



**Das Num1-Protein stabilisiert den Spleißosom-assoziierten  
NineTeen-Komplex und erfüllt zusätzliche Funktionen in  
*Ustilago maydis***

**genehmigte  
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

**Dipl. Biol. Sebastian Hassinger**  
aus Homburg (Saar)

März 2015

Dekan: Prof. Dr. Peter Roesky  
Referent: Prof. Dr. Jörg Kämper  
Co-Referent: Prof. Dr. Holger Puchta  
Tag der mündlichen Prüfung: 17.04.2015





## Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation mit dem Titel „Das Num1-Protein stabilisiert den Spleißosom-assoziierten NineTeen-Komplex und erfüllt zusätzliche Funktionen in *Ustilago maydis*“ 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 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)

---

(Sebastian Hassinger)

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von Oktober 2011 bis Februar 2015 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.



# Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>1</b>
<b>Abkürzungen.....</b>	<b>3</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>4</b>
1.1 Ustilago maydis .....	4
1.2 Der Lebenszyklus von <i>U. maydis</i> .....	6
1.3 Kontrolle der Entwicklung durch die Paarungstyp-Loci .....	9
1.3.1 Der <i>a</i> -Locus .....	9
1.3.2 Der <i>b</i> -Locus .....	11
1.4 Schnallenbildung zur korrekten Kernverteilung .....	13
1.5 Das Num1 Protein.....	15
1.6 Num1 als Komponente des Spleißosom-assoziierten <b>NineTeen-Komplexes</b> ...	19
1.7 Die zytoplasmatische Funktion des Num1-Proteins in <i>U. maydis</i> .....	23
1.8 Bisheriges Modell der Num1 Funktion .....	26
1.9 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit .....	27
<b>2 Ergebnisse.....</b>	<b>29</b>
2.1 Der Einfluss der <i>num1</i> Deletion auf die Wachstumsrate von haploiden <i>U. maydis</i> Sporidien .....	29
2.2 Eine N-term. verkürzte Num1 Variante kompl. den $\Delta num1$ Phänotyp .....	33
2.3 Selbstinteraktion des Num1 Proteins .....	36
2.4 Charakterisierung von bekannten Num1 Interaktionen.....	38
2.5 Aufreinigung von Proteinkomplexen und Identifizierung von direkten oder indirekten Proteininteraktionen mithilfe biochemischer Methoden .....	41
2.5.1 Massenspektroskopische Untersuchung der präzipitierten Proteine.....	42
2.5.2 Anreicherung und Untersuchung der zytoplasmatischen Proteinfraktion .....	43
2.5.3 Aufbau des NTC in <i>U. maydis</i> .....	46
2.5.4 Num1 und der NTC nehmen Einfluss auf die DNA-Reparatur .....	50
2.5.5 Die Identifizierung von Proteasom-Komponenten .....	51
2.5.6 Identifizierung von Transport-assoziierten Proteinen .....	52
2.5.7 Stabilisierung des NTC durch Num1 .....	53
<b>3 Diskussion.....</b>	<b>60</b>
3.1 Vermindertes Wachstum von $\Delta num1$ Stämmen .....	60
3.2 Der NTC von <i>U. maydis</i> .....	61
3.3 Num1 stabilisiert den NTC in <i>U. maydis</i> .....	63
3.4 Num1, der NTC und die Reparatur/Instandhaltung von DNA.....	67

3.5	Num1 und Prp19 interagieren mit Komponenten des Proteinabbaus.....	71
3.6	Num1 als Komponente des mRNA Exports .....	75
3.7	Num1 und die Kernpore (NPC).....	76
3.8	Die zytoplasmatische Funktion von Num1 .....	77
3.9	Die Funktionen des Num1 Proteins in <i>U. maydis</i> .....	80
4	Material und Methoden .....	83
4.1	Material und Bezugsquellen .....	83
4.2	Mikrobiologische und genetische Methoden.....	98
4.3	Fluoreszenzmikroskopie.....	103
4.4	Molekularbiologische Standardmethoden .....	104
4.5	Biochemische Methoden .....	112
4.6	PCR-Techniken .....	121
5	Literaturverzeichnis .....	125
6	Anhang.....	142
6.1	Etablierung der Immunpräzipitation von Proteinkomplexen .....	142
6.2	Co-Immunpräzipitation von Nup192 und Num1 .....	146
6.3	Die Lokalisierung von Cef1 mit eGFP.....	148
6.4	Die am stärksten vertretenen Proteine.....	150
	Digitale Datensätze .....	151

## Zusammenfassung

Die posttranskriptionelle Modifikation von mRNA durch Spleißen ist ein essentieller Prozess in eukaryotischen Zellen. Dieser Prozess wird hauptsächlich durch das Spleißosom katalysiert, welches aus einer Vielzahl von Komponenten besteht. Neben den wohl bekannten snRNPs (small nuclear ribonuclear particles) ist der NineTeen Komplex (NTC) eine der Hauptkomponenten des Spleißosoms. Der Komplex ist unverzichtbar für die korrekte Rekrutierung von snRNPs und hat damit Einfluss auf Spleiß-Effizienz und -Genauigkeit (Chen *et al.*, 2001; He und Parker, 2000).

Der humane NTC besteht im Kern aus den Komponenten hSPF27, hCDC5L, hPRP19 und hPRL1, welche in vielen anderen Eukaryoten konserviert sind. Jedes der vier Proteine besitzt zusätzliche Funktionen in weiteren zellulären Prozessen wie Zellzyklusregulation, DNA Reparatur und mRNP Formierung/Export. Aus diesen Gründen führt in den meisten Organismen die Deletion einer der vier NTC Kernkomponenten zur Letalität.

*Ustilago maydis* ist ein obligat biotropher Basidiomycet, welcher als Verursacher der Brandbeulenpest bei Mais bekannt ist. Das *U. maydis* Num1 Protein ist das Homolog des humanen hSPF27 Proteins. Interessanterweise kann das *num1* Gen in *U. maydis* deletiert werden und ist damit nicht essentiell.  $\Delta num1$ -Stämme weisen einen globalen Spleiß-defekt und eine aberrante Hyphenmorphologie auf (Kellner *et al.*, 2014). Mithilfe von Hefe-Zwei-Hybrid- und Co-Immunpräzipitations-Experimenten konnte für Prp19 und Cef1, den *U. maydis* Homologen von den humanen NTC Kernkomponenten hPRP19 und hCDC5L, eine Interaktion mit Num1 gezeigt werden. Zusätzlich konnten in Hefe-Zwei-Hybrid Untersuchungen mehrere zytoplasmatische Interaktionspartner von Num1 identifiziert werden, welche additive und bisher unbekannte Funktionen einer NTC-Kernkomponente implizieren. Einer dieser zytoplasmatischen Interaktionspartner ist das Motorprotein Kinesin 1 (Kellner *et al.*, 2014).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Zusammensetzung des NTC in *U. maydis* ermittelt. Dazu wurden Num1 und Prp19 jeweils mit einem 3xHA Tag versehen. Dadurch war deren Co-Immunpräzipitation mit direkten und indirekten Interaktionspartnern möglich. Der Nachweis der präzipitierten Proteine erfolgte massenspektroskopisch. Dabei wurden die meisten NTC Komponenten aus Mensch und Hefe identifiziert. Dies zeigt, dass der Komplex auch in *U. maydis* konserviert ist. Die Deletion von *num1* hat dabei wenig Einfluss auf die Komplexzusammensetzung, jedoch wird der Komplex durch die Abwesenheit von Num1 destabilisiert und dissoziiert in der Folge nahezu vollständig. Diese Dissoziation in Abwesenheit von Num1 konnte mittels TMTduplex- und zusätzlichen Co-IP-Experimenten

bestätigt und quantifiziert werden. Die große Bedeutung des Num1 Proteins für die Integrität des NTC erklärt somit auch die herabgesetzte Spleiß-Effizienz in  $\Delta num1$  Stämmen.

Durch die bioinformatische Analyse der präzipitierten Interaktionspartner konnte für den NTC von *U. maydis* eine direkte oder indirekte Beteiligung an Prozessen wie Protein-Degradierung, Zellzykluskontrolle und DNA Reparatur gezeigt werden.

Zusätzlich konnten weitere Interaktionspartner von Num1 identifiziert werden, welche vermuten lassen, dass Num1 den Zellkern zusammen mit mRNA über die Kernpore verlässt und im Zytoplasma NTC-unabhängige Aufgaben im Langstreckentransport von Vesikeln und Endosomen erfüllt. Dabei dient Num1 möglicherweise als Chaperon, welches neben dem NTC auch mRNPs, COPI- und COPII-Vesikelhüllen stabilisiert. Auch die Beteiligung an weiteren Intrazellulären Transportprozessen erscheint durch die vorgestellten Ergebnisse möglich.

## Abkürzungen

Ade	Adenin	NLS	Zellkern- Lokalisierungssequenz
Amp <sup>R</sup>	Ampicillin-Resistenz	NPC	„nuclear pore complex“
APS	Ammoniumperoxodisulfat	NTC	„NineTeen-Complex“
AS	Aminosäure	N-terminal	Amino-terminal
bE	„bEast“	OD <sub>600</sub>	optische Dichte bei 600 nm
BER	„base excision repair“	ORC	„origin recognition complex“
BLAST	„basic local alignment search tool“	ORF	offener Leserahmen
BSA	Rinderserum-Albumin	P <sub>xy</sub>	Promotor
bW	„bWest“	p.a.	für die Analyse
Cbx	Carboxin	PBS	Phosphat-gepufferte Saline
Cbx <sup>R</sup>	Carboxin-Resistenz	PCR	Polymerase-Kettenreaktion
cDNA	komplementäre DNA	PD	Kartoffel-Dextrose-Medium
cm	Zentimeter	PEG	Polyethylenglykol
CM	Komplex-Medium	pers.	persönlich(e)
Co-IP	Co-Immunopräzipitation	Phleo <sup>R</sup>	Phleomycin-Resistenz
C-terminal	Carboxy-terminal	PSM	Peptide pro Protein (petide spectrum match)
DIG	Digoxigenin	Primer	Startoligonukleotid für die PCR
DMSO	Dimethyl-Sulfoxid	RFP	rot fluoreszierendes Protein
dpi	Tage nach Infektion	RNase	Ribonuklease
Drop-out	Aminosäuremischung für Hefe- Medien	RNA-Seq	RNA-Sequenzierung
DSB	DNA-Doppelstrangbrüche	RT	Raumtemperatur oder reverse Transkriptase
DSP	Dithiobis[Succinimidyl- Propionat]	SD	„synthetic drop-out“
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	SDS-PAGE	Natriumdodecyl-Sulfat Polyacrylamidgel- Elektrophorese
EE	frühe Endosomen	T	Thymin oder Tryptophan
eGFP	verstärkte Version von GFP	TCR	„transcription coupled repair“
EJC	„Exon Junction Complex“	TE	Tris-HCl/EDTA
f.c.	finale Konzentration	TEMED	Tetramethylethylendiamin
<i>et al.</i>	und andere	TMT	Tandem Mass Tag
G	Guanin	Tris	Trihydroxymethyl- aminomethan
GFP	grün fluoreszierendes Protein	Trp	Tryptophan
His	Histidin	U	Unit (Enzymaktivität)
HA	Hämagglutinin	ÜN	über Nacht
HD	Homeodomäne	Upm	Umdrehungen pro Minute
HRP	Meerrettich-Peroxidase	(v/v)	Volumen pro Volumen
Hyg <sup>R</sup>	Hygromycin-Resistenz	WT	Wildtyp
Kan <sup>R</sup>	Kanamycin-Resistenz	(w/v)	Gewicht pro Volumen
Leu	Leucin	Y2H	Hefe-Zwei-Hybrid
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase	Δ	Deletion
MM	Minimalmedium		
Nat <sup>R</sup>	Nourseothricin-Resistenz		
NER	„nucleotide excision repair“		

# 1 Einleitung

## 1.1 *Ustilago maydis*

Der phytopathogene Pilz *Ustilago maydis* gehört zu der Abteilung der Basidiomyceten (Ständerpilze) und ist der wohl bekannteste Vertreter der Brandpilze (Ustilaginomycotina). Die Brandpilze bilden eine Unterabteilung der Ständerpilze. Bis auf wenige Ausnahmen handelt es sich bei den ungefähr 1.500 bekannten Brandpilzen um Pflanzenparasiten, welche hauptsächlich Poaceen (Süßgräser) und Cyperaceen (Sauergrasgewächse) infizieren. Unter den Wirtspflanzen der Brandpilze finden sich dabei auch viele Kulturpflanzen mit wirtschaftlicher Bedeutung wie Gerste, Hafer, Mais, Weizen und Zuckerrohr (Bakkeren *et al.*, 2008; Begerow *et al.*, 2006). *U. maydis* ist, wie alle Brandpilze, ein biotropher Pilz. Das bedeutet, dass er auf das lebende pflanzliche Gewebe des Wirtes angewiesen ist, um seinen Lebenszyklus zu vervollständigen (Christensen, 1963). Das Wachstum bzw. die Vermehrung der Brandpilze findet meist innerhalb des Meristems statt, wo das Nährstoffangebot am größten ist. Auch wenn die Infektion meist die ganze Pflanze betrifft (systemisch), so sind die größten Tumore an den Blütenstände zu beobachten (Ruiz-Herrera und Martinez-Espinoza, 1998). Dort kommt es zu einer exzessiven Proliferation des Myzels, an dessen Ende die Entstehung von stark melanisierten Brand- oder Teliosporen steht. Durch diese Sporen kamen die Brandpilze zu ihrem Namen. Denn sobald die sporenhaltigen Gallen bersten, verteilen sich die dunklen Sporen auf der Pflanzenoberfläche und sorgen für ein verbranntes Aussehen. Die freigesetzten Sporen sind nun imstande, weitere Pflanzen in der Umgebung zu infizieren.

*U. maydis* besitzt, wie die meisten Brandpilze, ein sehr eingeschränktes Wirtsspektrum. Dieses beschränkt sich in seinem Fall auf Mais (*Zea mays*) und dessen vermeintliche Urform Teosinte (*Euchlana mexicana*). Es werden alle oberirdischen Teile der Pflanze befallen, wobei die Infektion meist lokal begrenzt bleibt (Bölker, 2001; Doebley, 1992). Symptome einer *U. maydis* Infektion sind Chlorosen, Anthocyanosen und Tumoren, welche je nach Stärke und Dauer der Infektion auftreten können (Christensen, 1963). Das Aussehen der infizierten Pflanzen nach Freisetzung der Teliosporen führte zu dem Krankheitsnamen Maisbeulenbrand (Brefeld, 1875). Befallene Maiskolben sind essbar und gelten in Mexiko unter dem Namen Cuitlacoche als Delikatesse (Ruiz-Herrera und Martinez-Espinoza, 1998; Valverde *et al.*, 1995). Hauptsächlich wird *U. maydis* jedoch als Ernteschädling angesehen, dessen wirtschaftliche Bedeutung als eher gering einzustufen ist. Ein Grund dafür ist der Einsatz von teilresistenten Maislinien (Allen *et al.*, 2011; Martinez-Espinoza *et al.*, 2002).

Trotz seiner geringen wirtschaftlichen Relevanz hat sich *U. maydis* im Laufe der letzten Dekaden zu einem wichtigen Modellorganismus entwickelt. Als Modell für biotrophe, phytopathogene Pilze und deren Infektionsstrategien wurde *U. maydis* zu einem der wichtigsten pilzlichen Pathogene für die molekulare Pflanzenpathologie erklärt (Dean *et al.*, 2012). Zusätzlich kommt *U. maydis* bei der Erforschung von verschiedensten zellulären Prozessen wie dem polaren Wachstum und der sexuellen Entwicklung zum Einsatz (Bakkeren *et al.*, 2008; Brefort *et al.*, 2009; Steinberg und Perez-Martin, 2008). Einige wichtige Eigenschaften machen *U. maydis* zu einem idealen Labororganismus. Durch seinen dimorphen Lebenszyklus kann *U. maydis* sehr einfach im Labor kultiviert werden. Die haploiden Sporidien eignen sich hervorragend für die Anzucht auf und in künstlichem Medium. Zusätzlich kann der vollständige Lebenszyklus unter Laborbedingungen in wenigen Wochen vollzogen werden (Christensen, 1963; Holliday, 1961; Holliday, 1974). Des Weiteren unterstützten die einfache genetische Zugänglichkeit und das Vorhandensein der kompletten Genomsequenz das molekularbiologische Arbeiten. Dabei bleibt zu erwähnen, dass *U. maydis* der erste phytopathogene Pilz war, dessen Genomsequenz vollständig publiziert wurde (Kämper *et al.*, 2006). Dadurch ist der Einsatz von revers-genetischen Ansätzen und Methoden wie DNA-Arrays oder RNA-Sequenzierung möglich und etabliert (Doehlemann *et al.*, 2008; Kämper *et al.*, 2006; Kellner *et al.*, 2014). Die jahrelange Forschung stellt viele genetische Werkzeuge wie dominante Selektionsmarker, verschiedenste Fusionskassetten (z.B. Fluoreszenzproteine, Affinitäts- und Epitop-Tags) und induzierbare Promotorsysteme zur Verfügung (Banks *et al.*, 1993; Bottin *et al.*, 1996; Brachmann *et al.*, 2004; Gold *et al.*, 1994; Keon *et al.*, 1991; Kojic und Holloman, 2000; Spellig *et al.*, 1996). Durch die äußerst effiziente homologe Rekombination von *U. maydis* lassen sich diese Werkzeuge meist einfach und effizient einsetzen (Brachmann *et al.*, 2004; Holloman *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 1988). Die Identifizierung und Charakterisierung der Paarungstyp-Loci ermöglichte die Generierung von solopathogenen Stämmen, welche keinen kompatiblen Kreuzungspartner mehr benötigen um die Pflanze zu infizieren und den Lebenszyklus vollständig zu durchlaufen (Bölker *et al.*, 1995b; Kämper *et al.*, 2006). Diese Stämme machen Infektionsexperimente besser kontrollierbar und besser vergleichbar. So kann *U. maydis* in Maiskeimlinge injiziert werden, welche bereits nach sieben Tagen auswertbare Infektionssymptome aufweisen. *U. maydis* eignet sich zur schnellen und einfachen Bearbeitungen von Grundfragestellungen der Zell- und Molekularbiologie von höheren Eukaryoten. Denn Genomanalysen konnten zeigen, dass der Verwandtschaftsgrad von *U. maydis* zum Menschen enger ist als der zu Bäckerhefe (Münsterkötter und Steinberg, 2007). Viele Proteine können in *U. maydis* und im Menschen gefunden werden, fehlen jedoch in Hefe. Ein Beispiel dafür ist das in dieser Arbeit behandelte Protein Num1 (hSPF27).

## 1.2 Der Lebenszyklus von *U. maydis*

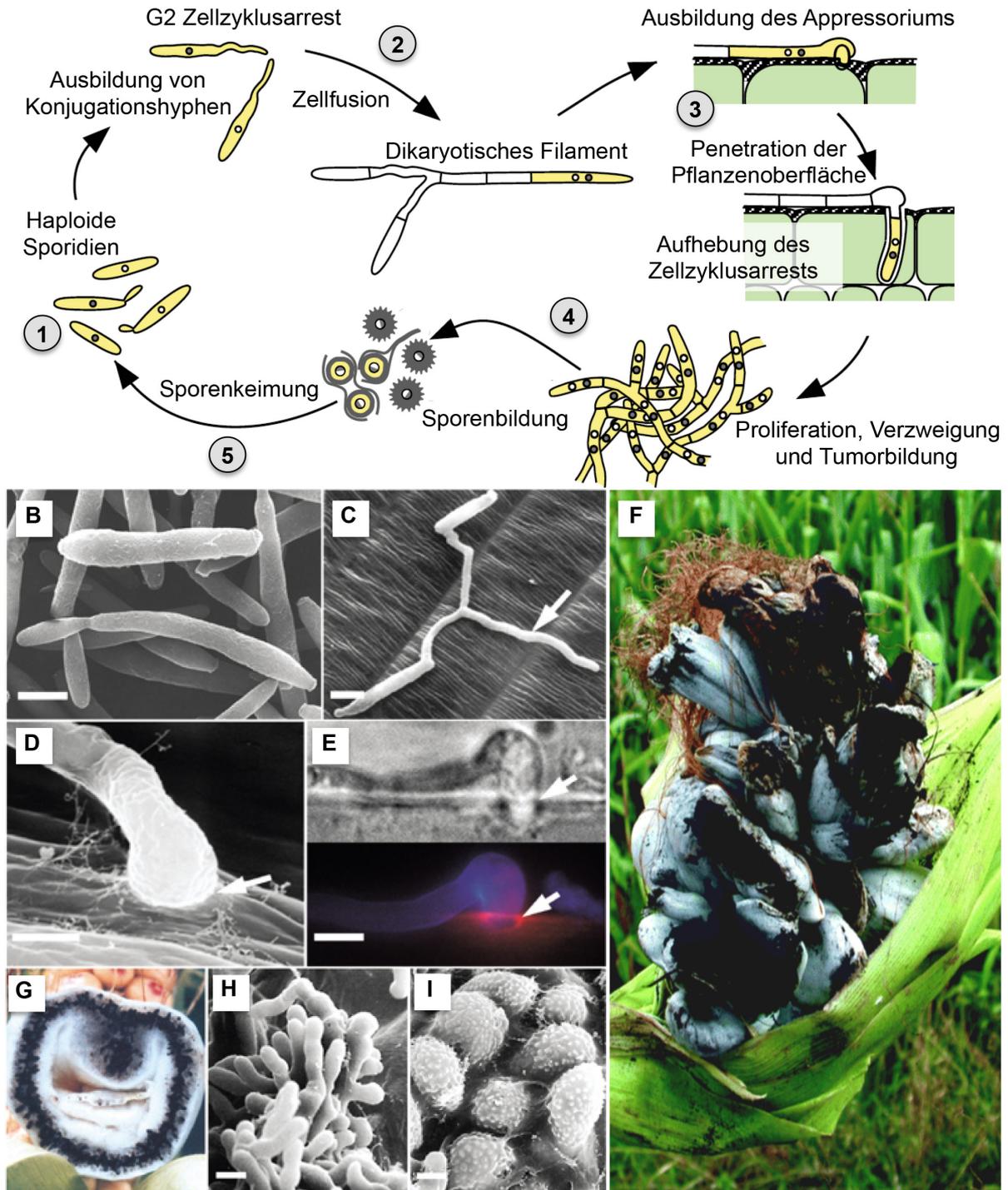
*U. maydis* durchläuft während seines dimorphen Lebenszyklus eine saprophytische und eine biotrophe Phase (Abbildung 1 A). Während der haploiden Phase außerhalb der Pflanze, kommt *U. maydis* als haploide Sporidie vor und vermehrt sich durch hefeartige Knospung. In dieser Form ist der Pilz apathogen und somit nicht in der Lage Wirtspflanzen zu infizieren. Unter geeigneten Bedingungen (auf der Pflanzenoberfläche), bei der Anwesenheit eines kompatiblen Kreuzungspartners, kommt es zur Ausbildung von Konjugationshyphen, welche nach der Zell-Zell-Fusion das Heterodikaryon bilden (Snetselaar und Mims, 1992; Snetselaar und Mims, 1993). In dieser diploiden Form ist *U. maydis* pathogen und kann die Pflanzenoberfläche penetrieren und damit die Pflanze infizieren. Die Pheromon vermittelte Zell-Zell-Erkennung und die Fusion der haploiden Sporidien stehen unter der Kontrolle des biallelischen *a*-Paarungstyp-Locus (siehe auch 1.3.1) (Kahmann *et al.*, 2000).

Durch die Perzeption des Pheromon-Signals eines kompatiblen Kreuzungspartners wird der Zellzyklus im G2-Stadium arretiert (Garcia-Muse *et al.*, 2003; Sgarlata und Perez-Martin, 2005). Dieser Zellzyklusarrest wird auch nach der Fusion kompatibler Sporidien aufrecht erhalten, was dazu führt, dass nur ein apikales Längenwachstum der Hyphe, aber keine Zellteilung stattfindet. Während dieses Spitzenwachstums werden Septen gebildet, welche zu einer Kompartimentierung führen. Bei dieser ressourcensparenden Art des Wachstums ist ausschließlich das apikale Kompartiment mit Zytoplasma gefüllt (Banuett und Herskowitz, 1994). In dieser Form ist *U. maydis* imstande, durch die Bildung von Infektionsstrukturen die Pflanzenoberfläche zu penetrieren und in die Pflanze eindringen. Bei den genannten Strukturen handelt es sich um Appressorien. Für diese wird postuliert, dass sie in *U. maydis* hauptsächlich der Änderung der Wuchsrichtung dienen (Schirawski *et al.*, 2005a). Gleichzeitig markieren sie die Stelle, an der die Penetration durch die Sekretion von lytischen Enzymen vereinfacht wird (Kahmann *et al.*, 2000). Bei anderen phytopathogenen Pilzen sind die Zellwände der Appressorien oft stark melanisiert. Dadurch kann ein sehr hoher Druck in den Appressorien aufgebaut werden, welcher dann direkt gegen die Pflanzenoberfläche gerichtet wird. Dies führt zu einem mechanischen Eindringen in die Pflanze (Bechinger *et al.*, 1999; Snetselaar und Mims, 1992; Snetselaar und Mims, 1993; Staples, 1985).

Nach der Penetration kommt es zur Aufhebung des G2-Zellzyklusarrestes und damit zur interzellularen Proliferation, welche den Beginn der biotrophen Phase des Lebenszyklus markiert. Dabei bleibt das pflanzliche Gewebe im Ganzen und auch die Plasmamembranen der einzelnen Pflanzenzellen erhalten. Das Umschalten zum filamentösen Wachstum nach der Zellfusion und die darauf folgende pathogene Entwicklung stehen unter der Kontrolle des multiallelischen *b*-Paarungstyp-Locus (siehe auch 1.3.2)(Kahmann *et al.*, 2000). Die Zellkernverteilung innerhalb der Pflanze und der damit verbundene Erhalt des dikaryotischen Filaments erfolgt durch die für Basidiomyceten typische Schnallenbildung (Banuett und

Herskowitz, 1996; Scherer *et al.*, 2006). Bereits kurz nach der Infektion ist zu erkennen, dass *U. maydis* vermehrt im Bereich der pflanzlichen Leitbündel proliferiert. Dort sind am meisten Nährstoffe vorhanden und dort kommt es auch zum Nährstoffaustausch zwischen Pilz und Pflanze. Um diesen zu gewährleisten durchdringt der Pilz die Zellwand der Pflanzenzelle und wird anschließend von deren Plasmamembran umgeben. In dem entstandenen Bereich zwischen pilzlicher Zellwand und pflanzlicher Plasmamembran etabliert sich eine biotrophe Interaktionszone.

Mit fortschreitender Infektionsdauer kommt es zu einer erhöhten Proliferationsrate des pilzlichen Myzels, was zur Entstehung von Tumoren führt. Innerhalb dieser Tumore werden durch Karyogamie diploide Teliosporen gebildet. Nachdem ein Tumor aufgeplatzt ist, werden die Sporen durch Wind, Regen und Insekten verbreitet. Telio- oder Brandsporen können lange Zeit im Boden überdauern und bei geeigneten Bedingungen auskeimen. Bei der Keimung durchläuft der diploide Kern der Teliosporen eine Meiose, welche zu vier haploiden Kernen führt. Diese wandern anschließend in die Probasidie ein. Um den Lebenszyklus abzuschließen, werden die haploiden Sporidien von der septierten Probasidie durch sukzessive Sprossung abgeschnürt (Christensen, 1963).



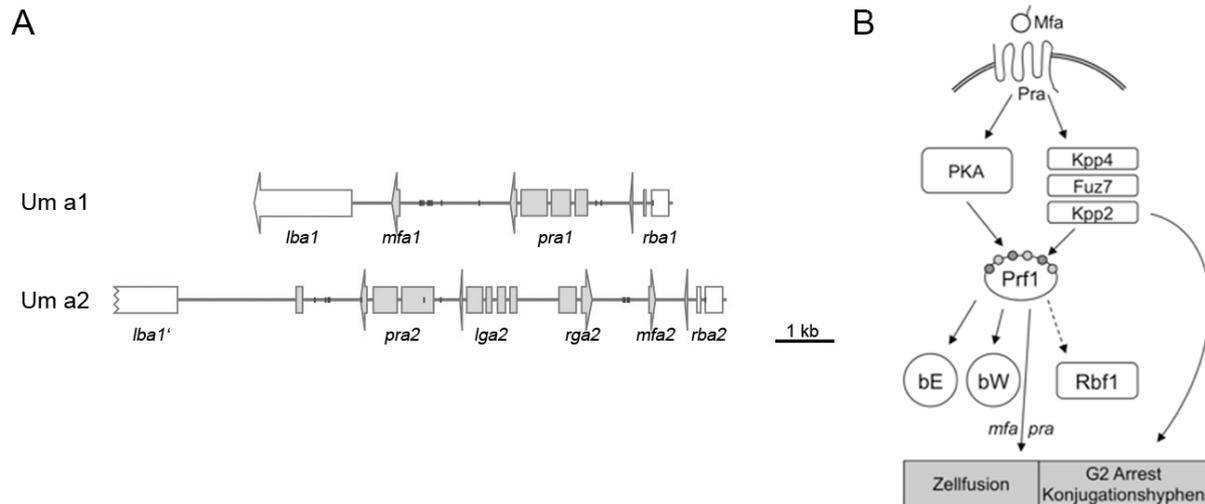
**Abbildung 1: Der Lebenszyklus von *U. maydis*.** (A) Schematische Darstellung der Entwicklungsstadien. 1: haploide Sporidien, Wachstum durch Knospung, 2: Zellfusion zweier kompatibler Sporidien zu einem filamentösen Heterodikaryon, 3: Penetration der Pflanzenoberfläche mithilfe eines Appressoriums und anschließende Aufhebung des G2-Zellzyklusarrests, 4: Proliferation des Pilzmycels *in planta* und Teliosporenbildung in Tumoren, 5: Freisetzung der Teliosporen mit anschließender Keimung zu haploiden Sporidien. (B) elektronenmikroskopische Aufnahme haploider Sporidien. (C) elektronenmikroskopische Aufnahme der Zellfusion auf der pflanzlichen Epidermis, Pfeil markiert das heterodikaryotische Filament. (D) elektronenmikroskopische Aufnahme des Appressoriums, Pfeil markiert den Eintrittspunkt. (E) oben: lichtmikroskopische Aufnahme des Appressoriums, unten: fluoreszenzmikroskopische Aufnahme des Appressoriums, Pilzzellwand mit Calcofluor gefärbt (blau), endocytotische Vesikel mit FM4-64 angefärbt (rot), Pfeile markieren den Eintrittspunkt. (F) Tumor an einem Maiskolben. (G) Querschnitt durch einen Tumor mit schwarzen Teliosporen. (H) elektronenmikroskopische Aufnahme sporulierender Hyphen. (I) elektronenmikroskopische Aufnahme von Teliosporen. Maßstabsbalken entsprechen 5 µm (Abbildung modifiziert nach Kämper *et al.*, 2006)

### 1.3 Kontrolle der Entwicklung durch die Paarungstyp-Loci

Die sexuelle und pathogene Entwicklung ist in Brandpilzen eng miteinander verbunden (Bakkeren *et al.*, 2008). Um die genetische Diversität zu erhalten wird die Bildung eines infektiösen Dikaryons durch die Paarungstyp-Loci kontrolliert. Bei Basidiomyceten sind diese meist durch die *A*- und *B*-Loci repräsentiert und kodieren typischerweise für ein Pheromon/Pheromonrezeptor-basiertes Zell/Zell-Erkennungssystem sowie für Homeodomänen-Transkriptionsfaktoren. In *U. maydis* kodiert der biallelische *a*-Locus für ein Pheromon/Pheromon-Rezeptorsystem, welches die Zell/Zell-Erkennung und die anschließende Zellfusion steuert. Die folgende sexuelle und pathogene Entwicklung steht unter der Kontrolle des multiallelischen *b*-Locus, welcher für die Homeodomänenproteine *bEast* (*bE*) und *bWest* (*bW*) kodiert. Die Expression kompatibler *bE/bW*-Allele ist unabdingbar für die pathogene Entwicklung von *U. maydis* (Bölker *et al.*, 1992; Gillissen *et al.*, 1992; Morrow und Fraser, 2009; Schulz *et al.*, 1990).

#### 1.3.1 Der *a*-Locus

Die Zell-Zell-Erkennung und die darauf folgende Fusion der Konjugationshyphen werden vom biallelischen *a*-Locus gesteuert, welcher für das Pheromon *Mfa* (mating factor a) und den Pheromonrezeptor *Pra* (pheromone receptor a) kodiert (siehe Abb.1A). Das Pheromon-Vorläuferpeptid *Mfa1* besteht aus 40 Aminosäuren und das *Mfa2*-Peptid aus 38 Aminosäuren, welche posttranslational modifiziert werden. Die prozessierten Proteine bestehen aus dreizehn bzw. neun Aminosäuren langen Lipopeptid-Pheromonen, die am Carboxy-Terminus farnesyliert und methyliert sind (Spellig *et al.*, 1994). Die Zell-Zell-Erkennung erfolgt durch die Perzeption des Pheromons des einen Kreuzungstyps ausschließlich durch den Pheromonrezeptor des anderen Kreuzungstyps (Bölker *et al.*, 1992).



**Abbildung 2: (A) Schematische Darstellung der Gene der a-Loci.** Der *a1*-Locus (Um *a1*) kodiert für das Pheromon-Vorläuferprotein Mfa1 sowie für den Pheromonrezeptor Pra1. Der *a2*-Locus (Um *a2*) beinhaltet neben den entsprechenden Genen *mfa2* und *pra2* die beiden zusätzlichen Gene *lga2* und *rga2* (Abbildung modifiziert nach Schirawski *et al.*, 2005b). **(B) Durch Pheromonstimulation eingeleitete Signaltransduktionskaskaden.** Sowohl die MAP-Kinase-Kaskade als auch die cAMP-abhängige Kaskade führen zur Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors Prf1. Dieser bindet an PRE, welche Promotorelemente in der DNA darstellen und induziert somit die weitere pathogene Entwicklung. (Abbildung aus Kaffarnik *et al.*, 2003)

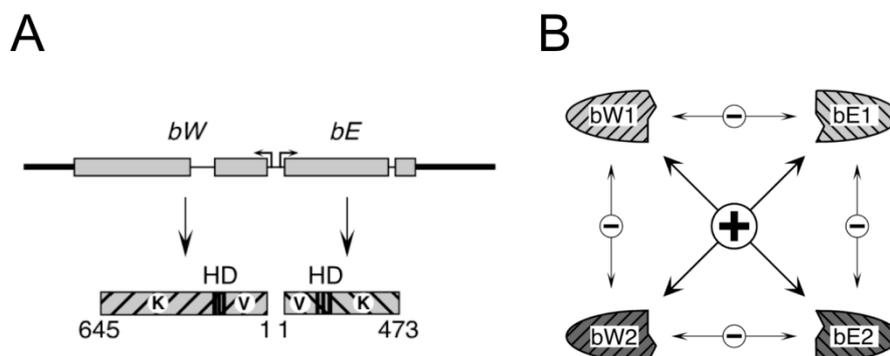
Die Pheromonrezeptoren Pra1 und Pra2 sind 357- bzw. 420 Aminosäuren lang und gehören zur Familie der Ste3p-ähnlichen Pheromonrezeptoren, welche sieben Transmembrandomänen besitzen und in der Regel mit heterotrimeren G-Proteinen gekoppelt sind (Bölker *et al.*, 1992). Der *a2*-Locus beinhaltet zusätzlich die Gene *lga2* und *rga2*, welche für mitochondrial lokalisierte Proteine kodieren (Mahlert *et al.*, 2009; Urban *et al.*, 1996a) (siehe Abb.1A). Es wird vermutet, dass Lga2 die mitochondriale Fusion inhibiert, wobei die Aktivität von Lga2 durch das Protein Mrb1 kontrolliert wird (Bortfeld *et al.*, 2004).  $\Delta mrb1$  Stämme sind bei der Anwesenheit von *lga2* und *rga2* apathogen, wobei die zusätzliche Deletion von *lga2* zur vollständigen und die Deletion von *rga2* zur teilweisen Wiederherstellung der Pathogenität führt. Es wurde gezeigt, dass diese Gene in die uniparentalen Vererbung der mitochondrialen DNA während der sexuellen Entwicklung von *U. maydis* involviert sind (Fedler *et al.*, 2009).

Durch die Bindung des Pheromons an den passenden Rezeptor des Fusionspartners kommt es zur Ausbildung der Konjugationshyphen und folglich zur Zellfusion der kompatiblen haploiden Sporidien. Auf molekularer Ebene löst die Bindung des Pheromons an den Rezeptor zwei Signalkaskaden aus. Zum einen führt die Pheromon-Rezeptorbindung zur Induktion der cAMP- und zum andern zur Induktion einer MAPK-Kaskade (Mitogen-aktivierter Proteinkinase-Kaskade). Beide Wege führen zur Phosphorylierung und damit zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors Prf1, welcher den übergeordneten Regulator für die weitere Entwicklung darstellt. Die Phosphorylierung erfolgt durch zwei verschiedene Kinasen, die Proteinkinase A, bei cAMP vermittelter Aktivierung, und die MAP-Kinase Kpp2. *In vitro*

Analysen zeigten eine differentielle Phosphorylierung spezifischer Serin- oder Threoninreste an Prf1 durch diese beiden Wege (Kaffarnik *et al.*, 2003). Die Induzierung von *prf1* auf transkriptioneller Ebene führt zu einer zusätzlichen Signalverstärkung durch die Kinase Kpp2. Aktiviertes Prf1 ist in der Lage an Pheromone Response Elements (PREs) zu binden. Dies führt zu einer differentiellen Expression von Genen, die unter der Kontrolle eines PREs stehen. Zu den Zielgenen von Prf1 zählen *prf1* selbst, die *a*-Locus Gene sowie *rbf1*, das für einen C2H2-Zinkfinger Transkriptionsfaktor kodiert (Zarnack *et al.*, 2008). Die Prf1 aktivierten Gene beinhalten auch die für die weitere pathogene Entwicklung essentiellen Homeodomänen-Proteine *bE* und *bW* (Urban *et al.*, 1996b).

### 1.3.2 Der *b*-Locus

Nach der *a*-abhängigen Fusion der Sporidien zu einem Dikaryon erfordert die weitere Entwicklung kompatible *b*-Loci (Bölker *et al.*, 1995a). Dabei gilt der *b*-Locus als zentraler Schalter für den Übergang von der saprophytischen in die biotrophe Lebensphase, in welcher der Pilz abhängig vom lebenden Gewebe der Wirtspflanze ist. Alle wichtigen Faktoren, welche die Pathogenität von *U. maydis* und die damit einhergehende Kolonisierung der Pflanze betreffen, stehen unter der Kontrolle des *b*-Locus (Gillissen *et al.*, 1992; Kämper *et al.*, 1995). Anders als beim *a*-Locus liegt der *b*-Locus in der Natur in mindestens 19 verschiedenen Allelen vor (J. Kämper, pers. Mitteilung) und enthält die zwei Gene *bEast* (*bE*) und *bWest* (*bW*). Beide Gene liegen ungefähr 200 bp voneinander entfernt und werden von einem einzelnen gemeinsamen Promotor divergent transkribiert (Abbildung 3 A). *bE* und *bW* sind Homeodomänen-Proteine mit 473 bzw. 645 Aminosäuren und weisen keine Sequenzhomologien zueinander auf.



**Abbildung 3: Der *b*-Locus in *U. maydis*.** (A) Schematische Darstellung der genomischen Struktur des *b*-Locus und der *bW*- und *bE*-Proteine. Beide Gene werden gegenläufig zueinander von einem Promotor transkribiert. Daraus ergeben sich die beiden Proteine *bW* und *bE*. K bezeichnet die konstanten, V die variablen Bereiche der Proteine. (B) Allelspezifische Dimerisierung der *b*-Proteine. Die Homeodomänen-Proteine können nur dimerisieren, wenn sie von verschiedenen Allelen stammen (Abbildung aus Brachmann *et al.*, 2001).

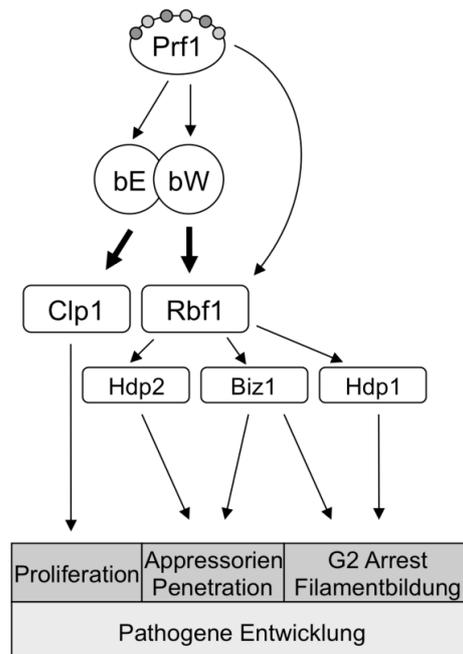
Trotzdem besitzen beide Proteine deutliche Gemeinsamkeiten in ihrem strukturellen Aufbau. Betrachtet man die Proteinsequenz etwas genauer, so zeigt sich ein mit 90% stark konservierter C-terminaler Bereich sowohl bei bE als auch bei bW. Die N-terminalen Bereiche der b-Proteine sind hoch variabel und weisen nur sehr geringe Sequenzhomologien zueinander auf (Gillissen *et al.*, 1992; Kronstad und Leong, 1990; Schulz *et al.*, 1990). Diese Bereiche sind essentiell für die Interaktion von bE und bW (Kämper *et al.*, 1995). Kommt es durch die Interaktion kompatibler b-Proteine zur Bildung eines funktionellen bE/bW-Heterodimers, so ist dieses in der Lage sequenzspezifisch DNA an sog. b-Bindestellen (bbs) zu binden und die Expression von Zielgenen zu induzieren (Brachmann *et al.*, 2001; Heimel *et al.*, 2010b; Romeis *et al.*, 2000). Die Expression des b-Heterodimers ist notwendig und ausreichend für den Wechsel vom saprophytischen, vegetativen Wachstum zum filamentösen Wachstum und der damit einhergehenden Arretierung des Zellzyklus im G2-Stadium (Brachmann *et al.*, 2001; Heimel *et al.*, 2010b). Es wurde bereits von haploiden Stämmen mit kompatiblen *b*-Genen berichtet (1.1). Diese können auch ohne die Fusion mit einem kompatiblen Kreuzungspartner in die Wirtspflanze eindringen und dort ihre pathogene Entwicklung und damit auch den Lebenszyklus abschließen (Bölker *et al.*, 1995a; Kämper *et al.*, 2006).

Das b-Heterodimer reguliert eine große Anzahl von Genen und ist der „Masterregulator“ der pathogenen Entwicklung von *U. maydis*. Durch Microarray-Studien konnten insgesamt 345 *b*-regulierte Gene identifiziert werden (Heimel *et al.*, 2010b).

