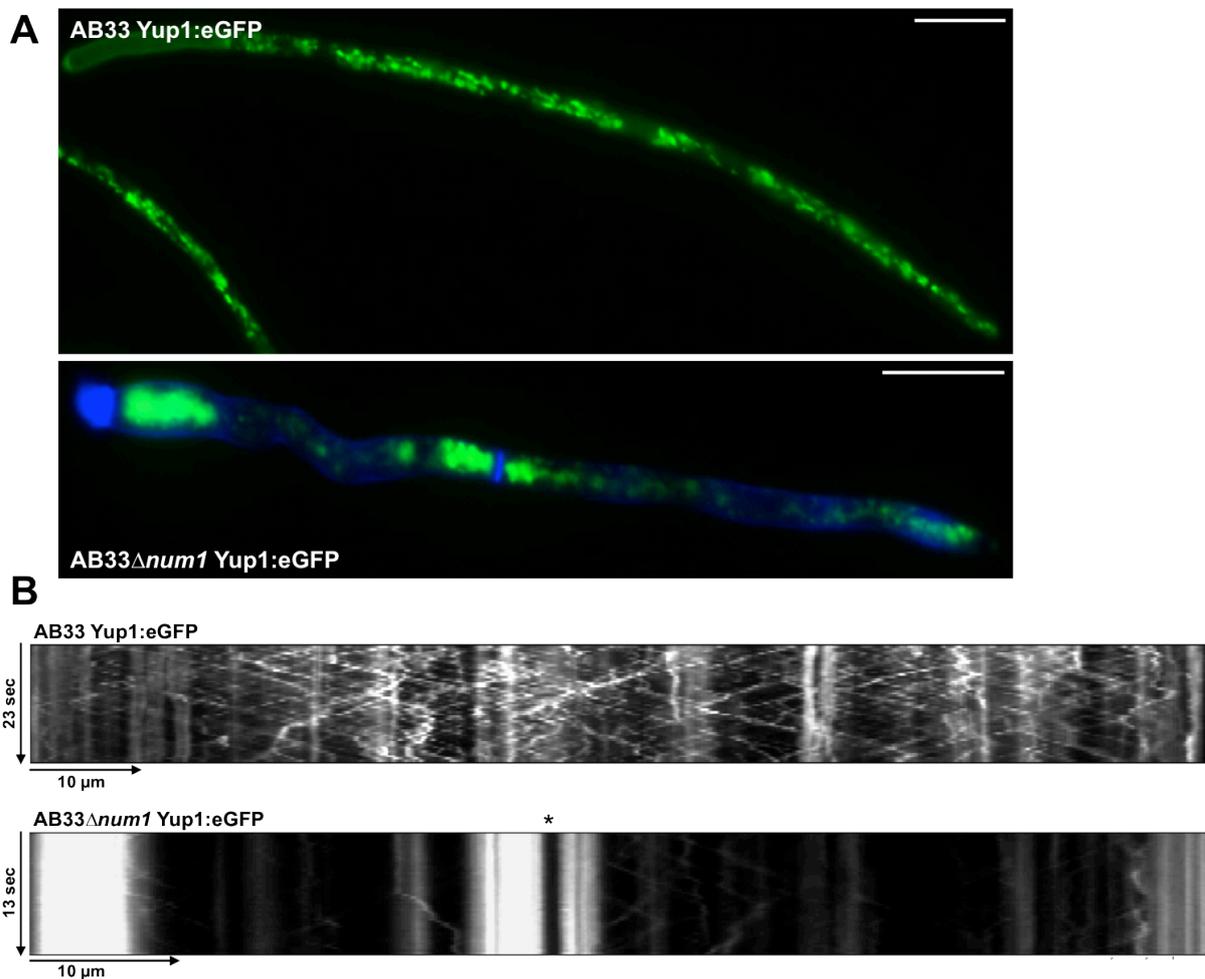


Abbildung 21: Fluoreszenzmikroskopische Analyse früher Endosomen in Abhängigkeit von Num1. (A) Die Visualisierung von Endosomen erfolgte mit Hilfe eines Yup1:eGFP-Fusionsproteins unter Kontrolle des konstitutiv aktiven P_{oteF} -Promotors in AB33 und AB33 $\Delta num1$. Die Endosomenmorphologie wurde 14 Stunden nach Induktion des bE/bW-Heterodimers in Nitrat-haltigem Minimalmedium fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Septen wurden durch eine Färbung der Hyphen mit Calcofluor White sichtbar gemacht. Gezeigt sind das GFP-Signal (oben) bzw. die Überlagerung von GFP- und DAPI-Kanal (unten). Im Gegensatz zu AB33 akkumulieren die Yup1:eGFP-Proteine in AB33 $\Delta num1$ an den basalen und apikalen Hyphenspitzen, sowie im Bereich der delokalisierten Septen. Der Längenmaßstab entspricht 10 μ m. (B) Die korrespondierenden Kymographen (x-Achse = Distanz, y-Achse = Zeit) spiegeln die Motilität der Endosomen wider. Im Gegensatz zu AB33 kommt es in AB33 $\Delta num1$ zu deutlich reduzierter Motilität, die Endosomen akkumulieren an den Zellpolen (die Hyphenspitze zeigt jeweils nach rechts) sowie im Bereich des Septums (mit * gekennzeichnet).

Mit Hilfe von „time lapse“-Mikroskopie konnte gezeigt werden, dass insbesondere der Langstreckentransport von EE in $\Delta num1$ -Filamenten signifikant reduziert war und die durchschnittliche Geschwindigkeit mit einem Wert von $1,14 \mu\text{m}/\text{sec}$ deutlich unter der Geschwindigkeit von EE in AB33 Wildtyp-Filamenten lag ($1,46 \mu\text{m}/\text{sec}$); t-Test $p = 0,005$. Für die Bestimmung der Geschwindigkeit wurden nur Endosomen gewertet, die eine Distanz von mindestens $5 \mu\text{m}$ zurücklegten. In AB33 $\Delta num1$ -Filamenten mit aberranter Septierung kam der Transport von EE meist fast vollständig zum Erliegen (Film 2). Für die graphische Aufzeichnung der Endosomen-Motilität über die Zeit wurden Kymographen der entsprechenden Filmsequenzen erstellt, anhand derer die Akkumulation der Endosomen an den Zellpolen und im Bereich der delokalisierten Septen sowie die reduzierte Motilität in AB33 $\Delta num1$ im Vergleich zu AB33 deutlich wird (Abb. 21B). In Tabelle 4 wurde die Motilität der EE zusammenfassend quantifiziert.

Tabelle 4: Quantifizierung der Endosomen-Motilität

	AB33$\Delta num1$ (Hyphen mit delok. Septum)	AB33$\Delta num1$ (Hyphen ohne Septum)	AB33
Endosomen Motilität über eine Strecke $> 5 \mu\text{m}$	13 % N = 150	42 % N = 150	92 % N = 150
Ø Geschwindigkeit von motilen Endosomen	n.d.	$1,14 \pm 0,25 \mu\text{m}/\text{s}$ N = 20 *	$1,46 \pm 0,42 \mu\text{m}/\text{s}$ N = 20 *

* t-Test: $p = 0,005$

2.4 Num1 beeinflusst die Zellteilung und den Zellzyklus

Der für die bisherigen Analysen verwendete Stamm AB31 führt nach der Induktion des bE/bW-Heterodimers zu einem Arrest in der G2-Phase des Zellzyklus (Garcia-Muse *et al.*, 2003). Der haploide Kern ist dabei im Spitzenkompartiment der wachsenden Hyphe positioniert. In AB31 $\Delta num1$ -Filamenten konnten jedoch explizite Unterschiede bezüglich der Zellkernverteilung beobachtet werden. 18% der Filamente (N=100) wiesen mehr als einen Zellkern auf und durch die aberrante Septierung wurden in manchen Fällen auch Kompartimente generiert, die ohne einen Zellkern verblieben (Abb. 22). Diese Effekte deuten darauf hin, dass die *num1*-Deletion weitere *b*-abhängige Prozesse beeinflusst und neben dem polaren Wachstum auch an der Regulation der Zellteilung und des Zellzyklus beteiligt ist.

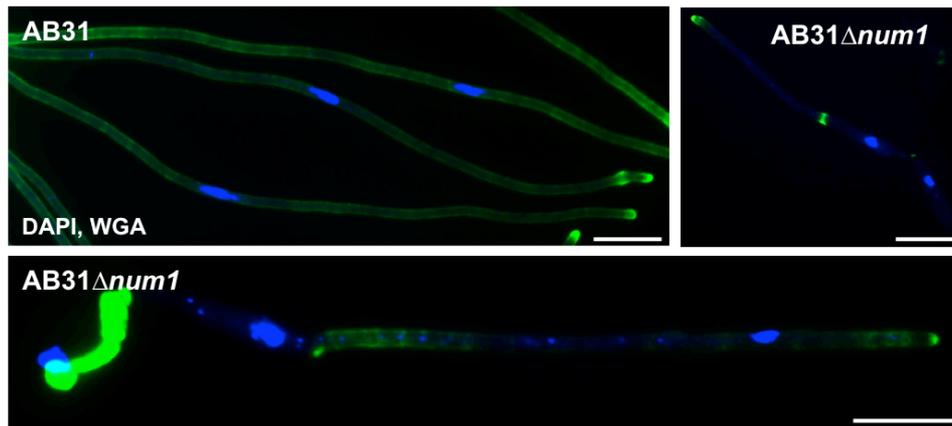


Abbildung 22: Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Zellkernverteilung in AB31 und AB31 Δ num1. Die Stämme AB31 und AB31 Δ num1 wurden 14 Stunden nach Induktion des bE/bW-Heterodimers in Arabinosehaltigem Medium fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Zur Visualisierung der Zellkerne und Septen innerhalb einer Zelle wurden die Filamente mit DAPI- und „wheat germ agglutinin“ (WGA)-FITC (Fluorescein-Isothiocyanat)-Färbelösungen behandelt. Gezeigt sind die Überlagerungen der DAPI- und GFP-Kanäle. In AB31 ist der Zellzyklus arretiert, sodass sich in Wildtyp-Hyphen jeweils nur ein Zellkern im apikalen Hyphenkompartiment befindet. In 18% der AB31 Δ num1-Hyphen war mehr als ein Zellkern zu beobachten. Durch die aberrante Septierung sind in einigen Fällen Kompartimente ohne Zellkern entstanden (oben rechts). Der Längenmaßstab entspricht 10 μ m.

2.5 Untersuchungen von Num1-homologen Proteinen

2.5.1 Die Expression des humanen BCAS2-Proteins führt zur teilweisen Komplementation des Δ num1-Phänotyps

Das Num1-Protein ist evolutionär konserviert und homologe Proteine sind in allen eukaryotischen Reichen zu finden. Das humane SPF27/BCAS2-Protein ist bereits gut charakterisiert und als Spleißing-Faktor innerhalb des hoch konservierten „NineTeen“-Komplexes bekannt (Grote *et al.*, 2010; Hogg *et al.*, 2010). Um zu untersuchen, ob das *U. maydis* Num1-Protein und das humane SPF27/BCAS2-Protein auch funktionelle Homologe sind, wurden Komplementationsanalysen der Δ num1-Mutante mit dem humanen BCAS2-Protein durchgeführt. Die *bcas2*-Sequenz wurde dafür zunächst in Bezug auf GC-Gehalt und Codon-Gebrauch für *U. maydis* angepasst und anhand eines bereits etablierten Datensatzes zur Bestimmung der Codon- und Dicodon-Häufigkeit (Nakamura *et al.*, 2000; Zarnack *et al.*, 2006) optimiert (<http://dicodon-optimization.appspot.com/>). Das optimierte *bcas2*-Gen wurde durch die Firma Invitrogen synthetisiert und anschließend heterolog in *U. maydis* unter Kontrolle des regulierbaren P_{crg1}-Promotors im Stamm AB31 Δ num1 exprimiert. 14 Stunden nach Induktion des bE/bW-Heterodimers sowie des P_{crg1}-Promotors wurden Filamente mikroskopisch analysiert. Durch die Expression des humanen SPF27/BCAS2-Proteins konnte der Δ num1-Phänotyp teilweise komplementiert werden (Abb. 23B). Die resultierenden Filamente wuchsen oft kurvig, jedoch nicht kürzer als der entsprechende AB31-Ausgangsstamm. Deutlich verkürzte oder verzweigte Filamente wie in AB31 Δ num1 konnten nicht beobachtet werden. Zur Überprüfung der Expression des humanen SPF27/BCAS2-Proteins in *U. maydis* wurde das Protein zusätzlich als eGFP-Fusionsprotein

exprimiert, wiederum unter Kontrolle des regulierbaren P_{crg1} -Promotors. Prinzipiell ist das humane Homolog funktionell, 14 Stunden nach Induktion des P_{crg1} -Promotors ist die Stärke des GFP-Signals jedoch geringer, als die eines vergleichbaren Num1:eGFP-Fusionsproteins unter identischen Expressionsbedingungen (Abb. 23C). Weitere Untersuchungen zum humanen Num1-Homolog werden in Kapitel 6.3 im Anhang erläutert.

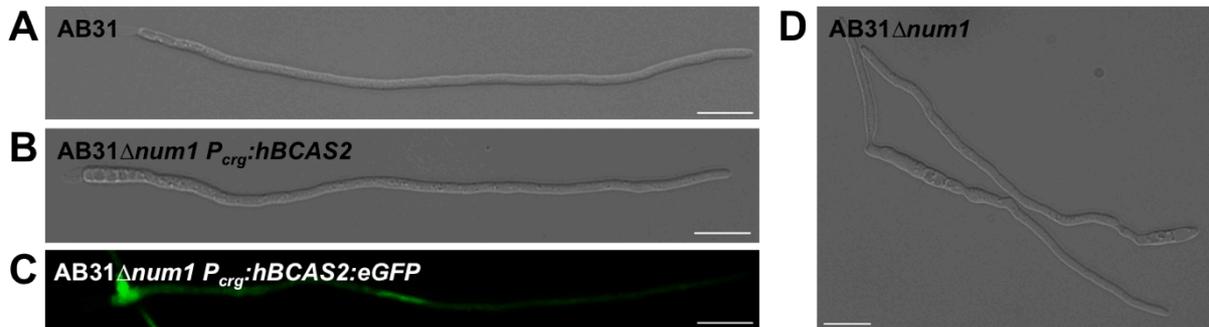


Abbildung 23: Komplementationsanalyse mit dem humanen BCAS2-Protein. Die Hyphenmorphologie der angegebenen Stämme wurde 12-14 Stunden nach der Induktion des bE/bW-Heterodimers sowie des P_{crg1} -Promotors in Arabinose-haltigem Medium fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Gezeigt sind DIC-Durchlichtaufnahmen sowie die GFP-Fluoreszenzsignale. **(A)** Typische Morphologie eines AB31 Wildtyp-Stammes. **(B)** Eine Dicodeon-optimierte Version des humanen BCAS2-Proteins wurde unter Kontrolle des induzierbaren P_{crg1} -Promotors in einem AB31 Δ num1-Stamm exprimiert. Der Phänotyp gleicht dem des Wildtyp-Stammes. **(C)** Expressionskontrolle des hBCAS2:eGFP-Fusionsproteins unter Kontrolle des induzierbaren P_{crg1} -Promotors. **(D)** Typische Morphologie eines AB31 Δ num1-Deletionsstammes. Der Längenmaßstab entspricht 10 μ m.

2.5.2 Num1 besitzt ein funktionelles Homolog (AN4244) in *Aspergillus nidulans*

Im Rahmen dieser Arbeit wurde neben Num1 in *U. maydis* auch das homologe Protein AN4244 im Ascomyzeten *Aspergillus nidulans* untersucht, um festzustellen ob die Funktion des Proteins in Pilzen generell konserviert ist. AN4244 weist 29% Sequenzidentität ($E = 7e^{-14}$, NCBI BLAST) und 49% Ähnlichkeit zum Num1-Protein aus *U. maydis* auf. Zur funktionellen Charakterisierung wurde der offene Leserahmen des AN4244-Gens durch homologe Rekombination mit dem Pyridoxalphosphat-Auxotrophiemarker (*pyrG*) im Stamm TN02A3 (Nayak *et al.*, 2006) ersetzt. AN4244-Deletionsmutanten wiesen eine deutlich kleinere und kompaktere Kolonie-Morphologie sowie eine drastisch reduzierte Bildung von Sporen auf (Abb. 24A). Darüber hinaus setzte das Auskeimen der Sporen in AN4244-Deletionsstämmen verzögert ein (Abb. 24B). In weiterführenden Untersuchungen wurde die Keimungsrate näher quantifiziert und nach acht-stündiger Inkubation bei 37°C waren in Δ AN4244-Stämmen 5% der Sporen ausgekeimt, während es im Wildtyp-Stamm bereits 98% waren (Bisson, 2011).

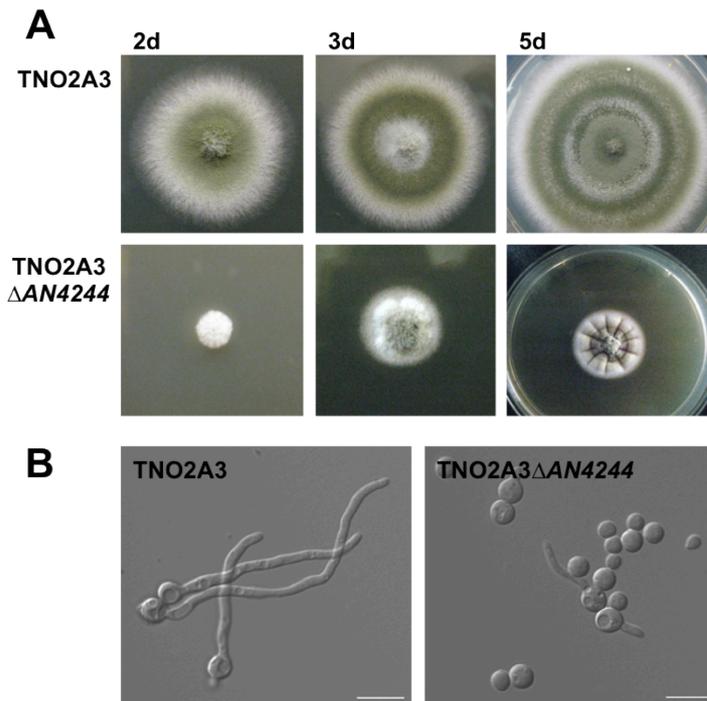


Abbildung 24: Phänotypische Analyse von Deletionsmutanten des *num1*-Homologs AN4244 in *Aspergillus nidulans*. (A) Sporen der angegebenen Stämme wurden auf CM-Medium appliziert und die Platten wurden bei 37°C inkubiert. Gezeigt sind fotografische Aufnahmen der Kolonien nach zwei, drei und fünf Tagen Inkubation. Die Kolonien der Deletionsmutante sind deutlich kleiner als die Wildtyp-Kolonien nach entsprechender Inkubationsdauer. Die Sporenmenge ist reduziert. (B) Sporensuspensionen der angegebenen Stämme wurden für 20 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und mikroskopisch analysiert. Gezeigt sind DIC-Durchlichtaufnahmen. Das Auskeimen der Sporen tritt in der Deletionsmutante im Vergleich zum TNO2A3 Wildtyp-Stamm stark verzögert ein. Der Längenmaßstab entspricht 10 µm.

Ferner wurde der Phänotyp der AN4244-Deletion im Vergleich zu den *num1*-Deletionsmutanten in *U. maydis* in *A. nidulans* Hyphen betrachtet. Grundsätzlich wiesen die Filamente, die unter geeigneten Wachstumsbedingungen aus den Sporen auskeimen können, eine ähnliche Morphologie wie die von *U. maydis* auf und waren deutlich kürzer als TNO2A3 Wildtyp-Hyphen nach identischer Keimdauer, wohingegen der Durchmesser verdickt war (Abb. 25, 26A+B und 27). Wie bereits für *num1*-Deletionsstämme beschrieben wurde, war auch die Vakuolenmorphologie in TNO2A3ΔAN4244-Stämmen gestört und die Deletionsmutanten wiesen überwiegend fragmentierte Vakuolen auf, die statt in regelmäßiger Anordnung gehäuft verteilt waren (Abb. 25).

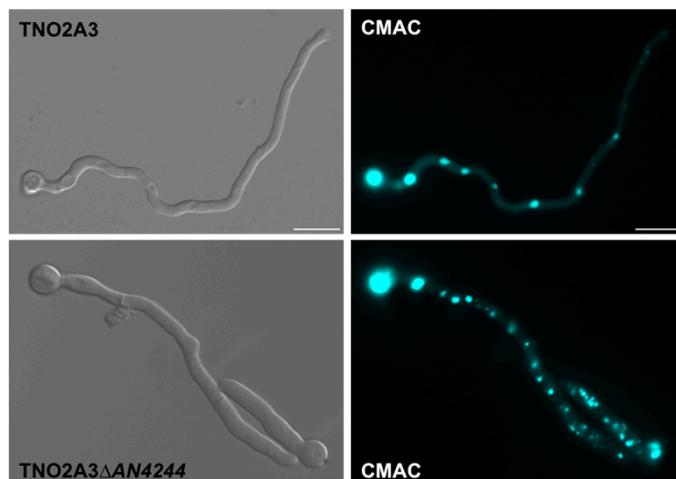


Abbildung 25: Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Vakuolenmorphologie in Deletionsmutanten des *num1*-Homologs AN4244 in *A. nidulans*. Sporensuspensionen der angegebenen Stämme wurden für 18 Stunden bei 37°C inkubiert. Die ausgekeimten Filamente wurden zur Visualisierung von Vakuolen anschließend mit CellTracker Blue® (CMAC) angefärbt. Gezeigt sind DIC-Durchlichtaufnahmen und CFP-Fluoreszenzsignale. Die Anzahl der Vakuolen ist in der Deletionsmutante signifikant erhöht. Der Längenmaßstab entspricht 10 µm.

Zur Untersuchung der Zellkernverteilung wurden die Hyphen mit DAPI-Färbelösung behandelt und anschließend fluoreszenzmikroskopisch analysiert. In *AN4244*-Deletionsmutanten kam es insbesondere im Bereich des Auswachsens der Hyphe aus der Spore häufig zu Akkumulationen von Zellkernen, wohingegen die Zellkerne in Wildtyp-Hyphen in gleichmäßigem Abstand in der Hyphe angeordnet waren (Abb. 26). Ein ähnlicher Phänotyp bezüglich der Zellkern-Positionierung wurde bereits in *kinA*-Deletionsstämmen beobachtet, dem *A. nidulans* Homolog zu *U. maydis kin1* (Requena *et al.*, 2001), was ein Hinweis für eine funktionelle Kopplung von *AN4244* und *kinA* in *A. nidulans* sein könnte. Um diese Annahme weiter zu testen, wurde analog zu *U. maydis* die Lokalisierung des Dynein Motorproteins untersucht. Die Lokalisierung von Dynein in *A. nidulans* erfolgte mit Hilfe eines GFP:NudA-Fusionsproteins in den Stämmen LZ12 (Zhuang *et al.*, 2007) und LZ12 Δ *AN4244*. Wie in Kapitel 1.2 beschrieben, akkumulieren GFP:NudA-Fusionsproteine an der Hyphenspitze von Wildtyp-Hyphen und bilden eine apikale Ladezone für retrograde Transportprozesse. Ähnlich der Dynein-Lokalisierung in *U. maydis num1*-Deletionsstämmen ist die apikale Akkumulation von GFP:NudA in LZ12 Δ *AN4244* bedeutend reduziert, das GFP-Signal stattdessen verstärkt im Zytoplasma der Hyphen zu beobachten (Abb. 27).

Zusammenfassend deuten diese Daten neben der Sequenzhomologie auf eine funktionelle Ähnlichkeit von *num1* aus *U. maydis* und *AN4244* aus *A. nidulans* hin.

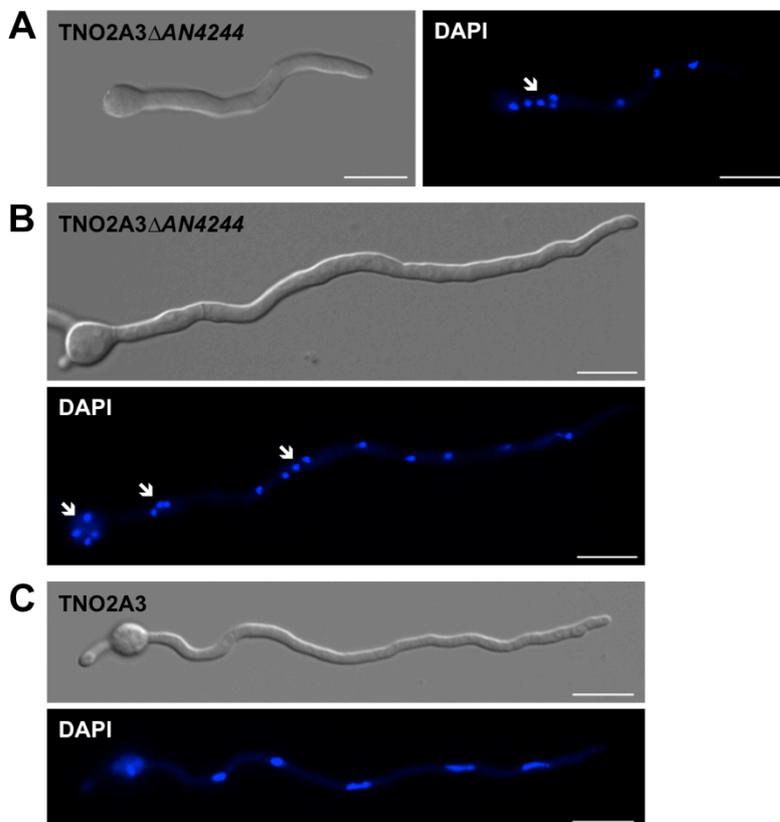


Abbildung 26:
Mikroskopische Analyse
der Zellkernverteilung in
Deletionsmutanten des
num1-Homologs AN4244
in *A. nidulans*.

Sporensuspensionen der angegebenen Stämme wurden für 12 Stunden (A) bzw. 18 Stunden (B) bei 37°C inkubiert. Die ausgekeimten Filamente wurden zur Visualisierung der Zellkerne anschließend mit DAPI gefärbt. Gezeigt sind DIC-Durchlichtaufnahmen und DAPI-Fluoreszenzsignale. In der Deletionsmutante kam es häufig zur Bildung von Zellkern-Clustern (mit \blacktriangledown markiert), wohingegen die Zellkerne im Wildtyp-Stamm TNO2A3 (C) gleichmäßig in der Hyphe verteilt waren (12 Stunden Inkubation bei 37°C). Der Längenmaßstab entspricht 10 μ m.

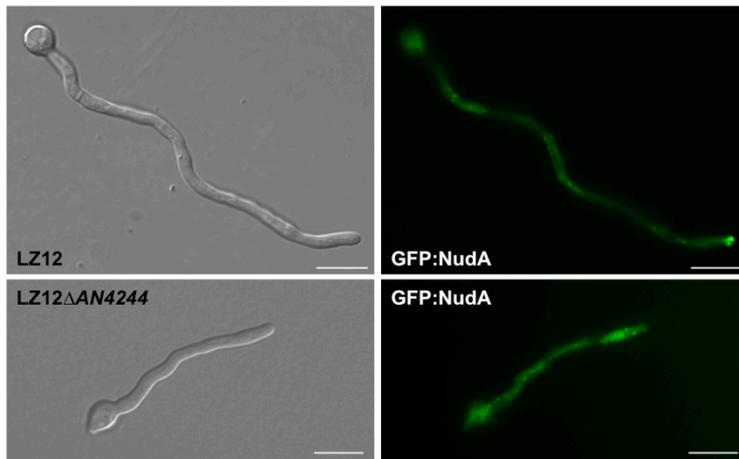


Abbildung 27: Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Dynein-Lokalisierung in Deletionsmutanten des *num1*-Homologs *AN4244* in *A. nidulans*. Sporensuspensionen der angegebenen Stämme wurden für 18 Stunden bei 37°C inkubiert und fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Gezeigt sind DIC-Durchlicht-Aufnahmen und GFP-Fluoreszenz-Signale. Im Wildtyp-Stamm LZ12 ist eine starke Akkumulation von GFP:NudA an der apikalen Hyphenspitze zu beobachten; in LZ12 Δ AN4244 hingegen war das GFP-Signal stattdessen verstärkt im Zytoplasma zu beobachten. Der Längenmaßstab entspricht 10 μ m.

2.6 Funktionelle Analyse von Num1-Interaktionspartnern

Um weitere Einblicke in die molekulare Funktion des Num1-Proteins zu erlangen, wurden in der vorliegenden Arbeit verschiedene Num1-Interaktionspartner funktionell charakterisiert und in Bezug auf die bereits bekannten Num1-abhängigen Prozesse analysiert. Darunter fielen neben dem Kin1-Motorprotein mehrere Proteine, für die eine putative Rolle während vesikulärer Transportprozesse prognostiziert wurde. Ein Einfluss von Num1 auf die Motilität früher Endosomen konnte bereits gezeigt werden (2.3.4). Weitere Interaktionspartner fielen aber auch in die Kategorien „Zellzyklus“ (Cef1, Um10958) oder „Mitochondrien-Morphologie“ (Dnm1).

2.6.1 Um03539 und Um11510 sind nicht notwendig für das polare Wachstum

Es wurden verschiedene Num1-Interaktionspartner identifiziert, die aufgrund ihrer vorhergesagten Domänenarchitektur in die Kategorie „zelluläre Transportprozesse“ eingeordnet wurden. Um10158 ist ein Adaptin-ähnliches Protein aus Clathrin/Coatomer-Adapter Komplexen (IPR002553), die in vesikulären Transportprozessen zwischen ER und Golgi sowie endozytotischen Vorgängen involviert sind (McMahon und Mills, 2004). Es war nicht möglich, Deletionsmutanten von *um10158* zu generieren, sodass das entsprechende Protein aus weiterführenden Analysen ausgeschlossen wurde. Um03539 und Um11510 enthalten eine BAR-Domäne (IPR004148) bzw. eine BRO1-Domäne (IPR004328), was eine Beteiligung an intrazellulären Transport- und Endozytose-Prozessen wahrscheinlich macht. BAR-Domänen können an Membranen dimerisieren, wodurch Membrankrümmungen für das Abschnüren von Transportvesikeln induziert werden (Habermann, 2004). BRO1-Domänen sind für den Proteintransport in Vakuolen oder Lysosomen bekannt (Kim *et al.*, 2005). Um00933 weist keine konservierten Domänen auf, anhand derer man auf eine spezifische Funktion schließen könnte. Von allen drei Proteinen wurden mehrere unabhängige Klone im Hefe Zwei-Hybrid Screen isoliert, weshalb sie innerhalb dieser Arbeit näher charakterisiert werden sollten.

Die offenen Leserahmen von *um03539*, *um11510* und *um00933* wurden zunächst durch homologe Rekombination mit einer Hygromycin-Resistenzkassette im solopathogenen Stamm SG200 deletiert. Um die pathogene Entwicklung der Deletionsstämmen zu untersuchen, wurden Spritzinfektionen sieben Tage alter Maispflanzen durchgeführt. Die Infektionsstudien ergaben, dass die Deletion von *um03539* keinen Unterschied zum SG200-Kontrollstamm aufwies, die Deletion von *um11510* bzw. *um00933* jedoch zu einer reduzierten Pathogenitätsrate führte. Diese war hauptsächlich durch die Bildung von kleineren Tumoren gekennzeichnet, während insgesamt die Anzahl an Pflanzen mit Tumorbildung nicht verringert war (Abb. 28).

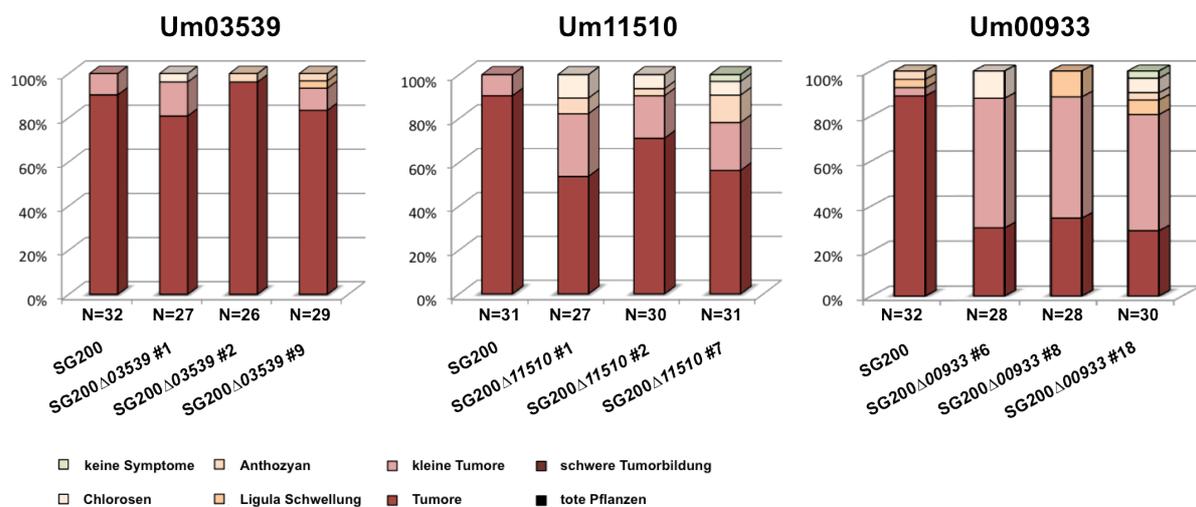


Abbildung 28: Pathogenität von Deletionsstämmen ausgewählter Num1-Interaktionspartner. Die angegebenen SG200-Derivate wurden in sieben Tage alte Maispflanzen injiziert. Weitere sieben Tage nach Inokulation wurden die Krankheitssymptome der infizierten Maispflanzen quantifiziert. Die Symptome der einzelnen Pflanzen wurden nach (Kämper *et al.*, 2006) je nach Stärke in verschiedene Kategorien unterteilt. N steht für die Anzahl der ausgewerteten Pflanzen.

Ob die BAR- und BRO1-Domänen enthaltene Proteine Um03539 und Um11510 eine Rolle während des intrazellulären Proteintransports in *U. maydis* spielen, wurde darüber hinaus anhand von Deletionsmutanten, die in Stamm AB33 Yup1:eGFP (Lenz *et al.*, 2006) generiert wurden, untersucht. Somit konnte wie bereits beschrieben die Motilität früher Endosomen während des filamentösen Wachstums analysiert werden. Die Morphologie und das polare Wachstum der *um03539*- und *um11510*-Deletionsstämmen unterschied sich nicht von der des AB33-Ausgangsstammes (Abb. 29). Lediglich in AB33 Δ *um11510* war in seltenen Fällen die Bildung zusätzlicher Septen im Zellkörper zu beobachten (Abb. 29C), was jedoch nicht näher quantifiziert wurde. Die Verteilung von frühen Endosomen innerhalb des Filaments sowie deren Motilität war wiederum nicht maßgeblich von der Wildtyp-Situation zu unterscheiden (Film 3).

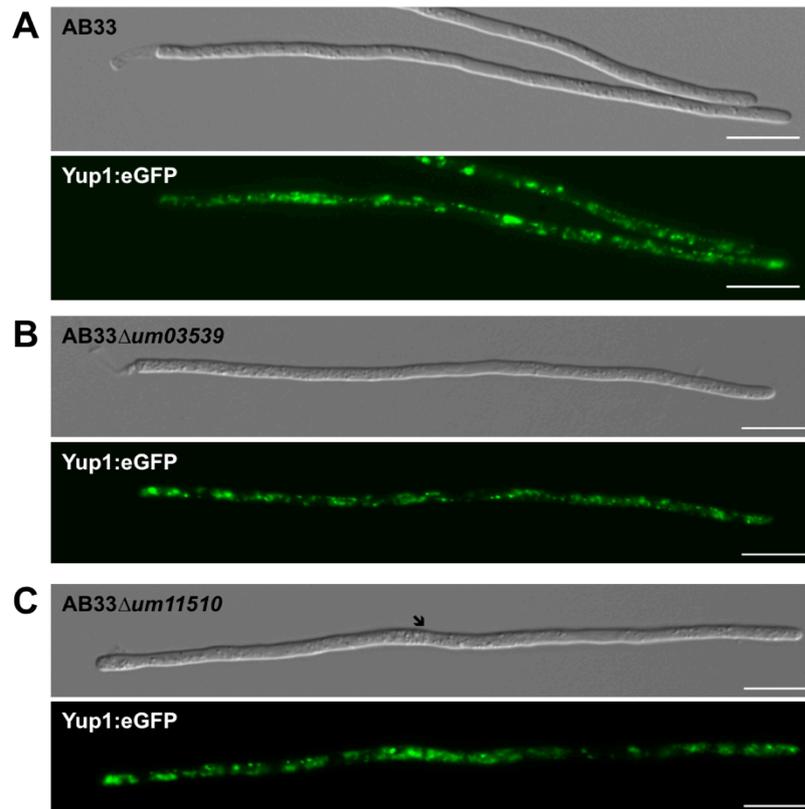


Abbildung 29: Fluoreszenzmikroskopische Analyse von AB33Δum03539- und AB33Δum11510-Deletionsstämmen. Die Hyphenmorphologie der angegebenen Stämme wurde 14 Stunden nach Induktion des bE/bW-Heterodimers in Nitrat-haltigem Minimalmedium fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Die Visualisierung von Endosomen erfolgte mit Hilfe eines Yup1:eGFP-Fusionsproteins unter Kontrolle des konstitutiv aktiven P_{oteF} -Promotors, das als Markerprotein für frühe Endosomen fungiert. Gezeigt sind DIC-Durchlichtaufnahmen sowie die GFP-Fluoreszenzsignale. **(A)** Typische Morphologie eines AB33-Wildtypstammes. Die Yup1:eGFP-Fusionsproteine lokalisieren auf schnellen, bidirektional-laufenden Partikeln, die gleichmäßig innerhalb der Hyphe verteilt sind. Die Deletion von *um03539* **(B)** und *um11510* **(C)** hat keine Auswirkung auf die Morphologie der Filamente bzw. die Motilität von Yup1-markierten Endosomen. In seltenen Fällen konnte die Bildung delokalierter Septen (mit Pfeil markiert) in der *um11510*-Deletion beobachtet werden. Der Längenmaßstab entspricht 10 μm .

2.6.2 Um00933 ist ein Pathogenitätsfaktor mit Num1-ähnlichem Phänotyp

In Analogie zu den in 2.6.1 beschriebenen Experimenten wurde die Auswirkung einer *um00933*-Deletion auf das filamentöse Wachstum sowie den Transport früher Endosomen im Stamm AB33 Yup1:eGFP untersucht. Während die Deletion des Gens keinen Einfluss auf das polare Hyphenwachstum oder die Morphologie der Filamente hatte, war ähnlich wie in *num1*-Deletionsstämmen in ca. 20% der Hyphen die Bildung delokalierter Septen zu beobachten. In einigen Filamenten wurde die Bildung mehrerer Septen beobachtet, was zu leeren Kompartimenten in der Zellmitte führte. Yup1-markierte Endosomen akkumulierten häufig im Bereich der delokalisierten Septen (Abb. 30), jedoch war die Motilitätsrate der Endosomen meist nicht signifikant beeinträchtigt (Film 4). Des Weiteren war insbesondere in den Hyphen mit delokalisierten Septen eine abweichende Anzahl von Zellkernen zu beobachten (nicht gezeigt). Vergleichbar mit den AB31Δ*num1*-

Deletionsstämmen wiesen die AB33 Δ um00933-Deletionsstämmen häufig mehrere Zellkerne auf, was für einen Einfluss von Um00933 auf die Regulation des Zellzyklus und die Zellteilung spricht.

In Bezug auf die Pathogenität, die Septierung der Filamente, der Zellkernverteilung sowie der Verteilung von Endosomen treten also überlappende Phänotypen der *num1*- und *um00933*-Deletionsstämmen auf.

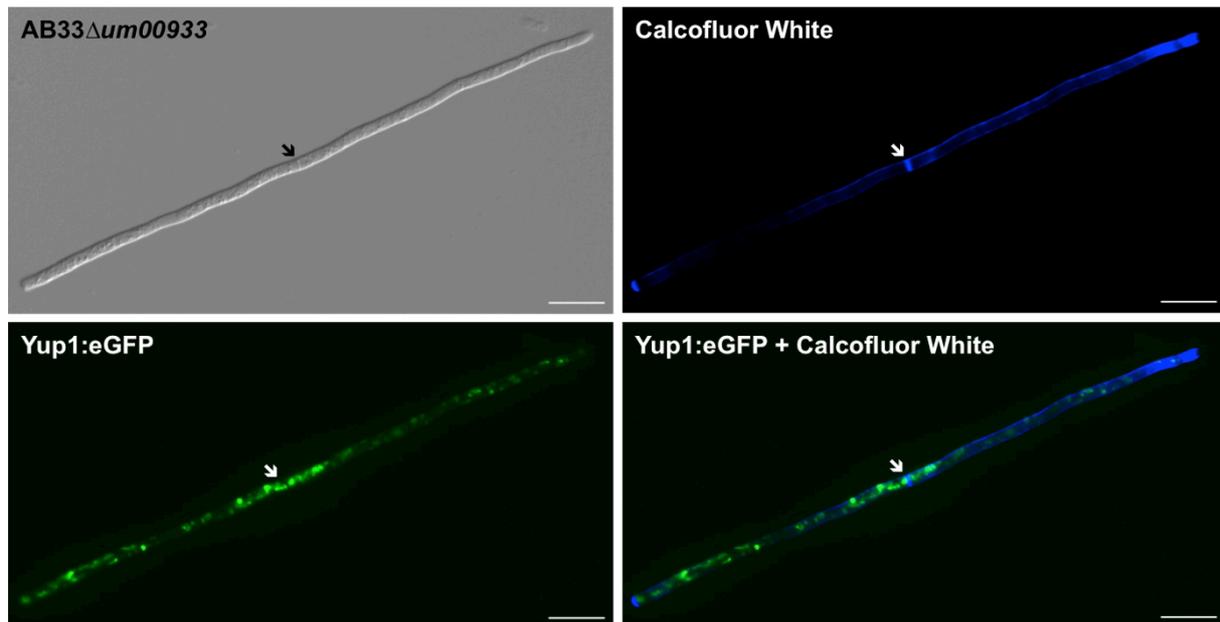


Abbildung 30: Fluoreszenzmikroskopische Analyse eines AB33 Δ um00933-Deletionsstammes. Die Hyphenmorphologie wurde 14 Stunden nach Induktion des bE/bW-Heterodimers in Nitrat-haltigem Minimalmedium fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Die Visualisierung von Endosomen erfolgte mit Hilfe des Yup1:eGFP-Fusionsproteins unter Kontrolle des konstitutiv aktiven P_{otef} -Promotors. Septen wurden durch eine Calcofluor White Färbung sichtbar gemacht. Gezeigt sind eine DIC-Durchlichtaufnahme, DAPI- und GFP-Fluoreszenzsignale, sowie die Überlagerung beider Fluoreszenzkanäle. Die Deletion von *um00933* hat keine Auswirkung auf die Morphologie der Filamente, es konnte jedoch häufig die Bildung delokalierter Septen (mit Pfeil markiert) sowie eine Akkumulation von Yup1-markierten Endosomen im Bereich dieser Septen beobachtet werden. Der Längenmaßstab entspricht 10 μ m.

Um weitere Einblicke in die molekulare Funktion des Um00933-Proteins zu erlangen, wurde anhand eines C-terminalen Fusionsproteins mit 3eGFP, das *in locus* unter Kontrolle des nativen P_{Um00933} -Promotors exprimiert wurde, dessen subzelluläre Lokalisierung im Stamm AB31 untersucht. Sowohl in haploiden Sporidien als auch nach Induktion von *b*-abhängigen Filamenten war das GFP-Signal entlang longitudinaler, fibrillärer Strukturen zu beobachten, an denen kleine motile, dynamische Partikel sowohl in antero- als auch in retrograde Richtung transportiert wurden (Film 6). Darüber hinaus war das Um00933-Protein an distinkten weniger motilen Foci innerhalb der Zelle zu detektieren (Abb. 31). Die einzelnen Foci waren insbesondere in filamentösen Zellen prädominant in der Nähe des Nukleus zu beobachten. Inhibitionsstudien mit Benomyl deuteten darauf hin, dass es sich bei den beobachteten filamentösen Strukturen um Mikrotubuli handelte (nicht gezeigt). Durch eine Co-Lokalisierung der Fibrillen mit einem konstitutiv aktiven Tub1:mCherry-Protein zur Visualisierung von Mikrotubuli konnte dieses Ergebnis bestätigt werden (nicht gezeigt).

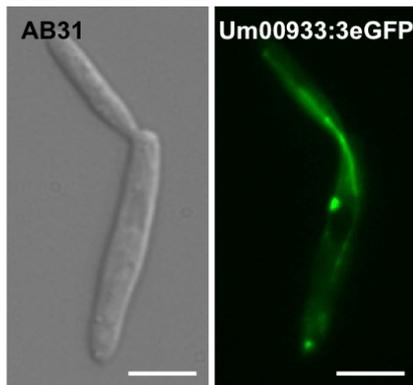


Abbildung 31: Subzelluläre Lokalisierung eines Um00933:3eGFP-Fusionsproteins. Haploide Sporidien wurden während der exponentiellen Wachstumsphase fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Gezeigt sind eine DIC-Durchlichtaufnahme und das GFP-Fluoreszenzsignal. Das Protein wurde entlang fibrillärer Strukturen sowie in distinkten Foci detektiert. Der Längenmaßstab entspricht 5 μm . Die Abbildung wurde zur Verfügung gestellt von Niko Pinter.

2.6.3 Um10958 ist eine Komponente des Spindelpolkkörpers in *U. maydis*

Neben den Komponenten der vesikulären Transportmaschinerie konnte Um10958 als Num1-Interaktionspartner identifiziert werden. Das Protein weist 24% Sequenzidentität ($E = 1e^{-35}$) zu dem *S. pombe* Ndc80 und 23% Sequenzidentität ($E = 4e^{-21}$, NCBI BLAST) zum *S. cerevisiae* Tid3p/Ndc80p-Protein auf, welche die evolutionär hoch konservierte HEC/Ndc80-Domäne (IPR005550) beinhalten. Es könnte sich also um eine Komponente des putativen Ndc80p-Komplexes handeln, der die Mikrotubuli der Mitosespindel im Bereich der Zentromerregionen der Chromosomen bindet und essentiell für die Chromosomensegregation, Kinetochor-Assemblierung und Spindel-Checkpoint Aktivität ist (McClelland *et al.*, 2003; Wigge und Kilmartin, 2001; Zheng *et al.*, 1999). Der Versuch, Deletionsmutanten von *um10958* zu generieren, ist in vorangegangenen Studien bereits gescheitert, woraus geschlussfolgert werden kann, dass das Protein essentiell ist. Die Interaktion von Um10958 mit Num1 konnte jedoch durch Co-Immunopräzipitation in einem *in vitro* Expressionssystem verifiziert werden (Kellner, 2009).

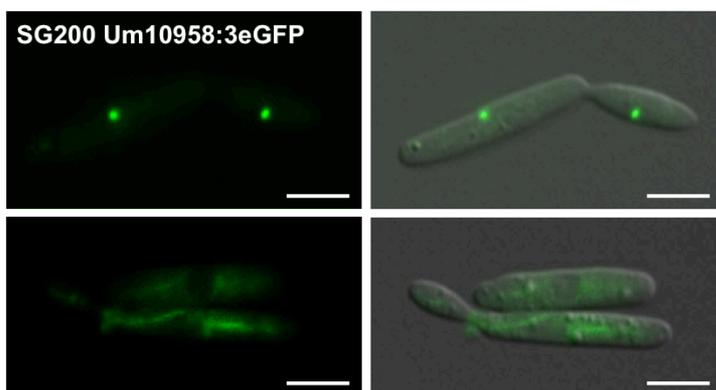


Abbildung 32: Subzelluläre Lokalisierung eines Um10958:3eGFP-Fusionsproteins. Haploide Sporidien des Stammes UNK104 wurden während der exponentiellen Wachstumsphase fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Gezeigt sind DIC-Durchlichtaufnahmen und GFP-Fluoreszenzsignale. Während der Zellteilung konnte das Um10958:3eGFP-Fusionsprotein an Spindelpolkörper-ähnlichen Strukturen beobachtet werden (oben). Häufig wurde auch ein diffuses zytoplasmatisches GFP-Signal entlang filamentöser Strukturen beobachtet (unten). Der Längenmaßstab entspricht 5 μm .

Da für Num1 bereits eine Rolle während der Zellzyklusregulation beschrieben werden konnte, wurde die Funktion des Um10958-Proteins in diesem Zusammenhang weiter charakterisiert. Zunächst wurde die subzelluläre Lokalisierung des Proteins untersucht, indem das Gen im Stamm SG200 im nativen Locus durch eine Variante mit C-terminal fusioniertem 3eGFP ersetzt wurde. Das GFP-Signal des Fusionsproteins war häufig als diffuses Signal im Zytoplasma bzw. entlang filamentöser Strukturen zu

detektieren. Während der Zellteilung kam es jedoch zu sehr fokussierten Signalen, die an Spindelpolkkörper-ähnlichen Strukturen in der Nähe des Zellkerns lokalisierten. Ab einer gewissen Größe der sprossenden Tochterzelle wurden beide Foci in einer raschen Bewegung gleichmäßig auf Mutter- und Tochterzelle verteilt (Abb. 32 und Film 5). Es kann spekuliert werden, dass das Protein eine Komponente des Spindelpolkkörpers oder Kinetochors in *U. maydis* darstellt und für die Chromosomensegregation während Kernteilungsvorgängen benötigt wird. Aufgrund der Letalität der *um10958*-Deletion in haploiden Stämmen wurde auf weitere funktionelle Analysen im Rahmen dieser Arbeit verzichtet.

2.7 Num1 interagiert mit Dnm1, einem mitochondrialen Spaltungsfaktor

Das Dnm1-Protein ist eine evolutionär hoch konservierte GTPase der Dynamin-Familie und weist 54% Sequenzidentität zum humanen Drp1-Protein (E = 0,0) sowie 51% Sequenzidentität (E = 0,0, NCBI BLAST) zum Dnm1p-Protein aus *S. cerevisiae* auf, wo die Funktion des Proteins besonders gut untersucht ist. Dynamine kommen in allen Eukaryoten vor (Praefcke und McMahon, 2004; Shin *et al.*, 1997) und werden unter anderem beim Abschnüren von endozytotischen Vesikeln von der Plasmamembran oder der Teilung von verschiedenen Zellorganellen, wie Mitochondrien oder Chloroplasten, benötigt. Dnm1p assembliert an der dem Zytoplasma zugewandten Seite der Mitochondrien an Stellen, an denen die Teilung stattfindet (Bleazard *et al.*, 1999) und oligomerisiert dort zu Ringen, die durch Konstriktion zur Teilung des Organells führen (Klockow *et al.*, 2002). In *U. maydis* ist Dnm1 ebenfalls eine essentielle Komponente für die Teilung von Mitochondrien (Mahlert *et al.*, 2009). Über das Fis1-Protein assemblieren Dnm1-Moleküle an der Mitochondrien-Membran (Basse, pers. Mitteilung).

Zunächst wurde die in der Hefe-Zwei-Hybrid Analyse identifizierte Interaktion von Num1 mit Dnm1 durch *in vivo* Co-Immunoprecipitations-Experimente verifiziert. Für die im folgenden beschriebenen Untersuchungen wurde der Stamm Bub7/pKS2/pCudg1 (*a1 b3, P_{crg1}:mtRFP, P_{crg1}:dnm1:egfp*) (Mahlert *et al.*, 2009) verwendet, der ein mitochondrielle Matrix gerichtetes RFP zur Visualisierung von Mitochondrien sowie ein Dnm1:eGFP-Fusionsprotein exprimiert, beide unter Kontrolle des regulierbaren P_{crg1}-Promotors. Für die Co-Immunoprecipitation wurde zusätzlich ein Num1:3HA-Fusionsprotein eingebracht. In der Negativkontrolle wurde keine unspezifische Bindung an die anti-HA-gekoppelte Agarose beobachtet. Im Gegensatz dazu wurde Dnm1 co-immunoprecipitiert, was eine physikalische Interaktion von Num1 mit Dnm1 bestätigt (Abb. 33A). Des Weiteren wurde die subzelluläre Lokalisierung von Dnm1:eGFP untersucht, um festzustellen, ob neben der physikalischen Interaktion auch eine genetische Interaktion zwischen Num1 und Dnm1 vorliegt. Im Stamm Bub7/pKS2/pCudg1 wurde dazu das *num1*-Gen deletiert und die resultierenden Stämme fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Dnm1:eGFP-Proteine akkumulieren zu Patches, die zu einem Großteil mit der Mitochondrienmembran assoziiert sind, teils aber auch zytoplasmatisch lokalisieren (Mahlert *et al.*, 2009). Die Deletion von *num1* führt zu einem differenzierten Lokalisierungsmuster:

Die Patches unterschieden sich zum einen in der Größe und waren in der $\Delta num1$ -Mutante deutlich kleiner als im Wildtyp, zum anderen war die Anzahl der Patches signifikant erhöht. Während im Bub7 Wildtypstamm durchschnittlich 6,6 ($\pm 2,6$, N=36, (Mahlert *et al.*, 2009)) Patches gezählt wurden, lag die Anzahl in Bub7 $\Delta num1$ zwischen 8 und 16 Patches pro Zelle (Abb. 33B).

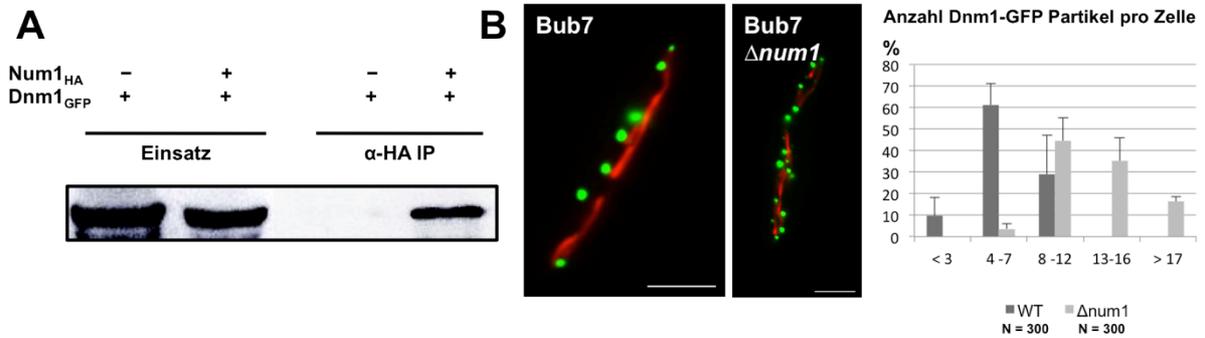


Abbildung 33: Funktionelle Charakterisierung der Num1/Dnm1-Interaktion. (A) *in vivo* Co-Immunopräzipitation von Num1 und Dnm1. Num1:3HA wurde unter Kontrolle des nativen P_{num1}-Promotors und Dnm1:eGFP wurde unter Kontrolle des induzierbaren P_{org1}-Promotors in Bub7 co-exprimiert. Die Zellen wurden in Arabinose-haltigem CM-Medium angezogen, um den P_{org1}-Promotor zu induzieren. Der Gesamtzellextrakt (Einsatz) aus exponentiell wachsenden Kulturen wurde für eine Immunopräzipitation mit anti-HA Antikörpern eingesetzt (α-HA IP). In einer anschließenden Western-Analyse mit anti-GFP Antikörpern konnte das Dnm1:eGFP-Fusionsprotein detektiert werden. Die Negativkontrolle zeigt keine unspezifische Bindung von Dnm1:eGFP an die anti-HA Agarose. (B) Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Dnm1-Lokalisierung in Abhängigkeit von Num1. Exponentiell wachsende Kulturen der Stämme Bub7/pKS2/pCudg1 (Mahlert *et al.*, 2009) sowie UTO7 (Bub7/pKS2/pCudg1 $\Delta num1$) wurden mikroskopisch analysiert. Beide Stämme exprimieren mitochondrielles RFP zur Visualisierung von Mitochondrien sowie Dnm1:eGFP unter Kontrolle des induzierbaren P_{org1}-Promotors. Gezeigt sind Überlagerungen der RFP- und GFP-Fluoreszenzsignale. Die Deletion von *num1* führt zu einer erhöhten Anzahl an Dnm1-Partikeln. Der Längenmaßstab entspricht 5 μ m. Rechts ist die Quantifizierung der Anzahl der Dnm1:eGFP-Partikel pro Zelle dargestellt. Gezeigt sind die Mittelwerte von jeweils drei unabhängigen Transformanten. N steht für die Anzahl der ausgewerteten Zellen. Abbildung B wurde zur Verfügung gestellt von Theresa Obhof.

2.7.1 Num1 hat keinen Einfluss auf die Morphologie, Fusion oder den Transport von Mitochondrien

Da Dnm1 ein wichtiger Faktor für die Dynamik von Fusion und Teilung ist, wurde überprüft, ob auch Num1 einen Einfluss auf die Morphologie von Mitochondrien hat. Da Num1 mit Komponenten aus der zellulären Transportmaschinerie interagiert, wurde zusätzlich getestet, ob die *num1*-Deletion das Fusionsverhalten der Organellen beeinflusst, da für die Fusion auch der Transport der Mitochondrien innerhalb der Zelle intakt sein muss. Für die fluoreszenzmikroskopische Analyse der Mitochondrien-Morphologie wurde ein FB2-Stamm, der als Mitochondrienmarker Matrix-gerichtetes GFP (mtGFP) exprimiert (Mahlert *et al.*, 2009), verwendet. Die Mitochondrien liegen in Wildtyp-Sporidien meist als lange, tubuläre Strukturen vor, pro Zelle sind dabei zwischen drei und sechs Fragmente zu detektieren. Aufgrund der fehlenden Teilung in *dnm1*-Deletionsstämmen liegen die Organellen hier als lange, die ganze Zelle durchspannende Tubuli bis hin zu netzartigen Strukturen vor (Mahlert *et al.*, 2009). In

FB2 $\Delta num1$ -Stämmen waren im Gegensatz dazu keine wesentlichen Unterschiede im Vergleich zu FB2 festzustellen (Abb. 34).

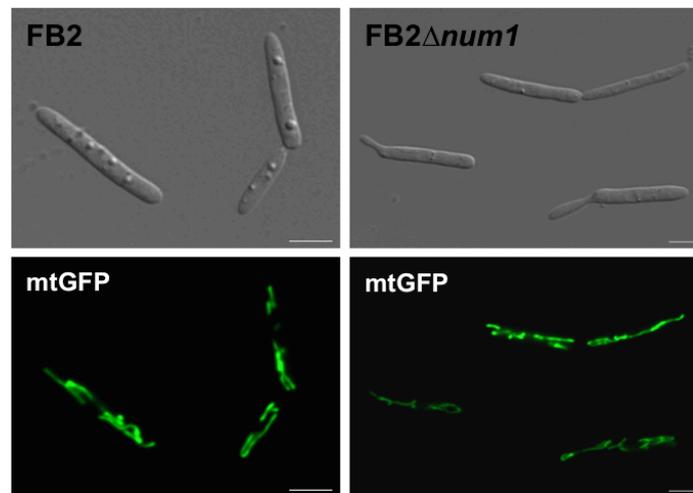


Abbildung 34: Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Mitochondrien-Morphologie in Abhängigkeit von Num1. Exponentiell wachsende Kulturen der Stämme FB2 pKS1 (Mahlert *et al.*, 2009) sowie UTO4 (FB2 pKS1 $\Delta num1$) wurden fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Beide exprimieren zur Visualisierung von Mitochondrien mitochondrielles GFP unter Kontrolle des induzierbaren P_{crg1} -Promotors. Gezeigt sind DIC-Durchlichtaufnahmen und GFP-Fluoreszenzsignale ca. sechs Stunden nach Induktion des P_{crg1} -Promotors in Arabinose-haltigem CM-Medium. Der Längenmaßstab entspricht 5 μ m.

Mitochondrielle Fusionsereignisse wurden anhand kompatibler FB1- und FB2-Stämme, die die Reporterkonstrukte pKS1 (mtGFP) bzw. pKS2 (mtRFP) (Mahlert *et al.*, 2009) exprimieren, analysiert. Die Proteine, für die diese Plasmide kodieren, lokalisieren in der mitochondrialen Matrix und werden als Fusionsproteine mit RFP bzw. GFP unter Kontrolle des regulierbaren P_{crg1} -Promotors exprimiert. Die haploiden Sporidien können in Aktivkohle-haltigem Flüssigmedium fusionieren und zu dikaryotischen Filamenten heranwachsen. Auf dieser Grundlage wurden Experimente zur Mitochondrienfusion durchgeführt (Mahlert *et al.*, 2009; Nunnari *et al.*, 1997). Durch die Verwendung der unterschiedlichen Reporterkonstrukte zur Visualisierung der Mitochondrien können Fusionsereignisse ausgewertet werden. Erscheint nach der Überlagerung der beiden Fluoreszenzkanäle das Signal gelb, so ist es zur Fusion der Mitochondrienpopulationen gekommen. Ohne Fusionsereignisse bleiben die GFP- und RFP-Signale getrennt voneinander in den Filamenten zu beobachten. Untersucht wurden kompatible FB1/FB2 Wildtyp-Kreuzungen, sowie die entsprechenden *num1*-Deletionsstämme. Letztere wiesen wie die Wildtyp-Stämme keine Fusion auf und die beiden Mitochondrienpopulationen blieben getrennt (Abb. 35A+B). Als Kontrolle für ein positives Fusionsereignis wurden kompatible FB1 $\Delta dnm1$ x FB2 $\Delta dnm1$ -Kreuzungen in die Analyse mit einbezogen (Abb. 35C).

Um den Einfluss von Num1 auf den Transport der Mitochondrien während des filamentösen Hyphenwachstums zu untersuchen, wurde mitochondrielles GFP von pKS2 (Mahlert *et al.*, 2009) in AB31 und AB31 $\Delta num1$ exprimiert. Eine axenisch wachsende Kultur wurde vier Stunden nach Induktion des filamentösen Wachstums über das bE/bW-Heterodimer mit Inhibitoren des Zytoskeletts

behandelt und nach zwei weiteren Stunden fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Zur Depolymerisierung des Mikrotubuli-Zytoskeletts wurde Benomyl verwendet; das Actin-Zytoskelett wurde durch Zugabe von Cytochalasin A degradiert. Die Behandlung mit den Inhibitoren führte zu erheblichen morphologischen Störungen des filamentösen Hyphenwachstums. Maßgebliche Unterschiede bezüglich des Transports der Mitochondrien konnten jedoch durch diese Methode in AB31 Δ *num1*-Stämmen im Vergleich zu AB31 nicht beobachtet werden (nicht gezeigt).

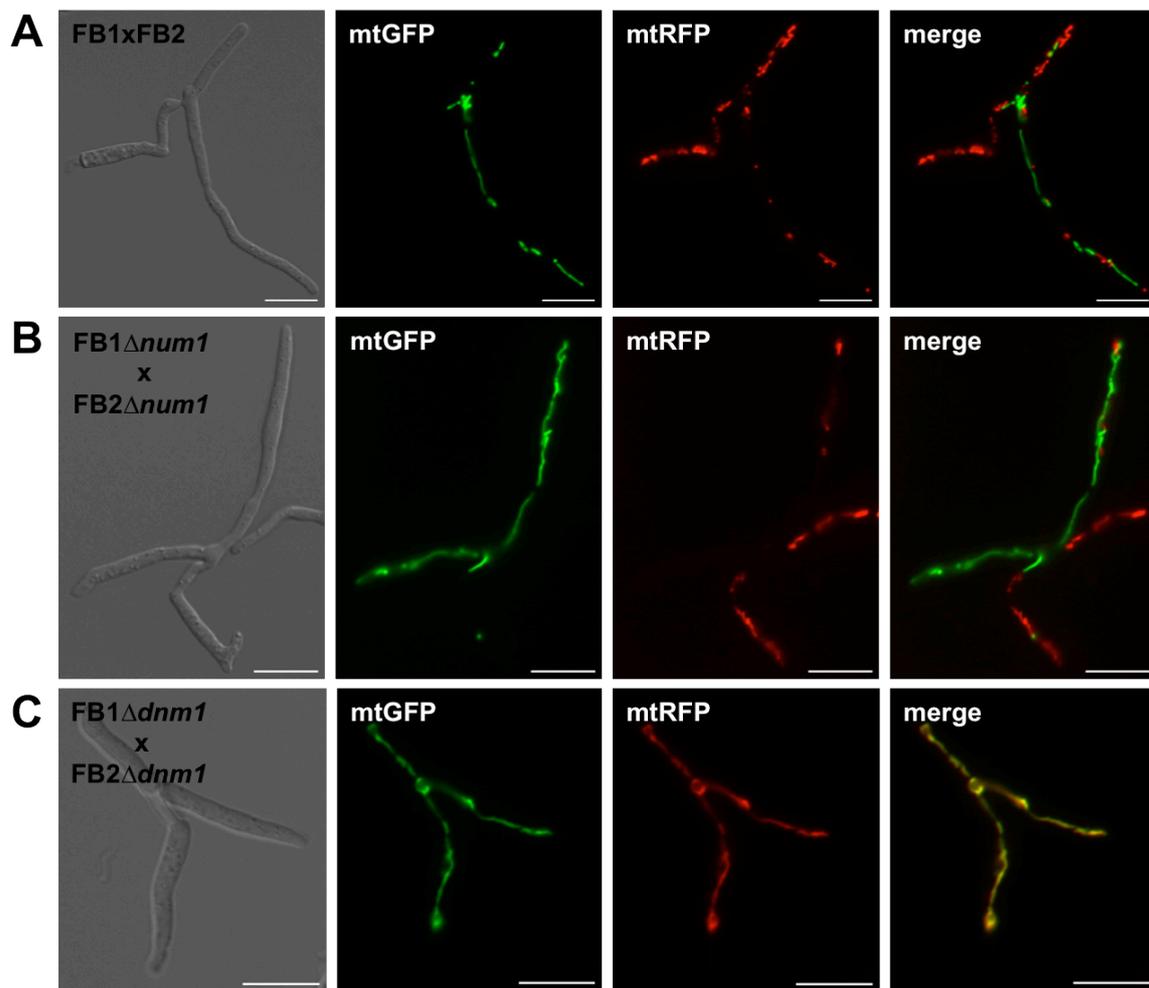


Abbildung 35: Untersuchungen zur Mitochondrienfusion. Die Fusion von Mitochondrien wurde anhand kompatibler FB1- und FB2-Stämme mit unterschiedlichen Reporterkonstrukten für Mitochondrien analysiert. Die FB1-Stämme exprimieren jeweils mitochondrielles RFP vom Plasmid pKS2 und die FB2-Stämme mitochondrielles GFP vom Plasmid pKS1 unter Kontrolle des induzierbaren P_{org1} -Promotors. Die Fusion der kompatiblen Stämme wurde über Nacht in Arabinose-haltigem Aktivkohle-Flüssigmedium induziert. Gezeigt sind jeweils DIC-Durchlichtaufnahmen, GFP- und RFP-Fluoreszenzsignale, sowie die Überlagerung der beiden Fluoreszenzsignale. Durch die Überlagerung können Mitochondrien-Fusionsereignisse ausgewertet werden: nach erfolgter Fusion erscheint das Signal gelb, ohne Fusion bleiben die RFP- und GFP-Signale getrennt voneinander innerhalb eines Filaments zu sehen. **(A)** Kompatible Kreuzungen aus FB1xFB2 dienten als Wildtyp-Kontrolle. Es ist keine Co-Lokalisierung der beiden Mitochondrien-Populationen zu erkennen, es kommt also nicht zur Fusion der Mitochondrien innerhalb der gekreuzten Stämme. **(B)** Kompatible FB1 Δ *num1*xFB2 Δ *num1*-Kreuzungen wiesen ebenfalls keine Fusion der Mitochondrien auf. **(C)** Kompatible FB1 Δ *dnm1*xFB2 Δ *dnm1*-Kreuzungen dienten als Kontrolle für ein positives Mitochondrien-Fusionsereignis. Der Längenmaßstab entspricht jeweils 10 μ m. Die Abbildungen wurden zur Verfügung gestellt von Theresa Obhof.

2.7.2 Neue Funktion von Dnm1 bei endosomalen Transportprozessen

Es ist bekannt, dass das Dnm1-Homolog in *S. cerevisiae* neben der Funktion der mitochondrialen Teilung auch weitere Prozesse regulieren kann. Beispielsweise laufen endosomale Transportprozesse zur Vakuole nur verlangsamt ab (Gammie *et al.*, 1995). Ferner konnte ein Zusammenhang zwischen Dnm1 und der Teilung von Peroxisomen und möglicherweise weiteren Organellen festgestellt werden (Motley *et al.*, 2008).

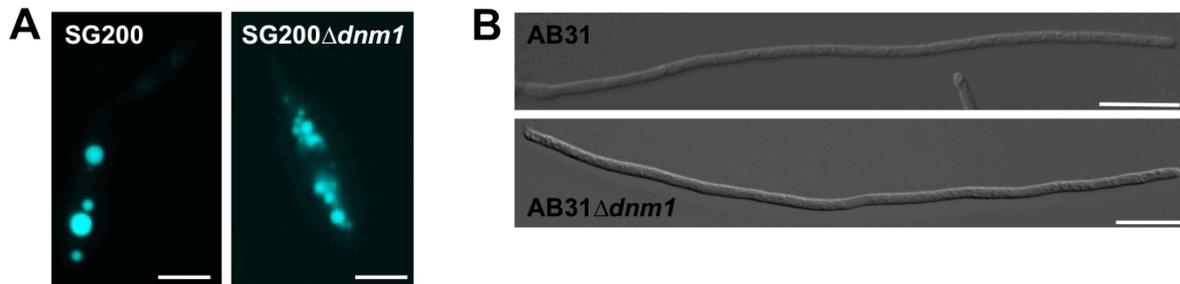


Abbildung 36: Dnm1 ist notwendig für die Vakuolenmorphologie, aber nicht für das polare Wachstum. (A) Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Vakuolenmorphologie in SG200- und SG200Δ*dnm1*-Stämmen. Exponentiell wachsende Kulturen der angegebenen Stämme wurden zur Visualisierung der Vakuolen mit CellTracker Blue® (CMAC) angefärbt. Gezeigt sind die Fluoreszenzsignale des CFP-Kanals. Die Deletion von *dnm1* führt zu einer erhöhten Anzahl an Vakuolen. Der Längenmaßstab entspricht 5 µm. **(B)** Analyse der Filamentmorphologie von AB31Δ*dnm1*-Stämmen. 14 Stunden nach Induktion des bE/bW-Heterodimers wurden die Filamente mikroskopisch analysiert. Gezeigt sind DIC-Durchlichtaufnahmen. Die Deletion von *dnm1* hat keinen Einfluss auf das polare Hyphenwachstum. Der Längenmaßstab entspricht 10 µm. Abbildung zur Verfügung gestellt von Theresa Obhof.

Um der Frage nachzugehen, ob ähnliche Effekte auch auf *U. maydis* zutreffen, wurden *dnm1*-Deletionsmutanten in SG200 und AB31 generiert. Die Vakuolenmorphologie wurde mit Hilfe des CellTracker Blue® (CMAC) Farbstoffs fluoreszenzmikroskopisch untersucht. SG200 Wildtyp-Stämme wiesen durchschnittlich 5 (±1,5, N=50) große Vakuolen auf, wohingegen *dnm1*-Deletionsstämme etwa doppelt so viele (10,8 ±3,6, N=50), jedoch kleinere Vakuolen pro Zelle aufzeigten (Abb. 36A und Abb. 37B).

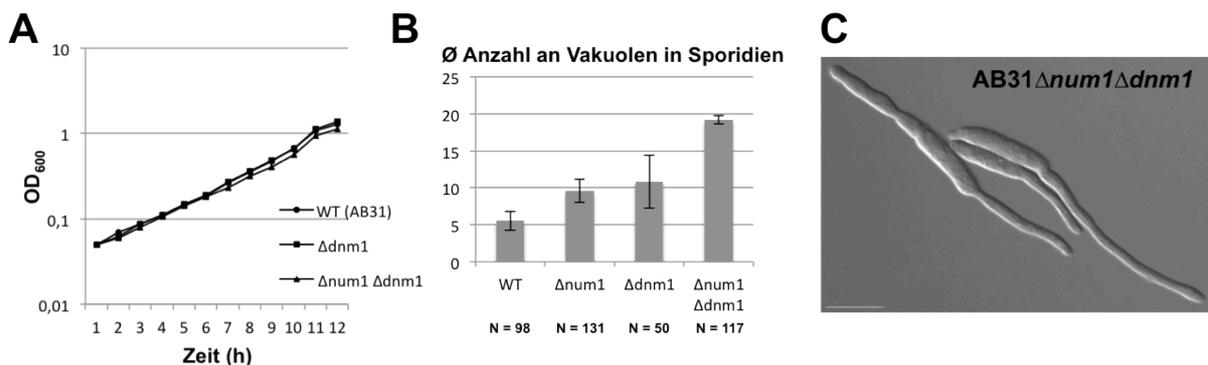


Abbildung 37: Phänotypische Analysen von *num1/dnm1*-Doppeldelusionsmutanten. (A) Um das Wachstumsverhalten der Stämme AB31, AB31Δ*dnm1* und AB31Δ*num1*Δ*dnm1* in axenischer Kultur zu untersuchen, wurden Wachstumskurven (logarithmisch skaliert) in YEPS_{light} Vollmedium angefertigt. Es sind keine Änderungen bezüglich des Wachstumsverhaltens haploider Sporidien zu erkennen. **(B)** Quantifizierung der Anzahl an Vakuolen in Sporidien exponentiell wachsender Kulturen der Stämme SG200 (WT), SG200Δ*num1*, SG200Δ*dnm1* sowie AB31Δ*num1*Δ*dnm1*. Gezeigt sind die Mittelwerte von jeweils drei unabhängigen Transformanden. N bezeichnet die Anzahl der ausgewerteten Zellen. **(C)** 14 Stunden nach Induktion des bE/bW-Heterodimers wurden AB31Δ*num1*Δ*dnm1* Filamente mikroskopisch analysiert. Gezeigt ist eine DIC-Durchlichtaufnahme. Der Längenmaßstab entspricht 10 µm.

In AB31 $\Delta num1\Delta dnm1$ -Doppeldeletionsmutanten war die Anzahl an Vakuolen nochmals erhöht. Das Wachstumsverhalten von haploiden Sporidien war weder in AB31 $\Delta dnm1$ - noch in AB31 $\Delta num1\Delta dnm1$ -Stämmen beeinträchtigt, was anhand von Wachstumskurven nachgewiesen wurde (Abb. 37A). Ein Einfluss auf die Hyphenmorphologie und das polare Wachstum konnte in AB31 $\Delta dnm1$ -Deletionsstämmen nicht festgestellt werden (Abb. 36B). Lediglich in der *num1/dnm1*-Doppeldeletionsmutante war ein Effekt zu beobachten. Die Doppeldeletion von beiden Genen führt zu stark verkürzten, gekrümmten und oft bipolar wachsenden Filamenten. Die Polarität der Zellen ist stark gestört (Abb. 37C).

Zusammenfassend deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass Num1 und Dnm1 in Bezug auf die Vakuolenmorphologie funktionell zusammenwirken, da die entsprechenden Deletionsmutanten einen identischen Phänotyp aufweisen. Für Dnm1 konnte somit eine bislang unbekannte Funktion während des endosomalen Transports zur Vakuole beschrieben werden.

2.8 Num1 interagiert mit dem Kin1-Motorprotein

Die Interaktion von Num1 mit dem Kin1-Motorprotein wurde bereits in der Hefe Zwei-Hybrid Analyse sowie *in vitro* durch Co-Immunopräzipitation (Kellner, 2009) und *in vivo* durch Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation (BiFC) (Abb. 60, Anhang) gezeigt. Da die BiFC-Experimente jedoch keine biologische Relevanz aufwiesen, sollte die Interaktion durch weitere Co-Immunopräzipitationsstudien *in vivo* verifiziert werden. Für die Analysen wurden zunächst Num1 als Fusionsprotein mit 3xHA und Kin1 als Fusionsprotein mit 3eGFP unter Kontrolle ihrer nativen Promotoren im Stamm AB33 co-exprimiert. Während in der Negativkontrolle keine unspezifische Bindung an die anti-HA-Agarose zu beobachten war, konnte nach der Präzipitation von Num1 mit anti-HA Antikörpern das Kin1:3eGFP-Fusionsprotein in der Western-Analyse nachgewiesen werden (Abb. 38A α -HA IP). Da die Bande in sämtlichen Experimenten nur sehr schwach zu detektieren war, ist davon auszugehen, dass es sich um eine schwache oder transiente Interaktion handelt. Um die Interaktion weiter zu verifizieren, wurden die Proteine durch Behandlung mit Dithiobis[Succinimidyl-Propionat] (DSP) quervernetzt. Nach der Präzipitation des Kin1:3xHA-Fusionsproteins mit anti-HA Antikörpern konnte nach Quervernetzung der Proteine ein starkes Signal für das Num1:3eGFP-Fusionsprotein nachgewiesen werden (Abb. 38B α -HA IP), was eine schwache oder transiente Interaktion von Num1 und Kin1 indiziert.

Um weitere Rückschlüsse bezüglich der Interaktion von Num1 mit dem Kin1-Motorprotein zu erhalten, wurde der Bereich des Num1 Proteins, der für die Interaktion mit Kin1 notwendig ist, mit Hilfe des Hefe-Zwei-Hybrid Systems kartiert. Dazu wurden N- und C-terminal verkürzte Num1-Fragmente generiert und auf ihre Fähigkeit zur Interaktion mit Kin1 untersucht. Insbesondere der *Ustilago*- (und *Sporisorium*-) spezifische N-Terminus wurde auf die Fähigkeit zur Interaktion mit Kin1 untersucht. Sollten die N-terminalen 66 AS für eine Interaktion ausreichen, kann eine spezifische Funktion dieser Domäne in Bezug auf Kin1-abhängige Transportprozesse weiter untersucht werden.

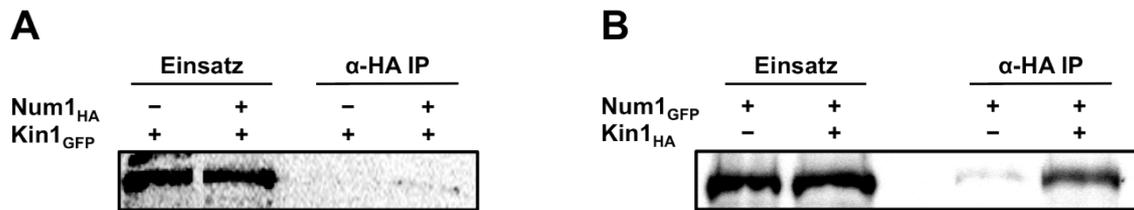


Abbildung 38: *in vivo* Co-Immunopräzipitation von Num1 und Kin1. (A) Num1:3HA und Kin1:3eGFP wurden jeweils *in locus* unter Kontrolle ihres nativen Promotors im Stamm AB33 co-exprimiert. Als Negativkontrolle diente AB33 Kin1:3eGFP. Der Gesamtzellextrakt (Einsatz) aus exponentiell wachsenden Kulturen wurde für eine Immunopräzipitation mit anti-HA Antikörpern eingesetzt (α-HA IP). In einer anschließenden Western-Analyse mit anti-GFP Antikörpern konnte das Kin1:3eGFP-Fusionsprotein sehr schwach detektiert werden. Die Negativkontrolle zeigte keine unspezifische Bindung von Kin1:3eGFP an die anti-HA Agarose. (B) *in vivo* Co-Immunopräzipitation von Num1 und Kin1 nach Quervernetzung der Proteine mit DSP. Hier wurden Num1:3eGFP und Kin1:3HA Fusionsproteine *in locus* unter Kontrolle ihres nativen Promotors im Stamm AB31 co-exprimiert. Als Negativkontrolle diente AB31 Num1:3eGFP. Der Gesamtzellextrakt (Einsatz) wurde wiederum für eine Immunopräzipitation mit anti-HA Antikörpern eingesetzt (α-HA IP). In der Western-Analyse mit anti-GFP Antikörpern konnte das Num1:3eGFP-Fusionsprotein erfolgreich detektiert werden. Die Negativkontrolle zeigte deutlich weniger unspezifische Bindung.

Eine Selbstaktivierung von Num1 konnte in vorangegangenen Untersuchungen bereits ausgeschlossen werden. Weiterhin ist bekannt, dass die Interaktionsdomäne von Kin1 für Num1 am C-Terminus im Bereich der Cargo-Bindedomäne liegt (Kellner, 2009). Die Interaktion wurde anhand von Wachstumstests auf Hochstringenzmedium (SD-Leu-Trp-Ade-His) untersucht. Hierbei zeigte sich, dass die N-terminalen 147 AS für eine Interaktion mit Kin1 ausreichen (Abb. 39). Die weitere Verkürzung des Proteins auf die N-terminalen 66 AS hingegen führen zum Verlust der Interaktionsfähigkeit.

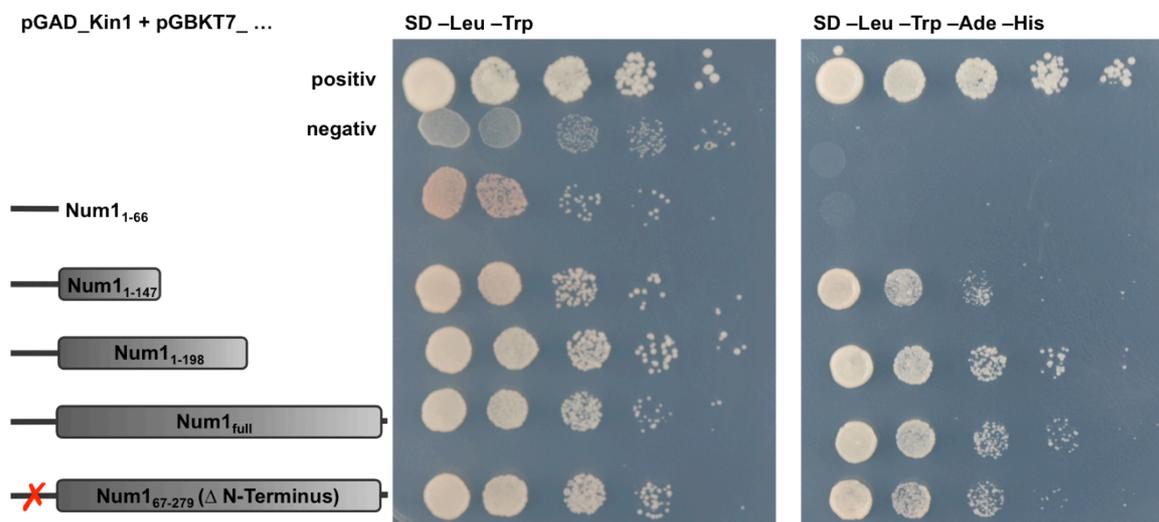


Abbildung 39: Bestimmung der Num1-Interaktionsdomäne für Kin1. N- oder C-terminal verkürzte Varianten des Num1-Proteins wurden im Hefe-Zwei-Hybrid System auf Interaktion mit Kin1 getestet. Auf der linken Seite sind die verwendeten Konstrukte schematisch dargestellt. Die Zahlen repräsentieren die Bereiche der Num1-Fragmente in Aminosäuren. Die Konstrukte wurden nach Klonierung in pGBKT7 (Clontech) mit dem aus dem Hefe-Zwei-Hybrid Screen isolierten pGAD-Kin1 Plasmid co-transformiert. Serielle 10-fache Verdünnungen von Zellsuspensionen der entsprechenden Transformanten wurden auf Selektionsmedium (SD-Leu-Trp) sowie auf Hochstringenzmedium (SD-Leu-Trp-Ade-His) getropft. Die Platten wurden für zwei Tage bei 30°C inkubiert. Die Interaktionsdomäne von Num1 befindet sich zwischen Aminosäure 67 und 147. Als Positivkontrolle diente das Volllänge Num1-Protein (Num1_{full}) sowie pGBKT7-p53 mit pGADT7-T, als Negativkontrolle diente pGBKT7-Lam mit pGADT7-T (Clontech).

Die Deletion des N-Terminus hat keine Auswirkung auf die Interaktion von Num1 mit Kin1, was darauf hindeutet, dass die Interaktionsdomäne von Num1 die 80 AS zwischen AS 67 und 147 umfasst. Es können jedoch keine eindeutigen Rückschlüsse auf die Relevanz der Num1-Kin1 Proteininteraktion gezogen werden.

2.8.1 *num1*- und *kin1*-Deletionsstämme haben überlappende Phänotypen

Neben der physikalischen Interaktion von Num1 mit dem Kin1-Motorprotein, die in Hefe-Zwei-Hybrid- und Co-Immunoprecipitations-Analysen gezeigt werden konnte, gibt es mehrere Indizien für eine genetische Interaktion und eine funktionelle Verbindung von Num1 und Kin1. Die Deletion von *kin1* führt neben verkürzten, bipolar wachsenden Filamenten mit aberranter Septierung (Schuchardt *et al.*, 2005; Steinberg *et al.*, 1998) (vgl. Abb. 43B) zu einer fehlerhaften Vakuolenmorphologie. 80% der Sporidien in FB1 oder FB2 Wildtypstämmen enthalten meist zwei bis drei große Vakuolen, die gleichmäßig innerhalb der Zelle verteilt sind. FB1 Δ *kin1*- oder FB2 Δ *kin1*-Sporidien enthielten im Gegensatz dazu eine signifikant höhere Anzahl an Vakuolen, die oft irregulär in der Zelle verteilt vorlagen (Steinberg *et al.*, 1998) (vgl. Abb. 40). Ebenso konnte mit Hilfe einer CellTracker Blue[®]-Färbung zur Visualisierung der Vakuolen gezeigt werden, dass auch in SG200 Δ *num1*-Sporidien die Anzahl der Vakuolen bei kleinerer Größe signifikant erhöht war (Abb. 40).

Darüber hinaus konnten bereits gleichartige Phänotypen in Bezug auf die subzelluläre Lokalisierung des Dynein-Motorproteins und die daraus resultierende Verteilung und Motilität früher Endosomen für beide Deletionsmutanten festgestellt werden (siehe Abb. 19 und 21). Die Phänotypen für beide Mutanten wurden in Tabelle 5 gegenübergestellt. Zusammen genommen deuten diese Daten auf eine enge funktionelle Kopplung und ein Zusammenwirken von Num1 und Kin1 in verwandten zellulären Prozessen hin.

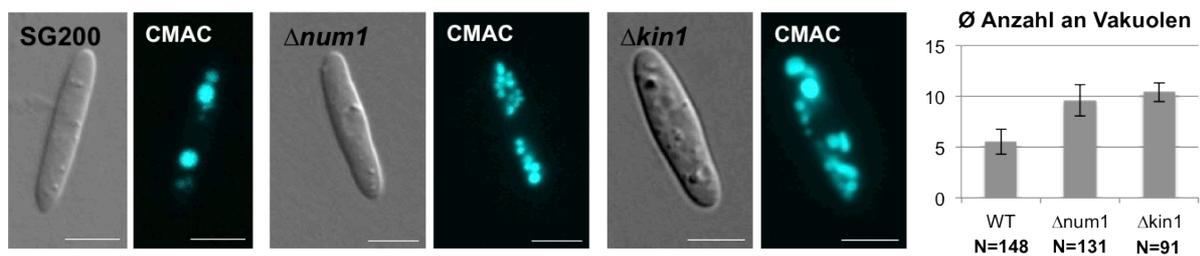


Abbildung 40: Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Vakuolenmorphologie in *num1*- und *kin1*-Deletionsstämmen. Die Vakuolenmorphologie der angegebenen SG200-Derivate wurde mikroskopisch analysiert. Exponentiell wachsende Kulturen wurden zur Visualisierung der Vakuolen mit dem CellTracker Blue[®] (CMAC)-Farbstoff angefärbt. Gezeigt sind die DIC-Durchlichtaufnahmen und Fluoreszenzsignale des CFP-Kanals. Sowohl die Deletion von *num1* als auch die Deletion von *kin1* führt zu einer erhöhten Anzahl an Vakuolen. Rechts ist die Quantifizierung der Vakuolenanzahl dargestellt. Es sind jeweils Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten gezeigt. N steht für die Anzahl der ausgewerteten Zellen. Der Längenmaßstab entspricht 5 μ m.

2.8.2 Die Lokalisierung der zytoplasmatischen Num1-Population ist abhängig von Kin1

Ein weiteres Indiz für eine wechselseitige Beziehung von Num1 und Kin1 lieferte die fluoreszenzmikroskopische Analyse der Num1-Lokalisierung in Abhängigkeit von Kin1. Die Deletion von *kin1* im Stamm UNK10 (AB31 Num1:3eGFP) führte, verglichen mit der Num1-Lokalisierung in Stamm UNK10, nach der Induktion des filamentösen Wachstums zu einer deutlich verstärkten Lokalisierung der zytoplasmatischen Num1-Population (Abb. 41A). Das Protein war dort in größeren Aggregaten zu detektieren, die ausschließlich im Bereich der initialen Zelle akkumulierten und nicht in die Filamente einwanderten.

Tabelle 5: Zusammenfassung der Phänotypen von *kin1*- und *num1*-Deletionsstämmen

	<i>Δkin1</i>	<i>Δnum1</i>
Hyphenmorphologie	kürzer als WT und bipolar (Schuchardt <i>et al.</i> , 2005)	kürzer und dicker als WT, gekrümmt, verzweigt oder bipolar
Septierung	delokalisierte Septen in der Hyphenmitte (Steinberg <i>et al.</i> , 1998)	delokalisierte Septen in der Hyphenmitte; können zu leeren apikalen Spitzenkompartimenten führen
Vakuolenmorphologie	kleinere Vakuolen, Anzahl erhöht (Steinberg <i>et al.</i> , 1998)	kleinere Vakuolen, Anzahl erhöht
Dynein-Lokalisierung	keine apikalen Dynein-Kometen (Lenz <i>et al.</i> , 2006)	apikale Dynein-Lokalisierung reduziert auf 30%
Lokalisierung und Motilität von frühen Endosomen (EE)	EE akkumulieren an Hyphenspitze, keine Motilität (Lenz <i>et al.</i> , 2006)	EE akkumulieren an Hyphenspitze und an delok. Septen, reduzierte Motilität

Durch CellTracker Blue®-Färbungen konnte bestätigt werden, dass es sich bei den beobachteten Aggregaten um Vakuolen handelt (nicht gezeigt). Mit Hilfe von Calcofluor White-Färbungen wurde gezeigt, dass die Vakuolen, in denen das Num1-Protein akkumuliert, nicht durch delokalisierte Septen am Transport in die auswachsenden Filamente gehindert wurden (nicht gezeigt), was für einen direkten Kin1-abhängigen Langstreckentransport spricht.

Um weiterhin den Einfluss von Kin1 auf die zytoplasmatische Lokalisierung von Num1 zu untersuchen, wurde ein *kin1^{rigor}*-Allel exprimiert, dessen ATPase-Stelle durch einen einfachen Aminosäure-Austausch (G96→E) mutiert war. Die Kin1-Motordomäne bindet dadurch fest an die Mikrotubuli, sodass Kin1-abhängige Transport-Prozesse zum Erliegen kommen (Meluh und Rose, 1990; Straube *et al.*, 2006; Wedlich-Söldner *et al.*, 2002). Das *kin1^{rigor}*-Allel wurde im Stamm UNK10 unter Kontrolle des regulierbaren P_{erg1}-Promotors exprimiert. Analog zur *kin1*-Deletion führte die Expression von *kin1^{rigor}* zu einer verstärkten Num1-Lokalisierung im Zytoplasma, wo es in Aggregaten in der Nähe der Zellkerne akkumulierte. Zusätzlich konnte das Num1:3eGFP-Signal in einigen Fällen entlang fibrillärer Strukturen beobachtet werden (Abb. 41B).

Diese Daten deuten darauf hin, dass das Kin1-Motorprotein eine Rolle innerhalb zytoplasmatischer Transportvorgänge von Num1 während des filamentösen Wachstums spielt.

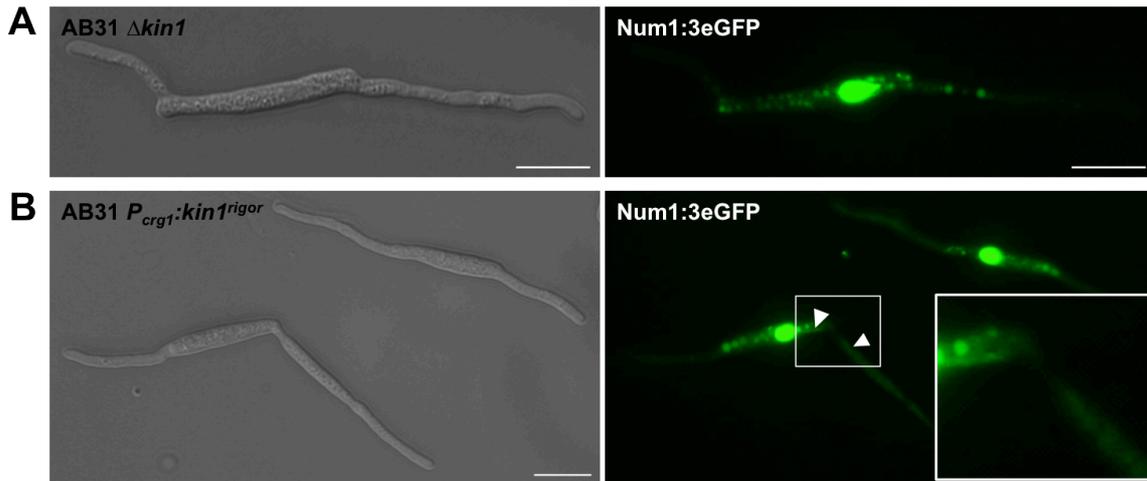


Abbildung 41: Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Num1-Lokalisierung in Abhängigkeit von Kin1. Die angegebenen Stämme wurden 14 Stunden nach Induktion des bE/bW-Heterodimers in Arabinose-haltigem Medium fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Gezeigt sind DIC-Durchlichtaufnahmen sowie die GFP-Fluoreszenzsignale. **(A)** Die Deletion von *kin1* führt zu einer verstärkten Num1-Lokalisierung im Zytoplasma, wo das Protein in größeren Aggregaten akkumuliert. **(B)** Die Expression des *kin1^{rigor}*-Allels nach Induktion des *P_{crg1}*-Promotors in Arabinose-haltigem Medium führt gleichermaßen zu einer zytoplasmatischen Lokalisierung von Num1 in Aggregaten in der initialen Zelle. Zusätzlich sind filamentöse Strukturen zu beobachten (Pfeilspitzen). Der Längenmaßstab entspricht 10 µm.

2.8.3 Die Doppeldeletion von *num1* und *kin1* zeigt additive Effekte

Durch Generierung einer *num1/kin1*-Doppeldeletion in den Stämmen SG200 und AB31 wurden Hinweise dafür entdeckt, dass beide Proteine neben ihren überlappenden Funktionen offenbar weitere Funktionen innehaben, die sie unabhängig voneinander ausüben. Zunächst wurden Infektionsexperimente mit *SG200Δnum1*, *SG200Δkin1* sowie *SG200Δnum1/Δkin1* durchgeführt. Während die Deletion von *num1* bzw. *kin1* alleine jeweils nur zu verminderten Pathogenitätssymptomen, gekennzeichnet durch kleinere Tumore, führte, war die Tumorbildung in *SG200Δnum1/Δkin1* auf unter 15% reduziert. 27% der infizierten Pflanzen wiesen keine Symptome auf, der Großteil der Pflanzen war lediglich durch die Bildung von Chlorosen und Anthozyan gekennzeichnet (Abb. 42).

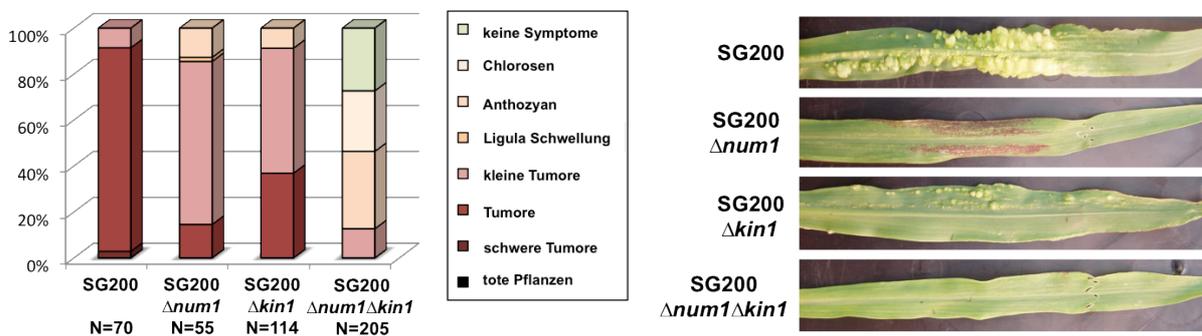


Abbildung 42: Pathogenitätsstudien von *num1*- und *kin1*-Deletionsstämmen. Sieben Tage alte Maispflanzen wurden mit den angegebenen SG200-Derivaten inokuliert (Für *SG200Δkin1* sind Mittelwerte aus zwei, für *SG200Δnum1Δkin1* sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Kreuzungen gezeigt). Weitere sieben Tage nach Inokulation wurden die Krankheitssymptome der infizierten Maispflanzen quantifiziert. Die Symptome der einzelnen Pflanzen wurden nach (Kämper *et al.*, 2006) je nach Stärke in verschiedene Kategorien unterteilt (s. Kasten). Die Deletion von *num1* bzw. *kin1* führt zu einer leicht verminderten Pathogenität, wohingegen die Doppeldeletion einen weitaus stärkeren Effekt auf die Pathogenität hat. N steht für die Anzahl der ausgewerteten Pflanzen. Rechts sind Krankheitssymptome an repräsentativen Maispflanzen sieben Tage nach Infektion dargestellt. Gezeigt sind Fotografien des jeweils dritten Blatts unterhalb der Injektionsstelle.

Bei mikroskopischer Betrachtung von *SG200Δnum1Δkin1*-Sporidien fiel bereits auf, dass die Zellen eine leichte Polaritätsstörung aufweisen. Viele Zellen waren dabei im Gegensatz zu *SG200*-Sporidien durch eine unregelmäßige Morphologie, bi- oder multipolare Knospung bzw. eine unregelmäßige Septenbildung gekennzeichnet (Abb. 43A). Die Anzahl der Vakuolen war gegenüber den Stämmen mit *num1*- oder *kin1*-Deletion in der Doppeldeletionsmutante drastisch erhöht. Um die Auswirkung der Doppeldeletion auf das polare Hyphenwachstum zu untersuchen, wurden beide Gene zusätzlich im Stamm *AB31* deletiert. Als Vergleich wurde der Stamm *AB31Δkin1* in die Analyse mit einbezogen. Im Unterschied zu den verkürzten, bipolaren Filamenten, die aus der Deletion von *kin1* bzw. *num1* in *AB31* resultieren, hatte die *num1/kin1*-Doppeldeletion additive Auswirkungen in Bezug auf die Hyphenmorphologie und Polarität der Zelle.

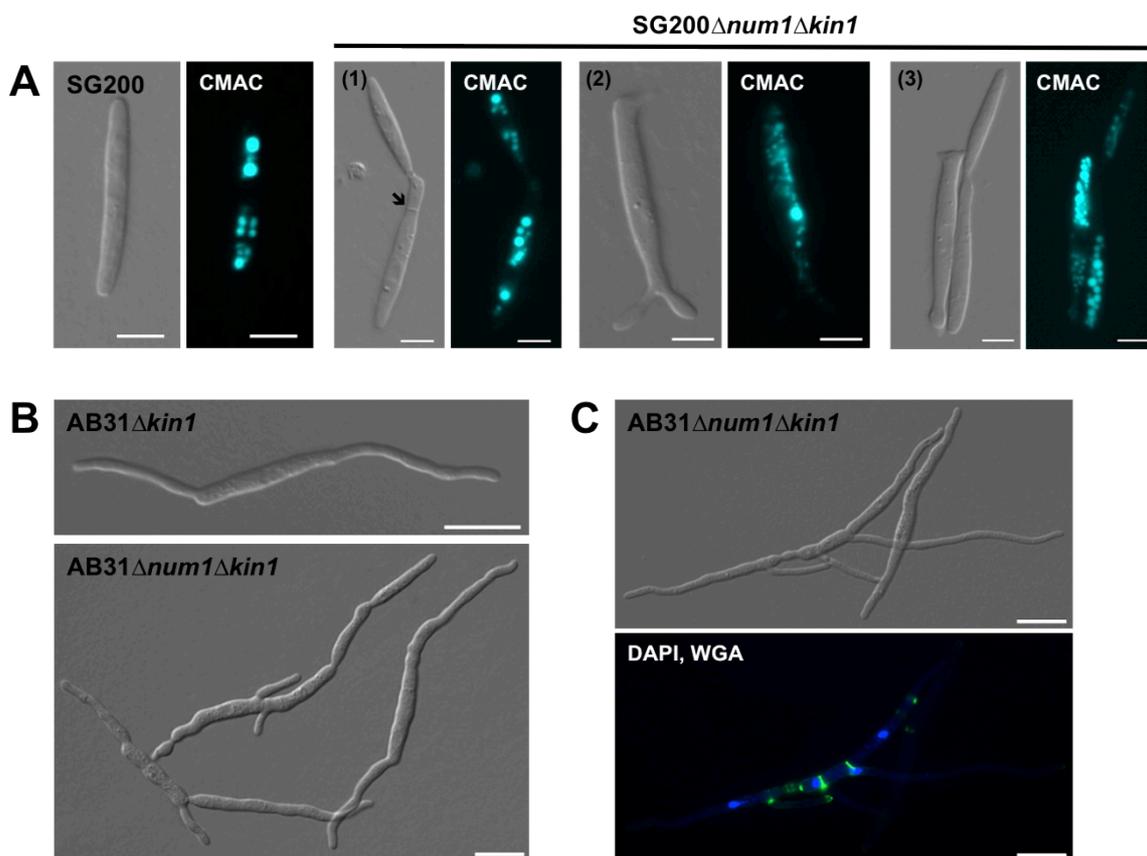


Abbildung 43: Phänotypische Analyse von *num1/kin1*-Doppeldeletionsmutanten. (A) Zur Untersuchung der Morphologie von *num1/kin1*-Doppeldeletionsmutanten wurden exponentiell wachsende *SG200*-Derivate mikroskopisch analysiert. Zur Visualisierung von Vakuolen wurden die Zellen zusätzlich mit dem CellTracker Blue® (CMAC)-Farbstoff angefärbt. Gezeigt sind DIC-Durchlichtaufnahmen und Fluoreszenzsignale des CFP-Kanals. Im Gegensatz zu *SG200*-Sporidien (links) zeigen *SG200Δnum1Δkin1*-Sporidien oftmals eine aberrante Septierung ((1), mit ↑ markiert) und/oder Polaritätsstörungen (durch Verzweigungen (2) oder ungleichmäßig geformte Zellen (3) gekennzeichnet) auf. Die Anzahl der Vakuolen ist in den Doppelmutanten drastisch erhöht. Der Längenmaßstab entspricht 5 µm. (B) Auswirkung der Doppeldeletion auf das polare Hyphenwachstum im Stamm *AB31Δnum1Δkin1*. 12 Stunden nach Induktion des bE/bW-Heterodimers in Arabinose-haltigem CM-Medium wurden die Filamente mikroskopisch analysiert. Gezeigt sind DIC-Durchlichtaufnahmen. Die Doppeldeletion hat additive Effekte auf die Filamentmorphologie, Polarität und Verzweigung. Der Längenmaßstab entspricht 10 µm. (C) Um den Einfluss der Doppeldeletion auf die Zellkernverteilung und Septierung zu analysieren, wurden die Filamente mit DAPI- und WGA/FITC-Färbelösungen behandelt. Gezeigt sind eine DIC-Durchlichtaufnahme sowie die Überlagerung der DAPI- und GFP-Kanäle. Der Längenmaßstab entspricht 10 µm.

Nach Induktion des filamentösen Wachstums waren die Zellen verkürzt, geschwollen und stark verzweigt (Abb. 43B), was auf eine massive Störung bezüglich der Determination der Polaritätsachse der Hyphe hindeutet. Die Färbung der Zellkerne mit DAPI-Färbelösung und die Behandlung der Filamente mit WGA/FITC zur Visualisierung von Septen zeigten in AB31 Δ *num1* Δ *kin1* darüber hinaus eine deutlich erhöhte Anzahl an Zellkernen und Septen als die entsprechenden AB31 Δ *kin1*- und AB31 Δ *num1*-Mutanten (Abb. 43C). Diese Daten signalisieren, dass Num1 und Kin1 neben einer gemeinsamen Funktion innerhalb eines Komplexes zusätzliche Funktionen besitzen, die unabhängig voneinander eine wesentliche Rolle bei der Etablierung der Zellpolarität während des filamentösen Wachstums sowie bei der Regulation der Zellteilung und des Zellzyklus einnehmen.

2.9 Num1 ist eine Komponente des evolutionär konservierten Spleißosom-assoziierten Prp19/CDC5L-Komplexes

Wie eingangs bereits erwähnt hat das Num1-Protein beträchtliche Ähnlichkeiten zum humanen BCAS2/SPF27-Protein, das als eine von vier Kernkomponenten (Prp19, PLR1, CDC5L und SPF27) des evolutionär hoch konservierten Spleißosom-assoziierten Prp19/CDC5L-Komplexes (NTC) identifiziert wurde. Mit Hilfe einer gezielten Hefe-Zwei-Hybrid Analyse wurde zunächst untersucht, ob das *U. maydis* Num1-Protein wie das humane Homolog SPF27/BCAS2 mit dem NTC assoziiert ist und mit anderen bekannten Komponenten, wie Prp19 und Cdc5, interagiert. Anhand bioinformatischer Analysen wurden in *U. maydis* zwei Gene (*um10027* und *um04411*) identifiziert, die Ähnlichkeiten zu den bereits beschriebenen konservierten *prp19*- bzw. *cdc5*-Genen aufweisen. Um10027 weist 42% Sequenzidentität ($E = 4e^{-23}$) zu *S. cerevisiae* Prp19p, 31% ($E = 4e^{-60}$) zu *S. pombe* Cwf8 (Prp19) und 34% ($E = 1e^{-86}$) zum humanen hPrp19-Protein auf. Um04411 weist 52% Sequenzidentität ($E = 9e^{-71}$) zu *S. cerevisiae* Cef1p, 42% ($E = 3e^{-161}$) zu *S. pombe* Cdc5 und 42% ($E = 6e^{-175}$) zum humanen CDC5L-Protein auf. Die hohe Sequenzidentität deutet darauf hin, dass es sich um konservierte Strukturproteine des NTC handelt, die als funktionelle Homologe der Prp19- bzw. Cef1/Cdc5-Proteine in *U. maydis* agieren.

Für die Interaktionsstudie im Hefe-Zwei-Hybrid System wurden das Volllänge Num1-Protein als Köder und Volllänge- sowie C- und N-terminale Fragmente der Prp19- (*Um10227*) und CDC5L-Homologe (*Cef1*, *Um04411*) als Beute verwendet. Das Wachstum auf Selektivmedium zeigt an, dass Num1 mit dem N-terminalen Fragment von Prp19 und dem C-Terminus von Cef1 interagiert (Abb. 44A). Die physikalische Interaktion von Num1 mit Prp19 und Cef1 wurde anschließend *in vivo* durch Co-Immunopräzipitation verifiziert. Die endogenen *prp19* und *cef1* Gene wurden dazu via homologer Rekombination in Stamm AB31 mit 3xHA-getaggt Versionen ersetzt, um Stämme zu generieren, die Prp19:3xHA- und Cef1:3xHA-Fusionsproteine auf einem endogenen Level exprimieren.

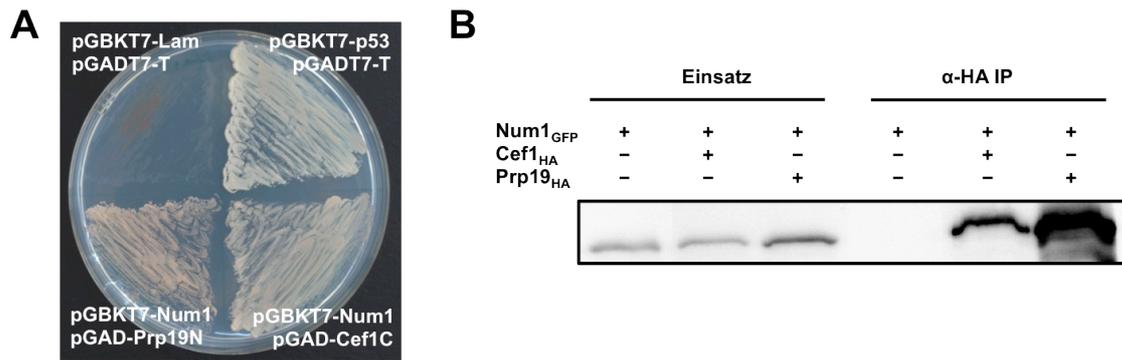


Abbildung 44: Das Num1-Protein interagiert mit Komponenten aus dem NTC in *U. maydis*. (A) Anhand einer Hefe-Zwei-Hybrid Analyse wurden Komponenten des NTC auf ihre Interaktion mit Num1 getestet. Nach Klonierung von *num1* in pGBKT7 (Clontech) und Vollängen- bzw. N- und C-terminalen Varianten von *cef1* und *prp19* in pGAD (Dualsystems Biotech) wurden die Konstrukte in den *S. cerevisiae*-Stamm AH109 co-transformiert. Gezeigt ist das Wachstum der entsprechenden Transformanden auf Hochstringenzmedium (SD-Leu-Trp-Ade-His) nach zwei Tagen Inkubation bei 28°C. Als Positivkontrolle diente pGBKT7-p53 mit pGADT7-T, als Negativkontrolle diente pGBKT7-Lam mit pGADT7-T (Clontech). (B) *in vivo* Co-Immunopräzipitation von Num1 mit Cef1 und Prp19. Num1:3eGFP- und Cef1:3HA- bzw. Prp19:3HA-Fusionsproteine wurden *in locus* unter Kontrolle ihrer nativen Promotoren im Stamm AB31 co-exprimiert. Als Negativkontrolle diente AB31 Num1:3eGFP. Der Gesamtzellextrakt (Einsatz) wurde für Immunopräzipitationen mit anti-HA Antikörpern eingesetzt (α-HA IP). In der Western-Analyse mit anti-GFP Antikörpern konnte Num1:3eGFP erfolgreich detektiert werden. Die Negativkontrolle zeigte keine unspezifische Bindung an die α-HA-Agarose.

Zudem wurde Num1 als Fusionsprotein mit 3eGFP unter Kontrolle des nativen P_{num1} -Promotors co-exprimiert. Mit Hilfe von anti-HA-Antikörpern konnte das Num1:3eGFP-Fusionsprotein spezifisch mit Prp19:3xHA bzw. Cef1:3xHA co-präzipitiert werden. Wurden hingegen Stämme mit Wildtyp-Allelen von *prp19* bzw. *cef1* verwendet, war kein Num1:3eGFP-Signal detektierbar (Abb. 44B).

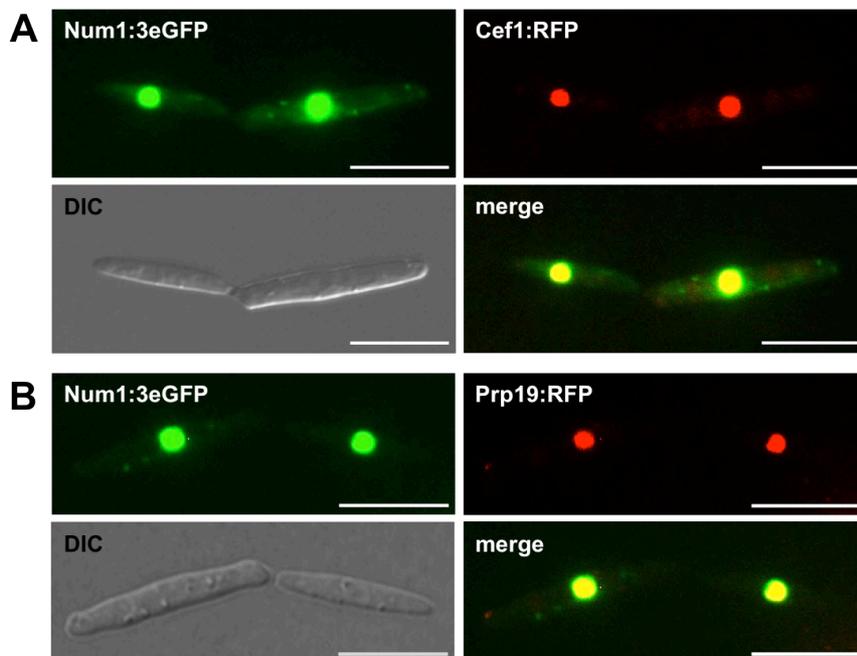


Abbildung 45: Co-Lokalisierung von Num1 mit Cef1 und Prp19. Num1:3eGFP und Cef1:RFP bzw. Prp19:RFP-Fusionsproteine wurden *in locus* unter Kontrolle ihrer nativen Promotoren in Stamm AB31 co-exprimiert. Exponentiell wachsende Kulturen der Stämme UMO10 (A) und UNK208 (B) wurden fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Gezeigt sind die DIC-Durchlichtaufnahmen, GFP- und RFP-Fluoreszenzsignale sowie die Überlagerung beider Kanäle. In beiden Fällen konnte eine Co-Lokalisierung mit Num1 in Zellkernen beobachtet werden. Der Längenmaßstab entspricht 10 µm.

Die Interaktionen konnten durch zusätzliche Daten bezüglich der Lokalisierung der Komponenten unterstützt werden. Für die subzelluläre Lokalisierung von Prp19 und Cef1 wurden AB31-Stämme generiert, die neben einem Num1:3eGFP-Fusionsprotein Prp19:RFP- bzw. Cef1:RFP jeweils *in locus* unter Kontrolle ihrer nativen Promotoren co-exprimierten. Es konnte gezeigt werden, dass Num1 mit Prp19 und Cef1 in Zellkernen sowohl von Sporidien (Abb. 45A+B) als auch nach Induktion des filamentösen Wachstums (nicht gezeigt) co-lokalisiert. Während die Prp19:RFP- bzw. Cef1:RFP-Fluoreszenz ausschließlich auf Zellkerne beschränkt war, konnte Num1:3eGFP zusätzlich in distinkten Foci im Zytoplasma beobachtet werden.

Zusammen genommen indizieren diese Daten, dass Num1 mit Prp19 und Cef1 interagiert und somit eine strukturelle Komponente des putativen NTC in *U. maydis* darstellt.

Es war nicht möglich, Deletionsmutanten von *prp19* und *cef1* im haploiden Stamm SG200 zu generieren, was bereits darauf hindeutet, dass die Proteine in *U. maydis* wie in anderen Organismen essentiell sind. Für eine weiterführende Analyse wurde jeweils eine Kopie von *prp19* bzw. *cef1* durch homologe Rekombination mit einer Hygromycin-Resistenzkassette im diploiden Stamm FBD11 (Banuett und Herskowitz, 1989) ersetzt. Anschließend wurden sieben Tage alte Maispflanzen mit den Stämmen FBD11 Δ *prp19* und FBD11 Δ *cef1* infiziert. Die Analyse der meiotischen Nachkommenschaft aus diploiden Teliosporen, die aus ca. vier Wochen alten Tumoren geerntet wurden, wies keine Mendel'sche Aufspaltung des Hygromycin-Markers auf. Während der Meiose werden beide Allele, das Wildtyp- und das Δ *prp19*- bzw. Δ *cef1*-Allel, gleichmäßig auf die meiotischen Nachkommen verteilt. 50% der Nachkommen sollten dementsprechend eine Hygromycin-Resistenz aufweisen. Führt die Deletion jedoch zur Letalität, sollten keine Hygromycin-resistenten Kolonien zu verzeichnen sein. In dieser Untersuchung waren vier von 100 getesteten FBD11 Δ *prp19*- und acht von 50 getesteten FBD11 Δ *cef1*-Meioseprodukten Hygromycin-resistent. In darauffolgenden PCR- und Southern-Analysen konnte gezeigt werden, dass alle Hygromycin-resistenten Stämme noch eine Wildtyp-Kopie der *prp19*- und *cef1*-Allele trugen (nicht gezeigt), wodurch bestätigt werden konnte, dass *prp19* und *cef1* in *U. maydis* essentielle Gene sind.

2.9.1 Num1 beeinflusst die zelluläre Antwort auf DNA-Schädigung

Es ist bekannt, dass der NTC bzw. die NTC-assoziierten Proteine neben ihrer Rolle während des prä-mRNA Spleißens noch für weitere zelluläre Funktionen, wie für die Regulation des Zellzyklus (Zhang *et al.*, 2009), die Reparatur von DNA-Schäden (Brendel *et al.*, 2003; Legerski, 2009) oder die Bildung und den Export von mRNP-Partikeln aus dem Zellkern (Chanarat *et al.*, 2011) notwendig sind.

Um weitere Erkenntnisse bezüglich der molekularen Funktion von Num1 zu erhalten und um festzustellen, ob das Protein in *U. maydis* übereinstimmend mit bereits aus anderen Organismen bekannten Funktionen des NTC agiert, wurde die Regulation des Zellzyklus, die zelluläre Antwort auf DNA-Schäden sowie das Spleißen von prä-mRNAs untersucht. Für Num1 konnte bereits eine Funktion während der Regulation von Zellzyklus und Zellteilung nachgewiesen werden (siehe 2.4).

Darüber hinaus ist ein unmittelbarer Zusammenhang von Komponenten des NTC mit der DNA-Reparaturmaschinerie bekannt. Insbesondere Prp19 übt in Säugern eine direkte Funktion bei der DNA-Reparatur aus, unabhängig von der Funktion während des Spleißens (zusammengefasst in (Legerski, 2009), siehe auch Diskussion 3.1.5). Um den Einfluss von Num1 auf die zelluläre Antwort auf DNA-Schäden zu untersuchen, wurden serielle Verdünnungen eines AB31- und eines AB31 Δ num1-Stammes auf CM-Medien mit DNA-schädigenden Agenzien getropft beziehungsweise mit UV-Licht bestrahlt. Hydroxyurea, ein Agens, das die Ribonukleotid-Reduktase hemmt und durch die Depletion von Desoxyribonukleotid-Triphosphaten zum Anhalten und Kollaps der Replikationsgabel führt, oder Phleomycin, das Doppelstrangbrüche in der DNA induziert, hatten keinen Effekt auf das Wachstumsverhalten des num1-Deletionsstammes im Vergleich zum Wildtyp. Im Gegensatz dazu war die Überlebensrate der Δ num1-Sporidien nach Bestrahlung mit 300 J/m² UV-Licht um einen Faktor 10 geringer als die des Wildtyp-Stammes (Abb. 46), was auf eine Rolle von Num1 bei der zellulären Antwort auf DNA-Schäden hindeutet.

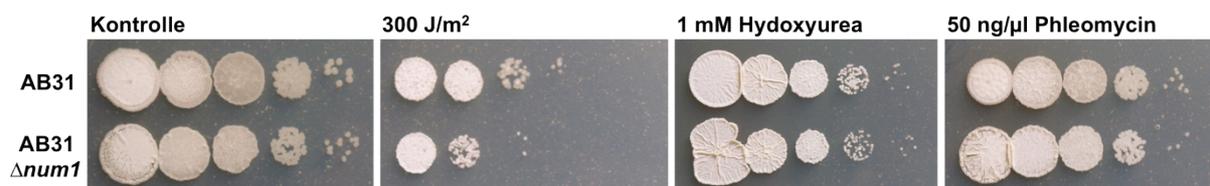


Abbildung 46: Untersuchungen zur Sensitivität von num1-Deletionsmutanten gegenüber DNA-schädigenden Agenzien. Serielle 10-fache Verdünnungen von Kulturen eines AB31- und eines AB31 Δ num1-Stammes wurden auf CM-Medien mit den angegebenen Zusätzen getropft bzw. mit UV-Licht bestrahlt. Die Platten wurden für zwei Tage bei 28°C inkubiert.

2.9.2 Num1 hat einen Einfluss auf die Intron-Retention während des Spleißens

Als strukturelle Komponente des NTC ist zu erwarten, dass Num1 Einfluss auf die Rate oder Effizienz des prä-mRNA Spleißens hat. Der Effekt von Num1 auf das Spleißens, d.h. die Expressionsrate von gespleißten vs. ungespleißten Transkripten wurde zunächst anhand von quantitativer Realtime (qRT)-PCR untersucht. Als Ausgangsmaterial für die cDNA-Synthese diente die mRNA eines AB31 und eines AB31 Δ num1-Stammes, die in jeweils drei unabhängigen biologischen Replikaten für acht Stunden in Minimalmedium mit Arabinose kultiviert wurden, um durch Induktion des bE/bW-Heterodimers das filamentöse Wachstum zu induzieren.

Für eine initiale Analyse des Spleißens wurden Transkripte verwendet, die konstitutiv in der Zelle exprimiert werden: *pcna* (*um05403*, „probable proliferating cell nuclear antigen“), das für einen DNA Polymerase Prozessivitätsfaktor kodiert, und *rpb3* (*um03550*, „DNA-directed RNA polymerase II chain), das für eine Untereinheit der RNA Polymerase II kodiert. Die verwendeten Primerpaare ermöglichten die Diskriminierung von gespleißter und ungespleißter mRNA (Abb. 47A).

Um die Rate der Intron-Retention zu bestimmen, wurden die Verhältnisse der relativen Expression von gespleißter zu ungespleißter mRNA bestimmt. Die Verhältnisse nahmen in allen getesteten Transkripten der AB31 Δ num1-Stämme im Vergleich zum Wildtyp signifikant ab (Abb. 47B+C), was darauf hindeutete, dass die Menge an gespleißter mRNA in den Proben deutlich geringer war. Num1 hat also einen Einfluss auf die Intron-Retention während des prä-mRNA Spleißens.

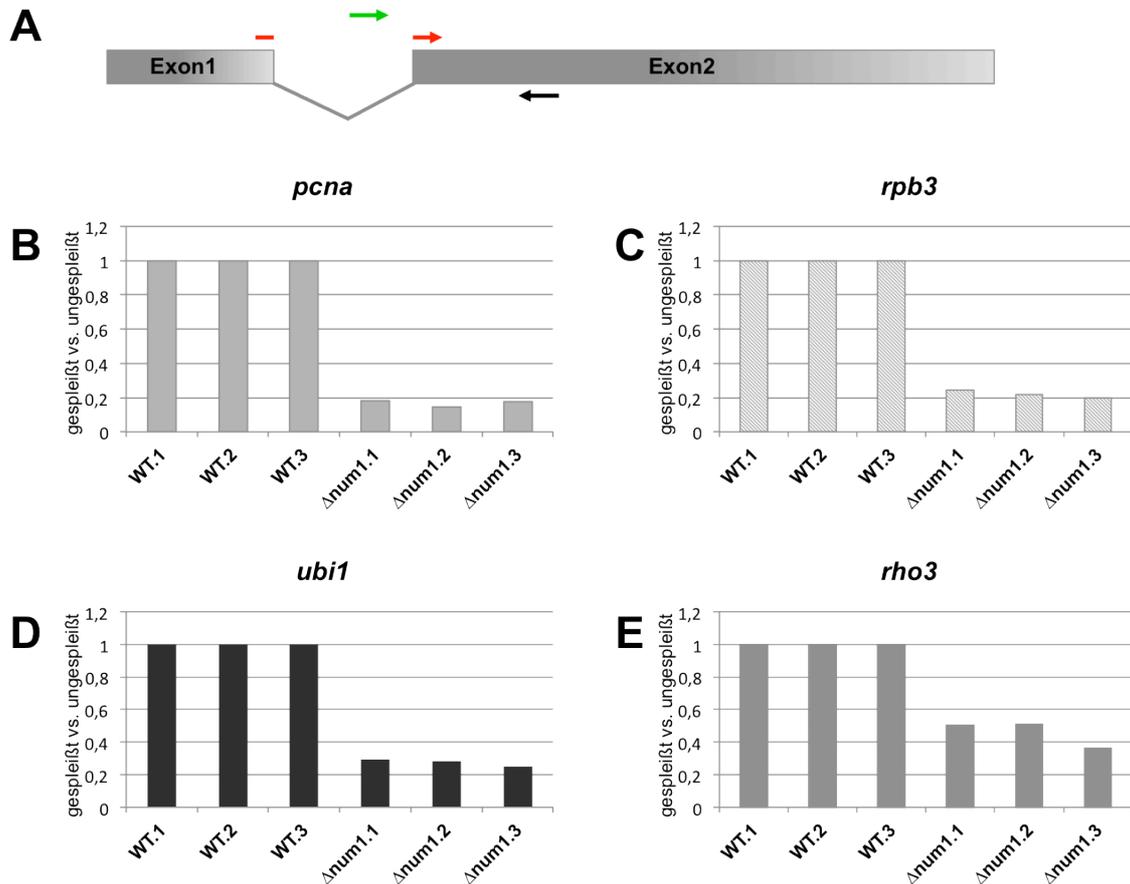


Abbildung 47: Untersuchungen zum mRNA-Spleißen mittels qRT-PCR. (A) Schematische Darstellung der Intron-Exon-Struktur. Die für die qRT-PCR Analysen verwendeten Oligonukleotid-Paare sind als Pfeile eingezeichnet und erlauben die Diskriminierung von gespleißter und ungespleißter mRNA: Für die Detektion von gespleißten Transkripten wurde ein Vorwärts-Primer verwendet, der an den Exon/Intron-Übergängen bindet (roter Pfeil), zur Detektion von ungespleißten Transkripten wurde ein Vorwärts-Primer verwendet, der innerhalb der Intron-Sequenz bindet (grüner Pfeil). (B) - (E) qRT-PCR Analysen der Expression von gespleißten vs. ungespleißten Transkripten der angegebenen Gene. Die Berechnung der Genexpression erfolgte jeweils relativ zum geringsten Expressionswert. Die Normalisierung der relativen Genexpression erfolgte durch Verwendung von Actin (*act1*, *um11323*) und dem eukaryotischen Translationsinitiationsfaktor 2b (*eIF2b*, *um04869*). Dargestellt sind die Verhältnisse von gespleißter zu ungespleißter mRNA von jeweils drei unabhängigen biologischen Replikaten eines AB31-Wildtyp- und eines AB31 Δ num1-Stammes. Gezeigt sind Mittelwerte aus jeweils zwei technischen Replikaten.

Zusammengenommen deuten diese Daten darauf hin, dass das Num1-Protein auch funktionell innerhalb des NTC agiert und verschiedene zelluläre Prozesse, wie den Zellzyklus, DNA-Reparatur sowie das prä-mRNA Spleißen beeinflusst.

2.10 Untersuchungen zum mRNA-Transport

Bislang konnten verschiedene Funktionen für das Num1-Protein beschrieben werden, die an unterschiedlichsten zellulären Prozessen beteiligt sind. Aus diesem Grund war von Interesse herauszufinden, ob das Protein zwei distinkte Funktionen ausübt, eine Spleißosom-assoziierte Funktion im Zellkern und eine zweite, Kin1-abhängige Transportfunktion im Zytoplasma, oder ob das Protein an einem Mechanismus beteiligt ist, der diese beiden ungleichartig erscheinenden Prozesse miteinander verknüpft. Ein möglicher Mechanismus, der eine Verbindung zwischen Spleißing- und Transportvorgängen darstellen könnte, ist der Transport von spezifischen mRNA Transkripten (siehe auch Diskussion 3.4). Transport und Lokalisierung von mRNAs sind ein weit verbreitetes Phänomen in der Biologie und derartige Transportprozesse spielen entscheidende Rollen für zelluläre Entwicklungsvorgänge. Auch in *U. maydis* ist der mRNA Transport von zentraler Bedeutung für das polare Hyphenwachstum. Das RNA-Bindeprotein Rrm4 spielt dabei eine wesentliche Rolle und vermittelt den Transport von spezifischen Transkripten, die in Ribonukleoprotein-Partikeln bidirektional entlang des Mikrotubuli-Zytoskeletts durch die Hyphe transportiert werden (Becht *et al.*, 2006). Der Phänotyp von *rrm4*-Deletionsstämmen ähnelt in Bezug auf das polare Hyphenwachstum stark den Phänotypen der *num1*- und *kin1*-Deletionsstämmen (Becht *et al.*, 2006), was eine Funktion von Num1 innerhalb dieses Prozesses wahrscheinlich macht.

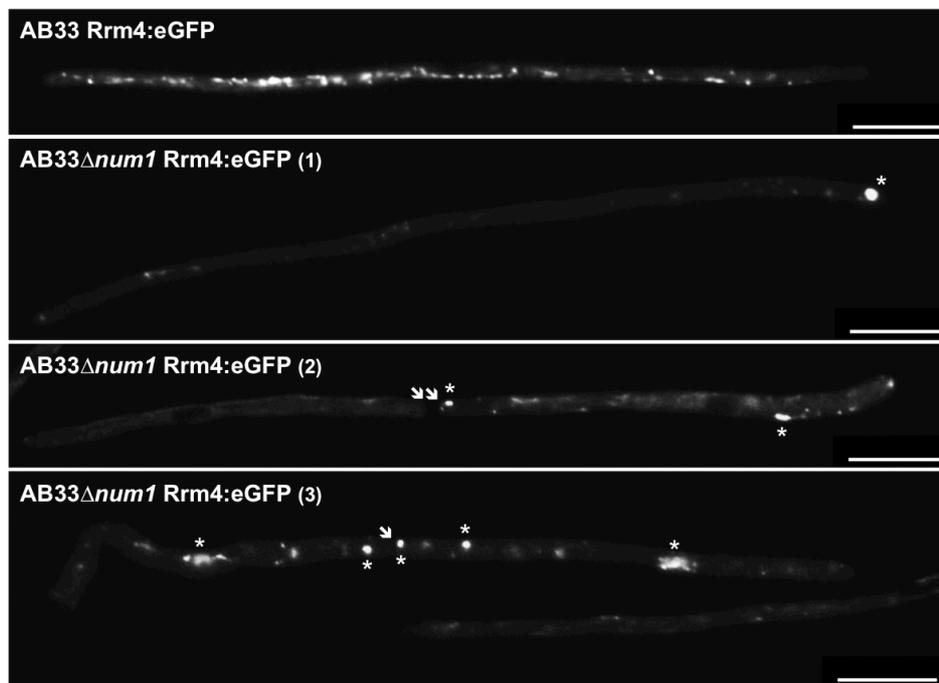


Abbildung 48: Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Rrm4-Dynamik in Abhängigkeit von Num1. Um den Einfluss von Num1 auf den RNA-Transport zu untersuchen, wurde das RNA-Bindeprotein Rrm4 als Fusion mit eGFP in AB33 bzw. AB33 Δ *num1* 16 Stunden nach Induktion des bE/bW-Heterodimers in Nitrat-haltigem Minimalmedium fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Gezeigt sind die GFP-Signale der angegebenen Stämme. Zur Verstärkung des Kontrasts wurden die Aufnahmen als schwarz/weiß-Bilder dargestellt. In AB33 lokalisieren die Rrm4:eGFP-Fusionsproteine auf schnellen, bidirektional lokalisierten Partikeln. In AB33 Δ *num1* kommt es zu Akkumulationen von Rrm4:eGFP-Partikeln (mit * gekennzeichnet) an der Hyphenspitze (1), im Bereich von delokalisierten Septen (mit Pfeil gekennzeichnet) (2) und (3), oder in anderen Bereichen der Hyphe (3). Der Längsmaßstab entspricht 10 μ m.

Um einen Effekt von Num1 auf den mRNA-Transport in *U. maydis* zu untersuchen, wurden die Lokalisierung und Motilität von Rrm4:eGFP-Partikeln in einem AB33 Δ num1-Stamm fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Im AB33 Wildtyp-Stamm sind die Rrm4:eGFP-Partikel auf schnellen, bidirektional transportierten Vesikeln zu beobachten (Film 7), die mit Yup1-markierten Endosomen co-lokalisieren (Becht *et al.*, 2006). Im Gegensatz dazu kommt es in num1-Deletionsstämmen in etwa 20% der betrachteten Filamente zu Akkumulationen der Rrm4-Partikel an der Hyphenspitze (Abb. 48 (1) und Abb. 49B) oder in anderen Teilen der Hyphen, insbesondere im Bereich von delokalisierten Septen, die als Folge der num1-Deletion zu beobachten waren (Abb. 48 (2)+(3)). Die Anzahl der Rrm4-Partikel pro Filament erschien in num1-Deletionsstämmen reduziert (Abb. 49A), was jedoch auch als indirekter Effekt aufgrund der Akkumulationen der Partikel gewertet werden kann und deshalb nicht näher quantifiziert wurde. Insbesondere in Hyphen mit starkem Polaritätsdefekt (wie bipolarem Wachstum oder delokalisierten Septen) verlief der Langstreckentransport der Rrm4-Partikel eingeschränkt (Filme 8a-c und Abb. 49B), was in Einklang mit den bereits beschriebenen Daten bezüglich des Transports von Yup1-markierten Endosomen in num1-Deletionsstämmen steht (vgl. Abb. 21).

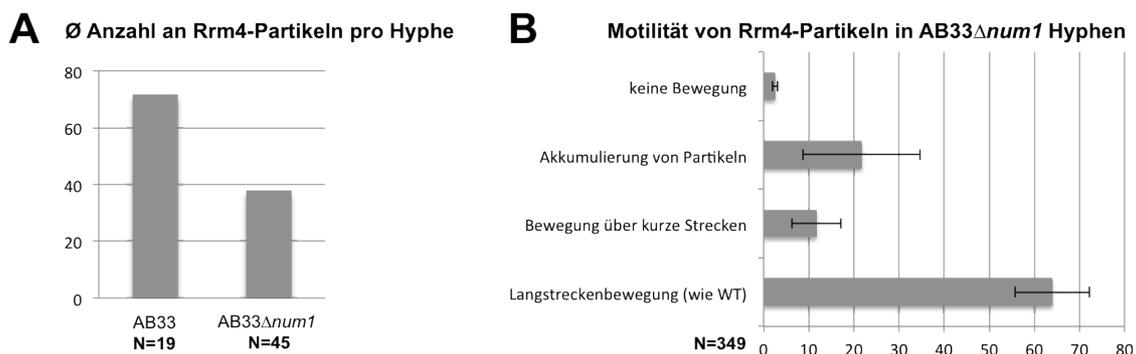


Abbildung 49: Quantifizierung der Rrm4-Dynamik. (A) Quantifizierung der Anzahl an Rrm4:eGFP-Partikeln pro Filament der angegebenen Stämme. N bezeichnet die Anzahl an ausgewerteten Filamenten. Da einzelne Partikel aufgrund der Akkumulationen oftmals schwer zu erkennen sind und die durchschnittliche Hyphenlänge in AB33-Filamenten (100 μ m) länger ist als in AB33 Δ num1-Filamenten (81,5 μ m) kann das Ergebnis nicht unbedingt als signifikant angesehen werden. (B) Motilität von Rrm4:eGFP-Partikeln in AB33 Δ num1-Stämmen. Gezeigt sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Transformanten. N bezeichnet die Anzahl an ausgewerteten Filamenten.

Um weiterhin den Einfluss von Num1 auf mRNA-Transportprozesse zu untersuchen, wurde die Dynamik des PolyA-Bindeproteins Pab1 während des filamentösen Wachstums analysiert. Mit Hilfe von Pab1 kann mRNA fluoreszenzmikroskopisch visualisiert werden. In AB33 lokalisieren Pab1:eGFP-Fusionsproteine auf schnellen, bidirektional transportierten Partikeln (Film 9), die sowohl mit Yup1-markierten Endosomen als auch mit Rrm4-Partikeln co-lokalisieren sowie diffus im Zytoplasma verteilt sind (König *et al.*, 2009). In AB33 Δ num1 hingegen erscheint die Anzahl der Pab1:eGFP-Partikel reduziert und es konnte oftmals eine verminderte Motilität der Partikel beobachtet werden (Filme 10a-b). Die direkte Assoziation von Num1 mit Elementen des Zytoskeletts lässt drauf schließen, dass die beobachteten Motilitätsdefekte bezüglich der Rrm4- und Pab1-Partikel in num1-

Deletionsstämmen als indirekte Folge des gestörten Transports, der durch die $\Delta num1$ -Mutation hervorgerufen wird, resultieren.

Num1 scheint keinen spezifischen Einfluss auf den Transport mRNA-enhaltender, Rrm4-positiver Ribonukleoprotein-Partikel zu haben. So wurde im nächsten Schritt untersucht, ob das Protein eine Funktion während des Beladens derartiger Partikel mit mRNA übernimmt. Dazu stand ein AB33-Stamm zur Verfügung, der Rrm4:eGFP- und Pab1:RFP-Fusionsproteine co-exprimierte (König *et al.*, 2009), und in Abhängigkeit von Num1 auf die Co-Lokalisierung der beiden Partikel-Populationen untersucht wurde. Sollten weniger co-lokalisierte Signale beobachtet werden, könnte dies ein Hinweis auf eine Rolle von Num1 bei der Beladung von Rrm4-Partikeln mit mRNA sein. Aufgrund der hohen Motilitätsrate der Partikel wurden die Proteine vor der fluoreszenzmikroskopischen Analyse mit Formaldehyd fixiert.

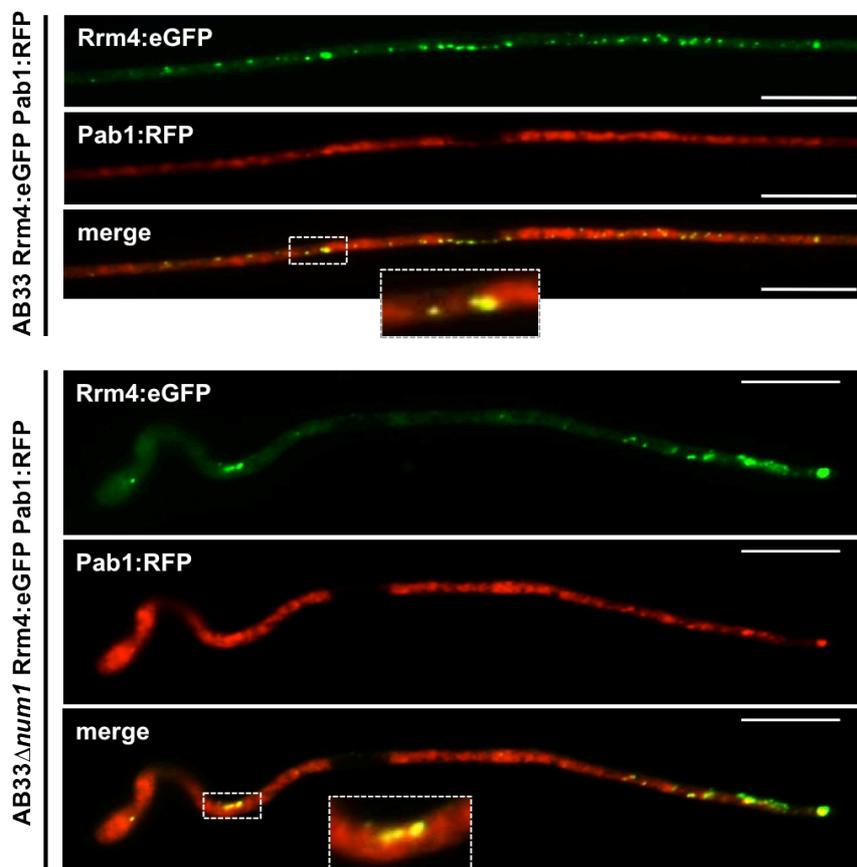


Abbildung 50: Fluoreszenzmikroskopische Analyse zur Co-Lokalisierung von Rrm4- und Pab1-Partikeln in Abhängigkeit von Num1. Um zu untersuchen, ob das Num1-Protein einen Einfluss auf die Beladung von Rrm4-Partikeln mit RNA hat, wurde ein AB33- bzw. ein AB33 $\Delta num1$ -Stamm verwendet, der Rrm4 als Fusionsprotein mit eGFP sowie Pab1 als Fusionsprotein mit RFP exprimiert (König *et al.*, 2009). Filamente wurden zur Induktion des bE/bW-Heterodimers für 16 Stunden in Nitrat-haltigem Minimalmedium induziert. Gezeigt sind die GFP- und RFP-Signale sowie die Überlagerung beider Kanäle aus Formaldehyd-fixierten Filamenten. Der Längenmaßstab entspricht 10 μ m.

In AB33 konnte eine deutliche Co-Lokalisierung von Rrm4:eGFP- und Pab1:RFP-Partikeln beobachtet werden (Abb. 50). In AB33 $\Delta num1$ kommt es häufig zur Akkumulation von Rrm4:eGFP- und Pab1:RFP-Partikeln an der Hyphenspitze, jedoch ist auch hier die Co-Lokalisierung der Partikel

nicht beeinträchtigt (Abb. 50). Das Num1-Protein hat keinen Einfluss auf die Beladung der Rrm4-Partikel mit mRNA.

Um der Frage nachzugehen, ob die Spleißing-Effizienz Rrm4-abhängig transportierter Transkripte in *num1*-Deletionsstämmen reduziert ist, wurden wie in Punkt 2.9.2 beschrieben quantitative Realtime (qRT) PCR-Analysen von Rrm4-Targettranskripten durchgeführt. Rrm4-spezifisch transportierte mRNAs wurden zuvor anhand von *in vivo* RNA-Bindestudien (CLIP), Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) und „life imaging“ eines RNA-Reporter Systems identifiziert (Koepke *et al.*, 2011; König *et al.*, 2009). Analog zu den in 2.9.2 beschriebenen Experimenten wurde die Rate der Intron-Retention für die mRNAs von *ubi1* (*um02440*), das für ein Fusionsprotein zwischen Ubiquitin und dem ribosomalen Rpl40-Protein kodiert, *rho3* (*um04070*), das für ein kleines G-Protein kodiert sowie *cts1* (*um10919*), das für eine Endochitinase kodiert, bestimmt. Die Verhältnisse von gespleißten zu ungespleißten Transkripten nahmen in AB31 Δ *num1* im Vergleich zum Wildtyp in allen getesteten Replikaten signifikant ab (Abb. 47D+E, *cts1* nicht gezeigt), was darauf hindeutet, dass Num1 die Effizienz des Spleißens Rrm4-abhängig transportierter mRNAs beeinflusst. Die Auswirkung des Num1-Proteins auf das Spleißen scheint jedoch nicht spezifisch für Rrm4-abhängig transportierte Transkripte zu sein (vgl. Abb. 47A+B), was eine Rolle von Num1 bei einem generellen Mechanismus während des Spleißens wahrscheinlich macht.

2.11 Num1 beeinflusst die Effizienz des Spleißens auf globaler Ebene

Für eine detaillierte und Genom-weite Untersuchung der Spleißing-Ereignisse in Δ *num1*-Mutanten verglichen mit Wildtyp-Stämmen wurde eine mRNA-Seq Analyse durchgeführt. Als Ausgangsmaterial für die cDNA-Synthese diente mRNA eines AB31 und eines AB31 Δ *num1*-Stammes, die acht Stunden nach der Induktion des bE/bW-Heterodimers in Arabinose-haltigem Minimalmedium aus axenischer Kultur isoliert wurde. Das filamentöse Wachstum der Kulturen wurde mikroskopisch verfolgt. Acht Stunden nach Induktion schien ein geeigneter Zeitpunkt für die RNA-Isolierung zu sein, da die überwiegende Mehrheit der Zellen filamentös auswuchs und der Δ *num1*-Phänotyp bereits ausgeprägt war (Abb. 63A, Anhang). Die Gesamt-RNA wurde mit Hilfe der Trizol-Methode aus jeweils drei unabhängig angezogenen Kulturen, d.h. biologischen Replikaten, isoliert. Anschließend wurde die Qualität der Säulen-aufgereinigten RNA-Proben auf einem 1%-igen TBE-Gel sowie anhand des Bioanalyzer RNA6000 Nano LabChip[®] Kits (Agilent Technologies) überprüft (Abb. 63B+C, Anhang). Zusätzlich wurde die *b*-Induktion in beiden Stämmen mittels quantitativer Realtime (qRT)-PCR Analyse verglichen. Wie in Abb. 51 gezeigt, gab es nur marginale Abweichungen bezüglich der Genexpression von *bW* und *rbf1* in AB31 Δ *num1* verglichen mit AB31, was darauf hindeutet, dass der Δ *num1*-Phänotyp nicht bereits durch eine veränderte Expression der *b*- bzw. *b*-abhängigen Gene hervorgerufen wird. Als weitere interne Kontrolle wurde die *num1*-Expression gemessen (Abb. 51).

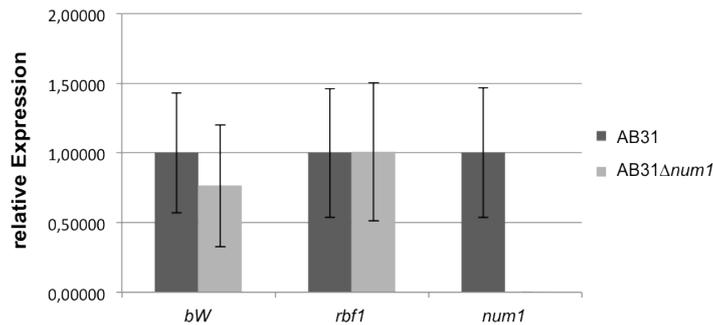


Abbildung 51: qRT-PCR Analyse der *bW*-, *rbf1*- und *num1*-Genexpression in den Stämmen AB31 (dunkel) und AB31 Δ num1 (hell). Die für die cDNA-Synthese verwendete RNA wurde acht Stunden nach Induktion des bE/bW-Heterodimers in Arabinose-haltigem Minimalmedium isoliert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus jeweils drei biologischen und zwei technischen Replikaten. Fehlerbalken geben die Standardabweichung wider. Die Berechnung der Genexpression erfolgte relativ zum höchsten Expressionswert. Die Normalisierung der relativen Genexpression erfolgte durch Verwendung von Actin (*act1 um11323*) und dem eukaryotischen Translations-Initiationsfaktor 2b (*eIF2b um04869*).

Alle weiteren für die mRNA-Seq Analyse erforderlichen Schritte, wie die Fragmentierung der mRNA, cDNA-Synthese, Ligation der Adapter und Herstellung der cDNA-Banken, wurden in Kollaboration mit Dr. Olivier Armand vom Institut für Toxikologie und Genetik am Karlsruhe Institut für Technologie, Campus Nord, durchgeführt. Für jeden Stamm wurden drei unabhängige cDNA-Banken (biologische Replikate) generiert. Der Sequenzierlauf erfolgte auf einem Illumina HighSeq1000®-Gerät; aufgrund der verhältnismäßig geringen Komplexität des *U. maydis* Genoms konnten alle sechs Proben in einer Spur vereint werden (Multiplexing). Für jede Probe konnten bei einer durchschnittlichen Anzahl von ca. 60 Mio. gelesenen „paired-end“ Fragmenten von 2×56 Basenpaaren etwa drei Gigabasen Sequenz (30×10⁹ Basenpaare) generiert werden, was in etwa der 150-fachen Abdeckung des Genoms entspricht. Mit einem Phred Qualitätsindex von >37 wurden alle erforderlichen Qualitätsstandards erreicht (Ewing und Green, 1998; Ewing *et al.*, 1998). Die Statistiken für die mRNA-Seq Analyse wurden in Tabelle 18 im Anhang zusammengefasst. Die anschließende bioinformatische Auswertung, wie der automatisierte Sequenzabgleich mit dem *U. maydis* Referenzgenom, das Zählen der gelesenen cDNA-Fragmente zur Expressionsanalyse sowie die Identifizierung von Exon-Intron-Übergängen erfolgte in Kollaboration mit Florian Finkernagel vom Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung an der Philipps-Universität in Marburg.

Um festzustellen wie viele Gene in der *num1*-Deletionsmutante differenziell reguliert sind, wurden die Expressionswerte aller annotierten MUMDB-Gene jeder AB31 Δ num1-Probe mit den Werten der AB31-Wildtypstämme verglichen, wobei die einzelnen Replikate nur minimale Abweichungen bezüglich ihrer Expression aufwiesen, was eine hohe Reproduzierbarkeit der Daten impliziert (Abb. 64, Anhang). Die Änderungen bezüglich der Genexpression wurden mit zwei unterschiedlichen Methoden, der DESeq-Methode (Anders und Huber, 2010) sowie der BaySeq-Methode (Hardcastle und Kelly, 2010) berechnet. Dabei wurden nur Gene in die Berechnung mit einbezogen, die exprimiert waren, d.h. mindestens 50 gelesene Fragmente in mindestens einem Replikat aufwiesen, und die mehr als zweifach differentiell reguliert sowie statistisch signifikant waren. Insgesamt konnten so 459

differenziell regulierte Gene detektiert werden, von denen 209 Gene mindestens zweifach induziert und 250 Gene mindestens zweifach reprimiert wurden. Vollständige Listen aller deregulierten Gene befinden sich im Anhang (Listen I und II). Eine signifikante Anreicherung von funktionellen Kategorien („FunCats“, „GO terms“) konnte in den Sets von Genen, die in AB31 Δ num1 induziert oder reprimiert waren, nicht erfasst werden.

Neben der Genregulation wurde im nächsten Schritt die Effizienz des Spleißens anhand der Bestimmung der Intron-Retentionsraten (d.h. Menge an ungespleißter mRNA in Intron-Sequenzen) in AB31 Δ num1-Deletionsmutanten, verglichen mit dem AB31 Ausgangsstamm, untersucht. Die Intron-Retentionsraten wurden durch Bestimmung der Abdeckung der normalisierten Anzahl an gelesenen Fragmenten in intronischen Bereichen in Relation zur Abdeckung der normalisierten Anzahl an gelesenen Fragmenten in Bereichen von 50 bp innerhalb der umliegenden Exon-Sequenzen berechnet. Basierend auf 2.295 Intron-Sequenzen im *U. maydis* Genom konnte gezeigt werden, dass die Transkripte in AB31 mit einer Effizienz von durchschnittlich 0,92 ($\pm 0,13$) gespleißt werden, in AB31 Δ num1 hingegen die Spleißing-Effizienz mit durchschnittlich 0,79 ($\pm 0,21$, t-Test $p = 1,6 \times 10^{-283}$) signifikant reduziert ist. Für 79% der Introns (1805 von 2295) war in AB31 Δ num1 eine mindestens zweifach erhöhte Intron-Retentionsrate im Vergleich zum Wildtyp zu verzeichnen, was darauf hindeutet, dass die Δ num1-Mutation die Intron-Retentionsrate Genom-weit beeinflusst. Die Kastengraphik in Abb. 52 zeigt, dass in allen drei AB31 Δ num1-Replikaten deutlich mehr Fragmente innerhalb von Intron-Regionen gezählt werden konnten, als in den AB31-Replikaten. Eine vollständige Auflistung der Retentionsraten aller Intron-haltiger Gene befindet sich im Anhang (Liste III).

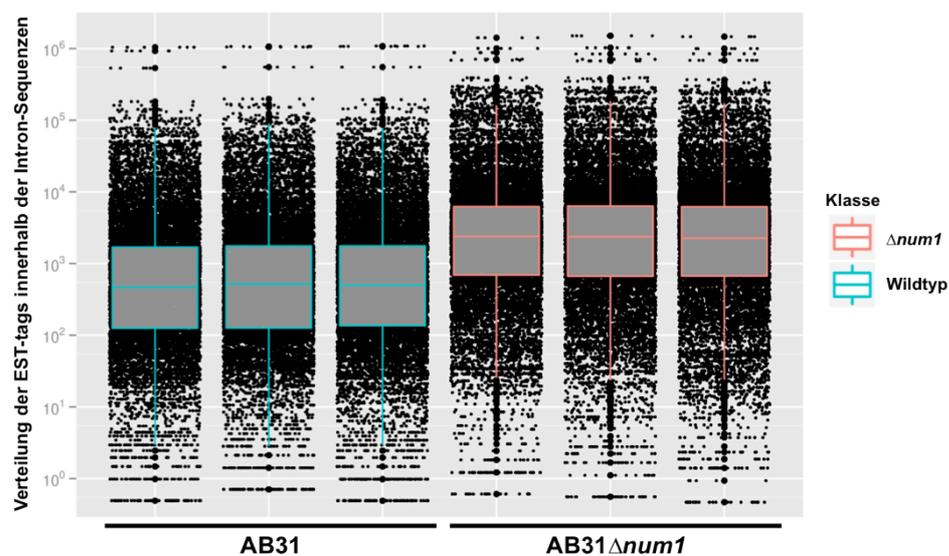


Abbildung 52: Num1 hat einen globalen Effekt auf die Intron-Retention. Dargestellt ist die Verteilung der gelesenen Fragmente innerhalb von Intron-Sequenzen jeweils dreier biologischer Replikate von AB31 (blau) bzw. AB31 Δ num1 (rot) in der Kastengraphik („box plot“). Es wurde auf gleiche Gesamtanzahl normalisiert. Abbildung freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Florian Finkernagel.

In Abb. 53 sind weitere bioinformatische Analysen aufgeführt, um den globalen Effekt auf die Intron-Retention zu visualisieren. Abb. 53A und B zeigen zwei unterschiedliche Arten, die gelesenen Fragmente innerhalb von Intron-Regionen abhängig von der Intensität ($\log_{AB31} + \log_{AB31\Delta num1} / 2$) zu zählen. Zusätzlich wurde die Genexpressionsstärke mit einbezogen, um den Einfluss der Expressionsrate auf die Intron-Retention zu untersuchen. Abb. 53C veranschaulicht, dass sich die Genexpression nicht wesentlich auf die Intron-Retention auswirkt. Weiterhin wurde gezeigt, dass die Kardinalität der Introns (also die Reihenfolge der Introns innerhalb eines Gens) keinen Einfluss auf die Intron-Retention besitzt (Abb. 53D).