Nur wenige dieser 345 *b*-abhängigen Gene werden direkt durch das b-Heterodimer reguliert. Eines dieser Gene ist *rbf1* (regulator of *b*-dependent filamentation 1), welches für einen C2H2-Zinkfinger Transkriptionsfaktor kodiert. Rbf1 reguliert ungefähr 90% der *b*-abhängigen Gene und ist essentiell für die Pathogenität (Heimel *et al.*, 2010b). Die Überexpression von *rbf1* induziert den G2-Zellzyklusarrest und das filamentöse Wachstum ohne ein funktionelles b-Heterodimer, was es zum zentralen Regulator der *b*-Regulationskaskade macht. *rbf1* kann auch *a*-abhängig induziert werden, was auf eine komplexe Regulierung der pathogenen Entwicklung hinweist, wodurch z.B. eine schnelle und spezifische Anpassung an verschiedene Umweltbedingungen ermöglicht wird. Eines der Rbf1 induzierten Gene ist *biz1* (*b*-induced zinc finger protein), welches für einen weiteren C2H2-Zinkfinger Transkriptionsfaktor kodiert. Biz1 reprimiert die Expression des mitochondrialen Zyklins Clb1, was einen G2-Zellzyklusarrest, die Appressorienbildung und die Expression einer Vielzahl von sezernierten Proteinen zur Folge hat. Die Deletion von *biz1* führt bei *U. maydis* zum Verlust der Pathogenität (Flor-Parra *et al.*, 2006). Zwei weitere Rbf1-regulierte Gene sind *hdp1* und *hdp2* (homeodomain protein), welche beide für Homeodomänen-Proteine kodieren. Dies weist erneut auf eine regulatorische Funktion durch DNA-Bindung hin. Hdp1 wirkt ähnlich wie Biz1 auf die Regulation des G2-Zellzyklusarrests, wohingegen die Deletion

von *hdp2* zu einem Pathogenitätsverlust führt, welcher durch fehlende Appressorienbildung zu erklären ist (Goos, 2007).

*clp1* (*clampless 1*) kodiert für einen weiteren wichtigen Regulator und ist neben *rbf1* das einzige direkt durch das b-Heterodimer regulierte Gen, welches für die pathogene Entwicklung von *U. maydis* notwendig ist. *clp1* vermittelt die Proliferation innerhalb der Pflanze (Heimel *et al.*, 2010a; Heimel *et al.*, 2010b; Scherer *et al.*, 2006).

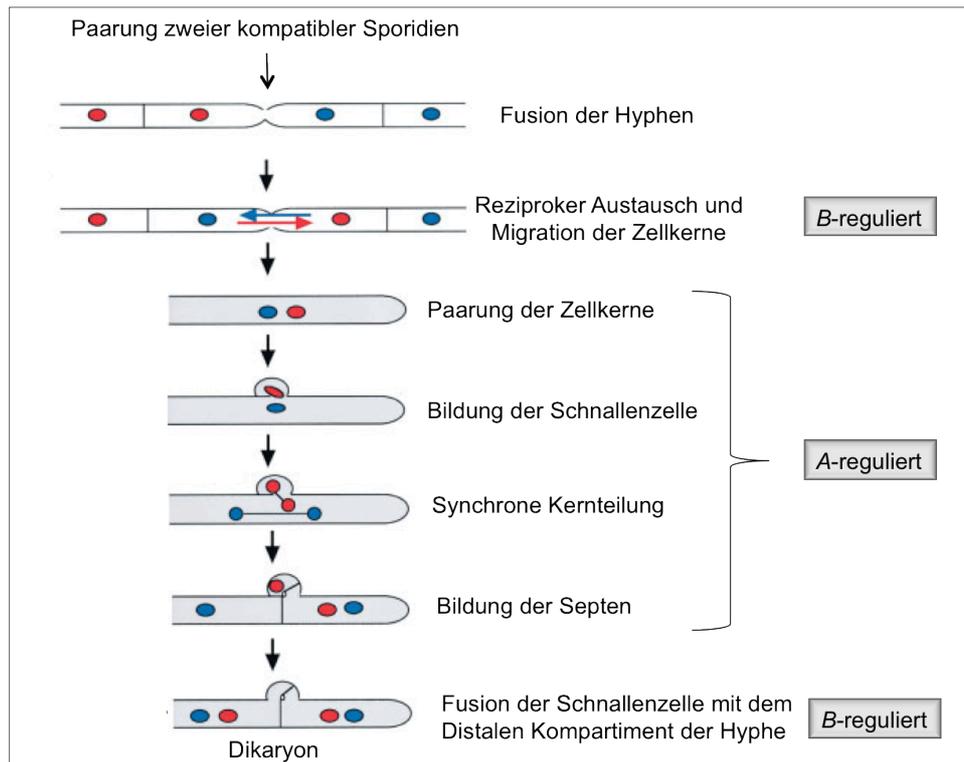


**Abbildung 4: Schematische Darstellung der regulatorischen Hauptkomponenten in der b-vermittelten Regulationskaskade.** Das b-Heterodimer ist nach der Zellfusion der Schlüsselfaktor für die weitere sexuelle, pathogene Entwicklung. Clp1 und Rbf1 sind beide direkt b induziert. Dabei ist Clp1 für die *in planta* Proliferation verantwortlich. Rbf1 hingegen spielt die Rolle des zentralen transkriptionellen Regulators, welcher über die Transkriptionsfaktoren Biz1, Hdp1 und Hdp2 den Zellzyklusarrest und die Appressorienbildung steuert. (Abb. Nach Heimel *et al.*, 2010b).

#### 1.4 Schnallenbildung zur korrekten Kernverteilung

Schnallenzellen vermitteln bei vielen Basidiomyceten die korrekte Kernverteilung während des dikaryotischen Wachstums. Dabei wird die Bildung der Schnalle von beiden Paarungstyp-Loci beeinflusst. Bei *Coprinopsis cinerea* kodiert der A-Locus für Transkriptionsfaktoren welche, wie die b-Proteine aus *U. maydis*, Homeodomänen-Motive beinhalten (Gillissen *et al.*, 1992). Der B-Locus von *C. cinerea* kodiert hingegen für verschiedene Pheromone und entsprechende Rezeptoren (zusammengefasst in Casselton, 2002; Casselton und Olesnicky, 1998). Der komplexe Prozess der Schnallenbildung ist abhängig von beiden Paarungstyp-Loci. Der Beginn der Schnallenbildung, sowie die Schnallen-assoziierte mitotische Teilung der beiden Zellkerne wird vom A-Locus kontrolliert,

während die Fusion der Schnallenzelle mit der Hyphe und somit der reziproke Austausch der beiden Zellkerne, welcher Voraussetzung für ein stabiles Dikaryon ist, durch den B-Locus kontrolliert wird. Zunächst teilen sich beide Zellkerne, einer parallel zur Wuchsrichtung und der andere seitlich in den Vorläufer der Schnallenzelle am Ort des späteren Septums. Bei der folgenden Septierung entsteht ein apikal gelegenes Heterodikaryon. Anschließend fusioniert die Schnallenzelle mit dem subapikal gelegenen Kompartiment und das zweite heterodikaryotische Kompartiment wird gebildet (Abbildung 5).



**Abbildung 5: Schematische Darstellung der Schnallenbildung in *C. cinerea*.** Nach der Paarung zweier Sporidien mit kompatiblen Allelen, sowohl des A- als auch des B-Locus, kommt es zur Zellfusion und dem reziproken Austausch der Zellkerne. Dies führt zur Bildung des Dikaryons mit den typischen Schnallenstrukturen (Abbildung modifiziert nach Kamada, 2002).

Die Schnallenbildung in *U. maydis* erfolgt vergleichbar zu *C. cinerea*, wobei die Fusion der Schnallenzelle mit dem subapikalen Kompartiment bisher noch nicht eindeutig gezeigt werden konnte. Somit sind mechanistische Abweichungen nicht auszuschließen. Es gibt jedoch nachweislich einen Unterschied zwischen den beiden Systemen, so kann bei *U. maydis* in dem haploiden, solopathogenen Stamm CL13 (*a1 bE1/bW2*) die Schnallenbildung auch ohne ein aktives Pheromon-Rezeptor System vonstatten gehen (Scherer *et al.*, 2006), was bei *C. cinerea* nicht möglich ist.

*clp1* ist, wie *rbf1*, durch genomweite Expressionsanalysen identifiziert worden und kodiert für ein 444 Aminosäuren langes Protein. Es weist im Promotorbereich zwei putative b-Bindestellen auf (Heimel *et al.*, 2010a; Scherer *et al.*, 2006). Die Expression von *clp1* ist sehr früh nach *b*-Induktion detektierbar und hält während der kompletten pathogenen Entwicklung

an. Clp1 wurde zuerst in *C. cinerea* entdeckt und weist eine 41%ige Homologie zum *U. maydis* Clp1 auf. In *C. cinerea* ist Clp1 notwendig und ausreichend für die Schnallenbildung (Inada *et al.*, 2001). Die Deletion von *clp1* in *U. maydis* führt zum Verlust der Pathogenität. Bei haploiden Deletionsstämmen sind keine Auffälligkeiten beim Wachstum in axenischer Kultur zu beobachten und die Kreuzungsreaktion kompatibler Stämme unterscheidet sich nicht von der entsprechenden Kontrolle (Heimel *et al.*, 2010a; Scherer *et al.*, 2006). Erst nach Penetration der Pflanzenoberfläche zeigen sich die Auswirkungen der Deletion durch die fehlende Schnallenbildung und die damit einhergehende, fehlende Hyphenproliferation.

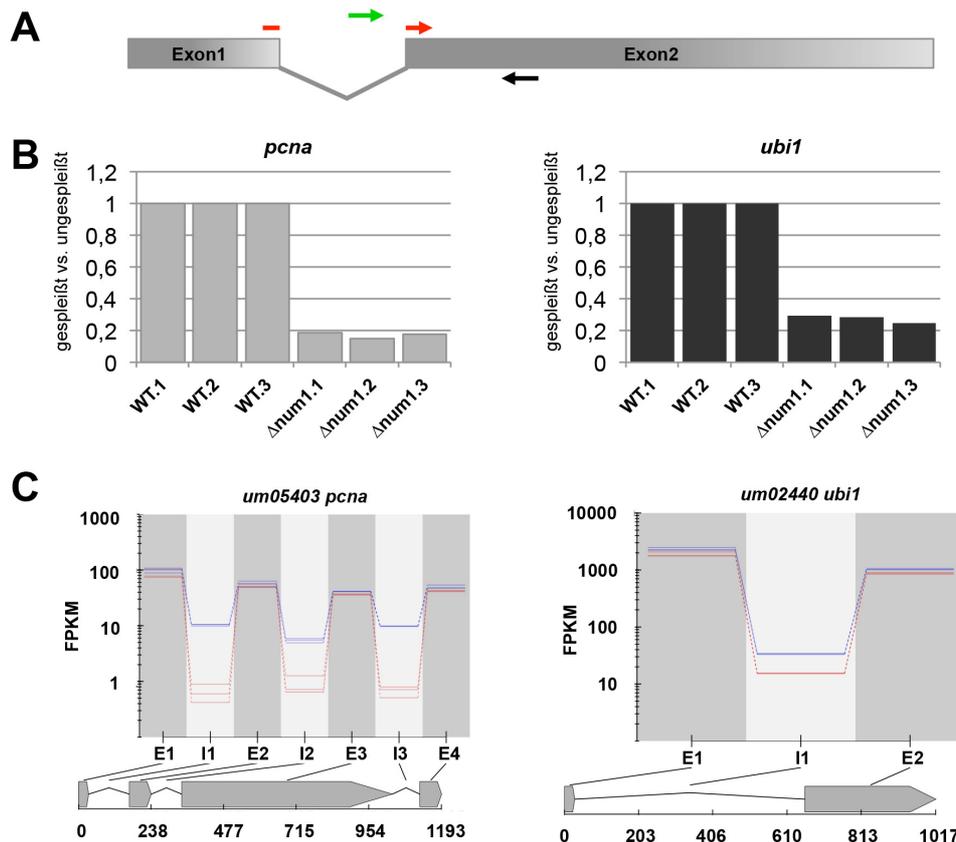
## 1.5 Das Num1 Protein

Das polare Wachstum im pilzlichen Filament und die Aufrechterhaltung des Heterodikaryons während der pathogenen Entwicklung sind komplexe Prozesse während der Entwicklung von *U. maydis*. Es wurde bereits erwähnt, dass dem Clp1 Protein eine immense Bedeutung für die *in planta* Proliferation beigemessen wird, da die Deletion des *clp1* Gens zum Verlust der Schnallenbildung führt (Heimel *et al.*, 2010a; Scherer *et al.*, 2006). Um weitere Einblicke in das Kernwanderungsverhalten und die Determination der Zellpolarität in *U. maydis* zu erlangen, wurde anhand eines Kandidatengen-Ansatzes die Funktion von Genen analysiert, die Einfluss auf diese Prozesse haben könnten. Eines dieser Gene war *num1* (*um01682*). Das Num1 („nuclear migration 1“) Protein wurde in *C. cinereus* bereits mit den erwähnten Prozessen in Verbindung gebracht.

Im Gegensatz zu *U. maydis* kommt *C. cinereus* ausschließlich als filamentöse Hyphe vor, wobei die Paarung (Mating) durch die Fusion (Anastomose) zweier kompatibler Hyphen initiiert wird. Nach der Fusion der Hyphen kommt es zur Bildung des heterodikaryotischen Filaments indem je ein Zellkern des „Donors“ in die „Akzeptor“-Hyphe einwandert (Kamada, 2002; Kües, 2000). Durch Mutageneseexperimente wurde das *num1*-Gen identifiziert, dessen Mutation zu einem Defekt während der Anastomose kompatibler haploider Stämme führte (Makino und Kamada, 2004). Um die zugrundeliegenden Mechanismen zu verstehen, wurden die mutierten Stämme mit kompatiblen Wildtyp-Stämmen gekreuzt. Dabei wurde entdeckt, dass die mutierten Stämme zwar noch in der Lage waren einen Zellkern in das „Akzeptor“-Mycel zu übergeben, sie jedoch nicht mehr im Stande waren, einen Zellkern des Partners aufzunehmen. Dieser Defekt verhinderte somit das Zustandekommen des Heterodikaryons. Es konnte gezeigt werden, dass es sich bei der Mutation um ein dominant-negatives Allel (*num1-1*) handelt, welches ein verkürztes Num1-Protein zur Folge hat.

Das Num1 Protein in *U. maydis* weist eine 40%-ige Sequenzhomologie zum *C. cinereus* Num1 auf. Es konnte bereits gezeigt werden, dass auch der Mensch ein Num1 Homolog

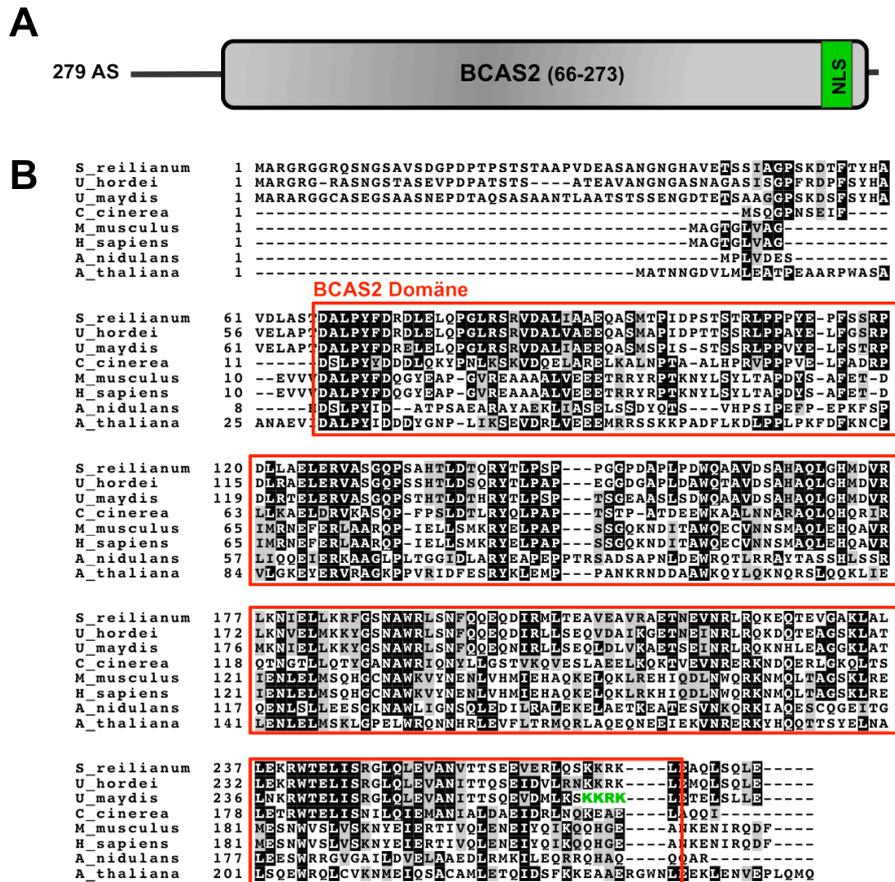
besitzt. Dabei handelt es sich um das hSPF27/hBCAS2 Protein (Breast Cancer Amplified Sequences 2). Das dazugehörige Gen zeigt in verschiedenen humanen Brustkrebszelllinien eine erhöhte Expression und wird deshalb als Brustkrebsmarker verwendet (Nagasaki *et al.*, 1999). Zum Anderen wird hSPF27/hBCAS2 als transkriptioneller Co-Regulator des Östrogenrezeptors und als negativer Regulator des p53 Tumorrepressors diskutiert (Kuo *et al.*, 2009; Qi *et al.*, 2005). Weitere Analysen identifizierten hSPF27 als Kernkomponente des Prp19/CDC5L Multiproteinkomplexes (NTC), welcher mit dem Spleißosom assoziiert ist. Dieser Komplex ist essentiell für den korrekten Ablauf des Spleiß-Prozesses, indem er den Auf- und Abbau des Spleißosoms aktiv unterstützt (Neubauer *et al.*, 1998). Aus *Homo sapiens* ist bereits bekannt, dass das hSPF27/hBCAS2 Protein hauptsächlich im Zellkern lokalisiert ist (Maass *et al.*, 2002). Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen mit einem Num1:3eGFP-Fusionsprotein ergaben auch in *U. maydis* eine starke Zellkernlokalisierung. Zusätzlich konnten jedoch auch kleine Foci im Zytoplasma beobachtet werden (Abbildung 8 C).



**Abbildung 6: Experimente zur Verringerung der Spleiß-Effizienz von verschiedenen Genen durch die *num1* Deletion.** (A) Schematische Darstellung der Primer Wahl für qPCRs, grüner Vorwärts-Primer bindet im Intron und funktioniert nur bei ungespleißtem Transkript, roter Vorwärts-Primer bindet im Übergang von Exon1+2 und funktioniert nur bei gespleißtem Transkript, schwarzer Rückwärts-Primer funktioniert in Kombination mit beiden Vorwärtsprimer (B) qPCR Ergebnisse. Verhältnis gespleißt gegen ungespleißt von *pcna* (proliferating cell nuclear antigen) und *ubi1* (ubiquitin gene 1) in 3 biologischen Replikaten von WT und Δ*num1*. (C) mRNA Seq. Ergebnisse. Intronretention bei den beiden mRNAs in 3 biologischen Replikaten von WT(rot) und Δ*num1*(blau). I=Intron, E=Exon.

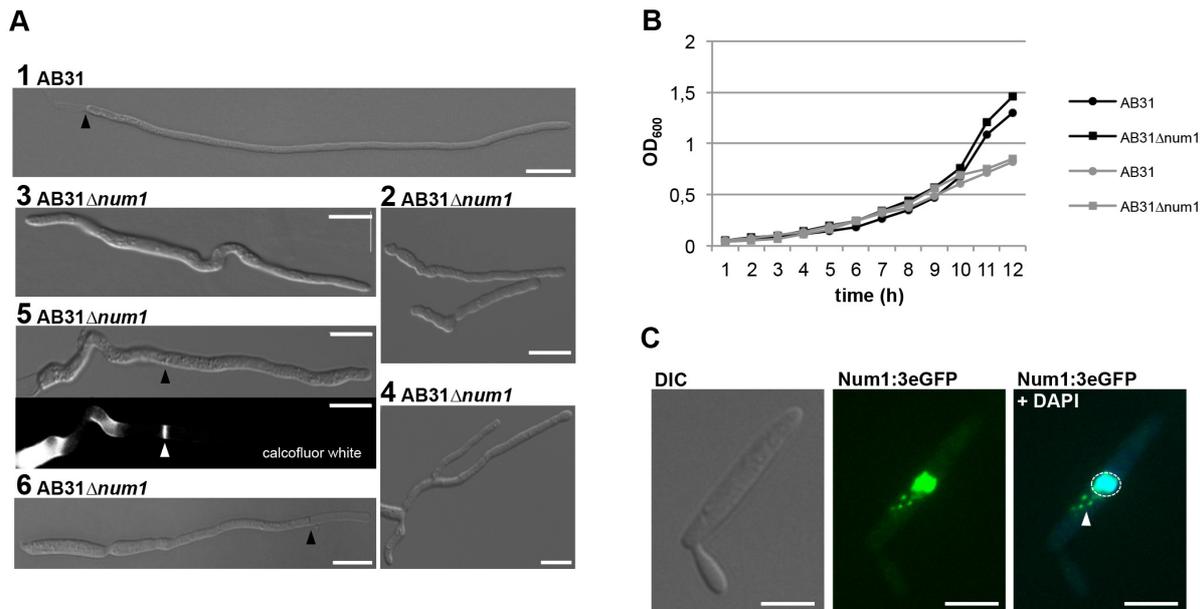
Auch das *U. maydis* Num1-Protein besitzt eine große Bedeutung für den Spleiß-Prozess. Es interagiert nachweislich mit zwei, aus anderen Organismen, als NTC Kernkomponenten bekannten Proteinen (siehe 1.6). Des Weiteren konnte mittels quantitativer Real-Time PCR (qRT-PCR) gezeigt werden, dass Num1 für die Spleißeffizienz einzelner konstitutiv exprimierter Gene von enormer Wichtigkeit ist (Abbildung 6 A und B). Ein anschließendes RNA-Sequenzierungsexperiment mit einem WT und einem  $\Delta num1$  Stamm ergab, dass in Abwesenheit von Num1 die Spleiß-Effizienz global abnimmt. Num1 ist essentiell für die Aufrechterhaltung der nativen Intron-Retentionsraten. Verschiedene Introns sind dabei unterschiedlich stark von der *num1* Deletion beeinflusst (Abbildung 6 C). Es ist bisher nicht bekannt welcher Effekt oder welche Erkennungssequenzen zu diesen Unterschieden führen (Kellner, 2012; Kellner *et al.*, 2014).

Ein Sequenzabgleich der Aminosäure-Sequenz des Num1 Protein aus *U. maydis* mit den Homologen aus *S. reilianum* (Sr12752), *U. hordei* (UHOR\_02497), *C. cinerea* (Num1), *A. nidulans* (AN4244), *A. thaliana* (AT3G18165.1), Maus (BAB31409) und Mensch (BCAS2/SPF27) ergab, dass die Varianten von *U. maydis* und seinen engsten Verwandten (*S. reilianum* und *U. hordei*) eine zusätzliche N-terminale Domäne besitzen, welche in keinem anderen Organismus zu finden ist (Abbildung 7 B). Kürzlich konnte bereits gezeigt werden, dass es einer, um diese 65-AS verkürzten Num1 Version nicht möglich ist, den Deletionsphänotyp in *U. maydis* zu komplementieren (Kellner, 2012). Im gleichen Kontext ist zu erwähnen, dass die Expression des humanen SPF27/BCAS2 in *U. maydis* nur zu einer partiellen Komplementation der *num1* Deletion führt (Kellner, 2012).



**Abbildung 7: Bioinformatische Analyse des Num1-Proteins. (A)** Prognostizierte Domänenarchitektur des Num1-Proteins, das insgesamt aus 279 Aminosäuren (AS) besteht. Hervorgehoben sind die BCAS2-Domäne (AS 66-273), sowie eine klassische, basische Zellkern-Lokalisierungs-Sequenz (NLS) am C-Terminus. Der 65 AS umfassende N-Terminus des Num1-Proteins ist spezifisch für *U. maydis* und enge Verwandte. **(B)** Sequenzabgleich von Num1 mit SPF27-homologen Proteinen. Die Software ClustalW wurde verwendet, um Num1-ähnliche Proteine aus *S. reilianum* (Sr12752), *U. hordei* (UHOR\_02497), *C. cinerea* (Num1), *A. nidulans* (AN4244), *A. thaliana* (AT3G18165.1), Maus (BAB31409) und Mensch (BCAS2/SPF27) abzugleichen. Identische bzw. ähnliche Aminosäuren sind in schwarz bzw. grau hervorgehoben. Die NLS in der *U. maydis* Sequenz ist in grün dargestellt. (Kellner, 2012)

Die Deletion von *num1* führt in Stämmen mit induzierbarem filamentösem Wachstum, zur Ausbildung von kurzen verdickt und kurvig wachsenden Filamenten verglichen mit dem WT. Häufig wachsen Sporen bipolar aus und/oder bilden verzweigte Filamente (Abbildung 8 A). Es kommt häufig zur Bildung von falsch lokalisierten Septen und mehreren Zellkernen, was einen Einfluss von Num1 auf Zellteilung und Zellzyklus impliziert. Das haploide Wachstum in Flüssigkultur ist, wie auch die Hyphenbildung auf Festmedium, nicht beeinflusst. Allerdings sind keine Defekte in der Schnallenbildung *in planta* zu erkennen und die Pathogenität ist nur leicht vermindert. Diese Beobachtungen weisen auf eine gestörte Determination der Polarität hin, welche jedoch nicht zu einem Verlust der Schnallenbildung und der Kernverteilung führt. Dies wird zusätzlich durch das unveränderte Wachstum der haploiden Sporiden in axenischer Kultur unterstützt, da die Determination der Polarität während des Hefe-artigen Wachstums nur von untergeordneter Relevanz ist (Kellner, 2009; Kellner, 2012; Kellner et al., 2014).



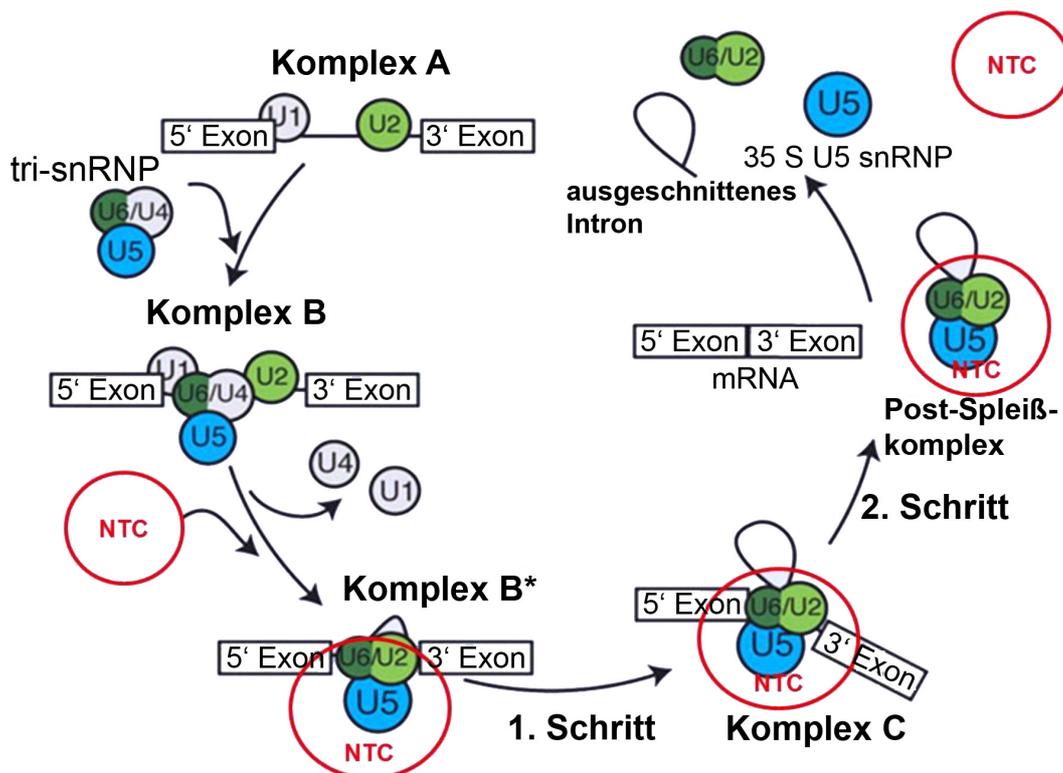
**Abbildung 8: Charakterisierung des Num1 Proteins in *U. maydis*.** (A) Lichtmikroskopische Aufnahmen von AB31 (WT) und AB31 $\Delta$ num1 Filamenten 12-14 Stunden nach der Induktion des filamentösen Wachstums; 1: WT Filament, Pfeil markiert die Hyphenspitze; 2: kurz und kurvige  $\Delta$ num1 Filamente; 3: bipolare Filamentbildung bei AB31 $\Delta$ num1; 4: verzweigtes  $\Delta$ num1 Filament; 5:  $\Delta$ num1 Filament mit falsch lokalisiertem Septum, unteres Bild zeigt, durch Calcofluor White Färbung, gefärbtes Septum, Pfeil markiert das Septum; 6: Falsch lokalisiertes Septum führt in  $\Delta$ num1 Filament zu leerem Spitzenkompartiment, Pfeil markiert das Septum; Maßstabsbalken entsprechen 10  $\mu$ m. (B) Diagramm mit zwei unabhängigen Wachstumsuntersuchungen, aufgetragen sind jeweils stündlich gemessenen OD<sub>600</sub>-Werte von AB31 (WT) und AB31 $\Delta$ num1. (C) Licht- und Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Num1:3xeGFP Lokalisierung, rechts Blaufärbung der DNA durch DAPI, Pfeil markiert kleine Foci im Zytoplasma, gestrichelter Ring markiert den Zellkern, Maßstabsbalken entsprechen 5  $\mu$ m. (Kellner *et al.*, 2014)

Weitere Untersuchungen ergaben, dass die Deletion der Zellkern-Lokalisierungssequenz (NLS siehe Abbildung 7 A und B) zum Verlust der Funktionalität und zu einer Änderung der Lokalisierung ins Zytoplasma führt (Kellner, 2012).

## 1.6 Num1 als Komponente des Spleißosom-assoziierten NineTeen-Komplexes (NTC)

Die Prozessierung von unreifer prä-mRNA zu reifer mRNA mittels Spleißen stellt einen essentiellen Vorgang bei der eukaryotischen Genexpression da. Dabei wird die frisch transkribierte prä-mRNA von ihren Introns befreit und für ihren weiteren Weg ins Zytoplasma bzw. zum Ribosom vorbereitet, wo sie letztendlich translatiert werden kann. Der Prozess des Spleißens beinhaltet zwei sequentielle trans-Esterifizierungs-Reaktionen, denen eine präzise Erkennung konservierter RNA-Sequenzen vorher geht. Während des Spleißens kommt es somit immer wieder zu Konformationsänderungen im Spleißosom, um dieses an die sich stets ändernden Anforderungen anzupassen (Wahl *et al.*, 2009; Will und Luhrmann, 2011). Die bekanntesten Hauptbestandteile des Spleißosoms sind die fünf snRNPs („small nuclear Ribonucleoprotein particles“ U1, U2, U5 und U4/U6) und weitere pre-mRNA Spleißfaktoren.

snRNPs bestehen aus snRNA (small nuclear RNA) und verschiedenen Proteinen, welche hauptsächlich als Sm-Proteine bezeichnet werden. Diese Proteine sind in jedem snRNP vorhanden und bilden einen Ring, welcher die snRNA an der „Sm site“ umschließt (He und Parker, 2000). Die Spleißosom-Assemblierung beginnt, indem die U1 und U2 snRNPs die definierten 5' und 3' Spleißregionen der Introns erkennen und binden (Abbildung 9 Komplex A). Anschließend werden die snRNPs U5 und U4/U6 rekrutiert (Abbildung 9 Komplex B), woraufhin es zu einer Konformationsänderung kommt. Dies führt zur Entlassung der snRNPs U1 und U4 und zur Rekrutierung des NineTeen Komplex (NTC). Beide Prozesse führen zum Übergang des inaktiven in den aktiven Zustand des Spleißosoms (Abbildung 9 Komplex B\* und C). Dabei wird der NTC benötigt, um die Interaktion der snRNPs U5 und U6 mit der pre-mRNA zu stabilisieren und die Interaktion von Sm-Proteinen mit dem U6 snRNA zu destabilisieren (Chen *et al.*, 2001; He und Parker, 2000). Nach seiner Rekrutierung bleibt der NTC und NTC-assoziierte Proteine während den zwei Schritten der Intronexzision und der anschließenden Auflösung des Spleißosoms von großer Bedeutung (Abbildung 9). Der Multiprotein Komplex reguliert die Konformation und Dynamik der beteiligten Spleißosomkomponenten (Gahura *et al.*, 2009; Hogg *et al.*, 2010; Villa und Guthrie, 2005).

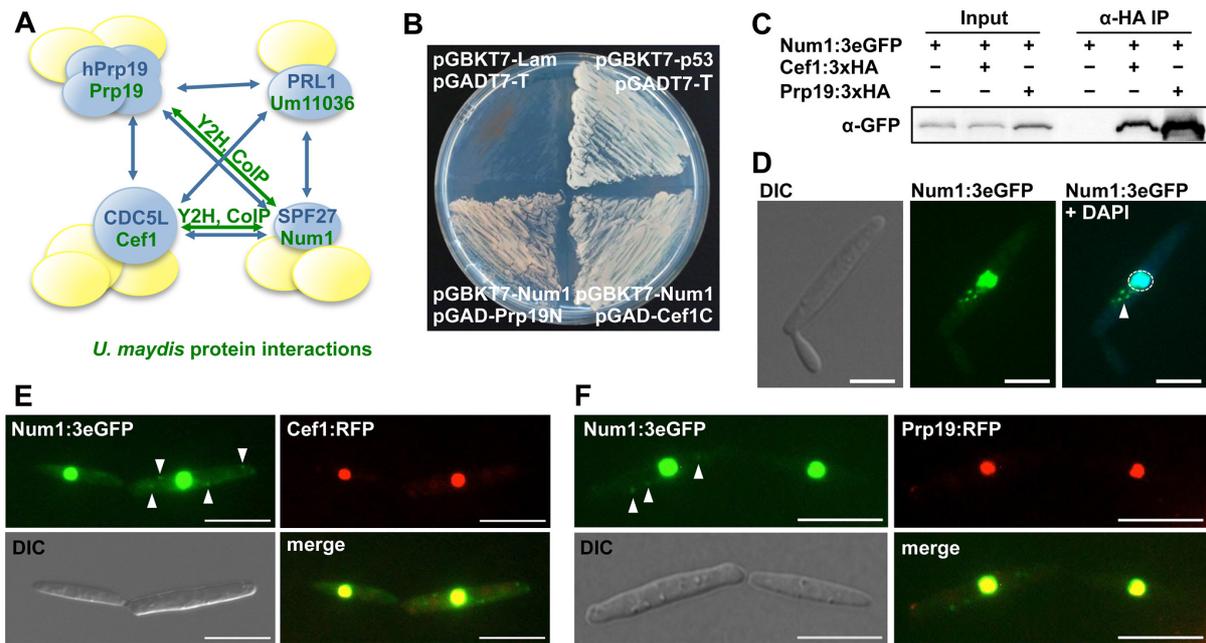


**Abbildung 9: Schematische Darstellung der mRNA Prozessierung durch das Spleißosom in *S. cerevisiae*, NineTeen Komplex (NTC) in rot. Modifiziert nach (Ohi *et al.*, 2005)**

Namensgebend für den NTC ist das Prp19p-Protein aus *S. cerevisiae*, welches als erste Komponente aus dem Komplex als essentieller Spleiß-Faktor identifiziert wurde (Cheng *et al.*, 1993; Vijayraghavan *et al.*, 1989). Eine weitere wichtige Komponente des Komplexes ist

das Cef1p Protein. Es ist wie Prp19p zwischen vielen Organismen konserviert und war bereits Gegenstand vieler Untersuchungen. Das humane Homolog trägt den Namen hCDC5. Tiefere Einblicke in die Funktion von Cef1/CDC5 wurden in *H. sapiens* (Bernstein und Coughlin, 1998b), *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans* (Ohi *et al.*, 1998), *Arabidopsis thaliana* (Hirayama und Shinozaki, 1996) und *Xenopus laevis* (Stukenberg *et al.*, 1997) erlangt. In *S. pombe* kann die temperatursensitive Letalität der *cdc5-120* Mutante mittels *cdc5*-cDNA aus *D. melanogaster*, *C. elegans* und *H. sapiens* zu überwinden werden. Cef1 ist, wie Prp19, zumindest in *S. cerevisiae* und *S. pombe* essentiell für den ersten katalytischen Schritt während des Spleißprozesses (Burns *et al.*, 1999; McDonald *et al.*, 1999). Wie bereits erwähnt, ist einer der Namen für das Num1 Homolog im Menschen hSPF27 (splicing factor 27). Dieses ist neben hCDC5 und hPRP19 eines der Kernkomponenten des NTC im Menschen und bildet bemerkenswerterweise eine Ausnahme in diesem sonst so stark konservierten Komplex. Denn im Genom von *S. cerevisiae* ist diese nicht vertreten. Es gibt lediglich ein funktionelles Äquivalent, das Snt309p-Protein, welches Num1/hSPF27 substituiert (Chen *et al.*, 1998b; Chen *et al.*, 1999; Ohi *et al.*, 2002).

Nicht nur diese beiden NTC Komponenten, sondern der komplette Komplex ist zwischen verschiedenen Spezies hoch konserviert. Dabei ist der NTC am besten in *S. pombe*, *S. cerevisiae* und *H. sapiens* untersucht. In *S. cerevisiae* wird von mindestens 26 NTC assoziierten Proteinen gesprochen, von denen neun (Prp19p, Cef1p, Snt309p, Prp46p, Syf1p, Syf2p, Syf3p/Clf1p, Isy1p and Ntc20p) für die Spleiß-Funktion des Komplexes im aktiven Spleißosom benötigt werden und somit dessen erweiterten Kern bilden (Fabrizio *et al.*, 2009). Im Menschen ist die Situation eine andere. Hier sind mindestens drei unterschiedliche Prp19-ähnliche Komplexe vorhanden. Der humane Prp19-Komplex selbst besteht aus PRP19, CDC5L, HSP73,  $\beta$ -catenin-like-1 CTNNBL1, PRL1, AD002 und SPF27 (Makarova *et al.*, 2004). Dazu kommt der Prp19-assozierte Komplex mit weiteren 14 Proteinen, welche in Hefe teilweise direkt zum Spleiß-assozierten Komplex gezählt werden. Während der Veränderung der Spleißosomkomposition bei fortschreitender prä-mRNA Prozessierung kommt es zu Veränderungen des NTC-Aufbaus. Dies erklärt die Vielzahl an beobachteten Zusammensetzungen des Komplexes und die Aufteilung in Subkomplexe beim Menschen. Weitere stringente Aufreinigung des eigentlichen Prp19-Komplexes führte in *H. sapiens* zu einem Kern von vier Proteinen. hPRP19, hCDC5L, hPRL1 und hSPF27 sind so fest miteinander verbunden, dass sie selbst nach Protease-Behandlung nicht dissoziieren (Grote *et al.*, 2010). Diese vier Komponenten bilden in allen untersuchten Organismen den Kernkomplex, an den die anderen Proteine eher lose gebunden sind. Anhand von Hefe-2-Hybrid-Experimenten konnte auch für *U. maydis* eine Interaktion von Num1 mit Prp19 und Num1 mit Cef1 gezeigt werden. Zusätzlich wurden die Interaktionen durch Co-Lokalisierung und Co-Immunoprecipitation verifiziert (Abbildung 10).



**Abbildung 10: Interaktion zwischen Num1 mit Prp19 und Cef1.** (A) Schematische Darstellung der bekannten Interaktionen in *H. sapiens* und *U. maydis*, blue Pfeile zeigen humane Interaktionen, grüne Pfeile zeigen *U. maydis* Interaktionen. (B) Interaktionen im Hefe-Zwei-Hybrid Versuch, oben links negativ-Kontrolle, oben rechts positiv-Kontrolle, unten links Interaktion von Num1 und Prp19, unten rechts Interaktion von Num1 und Cef1, Wachstum auf SD<sup>-LTHA</sup>-Platten bedeutet Interaktion. (C) Co-Immunoprecipitation zur Verifizierung von B, Pull-Down wurde einmal mit Cef1:3xHA und einmal mit Prp19:3xHA durchgeführt, Nachweis von Num1:3xeGFP nach Aufreinigung mittels anti-GFP Antikörper. (E) und (F) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Num1:3xeGFP, der Cef1:RFP, der Prp19:RFP Lokalisierung, Maßstabsbalken entsprechen 10 µm

Insgesamt lässt sich die Liste der organismenübergreifend Spleiß-assoziierten NTC Komponenten auf eine Liste von 10 Proteinen vereinfachen (Tabelle 1). Mindestens die vier Kernkomponenten Prp19, Cef1, Prl1 und Num1/SPF27 sind in den meisten untersuchten Organismen essentiell. Interessanterweise ist dies für das *U. maydis* Num1 nicht der Fall.