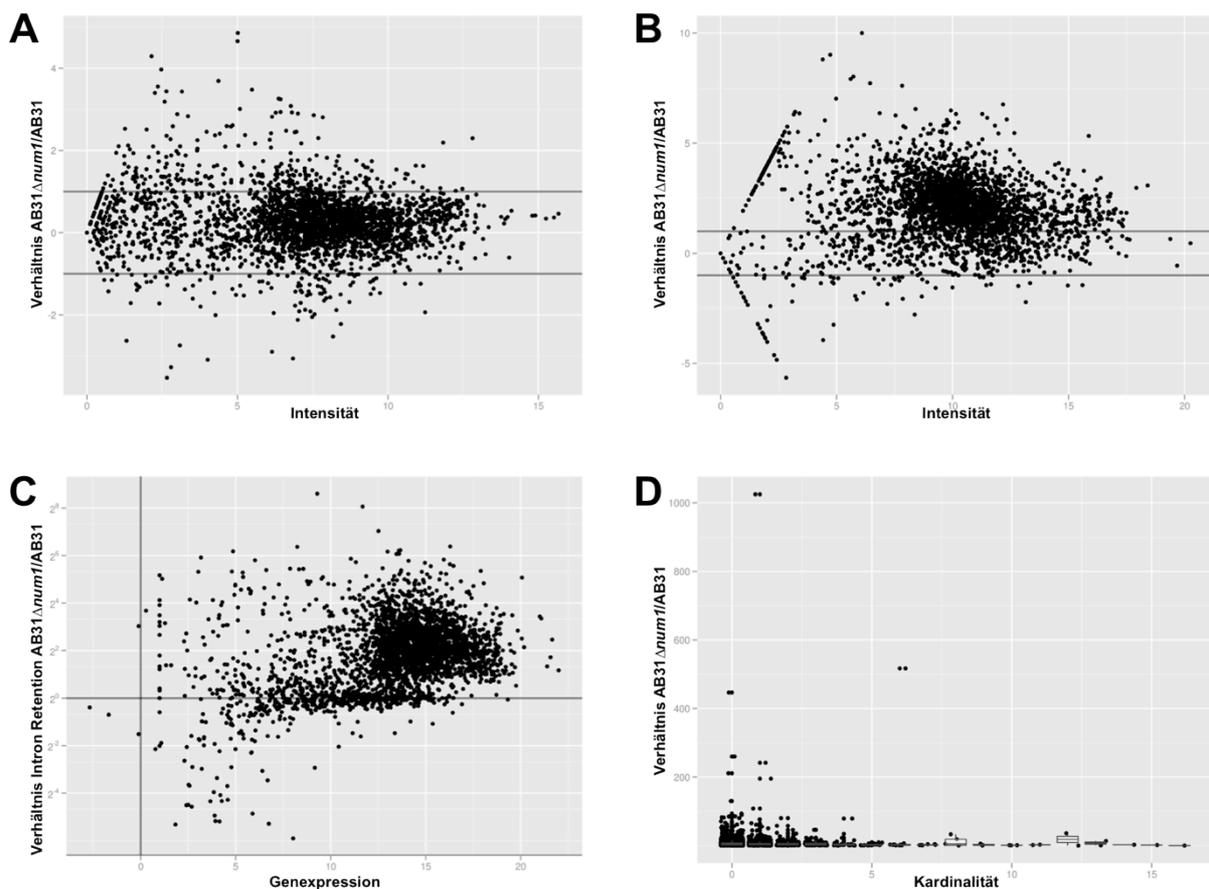


Abbildung 53: Bioinformatische Analysen zur Intron-Retention. (A) + (B) Unterschiede bezüglich der Intron-Retentionsrate wurden anhand von MA-Plots dargestellt. (A) Anzahl der „paired-end“-Fragmente, die vollständig in Intron-Regionen liegen (normalisiert auf gleiche Gesamtanzahl) in AB31 $\Delta num1$ im Vergleich zu AB31. (B) Anzahl „total coverage“ je Nukleotid-Position in Intron-Regionen (normalisiert auf gleiche Gesamtanzahl) in AB31 $\Delta num1$ im Vergleich zu AB31. (C) Einfluss der Genexpressionsstärke auf die Intron-Retention. Gezeigt ist die Genexpression (berechnet anhand von 50bp Exon-Regionen rechts und links des Introns: $\emptyset \Delta num1/wt$) gegenüber Intron-Retentionsraten (durch $(\Delta num1_Intron/\Delta num1_Umgebung) / (wt_Intron/wt_Umgebung)$ berechnet). (D) Die Kardinalität der Introns (1. Intron, 2. Intron, ...) hat keinen Einfluss auf die Retentions-Rate. Dargestellt sind die Verhältnisse von AB31 $\Delta num1$ /AB31 (normalisiert auf gleiche Gesamtanzahl) für jedes Intron im Jitter Plot. Abbildungen freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Florian Finkernagel.

Bezüglich der Spleißing-Effizienz von AB31 $\Delta num1$ -Stämmen im Vergleich zum Wildtyp waren jedoch in einigen Fällen deutliche Unterschiede zu verzeichnen. Während manche Transkripte in AB31 $\Delta num1$ besonders stark vom Spleißen betroffen waren (379 Intron-Sequenzen mit einer 10-fach erhöhten Retentionsrate), wurden andere mit ähnlicher Effizienz gespleißt wie die vergleichbaren

Transkripte in AB31. Zur visuellen Darstellung der unterschiedlichen Spleißing-Effizienzen wurden Beispiele für ein gut- bzw. ein schlecht gespleißtes Transkript ausgewählt. Die putative Allantoat-Permease (Um02704) (Abb. 54A) steht mit einer Intron-Retentionsrate von 66,85 auf der Liste der Gene mit den höchsten Intron-Retentionsraten an 11. Stelle. Im Gegensatz dazu ist für das konservierte Protein Um15087 kein Defekt bezüglich der Spleißing-Effizienz zu verzeichnen (Abb. 54B). Mit einer Intron-Retentionsrate von 1,03 wird das Transkript in AB31 Δ num1 gleich effizient wie in AB31 gespleißt.

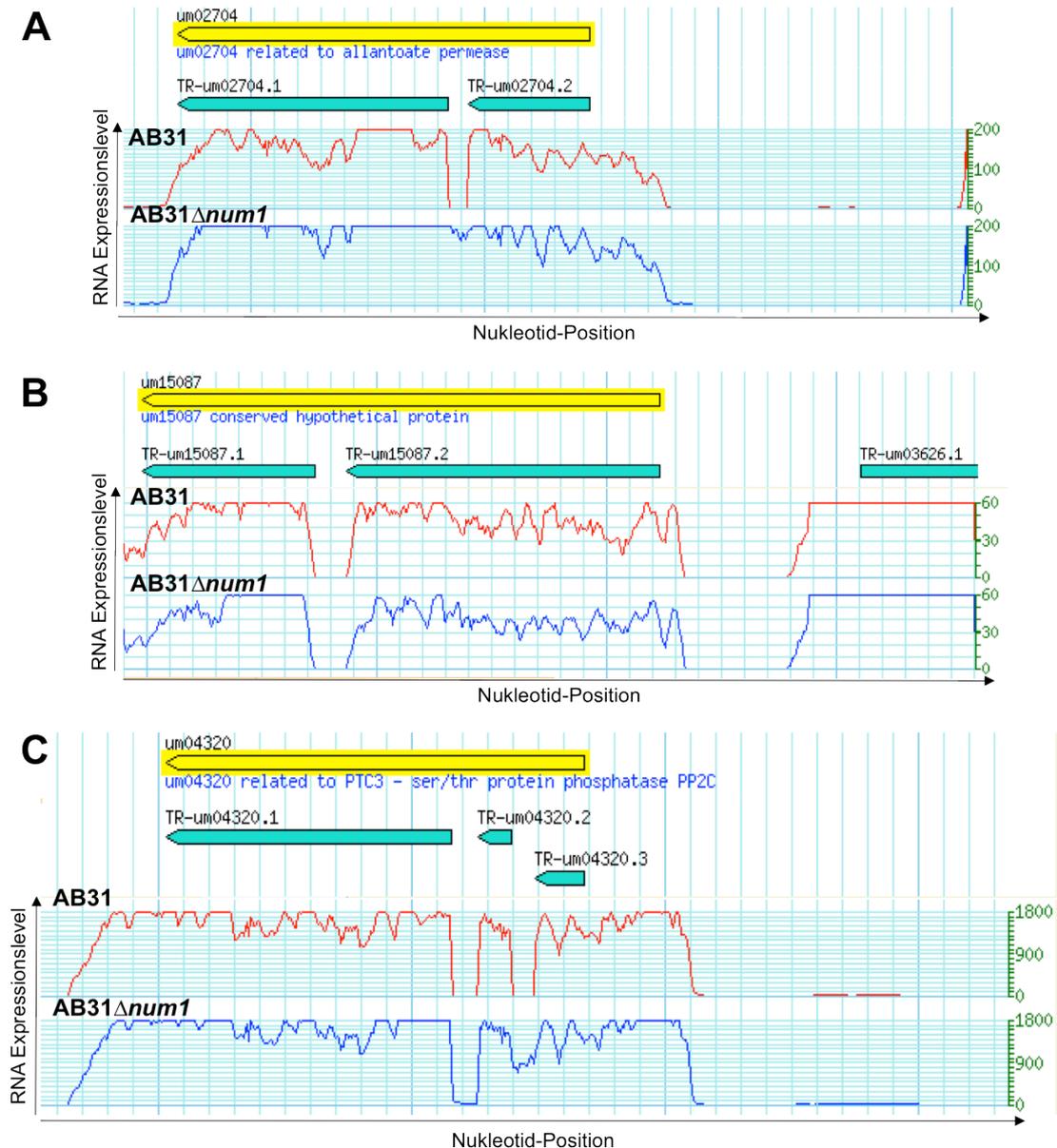


Abbildung 54: Unterschiedliche Intron-Retentionsraten in AB31 Δ num1. Gezeigt sind Beispiele von Genen, deren Introns (A) besonders vom Spleißen betroffen sind, (B) ähnlich gut wie im Wildtyp gespleißt werden oder (C) eine divergente Intron-Retentionsrate aufweisen. Dargestellt sind jeweils die anhand der MUMDB (<http://mips.helmholtz-muenchen.de/genre/proj/ustilago>) vorhergesagten offenen Leserahmen (gelb); die vorhergesagten transkribierten Exons sind als blaue Pfeile gezeigt. Die „single base resolution“-Expressionsprofile für je ein AB31- (rot) und AB31 Δ num1-Replikat (blau) verdeutlichen die unterschiedlichen Intron-Retentionsraten der drei Gene. Die Höhe der abgebildeten Linie ist proportional zur Abdeckung jeder Nukleotid-Position mit gelesenen „paired-end“ Fragmenten.

Darüber hinaus gab es Gene mit divergenten Intron-Retentionsraten, d.h. bei denen ein Intron weiterhin gut gespleißt wurde, ein anderes Intron hingegen massiv am Spleiß-Verlust litt. Diese Gene wurden in eine separate Liste gefiltert (Liste IV im Anhang). Als Beispiel für eine divergente Intronretention wurde in Abb. 54C die Serin/Threonin-Phosphatase PP2C (Um04320) dargestellt. In AB31 Δ *num1* wurden die beiden Introns des Transkripts mit unterschiedlicher Effizienz gespleißt; die Retentionsraten betragen 83,25 (1. Intron) und 3,30 (2. Intron).

Als weitere Auffälligkeit wurde beobachtet, dass einige Gene, bei denen in der *num1*-Deletionsmutante eine erhöhte Intron-Retentionsrate zu verzeichnen war, signifikant induziert wurden. Als stellvertretendes Beispiel für diese Situation galt eine Polyketid-Synthase (Um04095), die bei einer Intron-Retentionsrate von 42,95 (1. Intron) in AB31 Δ *num1* 5,14-fach induziert war (Abb. 65, Anhang). In Liste III im Anhang sind neben den Retentionsraten der Introns die Genexpressionswerte der entsprechenden Gene verzeichnet.

Um aufzuklären, ob die beobachteten pleiotropen Phänotypen bezüglich des polaren, filamentösen Hyphenwachstums beziehungsweise Kin1-abhängiger endosomaler Transportprozesse, aus einer reduzierten Spleißing-Effizienz bestimmter Transkripte resultieren, wurde die Gruppe von Genen mit einer Intron-Retentionsrate >10 auf eine Anreicherung funktioneller Kategorien untersucht. Es konnte jedoch innerhalb der untersuchten Gruppe keine signifikante Anreicherung spezifischer funktioneller Kategorien detektiert werden.

Bei der Betrachtung von Genen, die für Transkriptionsfaktoren kodieren, fiel auf, dass die Intron-Retentionsrate in vielen Genen signifikant erhöht war (Tabelle 6). Die Liste der Transkriptionsfaktoren, die durch eine reduzierte Effizienz des Spleißens betroffen waren, umfasste unter anderem Regulatoren des filamentösen Wachstums, des Zellzyklus und/oder der pathogenen Entwicklung: Alle vier im *rbf1*-Gen enthaltenen Introns wurden in AB31 Δ *num1* signifikant weniger gespleißt (Tabelle 6 und Abb. 55B), was in einer deutlich reduzierten Menge an funktionellem *rbf1*-Transkript resultierte: Die kumulative Spleißing-Effizienz der vier Introns im *rbf1*-Gen betrug 0,39 in AB31 Δ *num1* im Gegensatz zu 0,78 in AB31. Rbf1 gilt als zentraler Regulator für die Kontrolle des pathogenen Entwicklungsprogramms, ist sowohl notwendig, als auch hinreichend für die Bildung von Filamenten, und reguliert eine komplexe Kaskade von weiteren Transkriptionsfaktoren, die essentiell für die sexuelle, pathogene Entwicklung sind und beispielsweise die Koordination des Zellzyklus, die Morphogenese des Filaments und die Kolonisierung der Wirtspflanze steuern (Heimel *et al.*, 2010b). Die Effizienz des Spleißens einiger Rbf1-abhängiger Gene ist wie Rbf1 selbst von der *num1*-Deletion betroffen. Dazu zählt unter anderem Fox1, das ausschließlich während der biotrophen Phase *in planta* exprimiert wird und seinerseits mehrere Gene reguliert, die für Effektor-Proteine kodieren und somit die pathogene Entwicklung und die Suppression von Pflanzenabwehrreaktionen beeinflussen (Zahiri *et al.*, 2010). Mzr1 ist wie Fox1 während der pathogenen Phase induziert und fungiert als transkriptioneller Aktivator (Zheng *et al.*, 2008). Es reguliert unter anderem die Expression des *mig2*-Genclusters, das zur Kolonisierung der Wirtspflanze beiträgt (Basse *et al.*, 2002). Ein weiteres Rbf1-

abhängig reguliertes Gen, das vom Spleißen betroffen ist, ist *Hdp1*, das eine zentrale Rolle bei der Zellzyklus-Regulation spielt, da es einen Effekt auf die mitotischen Zykline *Cib1* und *Pcl12* hat (Pothiratana, 2007). Aufgrund der geringen *fox1*-Expression in den AB31-Wildtyp Proben konnte keine signifikante Intron-Retentionsrate für dieses Gen berechnet werden. Die Spleißing-Effizienz des *mzr1*-Transkripts wurde in Abhängigkeit der *num1*-Deletion von 0,94 (AB31) auf 0,36 (AB31 Δ *num1*) und des *hdp1*-Transkripts von 0,82 (AB31) auf 0,12 (AB31 Δ *num1*) reduziert.

Tabelle 6: Num1 hat einen Effekt auf die Intron-Retention von Transkriptionsfaktoren

Accession*	Beschreibung	Domäne	# Introns	Spleißing-Effizienz Introns in Δ <i>num1</i>				Gesamt Spleißing-Effizienz in Δ <i>num1</i>	Spleißing-Defekt (fach) Δ <i>num1</i> vs wt
				1	2	3	4		
um01523	Fox1	Winged	1	ND				ND	ND
um05080	hypothetisches Protein	Helix-loop-helix	1	ND				ND	ND
um02451	konserviertes, hypothetisches Protein	Zn(2)-C6	1	ND				ND	ND
um01025	konserviertes, hypothetisches Protein	Zn(2)-C6	1	ND				ND	ND
um02835	konserviertes, hypothetisches Protein	TEA/ATTS	1	ND				ND	ND
um05804	Mzr1	Zn C2H2	1	0,36				0,36	-2,6
um02022	konserviertes, hypothetisches Protein	Zn(2)-C6	1	ND				ND	ND
um12189	konserviertes, hypothetisches Protein	Zn(2)-C6	1	ND				ND	ND
um02808	verwandt mit Nit-4 (Stickstoff-Assimilations Transkriptionsfaktor)	Zn(2)-C6	1	0,34				0,34	-2,5
um01963	konserviertes, hypothetisches Protein	Zn(2)-C6	1	0,64				0,64	-1,5
um15065	konserviertes, hypothetisches Protein	Zn(2)-C6	1	0,99				0,99	-1,0
um11462	putatives Protein	Zn(2)-C6	1	0,27				0,27	-3,2
um15066	konserviertes, hypothetisches Protein	Zn(2)-C6	1	0,87				0,87	-1,0
um05515	hypothetisches Protein	Zn(2)-C6	1	0,22				0,22	-4,4
um10005	konserviertes, hypothetisches Protein	Zn(2)-C6	1	0,15				0,15	-5,2
um11176	konserviertes, hypothetisches Protein	bZIP	1	0,76				0,76	-1,3
um15058	konserviertes, hypothetisches Protein	Zn(2)-C6	1	1,00				1,00	-1,0
um15088	konserviertes, hypothetisches Protein	Zn(2)-C6	1	0,85				0,85	-1,0
um02247	konserviertes, hypothetisches Protein	Zn(2)-C6	1	0,35				0,35	-1,2
um11197	putatives Protein	Helix-loop-helix	1	0,34				0,34	-2,4
um12004	konserviertes, hypothetisches Protein	Zn C2H2	1	0,87				0,87	-1,1
um15103	verwandt mit dem Transkriptionsfaktor ATFA	bZIP	1	1,00				1,00	-1,0
um03536	verwandt mit dem Zink-Finger Protein SFP1	Zn C2H2	1	0,44				0,44	-1,1
um11967	konserviertes, hypothetisches Protein	transcription factor Opi1	1	0,58				0,58	-1,5
um10087.2	putatives Protein	Homeobox	1	0,58				0,58	-1,7
um01390	konserviertes, hypothetisches Protein	HMG	1	0,83				0,83	-1,2
um15080	konserviertes, hypothetisches Protein	SANT	1	1,00				1,00	-1,0
um01482	hypothetisches Protein	Zn(2)-C6	1	0,89				0,89	-1,1
um15078	konserviertes, hypothetisches Protein	Zn(2)-C6	1	1,00				1,00	-1,0
um15091	konserviertes, hypothetisches Protein	Helix-loop-helix	1	1,00				1,00	-1,0
um11222	verwandt mit MBP1	APSES-type	1	0,74				0,74	-1,3
um11782	putatives Protein	bZIP	1	0,24				0,24	-1,2
um00578	b Paarungstyp Locus, bW1 Allel	Homeobox	1	0,98				0,98	-1,0
um12052	b Paarungstyp Locus, bE1 Allel	Homeobox	1	0,19				0,19	-4,3
um10500	hypothetisches Protein	Zn(2)-C6	1	ND				ND	ND
um04083	konserviertes, hypothetisches Protein	transcription factor, fungi	2	ND	ND			ND	ND
um11957	verwandt mit der Histidin Kinase	PAS fold	2	0,24	0,74			0,18	-0,1
um05820	hypothetisches Protein	Zn(2)-C6	2	0,84	0,77			0,65	-1,4
um00113	verwandt mit dem transkriptionellen Aktivator Acu-15	Zn(2)-C6	2	0,81	0,81			0,66	-1,5
um00906.2	konserviertes, hypothetisches Protein	CBF/NFY	2	0,85	0,90			0,77	-1,2
um12024	Hdp1	Homeobox	2	0,18	0,66			0,12	-6,9
um15041	konserviertes, hypothetisches Protein	Zn(2)-C6	3	0,82	0,81	0,91		0,61	-1,5
um12304	hypothetisches Protein	Zn(2)-C6	3	ND	ND	ND		ND	ND
um03570	konserviertes, hypothetisches Protein	Zn C2H2	3	0,99	1,00	0,66		0,65	-1,4
um11602	verwandt mit einem Zink-Finger Protein	Zn C2H2	3	0,93	0,58	0,76		0,41	-1,7
um04778	konserviertes, hypothetisches Protein	APSES-type	4	ND	ND	ND	ND	ND	ND
um02775	hypothetisches Protein	p53-like	4	0,80	0,01	0,57	0,23	0,00	-74,4
um03172	Rbf1	Zn C2H2	4	0,72	0,76	0,76	0,95	0,39	-2,0
um10544	konserviertes, hypothetisches Protein	Myb	4	ND	ND	ND	ND	ND	ND

* – Accession gemäß MUMDB (<http://mips.helmholtz-muenchen.de/genre/proj/ustilago>). Dargestellt sind alle Gene, die für putative Transkriptionsfaktoren kodieren und Introns enthalten. Die Spleißing-Effizienz für die einzelnen Introns, sowie die daraus resultierende Gesamt-Spleißing-Effizienz in AB31 Δ *num1* ist angegeben. Die letzte Spalte zeigt die faktorielle Veränderung der Spleißing-Effizienz in AB31 Δ *num1* im Vergleich zu AB31. Durch die blaue Markierung sind Transkriptionsfaktoren hervorgehoben, die eine maßgebliche Rolle während des filamentösen Wachstums und der pathogenen Entwicklung von *U. maydis* innehaben. ND – Die Spleißing-Effizienz konnte aufgrund des geringen Expressionslevels des Gens nicht bestimmt werden.

Die reduzierte Spleißing-Effizienz lässt auf damit einhergehende Funktionsdefizite der erwähnten Transkriptionsfaktoren schließen. Es wurde erwartet, dass viele in der Rbf1-Regulationskaskade

nachgeschaltete Gene dereguliert sein müssten. Beispielhaft wurde daher die Anzahl an Rbf1-abhängig exprimierten Genen untersucht, die als Folge der *num1*-Deletion herunterreguliert werden. Von 337 Genen, die in *rbf1*-Deletionsstämmen reprimiert sind (Heimel *et al.*, 2010b) befanden sich rund 30% innerhalb einer Schnittmenge mit den in *num1*-Deletionsstämmen reprimierten Genen wieder (Abb. 55C und Liste II im Anhang). Unter den sich überschneidenden Genen befanden sich auch solche, die wiederum als Regulatoren des Zellzyklus oder als Faktoren für das filamentöse, pathogene Entwicklungsprogramm bekannt waren, wie Biz1, Hdp2, Rep1, Dik6 oder Kpp6, deren Expression in beiden Deletionsstämmen mindestens zwei-fach reprimiert war.

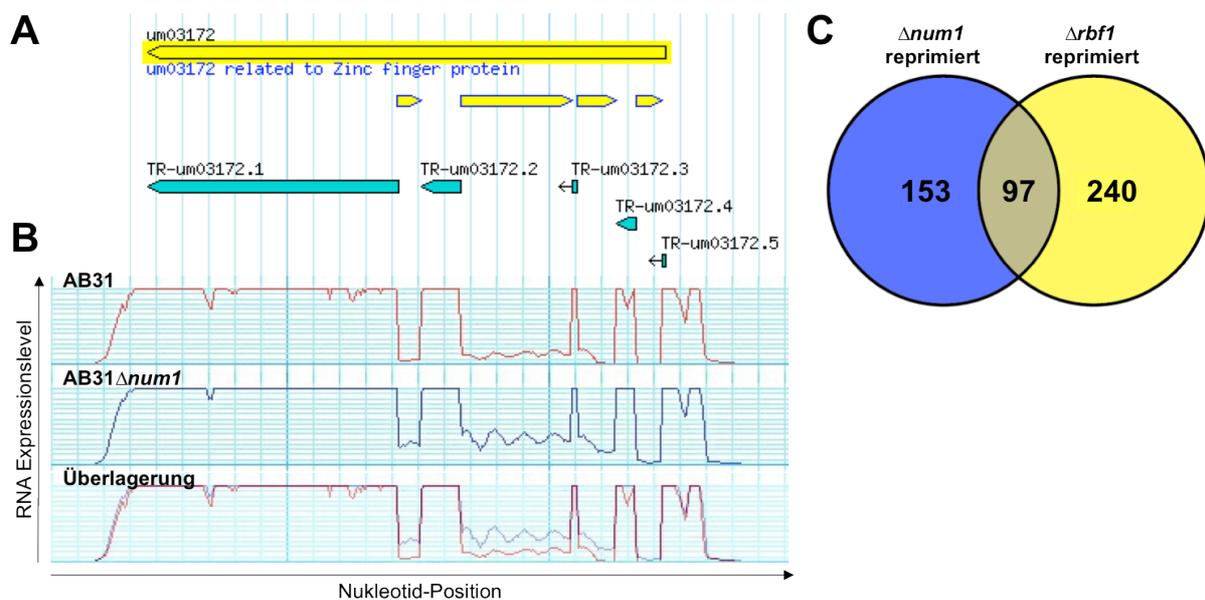


Abbildung 55: Die *num1*-Deletion führt zu erhöhter Intron-Retention im *rbf1*-Gen. (A) Dargestellt ist die anhand der MUMDB (<http://mips.helmholtz-muenchen.de/genre/proj/ustilago>) vorhergesagte Struktur des *rbf1*-Locus (*um03172*). Der offene Leserahmen des *rbf1*-Genes ist als gelber Pfeil dargestellt; die kodierende Sequenz ist durch vier Introns unterbrochen (gelb) und die vorhergesagten transkribierten Exons sind als blaue Pfeile abgebildet. (B) „single base resolution“-Expressionsprofile der *rbf1*-Expression in AB31 (rot) und AB31 Δ *num1* (blau). Die Höhe der abgebildeten Linie ist proportional zur Abdeckung jeder Nukleotid-Position mit gelesenen „paired-end“ Fragmenten. In der Überlagerung der beiden Diagramme wird deutlich, dass die Effizienz des Spleißens aller vier im *rbf1*-Gen enthaltenen Introns in der Δ *num1*-Mutante reduziert ist. (C) Im Schnittmengendiagramm ist die Gesamtzahl der in AB31 Δ *num1* reprimierten (acht Stunden nach Induktion des bE/bW-Heterodimers) sowie aller in AB31 Δ *rbf1* reprimierten Gene dargestellt. Rund ein Drittel der herunterregulierten Gene findet sich in beiden Teilmengen wieder.

Zusammen genommen deuten diese Daten darauf hin, dass die reduzierte Spleißing-Effizienz von Transkriptionsfaktoren, wie dem zentralen Master-Regulator Rbf1, zu einer reduzierten Funktion und eine daraus resultierende Deregulierung von weiteren Transkriptionsfaktoren führt. Viele der pleiotropen Phänotypen der Δ *num1*-Mutanten, wie das filamentöse, polare Hyphenwachstum, die Regulation des Zellzyklus oder die Sensitivität gegenüber DNA-Schäden können somit indirekt als Folge ineffizienter oder aberranter Spleißing-Vorgänge erklärt werden.

3. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die Funktion des Num1-Proteins charakterisiert, das als Komponente des Spleißosom-assoziierten Prp19/CDC5L-Komplexes (NTC) identifiziert werden konnte. Die Deletion von *num1* führt Genom-weit zu einer reduzierten Spleißing-Aktivität, was zu pleiotropen Phänotypen bezüglich des polaren, filamentösen Hyphenwachstums, Zellzyklus-Kontrolle und DNA-Reparatur führt. Erstmals wurde die bislang unbekannte Funktion einer NTC-Komponente im Zytoplasma gezeigt, wo Num1 mit dem Kin1-Motorprotein interagiert. Die funktionelle Verbindung zwischen dem Num1-Protein und Elementen des Zytoskeletts impliziert zusätzliche Funktionen bei intrazellulären Transportprozessen.

3.1 Num1 als strukturelle und funktionelle Komponente des Spleißosom-assoziierten konservierten Prp19/CDC5L-Komplexes

Aufgrund der hohen Homologiegrade der zentralen Komponenten aus dem evolutionär konservierten NTC (siehe 2.9) wurde postuliert, dass das Num1-Protein in *U. maydis* ebenso wie seine bekannten Homologe aus *S. cerevisiae*, *S. pombe* oder dem Menschen ein struktureller Bestandteil dieses Komplexes ist. Eine positive Interaktion von Num1 mit zwei NTC Kernproteinen, Prp19 und Cef1, konnte in einer Hefe-Zwei-Hybrid Analyse gezeigt sowie durch Co-Immunopräzipitation *in vivo* verifiziert werden (Abb. 44). Die Co-Lokalisierung von Num1 mit Prp19 bzw. Cef1 im Nukleus (Abb. 45) ist ein weiteres Indiz für das Vorliegen aller drei Proteine in einem gemeinsamen Komplex. Ferner wurde gezeigt, dass die *num1*-Deletion verschiedene zelluläre Prozesse, wie die Regulation von Zellzyklus und Zellteilung (Abb. 22), die Sensitivität gegenüber DNA-schädigendem UV-Licht (Abb. 46) sowie das Spleißen (Abb. 47 und Abb. 52) beeinflusst. Insgesamt indizieren diese Daten, dass Num1 neben der physikalischen Interaktion mit den NTC-Komponenten Prp19 und Cef1 auch funktionell als Komponente des Spleißosom-assoziierten NTC in *U. maydis* agiert.

Das Num1-Protein interagiert in der Hefe-Zwei-Hybrid Analyse mit dem Prp19 N-Terminus und dem Cef1 C-Terminus, was in guter Übereinstimmung zu den bereits charakterisierten Interaktionen aus *S. pombe* und *S. cerevisiae* (Ohi und Gould, 2002), sowie der Architektur des humanen und pflanzlichen NTC (Grote *et al.*, 2010; Koncz *et al.*, 2012) steht. Der N-Terminus ist der am höchsten konservierte Teil der Prp19-homologen Proteine. Dort befindet sich jeweils eine U-box Domäne mit E3 Ubiquitin-Ligase Aktivität *in vitro* (Ohi *et al.*, 2003), die essentiell für die Funktion des Proteins ist (Ohi *et al.*, 2003; Ohi *et al.*, 2005). Auch die in *U. maydis* vorhergesagte Proteinstruktur weist hier eine U-box Domäne auf; ob diese wie die homologen Prp19-Proteine eine Ubiquitylierungs-Aktivität aufweist, wurde jedoch nicht untersucht. Am C-Terminus befinden sich sieben WD40-Domänen, die eine Interaktion mit anderen Proteinen signalisieren (Smith *et al.*, 1999). In *S. cerevisiae* wurde gezeigt, dass in diesem Bereich des Proteins die Interaktionsdomäne für andere

NTC-Komponenten liegt (Tarn *et al.*, 1994), sodass das Prp19-Tetramer das Grundgerüst des NTC bildet, an das weitere Proteine binden. Das Cef1-Protein weist am N-Terminus eine konservierte Myb-ähnliche Domäne auf, die möglicherweise bei der DNA-Bindung involviert ist (Hirayama und Shinozaki, 1996; Klempnauer und Sippel, 1987), was bislang in *U. maydis* jedoch nicht untersucht wurde.

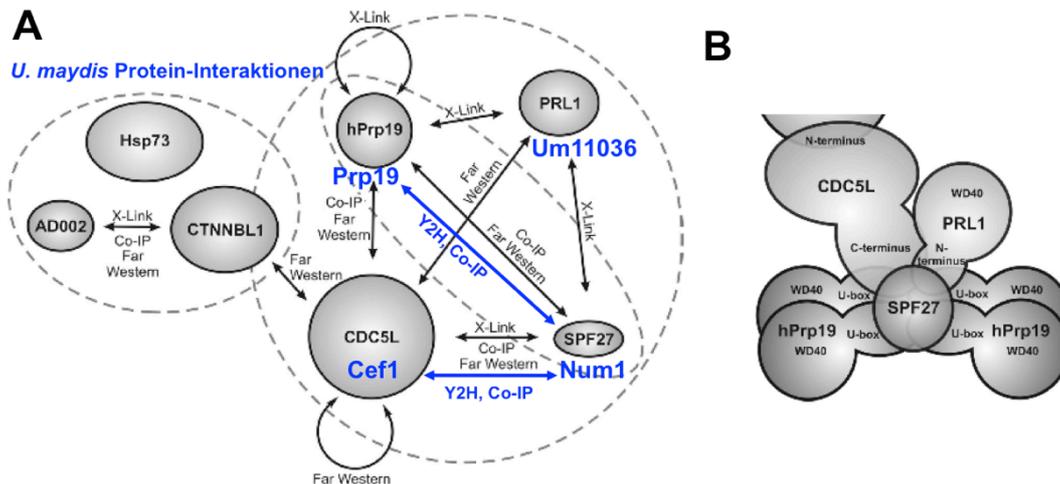


Abbildung 56: Schematische Übersicht der Protein-Protein Interaktionen innerhalb des Prp19/CDC5L-Komplexes. (A) Die Protein-Interaktionen innerhalb des humanen hPrp19/CDC5L-Komplexes sind durch Pfeile gekennzeichnet und die Methoden, mit denen die Interaktionen analysiert wurden, sind angegeben. Gestrichelte Kreise indizieren stabile Subkomplexe. Die in dieser Arbeit identifizierten *U. maydis* Protein-Interaktionen sind in blau dargestellt. **(B)** Modell für die molekulare Architektur des humanen hPrp19/CDC5L-Komplexes. Abbildungen modifiziert nach (Grote *et al.*, 2010).

Weitere Interaktionen innerhalb der Kern-Komponenten aus dem NTC in *U. maydis* (siehe Abb. 56 und Tabelle 2) sind wahrscheinlich, in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht belegt worden. Es ist davon auszugehen, dass nicht alle Interaktionen direkt in dualen Systemen wie dem Hefe-Zwei-Hybrid System nachgewiesen werden können, da es zusätzlicher stabilisierender Faktoren bedarf. Fehlende oder nicht funktionelle Proteine aus dem NTC können in diversen Organismen zu einer gestörten Integrität des Komplexes führen (Chen *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2002; Hirayama und Shinozaki, 1996; Revers *et al.*, 2002). Andere Beispiele zeigen, dass eine stabile Interaktion von NTC-Komponenten auch auf der aktiven Bildung von prä-mRNA beruht (Lleres *et al.*, 2010).

Die Deletion von *prp19*- und *cef1*-Homologen in *S. pombe* und *S. cerevisiae* wirkt sich letal auf die Zellen aus, da beide Komponenten essentiell für das prä-mRNA Spleißen sind (Burns *et al.*, 1999; McDonald *et al.*, 1999; Tarn *et al.*, 1993; Tsai *et al.*, 1999). Ebenso ist bekannt, dass die Orthologe in Mensch und Maus essentielle Proteine sind (Ajuh *et al.*, 2000; Fortschegger *et al.*, 2007; Grillari *et al.*, 2005). Ein RNAi-vermittelter Knockdown des Prp19-Homologs T10F2.4 in *C. elegans* führt zu embryonaler Letalität (Gönczy *et al.*, 2000; Kamath *et al.*, 2003) und auch in *D. melanogaster* ist die „loss-of-function“-Mutation Prp19⁰⁷⁸³⁸ rezessiv letal (Milchanowski *et al.*, 2004). Ebenso konnte in der vorliegenden Studie gezeigt werden, dass *prp19* und *cef1* in *U. maydis* essentielle Gene sind, was ihre Rolle als wesentliche Spleißing-Faktoren in diesem Organismus unterstreicht.

Im Gegensatz zu den bisher untersuchten Num1-Homologen in anderen Organismen, dessen Deletion ausnahmslos letale Auswirkungen hat, ist das Num1-Protein in *U. maydis* die erste bislang identifizierte Komponente aus dem Kern-NTC, die nicht essentiell ist. Eine mögliche Erklärung ist, dass das *U. maydis* Genom verhältnismäßig wenige Intron-haltige Gene enthält. 70% aller *U. maydis* Gene sind Intron-frei und die durchschnittliche Anzahl an Introns pro Gen beträgt lediglich 0,46 (Kämper *et al.*, 2006), im Gegensatz zu den eng verwandten Basidiomyzeten *Cryptococcus neoformans* und *Coprinus cinereus*, deren Gene im Mittel 5,3 bzw. 4,5 Introns aufweisen (Loftus *et al.*, 2005). Es kann somit spekuliert werden, dass sich die Deletion eines Spleißing-Faktors in *U. maydis* nicht zwangsläufig letal auf die Zellen auswirkt, sondern die Zellen auch mit einem Spleiß-Defekt in der Lage sind, zu überleben. Gleiches gilt für *S. cerevisiae* – nur 5% der Gene enthalten meist ein einzelnes Intron, darunter sind oftmals Gene, die stark exprimiert sind und präzise reguliert werden müssen (Davis *et al.*, 2000; Spingola *et al.*, 1999). In Hefe können einige Spleißing-Faktoren vom Genom deletiert werden ohne einen bedeutenden Einfluss auf die Vitalität der Zellen zu haben (Clark *et al.*, 2002). Die Hypothese kann jedoch nicht pauschal auf andere Systeme übertragen werden, da die Deletion eines Num1-Homologs in *A. nidulans* erfolgreich verlief, einem Organismus mit deutlich mehr Introns im Genom (Arnaud *et al.*, 2010). Es muss also eine weitere Erklärung dafür geben, dass das Num1-Protein in *U. maydis* (und *A. nidulans*) nicht essentiell ist.

Eine andere Möglichkeit ist, dass der NTC in *U. maydis* eine abweichende Komposition aufweist und das Protein wie in *S. cerevisiae*, wo ein direktes Num1-Homolog durch das nicht-essentielle Snt309p kompensiert wird, funktionell durch eine andere Komponente ersetzt wurde. Obwohl das *U. maydis* Genom keine Sequenz mit signifikanten Ähnlichkeiten zum Snt309p-Protein aufweist, kann diese Theorie nicht ausgeschlossen werden. Aus evolutionärer Sicht könnte eine derartige Hypothese bedeuten, dass das Num1-Protein im Laufe der Evolution weitere Funktionen übernehmen konnte, die möglicherweise spezifisch für *U. maydis* und enge Verwandte sind und nicht generell auf die höheren Eukaryoten übertragen werden können (siehe auch 3.3 und Kapitel 6.3 im Anhang). In Pflanzen wurden offenbar im Laufe der Evolution einige Gene für NTC-Komponenten dupliziert; *A. thaliana* weist beispielsweise zwei zu Prp19 homologe Proteine mit redundanter Funktion auf, die jedoch möglicherweise zusätzliche Funktionen, wie Resistenzmechanismen, adaptieren konnten, was die genannte These unterstützt (Koncz *et al.*, 2012; Monaghan *et al.*, 2009).

Um ein detailliertes Bild bezüglich der Zusammensetzung des NTC in *U. maydis* zu erlangen, soll der Komplex zukünftig anhand von Pulldown-Experimenten mit Prp19:HA- und Cef1:HA- bzw. TAP-Tag-Varianten und anschließender massenspektrometrischer Analyse der co-präzipitierten Proteine untersucht werden. Die Tandem-Affinitäts-Aufreinigung von NTC-Komponenten wurde bereits erfolgreich angewandt, um die Zusammensetzung des Komplexes in *S. pombe* und *S. cerevisiae* aufzuklären (Ohi *et al.*, 2002). Erwartet wird dabei ein größerer Proteinkomplex mit einer vielschichtigen Zusammensetzung. In *S. cerevisiae* ist mit Prp19p ein Komplex aus 10 weiteren Proteinen isoliert worden (Tarn *et al.*, 1994) und der mit Cef1p co-präzipitierte Komplex umfasste bis

zu 27 Interaktionspartner (Ohi *et al.*, 2002). Eine Immunoaffinitäts-Aufreinigung des humanen CDC5L-Komplexes aus HeLa-Zellen und die anschließende massenspektrometrische Analyse deutet darauf hin, dass eine Vielzahl weiterer, bislang nicht identifizierter Proteine mit dem NTC-assoziiert sind, die neben mRNA-Prozessierung in unterschiedlichen zellulären Prozessen involviert sein können (Lleres *et al.*, 2010). Durch vergleichbare Experimente können die Zusammensetzung der NTC-Komponenten in *U. maydis* untersucht und Ähnlichkeiten aber auch spezifische Unterschiede des NTC in *U. maydis* im Vergleich zu anderen Pilzen bzw. höheren Eukaryoten aufgedeckt werden.

3.1.1 Num1 ist ein globaler Spleißing-Faktor

Aufgrund der Tatsache, dass das Num1-Protein kein essentielles Protein ist, bestand die Möglichkeit einer detaillierten funktionellen Charakterisierung von Deletionsmutanten in *U. maydis*, was ein deutlicher Vorteil gegenüber den bisher verwendeten Modellorganismen zur Untersuchung der NTC-assoziierten Funktionen ist. Ob auf das Num1-Protein in ähnlicher Weise wie für andere bekannte NTC-Komponenten eine Funktion bei der Genregulation durch differentielles Spleißen zutrifft, wurde anhand eines Genom-weiten mRNA-Seq Experiments untersucht. RNA-Seq ist eine „Next Generation Sequencing“-basierte Technik zur quantitativen Transkriptomanalyse im Hochdurchsatz-Verfahren (Wilhelm *et al.*, 2010; Wilhelm *et al.*, 2008). Mit dieser Methode können neben der Genexpression, auch unterschiedliche Exon/Intron-Strukturen dargestellt werden, wodurch die Auflösung differentieller Spleiß-Ereignisse auf Level einzelner Nukleotide möglich wird. Die RNA-Seq Methode ist daher Hybridisierungs-basierten Ansätzen, wie Intron-spezifischen Microarrays, vorzuziehen (Griffith *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2009).

Um Unterschiede bezüglich der Spleißing-Effizienz von Transkripten in Abhängigkeit von Num1 aufzudecken wurden die Expressionsprofile eines AB31 Δ num1- und eines AB31 Wildtyp-Stammes während der filamentösen Wachstumsphase miteinander verglichen. Es konnte gezeigt werden, dass es sich bei Num1 um einen generellen Spleißing-Faktor handelt, der die Spleißing-Effizienz von fast 80% aller Introns signifikant beeinflusst, d.h. die Intron-Retentionsrate war in 1.805 von 2.295 vorhandenen Introns mindestens zwei-fach erhöht (Abb. 52 und Liste III im Anhang). Durch die qRT-PCR Experimente (Abb. 47) konnten die Ergebnisse der RNA-Seq Analyse stichpunktartig verifiziert werden. Es fiel jedoch auf, dass bezüglich der Spleiß-Effizienz in der Δ num1-Mutante mitunter deutliche Unterschiede auftraten. Während das Spleißen einiger Introns in AB31 Δ num1 unverändert war, tendierte die Spleißing-Effizienz anderer Introns gegen null. Daneben gab es einige Gene mit divergenten Intron-Retentionsraten (Abb. 54 und Liste IV im Anhang), was darauf hindeutet, dass es Unterschiede innerhalb der Intron-Sequenzen geben muss, die in Abhängigkeit des Num1-Proteins ungleichartig gut erkannt werden und zu differentiellen Spleißing-Ergebnissen führen. Daraufhin wurden Sequenz- und Strukturmerkmale der 50 Intron-Sequenzen mit den höchsten Retentionsraten untersucht, welche eine unterschiedliche Suszeptibilität für das schlechtere Spleißen erklären könnten. Innerhalb dieser Sequenzen konnten jedoch keine signifikanten Übereinstimmungen oder

Auffälligkeiten bezüglich der Länge, GC-Gehalt (zwischen 36% und 58%, durchschnittlich 48% \pm 4,7%), besonderen Sequenz-Mustern (MEME, <http://meme.sdsc.edu/meme/cgi-bin/meme.cgi>) bzw. Sekundärstrukturen (Mfold, <http://mfold.rna.albany.edu/>) ausfindig gemacht werden. Es gibt zudem Hinweise, dass die Strukturmerkmale, die eine differentielle Erkennung von Spleiß-Stellen vermitteln nicht in cis-, d.h. in den Intron-Sequenzen selbst kodiert sind, sondern in trans-, also in den Exon-Bereichen kodiert sind. In vielen Organismen steht der GC-Gehalt in unmittelbarer Nähe von Exon/Intron-Sequenzen mit der Nutzung dieser Stellen in Zusammenhang. Alternative Spleiß-Stellen tendieren zu erhöhtem GC-Gehalt, was eine stabile Sekundärstruktur zur Folge hat und die prä-mRNA für das Spleißen empfänglich macht (Zhang *et al.*, 2011a). RNA-Strukturen spielen eine wichtige Rolle für die Spleiß-Reaktion, da sie die Bindung von Spleißosom-Komponenten an die mRNA fördern oder inhibieren können, bzw. die Spleiß-Stellen in räumliche Nähe zueinander bringen können (Buratti und Baralle, 2004; Warf und Berglund, 2010). Eine weitere Ebene, die zu differentiellem Spleißen beitragen kann, ist die Chromatin-Struktur der DNA, da auch die Positionierung von Nukleosomen und Histon-Modifikationen einen Einfluss auf die Spleißing-Effizienz haben können (Schwartz und Ast, 2010). Derartige trans-Elemente, die in der *Anum1*-Mutante zu einer differentiiellen Erkennung von Exon/Intron-Strukturen führen könnten, wurden im Rahmen der Arbeit nicht untersucht.

Aus der Literatur ist bekannt, dass das Spleißosom prinzipiell zwischen verschiedenartigen Transkripten unterscheiden kann (Pleiss *et al.*, 2007a). Mit Hilfe einer Spleißing-spezifischen Microarray-Technologie, die eine simultane Analyse aller \sim 250 Intron-haltigen Gene in *S. cerevisiae* ermöglicht (Clark *et al.*, 2002), wurde die Genom-weite Spleißing-Response nach der Inaktivierung von 18 verschiedenen Spleißosom-Kernkomponenten, darunter auch Bestandteile des NTC, wie Prp19, untersucht. Die Spleißing-Defekte bestimmter mRNA-Substrate der unterschiedlichen Mutanten wiesen beachtliche Unterschiede auf, was darauf hindeutet, dass einzelne NTC-Komponenten in der Lage sind, das Spleißen unterschiedlicher Gene zu beeinflussen. Das kann zum einen strukturelle Gründe haben: Beispielsweise führen nicht funktionelle Mutanten von Cef1p oder der NTC-assoziierten Spleißing-Faktoren Isy1p, Prp16p oder Prp45p in *S. cerevisiae* aufgrund aberranter Konformationszustände des Spleißosoms zu einer veränderten Nutzung von 5'- und 3'-Spleißstellen und damit zu differentiiellen Spleiß-Mustern (Gahura *et al.*, 2009; Query und Konarska, 2012; Villa und Guthrie, 2005). Ähnliche Mechanismen sind auch für NTC-assoziierte Komponenten aus höheren Organismen bekannt, wie für das crooked neck-Protein aus *D. melanogaster* (Edenfeld *et al.*, 2006) oder den humanen Spleißing-Faktor Blom7 α (Grillari *et al.*, 2009). Ebenso bewirken CDC5L und PLR1 gemeinsam mit einem mRNA-Bindeprotein die differenzielle Auswahl von 5'- und 3'-Spleiß-Stellen bestimmter Transkripte durch Überspringen von Exons („exonskipping“) oder gezieltes Einbeziehen von Introns (Lleres *et al.*, 2010). Durch eine veränderte Integrität des Komplexes kann die Interaktion mit weiteren Spleißing-Faktoren und RNA-Bindeproteinen, wie dem 3'-Spleißstellen Bindeprotein U2AF oder dem Verzweigungspunkt („branchpoint“)-Bindeprotein,

verhindert werden, was zu (Transkript-spezifischer) verringerter Effizienz der Spleißing-Reaktion und somit zu alternativem bzw. differentiellen Spleißen führen kann. Alternativ können über NTC-Komponenten möglicherweise auch Signale integriert werden, die über das differentielle Spleißen zu einer Regulation der Genexpression führen können. So ergab eine weiterführende Analyse der Spleißing-Response in *S. cerevisiae*, dass das Spleißen in Abhängigkeit von Umwelteinflüssen unterschiedlich reguliert werden kann. So wird als Folge von Aminosäure-Mangel spezifisch das Spleißen von ribosomalen Genen inhibiert, wohingegen nach der Exposition von toxischen Ethanol-Mengen das Spleißen diverser Transkripte differentiell reguliert werden kann, wodurch eine schnelle und spezifische Genregulation zur Anpassung an verschiedene Umweltbedingungen möglich wird (Pleiss *et al.*, 2007b).

Eine weitere Auffälligkeit, die sich aus den RNA-Seq Daten ergab war, dass die Expression einiger Gene, die in AB31 Δ *num1* schlechter gespleißt waren, mitunter deutlich induziert war (Abb. 65, Anhang). Dabei fiel auf, dass die Expression oftmals um den Wert induziert war, wie die Menge an funktionellem Transkript durch das aberrante Spleißen reduziert war. Es handelt sich dabei also vermutlich eher um eine (autoregulatorische) kompensatorische Regulation der Genexpression um die fehlenden Transkripte auszugleichen, als um einen durch die *num1*-Deletion ausgelösten spezifischen Effekt. Insgesamt konnte eine Anzahl von 209 Genen identifiziert werden, deren Expression in AB31 Δ *num1* im Vergleich zum AB31-Wildtyp signifikant induziert war (Liste I). Ein Beispiel ist das *fox1*-Gen, dessen Expression offenbar einem Pflanzensignal unterliegt, da das Gen in Wildtyp-Stämmen ausschließlich während der biotrophen Entwicklungsphase innerhalb der Pflanze exprimiert wird (Zahiri *et al.*, 2010). Die *fox1*-Expression war in AB31 Δ *num1* um den Faktor 67,3 induziert. Vermutlich wird ein Inhibitor, der das *fox1*-Gen unter normalen Wachstumsbedingungen reguliert aufgrund der *num1*-Deletion fehlerhaft oder weniger effizient gespleißt, was zur Induktion des Gens auch außerhalb der Pflanze ohne das Pflanzensignal führen könnte. Unter den induzierten Genen befand sich auch ein metabolisches Cluster bestehend aus insgesamt 10 Genen, die in AB31 Δ *num1* verstärkt exprimiert wurden (Abb. 66, Anhang). Auch hierbei handelt es sich jedoch nicht notwendigerweise um einen *num1*-spezifischen Effekt, sondern um indirekte Auswirkungen, die z.B. durch das aberrante Spleißen eines Regulators des Clusters hervorgerufen werden.

Zusammenfassend deuten diese Daten darauf hin, dass das Num1-Protein als Kern-Komponente des Spleißosom-assoziierten NTC zur globalen Spleißing-Effizienz beiträgt. Dabei könnte das Protein als Gerüstprotein des NTC fungieren, das die Interaktionen mit den anderen NTC-Komponenten und/oder weiteren Spleißing-Faktoren stabilisiert. Die verringerte Spleißing-Effizienz in der Δ *num1*-Mutante könnte infolgedessen durch eine veränderte Zusammensetzung oder eine instabile Konformation des Komplexes und die damit einhergehende verminderte Bindung an mRNA, schlechteres Erkennen der Exon/Intron-Übergänge und/oder aberrante Positionierung von essentiellen snRNPs zustande kommen. Eine Affinitäts-Aufreinigung von NTC-Komponenten analog zu den oben beschriebenen Experimenten könnte darüber Auskunft erteilen. In *U. maydis* können Wildtyp- und *num1*-

Deletionsstämme miteinander verglichen werden, um die Auswirkung von Num1 auf das Interaktions-Netzwerk der verschiedenen NTC-Komponenten und akzessorischen Proteine zu analysieren. Ein direktes Erkennen der Spleiß-Stellen durch das Num1-Protein und eine daraus resultierende Funktion bei der Genregulation durch differentielles Spleißen kann ebenfalls in Frage kommen. Nicht zuletzt könnte das Num1-Protein spezifische Proteine rekrutieren, die den Spleiß-Vorgang verstärken („enhancer“) oder inhibieren können.

3.1.2 Spleißing-Defekte als Ursache für die pleiotropen Phänotypen in $\Delta num1$ -Stämmen

Durch morphologische Untersuchungen von *num1*-Deletionsstämmen konnte gezeigt werden, dass die Deletion von *num1* zu pleiotropen Phänotypen führt, die spezifisch für die filamentöse Wachstumsphase zu sein scheinen. Während die Deletion keine Auswirkungen auf das Wachstum von Sporidien in axenischer Kultur hat (Abb. 12A), ist die Morphologie und Polarität der Zellen nach der Induktion des filamentösen Wachstums stark gestört (Abb. 15).

Zum einen kann diese Beobachtung darin begründet sein, dass das Filament eine deutlich komplexere Entwicklung durchläuft als die Sporidie und die reduzierte Spleißing-Effizienz in der $\Delta num1$ -Mutante sich möglicherweise nicht auf das vegetative Wachstum des Pilzes auswirkt. Eine alternative Erklärung wäre, dass das Num1-Protein spezifisch ein Signal aus der filamentösen Entwicklungsphase weiterleitet, sodass erst in dieser Phase des Lebenszyklus die Effekte evident werden. Aufgrund der Tatsache, dass in AB31 $\Delta num1$ verglichen mit dem Wildtyp Unterschiede bezüglich der Intron-Retention aufgedeckt wurden, ist untersucht worden ob die beobachteten Phänotypen aus einem indirekten Effekt durch fehlerhaftes oder ineffizientes Spleißen spezifischer Transkripte resultieren. Das differentielle Spleißen individueller Gene für das polare, filamentöse Hyphenwachstum könnte erklären, weshalb die *num1*-Deletion in axenischer Kultur von Sporidien keine Auswirkungen auf die Wachstumsrate hat sondern der durch die Mutation hervorgerufene Phänotyp fast ausschließlich während der filamentösen Wachstumsphase ausgeprägt wird. Eine Anreicherung funktioneller Kategorien wie „Transport“, „Polarität“ o.ä. konnte jedoch auch unter denjenigen Genen nicht ermittelt werden, die besonders hohe Intron-Retentionsraten aufwiesen, sodass man die morphologischen Phänotypen der $\Delta num1$ -Mutante nicht pauschal mit dem differentiellen Spleißen von Genen begründen kann, die für das filamentöse Hyphenwachstum benötigt werden. Somit kann ausgeschlossen werden, dass das Num1-Protein als Regulator fungiert, der über das differentielle Spleißen Intron-haltiger Gene das Entwicklungsprogramm für das filamentöse Hyphenwachstum kontrolliert.

Obwohl es keine Anreicherung funktioneller Kategorien von Genen gibt, die in AB31 $\Delta num1$ -Stämmen besonders stark vom Spleißen betroffen sind können viele der beobachteten Phänotypen - das polare, filamentöse Hyphenwachstum, die aberrante Septierung oder auch die Zellzyklus-Regulation – dennoch indirekt durch die reduzierte Spleißing-Effizienz einzelner Transkripte erklärt werden. Der Eintritt in die filamentöse Wachstumsphase, die mit einer präzisen Regulation des

Zellzyklus einhergeht, wird von einer Kaskade an Transkriptionsfaktoren gesteuert, an dessen Spitze das bE/bW-Heterodimer steht (siehe 1.3.4). Einige dieser Gene wiesen in AB31 $\Delta num1$ erhöhte Intron-Retentionsraten oder ein verändertes Expressionsmuster auf (Listen II und III). Das *bE1*-Allel zeigt beispielsweise eine deutlich reduzierte Spleißing-Effizienz, wobei mit AB31 für die Analyse ein Stamm verwendet wurde, in dem durch die starke Induktion der *b*-Gene das filamentöse Wachstum induziert werden kann. In diesem Fall ist es unwahrscheinlich, dass eine verminderte Spleißing-Aktivität zu den Phänotypen des AB31 $\Delta num1$ -Stammes führt. Das *hdp1*-Gen hingegen weist zwei Introns auf, die in der $\Delta num1$ -Mutante deutlich schlechter gespleißt werden, was zu einer nur 0,12-fachen Spleiß-Effizienz im Vergleich zum Wildtyp führt. Hdp1 wird für das filamentöse Wachstum und die Zellzykluskontrolle benötigt, da die Deletion des *hdp1*-Gens nach der Fusion zweier kompatibler Kreuzungstyp-Partner zu verkürzten Hyphen sowie Filamenten mit mehr als zwei Zellkernen führt. Der deregulierte Zellzyklus in $\Delta hdp1$ -Stämmen ist eine direkte Folge der Aktivität auf die Expression der Gene, die für die mitotischen Cycline Pcl12 und Clb1 kodieren (Pothiratana, 2007). Das prominenteste Beispiel eines Transkriptionsfaktors mit reduzierter Spleißing-Aktivität in AB31 $\Delta num1$ ist Rbf1, der zentrale Master-Regulator für das sexuelle Entwicklungsprogramm, der notwendig und hinreichend für die Bildung filamentöser Hyphen sowie der Zellzyklus-Regulation ist (Heimel *et al.*, 2010b). Sämtliche Introns im *rbf1*-Gen werden in AB31 $\Delta num1$ schlechter gespleißt und unter der Annahme, dass alle vier Introns gleichmäßig vom Spleißen betroffen sind resultiert daraus im Vergleich zum Wildtyp eine Gesamtreduktion der Spleißing-Effizienz um den Faktor 0,39. Es ist zu erwarten, dass mit der verringerten Menge an funktionellem Transkript auch eine Abnahme der Proteinmenge einher geht, was bislang jedoch nicht überprüft wurde. Dazu könnte ein Rbf1:HA-Fusionsprotein in AB31- sowie AB31 $\Delta num1$ -Stämmen exprimiert und die Proteinmenge in einer Western-Analyse quantifiziert werden. Es konnte hingegen gezeigt werden, dass sich die reduzierte Spleißing-Effizienz des *rbf1*-Gens auf die Funktion des Proteins auswirkt. Insgesamt wurden 250 Gene in AB31 $\Delta num1$ reprimiert und interessanterweise überlappten 97 dieser Gene mit dem Set aus 351 Genen, die bereits AB31 $\Delta rbf1$ -Stämmen als herunterreguliert beschrieben wurden (Heimel *et al.*, 2010b) (Abb. 55C). Unter anderem waren darunter auch Gene, die als Regulatoren des Zellzyklus oder als Faktoren für das filamentöse, pathogene Entwicklungsprogramm beschrieben wurden und somit einige der in der $\Delta num1$ -Mutante beobachteten Phänotypen erklären könnten. Biz1 ist ein Beispiel für einen *rbf1*-abhängig induzierten Pathogenitätsfaktor, dessen Expression in AB31 $\Delta num1$ reduziert ist (–3,38-fach). Das Protein ist essentiell für die Bildung von Appressorien. Zusätzlich induziert es als Folge einer Clb1-Repression einen Zellzyklus-Arrest (Flor-Parra *et al.*, 2006), der Voraussetzung für das kontrollierte Wachstum während des Infektionsprozesses ist. Ebenso wird in AB31 $\Delta num1$ die Expression des Gens für den Homeobox-Transkriptionsfaktor Hdp2 wie in $\Delta rbf1$ -Stämmen reprimiert (–3,08-fach). *hdp2*-Deletionsstämme sind aufgrund der ausbleibenden Bildung von Appressorien apathogen (Scherer, unveröffentlicht), jedoch ist die *hdp2*-Überexpression hinreichend, um das filamentöse Wachstum und einen Zellzyklusarrest zu induzieren. Da die resultierenden Hyphen eine

bi- bzw. multipolare Morphologie aufwiesen, wird dem Hdp2-Transkriptionsfaktor ein Einfluss auf die Festlegung des Zellpols und auf das polare Wachstum der Hyphen zugeschrieben (Goos, 2007).

Aufgrund der großen Überschneidung jener Gene, die sowohl in AB31 Δ *num1*- als auch in AB31 Δ *rbf1*-Stämmen reprimiert sind kann man davon ausgehen, dass die reduzierte Spleißing-Effizienz des Rbf1 Master-Regulators in der *num1*-Mutante und die damit einhergehende Deregulation *rbf1*-abhängig exprimierter Gene, die als Regulatoren des polaren, filamentösen Hyphenwachstums bzw. des Zellzyklus fungieren, zu den beobachteten Phänotypen beiträgt. Um diese Annahme zu validieren kann der AB31 Δ *num1*-Stamm mit einer Intron-freien *rbf1*-Kopie komplementiert werden und zum einen morphologisch in Bezug auf Filamentierung, polares Wachstum und Zellzyklus-Kontrolle analysiert werden; zum anderen kann die Expression von *rbf1*-Zielgenen getestet werden. Vorläufige Daten deuten darauf hin, dass durch die Expression einer *rbf1*-cDNA unter Kontrolle des nativen P_{rbf1}-Promotors in AB31 Δ *num1* der Phänotyp teilweise komplementiert werden kann, da der Anteil an verkürzten und bipolaren Hyphen geringer war (Theresa Obhof, pers. Mitteilung), was die Hypothese unterstützt und zukünftig im Detail untersucht werden soll.

Eine verminderte Spleißing-Effizienz Intron-haltiger Gene kann hinreichend sein, um weitere zelluläre Prozesse zu beeinflussen, die durch die *num1*-Deletion hervorgerufenen Phänotypen begründen könnten. *num1*-Deletionsstämme weisen neben der gestörten Polarität häufig delokalisierte Septen auf (Abb. 15). Die Bildung von Septen erfordert eine hoch koordinierte und dynamische Positionierung von Septinen in Ring-ähnliche Strukturen (Böhmer *et al.*, 2008). Für diesen Prozess sind konzertierte Aktionen der kleinen GTPase Cdc42, dessen Guanin-Nukleotid Austauschfaktor Don1 sowie der Ste20-ähnlichen Proteinkinase Don3 erforderlich (Böhmer *et al.*, 2009; Mahler *et al.*, 2006; Weinzierl *et al.*, 2002). Zu diesem Signal-Modul für die Regulation der Septierung zählt außerdem ein Formin, Drf1, das ebenfalls als Effektor von Cdc42 gilt und gemeinsam mit Don3 essentiell für die Bildung des kontraktilen Actomyosin-Rings (CAR) ist (Freitag *et al.*, 2011), eine Struktur die auch in anderen filamentösen Pilzen wie *N. crassa* für die Septierung unabdingbar ist (Riquelme *et al.*, 2011). Für die Bildung des CAR sind über 100 Proteine erforderlich, darunter eine Vielzahl an Septinen, sowie das Typ II Myosin Cdc4, eine essentielle leichte Kette des Myosin-Motorproteins. Die Gene für die Septine Cdc3 (*um10503*) und Sep3 (*um03449*) sowie für Cdc4 (*um11848*) weisen in AB31 Δ *num1* erhöhte Intron-Retentionsraten von 9,19 und 3,94, 3,36 bzw. 6,33 auf. Während der Großteil der genannten Faktoren keine veränderte Genexpression aufweist, ist die Expression des *don3*-Gens in AB31 Δ *num1* im Vergleich zu AB31 um -2,35-fach reduziert, was neben dem Spleißing-Defekt der Septine möglicherweise ursächlich für die delokalisierte Bildung der Septen in den Deletionsstämmen sein kann. In ähnlicher Weise könnte das verstärkte Vorhandensein von verzweigten Hyphen in AB31 Δ *num1* durch Spleißing-Defekte beispielsweise von Komponenten des Spitzenkörpers bzw. Polarisoms oder auch Zellwand-modulierenden Enzymen, die an lateralen Verzweigungsprozessen beteiligt sind, zustande kommen.

Aberrantes oder unvollständiges Spleißen der den Transport vermittelnden Motorproteine wäre ebenfalls eine einfache Erklärung für die eingeschränkten endosomalen Transportvorgänge in der *Δnum1*-Mutante. Für die Morphologie der filamentösen Pilzhyphen und die Etablierung der korrekten Polaritätsachse sind die Motorproteine Kin1, Kin3 und Myo5 sowie Dyn1/2 verantwortlich (Schuchardt *et al.*, 2005; Straube *et al.*, 2001). Letzteres stellt die schwere Kette des Dynein-Motors dar, die von zwei verschiedenen essentiellen Genen (*dyn1* (*um15045*), das für die für die ATPase Region kodiert und *dyn2* (*um04372*), das für die Mikrotubuli-Binderegion kodiert) auf zwei unterschiedlichen Chromosomen kodiert wird (Straube *et al.*, 2001). Keines der erwähnten Gene enthält in seiner kodierenden Sequenz jedoch ein Intron, sodass hier keine Effekte durch fehlerhaftes Spleißen auftreten können. Anhand der Expressionsdaten aus der mRNA-Seq Analyse geht hervor, dass auch die Expression der Gene in der *Δnum1*-Mutante nicht signifikant dereguliert ist. Lediglich das Gen für eine regulatorische leichte Kette des Myosin-Motors sowie die Gene, die für zwei leichte Ketten des Dynein-Motorproteins kodieren, weisen Introns auf, deren Retentionsraten in AB31 Δ *num1* verglichen mit dem Wildtyp erhöht sind (Tabelle 7, für weitere Beispiele aus der funktionellen Kategorie „Zytoskelett“ siehe Liste VII im Anhang). Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass die reduzierte apikale Lokalisierung von Dyn2 in AB33 Δ *num1* (Abb. 19) und damit einhergehend die beobachteten Effekte bezüglich der Endosomen-Motilität auch indirekte Folgen dieses Spleißing-Defekts sind. Die leichten Ketten sind primär nicht-essentielle akzessorische Proteine des Motors, denen meist regulatorische Funktionen zukommen (Harrison und King, 2000; King, 2000). Das fehlerhafte Spleißen hat demnach vermutlich nur eine untergeordnete Auswirkung auf die Funktion des Dynein-Motorproteins und dessen zelluläre Transportprozesse.

3.1.3 Num1 beeinflusst die Zellzyklus-Regulation und DNA-Reparatur

Neben der Hyphenmorphologie sind in AB31 Δ *num1*-Deletionsstämmen häufig mehrere Zellkerne beobachtet worden (Abb. 22), was darauf hindeutet, dass das Num1-Protein einen Einfluss auf die Zellteilung und die Regulation des Zellzyklus hat. Auch dieser Phänotyp kann zumindest teilweise durch einen Spleißing-Defekt von regulatorischen Schlüsselproteinen dieser Prozesse erklärt werden. Ausgehend von der funktionellen Kategorie „Zellzyklus“ sind mehrere Gene identifiziert worden, wie verschiedene Cycline und Cyclin-abhängige Kinasen, die an der Zellzyklus-Regulation beteiligt sind und deren Spleißing-Effizienz durch die *Δnum1*-Mutation beeinträchtigt war. Einige Beispiele aus dieser Kategorie sind in Tabelle 7 dargestellt. Die vollständige Auflistung befindet sich im Anhang (Liste V). Zusammengenommen kann das fehlerhafte Spleißen dieser und weiterer Zellzyklus-Regulatoren ausschlaggebend für den beobachteten Phänotyp in AB31 Δ *num1* sein. Dass ein fehlerhafter Spleißing-Prozess, hervorgerufen durch Mutationen in NTC-Komponenten, indirekte Auswirkungen auf die Zellzyklus-Regulation haben kann, ist bereits häufig beschrieben worden. Das beste Beispiel ist das *cdc5/cefl*-Gen, das sowohl in genetischen Screens für Spleißing-Faktoren (*prp*), als auch unabhängig davon in Screens für Zellzyklus-Regulatoren (*cdc*) isoliert wurde. Der G2/M-

Zellzyklusarrest und das defekte Mikrotubuli-Zytoskelett eines temperatursensitiven *CEF1*-Allels in *S. cerevisiae*, *cef1-13* konnten beispielsweise durch das Entfernen des Introns im α -Tubulin Gen *TUB1* supprimiert werden (Burns *et al.*, 2002). Ebenso sind durch mangelhaftes Spleißen verursachte geringe Mengen an α -Tubulin in $\Delta isy1$ - und $\Delta syf2$ -Mutanten hinreichend, um den Mitose-Spindel „checkpoint“ zu aktivieren, was in einem Zellzyklus-Arrest resultiert (Dahan und Kupiec, 2002). Weitere Beispiele für eine Verbindung zwischen Spleißen und Zellzyklus-Regulation sind in (Burns und Gould, 1999), (Ben-Yehuda *et al.*, 2000) und (Russell *et al.*, 2000) beschrieben.

Tabelle 7: Gene für Schlüsselproteine aus Zellzyklusregulations- und DNA-Reparatur-Wegen werden in *AB31 $\Delta num1$* weniger effizient gespleißt

Gen	Beschreibung/ähnlich zu *	Intron-Retentionsrate $\Delta num1$ vs. wt	Referenz
<i>um10705</i>	Cdk1, katalytische Untereinheit der Cyclin-abhängigen Kinase 1	4,27; 3,76	(Garcia-Muse <i>et al.</i> , 2004)
<i>um03210</i>	Cks1, regulatorische Untereinheit der Cyclin-abhängigen Kinasen	5,63; 3,79; 1,54	nicht publiziert
<i>um03758</i>	Clb1, b-Typ Cyclin	7	(Garcia-Muse <i>et al.</i> , 2004)
<i>um10279</i>	Clb2, b-Typ Cyclin	1,83	(Garcia-Muse <i>et al.</i> , 2004)
<i>um10529</i>	Pcl12	11,16	(Flor-Parra <i>et al.</i> , 2007)
<i>um03803</i>	Tub2, γ -Tubulin	20,26; 4,92	(Straube <i>et al.</i> , 2003)
<i>um03290</i>	Rad51, Rekombinase für DNA-Reparatur	5,05	(Holloman <i>et al.</i> , 2008)
<i>um10396.1</i>	Rad1, Komponente aus der Nukleotid-Excisions Maschinerie	7,58; 5,60; 5,15	(Holloman <i>et al.</i> , 2008)
<i>um10097</i>	Mms2, Komponente des post-replikativen DNA-Reparaturwegs	6,81; 4,50; 2,24	(Holloman <i>et al.</i> , 2008)
<i>um11016</i>	Rec1, Reparatur-Exonuklease	2,47	(Holloman <i>et al.</i> , 2008)
<i>um11848</i>	Regulatorische leichte Kette des Myosin-Motorproteins	6,33	(Banuett <i>et al.</i> , 2008)
<i>um12278</i>	Dynein leichte Kette 1	2,1	(Banuett <i>et al.</i> , 2008)
<i>um03100</i>	Dynein leichte Kette 2B	9,33; 5,90	(Banuett <i>et al.</i> , 2008)

* - gemäß MUMDB (<http://mips.helmholtz-muenchen.de/genre/proj/ustilago>)

Dargestellt sind ausgewählte Gene aus den funktionellen Kategorien „Zellzyklus“ (grün), „DNA-Reparatur“ (rot) und „Zytoskelett“ (blau).

Neben dem deregulierten Zellzyklus waren *AB31 $\Delta num1$* -Mutanten auch sensitiver gegenüber DNA-Schäden als der entsprechende Wildtypstamm (Abb. 46). Auch dieser Phänotyp kann durch einen Spleißing-Defekt von DNA-Reparaturenzymen erklärt werden, da diverse Gene, die für Schlüsselproteine aus verschiedenen DNA-Reparatur-Wegen kodieren in *AB31 $\Delta num1$* im Vergleich zu *AB31* eine erhöhte Intron-Retentionsrate aufweisen (Tabelle 7, siehe auch Liste VI im Anhang). Ähnliche Beobachtungen bezüglich der Sensitivität von *S. cerevisiae* *PRP19*-Mutanten gegenüber mutagenen Substanzen wurden zuvor ebenso durch fehlerhaftes Spleißen interpretiert (Revers *et al.*, 2002).

Es gibt jedoch in der Literatur mehrere Hinweise, dass NTC-Komponenten auch direkt und unabhängig vom Spleißen in die Prozesse Zellzyklus-Regulation und DNA-Reparatur involviert sein können. Demgemäß konnte eine physikalische Interaktion von CDC5L mit der zentralen Zellzyklus „checkpoint“ Kinase ATR („Ataxia-Telangiectasia und Rad3-ähnlich“) gezeigt werden (Zhang *et al.*, 2009) und die RNAi-vermittelte Depletion von CDC5L resultierte in einem defekten S-Phase

„checkpoint“ und deregulierten ATR-abhängigen „checkpoint“ Kinasen (Zhang *et al.*, 2009). Weiterhin wurde gezeigt, dass Prp19 eine direkte Rolle bei der Reparatur von DNA-Schäden übernimmt, die unabhängig vom Spleißen ist (de Andrade *et al.*, 1989; Henriques *et al.*, 1989; Revers *et al.*, 2002). Für Prp19 konnten zudem diverse Interaktionspartner isoliert werden, die nicht in den Spleißosom-assoziierten Komplex kategorisiert werden konnten, sondern in andere funktionelle Klassen wie Zellzyklus, Chromatin-Struktur oder DNA-Reparatur eingeordnet wurden (Revers *et al.*, 2002). Die DNA-Reparatur Funktion scheint evolutionär stark konserviert zu sein da auch in Säugern die *prp19*-Expression als Folge von DNA-Schäden induziert wird, wohingegen nach RNAi-vermittelter Depletion eine Akkumulation von DNA-Doppelstrang-Brüchen (DSB) und eine geringere Überlebensrate nach Bestrahlung zu verzeichnen war (Mahajan und Mitchell, 2003). hPrp19 interagiert mit der Terminalen deoxynukleotidyl-Transferase (TdT), ein Enzym, das für die Reparatur von DSB benötigt wird (Mahajan und Mitchell, 2003), bzw. erkennt es auch selbst DNA-Schäden und rekrutiert das DNA-Reparaturprotein Metnase an Stellen mit DSB (Beck *et al.*, 2008).

Aufgrund seiner direkten Rolle bei der zellulären Antwort auf DNA-Schäden wurde eine weitere Funktion des Prp19-Proteins diskutiert, die über seine Funktion während des Spleißens hinaus geht. Wie das humane Homolog, das in diesem Zusammenhang auch als hNMP200 bekannt ist, könnte eine Funktion als Zellkern-Matrix Protein in Frage kommen, wo es strukturelle Unterstützung für die RNA-Prozessierungs-Maschinerie und/oder für Komplexe, die eine Rolle bei der DNA-Replikation, Transkription oder DNA-Reparatur spielen, verschaffen könnte (Gotzmann *et al.*, 2000; Revers *et al.*, 2002). Eine ähnliche duale Funktion ist auch für das Num1-Protein denkbar. Zum einen wird es vermutlich für die korrekte Konformation und Positionierung des Spleißosoms benötigt und spielt damit eine regulatorische Rolle für die Spleißing-Aktivität. Zum anderen könnte es wie Prp19 als Komponente der Zellkern-Matrix eine strukturelle Rolle bei der Assemblierung weiterer Komplexe übernehmen, die zur Zellzyklus-Regulation und DNA-Reparatur beitragen. Wie das Num1-Protein als derartige strukturelle Komponente die Zellzyklus-Regulation beeinflusst, ob es z.B. einen Einfluss auf die Aktivierung der „checkpoint“ Kinasen Atr1 und Chk1 (Perez-Martin, 2009) hat, ist bislang nicht untersucht worden. Weiterhin muss die genaue Funktion von Num1 in *U. maydis* bei der Antwort auf DNA-Schäden noch charakterisiert werden.

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass das Num1-Protein eine strukturelle Komponente des konservierten NTC ist und diverse Funktionen ausübt, die bereits zuvor mit dem NTC oder NTC-assoziierten Komponenten in Zusammenhang standen – neben dem pleiotropen Phänotyp bezüglich des polaren, filamentösen Hyphenwachstums trägt es zum *b*-abhängigen Zellzyklus-Arrest bei und beeinflusst die zelluläre Antwort auf DNA-Schäden. Die Phänotypen können zumindest teilweise durch den Spleißing-Defekt von Genen erklärt werden, die in Zellzyklus-Regulation und DNA-Reparatur involviert sind, bzw. die zentralen Komponenten der *rbf1*-Regulationskaskade während des filamentösen Wachstums und der pathogenen Entwicklung umfassen. Daneben kommen auch andere Funktionen von Num1, beispielsweise als generelles „Scaffold“ im Zellkern in Frage, was als

Plattform für die Interaktion weiterer Proteine und Komplexe direkte Auswirkungen auf die präzise Regulation des Zellzyklus sowie die DNA-Reparatur haben kann. Darüber hinaus gibt es aber vermutlich noch zusätzliche, bislang unbekannte Funktionen des Num1-Proteins, die in den folgenden Kapiteln erläutert werden.

3.2 Das Num1-Protein besitzt unterschiedliche zytoplasmatische Funktionen

Neben der nukleären Num1-Lokalisierung ist eine weitere Fraktion des Proteins im Zytoplasma von *U. maydis* Zellen detektiert worden (Abb. 9), was neben seiner Funktion als NTC-Komponente beim Spleißen zusätzliche Funktionen impliziert. Auch eine bioinformatische WoLF PSORT Analyse zur Vorhersage der subzellulären Lokalisierung des Num1-Proteins deutet darauf hin, dass das Protein nicht nur im Zellkern sondern mit geringerer Wahrscheinlichkeit auch zytoplasmatisch auftreten kann. Eine vorhergesagte putative Leucin-reiche Kern-Exportsequenz (NES) ($p = 0,0008$; ELM), die häufig in Proteinen, die aus dem Zellkern re-exportiert werden, vorkommt, unterstützt diese Hypothese. Darüber hinaus wurden in vorangegangenen Studien mehrere mit Num1 interagierende Proteine identifiziert, für die eine zytoplasmatische Lokalisierung beobachtet wurde (Um00933, Um10958, Dnm1 und Kin1) oder wahrscheinlich ist (Um03539 u.a.). Zusammengenommen deuten diese Interaktoren darauf hin, dass dem Num1-Protein eine Funktion während des Mikrotubuli-basierten Langstreckentransports von Vesikeln und anderen Organellen, die für das polare Hyphenwachstum verantwortlich sind, zugeschrieben werden kann (Kellner, 2009), Tabelle 1. Damit einhergehend wurde eine reduzierte Motilität von frühen Endosomen (Abb. 21 und Film 2) und eine aberrante Lokalisierung des Dynein Motorproteins (Abb. 19) beobachtet.

Aufgrund der zytoplasmatischen Lokalisierung des Num1-Proteins sowie der unterschiedlichen Interaktionspartner wurden in der vorliegenden Arbeit bislang unbekannte Funktionen einer NTC-Komponente im Zytoplasma untersucht, die zum Teil direkt mit Transportvorgängen assoziiert sind und nicht allein durch mangelnde Spleißing-Effizienz erklärt werden können.

3.2.1 Num1 interagiert mit Komponenten des Spindelpolkörpers

Das Um00933-Protein wurde in der Hefe-Zwei-Hybrid Analyse als potentieller Num1-Interaktionspartner identifiziert. In der vorliegenden Studie konnten überlappende Phänotypen in Bezug auf die Pathogenität, Septierung, Zellkernverteilung und Akkumulation von Yup1-markierten frühen Endosomen von *num1*- sowie *um00933*-Deletionsstämmen aufgezeigt werden, was für eine funktionelle Kopplung der beiden Proteine spricht. Eine direkte Interaktion von Num1 mit Um00933 sollte zunächst *in vivo* mittels Co-Immunoprecipitation verifiziert werden.