**Tabelle 1: NTC-Komponenten aus *S. cerevisiae* und homologe Proteine in *H. sapien* und *U. maydis***

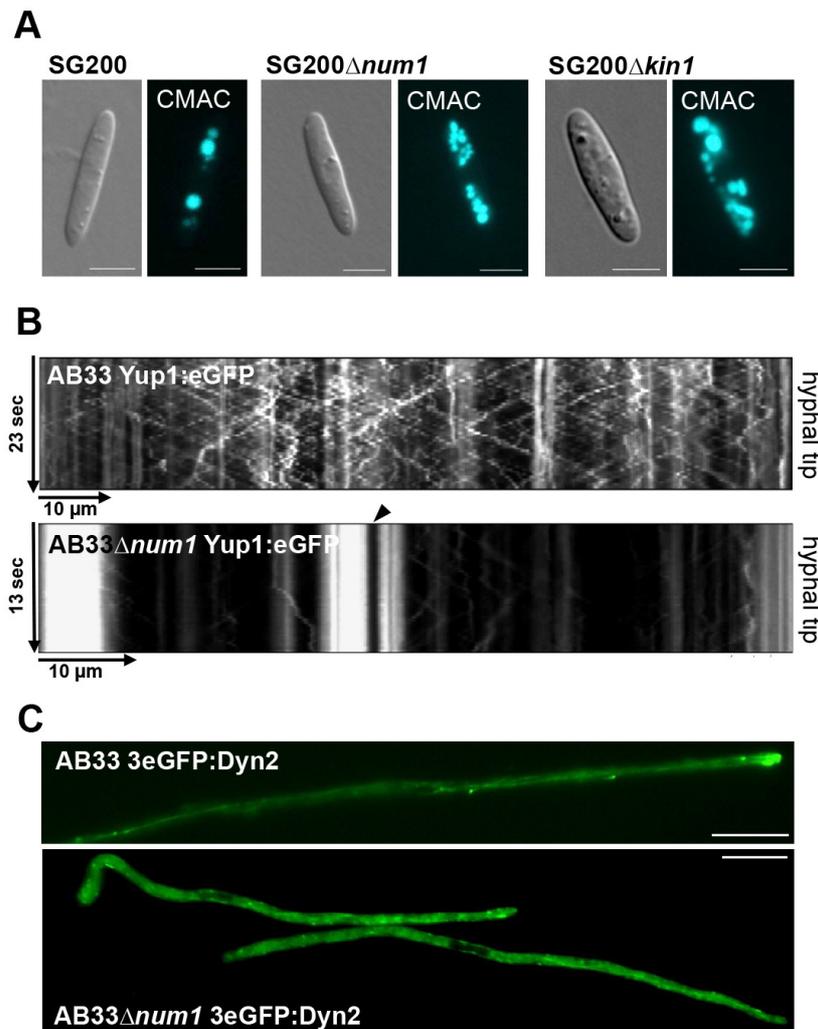
<i>S.cerevisiae</i>	<i>H.sapiens</i>	<i>U.maydis</i>
Prp19	PRP19	Prp19/Um10027
Syf1	SYF1/XAB2	Um03842
Isy1	ISY1	Um01323
Cef1	CDC5L	Cef1/Um04411
Prp46	PRL1	Prl1/Um11036
Snt309	BCAS2/SPF27	Num1/Um01682
Cwc15	CWF15	Um10535
Cif1	SYF3	Um02676
Syf2	SYF2	Um11427
Cwc2	CWC2	Um12203

Die meisten weiteren NTC assoziierten Proteine sind lose und dynamisch mit dem Komplex verbunden (Chanarat und Strasser, 2013; Ohi *et al.*, 2002; Ren *et al.*, 2011). Für viele NTC-Komponenten und -assoziierte Proteine ist eine Vielzahl von Funktionen, unabhängig von der prä-mRNA Prozessierung, bekannt. Im Folgenden werden einige dieser Funktionen näher erläutert und teilweise mit bereits gewonnen Erkenntnissen über das *U. maydis* Num1 Protein in Bezug gebracht. Cdc5-Proteine wurden, wie der Name („cell division cycle“) bereits vermuten lässt, ursprünglich als Zellzyklus-Faktoren identifiziert, die für den Übergang von der G2- in die M-Phase benötigt werden (Bernstein und Coughlin, 1998b; Nasmyth und Nurse, 1981; Ohi *et al.*, 1994b). In mehreren Studien konnte bereits gezeigt werden, dass Cdc5 unerlässlich für den korrekten Ablauf des eukaryotischen Zellzyklus ist (Ben-Yehuda *et al.*, 2000; Burns *et al.*, 1999; Gräub *et al.*, 2008; Russell *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2009). Die *num1*-Deletion führt in *U. maydis* ebenfalls zu einer Deregulierung des Zellzyklus (Kellner *et al.*, 2014). Prp19p wurde zunächst unter dem Namen Pso4p identifiziert. Die Mutation in Pso4p führt zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber DNA-Schäden (Henriques und Moustacchi, 1980). Prp19 selbst und einige Prp19-assoziierte Proteine sind in Hefe und Mensch für ihre Beteiligung in verschiedenen DNA-Reparaturprozessen bekannt (Beck *et al.*, 2008; Brendel *et al.*, 2003; Grey *et al.*, 1996; Lu und Legerski, 2007; Zhang *et al.*, 2005). In *U. maydis* führt die Deletion von *num1* zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber UV-Bestrahlung und DNA-schädigenden Agenzien. Auch in diesem Fall ist eine Beeinträchtigung der DNA-Reparatur durch ineffizientes Spleißen in  $\Delta num1$  nicht auszuschließen (Kellner, 2012; Kellner *et al.*, 2014). Andere Zelluläre Prozesse, die von NTC-Komponenten und -assoziierten Proteinen beeinflusst werden, sind die Transkriptionsregulation (David *et al.*, 2011), der mRNP (Ribonucleoprotein)-Partikeln vermittelte mRNA Export aus dem Zellkern (Chanarat *et al.*, 2012; Chanarat *et al.*, 2011), die Protein-Ubiquitinierung/ -Degradierung (Loscher *et al.*, 2005; Sihn *et al.*, 2007) und die Zellalterung (Kleinriders *et al.*, 2009; Voglauer *et al.*, 2006). Zusätzlich gibt es Untersuchungen zum Einfluss auf die Struktur des Zytoskeletts (Burns *et al.*, 2002) und auf verschiedene intrazelluläre Transportprozesse (Dellago *et al.*, 2011; Lleres *et al.*, 2010; Vincent *et al.*, 2003). Im Diskussionsteil werden einige, für diese Arbeit wichtige, Funktionen des NTC und seiner Komponenten genauer betrachtet.

## 1.7 Die zytoplasmatische Funktion des Num1-Proteins in *U. maydis*

Es wurde bereits erwähnt, dass Num1:3xeGFP, neben seiner Zellkern-Lokalisierung auch in kleinen Punkten im Zytoplasma beobachtet werden kann (Abbildung 8 C). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass in Abwesenheit von Num1 die Motilität von Early Endosomes (EE) verringert ist (Abbildung 11 B), dies jedoch nicht auf ein fehlerhaftes Zytoskelett

zurückzuführen ist. Weder die Organisation des Mikrotubuli- noch des Actin-Zytoskeletts sind gestört. Es konnte auch kein Einfluss auf die Verteilung von sekretorischen Vesikeln beschrieben werden. Die Anzahl und Beschaffenheit von Vakuolen wird durch die *num1*-Deletion stark verändert. Es sind weit mehr Vakuolen mit verringerter Größe zu beobachten (Abbildung 11 A). Im Gegensatz zur Kinesin (Kin1) Lokalisierung hat die Deletion von *num1* einen großen Einfluss auf die Lokalisierung von Dynein (Dyn2). Statt wie gewohnt an der Spitze zu lokalisieren ist Dyn2 nun über die komplette Hyphe verteilt (Abbildung 11 C)(Kellner *et al.*, 2014).



**Abbildung 11: Weitere Einflüsse von  $\Delta$ *num1* auf die Vakuolen-Morphologie und intrazelluläre Transportprozesse. (A)** Licht- und Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Anzahl und Beschaffenheit von Vakuolen in haploiden Sporidien, *num1* und *kin1* Deletion führt zu mehr und kleineren Vakuolen, Vakuolen wurden mit CellTracker Blue (7-amino-4-chloromethyl-coumarin, CMAC) angefärbt, Maßstabsbalken entsprechen 5  $\mu$ m. **(B)** Kymograph der Early Endosome (EE) Motilität (Distanz gegen Zeit), Yup1:eGFP als EE Marker, Pfeil markiert ein Septum **(C)** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Dynein 2 Lokalisierung in AB33 WT und AB33 $\Delta$ *num1*, 3eGFP:Dyn2 in grün, Maßstabsbalken entsprechen 10  $\mu$ m. (Kellner *et al.*, 2014)

Wie bereits in Abbildung 11 A zu sehen, gibt es Gemeinsamkeiten zwischen  $\Delta$ *num1* und  $\Delta$ *kin1* Deletionsstämmen. Auf diese wird im Weiteren genauer eingegangen.

Das konventionelle Kinesin 1 (Kin1) Motorprotein interagiert in *U. maydis* mit Num1 (Kellner, 2009). Der Mikrotubuli basierte Langstreckentransport in der Zelle erfolgt mit Kinesin- und Dynein-Motorproteinen. Durch die polar angeordneten Mikrotubuli unterstützen diese Motorproteine das polare Wachstum der Zelle, indem sie Vesikel und andere Organellen zur apikalen Wachstumsregion befördern. Dabei gelten manche Motorproteine wie Kin3 und Dyn2 als Schlüsselkomponenten für die pilzliche Morphogenese. Defekte in diesen Komponenten können zur Herabsetzung des Wachstums bis hin zur Letalität führen (Harris, 2006; Ramos-Garcia *et al.*, 2009; Riquelme *et al.*, 2000; Seiler *et al.*, 1999; Steinberg, 2007). In *U. maydis* sind die Kinesine 1 und 3 während des filamentösen Wachstums stark induziert und haben einen großen Einfluss auf die polare Hyphenmorphologie (Schuchardt *et al.*, 2005). Der apikal-gerichtete Transport von Endosomen ist in *U. maydis* Kin3 abhängig (Baumann *et al.*, 2012b; Schuchardt *et al.*, 2005; Schuster *et al.*, 2011a; Schuster *et al.*, 2011b; Wedlich-Söldner *et al.*, 2002). Im Gegensatz dazu transportiert Dynein die Organellen in die entgegengesetzte (retrograde) Richtung und hilft dabei durch den Transport der Kinesine beim Motorproteinrecycling. Dynein-Motorproteine akkumuliert an den Plus-Enden der Mikrotubuli, wo sie als Reservoir für dem retrograden Transport dienen (Lenz *et al.*, 2006; Schuster *et al.*, 2011a; Zhang *et al.*, 2010).

Die Interaktionsdomäne von Num1 mit Kin1 konnte auf die 80 AS zwischen AS 67 und 147 eingegrenzt werden. Es handelt sich dabei um eine schwache oder transiente Interaktion (Kellner *et al.*, 2014).

Neben der physikalischen Interaktion von Num1 und Kin1 gibt es weitere Anhaltspunkte für eine genetische Interaktion und eine funktionelle Verbindung. Die Deletion von *kin1* führt in *U. maydis* Filamenten zu einem ähnlichen Phänotyp wie die *num1* Deletion. Bei beiden Deletionen kommt es zu verkürzten und bipolar wachsenden Filamenten mit oftmals falsch eingezogenen Septen (Kellner, 2012; Schuchardt *et al.*, 2005; Steinberg *et al.*, 1998). Durch die Doppeldeletion der beiden Gene wird der beschriebene Phänotyp verstärkt. Bei Infektionsstudien mit dem solopathogenen Stamm SG200 zeigt  $\Delta kin1$  eine ähnlich leicht verminderte Pathogenität wie sie auch bei  $\Delta num1$  auftritt. Auch hier kommt es durch die Doppeldeletion zu einem additiven Effekt, der sich in einer drastisch verminderten Pathogenität niederschlägt (Kellner, 2012; Kellner *et al.*, 2014). Auch wenn die Deletion beider Gene im Einzelnen zu einem fast identischen Phänotyp in Bezug auf Pathogenität, Zell- und Vakuolenmorphologie führen, so zeigen die additiven Effekte der Doppeldeletion, dass beide Proteine weitere, von einander unabhängige Funktionen einnehmen.

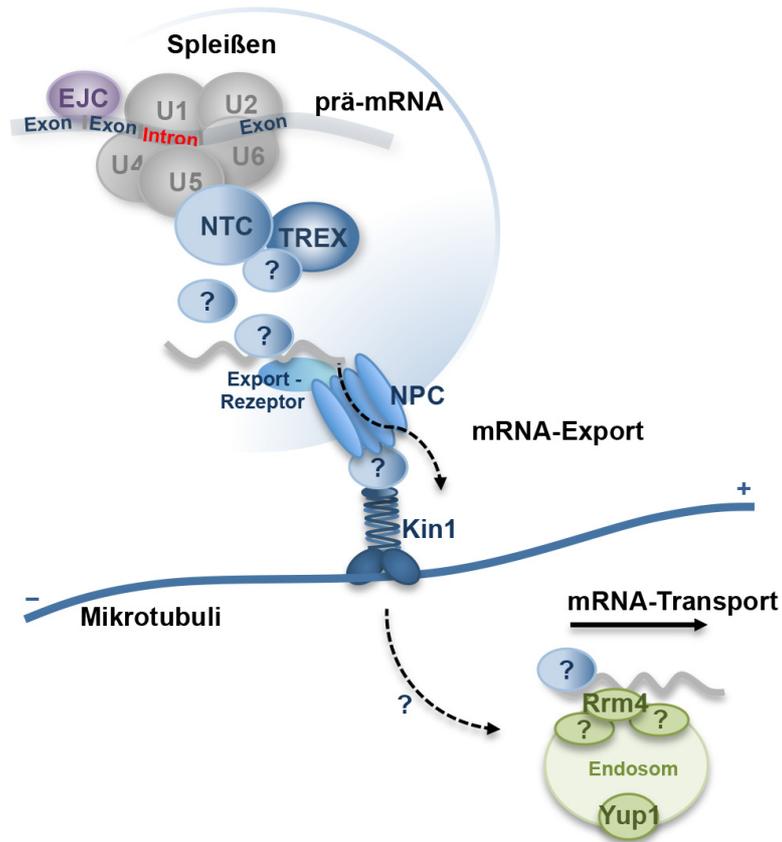
## 1.8 Bisheriges Modell der Num1 Funktion

In (Kellner *et al.*, 2014) wurde die favorisierten Num1 Funktionen folgendermaßen zusammengefasst. Num1 nimmt in diesem Modell zunächst, als Teil des NTC, Einfluss auf den Spleiß-Prozess. In *Drosophila melanogaster* werden Komponenten des EJC (exon junction complex) für den Transport von *oskar* mRNA benötigt (Zimyanin *et al.*, 2008). Der EJC markiert Exon/Exon Übergänge während des Spleiß-Prozesses und bleibt auch nach der Reifung der mRNA daran gebunden (zusammengefasst in Chang *et al.*, 2007). Interessanterweise ist auch der *oskar* Transport von Kin1 abhängig (Brendza *et al.*, 2002).

Da bereits bekannt ist, dass die NTC-Komponente Syf1p in Hefe mit dem mRNA Exportkomplex TREX (transcription-coupled export) interagiert (Chanarat *et al.*, 2011), könnte dies auch für Num1 der Fall sein. Es wurde postuliert, dass Num1 anschließend, gemeinsam mit der prozessierten mRNA über die Kernpore (NPC) den Zellkern verlässt. Dies passt zu der kürzlich gezeigten Lokalisierung von Kin1 an der Kernpore, wo es Zellkern-Zytoplasma Transportprozesse unterstützt (Steinberg *et al.*, 2012).

Es ist bekannt, dass die *num1* Deletion die Bewegung von Early Endosomes (EEs) behindert und dass mRNA mit dem mRNA bindenden Protein Rrm4 auf diesen Organellen transportiert wird (Baumann *et al.*, 2012a; Kellner *et al.*, 2014; König *et al.*, 2009). Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass die Deletion von *num1* und *kin1* gleichermaßen die Motilität von Rrm4-tragenden Endosomen verschlechtert (Baumann *et al.*, 2012a; Kellner *et al.*, 2014; Schuchardt *et al.*, 2005).

Es bleibt jedoch weiterhin fraglich, wie der mögliche Kin1 vermittelte Transport von Num1 mit dem Rrm4 gekoppelten mRNA Transport zusammenhängt. Zusätzlich ist nicht untersucht worden, ob Num1 wirklich mit Komponenten des TREX Komplexes interagiert und ob Num1 zusammen mit reifer mRNA den Zellkern verlässt.



**Abbildung 12: Modell zur postulierten Num1 Funktion in *U. maydis*.** Möglicher Zusammenhang von der NTC abhängigen Num1 Funktion mit mRNA Export und Transport. Abbildung abgeändert nach (Kellner *et al.*, 2014).

## 1.9 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Die posttranskriptionale Modifikation von mRNA mittels Spleißen ist ein wichtiger Prozess in eukaryotischen Zellen. Diese mRNA-Prozessierung wird durch das Spleißosom katalysiert welches aus einer Vielzahl an Komponenten besteht. Neben den snRNPs ist der NineTeen-Komplex (NTC) eine der Hauptkomponenten des Spleißosoms. Er ist für die korrekte Rekrutierung von snRNPs und damit generell für den gesamten Spleiß-Prozess von großer Wichtigkeit.

Im Menschen besteht der Kernkomplex aus den Proteinen hSPF27, hCDC5L, hPRP19 und hPRL1. Diese Komponenten sind zwischen allen Eukaryoten hoch konserviert und in eben diesen auch essentiell. Dabei werden den einzelnen Proteinen zusätzliche, vom Spleißen unabhängige zelluläre Funktionen wie Zellzyklus-Kontrolle, DNA-Reparatur und mRNP-Bildung und -Export zugeordnet.

In *U. maydis* ist die Deletion von *num1* nicht letal und es konnten bereits viele Aussagen über den entstehenden Phänotyp getroffen werden. Neben seiner Aufgabe im NTC scheint

Num1 weitere Funktionen im Zytoplasma zu übernehmen, wo es mit dem Motorprotein Kin1 interagiert.

Das Hauptaugenmerk dieser Arbeit liegt in der weiteren Untersuchung der Num1 Funktion als integraler Bestandteil des NTC in *U. maydis*. Durch vergleichende Experimente soll aufgedeckt werden, welchen Einfluss die *num1* Deletion auf den Aufbau bzw. die Zusammensetzung des NTC hat und welche NTC assoziierten Komponenten möglicherweise verloren gehen. Dazu werden Pull-Down Experimente im WT und  $\Delta num1$  Hintergrund durchgeführt, welche anschließend durch Massenspektroskopie analysiert werden sollen. Quantifizierungsexperimente mittels Co-Immunopräzipitation und Massenspektroskopie sollen weitere Einblicke in die NTC-assoziierte Funktion von Num1 geben. Zusätzlich soll die zytoplasmatische Funktion von Num1 näher untersucht werden. Dafür wird das Num1 Protein ausschließlich in der zytoplasmatischen Fraktion immunopräzipitiert. Das Ziel ist es, die Num1 Funktion in ihrer Gänze zu verstehen. Dabei gilt es zu erfahren, ob die mögliche NTC-assoziierte Funktion mit der zytoplasmatischen Funktion in Verbindung steht und was diese Verbindung ausmacht. Eine Möglichkeit stellt die Kopplung von Num1 an die prozessierte mRNA dar, welche dann in das Zytoplasma transportiert und dort mittels Num1 an Kin1 bindet. Es bleibt offen aus welchem Grunde Kin1 mit Num1 interagiert, da Kin1 ausschließlich für den Dynein Transport in *U. maydis* bekannt ist.

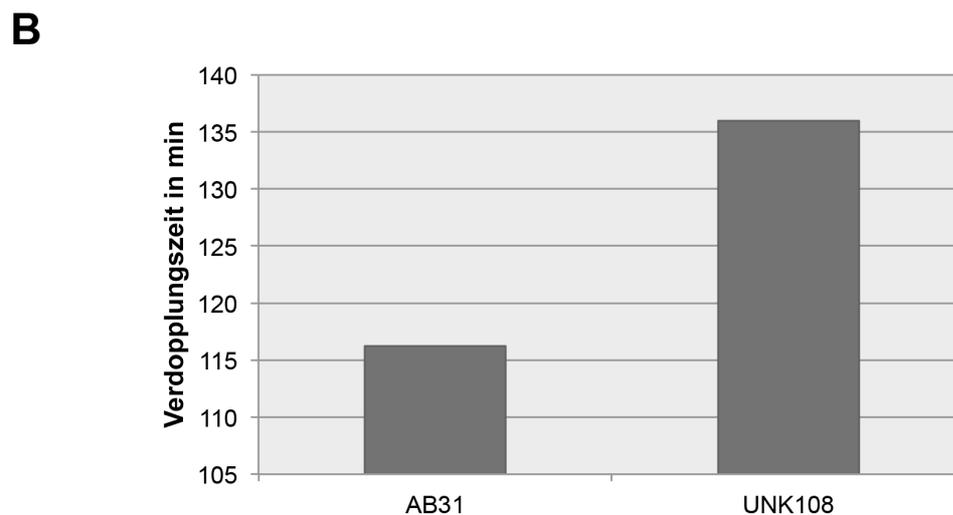
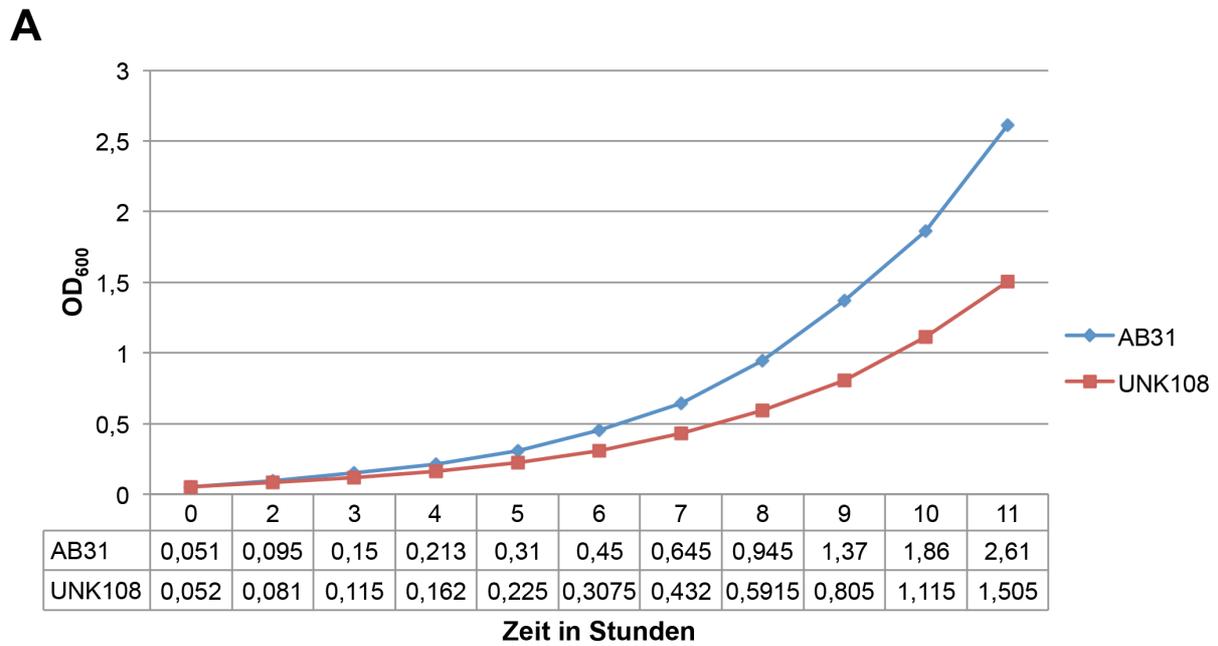
## 2 Ergebnisse

Das Num1-Protein wurde durch einen Kandidatengen-Ansatz gefunden. Dessen Ziel war es Gene in *U. maydis* zu identifizieren, welche Einfluss auf die komplexen Entwicklungsprozesse der Schnallenbildung und der damit einhergehenden Zellkernwanderung haben. Aus *C. cinereus* war das Num1 Protein bekannt, welches für die korrekte Zellkernverteilung während der Kreuzung verantwortlich ist (Makino und Kamada, 2004). Aus diesem Grund sollte der Effekt einer *num1* Deletion auf die Pathogenität und die Zellmigration in *U. maydis* untersucht werden. Die darauffolgenden Studien ergaben eine leicht verringerte Pathogenität, Defekte in der Hyphenpolarität und Defekte in verschiedenen Transportprozessen innerhalb pilzlicher Hyphen, hervorgerufen durch die Abwesenheit des Num1 Proteins. Durch die Hefe-Zwei-Hybrid Methode konnte unter anderem das Kin1-Motorprotein als Interaktionspartner, mit Bezug auf intrazelluläre Transportprozesse, identifiziert werden (Kellner *et al.*, 2014). Die Erkenntnis, dass das Num1 Protein ein humanes Homolog (SPF27/BCAS2) besitzt, dessen primäre Funktion die Unterstützung des Spleißprozesses als Teil des evolutionär konservierten NineTeen-Komplexes (NTC) ist, machte Untersuchungen in diese Richtung notwendig. So konnte gezeigt werden, dass Num1 mit zwei weiteren Kernkomponenten, Prp19 und Cef1, des Komplexes interagiert und dass der Verlust des Num1 Proteins zu einer global erhöhten Intron-Retentionsrate führt (Kellner *et al.*, 2014). In der vorliegenden Arbeit wurden der NTC von *U. maydis* und die Funktion des Num1-Proteins innerhalb dieses Komplexes untersucht. Des Weiteren sollte die zytoplasmatische, möglicherweise NTC unabhängige Funktion des Proteins weiter erforscht werden. Dabei galt zu klären, ob die zwei postulierten Num1 Funktionen miteinander in Verbindung stehen. Ein Modell für den möglichen Zusammenhang besteht in dem mRNA Export aus dem Zellkern und den weiteren Transport im Zytoplasma (Kellner *et al.*, 2014) (1.8).

### 2.1 Der Einfluss der *num1* Deletion auf die Wachstumsrate von haploiden *U. maydis* Sporidien

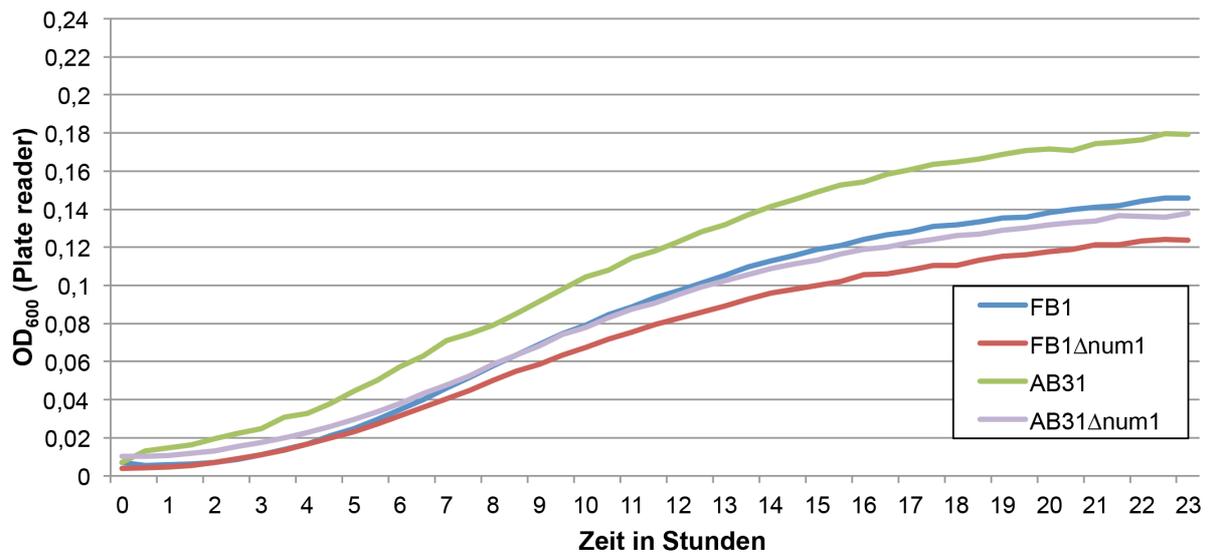
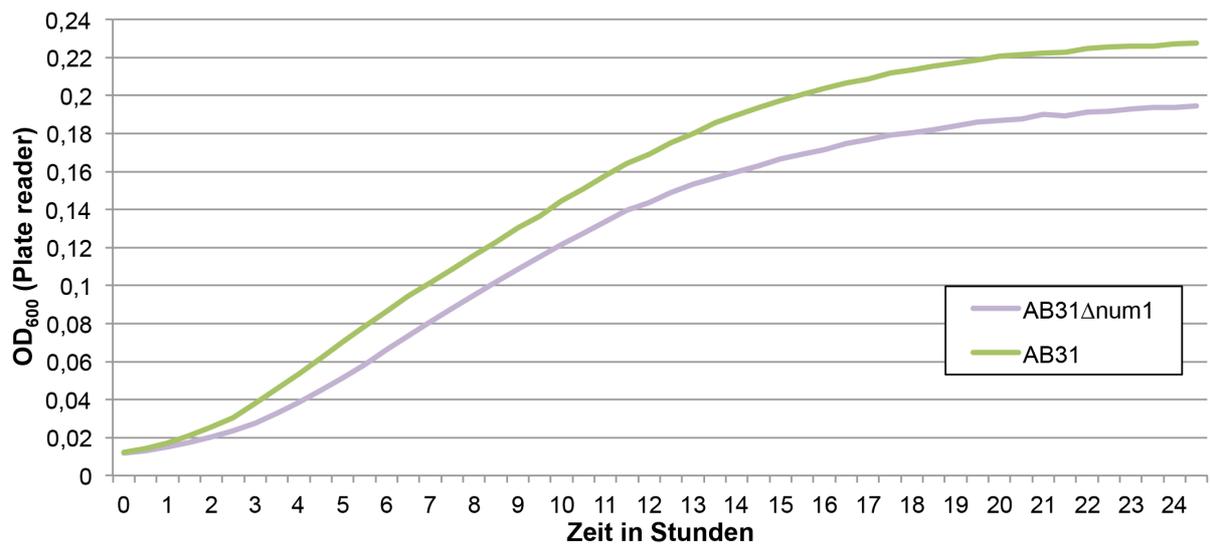
Vorangegangene Studien haben gezeigt, dass die Deletion von *num1* zu keinen Wachstumsveränderungen in haploiden Sporidien führt. Zum einen weisen die Sporidien keinerlei morphologische Aberrationen auf wenn sie im Lichtmikroskop betrachtet werden. Zum Andern ergaben mehrere Experimente zur Bestimmung der Zellverdopplung von verschiedenen WT und  $\Delta num1$  Stämmen, dass die Verdopplungszeit durch die Abwesenheit

von Num1 nicht negativ beeinflusst wird (Abbildung 8 B). Es ist jedoch bekannt, dass die Deletion von *num1* zu einer stark verminderten Spleiß-Effizienz und zu defektem Hyphenwachstum führt. Schlechteres Spleißen sollte logischerweise auch verringerte Proteinmengen und somit auch vermindertes Wachstum bei jeglicher Wuchsform zur Folge haben. Um den fehlenden Einfluss der *num1* Deletion auf die Wachstumsraten der betroffenen Stämme erneut zu testen, wurden in der vorliegenden Arbeit Wachstumsversuche in axenischer Kultur mit verschiedenen Medien durchgeführt. Dabei kamen die Stämme FB1 (*a1b1*) und das FB2 (*a2b2*) Derivat AB31 zum Einsatz. Wie in den vorangegangenen Studien wurde eine Wachstumskurve in Kompletmedium (YEPS<sub>light</sub>) mit manueller Probenentnahme durchgeführt. Abbildung 13 zeigt, dass die Deletion von *num1* (UNK108) zu einer signifikant herabgesetzten Wachstumsrate, verglichen mit dem Wildtyp (AB31) führt. Dies schlägt sich in einer Erhöhung der Verdopplungszeit um ungefähr 20 Minuten nieder (Abbildung 13 B).



**Abbildung 13: Wachstum von *U. maydis* Sporidien in axenischer Kultur. WT (AB31) gegen  $\Delta num1$  (UNK108/AB31 $\Delta num1$ ). (A) Diagramm der zwei verschiedenen Wachstumskurven. Die Tabelle gibt die jeweilige OD<sub>600</sub> zu definierten Zeitpunkten an. (B) Verdopplungszeiten der jeweiligen Stämme in Minuten.  $\Delta num1$  zeigt im Vergleich zum Wildtyp ein reduziertes Wachstum und damit eine längere Verdopplungszeit.**

Um diese Ergebnisse zu verifizieren wurden zusätzliche Experimente in einem Perkin Elmer Enspire Plate Reader durchgeführt. Dabei konnten vergleichbare Beobachtungen gemacht werden. Sowohl in GM (Glutamin-minimal)-Medium als auch in YEPS<sub>light</sub>-Komplexmedium, ließ sich die herabgesetzte Teilungsrate haploider Sporidien reproduzieren.

**A****B**

**Abbildung 14: Wachstum von *U. maydis* in axenischer Kultur in einem Plate Reader. (A)** Diagramm mit Wachstumskurven der angegebenen Stämme in GM (Glutaminminimal)-Medium, aufgetragen ist die im Plate Reader gemessene OD<sub>600</sub> gegen die Zeit in Stunden. **(B)** Diagramm mit Wachstumskurven verschiedener Stämme in YEPS<sub>light</sub>-Komplettmedium, aufgetragen ist die im Plate Reader gemessene OD<sub>600</sub> gegen die Zeit in Stunden. Sowohl in Komplettmedium als auch in Minimalmedium zeigt  $\Delta num1$  ein langsames Wachstum als der WT.

## 2.2 Eine N-terminal verkürzte Num1 Variante komplementiert den $\Delta num1$ Phänotyp

Die zwei bekannten Num1 Funktionen konnten bisher nicht voneinander getrennt werden und in anderen Organismen war bisher keine zytoplasmatische Funktion in Zusammenhang mit Kin1 bekannt. Wie bereits in der Einleitung (Abbildung 7) erwähnt, besitzt das Num1-Protein in *U. maydis* N-terminal eine 65 AS umfassende Verlängerung, welche nur ihm und seinen engsten Verwandten zugeschrieben wird (Kellner, 2012). Bei Untersuchungen mit einem AB31 $\Delta num1$  Stamm, welcher im *lp*-Locus die um diesen N-Terminus verkürzte Version unter Kontrolle des Arabinose induzierbaren *crg*-Promotor exprimiert, konnten keine morphologischen Unterschiede zu der Deletionsmutante festgestellt werden. Auch die bekannte Interaktion mit dem Kin1 Motorprotein blieb von der Deletion der N-terminalen 65 AS unbeeinflusst (Kellner, 2012).

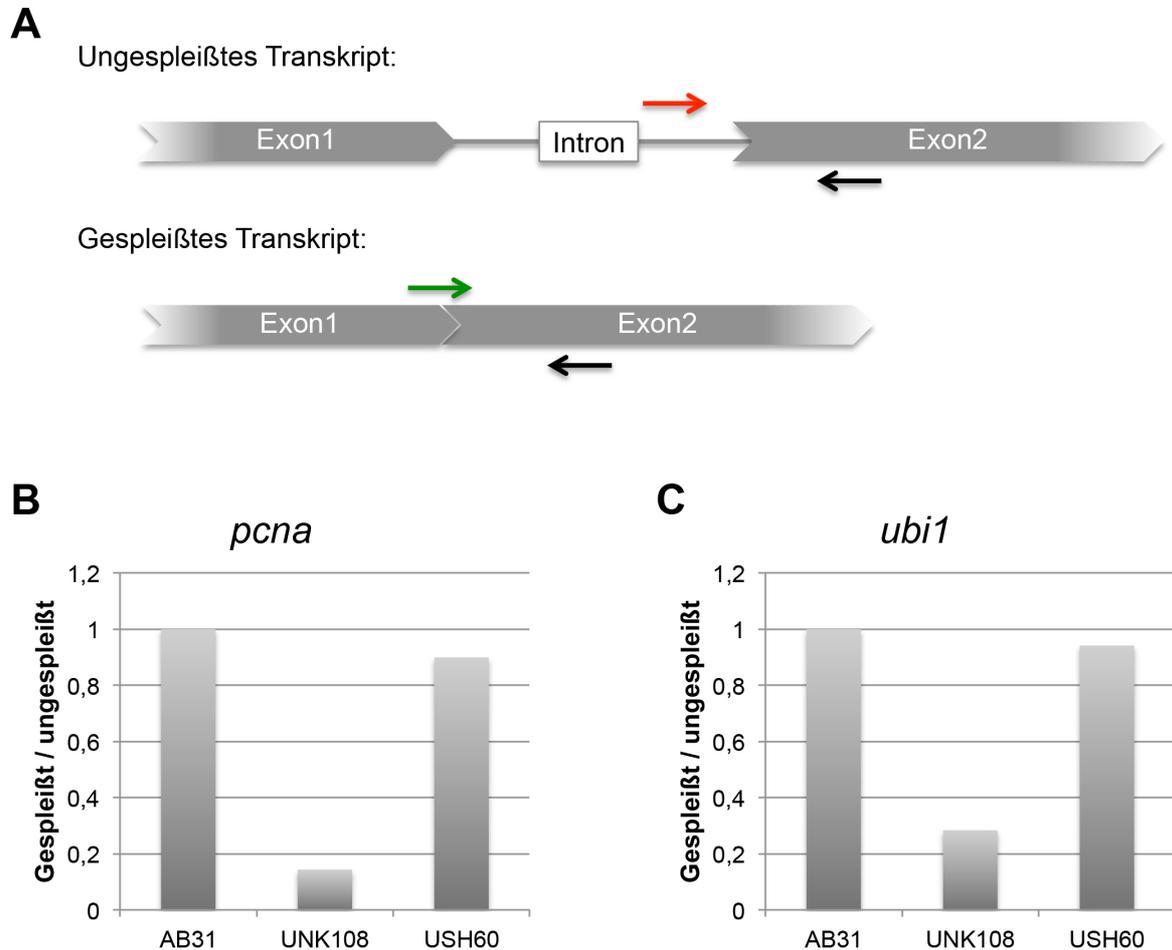
Durch die bereits gewonnen Erkenntnisse konnte jedoch keine Aussage über den Effekt auf die reduzierte Spleißeffizienz in AB31 $\Delta num1$  gemacht werden. Wäre diese durch die Komplementation mit der verkürzten Num1 Version wieder hergestellt, so ließe dies vermuten, dass die aberrante Morphologie von  $\Delta num1$  Filamenten hauptsächlich der fehlenden spleiß-unabhängigen Funktion von Num1 zugeordnet werden muss. Dies würde gleichzeitig den Schluss zulassen, dass die 65 AS am N-Terminus für die Spleiß-Funktion von Num1 unverzichtbar sind.

Um die Auswirkungen von  $num1_{\Delta 1-65}$  auf die Spleiß-Effizienz von *U. maydis* zu untersuchen, wurde ein AB31 Stamm generiert, welcher die verkürzte Num1 Variante statt des endogenen Num1 Proteins unter der Kontrolle des nativen Promotors *in locus* exprimiert. In dem entstandenen Stamm muss die Expression des Gens nicht induziert werden, wodurch Nebeneffekte durch eine artifizielle Überexpression ausgeschlossen werden können.

Der Effekt der partiellen Deletion von *num1* auf das Spleißen wurde mithilfe quantitativer Realtime (qRT)-PCRs untersucht. Für dieses Experiment wurden Oligonukleotide verwendet, die einen direkten Mengenvergleich von gespleißtem und ungespleißtem Transkript zulassen (Abbildung 15 A). Für die untersuchten Transkripte *pcna* (*um05403*, „probable proliferating cell nuclear antigen“), das für einen DNA Polymerase Prozessivitätsfaktor kodiert, und *ubi1* (*um02440*, „ubiquitin gene 1“), das für ein Fusionsprotein zwischen Ubiquitin und dem ribosomalen Rpl40-Protein kodiert, konnte in vorhergehenden Studien bereits eine erhöhte Intron-Rententionsrate für die *num1*-Deletionsmutante belegt werden (Kellner, 2012; Kellner *et al.*, 2014) (Abbildung 6). Als Ausgangsmaterial für die cDNA-Synthese diente die mRNA von haploiden Sporidien eines AB31, eines AB31 $\Delta num1$  (UNK108) und eines AB31 $\Delta num1_{1-65}$  (USH60) Stammes, welche in CM-Komplettmedium kultiviert wurden.

Zur Bestimmung der Intron-Rententionsrate wurden die Verhältnisse zwischen der relativen Expression von gespleißter und ungespleißter mRNA gebildet. Für beide Transkripte konnte

eine verminderte Spleiß-Effizienz in  $AB31\Delta num1$  gezeigt werden. In  $AB31\Delta num1_{1-65}$  dagegen war das Verhältnis von gespleißtem zu ungespleißtem Transkript wieder annähernd auf WT-Niveau (Abbildung 15). Dies deutet darauf hin, dass der N-Terminus von Num1 nicht für dessen spleiß-assoziierte Funktion benötigt wird.

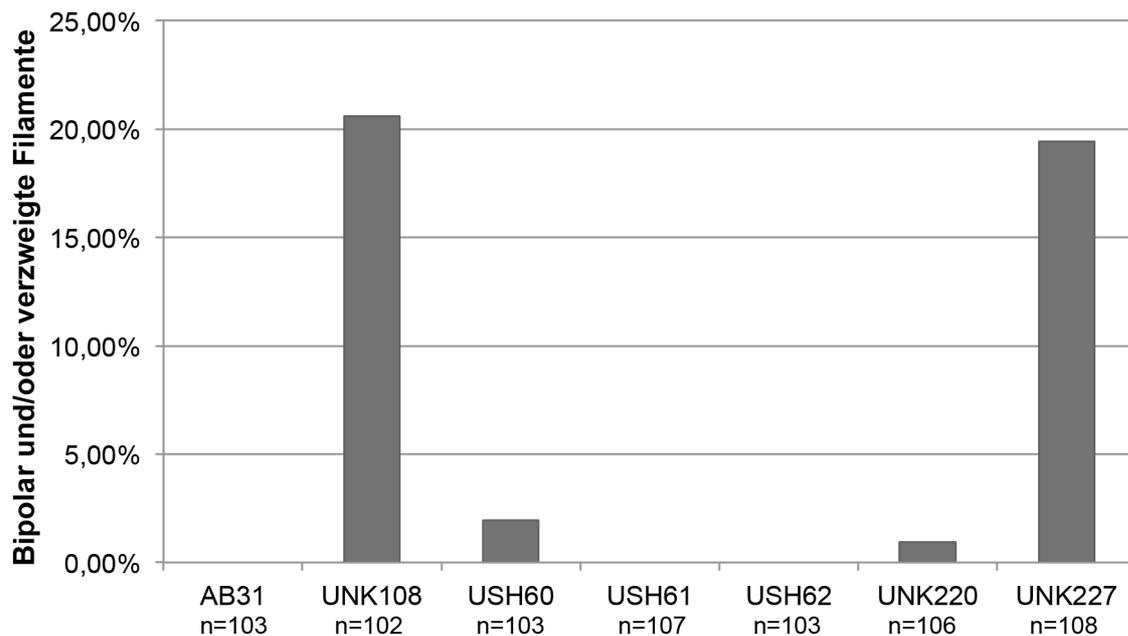


**Abbildung 15: qRT-PCR Ergebnisse zur Bestimmung der Spleiß-Effizienz in AB31,  $AB31\Delta num1$  (UNK108) und  $AB31\Delta num1_{2-66}$  (USH60).** (A) Schematische Darstellung von gespleißtem und ungespleißtem Transkript und die entsprechenden Primerkombinationen, roter Vorwärts-Primer bindet im Intron und kann nur an ungespleißte Transkripte binden, grüner Vorwärts-Primer bindet im Übergang von Exon 1+2 und funktioniert nur bei gespleißten Transkripten, schwarzer Rückwärts-Primer bindet in einem Exon und funktioniert somit in Kombination mit beiden Vorwärts-Primern. (B) Verhältnis von gespleißtem zu ungespleißtem Transkript von *pcna* (proliferating cell nuclear antigen). (C) Verhältnis von gespleißtem zu ungespleißtem Transkript von *ubi1* (ubiquitin gene 1). Die Normalisierung der relativen Genexpression erfolgte anhand der Expression des eukaryotischen Translationsinitiationsfaktor 2b (*eIF2b*, *um04869*) -Transkripts. Die Spleiß-Effizienz beider Transkripte nimmt nach *num1* Deletion ab. Dieser Effekt wird durch die Expression von  $Num1_{\Delta 2-66}$  nahezu vollständig aufgehoben.