Das Um00933-Protein lokalisierte auf beweglichen Strukturen entlang des Mikrotubuli-Zytoskeletts (Abb. 31 und Film 6), was anhand von Inhibitionsstudien mit Benomyl sowie der Co-Lokalisierung mit einem Tub1:mCherry-Fusionsprotein belegt werden konnte. Um00933 kann somit als

Mikrotubuli-assoziiertes Protein (MAP) diskutiert werden, das möglicherweise die Organisation des Mikrotubuli-Zytoskeletts stabilisiert, was bereits für diverse andere MAPs beschrieben wurde (Drewes *et al.*, 1998; Itoh und Hotani, 2004). Aufgrund der Lokalisierung wird das Protein im Folgenden als Nma1 („Num1-interacting microtubule-associated 1“) bezeichnet. Ob das Protein tatsächlich einen Einfluss auf die Stabilität oder Abundanz von Mikrotubuli hat könnte anhand einer $\Delta nma1$ -Deletion in einem Stamm, der ein Tub1:mCherry-Fusionsprotein zur Visualisierung von Mikrotubuli exprimiert, überprüft werden. Die motilen Strukturen sprechen zusätzlich für einen direkten Transport von Nma1 in vesikulären Strukturen entlang der Mikrotubuli. Das Num1-Protein, für das bereits eine Rolle während des Vesikel-vermittelten Transports postuliert wurde, könnte über die Interaktion mit Nma1 für zytoplasmatische, Mikrotubuli-basierte Transportprozesse rekrutiert und/oder stabilisiert werden (siehe auch 3.2.4).

Neben der hoch motilen Nma1 Population wurde das Protein an distinkten weniger motilen Foci beobachtet, die sich lediglich in einem Bereich von 2-3 μm um den Zellkern herum bewegten. Dabei könnte es sich um den Spindelpolkkörper (entspricht dem humanen Centromer) handeln, der mit dem Zellkern assoziiert und mit Mikrotubuli verbunden ist (Heath, 1981). Der Spindelpolkkörper gilt als Mikrotubuli-organisierendes Zentrum (MTOC) und enthält γ -Tubulin, das eine wichtige Funktion bei der Nukleation von Mikrotubuli hat. In *S. cerevisiae* und *S. pombe* tragen die Spindelpolkkörper zu diversen essentiellen Prozessen wie Mitose, Zellteilung und Mating bei (Bullitt *et al.*, 1997; Kilmartin, 1994). In einer bioinformatischen Analyse des Nma1-Proteins konnten weder konservierte Domänen oder Motive, noch nennenswerte Ähnlichkeiten zu homologen Proteinen aus anderen Organismen identifiziert werden, anhand derer man auf die Funktion des Proteins schließen könnte. Eine WoLF PSORT Analyse zeigte Ähnlichkeiten zu Zellkern- aber auch zytoplasmatisch lokalisierten Proteinen; das Protein mit der höchsten Ähnlichkeit und nächsten Verwandtschaft zu Nma1 war ApsB aus *A. nidulans*, das bereits als Spindelpolkkörper assoziiertes Protein beschrieben wurde (Veith *et al.*, 2005; Zekert *et al.*, 2010). ApsB lokalisiert am Spindelpolkkörper, an Septen, aber auch auf schnellen (bis zu 6 $\mu\text{m}/\text{sec}$) Partikeln, die entlang der Mikrotubuli bewegt werden und erfüllt seine Funktion bei der Organisation des Mikrotubuli-Zytoskeletts sowie der Migration und Positionierung der Zellkerne innerhalb der pilzlichen Hyphe (Veith *et al.*, 2005). In *apsB*-Mutanten ist die Anzahl der Mikrotubuli aufgrund der reduzierten MTOC-Aktivität dezimiert (Veith *et al.*, 2005). Für das zu ApsB homologe Mto1 Protein aus *S. pombe* ist eine ähnliche statische Lokalisierung am Spindelpolkkörper sowie in antero- und retrograden Transportvorgängen entlang von Mikrotubuli beschrieben worden (Samejima *et al.*, 2005) und das Protein wurde in Screens zur Identifikation von Genen, die an der Organisation und Polarität des Zytoskeletts beteiligt sind, als Komponente des γ -Tubulin-Komplexes isoliert (Sawin *et al.*, 2004; Venkatram *et al.*, 2004). Ein direktes Homolog von ApsB/Mto1 konnte anhand von BLASTp-Analysen in *U. maydis* nicht identifiziert werden. Aufgrund der möglichen strukturellen Ähnlichkeiten kann jedoch eine vergleichbare Funktion bei der Generierung von Mikrotubuli für Nma1 in *U. maydis* postuliert werden. Der deregulierte Zellzyklus in $\Delta nma1$ -Mutanten deutet zudem

auf eine Rolle bei Kernteilungs-Vorgängen hin. Es ist davon auszugehen, dass es wie in *A. nidulans* zu einer verringerten Bildung der astralen Mikrotubuli während der Mitose kommt, was den Effekt auf den Zellzyklus in *num1*- und *nma1*-Deletionsmutanten erklären könnte.

Ein weiterer Num1-Interaktionspartner, der eine putative Funktion bei Kernteilungsvorgängen innehat, ist Um10958. Das Protein enthält die evolutionär hoch konservierte HEC/Ndc80-Domäne und ist vermutlich Teil es putativen Ndc80-Komplexes, der essentiell für die Chromosomen-Segregation während der Kernteilung ist (Pidoux und Allshire, 2000; Wigge und Kilmartin, 2001). Eine WoLF PSORT Analyse ergab ähnlich wie Nma1 eine hohe Ähnlichkeit zum ApsB-Protein aus *A. nidulans*. Die Deletion des Um10958-Proteins war wie die der Ndc80-Homologe in *S. pombe* und *S. cerevisiae* letal (Kellner, 2009). Der hohe Homologie-Grad lässt auf eine homologe Funktion des Um10958-Proteins in *U. maydis* schließen. Auch die subzelluläre Lokalisierung des Um10958:3eGFP-Proteins deutet darauf hin, dass das Protein während der Kernteilung mit dem Spindelpolkkörper assoziiert (Abb. 32 und Film 5).

Mit Um03539 ist ein zusätzlicher Num1-Interaktionspartner identifiziert worden, der in diese funktionelle Kategorie fallen könnte. Auch für dieses Protein ist in einer WoLF PSORT Analyse die nächste Nachbarschaft zu ApsB aufgetreten, was eine Rolle von Num1 als Komponente des Spindelpolkkörpers weiter unterstützt. Da die Deletion von *um03539* weder morphologische Auswirkungen auf das Hyphenwachstum, noch einen Einfluss auf die Pathogenität hatte, wurde auf eine detaillierte funktionelle Charakterisierung des Um03539-Proteins verzichtet.

Ob Nma1, Um10958 und Um03539 tatsächlich Komponenten des Spindelpolkkörpers darstellen, kann z.B. anhand einer Co-Lokalisierung, BiFC oder biochemisch durch Co-Immunopräzipitation der Proteine mit Tub2, γ -Tubulin in *U. maydis* (Straube *et al.*, 2003), und/oder weiteren Komponenten des Spindelpolkkörpers festgestellt werden. Die weitere funktionelle Charakterisierung von Um10958 kann durch Verwendung von konditionalen Deletionsmutanten geschehen, um einen Einfluss des Proteins auf Mitose oder die Regulation des Zellzyklus zu untersuchen. Mögliche Effekte auf den Zellzyklus können anhand von FACS-Analysen studiert werden (Garcia-Muse *et al.*, 2003).

3.2.2 Num1 interagiert mit Dnm1, einem mitochondriellen Spaltungsfaktor

Ein weiterer Num1-Interaktionspartner ist das Dnm1-Protein, das in der Hefe-Zwei-Hybrid Analyse identifiziert wurde. Die Interaktion konnte durch Co-Immunopräzipitation *in vivo* validiert werden (Abb. 33A). Die Interaktion eines SPF27-Homologs mit einem Dnm1-Protein ist zuvor bereits in *A. thaliana* beschrieben worden. Zur Identifizierung von NTC-Komponenten in Pflanzen wurden Immunopräzipitations-Experimente mit einem MOS4-(SPF27) HA-Fusionsprotein durchgeführt, wobei DNM1 als Interaktionspartner isoliert, die Interaktion hingegen nicht näher charakterisiert wurde (Monaghan *et al.*, 2009). Es ist jedoch ein bedeutender Hinweis, dass die Interaktion von Num1 mit Dnm1 auch in höheren Organismen konserviert sein könnte. Weiterhin wurde in *U. maydis* eine funktionelle Kopplung der beiden Proteine festgestellt, da die korrekte Lokalisierung von Dnm1

abhängig von Num1 ist (Abb. 33B). Um auszuschließen, dass die erhöhte Anzahl von Dnm1-Partikeln in der $\Delta num1$ -Mutante auf eine Expressionsänderung des *dnm1*-Gens zurückzuführen ist, wurden die Expressionsdaten aus der mRNA-Seq Analyse von AB31 und AB31 $\Delta num1$ verglichen. Das *dnm1*-Gen ist in beiden Stämmen identisch exprimiert und die kodierende Sequenz enthält kein Intron.

Als Faktor für die Fission von Mitochondrien reguliert das Dnm1-Protein in *U. maydis* die Dynamiken zwischen Fusion und Teilung der Organellen und trägt so zur Mitochondrienmorphologie bei (Mahlert *et al.*, 2009). Als zentrale Energielieferanten der Zelle und Träger mitochondrieller DNA muss die Verteilung von Mitochondrien bei der Mitose präzise reguliert werden. Während die Vererbung der nukleären DNA auf beide Tochterzellen hoch koordiniert abläuft, ist die Regulation der mitochondriellen Verteilung weitestgehend unbekannt. Es ist jedoch davon auszugehen, dass Transportprozesse dabei eine wichtige Rolle spielen. Der Transport von Mitochondrien ist insbesondere in filamentösen Pilzen und den Axonen von höheren Eukaryoten von besonderer Bedeutung, um die lokale ATP-Konzentration in der Hyphenspitze bzw. den Synapsen von Neuronen aufrecht zu halten (Hollenbeck und Saxton, 2005; Verstreken *et al.*, 2005). Im Hinblick auf eine putative Transportfunktion von Num1 wurde untersucht, ob das Protein einen Einfluss auf die Morphologie, Positionierung, Teilung oder den Transport von Mitochondrien hat, was mit den Experimenten aus dieser Studie jedoch nicht bestätigt werden konnte (Abb. 34+35). In multizellulären Organismen werden Mitochondrien mit Hilfe von Kinesin- und Dynein-Motorproteinen über das Mikrotubuli-Zytoskelett transportiert (Frederick und Shaw, 2007; Fuchs und Westermann, 2005; Hollenbeck und Saxton, 2005). Für einen Organell-spezifischen Transport sind zusätzlich Adapter-Moleküle von Nöten (Frederick und Shaw, 2007), wie die Proteine Miro und Milton in *D. melanogaster* oder das humane Syntabulin, die den Kinesin-basierten Transport von Mitochondrien in Neuronen regulieren bzw. die Organellen für den Transportprozess selektieren (Cai *et al.*, 2005; Cox und Spradling, 2006; Fransson *et al.*, 2006; Glater *et al.*, 2006). Bislang ist nicht bekannt, welche Motorproteine den Transport von Mitochondrien in *U. maydis* vermitteln. Es ist nicht auszuschließen, dass das Num1-Protein eine ähnliche Funktion als Adaptermolekül zwischen dem Mitochondrien-gebundenen Dnm1 und dem konventionellen Kin1 Motorprotein übernimmt, und entweder direkt in Transportprozesse involviert ist, oder aber eine regulatorische Funktion bei der Aktivierung und/oder Rekrutierung des Motorproteins ausführt. Ob Num1, Kin1 und Dnm1 gemeinsam in einem Komplex vorliegen, muss zukünftig im Detail charakterisiert werden (siehe 3.2.3).

Weiterhin weisen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit darauf hin, dass Dnm1 neben der Rolle bei der Mitochondrien-Fission weitere, bislang nicht identifizierte Funktionen ausübt. Sowohl in *S. cerevisiae* als auch in Säugern spielen Dnm1-Homologe eine Rolle während der Rezeptor-vermittelten Endozytose sowie während des endosomalen Transports zur Vakuole (Gammie *et al.*, 1995; Praefcke und McMahon, 2004). In *S. cerevisiae* konnte gezeigt werden, dass nur ein Teil der Dnm1p-Population mit mitochondriellen Membranen co-fraktioniert (Otsuga *et al.*, 1998) und in *U. maydis* führte die prolongierte Expression von eGFP:Dnm1-Molekülen zu einer Akkumulation des

Proteins im Zytoplasma, was auf eine zusätzliche zytoplasmatische Funktion von Dnm1 in *U. maydis* hindeutet (Mahlert *et al.*, 2009). In *dnm1*-Deletionsstämmen war die Anzahl an Vakuolen im Vergleich zum Wildtyp signifikant erhöht, wohingegen die Größe reduziert war (Abb. 36A), was in Analogie zu *S. cerevisiae* für eine Rolle als „vacuolar sorting“-Protein während des endosomalen Transports zur Vakuole sprechen würde. Der Phänotyp bezüglich der Vakuolenmorphologie überlappt mit *num1*- und *kin1*-Deletionsmutanten, was ein weiterer Hinweis dafür ist, dass alle drei Proteine innerhalb eines gemeinsamen Komplexes fungieren. In beiden Mutanten ist die Motilität von Endosomen drastisch reduziert, was die Hypothese unterstützt. Ob der Transport bzw. die Motilität von Endosomen auch in Δ *dnm1*-Mutanten eingeschränkt ist, wurde bislang nicht untersucht, könnte jedoch durch die Verwendung fluoreszenzmarkierter endosomaler Markerproteine, wie Yup1 oder Rab5, während des filamentösen Hyphenwachstums erfolgen. Im Unterschied zu Δ *num1*- und Δ *kin1*- ist die Polarität der Hyphen in Δ *dnm1*-Mutanten nicht beeinträchtigt (Abb. 36B), was darauf hindeutet, dass der Einfluss auf endosomale Transportprozesse nicht essentiell ist. Zudem weist der additive Effekt der *num1/dnm1*-Doppeldelation (Abb. 37) darauf hin, dass beide Proteine auch unabhängig voneinander zur Vakuolenmorphologie beitragen.

3.2.3 Num1 und das Kin1-Motorprotein fungieren in einem gemeinsamen Komplex

Die Interaktion des Num1-Proteins mit dem konventionellen Kinesin in *U. maydis*, Kin1, wurde anhand verschiedener CoIP-Techniken verifiziert. Die präzipitierte Bande war trotz mehrfacher Abänderung verschiedener Parameter, wie der Inkubationsdauer mit der α -HA Agarose, Anzahl der Waschschriffe oder der Verwendung des Puffersystems, ausschließlich äußerst schwach zu detektieren (Abb. 38A), was auf eine transiente Interaktion hindeutet. Um die Annahme zu bestätigen, wurden die Proteine quervernetzt. Die Behandlung der Zellen mit Dithiobis-[Succinimidyl-Propionat] vor der Präzipitation von Kin1:HA über α -HA Antikörper führte zu einem deutlich stärkeren Num1:GFP-Signal in der anschließenden Western-Analyse (Abb. 38B), was eine transiente oder instabile Num1/Kin1-Interaktion indiziert. Schwache Wechselwirkungen zwischen Proteinen bzw. Assoziations- und Dissoziations-Dynamiken innerhalb von Proteinkomplexen und dynamischen Netzwerken können jedoch biologisch höchst signifikant sein (Perkins *et al.*, 2010). Der Nachweis des Num1:HA-Proteins im Präzipitat des über den TAP-Tag isolierten Kin1-Komplexes (Abb. 62, Anhang) ist ein weiterer Hinweis für eine reale Interaktion von Num1 mit dem Kin1-Motorprotein. Zusätzlich zur physikalischen Interaktion gibt es zahlreiche Indizien für ein sehr enges funktionelles Zusammenwirken von Num1 und Kin1. *b*-abhängige Filamente von *num1*- und *kin1*-Deletionsstämmen weisen in Bezug auf das polare Wachstum (Septierung, Morphologie und Determination der Polaritätsachse) identische Phänotypen auf (Abb. 43). Aufgrund des Kin1-abhängigen anterograden Transports von Dynein kommt es in *kin1*-Deletionsstämmen zum vollständigen Verlust von apikalem Dynein an der Hyphenspitze. In ähnlicher Weise ist auch in *num1*-Deletionsstämmen die apikale Lokalisierung von Dynein reduziert (Abb. 19). Darüber hinaus sind

Δnum1- und *Δkin1*-Stämme vermutlich aufgrund der deregulierten Dynein-Lokalisierung bezüglich des Transports und der Motilität Yup1-markierter Endosomen eingeschränkt (Abb. 21 und Film 2); ferner ist die Morphologie von Vakuolen in beiden Deletionsstämmen im Vergleich zum Wildtyp gestört (Abb. 40). Die übereinstimmenden Phänotypen in Verbindung mit den CoIP-Ergebnissen signalisieren eine funktionelle Kopplung der beiden Proteine innerhalb identischer zellulärer Prozesse und belegen eine zusätzliche Kin1-abhängige Funktion des Num1-Proteins im Zytoplasma.

Aufgrund der mangelnden biologischen Relevanz der BiFC-Analysen konnte über den genauen Ort und den Zeitpunkt der Num1/Kin1-Interaktion keine Aussage getroffen werden. Die Expression eines Volllängen Kin1-Proteins als Fusion mit 3eGFP resultierte in einer gleichmäßigen zytoplasmatischen Hintergrundfluoreszenz (Schuchardt *et al.*, 2005; Straube *et al.*, 2006). Im Gegensatz zu Kin1 lokalisierte das Num1:3eGFP-Fusionsprotein prädominant im Zellkern, wo es seine Funktion als Spleißing-Faktor ausübt. Zusätzlich konnte jedoch auch für Num1 eine zytoplasmatische Lokalisierung in distinkten, statischen Foci beobachtet werden. Dabei könnte es sich um die Stellen der (transienten) Interaktion von Num1 mit Kin1 im Zytoplasma handeln. Es ist bereits ein möglicher funktioneller Zusammenhang zwischen Num1 und Komponenten der MTOCs, der Mikrotubuliorganisierenden Zentren, diskutiert worden. Ob es sich bei den beschriebenen Foci um MTOCs handelt, muss zunächst durch weitere Experimente analysiert werden (s.o.). Untersuchungen zur Bindung von Kin1-Molekülen an Mikrotubuli unterstützen jedoch diese Aussage. Da das Volllängen Kin1-Protein nur diffus im Zytoplasma verteilt zu beobachten war, wurden Fusionsproteine mit dem Kin1 C-Terminus (AS 336-968), der um die Motordomäne verkürzt war, und dem YFP-Protein generiert. Diese Fusionsproteine konnten ähnlich wie Num1 in schwachen Foci im Zytoplasma detektiert werden, von denen über 70% mit Mikrotubuli co-lokalisierten (Straube *et al.*, 2006). Anhand einer Co-Lokalisierung von Num1 mit dem Kin1 C-Terminus könnten daher nähere Erkenntnisse über den Ort der Interaktion gewonnen werden. Im Falle eines transienten „kiss-and-run“ Mechanismus können die Proteine mit Formaldehyd fixiert werden um die Interaktion fluoreszenzmikroskopisch analysieren zu können. Eine weitere Möglichkeit der Interaktion wäre, dass Num1 ständig, wenn auch schwach, mit dem Kin1-Motorprotein während des aktiven Mikrotubuli-basierten Transports verbunden bleibt. Eine Motilität der Num1-Foci entlang des Zytoskeletts konnte mikroskopisch bislang zwar nicht festgehalten werden. Aufgrund der schwachen Interaktion und/oder der nur geringen zytoplasmatischen Num1-Fraktion und der damit eingehenden sehr schwachen Fluoreszenz kann diese Variante dennoch nicht ausgeschlossen werden.

Weitere Hinweise, die für eine funktionelle Beziehung der beiden Proteine argumentieren, ergeben sich aus der Kin1-abhängigen subzellulären Lokalisierung des Num1-Proteins. Die Lokalisierung von Kin1 weist zwar keine Veränderungen in Abhängigkeit von Num1 auf: Sowohl in AB31- als auch in AB31 Δ *num1*-Stämmen ist das Motorprotein gleichmäßig im Zytoplasma der Hyphen distribuiert (Abb. 18). Die starke *kin1*-Expression während des filamentösen Wachstums (Schuchardt *et al.*, 2005) und die damit einhergehende starke Fluoreszenz kann ursächlich dafür sein, dass keine Unterschiede,

z.B. bezüglich der Bindung von Kin1 an Mikrotubuli, beobachtet werden konnten. Im Gegensatz dazu war die Lokalisierung von Num1 im $\Delta kin1$ -Hintergrund deutlich verändert und die Deletion von *kin1* führte zu einer verstärkten zytoplasmatischen Lokalisierung der Num1-Population (Abb. 41A). Das Protein war hier primär in Vakuolen zu detektieren, die ausschließlich im Bereich der initialen Zelle, nicht jedoch in Filamenten zu beobachten waren. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass Num1 seine Funktion im Zytoplasma nicht mehr erfüllen kann wenn die Zellen *kin1*-defizient sind. Überschüssiges Protein wird möglicherweise als Resultat eines generellen Abbaumechanismus in den Vakuolen degradiert. Vakuolen sind saure Zellorganellen, die neben der Speicherung von Metaboliten und dem Protein-Turnover vorrangig proteolytische Funktionen zur Degradierung von Proteinen ausüben (Armstrong, 2010; Klionsky *et al.*, 1990; Sarry *et al.*, 2007). Vergleichbare Resultate wurden bei der Lokalisierung eines nicht funktionellen Effektorproteins in *U. maydis* erzielt, das aufgrund von unkorrekter Faltung nicht sekretiert werden kann und folglich in Vakuolen abgebaut wird (Bergs, 2012). Bemerkenswerterweise war das nicht funktionelle Num1:GFP-Protein mit mutierter Kern-Lokalisierungssequenz ebenfalls im Zytoplasma zu beobachten, war dort jedoch gleichmäßig in der Zelle verteilt statt in Vakuolen zu akkumulieren (Abb. 16). Diese Beobachtung sowie die Tatsache, dass die Vakuolen ausschließlich im Bereich der initialen Zellen akkumulierten spricht im Gegensatz zu einer generellen Degradierung des Proteins für eine weitere Möglichkeit, diese Beobachtungen auszulegen, nämlich für eine direkte Funktion des Num1/Kin1-Komplexes beim intrazellulären Transport von Vakuolen (siehe 3.2.4). Unterstützt wird die Hypothese einer Transportfunktion von Num1 durch analoge Experimente zur subzellulären Lokalisierung des Num1-Proteins in Zellen die ein *kin1^{rigor}*-Allel exprimierten. Hier akkumulierte das Protein ebenfalls in Vakuolen, vereinzelt waren jedoch auch fibrilläre Strukturen zu beobachten (Abb. 41B), die darauf hindeuten, dass das Num1-Protein über Kin1 an Mikrotubuli gebunden wird. Ob es sich bei den beobachteten Strukturen hingegen tatsächlich um Mikrotubuli handelt, muss durch weitere Experimente, wie Inhibitorstudien oder einer Co-Lokalisierung mit einem Tub1:mCherry-Protein validiert werden.

Trotz der Interaktion von Num1 mit dem Kin1 Motorprotein wird kein epistatisches Verhältnis der beiden Proteine zueinander beobachtet (Abb. 42 und Abb. 43B+C), was darauf hindeutet, dass beide Proteine zusätzlich zu einer gemeinsamen Funktion innerhalb eines Komplexes weitere Funktionen ausüben, die unabhängig voneinander zu den beobachteten Phänotypen beitragen. So agiert Num1 unabhängig von Kin1 als globaler Spleißing-Faktor im Zellkern wohingegen Kin1 als Motorprotein erwartungsgemäß Transportprozesse entlang des Mikrotubuli-Zytoskeletts im Zytoplasma ausübt.

Für eine funktionelle Charakterisierung der Num1/Kin1-Interaktion bietet es sich an, den gesamten Kin1-Komplex zu isolieren und biochemisch zu analysieren. Dazu wurde bereits die Tandem-Affinitäts-Aufreinigung über den TAP-Tag etabliert (Kapitel 6.2). Die Auftrennung des Präzipitats aus dem Kin1-Komplex mittels SDS-PAGE und die Färbung der Proteine mit Hilfe von Silbernitrat-Ionen deuten darauf hin, dass das Num1-Protein Teil eines größeren Komplexes ist (Abb. 62D). Weitere, bislang unbekannt Komponenten aus dem Num1/Kin1-Komplex können anschließend über eine

massenspektrometrische Analyse identifiziert werden, was zur weiteren Aufklärung der molekularen Funktion des Num1-Proteins bzw. der biologischen Relevanz der Num1/Kin1-Interaktion beitragen soll. Der Einfluss von Kin1 auf die Stabilität des Num1-Proteins kann anhand von Western-Analysen untersucht werden, da im Falle eines Abbaus des nicht-funktionellen Num1-Proteins in AB31 Δ *kin1*-Zellen im Gegensatz zum AB31-Wildtyp Num1:GFP-Abbauprodukte detektierbar sein müssten.

3.2.4 Putative Funktionen des Num1/Kin1-Komplexes

Die überlappenden Phänotypen der *num1*- und *kin1*-Deletionsstämme deuten darauf hin, dass das Num1-Protein für die vollständige Kin1-Aktivität notwendig ist. Kin1 spielt primär eine indirekte Rolle bei intrazellulären Transportprozessen, indem es Dynein an die Hyphenspitze befördert (Lenz *et al.*, 2006). Es konnte hingegen auch eine direkte Funktion beim Transport sekretorischer Vesikel in *U. maydis* gezeigt werden (Schuster *et al.*, 2012). Aufgrund der physikalischen und genetischen Interaktion der beiden Proteine kann über verschiedene Funktionen des Num1/Kin1-Komplexes spekuliert werden.

Untersuchungen zur Funktionalität und Effizienz des konventionellen Kinesins in *N. crassa* haben gezeigt, dass für die volle Funktion des Motorproteins *in vivo* eine spezielle Konformation erforderlich ist (Kirchner *et al.*, 1999). Weiterhin ist durch die Aufklärung der Kristall-Struktur bekannt, dass die Funktion des konventionellen Kinesins autoinhibitorisch reguliert wird, wenn es nicht an ein Cargo-Molekül gebunden ist (Kaan *et al.*, 2011). Dem Num1-Protein in *U. maydis* könnte die Funktion eines regulatorischen Rezeptormoleküls zukommen, das mit der Cargo-Bindedomäne interagiert und über eine Konformationsänderung die Bindung an andere Bereiche des Motorproteins kommuniziert, was beispielsweise die Interaktion der Motordomäne mit der Mikrotubuli-Oberfläche effektiver machen und so die Bewegung der Motordomäne entlang der Mikrotubuli aktivieren kann. Eine unausgewogene Regulation der Motoraktivität, wie eine konstitutive Aktivierung von Kinesin-Molekülen, kann zum einen dazu führen, dass der Transport weniger effizient abläuft. Auf diese Weise kann möglicherweise auch eine gewisse Selektivität des Motorproteins für den spezifischen Transport bestimmter Cargo-Moleküle erreicht werden.

Aufgrund der Interaktion von Num1 mit dem Mikrotubuli-assoziierten Nma1-Protein ist eine weitere Form von Regulation denkbar, indem Num1 als eine Art Bindeglied zwischen Kin1 und dem Mikrotubuli-Zytoskelett fungiert um dessen Bindung an die Mikrotubuli zu stabilisieren oder das Motorprotein selektiv zu rekrutieren, um auf diese Weise den Transport zu kontrollieren. Ein prominentes Beispiel wie die Regulation der Motorprotein-Aktivität über ein Mikrotubuli-assoziiertes Protein gesteuert werden kann, ist das tau Protein, das ein Gleichgewicht zwischen Kinesin- und Dynein-basiertem Transport in Neuronen reguliert (Dixit *et al.*, 2008; Seitz *et al.*, 2002). Ähnliche regulatorische Effekte sind auch für das MAP4-Protein beobachtet worden, das in nicht-neuronalen Zellen exprimiert wird (Bulinski *et al.*, 1997).

Es gibt Subpopulationen post-translational modifizierter Mikrotubuli für einen spezialisierten intrazellulären Transport. Modifikationen, wie Acetylierung, Tyrosinierung, Detyrosinierung, Polyglutamylierung oder Phosphorylierung, können zur Mikrotubuli-Stabilität beitragen, aber auch regulatorische Funktion haben, indem sie über spezialisierte MAPs die Assoziation von Motorproteinen an Mikrotubuli beeinflussen (Fukushima *et al.*, 2009; Ikegami und Setou, 2010). Es ist bekannt, dass das konventionelle Kinesin in Abhängigkeit bestimmter Modifikationen in Neuronen unterschiedliche Transport-Eigenschaften aufweist (Dunn *et al.*, 2008; Liao und Gundersen, 1998). Die Acetylierung von Mikrotubuli führt beispielsweise zu einer erhöhten Prozessivität des konventionellen Kinesins und bestimmte Cargos werden ausschließlich entlang dieser Subpopulation transportiert (Reed *et al.*, 2006). Auch in filamentösen Pilzen sind post-translationale Mikrotubuli-Modifikationen beobachtet worden. So bindet das Kinesin-3 Motorprotein UncA präferentiell detyrosinierte Mikrotubuli für den Vesikel-Transport (Seidel *et al.*, 2012; Zekert und Fischer, 2009). In *U. maydis* sind Mikrotubuli-Modifikationen bislang nicht untersucht worden. Ob das Nma1-Protein eine spezielle Subpopulation von Mikrotubuli markiert, ist dementsprechend noch unbekannt. Ein vergleichbarer Mechanismus für einen spezifischen Kin1-abhängigen Transport z.B. bestimmter Vesikel-Populationen, möglicherweise durch den Num1/Nma1-Komplex vermittelt, ist vorstellbar.

Darüber hinaus ist bereits eine putative Funktion von Num1 als Adaptermolekül im Zusammenhang mit Dnm1 diskutiert worden (siehe 3.2.2). Es gibt vielerlei Hinweise, dass die Bindung von Motorproteinen nicht nur an die Mitochondrien, sondern auch an andere Organellen und Transport-Vesikel über Adapterproteine reguliert wird. Oftmals handelt es sich dabei um „Scaffold“-Proteine wie die Gruppe der JIPs („c-Jun N terminal kinase interacting proteins“), die bestimmte MAP-Kinase Module stabilisieren (Dhanasekaran *et al.*, 2007; Weston und Davis, 2002) aber darüber hinaus mit dem konventionellen Kinesin interagieren (Ikononov *et al.*, 2009) und somit eine Funktion beim Mikrotubuli-basierten Membrantransport in Neuronen einnehmen. Verschiedene vesikuläre Cargos für JIP „Scaffold“-Proteine konnten in *D. melanogaster*, *C. elegans* und humanen Neuronen identifiziert werden (Bowman *et al.*, 2000; Byrd *et al.*, 2001; Horiuchi *et al.*, 2005; Verhey *et al.*, 2001). Weitere Beispiele für molekulare Adapterproteine sind Nesca, das sowohl an Mikrotubuli als auch an das humane konventionelle Kinesin KIF5B bindet. Nesca co-präzipitiert in Fraktionen, die Marker für frühe Endosomen und Golgi-Proteine beinhalten. Es wird daher postuliert, dass es als Adapterprotein für den Transport von Vesikeln fungiert, die unter anderem für die Exozytose von sekretorischen Proteinen essentielle SNARE-Proteine enthalten (MacDonald *et al.*, 2012). FYCO1 ist ein Adapterprotein, das dem selektiven Mikrotubuli Plus-Ende-gerichteten Transport von Autophagosomen zu Endosomen bzw. Vakuolen dient (Pankiv und Johansen, 2010). Sowohl in *num1*- als auch in *kin1*-Deletionsstämmen wurden Defekte bezüglich des Transports und der Motilität Yup1-markierter Endosomen beobachtet. Die fragmentierten Vakuolen in Δ *num1*- und Δ *kin1*-Mutanten deuten zudem darauf hin, dass beide Proteine einen Schritt vom endosomalen Transport zur Vakuole regulieren. Das Num1-Protein könnte in ähnlicher Weise als Adaptermolekül zwischen dem Kin1-

Motorprotein und der transportierten Fracht, membranösen Strukturen wie Vesikeln oder Endosomen fungieren. Zudem wurde bereits postuliert, dass der Komplex während des filamentösen Wachstums eine Rolle beim Transport von Vakuolen spielt (siehe 3.2.3). Bei Num1 könnte es sich dabei um einen wie bereits beschrieben um ein generelles „Scaffold“-Molekül für die Stabilisierung des Motorprotein/Cargo-Komplexes handeln. Zum anderen besteht die Möglichkeit, dass das Num1-Protein bestimmte Cargos für den Transport selektiert und so einen regulatorischen Einfluss auf den Kin1-abhängigen Transport in *U. maydis* nimmt. Um diese Annahmen zu validieren, müsste man weitere Experimente durchführen. Eine biochemische Untersuchung des Num1/Kin1-Komplexes (siehe 3.2.3) und anschließende massenspektrometrische Analyse kann Hinweise auf derartige molekulare Funktionen des Num1-Proteins bzw. Aufschlüsse über etwaige vesikuläre Cargos des Kin1-Motorproteins liefern. Ferner könnte untersucht werden, ob das Num1-Protein in Vesikel- bzw. Endosomen-Fraktionen und/oder in Mitochondrien-Fraktionen nachweisbar ist, was eine direkte Rolle bei vesikulären Transportprozessen implizieren würde.

Zusammenfassend kommen verschiedene putative Mechanismen der zytoplasmatischen Num1-Funktion in Frage. Zum einen könnte es einen regulatorischen Einfluss auf die Kin1-Funktion geben, indem es die Konformation des Motorproteins reguliert oder als Bindeglied zwischen Mikrotubuli dessen selektive Rekrutierung kontrolliert. Alternativ könnte das Num1-Protein eine Rolle bei der Stabilisierung von Motorprotein/Cargo-Komplexen spielen (siehe Abb. 59). In Abschnitt 3.4 werden weitere potentielle Funktionen des Num1-Proteins diskutiert, die einen funktionellen Zusammenhang zwischen der Kin1-abhängigen Transportfunktion mit der Funktion beim Spleißen als Komponente des NTC postulieren.

3.3 Die Num1 Funktion ist zwischen Basidio- und Ascomyzen konserviert

Es konnte gezeigt werden, dass Num1 eine strukturelle sowie funktionelle Komponente des evolutionär konservierten Spleißosom-assoziierten NTC ist, da das Protein diverse Funktionen ausübt, die bereits in anderen Organismen für NTC-Komponenten beschrieben wurden (siehe 3.1). Die Assoziation eines Kinesin-Motorproteins ist bislang jedoch nicht für ein Protein aus dem NTC beschrieben worden und wäre eine gänzlich neue, bislang nicht identifizierte Funktion. Um zu untersuchen, ob diese Funktion spezifisch für *U. maydis* oder aber in anderen Organismen konserviert ist, wurde die Interaktion des humanen Num1-Homologs hBCAS2 mit dem humanen konventionellen Kinesin-Motorprotein KIF5C in einer Hefe-Zwei-Hybrid Analyse getestet. In diesem System konnte keine Interaktion der beiden Proteine festgestellt werden. In ähnlicher Weise konnte der $\Delta num1$ -Phänotyp mit dem humanen hBCAS2-Protein nur partiell komplementiert werden (Abb. 23). Offenbar wird das humane Protein trotz Sequenzoptimierung nicht bestmöglich transkribiert, translatiert und/oder modifiziert, sodass nur eine geringe Proteinmenge vorliegt. Aus diesen Gründen kann keine Aussage bezüglich einer Konservierung der Num1-Funktion in höheren Eukaryoten getroffen werden (siehe auch 6.3 im Anhang).

Es konnte jedoch mit AN4244 ein funktionelles Homolog im filamentösen Ascomyzeten *Aspergillus nidulans* ermittelt werden. Um die Funktion von Num1-homologen Proteinen in Pilzen generell zu charakterisieren wurden Deletionsmutanten des AN4244-Gens generiert, für die gezeigt werden konnte, dass sie zu *U. maydis* *num1*-Deletionsmutanten stark ähnelnde Phänotypen aufweisen. Filamente, die aus keimenden Konidien resultieren, sind für gewöhnlich kürzer und dicker, als die eines Wildtypstammes in vergleichbaren Experimenten (Abb. 25-27) und weisen wie in AB31 Δ *num1* fragmentierte Vakuolen auf (Abb. 25). Anders als *U. maydis* sind in *A. nidulans* mehrere Zellkerne pro Hyphenkompartiment enthalten, die im Wildtyp gleichmäßig verteilt sind, in der Δ AN4244-Mutante hingegen gehäuft vorliegen (Abb. 26). Der Positionierungseffekt scheint Temperatur-abhängig zu sein, da die Zellkern-Cluster nach Inkubation bei 37°C stärker zu beobachten waren, als bei 28°C. Bezüglich der Hyphenmorphologie und der Positionierung von Zellkernen wurde ein ähnlicher Phänotyp bereits in früheren Studien von Deletionsmutanten des konventionellen Kinesins in *A. nidulans*, KinA, beobachtet (Requena *et al.*, 2001). Die Deletion des *kinA*-Gens führte nicht nur zu gestörtem polarem Wachstum sondern hatte zudem einen ausgeprägten Einfluss auf die Zellkernverteilung. Interessanterweise traten beide Defekte wie in Δ AN4244 deutlicher bei einer Temperatur von 37°C hervor, bei geringeren Temperaturen von 25°C wurde der Wachstumsdefekt von Δ *kinA* gegenüber dem Wachstum eines Wildtyp-Stammes sogar verringert (Requena *et al.*, 2001). Diese Beobachtungen deuten auf potentielle funktionelle Beziehung zwischen AN4244 und KinA in *A. nidulans* hin. Um die Annahme zu bestätigen wurde in Analogie zu *U. maydis* die subzelluläre Lokalisierung des Dynein Motorproteins, NudA, in Abhängigkeit von AN4244 untersucht, die in Δ AN4244 wie in *U. maydis* verstärkt zytoplasmatisch zu beobachten war, statt am apikalen Zellpol zu akkumulieren (Abb. 27).

Es kann somit spekuliert werden, dass das AN4244-Protein in *A. nidulans* in Bezug auf das polarisierte Hyphenwachstum und intrazelluläre Transportprozesse eine ähnliche Funktion wie das Num1-Protein in *U. maydis* ausübt. Um die Hypothese zu bestätigen, sollte die Komplementation des Δ *num1*-Phäotyps in *U. maydis* mit dem AN4244-Protein aus *A. nidulans* gezeigt und die Interaktion von AN4244 mit KinA anhand des Hefe-Zwei-Hybrid Systems und/oder Co-Immunopräzipitation validiert werden. Um die Aussage über die Homologie des Num1 Proteins für das Reich der Pilze zu generalisieren, sollten die Homologe von weiteren Asco- und Basidiomyzeten, wie *Neurospora crassa* und *Cryptococcus neoformans*, in die Analysen mit einbezogen werden.

3.4 Num1 als Bindeglied zwischen Spleißen und Transportvorgängen

Es konnte gezeigt werden, dass das Num1-Protein ein globaler Spleißing-Faktor ist und viele Phänotypen der *num1*-Deletionsstämme können durch aberrantes oder ineffizientes Spleißen der zugrundeliegenden Gene erklärt werden (siehe 3.1). Zusätzlich ist das Protein in (Kin1-abhängige) Transportvorgänge im Zytoplasma involviert (siehe 3.2). Bislang sind NTC-Komponenten, z.B. die Prp19-Homologe ausschließlich im Zellkern detektiert worden, was biochemisch nach Fraktionierung

von humanen Jurkat-Zellen sowie durch konfokale Mikroskopie von *A. thaliana*-Zellen gezeigt werden konnte (Gotzmann *et al.*, 2000; Monaghan *et al.*, 2009). Aufgrund der Tatsache, dass Num1 in *U. maydis* im Gegensatz zu den anderen NTC-Komponenten Prp19 und Cef1 auch eine zytoplasmatische Lokalisierung aufweist (Abb. 9 und Abb. 45), kann spekuliert werden, dass das Protein zusätzliche Funktionen übernommen hat, die womöglich spezifisch für *U. maydis* und seine engen Verwandten sind. Im Folgenden werden einige Prozesse diskutiert, die möglicherweise eine funktionelle Verbindung zwischen den scheinbar ungleichartigen Prozessen „Spleißen“ und „intrazellulärer Transport“ darstellen könnten.

Die verschiedenen Schritte bei der eukaryotischen Genexpression sind oftmals eng miteinander verknüpft. Das 5'-Capping, Spleißen und Polyadenylierung von Transkripten sind Prozesse, die noch während der Polymerase II-Transkription vollzogen werden. Darüber hinaus ist bekannt, dass Transkription und Bildung von mRNP-Partikeln, mRNP-Export- sowie mRNA-Transport-Prozesse oftmals gekoppelt stattfinden. Der mRNA-Export aus dem Zellkern wird durch spezifische Rezeptor-Proteine vermittelt, die mit Komponenten aus dem Kernporen-Komplex interagieren. Der Großteil dieser Export-Rezeptoren, wie der konservierte Mex67/Mtr2-Komplex, gehören der Familie der Importin/ Karyopherin- β Proteine an (Katahira *et al.*, 1999; Santos-Rosa *et al.*, 1998; Segref *et al.*, 1997). Die Rezeptoren erkennen jedoch ihre RNA-Cargos meist indirekt mit Hilfe der Bindung an verschiedene Adapter-Proteine. Yra1p ist ein Beispiel für einen Mex67-Adapter für die RNA-Bindung und temperatur-sensitive Mutanten führen unter restriktiver Temperatur zur Akkumulation von Poly(A)-RNAs im Zellkern (Strässer und Hurt, 2000). Yra1 ist eine Komponente aus dem konservierten TREX („transcription export“-Komplex, dessen Komponenten sowohl in Transkriptions-Elongation als auch in mRNA-Export Prozesse involviert sind (Chavez *et al.*, 2000; Chavez *et al.*, 2001; Katahira und Yoneda, 2009). Der TREX-Komplex wird noch während des Spleißing-Prozesses an aktiv transkribierte Gene rekrutiert (Cheng *et al.*, 2006; Masuda *et al.*, 2005). Über die Interaktion des Syf1-Proteins, einer Kernkomponente aus dem NTC, an die RNA-Polymerase II gibt es eine Verbindung zwischen dem TREX-Komplex und der Transkriptions-Maschinerie (Chanarat *et al.*, 2011) und damit zwischen dem NTC und mRNP-Transport aus dem Zellkern (Abb. 57). Der NTC wird zudem für eine effiziente Transkriptions-Aktivität und volle Prozessivität der RNA-Polymerase II benötigt, sodass ihm eine neuartige Funktion während der Transkriptionselongation zugeschrieben werden kann, die unabhängig von der Funktion während des Spleißens ist (Chanarat *et al.*, 2012; Chanarat *et al.*, 2011). Es ist bekannt, dass der NTC nur für die TREX-Bindung einer Untergruppe an Transkripten und damit für den Export von individuellen mRNA-Transkripten benötigt wird (Rehwinkel *et al.*, 2004), sodass vermutlich spezifische mRNA-Export Wege existieren, die möglicherweise durch unterschiedliche Adapter-Proteine vorgegeben werden. Das Num1-Protein könnte bei diesen Prozessen eine Rolle spielen indem es das prä-mRNA Spleißen mit dem Verpacken von mRNAs in mRNP-Partikel und/oder den Export der mRNP-Partikel aus dem Zellkern koordiniert. Als Adapterprotein für mRNP Export-Rezeptoren könnte es gleichzeitig

eine regulatorische Funktion ausüben und spezifische Transkripte für den Export ins Zytoplasma selektionieren oder aber deren Transport inhibieren. Weiterhin kommt eine Rolle als „Shuttle-Protein“ in Frage, das zwischen Nukleus und Zytoplasma pendelt, um spezifische Transkripte ins Zytoplasma zu transportieren, wo diese translatiert oder an die mRNA-Transport-Maschinerie übergeben werden. Ein ähnlicher Mechanismus ist für Npl3p aus *S. cerevisiae* bekannt, ein Adapterprotein für die RNA-Bindung. Es existiert im Nukleus in Assoziation mit der Poly(A)+ RNA, deponiert diese im Zytoplasma und wird anschließend in den Kern re-importiert, wo es einen erneuten Export-Zyklus durchlaufen kann (Lee *et al.*, 1996).

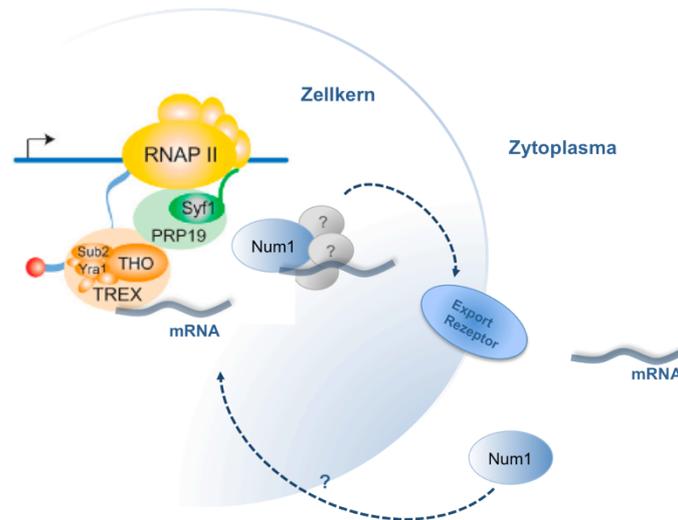


Abbildung 57: Putative Funktion des Num1-Proteins beim mRNA-Export. Über den C-Terminus von Syf1 wird der NTC an die Transkriptionsmaschinerie gekoppelt. Durch Rekrutierung und Stabilisierung des TREX-Komplex an aktiv transkribierte Gene wird der NTC für die Transkriptionselongation benötigt. Die TREX-Komponenten binden das entstehende Transkript und formen mRNP-Partikel. Das Num1-Protein fungiert in diesem Modell als Adapter für die spezifische Interaktion mit Export-Rezeptorproteinen für den Export von mRNPs aus dem Zellkern ins Zytoplasma. Abbildung modifiziert nach (Chanarat *et al.*, 2011).

Der Transport von mRNAs und dadurch die gezielte Lokalisierung und lokale Translation von Transkripten ist ein fundamentaler Mechanismus für eine räumlich und zeitlich koordinierte Genexpression. Die lokale Morphogen-Expression während der Oogenese und Embryogenese von *D. melanogaster* oder *X. laevis* dient der Determination der Haupt-Körperachsen des Embryos und ist ein gutes Beispiel für die Bedeutung des mRNA-Transports für Entwicklungsprozesse (Lipshitz, 2009; Martin und Ephrussi, 2009; St Johnston, 2005; Vollmeister *et al.*, 2012). Lokale Translationsprozesse sind auch in aktivierten Synapsen von Dendriten und Neuronen im Nervensystem höherer Eukaryoten bekannt (Doyle und Kiebler, 2011). In einer Transkriptom-weiten Studie in *D. melanogaster* konnte gezeigt werden, dass über 70%, also die Mehrheit der Transkripte eine distinkte subzelluläre Lokalisierung aufweisen (Lecuyer *et al.*, 2007). Im Allgemeinen erfolgt die Lokalisierung von mRNAs in Form eines aktiven Transports entlang des Actin- oder Mikrotubuli-Zytoskeletts. Transportierte mRNAs enthalten oft spezielle Sequenzen, sogenannte „zipcodes“, die ihren korrekten subzellulären Bestimmungsort vorgeben. Diese Elemente werden von RNA-Bindeproteinen erkannt und formen mit weiteren akzessorischen Proteinen hoch strukturierte Ribonukleoprotein-Komplexe

(St Johnston, 2005; Zarnack und Feldbrügge, 2010). Diese mRNPs werden über spezifische Adapterproteine an die Motorproteine der Transport-Maschinerie übergeben (Tekotte und Davis, 2002; Vale, 2003). Eine vorzeitige Translation wird während des Transports durch spezifische Inhibitoren gewährleistet. Durch eine lokale Phosphorylierung werden die Transkripte anschließend entlassen, von Inhibitoren befreit und über verankernde Proteine an ihrem Bestimmungsort festgehalten (Hüttelmaier *et al.*, 2005; Paquin und Chartrand, 2008). In *U. maydis* ist das RNA-Bindeprotein Rrm4 maßgeblich am bidirektionalen Transport von mRNAs entlang des Mikrotubuli-Zytoskeletts beteiligt (Becht *et al.*, 2006). Für deren Transport werden die selben Motorproteine benötigt, die auch den bidirektionalen Transport von Endosomen koordinieren: Dyn1/2 für den retrograden Transport, Kin3 für den anterograden Transport und Kin1 für das anterograde Recycling von Dyn1/2 (Baumann *et al.*, 2012; Schuster *et al.*, 2011b). Rrm4 vermittelt den Transport von spezifischen mRNAs, wie *ubi1* und *rho3*, die in Form von mRNP-Partikeln durch das Filament transportiert werden (König *et al.*, 2009) (Abb. 58). Interessanterweise überlappen *Δrrm4*-Phänotypen mit denen der *num1*- und *kin1*-Deletionsstämmen nach Induktion des *b*-abhängigen Hyphenwachstums, was eine gemeinsame Funktion dieser drei Proteine innerhalb dieses Prozesses wahrscheinlich macht. Der eingeschränkte Transport von Yup1-markierten frühen Endosomen, die mit den Rrm4-Partikeln co-lokalisieren, in *num1*- und *kin1*-Deletionsstämmen unterstützen diese Annahme.

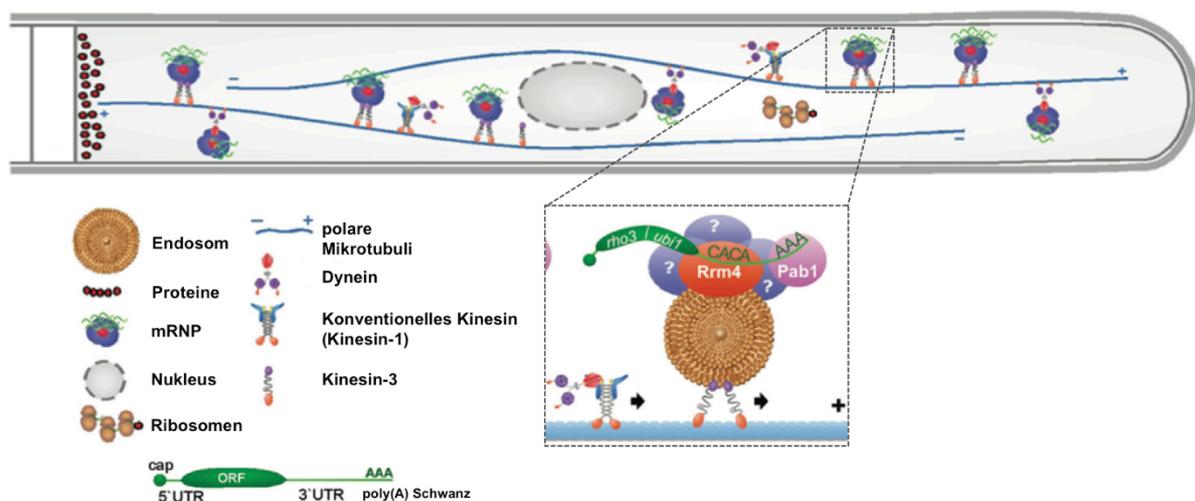


Abbildung 58: Mikrotubuli-basierter mRNA-Transport während des filamentösen Wachstums von *U. maydis*. Rrm4-enthaltende mRNP-Partikel transportieren mRNA-Transkripte, die das Poly(A)-Bindepotein tragen, bidirektional entlang des polaren Mikrotubuli-Zytoskeletts. Aufgrund der Co-Lokalisierung von Rrm4 mit dem Endosomen-Marker Yup1 wurde für den mRNA-Transport ein Mechanismus vorgeschlagen, bei dem die mRNP-Partikel gemeinsam mit Vesikeln transportiert werden („vesicle hitchhiking“). Abbildung modifiziert nach (Vollmeister *et al.*, 2012).

Die meisten bislang identifizierten Rrm4-abhängig transportierten mRNAs enthalten mindestens ein Intron (Feldbrügge, unveröffentlicht). Aufgrund der Tatsache, dass 70% aller offenen Leserahmen im *U. maydis* Genom Intron-frei sind (Kämper *et al.*, 2006) besteht die Annahme, dass eine potentielle Verbindung zwischen dem Spleißen und dem Transport der entsprechenden Transkripte existiert.

Eine mögliche funktionelle Verbindung zwischen diesen beiden Mechanismen besteht durch den sogenannten Exon-Verbindungs-Komplex („exon junction complex“, EJC), ein Proteinkomplex, der nach der Spleiß-Reaktion mit dem Transkript verbunden und mit diesem zusammen aus dem Zellkern transportiert wird. Der EJC markiert Exon/Exon-Übergänge und dient der Qualitätskontrolle der Spleiß-Reaktion: Im Normalfall werden die EJC-Komponenten während der ersten Translationsrunde vom Transkript entfernt. Im Falle von vorzeitigen Stopp-Codons können jedoch durch den EJC Terminationsfaktoren rekrutiert werden, die wiederum Decapping-Enzyme für den Abbau der 5'-Kappe der mRNA aktivieren, was die Degradierung des fehlerhaften Transkripts durch 5'-3'-Exonukleasen erleichtert (Chang *et al.*, 2007). Mutationen in EJC-Komponenten (Mago nashi, Y14 und eIF4AIII) führen zur Mislokalisierung der *oskar* mRNA in *D. melanogaster* Oozyten; darüber hinaus wurde eine Co-Lokalisierung dieser Komponenten mit den *oskar*-Transkripten beobachtet, was darauf hindeutet, dass es sich dabei um essentielle Faktoren des *oskar* mRNA-Lokalisierungskomplexes handelt (Zimyanin *et al.*, 2008). Für den Transport sind neben weiteren RNA-Bindeproteinen Tropomyosin II sowie die schwere Kette des konventionellen Kinesin Motorproteins notwendig (Brendza *et al.*, 2002; Erdelyi *et al.*, 1995).

Interessanterweise ist für die korrekte Lokalisierung der *oskar*-mRNA an posterioren Zellpol der Oozyte ausschließlich das Spleißen des ersten Introns essentiell (Hachet und Ephrussi, 2004). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass nur manche Exon/Exon-Verbindungen durch den EJC markiert werden, was auf *cis*-agierenden Elementen innerhalb der RNA-Sequenzen beruht. Die Deponierung des EJC erfolgt also nicht konstitutiv, sondern ist ein regulierter Prozess, der die Selektion spezifischer mRNAs für den zytoplasmatischen Transport erklären könnte (Sauliere *et al.*, 2010).

Da für das Num1-Protein in *U. maydis* sowohl eine Rolle beim Spleißen als auch bei zytoplasmatischen Transportvorgängen postuliert wurde, ist der Einfluss des Proteins auf Rrm4-abhängige mRNA-Transportvorgänge untersucht worden. Es konnte gezeigt werden, dass der Transport von Rrm4-Partikeln in Bezug auf die zurückgelegte Distanz und die Motilität in AB33 Δ *num1*-Stämmen eingeschränkt war und häufig wurde eine Akkumulation von Rrm4-Partikeln in verschiedenen Bereichen der Filamente beobachtet (Abb. 48+49, Filme 8a-c). Damit einhergehend war auch die Motilität des Poly(A)-Bindeproteins Pab1 durch die *num1*-Deletion beeinträchtigt (Filme 10a-b). Da die Co-Lokalisierung von Rrm4 und Pab1 in AB33 Δ *num1* nicht beeinträchtigt war (Abb. 50), hat das Num1-Protein offenbar keinen direkten Einfluss auf die Beladung der Rrm4-Partikel mit den exportierten Transkripten.

Aufgrund der Interaktion von Num1 mit dem Kin1-Motorprotein sowie der möglichen funktionellen Verbindung zwischen Num1 und dem Rrm4 RNA-Bindeprotein, kann eine weitere mögliche Funktion für das Num1-Protein beim intrazellulären mRNA-Transport vorgeschlagen werden. Als Kernkomponente des NTC fungiert es möglicherweise bei der Selektion spezifischer Transkripte während der Spleiß-Reaktion, die für den Transport ausgewählt und an die Transport-Maschinerie übergeben werden. Es konnte bereits gezeigt werden, dass drei Rrm4-abhängig transportierte

Transkripte, *ubil*, *rho3* und *cts1*, verglichen mit dem Wildtyp in AB31 Δ *num1* höhere Intron-Retentionsraten aufweisen (Abb. 47). Ein direkter Beweis für einen Einfluss des Num1-Proteins auf den mRNA-Transport sollte zunächst durch Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) von RNA-Transkripten oder durch die Anwendung des λ N-GFP Reporter-Systems zur Visualisierung des zytoplasmatischen Transports spezifischer Transkripte erzielt werden. Letzteres wurde in *U. maydis* etabliert, um den Transport Rrm4-abhängig transportierter Transkripte während des filamentösen Hyphenwachstums zu verfolgen (König *et al.*, 2009). Mit Hilfe dieses Reporter-Systems kann zukünftig untersucht werden, ob diejenigen Transkripte, die in AB31 Δ *num1*-Stämmen besonders vom Spleißen betroffen sind auch bezüglich ihres Transports bzw. ihrer subzellulären Lokalisierung eingeschränkt sind. Unter den Transkripten, die in AB31 Δ *num1* besonders hohe Intron-Retentionsraten aufwiesen konnten keine funktionellen Gruppen ausgemacht werden, anhand derer man auf mögliche mRNAs schließen kann, die in der Δ *num1*-Mutante nicht transportiert und daher falsch lokalisiert werden. Die funktionelle Kategorie „Transport“ beispielsweise umfasst jedoch nicht notwendigerweise Transkripte, die aktiv im Filament transportiert werden und umgekehrt können die Transkripte, die falsch lokalisiert werden, unter Umständen den unterschiedlichsten Kategorien angehören. Zukünftig soll daher untersucht werden, ob es eine Übereinstimmung zwischen den in AB31 Δ *num1* besonders schlecht gespleißten Transkripten und den Rrm4-abhängig transportierten mRNAs gibt, was derzeit auf Genom-weiter Ebene anhand von *in vivo* UV cross-linking und Immunopräzipitations- (CLIP) Experimenten (Ule *et al.*, 2003) untersucht wird (Haag und Feldbrügge, unveröffentlicht).

Mechanistisch sind verschiedene Varianten denkbar, die dazu führen, dass im Zuge der Spleißing-Reaktionen bestimmte Transkripte selektiert und für die Transportmaschinerie markiert werden. In Punkt 3.1.1 wurde erläutert, dass es Unterschiede innerhalb der Intron-Sequenzen geben muss, die dazu führen, dass einzelne Introns in AB31 Δ *num1* besonders vom Spleißen betroffen sind, während andere mit einer vergleichbaren Effizienz wie der AB31-Wildtyp gespleißt werden. Ähnlich wie für die EJC-Komponenten beschrieben könnten entweder das Num1-Protein selbst oder aber andere Proteine, die über Num1 rekrutiert werden, sequenzspezifisch mit dem Transkript verbunden werden, die dann wie in höheren Eukaryoten als Adapterprotein für RNA-Bindeproteine wie das Rrm4-Protein fungieren. Derartige Adapterproteine, die als Bindeglied zwischen dem Rrm4-mRNP und dem Transport-Vesikel dienen, sind bislang in *U. maydis* zwar nicht identifiziert worden, können jedoch nicht ausgeschlossen werden. Womöglich dient das Num1-Protein aber auch der Rekrutierung von EJC-Komponenten an die Transkripte, die diese wiederum (über Kin1) an die Transportmaschinerie koppeln könnten. Zwei Gene, die für die konservierten EJC-Komponenten Mago nashi (*um05829*) bzw. Y14 (*um10902.2*) kodieren, beinhalten jeweils drei Introns, die in AB31 Δ *num1* verglichen mit AB31 deutlich schlechter gespleißt werden, sodass auch ein indirekter Effekt aufgrund des aberranten Spleißens dieser Komponenten in Betracht gezogen werden muss. Alternativ könnte das Num1-Protein wie bereits in Punkt 3.2.4 diskutiert als Bindeglied zwischen dem Kin1-Motorprotein und der

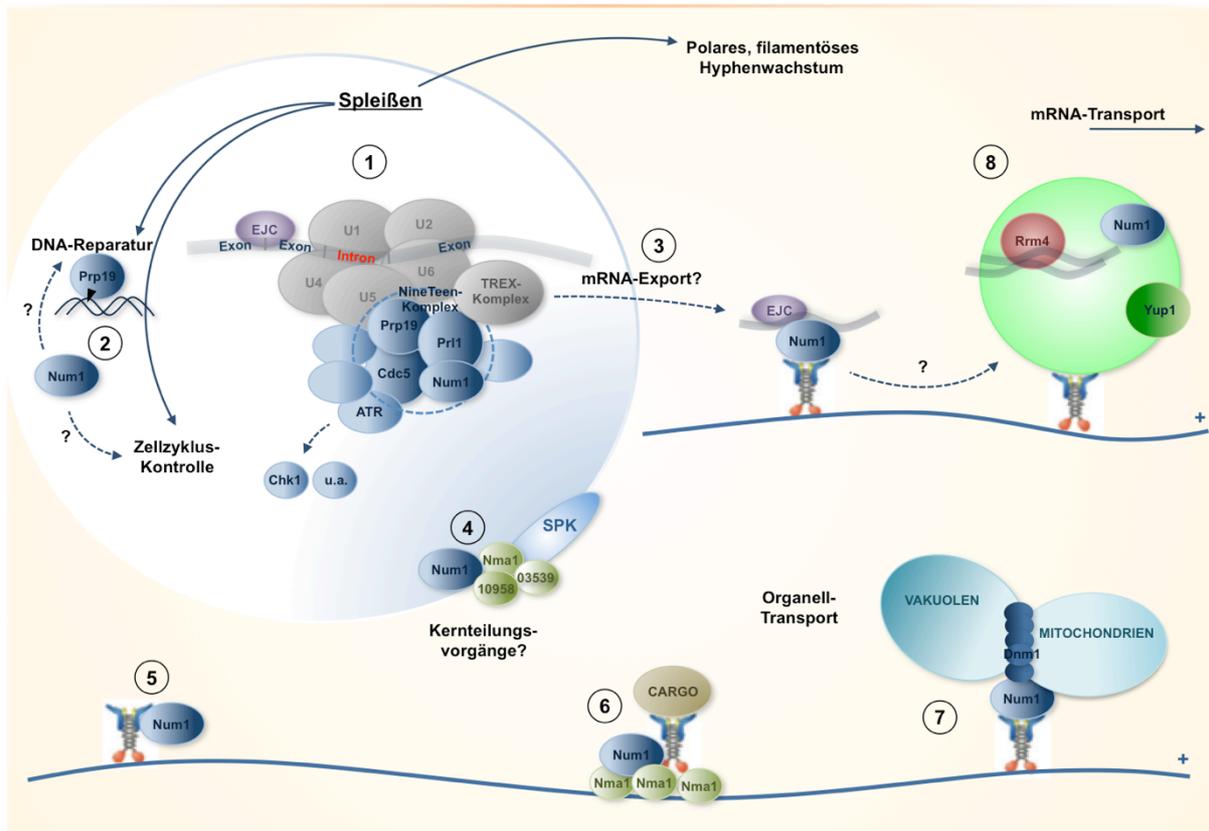


Abbildung 59: Zusammenfassung der putativen Num1-Funktionen im Zellkern und im Zytoplasma. (1) Das Num1-Protein ist eine Kernkomponente des Spleißosom-assoziierten NTC. Als Scaffold-Protein stabilisiert es die Zusammensetzung des Komplexes sowie die Interaktion mit anderen NTC-Komponenten und/oder weiteren Spleißing-Faktoren, was zur Aktivierung des Spleißosoms führt und für die Effizienz und Genauigkeit der Spleiß-Reaktionen sorgt. Das aberrante Spleißen in *num1*-Deletionsstämmen hat indirekte Auswirkungen auf das polare, filamentöse Hyphenwachstum, die DNA-Reparatur sowie die Zellzyklus-Kontrolle. (2) Zusätzlich kann Num1 als Zellkern-Matrix Protein die RNA-Prozessierungsmaschinerie und/oder weitere Komplexe, z.B. für die DNA-Reparatur, strukturell unterstützen, was auch direkte Auswirkungen auf diese Prozesse haben würde. (3) Über die Rekrutierung und/oder Stabilisierung des NTC-assoziierten TREX-Komplex beeinflusst das Num1-Protein womöglich den mRNA-Export aus dem Nukleus. (4) Das Num1-Protein ist mit Komponenten des Spindelpol-Körpers assoziiert, was seine Rolle bei Kernteilungsvorgängen erklären würde. (5) Im Zytoplasma ist das Num1-Protein maßgeblich an intrazellulären Transportvorgängen beteiligt. Als regulatorisches Rezeptormolekül hat es eine mögliche Auswirkung auf die Aktivierung und/oder Regulation der Aktivität des Kin1-Motorproteins. (6) Num1 interagiert mit dem Mikrotubuli-assoziierten Nma1-Protein. Es wurde daher eine mögliche Funktion als Bindeglied zwischen dem Mikrotubuli-Zytoskelett diskutiert, um Motorproteine (Kin1) für einen regulierten Transport zu rekrutieren. (7) Das Num1-Protein agiert möglicherweise auch als Adaptermolekül zwischen dem Kin1-Motorprotein und der transportierten Fracht, z.B. Organellen wie Endosomen, Mitochondrien oder Vakuolen. Dabei dient es entweder der Stabilisierung des Motorprotein/Cargo-Komplexes oder aber es hat durch die Selektion des Cargos einen regulatorischen Einfluss auf die Transportprozesse. (8) Weiterhin ist ein funktionelles Zusammenwirken zwischen Num1 und dem RNA-Bindeprotein Rrm4 untersucht worden. Num1 könnte einen Einfluss auf das Verpacken der exportierten mRNA in die mRNP-Partikel oder deren Mikrotubuli-basierten Transport haben. Alternativ könnte es als Chaperon die korrekte Faltung oder Stabilisierung der lokal translatierten Proteine unterstützen.

transportierten Fracht, den mRNP-Partikeln, dienen. Obwohl der direkte anterograde Transport hauptsächlich durch das Kin3-Motorprotein vermittelt wird, kann nicht ausgeschlossen werden, dass das „Docking“ der mRNP-Partikel an die Transportmaschinerie zunächst über das konventionelle Kinesin verläuft, von wo aus die Fracht dann auf die anderen Motorproteine weitergegeben wird.

Weiterhin ist denkbar, dass das Num1-Protein nicht direkt über eine Sequenzspezifität zur Selektion der transportierten Transkripte beiträgt und auch kein direkter Bestandteil der Transportmaschinerie ist

sondern vielmehr einen indirekten Einfluss auf die Genexpression hat. Es könnte sich z.B. um ein Chaperon handeln, das zusammen mit den mRNP-Partikeln transportiert ist, um bei der lokalen Translation der Proteine für die korrekte Faltung und Stabilität der synthetisierten Proteine zu sorgen. In der vorliegenden Studie wurden transkriptionelle Netzwerke untersucht, die durch das Num1-Protein, eine Komponente des evolutionär konservierten, Spleißosom-assoziierten Prp19/CDC5L-Komplex in *U. maydis*, vermittelt werden. Mit Hilfe der RNA-Seq Analyse konnte eine Genom-weite differentielle Spleißing-Regulation in *num1*-defizienten Stämmen aufgeklärt werden. Weitere Erkenntnisse über die Spleißing-unabhängigen zytoplasmatischen Num1-Funktionen können durch Massenspektroskopie der mit Num1 assoziierten Komplexpartner gewonnen werden und möglicherweise neue Einblicke bezüglich einer funktionellen Verbindung zwischen dem Spleißen und intrazellulären Transportprozessen aufzeigen.

4. Material und Methoden

4.1 Material und Bezugsquellen

4.1.1 Chemikalien, Puffer, Lösungen, Enzyme, Kits und Medien

Chemikalien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien waren p.a. Qualität und wurden von den Firmen Ambion, Amersham, BioRad, Carl Roth, Difco, Duchefa, Fluka, Gerbu, Invitrogen, Merck, Pharmacia, Riedel-de-Han, Seakem, Serva, und Sigma-Aldrich bezogen. Für weitere Einzelheiten siehe (Brachmann, 2001).

Puffer und Lösungen

Standard-Puffer und Lösungen wurden nach (Ausubel *et al.*, 1987), (Sambrook *et al.*, 1989) und (Sambrook und Russell, 2001) hergestellt. Spezielle Puffer und Lösungen sind unter den jeweiligen Methoden aufgeführt.

Enzyme

Tabelle 8: In dieser Arbeit verwendete Enzyme

Name	Bezugsquelle
Albumin (aus Rinderpankreas)	Sigma-Aldrich
Antarktische Phosphatase	New England Biolabs
<i>E. coli</i> DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment)	New England Biolabs
Glucanex	Novo Nordisk
Lysozym (aus Hühnerei)	Boehringer
Novozym 234	Novo Nordisk
PHUSION [®] DNA-Polymerase	New England Biolabs bzw. eigene Präparation
Restriktionsenzyme	New England Biolabs
Ribonuklease A (aus Rinderpankreas)	Boehringer
T4 DNA-Ligase	New England Biolabs
T4 DNA-Polymerase	New England Biolabs
Taq-Polymerase	eigene Präparation

Verwendete Kits

In dieser Arbeit wurden folgende Kits verwendet: Agilent RNA 6000 Nano Kit (Agilent) für die Analyse und Quantifizierung von Gesamt-RNA, DIG High Prime Kit (Roche) zur Herstellung Digoxigenin-markierter Sonden für Southern Analysen, JETsorb (Genomed) zur Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen, MesaGreen qPCR MasterMix for SYBR Assay Kit (Eurogentech) für qRT-PCR Analysen, ProtoScript AMV First Strand cDNA Synthesis Kit (NEB) und SuperScript III (Invitrogen) für die Erststrang cDNA Synthese bei der reversen Transkription von mRNA, Qiaquick Gel Extraction Kit (Qiagen) zur Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen, Qiaquick PCR Purification Kit (Qiagen) zur Aufreinigung von DNA-Fragmenten und PCR-Produkten, Qiaprep Spin

Miniprep Kit (Qiagen) zur Isolierung hochreiner Plasmid-DNA aus *E. coli*, RNeasy Kit (Qiagen) zur Aufreinigung hochreiner Gesamt-RNA, RotiPrep Plasmid Mini (Carl Roth) zur Aufreinigung von Plasmiden vor der Sequenzierung, TOPO-TA Cloning Kit Dual Promoter (Invitrogen) zur Klonierung von DNA-Fragmenten, TurboDNase Kit (Ambion) für die Aufreinigung von RNA für qRT-PCR Analysen.

Medien

Medien für die Kultivierung von *E. coli* (Sambrook *et al.*, 1989)

LB-Medium

10g Bacto Trypton
5g Hefeextrakt
10g NaCl
Mit H₂O_{bid.} auf 1L aufgefüllt und autoklaviert, für Festmedien wurden 15g/L Agar zugefügt.

YT-Festmedium

8 g Bacto Trypton
5 g Hefeextrakt
5 g NaCl
15 g Agar
Mit H₂O_{bid.} auf 1L aufgefüllt und autoklaviert.

dYT-Flüssigmedium

16 g Bacto Trypton
10 g Hefeextrakt
5 g NaCl
Mit H₂O_{bid.} auf 1L aufgefüllt und autoklaviert. Ampicillin- bzw. Kanamycinhaltige Medien wurden nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf ca. 60°C mit steriler Ampicillin-Lösung (10 mg/ml) (Endkonzentration 100 µg/ml), bzw. steriler Kanamycin-Lösung (10 mg/ml) (Endkonzentration 40 µg/ml) versetzt.

Medien für die Kultivierung von *S. cerevisiae* (Guthrie, 2004)

YPDA-Medium

10 g Hefeextrakt
20 g Bacto Pepton
0,003% (w/v) Adenin-hemisulfat
Mit H₂O_{bid.} auf 980 ml aufgefüllt und autoklaviert. Für Festmedium wurden 15 g Agar zugefügt. Nach dem Autoklavieren wurde 2% (v/v) 50% Glukose (1% f.c.) zugefügt.

5x Synthetic Complete (SC) –LWHA Medium

6,7 g Hefe Stickstoff-Basismedium
1,7 g „Drop out additive“ –Leu –Trp –His –Ade
In 200 ml H₂O_{bid.} gelöst, mit 760 ml sterilem H₂O_{bid.} (für Flüssigmedium) oder 760 ml autoklaviertem 2% Agar (für Festmedium) und 40 ml 50% (w/v) Glukose aufgefüllt.

5x Synthetic Complete (SC) –LW Medium

6,7 g Hefe Stickstoff-Basismedium
1,7 g „Drop out additive“ –Leu –Trp –His –Ade
76 mg Adenin-Hemisulfat
76 mg Histidin-
In 200 ml H₂O_{bid.} gelöst, mit 760 ml sterilem H₂O_{bid.} (für Flüssigmedium) oder 760 ml autoklaviertem 2% Agar (für Festmedium) und 40 ml 50% (w/v) Glukose aufgefüllt.

Medien für die Kultivierung von *U. maydis*

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

1,5 g NH₄NO₃
2,5 g Casein-Hydrolysat
0,5 g Heringssperma DNA
1 g Hefeextrakt
10 ml Vitamin-Lösung (s.u.)
62,5 ml Salz-Lösung (s.u.)
0,5 ml Spurenelement-Lösung (s.u.)
20 g Agar
Mit H₂O_{bid.} auf 980 ml aufgefüllt, der pH-Wert wurde mit NaOH auf pH 7,0 eingestellt. Nach dem Autoklavieren wurde 2% (v/v) 50% sterile Glukose-Lösung (1% f.c.) zugefügt.

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

1,5 g NH₄NO₃
2,5 g Casein-Hydrolysat
0,5 g Heringssperma DNA
1 g Hefeextrakt
10 ml Vitamin-Lösung (s.u.)
62,5 ml Salz-Lösung (s.u.)
0,5 ml Spurenelement-Lösung (s.u.)
Mit H₂O_{bid.} auf 980 ml aufgefüllt, der pH-Wert wurde mit NaOH auf pH 7,0 eingestellt. Nach dem Autoklavieren wurde 2% (v/v) 50% sterile Glukose- (1% f.c.) oder 4% (v/v) 25% sterile Arabinose-Lösung (1% f.c.) zugefügt.

Nitrat-Minimalmedium (Scherer *et al.*, 2006)

62,5 ml Salz-Lösung (s.u.)
3,8 g KNO₃
Mit H₂O_{bid.} auf 980 ml aufgefüllt, der pH-Wert wurde mit NaOH auf pH 7,0 eingestellt. Nach dem Autoklavieren wurde 2% (v/v) 50% sterile Glukose-Lösung (1% f.c.) oder 4% (v/v) 25% sterile Arabinose-Lösung (1% f.c.) zugefügt.

Salz-Lösung (Holliday, 1974)

8 g KH_2PO_4
 2 g Na_2SO_4
 1 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$
 Mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid}}$ auf 1L aufgefüllt und autoklaviert.

Spurenelemente-Lösung (Holliday, 1974)

60 mg H_3BO_3
 191 mg MnCl_2
 400 mg ZnCl_2
 47 mg $\text{NaMoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$
 140 mg $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$
 557 mg $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$
 Mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid}}$ auf 1L aufgefüllt und sterilfiltriert.

Vitamin-Lösung (Holliday, 1974)

100 mg Thiamin
 20 mg Calciumpanthothenat
 50 mg p-Aminobenzoensäure
 20 mg Nikotinsäure
 20 mg Cholinchlorid
 40 mg myo-Inositol
 50 mg Folsäure
 Mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid}}$ auf 1L aufgefüllt und sterilfiltriert.

NSY-Glycerin (Einfriermedium)

8 g Nutrient Broth
 1 g Hefeextrakt
 5 g Sukrose
 800 ml 87% Glycerin
 Mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid}}$ auf 1L aufgefüllt und sterilfiltriert.

PD-Festmedium

39 g Kartoffeleextrakt-Glukose Agar
 Mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid}}$ auf 1L aufgefüllt und autoklaviert.

Regenerationsagar_{light} (Schulz *et al.*, 1990)

a) Top-Agar:
 15 g (w/v) Agar
 182,2 g (w/v) Sorbitol
 10 g (w/v) Hefeextrakt
 4 g (w/v) Bacto Pepton
 4 g (w/v) Sukrose
 Mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid}}$ auf 1L aufgefüllt und autoklaviert.

b) Bottom-Agar

wie a), zusätzlich wurden Antibiotika zugegeben:
 Für Hygromycin betrug die Endkonzentration
 400 $\mu\text{g/ml}$, für Nourseothricin 100 $\mu\text{g/ml}$ und für
 Carboxin 4 $\mu\text{g/ml}$.

YEPS_{light}-Flüssigmedium (Tsukuda *et al.*, 1988)

10 g Hefeextrakt
 4 g Bacto Pepton
 4 g Sukrose
 Mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid}}$ auf 1L aufgefüllt und autoklaviert.
 Hygromycin-, Nourseothricin- bzw. Carboxin-
 haltige Medien wurden nach dem Autoklavieren auf
 ca. 60°C abgekühlt und die sterilen Lösungen
 wurden zugegeben. Für Platten betrug die

Endkonzentration von Hygromycin 200 $\mu\text{g/ml}$, von
 Nourseothricin 50 $\mu\text{g/ml}$ und von Carboxin
 2 $\mu\text{g/ml}$.

Medien für die Kultivierung von *A. nidulans***Komplex-Medium (CM)** (Pontecorvo *et al.*, 1953)

50 ml Salz-Stammlösung (s.u.)
 1 ml Spurenelemente-Lösung (s.u.)
 1 ml Vitamin-Lösung (s.u.)
 20 g Glukose
 2 g Pepton
 1 g Hefeextrakt
 1 g Casein-Hydrolysat
 Mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid}}$ auf 1L aufgefüllt und autoklaviert, der
 pH-Wert wurde zuvor mit NaOH auf pH 6,5
 eingestellt. Für Festmedien wurden 15g/L Agar
 zugefügt.

Minimal-Medium (MM) (Hill, 2001)

50 ml Salz-Stammlösung (s.u.)
 1 ml Spurenelemente-Lösung (s.u.)
 20 g Glukose
 Mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid}}$ auf 1L aufgefüllt und autoklaviert, der
 pH-Wert wurde zuvor mit NaOH auf pH 6,5
 eingestellt. Für Festmedien wurden 15g/L Agar
 zugefügt. Für Regenerationsmedien nach der
 Protoplasten-Transformation wurde zusätzlich
 0,6 M KCl als osmoprotektive Substanz zugegeben.
 Als Auxotrophiemarker wurde 1ml/L Pyridoxin-
 HCl (0,1 g/100ml in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid}}$) verwendet.