Anschließend sollte untersucht werden, ob die verkürzte Num1 Variante im Stande ist die morphologischen Effekte der *num1* Deletion zu komplementieren. Dazu wurden die betreffenden Stämme 12 bis 13 Stunden in Arabinose-haltigem CM-Medium inkubiert, um das filamentöse Wachstum zu induzieren. Alle verwendeten Stämme wurden im AB31 Hintergrund generiert, welcher die Arabinose-induzierbare Gene *bE/bW* besitzt. Verglichen wurden die Stämme AB31 (WT),  $AB31\Delta num1$  (UNK108),  $AB31\Delta num1$  mit  $P_{crg}:num1:eGFP$

im *lp*-Locus (UNK220), AB31 $\Delta$ *num1* mit  $P_{crg}:num1_{\Delta 1-65}$  im *lp*-Locus (UNK227) und drei unabhängige Klone von AB31*num1* $\Delta 1-65$  (USH60-62). In bisherigen Studien wurde gezeigt, dass UNK108 und UNK227 gleichermaßen ein gestörtes filamentöses Wachstum aufweisen. AB31 (WT) und UNK220 zeigten hingegen beide den WT-Zustand (Kellner, 2012).

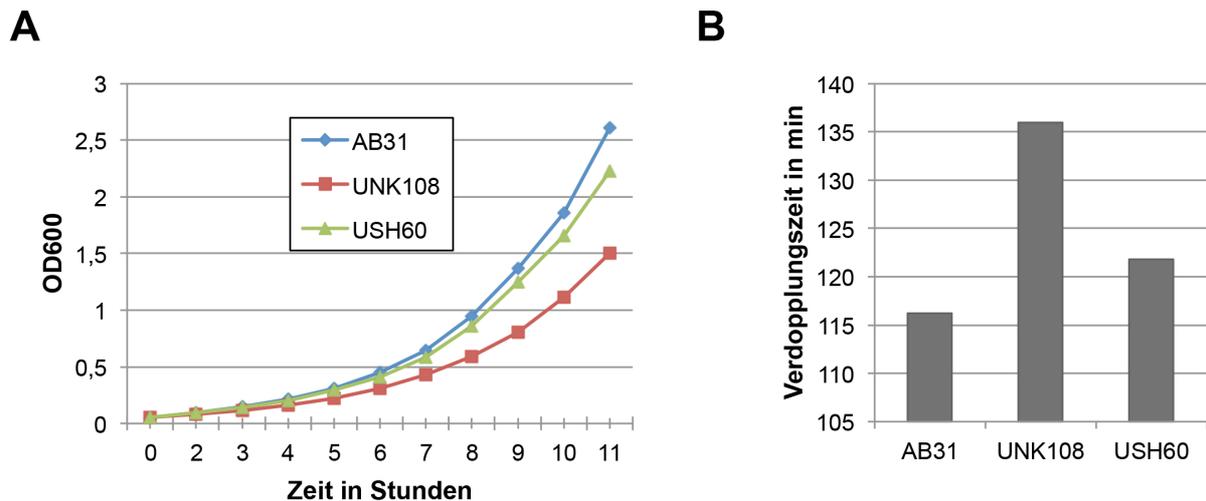
Der Anteil von bipolar und/oder verzweigten Hyphen wurde lichtmikroskopisch quantifiziert. Im Gegensatz zur ektopischen Expression führte die Expression von *Num1* $\Delta 1-65$  *in locus* zu einer Komplementation der  $\Delta$ *num1* Hyphenmorphologie (Abbildung 16).



**Abbildung 16: Quantifizierung bipolar und/oder verzweigt wachsenden Filamenten.** Verglichen wurden AB31 (WT), AB31 $\Delta$ *num1* (UNK108), AB31 $\Delta$ *num1* mit  $P_{crg}:num1:eGFP$  im *lp*-Locus (UNK220), AB31 $\Delta$ *num1* mit  $P_{crg}:num1_{\Delta 1-138}$  im *lp*-Locus (UNK227) und drei unabhängige Klone von AB31 $\Delta$ *num1* $_{2-66}$  (USH60-62), n gibt die Anzahl der gezählten Sporidien/Filamente an. Der morphologische Defekt in  $\Delta$ *num1* wird durch die Expression von *Num1* $_{67-279}$  nahezu vollständig aufgehoben.

In 2.1 wurde bereits gezeigt, dass die Deletion von *num1* zu einer Abnahme der Verdopplungszeit von haploiden Sporidien in axenischer Kultur führt. Um die Auswirkungen der Komplementation von  $\Delta$ *num1* durch die N-terminal verkürzte Version in AB31 $\Delta$ *num1* $_{2-65}$  weiter zu untersuchen, wurde eine Wachstumskurve in CM Komplettmedium durchgeführt. Ähnlich wie in den vorangegangenen Experimenten wurde die *num1* Deletion durch die Expression der verkürzten *Num1* Version nahezu vollständig komplementiert. Es ist lediglich eine Abnahme der Verdopplungszeit von ungefähr fünf Minuten zu beobachten (Abbildung 17).

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen eindeutig, dass die Deletion der *U. maydis* eigenen 65 AS am N-Terminus von *Num1* keine bzw. nur sehr geringe Auswirkung auf Spleiß-Effizienz, Filament-Morphologie und Wachstumsrate haben.



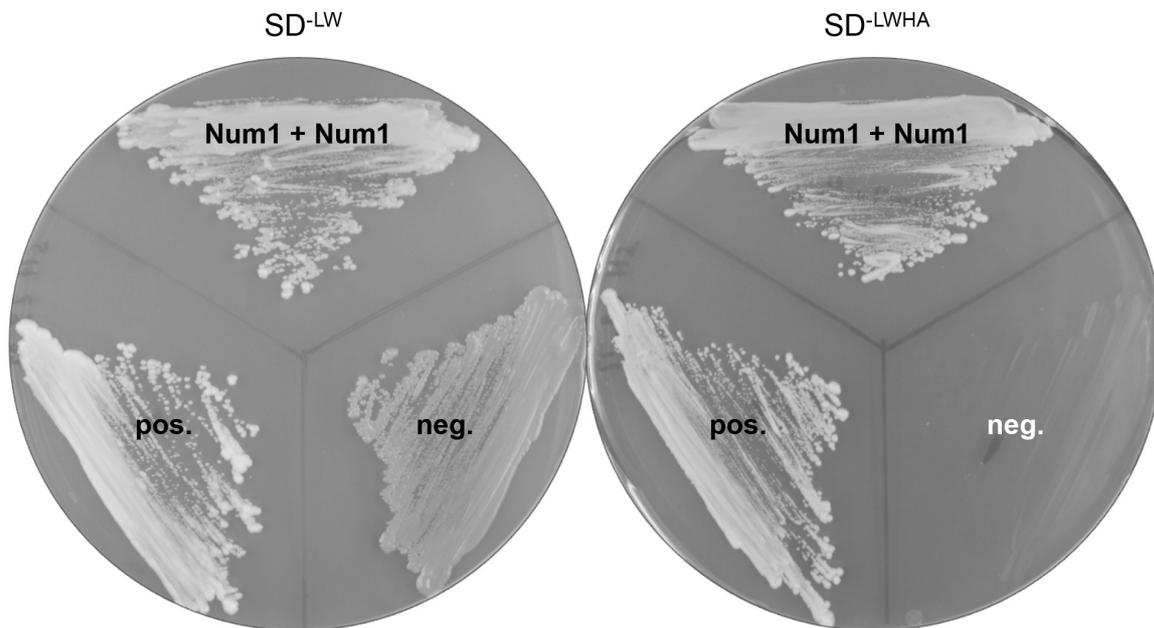
**Abbildung 17: Wachstum von *U. maydis* Sporidien in axenischer Kultur. WT (AB31) gegen UNK108 ( $AB31\Delta num1$ ) und USH60 ( $AB31\Delta num1_{2-66}$ ). (A) Diagramm mit den drei verschiedenen Wachstumskurven, Tabelle gibt die jeweilige OD<sub>600</sub> zu definierten Zeitpunkten an. (B) Verdopplungszeiten der jeweiligen Stämme in Minuten. Der Wachstumsphänotyp der *num1* Deletion wird durch die Expression von Num1<sub>67-279</sub> nahezu vollständig komplementiert.**

### 2.3 Selbstinteraktion des Num1 Proteins

Die Aufgaben des Num1 Proteins scheinen zwischen Mensch und *U. maydis* nicht vollständig konserviert zu sein. Die Selbstinteraktion von Num1 könnte erklären, wie es möglich ist, dass eine Komponente des NTC den selbigen verlässt und eine weitere Funktion im Zytoplasma erfüllt. Es ist bereits bekannt, dass Num1 in *U. maydis* mit zwei weiteren Hauptkomponenten des NTC interagiert (Abbildung 10). Diese Interaktion mit Cef1 und Prp19 konnte auch für die *H. sapiens* Homologe hPRP19 und hCDC5L mittels Far-Western und Co-IP Experimenten nachgewiesen werden (Grote *et al.*, 2010). In Hefe wurde für Snt309p lediglich eine Interaktion mit Prp19p, nicht jedoch mit Cef1p gezeigt (Chen *et al.*, 1998b; Ohi und Gould, 2002). Zusätzlich ist bekannt, dass Prp19 in Hefe und Mensch ein Tetramer bildet, welches als Gerüst für die übrigen NTC-Komponenten diskutiert wird (Grote *et al.*, 2010; Ohi *et al.*, 2005). In keinem Organismus konnte bisher eine Di- bzw. Multimerisierung eines Num1 Homologs beobachtet werden. Far-Western Analysen im Menschen zeigten keine direkte Selbstinteraktion von hSPF27 (Grote *et al.*, 2010) und in Hefe fehlen entsprechende Untersuchungen mit Snt309p gänzlich.

Zur Untersuchung in *U. maydis* wurde zunächst ein Hefe-Zwei-Hybrid Experiment durchgeführt. Dafür wurde der *num1* ORF („Open reading frame“ bzw. offener Leserahmen) sowohl in das Köderplasmid pGBKT7 als auch in das Beuteplasmid pGAD inseriert. Nach der Co-Transformation in *S. cerevisiae* AH109 konnten die entstandenen Transformanden zunächst auf das Vorhandensein beider Plasmide und anschließend auf Interaktion der

entsprechenden Proteine getestet werden. Das Wachstum auf  $SD^{-LWHA}$  Medium zeigt an, dass das Num1 Protein mit sich selbst interagiert (Abbildung 18).



**Abbildung 18: Selbstinteraktion von Num1 im Hefe-Zwei-Hybrid Versuch.** Nach Klonierung von *num1* in pGBKT7 (Clontech) und pGAD (Dualsystems Biotech) wurden die Konstrukte in den *S. cerevisiae*-Stamm AH109 co-transformiert. Gezeigt ist das Wachstum der entsprechenden Transformanten auf Plasmidselektivmedium (SD-Leu-Trp) und Hochstringenzmedium (SD-Leu-Trp-Ade-His) nach drei Tagen Inkubation bei 28°C. Als Positivkontrolle diente pGBKT7-p53 mit pGADT7-T, als Negativkontrolle diente pGBKT7-Lam mit pGADT7-T (Clontech). Num1 ist im Hefe-Zwei-Hybrid System nicht selbstaktivierend (Kellner, 2012).

Die physikalische Selbstinteraktion von Num1 wurde anschließend *in vivo* durch Co-Immunopräzipitation verifiziert. Dazu wurde das *num1* Gen, inklusive eines 2 kb langen Promotorfragments und einem c-terminalen eGFP ( $P_{num1}:num1:3eGFP$ ) in den *Ip*-Locus des Stammes AB31*num1:3xha* transformiert. Durch die Expression beider Fusionsproteine unter dem endogenen *num1* Promotor sollte ein vergleichbarer Expressionslevel gewährleistet sein. Mit Hilfe von anti-HA Antikörpern, gekoppelt an Agarose-Partikel, konnte Num1:3xHA mit Num1:3eGFP co-präzipitiert werden. Als Kontrolle diente ein Stamm, welcher nur das Num1:3eGFP Fusionsprotein exprimiert. In diesem konnte nach identischer Behandlung keine entsprechende Bande detektiert werden (Abbildung 19).



**Abbildung 19: *in vivo* Selbstinteraktion von Num1.** Co-Immunpräzipitation von Num1 und Num1. Num1:3xHA und Num1:3eGFP wurden unter der Kontrolle des *num1* Promotors im Stamm AB31 simultan exprimiert. Als Negativkontrolle diente AB31 Num1:3eGFP. Der Gesamtzellextrakt (Einsatz) wurde für eine Immunpräzipitation mit Agarose-gekoppelten anti-HA Antikörpern verwendet. Nur im Stamm mit exprimiertem Num1:3xHA konnte ein Signal mit dem anti-eGFP Antikörper detektiert werden (nach Western Blot).

## 2.4 Charakterisierung von bekannten Num1 Interaktionen

Die Interaktion von Num1 mit Kin1 wurde durch verschiedenste Methoden bereits gezeigt und verifiziert. Zusätzlich konnte die für diese Interaktion benötigte Domäne des Num1 Proteins auf 80 AS zwischen AS 67 und AS 147 eingegrenzt werden (Kellner *et al.*, 2014). Durch die Ergebnisse aus 2.2 konnten die Num1 Funktionen nicht zu einzelnen Proteinabschnitten zugeordnet werden. Um zu erfahren, welche Bereiche von Num1 für seine Interaktion mit den NTC Komponenten Prp19 und Cef1 benötigt werden, wurden weitere Hefe-Zwei-Hybrid Experimente durchgeführt. Dadurch sollte es möglich sein, verschiedene Num1-Varianten zu generieren, die nur eine der beiden bekannten Funktionen erfüllen können. Für die Vollängen-Proteine Prp19 und Cef1 konnte bislang keine Interaktion im Y2H gezeigt werden. Daher wurden für die Experimente die interaktionsfähigen verkürzten Versionen von Prp19 und Cef1 verwendet. Diese bestehen aus dem N-terminalen Fragment von Prp19 und dem C-terminalen Fragment von Cef1 (Kellner *et al.*, 2014).

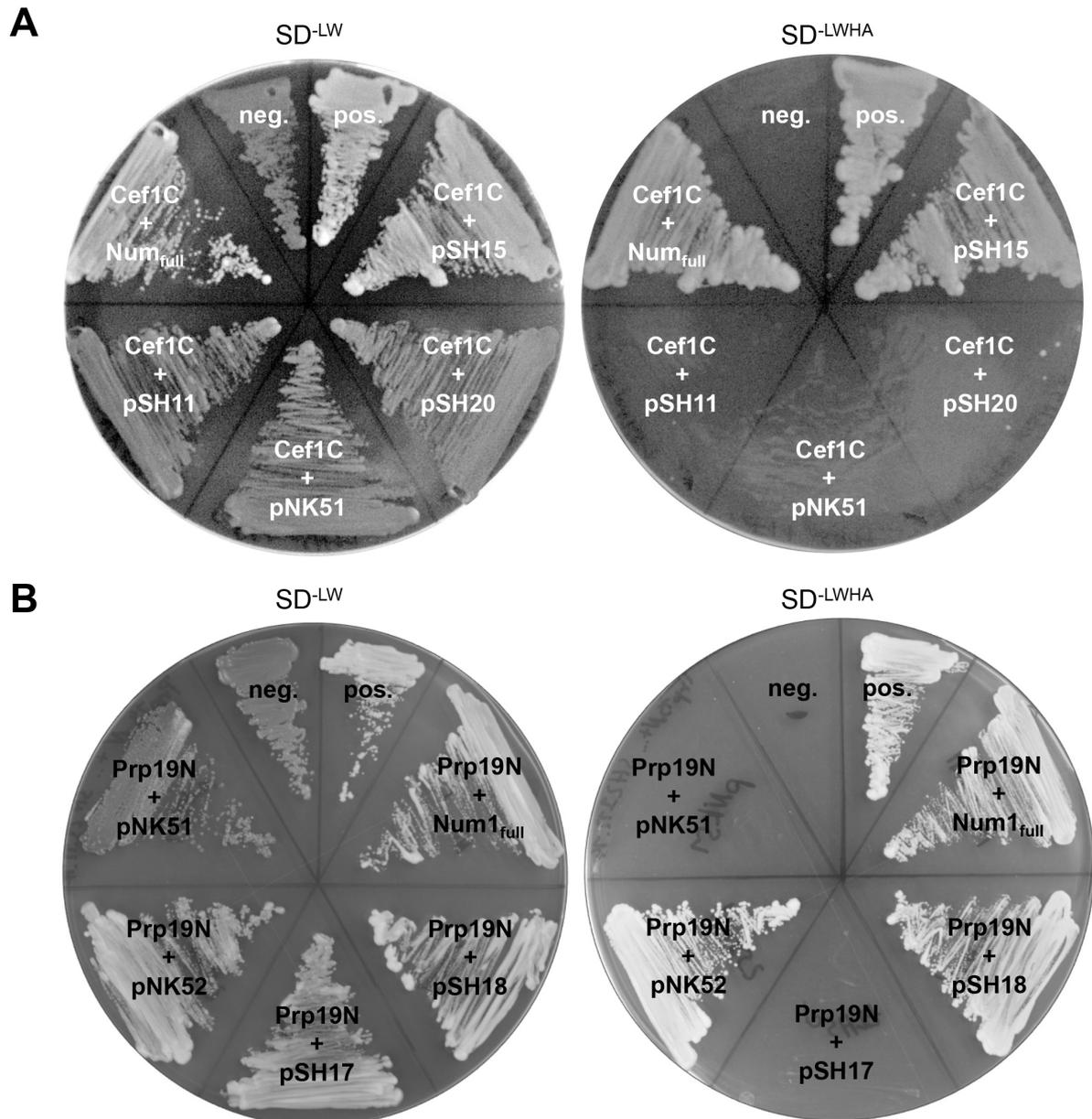
Beute	Num1-Fragment	Köder Cef1C	Köder Prp19N
pNK53	Num1 <sub>1-66</sub>	-	-
pNK52	Num1 <sub>1-147</sub>	-	+
pSH19	Num1 <sub>1-158</sub>	-	+
pSH18	Num1 <sub>1-168</sub>	-	+
pSH17	Num1 <sub>1-176</sub>	-	-
pSH16	Num1 <sub>1-188</sub>	-	-
pNK51	Num1 <sub>1-198</sub>	-	-
Num1-full	Num1 <sub>full</sub> NLS	+	+
pNK54	Num1 <sub>67-279</sub> ( $\Delta$ N-term.) NLS	+	+
pSH20	Num1 <sub>1-271</sub> NLS	-	+
pSH11	Num1 <sub>1-263</sub>	-	+
pSH12	Num1 <sub>1-246</sub>	-	+
pSH13	Num1 <sub>1-229</sub>	-	+
pSH14	Num1 <sub>1-212</sub>	-	+
pSH15	Num1 <sub>198-279</sub> NLS	+	-

**Abbildung 20: Schematische Darstellung der verschiedenen Num1 Verkürzungen und deren Interaktion mit Cef1C und Prp19N.** Die erste Spalte zeigt den Namen der Beute-Plasmide (pGAD/Dualsystems Biotech), welche die entsprechenden *num1*-Verkürzungen aus Spalte zwei beinhalten. In den hinteren beiden Spalten sind die beobachteten Interaktionen mit Cef1C bzw Prp19N (pGBKT7/Clontech) angegeben. + steht für Wachstum auf Hochstringenzmedium (SD-Leu-Trp-Ade-His) nach zwei Tagen Inkubation bei 28°C. Die putative NLS ist in orange markiert.

Beide Proteine wurden in den folgenden Analysen als Beute in dem Plasmid pGAD eingesetzt. Als Köder im Plasmid pGBKT7 dienten C- und N- terminal Verkürzte Num1 Fragmente (Abbildung 20). Alle verwendeten Plasmide wurden vor Gebrauch durch DNA-Sequenzierung verifiziert.

In einem vorhergehenden Experiment erfolgte die Expression der C-terminal verkürzten *num1*-Fragmente im Plasmid pGBKT7 mithilfe der Plasmid-eigenen STOP-Codons. Dadurch wurden bis zu 23 zusätzliche AS aus dem Plasmid an das C-terminale Ende der jeweiligen Num1-Version fusioniert. Um einen Einfluss dieser AS auf die Interaktion auszuschließen wurden alle in Abbildung 20 aufgeführten pSH Plasmide mit C-terminaler Verkürzung neu

generiert. Für die Amplifikation der *num1*-Fragmente wurden nun Rückwärts-Primer eingesetzt, welche zur Insertion eines STOP-Codons (TAG) unmittelbar am Ende der entsprechenden *num1*-Sequenz führten. So konnte gewährleistet werden, dass keine zusätzlichen, artifiziellen AS bei der Expression aus pGBKT7 angefügt wurden.



**Abbildung 21: Interaktionen von Num1-Verkürzungen.** Nach Klonierung von *num1*-Verkürzungen in pGBKT7 (Clontech) und Cef1C bzw. Prp19N in pGAD (Dualsystems Biotech) wurden die Konstrukte in den *S. cerevisiae*-Stamm AH109 co-transformiert. Gezeigt ist das Wachstum der entsprechenden Transformanten auf Plasmidselektivmedium (SD-Leu-Trp) und 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). **(A)** Cef1C Interaktion mit Num1-Verkürzungen. Cef1C interagiert mit dem Num1-Volllängenprotein und C-Terminus (pSH15). **(B)** Prp19N Interaktion mit Num1-Verkürzungen. Prp19N interagiert mit dem Num1-Volllängenprotein und den, C-terminal verkürzten Num1-Varianten aus pSH18 und pNK52. Die Verkürzungen entsprechen den in **Abbildung 20** aufgeführten.

Die vorliegenden Untersuchungen zeigen, dass die C-terminalen 81 AS von Num1 für die Interaktion mit Cef1 ausreichend sind. Jegliche Verkürzung um mehr als acht Aminosäuren des Num1 C-Terminus führt hingegen zum Verlust der Interaktion (Abbildung 20 und Abbildung 21). Dies zeigt, dass die letzten acht AS von Num1 essentiell für die Interaktion mit Cef1 sind. Die putative, C-terminal gelegene NLS von Num1 hat keinen Einfluss auf die Interaktion (Abbildung 20). Dies war auch nicht zu erwarten, musste jedoch geklärt werden, da die Deletion der NLS zu einem nicht funktionellen Num1 Protein führt (Kellner, 2012).

Die Prp19-Interaktionsdomäne des Num1-Proteins konnte nicht auf einen ähnlich kleinen Proteinabschnitt eingegrenzt werden. Der Num1 C-Terminus zwischen AS 212 und AS 279 wird nicht für die Interaktion mit Prp19 benötigt. Überraschenderweise interagierten die Num1-Verkürzungen aus pSH16, pSH17 und pNK51 ebenfalls nicht, wohingegen die kürzeren Fragmente aus pSH18, pSH19 und pNK52 wieder Interaktion zeigten. Somit sind die ersten 147 AS von Num1 ausreichend für die Interaktion mit Prp19.

## **2.5 Aufreinigung von Proteinkomplexen und Identifizierung von direkten oder indirekten Proteininteraktionen mithilfe biochemischer Methoden**

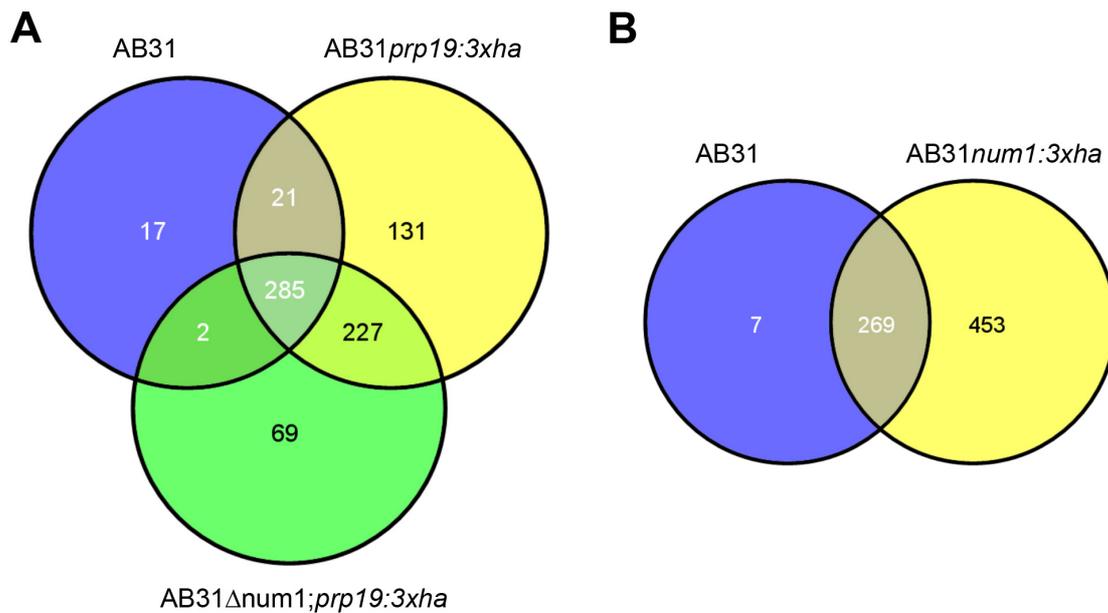
Die bekannten Interaktionspartner des Num1-Proteins in *U. maydis* können in zwei Klassen unterteilt werden. Zum einen interagiert Num1 im Zellkern mit Prp19 und Cef1. Diese sind auch in anderen Eukaryoten als Num1-Interaktoren bekannt und bilden dort gemeinsam mit Num1 und Prl1 den Kern des NTC. Zum anderen konnte eine Num1-Interaktionen mit zytoplasmatisch lokalisierten Proteinen wie Kin1 oder Dnm1 belegt werden (Kellner, 2012). Um tiefere Einblicke in den Aufbau des NTC und die Funktion von Num1 zu erlangen wurden Untersuchungen des NTC mittels Immunpräzipitation und anschließender Massenspektroskopie (HPLC-MS) durchgeführt. Da *num1* im Gegensatz zu anderen Organismen in *U. maydis* nicht essentiell ist, bieten sich einzigartige Möglichkeiten für die Charakterisierung des Num1 Proteins im NTC. Durch den Pull-Down des NTC in WT- und  $\Delta num1$ -Stämmen und dessen massenspektroskopische Untersuchung lassen sich Unterschiede im Aufbau und der Zusammensetzung erkennen. Ferner sollte geklärt werden, ob die postulierte zytoplasmatische Funktion von Num1 unabhängig vom NTC und dessen einzelnen Komponenten ist. Die Immunpräzipitation von Num1 in Kompletzellextrakt und zytoplasmatischer Protein-Fraktion sollte einen Einblick in die Prozesse gewähren, die eine Spleiß-Funktion mit anschließendem Export aus dem Zellkern und der Interaktion mit Komponenten des Langstreckentransports ermöglichen.

### 2.5.1 Massenspektroskopische Untersuchung der präzipitierten Proteine

Um den Aufbau des NTC in *U. maydis* mit dem aus *S. cerevisiae* und *H. sapiens* zu vergleichen, wurden Immunpräzipitationen mit Prp19:3xHA durchgeführt. Als Kontrolle für unspezifisch vorkommende Proteine wurde AB31 (WT) ohne HA-Fusionsprotein verwendet. Die Auswirkungen der *num1* Deletion auf den NTC sollten anhand des Vergleichs der beiden Stämme AB31 $\Delta$ *num1*;prp19:3xha und AB31prp19:3xha untersucht werden. Die Behandlung aller drei Stämme erfolgte identisch, wie in 6.1 beschrieben. Nach der Immunpräzipitation wurden die Proben auf ein 10%iges Polyacrylamidgel geladen. Die Gelstücke der 1,5 bis 2 cm eingelaufenen Proteine wurden anschließend ausgeschnitten, die darin enthaltenen Proteine mit Trypsin verdaut und die entstandenen Peptide extrahiert. Die massenspektroskopische Analyse der heterogenen Peptidgemische wurde von unseren Kooperationspartnern der Georg-August Universität in Göttingen durchgeführt (O. Valerius, GH. Braus). Die Identifizierung der Peptidsequenz und der Abgleich der sequenzierten Peptide auf das Proteom von *U. maydis* geschah mithilfe der Proteom Discoverer Software (Thermo Fisher). Die Peptidabfrage wurde dabei anhand der Sequest- und des Mascot- Algorithmen durchgeführt. Es wurden nur Peptide einbezogen, welche in beiden Abfragen mit hoher Sicherheit identifiziert wurden. Nur Proteine mit einer Mindestgesamtpeptidmenge von zwei wurden berücksichtigt. In der Kontrolle (AB31) konnten mit diesen Parametern 325 Proteine identifiziert werden. In AB31prp19:3xha und AB31 $\Delta$ *num1*;prp19:3xha waren es mit 664 und 583 Proteinen ungefähr doppelt so viele. Lediglich 17 der in der Kontrolle identifizierten Proteine wurden ausschließlich in dieser gefunden. Die übrigen 308 Proteine traten auch in den beiden (285) oder einzelnen (23) anderen Proben auf. Zieht man die Kontrolltreffer ab, so wurden in den Proben AB31prp19:3xha und AB31 $\Delta$ *num1*;prp19:3xha überschneidende 227 Proteine gefunden. Exklusiv wurden für die Proben 131 bzw. 69 Proteine identifiziert (**Abbildung 22 A**).

Eine identisch durchgeführte Immunpräzipitation mit Num1:3xHA und der entsprechenden unmarkierten Kontrolle (AB31) führte zu einer bereinigten Liste von 453, mit Num1:3xHA co-immunpräzipitierten Proteinen (**Abbildung 22 B**).

Die genauere Auswertung der potentiellen Interaktionspartnern erfolgt in 2.5.3 bis 2.5.6.



**Abbildung 22: Venn-Diagramm der durch Massenspektroskopie identifizierten Proteine. (A)** Vergleich der, mit Prp19:3xHA immunpräzipitierten Proteine im WT (*AB31prp19:3xha*)- und im  $\Delta num1$  (*AB31Δnum1;prp19:3xha*)-Hintergrund. Als Kontrolle diente die Immunpräzipitation im ungetaggten Stamm AB31. **(B)** Vergleich der immunpräzipitierten Proteine im ungetaggten Stamm AB31 und dem Stamm *AB31prp19:3xha*. Überschneidende Proteinmengen sind in den sich überschneidenden Kreisbereichen angegeben. Es wurden nur solche Proteine eingerechnet, deren Gesamtpeptidmenge mindestens zwei betrug. Es wurden nur Peptide mit einer hohen Peptid Confidence (Fehlerrate max. 1% pro Peptid) verwendet. Die Peptidbestimmung erfolgte mithilfe der Mascot und Sequest-Algorithmen in der Proteom Discoverer Software (Thermo Fisher).

### 2.5.2 Anreicherung und Untersuchung der zytoplasmatischen Proteinfraction

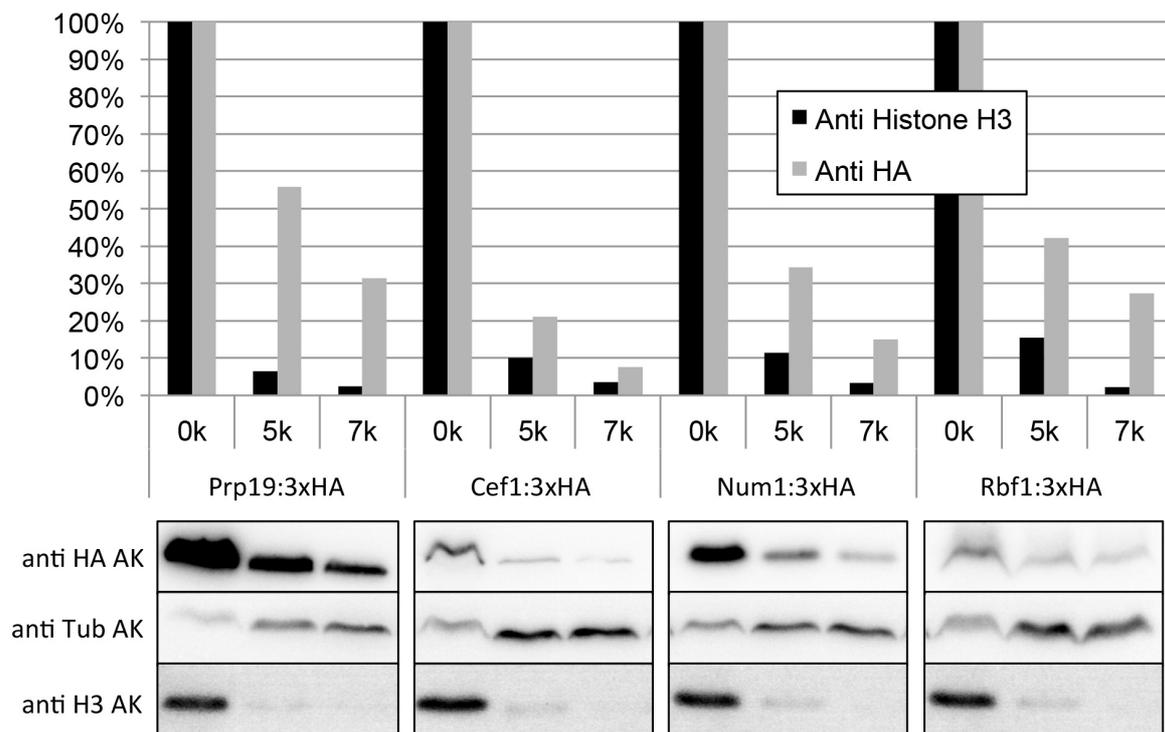
Es wurde bereits postuliert, dass Num1 ein integraler Bestandteil des NTC ist (1.6). Gleichzeitig ist die Interaktion mit dem zytoplasmatischen Motorprotein Kin1 bekannt (1.7). Bisher ist unklar, wie diese NTC-assoziierte Funktion mit der zytoplasmatischen Lokalisierung und der Interaktion mit Kin1 zusammenhängt.

Um einen exklusiven Blick auf diese zytoplasmatische Num1-Funktion zu erhalten, sollte ein Protokoll zur Aufreinigung der zytoplasmatischen Proteinfraction von *U. maydis* etabliert werden. Im endgültigen Protokoll erfolgte der Zellaufschluss in einem osmotisch stabilisierenden Zellkernextraktionspuffer. Es wurden 500 ml einer exponentiell wachsenden Kultur mit einer  $OD_{600}$  von 0,8 bis 1 pelletiert und für den Aufschluss in 5 ml Endvolumen verwendet. Nach dem Zellaufschluss wurde das Lysat bei 7 000 Upm abzentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde anschließend direkt für co-Immunpräzipitations-Experimente eingesetzt (4.5.2). Zur Ermittlung der korrekten Zentrifugiergeschwindigkeit kamen vier verschiedene Stämme zum Einsatz. Sie exprimierten jeweils eines der HA-Fusionsproteine Prp19:3xHA, Cef1:3xHA, Num1:3xHA oder Rbf1:3xHA. Die Expression der entsprechenden Gene erfolgte dabei jeweils unter dem nativen Promotor *in locus*.

Mindestens der Transkriptionsfaktor Rbf1:3xHA sollte nahezu ausschließlich im Zellkern lokalisieren und stellt dadurch eine Kontrolle für zerstörte Zellkerne da. Zusätzlich sollte die

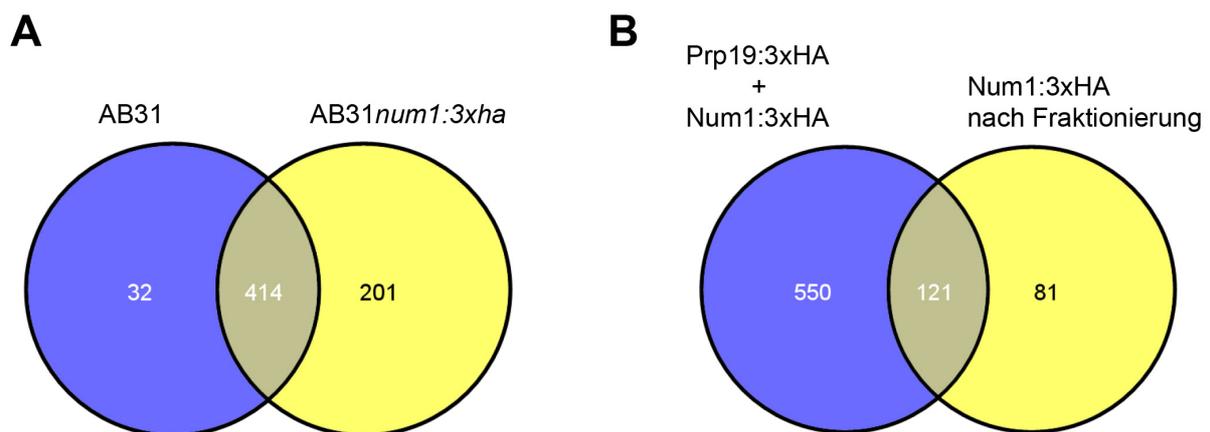
An- bzw. Abwesenheit von Chromatin mithilfe eines anti-H3 (Histon H3)-Antikörpers gezeigt werden. Die jeweiligen Proteine wurden im Western Blot nachgewiesen.

Wie in Abbildung 23 zu sehen ist, war bereits nach einer Zentrifugierung bei 7 000 Upm nur noch sehr wenig Histon-H3 im Überstand nachzuweisen. Auch die Proteinmengen der getesteten Fusionsproteine konnte auf 20-34% der Gesamtmenge reduziert werden. Durch Proteinbestimmungen mittels BCA-Färbung (Pierce / Thermo Fisher) wurde sichergestellt, dass eine vergleichbare Menge an Gesamtprotein für Polyacrylamid-Gel und Western Blot eingesetzt wurde. Zusätzlich wurden die Proteinlevel anhand der Signalstärke eines anti-Tubulin-Antikörpers normalisiert. Die Ergebnisse deuten auf eine Anreicherung der zytoplasmatischen Proteinfraction durch die beschriebene Methode hin. Der Aufschluss eines geringen Teils der Zellkerne konnte jedoch nicht vollständig vermieden werden. Die Intensität der Western Blot Signale erfolgte mithilfe der Image J Software. Die Zentrifugierung des Rohlysats mit höheren Geschwindigkeiten als 7 000 Upm führte zu keiner Änderung der Proteinmengen.



**Abbildung 23. Anreicherung der zytoplasmatischen Proteinfraction von *U. maydis*.** Sporidien wurden in einer French Press in osmotisch stabilisierenden Aufschlusspuffer aufgeschlossen. Anschließend wurde das Rohlysats mit 5 000 und 7 000 Upm zentrifugiert. Es wurden jeweils gleiche Proteinmengen des Rohlysats und der beiden Überstände (aus Zentrifugierung) in einem 10% Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Der Nachweis der Fusionsproteine Prp19:3xHA, Cef1:3xHA, Num1:3xHA und Rbf1:3xHA erfolgte mit anti-HA Antikörpern. Als Kontrollen dienten Histon H3 und Tubulin. Der Nachweis der Kontrollproteine erfolgte mithilfe von anti-H3 und anti-Tub Antikörpern. Alle in Image J gemessenen Intensitäten der gezeigten Banden wurden mit dem Tubulin Signal normalisiert. Die schwarzen Balken im Diagramm geben die verbleibende H3 Menge im Bezug auf das Rohlysats (0k) an. Die grauen Balken im Diagramm geben die verbleibenden Mengen des jeweiligen HA-Fusionsproteins im Bezug zum Rohlysats an. 0k, 5k und 7k steht jeweils für die Zentrifugiergeschwindigkeit x1000.

Nach der Fraktionierung des Stamms AB31*num1:3xha* und einer WT Kontrolle (AB31) wurden die Überstände der 7 000 Upm Zentrifugierung jeweils für eine Immunpräzipitation eingesetzt (4.5.2). Die massenspektroskopische Untersuchung der präzipitierten Proteine wurde identisch zu 2.5.1 durchgeführt. Es konnten 615 Proteine ermittelt werden, welche mit Num1:3xHA in der zytoplasmatischen Fraktion co-präzipitieren. Von diesen 615 wurden 414 auch in der AB31-Kontrolle identifiziert (Abbildung 24 A). Nach den Präzipitationen von Prp19:3xHA (in AB31- und  $\Delta num1$ -Hintergrund) und Num1:3xHA wurde insgesamt eine Liste von ungefähr 670 Proteinen identifiziert. Vergleicht man diese Liste mit den 200 Proteinen aus der Fraktionierung, welche gleichzeitig nicht in der Kontrolle gefunden wurden, so erhält man eine Liste von 81 Proteinen, welche exklusiv in der Num1:3xHA Immunpräzipitation der zytoplasmatischen Fraktion identifiziert wurden (Abbildung 24 B). Jedoch konnten nur wenige passende Peptide für diese 81 Proteine identifiziert werden. So wurden für 77 der 81 Proteine jeweils nur Gesamtpeptidmengen unter 10 ermittelt. Alle stark vertretenen Proteine überschneiden sich mit denen aus den vorangegangenen Experimenten. Eine genauere Auswertung der potentiellen Interaktionspartner erfolgt in 2.5.3 bis 2.5.6.



**Abbildung 24: Venn-Diagramm zu den massenspektroskopischen Ergebnissen nach zytoplasmatischer Fraktionierung.** (A) Vergleich der immunpräzipitierten Proteine im WT (AB31)- und in AB31*num1:3xha*. Der ungetaggte Stamm AB31 diente dabei als Kontrolle. (B) Vergleich der immunpräzipitierten Proteine aller vorhergehenden Immunpräzipitationen (abzüglich Kontrolle) mit der Präzipitation von Num1:3xHA in der zytoplasmatischen Proteinfraction. Überschneidende Proteinmengen sind in den sich überschneidenden Kreisbereichen angegeben. Es wurden nur solche Proteine eingerechnet, deren Gesamtpeptidmenge mindestens zwei betrug. Es wurden nur Peptide mit einer hohen Peptid Confidence (Fehlerrate max. 1% pro Peptit) verwendet. Die Peptidbestimmung erfolgte mithilfe der Mascot und Sequest-Algorithmen in der Proteom Discoverer Software (Thermo Fisher).

### 2.5.3 Aufbau des NTC in *U. maydis*

Wie bereits in (1.6) erwähnt kann der Spleißosom-assoziierte NTC in Hefe und Mensch auf 10 Proteine reduziert werden, welche in den Komplexen beider Organismen vertreten sind (Fabrizio *et al.*, 2009; Makarova *et al.*, 2004; Ohi *et al.*, 2002). Um das Vorhandensein bzw. die Zusammensetzung des NTC in *U. maydis* zu überprüfen wurden die Gesamtpeptidmengen der 10 bekannten NTC Komponenten aus Mensch und Hefe in den Ergebnissen der massenspektroskopischen Analysen ermittelt (Tabelle 2). Alle 10 Proteine besitzen putative Homologe in *U. maydis*. Diese wurden mit Prp19:3xHA und Num1:3xHA co-immunpräzipitiert und weisen hohe Gesamtpeptidmengen auf. Wie zu erwarten, wurden in  $\Delta num1$  keine, zu Num1 passenden Peptide identifiziert. Die Tatsache, dass sowohl nach Immunpräzipitation mit Num1:3xHA als auch mit Prp19:3xHA alle bekannten NTC-Komponenten zu den meistvertretenen Proteinen zählen, deutet auf eine primäre Funktion von Num1 innerhalb des NTC hin.

**Tabelle 2: Die 10 überlappenden NTC-Komponenten von Mensch und Hefe und ihre jeweiligen Homologe und deren Gesamtpeptidmengen in *U. maydis*.** Präzipitiert wurde mit Prp19:3xHA und Num1:3xHA. In den jeweiligen Kontrollen wurden keine Peptide der aufgeführten Proteine identifiziert.

<i>S. cerevisiae</i>	<i>H. sapiens</i>	<i>U. maydis</i>	PSM** nach HA Immunpräzipitation			
			Prp19	Prp19 in $\Delta num1$	Num1	Num1 in zytopl.
Prp19	PRP19	Um10027/Prp19	344	358	362	314
Syf1	SYF1	Um03842	148	81	341	223
Isy1	ISY1	Um01323	25	10	70	101
Cef1	CDC5L	Um04411/Cef1	103	60	217	239
Prp46	PRL1	Um11036/Prp1	54	32	114	84
Snt309*	SPF27	Um01682/Num1	55	--	112	188
Cwc15	CWF15	Um10535	12	9	14	23
Clf1	SYF3	Um02676	85	47	245	186
Syf2	SYF2	Um11427	25	18	29	50
Cwc2	CWC2	Um12203	53	28	153	152

\*kein Homolog \*\*Gesamtmenge der Peptide pro Protein (peptide spectrum match)

In *S. cerevisiae* konnten mindestens 26 NTC assoziierte Proteine identifiziert werden (Ohi *et al.*, 2002). Darunter befinden sich auch die 10 Komponenten aus Tabelle 2, welche essentiell für den Spleiß-Prozess sind. Um einen direkten Vergleich der in *U. maydis* präzipitierten Proteine mit dem vollständigen Hefe-NTC durchzuführen, wurden die Gesamtpeptidmengen der homologen Proteine ermittelt. Für Ntc20p konnte kein Homolog in *U. maydis* gefunden werden. Bis auf die Hefe-Komponenten Slu7p und Cwc16p konnte für jedes vorhergesagte *U. maydis* Homolog eine signifikante Peptidmenge nachgewiesen werden. In Abwesenheit von Num1 blieben die identifizierten NTC-Komponenten größtenteils identisch, bis auf Smx3p, für dessen Homolog Um12130 kein Peptid nachgewiesen werden konnte (Tabelle 3). Snt309p hat Num1 im NTC nur funktionell ersetzt, ist jedoch kein Homolog.

Es ist bekannt, dass der Aufbau des NTC im Menschen höchst heterogen ist. Der Komplex durchläuft während des Spleiß-Prozesses massive Veränderungen seiner Proteinzusammensetzung. In unabhängigen Studien konnten mindestens drei Prp19-ähnliche Komplexe identifiziert werden (Tabelle 4). So wurde der Prp19-Komplex je nach Spleißphase in Prp19/CDC5L und einen Prp19-assoziierten Komplex unterteilt. Dabei betritt der Prp19-assoziierte Komplex das Spleißosom beim Übergang von Komplex A zu B (Makarova *et al.*, 2004). Zum anderen wurde durch Immunpräzipitation mit dem hXAB2 Protein auch hPRP19 als Teil des XAB2-Komplexes identifiziert. Dieser XAB2 Komplex erfüllt Funktionen in der DNA-Reparatur, der Transkription und beim Spleißen. Alle seine Komponenten gelten als Spleißosom-assoziiert (Kuraoka *et al.*, 2008). Es bleibt unklar was die Funktionen aller einzelnen Komponenten sind und ob sich dadurch die Funktionen der einzelnen Komplexe überschneiden.

Um auch die Vielzahl an humanen Unterkomplexen in die vorliegenden Analysen mit einzubeziehen, wurden die Hauptkomponenten des NTC in Tabelle 4 nebeneinander gestellt. Bei der Immunpräzipitation mit Prp19:3xHA und Num1:3xHA in *U. maydis* wurden neben den Homologen der meisten Hefe NTC-Komponenten auch die Homologen der humanen NTC-Komponenten co-präzipitiert. Jedoch wurde der Vergleich, vor allem zum Menschen teilweise dadurch erschwert, dass für einige Komplexkomponenten keine eindeutigen Homologe in *U. maydis* ermittelt werden konnten. Trotzdem wird deutlich, dass nach Immunpräzipitation mit Prp19:3xHA und Num1:3xHA nahezu alle bekannten NTC-Komponenten aus Mensch und Hefe identifiziert werden konnten. Es fällt in Tabelle 3 und Tabelle 4 auf, dass hBUD31 bzw. Cwc14p nur in Anwesenheit von Num1 co-präzipitiert wurde. Weiter ist zu erwähnen, dass das mögliche *U. maydis* Homolog von GCIP (cyclin-D1-binding protein) nur mit Prp19:3xHA co-Präzipitiert. Dies lässt vermuten, dass GCIP NTC unabhängig mit Prp19 interagiert.

**Tabelle 3: Bekannte NTC Komponenten und deren Homologe in *U. maydis*.** Präzipitiert wurde mit Prp19:3xHA und Num1:3xHA. In den jeweiligen Kontrollen wurden keine Peptide der aufgeführten Proteine identifiziert.

No.	<i>S. cerevisiae</i> (Ohi et al., 2002)	<i>U. maydis</i>	PSM** nach HA Pull-Down				<i>S. cerevisiae</i> Funktion oder Motif (Ohi et al., 2002)
			Num1	Num1 in zytopl.	Prp19	Prp19 in $\Delta$ num1	
1	Cef1p (Q03654)	um04411/Cef1	217	239	103	60	Notwendig zum Spleißen; Myb repeats
2	Prp46p/Cwc1p (Q12417)	um11036/Prp1	114	84	54	32	WD-40 repeats
3	Cwc2p (CAA98787)	um12203	153	152	53	28	RRMd Domäne
4	Syf1p (Q04048)	um03842	341	223	148	81	Notwendig zum Spleißen; TPR repeats
5	Clf1p (Q12309)	um02676	245	186	85	47	Notwendig zum Spleißen; TPR repeats
6	Ecm2p (P38241)	um00667	49	61	16	14	Spleißfaktor; RRM domain
7	Prp8p (P33334)	um10807	682	104	306	157	Spleißfaktor, S-phase progression, U5 snRNP protein; polyproline domains
8	Prp19p (P32523)	um10027/Prp19	362	314	344	358	Spleißfaktor, U box, WD-40 repeats
9	SmD2p (Q06217)	um04781	70	63	17	6	Core Sm Protein
10	Snu114p (P36048)	um02868	445	383	196	114	U5 snRNP Komponente; GTP-Bindedomäne
11	Isy1p/Ntc30p (P21374)	um01323	70	101	25	10	Spleißfaktor, Y2H Interaktion mit Syf1p, Syf3p und Cef1p
12	Snt309p/Ntc25p (Q06091)	um01682/Num1*	112	188	55	--	Spleißfaktor
13	Ntc20p (P38302)	--	--	--	--	--	Spleißfaktor
14	Lea1p (Q08963)	um04654	34	98	47	18	U2A Protein, Teil des U2 snRNP
15	Msl1p (P40567)	um11178	33	51	28	19	U2 snRNP Komponente
16	Brr2p (P32639)	um03738	123	--	210	102	Notwendig zum Spleißen, U5 snRNP; DEAD/DEAH RNA Helikase
17	Slu7p (Q02775)	um04951	--	--	--	--	3' splice choice in 2nd stepin splicing
18	Syf2p (P53277)	um11427	29	50	25	18	Y2H Interaktion Syf1p, Syf3p, und Cef1p
19	Prp17p/Cdc40p (P40968)	um04752	211	142	89	43	Spleißen, G2/M progression; WD-40 repeats
20	Prp45p (P28004)	um02618.2	65	78	40	19	SNW und Polyproline Domäne, SH2-ähnliche Domäne
21	Smx3p (P54999)	um12130	13	25	4	--	Core Sm Protein
22	SmB1p (P40018)	um12244	84	91	32	16	Core Sm Protein
23	SmD3p (P43321)	um11043	56	115	33	7	Core Sm Protein
24	Cwc14p (P25337)	um10057	22	37	16	--	Hypothetisches Protein; potentielle NLS; putativer Zinkfinger
25	Cwc15p (Q03772)	um10535	14	23	12	9	Hypothetisches Protein
26	Cwc16p /Yju2 (P28320)	um11557	--	--	--	--	Hypothetisches Protein

\*kein Homolog \*\*Gesamtmenge der Peptide pro Protein (peptide spectrum match)

**Tabelle 4: Die Hauptkomponenten des NTC in Hefe und Mensch und deren Homologe in *U. maydis*.** Präzipitiert wurde mit Prp19:3xHA und Num1:3xHA. Wenn nicht anders vermerkt wurden in den jeweiligen Kontrollen keine Peptide der aufgeführten Proteine identifiziert.

<i>S. cerevisiae</i> (Fabrizio et al., 2009)	<i>H. sapiens</i>			<i>U. maydis</i>	PSM** nach HA Pull-Down			Num1 in zytopl.
	PRP19/CDC5L (Makarova et al., 2004)	PRP19-assoziert (Makarova et al., 2004)	XAB2 (Kuraoka et al., 2008)		Prp19 IP	Prp19 IP in $\Delta num1$	Num1	
Prp19p	PRP19/PSO4		PRP19/PSO4	Um10027	344	358	362	314
Syf1p		XAB2/SYF1	XAB2/SYF1	Um03842	148	81	341	223
Isy1p		ISY1	ISY1	Um01323	25	10	70	101
Cef1p	CDC5L			Um04411	103	60	217	239
Prp46p	PRL1/PRP46			Um11036	54	32	114	84
Snt309p***	SPF27			Um01682	55	-	112	188
Cwc15p	CWF15			Um10535	12	9	14	23
Cif1p		SYF3		Um02676	85	47	245	186
Syf2p		SYF2		Um11427	25	18	29	50
Cwc2p		CWC2		Um12203	53	28	153	152
Ntc20p				--	--	--	--	--
Yju2p				--	--	--	--	--
-		PPIE/CypE	PPIE/CypE	Um03941*	13	6	16	4
-		hAquarius/fSAP164	hAquarius/fSAP164	Um11428	10	--	5	--
-			CCDC16/ZNF830	Um06193*/ Um02056*	--	--	--	--
-	CTNNB1			Um15050*	7	6	11	2
-	HSP73			Um10526*/Um03791*/Um14034*	In Kontrolle	In Kontrolle	In Kontrolle	In Kontrolle
-		Prp45/SKIP		Um02618.2	40	19	65	78
-		G10/BUD31		Um10057	16	-	22	37
-		CCDC12		Um06036*	20	7	48	59
-		PIL1/CYPL1		Um11882	31	5	61	56
-		GCIP		Um00372*	4	9	--	--
-		MGC23918		Um06036	20	7	48	59
-		KIAA0560		Um11428	10	--	5	--

\*Nur geringe Sequenzhomologie oder mehrere Homologe; \*\* Gesamtmenge der Peptide pro Protein (petide spectrum match); \*\*\*kein Homolog

#### 2.5.4 Num1 und der NTC nehmen Einfluss auf die DNA-Reparatur

Wie bereits erwähnt, sind der NTC und einige seiner Komponenten für ihre Funktion in weiteren zellulären Prozessen, neben dem Spleißen, bekannt (siehe 1.6) (zusammengefasst in Chanarat und Strasser, 2013). Einer dieser Prozesse ist die DNA-Reparatur bzw. die Genom Instandhaltung („Genome maintenance“). Um ähnliche Funktionen des NTC und seiner assoziierten Komponenten in *U. maydis* zu belegen, wurden die Ergebnisse der Massenspektroskopie in Hinblick darauf betrachtet. Gesucht wurde anhand bekannter DNA-Reparatur-Proteine aus anderen Organismen. Zusätzlich konnten Kandidaten anhand ihrer vorhergesagten Funktion in *U. maydis* gefunden werden. Die dadurch identifizierten Proteine sind in Tabelle 5 dargestellt. Die Proteine Syf1 und Clf1 sind Bestandteile des konservierten NTC und konnten schon in anderen Organismen mit den oben genannten Funktionen in Verbindung gebracht werden (Fousteri *et al.*, 2006; Nakatsu *et al.*, 2000; Zhu *et al.*, 2002). Alle übrigen Proteine weisen meist nur geringe Peptidmengen auf. Dies lässt vermuten, dass sie nur in geringer Menge mit Prp19:3xHA und Num1:3xHA co-präzipitieren. Was wiederum an einer schwachen Interaktion mit dem NTC oder an einer geringen Proteinmenge liegen kann. Des Weiteren können die idealen Kultivierungsbedingungen dazu führen, dass nur verhältnismäßig wenige Proteine der DNA Reparatur und Genom Instandhaltung in der Zelle benötigt werden. Passende Peptide für Rpb3, Rpb8, Snf3 und Mot1 wurden ausschließlich nach der Präzipitation mit Num1:3xHA identifiziert, was ein Hinweis auf eine zusätzliche Funktion von Num1 in der DNA-Reparatur hindeutet. Alle in Tabelle 5 identifizierten Proteine werden in der Diskussion näher behandelt.

**Tabelle 5: Co-immunpräzipitierte Proteine der DNA-Reparatur und Genom Instandhaltung.** Präzipitiert wurde mit Prp19:3xHA und Num1:3xHA.

Accession	PSM* nach HA Pull-Down				Name	Funktion
	Num1	Prp19	Prp19 in $\Delta num1$	Num1 in zytopl.		
um03624	2	2	4	4	Mms19	NER und Transkription
um05403	9	5	4	32	PCNA	Metnase bindendes Protein
um05156	2	10	2	5	Rfa1	Bindet DNA-Einzelstränge
um03863	40	16	4	22	Rpo21	DNA-Polymerase II Untereinheit
um10429	24	11	12	30	Rpb2	DNA-Polymerase II Untereinheit
um03550	8	--	--	--	Rpb3	DNA-Polymerase II Untereinheit
um04460	4	--	--	--	Rpb8	DNA-Polymerase II Untereinheit
um11301	4	--	--	--	Snf3	vermutlich CSC Homolog / Transkription-gekoppelte Reparatur
um04230	4	--	--	--	Mot1	vermutlich CSC Homolog / Transkription-gekoppelte Reparatur
um03290	--	--	--	3	Rad51	DSB Reparatur
um03025	--	5	--	--	Msh2	DNA Reparatur (alle Arten)
um03842	341	148	81	223	Syf1	Teil des NTC mit Verbindung zur DNA-Reparatur
um02676	245	85	47	186	Clf1/Syf3	Cell cycle progreseion und DNA-Replikation

\* Gesamtmenge der Peptide pro Protein (petide spectrum match)

### 2.5.5 Die Identifizierung von Proteasom-Komponenten

Das Prp19-Protein ist wohl das am besten untersuchte Protein des NTC. Außer seiner Funktion im NTC werden Prp19 zusätzlich vielfältige andere Aufgaben zugesprochen. Dabei bleibt oft unklar, ob die jeweiligen Funktionen durch andere NTC-Komponenten oder durch Prp19 selbst erfüllt werden. Das Prp19-Protein besitzt eine Ubiquitinligase (E3)-Aktivität und es interagiert in Maus und Mensch mit dem Proteasom (Loscher *et al.*, 2005; Sihn *et al.*, 2007). Bei der Immunpräzipitation wurden, neben Prp19, mindestens 18 Proteine gefunden, die Teil des Abbauweges bzw. Ubiquitinierungsweg von Proteinen sind. Wiederum 11 dieser Proteine sind Komponenten des Proteasoms (Tabelle 6). Die aufgeführten Proteine deuten auf eine Involvierung des NTC bzw. der Proteine Num1 und Prp19 in der Degradierung von Proteinen in *U. maydis* hin. Die in Tabelle 6 aufgeführten Proteine und ihre einzelnen Funktionen werden in der Diskussion näher ausgeführt.

**Tabelle 6: Co-immunpräzipitierte Proteine der Proteindegredierung.** Präzipitiert wurde mit Prp19:3xHA und Num1:3xHA.

Accession	PSM* in HA Pull-Down				Name	Funktion
	Num1	Num1 in zytopl.	Prp19	Prp19 in $\Delta num1$		
um10459	35	45	25	19	Rpt3	Komponente des 19S Proteasoms (Basis)
um11291	25	50	22	22	Rpt4	Komponente des 19S Proteasoms (Basis)
um02562	24	33	15	14	Rpt2	Komponente des 19S Proteasoms (Basis)
um00622	16	33	10	14	Rpt1	Komponente des 19S Proteasoms (Basis)
um00833	16	59	12	14	Rpt6	Komponente des 19S Proteasoms (Basis)
um11760.2	16	44	12	22	Rpt5	Komponente des 19S Proteasoms (Basis)
um02905	56	66	24	24	Rpn1	Komponente des 19S Proteasoms (Basis)
um04786	28	43	29	19	Rpn2	Komponente des 19S Proteasoms (Basis)
um03252	26	34	8	15	Rpn3	Komponente des 19S Proteasoms (Verschluss)
um10903	10	31	7	8	Rpn7	Komponente des 19S Proteasoms (Verschluss)
um00175	2	11	3	2	Rpn8	Komponente des 19S Proteasoms (Verschluss)
um04202	33	33	--	--	Ubp12	deubiquitinierendes Enzym
um02340	6	--	--	--	Ubp6	26s ADPase Aktivierung; verankert an RPN1
um00982	5	7	--	--	Ubc4	Histon Degradierung
um10487	4	21	3	--	Ubc13	Katalysiert die K63-verbundene Protein Polyubiquitinierung
um04518	10	--	--	--	Ufd4	bindet RPT4 und RPT6
um05564	14	17	7	2	probable Tom1	Histon Degradierung; E3 Ubiquitinligase
um03442	4	--	--	--	probable Tom1	Histon Degradierung; E3 Ubiquitinligase

\* Gesamtmenge der Peptide pro Protein (petide spectrum match)

## 2.5.6 Identifizierung von Transport-assoziierten Proteinen

Es konnte bereits gezeigt werden, dass das Num1 Protein nicht nur ein Teil des Spleißosom-assoziierten NTC ist. Die Interaktion mit Kin1 und die partielle Lokalisierung im Zytoplasma deuten auf eine weitere möglicherweise spleiß-unabhängige Funktion von Num1 im Zytoplasma hin (Kellner *et al.*, 2014). Durch die Immunpräzipitation mittels anti-HA gekoppelter Agarose von Prp19:3xHA und Num1:3xHA wurden zahlreiche Proteine co-präzipitiert, welche Einblicke in die Funktionsweise von Num1 im Zytoplasma und dessen Weg dorthin zulassen. In diesem Zusammenhang war es möglich Komponenten des mRNA Transports zu identifizieren. Zusätzlich wurden Teile der Kernpore und Komponenten des Zellkern-Imports und -Exports vorwiegend als potentielle Interaktoren von Num1 gefunden. Auch Bestandteile des Zytoskeletts wurden hauptsächlich mit Num1 co-präzipitiert. Aktin-assoziierte Proteine scheinen dabei ausschließlich mit Num1 zu interagieren, wohingegen Tubulin auch mit Prp19 interagiert. Auch Interaktionen mit Teilen der COPI- und COPII-Vesikelhüllen scheinen für Num1 und Prp19 zu bestehen. Das gleiche gilt für Komponenten der EE (early endosome)-Entstehung und des EE-Transports sowie für die Septine Cdc11 und Cdc12. Zytosolische Interaktionspartner von Num1 scheinen nach Immunpräzipitation in der zytoplasmatischen Proteinfraction stark angereichert zu sein (Tabelle 7). In der Diskussion wird näher auf die einzelnen Proteine eingegangen.

Tabelle 7: Transport-assoziierte Proteine, welche mit Prp19 und Num1 co-präzipitieren.

Accession	PSM* in HA Pull-Down				Name	Funktion
	Num1	Num1 in zytopl.	Prp19	Prp19 in $\Delta num1$		
<b>Zellkern Export/Import</b>						
um02524	41	9	19	27	Nup192	Kernpore (NPC)
um03813	19	7	9	10	Nic96	Kernpore (NPC)
um02855	2	--	--	--	Nup133	Kernpore (NPC)
um04795	5	--	--	--	Nup84	Kernpore (NPC)
um11634	8	13	--	--	Kap114	Karyopherin; Zellkern-Import
um04397	2	2	--	--	Kap104	Karyopherin; Zellkern-Import
<b>Bindung und/oder Transport von mRNA</b>						
um11511	6	14	10	10	Yra1	bindet mRNA; TREX
um03765	11	29	--	--	Dbp5	mRNP Umbau
um06211	20	--	4	5	Sto1	mRNA-Bindung und Transport
um03494	15	15	43	28	Pab1	mRNA-Bindung und Transport
<b>Zytoskelett-Komponenten und -assoziierte Proteine</b>						
um04218	16	24	--	--	Kin1	Kinesin
um00582	10	6	--	--	Sla2	Kontrolle des Zytoskelett-Aufbaus
um10558	32	46	12	20	Tub2	Beta-Tubulin
um05828	81	142	47	46	Tub2	Beta-Tubulin
um01221	67	133	37	34	Tub1	Alpha-1 Tubulin
um05715	11	13	--	--	Act1	Aktin
um05405	7	2	--	--	Arp2	Aktin-ähnlich
um04768	2	--	--	--	Sac6	Bündelung von Aktin-Filamenten; Fimbrin
<b>Vesikel-Komponenten und-Transport</b>						
um03361	25	17	19	19	Sec26	COPI Hülle

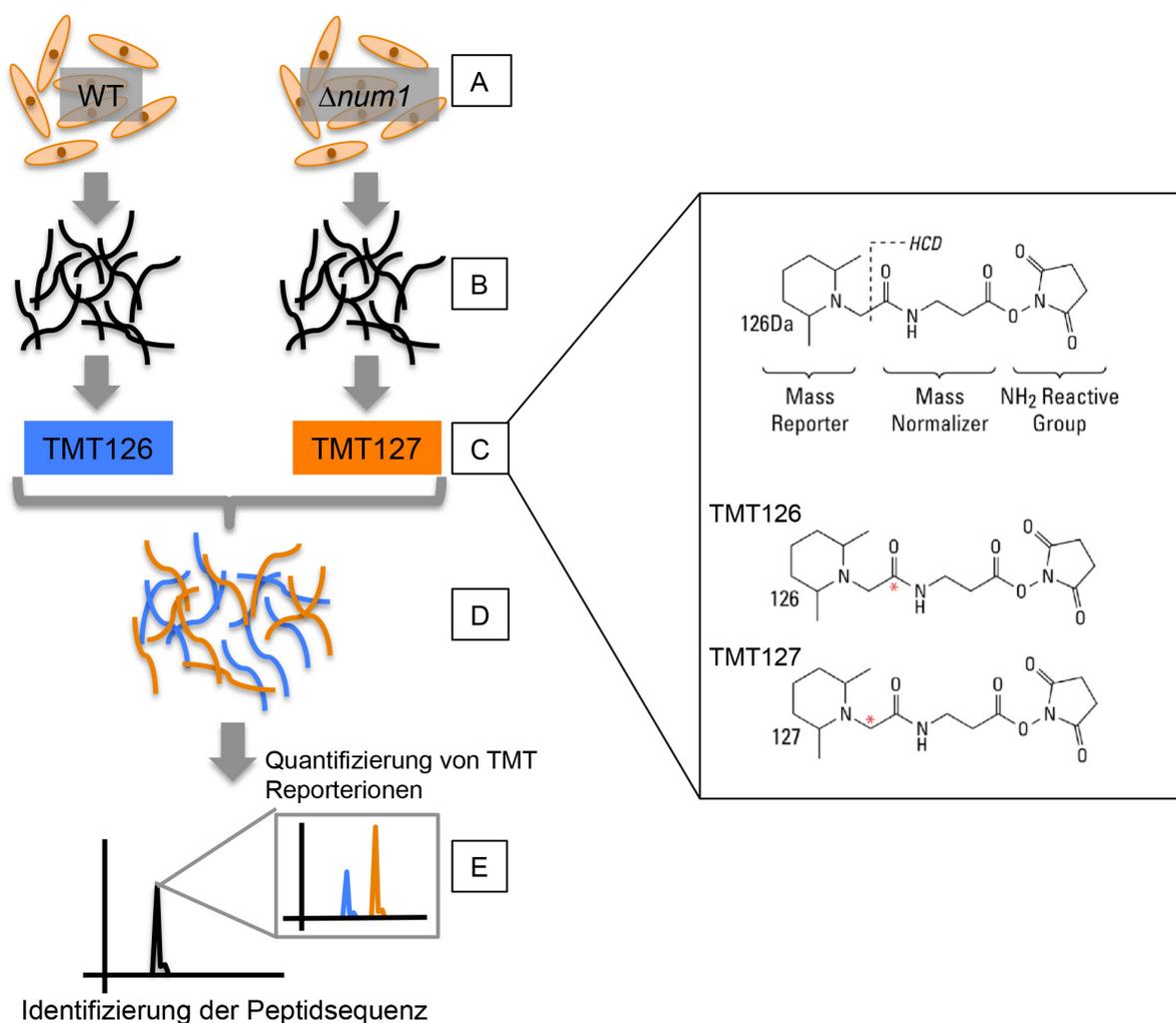
um11327	24	5	9	11	Sec27	COPI Hülle
um03209	12	--	12	12	Sec24	COPII Hülle
um05747	10	14	--	--	Sec31	COPII Hülle
um01284	8	--	--	--	Sec18	ER/Goligi Transport
um06175	8	--	--	--	Sec63	ER Protein-Import
um10195	6	--	--	--	Sec61	ER Protein-Import
um01624	22	3	15	17	Sec23	COPII Hülle
um03865	14	9	--	--	Sec4	Golgi/Exozyst Transport
um02245	12	20	10	10	Sec13	NPC; COPII Hülle
um00768	6	--	8	6	Sec21	COPI Hülle
um04173	27	--	30	35	Cop1	COPI Hülle
<b>EE Entstehung und Transport</b>						
um11937	3	4	--	--	Aps1	AP-1 Komplex; EE Entstehung und Transport
um00660.2	7	4	10	8	Apl4	AP-1 Komplex; EE Entstehung und Transport
um03921	70	68	67	92	Chc1	Clathrin; EE Entstehung und Transport
um10448	8	3	5	4	Apm1	AP-1 Komplex; EE Entstehung und Transport
<b>Septine</b>						
um03599	30	51	5	6	Cdc12	Septin
um03449	4	2	2	2	Cdc11	Septin

\* Gesamtmenge der Peptide pro Protein (petide spectrum match)

### 2.5.7 Stabilisierung des NTC durch Num1

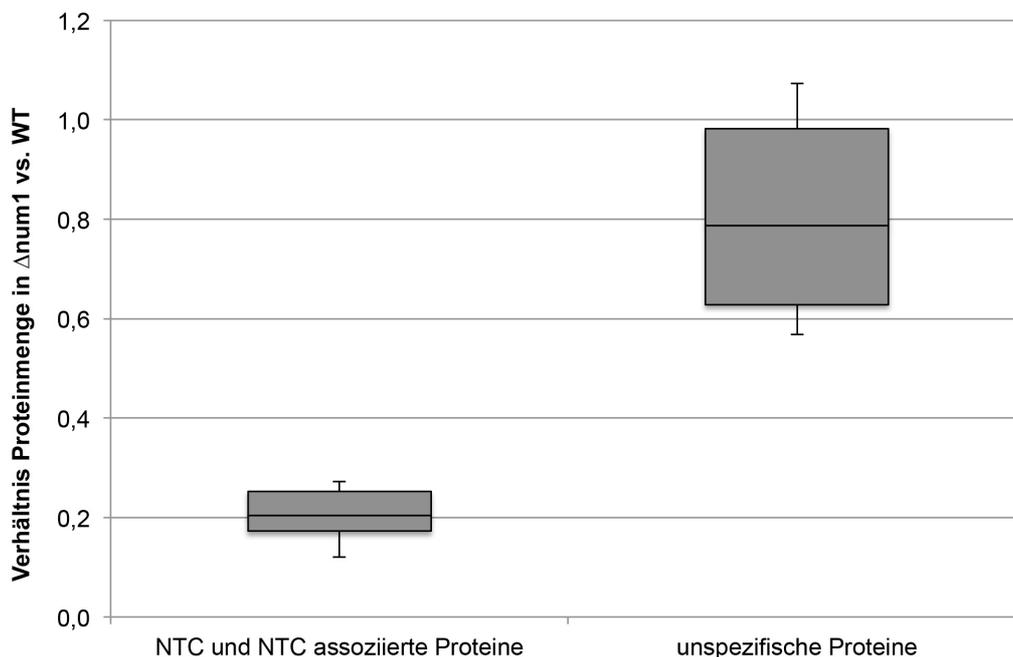
Bei den bisherigen Untersuchungen zum NTC in *U. maydis* (2.5.3) konnten keine gravierenden Unterschiede im Aufbau des NTC durch die Deletion von *num1* festgestellt werden. Vergleicht man die mit Prp19:3xHA co-immunpräzipitierten Proteine im WT (AB31)- und im  $\Delta num1$ -Hintergrund so unterscheiden sich die Proteinlisten nur geringfügig. Dies gilt vor allem für Komponenten und assoziierte Proteine des NTC (Tabelle 2 - 4). Wirft man jedoch einen genaueren Blick auf die Gesamtpeptidmengen in den unterschiedlichen Proben, so fällt auf, dass diese alle im  $\Delta num1$  Hintergrund stark herabgesetzt sind. Diese Werte lassen die Vermutung zu, dass die Abwesenheit des Num1-Proteins zwar keinen Einfluss auf die Zusammensetzung, dafür jedoch auf die Stabilität des Komplexes hat. Aufgrund der unterschiedlichen Komplexität und Zusammensetzung der Proben zählt die Abnahme der Gesamtpeptidmengen einzelner Proteine in unterschiedlichen massenspektroskopischen Untersuchungen jedoch nicht als Beweis für die Stabilisierung des NTC durch Num1. Die Quantifizierung von Proteinmengen in verschiedenen Proben lässt sich nur durch deren Kombination innerhalb eines einzelnen HPLC-MS Experiments durchführen. Um die Peptide aus unterschiedlichen Proben unterscheiden zu können, müssen diese unterschiedlich markiert werden. In der vorliegenden Arbeit wurden die Proteine aus WT (AB31)- und  $\Delta num1$ -Hintergrund mit sogenannten TMTs (tandem mass tags / Thermo Fisher) versehen. Nach der Präzipitation von, direkt oder indirekt mit Prp19:3xHA interagierenden Proteinen, wurden diese wie bereits beschrieben in einem

Polyacrylamidgel kurz aufgetrennt und im Gel mit Trypsin verdaut. Vor der massenspektroskopischen Untersuchung der Peptide wurden diese jeweils mit unterschiedlichen TMTs versehen und anschließend vereinigt. Die TMT126 und TMT127 Markierungen besitzen exakt die gleiche Masse, haben jedoch einen unterschiedlich „schweren“ Massenreporter (Abbildung 25 C). Im Laufe der massenspektroskopischen Analyse werden die Reporterionen abgespalten und gesondert erfasst. Wird dasselbe Peptid nun mehrfach detektiert, so kann anhand der abgespaltenen Massenreporter bestimmt werden wie viele dieser gleichen Peptide aus welcher Ausgangsprobe stammen (Abbildung 25 E).



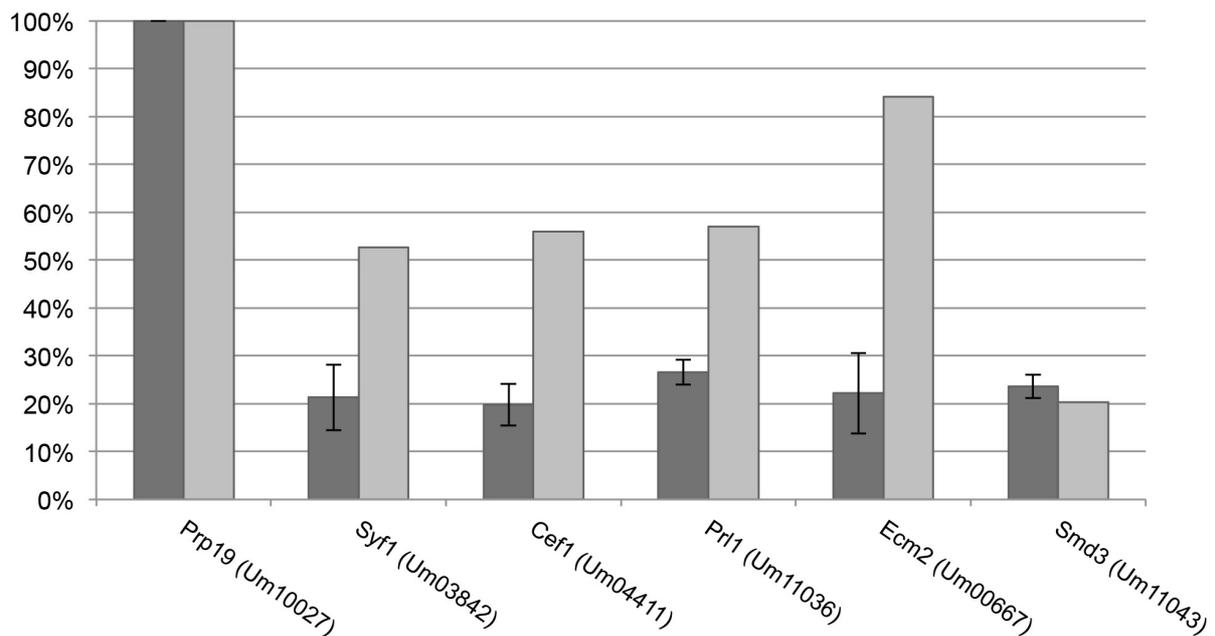
**Abbildung 25: Quantifizierung von Proteinmengen mithilfe von TMT labeling (Thermo Fisher).** (A) die Stämme AB31 (WT) und  $\Delta num1$  exprimieren jeweils Prp19:3xHA. Sie wurden getrennt von einander bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,8 bis 1 inkubiert. (B) Nach der Ernte wurde eine Immunpräzipitation mit anti-HA Agarose durchgeführt und die resultierenden Proteine im Gel mit Trypsin verdaut. (C) Die Peptidgemische werden jeweils mit einem TMT versehen. Diese bestehen aus einem Massenreporter, einem Massennormalisierer und einer reaktiven Gruppe zur Bindung an das Peptid. TMT126 und TMT127 haben die gleiche Masse und tragen an unterschiedlichen Stellen Isotope(\*). (D) Die markierten Peptide werden anschließend für die massenspektroskopische Analyse vereinigt. (E) Durch higher energy collision dissociation (HCD) werden die Massenreporter abgespalten und gesondert detektiert. Dadurch kann die Gesamtmenge eines Peptids den verschiedenen Ursprüngen zugeordnet werden. Bild C nach TMT mass Tagging Kits and Reagents Instructions von Thermo Fisher.

Um die Reproduzierbarkeit und Verlässlichkeit der Ergebnisse zu zeigen wurde der Versuch mit drei biologischen Replikaten durchgeführt. Die Behandlung der Ansätze erfolgte dabei identisch. Jeweils eine Immunpräzipitation im AB31 (WT)-Hintergrund wurde mit einer Immunpräzipitation im  $\Delta num1$ -Hintergrund verglichen. Die Normalisierung der Proteinmengen erfolgte mittels Prp19 (Peptidmenge). Anschließend wurde für jedes Protein jeweils der Mittelwert der drei Replikate ermittelt. Ein Boxplot verdeutlicht das Gesamtergebnis zweier Proteingruppen (Abbildung 26). Es kamen nur Proteine zum Einsatz, welche in mindestens zwei der drei Replikate eine Gesamtpeptidmenge größer 10 aufwiesen. Die zwei Gruppen ergaben sich durch die Aufteilung in NTC bzw. NTC assoziierte und in unspezifische Proteine. Die Gruppe der unspezifischen Proteine enthält dabei Proteine, welche bereits in den vorangegangenen Experimenten mit hoher Gesamtpeptidmenge in der ungetaggten WT Kontrolle vorgekommen sind. Alle übrigen Proteine waren Teil des NTC, NTC assoziiert oder Spleißosom-assoziiert und wurden in der zweiten Gruppe zusammengefasst (NTC und NTC assoziierte Proteine). In Abbildung 26 ist zu erkennen, dass die Proteinmengen von NTC und NTC-assoziierten Proteinen stark herabgesetzt sind, wohingegen die Proteinmenge der unspezifischen Proteine nahezu gleich bleibt. Dieses Ergebnis deutet auf eine Stabilisierung des NTC durch Num1 hin.



**Abbildung 26: Quantifizierung von Proteinmengen mit TMT-Quantifizierung.** Das Diagramm zeigt das Verhältnis von Proteinmengen aus den zwei Stämmen AB31 (WT) und AB31 $\Delta num1$  nach Prp19:3xHA Pull-Down, TMT-Markierung und Massenspektroskopie. Durch geringere Proteinmenge in  $\Delta num1$  entsteht ein Wert  $<1$ . Die Boxen beinhalten jeweils 70% der Proteine aus der jeweiligen Gruppe. Die Linie nach unten reicht zum Minimum der jeweiligen Gruppe und die Linie nach oben reicht zum Maximum der jeweiligen Gruppe. Die Linie in der Mitte zeigt den Median der jeweiligen Gruppe an. Die linke Box beinhaltet die 24 NTC und NTC assoziierte Proteine, welche die höchsten Gesamtpeptidmengen aufgezeigt haben. Die rechte Box beinhaltet die 22 unspezifischen Proteine mit den höchsten Gesamtpeptidmengen, welche auch nach HA-Pull-Down in der Kontrolle ohne Fusionsprotein identifiziert wurden. Das Proteinverhältnis von jedem Protein ergibt sich aus dem Mittel von drei unabhängigen biologischen Replikaten.

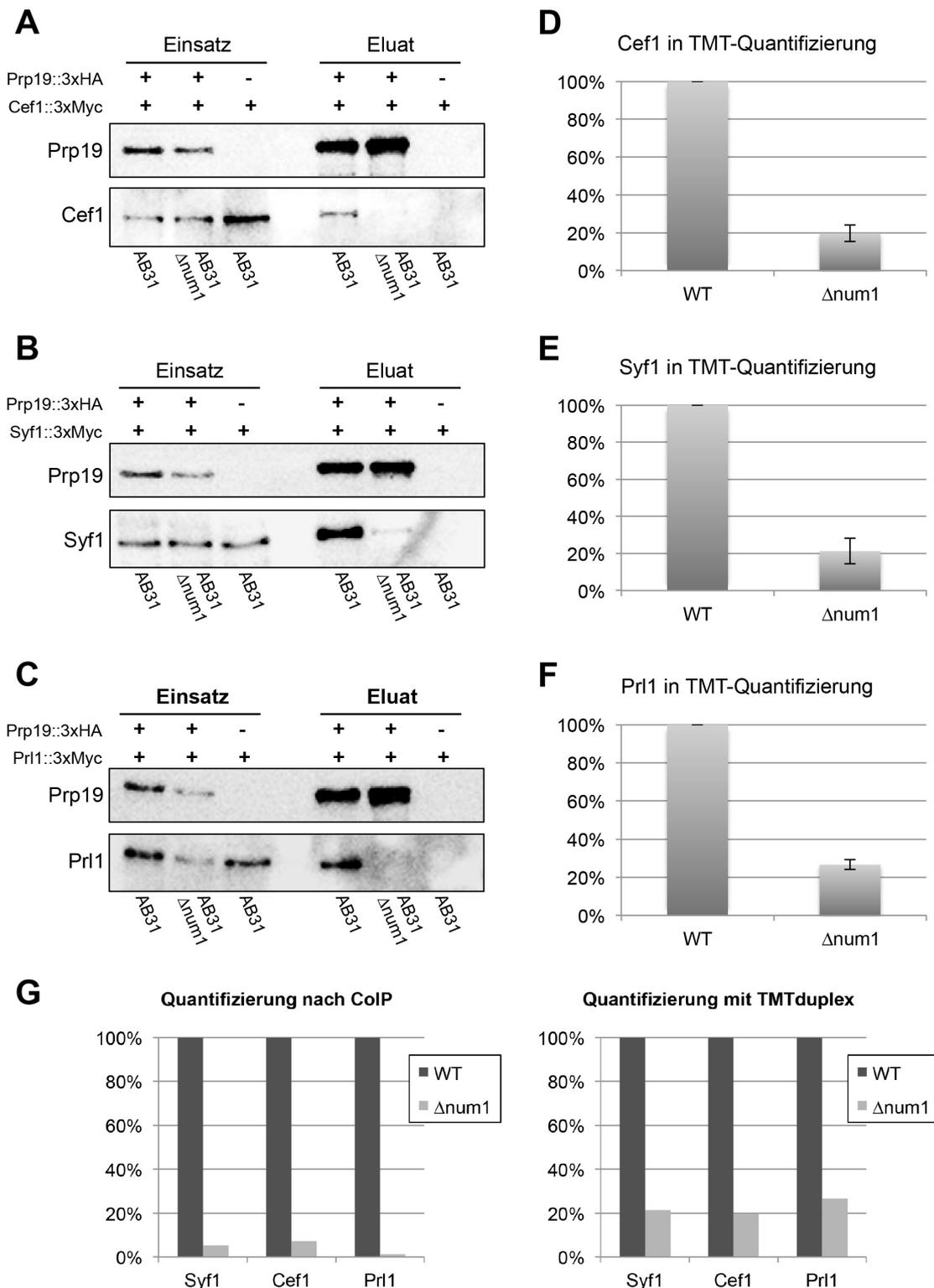
Wie bereits erwähnt können verschiedene massenspektroskopisch ermittelte Proteinlisten nur bedingt quantitativ miteinander verglichen werden. Die Peptidmengen in unterschiedlichen Läufen kann nur als Hinweis auf eine „echte“ Veränderung der Proteinmengen angesehen werden. Dies wird deutlich wenn man den Vergleich einzelner massenspektroskopischer Experimente im WT (AB31)- und im  $\Delta num1$ -Hintergrund und die direkte Quantifizierung mittels TMT-Markierung gegenüberstellt (Abbildung 27). Dazu wurden repräsentativ fünf Proteine miteinander verglichen. Die Abnahme der Proteinmenge von Syf1, Cef1 und Prl1 beträgt in den Unterschiedlichen HPLC-MS Experimenten 50 bis 60%. Dagegen konnte mittels TMT-Quantifizierung eine Abnahme auf 20 bis 30% ermittelt werden. Bei diesen drei Beispielen ist der Unterschied sehr konstant und es könnte behauptet werden, dass die Proteinmengen zueinander in einem ähnlichen Verhältnis stehen. Um zu zeigen, dass die Differenz nicht bei allen Proteinen gleich ist, wurde die Proteinmengenabnahme zweier weiterer Proteine aufgeführt (Ecm2 und Smd3). Diese Beispiele verdeutlichen, dass der Vergleich zweier unabhängiger Proben keinesfalls zu ähnlichen, lediglich höheren Proteinmengenabnahmen führt.