Salz-Stammlösung (20x)

120 g NaNO_3
 10,4 g KCl
 10,4 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$
 30,4 g KH_2PO_4
 Mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid}}$ auf 1L aufgefüllt und autoklaviert.

Spurenelemente-Lösung (1000x)

2,2 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$
 1,1 g H_3BO_3
 0,5 g $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$
 0,5 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$
 0,16 g $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$
 0,16 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$
 0,11 g $(\text{NH}_4)\text{MO}_7\text{O}_{24} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$
 5 g $\text{Na}_4 \text{EDTA}$
 Mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid}}$ auf 100 ml aufgefüllt und auf 99°C
 erhitzt. Nach dem Abkühlen auf ca. 60°C wurde der
 pH-Wert mit KOH auf pH 6,5-6,8 eingestellt.

Vitamin-Lösung (1000x)

0,1 g D-Biotin
 0,1g Pyridoxin-HCl
 0,1 g Thiamin-HCl
 0,1 g Riboflavin
 0,1 g p-Aminobenroësäure
 0,1 g Nikotinsäure
 Mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid}}$ auf 1L aufgefüllt und sterilfiltriert.

Sonstige Materialien

Filterpapier 3MM (Whatman), Glasperlen 150-212 microns (Sigma), Roti[®]-Nylon plus Membran (Carl Roth) für den Transfer von DNA (Southern Blot), Roti[®]-PVDF-Membran (Carl Roth) für den Transfer von Proteinen (Western Blot), Nitrozellulose-Membran (Millipore), Papierfilter (S&S 595), 1,5 ml-Reaktionsgefäße (Sarstedt) und 2 ml-Reaktionsgefäße (Greiner), 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäße (Biozym), 96-well PCR-Platten (Biozym) für qRT-PCR, Standard Universal Pipettenspitzen (0,5-10 μ l, 2-200 μ l und 100-1000 μ l) (Sarstedt, Carl Roth), Kapillarspitzen (Biozym), Petrischalen (Sarstedt), 15 ml und 50 ml PPN-Röhrchen (Greiner), 1,5 ml Polystyrol-Küvetten (Sarstedt), Elektroporationsküvetten (Peqlab), 0,20 μ m Sterilfilter (Carl Roth), 1 ml Einmalspritzen (Dispomed), Einmal-Injektionskanülen (B. Braun), Thermalpapier (Hitachi).

4.1.2 Stämme

Escherichia coli

Für sämtliche Klonierungen wurde der Stamm TOP10 (Invitrogen) verwendet, ein Derivat von *E. coli* DH10B mit folgenden genetischen Markern: F- mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 nupG recA1 araD139 Δ (ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(Str^R) endA1 λ -. Die Nomenklatur von *E. coli*-Stämmen richtet sich nach (Demerec *et al.*, 1966).

Saccharomyces cerevisiae

Für sämtliche Hefe-Zwei-Hybrid Analysen wurde der Stamm AH109 (James *et al.*, 1996) Holtz, unveröffentlicht) verwendet. Der Stamm trägt den Genotyp MATa trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200 gal4 Δ , gal80 Δ , LYS2::GAL1UAS-GAL1TATA-HIS3, GAL2UAS-GAL2TATA-ADE2, URA3::MEL1UAS-MEL1TATA-lacZ.

Ustilago maydis

Tabelle 9: In dieser Arbeit verwendete *U. maydis* Ausgangsstämme

Stamm	Genotyp	Resistenz	Referenz
FB1	a1, b1	-	(Banuett und Herskowitz, 1989)
FB2	a2, b2	-	(Banuett und Herskowitz, 1989)
AB31	a2, P _{crg1} : bE1, P _{crg1} : bW2	Phleo ^R	(Brachmann <i>et al.</i> , 2001)
SG200	a1:mfa2, bE1, bW2	Phleo ^R	(Kämper <i>et al.</i> , 2006)
FBD11	a1/a2, b1/b2, ade ⁻⁺ , pan ⁻⁺	-	(Banuett und Herskowitz, 1989)
UNK10	a2, P _{crg1} : bE1, P _{crg1} : bW2, num1:3egfp	Phleo ^R , Hyg ^R	(Kellner, 2009)
UKH11	a1:mfa2, bE1, bW2, Δ num1::hyg ^R	Phleo ^R , Hyg ^R	(Heimel, 2010)
UKH12	a1:mfa2, bE1, bW2, Δ num1::hyg ^R	Phleo ^R , Hyg ^R	(Heimel, 2010)
FB1 Δ num1	a1, b1, Δ num1::hyg ^R #1	Hyg ^R	Hassinger, unveröffentlicht
FB1 Δ num1	a1, b1, Δ num1::hyg ^R #6	Hyg ^R	Hassinger, unveröffentlicht

FB1 Δ num1	a1, b1, Δ num1::hyg ^R #10	Hyg ^R	Hassinger, unveröffentlicht
FB2 Δ num1	a2, b2, Δ num1::hyg ^R #8	Hyg ^R	Hassinger, unveröffentlicht
FB2 Δ num1	a2, b2, Δ num1::hyg ^R #9	Hyg ^R	Hassinger, unveröffentlicht
FB2 Δ num1	a2, b2, Δ num1::hyg ^R #11	Hyg ^R	Hassinger, unveröffentlicht
UKH95	a1, b1, ip ^R , P _{mig2_5::nls:egfp} , ip ^S , /P _{otef::2rfp:nat} ^R	Cbx ^R , Nat ^R	Heimel, unveröffentlicht
UKH96	a2, b2, ip ^R , P _{mig2_5::nls:egfp} , ip ^S , /P _{otef::2rfp:nat} ^R	Cbx ^R , Nat ^R	Heimel, unveröffentlicht
AB33 Kin1:eGFP	a2, P _{nar1::bE1} , P _{nar1::bW2} , /egfp3:kin1	Phleo ^R , Nat ^R	(Schuchardt <i>et al.</i> , 2005)
AB33 Dyn2:eGFP	a2, P _{nar1::bE1} , P _{nar1::bW2} , 3egfp:dyn2	Phleo ^R , Nat ^R	(Lenz <i>et al.</i> , 2006)
AB33:Yup1:eGFP	a2, P _{nar1::bE1} , P _{nar1::bW2} , /P _{otef::yup1:egfp}	Phleo ^R , Cbx ^R	(Lenz <i>et al.</i> , 2006)
AB33 Yup1:eGFP, Tub1:RFP	a2, P _{nar1::bE1} , P _{nar1::bW2} , /P _{otef::rfp:tub1} , /P _{otef::yup1:egfp}	Phleo ^R , Cbx ^R , Hyg ^R	(Lenz <i>et al.</i> , 2006)
AB31 LifeAct:YFP	a2, P _{crq1::bE1} , P _{crq1::bW2} , ip ^R , p123 lifeact:yfp, ip ^S	Phleo ^R , Cbx ^R	Schink, unveröffentlicht
AB31 Sec4:eGFP	a2, P _{crq1::bE1} , P _{crq1::bW2} , ip ^R , p123 sec4:egfp, ip ^S	Phleo ^R , Cbx ^R	(Freitag <i>et al.</i> , 2011)
BUB7/pKS2/pCudg1	a1, b3, /P _{crq1::mtRFP} , cbx ^R , /P _{crq1::dnm1:egfp} , nat ^R	Cbx ^R , Nat ^R	(Mahlert <i>et al.</i> , 2009)
FB1/pKS2	a1, b1, /P _{crq1::mtRFP}	Cbx ^R	(Mahlert <i>et al.</i> , 2009)
FB2/pKS1	a2, b2, /P _{crq1::mtGFP}	Cbx ^R	(Mahlert <i>et al.</i> , 2009)
FB1/pKS2 Δ dnm1	a1, b1, /P _{crq1::mtRFP} , Δ dnm1::hyg ^R	Cbx ^R , Hyg ^R	(Mahlert <i>et al.</i> , 2009)
FB2/pKS1 Δ dnm1	a2, b2, /P _{crq1::mtGFP} , Δ dnm1::hyg ^R	Cbx ^R , Hyg ^R	(Mahlert <i>et al.</i> , 2009)
AB33 Rrm4:eGFP	a2, P _{nar1::bE1} , P _{nar1::bW2} , rrm4:egfp, nat ^R	Phleo ^R , Nat ^R	(Becht <i>et al.</i> , 2006)
AB33 Pab1:eGFP	a2, P _{nar1::bE1} , P _{nar1::bW2} , pab1:egfp, nat ^R	Phleo ^R , Nat ^R	(König <i>et al.</i> , 2009)
AB33 Rrm4:eGFP Pab1:RFP	a2, P _{nar1::bE1} , P _{nar1::bW2} , rrm4:egfp, nat ^R , pab1:rfp, hyg ^R	Phleo ^R , Nat ^R , Hyg ^R	(König <i>et al.</i> , 2009)
AB33 Δ rrm4	a2, P _{nar1::bE1} , P _{nar1::bW2} , Δ rrm4::hyg ^R	Phleo ^R , Hyg ^R	(Becht <i>et al.</i> , 2006)

Tabelle 10: In dieser Arbeit hergestellte *U. maydis* Stämme

Stamm	Ausgangsstamm	Genotyp	Resistenz
UNK 11, 12, 13	AB33 Kin1:eGFP	a2, P _{nar1::bE1} , P _{nar1::bW2} , /egfp3:kin1, Δ num1::hyg ^R	Phleo ^R , Nat ^R , Hyg ^R
UNK 15, 16, 17	AB33:Yup1:eGFP	a2, P _{nar1::bE1} , P _{nar1::bW2} , /P _{otef::yup1:egfp} , Δ num1::hyg ^R	Phleo ^R , Cbx ^R , Hyg ^R
UNK 24, 25, 26	AB33 Yup1:eGFP, Tub1:RFP	a2, P _{nar1::bE1} , P _{nar1::bW2} , /P _{otef::rfp:tub1} , /P _{otef::yup1:egfp} , Δ num1::nat ^R	Phleo ^R , Cbx ^R , Hyg ^R , Nat ^R
UNK 32, 33, 34	AB33:Yup1:eGFP	a2, P _{nar1::bE1} , P _{nar1::bW2} , /P _{otef::yup1:egfp} , Δ um11510::hyg ^R	Phleo ^R , Cbx ^R , Hyg ^R
UNK 36, 37, 38	SG200	a1:mfa2, bE1, bW2, Δ um11510::hyg ^R	Phleo ^R , Hyg ^R
UNK 39, 40, 41	SG200	a1:mfa2, bE1, bW2, Δ um03539::hyg ^R	Phleo ^R , Hyg ^R
UNK 42, 43, 44	AB33:Yup1:eGFP	a2, P _{nar1::bE1} , P _{nar1::bW2} , /P _{otef::yup1:egfp} , Δ um03539::hyg ^R	Phleo ^R , Cbx ^R , Hyg ^R
UNK 45, 46, 47	AB33 Dyn2:eGFP	a2, P _{nar1::bE1} , P _{nar1::bW2} , 3egfp:dyn2, Δ num1::cbx ^R	Phleo ^R , Nat ^R , Cbx ^R
UAß 1, 2, 3 ¹	AB33:Yup1:eGFP	a2, P _{nar1::bE1} , P _{nar1::bW2} , /P _{otef::yup1:egfp} , Δ um00933::hyg ^R	Phleo ^R , Cbx ^R , Hyg ^R
UAß 7,8,9 ¹	SG200	a1:mfa2, bE1, bW2, Δ um00933::hyg ^R	Phleo ^R , Hyg ^R
UNK 59	AB31	a2, P _{crq1::bE1} , P _{crq1::bW2} , num1:ngfp, hyg ^R	Phleo ^R , Hyg ^R
UNK 77, 80	UNK 59	a2, P _{crq1::bE1} , P _{crq1::bW2} , num1:ngfp, hyg ^R , kin1:cgfp, nat ^R	Phleo ^R , Hyg ^R , Nat ^R
UNK 78	UNK 59	a2, P _{crq1::bE1} , P _{crq1::bW2} , num1:ngfp, hyg ^R , um10958:cgfp, nat ^R	Phleo ^R , Hyg ^R , Nat ^R
UNK 89	UNK 59	a2, P _{crq1::bE1} , P _{crq1::bW2} , num1:ngfp, hyg ^R , um00933:cgfp, nat ^R	Phleo ^R , Hyg ^R , Nat ^R
UNK 90, 91, 92	UNK 77	a2, P _{crq1::bE1} , P _{crq1::bW2} , num1:ngfp, hyg ^R , kin1:cgfp, nat ^R , P _{otef::rfp:tub1}	Phleo ^R , Hyg ^R , Nat ^R , Cbx ^R
UNK 96, 97, 98	UNK 78	a2, P _{crq1::bE1} , P _{crq1::bW2} , num1:ngfp, hyg ^R , um10958:cgfp, nat ^R , P _{otef::rfp:tub1}	Phleo ^R , Hyg ^R , Nat ^R , Cbx ^R
UNK 102, 103	SG200	a1:mfa2, bE1, bW2, ip ^R , P _{otef::tap-tag:egfp} , ip ^S	Phleo ^R , Cbx ^R
UNK 104, 105, 106	SG200	a1:mfa2, bE1, bW2, um10958:3egfp, hyg ^R	Phleo ^R , Hyg ^R

UNK 107, 108, 109	AB31	<i>a2, P_{crq1}: bE1, P_{crq1}:bW2, Δnum1::hyg^R</i>	Phleo ^R , Hyg ^R
UNK 110, 111, 112	AB31	<i>a2, P_{crq1}: bE1, P_{crq1}:bW2, um10958:3egfp, hyg^R</i>	Phleo ^R , Hyg ^R
UNK 113, 114, 115	AB31 LifeAct:YFP	<i>a2, P_{crq1}: bE1, P_{crq1}:bW2, ip^R, p123 lifeact:yfp, ip^S, Δnum1::hyg^R</i>	Phleo ^R , Cbx ^R , Hyg ^R
UNK 116, 117, 118	AB31 Sec4:eGFP	<i>a2, P_{crq1}: bE1, P_{crq1}:bW2, ip^R, p123 sec4:egfp, ip^S, Δnum1::hyg^R</i>	Phleo ^R , Cbx ^R , Hyg ^R
UNK 119, 120	AB31	<i>a2, P_{crq1}: bE1, P_{crq1}:bW2, ip^R, p123 tub1:mCherry, ip^S</i>	Phleo ^R , Cbx ^R
UNK 121, 122, 123	UNK 107	<i>a2, P_{crq1}: bE1, P_{crq1}:bW2, ip^R, p123 tub1:mCherry, ip^S, Δnum1::hyg^R</i>	Phleo ^R , Cbx ^R , Hyg ^R
UNK 124, 125	AB31	<i>a2, P_{crq1}: bE1, P_{crq1}:bW2, ip^R, p123 sec3:mCherry, ip^S</i>	Phleo ^R , Cbx ^R
UNK 126, 127	UNK 107	<i>a2, P_{crq1}: bE1, P_{crq1}:bW2, ip^R, p123 sec3:mCherry, ip^S, Δnum1::hyg^R</i>	Phleo ^R , Cbx ^R , Hyg ^R
UNK 128, 129, 130	UNK 59	<i>a2, P_{crq1}: bE1, P_{crq1}:bW2, num1:ngfp, hyg^R, ip^R, P_{otef}:cgfp, ip^S</i>	Phleo ^R , Hyg ^R , Cbx ^R
UTO 1, 2, 3 ²	FB1/pKS2	<i>a1, b1, /P_{crq1}:mtRFP, Δnum1::hyg^R</i>	Cbx ^R , Hyg ^R
UTO 4, 5, 6 ²	FB2/pKS1	<i>a2, b2, /P_{crq1}:mtGFP, Δnum1::hyg^R</i>	Cbx ^R , Hyg ^R
UTO 7, 8, 9 ²	BUB7/pKS2/pCudg1	<i>a1, b3, /P_{crq1}:mtRFP, cbx^R, /P_{crq1}:dnm1:egfp, nat^R, Δnum1::hyg^R</i>	Cbx ^R , Nat ^R , Hyg ^R
UTO 10, 11, 12 ²	AB31	<i>a2, P_{crq1}: bE1, P_{crq1}:bW2, Δdnm1::hyg^R</i>	Phleo ^R , Hyg ^R
UTO 13, 14, 15 ²	SG200	<i>a1:mfa2, bE1, bW2, Δdnm1::hyg^R</i>	Phleo ^R , Hyg ^R
UNK 143, 144, 145	UNK 107	<i>a2, P_{crq1}: bE1, P_{crq1}:bW2, Δnum1::hyg^R, Δdnm1::nat^R</i>	Phleo ^R , Hyg ^R , Nat ^R
UNK 146, 147, 148	FB2	<i>a2, b2, Δkin1::nat^R</i>	Nat ^R
UNK 149, 150, 151	UKH95	<i>a1, b1, ip^R, P_{mjg2-5}:nls:egfp, ip^S, /P_{otef}:2rfp:nat^R, Δnum1::hyg^R</i>	Cbx ^R , Nat ^R , Hyg ^R
UNK 152, 153, 154	UKH96	<i>a2, b2, ip^R, P_{mjg2-5}:nls:egfp, ip^S, /P_{otef}:2rfp:nat^R, Δnum1::hyg^R</i>	Cbx ^R , Nat ^R , Hyg ^R
UNK 155	BUB7/pKS2/pCudg1	<i>a1, b3, /P_{crq1}:mtRFP, cbx^R, /P_{crq1}:dnm1:egfp, nat^R, num1:3xHA, hyg^R</i>	Cbx ^R , Nat ^R , Hyg ^R
UNK 156, 157, 158	AB31	<i>a2, P_{crq1}: bE1, P_{crq1}:bW2, ip^R, P_{crq1}:num1, ip^S</i>	Phleo ^R , Cbx ^R
UNK 162, 163, 164	AB31	<i>a2, P_{crq1}: bE1, P_{crq1}:bW2, ip^R, P_{crq1}:num1¹⁻³⁰⁹, ip^S</i>	Phleo ^R , Cbx ^R
UTO 22, 23, 24 ³	UNK 107	<i>a2, P_{crq1}: bE1, P_{crq1}:bW2, Δnum1::hyg^R, ip^R, P_{crq1}:num1¹⁻³⁰⁹, ip^S</i>	Phleo ^R , Hyg ^R , Cbx ^R
UTO 25, 26, 27 ³	FB1Δnum1	<i>a1, b1, Δnum1::hyg^R, ip^R, P_{crq1}:num1¹⁻³⁰⁹, ip^S</i>	Hyg ^R , Cbx ^R
UTO 28, 29, 30 ³	FB2Δnum1	<i>a2, b2, Δnum1::hyg^R, ip^R, P_{crq1}:num1¹⁻³⁰⁹, ip^S</i>	Hyg ^R , Cbx ^R
UNK 177, 178, 179	SG200	<i>a1:mfa2, bE1, bW2, num1¹⁻³⁰⁹:3egfp, hyg^R</i>	Phleo ^R , Hyg ^R
UNK 165, 166, 167	AB33 Kin1:eGFP	<i>a2, P_{nar1}:bE1, P_{nar1}:bW2, /egfp3:kin1, num1:3xHA, hyg^R</i>	Phleo ^R , Nat ^R , Hyg ^R
UNK 168, 169, 170	UNK 107	<i>a2, P_{crq1}: bE1, P_{crq1}:bW2, Δnum1::hyg^R, Δkin1::nat^R</i>	Phleo ^R , Hyg ^R , Nat ^R
UNK 171, 172	SG200	<i>a1:mfa2, bE1, bW2, Δkin1::hyg^R</i>	Phleo ^R , Hyg ^R
UNK 174, 175, 176	AB31	<i>a2, P_{crq1}: bE1, P_{crq1}:bW2, Δkin1::hyg^R</i>	Phleo ^R , Hyg ^R
UKT 1, 2, 3 ⁴	UNK10	<i>a2, P_{crq1}: bE1, P_{crq1}:bW2, num1:3egfp, hyg^R, Δkin1::nat^R</i>	Phleo ^R , Hyg ^R , Nat ^R
UKT 4, 5, 6 ⁴	UNK10	<i>a2, P_{crq1}: bE1, P_{crq1}:bW2, num1:3egfp, hyg^R, ip^R, P_{crq1}:kin1^{rigor}, ip^S</i>	Phleo ^R , Hyg ^R , Cbx ^R
UNK 185, 186, 187	AB33 Rrm4:eGFP	<i>a2, P_{nar1}:bE1, P_{nar1}:bW2, rrm4:egfp, nat^R, Δnum1::hyg^R</i>	Phleo ^R , Nat ^R , Hyg ^R
UNK 188, 189, 190	AB33 Pab1:eGFP	<i>a2, P_{nar1}:bE1, P_{nar1}:bW2, pab1:egfp, nat^R, Δnum1::hyg^R</i>	Phleo ^R , Nat ^R , Hyg ^R
UNK 191, 192, 193	AB33 Rrm4:eGFP Pab1:RFP	<i>a2, P_{nar1}:bE1, P_{nar1}:bW2, rrm4:egfp, nat^R, pab1:rfp, hyg^R, Δnum1::cbx^R</i>	Phleo ^R , Nat ^R , Hyg ^R , Cbx ^R
UNK 194, 195, 196	UNK 171	<i>a1:mfa2, bE1, bW2, Δkin1::hyg^R, Δnum1::nat^R</i>	Phleo ^R , Hyg ^R , Nat ^R
UNK 197, 198, 199	UNK 10	<i>a2, P_{crq1}: bE1, P_{crq1}:bW2, num1:3egfp, hyg^R, kin1:3xHA, cbx^R</i>	Phleo ^R , Hyg ^R , Cbx ^R
UNK 200, 201, 202	UNK 10	<i>a2, P_{crq1}: bE1, P_{crq1}:bW2, num1:3egfp, hyg^R, prp19:3xHA, cbx^R</i>	Phleo ^R , Hyg ^R , Cbx ^R
UNK 208	UNK 10	<i>a2, P_{crq1}: bE1, P_{crq1}:bW2, num1:3egfp, hyg^R, prp19:rfp, nat^R</i>	Phleo ^R , Hyg ^R , Nat ^R
UMO 1, 2, 3 ⁵	FBD11	<i>a1/a2, b1/b2, ade^{-/+}, pan^{-/+}, Δprp19::hyg^R</i>	Hyg ^R
UMO 4, 5, 6 ⁵	FBD11	<i>a1/a2, b1/b2, ade^{-/+}, pan^{-/+}, Δcef1::hyg^R</i>	Hyg ^R
UMO 7, 8, 9 ⁵	UNK 10	<i>a2, P_{crq1}: bE1, P_{crq1}:bW2, num1:3egfp, hyg^R, cef1:3xHA, cbx^R</i>	Phleo ^R , Hyg ^R , Cbx ^R
UMO 10, 11, 12 ⁵	UNK 10	<i>a2, P_{crq1}: bE1, P_{crq1}:bW2, num1:3egfp, hyg^R</i>	Phleo ^R , Hyg ^R , Nat ^R

Stamm	Genotyp	Referenz
UNK 209, 210, 211	AB33 $\Delta rrm4$ <i>cef1::rfp, nat^R</i> <i>a2, P_{nar1}::bE1, P_{nar1}::bW2, $\Delta rrm4$::hyg^R, $\Delta num1$::nat^R</i>	Phleo ^R , Hyg ^R , Nat ^R
UNK 215, 216, 217	UNK 108 <i>a2, P_{crq1}::bE1, P_{crq1}::bW2, $\Delta num1$::hyg^R, ip^R, P_{crq1}::num1^{mutNLS}::egfp, ip^S</i>	Phleo ^R , Hyg ^R , Cbx ^R
UNK 218, 219, 220	UNK 108 <i>a2, P_{crq1}::bE1, P_{crq1}::bW2, $\Delta num1$::hyg^R, ip^R, P_{crq1}::num1::egfp, ip^S</i>	Phleo ^R , Hyg ^R , Cbx ^R
UNK 221, 222, 223	UNK 108 <i>a2, P_{crq1}::bE1, P_{crq1}::bW2, $\Delta num1$::hyg^R, ip^R, P_{crq1}::hBCAS2, ip^S</i>	Phleo ^R , Hyg ^R , Cbx ^R
UNK 224, 225, 226	UNK 108 <i>a2, P_{crq1}::bE1, P_{crq1}::bW2, $\Delta num1$::hyg^R, ip^R, P_{crq1}::hBCAS2::egfp, ip^S</i>	Phleo ^R , Hyg ^R , Cbx ^R
UNK 227, 228, 229	UNK 108 <i>a2, P_{crq1}::bE1, P_{crq1}::bW2, $\Delta num1$::hyg^R, ip^R, P_{crq1}::num1Δ_{1-138}, ip^S</i>	Phleo ^R , Hyg ^R , Cbx ^R
UNK 230, 231, 232	AB31 <i>a2, P_{crq1}::bE1, P_{crq1}::bW2, kin1::egfp, tap-tag, nat^R</i>	Phleo ^R , Nat ^R
UNK 242, 243, 244	UNK 232 <i>a2, P_{crq1}::bE1, P_{crq1}::bW2, kin1::egfp, tap-tag, nat^R, num1::3xHA, hyg^R</i>	Phleo ^R , Nat ^R , Hyg ^R
UNK 245, 246, 247	AB31 <i>a2, P_{crq1}::bE1, P_{crq1}::bW2, ip^R, P_{crq1}::num1Δ_{1-138}:: egfp, ip^S</i>	Phleo ^R , Cbx ^R
UNP 1, 2, 3 ⁶	AB31 <i>a2, P_{crq1}::bE1, P_{crq1}::bW2, um00933::3egfp, hyg^R</i>	Phleo ^R , Hyg ^R

a, b - Paarungstyp-Loci, *mfa2* - Pheromon-Gen, *E1, W2* - Gene des *b*-Paarungstyp-Locus, Δ - Deletion; P – Promotor, P_{otef} – konstitutiv aktiver Promotor (Spellig *et al.*, 1996), P_{nar1} – konditionaler Nitrat-Reduktase Promotor (Banks *et al.*, 1993), P_{crq1} – konditionaler Arabinose-induzierbarer Promotor (Bottin *et al.*, 1996), :: - homologer Austausch, : - Fusion, Phleo^R – Phleomycin-Resistenz, Cbx^R – Carboxin-Resistenz, Hyg^R – Hygromycin-Resistenz, Nat^R – Nourseothricin-Resistenz, / - ektopisch integriert.

Die homologen Rekombinationsereignisse wurden in allen in dieser Arbeit generierten Stämmen, wenn nicht anders angegeben, per Southern-Analyse und/oder analytischer PCR verifiziert.

¹ – F3-Praktikum Alexander Bisson

⁴ – Bachelorarbeit Katrin Trognitz

² – Bachelorarbeit Theresa Obhof

⁵ – Bachelorarbeit Melissa Ort

³ – F3-Praktikum Theresa Obhof

⁶ – Bachelorarbeit Niko Pinter

Aspergillus nidulans

Tabelle 11: In dieser Arbeit verwendete *A. nidulans* Ausgangsstämme

Stamm	Genotyp	Referenz
TNO2A3	<i>pyrG89-; argB2-, $\Delta nkuA$::argB; pyroA4-</i>	(Nayak <i>et al.</i> , 2006)
LZ12	<i>gfp-nudA; $\Delta nkuA$::argB; pyroA4-; pyrG89-</i>	(Zhuang <i>et al.</i> , 2007)

Tabelle 12: In dieser Arbeit hergestellte *A. nidulans* Stämme

Stamm	Genotyp
TNO2A3 $\Delta AN4244$	<i>pyrG89-; argB2-, $\Delta nkuA$::argB; pyroA4-; $\Delta AN4244$::pyroA4 #1</i>
TNO2A3 $\Delta AN4244$	<i>pyrG89-; argB2-, $\Delta nkuA$::argB; pyroA4-; $\Delta AN4244$::pyroA4 #2</i>
TNO2A3 $\Delta AN4244$	<i>pyrG89-; argB2-, $\Delta nkuA$::argB; pyroA4-; $\Delta AN4244$::pyroA4 #5</i>
LZ12 $\Delta AN4244$	<i>gfp-nudA; $\Delta nkuA$::argB; pyroA4-; pyrG89-; $\Delta AN4244$::pyroA4</i>

Maisvarietäten (*Zea mays spec.*)

Für sämtliche Pflanzeninfektionen wurde die Maisvarietät „Early Golden Bantam“ (Old Seeds Company, Madison, Wisconsin, USA) verwendet.

4.1.3 Nukleinsäuren, Oligonukleotide und Plasmide

Für die Herstellung von CM-Medium (s. 4.1.1) wurde Heringssperma-DNA (Sigma) verwendet. Für die Transformation von *S. cerevisiae* (s. 4.2.2) wurde Lachssperma-DNA als Träger-DNA (Invitrogen) verwendet. Für PCR-Reaktionen wurden dATP, dTTP, dCTP und dGTP (Jena Bioscience) eingesetzt. Für die Markierung Digoxigenin-markierter Sonden für Southern-Analysen wurden Digoxigenin-markierte dUTPs (Jena Bioscience) verwendet. Als DNA-Größenstandard wurde der GeneRuler DNA Ladder Mix[®] (Fermentas) verwendet.

Oligonukleotide

Sämtliche Oligonukleotide wurden von der Firma Eurofins MWG Operon synthetisiert.

Tabelle 13: In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide

Oligonukleotid/Funktion	Sequenz (5' → 3' Richtung)
Hefe-Zwei-Hybrid Analysen	
num1_Y2H_for	GTGGGCCATTACGGCCATGGCGAGAGCACGAGGTGGAT
num1_Y2H_rev	ATAGGCCGAGGCGGCCCTACTCCAACAGGGCTCAACTCTGTC
pGAD-DS_for	TACGACTCACTATAGGGCGAGCGCC
pGAD-DS_rev	TGGTGCACGATGCACAGTTGAAGTG
10027_Y2H_full_se	GTGGGCCATTACGGCCATGTTCTGCGCCATCTCTGGTGAG
10027_Y2H_full_as	ATAGGCCGAGGCGGCCCTCAGGCGGCGAGACCAAACG
10027_Y2H_Cterm_se	GTGGGCCATTACGGCCCCGTGGCAGACTTTGTAGAGGTGC
10027_Y2H_N_as	ATAGGCCGAGGCGGCCCGGTGCTTTACGTTTGGACTTGG
04411_Y2H_se	GTGGGCCATTACGGCCATGGTTTCGCGTCATCATCAAAGGC
04411_Y2H_as	ATAGGCCGAGGCGGCCCTAGGCAGACAGATTAGCCTCGTTG
num1 Deletion	
01682_LB_se	GACGCCGTACATGTCCCAGATTTTC
01682_LB_as	GTTGGCCATCTAGGCCCTGGATGGAGTAGCAGCGGCTTTTC
01682_RB_se	GTTGGCCTGAGTGGCCGCAGTGATGCGGTTTCATGTGTCC
01682_RB_as	TCCCACAGGGGACTCGAAGAATC
01682_nested_se	GTACCAGTCTGCGGATCGGAAGAC
01682_nested_as	TTGCGGCAGATTCTTCCAACCTCC
01682_PCR_se	AACACCTTGGCTGCCACATCGAC
01682_PCR_as	CTGTTGAAATTGGACAGCCTCC
prp19 Deletion	
10027_LB_se	CCCGTGACATGAGAAGCTTAACGTC
10027_LB_as	GTTGGCCATCTAGGCCGTTGACGCGATTGGCCCTTCT
10027_RB_se	GTTGGCCTGAGTGGCCTCGCCGTCTCATTCTTTTGTTTACC
10027_RB_as	GGAATATTTATCGTCAAGGCGCTCG
10027_nested_se	CGTGTCTTCTGTCTGTTGGTCCG
10027_nested_as	CCGTCCGACTGTGGTTGGTGC
10027_ORF_se	GTGGGCCATTACGGCCATGTTCTGCGCCATCTCTGGTGAG
10027_ORF_as	CGAACGGTACGGTCCAGACTCG
10027_LB_außen	GGTCCGAGTGTGAAGGAGG
10027_RB_außen	GCAAGATATCGGTTGCGTGAAC
hhn3	GTGGTAACTACCAGCGAGTT
hhn5	ACTAGATCCGATGATAAGCTG
cef1 Deletion	
04411_LB_se	CTGGCAGCTGCCTCCCTGATTCT
04411_LB_as	GTTGGCCATCTAGGCCGTTGACAATGAGAAGCCTGACAGC
04411_RB_se	GTTGGCCTGAGTGGCCTAGTTGTGGCCAAGCACAGATCATG
04411_RB_as	CTGTGAGCCTTGAAGTCTGCCA
04411_nested_se	TCTGTGGATAACAAGTCATGCTGCTC
04411_nested_as	TAAACGGACAACACAGACCTGCC
04411_ORF_se	ATGGTTCGCGTCATCATCAAAGG
04411_ORF_as	ATACGCGCCCACTGATTCTTGCC
04411_LB_außen	GTCTTATTAAGGCAGTCTGACGTC

04411_RB_außen	CAAGAGCGTGAGCTGCAGTC
kin1 Deletion	
kin1_LB_se	GTGTGCTTTGTGGAGGAAGTCCGAC
kin1_LB_as	GTTGGCCATCTAGGCCGACGACTTGCGGTGTAAGTGTGC
kin1_RB_se	GTTGGCCTGAGTGGCCCGTGAAGATCTATACGTTTCACCTT
kin1_RB_as	GCAATCTCAAGCGTCGCTATGA
kin1_nested_se	CCCACTCGACTCTGTGCCTTGTGAC
kin1_nested_as	CCAACACGGCTGCTTCCATTTC
kin1_ORF_se	ATGTCCAACAACATCAAGGTCGTC
kin1_ORF_as	CGAACTCAAAGACGTCGCGTTG
dnm1 Deletion	
05378_ORF_se	ATGGACGTCGACTTGATTCAGGTTG
05378_ORF_as	GACTTTCGGCTGATTGCGAACC
CBb6 (dnm1 fn)	CACACGGATATGAATAGCCTGTGG
CBb6r (dnm1 rn)	CAAGTGGAGCTGAGTGCGATCG
um03539 Deletion	
03539_LB_se	AGAATCAGTACTAGGTGGCGGGTG
03539_LB_as	GTTGGCCATCTAGGCCCTTGTAATCGAATGCGATGCA
03539_RB_senew	GTTGGCCTGAGTGGCCGATACCGGCCAAAGAGGTGCCTC
03539_RB_as	GGAACGTCGGCTTCCGACAATC
03539_nested_se	CACGATGACGTCGAGGTCGACT
03539_nested_as	TTCAGCAAGATCCTCAGTGCCG
03539_ORF_se	ATGGATCAGTGAAGAAATTCACCA
03539_ORF_as	CAGGCTTTGCGACATACAGGATAGT
um00933 Deletion	
00933_LB_se	CGCTCATTATGAAGTCGATCATCG
00933_LB_as	GTTGGCCATCTAGGCCCTTGACTAGTTCGTAACCTGGATCTTG
00933_RB_se	GTTGGCCTGAGTGGCCTCTTTGTCTTGAACGATCAGGAACT
00933_RB_as	CGAATATGCTATCTTTGCACAGCC
00933_nested_se	GAGGTGCTTCCCAAGGACTCGATC
00933_nested_as	GATTCTGCCTCGCCTGAACCTTTC
00933_ORF_se	CAGTGACCCCAACGAGTCAGCTCT
00933_ORF_as	CTTTGGAGTACCGGTAGCACGAGC
um11510 Deletion	
11510_LB_se	GGGCTGTTGCGGTTCTGATTCC
11510_LB_as	GTTGGCCATCTAGGCCCTGTTGAGGAGACACAAATGCCGTTG
11510_RB_se	GTTGGCCTGAGTGGCCCATGCCACCGGGATCTCGC
11510_RB_as	ACCCACAGCTGCCAAATCGAAAATG
11510_nested_se	ATCTTGTTGGCACCTTGTTCTGAAC
11510_nested_as	GGACAACCAACCGTTAGCTCCTTC
11510_ORF_se	ATGCCGCGAAACGTTCTATCTATCC
11510_ORF_as	GTTTGCCATGACGGCAGAGAGG
um10158 Deletion	
10158_LB_se	TTGTCCGTGTTGAAGATGGGGTT
10158_LB_as	GTTGGCCATCTAGGCCGCTAGGCTGTGCTGAGCCCAAC
10158_RB_se	GTTGGCCTGAGTGGCCTTCGCCCAATGTACTCTCAGAGA
10158_RB_as	GGTTTCCGTGGTGTCAAGGGTA
10158_nested_se	CACTCGAGTTCTGGTTGGATGCGT
10158_nested_as	TCAACAGCCTTTCCTCCTTCTCCG
10158_ORF_se	ATGAGTCGTCCTCGCTTCTTCAATG
10158_ORF_as	ACGAATGAGCGGATTTGGATCTTC
C-terminale num1 Fusion	
01682GFP_LB_se	CCAATTCTTAACGGCCGAAAAGAC
01682GFP_LB_as	GTGGGCCGCGTTGGCCCGCTCCAACAGGCTCAACTC
01682GFP_RB_Sfi	CACGGCCTGAGTGGCCTAGGCAGTGATGCGGTTTAT
01682GFP_RB_as	GACGGCATCGTTGCGTTGGAAG
C-terminale prp19 Fusion	
10027fusion_LB_se	CCGTGGCAGACTTTGTAGAGGTGC
10027fusion_LB_as	GGCCGCGTTGGCCCGGGCGGCGAGACCAAACGC
10027fusion_RB_se	GGCCTGAGTGGCCTCGCCGTCTCATTCTTTTGTTTACC

10027fusion_RB_as	GGAATATTTATCGTCAAGGCGCTCG
C-terminale <i>cef1</i> Fusion	
04411fusion_LB_se	CTCAAGCGGGCACGTAGCCTG
04411fusion_LB_as	GGCCGCGTTGGCCCGGCAGACAGATTAGCCTCGTTGAGAG
04411fusion_RB_se	GGCCTGAGTGGCCTCGCCGTCTCATTTCTTTTGTTTACC
04411fusion_RB_as	CTGTGAGCCTTGAAAGTCTGCCA
C-terminale <i>kin1</i> Fusion	
kin1fusion_LB_se	GGAGAACGAGCTACTGCATCAAAGG
kin1fusion_LB_as	GGCCGCGTTGGCCCGCTTGGACGAAAAGAACCAGCTGG
kin1fusion_RB_se	GGCCTGAGTGGCCACCTTACCTTACATACCCGATCTCTG
kin1fusion_RB_as	GCAATCTCAAGCGCTCGCTATGA
C-terminale <i>dnm1</i> Fusion	
dnm1fusion_LB_se	CGTCTGCACGCCAACTCATCG
dnm1fusion_LB_as	GGCCGCGTTGGCCCGCTACTACCACCGCTAGGCTTGAACG
dnm1fusion_RB_se	GGCCTGAGTGGCCACCAAGGAGGAGAGCGAGATGCTG
dnm1fusion_RB_as	CCATCTCGTTGCGCGATCAAGC
C-terminale <i>um10958</i> Fusion	
10958fusion_LB_se	CGACAAGACCAAGAAGGCCATCG
10958fusion_LB_as	GGCCGCGTTGGCCCGATCGTCACGGCTCTTAAGAGCG
10958fusion_RB_se	GGCCTGAGTGGCCTCTCGCTCACACTCAGAGCCCCA
10958fusion_RB_as	GCTTGTCTCCACGATTCTTGTCCG
C-terminale <i>um00933</i> Fusion	
00933fusion_LB_se	GGCGCAGGGCGACCTGAAGAGG
00933fusion_LB_as	GGCCGCGTTGGCCCGAGCTGCAGCAGCGCTGGC
00933fusion_RB_se	GGCCTGAGTGGCCTCTTTTGTCTTGAACGATCAGGAAC
00933fusion_RB_as	CATATTCTACCACCGGCCATTC
<i>num1</i> Verkürzung	
01682_LB_se	GACGCCGTACATGTCCAGATTTTC
01682trunc_LB_as	GGCCGCGTTGGCCCGTGTGGAAGAGATGGGAGACATGGAC
01682_Nde	CATATGGCGAGAGCACGAGGTGGATG
01682trunc_Not	AGCGGCCGCTATGTGGAAGAGATGGGAGACATGGAC
<i>num1</i>ΔNLS	
num1_seNde	CATATGGCGAGAGCACGAGGTGGATG
num1_dNLS_Sfi	GGCCGCGTTGGCCCGCTCCAACAGGCTCAACTCTGTCTCGAGCGCAGC GGCGGCACTTTTC
<i>P_{crg1}:hBCAS2</i>-Expression	
hBCAS2_seNdel	GTGCATATGGCCGGCACCGGTCTC
hBCAS2_asNotI	ATAGCGGCCGCTCAAAGTCCTGACGGATGTTCTCC
hBCAS2_asSfiI	GTGGGCCGCGTTGGCCCGAAAAGTCCTGACGGATGTTCTCCTTG
<i>P_{crg1}:num1</i>ΔNterm-Expression	
Num1_dNterm_Nde	GTGCATATGGCAGCTGGTGGTCCATCCAAAG
Num1_NotI	GCGGCCGCTACTCCAACAGGCTCAACTCTG
Num1 Interaktionsdomäne	
Num1_Y2H_66	ATAGGCCGAGGCGGCCAGTAGGTGCCAGTTCGACAGCG
Num1_Y2H_147	ATAGGCCGAGGCGGCCGCGGGGAGGGGAGCGTGT
Num1_Y2H_197	ATAGGCCGAGGCGGCCCTGTTGGAAATTGGACAGCCTCCAG
Num1_Y2H_dNterm	GTGGGCCATTACGGCCGACGCTGGTGGTCCATCCAAAG
Num1_Y2H_for	GTGGGCCATTACGGCCATGGCACACCTTGCTGCTCAT
Num1_Y2H_rev	ATAGGCCGAGGCGGCCCTCAACTGGAATCAGGCCACTCCC
<i>P_{crg1}:kin1</i>-Expression	
kin1_seNde	CATATGTCCAACAACATCAAGGTCTGTC
kin1_asNot	AGCGGCCGCTCACTTGGACGAAAAGAACCAGC
qRT PCR Analysen	
Ubi1_RTas	CATCCTCGAGCTGCTTACCG
Ubi1_RTintron	CAGTACGGCAAGCTAACGCATTTC
Ubi1_RTborders	CTCTGACGGGTAAGACCATTACC
Rho3_RTas	CTTGTCAAACCTCCTCTGACCAG

Rho3_RTintron	GTGGCTGGCTAGAACGACTG
Rho3_RTborders	CACAGACATACGAGCCGACG
Cts1_RTas	GGAAGCTTCGGGTGCCGTA
Cts1_RTintron	GCACAGATGACTCAATGCAGCA
Cts1_RTborders	ATGTTTGACGTCTTAAGCACAGG
PCNA_RTas	GACACCGATCGACATAGGTC
PCNA_RTintron	GCAACGTGCGATTTGATCTGG
PCNA_RTborders	GACGGCATTGACTGCAAG
Rpb3_RTas	CGAGAAGTCACCTCGAGATTAC
Rpb3_RTintron	CGTGTCTCTATCTTGCTCTCTTC
Rpb3_RTborders	GGATCACAGGGATTGCGCATG
RT_eIF2b_f	ATCCCGAACAGCCCAAAC
RT_eIF2b_r	ATCGTCAACCGCAACCAC
RT_actin_f	CATGTACGCCGGTATCTCG
RT_actin_r	CTCGGGAGGAGCAACAATC
RT_bW-F	GATCTCACCCAGCCAATCAC
RT_bW-R	GAGTTGATCGAGGCCGAATG
RT_rbf1-F	AGTACGAGCTACGACGGATTG
RT_rbf1-R	GGTAGGTGTTGGACACATTC
01682RT_for	CAACTGGGCCATATGGATGTTCCG
01682RT_rev	TCGAGCTGTTGCGATAGCAGACG
A. nidulans AN4244 Deletion	
Num1_A_nid_LBs	GCCATTGCAGACTAGCTTCGAGC
Num1_A_nid_LBas	GTTGGCCATCTAGGCCGTGAATAGCTGTCTTGGCTGCT
Num1_A_nid_RBAs	GTTGGCCTGAGTGGCCAAAGTGTCTATGCCCTGATTAC
Num1_A_nid_RBAs	GAGGAGACTACAGCCGGCAGTTTTT
Num1_A_nid_ORFs	ATGCCTTTGGTTCGATGAATCTCAC
Num1_A_nid_ORFa	GCGTTGCATCGATATCTACACCG

Plasmide

Tabelle 14: In dieser Arbeit verwendete Ausgangsplasmide

Plasmid	Kurzbeschreibung	Resistenzen	Referenz
pGBKT7	Y2H Ködervektor	Kan ^R , Trp ⁺	Clontech
pGAD-DS	Y2H Beutevektor	Amp ^R , Leu ⁺	Dualsystems Biotech
pGBKT7-p53	Y2H Kontroll-Vektor	Kan ^R , Trp ⁺	Clontech
pGBKT7-lamC	Y2H Kontroll-Vektor	Kan ^R , Trp ⁺	Clontech
pGADT7-T	Y2H Kontroll-Vektor	Amp ^R , Leu ⁺	Clontech
pGBKT7-num1	Y2H Ködervektor	Kan ^R , Trp ⁺	(Kellner, 2009)
pGAD-NK44	Y2H Beutevektor (Cef1)	Amp ^R , Leu ⁺	(Kellner, 2009)
pGAD-num1	Y2H-Beutevektor	Amp ^R , Leu ⁺	Kellner, unveröffentlicht
pCRII [®] TOPO	Klonierung von PCR Produkten	Amp ^R , Kan ^R	Invitrogen
pPcrg1:num1	<i>num1</i> Überexpression	Amp ^R , Cbx ^R	Heimel, unveröffentlicht
pNK1	Für die C-terminale Num1:3eGFP-Fusion <i>in locus</i>	Amp ^R , Hyg ^R	(Kellner, 2009)
pNK3	pRU11-Derivat (Brachmann <i>et al.</i> , 2001) für die C-terminale Num1:eGFP-Fusion unter Kontrolle des induzierbaren P _{cr1} -Promotors, zur homologen Integration in den ip-Locus	Amp ^R , Cbx ^R	(Kellner, 2009)
pNG-Leu-Clp1	pRU12-Derivat (Brachmann <i>et al.</i> , 2001). Enthält das N-terminale 0,5 kb eGFP Fragment (AS 1-154) als C-terminale Fusion mit dem <i>clp1</i> -Gen unter der Kontrolle des P _{cr1} -Promotors.	Amp ^R , Cbx ^R	(Heimel, 2010)
pCG-Cbx-rbf1	pRU11-Derivat (Brachmann <i>et al.</i> , 2001). Enthält das C-terminale 0,3 kb eGFP Fragment (AS 155-238) als C-terminale Fusion mit dem <i>rbf1</i> -Gen unter der Kontrolle des P _{cr1} -Promotors.	Amp ^R , Cbx ^R	(Heimel, 2010)
p123gfp	Enthält eGFP unter Kontrolle des konstitutiv aktiven P _{otef} -Promotors; homologe Integration in den ip-Locus	Amp ^R , Cbx ^R	(Aichinger, 2000)
pBS-hhn	Enthält eine 1884 bp Hygromycin-Resistenz-	Amp ^R , Hyg ^R	(Kämper, 2004)

	Kassette (<i>hph</i> -Gen von P _{hsp70} und T _{nos} flankiert) als <i>Sfil</i> -Fragment für Gendeletionen		
pUMa260	Enthält eine 1897 bp Carboxin-Resistenz-Kassette als <i>Sfil</i> -Fragment für Gendeletionen	Amp ^R , Hyg ^R	(Brachmann <i>et al.</i> , 2004)
pUMa262	Enthält eine 1437 bp Nourseothricin-Resistenz-Kassette als <i>Sfil</i> -Fragment für Gendeletionen	Amp ^R , Nat ^R	(Brachmann <i>et al.</i> , 2004)
pUMa791	Enthält eine 2333 bp 3xHA-Carboxin-Kassette als <i>Sfil</i> -Fragment für die C-terminale Fusion mit dem 3xHA-Tag	Amp ^R , Cbx ^R	Müller, unveröffentlicht
pUMa792	Enthält eine 3099 bp 3xHA-Hygromycin-Kassette als <i>Sfil</i> -Fragment für die C-terminale Fusion mit dem 3xHA-Tag	Amp ^R , Hyg ^R	Müller, unveröffentlicht
pUMa647	Enthält eine 5158 bp 3xeGFP-Hygromycin-Kassette als <i>Sfil</i> -Fragment für die C-terminale Fusion mit GFP	Amp ^R , Hyg ^R	(Baumann <i>et al.</i> , 2012)
pUMa389	Enthält eine 2434 bp eGFP-Nourseothricin-Kassette als <i>Sfil</i> -Fragment für die C-terminale Fusion mit GFP	Amp ^R , Nat ^R	(Becht <i>et al.</i> , 2006)
pUMa738	Enthält eine 2403 bp RFP-Nourseothricin-Kassette als <i>Sfil</i> -Fragment für die C-terminale Fusion mit RFP	Amp ^R , Nat ^R	(Becht <i>et al.</i> , 2006)
pUMa737	Enthält eine 2987 bp eGFP-TapTag-Nourseothricin-Kassette als <i>Sfil</i> -Fragment für die C-terminale Fusion mit dem GFP-TapTag	Amp ^R , Nat ^R	(Becht <i>et al.</i> , 2006)
pNEBUH	frei replizierendes Plasmid mit Hygromycin-Resistenz-Kassette	Amp ^R , Hyg ^R	Laborsammlung
pNEBUN	frei replizierendes Plasmid mit Nourseothricin-Resistenz-Kassette	Amp ^R , Nat ^R	Laborsammlung
p123-Tub1-mCherry	Für die C-terminale Tub1:mCherry-Fusion unter Kontrolle des konstitutiv aktiven P _{otef} -Promotors, für ektopische Integration	Amp ^R , Cbx ^R	(Schink, 2010)
p123-Sec3-GFP	Für die C-terminale Sec3:eGFP-Fusion unter Kontrolle des konstitutiv aktiven P _{otef} -Promotors, für eine ektopische Integration	Amp ^R , Cbx ^R	(Schink, 2010)
pPotef:RFP:Tub1	Für die N-terminale-Fusion von Tub1 an RFP unter Kontrolle des konstitutiv aktiven P _{otef} -Promotors, für eine ektopische Integration	Amp ^R , Cbx ^R	(Straube <i>et al.</i> , 2005)
pHcrgKin1 ^{G96E}	Enthält das <i>kin1</i> -Gen mit „rigor“-Mutation (G96E) unter Kontrolle des induzierbaren P _{crg1} -Promotors	Amp ^R , Hyg ^R	(Straube <i>et al.</i> , 2006)
phBCAS2	Enthält eine Codon-optimierte Version des humanen <i>hBCAS2</i> -Gens		Invitrogen

Tabelle 15: In dieser Arbeit hergestellte Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Resistenzen
pNK5	Enthält eine nGFP:Hyg ^R -Kassette. Das N-terminale 0,5 kb eGFP- <i>Ascl/Sfil</i> -Fragment (AS 1-154) aus pNG-Leu-Clp1 wurde in das mit <i>Ascl/Sfil</i> geöffnete pUMa647-Plasmid integriert.	Amp ^R , Hyg ^R
pNK6*	Für die C-terminale <i>num1:ngfp</i> -Fusion <i>in locus</i> , <i>Sfil</i> -Fragment (nGFP:Hyg ^R) aus pNK5	Amp ^R , Hyg ^R
pNK8	Enthält eine cGFP:Nat ^R -Kassette. Das C-terminale 0,3 kb eGFP- <i>Ascl/Sfil</i> -Fragment (AS 155-238) aus pCG-Cbx-rbf1 wurde in das mit <i>Ascl/Sfil</i> geöffnete pUMa389-Plasmid integriert.	Amp ^R , Nat ^R
pNK15*	Für die C-terminale <i>kin1:cgfp</i> -Fusion <i>in locus</i> , <i>Sfil</i> -Fragment (cGFP:Nat ^R) aus pNK8	Amp ^R , Nat ^R
pNK16*	Für die C-terminale <i>um10958:cgfp</i> -Fusion <i>in locus</i> , <i>Sfil</i> -Fragment (cGFP:Nat ^R) aus pNK8	Amp ^R , Nat ^R

pNK19*	Für die C-terminale <i>um00933:cgfp</i> -Fusion in <i>locus</i> , <i>Sfil</i> -Fragment (cGFP:Nat ^R) aus pNK8	Amp ^R , Nat ^R
pNK21	„pP _{oterf} :egfp:taptag“. Kontrollkonstrukt für die TAP-Tag Aufreinigung von Proteinen (Negativkontrolle). Enthält den eGFP-TAP-Tag unter Kontrolle des konstitutiv aktiven P _{oterf} -Promotors. Ein <i>NcoI/NotI</i> -Fragment aus pUMa737 wurde in den mit <i>NcoI/NotI</i> geöffneten p123gfp integriert. Zur homologen Integration in den ip-Locus.	Amp ^R , Cbx ^R
pNK22*	Für die C-terminale <i>um10958:3egfp</i> -Fusion in <i>locus</i> , <i>Sfil</i> -Fragment (3eGFP:Hyg ^R) aus pUMa647	Amp ^R , Hyg ^R
pNK23	„pP _{oterf} :cGFP“. Negativkontrolle für die BiFC-Analysen. Enthält das C-terminale 0,3 kb eGFP Fragment unter Kontrolle des konstitutiv aktiven P _{oterf} -Promotors. Ein <i>NcoI/NotI</i> -Fragment (PCR) wurde in den mit <i>NcoI/NotI</i> geöffneten p123gfp integriert. Zur homologen Integration in den ip-Locus.	Amp ^R , Cbx ^R
pNK24*	Für die C-terminale <i>num1:3xha</i> Fusion in <i>locus</i> , <i>Sfil</i> -Fragment (3xHA-Hyg ^R) aus pUMa792)	Amp ^R , Hyg ^R
pNK26	„pP _{crq1} :num1 ₁₋₁₀₃ “. Enthält eine C-terminal verkürzte Version des <i>num1</i> -Gens unter Kontrolle des induzierbaren P _{crq1} -Promotors. Ein <i>NdeI/NotI</i> -Fragment wurde in den mit <i>NdeI/NotI</i> geöffneten pP _{crq1} :num1 integriert. Zur homologen Integration in den ip-Locus.	Amp ^R , Cbx ^R
pNK29	„pGAD_um10027 _{full} “. Hefe-Zwei-Hybrid Beutevektor. Enthält ein <i>Sfil</i> -Fragment des kodierenden Bereichs des <i>prp19</i> -Gens (Amplifikat von cDNA).	Amp ^R , Leu ⁺
pNK30	„pGAD_um11036 _{full} “. Hefe-Zwei-Hybrid Beutevektor. Enthält ein <i>Sfil</i> -Fragment des offenen Leserahmens des <i>um11036</i> -Gens.	Amp ^R , Leu ⁺
pNK34	„pGAD_10027Nterm“ Hefe-Zwei-Hybrid Beutevektor. Enthält den N-Terminus von Prp19 (AS 1-199) als <i>Sfil</i> -Fragment.	Amp ^R , Leu ⁺
pNK35	„pGAD_10027Cterm“. Hefe-Zwei-Hybrid Beutevektor. Enthält den C-Terminus von Prp19 (AS 206-535) als <i>Sfil</i> -Fragment.	Amp ^R , Leu ⁺
pNK36	„pGAD_11036Nterm“ Hefe-Zwei-Hybrid Beutevektor. Enthält den N-Terminus von Um11036 (AS 1-203) als <i>Sfil</i> -Fragment.	Amp ^R , Leu ⁺
pNK37	„pGAD_11036Cterm“. Hefe-Zwei-Hybrid Beutevektor. Enthält den C-Terminus von Um11036 (AS 205-506) als <i>Sfil</i> -Fragment.	Amp ^R , Leu ⁺
pNK39*	Für die C-terminale <i>kin1:3xha</i> Fusion in <i>locus</i> , <i>Sfil</i> -Fragment (3xHA-Cbx ^R) aus pUMa791)	Amp ^R , Cbx ^R
pNK41	„pP _{crq1} :num1 _{mutNLS} :egfp“. Enthält das <i>num1</i> -Gen mit mutierter Kernlokalisierungs-Sequenz als Fusion mit <i>egfp</i> unter Kontrolle des induzierbaren P _{crq1} -Promotors. Ein <i>NdeI/Sfil</i> - (<i>num1</i> -C-Terminus) und ein <i>NdeI</i> - (<i>num1</i> N-Terminus) Fragment wurde in den mit <i>NdeI/Sfil</i> geöffneten Vektor pNK3 integriert. Zur homologen Integration in den ip-Locus.	Amp ^R , Cbx ^R
pNK47	„pP _{crq1} :hBCAS2“. Enthält das humane hBCAS2-Gen (Codon-optimiert) unter Kontrolle des induzierbaren P _{crq1} -Promotors. Ein <i>NdeI/NotI</i> -Fragment wurde in den mit <i>NdeI/NotI</i> geöffneten pP _{crq1} :num1 integriert. Zur homologen Integration in den ip-Locus.	Amp ^R , Cbx ^R
pNK48	„pP _{crq1} :hBCAS2:egfp“. Enthält das humane hBCAS2-Gen (Codon-optimiert) als Fusion mit <i>egfp</i> unter Kontrolle des induzierbaren P _{crq1} -Promotors. Ein <i>NdeI/Sfil</i> -Fragment wurde in den mit <i>NdeI/Sfil</i> geöffneten Vektor pNK3 integriert. Zur homologen Integration in den ip-Locus.	Amp ^R , Cbx ^R
pNK49*	Für die C-terminale <i>kin1:egfp:taptag</i> Fusion in <i>locus</i> , <i>Sfil</i> -Fragment (eGFP:TAP-Tag-Nat ^R) aus pUMa737)	Amp ^R , Nat ^R
pNK50	„pP _{crq1} :num1ΔNterm“. Enthält ein N-terminal verkürztes <i>num1</i> -Fragment (AS 233-279) unter Kontrolle des induzierbaren P _{crq1} -Promotors. Ein <i>NdeI/NotI</i> -Fragment wurde in den mit <i>NdeI/NotI</i> geöffneten pP _{crq1} :num1 integriert. Zur homologen Integration in den ip-Locus.	Amp ^R , Cbx ^R
pNK51	„pGBKT7-num1 ₁₋₁₉₇ “. Hefe-Zwei-Hybrid Ködervektor. Enthält ein C-terminal verkürztes 591 bp <i>Sfil</i> -Fragment des offenen Leserahmens von <i>num1</i> .	Kan ^R , Trp ⁺
pNK52	„pGBKT7-num1 ₁₋₁₄₇ “. Hefe-Zwei-Hybrid Ködervektor. Enthält ein C-terminal verkürztes 441 bp <i>Sfil</i> -Fragment des offenen Leserahmens von <i>num1</i> .	Kan ^R , Trp ⁺
pNK53	„pGBKT7-num1 ₁₋₆₆ “. Hefe-Zwei-Hybrid Ködervektor. Enthält ein C-terminal verkürztes 198 bp <i>Sfil</i> -Fragment des offenen Leserahmens von <i>num1</i> .	Kan ^R , Trp ⁺
pNK54	„pGBKT7-num1ΔNterm“. Hefe-Zwei-Hybrid Ködervektor. Enthält ein N-terminal	Kan ^R , Trp ⁺

	verkürztes 702 bp <i>Sfil</i> -Fragment des offenen Leserahmens von <i>num1</i> .	
pNK55	„pP _{crG1} :num1ΔNterm:egfp“. Enthält ein N-terminal verkürztes <i>num1</i> -Fragment (AS 233-279) als Fusion mit <i>egfp</i> unter Kontrolle des induzierbaren P _{crG1} -Promotors. Ein <i>Ndel/Sfil</i> -Fragment wurde in den mit <i>Ndel/Sfil</i> geöffneten Vektor pNK3 integriert. Zur homologen Integration in den ip-Locus.	Amp ^R , Cbx ^R
pMO1 ^{1*}	Für die C-terminale <i>prp19:3xha</i> -Fusion <i>in locus</i> , <i>Sfil</i> -Fragment aus pUMa791 (3xHA-Cbx ^R)	Amp ^R , Cbx ^R
pMO2 ^{1*}	Für die C-terminale <i>prp19:rfp</i> -Fusion <i>in locus</i> , <i>Sfil</i> -Fragment aus pUMa738 (RFP-Nat ^R)	Amp ^R , Nat ^R
pMO3 ^{1*}	Für die C-terminale <i>cef1:3xha</i> -Fusion <i>in locus</i> , <i>Sfil</i> -Fragment aus pUMa791 (3xHA-Cbx ^R)	Amp ^R , Cbx ^R
pMO4 ^{1*}	Für die C-terminale <i>cef1:rfp</i> -Fusion <i>in locus</i> , <i>Sfil</i> -Fragment aus pUMa738 (RFP-Nat ^R)	Amp ^R , Nat ^R
pUMa1732 ²	Enthält eine 3eGFP-Nat ^R <i>Sfil</i> -Kassette. Ein <i>NotI</i> -Fragment aus pNEBUN (Nat ^R) wurde in den mit <i>NotI</i> -geöffneten pUMa647 integriert, um die Hyg ^R - durch die Nat ^R auszutauschen.	Amp ^R , Nat ^R
pKT1 ²	Für die C-terminale <i>num1:3egfp</i> -Fusion <i>in locus</i> . pNK24-Derivat. <i>Sfil</i> -Fragment aus pUMa1732 (3eGFP-Nat ^R)	Amp ^R , Nat ^R
pKT2 ²	Enthält den offenen Leserahmen des <i>kin1</i> -Gens mit der ^{rigor} -Mutation. Das PCR-Produkt auf pHcrgKin1 ^{G96E} wurde in TOPO pCRII integriert.	Amp ^R
pKT3 ²	„pP _{crG1} :kin1 ^{rigor} “. Enthält den offenen Leserahmen des <i>kin1</i> -Gens mit der ^{rigor} -Mutation unter Kontrolle des induzierbaren P _{crG1} -Promotors. Ein <i>Ndel/NotI</i> -Fragment aus pKT2 wurde in den mit <i>Ndel/NotI</i> geöffneten pP _{crG1} :num1 integriert. Zur homologen Integration in den ip-Locus.	Amp ^R , Cbx ^R
pNP1 ^{3*}	Für die C-terminale <i>um00933:3egfp</i> -Fusion <i>in locus</i> , <i>Sfil</i> -Fragment (3eGFP:Hyg ^R) aus pUMa647	Amp ^R , Hyg ^R

¹ – Bachelorarbeit Melissa Ort

³ – Bachelorarbeit Niko Pinter

² – Bachelorarbeit Katrin Trognitz

Alle Klonierungsschritte wurden anhand von Restriktionsanalysen überprüft, eingebrachte PCR-Produkte wurden sequenziert.

* Für C-terminale Gen-Fusionen mit eGFP-Derivaten bzw. RFP wurde ein *Sfil*-vermitteltes Kassettensystem verwendet (Brachmann *et al.*, 2004). Dazu wurden 1 kb aus dem 3'-Ende des zu fusionierenden offenen Leserahmens und 1 kb der 3'-untranslatierten Region mittels PCR von genomischer DNA amplifiziert. Es wurden Oligonukleotide verwendet, die zwei *Sfil*-Restriktionsschnittstellen einführen und das Stop-Codon ausliefern. Beide Fragmente wurden an ein *Sfil* eGFP-Fragment aus pUMa647, pNK5 oder pNK8 bzw. ein *Sfil* RFP-Nat^R aus pUMa738 mit TOPO pCRII (Invitrogen) als Rückgrat ligiert. PCR-generierte lineare DNA der resultierenden Plasmide wurde anschließend für die Transformation verwendet. C-terminale Gen-Fusionen mit einem 3xHA- oder TAP-Tag wurden analog hergestellt. Dazu wurden *Sfil* 3xHA-Hyg^R- bzw. 3xHA-Cbx^R-Fragmente aus pUMa791 und pUMa792 bzw. *Sfil* 3eGFP-TAP-Tag-Nat^R-Fragmente aus pUMa737 verwendet. Alle Fusionsereignisse wurden per Southern Analyse verifiziert.

4.2 Mikrobiologische, genetische und zellbiologische Methoden

4.2.1 *E. coli*

Kultivierung von *E. coli*

E. coli-Kulturen wurden standardmäßig als Schüttelkulturen bei 180 Upm oder auf Festmedien unter aeroben Bedingungen bei 37°C kultiviert. Übernachtskulturen wurden entweder aus bei -80°C eingelagerten Glycerinkulturen oder von bewachsenen YT-Ampicillin Platten, die weniger als einen Monat bei 4°C gelagert waren, angeimpft.

Bestimmung der Zelldichte

Die Zelldichte von Bakterienkulturen wurde photometrisch in einem LKB Biochrom Photometer bei einer Wellenlänge von 600 nm bestimmt. Dabei entspricht die optische Dichte $OD_{600} = 1$ im Verhältnis zum Leerwert des jeweiligen Kulturmediums etwa 1×10^9 Zellen pro ml Kultur. Um eine lineare Abhängigkeit sicherzustellen, wurden für die Messung der OD_{600} die Kulturen durch entsprechende Verdünnung auf einen Wert unterhalb von 0,5 verdünnt.

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

Zur Herstellung transformationskompetenter Bakterienzellen wurden 100 ml LB-Medium, dem je 10 mM $MgCl_2$ und $MgSO_4$ zugesetzt wurde, mit 1 ml einer frischen TOP10-Übernachtskultur angeimpft und bis zu einer $OD_{600} = 0,5$ bei 37°C und 180 Upm inkubiert. Die Zellen wurden für 15 min bei 3.000 Upm und 4°C 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), 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 10 µl Plasmidlösung (1-5 ng Plasmid) bzw. Ligationsansatz versetzt und 5-30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock von 60 sec bei 42°C wurde der Transformationsansatz zur phänotypischen Expression der durch das eingebrachte Plasmid vermittelten Antibiotikum-Resistenz mit 500 µl dYT-Medium versetzt und 30 min bei 500 Upm und 37°C in einem Eppendorf-Wärmeblock inkubiert. 200 µl des Transformationsansatzes wurden auf YT-Platten mit 100 µg/ml Ampicillin ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Auf diese Weise konnte eine Transformationsrate von 10^6 Transformanden pro 1 µg eingesetzter Plasmid-DNA erreicht werden.

RF1-Lösung:

100 mM RbCl
50 mM $MnCl_2 \times 4 H_2O$
30 mM K-Acetat
10 mM $CaCl_2 \times 2 H_2O$
15% (v/v) Glycerin in H_2O_{bid} .
mit Essigsäure auf pH 5,8 eingestellt und sterilfiltriert.

RF2-Lösung:

10 mM MOPS
10 mM RbCl
75mM $CaCl_2 \times 2 H_2O$
15% (v/v) Glycerin
in H_2O_{bid} . mit NaOH
auf pH 5,8 eingestellt und sterilfiltriert.

4.2.2 *S. cerevisiae*

Kultivierung von *S. cerevisiae*

S. cerevisiae-Stämme wurden standardmäßig als Schüttelkulturen bei 180 Upm oder auf Festmedien unter aeroben Bedingungen bei 28°C oder 30°C kultiviert. Übernachtkulturen wurden entweder aus bei -80°C eingelagerten Glycerinkulturen oder von bewachsenen YEPD-Platten bzw. entsprechenden Selektionsplatten, die weniger als zwei Monate bei 4°C gelagert waren, angeimpft.

Bestimmung der Zelldichte

Die Zelldichte von Flüssigkulturen wurde photometrisch in einem LKB Biochrom Photometer bei einer Wellenlänge von 600 nm bestimmt. Dabei entspricht $OD_{600} = 1$ im Verhältnis zum Leerwert des jeweiligen Kulturmediums je nach verwendetem Stamm und Wachstumsmedium etwa $1-5 \times 10^7$ Zellen pro ml Kultur. Um eine lineare Abhängigkeit sicherzustellen, wurden für die Messung der OD_{600} die Kulturen durch entsprechende Verdünnung auf einen Wert unterhalb von 0,5 verdünnt.

Transformation von *S. cerevisiae* (Ito et al., 1983)

Von einem Verdünnungsausstrich auf YEPD-Platten ausgehend wurden 25 ml YEPDA-Medium mit einigen AH109-Einzelkolonien inokuliert und bis zur stationären Wachstumsphase ($OD_{600} > 1,5$) bei 30°C und 250 Upm inkubiert. Diese Vorkultur wurde ca. 1:50 in 50 ml YEPDA-Medium auf eine $OD_{600} = 0,1$ verdünnt und weitere 4-6 h bei 28°C und 250 Upm bis zu einer $OD_{600} = 0,4-0,6$ inkubiert. Um die Zellen zu ernten wurde die Kultur in 50 ml Greiner-Röhrchen überführt und (in einer Heraeus Biofuge stratos bei 3 min, 2.000 Upm und Raumtemperatur) abzentrifugiert. Die Zellen wurden dann einmal mit 15 ml sterilem H_2O und anschließend mit 10 ml SORB-Lösung gewaschen. Nach der Pelletierung wurden die kompetenten Zellen in 360 μl SORB-Lösung aufgenommen und 40 μl Lachssperma-DNA (Invitrogen) wurde zugeben. Der Ansatz wurde für 10 min bei 100°C in einem Eppendorf-Wärmeblock denaturiert und anschließend sofort auf Eis gekühlt. An diesem Schritt können die Zellen in 50 μl Aliquots bei -80°C eingefroren werden.

Für die Transformation wurden 50 μl der kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut, mit 2 μl Plasmid-DNA versetzt und gemischt. Anschließend wurde das 6-fache Volumen steriler LIT-PET-Lösung zugefügt, gemischt und der Ansatz für 30 min bei 30°C inkubiert. Nach einem Hitzeschock für 15 min bei 42°C wurden die Zellen 3 min bei 2.000 Upm in einer Heraeus Biofuge pico abzentrifugiert, einmal mit YEPDA-Medium gewaschen und in 100 μl TE-Puffer resuspendiert, bevor der Ansatz auf einer entsprechenden Selektionsplatte ausgestrichen wurde.

SORB:

100 mM LiAc
10 mM Tris-Cl, pH 8,0
1 mM Na_2 -EDTA, pH 8,0
1 M Sorbitol
in $H_2O_{bid.}$, sterilfiltriert

Lit/PEG:

50 g PEG-3500
10 ml Lithium-Acetat-Lösung (100 mM)
in 100 ml $H_2O_{bid.}$, sterilfiltriert

4.2.3 *U. maydis*

Kultivierung von *U. maydis*

U. maydis-Stämme wurden standardmäßig als Schüttelkulturen bei 180 Upm oder auf Festmedien unter aeroben Bedingungen bei 28°C kultiviert. Übernachtskulturen wurden entweder aus bei -80°C eingelagerten Glycerinkulturen oder von bewachsenen PD- oder CM-Platten, die weniger als einen Monat bei 4°C gelagert waren, angeimpft.

Bestimmung der Zelldichte

Die Zelldichte von Flüssigkulturen wurde photometrisch in einem LKB Biochrom Photometer bei einer Wellenlänge von 600 nm bestimmt. Dabei entspricht $OD_{600} = 1$ im Verhältnis zum Leerwert des jeweiligen Kulturmediums je nach verwendetem Stamm und Wachstumsmedium etwa $1-5 \times 10^7$ Zellen pro ml Kultur. Um eine lineare Abhängigkeit sicherzustellen, wurden für die Messung der OD_{600} die Kulturen durch entsprechende Verdünnung auf einen Wert unterhalb von 0,5 verdünnt.

Protoplastierung und Transformation von *U. maydis* (Gillissen *et al.*, 1992; Schulz *et al.*, 1990)

Von einer auf Platte wachsenden Kultur wurde eine 10 ml YEPS_{light}-Flüssigkultur angesetzt und über Nacht bei 28°C und 180 Upm inkubiert. Diese Vorkultur wurde anschließend 1:100, 1:300 oder 1:1.000 in 50 ml frischem YEPS_{light}-Medium verdünnt und bei 28°C und 180 Upm bis zu einer Zelldichte von ca. 5×10^7 Zellen pro ml ($OD_{600} = 0,6 - 1$) geschüttelt. Nach Erreichen des optimalen Zelltiters wurden die Zellen durch Zentrifugation (3.500 Upm, 5 min, 4°C, Heraeus Biofuge stratos) in 50 ml Greiner-Röhrchen geerntet, einmal mit 25 ml SCS-Puffer gewaschen und in 4 ml SCS resuspendiert. Anschließend wurden 5 ml SCS-Puffer mit 12 mg/ml Novozym 234 (sterilfiltriert) zugegeben. Die in diesem Puffer bei Raumtemperatur erfolgende Protoplastierung konnte mikroskopisch beobachtet werden, da die zigarrenförmigen Zellen nach Lyse der Zellwand eine kugelige Form annehmen. Nach vollständiger Protoplastierung (3-8 min) wurden die Ansätze auf 30 ml mit SCS-Puffer aufgefüllt und die Protoplasten durch 8-minütiges Zentrifugieren bei 2.300 Upm (4°C, Heraeus Biofuge stratos) pelletiert. Um das Novozym vollständig zu entfernen, wurde das Pellet zweimal mit 10 ml SCS-Puffer gewaschen. Anschließend wurde noch einmal mit 10 ml eiskaltem STC-Puffer gewaschen. Das Pellet wurde danach in einem Volumen von 2,5 ml eiskaltem STC-Puffer aufgenommen und zu je 110 μ l aliquotiert. Die so behandelten Protoplasten können 3-4 h auf Eis oder bei -80°C mehrere Monate (bzw. Jahre) aufbewahrt werden.

Zur integrativen Transformation wurden 110 μ l Protoplasten mit 3-5 μ g linearisierter Plasmid-DNA (in bis zu 10 μ l H₂O_{bid.}) und 1 μ l Heparin-Lösung (15 mg/l in in H₂O_{bid.}) für 15 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 drei bis sieben Tagen Inkubation bei 28°C wurden die gewachsenen Kolonien mit sterilen Zahnstochern auf antibiotikahaltigen PD- oder CM-Platten vereinzelt.

SCS-Puffer:

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

STC-Puffer:

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

STC/PEG:

15 ml STC-Puffer
10 g PEG4000

Induktion des filamentösen Wachstums in Flüssigkultur

Die zu induzierenden Stämme wurden aus Vorkulturen in Flüssigmedien angeimpft, die reprimierende Bedingungen boten (im Falle des P_{erg1}-Promotors mit Glukose als einziger Kohlenstoffquelle, im Falle des P_{nar1}-Promotors mit Glutamin als einziger Stickstoffquelle), und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bis 0,8 bei 28°C und 180 Upm inkubiert. Die Zellen wurden daraufhin abzentrifugiert (3.500 Upm, 5 min, RT, Heraeus Multifuge 4 KR), der Überstand wurde verworfen und die Zellen wurden im gleichen Volumen H₂O_{bid.} resuspendiert. Nach erneuter Pelletierung wurden die Zellen in Flüssigmedium resuspendiert, das induzierende Bedingungen bot (im Falle des P_{erg1}-Promotors mit Arabinose als einziger Kohlenstoffquelle, im Falle des P_{nar1}-Promotors mit Nitrat als einziger Stickstoffquelle). Die Kulturen wurden dann bei 28°C und 180 Upm für die erforderliche Zeit inkubiert. Für die Probenentnahme zur Isolation von RNA oder Proteinen wurden jeweils 50 ml Kultur in 50 ml Röhren (Greiner) abzentrifugiert (3.500 Upm, 5 min, RT, Heraeus Multifuge 4 KR), der Überstand dekantiert und die Zellpellets in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Zellpellets können bis zu einigen Monaten bei -80°C gelagert werden.

Test auf filamentöses Wachstum

Um das Kreuzungsverhalten von *U. maydis*-Stämmen zu testen, wurden die Stämme in CM-Glukose Flüssigmedium bei 28°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5-0,8 angezogen. Die Zellen wurden anschließend pelletiert (13.000 Upm, 1 min, RT) und so in H₂O_{bid.} aufgenommen, dass die Zelldichte auf eine OD₆₀₀ von 1,0 eingestellt wurde. Bei Ko-Inokulationen von kompatiblen Kreuzungspartnern wurden gleiche Volumina der Zellsuspensionen in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß gemischt. Von jedem Ansatz wurden 3 bis 5 µl auf eine CM-Glukose Platte mit Aktivkohle getropft. Die Platte wurde mit Parafilm versiegelt und für 24-48 Stunden bei 22°C inkubiert.

Analyse der Teliosporenkeimung

Aus getrockneten Tumoren von etwa vier Wochen alten Pflanzen wurden Teliosporen geerntet, für 15 min in 1% CuSO₄ inkubiert, abzentrifugiert (13.000 Upm, 5 min, RT), zweimal in H₂O_{bid.} gewaschen und anschließend in verschiedenen Verdünnungsstufen auf PD-Medium ausplattiert, dem zusätzlich Ampicillin (100 µg/ml), Kanamycin (40 µg/ml) und Chloramphenicol (34 µg/ml) zugesetzt wurde. Nach zweitägiger Inkubation bei 28°C wurden die ausgekeimten Sporen mit sterilen Zahnstochern auf PD-Medium vereinzelt. Jede ausgekeimte Spore führt zu einer Kolonie, die die unterschiedlichen Meioseprodukte enthält. Diese wurden anschließend charakterisiert. Dazu wurden Einzelkolonien auf CM-Medium ohne Zugabe von Antibiotikum bzw. mit dem/den zur Selektion der Meioseprodukte

benötigten Marker(n) überstrichen und zwei weitere Tage bei 28°C inkubiert. Anschließend wurde das Wachstum auf den Selektionsplatten ausgewertet.

Pflanzeninfektionen

Für Pathogenitätstests wurden Spritzinfektionen sieben Tage alter Early Golden Bantam Maispflanzen durchgeführt. Dazu wurden 20 ml YEPS_{light} Medium mit dem zu untersuchenden Stamm inokuliert und über Nacht bei 28°C und 180 Upm inkubiert. Diese Vorkultur wurde auf eine OD₆₀₀ = 0,3 verdünnt und weitere 6 h bei 28°C und 180 Upm geschüttelt. Die Kultur wurde anschließend abzentrifugiert (6 min., 3.500 Upm, 4°C, Heraeus Biofuge stratos) und einmal mit H₂O_{dest.} gewaschen. Für die Infektion wurde das Pellet in H₂O_{dest.} aufgenommen, sodass eine OD₆₀₀ = 1 eingestellt werden konnte. Kompatible Stämme wurden vor der Infektion im Verhältnis 1:1 gemischt. Ca. 300 µl der Pilzsuspensionen wurden in das Innere des Blattwirtels injiziert. Die Bonitur erfolgte sieben Tage nach der Infektion.

4.2.4 *A. nidulans*

Kultivierung von *A. nidulans*

A. nidulans-Stämme wurden standardmäßig auf Festmedien unter aeroben Bedingungen bei 37°C kultiviert. Für die Lagerung der Stämme wurden Sporen in 30%-ige Glycerin-Lösung gegeben und bei -80°C gelagert. Frische Kulturen wurden entweder aus bei -80°C eingelagerten Glycerinkulturen oder mit einer Sporensuspension von bewachsenen MM- oder CM-Platten angeimpft.

Protoplastierung und Transformation von *A. nidulans* (Yelton *et al.*, 1984)

Von einer frischen Platte wurden Sporen geerntet (ca. 10⁹ Conidien) und zur Inokulation von 500 ml Minimalmedium mit den für den verwendeten Stamm erforderlichen Supplementen verwendet. Die Inkubation erfolgte bei 30°C und 150 Upm im Wasserbad für 12-16 Stunden bis die Sporen ausgekeimt waren. Die Kultur wurde anschließend durch zwei Lagen sterile Mullbinde gefiltert und einmal mit Myzelium-Wasch-Lösung gewaschen. Das gewaschene Myzel wurde in einen sterilen 100 ml Erlenmeyer-Kolben mit 5 ml eiskaltem Osmotischen Medium überführt. Nach Zugabe von GlucanX (180 mg/ml in H₂O_{bid.}, Novo Nordisk) und fünf-minütiger Inkubation auf Eis erfolgte die Zugabe von BSA (10 mg/0,5 ml in H₂O_{bid.}). Zur Protoplastierung der ausgekeimten Sporen wurde das Myzel bei 30°C und 70 Upm für 1-2 Stunden inkubiert. Die Protoplastierung wurde mikroskopisch alle 30 Minuten verfolgt. Anschließend wurde das Gemisch in ein steriles Corex Röhrchen gegeben, vorsichtig mit 10 ml „Trapping“ Puffer überschichtet und 15 min bei 5000 Upm mit einem HB-6 Ausschwingrotor zentrifugiert. Nach diesem Zentrifugationsschritt sammelten sich die Protoplasten in einer Bande an der Puffer-Grenzschicht. Die Bande wurde mit einer Glaspipette abgenommen und in ein frisches Corex Röhrchen transferiert. Nach Zugabe von 10 ml STC-Puffer erfolgte eine erneute

Zentrifugation für 10 min bei 7000 Upm. Das Pellet wurde anschließend vorsichtig in 100-300 μ l STC-Puffer resuspendiert.

Für die Transformation wurden 100 μ l Protoplasten mit 100 μ l DNA (10 μ g DNA, auf 100 μ l mit STC aufgefüllt) in einem sterilen 15 ml Greiner gemischt und für 25 min leicht schwenkend bei RT inkubiert. Es folgte die Zugabe von 2 ml PEG und das Röhrchen wurde vorsichtig invertiert, bis eine homogene Mischung erreicht war. Nach weiteren 20 min Inkubation bei RT wurden nochmals 8 ml STC zugefügt und das gesamte Volumen wurde auf mehrere Platten mit osmotisch stabilisiertem Medium (MM mit 0,6 M KCl) mit erforderlichen Selektionsmarkern ausgestrichen. Die Platten wurden bei 37°C inkubiert. Nach drei bis vier Tagen waren die ersten Kolonien sichtbar.

Myzelium-Wasch-Lösung

0,6 M MgSO₄

Osmotisches Medium

1,2 M MgSO₄

10 mM Na₃PO₄-Puffer, pH 5,8

„Trapping“ Puffer

0,6 M Sorbitol

0,1 M Tris-HCl, pH 7,0

STC-Puffer

1,2 M Sorbitol

10 mM CaCl₂

10 mM Tris-HCl, pH 7,5

PEG

60% (w/v) PEG4000

10 mM CaCl₂

10 mM Tris-HCl, pH 7,5

4.3 Fluoreszenzmikroskopie und Färbemethoden

Mikroskopie und Bildverarbeitung

Die zellmorphologische Betrachtung von *U. maydis*-Sporidien und -Filamenten bzw. *A. nidulans*-Hyphen erfolgte an einem Lichtmikroskop (AxioImager.Z1, Carl Zeiss) mittels Nomarski-Optik. Für DIC- und Epifluoreszenz-Mikroskopie wurde ein 63-faches Plan-Apochromat Ölimmersions-Objektiv (Carl Zeiss) mit 1,4 numerischer Apertur verwendet. Als UV-Lichtquelle wurde eine HBO103 Quecksilberdampf-Lampe (Osram) verwendet. Für die Fluoreszenzmikroskopie wurden Filter mit folgendem Anregungs- und Emissionsspektrum eingesetzt: eGFP – 450-490 nm und 515-565 nm, Rhodamin – 546 nm und 590 nm, DAPI – 365 nm und 397 nm, CFP – 430 nm und 474 nm. Digitale Aufnahmen wurden mit einer hochauflösenden CCD-Kamera (AxioCam MRm (Carl Zeiss)) aufgenommen, welche durch die Axiovision-Software (Carl Zeiss) gesteuert wurde. Die Nachbearbeitung der Aufnahmen (Bildausschnitt, Kontrastverstärkung, Korrektur von γ -Werten und Maßstabsskalierung) erfolgte mit Hilfe der Axiovision-Software (Carl Zeiss)).

U. maydis

Zur mikroskopischen Analyse wurden 5 μ l einer exponentiell wachsenden *U. maydis* Kultur (OD₆₀₀ = 0,3-0,5) bzw. einer induzierten Kultur auf einen Objektträger getropft. Eine einheitliche Fokusebene wurde durch Verwendung eines Kissens aus 2%-iger Agarose (in H₂O_{bid.} gelöst) erreicht.

A. nidulans

Zur mikroskopischen Analyse von Keimlingen und jungen Hyphen wurden die Zellen in 0,5 ml MM auf Deckgläsern angezogen. Die Inokulation erfolgte mit einer kleinen Menge an Sporen mit einem sterilen Zahnstocher. Die Deckgläser wurden entweder über Nacht bei 37°C oder für einen Tag bzw. den angegebenen Zeitraum bei RT inkubiert. Eine einheitliche Fokusebene wurde durch Verwendung eines Kissens aus 2%-iger Agarose (in H₂O_{bid.} gelöst) erreicht.

Färbemethoden

DAPI-Färbung

Um Zellkerne anzufärben wurden den zu untersuchenden Zellen etwa 20 µl einer 4', 6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) Färbelösung (Vectashield H-1200 (Vector Laboratories)) gegeben. Dieser Farbstoff lagert sich an AT-reiche Regionen in der kleinen Furche der DNA an und ist somit geeignet, die DNA enthaltenden Zellkerne anzufärben (Taniou *et al.*, 1992). Bei Bedarf wurden die Zellen durch Zugabe von 1-2 µl PBS-Puffer mit 1% TritonX-100 permeabilisiert und damit durchlässiger für den Farbstoff gemacht.

Calcofluor White Färbung

Calcofluor bindet Chitin in pilzlichen Zellwänden und kann daher verwendet werden, um pilzliche Zellwände und Septen zu visualisieren (Monheit *et al.*, 1984). 2 µl einer Calcofluor White Färbelösung (Stammlösung: 1g/L, Fluka Analytical) wurden direkt zu den zu untersuchenden Zellen auf den Objektträger gegeben. Die anschließende fluoreszenzmikroskopische Betrachtung der Septen erfolgte im DAPI-Kanal.

Weizenkeim-Agglutinin (WGA)-Fluorescein-Färbung

Weizenkeim-Agglutinin, ein Lektin, bindet selektiv an N-Acetylglucosamin- und N-Acetylneuraminsäure-Reste (Wright, 1984) und kann als Fluorescein-Konjugat verwendet werden, um pilzliche Zellwände und Septen fluoreszenzmikroskopisch zu visualisieren. 1 µl einer 1:10 verdünnten WGA-Fluorescein-Färbelösung (Stammlösung: 1 mg/ml, Invitrogen) wurde direkt zu den zu untersuchenden Zellen auf den Objektträger gegeben. Die anschließende fluoreszenzmikroskopische Betrachtung der Septen erfolgte im GFP-Kanal.

MitoTracker Red®-Färbung

Mitochondrien wurden mit dem spezifischen Marker MitoTracker red® CM-H₂X-Ros (Chloromethyl Dihydro-X-Rosamine) (Invitrogen) sichtbar gemacht. Dieser Fluoreszenz-Farbstoff akkumuliert in aktiven Mitochondrien (Poot *et al.*, 1996). Die Färbung erfolgte direkt im Medium. 1 ml exponentiell wachsende Zellen wurden abzentrifugiert (3.500 Upm, 2 min, Raumtemperatur in einer Heraeus Biofuge pico) und in frischem CM-Medium, dem 0,25 µM des Farbstoffs zugesetzt wurden, resuspendiert. Die Zellen wurden dann für 20 min langsam auf einem Schüttler geschwenkt, zweimal

mit frischem CM-Medium gewaschen und direkt im Anschluss für die Fluoreszenzmikroskopie mit Rhodaminfilter-Einsatz verwendet.

CellTracker Blue[®] (CMAC)-Färbung

Zur Visualisierung von Vakuolen wurde der CellTracker blue[®] (7-Amino-4-Chloromethyl-Coumarin)-Farbstoff (Life Technologies) verwendet. Die Färbung erfolgte bei *U. maydis* Zellen direkt im Medium. 1 ml exponentiell wachsende Zellen wurden abzentrifugiert (3.500 Upm, 2 min, Raumtemperatur in einer Heraeus Biofuge pico) und in frischem CM-Medium, dem 10 μ M (f.c.) des CMAC-Farbstoffs (Stammlösung: 20 mg/ml) zugesetzt wurden, resuspendiert. Die Zellen wurden dann für 30 min langsam auf einem Schüttler geschwenkt, zweimal mit frischem CM-Medium gewaschen und direkt im Anschluss für die Fluoreszenzmikroskopie im CFP-Kanal verwendet. Bei *A. nidulans* wurden 10 μ M (f.c.) des CMAC-Farbstoffs direkt zu den ausgekeimten Sporen auf das Deckglas gegeben, 30 min bei 37°C inkubiert und anschließend einmal mit frischem Medium gewaschen.

Formaldehyd-Fixierung von *U. maydis* Zellen

Zu einer exponentiell wachsenden Kultur ($OD_{600} = 0,5-0,8$) bzw. einer induzierten Kultur mit Filamenten wurde 37%-ige Formaldehyd-Lösung unter Rühren tropfenweise bis zu einer finalen Konzentration von 1% hinzugefügt. Es folgte eine 15-minütige Inkubation unter Schwenken bei RT. Die Reaktion wurde mit 2,5 M Glyzin-Lösung (125 mM f.c.) gestoppt. Anschließend wurden die Zellen pelletiert (5 min., 3.500 Upm, RT, Heraeus Biofuge stratos) und einmal mit PBS-Puffer gewaschen. Die Zellen wurden direkt im Anschluss der fluoreszenzmikroskopischen Analyse unterzogen, können jedoch auch einige Zeit bei 4°C gelagert werden.

Untersuchungen zur Mitochondrienfusion

Zum Mitochondrien-Fusionstest (nach (Nunnari *et al.*, 1997) und (Mahlert *et al.*, 2009)) wurden *U. maydis* FB1- und FB2-Stämme, die die Mitochondrienmarker pKS1 und pKS2 (induzierbare Expression von mitochondriale Matrix gerichtetem mtGFP bzw. mtRFP) enthielten, als Schüttelkulturen bei 180 Upm und 28°C über Nacht in 10 ml CM-Arabinose-Medium kultiviert, um die Marker zu induzieren. Die exponentiell wachsenden Kulturen wurden anschließend abzentrifugiert (5 min., 3.500 Upm, RT, Heraeus Biofuge stratos) und in 15 ml sterilem H₂O_{bid.} resuspendiert. Nach photometrischer Bestimmung der Zelldichte wurden die Zellen erneut abzentrifugiert und in CM-Glukose-Medium auf eine $OD_{600} = 2,0$ eingestellt. Von dieser Suspension wurden je 6 ml mit frischem CM-Glukose-Medium im Verhältnis 1:1 in Schikanekolben gemischt. An diesem Punkt wurden zur Kontrolle je 10 μ l der Suspension entnommen um die nicht-fusionierenden Zellen fluoreszenzmikroskopisch zu untersuchen. Währenddessen wurden die Kulturen für zwei weitere Stunden bei 180 Upm und 28°C inkubiert. Für die Kreuzung der kompatiblen Kreuzungspartner wurde erneut die Zelldichte photometrisch bestimmt und auf einen Wert von $OD_{600} = 3,0$ eingestellt. Als

Kontrolle für die Zellfusion wurden jeweils 8 μl der Ausgangsstämme sowie 1:1 Mischungen der kompatiblen Kreuzungspartner auf Aktivkohle-haltige PD-Platten getropft, die für zwei Tage bei 22°C inkubiert wurden. Für die Kreuzung der kompatiblen Stämme zur Mitochondrienfusion wurde in 2 ml-Reaktionsgefäßen jeweils 400 μl CM-Glukose-Medium mit Aktivkohle vorgelegt, zu dem anschließend jeweils 400 μl der im Verhältnis 1:1 gemischten kompatiblen Stämme gegeben wurden. Pro Kreuzung wurden drei unabhängige biologische Replikate angefertigt. Die Gemische wurden über Nacht bei 22°C auf einem Drehrad inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Reaktionsgefäße einmal entlüftet und nach zwei weiteren Stunden Inkubation auf dem Drehrad fluoreszenzmikroskopisch analysiert.

Inhibitorstudien

Um die Rolle der Mikrotubuli- und Aktin-Zytoskelette zu untersuchen, wurden nach (Fuchs *et al.*, 2005) Inhibitor-Studien mit Benomyl bzw. Cytochalasin A angestellt. Benomyl verhindert die Polymerisierung der Mikrotubuli, während Cytochalasin A die Polymerisierung und Elongation von Aktin-Filamenten stört. Aus einer exponentiell wachsenden Kultur ($\text{OD}_{600} = 0,5-0,8$) wurden 500 μl Zellen in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 20 μM (f.c.) Benomyl (Stammlösung: 10 mM in DMSO, Sigma-Aldrich) bzw. 0,1 μM (f.c.) Cytochalasin A (Stammlösung: 10 mM in DMSO, ICN Biomedicals Inc.) und eine Inkubation für 6-8 h bei 180 Upm und 28°C. Als Lösungsmittelkontrolle wurde das entsprechende Volumen an DMSO hinzugegeben. Um das Zytoskelett in b-abhängigen Filamenten zu analysieren, wurden Kulturen standardmäßig bis zu einer $\text{OD}_{600} = 0,3$ in CM-Glukose-Medium angezogen, einmal mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid}}$ gewaschen und in CM-Arabinose-Medium (AB31-Stämme) bzw. Nitrat-Minimalmedium (AB33-Stämme) aufgenommen und für 2,5 h bei 180 Upm und 28°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe der Inhibitoren, gefolgt von einer weiteren Inkubation für 6-8 h bei 180 Upm und 28°C, bevor die Zellen der fluoreszenzmikroskopischen Analyse unterzogen wurden.

„time lapse“-Mikroskopie

Die Endosomen-Motilität wurde anhand von Bildsequenzen aus 25-50 Aufnahmen mit einer Belichtungszeit von jeweils 50-250 msec mit Hilfe der Axiovision-Software (Carl Zeiss) bestimmt. Berücksichtigt wurden dabei nur Organellen, die eine Distanz von mindestens 5 μm zurücklegten. Für die Konvertierung der entstandenen Filme in Kymographen wurde die ImageJ-Software verwendet.

4.4 Molekularbiologische Standardmethoden

4.4.1 Isolierung von Nukleinsäuren

Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* (Sambrook *et al.*, 1989)

Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte durch „kochende Lyse“. 1,5 ml einer *E. coli* Übernachtskultur, die in dYT-Medium mit den zur Selektion erforderlichen Antibiotika angezogen wurde, wurden eine Minute bei 13.000 Upm (RT, Heraeus Biofuge pico) pelletiert. Das Zellpellet wurde in 300 μ l STET-Puffer resuspendiert, nach Zugabe von 20 μ l Lysozym-Lösung ca. fünf Minuten in einem Eppendorf-Heizblock bei 37°C und 1.400 Upm inkubiert und anschließend eine Minute bei 95°C inkubiert. Die lysierten Zelltrümmer und die denaturierte genomische DNA wurden neun Minuten bei 8.500 Upm abzentrifugiert (RT, Heraeus Biofuge pico) und mit einem sterilen Zahnstocher aus der wässrigen Lösung entfernt. Die Plasmid-DNA wurde anschließend durch Zugabe von 30 μ l Minilysat(III)-Lösung und 500 μ l Isopropanol und 20-minütiger Zentrifugation (13.000 Upm, RT, Heraeus Biofuge pico) gefällt. Das Pellet wurde mit 70%-igem Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen bei RT in 100 μ l TE-Puffer mit 50 μ g/ml RNaseA aufgenommen. Mit dieser Methode gelang es routinemäßig, aus 1,5 ml Übernachtskultur etwa 50-100 μ g Plasmid-DNA zu isolieren.

STET-Puffer

10 mM Tris-HCl, pH 8,0
100 mM NaCl
1 mM Na₂-EDTA
5% (v/v) TritonX-100
in H₂O_{bid.}

Lysozym-Lösung

10 mg/ml Lysozym
in 1x TE-Puffer

Minilysat(III)-Lösung

3 M NaAc, pH 4,8
in H₂O_{bid.}

Isolierung genomischer DNA aus *A. nidulans* (Timberlake und Marshall, 1989)

Für die Präparation von genomischer DNA aus *A. nidulans* wurden 20 ml CM-Flüssigmedium in einer 9 cm Ø Petrischale mit einer Sporensuspension einer frischen Kultur, die auf Festmedium gewachsen war, inokuliert und für 12-15 Stunden bei 32°C inkubiert. Das Myzel wurde anschließend mit einem Spatel geerntet, zwischen einigen Papierhandtüchern trocken gepresst und in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Das gefrorene Myzel wurde anschließend in flüssigem Stickstoff gemörsert, oder bis zur Isolierung der genomischen DNA bei -80°C gelagert. Anschließend wurde ein ml Extraktions-Puffer (50 mM EDTA, 0,2% SDS) zugegeben, für 90 min bei 68°C inkubiert und für fünf min bei 13.000 Upm zentrifugiert (RT, Heraeus Biofuge pico). Zum Überstand wurde 8 M KAc pH 4,2 gegeben und erneut fünf min und 13.000 Upm zentrifugiert. Die DNA wurde durch Zugabe des selben Volumens an Isopropanol präzipitiert, zwei Mal mit 70% Ethanol gewaschen und an der Luft getrocknet. Das Pellet wurde anschließend in einem geeigneten Volumen in TE-Puffer resuspendiert.

Isolierung genomischer DNA aus *U. maydis* (Hoffman und Winston, 1987)

Für die Isolierung genomischer DNA wurden zunächst 2 ml einer *U. maydis* Übernachtskultur, die in 3 ml YEPS_{light}-Medium angezogen wurde, abzentrifugiert (zwei Minuten, 13.000 Upm, RT, Heraeus Biofuge pico) und der Überstand wurde abgenommen. Zum Zellpellet wurden 400 µl Lysis-Puffer, 500 µl TE-Phenol/Chloroform sowie ca. 300 µg Glasperlen (150-200 µm Ø) gegeben. Das Gemisch wurde für 6-10 Minuten bei 1.400 Upm auf einem Vibrax-Schüttler kräftig geschüttelt, um die Zellen aufzuschließen. Zur Phasentrennen erfolgte anschließend ein 15-minütiger Zentrifugationsschritt (13.000 Upm, RT, Heraeus Biofuge pico). Von der wässrigen Phase im Überstand wurden 400 µl in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und die genomische DNA wurde durch Zugabe von einem ml 100% Ethanol und 15-minütiger Zentrifugation (13.000 Upm, RT, Heraeus Biofuge pico) gefällt. Das Pellet wurde mit 70%-igem Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen bei RT in 50 µl TE-Puffer mit 50 µg/ml RNaseA aufgenommen. Die DNA wurde anschließend bei 50°C und 850 Upm in einem Eppendorf-Thermomixer gelöst. Zur Qualitätskontrolle wurde 1 µl der genomischen DNA auf ein 0,8%-iges Agarose-Gel aufgetragen und analysiert.

***U. maydis* Lysis-Puffer**

50 mM Tris-HCl, pH 7,5
50 mM Na₂-EDTA
1% (w/v) SDS
in H₂O_{bid.}

TE-Phenol/Chloroform

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

RNA-Isolierung aus *U. maydis* Flüssigkulturen

Diese Methode orientiert sich am Protokoll der Herstellerfirma (Invitrogen) und wurde zur Präparation von Gesamt-RNA aus *U. maydis* Flüssigkulturen verwendet. Es wurde ausschließlich Nuklease-freies Verbrauchsmaterial verwendet. 50 ml Zellkultur (auch induzierte Kulturen) wurden in CM-Medium bis zu einer OD₆₀₀ = 0,5 angezogen und pelletiert (3.500 Upm, 5 min, RT). Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in flüssigem Stickstoff schockgefroren (ggf. wurde das Pellet bei -80°C gelagert). Auf das tiefgefrorene Pellet wurden 2 ml Trizol (Invitrogen) pipettiert, dieser Ansatz kurz gevortext und nach Zugabe von ca. 300 mg Glasperlen (150-200 µm Ø) wurden die Zellen in einer Kugelmühle (Retsch) bei 30 Hz aufgeschlossen. Der Zellaufschluss wurde in zwei frische 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt, um die Glasperlen aus dem Ansatz zu entfernen. Nach fünf-minütiger Inkubation bei RT wurden pro Ansatz (ein ml Trizol) 200 µl Chloroform zugesetzt, kurz gevortext und drei Minuten bei RT inkubiert. Nach Zentrifugation (15 min, 13.000 Upm, RT) wurde die wässrige Phase abgenommen, in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und nach Zugabe von 500 µl Isopropanol für mindestens zehn Minuten bei RT gefällt. Nach erneuter Zentrifugation (15 min, 13.000 Upm, RT) wurde die pelletierte RNA mit 75% Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (5 min, 13.000 Upm, RT). Der Überstand wurde verworfen und das RNA-Pellet wurde für fünf Minuten bei RT getrocknet, anschließend in 50 µl Nuklease-freiem Wasser (Ambion) aufgenommen und für

zehn Minuten bei 55°C in einem Eppendorf-Heizblock gelöst. Eine Qualitäts- und Quantitätskontrolle erfolgte durch photometrische Messung am NanoDrop ND-1000 Spektrophotometer sowie durch Analyse auf einem Agilent 2100-Bioanalytiker (siehe Angaben des Herstellers).

4.4.2 Handhabung und *in vitro*-Modifikationen von Nukleinsäuren

Sämtliche *in vitro* Methoden zur Handhabung von Nukleinsäuren wurden, wenn nicht gesondert beschrieben, nach (Sambrook *et al.*, 1989) durchgeführt.

EtOH/NaAc-Fällung

Die Reinigung und Konzentrierung von Nukleinsäuren aus wässrigen Lösungen erfolgte durch Fällung. Hierzu wurde die Probe mit 1/10 Volumen 3 M Na-Acetat pH 5,3 und dem 2,5-fachen Volumen an 100% Ethanol versetzt und durch invertieren gemischt. Das Präzipitat wurde durch 20-minütiges Zentrifugieren (13.000 Upm, RT, Heraeus Biofuge pico) pelletiert. Der Niederschlag wurde mit 70% Ethanol gewaschen, um Salze zu entfernen. Nach erneuter kurzer Zentrifugation wurde das Pellet bei RT getrocknet und in einem kleinen Volumen H₂O_{bid.} oder TE-Puffer gelöst.

Phenol/Chloroform-Extraktion

Proteine und andere Verunreinigungen wurden aus wässrigen DNA-Lösungen durch Extraktion mit Phenol entfernt. Die Probe wurde mit gleichem Volumen TE-Phenol/Chloroform kräftig gemischt. Die Phasentrennung erfolgte durch Zentrifugation (13.000 Upm, fünf min, Heraeus Biofuge pico) und die obere wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. In einem zweiten Schritt wurde die Probe mit dem gleichen Volumen TE-Phenol/Chloroform ausgeschüttelt (Sambrook *et al.*, 1989). Die so gereinigten Nukleinsäuren wurden anschließend mit Ethanol präzipitiert (s.o.).

Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde photometrisch bestimmt. Bei einer Wellenlänge von 260 nm und einer Schichtdicke von 1 cm entspricht ein Absorptionwert von 1 einer Konzentration von etwa 50 µg/ml doppelsträngiger DNA und 33 µg/ml einzelsträngiger DNA. Als Maß für die Reinheit der Desoxyribonukleinsäuren diente der Quotient aus den optischen Dichten bei den Wellenlängen 260 nm und 280 nm. Für reine DNA sollte er bei etwa 1,8 liegen. niedrigere Werte deuten Verunreinigungen mit Proteinen, höhere Werte Verunreinigungen mit Salzen oder Zuckern an. Die Messungen erfolgten an einem Nanodrop-ND1000-Spektralphotometer.

Restriktion von DNA

Zur Spaltung von doppelsträngiger DNA wurden TypII-Restriktionsendonukleasen unter den vom Hersteller empfohlenen Pufferbedingungen eingesetzt. Ein typischer analytischer Ansatz enthielt:

- 0,5 µg DNA
- 10 µg Albumin (falls empfohlen)
- 0,5 U Restriktionsenzym (New England Biolabs)
- in 20 µl Reaktionspuffer

Nach der Inkubation für eine Stunde bei 37°C (bzw. der für das jeweilige Enzym optimalen Temperatur) wurden dem Ansatz zwei μl nativer Auftragspuffer zugesetzt und die Reaktionsprodukte wurden auf einem Agarose-Gel analysiert.

Dephosphorylierung linearer DNA-Fragmente

5'-terminale Phosphatgruppen können mit Hilfe der Antarktischen Phosphatase abgespalten werden. Da DNA-Stränge ohne 5'-terminale Phosphatgruppen nicht religieren können, kann so die Selbst-Ligation von linearisierter Plasmid-DNA verhindert werden. Ein typischer Reaktionsansatz enthielt:

1 μg linearisierte Plasmid-DNA
1 U Antarktische Phosphatase (New England Biolabs)
in 20-50 μl Antarktische Phosphatase Puffer

Der Ansatz wurde für 30 Minuten bei 37°C inkubiert und anschließend für 10 Minuten bei 65°C Hitze-inaktiviert. Die so behandelte Plasmid-DNA konnte direkt für die Ligation eingesetzt werden.

Ligation von DNA-Fragmenten

Doppelsträngige DNA-Fragmente wurden mit Hilfe der T4 DNA-Ligase kovalent miteinander verknüpft. Das zu klonierende Fragment wurde in der Regel in drei- bis sechs-fach molarem Überschuss gegenüber der linearisierten, dephosphorylierten Plasmid-DNA eingesetzt. Ein typischer Reaktionsansatz enthielt:

50-100 ng linearisierte, dephosphorylierte Plasmid-DNA
dreifach molarer Überschuss an linearem Fragment
1 U T4 DNA-Ligase (New England Biolabs)
in 20 μl T4 DNA-Ligase Puffer

Der Ansatz wurde entweder für zwei Stunden bei RT oder über Nacht bei ca. 16°C inkubiert. Die so behandelte DNA konnte direkt in chemisch kompetente *E. coli* TOP10 Zellen transformiert werden.

Sequenzierung von DNA

Für die Sequenzierung von DNA wurde der Sequenzier-Service der Ludwigs-Maximilian Universität in München in Anspruch genommen. Vor der automatischen Sequenzierung wurde die DNA mit der PEG-Methode gefällt. Dazu wurde 1/3 Volumen PEG4000 mit 750 mM NaCl zu den Proben gegeben, gut gemischt und anschließend 30 Minuten bei 13.000 Upm und RT zentrifugiert (Heraeus Biofuge pico). Das Pellet wurde einmal mit 70% Ethanol gewaschen, an der Luft getrocknet und in 20 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid}}$ aufgenommen. Alternativ wurde für die Proben-Aufreinigung das RotiPrep Plasmid Mini Kit (Carl Roth) verwendet. Je Sequenzier-Reaktion wurden 100-300 ng Plasmid-DNA mit 2 pmol des Oligonukleotids gemischt. Die erhaltenen Sequenzrohdaten konnten zur weiteren Bearbeitung in die Programme VectorNTI 9.0 oder ApE exportiert werden.

4.4.3 Auftrennung und Nachweis von Nukleinsäuren

Nicht-denaturierende Agarose-Gelelektrophorese

In Agarose-Gelen können Nukleinsäuren in einem elektrischen Feld gemäß ihrer Größe aufgetrennt werden (Sambrook *et al.*, 1989). Standardmäßig wurden Gele mit 0,8% (w/v) Agarose hergestellt. Für die Auftrennung von DNA-Fragmenten bis zu einer Größe von etwa 500 bp wurden 2%-ige Agarose-Gele verwendet. Die entsprechende Menge an Agarose wurde in 0,5x TBE-Puffer aufgekocht, nach Abkühlung auf ca. 70°C mit Ethidiumbromid versetzt (f.c. 0,5 µg/ml) und in einen Elektrophorese-Schlitten gegossen. Nach Erstarren des Gels wurde die Gelkammer mit 0,5x TBE-Puffer gefüllt. Die Nukleinsäuren wurden vor dem Auftragen im Verhältnis 6:1 mit nativem Auftragspuffer versetzt. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Spannung von 5-10 V/cm. Die Banden konnten anschließend im UV-Durchlicht (254 nm) mit einer „eagle eye“-Apparatur (Stratagene) oder einem E-BOX Video-Dokumentationssystem (Peqlab) detektiert und auf Thermalpapier fotografisch festgehalten werden.

5x TBE-Puffer

500 mM Tris-Borat, pH 7,9
10 mM Na₂-EDTA
in H₂O_{bid.}

6x Auftragspuffer, nativ

50% (w/v) Sucrose
0,25% (w/v) Bromphenol-Blau
0,25% (w/v) Xylencyanol FF
in TE-Puffer

Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

Für die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde das JETSORB[®]-Kit (Genomed) verwendet. Das Prinzip besteht darin, die DNA unter Hochsalzbedingungen an eine Silikat-Matrix zu binden, von Verunreinigungen frei zu waschen und schließlich unter Niedrigsalzbedingungen die DNA von dieser Matrix zu eluieren. Die Isolierung wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Mit dieser Methode konnten DNA-Fragmente einer Länge von 200 bp bis 5 kb aus Agarosegelen zu etwa 80 – 90% isoliert werden.

Transfer von DNA (Southern-Analyse) (Southern, 1975)

Der Transfer von mit Restriktions-Endonukleasen behandelten DNA-Fragmenten auf eine Nylonmembran erfolgte durch Kapillar-Blot. Hierbei wird die Transferlösung (20x SSC-Puffer) aus einem Pufferreservoir über Kapillarkräfte durch das Agarose-Gel hindurch in einen auf dem Gel platzierten Stapel Papierhandtücher gesaugt. Durch den Pufferstrom werden die DNA-Fragmente aus dem Gel eluiert und binden an die darüber liegende, positiv geladene Nylon-Membran (Roti[®] Nylon plus, Carl Roth). Ein gleichmäßig verteiltes Gewicht auf dem Papierstapel garantiert eine dichte Verbindung zwischen den einzelnen Lagen des Transfersystems. Vor dem Transfer wurde das Agarose-Gel für 20 Minuten in 0,25 M HCl inkubiert, um einen Großteil der Purine abzuspalten. Der Transfer großer DNA-Fragmente wird dadurch erleichtert. Anschließend wurde das Gel zur Denaturierung des DNA-Doppelstranges für 20 Minuten in DENAT-Lösung inkubiert, und zur

Neutralisierung für weitere 20 Minuten in RENAT-Lösung gewaschen. Der Aufbau des Blots von unten nach oben geschah folgendermaßen:

Whatman (1mm)-Brücke zum Pufferreservoir
 Agarose-Gel
 Nylon-Membran
 drei Lagen Whatman (1mm)-Papier
 Stapel Papierhandtücher
 Glasplatte als Gewicht

Der Kapillarblot erfolgte in der Regel über Nacht, mindestens jedoch für zwei Stunden. Anschließend wurde die Membran kurz getrocknet und die DNA durch UV-Bestrahlung mit einem UV-Stratalinker 1800 (Stratagene) fixiert.

20x SSC-Puffer

3 M NaCl
 0,3 M Na-Citrat * 2 H₂O
 in H₂O_{bid.}, pH-Wert mit HCl auf 7,0 eingestellt

DENAT-Lösung

1,5 M NaCl
 0,4 M NaOH
 in H₂O_{bid.}

RENAT-Lösung

1,5 M NaCl
 282 mM Tris-HCl
 218 mM Tris-Base

Spezifischer Nachweis von Nukleinsäuren (DIG-Protokoll)

Gen-spezifische Sonden wurden durch den Einbau von Digoxigenin-11-dUTP (DIG) in die Sonden-DNA hergestellt. Ein typischer Ansatz für die Markierungsreaktion enthielt:

6,6 µl DNA (0,5-1 µg in H₂O_{bid.})
 1 µl 10x DIG-Mix (Jena Bioscience, siehe Herstellerangaben)
 1 µl 10x Octadeoxyribonukleotide in Markierungspuffer (New England Biolabs)
 1 µl Albumin (10 µg/µl)
 0,4 µl DNA Polymerase I large (Klenow)-Fragment (New England Biolabs)

Vor der Markierungsreaktion wurde die Sonden-DNA zunächst für 10 Minuten bei 95°C in einem Eppendorf-Heizblock denaturiert. Anschließend wurde das Gemisch über Nacht, mindestens jedoch eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde mit 0,5 µl 0,5 M Na₂-EDTA und/oder Inkubation für 10 Minuten bei 65°C gestoppt. Zur Fällung der Sonden-DNA wurde das Gemisch mit 1,4 µl 4 M LiCl und 37,5 µl 100% Ethanol versetzt und 20 Minuten zentrifugiert (13.000 Upm, RT, Heraeus Biofuge pico). Das Pellet wurde in 1 ml Southern-Hybridisierungspuffer gelöst und 10 Minuten bei 95°C in einem Eppendorf-Heizblock oder einem Wasserbad denaturiert. Zur Absättigung der unspezifischen Bindestellen der Nylon-Membran wurde diese mit Southern-Hybridisierungspuffer für 15-30 Minuten bei 65°C in einer Hybridisierungs-Röhre prä-inkubiert. Der Puffer wurde anschließend verworfen, die denaturierte Sonde (in 10 ml Southern-Hybridisierungspuffer) hinzugegeben und über Nacht im Hybridisierungs-Ofen bei 65°C hybridisiert. Anschließend wurde die Membran für je 15 Minuten bei 65°C mit 2xSSPE + 0,1% (v/v) SDS, 1xSSPE + 0,1% (v/v) SDS und 0,1xSSPE + 0,1%

(v/v) SDS gewaschen. Für die Detektion wurde die Membran bei RT in der Hybridisierungs-Röhre in den folgenden Lösungen inkubiert: fünf Minuten DIG-Waschpuffer, 30 Minuten DIG2-Lösung, 60 Minuten Antikörper-Lösung (1:7.500 Anti-Digoxigenin-Fab-Fragmente (Roche) in DIG2-Lösung), und zwei Mal 15 Minuten in DIG-Waschpuffer. Anschließend wurde die Membran für fünf Minuten in DIG3-Lösung äquilibriert und für fünf Minuten in Chemilumineszenz-Lösung (1:500 CDP-Star Lösung (New England Biolabs) in DIG3) inkubiert. Die Membran wurde luftblasenfrei in einen Plastikbeutel eingeschweißt und gemeinsam mit einem blauempfindlichen Röntgenfilm in einer lichtdichten Kassette verschlossen. Nach einer Expositionszeit von durchschnittlich 1-30 Minuten wurde der Film entwickelt, indem dieser zunächst für einige Minuten in Entwickler-Lösung getaucht wurde bis die Banden sichtbar wurden, kurz mit Wasser gespült und schließlich ca. zwei Minuten in Fixier-Lösung fixiert wurde. Alternativ wurde die Chemilumineszenz-Anlage CHEMI-SMART-5100 (PeqLab) zur digitalen Aufnahme des Blots über eine CCD-Kamera verwendet. Mit der Software Chemi-Capt (PeqLab) konnten digitale Aufnahmen bearbeitet oder für eine weitere Bearbeitung exportiert werden.

Southern-Hybridisierungspuffer

500 mM Natrium-Phosphatpuffer, pH 7,0
 7% (w/v) SDS
 in H₂O_{bid.}

DIG-Waschpuffer

0,3% (v/v) Tween-20
 in DIG1

DIG1

0,1 M Maleinsäure
 0,15 M NaCl
 in H₂O_{bid.}, pH-Wert auf 7,5 eingestellt

DIG2

5% Milchpulver (w/v) in DIG1

DIG3

0,1 M Maleinsäure
 0,1 M NaCl
 0,05 M MgCl₂
 in H₂O_{bid.}, pH-Wert auf 9,5 eingestellt

4.5 Biochemische Methoden

4.5.1 Gewinnung von Proteinextrakten aus *U. maydis*

Aus einer exponentiell wachsenden Vorkultur wurden 50-100 ml CM-Medium auf eine OD₆₀₀ = 0,1-0,2 eingestellt. Diese Kultur wurde bis zu einer OD₆₀₀ = 0,7 bei 28°C und 180 Upm inkubiert. Nach der Ernte der Zellen (3.500 Upm, 5 min, 4°C, Heraeus Biofuge stratos) wurde das Zellpellet einmal mit PBS-Puffer gewaschen. Anschließend wurde das Pellet in 1 ml PBS-Puffer mit Protease-Inhibitoren (je 10 ml Puffer 100 µl 100x Complete Protease-Inhibitor Cocktail, 100 µl 0,1 M PMSF, 100 µl 0,5 M Benzamidin) resuspendiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Zellen wurden für 15 Minuten und 25 Hz im vorgekühlten Stahlbehälter mit einer Stahlkugel in einer Kugelmühle (Retsch) aufgeschlossen. Der Zellextrakt wurde auf Eis aufgetaut, in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und für 30 Minuten bei 22.000 Upm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in frische Reaktionsgefäße überführt und direkt für eine Co-Immunoprecipitations-Reaktion

verwendet. Alternativ wurde der Überstand mit Laemmli-Puffer versehen, für fünf Minuten bei 95°C denaturiert und für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese verwendet.

4.5.2 Auftrennung von Proteinen (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung von Proteinen wurde die Methode der diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) angewendet (Laemmli, 1970). Als Laufkammer diente eine Mini Protean II Apparatur (BioRad). Die Auftrennung erfolgte bei 25 mA (pro Gel) für 25-30 Minuten bis die Auftragspufferbande die Trenngel-Schicht erreicht hatte. Die Auftrennung im Trenngel erfolgte standardmäßig bei 40 mA für 45 Minuten oder bei 30 mA (pro Gel) für 60 Minuten.

Standardmäßig wurden Gele mit 10% Acrylamid hergestellt:

Sammelgel (5%)

0,333 ml Acrylamid/Bisacrylamid (30%)
 0,25 ml Sammelgel-Puffer, pH 6,8
 1,385 ml H₂O_{bid.}
 20 µl 10% SDS
 10 µl 10% APS (w/v in H₂O_{bid.})
 2 µl TEMED

Sammelgel-Puffer (4x)

55 mM Tris-Base
 445 mM Tris-HCl
 Mit H₂O_{bid.} angesetzt und pH-Wert auf 6,8 eingestellt.

Trenngel (10%)

1,667 ml Acrylamid/Bisacrylamid (30%)
 1,875 ml Trenngel-Puffer, pH 8,8
 1,364 ml H₂O_{bid.}
 50 µl 10% SDS
 40 µl 10% APS (w/v in H₂O_{bid.})
 4 µl TEMED

Trenngel-Puffer (4x)

1,27 M Tris-Base
 0,23 M Tris-HCl
 Mit H₂O_{bid.} angesetzt und pH-Wert auf 8,8 eingestellt.

Laufpuffer für Protein-Gele (1x)

25 mM Tris-HCl, pH 8,8
 200 mM Glyzin
 0,1% (w/v) SDS
 in H₂O_{bid.}

Laemmli-Puffer (1x)

60 mM Tris-HCl, pH 6,8
 2% (v/v) SDS
 10% (v/v) Glycerin
 5% (v/v) β-Mercaptoethanol
 0,01% (w/v) Bromphenolblau

Als Größenstandard für die Proteingele wurde der PeqGOLD Protein Marker IV (Peqlab) oder der ColorPlus Prestained Protein Marker (New England Biolabs) verwendet.

4.5.3 Silbernitrat-Färbung von Proteingelen

Für die Silbernitrat-Färbung nach (Blum *et al.*, 1987) wurden die Proteine im SDS-Polyacrylamid-Gel zunächst fixiert. Dazu wurde das Gel für eine Stunde in Fixier-Lösung inkubiert. Es folgte ein Waschschrift für 30 Minuten in Waschlösung. Anschließend wurde das Gel für genau eine Minute in Thiosulfat-Lösung und 20 Minuten in Färbelösung inkubiert. Die Banden wurden in Entwickler-Lösung bis zur gewünschten Färbung entwickelt. Die Reaktion wurde mit Stopper-Lösung beendet.

Fixierer

10% Essigsäure
50% Methanol

Waschlösung

30% Ethanol

Thiosulfat-Lösung

0,02% (w/v) Na-Thiosulfat
in H₂O_{bid.}, frisch angesetzt

Färbe-Lösung

0,2% (w/v) AgNO₃
0,015% (v/v) Formaldehyd (37%ig)

Entwickler

6% (w/v) NaCO₃
0,05% (v/v) Formaldehyd (37%ig)
2% Thiosulfat-Lösung

Stopper

18% Essigsäure
75% Methanol

4.5.4 Nachweis von immobilisierten Proteinen (Western-Analyse)

Der Transfer von Proteinen aus SDS-Polyacrylamid-Gelen auf eine PVDF-Membran (Roti®-PVDF (Carl Roth)) erfolgte nach (Towbin *et al.*, 1979) mittels Elektro-Blot in einer Semi-Dry Blotting Apparatur für eine Stunde mit 100 mA pro Gel (oder 1 mA pro cm² Gel). Der Aufbau des Blots von der Kathode in Richtung Anode geschah folgendermaßen:

- 3 Lagen Whatman (3mm)-Papier, in Kathodenpuffer getränkt
- SDS-Polyacrylamid-Gel (für 10 Minuten in Kathodenpuffer äquilibriert)
- PVDF-Membran (1 Minute in Methanol aktiviert, mit H₂O_{bid.} gespült und für 10 Minuten in Anodenpuffer 2 äquilibriert)
- 1 Lage Whatman (3mm)-Papier (in Anodenpuffer 2 getränkt)
- 2 Lagen Whatman (3mm)-Papier (in Anodenpuffer 1 getränkt)

Der spezifische, immunologische Nachweis der immobilisierten Proteine erfolgte mit Hilfe der an einen sekundären Antikörper konjugierten Meerrettich-Peroxidase (HRP). Nach dem Elektro-Blot wurde die PVDF-Membran zunächst für 30 Minuten in 5% (w/v) Magermilchpulver in TBST-Puffer geblockt, um eine unspezifische Bindung der Antikörper an die Membran zu verhindern. Anschließend wurde die Membran für eine Stunde bis über Nacht mit 3 ml des primären Antikörpers (verdünnt in TBST mit 5% Milchpulver), in eine Plastikfolie eingeschweißt, auf einem Drehrad bei 4°C inkubiert. Die Membran wurde danach für drei mal 10 Minuten in TBST-Puffer gewaschen und für eine Stunde mit 3 ml des sekundären Antikörpers (verdünnt in TBST mit 5% Milchpulver) inkubiert. Es folgten drei Waschschrte für jeweils 10 Minuten in TBST-Puffer und ein Waschschrte in TBS-Puffer.

Tabelle 16: Verwendete Antikörper

Antikörper	Wirt	Verdünnung	Bezugsquelle
anti-HA-Antikörper	Maus	1:5.000	Sigma-Aldrich, H3663
anti-GFP-Antikörper	Kaninchen	1:5.000	Sigma-Aldrich, G1544
anti-Maus-HRP	Ziege	1:2.500	Promega, W402B
anti-Kaninchen-HRP	Ziege	1:2.500	Promega, W401B

Für die Detektion wurden je 1 ml ECL 1- und ECL 2-Lösung gemischt, gleichmäßig auf der Membran verteilt und für zwei Minuten bei RT inkubiert. Die Membran wurde anschließend luftblasenfrei in einen Plastikbeutel eingeschweißt und gemeinsam mit einem blauempfindlichen Röntgenfilm in einer

lichtdichten Kassette verschlossen. Nach einer Expositionszeit von durchschnittlich 1-10 Minuten wurde der Film entwickelt, indem dieser zunächst für einige Minuten in Entwickler-Lösung getaucht wurde bis die Banden sichtbar wurden, kurz mit Wasser gespült und schließlich ca. zwei Minuten in Fixier-Lösung fixiert wurde. Alternativ wurde die Chemilumineszenz-Anlage CHEMI-SMART-5100 (PeqLab) zur digitalen Aufnahme des Blots über eine CCD-Kamera verwendet. Mit der Software Chemi-Capt (PeqLab) konnten digitale Aufnahmen bearbeitet oder für eine weitere Bearbeitung exportiert werden.

Anodenpuffer 1

300 mM Tris-HCl, pH 10,4
15% (v/v) Methanol
in H₂O_{bid.}

Anodenpuffer 2

30 mM Tris-HCl, pH 10,4
15% (v/v) Methanol
in H₂O_{bid.}

Kathodenpuffer

25 mM Tris-HCl, pH 9,4
40 mM γ -Aminocapronsäure
15% (v/v) Methanol in H₂O_{bid.}

TBST-Puffer

20 mM Tris-HCl, pH 7,9
136 mM NaCl
0,05% (v/v) Tween-20

ECL 1-Lösung

10 ml 100 mM Tris-HCl pH 8,5
44 μ l 90 mM Coumarinsäure
100 μ l 250 mM Luminol

ECL 2-Lösung

10 ml 100 mM Tris-HCl pH 8,5
6 μ l 30% H₂O₂

4.5.5 Co-Immunopräzipitation

Für den Nachweis von Protein-Interaktionen mittels Co-Immunopräzipitation wurden die entsprechenden Proteine als Fusionsproteine mit einem 3xHA- oder 3xGFP-Tag im nativen Locus und unter Kontrolle ihrer nativen Promotoren exprimiert.

Anti-HA Aufreinigung von Proteinen

Für die anti-HA Aufreinigung wurde ein an Agarose konjugierter monoklonaler anti-HA-Antikörper aus der Maus (Sigma Aldrich, A2095) verwendet. Die Suspension wurde vorbereitend gewaschen. Pro IP-Reaktion wurden 40 μ l Agarose-Suspension abzentrifugiert (30 sec, 13.000 Upm, RT, Heraeus Biofuge pico), der Überstand verworfen und mit je 500 μ l PBS-Puffer gewaschen. Vor dem Abnehmen des Puffers wurde das Reaktionsgefäß jeweils etwa eine Minute auf Eis gestellt, um den Niederschlag absetzen zu lassen. Die Agarose wurde bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert. Anschließend wurde der Proteinrohextrakt (siehe 4.5.1) zur vorbereiteten Agarose gegeben und das Gemisch wurde über Nacht auf einem Drehrad bei 4°C inkubiert. Nach der Reaktion wurde die Agarose dreimal mit je 500 μ l PBS-Puffer gewaschen. Vor dem letzten Zentrifugationsschritt wurden die Proteine in ein frisches Reaktionsgefäß überführt, um unspezifisch gebundene Proteine zu eliminieren. Durch Aufkochen der Agarose in 20 μ l Laemmli-Puffer wurden die Proteine von der Agarose abgelöst und konnten nach SDS-PAGE (siehe 4.5.2) in einer Western-Analyse (siehe 4.5.4) nachgewiesen werden.

Quervernetzung der Proteine mit DSP

Für den Nachweis schwacher oder transientser Proteininteraktionen in der Co-Immunopräzipitation wurden die Proteine quervernetzt. Dithiobis[Succinimidylpropionat] (Lomant's Reagenz, DSP) enthält Amin-reaktive N-Hydroxysuccinimid (NHS)-Ester Verbindungen, die mit den primären Aminen in der Proteinsequenz kovalente Amid-Bindungen eingehen können. Proteine beinhalten primäre Amine in Lysin-Seitenketten sowie am N-Terminus eines jeden Polypeptids, die als Angriffsgruppe für die NHS-Ester Quervernetzung dienen. Zwischen den reaktiven NHS-Ester Gruppen befindet sich ein „Spacer“-Arm mit spaltbarer Disulfid-Bindung, die durch Aufkochen in β -Mercaptoethanol-haltigem Puffer reduziert und somit aufgelöst werden kann.

Aus einer exponentiell wachsenden Vorkultur wurden 200 ml CM-Medium auf eine $OD_{600} = 0,1-0,2$ eingestellt. Diese Kultur wurde bis zu einer $OD_{600} = 0,8$ bei 28°C und 180 Upm inkubiert. Nach der Ernte der Zellen (3.500 Upm, 5 min, 4°C , Heraeus Biofuge stratos) wurde das Zellpellet zweimal mit PBS-Puffer gewaschen. Für die Quervernetzungs-Reaktion wurden die Zellen in 100 ml PBS-Puffer aufgenommen und 2 mM (f.c.) DSP (Fisher Scientific, Stammlösung: 200 mM in DMSO) wurde tropfenweise zugegeben. Die Kultur wurde 45 Minuten bei RT leicht schwenkend inkubiert. Zum Stoppen der Reaktion wurden 2 ml 1 M Tris-HCl, pH 7,5 (20 mM f.c.) zugegeben und weitere 15 Minuten leicht schwenkend inkubiert. Anschließend wurden die Zellen erneut zweimal mit PBS-Puffer gewaschen. Das Pellet wurde in 1 ml PBS mit Proteaseinhibitoren (je 10 ml Puffer 200 μl 100x Complete Protease-Inhibitor Cocktail, 100 μl 0,1 M PMSF, 100 μl 0,5 M Benzamidin) resuspendiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Nach dem Zellaufschluss in der Kugelmühle und dem Abzentrifugieren der Zelltrümmer (siehe 4.5.1) wurde der Überstand für die Co-Immunopräzipitation verwendet (siehe oben). Durch das anschließende Aufkochen des Präzipitats in Laemmli-Puffer für 5-10 Minuten bei 95°C werden die Quervernetzungen aufgelöst und die Proteine können im SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt werden.

4.5.6 Tandem-Affinitäts-Aufreinigung von Proteinen (TAP-Tag Methode)

Aus einer exponentiell wachsenden Vorkultur wurden 300 ml CM-Medium auf eine $OD_{600} = 0,1-0,2$ eingestellt. Diese Kultur wurde bis zu einer $OD_{600} = 0,8-1$ bei 28°C und 180 Upm inkubiert. Vor der Aufreinigung wurden die Proteine mit DSP quervernetzt (siehe 4.5.5). Nach der Ernte der Zellen (3.500 Upm, 5 min, 4°C , Heraeus Biofuge stratos) wurde das Zellpellet zweimal mit PBS-Puffer gewaschen. Anschließend wurde das Pellet in 5 ml Ustilago-Lysis-TT-Puffer mit Protease-Inhibitoren (je 10 ml Puffer 100 μl 100x Complete Protease-Inhibitor Cocktail, 5 μl 1 M DTT, 100 μl 0,1 M PMSF, 100 μl 0,5 M Benzamidin) resuspendiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Zellen wurden für 15 Minuten und 25 Hz im vorgekühlten Stahlbehälter mit einer Stahlkugel in einer Kugelmühle (Retsch) aufgeschlossen. Der Zellextrakt wurde auf Eis aufgetaut, in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und für 30 Minuten bei 22.000 Upm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand

wurden direkt für die TAP-Tag-Reaktion verwendet (Probe 1: Proteinrohextrakt). Alle Schritte sollten auf Eis oder bei 4°C durchgeführt werden.

IgG-Aufreinigung

Zunächst wurde die IgG-Agarose (Sigma-Aldrich) vorbereitet: Pro Ansatz wurden 150 µl (laut Hersteller bindet 1 mg Agarosesuspension bis zu 5 mg Protein binden) Agarose in einem 15 ml Greiner-Gefäß abzentrifugiert (30 sec, 8.000 Upm, 4°C, Heraeus Biofuge stratos) und der Überstand wurde verworfen. Die Suspension wurde anschließend dreimal mit kaltem Ustilago-Lysis-TT-Puffer gewaschen und auf Eis gelagert. Die Überstände mit dem Proteinrohextrakt wurden mit der Agarose vereint und das Gemisch wurde für drei Stunden bis über Nacht auf dem Drehrad bei 4°C inkubiert (je länger die Inkubationsdauer, umso mehr Protein bindet theoretisch an die Agarose, umso unspezifischer wird jedoch die Aufreinigung und die Proben werden anfälliger gegenüber eventuell im Zellextrakt vorhandenen Proteasen). Anschließend wurde die Agarose pelletiert (30 sec, 8.000 Upm, 4°C, Heraeus Biofuge stratos) und der Überstand abgenommen (Probe 2: Überstand nach IgG-Aufreinigung). Die Agarose wurde in 1 ml IPP150-Puffer resuspendiert (je 10 ml Puffer wurden frisch 5 µl 1 M DTT zugegeben) und ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Das Greiner wurde mit ca. 500 µl Puffer nachgespült. Anschließend wurde das Gemisch zentrifugiert (30 sec, 8.000 Upm, RT, Heraeus Biofuge pico), der Überstand abgenommen und zweimal mit je 1 ml IPP150-Puffer gewaschen.

TEV-Protease Behandlung

Die Agarose wurde weitere dreimal mit je 1 ml TEV-CB-Puffer gewaschen (je 10 ml Puffer wurden frisch 5 µl 1 M DTT zugegeben) und anschließend in 150 µl TEV-CB-Puffer aufgenommen (Probe 3: $\frac{1}{10}$ Einsatz). Es folgte die Zugabe von 5 µl TEV-Protease (Invitrogen) und eine Inkubation für zwei Stunden bei 16°C. Die Probe wurde danach kurz zentrifugiert und der Überstand in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Agarose wurde nochmals mit 150 µl TEV-CB-Puffer gewaschen, zentrifugiert und die Überstände wurden vereint. Um kontaminierende Agarose zu eliminieren, wurde die Probe nochmals zentrifugiert und 270 µl wurden wiederum in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt (Probe 4: $\frac{1}{10}$ Einsatz). Die Agarose wurde dreimal mit TEV-CB-Puffer gewaschen und mit 2x Laemmli-Puffer versetzt (Probe 5: Agarose nach TEV-Protease Behandlung).

Calmodulin-Aufreinigung

Zunächst wurde die Calmodulin-Suspension vorbereitet: 50 µl Calmodulin-Suspension (Agilent Technologies) wurden in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß abzentrifugiert (30 sec, 8.000 Upm, RT, Heraeus Biofuge pico), der Überstand wurde verworfen, die Suspension wurde einmal mit 500 µl CBP-Puffer gewaschen und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert. Zu den 270 µl Proteinen wurden 900 µl CBP-Puffer gegeben (je 10 ml Puffer wurden frisch 7,5 µl β-Mercaptoethanol sowie 1 µl 1 M CaCl₂ zugegeben). Die Proteine wurden mit der Calmodulin-Suspension gemischt und für eine Stunde bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert. Anschließend wurde die Probe zentrifugiert, der

Überstand wurde abgenommen (Probe 6: Überstand nach Calmodulin-Aufreinigung). Die Suspension wurde dreimal mit CBP-Puffer gewaschen und in 20 μ l Laemmli-Puffer aufgenommen. Durch Aufkochen der Suspension für fünf Minuten bei 95°C wurden die Proteine eluiert (Probe 7: Eluat) und konnten für weiterführende Analysen mittels SDS-PAGE (siehe 4.5.2) und Silbernitratfärbung der Proteine (siehe 4.5.3) verwendet werden.

Tabelle 17: Verwendete Enzyme und Proteine für die TAP-Tag Aufreinigung

Name	Bezugsquelle
IgG-Agarose aus Kaninchen	Sigma-Aldrich (A2909)
TEV-Protease (10 U/ μ l)	Invitrogen (12575-015)
Calmodulin Resin	Agilent Technologies (240106)

Ustilago-Lysis-TT-Puffer

100 mM Na₂HPO₄
 100 mM NaH₂PO₄*H₂O
 0.1% Nonidet P-40
 150 mM NaCl
 2 mM EDTA
 50 mM NaF
 0.1 mM Na₃VO₄
 in H₂O_{bid.}

IPP150-Puffer

10m M Tris-HCl, pH 8,0
 150 mM NaCl
 0.1% NP40
 in H₂O_{bid.}

TEV-CB-Puffer

10 mM Tris-HCl, pH 8,0
 150 mM NaCl
 0.1% NP40
 0.5 mM EDTA
 in H₂O_{bid.}

CBP-Puffer

10 mM Tris-HCl, pH 8,0
 150 mM NaCl
 0.1% NP40
 1 mM Mg-Acetat
 1 mM Imidazol
 2 mM CaCl₂
 in H₂O_{bid.}

4.6 Polymerase-Kettenreaktion- (PCR-) basierte Techniken

Standard PCR-Ansätze

Alle Reaktionen wurden nach (Innis *et al.*, 1990) in einem Peltier Thermal Cycler (PTC 100 oder PTC 200, MJ Research) durchgeführt. Für die selektive Amplifikation von DNA-Bereichen wurde folgender Standard PCR-Ansatz verwendet:

100 ng Matritzen-DNA
 2 U Taq-DNA-Polymerase
 1 μ l 10 mM dNTPs
 0,3 μ l je Oligonukleotid (100 pmol/ μ l)
 in 50 μ l PCR-Puffer (New England Biolabs)

Initiale Denaturierung:	94°C	für 5 min
Amplifikation:	94°C	für 45 sec
(30 Zyklen)	x°C	für 45 sec
	72°C	für y min
Finale Elongation:	72°C	für 10 min

Die Anlagerungstemperatur x entspricht der niedrigsten Schmelztemperatur der verwendeten Oligonukleotide, die Elongationszeit y entspricht eine Minute pro 1000 bp des zu amplifizierenden Produkts.

PHUSION®-Polymerase Protokoll

Für die Amplifikation genomischer Fragmente von *U. maydis* oder die Amplifikation von Fragmenten, welche für Klonierungsschritte benötigt wurden, wurde die PHUSION® Polymerase (Finnzymes) verwendet, die sich durch eine hohe Prozessivität und niedrige Fehleranfälligkeit auszeichnet. Folgender Ansatz wurde verwendet:

100ng Matrizen-DNA (genomisch) bzw.
 5ng Matrizen-DNA (Plasmid)
 2 U PHUSION® DNA Polymerase
 1 µl 10 mM dNTPs
 0,5 µl je Primer (100 pmol/µl)
 in 50 µl PHUSION®-Puffer (HF)

Initiale Denaturierung:	98°C	für 30 sec
Amplifikation:	98°C	für 10 sec
(30 Zyklen)	x°C	für 15 sec
	72°C	für y sec
Finale Elongation:	72 °C	für 10 min

Die Anlagerungstemperatur x entspricht der niedrigsten Schmelztemperatur der verwendeten Oligonukleotide + 3°C, die Elongationszeit y entspricht 30 Sekunden pro 1000 bp des zu amplifizierenden Produkts.

4.6.1 Generierung von Gen-Deletionskonstrukten für *U. maydis*

Mit dieser Methode (Kämper, 2004) können gezielt offene Leserahmen von Genen in *U. maydis* deletiert werden. Man bedient sich hierbei des Mechanismus der homologen Rekombination über die angrenzenden genomischen Flanken. Eine Klonierung der Fragmente ist dabei nicht notwendig. Prinzipiell erfolgt zunächst eine PCR-Amplifikation des 5'- und 3'- gelegenen Bereichs des zu deletierenden Gens. Die Fragmente sollten dabei etwa eine Länge von etwa 1 kb haben. Über geeignete PCR-Oligonukleotide wurden an den dem offenen Leseraster zugewandten Enden der Amplifikate *Sfi*I-Restriktionsschnittstellen eingebracht. Nach Restriktion der PCR-Produkte wird über die *Sfi*I-Restriktionsschnittstellen eine *Sfi*I-geschnittene Hygromycin-Resistenzkassette aus pBS-hhn direkt zwischen die amplifizierten Flanken ligiert. Mit einer weiteren PCR mit den jeweiligen Außenprimern für die Flanken wird das komplette Deletionskonstrukt amplifiziert, aufgereinigt und für die Transformation in *U. maydis* verwendet. Für alle PCR-Amplifikationen wurde Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase verwendet. Alle Änderungen im Bezug auf den in (Kämper, 2004) publizierten Ablauf sind im folgenden dargestellt:

PCR-Amplifikation der Flanken: Ein Außenprimer und ein Innenprimer mit *Sfi*I-Restriktionsschnittstelle wurden zusammen mit genomischer DNA von *U. maydis* als Matrize in eine PCR-Reaktion eingesetzt. Die Produkte wurden auf einem Agarosegel überprüft und das gewünschte DNA-Fragment, d. h. die linke (5'-) bzw. rechte (3'-) genomische Flanke des zu deletierenden Gens wurde über je eine QiaQuick PCR Purification Säule (Qiagen) aufgereinigt. Die eluierten Flanken

wurden anschließend mit *Sfi*I nachgeschnitten (20 U *Sfi*I; 2 h, 50°C, Gesamtvolumen: 20-50 µl). Es folgte eine Aufreinigung der restringierten Flanken über eine weitere QiaQuick PCR Purification Säule (Qiagen). Im Anschluss erfolgte die Ligation der Flanken mit der mit *Sfi*I-restringierten Resistenzkassette. Als Resistenzkassetten zur Selektion der Deletionskonstrukte wurden verwendet: eine Hygromycin-Resistenzkassette aus pBS-hhn, eine Carboxin-Resistenzkassette aus pUMa260 oder eine Nourseothricin-Resistenzkassette aus pUMa262. Nach zweistündiger Ligation bei RT wurde der Ligationsansatz über ein 0,8%iges TBE-Agarosegel aufgetrennt, die 4 kb-Bande (bestehend aus linker Flanke, Resistenzkassette und rechter Flanke) aufgereinigt und als Matrize in die abschließende PCR eingesetzt. Hierbei wurden „nested“-Oligonukleotide verwendet um eine effiziente und spezifische Amplifikation des Deletionskonstruktes zu gewährleisten. Nach der EtOH/NaAc-Fällung des PCR-Reaktionsgemisches wurde die DNA in 10-20 µl TE-Puffer resuspendiert und anschließend für die Transformation von *U. maydis* Protoplasten eingesetzt.

4.6.2 Real Time PCR (qRT-PCR) Analysen

DNaseI-Behandlung und Reverse Transkription (für Real Time PCR-Analysen)

Vor der reversen Transkription wurde die isolierte Gesamt-RNA zunächst mit Turbo DNase I (Ambion) behandelt, um DNA-Kontaminationen zu entfernen. Hierbei wurde nach Herstellerangaben vorgegangen (siehe Herstellerprotokoll Turbo DNafree™ Kit). Die reverse Transkription wurde mit Hilfe des SuperScript® III First-Strand Synthesis SuperMix-Kits von der Firma Invitrogen nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Für die reverse Transkription von Gesamt-RNA, die aus *U. maydis* Flüssigkulturen extrahiert wurde, wurden 0,5-1 µg DNase-behandelter RNA eingesetzt und zusammen mit Oligo(dT)20-Primern, den entsprechenden Puffern und Enzymgemischen (Details, siehe Herstellerangaben) für die Erststrang-cDNA-Synthese bei 50°C für 50 Minuten inkubiert.

Real Time PCR

qRT-PCR Analysen wurden mit Hilfe des MESA GREEN qPCR Master Mix plus for SYBR Assay + Fluorescein (Eurogentech) nach Herstellerangaben durchgeführt. Je PCR Reaktion wurden 2-5 µl der synthetisierten cDNA (siehe 4.6.3) eingesetzt. Die Analyse erfolgte auf einem BioRad iCycler System unter Verwendung des folgenden Programms:

95°C für 7 min
45 Zyklen für
30 sec bei 95°C
20 sec bei 60°C
40 sec bei 72°C

Im Anschluss wurde die Spezifität der Amplifikation anhand einer Schmelzkurve am BioRad-iCycler-System überprüft. Zur Kalkulation des CT-Wertes (Threshold Cycle), der den Wert bzw. Zyklus beschreibt, bei dem die Fluoreszenz zum ersten Mal signifikant über die Hintergrundfluoreszenz

steigt, wurde die BioRad-Software Version 3.0a verwendet. Die Berechnung der relativen Expressionswerte erfolgte mit dem Program Bio-Rad Gene Expression Macro der Firma BioRad.

4.7 *in silico* Methoden

Für die Sequenz- und Strukturanalyse von DNA- und Proteinsequenzen wurden die nachfolgend aufgelisteten Programme verwendet. Für die angegebenen Internet-Quellen erfolgte der letzte Zugriff jeweils im August 2012.

- ApE – „A Plasmid Editor“ zur Erstellung und Bearbeitung von Plasmid- und genomischen Sequenzen, zum Erstellen von Oligonukleotiden und zeichnen von Plasmidkarten.
- BLAST2 (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul *et al.*, 1990; Altschul *et al.*, 1997; Gish und States, 1993) zur Identifizierung ähnlicher Proteine oder DNA-Sequenzen in den öffentlichen Datenbanken. (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)
- BOXshade 3.2 zur graphischen Darstellung von mit CLUSTAL W oder CLUSTAL X erstellten multiplen Sequenzalignments. (http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html)
- CloneManager (Version 9.0, Sci Ed Central Software) zur Erstellung und Bearbeitung von Plasmid- und genomischen Sequenzen, zum Erstellen von Oligonukleotiden und zeichnen von Plasmidkarten.
- CLUSTAL W und CLUSTAL X Version 2.0 (Goujon *et al.*, 2010; Larkin *et al.*, 2007) zum automatisierten Sequenzabgleich mehrerer Proteinsequenzen. (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>)
- Dicodon-Optimierungs-Tool (Finkernagel, pers. Mitteilung) zur Erstellung von Dicodon-optimierten DNA-Sequenzen (<http://dicodon-optimization.appspot.com/>)
- ELM (Eukaryotic Linear Motive resource) zur Vorhersage funktioneller Motive in Proteinen. (<http://elm.eu.org>)
- FigTree 1.3.1 zur graphischen Darstellung von phylogenetischen Analysen. (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>)
- FunCat zur Klassifizierung von Proteinen in funktionelle Kategorien (<http://mips.helmholtz-muenchen.de/genre/proj/ustilago>)
- MAFFT 6.0 (Kato und Toh, 2008) zum automatisierten Sequenzabgleich mehrerer Proteinsequenzen und phylogenetischen Analysen. (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/software/>)
- MEME 4.8.1 (Multiple Em for Motif Elicitation) (Bailey und Elkan, 1994) für die automatisierte Suche nach Sequenzmotiven in Proteinsequenzen (<http://meme.sdsc.edu/meme/cgi-bin/meme.cgi>)

- MFold (Zuker, 2003) zur Bestimmung von Sekundärstrukturen in qPCR-Amplifikaten und mRNA-Sequenzen. (<http://mfold.rna.albany.edu/>)
- PFAM (Sonnhammer *et al.*, 1997) zur Vorhersage konservierter Proteindomänen bzw. zur Identifizierung von Proteinen mit ähnlichen Domänen oder ähnlicher Domänenstruktur. (<http://pfam.sanger.ac.uk/>)
- PSORT2 (Nakai und Kanehisa, 1992) zur Vorhersage der subzellulären Protein-Lokalisierung anhand von Protein-Sequenzen (<http://psort.hgc.jp/>)
- SMART (Simple Modular Architecture Research Tool) (Schultz *et al.*, 1998) zur Identifizierung konservierter Domänen in Proteinen bzw. zur Identifizierung von Proteinen mit ähnlichen Domänen oder ähnlicher Domänenstruktur. (<http://smart.embl-heidelberg.de/>)
- VectorNTI 10.0 (Invitrogen) Zur Sequenzanalyse, virtuellen Klonierung, und Bearbeitung von Plasmid- und genomischen Sequenzen, Oligonukleotid-Design und automatisierten Sequenzabgleichen von DNA- und Protein-Sequenzen
- WoLF PSORT (Horton *et al.*, 2007) zur Vorhersage der subzellulären Lokalisierung von Proteinen und Proteindomänen anhand von Proteinsequenzen (<http://wolfsort.org/>)

Die folgenden Genom-Datenbanken wurden zur Identifizierung von orthologen Proteinsequenzen anhand annotierter Funktionen und zur Analyse von DNA- und Protein-Sequenzdaten verwendet. Der letzte Zugriff erfolgte jeweils im August 2012.

- *Aspergillus* Genome Database (AspGD): <http://www.aspgd.org/>
- MIPS *Ustilago maydis* Database (MUMDB): <http://mips.helmholtz-muenchen.de/genre/proj/ustilago>
- MIPS *Ustilago hordei* Database (MUHDB): <http://mips.helmholtz-muenchen.de/genre/proj/MUHDB/>
- MIPS *Sporisorium reilianum* Database (MSRDB): <http://mips.helmholtz-muenchen.de/genre/proj/sporisorium/>
- *Saccharomyces* Genome Database (SGD): <http://www.yeastgenome.org>

Stammbaumanalyse

Für die vergleichende phylogenetische Analyse des Num1 Proteins wurden zunächst die 65 Sequenzen mit der höchsten Ähnlichkeit zu *U. maydis* Num1 anhand einer BLASTp Analyse bezogen. Die Sequenz des *S. cerevisiae* Num1 p Proteins wurde als Außengruppe in die Analyse mit einbezogen. Die Sequenzen wurden automatisch mit Hilfe der MAFFT Software (Version 6) und dem G-INS-i Algorithmus abgeglichen. Ein phylogenetischer Stammbaum wurde anhand der „minimum linkage clustering“ Methode berechnet. Das Programm Fig Tree wurde anschließend verwendet, um die Nexus-Formate der MAFFT-Ergebnisse zu visualisieren.

5. Literaturverzeichnis

ABENZA, J. F., PANTAZOPOULOU, A., RODRIGUEZ, J. M., GALINDO, A., und PENALVA, M. A. (2009). Long-distance movement of *Aspergillus nidulans* early endosomes on microtubule tracks. *Traffic* **10**, 57-75.

AICHINGER, C. (2000) Identifizierung pflanzenabhängig-regulierter Gene in *Ustilago maydis*, Ludwig-Maximilians-Universität, München.

AJUH, P., KUSTER, B., PANOV, K., ZOMERDIJK, J. C., MANN, M., und LAMOND, A. I. (2000). Functional analysis of the human CDC5L complex and identification of its components by mass spectrometry. *The EMBO journal* **19**, 6569-6581.

ALLEN, A., ISLAMOVIC, E., KAUR, J., GOLD, S., SHAH, D., und SMITH, T. J. (2011). Transgenic maize plants expressing the Totivirus antifungal protein, KP4, are highly resistant to corn smut. *Plant biotechnology journal* **9**, 857-864.

ALTSCHUL, S. F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E. W., und LIPMAN, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology* **215**, 403-410.

ALTSCHUL, S. F., MADDEN, T. L., SCHAFFER, A. A., ZHANG, J., ZHANG, Z., MILLER, W., und LIPMAN, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic acids research* **25**, 3389-3402.

ALWINE, J. C., KEMP, D. J., und STARK, G. R. (1977). Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **74**, 5350-5354.

ANDERS, S., und HUBER, W. (2010). Differential expression analysis for sequence count data. *Genome biology* **11**, R106.

ARMSTRONG, J. (2010). Yeast vacuoles: more than a model lysosome. *Trends in cell biology* **20**, 580-585.

ARNAUD, M. B., CHIBUCOS, M. C., COSTANZO, M. C., CRABTREE, J., INGLIS, D. O., LOTIA, A., ORVIS, J., SHAH, P., SKRZYPEK, M. S., BINKLEY, G., *et al.* (2010). The *Aspergillus* Genome Database, a curated comparative genomics resource for gene, protein and sequence information for the *Aspergillus* research community. *Nucleic acids research* **38**, D420-427.

ASHWIN, P., LIN, C., und STEINBERG, G. (2010). Queueing induced by bidirectional motor motion near the end of a microtubule. *Physical review E, Statistical, nonlinear, and soft matter physics* **82**, 051907.

AUSUBEL, M. A., AUSUBEL, M. A., BRENT, R., KINGSTON, R. E., MOORE, D. D., SEIDMANN, J. G., und SMITH, J. A., eds. (1987). *Current protocols in molecular biology* (John Wiley & Sons, Inc.).

BAILEY, T. L., und ELKAN, C. (1994). Fitting a mixture model by expectation maximization to discover motifs in biopolymers. *Proceedings / International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology ; ISMB International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology* **2**, 28-36.

BAKKEREN, G., KÄMPER, J., und SCHIRAWSKI, J. (2008). Sex in smut fungi: Structure, function and evolution of mating-type complexes. *Fungal genetics and biology : FG & B* **45 Suppl 1**, S15-21.

- BANKS, G. R., SHELTON, P. A., KANUGA, N., HOLDEN, D. W., und SPANOS, A.** (1993). The *Ustilago maydis nar1* gene encoding nitrate reductase activity: sequence and transcriptional regulation. *Gene* **131**, 69-78.
- BANUETT, F.** (1995). Genetics of *Ustilago maydis*, a fungal pathogen that induces tumors in maize. *Annu Rev Genet* **29**, 179-208.
- BANUETT, F., und HERSKOWITZ, I.** (1989). Different *a* alleles of *Ustilago maydis* are necessary for maintenance of filamentous growth but not for meiosis. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**, 5878-5882.
- BANUETT, F., und HERSKOWITZ, I.** (1994). Morphological transitions in the life cycle of *Ustilago maydis* and their genetic control by the *a* and *b* loci. *Exp Mycology* **18**, 247-266.
- BANUETT, F., und HERSKOWITZ, I.** (1996). Discrete developmental stages during teliospore formation in the corn smut fungus, *Ustilago maydis*. *Development* **122**, 2965-2976.
- BANUETT, F., QUINTANILLA, R. H., JR., und REYNAGA-PENA, C. G.** (2008). The machinery for cell polarity, cell morphogenesis, and the cytoskeleton in the Basidiomycete fungus *Ustilago maydis*-a survey of the genome sequence. *Fungal genetics and biology : FG & B* **45 Suppl 1**, S3-S14.
- BARTNICKI-GARCIA, S.** (2002). Hyphal tip growth: Outstanding questions. In *Molecular Biology of Fungal Development*, H. E. Osiewacz, ed. (New York, Dekker (Marcel)), pp. 29-58.
- BARTNICKI-GARCIA, S.** (2006). Chitosomes: past, present and future. *FEMS yeast research* **6**, 957-965.
- BASSE, C. W., KOLB, S., und KAHMANN, R.** (2002). A maize-specifically expressed gene cluster in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol* **43**, 75-93.
- BASSE, C. W., und STEINBERG, G.** (2004). *Ustilago maydis*, model system for analysis of the molecular basis of fungal pathogenicity. *Molecular plant pathology* **5**, 83-92.
- BAUMANN, S., POHLMANN, T., JUNGBLUTH, M., BRACHMANN, A., und FELDBRÜGGE, M.** (2012). Kinesin-3 and dynein mediate microtubule-dependent co-transport of mRNPs and endosomes. *Journal of cell science*.
- BECHT, P., KÖNIG, J., und FELDBRÜGGE, M.** (2006). The RNA-binding protein Rrm4 is essential for polarity in *Ustilago maydis* and shuttles along microtubules. *Journal of cell science* **119**, 4964-4973.
- BECHT, P., VOLLMEISTER, E., und FELDBRÜGGE, M.** (2005). Role for RNA-binding proteins implicated in pathogenic development of *Ustilago maydis*. *Eukaryotic cell* **4**, 121-133.
- BECK, B. D., PARK, S. J., LEE, Y. J., ROMAN, Y., HROMAS, R. A., und LEE, S. H.** (2008). Human Pso4 is a metnase (SETMAR)-binding partner that regulates metnase function in DNA repair. *The Journal of biological chemistry* **283**, 9023-9030.
- BEGEROW, D., STOLL, M., und BAUER, R.** (2006). A phylogenetic hypothesis of Ustilaginomycotina based on multiple gene analyses and morphological data. *Mycologia* **98**, 906-916.
- BEN-YEHUDA, S., DIX, I., RUSSELL, C. S., MCGARVEY, M., BEGGS, J. D., und KUPIEC, M.** (2000). Genetic and physical interactions between factors involved in both cell cycle progression and pre-mRNA splicing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **156**, 1503-1517.