**Abbildung 27: Auswirkungen der *num1* Deletion auf einzelne, mit Prp19:3xHA co-präzipitierte Proteine.** Die hellgrauen Balken geben den Unterschied der Gesamtpeptidmengen im  $\Delta num1$ -Hintergrund verglichen mit dem WT (AB31) aus getrennten HPLC-MS Experimenten an. Die dunkelgrauen Balken geben den, durch TMT-Quantifizierung ermittelten Unterschied der Proteinmengen im  $\Delta num1$ -Hintergrund verglichen mit dem WT (AB31) an. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung aus drei unabhängigen biologischen Replikaten. Alle Protein- bzw. Peptidmengen wurden mit Prp19 normalisiert.

Um die Vermutung der NTC-Stabilisierung durch Num1 zu verifizieren, sollten die gewonnenen Ergebnisse mit einer weiteren Methode überprüft werden. Zu diesem Zweck wurde erneut Prp19:3xHA mithilfe von anti-HA Agarose präzipitiert und anschließend jeweils

eine von drei NTC-Komponenten im WT (AB31)- und im  $\Delta num1$ -Hintergrund nachgewiesen. Die Expression der drei Komponenten erfolgte jeweils in ihrem nativen Locus als Fusionsprotein mit einem 3xMyc-Tag. Als Kontrolle dienten Stämme welche die jeweilige 3xMyc Fusionsproteine der NTC-Komponente ohne Prp19:3xHA exprimieren. Der Zellaufschluss und die anschließende Co-Immunpräzipitation erfolgte wie im Material und Methoden Teil beschrieben (4.5.3). Es konnte gezeigt werden, dass alle getesteten NTC-Komponenten in der Co-Immunpräzipitation mit Prp19:3xHA interagieren (Abbildung 28 A bis C). Nach der Deletion von *num1* konnte jedoch nur noch sehr wenig (Abbildung 28 A und B) oder gar kein (Abbildung 28 C) nachweisbares Protein mehr co-präzipitiert werden. Die Abnahme der Proteinlevel ist dabei sogar noch gravierender als es in der TMT Analyse den Anschein hatte. Um dies zu verdeutlichen, wurden in Abbildung 28 D bis G die jeweiligen Ergebnisse aus der TMT-Quantifizierung aufgeführt. Somit bestätigen die Co-IP Ergebnisse die, durch die TMT-Quantifizierung gewonnenen Ergebnisse.



**Abbildung 28: Bestimmung der NTC-Stabilität in  $\Delta num1$  durch Co-IP und TMT-Quantifizierung. (A) bis (C)** Co-IP Experimente zur NTC-Stabilisierung durch Num1. Es wurden drei verschiedene NTC-Komponenten, als Fusionsprotein mit 3xMyc, im WT (AB31)- und im  $\Delta num1$ -Hintergrund mit Prp19:3xHA co-präzipitiert. Durch die Deletion von *num1* kommt es zu einer starken Abnahme der jeweiligen Fusionsproteinmenge. Als Kontrolle diente jeweils ein WT (AB31) Stamm, welcher ausschließlich das 3xMyc-Fusionprotein exprimiert. Der Nachweis erfolgte jeweils nacheinander auf einem Gel mit anti-HA (Sigma) und anti-Myc Antikörpern (Sigma). **(D) bis (E)** Ergebnisse aus der TMT-Quantifizierung für die gleichen drei NTC-Komponenten. WT Proteinlevel wurden jeweils auf 100% gesetzt. Die Abnahme der Proteinkonzentration in  $\Delta num1$  ergibt sich aus drei unabhängigen biologischen Replikaten. Die Standardabweichung der drei Proben wurde im rechten Balken angegeben. Die jeweiligen Proteinmengen wurden mit Prp19 normalisiert. **(G)** Gegenüberstellung der Proteinmengenabnahmen in Co-IP und in TMTduplex Experiment. Quantifizierung der Signalintensität im Co-IP Experiment erfolgte mit der Software ImageJ.

Insgesamt zeigen die vorliegenden Ergebnisse, dass *U. maydis* einen NTC besitzt, wie er bereits in anderen eukaryotischen Zellen beobachtet wurde. Dabei stabilisiert das Num1 den NTC als Di- bzw. Multimer. Es konnten zusätzliche Funktionen von NTC-Komponenten aufgedeckt werden und tiefere Einblicke in den Mechanismus geworfen werden, welcher die zusätzliche zytoplasmatische Lokalisierung von Num1 betrifft. mRNA- und Vakuolen-Transport bleiben weiterhin mögliche Funktionen von Num1.

### 3 Diskussion

Es ist bekannt, dass Num1 mit Komponenten des NineTeen Spleiß-Komplexes (NTC) und dem Kin1 Motorprotein interagiert. Die Deletion von Num1 führt zu einer reduzierten Spleiß-Effizienz und die betreffenden Filamente weisen eine defekte Polarität auf. Bisher bleibt offen, welche Deletionsphänotypen von der fehlenden Interaktion im NTC und welche von der fehlenden Interaktion mit Kin1 abhängen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Funktion des Num1 Proteins in *U. maydis* weiter untersucht. Dabei lag das Hauptaugenmerk auf Num1 als Teil des NineTeen Spleiß-Komplexes (NTC). Es konnte gezeigt werden, dass der NTC in *U. maydis* große Ähnlichkeit zu den Komplexen aus Hefe und Mensch besitzt. Die Deletion von *num1* führt zu einer Dissoziation, hat aber sonst keinen gravierenden Einfluss auf die Proteinzusammensetzung des Komplexes. Der NTC und Num1 nehmen in *U. maydis* Einfluss auf DNA-Reparatur, Proteinabbauwege und mRNA-Export. Num1 verlässt den Zellkern vermutlich NTC unabhängig über die Kernpore und interagiert im Zytoplasma mit vielen Vesikel- und Zytoskelett-Komponenten. Dabei fungiert es möglicherweise als Chaperon bzw. Adapter für die Stabilisierung von Protein-Protein Interaktionen.

#### 3.1 Vermindertes Wachstum von $\Delta num1$ Stämmen

In der vorliegenden Arbeit konnte die bisherige Ansicht, dass die Deletion von *num1* keinen Einfluss auf das Wachstum in axenischer Kultur hat widerlegt werden (2.1). In verschiedenen Medien und bei verschiedenen Stammhintergründen führt die Abwesenheit von Num1 zum einem Anstieg der Verdopplungszeit, was im Widerspruch zu bisherigen Ergebnissen steht (Kellner *et al.*, 2014). Eine Reduktion der Zellteilungsrate ist jedoch zu erwarten. Denn auch wenn die Deletion keine Auswirkungen auf die Sporidien-Morphologie hat, besteht trotzdem ein globaler Spleiß-Defekt, der Auswirkungen auf die Proteinmengen in der Sporidie hat.

Auch die N-terminalen 65 AS von Num1 wurde in vorherigen Untersuchungen als essentiell für die Proteinfunktion beschrieben (Kellner, 2012), was ebenfalls nicht bestätigt werden konnte. Die N-terminale Verkürzung führt weder zu einer Änderung der Zellteilungsrate, noch zu einer Verminderung der Spleiß-Effizienz oder zu Defekten in der Hyphenmorphologie und dem polaren Wachstum (2.2). Dabei ist zu beachten, dass vorhergehende Experimente mit Stämmen durchgeführt wurden, in denen das Gen unter einem heterologen, induzierbaren Promotor im nicht-nativen Gen-Locus überexprimiert wurde. Es ist durchaus möglich, dass die Num1-Expression in diesem artifiziellen System zu den abweichenden Ergebnissen

geführt hat. Da die Deletion allerdings im nativen Locus keine Auswirkungen auf die Funktion hat, ist davon auszugehen, dass die für *U. maydis* spezifische N-terminale Domäne von Num1 für die Funktion des Proteins nicht notwendig ist.

### 3.2 Der NTC von *U. maydis*

Die Prozessierung von unreifer mRNA durch Spleißen und die darin involvierten Proteine sind in allen Eukaryoten stark konserviert. Somit ist es nicht überraschend, dass auch der für das Spleißen notwendige NineTeen Komplex (NTC) in konservierter Form in vielen Organismen vorkommt. Der detaillierteste Einblick in den Aufbau und die Funktion dieses Komplexes wurde durch Studien in *Saccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae* und *Homo sapiens* gewonnen. Für *S. cerevisiae* konnte bereits gezeigt werden, dass mindestens 26 Proteine Teil des NTC oder mit diesem assoziiert sind. Mindestens neun (Prp19p, Cef1p, Snt309p, Prp46p, Syf1p, Syf2p, Syf3p/Clf1p, Isy1p und Ntc20p) dieser 26 Komponenten sind als Teil des Spleißosoms unabdingbar für den Spleiß-Prozess (Fabrizio *et al.*, 2009). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die meisten der in Hefe identifizierten NTC Komponenten auch in *U. maydis* vorhanden sind. Durch Immunpräzipitationen von Prp19:3xHA und Num1:3xHA aus Proteinlysat von *U. maydis* und anschließender massenspektroskopischer Untersuchung (HPLC-MS) konnte die Mehrheit dieser Komponenten als Teil des NTC identifiziert werden (2.5.3). Die aus Mensch und Hefe bekannte Zusammensetzung des Komplexes führte zu einer Eingrenzung des Hauptkomplexes auf insgesamt 10 Proteine, die in beiden Organismen vorhanden sind. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass diese Komponenten auch Teil des NTC in *U. maydis* sind (Tabelle 2).

Im Menschen wurden mindestens drei unterschiedliche Prp19-ähnliche Komplexe beschrieben (zusammengefasst in Chanarat und Strasser, 2013). Dabei besteht der Prp19/CDC5L Komplex selbst aus hPRP19, hCDC5L, hHSP73,  $\beta$ -catenin-like-1 CTNNB1, hPRL1, AD002 und hSPF27 (Makarova *et al.*, 2004). Auch diese Komponenten konnten in *U. maydis* als Prp19- bzw. Num1 assoziierte Proteine identifiziert werden (Tabelle 4). Das *U. maydis* Homolog der NTC Komponente CTNNB1 konnte nur mit einer niedrigen Wahrscheinlichkeit (E-Wert CTNNB1/Um15050: 4.8e-08) ermittelt werden. Aus diesem Grund kann bei Um15050 nicht sicher von einem CTNNB1 Homolog ausgegangen werden. Zusätzlich wurden in *U. maydis* zwar drei Homologe für das humane hHSP73 ermittelt, die allerdings aufgrund der ähnlichen Peptidanzahl in der Kontrolle eine Interaktion mit Prp19 und Num1 unwahrscheinlich erscheinen lassen.

Betrachtet man den erweiterten Aufbau des NTC in Hefe und die äquivalenten Proteine in *U. maydis*, konnten bis auf wenige Ausnahmen alle Komponenten in den vorliegenden

Experimenten identifiziert werden (Tabelle 3). Wie bereits erwähnt stellt Snt309p kein Homolog von Num1/hSPF27 dar. Es handelt sich dabei lediglich um ein Protein, welches Num1 in *S. cerevisiae* funktionell ersetzt. Dies belegt, dass die Funktionen einzelner Komponenten des Komplexes in *U. maydis* durch andere Proteine übernommen werden können. Es ist somit möglich, dass dies auch für Slu7p, Cwc16p und Ntc20p der Fall ist. *U. maydis* besitzt kein Homolog für Ntc20p. Slu7p und Cwc16p scheinen Homologe zu besitzen (E-Werte von  $7.8e-11$  und  $1.2e-29$ ), welche jedoch in den Immunpräzipitations-Versuchen nicht identifiziert wurden.

Durch die Immunpräzipitation von Prp19-3xHA im  $\Delta num1$ -Hintergrund sollte die Relevanz von Num1 für die Zusammensetzung des NTC untersucht werden. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Homologe von Cwc14p und Smx3p in Abwesenheit von Num1 nicht mehr mit Prp19:3xHA co-präzipitieren. Allerdings konnten diese Komponenten auch im WT-Hintergrund nur mit geringen Gesamtpeptidmengen identifiziert werden. Kommt es durch die *num1* Deletion zu einer Destabilisierung des NTC so würden diese schwach vertretenen Proteine zuerst entfallen. Vergleicht man in gleicher Weise die *U. maydis* Homologe der NTC assoziierten Proteine aus *H. sapiens*, so gehen hier nach *num1* Deletion nur die drei Proteine hAquarius, hBUD31 und KIAA0560 verloren. Auch diese Proteine zeigen nur geringe Gesamtpeptidmengen nach der Präzipitation von Prp19:3xHA im WT-Hintergrund. Die Gesamtheit der konservierten NTC Komponenten weisen nach *num1* Deletion eine reduzierte Gesamtpeptidmenge auf. Die gewonnenen Erkenntnisse deuten somit darauf hin, dass der NTC durch Num1 stabilisiert wird und dies zur Herabsetzung der Spleiß-Effizienz in  $\Delta num1$  führt.

Die vorliegende Arbeit bestätigt somit die konservierte Zusammensetzung des NTC auch in *U. maydis*. Dabei besteht dieser aus den bereits aus Mensch und Hefe bekannten Komponenten. Num1 ist als hSPF27 Homolog Teil dieses Komplexes und die Deletion von *num1* hat kaum Einfluss auf dessen Zusammensetzung und Aufbau.

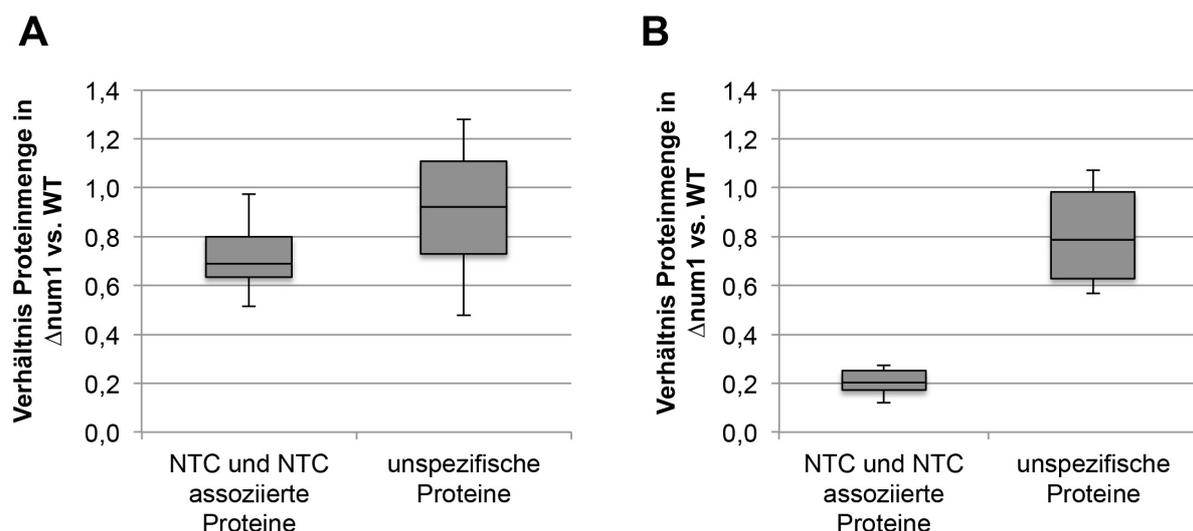
Auch die prominentesten (mit den meisten Gesamtpeptidmengen) identifizierten Proteine nach der Präzipitation von Num1:3xHA in der angereicherten zytoplasmatischen Proteinfraction sind Teil des NTC oder generell spleiß-assoziiert. Trotz einer Optimierung des Protokolls war die zytoplasmatische Proteinfraction durch Zellkern-lokalisierte Proteine verunreinigt. In vorhergehenden Experimenten war die Interaktion von Num1 mit Kin1 im Zytoplasma mittels Co-IP nur nach der Quervernetzung beider Proteine nachzuweisen (Kellner *et al.*, 2014). Somit ist es wahrscheinlich, dass schwache oder transiente Interaktionen, wie die mit Kin1, bei der Co-Präzipitation schneller verloren gehen. Die Verunreinigung der zytoplasmatischen Proteinfraction mit Zellkern-Proteinen und die schwache bzw. transiente Interaktion von Num1 mit zytoplasmatischen Proteinen könnte

erklären warum dieses Experiment zu ähnlichen Ergebnissen führte wie die Immunpräzipitation in Gesamtzellextrakt.

### 3.3 Num1 stabilisiert den NTC in *U. maydis*

Die Gesamtpeptidmengen einzelner HPLC-MS Experimente können nicht direkt miteinander verglichen werden. Wie in 2.5.7 beschrieben, ermöglicht das markieren der Peptide mit unterschiedlichen TMTs (tandem mass tags) vor der Zusammenführung zweier Peptidgemische, dass in der folgenden HPLC-MS Untersuchung für identische Peptide eine Quantifizierung in jeder der Ausgangsproben durchgeführt werden kann. Da nicht gewährleistet war, dass exakt gleiche Komplexmengen zum Einsatz kamen, wurden in den einzelnen Proben die Gesamtpeptidmengen mit denen von Prp19 normalisiert. Die Stabilisierung des NTC durch Num1 konnte mit diesen TMTduplex-Experimenten und mithilfe von Co-IPs gezeigt werden.

Es wurde bereits erwähnt, dass die im TMTduplex ermittelten Proteinunterschiede nicht mit denen aus unterschiedlichen HPLC-MS Experimenten übereinstimmen bzw. korrelieren (2.5.7). Durch drei verschiedene Co-IP-Experimente konnte beispielhaft die Abnahme von Cef1, Prl1 und Syf1 im NTC in Abwesenheit von Num1 ermittelt werden (Abbildung 28). Dabei war die Abnahme der Signale für die co-präzipitierten Proteine weit stärker, als dies im TMT-Experiment der Fall war (Abbildung 27).



**Abbildung 29: Boxplots zur Darstellung der beiden TMT-Experimente.** Die Diagramme zeigt das Verhältnis von Proteinmengen aus den zwei Stämmen AB31 (WT) und AB31 $\Delta num1$  nach Prp19:3xHA Pull-Down, TMT Markierung und Massenspektroskopie. Durch geringere Proteinmenge in  $\Delta num1$  entsteht ein Wert <1. Die Boxen beinhalten jeweils 70% der Proteine aus der jeweiligen Gruppe. Die Linie nach unten reicht zum Minimum der jeweiligen Gruppe und die Linie nach oben reicht zum Maximum der jeweiligen Gruppe. Die Linie in der Mitte zeigt den Median der jeweiligen Gruppe an. **(A)** Erstes TMT-Experiment mit unvollständiger Quenching Reaktion. Nur sehr geringe Abnahme der Proteinmengen von NTC Komponenten. Für diesen Blot wurde nur ein einzelner Ansatz verwendet. **(B)** Zweites TMT-Experiment. Das Proteinverhältnis von jedem Protein ergibt sich aus dem Mittel von drei unabhängigen biologischen Replikaten.

Ein erster Versuch zur Quantifizierung der NTC-Destabilisierung durch  $\Delta num1$  mittels TMT Markierung resultierte in einer sehr geringen Abnahme der NTC-Proteinmengen (Abbildung 29 A).

Die geringen Proteinmengenunterschiede sind dabei möglicherweise durch eine ineffiziente bzw. unvollständige Quenching Reaktion zustande gekommen. Diese Reaktion stoppt die Markierungsreaktion vor der Probenvereinigung. Erfolgt die Reaktion ineffizient, werden die Peptide auch nach Vereinigung der Proben weiterhin mit TMTs versehen und verfälschen den späteren Vergleich. Als Kontrolle wurden die Num1 Gesamtpeptidmengen aus beiden Proben verglichen. Num1-spezifische Peptide waren nicht ausschließlich im WT Hintergrund zu beobachten, sondern auch in erheblicher Menge im  $\Delta num1$  Hintergrund (Abnahme der Peptidmenge auf ungefähr 70%). Da in den vorhergehenden HPLC-MS Experimenten mit Prp19:3xHA im  $\Delta num1$ -Hintergrund keine zum Num1 Protein passenden Peptide identifiziert werden konnten, unterstützt dies die Vermutung der ungenügenden Quenching-Reaktion. Auch im finalen TMT Experiment (Abbildung 29 B) wurden Num1 Peptide zur  $\Delta num1$  Probe zugeordnet. Somit ist auch in diesem Fall die Quenching Reaktion möglicherweise nicht vollständig gestoppt worden. Num1 war das Protein mit der höchsten Gesamtpeptidmengenabnahme (Abnahme auf ungefähr 14%). Somit kann eine noch gravierendere Gesamtpeptidmengenabnahme für die NTC-Komponenten als die im TMT-Experiment ermittelten 20% (Im Mittel) erwartet werden. Diese Erwartung konnte durch die Co-IP-Ergebnisse bestätigt werden (Abbildung 28 G). Zusammengenommen verdeutlicht dies, dass der NTC in Abwesenheit von Num1 nahezu vollständig dissoziiert. Da jedoch Spleißen in  $\Delta num1$  immer noch möglich ist, wäre auch eine sehr lose Zusammensetzung des NTC denkbar, wodurch bei den Co-IP Experimenten mehr NTC Komponenten verloren gehen würden.

Die Homologe von Num1, wie hSPF27, und mindestens die drei anderen NTC Kernkomponenten Cef1, Prl1 und Prp19 sind in den meisten untersuchten Organismen essentiell. Somit konnten dort auch noch keine Einflüsse der *num1*-Deletion auf den NTC untersucht werden. Es wurden jedoch vereinzelte Experimente zu den Auswirkungen eines Spf27/Num1 Knock-Down beschrieben. So konnte in *Xenopus* beobachtet werden, dass der BCAS2 (SPF27) Knock-Down zu einer Abnahme der NTC-Komponenten-Expression führt, welche anhand einer Proteinmengenabnahme von Prp19, Prl1 und Cdc5L ermittelt wurde (Hofmann *et al.*, 2013). Dies kann jedoch nicht als Beweis für die Destabilisierung des Komplexes angesehen werden, da die meisten NTC Komponenten in *Xenopus* Introns enthalten und somit auch ein leichter Spleiß-Defekt durch den BCAS2 Knock-Down zu einer negativen Rückkopplung und somit generell zur Abnahme der Proteinmengen führen würde. Die vorliegenden Co-IP Ergebnisse zeigen, dass in *U. maydis* die NTC-Stabilität unabhängig von der Proteinkonzentration abnimmt (Abbildung 28).

Auch in anderen Organismen ist die Stabilisierung des NTC durch Num1/SPF27 möglich; In Trypanosomen führt die Herabsetzung der Spf27 Expression zu einer verminderten Methylierung der SL RNA („Spliced Leader“ RNA kommt nur in Trypanosomen und Nematoden beim Trans-Spließen vor) und zum Abbruch des Spleiß-Vorgangs nach bzw. während der ersten Transesterifizierung, wie es vorher auch schon beim Prp19 knock-down beobachtet wurde (Ambrosio *et al.*, 2014; Tkacz *et al.*, 2010). Dies lässt die Vermutung zu, dass auch in Trypanosomen die Destabilisierung des NTC durch den Spf27 Knock-Down automatisch zu ähnlichen Effekten wie der Prp19 Knock-Down führt. Denn wenn Spf27 nicht vorhanden ist und der NTC dissoziiert, dann kann auch Prp19 seine Funktion als Teil des NTC nicht mehr ausführen.

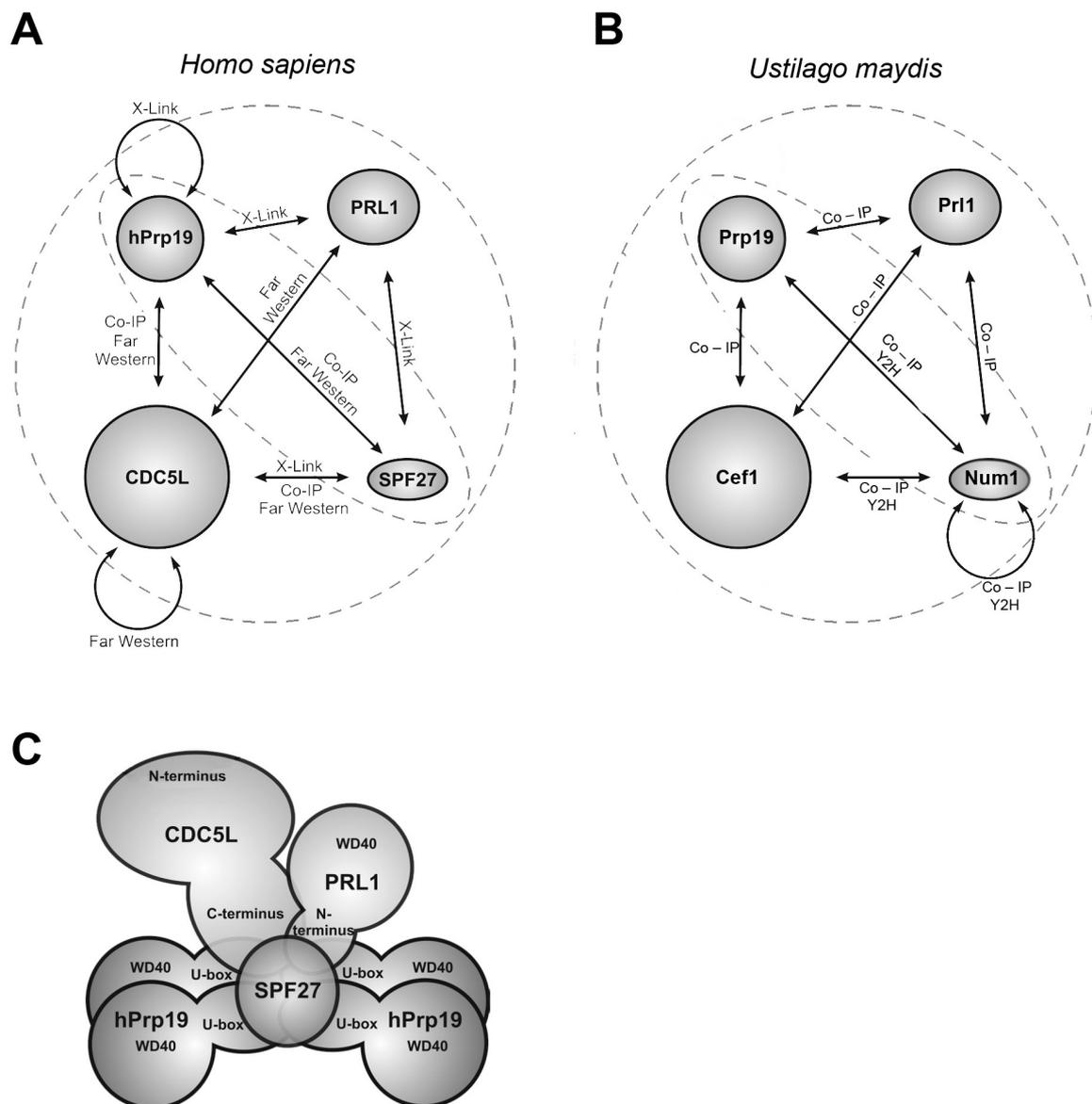
In Hefe fehlt das Num1/SPF27 Homolog; hSPF27 wird dort funktionell durch das Snt309p Protein ersetzt. Snt309p wurde in Hefe bereits sehr früh als Interaktionspartner von Prp19p identifiziert. Gleichzeitig wurde gezeigt, dass Snt309p (Ntc25p) in Hefe, wie auch Num1 in *U. maydis*, nicht essentiell ist (Chen *et al.*, 1998a). Weitere Studien ergaben eine modulierende Funktion gegenüber Prp19p, was zur Bindung weiterer NTC-Komponenten und somit auch zur Stabilisierung des Komplexes führt (Chen *et al.*, 1999). Betrachtet man zusätzlich die bekannten Interaktionen innerhalb des Komplexes und bedenkt man, dass es sich bei Num1 und Snt309p um komplett unterschiedliche Proteine handelt, so ist nicht gewährleistet, dass Snt309p und Num1 den NTC auf die gleiche Weise stabilisieren.

Snt309p interagiert im Hefe NTC ausschließlich mit dem N-Terminus von Prp19p (Ohi und Gould, 2002). In *H. sapiens* interagiert das Num1 Homolog hSPF27 mindestens mit hPRP19, hCDC5L (Cef1) und hPRL1 (Grote *et al.*, 2010). hCDC5L dimerisiert in oder außerhalb des NTC. Für hPRP19 konnte eine Selbstinteraktion nicht final bestätigt werden. Zusätzlich wurde im Menschen die Interaktion von hSPF27 mit dem C-Terminus von hCDC5L, dem N-Terminus von hPRP19 und dem N-Terminus von hPRL1 gezeigt (Grote *et al.*, 2010). Es sind bisher keine Studien bekannt, in denen die entsprechenden Interaktionsdomänen von hSPF27 beschrieben wurden. Für *U. maydis* ist durch Hefe-Zwei-Hybrid Experimenten bekannt, dass Num1 mit dem N-terminalen Bereich von Prp19 und dem C-terminalen Bereich von Cef1 interagiert (Kellner *et al.*, 2014), was sich mit den Ergebnissen aus *H. sapiens* überschneidet. Um Aufschlüsse über die Interaktionsdomänen von Num1 zu erlangen wurden Hefe-Zwei-Hybrid Experimente mit verkürzten Num1-Versionen durchgeführt. Damit wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass die letzten acht AS des Num1 Proteins für die Interaktion mit Cef1 benötigt werden und dass die C-terminalen 81 AS von Num1 für diese Interaktion ausreichend sind. Ferner ist das N-terminale Num1 Fragment mit einer Länge von 127 AS ausreichend für die Interaktion mit Prp19 (2.4). Zusätzlich konnte mit Co-IP und Hefe-Zwei-Hybrid eine Selbstinteraktion von Num1 gezeigt werden (2.3), welche im Menschen nicht bekannt ist (Grote *et al.*, 2010).

Das primäre Ziel der Hefe-Zwei-Hybrid Experimente war die Eingrenzung der Interaktionsdomänen von Num1 bis auf wenige AS. Mit diesem Wissen könnten mutierte Num1 Proteine generiert werden, welche die Funktion innerhalb des NTC nicht mehr erfüllen. Gleichzeitig sollten sie weiterhin mit Kin1 interagieren und somit eine Trennung der phänotypischen Auswirkungen der *num1* Deletion ermöglichen. Damit könnte untersucht werden, ob das depolarisierte Hyphenwachstum und die beeinträchtigten Transportprozesse Folgen der verminderten Spleiß-Effizienz sind, oder ob sie durch die Num1/Kin1 Interaktion komplementiert werden.

Es kann postuliert werden, dass in Mensch und *U. maydis* Komponenten zusätzlich zu Prp19/hPRP19 mehrfach im NTC vorkommen. Für hCDC5L konnte im Menschen eine Selbstinteraktion gezeigt werden und auch für hSPF27 kann eine Dimerisierung nicht restlos ausgeschlossen werden. Zusätzlich konnte die Selbstinteraktion von hPRP19 nicht sicher gezeigt werden (Grote *et al.*, 2010). Num1/hSPF27 könnte somit die Interaktionen zwischen Prp19/hPRP19 und Cef1/hCDC5L bzw. Prp19/hPRP19 und Prl1/hPRL1 stabilisieren. Außerdem wäre es möglich, dass Num1/hSPF27 die Interaktionen von Prp19/hPRP19 Mono- bzw. Dimeren unterstützt. Dies würde zur Stabilisierung des Kernkomplexes aus den genannten vier Komponenten führen. Das aus *H. sapiens* bekannte Modell (Grote *et al.*, 2010) (Abbildung 30) könnte auf diese Weise erweitert werden indem hSPF27 jeweils ein hPRP19 Dimer stabilisiert und zum Tetramer verbindet. Dabei wäre die Anwesenheit von hSPF27 für die Rekrutierung von hPRL1 und hCDC5L notwendig, indem es das hPRP19 Grundgerüst stabilisiert. Insgesamt deutet somit vieles auf eine große Ähnlichkeit der NTC-Kernzusammensetzung in Mensch und *U. maydis* hin.

Zusätzliche Hefe-Zwei-Hybrid Versuche könnten weitere Ähnlichkeiten zum humanen NTC belegen. Dabei wäre von großem Interesse ob Cef1 aus *U. maydis* und hSPF27 aus Mensch auch mit sich selbst interagieren. Auch eine sauberere Aufreinigung des *U. maydis* NTC z.B. durch Gelfiltration könnte in diesem Zusammenhang hilfreich sein.



**Abbildung 30: Der NTC Kernkomplex und seine Interaktionen. (A)** Interaktionen zwischen den vier Kernkomplexkomponenten im Menschen. **(B)** Interaktionen zwischen den vier Kernkomplexkomponenten in *U. maydis*. **(C)** Der postulierte Aufbau des Kernkomplexes im Menschen. Alle Abbildungen nach (Grote *et al.*, 2010).

### 3.4 Num1, der NTC und die Reparatur/Instandhaltung von DNA

Der NTC und einige seiner assoziierten Proteine sind dafür bekannt Funktionen in anderen wichtigen zellulären Prozessen zu übernehmen (zusammengefasst in Chanarat und Strasser, 2013). Einer davon besteht in der Reparatur und Instandhaltung von DNA. In den vorliegenden Ergebnissen wurden Hinweise darauf gefunden, dass auch in *U. maydis* ein Zusammenhang zwischen NTC und DNA Reparatur besteht. Nach Immunpräzipitation von Prp19:3xHA und Num1:3xHA konnten mehrere Proteine mittels HPLC-MS identifiziert werden, die an DNA-Reparaturprozessen beteiligt sind (Tabelle 5).

Das Homolog des humanen hXAB2 Proteins trägt in Hefe den Namen Syf1p. Das *U. maydis* Homolog wurde in den HPLC-MS Studien mit hohen Gesamtpeptidmengen identifiziert. Dies war zu erwarten, da Syf1p/hXAB2 ein integraler Bestandteil des NTC ist. Es wurde bereits erwähnt, dass hXAB2 die namensgebende Komponente des XAB2-Komplexes darstellt. Dieser Komplex ist in Prozessen wie Spleißen, Transkription und TCR (transcription coupled repair) involviert (Kuraoka *et al.*, 2008) und könnte in ähnlicher Form auch in *U. maydis* vorkommen. Er wurde in Tabelle 4 als einer der drei humanen Prp19-ähnlichen Komplexe aufgeführt und besteht aus hPRP19, hXAB2, hISY1, hPPIE, hAQUARIUS und hCCDC16. Zusätzlich interagiert das hXAB2 Protein (XPA binding protein 2) in Bezug auf DNA Reparatur mit hXPA, hCSA und hCSB und in Bezug auf Transkriptionselongation mit hRNAPII (RNA Polymerase II). Im Menschen führt der Knockdown von hXAB2 zu einer Überempfindlichkeit gegenüber UV Bestrahlung, wie sie auch für  $\Delta num1$ -Stämme bekannt ist, und zu einer verminderten RNA Syntheserate nach dieser Bestrahlung. Die Schädigung der DNA führt ferner zu einer verstärkten Interaktion von hXAB2 mit hRNAPII und hXPA (Fousteri *et al.*, 2006; Nakatsu *et al.*, 2000).

Auch Syf3p/Cif1p ist ein NTC assoziiertes Protein, dessen *U. maydis* Homolog mit hohen Gesamtpeptidmengen identifiziert wurde. Neben seiner Funktion im NTC ist es auch für die Initiation der DNA Replikation mitverantwortlich (Zhu *et al.*, 2002), möglicherweise indem es mit dem ORC (origin recognition complex) interagiert (Wysocka *et al.*, 2004). Es bleibt zu erwähnen, dass in Hefe die Deletion von Syf1p und der Knock-Down von Syf3p (essentiell) zu einer Deregulation des Zellzyklus führt. In beiden Fällen verbleiben die Zellen in der G2/M Phase. Es ist jedoch nicht ausgeschlossen, dass es sich dabei um einen indirekten Effekt durch den Spleiß-Defekt handelt (Ben-Yehuda *et al.*, 2000; Russell *et al.*, 2000; Zhu *et al.*, 2002).

Prp19p wurde zunächst als Pso4p identifiziert, dessen Mutation in Hefe zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber verschiedenen DNA-Schäden führt (de Andrade *et al.*, 1989; Henriques *et al.*, 1989). Die genaue Funktion von Prp19p während der DNA Reparatur ist bis heute nicht geklärt. Interessanterweise ist aber bekannt, dass im Menschen DNA Schäden zu einer Polyubiquitinierung von hPRP19 führen und dass diese hPRP19 Variante anschließend stärker an Chromatin assoziiert und gleichzeitig nicht mehr mit hCDC5L und hPRL1 interagiert. Die Interaktion mit hSPF27 (Num1) wurde dabei nicht untersucht (Lu und Legerski, 2007). Somit scheint die DNA Reparatur-Funktion von hPRP19 mindestens partiell NTC unabhängig zu sein. Eine direkte Beteiligung von Prp19 ohne Num1 in der DNA Reparatur von *U. maydis* ist jedoch unwahrscheinlich, da keine zusätzlichen oder größere Mengen an DNA-Reparatur-Proteinen nach immunpräzipitiert von Prp19:3xHA gefunden wurden. Dies schließt jedoch nicht aus, dass Num1 in die NTC unabhängigen Reparatur-Funktionen von Prp19 involviert ist.

Neben den erwähnten NTC-Komponenten, welche zusätzlich in DNA Reparatur und Genom Stabilisierung involviert sind, wurden weitere Proteine nach Co-Präzipitation mit Prp19:3xHA bzw. Num1:3xHA identifiziert, welche nur indirekt mit NTC Komponenten in Verbindung gebracht werden können. Der DNA Einzelstrang-Bindekomplex RFA (oder RPA) besteht aus den drei Untereinheiten hRFA1, hRFA2 und hRFA3. Dieser Proteinkomplex betritt gemeinsam mit dem hXAB2 Interaktionspartner hXPA die Reparaturmaschinerie und hat zusätzliche Funktionen in DNA Replikation und Rekombination (zusammengefasst in Wold, 1997). Die RFA-Untereinheit Rfa1 konnte bei jeder Präzipitation mit geringen Gesamtpeptidmengen identifiziert werden. Zusätzlich konnten weitere bekannte hXAB2 Interaktionspartner gefunden werden, welche in der Transkriptions-gekoppelten-Reparatur involviert sind. Zum einen wurden die RNAPII Untereinheiten Rpo21, Rpb2, Rpb3 und Rpb8 mit Num1:3xHA und teilweise mit Prp19:3xHA co-präzipitiert. Zum anderen wurden die zwei potentiellen hCSB Homologe Mot1 und Snf2 ausschließlich nach Immunpräzipitation mit Num1:3xHA identifiziert. Die genannten Proteine wurden alle mit geringen Gesamtpeptidmengen in den HPLC-MS Studien nachgewiesen.

hPRP19 interagiert, vor allem nach radioaktiver Bestrahlung, mit Metnase. Dabei wird postuliert, dass hPRP19 Metnase zu Doppelstrangbrüchen rekrutiert, welches dann für die Verbindung der gebrochenen DNA-Stränge (NHEJ: non-homologous end joining) verantwortlich ist (Beck *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2005). *U. maydis* besitzt kein bekanntes Homolog des Metnase-Proteins. Es ist bekannt, dass Metnase ins Stocken geratene Replikationsgabeln repariert bzw. neu startet. Wahrscheinlich zu diesem Zweck interagiert Metnase auch mit hPCNA (proliferating cell nuclear antigen) (De Haro *et al.*, 2010). hPCNA kann je nach Sumoylierungs- bzw. Ubiquitinierungs-Muster in der Nukleotidexcisionsreparatur (NER) oder in die DNA Replikation involviert sein und stellt den Ring der Replikationsgabel dar (Hoegge *et al.*, 2002). Das *U. maydis* Homolog von hPCNA wurde mit Prp19:3xHA und Num1:3xHA co-präzipitiert (Tabelle 5) und weist dabei geringe Gesamtpeptidmengen auf. Nur die Gesamtpeptidmenge nach Präzipitation mit Num1:3xHA im zytoplasmatischen Proteinlysate ist stark erhöht (im Vergleich zu den anderen Co-Immunpräzipitationen). Doch dies wird dadurch relativiert, dass bei den Untersuchungen mit der zytoplasmatischen Fraktion ebenfalls Peptide in der Kontrolle ohne Fusionsprotein identifiziert werden konnten (Tabelle 5). Möglicherweise neigt PCNA aufgrund seiner Struktur zu unspezifischer Bindung in Immunpräzipitationsexperimenten.

Die bisher aufgeführten Proteine konnten auch in anderen Studien in unterschiedlichen Organismen mit dem NTC in Verbindung gebracht werden. In der vorliegenden Arbeit konnten zusätzliche DNA-Reparatur-Proteine identifiziert werden, welche bisher keinen Bezug zum NTC aufwiesen. Eines dieser weiteren, in Tabelle 5 mit geringen Gesamtpeptidmengen aufgeführtes Protein ist das mögliche *U. maydis* Homolog von

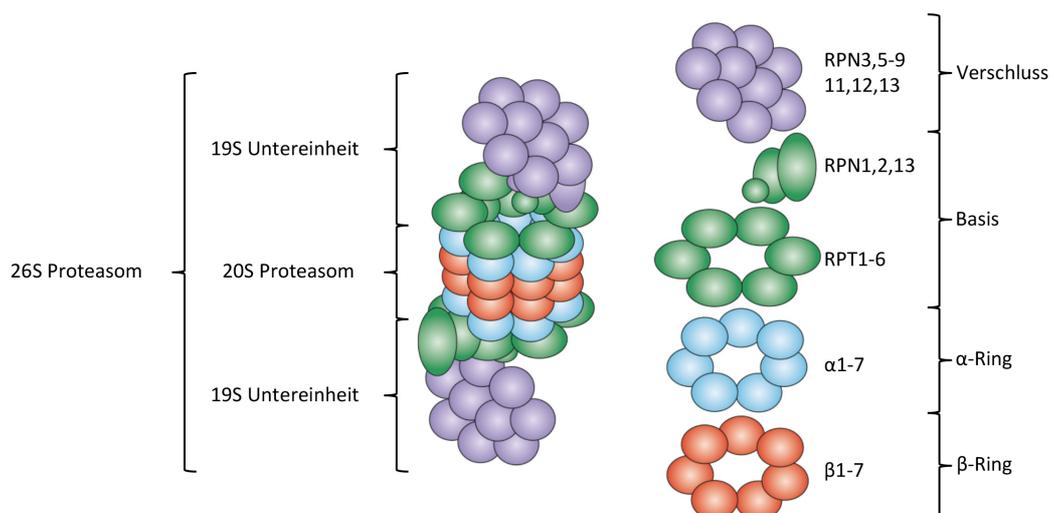
Mms19p (E-Wert:  $3.8e-32$ ). In Hefe ist dieses Protein unter anderem an der NER (nucleotide excision repair) beteiligt. Die Deletion von Mms19p führt zu einer Abnahme der Proteinkonzentration der NER Komponente Rad3p, zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber genotoxischem Stress und zu einer Verlängerung der Telomere (Kou *et al.*, 2008). Es wird behauptet, dass all diese Auswirkungen auf eine Beteiligung von Mms19p bei der Biosynthese von Eisensulfid-haltigen Proteinen zurückzuführen ist. Viele der durch die Mms19p Deletion beeinträchtigten Proteine sind wichtig für den DNA Metabolismus und die Genomintegrität (Stehling *et al.*, 2012).

Das Rad51 Protein und seine Paraloge sind bekannte Komponenten der DSB (double strand break) Reparatur Maschinerie. Deren Abwesenheit begünstigt die Tumorgenese durch Genominstabilität (zusammengefasst in Suwaki *et al.*, 2011). Das *U. maydis* Homolog von hMSH2 wurde ausschließlich nach Präzipitation mit Prp19:3xHA (nicht in  $\Delta num1$ ) mit wenigen Peptiden gefunden und ist als Tumorrepressor bekannt, welcher für verschiedene DNA-Reparatur-Vorgänge wie TCR (transcription coupled repair) (Mellon *et al.*, 1996), homologe Rekombination (de Wind *et al.*, 1995) und BER (base excision repair) (Pitsikas *et al.*, 2007) von großer Bedeutung ist. Im Menschen ist hSPF27/hBCAS2 ein negativer Regulator des Tumorrepressors hp53 (Kuo *et al.*, 2009). Dieses hp53 fungiert als Transkriptionsfaktor, welcher die Expression verschiedenster Gene induziert, welche DNA Schäden entgegenwirken und Apoptose induzieren können (Riley *et al.*, 2008). Für hp53 ist in *U. maydis* kein homologes Protein bekannt. Generell sind manche DNA-Reparaturmechanismen in *U. maydis*, im Vergleich zu vielen anderen Eukaryoten (z.B. Mensch, Hefe), nicht konserviert (Kojic *et al.*, 2002; Kojic *et al.*, 2008).

Es wird deutlich, dass Num1 und der NTC in vielerlei Hinsicht Einfluss auf DNA-Reparatur-Mechanismen nehmen. Dementsprechend zeigen  $\Delta num1$ -Stämme eine erhöhte Sensitivität gegenüber UV-Bestrahlung (Kellner *et al.*, 2014). Um die genauen Zusammenhänge zwischen Num1 bzw. NTC und DNA-Reparatur zu untersuchen könnten weitere Immunpräzipitationen durchgeführt werden. Dazu sollten die verwendeten Sporidien kurz vor ihrer Ernte mit DNA-schädigenden Agenzien behandelt werden um die DNA-Reparaturmaschinerie maximal zu induzieren. Denn es ist fraglich, wie stark Proteine der DNA-Reparatur unter idealen Kultivierungsbedingungen exprimiert werden.

### 3.5 Num1 und Prp19 interagieren mit Komponenten des Proteinabbaus

Prp19 fungiert als Ubiquitin-Ligase (E3) und es konnte bereits gezeigt werden, dass es mit der regulatorischen Untereinheit 19S (Sihn *et al.*, 2007) und mit dem katalytischen Kern 20S (Loscher *et al.*, 2005) des Proteasoms interagiert. In den vorliegenden Ergebnissen konnten nach massenspektroskopischer Untersuchung der Prp19:3xHA und Num1:3xHA Immunpräzipitationen 11 Proteine der proteasomalen 19S Untereinheit identifiziert werden. Es wurden hingegen keine Komponenten des 20S Proteasoms gefunden. Das 26S Proteasom besteht aus den beiden Untereinheiten 19S und 20S (Besche *et al.*, 2009). Die 20S Untereinheit stellt den aktiven Kern des Proteasoms da, wohingegen die 19S Untereinheit als Verschluss gilt, welcher auch für die Beladung des Proteasoms benötigt wird. Die 19S Untereinheit kann weiter in Basis und Deckel unterteilt werden (Abbildung 31). Alle Komponenten der 19S Basis und drei der neun Verschluss-Komponenten wurden mit Num1:3xHA und Prp19:3xHA co-präzipitiert (Tabelle 6). Die AAA-ATPasen Rpt1 bis Rpt6 bilden als katalytischer Ring den Kern der 19S Basis, welcher für die Substrat- bzw. Proteinfaltung, das Öffnen der protealytischen Kammer und die Überführung des Substrats zu den Proteasen des 20S Proteasoms verantwortlich ist (Bar-Nun und Glickman, 2012). Dem 19S Verschluss wird hauptsächlich die Funktion der Deubiquitinierung zugesprochen. Für Hefe ist jedoch bekannt, dass Ubp6p, welches mit der Basis interagiert, auch an der Deubiquitinierung beteiligt ist (Guterman und Glickman, 2004). Dabei wird Ubp6p wohl nicht für die Substrat-Deubiquitinierung sondern für die Proteasomzusammenbau benötigt, indem es ubiquitinierte Substrate von Proteasomvorläufern entfernt (Sakata *et al.*, 2011). Das *U. maydis* Homolog von Ubp6p konnte in unseren Experimenten ausschließlich mit Num1:3xHA co-präzipitiert werden.



**Abbildung 31: Schematischer Aufbau des Proteasoms in Eukaryoten.** Das 26S Proteasom besteht aus den Untereinheiten 19S und 20S. Diese sind jeweils doppelt im Proteasom vertreten. Die regulatorische Untereinheit 19S lässt sich in Basis und Verschluss aufteilen. Die aktive Kernuntereinheit 20S wird in  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ring unterteilt. (Abbildung abgeändert nach Murata *et al.*, 2009)

Zusätzlich konnten Proteine identifiziert werden, die Funktionen in verschiedenen Prozessen des Protein-vermittelten Proteinabbaus haben (Tabelle 6). Es fällt auf, dass die Mehrheit dieser Proteine nur bei Immunpräzipitation von Num1:3xHA vorzufinden waren. Somit könnten diese Proteine zur Aufklärung der NTC-unabhängigen Num1-Funktion beitragen. Möglicherweise handelt es sich hier um eine Spleiß- und Zytoplasmatransport-unabhängige Funktion von Num1.

Da die beschriebenen Proteasom-Komponenten auch nach der Deletion von *num1* mit Prp19 co-präzipitieren könnte Num1 nur indirekt über Prp19 mit dem Proteasom interagieren. Dies würde darauf hindeuten, dass die Prp19 Rolle beim Proteinabbau NTC-gekoppelt aber nicht NTC-abhängig ist, da auch in Abwesenheit von Num1 die selben Proteasom Komponenten mit Prp19 interagieren.

Das deubiquitinierende Protein Ubp12 wurde mit relativ hohen Gesamtpeptidmengen ausschließlich mit Num1:3xHA co-präzipitiert. Ubp12p unterstützt die Fusion von Mitochondrien, indem es das Ubiquitinierungsmuster des mitochondrialen Fusionsfaktors Fzo1 ändert (Anton *et al.*, 2013). Dabei verrichtet Ubp12p seine Aufgabe an bzw. in räumlicher Nähe zu der äußeren Mitochondrienmembran. Es scheint möglich, dass Num1 im Zytoplasma Einfluss auf die Mitochondrienmorphologie nimmt. Dies ist jedoch unwahrscheinlich, da die Deletion von *num1* keine veränderte Mitochondrienmorphologie zur Folge hat (Kellner, 2012). Num1 wurde bereits im Hinblick auf seine Interaktion mit Kin1 als Adaptermolekül für verschiedene intrazelluläre Transportprozesse diskutiert (Kellner, 2012). Somit wäre es möglich, dass Num1 z.B. in diesem Fall mit anderen Proteinen transportiert wird, aber dabei keinen Einfluss auf deren Funktion nimmt.

Zusätzlich zu Prp19 konnte eine weitere E3 Ligase identifiziert werden. Es gibt in *U. maydis* zwei Proteine, welche eine hohe Homologie zu einzelnen Proteinbereichen von Tom1p aufweisen. Beide wurden auch in den massenspektroskopischen Untersuchungen identifiziert (Tabelle 6). Um03442 weist nur in einem kleinen Teil des Proteins eine starke Homologie zu Tom1p auf. Die Identität bei diesen 617 AS beträgt 54% (E-Wert: 2.7e-158). Um05564 weist keine ähnlich hohe Homologie auf, scheint jedoch über die gesamte Länge des Proteins verteilte homologe Regionen zu besitzen (E-Wert: 8.5e-32). Es fällt auf, dass nur Um03442 eine HECTc Domäne und nur Um05564 drei DUF Domänen (DUF908, DUF913, DUF4414) aufweist, welche auch für Tom1p bekannt sind. Die HECTc Domäne wurde in der AP Ubiquitin-Ligase entdeckt und ist Teil vieler anderer Ubiquitin-Ligasen (Zheng, 2003). Somit scheint es möglich, dass die Tom1p Funktion in *U. maydis* von zwei verschiedenen Proteinen gemeinsam ausgeführt wird. Tom1p ist wichtig für den Abbau von überschüssigen Histonen und scheint für den Export verschiedenster mRNAs unerlässlich zu sein (Singh *et al.*, 2009). Die Deletion von *tom1p* führt zu einer Akkumulation des Poly-A-bindenden Proteins Nap2p an der Kernpore (nuclear porecomplex / NPC) (Duncan *et al.*,

2000). Zusätzlich hat Tom1p Einfluss auf den Zellzyklus, indem es Dia2p, welches für genomische Stabilität benötigt wird, in einem Zellzyklus-abhängigen Kontext für dessen Abbau markiert (Kim und Koepp, 2012; Kim *et al.*, 2012). Somit könnte Tom1 ein Weg sein, über den der NTC Einfluss auf Zellzyklus und den mRNA Export nimmt.

Eine weitere E3 Ligase konnte ausschließlich mit Num1:3xHA co-präzipitiert werden. Dabei handelt es sich um das *U. maydis* Homolog von Ufd4p (E-Wert:  $2.3e-108$ ). Auch hier sind funktionelle Überschneidungen zum NTC möglich. In Hefe ist Ufd4p für den Abbau des NER Proteins Rad4p bekannt und beeinträchtigt damit die DNA Reparatur (Ju und Xie, 2006).

E3 Ubiquitin-Ligasen und E2 Ubiquitin-konjugierende Proteine arbeiten bei der Markierung von durch das Proteasom abzubauen Proteine gemeinsam. Somit war es auch wenig überraschend, dass zwei E2 Ubiquitin-konjugierende Proteine in den HPLC-MS Experimenten identifiziert wurden (Tabelle 6). Ubc4p und Ubc13p sind wiederum beide an der Zellzykluskontrolle beteiligt (Loring *et al.*, 2008). Es ist bereits bekannt, dass Cdc5 in *S. pombe* und in *H. sapiens* starken Einfluss auf den Zellzyklus hat (Bernstein und Coughlin, 1998a; Collier *et al.*, 2014; Mu *et al.*, 2014; Ohi *et al.*, 1994a). Auch *U. maydis* Filamente mit fehlendem *num1* Gen weisen Defekte in der Zellzyklus-Regulation auf (Kellner *et al.*, 2014). Somit könnte die direkte oder indirekte Interaktion von Num1 mit Ubc4, Ubc13, Ufd4 und Tom1 mögliche Hinweise darauf liefern, wie der NTC oder Num1 im einzelnen Einfluss auf den Zellzyklus, die DNA Reparatur und den mRNA Export nehmen. Hier wäre die Generierung von Deletionsmutanten hilfreich. In diesen könnte der Zellzyklus mittels Durchflusszytometrie (FACS) und der Rrm4 vermittelte mRNA Transport mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht werden. Dabei wären Überschneidungen zum bekannten  $\Delta num1$  Phänotyp zu erwarten.

Das Proteasom lokalisiert sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma. Somit ist nicht klar ob das Num1 Protein an dem Proteinabbau im Zytoplasma beteiligt ist, oder ob es nur im Zellkern, möglicherweise zusammen mit dem NTC, diese Aufgabe erfüllt. Es ist aus verschiedenen Organismen bekannt, dass Proteasomen hauptsächlich im Zellkern vorhanden sind (Hugle *et al.*, 1983; Kleinschmidt *et al.*, 1983; Tsuchiya *et al.*, 2013; von Mikecz, 2006). Dabei wurde schon mehrfach berichtet, dass zytoplasmatische Proteine zum Abbau in den Zellkern transportiert werden (zusammengefasst in Gallagher *et al.*, 2014). Trotzdem scheint es mindestens in *S. cerevisiae* auch Proteine zu geben, welche den gegenläufigen Weg gehen und vom Zellkern ins Zytoplasma transportiert werden um von den dort vorhandenen Proteasomen abgebaut zu werden (Chen und Madura, 2014).

Es bleibt fraglich, warum nur Komponenten der 19S Untereinheit und keine der 20S Untereinheit identifiziert wurden. Die Erklärung könnte der Zellkern-Import von Proteasomen sein, der für die Zelle ein großes Problem darstellt. Der Komplex ist in seiner Gänze zu groß um an einem Stück durch die Pore zu passen. Aus diesem Grund wird das Proteasom in

Vorläuferuntereinheiten (wahrscheinlich 19S und 20S Proteasom) in den Zellkern transportiert und dort zusammengebaut. Mindestens eine Komponente jeder Untereinheit besitzt eine NLS, über die der Import initiiert werden kann. Dieser Import wird von Importinen/Karyopherinen unterstützt (Chen *et al.*, 2011; Isono *et al.*, 2007; Lehmann *et al.*, 2002; Savulescu *et al.*, 2011; Wendler *et al.*, 2004). Es ist jedoch weiterhin unklar, wie genau der Proteasom-Import und die Proteasom-Assemblierung in Hefe ablaufen (zusammengefasst in Enekel, 2014). Somit könnte Num1 und der NTC am Transport der 19S Untereinheit des Proteasoms beteiligt sein. Sowohl Importine/Karyopherine als auch Teile der Kernpore konnten nach Num1:3xHA Pull-Down identifiziert werden (3.7).

Zusätzlich wäre denkbar, dass Num1 selbst ubiquitiniert bzw. deubiquitiniert wird und es deshalb mit den hier beschriebenen Proteinen interagiert. Durch Ubiquitinierung kann die Funktion eines Proteins geändert werden. Dies wäre im Zusammenhang mit Num1 gut denkbar weil bereits mehrere Funktionen postuliert wurden. Das einzige deubiquitinierende Enzym (Ubp12) in den vorliegenden Datensätzen interagiert ausschließlich mit Num1. Das könnte bedeuten, dass Num1 zum verlassen des NTC ubiquitiniert werden muss (z.B. durch Prp19). Außerhalb des NTC könnte Num1 dann durch Ubp12 wieder deubiquitiniert werden. Dies könnte mithilfe von anti-Ubiquitin Antikörpern untersucht werden. Es sollte zunächst in Rohzellextrakt die Anwesenheit von ubiquitiniertem Num1 bewiesen werden. Anschließend könnte derselbe Antikörper Aufschluss über eine bestehende Ubiquitinierung von Num1 im NTC geben. Dafür müsste lediglich der NTC wie hier beschrieben mit Prp19 präzipitiert werden.

Es bleibt zu erwähnen, dass für alle identifizierten Komponenten des Proteinabbaus aus Tabelle 6 mindestens in einer der jeweiligen WT-Kontrollen (ohne HA-Fusionsprotein) auch passende Peptide identifiziert wurden. Dies ist nicht weiter verwunderlich, da Proteasomen neben Ribosomen die am häufigsten vorkommenden molekularen Maschinen in der Zelle sind. Ribosomale Proteine wurden dagegen meist in Kontrolle und IP-Stamm mit ähnlich hohen Gesamtpeptidmengen identifiziert.

Um zu klären, ob der NTC und/oder Num1 allein mit dem Proteasom interagiert, sollten in Zukunft weitere fluoreszenzmikroskopische Experimente durchgeführt werden, bei denen eine Komponente der 19S Untereinheit und Num1 mit verschiedenen Fluoreszenztags versehen werden könnten. Somit ließe sich klären, ob die zytoplasmatische Num1 Lokalisierung in distinkten Foci (Kellner *et al.*, 2014) mit der zytoplasmatischen Lokalisierung von Proteasomen übereinstimmt. Proteasomen sind dafür bekannt, in bestimmten Bereichen in der Nähe des Zellkerns zu akkumulieren und es ist auch bekannt, dass sie in „stillen“ Zellen als Untereinheiten in Vakuolen, den sogenannten PSGs (proteasome storage granules), gespeichert werden (Laporte *et al.*, 2008). Der Transport von Proteasomen sollte gleichzeitig fluoreszenzmikroskopisch in  $\Delta kin1$ - und  $\Delta num1$ -Stämmen in Spordien und

Filamenten überprüft werden. Dies könnte klären, ob Num1 für den Abbau von Proteinen durch das Proteasom oder für den Transport der 19S Untereinheit verantwortlich ist.

### 3.6 Num1 als Komponente des mRNA Exports

In *S. cerevisiae* konnte kürzlich gezeigt werden, dass der NTC für die Rekrutierung des TREX Komplexes an die Transkriptionsmaschinerie benötigt wird. Wie bereits erwähnt wird dafür hauptsächlich die NTC-Komponente Syf1p benötigt, welche den TREX Komplex mit Rbp1p, der größten Untereinheit der RNAPII, verbindet (Chanarat *et al.*, 2011). Der TREX Komplex besteht aus vielen Proteinen und ist zwischen verschiedensten Organismen konserviert. Er erleichtert die Transkriptions-Elongation, indem er gespleißte und mit einer 5' Kappe versehene Transkripte bindet und zur Kernpore transportiert (Katahira und Yoneda, 2009; Palazzo *et al.*, 2007).

Syf1 und die meisten Untereinheiten der RNAPII co-präzipitieren mit Num1:3xHA und/oder Prp19:3xHA (Tabelle 5). Überraschenderweise wurde Rbp1 jedoch nicht identifiziert. Dies deutet darauf hin, dass Syf1 den TREX in *U. maydis* nicht oder auf eine andere Weise mit der RNAPII koppelt, wie es in Hefe gezeigt werden konnte (Meinel *et al.*, 2013). In *U. maydis* fehlen viele bekannte Komponenten des TREX/THO von Mensch und Hefe. Keines der wenigen Homologen Proteine konnte in den vorliegenden Experimenten identifiziert werden. Andere Proteine, welche den Zellkern-Export von mRNA in Hefe unterstützen sind Yra1p und Mex67p. Dabei bindet Yra1p an prozessierte mRNA, welche anschließend zur Kernpore (NPC) transportiert wird. Dort übernimmt Mex67p die mRNA und schleust sie über den NPC aus dem Zellkern (Zenklusen *et al.*, 2001). Peptide für Yra1 traten auch in den Kontrollexperimenten auf und Mex67p konnte nicht identifiziert werden. Mex67p bildet in Hefe einen mRNA-Export-Komplex mit Mtr2p (Kadowaki *et al.*, 1994a; Kadowaki *et al.*, 1994b) für das *U. maydis* kein Homolog besitzt.

In Metazoen koexistieren unterschiedliche mRNA Exportwege. Einer davon entspricht dem aus Hefe bekannten Weg und der andere ist von dem Exportin Crm1 abhängig (Natalizio und Wente, 2013). Auch das putative *U. maydis* Crm1 Homolog ist jedoch vermutlich nicht mit dem NTC assoziiert, da in keinem der HPLC-MS Experimente entsprechende Peptide nachgewiesen werden konnten.

Diese Befunde deuten darauf hin, dass die Verbindung zwischen mRNA Prozessierung via Spleißen und dem mRNA Export in *U. maydis* partiell anders verläuft, als dies beispielsweise für *S. cerevisiae* bekannt ist. Es wäre möglich, dass der NTC in *U. maydis* keine wichtige Rolle bei dem TREX Komplex vermittelten Export von mRNA spielt oder dass dieser Komplex gänzlich fehlt. Die betreffenden Interaktionen könnten auch hier transient und/oder schwach sein, weshalb die mit der angewandten Methode nur schwer zu identifizieren

wären. Deshalb ist nicht ausgeschlossen, dass Num1 als Chaperon bzw. Adapter den mRNA Export und die mRNP Zusammensetzung stabilisiert.

### 3.7 Num1 und die Kernpore (NPC)

In 3.5 wurde bereits erwähnt, dass die Deletion der E3 Ubiquitinligase Tom1p zu einer Akkumulation von mRNA an der Kernpore führt. Zusätzlich wurde beschrieben, wie die mRNA nach ihrer Prozessierung aus dem Zellkern transportiert wird und dass dieser Transport durch die Kernpore erfolgt. Unabhängig davon, welche Rolle das Num1 Protein im Zytoplasma spielt, ist es sehr wahrscheinlich, dass es den Zellkern über die Kernpore (NPC) verlässt. In den vorliegenden Untersuchungen war es möglich, mehrere Komponenten des NPC (nuclear pore complex) gemeinsam mit Prp19:3xHA und Num1:3xHA zu präzipitieren (Tabelle 7). Dabei stellten Nup192 und Nic96 die Komponenten mit der höchsten Gesamtpeptidmenge da. Nup192p ist die größte Untereinheit des NPC in Hefe und ist mit Nic96p verbunden. Obwohl der NPC, wie bereits erwähnt, essentiell für den mRNA Export ist, führt die Deletion von *nup192p* zu keinen Einschränkungen dieses Exports (Kosova *et al.*, 1999). Nup192p und Nic96p sind Teile des ANC (adaptor nucleoporin complex), welcher an die integralen Membranelemente des NPC gekoppelt ist (Hoelz *et al.*, 2011).

Zusätzlich wurden in den vorliegenden Studien die NPC Komponenten Nup133, Nup84 und Sec13 mit geringen Gesamtpeptidmengen identifiziert. In Hefe wurde gezeigt, dass Nup84p, Nup133p und Sec13p Teile des Nup84-Komplexes sind. Von diesem wird vermutet, dass er sich nahe an der Porenmembran befindet und dort für eine Krümmung der Membran sorgt. Ähnliche Funktionen werden den COPI-, COPII- und Clathrin-Mänteln zugesprochen (Devos *et al.*, 2004; Rout *et al.*, 2000). Es wurde bereits postuliert, dass der Nup84-Komplex einen Ring um die APC-Ringstruktur bildet, welcher den eigentlichen Kanal in der Mitte des NPC einschließt (Debler *et al.*, 2010).

Weitere Anhaltspunkte für die Involvierung des NTC oder von NTC-Komponenten an Import/Export Prozessen an der Kernpore wird durch die Identifikation von Karyopherinen geliefert. Kap114 und Kap104 wurden ausschließlich mit Num1:3xHA co-präzipitiert (Tabelle 7), was auf eine NTC unabhängige Beteiligung am Kernimport schließen lässt. Kap104p ist in Hefe dafür bekannt, mRNA bindende Proteine wie Nab2p und Hrp1p in den Zellkern zu importieren bzw. zu reimportieren (Lee und Aitchison, 1999). Kap114p ist dagegen für den Import von Histonen und Histon-assoziierten Proteinen verantwortlich (Hodges *et al.*, 2005; Morehouse *et al.*, 1999; Mosammaparast *et al.*, 2002). Der Kap114p Proteingehalt in Hefe nimmt bei replikativem Stress zu (Tkach *et al.*, 2012). Für andere Proteine der Karyopherin/Importin-Familie wie Pse1p, Kap123p und Sxm1p konnte bereits ein Einfluss auf den mRNA Export in Hefe gezeigt werden (Seedorf und Silver, 1997). Somit unterstützen

diese Ergebnisse die Theorie, dass Num1 möglicherweise mit dem NTC zur Kernpore transportiert wird, wo Num1 dann den NTC verlässt und über den NPC durch die Kernpore transloziert wird. Anschließend ist auch der Reimport von Num1 mithilfe von Proteinen der Importin/Karyopherin-Familie möglich. Es gibt Anhaltspunkte dafür, dass Num1 und der NTC dabei am mRNA-Export beteiligt sind. Dies kann durch die vorliegenden Ergebnisse jedoch nicht endgültig bewiesen werden.

### 3.8 Die zytoplasmatische Funktion von Num1

Es wurde bereits erwähnt, dass Num1 neben seiner Zellkern-Lokalisierung auch in kleinen Foci im Zytoplasma beobachtet werden konnte. Das in 1.8 beschriebene Modell erklärt diese Lokalisierung mit der Interaktion von Num1 mit Kin1 und einer möglichen Beteiligung an mRNA Transportprozessen. Die Deletion von *num1* nimmt zusätzlich Einfluss auf die Zellmorphologie und die Polarität. Es bleibt jedoch offen, ob diese Effekte Folgen der beeinträchtigten Spleiß-Effizienz sind oder ob sie auf eine direkte Involvierung von Num1 bei den entsprechenden Transportprozessen zurückzuführen ist. In der vorliegenden Arbeit sollten neue Anhaltspunkte gefunden werden, die das postulierte Modell unterstützen oder widerlegen.

Wie in (Tabelle 7) zu sehen ist, wurde in den Immunpräzipitationen Kin1 gemeinsam mit Num1:3xHA co-präzipitiert. Nach der Präzipitation mit Prp19:3xHA konnten jedoch keine zu Kin1 passenden Peptide identifiziert werden. Auch dies deutet darauf hin, dass Num1 NTC unabhängige Funktionen bei intrazellulären Transportprozessen ausübt. Es ist bekannt, dass Kin1 als Motorprotein an Mikrotubuli bindet und sich auf ihnen fortbewegt. Die vorliegenden Immunpräzipitationsexperimente führten zur Identifizierung von Zytoskelettbestandteilen und Proteinen zur Zytoskelett-Assemblierung. In diesem Kontext sind Sla2, Sac6, Act1, Arp2, Tub1 und zwei mögliche Homologe von Tub2p zu nennen (Tabelle 7). Das Zytoskelett in Pilzen besteht ausschließlich aus Mikrotubuli und Aktinfilamenten. Mit Tub1, Tub2 und Act1 konnten die Hauptbestandteile dieser Filamente mit Num1 und/oder Prp19 co-präzipitiert werden. Tub1 und Tub2 sind zwei der am häufigsten vorkommenden Proteine in jedem Organismus. Somit ist es wenig verwunderlich, dass diese auch in der Kontrolle co-präzipitiert wurden. Trotzdem sind die Gesamtpeptidmengen nach der Co-Präzipitation mit Num1:3xHA und Prp19:3xHA mindestens drei mal höher, sodass eine echte Interaktion mit Num1 bzw. Prp19 nicht ausgeschlossen werden kann.

Im Gegensatz zu Tub1 und Tub2 wurde Actin (Act1) exklusiv mit Num1 co-präzipitiert. Das Gleiche gilt für das Sac6 und das Sla2 Protein. Sac6p ist in Hefe für die Bündelung von Aktin-Filamenten verantwortlich (Adams *et al.*, 1989). Das Sla2p Protein ist an der membranständigen Zytoskelett-Assemblierung beteiligt und es hilft bei der Zell-Polarisierung.

Gleichzeitig dient es als Adapter, welcher Aktin mit Clathrin und der Clathrin-vermittelten Endozytose verbindet. Zusätzlich ist bekannt, dass Sla2p bei den kortikal gelegenen Aktin-Filamenten der entstehenden Tochterzelle lokalisiert (Holtzman *et al.*, 1993; Pruyne und Bretscher, 2000; Yang *et al.*, 1999). Auch Arp2p, als Teil des Arp2/3 Komplexes, wird für die Motilität und Integrität von Aktin Filamenten benötigt und hat zusätzlichen Einfluss auf die Endozytose, das Membran-Wachstum und -Polarität (Machesky und Gould, 1999; Winter *et al.*, 1997). Wie alle anderen Aktin-assoziierten Proteine, wurde auch Arp2 ausschließlich mit Num1-3xHA co-präzipitiert. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass Num1 NTC-unabhängig auf bisher unbekannte Weise mit Aktin Filamenten interagiert. Zusammen mit der Interaktion mit Kin1 und dem Verlust des Dynein Transports nach der *num1* Deletion könnte dies erklären, warum die Zellpolarität nach der Deletion von *num1* gestört wird. Es muss jedoch erwähnt werden, dass bisher keine Co-Lokalisierung von Num1 mit Aktin möglich war.

Neben seiner Funktion im NPC (3.7) ist das Sec13 Protein auch Teil der COPII-Hülle von ER-Golgi Vesikeln. Dabei ist Sec13 bei weitem nicht das einzige Sec (secretory) Protein, welches in den HPLC-MS-Studien identifiziert wurde (Tabelle 7). Sec31, Sec23 und Sec24 sind auch bekannte Komponenten der COPII-Hülle. COPII umhüllte Vesikel verlassen das ER und werden anschließend hauptsächlich zum Golgi-Apparat transportiert (Szul und Sztul, 2011). Zusätzlich zu COPII Hüllen gibt es auch die sogenannten COPI Hüllen, welche als Teil von retrograd und anterograd transportierten Vesikeln diskutiert werden (Szul und Sztul, 2011). Die COPI Komponenten Cop1, Sec21, Sec26 und Sec27 co-präzipitierten in den Untersuchungen mit Num1 und Prp19.

Sec18 co-präzipitierte ausschließlich mit Num1:3xHA und fungiert in Hefe als Demontage-Chaperon von AAA ATPasen und SNAREs beim ER/Golgi Transport von Vesikeln (Hong, 2005; Ungermann *et al.*, 1998). Auch die Rab/GTPase Sec4 wurde nur nach Präzipitation mit Num1:3xHA nachgewiesen. Sec4p ist wichtig für den Transport vom Golgi-Apparat zum Exozyst und ist an weiteren Prozessen wie Autophagie und Endozytose beteiligt (Geng *et al.*, 2010; Guo *et al.*, 1999; Novick *et al.*, 2006). Die anderen zwei Sec-Proteine, welche ausschließlich nach Präzipitation von Num1:3xHA gefunden wurden sind Sec61 und Sec63. Beide sind Teile von Proteinkomplexen, welche für den Proteinimport ins ER gebraucht werden (Rapoport, 1992).

Alle aufgeführten Sec-Proteine sind an der Entstehung und dem Transport von Vesikeln beteiligt. Dies deutet auf eine mögliche Num1 Funktion als Vesikel-assoziiertes Protein hin. Dabei könnte Num1 die Vesikelhüllen stabilisieren oder sie mit anderen transportierten Proteinen verbinden.

Des Weiteren wurde die schwere Kette von Clathrin (Chc1) und die AP-1 Komplex Komponenten Aps1, Apl4 und Apm1 in den HPLC-MS Studien identifiziert (Tabelle 7).

Clathrine und der AP-1 Komplex sind an der Entstehung und dem Transport von Endosomen und frühen Endosomen (EEs) beteiligt (Nakayama *et al.*, 1991; Stepp *et al.*, 1995).

Für *U. maydis* konnte bereits gezeigt werden, dass die Deletion von *num1* zu einer Beeinträchtigung der EE Motilität und zu einer defekten Zellpolarität führt (Kellner *et al.*, 2014). Dies wurde bisher hauptsächlich mit der Interaktion zwischen Num1 und Kin1 erklärt. Dabei werden Endosomen nach der Deletion von *num1* möglicherweise aufgrund der gestörten Dynein Aktivität nicht mehr transportiert. Es wäre jedoch auch möglich, dass Num1 als Chaperon/Adapter die Vesikel-Hüllen mit anderen Transportkomponenten verbindet. Die beschriebenen  $\Delta num1$ -Phänotypen könnten teilweise durch die hier präsentierten Interaktionen mit Proteinen der EE Hülle und anderer Vesikeltransport-Komponenten erklärt werden.

Andere Proteine, welche zusätzlichen Aufschluss über die Num1 Funktion im Zytoplasma liefern könnten und in unseren Experimenten als direkte oder indirekte Interaktionspartner von Num1 identifiziert wurden sind die Septine Cdc12 und Cdc11. Die homologen Proteine in Hefe sind an der Wahl der korrekten Sprossseite, der Morphogenese und der Zytokinese beteiligt (Carroll *et al.*, 1998; Cid *et al.*, 1998; Madden und Snyder, 1998) und könnten somit auch für das polare Wachstum in *U. maydis* von Bedeutung sein.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass es viele Anhaltspunkte für eine Involvierung des NTC, aber vor allem von Num1 in verschiedensten zellulären Transportprozessen gibt. Zusätzlich wurden Proteine identifiziert, welche einen Transport von mRNA bzw. mRNPs durch Num1 und den NTC möglich machen. Es kann jedoch nur mit hoher Sicherheit behauptet werden, dass Num1 ohne andere NTC-Komponenten den Zellkern über die Kernpore verlässt. Es gibt verschiedene Möglichkeiten, die den Grund dieses Exports erklären würden. Einerseits kann Num1 wie erwähnt am mRNA Export beteiligt sein und zum anderen könnte Num1 für den Export/Import von bestimmten ubiquitinierten Proteinen und Teilen des Proteasoms verantwortlich sein. Auch eine überschneidende Funktion schließt sich keinesfalls aus.

Mit der Identifizierung von verschiedensten Proteinen, welche am Vesikeltransport (Sec-Proteine) und der Zytoskelettassemblierung beteiligt sind, erhalten wir Argumente dafür, dass die Auswirkungen der *num1* Deletion auf den Endosomentransport und das polarisierte Wachstum nicht ausschließlich durch die bekannte Num1 Funktion im Spleiß-assoziierten NTC hervorgerufen wird.

Wichtige Folgeexperimente bestünden zunächst in der Verifizierung einzelner Proteininteraktionen mit Num1. Ein Versuch zur Bestätigung der Interaktion zwischen Nup192 und Num1 war möglicherweise aufgrund der Größe des Nup192 Proteins und dessen Lokalisierung in der Kernmembran nicht möglich (6.2). Auch die Interaktion mit

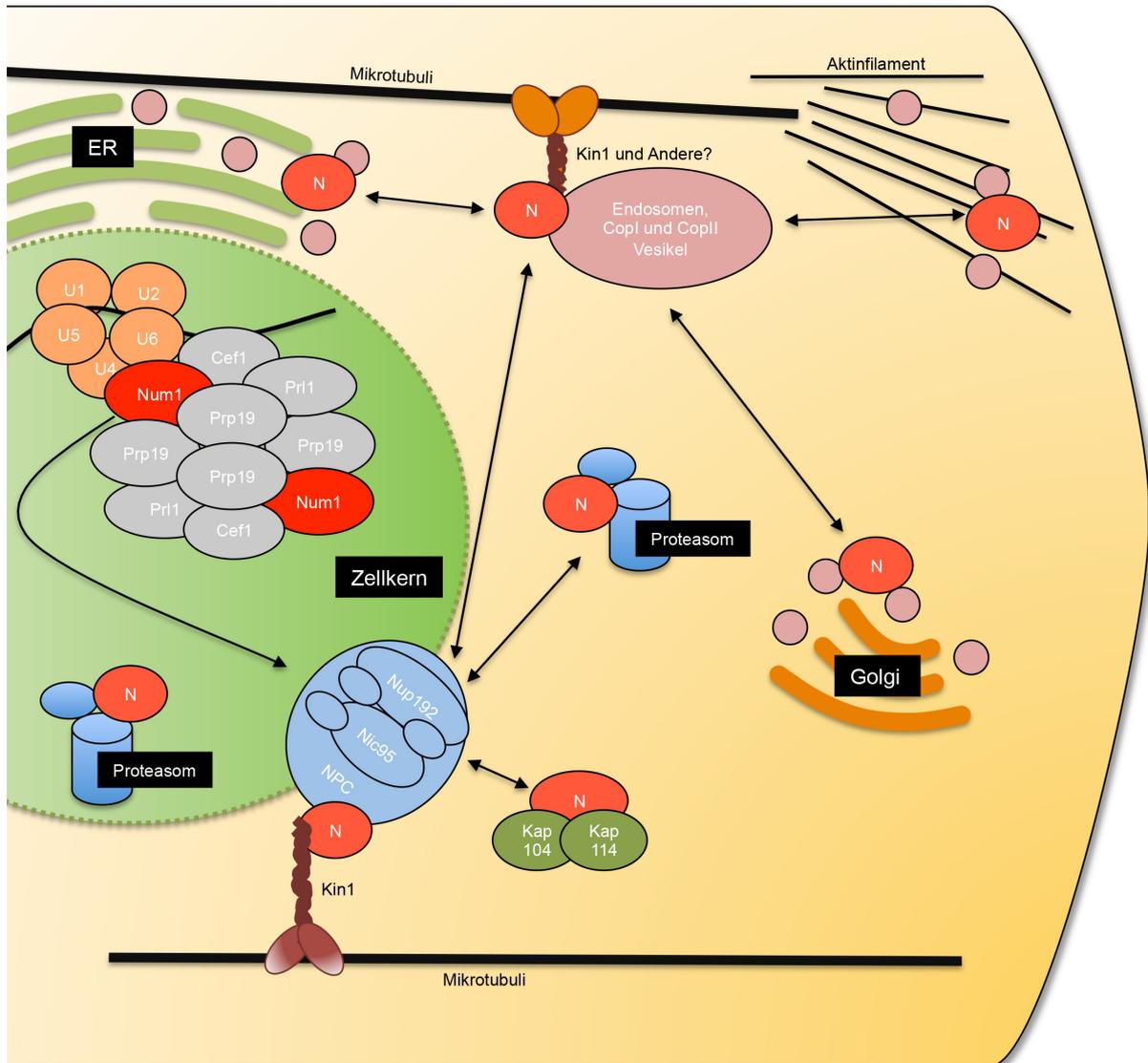
Importern und Exportern an der Zellpore sollte mit weiteren Methoden, wie Co-IP oder Hefe-Zwei-Hybrid, näher untersucht werden. Die genauere Untersuchung der Num1-Lokalisierung im Zytoplasma mit hochauflösenden Mikroskopiemethoden könnte in Zukunft die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse stützen. Bisher war es beispielsweise nicht möglich, Num1 mit Aktin oder Mikrotubuli zu co-lokalisieren. Auf ähnliche Weise könnte auch der Transport einzelner mRNA Moleküle verfolgt und der Einfluss der *num1* Deletion auf diese Transportprozesse aufgeklärt werden.

### **3.9 Die Funktionen des Num1 Proteins in *U. maydis***

Zusammenfassend lassen die vorliegenden Ergebnisse genauere Einblicke in die Num1 Funktion zu. Es war bereits bekannt, dass Num1 mit Komponenten des NTC interagiert und dass die Deletion von *num1* zu einer global herabgesetzten Spleiß-Effizienz führt. Ferner war bekannt, dass Num1 mit dem zytoplasmatisch lokalisierten Kin1 Motorprotein interagiert. Zusätzlich sind verschiedene Transportprozesse wie mRNA Transport und Endosomen Motilität in Abwesenheit von Num1 gestört (Kellner *et al.*, 2014). Dabei konnte bisher nicht geklärt werden, ob das aberrante Hyphenwachstum und die Polaritätsdefekte in der Deletionsmutante indirekt durch Beeinträchtigung der Spleiß-Effizienz verursacht werden.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Num1 ein integraler Bestandteil des NTCs ist und dass die Deletion von Num1 zu einer nahezu vollständigen Dissoziation des selbigen führt. Dies erklärt die abnehmende Spleiß-Effizienz in Abwesenheit von Num1. Ferner konnten neue Hinweise gesammelt werden, die belegen könnten wie Num1 den Zellkern verlässt und was seine Funktion innerhalb des Zytoplasmas ist.

Um die wichtigsten Ergebnisse zusammenzufassen wurde ein Modell der bekannten und postulierten Num1 Funktionen erstellt. Dabei ist zu beachten, dass es sich hier größtenteils um Vermutungen handelt, welche noch bewiesen werden müssen.



**Abbildung 32: Schematische Darstellung der verschiedenen Num1 Funktionen.**

Das Num1 Protein ist Teil des NTC im Zellkern. Dabei stabilisiert Num1 den Komplex als Di- oder Multimer. Auch die Kernkomponenten Cef1, Prl1 und Prp19 sind möglicherweise mehr als einmal in dem Komplex vertreten. Als Teil des NTC hat Num1 Einfluss auf DNA-Reparatur bzw. -Instandhaltung, Zellzykluskontrolle und Spleiß-Effizienz bzw. -Genauigkeit. Nach der mRNA-Prozessierung dissoziiert das Spleißosom und damit auch Teile des NTC. Num1 interagiert über Komponenten des Spleißosoms mit reifer mRNA und wird mit mRNA bindenden Proteinen zur Kernpore transportiert. Hier dissoziieren die letzten Reste des NTC von Num1, welches den Zellkern anschließend als stabilisierendes Chaperon mit mRNPs über die Kernpore verlässt. Im Zytoplasma ist Num1 in verschiedensten Transportprozessen involviert und interagiert direkt nach dem Austritt aus der Kernpore mit Kin1. Num1 interagiert im Zytoplasma mit Endosomen, COPI und COPII Vesikeln. Dies deutet auf eine Involvierung in Transportprozessen wie dem ER/Golgi Transport, dem Golgi/ER Transport,

der Endocytose und der Exozytose hin. Dabei lokalisiert Num1 nicht nur an Mikrotubuli, sondern auch an apikal gelegenen Aktinfilamenten.

Der Import bzw. Reimport von Num1 in den Zellkern erfolgt wie bei den meisten importierten Proteinen mithilfe von Karyopherinen.

Zusätzlich ist Num1, teilweise zusammen mit Prp19 an der Ubiquitinierung und dem Abbau von Proteinen beteiligt. Die Protein Degradierung findet hauptsächlich im Zellkern und nur in geringem Maße im Zytoplasma statt. Num1 ist auch an der Assemblierung von Zellkern-Proteasomen beteiligt, indem es als Shuttle-Chaperon eine Funktion bei dem Import der 19S Untereinheit in den Zellkern erfüllt.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass das Num1 Protein Teil des NTC in *U. maydis* ist. Dabei ist die Zusammensetzung des NTC sehr ähnlich zu denen aus Mensch und Hefe. Num1 stabilisiert den NTC und die Deletion von *num1* führt somit zur Dissoziation des Komplexes. Desweiteren erfüllt Num1 zusätzliche Aufgaben im Zytoplasma, nachdem es über den NTC aus dem Kern exportiert wurde. Alle diese Funktionen machen eine Adapter- bzw. Chaperon- Funktion von Num1 wahrscheinlich.