- BERGS, A.** (2012) Charakterisierung sekretierter Proteine in *Ustilago maydis*, Karlsruhe Institut für Technologie, Karlsruhe.
- BERNSTEIN, H. S., und COUGHLIN, S. R.** (1998). A mammalian homolog of fission yeast Cdc5 regulates G2 progression and mitotic entry. *The Journal of biological chemistry* **273**, 4666-4671.
- BISSON, A.** (2011) Charakterisierung des homologen Num1 Proteins aus *Ustilago maydis* in *Aspergillus nidulans* und *Cryptococcus neoformans*, Karlsruher Institut für Technologie, Karlsruhe.
- BLEAZARD, W., MCCAFFERY, J. M., KING, E. J., BALE, S., MOZDY, A., TIEU, Q., NUNNARI, J., und SHAW, J. M.** (1999). The dynamin-related GTPase Dnm1 regulates mitochondrial fission in yeast. *Nature cell biology* **1**, 298-304.
- BLUM, H., BEIER, H., und GROSS, H. J.** (1987). Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* **8**, 93-99.
- BÖHMER, C., BÖHMER, M., BÖLKER, M., und SANDROCK, B.** (2008). Cdc42 and the Ste20-like kinase Don3 act independently in triggering cytokinesis in *Ustilago maydis*. *J Cell Sci* **121**, 143-148.
- BÖHMER, C., RIPP, C., und BÖLKER, M.** (2009). The germinal centre kinase Don3 triggers the dynamic rearrangement of higher-order septin structures during cytokinesis in *Ustilago maydis*. *Molecular microbiology* **74**, 1484-1496.
- BÖLKER, M.** (2001). *Ustilago maydis*--a valuable model system for the study of fungal dimorphism and virulence. *Microbiology* **147**, 1395-1401.
- BÖLKER, M., GENIN, S., LEHMLER, C., und KAHMANN, R.** (1995). Genetic regulation of mating, and dimorphism in *Ustilago maydis*. *Can J Bot* **73**, 320-325.
- BÖLKER, M., URBAN, M., und KAHMANN, R.** (1992). The *a* mating type locus of *U. maydis* specifies cell signaling components. *Cell* **68**, 441-450.
- BORTFELD, M., AUFFARTH, K., KAHMANN, R., und BASSE, C. W.** (2004). The *Ustilago maydis* *a2* mating-type locus genes *lga2* and *rga2* compromise pathogenicity in the absence of the mitochondrial p32 family protein Mrb1. *Plant Cell* **16**, 2233-2248.
- BOTTIN, A., KÄMPER, J., und KAHMANN, R.** (1996). Isolation of a carbon source-regulated gene from *Ustilago maydis*. *Mol Gen Genet* **253**, 342-352.
- BOWMAN, A. B., KAMAL, A., RITCHINGS, B. W., PHILP, A. V., MCGRAIL, M., GINDHART, J. G., und GOLDSTEIN, L. S.** (2000). Kinesin-dependent axonal transport is mediated by the sunday driver (SYD) protein. *Cell* **103**, 583-594.
- BRACHMANN, A.** (2001) Die frühe Infektionsphase von *Ustilago maydis*: Genregulation durch das bW/bE-Heterodimer. München, Ludwig-Maximilians-Universität., Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- BRACHMANN, A., KONIG, J., JULIUS, C., und FELDBRÜGGE, M.** (2004). A reverse genetic approach for generating gene replacement mutants in *Ustilago maydis*. *Mol Genet Genomics* **272**, 216-226.
- BRACHMANN, A., SCHIRAWSKI, J., MÜLLER, P., und KAHMANN, R.** (2003). An unusual MAP kinase is required for efficient penetration of the plant surface by *Ustilago maydis*. *EMBO J* **22**, 2199-2210.

- BRACHMANN, A., WEINZIERL, G., KÄMPER, J., und KAHMANN, R.** (2001). Identification of genes in the bW/bE regulatory cascade in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol* **42**, 1047-1063.
- BRAND, A.** (2012). Hyphal growth in human fungal pathogens and its role in virulence. *International journal of microbiology* **2012**, 517529.
- BREFELD, O.** (1875). Untersuchungen aus dem Gesamtgebiete der Mykologie: die Brandpilze II. . In (Fortsetzung des V. Heftes) : die Brandkrankheiten des Getreides.
- BRENDEL, M., BONATTO, D., STRAUSS, M., REVERS, L. F., PUNGARTNIK, C., SAFFI, J., und HENRIQUES, J. A.** (2003). Role of PSO genes in repair of DNA damage of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutation research* **544**, 179-193.
- BRENDZA, R. P., SERBUS, L. R., SAXTON, W. M., und DUFFY, J. B.** (2002). Posterior localization of dynein and dorsal-ventral axis formation depend on kinesin in *Drosophila* oocytes. *Current biology : CB* **12**, 1541-1545.
- BULINSKI, J. C., MCGRAW, T. E., GRUBER, D., NGUYEN, H. L., und SHEETZ, M. P.** (1997). Overexpression of MAP4 inhibits organelle motility and trafficking *in vivo*. *Journal of cell science* **110 (Pt 24)**, 3055-3064.
- BULLITT, E., ROUT, M. P., KILMARTIN, J. V., und AKEY, C. W.** (1997). The yeast spindle pole body is assembled around a central crystal of Spc42p. *Cell* **89**, 1077-1086.
- BURATTI, E., und BARALLE, F. E.** (2004). Influence of RNA secondary structure on the pre-mRNA splicing process. *Molecular and cellular biology* **24**, 10505-10514.
- BURNS, C. G., und GOULD, K. L.** (1999). Connections between Pre-mRNA Processing and Regulation of the Eukaryotic Cell Cycle. In Post-Translational Processing and the Endocrine System, S. L. Chew, ed. (New York, Karger), pp. 59-82.
- BURNS, C. G., OHI, R., KRAINER, A. R., und GOULD, K. L.** (1999). Evidence that Myb-related CDC5 proteins are required for pre-mRNA splicing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 13789-13794.
- BURNS, C. G., OHI, R., MEHTA, S., O'TOOLE, E. T., WINEY, M., CLARK, T. A., SUGNET, C. W., ARES, M., JR., und GOULD, K. L.** (2002). Removal of a single alpha-tubulin gene intron suppresses cell cycle arrest phenotypes of splicing factor mutations in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology* **22**, 801-815.
- BYRD, D. T., KAWASAKI, M., WALCOFF, M., HISAMOTO, N., MATSUMOTO, K., und JIN, Y.** (2001). UNC-16, a JNK-signaling scaffold protein, regulates vesicle transport in *C. elegans*. *Neuron* **32**, 787-800.
- CACERES, A., YE, B., und DOTTI, C. G.** (2012). Neuronal polarity: demarcation, growth and commitment. *Current opinion in cell biology*.
- CAI, Q., GERWIN, C., und SHENG, Z. H.** (2005). Syntabulin-mediated anterograde transport of mitochondria along neuronal processes. *The Journal of cell biology* **170**, 959-969.
- CAMPANONI, P., und BLATT, M. R.** (2007). Membrane trafficking and polar growth in root hairs and pollen tubes. *Journal of experimental botany* **58**, 65-74.
- CARACUEL-RIOS, Z., und TALBOT, N. J.** (2007). Cellular differentiation and host invasion by the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Current opinion in microbiology* **10**, 339-345.

- CASSELTON, L. A., und OLESNICKY, N. S. (1998). Molecular genetics of mating recognition in basidiomycete fungi. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**, 55-70.
- CHAN, S. P., und CHENG, S. C. (2005). The Prp19-associated complex is required for specifying interactions of U5 and U6 with pre-mRNA during spliceosome activation. *The Journal of biological chemistry* **280**, 31190-31199.
- CHAN, S. P., KAO, D. I., TSAI, W. Y., und CHENG, S. C. (2003). The Prp19p-associated complex in spliceosome activation. *Science* **302**, 279-282.
- CHANARAT, S., BURKERT-KAUTZSCH, C., MEINEL, D. M., und STRASSER, K. (2012). Prp19C and TREX: interacting to promote transcription elongation and mRNA export. *Transcription* **3**, 8-12.
- CHANARAT, S., SEIZL, M., und STRASSER, K. (2011). The Prp19 complex is a novel transcription elongation factor required for TREX occupancy at transcribed genes. *Genes & development* **25**, 1147-1158.
- CHANG, Y. F., IMAM, J. S., und WILKINSON, M. F. (2007). The nonsense-mediated decay RNA surveillance pathway. *Annual review of biochemistry* **76**, 51-74.
- CHAVEZ, S., BEILHARZ, T., RONDON, A. G., ERDJUMENT-BROMAGE, H., TEMPST, P., SVEJSTRUP, J. Q., LITHGOW, T., und AGUILERA, A. (2000). A protein complex containing Tho2, Hpr1, Mft1 and a novel protein, Thp2, connects transcription elongation with mitotic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *The EMBO journal* **19**, 5824-5834.
- CHAVEZ, S., GARCIA-RUBIO, M., PRADO, F., und AGUILERA, A. (2001). Hpr1 is preferentially required for transcription of either long or G+C-rich DNA sequences in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology* **21**, 7054-7064.
- CHELSEY, D., RALPH, R., und JONAK, G. (1989). Sequence requirements for synthetic peptide-mediated translocation to the nucleus. *Molecular and cellular biology* **9**, 2487-2492.
- CHEN, C. H., TSAI, W. Y., CHEN, H. R., WANG, C. H., und CHENG, S. C. (2001). Identification and characterization of two novel components of the Prp19p-associated complex, Ntc30p and Ntc20p. *The Journal of biological chemistry* **276**, 488-494.
- CHEN, C. H., YU, W. C., TSAO, T. Y., WANG, L. Y., CHEN, H. R., LIN, J. Y., TSAI, W. Y., und CHENG, S. C. (2002). Functional and physical interactions between components of the Prp19p-associated complex. *Nucleic acids research* **30**, 1029-1037.
- CHEN, H. R., JAN, S. P., TSAO, T. Y., SHEU, Y. J., BANROQUES, J., und CHENG, S. C. (1998). Snt309p, a component of the Prp19p-associated complex that interacts with Prp19p and associates with the spliceosome simultaneously with or immediately after dissociation of U4 in the same manner as Prp19p. *Molecular and cellular biology* **18**, 2196-2204.
- CHEN, H. R., TSAO, T. Y., CHEN, C. H., TSAI, W. Y., HER, L. S., HSU, M. M., und CHENG, S. C. (1999). Snt309p modulates interactions of Prp19p with its associated components to stabilize the Prp19p-associated complex essential for pre-mRNA splicing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 5406-5411.
- CHENG, H., DUFU, K., LEE, C. S., HSU, J. L., DIAS, A., und REED, R. (2006). Human mRNA export machinery recruited to the 5' end of mRNA. *Cell* **127**, 1389-1400.

CHENG, S. C., TARN, W. Y., TSAO, T. Y., und ABELSON, J. (1993). PRP19: a novel spliceosomal component. *Molecular and cellular biology* **13**, 1876-1882.

CHRISTENSEN, J. J. (1963). Corn smut induced by *Ustilago maydis*. *Amer Phytopathol Soc Monogr* **2**.

CLARK, T. A., SUGNET, C. W., und ARES, M., JR. (2002). Genomewide analysis of mRNA processing in yeast using splicing-specific microarrays. *Science* **296**, 907-910.

COHEN, S. N., CHANG, A. C., und HSU, L. (1972). Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **69**, 2110-2114.

COX, R. T., und SPRADLING, A. C. (2006). Milton controls the early acquisition of mitochondria by *Drosophila* oocytes. *Development* **133**, 3371-3377.

DAHAN, O., und KUPIEC, M. (2002). Mutations in genes of *Saccharomyces cerevisiae* encoding pre-mRNA splicing factors cause cell cycle arrest through activation of the spindle checkpoint. *Nucleic acids research* **30**, 4361-4370.

DAVID, C. J., BOYNE, A. R., MILLHOUSE, S. R., und MANLEY, J. L. (2011). The RNA polymerase II C-terminal domain promotes splicing activation through recruitment of a U2AF65-Prp19 complex. *Genes & development* **25**, 972-983.

DAVIS, C. A., GRATE, L., SPINGOLA, M., und ARES, M., JR. (2000). Test of intron predictions reveals novel splice sites, alternatively spliced mRNAs and new introns in meiotically regulated genes of yeast. *Nucleic acids research* **28**, 1700-1706.

DE ANDRADE, H. H., MARQUES, E. K., SCHENBERG, A. C., und HENRIQUES, J. A. (1989). The PSO4 gene is responsible for an error-prone recombinational DNA repair pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular & general genetics : MGG* **217**, 419-426.

DEAN, R., VAN KAN, J. A., PRETORIUS, Z. A., HAMMOND-KOSACK, K. E., DI PIETRO, A., SPANU, P. D., RUDD, J. J., DICKMAN, M., KAHMANN, R., ELLIS, J., und FOSTER, G. D. (2012). The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular plant pathology* **13**, 414-430.

DEISING, H. B., WERNER, S., und WERNITZ, M. (2000). The role of fungal appressoria in plant infection. *Microbes and infection / Institut Pasteur* **2**, 1631-1641.

DELLAGO, H., LOSCHER, M., AJUH, P., RYDER, U., KAISERMAYER, C., GRILLARI-VOGLAUER, R., FORTSCHEGGER, K., GROSS, S., GSTRANTHALER, A., BORTH, N., et al. (2011). Exo70, a subunit of the exocyst complex, interacts with SNEV(hPrp19/hPso4) and is involved in pre-mRNA splicing. *The Biochemical journal* **438**, 81-91.

DEMEREK, M., ADELBERG, E. A., CLARK, A. J., und HARTMAN, P. E. (1966). A proposal for a uniform nomenclature in bacterial genetics. *Genetics* **54**, 61-76.

DESAI, A., und MITCHISON, T. J. (1997). Microtubule polymerization dynamics. *Annual review of cell and developmental biology* **13**, 83-117.

DHANASEKARAN, D. N., KASHEF, K., LEE, C. M., XU, H., und REDDY, E. P. (2007). Scaffold proteins of MAP-kinase modules. *Oncogene* **26**, 3185-3202.

- DIXIT, R., ROSS, J. L., GOLDMAN, Y. E., und HOLZBAUR, E. L.** (2008). Differential regulation of dynein and kinesin motor proteins by tau. *Science* **319**, 1086-1089.
- DJAMEI, A., SCHIPPER, K., RABE, F., GHOSH, A., VINCON, V., KAHNT, J., OSORIO, S., TOHGE, T., FERNIE, A. R., FEUSSNER, I., et al.** (2011). Metabolic priming by a secreted fungal effector. *Nature* **478**, 395-398.
- DOEBLEY, J.** (1992). Mapping the genes that made maize. *Trends in genetics : TIG* **8**, 302-307.
- DÖHLEMANN, G., REISSMANN, S., ASSMANN, D., FLECKENSTEIN, M., und KAHMANN, R.** (2011). Two linked genes encoding a secreted effector and a membrane protein are essential for *Ustilago maydis*-induced tumour formation. *Molecular microbiology* **81**, 751-766.
- DÖHLEMANN, G., VAN DER LINDE, K., ASSMANN, D., SCHWAMMBACH, D., HOF, A., MOHANTY, A., JACKSON, D., und KAHMANN, R.** (2009). Pep1, a secreted effector protein of *Ustilago maydis*, is required for successful invasion of plant cells. *PLoS Pathog* **5**, e1000290.
- DOYLE, M., und KIEBLER, M. A.** (2011). Mechanisms of dendritic mRNA transport and its role in synaptic tagging. *The EMBO journal* **30**, 3540-3552.
- DREWES, G., EBNETH, A., und MANDELKOW, E. M.** (1998). MAPs, MARKs and microtubule dynamics. *Trends in biochemical sciences* **23**, 307-311.
- DUNN, S., MORRISON, E. E., LIVERPOOL, T. B., MOLINA-PARIS, C., CROSS, R. A., ALONSO, M. C., und PECKHAM, M.** (2008). Differential trafficking of Kif5c on tyrosinated and detyrosinated microtubules in live cells. *Journal of cell science* **121**, 1085-1095.
- EDENFELD, G., VOLOHONSKY, G., KRUKKERT, K., NAFFIN, E., LAMMEL, U., GRIMM, A., ENGELEN, D., REUVENY, A., VOLK, T., und KLAMBT, C.** (2006). The splicing factor crooked neck associates with the RNA-binding protein HOW to control glial cell maturation in *Drosophila*. *Neuron* **52**, 969-980.
- ERDELYI, M., MICHON, A. M., GUICHET, A., GLOTZER, J. B., und EPHRUSSI, A.** (1995). Requirement for *Drosophila* cytoplasmic tropomyosin in *oskar* mRNA localization. *Nature* **377**, 524-527.
- EWING, B., und GREEN, P.** (1998). Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome research* **8**, 186-194.
- EWING, B., HILLIER, L., WENDL, M. C., und GREEN, P.** (1998). Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome research* **8**, 175-185.
- FABRIZIO, P., DANNENBERG, J., DUBE, P., KASTNER, B., STARK, H., URLAUB, H., und LUHRMANN, R.** (2009). The evolutionarily conserved core design of the catalytic activation step of the yeast spliceosome. *Molecular cell* **36**, 593-608.
- FEDLER, M., LUH, K. S., STELTER, K., NIETO-JACOBO, F., und BASSE, C. W.** (2009). The *a2* mating-type locus genes *lga2* and *rga2* direct uniparental mitochondrial DNA (mtDNA) inheritance and constrain mtDNA recombination during sexual development of *Ustilago maydis*. *Genetics* **181**, 847-860.
- FELDBRÜGGE, M., KÄMPER, J., STEINBERG, G., und KAHMANN, R.** (2004). Regulation of mating and pathogenic development in *Ustilago maydis*. *Curr Opin Microbiol* **7**, 666-672.
- FIELDS, S., und SONG, O.** (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* **340**, 245-246.

- FISCHER, R.** (2006). The cytoskeleton and polarized growth of filamentous fungi. . In *The Mycota VIII*, G. N. Howard RJ, ed. (Berlin, Heidelberg, Springer), pp. 121-135.
- FISCHER, R., ZEKERT, N., und TAKESHITA, N.** (2008). Polarized growth in fungi--interplay between the cytoskeleton, positional markers and membrane domains. *Molecular microbiology* **68**, 813-826.
- FLOR-PARRA, I., CASTILLO-LLUVA, S., und PEREZ-MARTIN, J.** (2007). Polar growth in the infectious hyphae of the phytopathogen *Ustilago maydis* depends on a virulence-specific cyclin. *Plant Cell* **19**, 3280-3296.
- FLOR-PARRA, I., VRANES, M., KÄMPER, J., und PEREZ-MARTIN, J.** (2006). Biz1, a zinc finger protein required for plant invasion by *Ustilago maydis*, regulates the levels of a mitotic cyclin. *Plant Cell* **18**, 2369-2387.
- FORTSCHEGGER, K., WAGNER, B., VOGLAUER, R., KATINGER, H., SIBILIA, M., und GRILLARI, J.** (2007). Early embryonic lethality of mice lacking the essential protein SNEV. *Molecular and cellular biology* **27**, 3123-3130.
- FRANSSON, S., RUUSALA, A., und ASPENSTROM, P.** (2006). The atypical Rho GTPases Miro-1 and Miro-2 have essential roles in mitochondrial trafficking. *Biochemical and biophysical research communications* **344**, 500-510.
- FREDERICK, R. L., und SHAW, J. M.** (2007). Moving mitochondria: establishing distribution of an essential organelle. *Traffic* **8**, 1668-1675.
- FREITAG, J., LANVER, D., BÖHMER, C., SCHINK, K. O., BÖLKER, M., und SANDROCK, B.** (2011). Septation of infectious hyphae is critical for appressoria formation and virulence in the smut fungus *Ustilago maydis*. *PLoS pathogens* **7**, e1002044.
- FUCHS, F., und WESTERMANN, B.** (2005). Role of Unc104/KIF1-related motor proteins in mitochondrial transport in *Neurospora crassa*. *Molecular biology of the cell* **16**, 153-161.
- FUCHS, U., MANN, I., und STEINBERG, G.** (2005). Microtubules are dispensable for the initial pathogenic development but required for long-distance hyphal growth in the corn smut fungus *Ustilago maydis*. *Mol Biol Cell* **16**, 2746-2758.
- FUKUSHIMA, N., FURUTA, D., HIDAKA, Y., MORIYAMA, R., und TSUJIUCHI, T.** (2009). Post-translational modifications of tubulin in the nervous system. *Journal of neurochemistry* **109**, 683-693.
- GAHURA, O., ABRHAMOVA, K., SKRUZNY, M., VALENTOVA, A., MUNZAROVA, V., FOLK, P., und PUTA, F.** (2009). Prp45 affects Prp22 partition in spliceosomal complexes and splicing efficiency of non-consensus substrates. *Journal of cellular biochemistry* **106**, 139-151.
- GAMMIE, A. E., KURIHARA, L. J., VALLEE, R. B., und ROSE, M. D.** (1995). DNMI1, a dynamin-related gene, participates in endosomal trafficking in yeast. *The Journal of cell biology* **130**, 553-566.
- GARCIA-MUSE, T., STEINBERG, G., und PEREZ-MARTIN, J.** (2003). Pheromone-induced G2 arrest in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Eukaryot Cell* **2**, 494-500.
- GARCIA-MUSE, T., STEINBERG, G., und PEREZ-MARTIN, J.** (2004). Characterization of B-type cyclins in the smut fungus *Ustilago maydis*: roles in morphogenesis and pathogenicity. *J Cell Sci* **117**, 487-506.

- GENRE, A., CHABAUD, M., TIMMERS, T., BONFANTE, P., und BARKER, D. G.** (2005). Arbuscular mycorrhizal fungi elicit a novel intracellular apparatus in *Medicago truncatula* root epidermal cells before infection. *The Plant cell* **17**, 3489-3499.
- GIERZ, G., und BARTNICKI-GARCIA, S.** (2001). A three-dimensional model of fungal morphogenesis based on the vesicle supply center concept. *Journal of theoretical biology* **208**, 151-164.
- GILLISSEN, B., BERGEMANN, J., SANDMANN, C., SCHRÖER, B., BÖLKER, M., und KAHMANN, R.** (1992). A two-component regulatory system for self/non-self recognition in *Ustilago maydis*. *Cell* **68**, 647-657.
- GISH, W., und STATES, D. J.** (1993). Identification of protein coding regions by database similarity search. *Nature genetics* **3**, 266-272.
- GLATER, E. E., MEGEATH, L. J., STOWERS, R. S., und SCHWARZ, T. L.** (2006). Axonal transport of mitochondria requires milton to recruit kinesin heavy chain and is light chain independent. *The Journal of cell biology* **173**, 545-557.
- GOLD, S. E., BAKKEREN, G., DAVIES, J. E., und KRONSTAD, J. W.** (1994). Three selectable markers for transformation of *Ustilago maydis*. *Gene* **142**, 225-230.
- GÖNCZY, P., ECHEVERRI, C., OEGEMA, K., COULSON, A., JONES, S. J., COPLEY, R. R., DUPERON, J., OEGEMA, J., BREHM, M., CASSIN, E., et al.** (2000). Functional genomic analysis of cell division in *C. elegans* using RNAi of genes on chromosome III. *Nature* **408**, 331-336.
- GOOS, S.** (2007) Funktionelle Analyse von Hdp2, einem neuen Pathogenitätsfaktor in *Ustilago maydis*, Philipps-Universität, Marburg.
- GOTZMANN, J., GERNER, C., MEISSNER, M., HOLZMANN, K., GRIMM, R., MIKULITS, W., und SAUERMAN, G.** (2000). hNMP 200: a novel human common nuclear matrix protein combining structural and regulatory functions. *Experimental cell research* **261**, 166-179.
- GOUJON, M., MCWILLIAM, H., LI, W., VALENTIN, F., SQUZZATO, S., PAERN, J., und LOPEZ, R.** (2010). A new bioinformatics analysis tools framework at EMBL-EBI. *Nucleic acids research* **38**, W695-699.
- GRÄUB, R., LANCERO, H., PEDERSEN, A., CHU, M., PADMANABHAN, K., XU, X. Q., SPITZ, P., CHALKLEY, R., BURLINGAME, A. L., STOKOE, D., und BERNSTEIN, H. S.** (2008). Cell cycle-dependent phosphorylation of human CDC5 regulates RNA processing. *Cell cycle* **7**, 1795-1803.
- GREY, M., DÜSTERHÖFT, A., HENRIQUES, J. A., und BRENDEL, M.** (1996). Allelism of PSO4 and PRP19 links pre-mRNA processing with recombination and error-prone DNA repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic acids research* **24**, 4009-4014.
- GRIFFITH, M., GRIFFITH, O. L., MWENIFUMBO, J., GOYA, R., MORRISSY, A. S., MORIN, R. D., CORBETT, R., TANG, M. J., HOU, Y. C., PUGH, T. J., et al.** (2010). Alternative expression analysis by RNA sequencing. *Nat Methods* **7**, 843-847.
- GRILLARI, J., AJUH, P., STADLER, G., LOSCHER, M., VOGLAUER, R., ERNST, W., CHUSAINOW, J., EISENHABER, F., POKAR, M., FORTSCHEGGER, K., et al.** (2005). SNEV is an evolutionarily conserved splicing factor whose oligomerization is necessary for spliceosome assembly. *Nucleic acids research* **33**, 6868-6883.
- GRILLARI, J., LOSCHER, M., DENEGRI, M., LEE, K., FORTSCHEGGER, K., EISENHABER, F., AJUH, P., LAMOND, A. I., KATINGER, H., und GRILLARI-VOGLAUER, R.** (2009). Blom7alpha is a novel heterogeneous

nuclear ribonucleoprotein K homology domain protein involved in pre-mRNA splicing that interacts with SNEVPrp19-Pso4. *The Journal of biological chemistry* **284**, 29193-29204.

GROTE, M., WOLF, E., WILL, C. L., LEMM, I., AGAFONOV, D. E., SCHOMBURG, A., FISCHLE, W., URLAUB, H., und LUHRMANN, R. (2010). Molecular architecture of the human Prp19/CDC5L complex. *Molecular and cellular biology* **30**, 2105-2119.

GROVE, S. N., und BRACKER, C. E. (1970). Protoplasmic organization of hyphal tips among fungi: vesicles and Spitzenkorper. *Journal of bacteriology* **104**, 989-1009.

GURKAN, C., und ELLAR, D. J. (2003). Expression of the *Bacillus thuringiensis* Cyt2Aa1 toxin in *Pichia pastoris* using a synthetic gene construct. *Biotechnology and applied biochemistry* **38**, 25-33.

GUTHRIE, C. F., G.R. (2004). Guide to Yeast Genetics and Molecular and Cell Biology. In *Methods in Enzymology* (San Diego, Kalifornien, Elsevier Academic Press).

HABERMANN, B. (2004). The BAR-domain family of proteins: a case of bending and binding? *EMBO reports* **5**, 250-255.

HACHET, O., und EPHRUSSI, A. (2004). Splicing of oskar RNA in the nucleus is coupled to its cytoplasmic localization. *Nature* **428**, 959-963.

HAMMERSCHLAG, R. S., und SISLER, H. D. (1972). Benomyl and methyl-2-benzimidazolecarbamate (MBC): Biochemical, cytological and chemical aspects of toxicity to *Ustilago maydis* and *Saccharomyces cerevisiae*. In *Pesticide Biochemistry and Physiology* (Amsterdam, Elsevier), pp. 42-54.

HARDCASTLE, T. J., und KELLY, K. A. (2010). baySeq: empirical Bayesian methods for identifying differential expression in sequence count data. *BMC bioinformatics* **11**, 422.

HARRIS, S. D. (2006). Cell polarity in filamentous fungi: shaping the mold. *International review of cytology* **251**, 41-77.

HARRIS, S. D., READ, N. D., ROBERSON, R. W., SHAW, B., SEILER, S., PLAMANN, M., und MOMANY, M. (2005). Polarisome meets Spitzenkorper: microscopy, genetics, and genomics converge. *Eukaryotic cell* **4**, 225-229.

HARRISON, A., und KING, S. M. (2000). The molecular anatomy of dynein. *Essays in biochemistry* **35**, 75-87.

HARTMANN, H. A., KAHMANN, R., und BÖLKER, M. (1996). The pheromone response factor coordinates filamentous growth and pathogenicity in *Ustilago maydis*. *EMBO J* **15**, 1632-1641.

HE, B., und GUO, W. (2009). The exocyst complex in polarized exocytosis. *Current opinion in cell biology* **21**, 537-542.

HEATH, B. I. (1981). Nucleus associated organelles of fungi. In *International Review of Cytology*, G. H. a. D. Bourne, J.F., ed. (New York, Academic Press).

HEIMEL, K. (2010) Regulationsmechanismen der biotrophen Entwicklung von *Ustilago maydis*, Philipps Universität, Marburg.

- HEIMEL, K., SCHERER, M., SCHULER, D., und KÄMPER, J.** (2010a). The *Ustilago maydis* Clp1 protein orchestrates pheromone and *b*-dependent signaling pathways to coordinate the cell cycle and pathogenic development. *The Plant cell* **22**, 2908-2922.
- HEIMEL, K., SCHERER, M., VRANES, M., WAHL, R., POTHIRATANA, C., SCHULER, D., VINCON, V., FINKERNAGEL, F., FLOR-PARRA, I., und KÄMPER, J.** (2010b). The transcription factor Rbf1 is the master regulator for *b*-mating type controlled pathogenic development in *Ustilago maydis*. *PLoS pathogens* **6**, e1001035.
- HENRIQUES, J. A., und MOUSTACCHI, E.** (1980). Isolation and characterization of *pso* mutants sensitive to photo-addition of psoralen derivatives in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **95**, 273-288.
- HENRIQUES, J. A., VICENTE, E. J., LEANDRO DA SILVA, K. V., und SCHENBERG, A. C.** (1989). PSO4: a novel gene involved in error-prone repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutation research* **218**, 111-124.
- HEPLER, P. K., VIDALI, L., und CHEUNG, A. Y.** (2001). Polarized cell growth in higher plants. *Annual review of cell and developmental biology* **17**, 159-187.
- HILL, T. W. U. K., E.** (2001). Improved protocols for *Aspergillus* minimal medium: trace element and minimal medium salt stock solutions. *Fungal Genetics Newsletter* **48**, 20-21.
- HIRAYAMA, T., und SHINOZAKI, K.** (1996). A *cdc5+* homolog of a higher plant, *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 13371-13376.
- HIROKAWA, N., und TAKEMURA, R.** (2005). Molecular motors and mechanisms of directional transport in neurons. *Nature reviews Neuroscience* **6**, 201-214.
- HOFFMAN, C. S., und WINSTON, F.** (1987). A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *E. coli*. *Gene* **57**, 267-272.
- HOGG, R., MCGRAIL, J. C., und O'KEEFE, R. T.** (2010). The function of the NineTeen Complex (NTC) in regulating spliceosome conformations and fidelity during pre-mRNA splicing. *Biochemical Society transactions* **38**, 1110-1115.
- HOLLENBECK, P. J., und SAXTON, W. M.** (2005). The axonal transport of mitochondria. *Journal of cell science* **118**, 5411-5419.
- HOLLIDAY, R.** (1974). *Ustilago maydis*. In Handbook of Genetics, R. C. King, ed. (New York, USA, Plenum Press), pp. 575-595.
- HOLLOMAN, W. K.** (2011). Unraveling the mechanism of BRCA2 in homologous recombination. *Nature structural & molecular biology* **18**, 748-754.
- HOLLOMAN, W. K., SCHIRAWSKI, J., und HOLLIDAY, R.** (2008). The homologous recombination system of *Ustilago maydis*. *Fungal genetics and biology : FG & B* **45 Suppl 1**, S31-39.
- HORIUCHI, D., BARKUS, R. V., PILLING, A. D., GASSMAN, A., und SAXTON, W. M.** (2005). APLIP1, a kinesin binding JIP-1/JNK scaffold protein, influences the axonal transport of both vesicles and mitochondria in *Drosophila*. *Current biology : CB* **15**, 2137-2141.
- HORTON, P., PARK, K. J., OBAYASHI, T., FUJITA, N., HARADA, H., ADAMS-COLLIER, C. J., und NAKAI, K.** (2007). WoLF PSORT: protein localization predictor. *Nucleic acids research* **35**, W585-587.

HU, C. D., CHINENOV, Y., und KERPPOLA, T. K. (2002). Visualization of interactions among bZIP and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation. *Molecular cell* **9**, 789-798.

HU, C. D., GRINBERG, A. V., und KERPPOLA, T. K. (2006). Visualization of protein interactions in living cells using bimolecular fluorescence complementation (BiFC) analysis. *Curr Protoc Cell Biol* **Chapter 21**, Unit 21 23.

HU, C. D., und KERPPOLA, T. K. (2003). Simultaneous visualization of multiple protein interactions in living cells using multicolor fluorescence complementation analysis. *Nature biotechnology* **21**, 539-545.

HÜTTELMAIER, S., ZENKLUSEN, D., LEDERER, M., DICTENBERG, J., LORENZ, M., MENG, X., BASSELL, G. J., CONDEELIS, J., und SINGER, R. H. (2005). Spatial regulation of beta-actin translation by Src-dependent phosphorylation of ZBP1. *Nature* **438**, 512-515.

IKEGAMI, K., und SETOU, M. (2010). Unique post-translational modifications in specialized microtubule architecture. *Cell structure and function* **35**, 15-22.

IKONOMOV, O. C., FLIGGER, J., SBRISSA, D., DONDAPATI, R., MLAK, K., DEEB, R., und SHISHEVA, A. (2009). Kinesin adapter JLP links PIKfyve to microtubule-based endosome-to-trans-Golgi network traffic of furin. *The Journal of biological chemistry* **284**, 3750-3761.

INADA, K., MORIMOTO, Y., ARIMA, T., MURATA, Y., und KAMADA, T. (2001). The *clp1* gene of the mushroom *Coprinus cinereus* is essential for A-regulated sexual development. *Genetics* **157**, 133-140.

INNIS, M. A., GELFAND, D. H., SNINSKY, J. J., und WHITE, T. J., eds. (1990). *PCR Protocols: a guide to methods and applications*. (San Diego, USA, Academic Press).

ITO, H., FUKUDA, Y., MURATA, K., und KIMURA, A. (1983). Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *Journal of bacteriology* **153**, 163-168.

ITOH, T. J., und HOTANI, H. (2004). Microtubule dynamics and the regulation by microtubule-associated proteins (MAPs). *Uchu Seibutsu Kagaku* **18**, 116-117.

JAMES, P., HALLADAY, J., und CRAIG, E. A. (1996). Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics* **144**, 1425-1436.

KAAN, H. Y., HACKNEY, D. D., und KOZIELSKI, F. (2011). The structure of the kinesin-1 motor-tail complex reveals the mechanism of autoinhibition. *Science* **333**, 883-885.

KAFFARNIK, F., MÜLLER, P., LEIBUNDGUT, M., KAHMANN, R., und FELDBRÜGGE, M. (2003). PKA and MAPK phosphorylation of Prf1 allows promoter discrimination in *Ustilago maydis*. *Embo J* **22**, 5817-5826.

KAHMANN, R., und KÄMPER, J. (2004). *Ustilago maydis*: how its biology relates to pathogenic development. *New Phytologist* **164**, 31-42.

KAHMANN, R., ROMEIS, T., HARTMANN, H. A., BOHNERT, H. U., BOLKER, M., und KAMPER, J. (1996). Control of mating, filamentous growth and pathogenicity in *Ustilago maydis*. *Biology Of Plant Microbe Interactions*, 239-241.

KAMADA, T. (2002). Molecular genetics of sexual development in the mushroom *Coprinus cinereus*. *Bioessays* **24**, 449-459.

- KAMATH, R. S., FRASER, A. G., DONG, Y., POULIN, G., DURBIN, R., GOTTA, M., KANAPIN, A., LE BOT, N., MORENO, S., SOHRMANN, M., et al.** (2003). Systematic functional analysis of the *Caenorhabditis elegans* genome using RNAi. *Nature* **421**, 231-237.
- KÄMPER, J.** (2004). A PCR-based system for highly efficient generation of gene replacement mutants in *Ustilago maydis*. *Mol Genet Genomics* **271**, 103-110.
- KÄMPER, J., KAHMANN, R., BÖLKER, M., MA, L. J., BREFORT, T., SAVILLE, B. J., BANUETT, F., KRONSTAD, J. W., GOLD, S. E., MÜLLER, O., et al.** (2006). Insights from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen *Ustilago maydis*. *Nature* **444**, 97-101.
- KÄMPER, J., REICHMANN, M., ROMEIS, T., BÖLKER, M., und KAHMANN, R.** (1995). Multiallelic recognition: nonself-dependent dimerization of the bE and bW homeodomain proteins in *Ustilago maydis*. *Cell* **81**, 73-83.
- KANAI, Y., OKADA, Y., TANAKA, Y., HARADA, A., TERADA, S., und HIROKAWA, N.** (2000). KIF5C, a novel neuronal kinesin enriched in motor neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **20**, 6374-6384.
- KATAHIRA, J., STRASSER, K., PODTELEJNIKOV, A., MANN, M., JUNG, J. U., und HURT, E.** (1999). The Mex67p-mediated nuclear mRNA export pathway is conserved from yeast to human. *The EMBO journal* **18**, 2593-2609.
- KATAHIRA, J., und YONEDA, Y.** (2009). Roles of the TREX complex in nuclear export of mRNA. *RNA biology* **6**, 149-152.
- KATOH, K., und TOH, H.** (2008). Recent developments in the MAFFT multiple sequence alignment program. *Briefings in bioinformatics* **9**, 286-298.
- KELLNER, N.** (2009) Funktionelle Charakterisierung des Num1 Proteins aus *Ustilago maydis*, Philipps Universität, Marburg.
- KEON, J. P., WHITE, G. A., und HARGREAVES, J. A.** (1991). Isolation, characterization and sequence of a gene conferring resistance to the systemic fungicide carboxin from the maize smut pathogen, *Ustilago maydis*. *Curr Genet* **19**, 475-481.
- KERPPOLA, T. K.** (2006). Design and implementation of bimolecular fluorescence complementation (BiFC) assays for the visualization of protein interactions in living cells. *Nature protocols* **1**, 1278-1286.
- KERPPOLA, T. K.** (2008). Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) analysis as a probe of protein interactions in living cells. *Annual review of biophysics* **37**, 465-487.
- KILMARTIN, J. V.** (1994). Genetic and biochemical approaches to spindle function and chromosome segregation in eukaryotic microorganisms. *Current opinion in cell biology* **6**, 50-54.
- KIM, J., SITARAMAN, S., HIERRO, A., BEACH, B. M., ODORIZZI, G., und HURLEY, J. H.** (2005). Structural basis for endosomal targeting by the Bro1 domain. *Developmental cell* **8**, 937-947.
- KING, S. M.** (2000). The dynein microtubule motor. *Biochimica et biophysica acta* **1496**, 60-75.
- KIRCHNER, J., SEILER, S., FUCHS, S., und SCHLIWA, M.** (1999). Functional anatomy of the kinesin molecule *in vivo*. *The EMBO journal* **18**, 4404-4413.

- KLEINRIDDER, A., POGODA, H. M., IRLBUSCH, S., SMYTH, N., KONCZ, C., HAMMERSCHMIDT, M., und BRUNING, J. C.** (2009). PLRG1 is an essential regulator of cell proliferation and apoptosis during vertebrate development and tissue homeostasis. *Molecular and cellular biology* **29**, 3173-3185.
- KLEMPNAUER, K. H., und SIPPEL, A. E.** (1987). The highly conserved amino-terminal region of the protein encoded by the v-myb oncogene functions as a DNA-binding domain. *The EMBO journal* **6**, 2719-2725.
- KLIONSKY, D. J., HERMAN, P. K., und EMR, S. D.** (1990). The fungal vacuole: composition, function, and biogenesis. *Microbiological reviews* **54**, 266-292.
- KLOCKOW, B., TICHELAAR, W., MADDEN, D. R., NIEMANN, H. H., AKIBA, T., HIROSE, K., und MANSTEIN, D. J.** (2002). The dynamin A ring complex: molecular organization and nucleotide-dependent conformational changes. *The EMBO journal* **21**, 240-250.
- KOEPKE, J., KAFFARNIK, F., HAAG, C., ZARNACK, K., LUSCOMBE, N. M., KONIG, J., ULE, J., KELLNER, R., BEGEROW, D., und FELDBRUGGE, M.** (2011). The RNA-binding protein Rrm4 is essential for efficient secretion of endochitinase Cts1. *Molecular & cellular proteomics : MCP* **10**, M111 011213.
- KOJIC, M., und HOLLOMAN, W. K.** (2000). Shuttle vectors for genetic manipulations in *Ustilago maydis*. *Can J Microbiol* **46**, 333-338.
- KOJIC, M., und HOLLOMAN, W. K.** (2012). Brh2 domain function distinguished by differential cellular responses to DNA damage and replication stress. *Molecular microbiology* **83**, 351-361.
- KOJIC, M., KOSTRUB, C. F., BUCHMAN, A. R., und HOLLOMAN, W. K.** (2002). BRCA2 homolog required for proficiency in DNA repair, recombination, and genome stability in *Ustilago maydis*. *Molecular cell* **10**, 683-691.
- KONCZ, C., DEJONG, F., VILLACORTA, N., SZAKONYI, D., und KONCZ, Z.** (2012). The spliceosome-activating complex: molecular mechanisms underlying the function of a pleiotropic regulator. *Frontiers in plant science* **3**, 9.
- KÖNIG, J., BAUMANN, S., KOEPKE, J., POHLMANN, T., ZARNACK, K., und FELDBRÜGGE, M.** (2009). The fungal RNA-binding protein Rrm4 mediates long-distance transport of *ubi1* and *rho3* mRNAs. *The EMBO journal* **28**, 1855-1866.
- KONZACK, S., RISCHITOR, P. E., ENKE, C., und FISCHER, R.** (2005). The role of the kinesin motor KipA in microtubule organization and polarized growth of *Aspergillus nidulans*. *Molecular biology of the cell* **16**, 497-506.
- KOZUBOWSKI, L., und HEITMAN, J.** (2012). Profiling a killer, the development of *Cryptococcus neoformans*. *FEMS microbiology reviews* **36**, 78-94.
- KRONSTAD, J. W., WANG, J., COVERT, S. F., HOLDEN, D. W., MCKNIGHT, G. L., und LEONG, S. A.** (1989). Isolation of metabolic genes and demonstration of gene disruption in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Gene* **79**, 97-106.
- KÜES, U.** (2000). Life history and developmental processes in the basidiomycete *Coprinus cinereus*. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**, 316-353.
- KUO, P. C., TSAO, Y. P., CHANG, H. W., CHEN, P. H., HUANG, C. W., LIN, S. T., WENG, Y. T., TSAI, T. C., SHIEH, S. Y., und CHEN, S. L.** (2009). Breast cancer amplified sequence 2, a novel negative regulator of the p53 tumor suppressor. *Cancer research* **69**, 8877-8885.

- LAEMMLI, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- LARKIN, M. A., BLACKSHIELDS, G., BROWN, N. P., CHENNA, R., MCGETTIGAN, P. A., MCWILLIAM, H., VALENTIN, F., WALLACE, I. M., WILM, A., LOPEZ, R., et al.** (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* **23**, 2947-2948.
- LECUYER, E., YOSHIDA, H., PARTHASARATHY, N., ALM, C., BABAK, T., CEROVINA, T., HUGHES, T. R., TOMANCAK, P., und KRAUSE, H. M.** (2007). Global analysis of mRNA localization reveals a prominent role in organizing cellular architecture and function. *Cell* **131**, 174-187.
- LEE, M. S., HENRY, M., und SILVER, P. A.** (1996). A protein that shuttles between the nucleus and the cytoplasm is an important mediator of RNA export. *Genes & development* **10**, 1233-1246.
- LEGERSKI, R. J.** (2009). The Pso4 complex splices into the DNA damage response. *Cell cycle* **8**, 3448-3449.
- LENZ, J. H., SCHUCHARDT, I., STRAUBE, A., und STEINBERG, G.** (2006). A dynein loading zone for retrograde endosome motility at microtubule plus-ends. *The EMBO journal* **25**, 2275-2286.
- LEROCH, M., MERNKE, D., KOPPENHOEFER, D., SCHNEIDER, P., MOSBACH, A., DOEHLEMANN, G., und HAHN, M.** (2011). Living colors in the gray mold pathogen *Botrytis cinerea*: codon-optimized genes encoding green fluorescent protein and mCherry, which exhibit bright fluorescence. *Applied and environmental microbiology* **77**, 2887-2897.
- LIAO, G., und GUNDERSEN, G. G.** (1998). Kinesin is a candidate for cross-bridging microtubules and intermediate filaments. Selective binding of kinesin to dephosphorylated tubulin and vimentin. *The Journal of biological chemistry* **273**, 9797-9803.
- LILLIE, S. H., und BROWN, S. S.** (1994). Immunofluorescence localization of the unconventional myosin, Myo2p, and the putative kinesin-related protein, Smy1p, to the same regions of polarized growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of cell biology* **125**, 825-842.
- LIPSHITZ, H. D.** (2009). Follow the mRNA: a new model for Bicoid gradient formation. *Nature reviews Molecular cell biology* **10**, 509-512.
- LLERES, D., DENEGRI, M., BIGGIOGERA, M., AJUH, P., und LAMOND, A. I.** (2010). Direct interaction between hnRNP-M and CDC5L/PLRG1 proteins affects alternative splice site choice. *EMBO reports* **11**, 445-451.
- LO, H. J., KOHLER, J. R., DIDOMENICO, B., LOEBENBERG, D., CACCIAPUOTI, A., und FINK, G. R.** (1997). Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent. *Cell* **90**, 939-949.
- LOFTUS, B. J., FUNG, E., RONCAGLIA, P., ROWLEY, D., AMEDEO, P., BRUNO, D., VAMATHEVAN, J., MIRANDA, M., ANDERSON, I. J., FRASER, J. A., et al.** (2005). The genome of the basidiomycetous yeast and human pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Science* **307**, 1321-1324.
- LÖSCHER, M., FORTSCHEGGER, K., RITTER, G., WOSTRY, M., VOGLAUER, R., SCHMID, J. A., WATTERS, S., RIVETT, A. J., AJUH, P., LAMOND, A. I., et al.** (2005). Interaction of U-box E3 ligase SNEV with PSMB4, the beta7 subunit of the 20 S proteasome. *The Biochemical journal* **388**, 593-603.
- LU, X., und LEGERSKI, R. J.** (2007). The Prp19/Pso4 core complex undergoes ubiquitylation and structural alterations in response to DNA damage. *Biochemical and biophysical research communications* **354**, 968-974.

- MAASS, N., ROSEL, F., SCHEM, C., HITOMI, J., JONAT, W., und NAGASAKI, K.** (2002). Amplification of the BCAS2 gene at chromosome 1p13.3-21 in human primary breast cancer. *Cancer letters* **185**, 219-223.
- MACDONALD, J. I., DIETRICH, A., GAMBLE, S., HRYCIW, T., GRANT, R. I., und MEAKIN, S. O.** (2012). Nesca, a novel neuronal adapter protein, links the molecular motor kinesin with the pre-synaptic membrane protein, syntaxin-1, in hippocampal neurons. *Journal of neurochemistry* **121**, 861-880.
- MAHAJAN, K. N., und MITCHELL, B. S.** (2003). Role of human Pso4 in mammalian DNA repair and association with terminal deoxynucleotidyl transferase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 10746-10751.
- MAHLERT, M., LEVELEKI, L., HLUBEK, A., SANDROCK, B., und BÖLKER, M.** (2006). Rac1 and Cdc42 regulate hyphal growth and cytokinesis in the dimorphic fungus *Ustilago maydis*. *Molecular microbiology* **59**, 567-578.
- MAHLERT, M., VOGLER, C., STELTER, K., HAUSE, G., und BASSE, C. W.** (2009). The *a2* mating-type-locus gene *lga2* of *Ustilago maydis* interferes with mitochondrial dynamics and fusion, partially in dependence on a Dnm1-like fission component. *Journal of cell science* **122**, 2402-2412.
- MAKINO, R., und KAMADA, T.** (2004). Isolation and characterization of mutations that affect nuclear migration for dikaryosis in *Coprinus cinereus*. *Current genetics* **45**, 149-156.
- MARTIN, K. C., und EPHRUSSI, A.** (2009). mRNA localization: gene expression in the spatial dimension. *Cell* **136**, 719-730.
- MARTINEZ-ESPINOZA, A. D., GARCIA-PEDRAJAS, M. D., und GOLD, S. E.** (2002). The Ustilaginales as plant pests and model systems. *Fungal Genet Biol* **35**, 1-20.
- MASUDA, S., DAS, R., CHENG, H., HURT, E., DORMAN, N., und REED, R.** (2005). Recruitment of the human TREX complex to mRNA during splicing. *Genes & development* **19**, 1512-1517.
- MCCAFFREY, L. M., und MACARA, I. G.** (2009). Widely conserved signaling pathways in the establishment of cell polarity. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **1**, a001370.
- MCCLELAND, M. L., GARDNER, R. D., KALLIO, M. J., DAUM, J. R., GORBSKY, G. J., BURKE, D. J., und STUKENBERG, P. T.** (2003). The highly conserved Ndc80 complex is required for kinetochore assembly, chromosome congression, and spindle checkpoint activity. *Genes & development* **17**, 101-114.
- MCDONALD, W. H., OHI, R., SMELKOVA, N., FRENDEWEY, D., und GOULD, K. L.** (1999). Myb-related fission yeast *cdc5p* is a component of a 40S snRNP-containing complex and is essential for pre-mRNA splicing. *Molecular and cellular biology* **19**, 5352-5362.
- MCCMAHON, H. T., und MILLS, I. G.** (2004). COP and clathrin-coated vesicle budding: different pathways, common approaches. *Current opinion in cell biology* **16**, 379-391.
- MELUH, P. B., und ROSE, M. D.** (1990). KAR3, a kinesin-related gene required for yeast nuclear fusion. *Cell* **60**, 1029-1041.
- MIELNICHUK, N., SGARLATA, C., und PEREZ-MARTIN, J.** (2009). A role for the DNA-damage checkpoint kinase Chk1 in the virulence program of the fungus *Ustilago maydis*. *Journal of cell science* **122**, 4130-4140.

- MILCHANOWSKI, A. B., HENKENIUS, A. L., NARAYANAN, M., HARTENSTEIN, V., und BANERJEE, U.** (2004). Identification and characterization of genes involved in embryonic crystal cell formation during *Drosophila* hematopoiesis. *Genetics* **168**, 325-339.
- MONAGHAN, J., XU, F., GAO, M., ZHAO, Q., PALMA, K., LONG, C., CHEN, S., ZHANG, Y., und LI, X.** (2009). Two Prp19-like U-box proteins in the MOS4-associated complex play redundant roles in plant innate immunity. *PLoS Pathogens* **5**, e1000526.
- MONHEIT, J. E., COWAN, D. F., und MOORE, D. G.** (1984). Rapid detection of fungi in tissues using calcofluor white and fluorescence microscopy. *Archives of pathology & laboratory medicine* **108**, 616-618.
- MOTLEY, A. M., WARD, G. P., und HETTEMA, E. H.** (2008). Dnm1p-dependent peroxisome fission requires Caf4p, Mdv1p and Fis1p. *Journal of cell science* **121**, 1633-1640.
- MOURINO-PEREZ, R. R., ROBERSON, R. W., und BARTNICKI-GARCIA, S.** (2006). Microtubule dynamics and organization during hyphal growth and branching in *Neurospora crassa*. *Fungal genetics and biology : FG & B* **43**, 389-400.
- MUNRO, E., und BOWERMAN, B.** (2009). Cellular symmetry breaking during *Caenorhabditis elegans* development. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **1**, a003400.
- MÜNSTERKÖTTER, M., und STEINBERG, G.** (2007). The fungus *Ustilago maydis* and humans share disease-related proteins that are not found in *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC genomics* **8**, 473.
- NAGASAKI, K., MAASS, N., MANABE, T., HANZAWA, H., TSUKADA, T., KIKUCHI, K., und YAMAGUCHI, K.** (1999). Identification of a novel gene, DAM1, amplified at chromosome 1p13.3-21 region in human breast cancer cell lines. *Cancer letters* **140**, 219-226.
- NAKAI, K., und KANEHISA, M.** (1992). A knowledge base for predicting protein localization sites in eukaryotic cells. *Genomics* **14**, 897-911.
- NAKAMURA, Y., GOJOBORI, T., und IKEMURA, T.** (2000). Codon usage tabulated from international DNA sequence databases: status for the year 2000. *Nucleic acids research* **28**, 292.
- NAKATA, T., und HIROKAWA, N.** (2003). Microtubules provide directional cues for polarized axonal transport through interaction with kinesin motor head. *The Journal of cell biology* **162**, 1045-1055.
- NASMYTH, K., und NURSE, P.** (1981). Cell division cycle mutants altered in DNA replication and mitosis in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Molecular & general genetics : MGG* **182**, 119-124.
- NAYAK, T., SZEWCZYK, E., OAKLEY, C. E., OSMANI, A., UKIL, L., MURRAY, S. L., HYNES, M. J., OSMANI, S. A., und OAKLEY, B. R.** (2006). A versatile and efficient gene-targeting system for *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **172**, 1557-1566.
- NELSON, W. J.** (2009). Remodeling epithelial cell organization: transitions between front-rear and apical-basal polarity. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **1**, a000513.
- NEUBAUER, G., KING, A., RAPPSILBER, J., CALVIO, C., WATSON, M., AJUH, P., SLEEMAN, J., LAMOND, A., und MANN, M.** (1998). Mass spectrometry and EST-database searching allows characterization of the multi-protein spliceosome complex. *Nature genetics* **20**, 46-50.

- NOGALES, E., WHITTAKER, M., MILLIGAN, R. A., und DOWNING, K. H.** (1999). High-resolution model of the microtubule. *Cell* **96**, 79-88.
- NUNNARI, J., MARSHALL, W. F., STRAIGHT, A., MURRAY, A., SEDAT, J. W., und WALTER, P.** (1997). Mitochondrial transmission during mating in *Saccharomyces cerevisiae* is determined by mitochondrial fusion and fission and the intramitochondrial segregation of mitochondrial DNA. *Molecular biology of the cell* **8**, 1233-1242.
- OHI, M. D., und GOULD, K. L.** (2002). Characterization of interactions among the Cef1p-Prp19p-associated splicing complex. *RNA* **8**, 798-815.
- OHI, M. D., LINK, A. J., REN, L., JENNINGS, J. L., MCDONALD, W. H., und GOULD, K. L.** (2002). Proteomics analysis reveals stable multiprotein complexes in both fission and budding yeasts containing Myb-related Cdc5p/Cef1p, novel pre-mRNA splicing factors, and snRNAs. *Mol Cell Biol* **22**, 2011-2024.
- OHI, M. D., VANDER KOOI, C. W., ROSENBERG, J. A., CHAZIN, W. J., und GOULD, K. L.** (2003). Structural insights into the U-box, a domain associated with multi-ubiquitination. *Nature structural biology* **10**, 250-255.
- OHI, M. D., VANDER KOOI, C. W., ROSENBERG, J. A., REN, L., HIRSCH, J. P., CHAZIN, W. J., WALZ, T., und GOULD, K. L.** (2005). Structural and functional analysis of essential pre-mRNA splicing factor Prp19p. *Molecular and cellular biology* **25**, 451-460.
- OHI, R., FEOKTISTOVA, A., MCCANN, S., VALENTINE, V., LOOK, A. T., LIPSICK, J. S., und GOULD, K. L.** (1998). Myb-related *Schizosaccharomyces pombe* cdc5p is structurally and functionally conserved in eukaryotes. *Molecular and cellular biology* **18**, 4097-4108.
- OHI, R., MCCOLLUM, D., HIRANI, B., DEN HAESE, G. J., ZHANG, X., BURKE, J. D., TURNER, K., und GOULD, K. L.** (1994). The *Schizosaccharomyces pombe* cdc5+ gene encodes an essential protein with homology to c-Myb. *The EMBO journal* **13**, 471-483.
- OTSUGA, D., KEEGAN, B. R., BRISCH, E., THATCHER, J. W., HERMANN, G. J., BLEAZARD, W., und SHAW, J. M.** (1998). The dynamin-related GTPase, Dnm1p, controls mitochondrial morphology in yeast. *The Journal of cell biology* **143**, 333-349.
- PADILLA-PARRA, S., und TRAMIER, M.** (2012). FRET microscopy in the living cell: different approaches, strengths and weaknesses. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* **34**, 369-376.
- PALANIVELU, R., und PREUSS, D.** (2000). Pollen tube targeting and axon guidance: parallels in tip growth mechanisms. *Trends in cell biology* **10**, 517-524.
- PANKIV, S., und JOHANSEN, T.** (2010). FYCO1: Linking autophagosomes to microtubule plus end-directing molecular motors. *Autophagy* **6**.
- PAQUIN, N., und CHARTRAND, P.** (2008). Local regulation of mRNA translation: new insights from the bud. *Trends in cell biology* **18**, 105-111.
- PELLETTIERI, J., und SEYDOUX, G.** (2002). Anterior-posterior polarity in *C. elegans* and *Drosophila*--PARallels and differences. *Science* **298**, 1946-1950.
- PEREZ-MARTIN, J.** (2009). DNA-damage response in the basidiomycete fungus *Ustilago maydis* relies in a sole Chk1-like kinase. *DNA repair* **8**, 720-731.

- PERKINS, J. R., DIBOUN, I., DESSAILLY, B. H., LEES, J. G., und ORENGO, C.** (2010). Transient protein-protein interactions: structural, functional, and network properties. *Structure* **18**, 1233-1243.
- PIDOUX, A. L., und ALLSHIRE, R. C.** (2000). Centromeres: getting a grip of chromosomes. *Current opinion in cell biology* **12**, 308-319.
- PLEISS, J. A., WHITWORTH, G. B., BERGKESSEL, M., und GUTHRIE, C.** (2007a). Rapid, transcript-specific changes in splicing in response to environmental stress. *Mol Cell* **27**, 928-937.
- PLEISS, J. A., WHITWORTH, G. B., BERGKESSEL, M., und GUTHRIE, C.** (2007b). Transcript specificity in yeast pre-mRNA splicing revealed by mutations in core spliceosomal components. *PLoS Biol* **5**, e90.
- PONTECORVO, G., ROPER, J. A., HEMMONS, L. M., MACDONALD, K. D., und BUFTON, A. W.** (1953). The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Advances in genetics* **5**, 141-238.
- POOT, M., ZHANG, Y. Z., KRAMER, J. A., WELLS, K. S., JONES, L. J., HANZEL, D. K., LUGADE, A. G., SINGER, V. L., und HAUGLAND, R. P.** (1996). Analysis of mitochondrial morphology and function with novel fixable fluorescent stains. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* **44**, 1363-1372.
- POTHIRATANA, C.** (2007) Functional characterization of the homeodomain transcription factor Hdp1 in *Ustilago maydis*, Philipps-Universität, Marburg.
- PRAEFCKE, G. J., und MCMAHON, H. T.** (2004). The dynamin superfamily: universal membrane tubulation and fission molecules? *Nature reviews Molecular cell biology* **5**, 133-147.
- PRUYNE, D. W., SCHOTT, D. H., und BRETSCHER, A.** (1998). Tropomyosin-containing actin cables direct the Myo2p-dependent polarized delivery of secretory vesicles in budding yeast. *The Journal of cell biology* **143**, 1931-1945.
- PUIG, O., CASPARY, F., RIGAUT, G., RUTZ, B., BOUVERET, E., BRAGADO-NILSSON, E., WILM, M., und SERAPHIN, B.** (2001). The tandem affinity purification (TAP) method: a general procedure of protein complex purification. *Methods* **24**, 218-229.
- QI, C., ZHU, Y. T., CHANG, J., YELDANDI, A. V., RAO, M. S., und ZHU, Y. J.** (2005). Potentiation of estrogen receptor transcriptional activity by breast cancer amplified sequence 2. *Biochemical and biophysical research communications* **328**, 393-398.
- QUERY, C. C., und KONARSKA, M. M.** (2012). *CEFI/CDC5* alleles modulate transitions between catalytic conformations of the spliceosome. *RNA* **18**, 1001-1013.
- RAMOS-GARCIA, S. L., ROBERSON, R. W., FREITAG, M., BARTNICKI-GARCIA, S., und MOURINO-PEREZ, R. R.** (2009). Cytoplasmic bulk flow propels nuclei in mature hyphae of *Neurospora crassa*. *Eukaryotic cell* **8**, 1880-1890.
- REED, N. A., CAI, D., BLASIUS, T. L., JIH, G. T., MEYHOFER, E., GAERTIG, J., und VERHEY, K. J.** (2006). Microtubule acetylation promotes kinesin-1 binding and transport. *Current biology : CB* **16**, 2166-2172.
- REHWINKEL, J., HEROLD, A., GARI, K., KOCHER, T., RODE, M., CICCARELLI, F. L., WILM, M., und IZAURREALDE, E.** (2004). Genome-wide analysis of mRNAs regulated by the THO complex in *Drosophila melanogaster*. *Nature structural & molecular biology* **11**, 558-566.

- REN, L., MCLEAN, J. R., HAZBUN, T. R., FIELDS, S., VANDER KOOL, C., OHI, M. D., und GOULD, K. L.** (2011). Systematic two-hybrid and comparative proteomic analyses reveal novel yeast pre-mRNA splicing factors connected to Prp19. *PLoS one* **6**, e16719.
- REQUENA, N., ALBERTI-SEGUI, C., WINZENBURG, E., HORN, C., SCHLIWA, M., PHILIPPSSEN, P., LIESE, R., und FISCHER, R.** (2001). Genetic evidence for a microtubule-destabilizing effect of conventional kinesin and analysis of its consequences for the control of nuclear distribution in *Aspergillus nidulans*. *Molecular microbiology* **42**, 121-132.
- REVERS, L. F., CARDONE, J. M., BONATTO, D., SAFFI, J., GREY, M., FELDMANN, H., BRENDDEL, M., und HENRIQUES, J. A.** (2002). Thermoconditional modulation of the pleiotropic sensitivity phenotype by the *Saccharomyces cerevisiae* PRP19 mutant allele pso4-1. *Nucleic acids research* **30**, 4993-5003.
- RIEDL, J., CREVENNA, A. H., KESSENBRUCK, K., YU, J. H., NEUKIRCHEN, D., BISTA, M., BRADKE, F., JENNE, D., HOLAK, T. A., WERB, Z., et al.** (2008). Lifeact: a versatile marker to visualize F-actin. *Nat Methods* **5**, 605-607.
- RIGAUT, G., SHEVCHENKO, A., RUTZ, B., WILM, M., MANN, M., und SERAPHIN, B.** (1999). A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nature biotechnology* **17**, 1030-1032.
- RIQUELME, M., GIERZ, G., und BARTNICKI-GARCIA, S.** (2000). Dynein and dynactin deficiencies affect the formation and function of the Spitzenkörper and distort hyphal morphogenesis of *Neurospora crassa*. *Microbiology* **146** (Pt 7), 1743-1752.
- RIQUELME, M., ROBERSON, R. W., MCDANIEL, D. P., und BARTNICKI-GARCIA, S.** (2002). The effects of ropy-1 mutation on cytoplasmic organization and intracellular motility in mature hyphae of *Neurospora crassa*. *Fungal genetics and biology : FG & B* **37**, 171-179.
- RIQUELME, M., YARDEN, O., BARTNICKI-GARCIA, S., BOWMAN, B., CASTRO-LONGORIA, E., FREE, S. J., FLEISSNER, A., FREITAG, M., LEW, R. R., MOURINO-PEREZ, R., et al.** (2011). Architecture and development of the *Neurospora crassa* hypha -- a model cell for polarized growth. *Fungal biology* **115**, 446-474.
- ROBIDA, A. M., und KERPPOLA, T. K.** (2009). Bimolecular fluorescence complementation analysis of inducible protein interactions: effects of factors affecting protein folding on fluorescent protein fragment association. *Journal of molecular biology* **394**, 391-409.
- ROMANOS, M. A., MAKOFF, A. J., FAIRWEATHER, N. F., BEESLEY, K. M., SLATER, D. E., RAYMENT, F. B., PAYNE, M. M., und CLARE, J. J.** (1991). Expression of tetanus toxin fragment C in yeast: gene synthesis is required to eliminate fortuitous polyadenylation sites in AT-rich DNA. *Nucleic acids research* **19**, 1461-1467.
- ROMEIS, T., BRACHMANN, A., KAHMANN, R., und KÄMPER, J.** (2000). Identification of a target gene for the bE/bW homeodomain protein complex in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol* **37**, 54-66.
- RUIZ-HERRERA, J., und MARTINEZ-ESPINOZA, A. D.** (1998). The fungus *Ustilago maydis*, from the aztec cuisine to the research laboratory. *International microbiology : the official journal of the Spanish Society for Microbiology* **1**, 149-158.
- RUSSELL, C. S., BEN-YEHUDA, S., DIX, I., KUPIEC, M., und BEGGS, J. D.** (2000). Functional analyses of interacting factors involved in both pre-mRNA splicing and cell cycle progression in *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA* **6**, 1565-1572.

- SAMAJ, J., MULLER, J., BECK, M., BOHM, N., und MENZEL, D.** (2006). Vesicular trafficking, cytoskeleton and signalling in root hairs and pollen tubes. *Trends in plant science* **11**, 594-600.
- SAMBROOK, J., FRISCH, E. F., und MANIATIS, T.** (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbour, New York, Cold Spring Harbour Laboratory Press).
- SAMBROOK, J., und RUSSELL, D. W.** (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd edn (Cold Spring Harbour, New York, Cold Spring Harbour Laboratory Press).
- SAMEJIMA, I., LOURENCO, P. C., SNAITH, H. A., und SAWIN, K. E.** (2005). Fission yeast mto2p regulates microtubule nucleation by the centrosomin-related protein mto1p. *Molecular biology of the cell* **16**, 3040-3051.
- SANCHEZ-LEON, E., VERDIN, J., FREITAG, M., ROBERSON, R. W., BARTNICKI-GARCIA, S., und RIQUELME, M.** (2011). Traffic of chitin synthase 1 (CHS-1) to the Spitzenkorper and developing septa in hyphae of *Neurospora crassa*: actin dependence and evidence of distinct microvesicle populations. *Eukaryotic cell* **10**, 683-695.
- SANTOS-ROSA, H., MORENO, H., SIMOS, G., SEGREF, A., FAHRENKROG, B., PANTE, N., und HURT, E.** (1998). Nuclear mRNA export requires complex formation between Mex67p and Mtr2p at the nuclear pores. *Molecular and cellular biology* **18**, 6826-6838.
- SARRY, J. E., CHEN, S., COLLUM, R. P., LIANG, S., PENG, M., LANG, A., NAUMANN, B., DZIERSZINSKI, F., YUAN, C. X., HIPPLER, M., und REA, P. A.** (2007). Analysis of the vacuolar luminal proteome of *Saccharomyces cerevisiae*. *The FEBS journal* **274**, 4287-4305.
- SAULIERE, J., HAQUE, N., HARMS, S., BARBOSA, I., BLANCHETTE, M., und LE HIR, H.** (2010). The exon junction complex differentially marks spliced junctions. *Nat Struct Mol Biol* **17**, 1269-1271.
- SAWIN, K. E., LOURENCO, P. C., und SNAITH, H. A.** (2004). Microtubule nucleation at non-spindle pole body microtubule-organizing centers requires fission yeast centrosomin-related protein mod20p. *Current biology : CB* **14**, 763-775.
- SCHAUWECKER, F., WANNER, G., und KAHMANN, R.** (1995). Filament-specific expression of a cellulase gene in the dimorphic fungus *Ustilago maydis*. *Biol Chem Hoppe-Seyler* **376**, 617-625.
- SCHERER, M., HEIMEL, K., STARKE, V., und KÄMPER, J.** (2006). The Clp1 protein is required for clamp formation and pathogenic development of *Ustilago maydis*. *Plant Cell* **18**, 2388-2401.
- SCHINK, K.** (2010) Funktionelle Analyse von Rho-spezifischen Guaninnukleotidaustauschfaktoren in *Ustilago maydis*, Philipps Universität, Marburg.
- SCHIRAWSKI, J., HEINZE, B., WAGENKNECHT, M., und KAHMANN, R.** (2005). Mating type loci of *Sporisorium reilianum*: novel pattern with three a and multiple b specificities. *Eukaryot Cell* **4**, 1317-1327.
- SCHOCH, C. L., AIST, J. R., YODER, O. C., und GILLIAN TURGEON, B.** (2003). A complete inventory of fungal kinesins in representative filamentous ascomycetes. *Fungal genetics and biology : FG & B* **39**, 1-15.
- SCHUCHARDT, I., ASSMANN, D., THINES, E., SCHUBERTH, C., und STEINBERG, G.** (2005). Myosin-V, Kinesin-1, and Kinesin-3 cooperate in hyphal growth of the fungus *Ustilago maydis*. *Mol Biol Cell* **16**, 5191-5201.

- SCHULTZ, J., MILPETZ, F., BORK, P., und PONTING, C. P.** (1998). SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 5857-5864.
- SCHULZ, B., BANUETT, F., DAHL, M., SCHLESINGER, R., SCHÄFER, W., MARTIN, T., HERSKOWITZ, I., und KAHMANN, R.** (1990). The *b* alleles of *U. maydis*, whose combinations program pathogenic development, code for polypeptides containing a homeodomain-related motif. *Cell* **60**, 295-306.
- SCHUSTER, M., KILARU, S., ASHWIN, P., LIN, C., SEVERS, N. J., und STEINBERG, G.** (2011a). Controlled and stochastic retention concentrates dynein at microtubule ends to keep endosomes on track. *The EMBO journal* **30**, 652-664.
- SCHUSTER, M., KILARU, S., FINK, G., COLLEMARE, J., ROGER, Y., und STEINBERG, G.** (2011b). Kinesin-3 and dynein cooperate in long-range retrograde endosome motility along a nonuniform microtubule array. *Molecular biology of the cell* **22**, 3645-3657.
- SCHUSTER, M., LIPOWSKY, R., ASSMANN, M. A., LENZ, P., und STEINBERG, G.** (2011c). Transient binding of dynein controls bidirectional long-range motility of early endosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**, 3618-3623.
- SCHUSTER, M., TREITSCHKE, S., KILARU, S., MOLLOY, J., HARMER, N. J., und STEINBERG, G.** (2012). Myosin-5, kinesin-1 and myosin-17 cooperate in secretion of fungal chitin synthase. *The EMBO journal* **31**, 214-227.
- SCHWARTZ, S., und AST, G.** (2010). Chromatin density and splicing destiny: on the cross-talk between chromatin structure and splicing. *The EMBO journal* **29**, 1629-1636.
- SEGREF, A., SHARMA, K., DOYE, V., HELLWIG, A., HUBER, J., LUHRMANN, R., und HURT, E.** (1997). Mex67p, a novel factor for nuclear mRNA export, binds to both poly(A)⁺ RNA and nuclear pores. *The EMBO journal* **16**, 3256-3271.
- SEIDEL, C., ZEKERT, N., und FISCHER, R.** (2012). The *Aspergillus nidulans* kinesin-3 tail is necessary and sufficient to recognize modified microtubules. *PloS one* **7**, e30976.
- SEILER, S., NARGANG, F. E., STEINBERG, G., und SCHLIWA, M.** (1997). Kinesin is essential for cell morphogenesis and polarized secretion in *Neurospora crassa*. *The EMBO journal* **16**, 3025-3034.
- SEILER, S., PLAMANN, M., und SCHLIWA, M.** (1999). Kinesin and dynein mutants provide novel insights into the roles of vesicle traffic during cell morphogenesis in *Neurospora*. *Current biology : CB* **9**, 779-785.
- SEITZ, A., KOJIMA, H., OIWA, K., MANDELKOW, E. M., SONG, Y. H., und MANDELKOW, E.** (2002). Single-molecule investigation of the interference between kinesin, tau and MAP2c. *The EMBO journal* **21**, 4896-4905.
- SHAW, B. D., CHUNG, D. W., WANG, C. L., QUINTANILLA, L. A., und UPADHYAY, S.** (2011). A role for endocytic recycling in hyphal growth. *Fungal biology* **115**, 541-546.
- SHIN, H. W., SHINOTSUKA, C., TORII, S., MURAKAMI, K., und NAKAYAMA, K.** (1997). Identification and subcellular localization of a novel mammalian dynamin-related protein homologous to yeast Vps1p and Dnm1p. *Journal of biochemistry* **122**, 525-530.
- SHIVJI, M. K., und VENKITARAMAN, A. R.** (2004). DNA recombination, chromosomal stability and carcinogenesis: insights into the role of BRCA2. *DNA repair* **3**, 835-843.

- SIHN, C. R., CHO, S. Y., LEE, J. H., LEE, T. R., und KIM, S. H.** (2007). Mouse homologue of yeast Prp19 interacts with mouse SUG1, the regulatory subunit of 26S proteasome. *Biochemical and biophysical research communications* **356**, 175-180.
- SLAUGHTER, B. D., SMITH, S. E., und LI, R.** (2009). Symmetry breaking in the life cycle of the budding yeast. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **1**, a003384.
- SMITH, T. F., GAITATZES, C., SAXENA, K., und NEER, E. J.** (1999). The WD repeat: a common architecture for diverse functions. *Trends in biochemical sciences* **24**, 181-185.
- SNETSELAAR, K. M., BÖLKER, M., und KAHMANN, R.** (1996). *Ustilago maydis* mating hyphae orient their growth toward pheromone sources. *Fungal Genetics and Biology* **20**, 299-312.
- SNETSELAAR, K. M., und MIMS, C. W.** (1992). Sporidial fusion and infection of maize seedlings by the smut fungus *Ustilago maydis*. *Mycologia* **84**, 193-203.
- SNETSELAAR, K. M., und MIMS, C. W.** (1993). Infection of maize stigmas by *Ustilago maydis*: Light and electron microscopy. *Phytopathology* **83**, 843.
- SONNHAMMER, E. L., EDDY, S. R., und DURBIN, R.** (1997). Pfam: a comprehensive database of protein domain families based on seed alignments. *Proteins* **28**, 405-420.
- SOUTHERN, E. M.** (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of molecular biology* **98**, 503-517.
- SPELLIG, T., BÖLKER, M., LOTTSPEICH, F., FRANK, R. W., und KAHMANN, R.** (1994). Pheromones trigger filamentous growth in *Ustilago maydis*. *EMBO J* **13**, 1620-1627.
- SPELLIG, T., BOTTIN, A., und KAHMANN, R.** (1996). Green fluorescent protein (GFP) as a new vital marker in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Mol Gen Genet* **252**, 503-509.
- SPINGOLA, M., GRATE, L., HAUSSLER, D., und ARES, M., JR.** (1999). Genome-wide bioinformatic and molecular analysis of introns in *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA* **5**, 221-234.
- ST JOHNSTON, D.** (2005). Moving messages: the intracellular localization of mRNAs. *Nature reviews Molecular cell biology* **6**, 363-375.
- STEINBERG, G.** (2007a). Hyphal growth: a tale of motors, lipids, and the Spitzenkörper. *Eukaryotic cell* **6**, 351-360.
- STEINBERG, G.** (2007b). On the move: endosomes in fungal growth and pathogenicity. *Nature reviews Microbiology* **5**, 309-316.
- STEINBERG, G.** (2007c). Preparing the way: fungal motors in microtubule organization. *Trends in microbiology* **15**, 14-21.
- STEINBERG, G.** (2007d). Tracks for traffic: microtubules in the plant pathogen *Ustilago maydis*. *The New phytologist* **174**, 721-733.
- STEINBERG, G.** (2011). Motors in fungal morphogenesis: cooperation versus competition. *Current opinion in microbiology* **14**, 660-667.

- STEINBERG, G., und PEREZ-MARTIN, J.** (2008). *Ustilago maydis*, a new fungal model system for cell biology. *Trends in cell biology* **18**, 61-67.
- STEINBERG, G., SCHLIWA, M., LEHMLER, C., BOLKER, M., KAHMANN, R., und MCINTOSH, J. R.** (1998). Kinesin from the plant pathogenic fungus *Ustilago maydis* is involved in vacuole formation and cytoplasmic migration. *J Cell Sci* **111** (Pt **15**), 2235-2246.
- STRÄSSER, K., und HURT, E.** (2000). Yra1p, a conserved nuclear RNA-binding protein, interacts directly with Mex67p and is required for mRNA export. *The EMBO journal* **19**, 410-420.
- STRAUBE, A., BRILL, M., OAKLEY, B. R., HORIO, T., und 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*. *Molecular biology of the cell* **14**, 642-657.
- STRAUBE, A., ENARD, W., BERNER, A., WEDLICH-SOLDNER, R., KAHMANN, R., und STEINBERG, G.** (2001). A split motor domain in a cytoplasmic dynein. *Embo J* **20**, 5091-5100.
- STRAUBE, A., HAUSE, G., FINK, G., und STEINBERG, G.** (2006). Conventional kinesin mediates microtubule-microtubule interactions in vivo. *Molecular biology of the cell* **17**, 907-916.
- STRAUBE, A., WEBER, I., und STEINBERG, G.** (2005). A novel mechanism of nuclear envelope break-down in a fungus: nuclear migration strips off the envelope. *EMBO J* **24**, 1674-1685.
- STUKENBERG, P. T., LUSTIG, K. D., MCGARRY, T. J., KING, R. W., KUANG, J., und KIRSCHNER, M. W.** (1997). Systematic identification of mitotic phosphoproteins. *Current biology : CB* **7**, 338-348.
- SUDBERY, P. E.** (2011). Growth of *Candida albicans* hyphae. *Nature reviews Microbiology* **9**, 737-748.
- TAKESHITA, N., DIALLINAS, G., und FISCHER, R.** (2012). The role of flotillin FloA and stomatin StoA in the maintenance of apical sterol-rich membrane domains and polarity in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Molecular microbiology* **83**, 1136-1152.
- TAKESHITA, N., und FISCHER, R.** (2011). On the role of microtubules, cell end markers, and septal microtubule organizing centres on site selection for polar growth in *Aspergillus nidulans*. *Fungal biology* **115**, 506-517.
- TANIOUS, F. A., VEAL, J. M., BUCZAK, H., RATMEYER, L. S., und WILSON, W. D.** (1992). DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) binds differently to DNA and RNA: minor-groove binding at AT sites and intercalation at AU sites. *Biochemistry* **31**, 3103-3112.
- TARN, W. Y., HSU, C. H., HUANG, K. T., CHEN, H. R., KAO, H. Y., LEE, K. R., und CHENG, S. C.** (1994). Functional association of essential splicing factor(s) with PRP19 in a protein complex. *The EMBO journal* **13**, 2421-2431.
- TARN, W. Y., LEE, K. R., und CHENG, S. C.** (1993). Yeast precursor mRNA processing protein PRP19 associates with the spliceosome concomitant with or just after dissociation of U4 small nuclear RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**, 10821-10825.
- TEERTSTRA, W. R., DEELSTRA, H. J., VRANES, M., BOHLMANN, R., KAHMANN, R., KÄMPER, J., und WÖSTEN, H. A.** (2006). Repellents have functionally replaced hydrophobins in mediating attachment to a hydrophobic surface and in formation of hydrophobic aerial hyphae in *Ustilago maydis*. *Microbiology* **152**, 3607-3612.

- TEKOTTE, H., und DAVIS, I.** (2002). Intracellular mRNA localization: motors move messages. *Trends in genetics : TIG* **18**, 636-642.
- TIMBERLAKE, W. E., und MARSHALL, M. A.** (1989). Genetic engineering of filamentous fungi. *Science* **244**, 1313-1317.
- TOWBIN, H., STAEHELIN, T., und GORDON, J.** (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **76**, 4350-4354.
- TSAI, W. Y., CHOW, Y. T., CHEN, H. R., HUANG, K. T., HONG, R. I., JAN, S. P., KUO, N. Y., TSAO, T. Y., CHEN, C. H., und CHENG, S. C.** (1999). Cef1p is a component of the Prp19p-associated complex and essential for pre-mRNA splicing. *The Journal of biological chemistry* **274**, 9455-9462.
- TSUKUDA, T., CARLETON, S., FOTHERINGHAM, S., und HOLLOMAN, W. K.** (1988). Isolation and characterization of an autonomously replicating sequence from *Ustilago maydis*. *Mol Cell Biol* **8**, 3703-3709.
- ULE, J., JENSEN, K. B., RUGGIU, M., MELE, A., ULE, A., und DARNELL, R. B.** (2003). CLIP identifies Nova-regulated RNA networks in the brain. *Science* **302**, 1212-1215.
- UPADHYAY, S., und SHAW, B. D.** (2008). The role of actin, fimbrin and endocytosis in growth of hyphae in *Aspergillus nidulans*. *Molecular microbiology* **68**, 690-705.
- URBAN, M., KAHMANN, R., und BÖLKER, M.** (1996a). The biallelic *a* mating type locus of *Ustilago maydis*: remnants of an additional pheromone gene indicate evolution from a multiallelic ancestor. *Mol Gen Genet* **250**, 414-420.
- URBAN, M., KAHMANN, R., und BÖLKER, M.** (1996b). Identification of the pheromone response element in *Ustilago maydis*. *Mol Gen Genet* **251**, 31-37.
- VALE, R. D.** (2003). The molecular motor toolbox for intracellular transport. *Cell* **112**, 467-480.
- VALVERDE, M. E., PAREDES LOPEZ, O., PATAKY, J. K., und GUEVARA LARA, F.** (1995). Huitlacoche (*Ustilago maydis*) as a food source--biology, composition, and production. *Crit-Rev-Food-Sci-Nutr* **35**, 191-229.
- VEITH, D., SCHERR, N., EFIMOV, V. P., und FISCHER, R.** (2005). Role of the spindle-pole-body protein ApsB and the cortex protein ApsA in microtubule organization and nuclear migration in *Aspergillus nidulans*. *Journal of cell science* **118**, 3705-3716.
- VENKATRAM, S., TASTO, J. J., FEOKTISTOVA, A., JENNINGS, J. L., LINK, A. J., und GOULD, K. L.** (2004). Identification and characterization of two novel proteins affecting fission yeast gamma-tubulin complex function. *Molecular biology of the cell* **15**, 2287-2301.
- VERHEY, K. J., MEYER, D., DEEHAN, R., BLENIS, J., SCHNAPP, B. J., RAPOPORT, T. A., und MARGOLIS, B.** (2001). Cargo of kinesin identified as JIP scaffolding proteins and associated signaling molecules. *The Journal of cell biology* **152**, 959-970.
- VERSTREKEN, P., LY, C. V., VENKEN, K. J., KOH, T. W., ZHOU, Y., und BELLEN, H. J.** (2005). Synaptic mitochondria are critical for mobilization of reserve pool vesicles at *Drosophila* neuromuscular junctions. *Neuron* **47**, 365-378.

- VIJAYRAGHAVAN, U., COMPANY, M., und ABELSON, J.** (1989). Isolation and characterization of pre-mRNA splicing mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes & development* **3**, 1206-1216.
- VILLA, T., und GUTHRIE, C.** (2005). The Isy1p component of the NineTeen complex interacts with the ATPase Prp16p to regulate the fidelity of pre-mRNA splicing. *Genes & development* **19**, 1894-1904.
- VINCENT, K., WANG, Q., JAY, S., HOBBS, K., und RYMOND, B. C.** (2003). Genetic interactions with *CLF1* identify additional pre-mRNA splicing factors and a link between activators of yeast vesicular transport and splicing. *Genetics* **164**, 895-907.
- VIRAG, A., und GRIFFITHS, A. J.** (2004). A mutation in the *Neurospora crassa* actin gene results in multiple defects in tip growth and branching. *Fungal genetics and biology : FG & B* **41**, 213-225.
- VOGLAUER, R., CHANG, M. W., DAMPIER, B., WIESER, M., BAUMANN, K., STEROVSKY, T., SCHREIBER, M., KATINGER, H., und GRILLARI, J.** (2006). SNEV overexpression extends the life span of human endothelial cells. *Experimental cell research* **312**, 746-759.
- VOLLMEISTER, E., und FELDBRÜGGE, M.** (2010). Posttranscriptional control of growth and development in *Ustilago maydis*. *Current opinion in microbiology* **13**, 693-699.
- VOLLMEISTER, E., SCHIPPER, K., und FELDBRUGGE, M.** (2012). Microtubule-dependent mRNA transport in the model microorganism *Ustilago maydis*. *RNA biology* **9**, 261-268.
- WAHL, M. C., WILL, C. L., und LUHRMANN, R.** (2009). The spliceosome: design principles of a dynamic RNP machine. *Cell* **136**, 701-718.
- WANG, F.** (2009). The signaling mechanisms underlying cell polarity and chemotaxis. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **1**, a002980.
- WANG, J., HOLDEN, D. W., und LEONG, S. A.** (1988). Gene transfer system for the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**, 865-869.
- WANG, Z., GERSTEIN, M., und SNYDER, M.** (2009). RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature reviews Genetics* **10**, 57-63.
- WARF, M. B., und BERGLUND, J. A.** (2010). Role of RNA structure in regulating pre-mRNA splicing. *Trends in biochemical sciences* **35**, 169-178.
- WEBER, I., ASSMANN, D., THINES, E., und STEINBERG, G.** (2006). Polar localizing class V myosin chitin synthases are essential during early plant infection in the plant pathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Plant Cell* **18**, 225-242.
- WEBER, I., GRUBER, C., und STEINBERG, G.** (2003). A class-V myosin required for mating, hyphal growth, and pathogenicity in the dimorphic plant pathogen *Ustilago maydis*. *The Plant cell* **15**, 2826-2842.
- WEDLICH-SÖLDNER, R., BÖLKER, M., KAHMANN, R., und STEINBERG, G.** (2000). A putative endosomal t-SNARE links exo- and endocytosis in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *EMBO J* **19**, 1974-1986.
- WEDLICH-SÖLDNER, R., STRAUBE, A., FRIEDRICH, M. W., und STEINBERG, G.** (2002). A balance of KIF1A-like kinesin and dynein organizes early endosomes in the fungus *Ustilago maydis*. *The EMBO journal* **21**, 2946-2957.

- WEINZIERL, G., LEVELEKI, L., HASSEL, A., KOST, G., WANNER, G., und BÖLKER, M.** (2002). Regulation of cell separation in the dimorphic fungus *Ustilago maydis*. *Molecular microbiology* **45**, 219-231.
- WESSELS, J. G. H.** (1993). Wall growth, protein excretion and morphogenesis in fungi. *New Phytologist* **123**, 397-649.
- WESTON, C. R., und DAVIS, R. J.** (2002). The JNK signal transduction pathway. *Current opinion in genetics & development* **12**, 14-21.
- WIGGE, P. A., und KILMARTIN, J. V.** (2001). The Ndc80p complex from *Saccharomyces cerevisiae* contains conserved centromere components and has a function in chromosome segregation. *The Journal of cell biology* **152**, 349-360.
- WILHELM, B. T., MARGUERAT, S., GOODHEAD, I., und BAHLER, J.** (2010). Defining transcribed regions using RNA-seq. *Nature protocols* **5**, 255-266.
- WILHELM, B. T., MARGUERAT, S., WATT, S., SCHUBERT, F., WOOD, V., GOODHEAD, I., PENKETT, C. J., ROGERS, J., und BAHLER, J.** (2008). Dynamic repertoire of a eukaryotic transcriptome surveyed at single-nucleotide resolution. *Nature* **453**, 1239-1243.
- WILL, C. L., und LUHRMANN, R.** (2011). Spliceosome structure and function. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **3**.
- WRIGHT, C. S.** (1984). Structural comparison of the two distinct sugar binding sites in wheat germ agglutinin isolectin II. *Journal of molecular biology* **178**, 91-104.
- XIANG, X., und PLAMANN, M.** (2003). Cytoskeleton and motor proteins in filamentous fungi. *Current opinion in microbiology* **6**, 628-633.
- YELTON, M. M., HAMER, J. E., und TIMBERLAKE, W. E.** (1984). Transformation of *Aspergillus nidulans* by using a *trpC* plasmid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **81**, 1470-1474.
- ZAHIRI, A., HEIMEL, K., WAHL, R., RATH, M., und KÄMPER, J.** (2010). The *Ustilago maydis* forkhead transcription factor Fox1 is involved in the regulation of genes required for the attenuation of plant defenses during pathogenic development. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI* **23**, 1118-1129.
- ZARNACK, K., EICHHORN, H., KAHMANN, R., und FELDBRÜGGE, M.** (2008). Pheromone-regulated target genes respond differentially to MAPK phosphorylation of transcription factor Prf1. *Mol Microbiol* **69**, 1041-1053.
- ZARNACK, K., und FELDBRÜGGE, M.** (2007). mRNA trafficking in fungi. *Molecular genetics and genomics : MGG* **278**, 347-359.
- ZARNACK, K., und FELDBRÜGGE, M.** (2010). Microtubule-dependent mRNA transport in fungi. *Eukaryotic cell* **9**, 982-990.
- ZARNACK, K., MAURER, S., KAFFARNIK, F., LADENDORF, O., BRACHMANN, A., KÄMPER, J., und FELDBRÜGGE, M.** (2006). Tetracycline-regulated gene expression in the pathogen *Ustilago maydis*. *Fungal Genet Biol* **43**, 727-738.

- ZEKERT, N., und FISCHER, R.** (2009). The *Aspergillus nidulans* kinesin-3 UncA motor moves vesicles along a subpopulation of microtubules. *Molecular biology of the cell* **20**, 673-684.
- ZEKERT, N., VEITH, D., und FISCHER, R.** (2010). Interaction of the *Aspergillus nidulans* microtubule-organizing center (MTOC) component ApsB with gamma-tubulin and evidence for a role of a subclass of peroxisomes in the formation of septal MTOCs. *Eukaryotic cell* **9**, 795-805.
- ZHANG, J., KUO, C. C., und CHEN, L.** (2011a). GC content around splice sites affects splicing through pre-mRNA secondary structures. *BMC Genomics* **12**, 90.
- ZHANG, J., LI, S., FISCHER, R., und XIANG, X.** (2003). Accumulation of cytoplasmic dynein and dynactin at microtubule plus ends in *Aspergillus nidulans* is kinesin dependent. *Molecular biology of the cell* **14**, 1479-1488.
- ZHANG, J., TAN, K., WU, X., CHEN, G., SUN, J., RECK-PETERSON, S. L., HAMMER, J. A., 3RD, und XIANG, X.** (2011b). *Aspergillus* myosin-V supports polarized growth in the absence of microtubule-based transport. *PLoS one* **6**, e28575.
- ZHANG, J., ZHUANG, L., LEE, Y., ABENZA, J. F., PENALVA, M. A., und XIANG, X.** (2010). The microtubule plus-end localization of *Aspergillus* dynein is important for dynein-early-endosome interaction but not for dynein ATPase activation. *Journal of cell science* **123**, 3596-3604.
- ZHANG, N., KAUR, R., AKHTER, S., und LEGERSKI, R. J.** (2009). Cdc5L interacts with ATR and is required for the S-phase cell-cycle checkpoint. *EMBO reports* **10**, 1029-1035.
- ZHANG, N., KAUR, R., LU, X., SHEN, X., LI, L., und LEGERSKI, R. J.** (2005). The Pso4 mRNA splicing and DNA repair complex interacts with WRN for processing of DNA interstrand cross-links. *The Journal of biological chemistry* **280**, 40559-40567.
- ZHENG, L., CHEN, Y., und LEE, W. H.** (1999). Hec1p, an evolutionarily conserved coiled-coil protein, modulates chromosome segregation through interaction with SMC proteins. *Molecular and cellular biology* **19**, 5417-5428.
- ZHENG, Y., KIEF, J., AUFFARTH, K., FARFSING, J. W., MAHLERT, M., NIETO, F., und BASSE, C. W.** (2008). The *Ustilago maydis* Cys2His2-type zinc finger transcription factor Mzr1 regulates fungal gene expression during the biotrophic growth stage. *Molecular microbiology* **68**, 1450-1470.
- ZHUANG, L., ZHANG, J., und XIANG, X.** (2007). Point mutations in the stem region and the fourth AAA domain of cytoplasmic dynein heavy chain partially suppress the phenotype of NUDF/LIS1 loss in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **175**, 1185-1196.
- ZIMYANIN, V. L., BELAYA, K., PECREAU, J., GILCHRIST, M. J., CLARK, A., DAVIS, I., und ST JOHNSTON, D.** (2008). *In vivo* imaging of *oskar* mRNA transport reveals the mechanism of posterior localization. *Cell* **134**, 843-853.
- ZUKER, M.** (2003). Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res* **31**, 3406-3415.

6. Anhang

6.1 Untersuchungen von Num1-Proteininteraktionen *in vivo*: BiFC-Analysen

Die anhand des Hefe-Zwei-Hybrid Systems identifizierten und per *in vitro* Co-Immunopräzipitation gezeigten Interaktionen von Num1 mit dem Kin1 Motorprotein sowie Um10958, einem Spindelpolkkörper-assoziierten Protein, wurden mittels Bimolekularer Fluoreszenzkomplementation (BiFC) *in vivo* verifiziert. Aufgrund des überlappenden Phänotyps von *num1*- und *um00933*-Deletionsmutanten wurde das Um00933-Protein in die Analysen mit einbezogen. Der experimentelle Ansatz der BiFC-Analysen beruht auf der funktionellen Rekonstitution eines fluoreszierenden Proteins (wie GFP oder YFP), wenn zwei nicht fluoreszente Fragmente dieses Proteins (cGFP und nGFP) in räumliche Nähe zueinander gebracht werden, was z.B. durch Protein-Protein-Interaktionen erfolgen kann. Durch Fusion der Fragmente an vermeintlich miteinander interagierende Proteine kann die BiFC-Methode verwendet werden, um Protein-Protein-Interaktionen innerhalb einer lebenden Zelle zu detektieren und darüber hinaus subzellulär zu lokalisieren (Hu *et al.*, 2002; Hu *et al.*, 2006; Hu und Kerppola, 2003; Kerppola, 2006). Kommt es aufgrund einer Protein-Protein-Interaktion zur Bildung einer funktionellen, fluoreszierenden Einheit von cGFP und nGFP, so ist die Bildung dieses Komplexes nahezu irreversibel. Zelluläre Dynamiken können mit diesem System also nicht detektiert werden, was als eindeutiger Nachteil angesehen werden muss (Hu *et al.*, 2002; Robida und Kerppola, 2009).

Da das Num1-Protein prädominant Zellkern-lokalisiert ist, die zu untersuchenden Interaktionspartner jedoch zytoplasmatische Proteine sind, war die Lokalisierung der Interaktionen von besonderer Bedeutung. Für die Analysen wurde das N-terminale Fragment des GFP-Proteins (nGFP, AS 1-154) C-terminal an das Num1-Protein fusioniert und *in locus* unter Kontrolle des nativen P_{num1} -Promotors im Stamm AB31 exprimiert. Das C-terminale GFP-Fragment (cGFP, AS 155-238) wurde C-terminal an das Kin1-, Um10958-, bzw. Um00933-Protein fusioniert und jeweils *in locus* unter Kontrolle ihrer nativen Promotoren mit dem Num1:nGFP-Protein co-exprimiert. Als Negativkontrolle wurde allein das cGFP-Fragment verwendet, das unter Kontrolle des P_{otef} -Promotors konstitutiv in der Zelle exprimiert wurde. Aufgrund der diskrepanten Lokalisierung der einzelnen Proteine erschien ein Protein mit distinkter Lokalisierung (wie dem Zellkern) als Negativkontrolle ungeeignet, da es unter Umständen keine valide Interpretation der Hintergrundfluoreszenz ermöglichen würde.

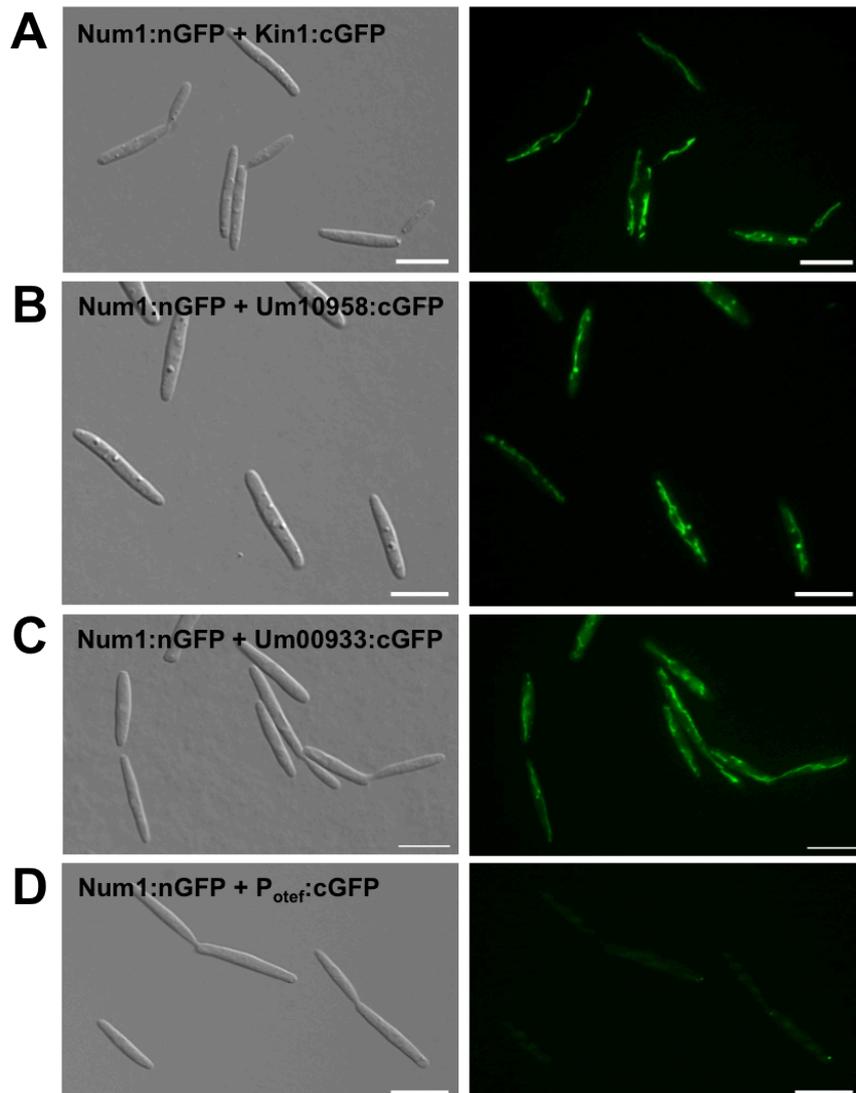


Abbildung 60: BiFC-Analyse der Num1/Kin1- Num1/Um10958- und Num1/Um00933-Proteininteraktionen. Für die BiFC-Analyse wurde Num1 als Fusionsprotein mit dem N-Terminus von GFP (nGFP), Kin1, Um10958 bzw. Um00933 wurden als Fusionsproteine mit dem C-Terminus von GFP (cGFP) jeweils *in locus* unter Kontrolle ihrer nativen Promotoren exprimiert. Exponentiell wachsende Kulturen der resultierenden Stämme wurden fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Gezeigt sind DIC-Durchlichtaufnahmen sowie die GFP-Fluoreszenzsignale. Bei der Co-Expression von Num1:nGFP mit Kin1:cGFP (UNK77) **(A)** Num1:nGFP mit Um10958:cGFP (UNK78) **(B)** und Num1:nGFP mit Um00933:cGFP (UNK89) **(C)** wurde ein starkes GFP-Signal entlang fibrillärer Strukturen beobachtet. **(D)** Für die Negativkontrolle wurde cGFP unter der Kontrolle des konstitutiv aktiven P_{otef} -Promotors exprimiert. Bei der Co-Expression mit Num1:nGFP wurde lediglich eine schwache, zyttoplasmatische Hintergrundfluoreszenz beobachtet. Der Längenmaßstab entspricht jeweils 10 μ m.

Die Co-Expression von Num1:nGFP mit den cGFP-fusionierten putativen Interaktionspartnern führte in allen drei Fällen zu einem deutlichen GFP-Signal, das entlang fibrillärer Strukturen, die innerhalb des Zytoplasmas verteilt waren, beobachtet wurde (Abb. 60A-C). Während des filamentösen Wachstums 12-14 Stunden nach Induktion des bE/bW-Heterodimers in Arabinose-haltigem Medium war eine ähnliche Situation zu verzeichnen und das rekonstituierte GFP-Signal war entlang mehrerer, tubulärer Strukturen innerhalb der Hyphe zu beobachten (nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu war bei der Negativkontrolle lediglich eine schwache Hintergrundfluoreszenz zu detektieren (Abb. 60D). Analog wurden die Analysen mit Num1:nYFP- bzw. Kin1:cYFP- und Um10958:cYFP-Proteinen

durchgeführt, wobei es zu identischen Lokalisierungen des YFP-Signals kam (nicht gezeigt). Auch die induzierte Expression des Num1:nGFP Proteins unter der Kontrolle des P_{crg1} -Promotors führte zusammen mit Kin1:cGFP und Um10958:cGFP zu keiner anderen Lokalisierung als die beobachteten tubulären Strukturen (nicht gezeigt).

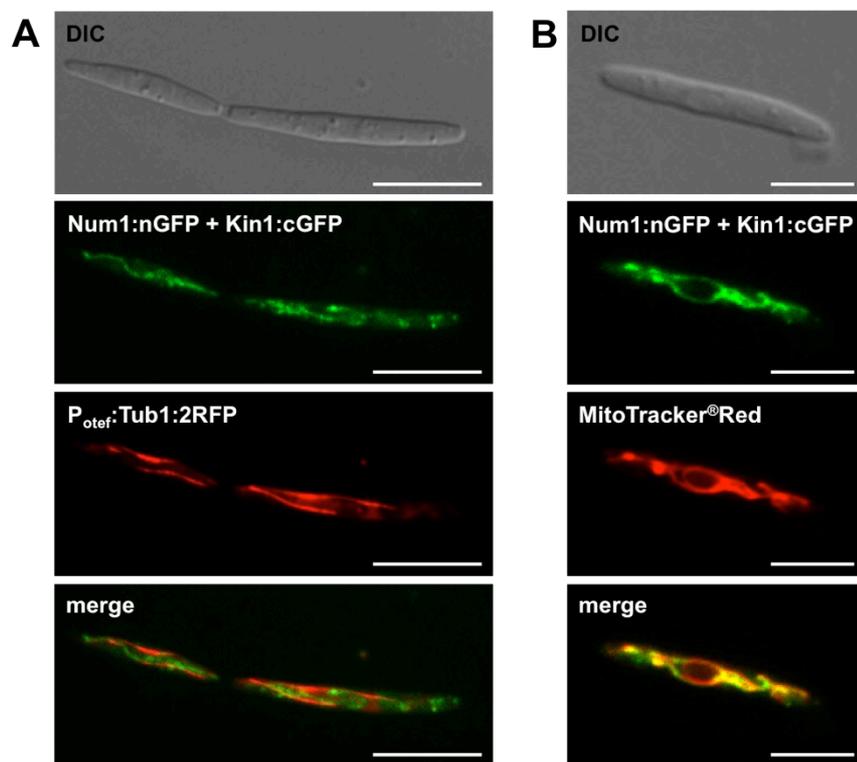


Abbildung 61: Untersuchungen zur Lokalisierung der Num1/Kin1-Interaktion in der BiFC-Analyse. (A) In Stamm UNK77 (Num1:nGFP/Kin1:cGFP) wurde zur Visualisierung von Mikrotubuli ein Tub1:2RFP-Fusionsprotein unter Kontrolle des konstitutiv aktiven P_{otef} -Promotors eingebracht. Exponentiell wachsende Kulturen des resultierenden Stammes wurden fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Gezeigt sind DIC-Durchlichtaufnahmen, GFP- und RFP-Fluoreszenzsignale, sowie die Überlagerung der beiden Kanäle. Es konnte keine Co-Lokalisierung der BiFC-Signale (grün) mit Mikrotubuli (rot) beobachtet werden. **(B)** Mitochondrien des Stammes UNK77 wurden mit Hilfe des MitoTracker®Red-Farbstoffs visualisiert. Die Überlagerung des RFP-Kanals mit dem GFP-Signal macht deutlich, dass die Interaktion in der BiFC-Analyse in oder an Mitochondrien stattfindet. Der Längenmaßstab entspricht jeweils 10 μ m.

In weiterführenden Untersuchungen wurde anhand des Stamms UNK77 (AB31 Num1:nGFP, Kin1:cGFP) die Art der fibrillären, tubulären Strukturen untersucht; es sollte geklärt werden, ob es sich dabei beispielsweise um Elemente des Zytoskeletts handelte. Zur Visualisierung von Mikrotubuli wurde zusätzlich zu den GFP-Fragmenten ein Tub1:2RFP-Fusionsprotein unter Kontrolle des konstitutiv aktiven P_{otef} -Promotors exprimiert. Es konnte jedoch keine Co-Lokalisierung der BiFC-Signale von Num1 und Kin1 mit Mikrotubuli verzeichnet werden (Abb. 61A). Die Behandlung von axenisch wachsenden Kulturen mit Inhibitoren des Zytoskeletts, wie Benomyl zur Depolymerisierung von Mikrotubuli und Cytochalasin A zur Destabilisierung des Actin-Zytoskeletts, führte nicht zum Abbau der filamentösen Strukturen (nicht gezeigt), woraus geschlossen werden konnte, dass es sich dabei nicht um Strukturelemente des Zytoskeletts handelte. Ferner wurden die Kulturen mit dem

MitoTracker Red[®]-Farbstoff behandelt, der in aktiven Mitochondrien akkumuliert. Hier konnte eine eindeutige Co-Lokalisierung der BiFC-Signale mit Mitochondrien beobachtet werden (Abb. 61B). Vergleichbare Resultate konnten auch für die Interaktion von Num1 mit Um10958 beobachtet werden (nicht gezeigt).

Über die biologische Relevanz dieser Beobachtung kann jedoch keine verlässliche Aussage getroffen werden, da die Interaktion von Num1 mit seinen Interaktionspartnern in der BiFC-Analyse zu einer irreversiblen Komplexbildung führt, was die subzelluläre Lokalisierung der Interaktion stark beeinflussen kann. Zelluläre Dynamiken, wie im Fall der Num1/Kin1-Interaktion postuliert (siehe 3.2.3), können mit diesem System also nicht detektiert werden, was als eindeutiger Nachteil angesehen werden muss (Hu *et al.*, 2002; Robida und Kerppola, 2009). Ein weiterer Nachteil dieser Methode besteht in der langen Zeit, die für eine korrekte Faltung und Assemblierung der Proteine benötigt wird, was die Detektion eines Fluoreszenzsignals erschweren kann. Die Tatsache, dass Num1 überwiegend im Zellkern lokalisiert, Kin1, Um10958 und Um00933 jedoch im Zytoplasma vorliegen, deutet darauf hin, dass die Interaktion schwach oder transient sein könnte. Für die Rekonstitution des GFP-Signals ist jedoch keine lange Halbwertszeit der gebildeten Komplexe notwendig. Außerdem muss nicht die gesamte Population der Interaktionspartner miteinander interagieren, um ein Fluoreszenzsignal zu erzeugen, da die Fragmente, die keine Interaktion eingehen, in der Untersuchung nicht sichtbar sind. Schwache Interaktionen werden somit durch die BiFC-Analyse stabilisiert (Kerppola, 2008). Da ein ähnliches Lokalisierungsmuster sowohl für die Interaktion von Num1 mit Kin1, als auch von Num1 mit Um10958 bzw. Um00933 beobachtet wurde, besteht die Möglichkeit, dass der detektierte Num1-Kin1/Um10958/Um00933-Komplex unspezifisch an Mitochondrien lokalisiert und stabilisiert wird. Die zeitlichen und räumlichen Dynamiken der erwähnten Interaktionspartner könnten möglicherweise besser anhand von FRET-Analysen (Förster Resonanz Energie-Transfer) aufgelöst und untersucht werden (Padilla-Parra und Tramier, 2012).

6.2 Num1 ist Teil eines größeren Komplexes

Einblicke in die Kin1-abhängige molekulare Funktion des Num1 Proteins können zukünftig durch die biochemische Analyse des Num1/Kin1-Komplexes erlangt werden. Für die Isolierung des Komplexes wurde die Tandem-Affinitäts-Aufreinigung (TAP) angewandt (Puig *et al.*, 2001; Rigaut *et al.*, 1999). Das Kin1 Protein wurde dazu als Fusionsprotein mit dem eGFP:TAP-Tag in AB31 exprimiert. Der TAP-Tag besteht aus einer IgG-Bindedomäne von Protein A aus *Staphylococcus aureus* (ProtA) sowie einem Calmodulin-Bindepeptid und kann für die spezifische Aufreinigung von Proteinkomplexen unter nativen Bedingungen verwendet werden. Als interne Kontrolle für die Aufreinigung des Komplexes wurde ein Num1:3xHA-Fusionsprotein co-exprimiert. Zunächst wurden Western-Analysen durchgeführt, um die Expression der Fusionsproteine zu verifizieren (Abb. 62A). Die

Expression des Kin1:eGFP:TAP-Tag Fusionsproteins wurde zusätzlich anhand von Fluoreszenzmikroskopie bestätigt (Abb. 62B).

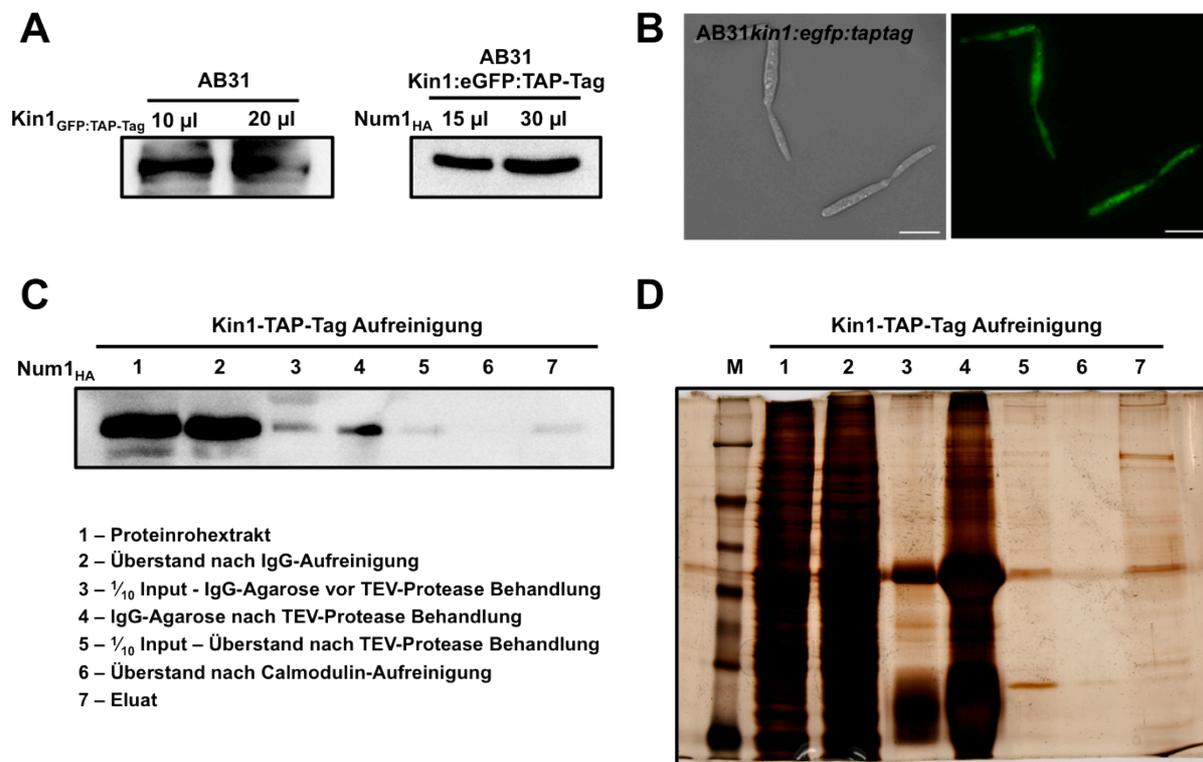


Abbildung 62: TAP-Tag Analyse des Num1/Kin1-Komplexes. (A) Western-Analysen zur Verifizierung der Expression der angegebenen Fusionsproteine. Von axenischen Kulturen der Stämme UNK232 (AB31 Kin1:eGFP:TAP-Tag) sowie UNK243 (AB31 Kin1:eGFP:TAP-Tag/Num1:3HA) wurden Proteinextrakte erstellt. Mittels anti-GFP- bzw. anti-HA Antikörpern konnten die entsprechenden Fusionsproteine nachgewiesen werden. (B) Eine exponentiell wachsende Kultur des Stammes UNK232 wurde fluoreszenzmikroskopisch analysiert, um die Expression des Kin1:eGFP:TAP-Tag-Fusionsproteins zu verifizieren. Gezeigt sind eine DIC-Durchlichtaufnahme sowie das GFP-Fluoreszenzsignal. Der Längenmaßstab entspricht 5 μ m. (C) und (D) Tandem-Affinitäts-Aufreinigung des Kin1-Komplexes mittels TAP-Tags aus dem Stamm UNK243. Die während der Aufreinigung entnommenen Proben sind unten links angegeben. In einer anschließenden Western-Analyse (C) konnte das Num1:3HA-Fusionsprotein mittels anti-HA Antikörpern erfolgreich im Eluat nachgewiesen werden. In (D) ist das entsprechende mit Silbernitrat-Ionen angefärbte Proteingel gezeigt. Im Eluat (Spur 7) ist eine Vielzahl an unterschiedlich großen Proteinbanden aus dem Kin1-Komplex zu erkennen.

Die Aufreinigung des Kin1-Komplexes erfolgte wie in Material und Methoden, Kapitel 4.5.6 beschrieben. Nach der Auftrennung des Eluats inklusive der während der Aufreinigung entnommenen Kontrollen per SDS-PAGE konnte in einer anschließenden Western-Analyse das Num1:3xHA-Fusionsprotein erfolgreich detektiert werden (Abb. 62C, Spur 7, Eluat), was darauf hindeutet, dass die Methode prinzipiell funktioniert und Num1 zusammen mit Kin1 in einem Proteinkomplex nachgewiesen werden kann. Die Färbung der Proteine im Polyacrylamid-Gel mit Silbernitrat-Ionen zeigt eine Vielzahl an unterschiedlich großen Proteinen auf, die über die Kin1-Aufreinigung co-präzipitiert wurden (Abb. 62D, Spur 7, Eluat). Dies suggeriert, dass Num1 eine Komponente eines größeren Komplexes ist, der nach Etablierung geeigneter Kontrollen zukünftig detailliert charakterisiert werden soll. Anhand einer massenspektrometrischen Analyse können weitere

Komponenten aus dem Num1/Kin1-Komplex identifiziert werden und zur Aufklärung der molekularen Funktion von Num1 beitragen.

6.3 Untersuchungen zum humanen Num1-Homolog hBCAS2

Im Gegensatz zu den meisten anderen Organismen besitzt das *U. maydis* Num1-Protein einen spezifischen Bereich von 65 AS am N-Terminus der Proteinsequenz, der essentiell für die Funktion des Proteins ist (Abb. 17). Durch die Kartierung der Num1-Interaktionsdomäne konnte gezeigt werden, dass der Num1 N-Terminus essentiell für die Interaktion mit dem Kin1-Motorprotein ist (Abb. 39). Der 65 AS-Bereich allein ist zwar nicht hinreichend für die direkte Interaktion mit Kin1, könnte jedoch trotzdem voraussetzend für die Kin1-spezifischen Funktionen sein.

Um zu überprüfen, ob die Interaktion mit dem Kin1 Motorprotein spezifisch für *U. maydis* und nah verwandte Organismen ist, oder ob die Interaktion bis hin zu höheren Organismen konserviert ist, wurde die Interaktion der humanen Homologen zu Num1 und Kin1 im Hefe-Zwei-Hybrid System getestet. Kin1 weist mit 34% ($E = 1e^{-142}$, NCBI BLAST) die höchste Sequenzidentität zu KIF5C, der schweren Kette des konventionellen Kinesins in *H. sapiens* auf. KIF5 existiert in Vertebraten aufgrund einer Genduplikation in drei Isoformen, die in verschiedenen Geweben und zu verschiedenen Zeitpunkten differentiell exprimiert werden. In der Maus sind KIF5A und KIF5C beispielsweise neuronal exprimiert, während KIF5B als ubiquitär gilt. Sie weisen jedoch eine hohe Identität zueinander auf, können gegenseitig ihre Phänotypen komplementieren und Heterodimere ausbilden, sodass davon auszugehen ist, dass sie funktionell redundant sind (Kanai *et al.*, 2000). In einer Hefe-Zwei-Hybrid Analyse mit humanen cDNA-Klonen konnte weder für das humane hBCAS2-Protein, noch für das *U. maydis* Num1-Protein eine Interaktion mit hKIF5C nachgewiesen werden. In einer Western-Analyse zum Nachweis der Proteine stellte sich jedoch zum einen heraus, dass die humanen Proteine in *S. cerevisiae* äußerst schlecht exprimiert wurden (nicht gezeigt). Zum anderen ist nicht auszuschließen, dass die unterschiedlichen KIF5-Isoformen distinkte Interaktionen eingehen. Möglicherweise hätte durch die Untersuchung der anderen Isoformen ein positives Ergebnis erzielt werden können. Wie bereits erwähnt werden für den Motorprotein-basierten Transport häufig weitere spezifische Adaptermoleküle benötigt, was den Nachweis einer direkten Interaktion im Hefe-Zellkern erschweren würde. Das Hefe-Zwei-Hybrid System ist ebenfalls ungeeignet, wenn die Interaktion in *H. sapiens* nur unter bestimmten physiologischen Bedingungen oder speziellen Zell- bzw. Gewebetypen eintritt.

Darüber hinaus wurde untersucht, ob der durch die $\Delta num1$ -Mutation hervorgerufene Phänotyp in *U. maydis* Filamenten durch eine Komplementation mit dem humanen hBCAS2-Protein revertiert werden kann. Um dessen Expression durch eine effiziente Translation im heterologen System sicherzustellen wurde eine Codon-optimierte Version der *hbcas2*-Sequenz erstellt und das Gen synthetisch generiert. Diese Optimierung führte zu einem Anstieg des GC-Gehaltes von 43% auf 62%.

Eine Anpassung des GC-Gehalts in Übereinstimmung mit der Codon-Verwendung führte in verschiedenen Studien beispielsweise zu einer verbesserten Expression von bakteriellen Toxinen in *Pichia pastoris* und *S. cerevisiae* (Gurkan und Ellar, 2003; Romanos *et al.*, 1991) oder zu einer deutlich effizienteren Expression und somit gesteigerter Fluoreszenz von GFP- und mCherry-Proteinen in *Botrytis cinerea* (Leroch *et al.*, 2011). Die Codon-optimierte heterologe Expression verschiedener Gene in *U. maydis* verlief bislang für viele Beispiele erfolgreich (Treutlein und Kämper, unveröffentlicht, Ladendorf und Kämper, unveröffentlicht, (Zarnack *et al.*, 2006)). Die Expression des humanen BCAS2-Proteins im AB31 Δ num1-Hintergrund führte zu einer teilweisen Komplementation des Phänotyps bezüglich des polaren, filamentösen Hyphenwachstums (Abb. 23), jedoch offenbarte die entsprechende Expressionskontrolle, das hBCAS2:eGFP-Fusionsprotein nur eine sehr geringe Expression, sodass über die biologische Relevanz der Komplementation und funktionelle Homologie zwischen Num1 und hBCAS2 keine vollständige Aussage getroffen werden kann. Ursächlich für das geringe Expressionslevel kann eine veränderte post-translationale Modifizierung (z.B. Glykosylierung) des Proteins in *U. maydis* sein. Es könnte aber auch zu einer vorzeitigen Polyadenylierung bei der heterologen Expression des humanen *hbcas2*-Gens in *U. maydis* kommen, die durch die pilzliche Prozessierungs-Maschinerie erkannt werden könnte und damit einen vorzeitigen Abbruch der Transkription zur Folge hätte. Anhand einer Northern-Analyse (Alwine *et al.*, 1977) kann die Länge des resultierenden *hbcas2*-Transkripts ermittelt werden, um auszuschließen, dass ein unvollständiges Transkript ausschlaggebend für die geringe Expression des hBCAS2:eGFP-Proteins ist.

Als weiteres Konstrukt zur Komplementation könnte man ein chimäres Protein aus der hBCAS2-Sequenz zusammen mit einem um die 65 spezifischen Aminosäuren aus *U. maydis* erweiterten N-Terminus generieren und die Komplementations-Fähigkeit untersuchen. Neben einer mikroskopischen Analyse der Filamentmorphologie wäre es auch möglich, per Realtime (qRT)-PCR Analyse von *rbf1*- und/oder *rbf1*-abhängig exprimierten Transkripten zu überprüfen, ob der Spleiß-Defekt in AB31 Δ num1-Stämmen durch Komplementation mit (1) dem humanen BCAS2-Protein oder (2) dem hBCAS2-Protein mit *U. maydis* N-Terminus revertiert werden kann. Auf diese Weise kann untersucht werden, ob es möglich ist die zytoplasmatische von der nukleären Num1-Funktion abzukoppeln. Sollte das humane BCAS2-Protein den Spleiß-Defekt komplett komplementieren, jedoch nicht den Phänotyp bezüglich des polaren Hyphenwachstums, so kann man davon ausgehen, dass das Num1-Protein zwei unabhängige Funktionen ausübt – zum einen eine konservierte Funktion als Spleißing-Faktor innerhalb des NTC, und zum anderen eine *U. maydis*-spezifische (Kin1-abhängige) Transportfunktion, die zum polaren Hyphenwachstum beiträgt.

6.4 Qualitätskontrollen zur mRNA-Seq Analyse

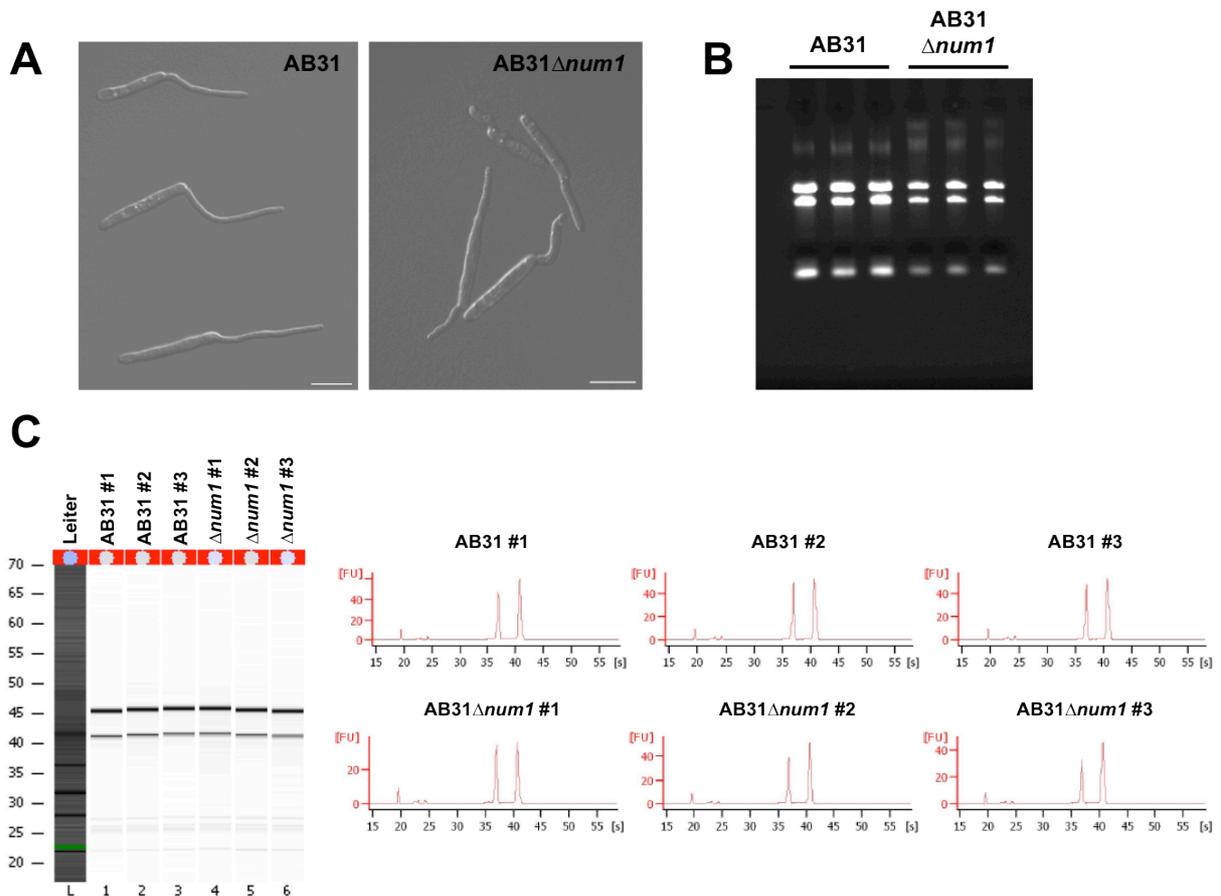


Abbildung 63: Qualitätskontrollen der für die mRNA-Sequenzierung eingesetzten RNA. (A) Mikroskopische Analyse der Filamentmorphologie acht Stunden nach Induktion des bE/bW-Heterodimers. Gezeigt sind DIC-Durchlichtaufnahmen der verwendeten Stämme. Der Längenmaßstab entspricht 10 μ m. (B) Gelelektrophoretische Analyse der acht Stunden nach Induktion des bE/bW-Heterodimers isolierten Gesamt-RNA von jeweils drei biologischen Replikaten. (C) Analyse der isolierten Gesamt-RNA mittels Agilent 2100-Bioanalyzer. Dargestellt ist die chromatografische Auftrennung der Proben, wobei die y-Achse Fluoreszenz-Einheiten (FU) und die x-Achse die Laufzeit in Sekunden (s) repräsentiert. Anhand der Spitzenwerte der 18S und 28S rRNAs wird die RNA-Integrität als Mittel für die RNA-Qualität berechnet.

Tabelle 18: mRNA-Seq Statistiken

Proben ID	Ertrag (Mbasen)	% PF	Anzahl gelesener Fragmente	raw clusters per lane (%)	perfect index reads	% one mismatch read (index)	% of \geq Q30 bases (PF)	mean quality score (Phred score)
AB31_1	3.512	96,79	64.790.016	17,56	100,00	0,00	96,90	37,92
AB31_2	2.484	96,98	45.735.083	12,39	100,00	0,00	96,87	37,91
AB31_3	3.570	96,90	65.786.676	17,83	100,00	0,00	96,87	37,90
$\Delta num1_1$	2.864	96,80	52.832.406	14,32	100,00	0,00	96,84	37,89
$\Delta num1_2$	3.130	96,72	57.780.234	15,66	100,00	0,00	96,85	37,90
$\Delta num1_3$	3.722	96,75	68.696.450	18,61	100,00	0,00	96,89	37,90

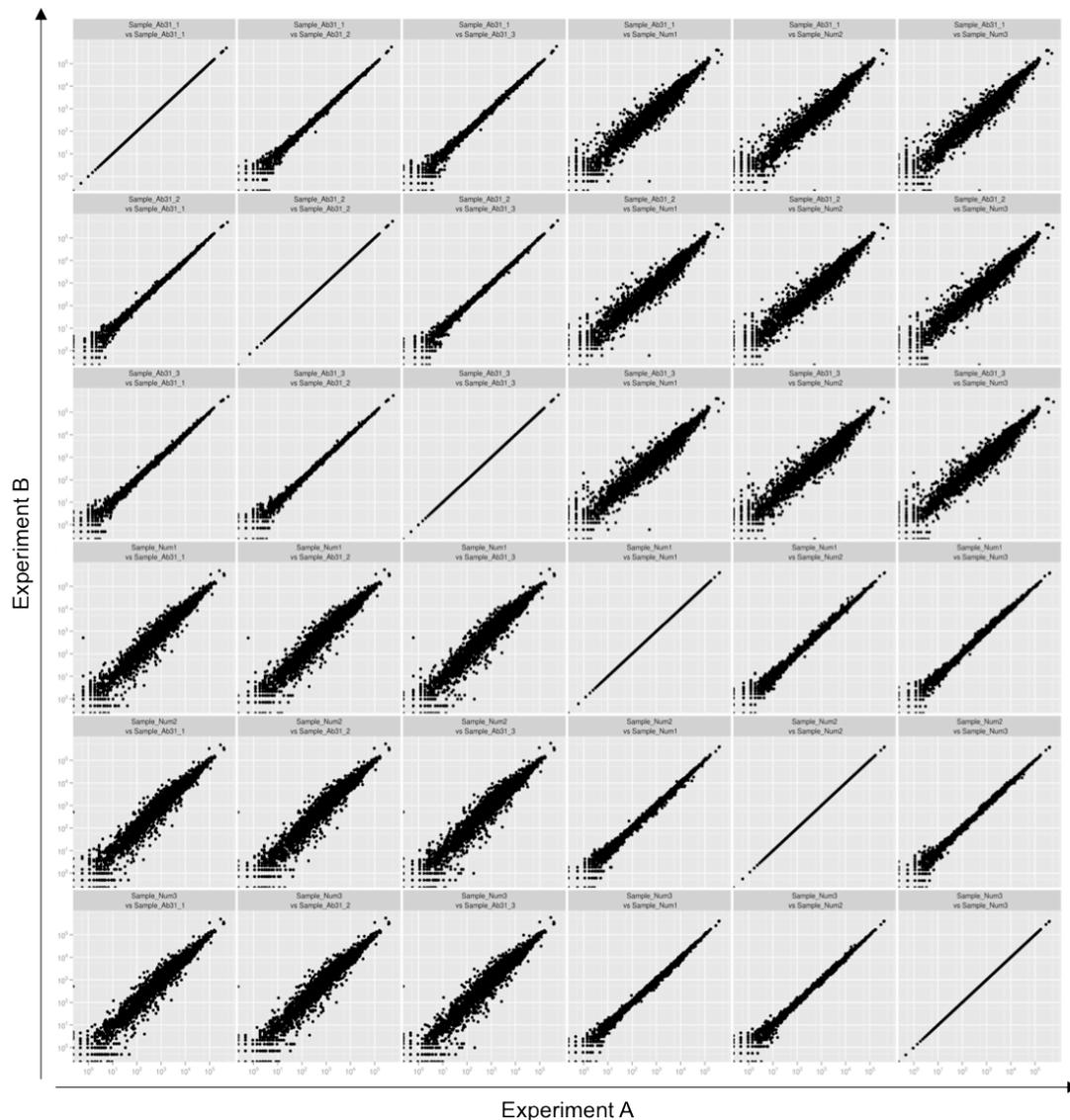


Abbildung 64: Graphische Darstellung zur Änderung der Genexpression von AB31 $\Delta num1$ vs. AB31. Um Änderungen bezüglich der Genexpression aufzuzeigen wurden die Expressionswerte (Anzahl gelesener Fragmente, normalisiert auf gleiche Gesamtanzahlen, logarithmisch skaliert) aller MUMDB-Gene der einzelnen Proben jeweils gegeneinander aufgetragen. Abbildung freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Florian Finkernagel.

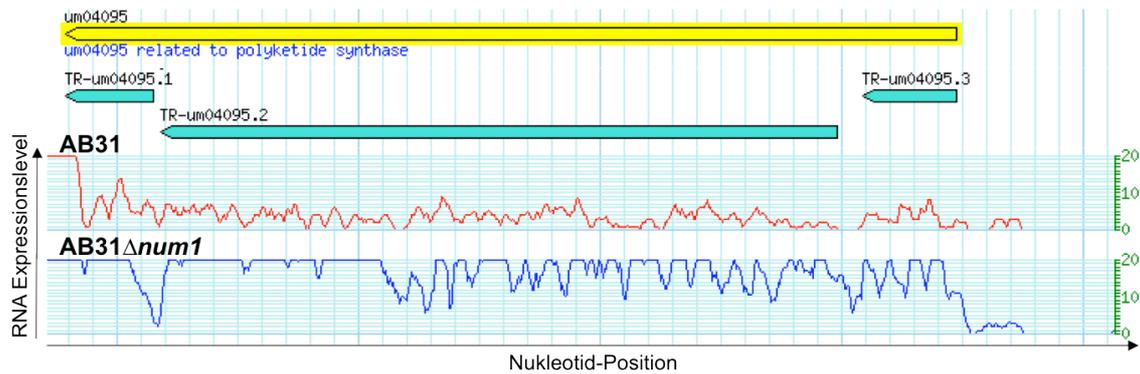


Abbildung 65: Intron-Retention und Genexpression im *um04095*-Gen. Dargestellt ist die anhand der MUMDB (<http://mips.helmholtz-muenchen.de/genre/proj/ustilago>) vorhergesagte Struktur des *um04095*-Locus. Der offene Leseraster des Gens ist als gelber Pfeil dargestellt; die kodierende Sequenz ist durch zwei Introns unterbrochen. Die vorhergesagten transkribierten Exons sind als blaue Pfeile abgebildet. Anhand der „single base resolution“-Expressionsprofile für je ein AB31- (rot) und ein AB31 Δ *num1*-Replikat (blau) wird deutlich, dass die Expression des Gens in der Mutante erhöht ist (5,14-fach induziert), und die Effizienz des Spleißens signifikant verringert ist (Intron-Retention 42,92 (1. Intron) bzw. 0,65 (2. Intron)).

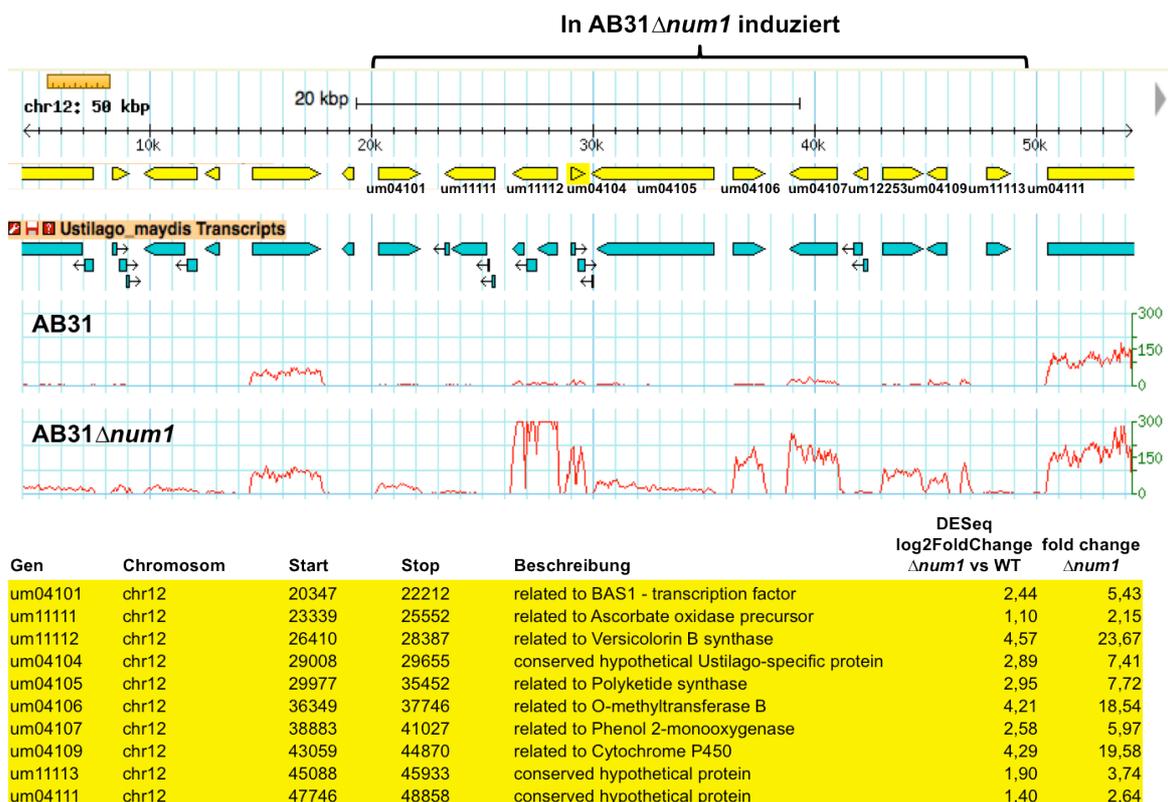


Abbildung 66: Induzierte Genexpression eines metabolischen Gen-Clusters. Dargestellt ist die anhand der MUMDB (<http://mips.helmholtz-muenchen.de/genre/proj/ustilago>) vorhergesagte Struktur des Gen-Clusters. Der offenen Leseraster sind als gelbe Pfeile dargestellt; die vorhergesagten transkribierten Exons sind als blaue Pfeile abgebildet. Anhand der „single base resolution“-Expressionsprofile wird deutlich, dass die Expression aller Gene im Cluster in AB31 Δ *num1* im Vergleich zum Wildtyp induziert ist. In der Tabelle sind die gemäß der MUMDB annotierten Beschreibungen der Gene sowie die differentiellen Änderungen der Genexpression aufgeführt.

6.5 Digitale Datensätze

Auf der beiliegenden CD befinden sich folgende Datensätze:

- Datensatz I** **Gene, die in AB31 Δ num1 vs. AB31 mindestens 2-fach induziert sind (DESeq)**
Gene, Beschreibung gemäß MUMDB (<http://mips.helmholtz-muenchen.de/genre/proj/ustilago>), sowie die faktorielle Veränderung der Genexpression in AB31 Δ num1 im Vergleich zu AB31 (Spalte D, gelb) sind angegeben. Zum Vergleich ist die faktorielle Veränderung der Genexpression in AB31 Δ rbf1 vs. AB31 5h bzw. 12h nach Induktion des bE/bW-Heterodimers angegeben.
- Datensatz II** **Gene, die in AB31 Δ num1 vs. AB31 mindestens 2-fach reprimiert sind (DESeq)**
Gene, Beschreibung gemäß MUMDB (<http://mips.helmholtz-muenchen.de/genre/proj/ustilago>), sowie die faktorielle Veränderung der Genexpression in AB31 Δ num1 im Vergleich zu AB31 (Spalte D, gelb) sind angegeben. Zum Vergleich ist die faktorielle Veränderung der Genexpression in AB31 Δ rbf1 vs. AB31 3h, 5h bzw. 12h nach Induktion des bE/bW-Heterodimers angegeben.
- Datensatz III** **Intron-Retentionsraten aller Intron-haltigen Gene in AB31 Δ num1 vs. AB31**
Gezeigt sind die Verhältnisse der Intron-Retentionsraten aus AB31 Δ num1 vs. AB31 (Spalte E, gelb), die faktorielle Veränderung der Genexpression (wenn zutreffend) sowie die normalisierten Expressionswerte für jedes Intron-haltige Gen. Die Beschreibung erfolgte gemäß MUMDB (<http://mips.helmholtz-muenchen.de/genre/proj/ustilago>).
- Datensatz IV** **Divergente Intron-Retentionsraten in AB31 Δ num1 vs. AB31**
Gezeigt sind die Top 50 Gene mit den höchsten Unterschieden bezüglich ihrer Intron-Retentionsraten. Beschreibung gemäß MUMDB (<http://mips.helmholtz-muenchen.de/genre/proj/ustilago>).
- Datensatz V** **Spleißing-Effizienz aller Gene aus der Kategorie „Zellzyklus“ (FunCat)**
Dargestellt ist die Genexpression aller Gene, die in der funktionellen Kategorie „Zellzyklus“ angereichert waren, sowie die Intron-Retentionsraten von AB31 Δ num1 vs. AB31 (Spalte N, blau). Interessante Kandidaten wurden in gelb hervorgehoben.
- Datensatz VI** **Spleißing-Effizienz aller Gene aus der Kategorie „DNA-Reparatur“ (FunCat)**
Dargestellt ist die Genexpression aller Gene, die in der funktionellen Kategorie „DNA-Reparatur“ angereichert waren, sowie die Intron-Retentionsraten von AB31 Δ num1 vs. AB31 (Spalte N, blau). Interessante Kandidaten wurden in gelb hervorgehoben.
- Datensatz VII** **Spleißing-Effizienz aller Gene aus der Kategorie „Zytoskelett“ (FunCat)**
Dargestellt ist die Genexpression aller Gene, die in der funktionellen Kategorie „Zytoskelett“ angereichert waren, sowie die Intron-Retentionsraten von AB31 Δ num1 vs. AB31 (Spalte N, blau). Interessante Kandidaten wurden in gelb hervorgehoben.
- Film 1** **Yup1:eGFP-markierte frühe Endosomen in AB33**
Visualisierung von Endosomen mit Hilfe eines Yup1:eGFP-Fusionsproteins in AB33, 14 Stunden nach Induktion des bE/bW-Heterodimers in Nitrat-haltigem Minimalmedium. Gezeigt ist das GFP-Signal. Längenmaßstab - 10 μ m.
- Film 2** **Yup1:eGFP-markierte frühe Endosomen in AB33 Δ num1**
Visualisierung von Endosomen mit Hilfe eines Yup1:eGFP-Fusionsproteins in AB33 Δ num1, 14 Stunden nach Induktion des bE/bW-Heterodimers in Nitrat-haltigem Minimalmedium. Gezeigt ist das GFP-Signal. Im Gegensatz zu AB33 akkumulieren die Yup1:eGFP-Proteine in AB33 Δ num1 an den basalen und apikalen Hyphenspitzen, sowie im Bereich der delokalisierten Septen. Die Motilität der Endosomen ist deutlich reduziert. Längenmaßstab - 10 μ m.
- Film 3** **Yup1:eGFP-markierte frühe Endosomen in AB33 Δ um03539**
Visualisierung von Endosomen mit Hilfe eines Yup1:eGFP-Fusionsproteins in AB33 Δ um03539, 12 Stunden nach Induktion des bE/bW-Heterodimers in Nitrat-haltigem Minimalmedium. Gezeigt ist das GFP-Signal. Längenmaßstab - 10 μ m.
- Film 4** **Yup1:eGFP-markierte frühe Endosomen in AB33 Δ um00933**
Visualisierung von Endosomen mit Hilfe eines Yup1:eGFP-Fusionsproteins in AB33 Δ um03539, 14 Stunden nach Induktion des bE/bW-Heterodimers in Nitrat-haltigem Minimalmedium. Gezeigt ist das

GFP-Signal. Die Motilität der Endosomen ist, verglichen mit dem Wildtyp, eingeschränkt. Längenmaßstab - 10 μm .

- Film 5** **Subzelluläre Lokalisierung des Um10958:3eGFP-Fusionsproteins in Sporidien**
Haploide Sporidien des Stammes UNK104 wurden während der exponentiellen Wachstumsphase fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Gezeigt ist das GFP-Fluoreszenzsignal. Während der Zellteilung kann das Um10958:3eGFP-Fusionsprotein an Spindelpolkörpern im Bereich der Nuklei beobachtet werden, die auf beide Zellen aufgeteilt werden. Längenmaßstab - 5 μm .
- Film 6** **Subzelluläre Lokalisierung des Um00933:3eGFP-Fusionsproteins im Filament**
15 Stunden nach Induktion des bE/bW-Heterodimers in Stamm AB31 Um00933:3eGFP wurden die Filamente fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Gezeigt ist das GFP-Signal. Das Protein dekoriert das Mikrotubuli-Zytoskelett in Form von motilen Partikeln, die in bidirektionale Richtung transportiert werden. Außerdem sind statischere Foci zu sehen, die sich in einem Bereich von 2-3 μm um den Zellkern herum bewegen, wobei es sich vermutlich um Komponenten des Spindelpolkörpers handelt. Längenmaßstab - 10 μm . Der Film wurde zur Verfügung gestellt von Niko Pinter.
- Film 7** **Rrm4:eGFP-Dynamiken in AB33**
Fluoreszenzmikroskopische Analyse des Rrm4:eGFP-Fusionsproteins in AB33, 16 Stunden nach Induktion des bE/bW-Heterodimers in Nitrat-haltigem Minimalmedium. Gezeigt ist das GFP-Signal. Das Protein lokalisiert auf schnellen, bidirektional transportierten Partikeln. Längenmaßstab - 10 μm .
- Film 8a** **Rrm4:eGFP-Dynamiken in AB33 Δ num1**
Fluoreszenzmikroskopische Analyse des Rrm4:eGFP-Fusionsproteins in AB33 Δ num1, 16 Stunden nach Induktion des bE/bW-Heterodimers in Nitrat-haltigem Minimalmedium. Gezeigt ist das GFP-Signal. Es kommt häufig zu Akkumulationen des Proteins an der Hyphenspitze. Längenmaßstab - 10 μm .
- Film 8b** **Rrm4:eGFP-Dynamiken in AB33 Δ num1**
Fluoreszenzmikroskopische Analyse des Rrm4:eGFP-Fusionsproteins in AB33 Δ num1, 16 Stunden nach Induktion des bE/bW-Heterodimers in Nitrat-haltigem Minimalmedium. Gezeigt ist das GFP-Signal. Es kommt häufig zu Akkumulationen und die Motilität der Partikel ist reduziert. Längenmaßstab - 10 μm .
- Film 8c** **Rrm4:eGFP-Dynamiken in AB33 Δ num1**
Fluoreszenzmikroskopische Analyse des Rrm4:eGFP-Fusionsproteins in AB33 Δ num1, 16 Stunden nach Induktion des bE/bW-Heterodimers in Nitrat-haltigem Minimalmedium. Gezeigt ist das GFP-Signal. Es kommt häufig zu Akkumulationen und die Motilität der Partikel ist reduziert. Längenmaßstab - 10 μm .
- Film 9** **Pab1:eGFP-Dynamiken in AB33**
Fluoreszenzmikroskopische Analyse des Pab1:eGFP-Fusionsproteins in AB33, 16 Stunden nach Induktion des bE/bW-Heterodimers in Nitrat-haltigem Minimalmedium. Gezeigt ist das GFP-Signal. Das Protein lokalisiert im Zytoplasma sowie auf bidirektional transportierten mRNP-Partikeln. Längenmaßstab - 10 μm .
- Film 10a** **Pab1:eGFP-Dynamiken in AB33 Δ num1**
Fluoreszenzmikroskopische Analyse des Pab1:eGFP-Fusionsproteins in AB33 Δ num1, 16 Stunden nach Induktion des bE/bW-Heterodimers in Nitrat-haltigem Minimalmedium. Gezeigt ist das GFP-Signal. Es sind weniger mRNP-Partikel als im Wildtyp zu beobachten und es kommt zu Akkumulationen des Proteins an der Hyphenspitze. Längenmaßstab - 10 μm .
- Film 10b** **Pab1:eGFP-Dynamiken in AB33 Δ num1**
Fluoreszenzmikroskopische Analyse des Pab1:eGFP-Fusionsproteins in AB33 Δ num1, 16 Stunden nach Induktion des bE/bW-Heterodimers in Nitrat-haltigem Minimalmedium. Gezeigt ist das GFP-Signal. Es sind weniger mRNP-Partikel als im Wildtyp zu beobachten und die Motilität erscheint reduziert. Längenmaßstab - 10 μm .

Zum Abspielen von .avi oder .mov Dateien eignen sich für PC und Apple Macintosh: Windows Media Player – siehe www.microsoft.com/windows/windowsmedia/players.aspx; Real Player – siehe www.real.com oder VLC Media Player – siehe www.vlc.de bzw. für Unix: Mplayer – siehe mplayerhq.hu.

Bitte die entsprechenden Download- und Installationsanweisungen auf den angegebenen Internet-Seiten beachten.

Daten-CD:

Lebenslauf

Angaben zur Person

Name	Nikola Kellner
Geburtsdatum	01. Mai 1984
Geburtsort	Werl, Nordrhein-Westfalen
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig, keine Kinder

Schullaufbahn

1990-1994	Mariengrundschule in Werl-Büderich
1994-2000	Mariengymnasium in Werl
2000-2001	Austauschschuljahr an der Cabot High School in Cabot, Arkansas, USA
2001-2003	Mariengymnasium in Werl
Juni 2003	Abitur (Note: 1,8)

Studienlaufbahn

2003-2005	Grundstudium der Biologie an der Philipps-Universität in Marburg
September 2005	Vordiplom (Note: 1,4)
2005-2008	Hauptstudium der Biologie mit den Schwerpunkten Genetik, Mikrobiologie, Virologie und Parasitologie
März/April 2008	Diplomprüfungen (Notendurchschnitt: 1,0)
Mai 2008 – März 2009	Untersuchungen zur Anfertigung der Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Jörg Kämper im Institut für Angewandte Biowissenschaften, Abteilung Genetik am Karlsruher Institut für Technologie (KIT) Thema: „Funktionelle Analyse des Num1 Proteins aus <i>Ustilago maydis</i> “
März 2009	Diplom - Abschluss (Dipl. Biol.) mit Auszeichnung

Promotion

Seit Mai 2009	Untersuchungen zur Anfertigung der Promotion in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Jörg Kämper im Institut für Angewandte Biowissenschaften, Abteilung Genetik am Karlsruher Institut für Technologie (KIT) Thema: „Das Num1 Protein in <i>Ustilago maydis</i> : Regulation intrazellulärer Transportprozesse durch einen globalen Spleißing-Faktor“
---------------	--

Sprachen

- Flüssige Englischkenntnisse in Wort und Schrift
Grundkenntnisse in Französisch
- 2005 Sprachkurs: „Englisch für Naturwissenschaftler“ am Sprachenzentrum der Philipps-Universität Marburg
- 2011 Workshop: „Scientific Writing“

Praktika

- Juli/August 2003 Laborpraktikum im Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie in Dortmund
- Juli-September 2004 Naturschutz-orientiertes Praktikum bei der Hellenic Ornithological Society (HOS) in Gialova, Griechenland
- September -
Dezember 2007 Forschungsaufenthalt in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. John C. Kennell an der Saint Louis University, Department of Microbiology in Saint Louis, Missouri, USA

Fachschaftsarbeit

- 2003 – 2008 Mitglied der aktiven Fachschaft am Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg und studentische Vertreterin in verschiedenen Gremien (Studien-Ausschuss, Diplom-Prüfungsausschuss, Berufungskommission)

Stipendien

- Mai 2009 --
März 2011 Promotions-Stipendium der Landesgraduiertenförderung des Landes Baden-Württemberg
- März 2011 Reisekosten-Stipendium der FAZIT-Stiftung
- Juni 2012 Weiterqualifizierungs-Stipendium des „Karlsruhe House of Young Scientists“ (KHYS)

Lehrtätigkeit

- 2005 – 2008 Als studentische Hilfskraft Mithilfe bei der Vorbereitung, Durchführung und Betreuung verschiedener Praktika in den Bereichen Genetik und Zellbiologie
- Seit 2009 Eigenständiges Vorbereiten, Durchführen und Betreuen verschiedener Grundkurse („Mikrobiologisches, Molekularbiologisches und Genetisches Praktikum“, „Methodenpraktikum“), Betreuung und Anleitung von Laborpraktikanten sowie Anleitung von einer Diplomarbeit und drei Bachelorarbeiten.

Konferenzbeiträge

- September 2009 Poster „Num1: a Novel Factor Required for Organelle Trafficking in Asco- and Basidiomycetes
Molecular Biology of Fungi, 9th VAAM-Symposium, Münster
- März 2011 Poster „The Num1 Protein of *Ustilago maydis* is Required for Polar and Filamentous Growth“
26th Fungal Genetics Conference, Asilomar Conference Center, Pacific Grove, CA, USA
- April 2011 Vortrag „The Num1 Protein of *Ustilago maydis* is Required for Polar and Filamentous Growth“
Annual Conference of the Association for General and Applied Microbiology (VAAM), Karlsruhe
- September 2011 Vortrag „The Num1 Protein in *Ustilago maydis* – a Novel Connection Between Splicing and Transport“
Molecular Biology of Fungi, 10th VAAM-Symposium, Marburg
- März/April 2012 Poster „The Num1 Protein in *Ustilago maydis* – a Novel Connection Between Splicing and Transport“
11th European Conference on Fungal Genetics, Marburg
- Mai 2012 Vortrag „The Num1 Protein in *Ustilago maydis* – a Novel Connection Between Splicing and Trafficking“
Second Workshop German-Mexican DFG-CONACyT Research Unit 1334, Mexico City, Mexico
- Juni, 2012 Vortrag & Poster „The Num1 Protein in *Ustilago maydis* – a Novel Connection Between Splicing and Trafficking“
Gordon Research Conference on Cellular and Molecular Fungal Biology, Holderness, NH, USA

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Menschen bedanken, ohne die diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre.

An erster Stelle steht Prof. Dr. Jörg Kämper. Jörg, dir habe ich besonders viel zu verdanken. Vielen Dank nicht nur für die wissenschaftliche Anleitung meiner Doktorarbeit und das Überlassen des spannenden Themas, sondern auch für dein Vertrauen und die Mühe, die du dir immer für mich gegeben hast! Danke auch für die vielen Freiheiten und deinen unvergleichlichen Humor.

Bei Prof. Dr. Peter Nick möchte ich mich herzlich für die freundliche Übernahme des Co-Referats bedanken.

Ich bedanke mich außerdem bei Prof. Dr. Michael Feldbrügge, Prof. Dr. Michael Bölker und Prof. Dr. Gero Steinberg und ihren Mitarbeitern für diverse Stämme und Plasmide, die für diese Arbeit zur Verfügung gestellt wurden, sowie für viele Diskussionen und hilfreiche Ideen.

Ein großes Dankeschön gilt Florian Finkernagel, unserem Computerexperten, ohne den das RNA-Seq Experiment nicht möglich gewesen wäre. Danke für die Auswertung der Daten-Flut, fürs Rechnen und das geduldige Beantworten all unserer Fragen!

Jörg, Reinhard und Natalia, euch allen danke ich für die wirklich tolle Arbeitsatmosphäre an der Westhochschule! Weiterhin möchte ich mich bei Theresa Obhof, Melissa Ort, Katrin Trognitz, Niko Pinter und Alex Bisson bedanken, die durch ihre Bachelor-Arbeiten bzw. F3-Praktika einen großen Teil zu dieser Arbeit beigetragen haben. 1000 Dank für eure Mitarbeit!

Ganz besonders möchte ich mich natürlich bei allen Mitarbeitern der AG Kämper bedanken. Kai1, dir danke ich sehr für deine großartige Betreuung und für die unzähligen guten Ideen und klugen Ratschläge, die viel zu dem Projekt beigetragen haben. Danke, dass ich so viel von dir lernen durfte. Ich wünsche dir eine erfolgreiche und spannende Zeit in Göttingen! Kai2, danke für die tolle Zeit, die wir zusammen „durchgemacht“ haben, für die nette Gesellschaft beim Mittagessen und die Kaffchen danach. Schade, dass der Tisch gegenüber (und die Füße darunter) jetzt leer ist. Ich wünsche dir alles erdenklich Gute für deine Zukunft! Miro, dir danke ich für deine allzeit bereite kompetente Expertise, viele gute Tipps und Ratschläge! Ein großer Dank gilt auch David, Sebastian, Benni und Theresa – ihr seid tolle Kollegen! Dass ihr meinen Ordnungsfimmel und die dazugehörigen Emails ertragen bzw. mit Humor genommen habt, ist dankenswert. Sebastian und Theresa, eure Aufgabe wird es sein, das Num1-Projekt fortzuführen. Ich denke, bei euch ist es in guten Händen. Danke dafür. Euch allen und natürlich auch allen ehemaligen „Kämpers“, Ramon, Al, Thorsten, Caro, Alex, ..., danke ich für die gute Zeit im Labor und die Nachmittage am Grill! Auch allen Freunden des Kämper-Labors, Nina, Christian, Silke, Jan, Bea, Sandy und vielen Menschen für die an dieser Stelle kein Platz ist, danke für unvergessliche Jahre in Karlsruhe, die vielen Abende im Biergarten, Ausflüge zum See und zum Skifahren. Hoffentlich verlieren wir uns nicht allzu schnell aus den Augen!

Zum Schluss gilt ein riesiger Dank meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, für ihre außerordentliche Unterstützung in allen Lebenslagen. Danke, dass ihr immer da seid, für euer Verständnis und wenn nötig finanziellen Beistand.

Ich danke auch Tobi, meinem Lieblingsmenschen, fürs Zuhören, Mut machen und viele wundervolle entspannte Wochenenden. Ich freue mich auf unsere gemeinsame Zukunft!