Es bleibt fraglich warum in Hefe solch ein wichtiger Adapter nicht vorkommt. Hefe wächst nicht filamentös, weshalb auch der Langstreckentransport in diesem Pilz wenig ausgeprägt ist. Beim Wachstum als Sporidie sind auch in *U. maydis* keine morphologischen Auswirkungen der *num1* Deletion zu beobachten. Dies deutet darauf hin, dass Num1 hauptsächlich beim Langstreckentransport und dem damit verbundenen polaren Wachstum benötigt wird. Es ist auch möglich, dass Snt309p die NTC-unabhängigen Funktionen des Num1 Proteins in Hefe erfüllt.

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Material und Bezugsquellen

#### 4.1.1 *Escherichia coli*-Stamm

Für alle vorgenommenen Klonierungen wurde der Stamm TOP10 (Invitrogen) verwendet, ein Derivat von *E. coli* DH10B mit den folgenden genetischen Markern: F- mcrA  $\Delta$ (mrr-hsdRMS-mcrBC)  $\phi$ 80lacZ $\Delta$ M15  $\Delta$ lacX74 nupG recA1 araD139  $\Delta$ (ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(StrR) endA1  $\lambda$ -. Die Nomenklatur von *E. coli*-Stämmen richtet sich nach (Demerec *et al.*, 1966).

#### 4.1.2 *Saccharomyces cerevisiae*-Stamm

Für das Hefe-Zwei-Hybrid-System wurde der Stamm AH109 verwendet. Der Stamm hat den Genotyp MATa, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4 $\Delta$ , gal80 $\Delta$ , LYS2::GAL1UAS-GAL1TATA-HIS3, GAL2UAS-GAL2TATA-ADE2, URA3::MEL1UAS-MEL1TATA-lacZ (James *et al.*, 1996).

#### 4.1.3 *Ustilago maydis*-Stämme

Tabelle 8: Ausgangsstämme

Stamm	Genotyp	Resistenz	Referenz
AB31	<i>a2, P<sub>crq1</sub>:bE1, P<sub>crq1</sub>:bW2</i>	Phleo <sup>R</sup>	(Brachmann <i>et al.</i> , 2001)
UNK108	<i>a2, P<sub>crq1</sub>:bE1, P<sub>crq1</sub>:bW2, <math>\Delta</math>num1::hyg<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup>	(Kellner, 2012)
UNK64	<i>a2, P<sub>crq1</sub>:bE1, P<sub>crq1</sub>:bW2, num1:tap:eGFP, nat<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , nat <sup>R</sup>	(Kellner, 2012)
UNK174	<i>a2, P<sub>crq1</sub>:bE1, P<sub>crq1</sub>:bW2, <math>\Delta</math>kin1::hyg<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup>	(Kellner, 2012)

Tabelle 9: In der Arbeit hergestellte Stämme

Stamm	Ausgangsstamm	Genotyp	Resistenzen
USH7	AB31	<i>a2, P<sub>crq1</sub>:bE1, P<sub>crq1</sub>:bW2, cef1:3xegfp, nat<sup>R</sup></i>	ClonNat/Phleo
USH8	AB31	<i>a2, P<sub>crq1</sub>:bE1, P<sub>crq1</sub>:bW2, cef1:3xegfp, nat<sup>R</sup></i>	ClonNat/Phleo
USH9	AB31	<i>a2, P<sub>crq1</sub>:bE1, P<sub>crq1</sub>:bW2, cef1:3xegfp, nat<sup>R</sup></i>	ClonNat/Phleo
USH10	AB31	<i>a2, P<sub>crq1</sub>:bE1, P<sub>crq1</sub>:bW2, prp19:3xHA, cbx<sup>R</sup></i>	cbx/Phleo
USH11	AB31	<i>a2, P<sub>crq1</sub>:bE1, P<sub>crq1</sub>:bW2, prp19:3xHA, cbx<sup>R</sup></i>	cbx/Phleo
USH12	AB31	<i>a2, P<sub>crq1</sub>:bE1, P<sub>crq1</sub>:bW2, prp19:3xHA, cbx<sup>R</sup></i>	cbx/Phleo
USH13	UNK108	<i>a2, P<sub>crq1</sub>:bE1, P<sub>crq1</sub>:bW2, <math>\Delta</math>num1::hyg<sup>R</sup>, prp19:3xHA, cbx<sup>R</sup></i>	cbx/Hyg/Phleo

USH14	UNK108	$a2, P_{crg1}:bE1, P_{crg1}:bW2, \Delta num1::hyg^R, prp19:3xHA, cbx^R$	cbx/Hyg/Phleo
USH15	UNK108	$a2, P_{crg1}:bE1, P_{crg1}:bW2, \Delta num1::hyg^R, prp19:3xHA, cbx^R$	cbx/Hyg/Phleo
USH16	AB31	$a2, P_{crg1}:bE1, P_{crg1}:bW2, cef1:tap:egfp, nat^R$	ClonNat/Phleo
USH17	AB31	$a2, P_{crg1}:bE1, P_{crg1}:bW2, cef1:tap:egfp, nat^R$	ClonNat/Phleo
USH18	AB31	$a2, P_{crg1}:bE1, P_{crg1}:bW2, cef1:tap:egfp, nat^R$	ClonNat/Phleo
USH19	AB31	$a2, P_{crg1}:bE1, P_{crg1}:bW2, cef1:3xHA, cbx^R$	cbx/Phleo
USH20	AB31	$a2, P_{crg1}:bE1, P_{crg1}:bW2, cef1:3xHA, cbx^R$	cbx/Phleo
USH21	AB31	$a2, P_{crg1}:bE1, P_{crg1}:bW2, cef1:3xHA, cbx^R$	cbx/Phleo
USH22	AB31	$a2, P_{crg1}:bE1, P_{crg1}:bW2, cef1:3xHA, cbx^R$	cbx/Phleo
USH23	AB31	$a2, P_{crg1}:bE1, P_{crg1}:bW2, cef1:3xHA, cbx^R$	cbx/Phleo
USH24	AB31	$a2, P_{crg1}:bE1, P_{crg1}:bW2, cef1:3xHA, cbx^R$	cbx/Phleo
USH25	UNK108	$a2, P_{crg1}:bE1, P_{crg1}:bW2, \Delta num1::hyg^R, cef1:3xHA, cbx^R$	cbx/Hyg/Phleo
USH26	UNK108	$a2, P_{crg1}:bE1, P_{crg1}:bW2, \Delta num1::hyg^R, cef1:3xHA, cbx^R$	cbx/Hyg/Phleo
USH27	UNK108	$a2, P_{crg1}:bE1, P_{crg1}:bW2, \Delta num1::hyg^R, cef1:3xHA, cbx^R$	cbx/Hyg/Phleo
USH28	UNK108	$a2, P_{crg1}:bE1, P_{crg1}:bW2, \Delta num1::hyg^R, cef1:3xHA, cbx^R$	cbx/Hyg/Phleo
USH29	AB31	$a2, P_{crg1}:bE1, P_{crg1}:bW2, cef1:tap:egfp, nat^R$	ClonNat/Phleo
USH30	AB31	$a2, P_{crg1}:bE1, P_{crg1}:bW2, cef1:tap:egfp, nat^R$	ClonNat/Phleo
USH31	AB31	$a2, P_{crg1}:bE1, P_{crg1}:bW2, cef1:tap:egfp, nat^R$	ClonNat/Phleo
USH32	UNK108	$a2, P_{crg1}:bE1, P_{crg1}:bW2, \Delta num1::hyg^R, cef1:tap:egfp, cbx^R$	cbx/Hyg/Phleo
USH33	UNK108	$a2, P_{crg1}:bE1, P_{crg1}:bW2, \Delta num1::hyg^R, cef1:tap:egfp, cbx^R$	cbx/Hyg/Phleo
USH34	UNK108	$a2, P_{crg1}:bE1, P_{crg1}:bW2, \Delta num1::hyg^R, cef1:tap:egfp, cbx^R$	cbx/Hyg/Phleo
USH35	AB31	$a2, P_{crg1}:bE1, P_{crg1}:bW2, prp19:tap:egfp, nat^R$	ClonNat/Phleo
USH36	AB31	$a2, P_{crg1}:bE1, P_{crg1}:bW2, prp19:tap:egfp, nat^R$	ClonNat/Phleo
USH37	AB31	$a2, P_{crg1}:bE1, P_{crg1}:bW2, prp19:tap:egfp, nat^R$	ClonNat/Phleo
USH38	UNK108	$a2, P_{crg1}:bE1, P_{crg1}:bW2, \Delta num1::hyg^R, prp19:tap:egfp, cbx^R$	ClonNat/Phleo
USH39	UNK108	$a2, P_{crg1}:bE1, P_{crg1}:bW2, \Delta num1::hyg^R, prp19:tap:egfp, cbx^R$	ClonNat/Phleo
USH40	UNK108	$a2, P_{crg1}:bE1, P_{crg1}:bW2, \Delta num1::hyg^R, prp19:tap:egfp, cbx^R$	ClonNat/Phleo
USH41	UNK64	$a2, P_{cra1}:bE1, P_{cra1}:bW2, num1:tap:egfp, nat^R, kin1:3xHA, cbx^R$	cbx/ClonNat/Phleo
USH42	UNK64	$a2, P_{cra1}:bE1, P_{cra1}:bW2, num1:tap:egfp, nat^R, kin1:3xHA, cbx^R$	cbx/ClonNat/Phleo
USH43	UNK64	$a2, P_{cra1}:bE1, P_{cra1}:bW2, num1:tap:egfp, nat^R, kin1:3xHA, cbx^R$	cbx/ClonNat/Phleo
USH44	USH12	$a2, P_{cra1}:bE1, P_{cra1}:bW2, prp19:3xHA, cbx^R, cef1:3xmyc, nat^R$	cbx/ClonNat/Phleo
USH45	USH12	$a2, P_{cra1}:bE1, P_{cra1}:bW2, prp19:3xHA, cbx^R, cef1:3xmyc, nat^R$	cbx/ClonNat/Phleo
USH46	USH12	$a2, P_{cra1}:bE1, P_{cra1}:bW2, prp19:3xHA, cbx^R, cef1:3xmyc, nat^R$	cbx/ClonNat/Phleo
USH47	USH13	$a2, P_{cra1}:bE1, P_{cra1}:bW2, \Delta num1::hyg^R, prp19:3xHA, cbx^R, cef1:3xmyc, nat^R$	cbx/ClonNat/Phleo/ Hyg
USH48	USH13	$a2, P_{cra1}:bE1, P_{cra1}:bW2, \Delta num1::hyg^R, prp19:3xHA, cbx^R, cef1:3xmyc, nat^R$	cbx/ClonNat/Phleo/ Hyg

USH49	USH13	<i>a2, P<sub>crg1</sub>:bE1, P<sub>crg1</sub>:bW2, Δnum1::hyg<sup>R</sup>, prp19:3xHA, cbx<sup>R</sup>, cef1:3xmyc, nat<sup>R</sup></i>	cbx/ClonNat/Phleo/Hyg
USH50	USH12	<i>a2, P<sub>crg1</sub>:bE1, P<sub>crg1</sub>:bW2, prp19:3xHA, cbx<sup>R</sup>, syf1:3xmyc, nat<sup>R</sup></i>	cbx/ClonNat/Phleo
USH51	USH12	<i>a2, P<sub>crg1</sub>:bE1, P<sub>crg1</sub>:bW2, prp19:3xHA, cbx<sup>R</sup>, syf1:3xmyc, nat<sup>R</sup></i>	cbx/ClonNat/Phleo
USH52	USH12	<i>a2, P<sub>crg1</sub>:bE1, P<sub>crg1</sub>:bW2, prp19:3xHA, cbx<sup>R</sup>, syf1:3xmyc, nat<sup>R</sup></i>	cbx/ClonNat/Phleo
USH53	USH13	<i>a2, P<sub>crg1</sub>:bE1, P<sub>crg1</sub>:bW2, Δnum1::hyg<sup>R</sup>, prp19:3xHA, cbx<sup>R</sup>, syf1:3xmyc, nat<sup>R</sup></i>	cbx/ClonNat/Phleo/Hyg
USH54	USH12	<i>a2, P<sub>crg1</sub>:bE1, P<sub>crg1</sub>:bW2, prp19:3xHA, cbx<sup>R</sup>, prl1:3xmyc, nat<sup>R</sup></i>	cbx/ClonNat/Phleo
USH55	USH12	<i>a2, P<sub>crg1</sub>:bE1, P<sub>crg1</sub>:bW2, prp19:3xHA, cbx<sup>R</sup>, prl1:3xmyc, nat<sup>R</sup></i>	cbx/ClonNat/Phleo
USH56	USH12	<i>a2, P<sub>crg1</sub>:bE1, P<sub>crg1</sub>:bW2, prp19:3xHA, cbx<sup>R</sup>, prl1:3xmyc, nat<sup>R</sup></i>	cbx/ClonNat/Phleo
USH57	USH13	<i>a2, P<sub>crg1</sub>:bE1, P<sub>crg1</sub>:bW2, Δnum1::hyg<sup>R</sup>, prp19:3xHA, cbx<sup>R</sup>, prl1:3xmyc, nat<sup>R</sup></i>	cbx/ClonNat/Phleo/Hyg
USH58	USH13	<i>a2, P<sub>crg1</sub>:bE1, P<sub>crg1</sub>:bW2, Δnum1::hyg<sup>R</sup>, prp19:3xHA, cbx<sup>R</sup>, prl1:3xmyc, nat<sup>R</sup></i>	cbx/ClonNat/Phleo/Hyg
USH59	USH13	<i>a2, P<sub>crg1</sub>:bE1, P<sub>crg1</sub>:bW2, Δnum1::hyg<sup>R</sup>, prp19:3xHA, cbx<sup>R</sup>, prl1:3xmyc, nat<sup>R</sup></i>	cbx/ClonNat/Phleo/Hyg
USH60	UNK108	<i>a2, P<sub>crg1</sub>:bE1, P<sub>crg1</sub>:bW2, Δnum1::num1<sub>1-65</sub>:nat<sup>R</sup></i>	Phleo/ClonNat
USH61	UNK108	<i>a2, P<sub>crg1</sub>:bE1, P<sub>crg1</sub>:bW2, Δnum1::num1<sub>1-65</sub>:nat<sup>R</sup></i>	Phleo/ClonNat
USH62	UNK108	<i>a2, P<sub>crg1</sub>:bE1, P<sub>crg1</sub>:bW2, Δnum1::num1<sub>1-65</sub>:nat<sup>R</sup></i>	Phleo/ClonNat
USH63	AB31	<i>a2, P<sub>crg1</sub>:bE1, P<sub>crg1</sub>:bW2, cef1:3xmyc, nat<sup>R</sup></i>	Phleo/ClonNat
USH64	AB31	<i>a2, P<sub>crg1</sub>:bE1, P<sub>crg1</sub>:bW2, cef1:3xmyc, nat<sup>R</sup></i>	Phleo/ClonNat
USH65	AB31	<i>a2, P<sub>crg1</sub>:bE1, P<sub>crg1</sub>:bW2, cef1:3xmyc, nat<sup>R</sup></i>	Phleo/ClonNat
USH66	AB31	<i>a2, P<sub>crg1</sub>:bE1, P<sub>crg1</sub>:bW2, syf1:3xmyc, nat<sup>R</sup></i>	Phleo/ClonNat
USH67	AB31	<i>a2, P<sub>crg1</sub>:bE1, P<sub>crg1</sub>:bW2, syf1:3xmyc, nat<sup>R</sup></i>	Phleo/ClonNat
USH68	AB31	<i>a2, P<sub>crg1</sub>:bE1, P<sub>crg1</sub>:bW2, syf1:3xmyc, nat<sup>R</sup></i>	Phleo/ClonNat
USH69	AB31	<i>a2, P<sub>crg1</sub>:bE1, P<sub>crg1</sub>:bW2, prl1:3xmyc, nat<sup>R</sup></i>	Phleo/ClonNat
USH70	AB31	<i>a2, P<sub>crg1</sub>:bE1, P<sub>crg1</sub>:bW2, prl1:3xmyc, nat<sup>R</sup></i>	Phleo/ClonNat
USH71	AB31	<i>a2, P<sub>crg1</sub>:bE1, P<sub>crg1</sub>:bW2, prl1:3xmyc, nat<sup>R</sup></i>	Phleo/ClonNat
USH72	AB31	<i>a2, P<sub>crg1</sub>:bE1, P<sub>crg1</sub>:bW2, num1:3xHA, hyg<sup>R</sup></i>	Hyg/Phleo
USH73	AB31	<i>a2, P<sub>crg1</sub>:bE1, P<sub>crg1</sub>:bW2, num1:3xHA, hyg<sup>R</sup></i>	Hyg/Phleo
USH74	AB31	<i>a2, P<sub>crg1</sub>:bE1, P<sub>crg1</sub>:bW2, num1:3xHA, hyg<sup>R</sup></i>	Hyg/Phleo
USH75	USH72	<i>a2, P<sub>crg1</sub>:bE1, P<sub>crg1</sub>:bW2, num1:3xHA, hyg<sup>R</sup>, nup192:3xmyc, nat<sup>R</sup></i>	Hyg/Phleo/ClonNat
USH76	USH73	<i>a2, P<sub>crg1</sub>:bE1, P<sub>crg1</sub>:bW2, num1:3xHA, hyg<sup>R</sup>, nup192:3xmyc, nat<sup>R</sup></i>	Hyg/Phleo/ClonNat
USH77	UNK174	<i>a2, P<sub>crg1</sub>:bE1, P<sub>crg1</sub>:bW2, Δkin1::hyg<sup>R</sup>, cef1:egfp, nat<sup>R</sup></i>	Hyg/Phleo/ClonNat
USH78	UNK174	<i>a2, P<sub>crg1</sub>:bE1, P<sub>crg1</sub>:bW2, Δkin1::hyg<sup>R</sup>, cef1:egfp, nat<sup>R</sup></i>	Hyg/Phleo/ClonNat
USH79	UNK174	<i>a2, P<sub>crg1</sub>:bE1, P<sub>crg1</sub>:bW2, Δkin1::hyg<sup>R</sup>, cef1:egfp, nat<sup>R</sup></i>	Hyg/Phleo/ClonNat
USH80	AB31	<i>a2, P<sub>crg1</sub>:bE1, P<sub>crg1</sub>:bW2, nup192:3xmyc, nat<sup>R</sup></i>	Phleo/ClonNat
USH81	USH72	<i>a2, P<sub>crg1</sub>:bE1, P<sub>crg1</sub>:bW2, ipR, p123 Pnum1:num1:3xeGFP, ipS, num1:3xHA, hygR</i>	cbx/Phleo/Hyg
USH82	USH72	<i>a2, P<sub>crg1</sub>:bE1, P<sub>crg1</sub>:bW2, ipR, p123 Pnum1:num1:3xeGFP, ipS, num1:3xHA, hygR</i>	cbx/Phleo/Hyg

USH83	USH72	<i>a2, P<sub>crG1</sub>: bE1, P<sub>crG1</sub>: bW2, ipR, p123 P<sub>num1</sub>: num1:3xeGFP, ipS, num1:3xHA, hygR</i>	cbx/Phleo/Hyg
USH84	USH72	<i>a2, P<sub>crG1</sub>: bE1, P<sub>crG1</sub>: bW2, ipR, p123 P<sub>num1</sub>: num1:3xeGFP, ipS, num1:3xHA, hygR</i>	cbx/Phleo/Hyg

a, b - Paarungstyp-Loci, mfa2 - Pheromon-Gen, E1, W2 - Gene des b-Paarungstyp-Locus, Promotor, P<sub>nar1</sub> – konditionaler Nitrat-Reduktase Promotor (Banks *et al.*, 1993), P<sub>crG1</sub> – konditionaler Arabinose-induzierbarer Promotor (Bottin *et al.*, 1996), :: - homologer Austausch, : - Fusion, PhleoR – Phleomycin-Resistenz, CbxR – Carboxin-Resistenz, HygR – Hygromycin- Resistenz, NatR – Nourseothricin-Resistenz.

#### 4.1.4 Verwendete Kits

In dieser Arbeit wurden die Kits JETSORB (Genomed) zur Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen, TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen) zur Klonierung von DNA-Fragmenten, Qiaprep Miniprep Kit, Qiagen Plasmid Midi Kit, Roth Roti-Prep Plasmid MINI Kit und Invitrogen PureLink Quick Plasmid Miniprep Kit zur Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*, DIG High-Prime Kit (Roche) zur Herstellung DIG-markierter Sonden für den Southern- Blot sowie Quiaquick PCR Purification Kit (Quiagen) zur Aufreinigung von Plasmiden vor der Sequenzierung verwendet. Proteinkonzentrationen wurden mit Pierce BCS Protein Assay Kit gemessen. Das MesaGreen qPCR MasterMix for SYBR Assay Kit (Eurogentech) wurde für qRT-PCR Analysen verwendet. Das ProtoScript AMV First Strand cDNA Synthesis Kit (NEB) und das SuperScript III Kit (Invitrogen) wurden für die Erststrang cDNA Synthese bei der reversen Transkription von mRNA verwendet. Das TurboDNase Kit (Ambion) wurde für die Aufreinigung von RNA für qRT-PCR Analysen verwendet.

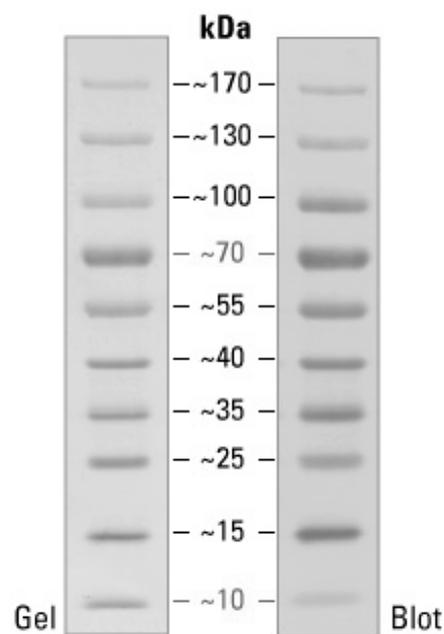
#### 4.1.5 Enzyme, Proteine und Antikörper

Tabelle 10: In dieser Arbeit verwendete Enzyme, Proteine und Antikörper

Name	Bezugsquelle
Albumin (aus Rinderserum)	Sigma, New England Biolabs
Antarctic Phosphatase	New England Biolabs
Anti-Digoxigenin, konjugiert mit alkalischer Phosphatase	Roche
Anti HA Antikörper (aus Maus)	Sigma-Aldrich
Anti c-myc Antikörper (aus Maus)	Sigma-Aldrich
Anti Histon H3 Antikörper	Sigma-Aldrich
Anti GFP Antikörper	Sigma-Aldrich
Anti-Hase-HRP-Antikörper	Promega
Anti-Maus-HRP-Antikörper	Promega
Anti c-myc Agarose	Sigma-Aldrich

Anti HA Agarose	Sigma-Aldrich
TEV-Protease	Invitrogen
Lysozym (aus Hühreier)	Boehringer
HA-Peptide	Sigma-Aldrich
Novozym 234	Novo Nordisc
Lysing enzyme	Sigma-Aldrich
Phusion DNA Polymerase	New England Biolabs
Q5 DNA Polymerase	New England Biolabs
Quick DNA-Ligase	New England Biolabs
Restriktionsenzyme	New England Biolabs
RibonukleaseA (aus Rinderpankreas)	Boehringer
T4 DNA-Ligase	New England Biolabs
T4 DNA-Polymerase	New England Biolabs
Taq DNA Polymerase	A. Brachmann und G. Weinzierl

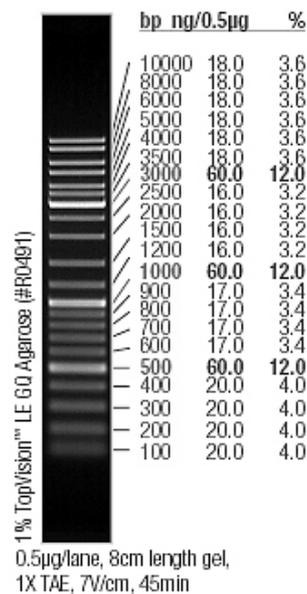
Bei der Auftrennung von Proteinen in SDS-haltigen Polyacrylamid-Gelen wurde der Pageruler prestained Proteinmarker (Fermentas/Thermo) verwendet:



Pageruler prestained Protein Marker

#### 4.1.6 Nukleinsäuren

Für die Herstellung von CM-Medium (siehe 5.1.10) wurde Herings-Sperma DNA (Sigma) verwendet. Für die Transformation von *S. cerevisiae* (siehe 5.2.11) wurde Lachs-Sperma DNA (Invitrogen) als Träger-DNA verwendet. Als DNA-Größenstandard für die Agarose-Gelelektrophorese wurde ein GeneRuler DNA Ladder Mix (Fermentas/Thermo) verwendet:



Im Text verwendete Größenangaben in kb geben annähernde, über Restriktionsverdau ermittelte Fragmentgrößen wider. Größenangaben in bp werden in der Regel nur für sequenzierte Fragmente oder solche, deren Größe eindeutig bekannt ist, verwendet.

**Tabelle 11: In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide**

Bezeichnung	Nukleotidsequenz (5'→3')
10027fu_LBse_new	GTGCAGAAGCTGCCTTCGATG
10027_RBas_new	CCGACTGTGGTTGGTGCAATC
04411fu_LBse_new	CACCTCAGGCAGAGTCTCTCATC
04411_RBas_new	CGCGCTCGCATTGACTACATC
Num1_Cte_fu_shrt	AAGCATCGACACGCGACCGAAG
Pr11_fu_LB_as	GTGGGCCGCGTTGGCCGCGACCTCTTTGTAAATCTTGATCG
Pr11_fu_RB_as	CGTTGTCACCTTCGCCATCTTG
Syf1_fu_LB_se	GTTCAAGTCGCTCAAGCTGTGG
Syf1_fu_LB_as	GTGGGCCGCGTTGGCCGCCAGAAGGTCTTGATCGTCTTGG
Syf1_fu_RB_se	CACGGCCTGAGTGGCCCGCAATTAGTCAAAGAGGCGTCC
Syf1_fu_RB_as	GAGAGACAGTGATGTTGGCTGC
Pr11_fu_LB_se	GCAAATCGCAAAGCTAAACCAGC
Pr11_fu_RB_se	CACGGCCTGAGTGGCCGCACAACCTGAGCCATACCAATCC
NLS_sfi_mc_for	CACCATGGTCGAGCCTCCAAAAAAGAAGAGAAAGGTCTGAATTC GGCGCGGCCAACGCGGCCACTATGGTG
mc_asc1_rev	GGCGCGCCGGCAGCCGGGCGGCCGCTTTAC
Num1_pET_Ndel_for	CGCCATATGGCGAGAGCACGAGGTGG
Num1_pET_BamHI_rev	GCGGGATCCCTACTCCAACAGGCTCAACTCTGTC
Num1-65AS_LB1_se	GATCGCGCAGGAAACTCAGAGTC
Num1_65AS_LB1_Bsal_as	CGGTCTCCATCGTGATTGCTTCAAGCGT
Num1_65AS_LB2_Bsal_se	CGGTCTCGCGATGGATGCGCTCCCCTACTTTCGAC
Num1-65ASnes_se	CGTCCTTGACAACGCTAAACTGC

Num1-65ASnes_as	GAGCTGCTTTGCGCTTTCGTAG
Num1-65AS_seq1	GCTGTTGGTTAGGCTTATTGC
Num1_Y2H_for	GTGGGCCATTACGGCCATGGCGAGAGCACGAGGTGG
Num1_Y2H_Nfor	GTGGGCCATTACGGCCAAAACATCCGTCTGCTATCCGAAC
Num1_Y2H_Crev1	ATAGGCCGAGGCGGCCGCATATCCACCTCTTGGCTTG
Num1_Y2H_Crev2	ATAGGCCGAGGCGGCCCTCTCGAGATGAGTTCAGTCC
Num1_Y2H_Crev3	ATAGGCCGAGGCGGCCAGCCTCCAAGTGGTTCCTTC
Num1_Y2H_Crev4	ATAGGCCGAGGCGGCCCTTTCACCAAGTTCGAGCTGTTC
Num1_Y2H_Crev5	ATAGGCCGAGGCGGCCGTTGCTTCCGTACTIONTTTTTCAGGAG
Num1_Y2H_Crev6	ATAGGCCGAGGCGGCCATTTCGAACATCCATATGGCCCAG
Num1_Y2H_Crev7	ATAGGCCGAGGCGGCCCTTGGGCGTGTGCTGAGTCTAC
Num1_Y2H_Crev8	ATAGGCCGAGGCGGCCCCAGTCAGACAGAGATGCTGC
Num1_Y2H_CrevNLS	ATAGGCCGAGGCGGCCGAGCTTCCGCTTCTTACTTTTTTCAG
Nup192_fus_LB_se	GCTTGCTCCCTACCACACTG
Nup192_fus_LB_as	GTGGGCCGCGTTGGCCGCTTGCTCGGTAAAGAAGCTAGCC
Nup192_fus_RB_se	CACGGCCTGAGTGGCCCATCACCTTAGTCGTCCGATTGG
Nup192_fus_RB_as	CCAACAAGACGATGCCGACG
Num1_Y2H_Crev1.1	ATAGGCCGAGGCGGCCCTACAGCATATCCACCTCTTGGCT
Num1_Y2H_Crev2.1	ATAGGCCGAGGCGGCCCTACCCTCTCGAGATGAGTTCAGTC
Num1_Y2H_Crev3.1	ATAGGCCGAGGCGGCCCTAGCCAGCCTCCAAGTGGTTC
Num1_Y2H_Crev4.1	ATAGGCCGAGGCGGCCCTATGCTTTCACCAAGTTCGAGCTG
Num1_Y2H_Crev5.1	ATAGGCCGAGGCGGCCCTAGTTGCTTCCGTACTIONTTTTTCAGGAG
Num1_Y2H_Crev6.1	ATAGGCCGAGGCGGCCCTACATTTCGAACATCCATATGGCCCAG
Num1_Y2H_Crev7.1	ATAGGCCGAGGCGGCCCTATTGGGCGTGTGCTGAGTCTAC
Num1_Y2H_Crev8.1	ATAGGCCGAGGCGGCCCTACCAGTCAGACAGAGATGCTGC
Num1_Y2H_CrvNLS1	ATAGGCCGAGGCGGCCCTAGAGCTTCCGCTTCTTACTTTTTTCAG
num1_3xGFPattb1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGCCAATCCGACAC GTTTCC
num1_3xGFPattb2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTCGACCTCTGTTACC GATTACC

#### 4.1.7 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 µl, 2-200 µl und 100-1000µl) (Sarstedt, Carl Roth, Greiner), Kapillarspitzen (Biozym), Petrischalen (Sarstedt), 15 ml und 50 ml PPN-Röhrchen (Greiner), 1,5 ml Polystyrol-Küvetten (Sarstedt), Elektroporationsküvetten (Peqlab), 0,20 µm Sterilfilter (Carl Roth), 1 ml Einmalspritzen (Dispomed), Einmal-Injektionskanülen (B. Braun), Thermalpapier (Hitachi).

#### 4.1.8 Puffer und Lösungen

Tabelle 12: In dieser Arbeit verwendete Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Rezept
<b>Adenin-Lösung</b>	10 mg/L Adeninhemisulfat in H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub> , sterilfiltriert
<b>3-Aminotriazol-Lösung</b>	100 mM in H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub> gelöst
<b>Ampicillin-Lösung</b>	10 mg/L Ampicillin in H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub> , sterilfiltriert
<b>Auftragspuffer für DNA-Gelelektrophoresen (nativ, 6x)</b>	50% (w/v) Sukrose 0,25% (w/v) Bromphenolblau 0,25% (w/v) Xylencyanol FF in TE-Puffer (s.u.)
<b>Calcofluor-Lösung</b>	10 mg/ml in DMSO
<b>CDP-Star-Lösung</b>	1:100 CDP-Star in DIG 3 (s.u.)
<b>Coomassie-Färbelösung</b>	0,25% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R250 45% (v/v) Methanol 10% (v/v) Essigsäure
<b>EDTA-Lösung</b>	0,5 M Na <sub>2</sub> -EDTA*2 H <sub>2</sub> O in H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub> ; pH-Wert mit NaOH auf 8,0 einstellen und autoklavieren
<b>Glyzerin/MgSO<sub>4</sub>-Lösung</b>	65 % Glyzerin (v/v) 100 mM MgSO <sub>4</sub> 25 mM Tris-Cl, pH 8,0 Mit H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub> ansetzen und autoklavieren
<b>Heparin-Lösung</b>	15 mg/L Heparin in H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub> , sterilfiltriert
<b>Hygromycin-Lösung</b>	50 mg/ml in PBS-Puffer (s.u.), sterilfiltriert
<b>Kanamycin-Lösung</b>	10 mg/ml Kanamycinsulfat in H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub> , sterilfiltriert
<b>L-Leucin-Lösung</b>	380 mg L-Leucin in H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub> , sterilfiltriert
<b>Ligase-Puffer (10x)</b>	100 mM MgCl <sub>2</sub> 500 mM Tris-Cl, pH 7,5 100 mM DTT 10 mM ATP in H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub>
<b>Lithium-Acetat-PEG-Lösung</b>	50 g PEG-3500 10 ml Lithium-Acetat-Lösung (100 mM) in 100 ml H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub> , sterilfiltriert
<b>Lysispuffer (<i>U. maydis</i>-DNA)</b>	1% (w/v) SDS 50 mM Tris-Cl, pH 7,5 50 mM Na <sub>2</sub> -EDTA, pH 8,0 in H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub>
<b>Natriumphosphat-Puffer</b>	Lösung 1: 14,2 % Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (f.c. 1 M) Lösung 2: 13,8 % NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> *H <sub>2</sub> O (f.c. 1 M) Mit H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub> ansetzen; Lösung 1 vorlegen und so lange Lösung 2 zugeben bis pH 7,0 erreicht ist.
<b>PBS-Puffer (10x)</b>	79 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 145 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 5 mM MgCl <sub>2</sub> *6 H <sub>2</sub> O 27 mM KCl 1,37 M NaCl Mit H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub> ansetzen, pH-Wert mit HCl auf 7,2 einstellen und autoklavieren.
<b>Phenol-Chloroform</b>	50% Phenol 50% Chloroform mit TE-Puffer überschichten
<b>50% PEG</b>	100g PEG-4000 in 100 ml H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub> gelöst

<b>RENAT-Lösung</b>	1,5 M NaCl 282 mM Tris-Cl 218 mM Tris-Base in H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub>
<b>RNase A-Lösung</b>	10 mg/ml RNase A 15 mM NaCl 10 mM Tris-Cl, pH 8,0 in H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub>
<b>Salzsäure (0,25 M)</b>	5 ml 37% HCl in 1 L H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub>
<b>Southern-Waschpuffer</b>	500 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,0 1% (w/v) SDS in H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub>
<b>SDS-PAGE Probenpuffer (6x)</b>	300 mM Tris-Cl, pH 8,0 30% (v/v) Glycerin 20% (w/v) SDS 0,5g/L Bromphenolblau 15% (v/v) β-Mercaptoethanol (frisch zugeben)
<b>Taq PCR-Puffer (10x)</b>	100 mM Tris-Cl, pH 8,3 500 mM KCl 15 mM MgCl <sub>2</sub>
<b>TBE-Puffer (5x)</b>	500 mM Tris-Borat, pH 7,9 10 mM Na <sub>2</sub> -EDTA in H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub>
<b>TBST</b>	20 mM Tris-Cl, pH 7,6 136 mM NaCl 0,05% (v/v) Tween-20 in H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub>
<b>TE (10x)</b>	100 mM Tris-Cl, pH 7,9 10 mM Na <sub>2</sub> -EDTA in H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub>
<b>Tris-HCl-Lösung (1 M)</b>	806 mM Tris-Cl 194 mM Tris-Base in H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub> , ansetzen, pH-Wert auf 7,5 einstellen und autoklavieren
<b>L-Tryptophan-Lösung</b>	76 mg/L L-Tryptophan in H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub> , sterilfiltriert
<b>Uracil-Lösung</b>	50 mg/L Uracil in H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub> , sterilfiltriert
<b>α-X-Gal-Lösung</b>	4 mg/ml α-X-Gal in DMF lösen

## 4.1.9 Medien

Tabelle 13: U. maydis-Medien

Bezeichnung	Rezept
<b>CM-Festmedium</b> (Banuett und Herskowitz, 1989; Holliday, 1974)	1,5 g NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 2,5 g Casaminosäuren 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 Bacto Agar mit H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub> auf 980 ml auffüllen Nach dem Autoklavieren 2% (v/v) 50% Glukose (1% f.c.) zufügen und mit NaOH auf pH 7,0 einstellen.
<b>CM-Flüssigmedium</b> (Banuett und Herskowitz, 1989; Holliday, 1974)	1,5 g NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 2,5 g Casaminosäuren 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 H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub> auf 980 ml auffüllen Nach dem Autoklavieren 2% (v/v) 50% Glukose oder 4% (v/v) 25% Arabinose (1% f.c.) zufügen und mit NaOH auf pH 7,0 einstellen.
<b>Salz-Lösung (Holliday, 1974)</b>	8 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 2 g Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 1 g MgSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O mit H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub> auf 1L auffüllen und sterilfiltrieren
<b>Spurenelement-Lösung (Holliday, 1974)</b>	60 mg H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> 191 mg MnCl <sub>2</sub> 400 mg ZnCl <sub>2</sub> 47 mg NaMoO <sub>4</sub> * 2 H <sub>2</sub> O 140 mg FeCl <sub>3</sub> * 6 H <sub>2</sub> O 557 mg CuSO <sub>4</sub> * 5 H <sub>2</sub> O mit in H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub> auf 1L auffüllen und sterilfiltrieren
<b>Vitamin-Lösung (Holliday, 1974)</b>	100 mg Thiamin 20 mg Calciumpanthothenat 50 mg p-Aminobenzoessäure 20 mg Nikotinsäure 20 mg Cholinchlorid 40 mg myo-Inositol 50 mg Folsäure mit H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub> auf 1L auffüllen und sterilfiltrieren
<b>NSY-Glyzerin (Einfriermedium)</b>	8 g Nutrient Broth 1 g Hefeextrakt 5 g Sukrose 800 ml 87% Glyzerin mit H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub> auf 1L auffüllen und autoklavieren
<b>PD-Festmedium</b>	24 g Potato Dextrose Broth 20 g Bacto Agar mit H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub> auf 1L auffüllen und autoklavieren

<b>Regenerationsagar<sub>light</sub></b> (Schulz <i>et al.</i> , 1990)	a) Top-Agar: 15 g (w/v) Bacto-Agar 182,2 g (w/v) Sorbitol 10 g (w/v) Hefeextrakt 4 g (w/v) Bacto Pepton 4 g (w/v) Sukrose mit H <sub>2</sub> O <sub>bid</sub> auf 1L auffüllen und autoklavieren b) Bottom-Agar wie a), zusätzlich Antibiotikum zugeben (s.u.)
<b>YEPS<sub>light</sub>-Vollmedium</b> (Tsukuda <i>et al.</i> , 1988)	10 g Hefeextrakt 4 g Bacto Pepton 4 g Sukrose mit H <sub>2</sub> O <sub>bid</sub> auf 1L auffüllen und autoklavieren

Hygromycin- 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 µg/ml und von Carboxin 2 µg/ml.

Tabelle 14: *S. cerevisiae*-Medien

Bezeichnung	Rezept
<b>YEPD+A</b>	10 g Hefeextrakt 20 g Bacto Pepton 0,003% (w/v) Adeninhemisulfat für Festmedium 15 g Bacto Agar zufügen mit H <sub>2</sub> O <sub>bid</sub> auf 980 ml auffüllen und autoklavieren Nach dem Autoklavieren 2% (v/v) 50% Glukose (1% f.c.) zufügen.
<b>5x SC-LTHA</b>	6,7 g Yeast Nitrogen Base 1,7 g „Drop out additive“ –Leu/-Trp/-His/-Ade in 200 ml H <sub>2</sub> O <sub>bid</sub> lösen mit 760 ml sterilem H <sub>2</sub> O <sub>bid</sub> (Flüssigmedium) oder 760 ml autoklaviertem 2% Bacto Agar (Festmedium) und 40 ml 50% (w/v) Glukose auffüllen
<b>5x SC-LT</b>	6,7 g Yeast Nitrogen Base 1,7 g „Drop out additive“ –Leu/-Trp/-His/-Ade 76 mg Histidin und 76 mg Adeninhemisulfat zufügen, in 200 ml H <sub>2</sub> O <sub>bid</sub> lösen mit 760 ml sterilem H <sub>2</sub> O <sub>bid</sub> (Flüssigmedium) oder 760 ml autoklaviertem 2% Bacto Agar (Festmedium) und 40 ml 50% (w/v) Glukose auffüllen
<b>5x SC-T</b>	6,7 g Yeast Nitrogen Base 1,7 g „Drop out additive“ –Leu/-Trp/-His/-Ade 76 mg Histidin, 76 mg Adeninhemisulfat und 380 mg Leucin zufügen, in 200 ml H <sub>2</sub> O <sub>bid</sub> lösen mit 760 ml sterilem H <sub>2</sub> O <sub>bid</sub> (Flüssigmedium) oder 760 ml autoklaviertem 2% Bacto Agar (Festmedium) und 40 ml 50% (w/v) Glukose auffüllen

Tabelle 15: E. coli-Medien

Bezeichnung	Rezept
<b>LB-Medium (Sambrook et al., 1989)</b>	10 g Bacto Trypton 5 g Hefeextrakt 10 g NaCl mit H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub> auf 1L auffüllen und autoklavieren; für Festmedium 15 g Bacto Agar zufügen
<b>YT-Festmedium (Sambrook et al., 1989)</b>	8 g Bacto Trypton 5 g Hefeextrakt 5 g NaCl 15 g Bacto Agar mit H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub> auf 1L auffüllen und autoklavieren
<b>dYT-Flüssigmedium (Sambrook et al., 1989)</b>	16 g Bacto Trypton 10 g Hefeextrakt 5 g NaCl mit H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub> auf 1L auffüllen und autoklavieren

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.

#### 4.1.10 Plasmide

Tabelle 16: In dieser Arbeit verwendete Plasmide

Plasmid	Kurzbeschreibung	Resistenz	Referenz
<b>pGBKT7</b>	Y2H Ködervektor	Kan <sup>R</sup> , Trp <sup>+</sup>	Clontech
<b>pGAD-DS</b>	Y2H Beutevektor	Amp <sup>R</sup> , Leu <sup>+</sup>	Dualsystems Biotech
<b>pGBKT7-p53</b>	Y2H Kontroll-Vektor	Kan <sup>R</sup> , Trp <sup>+</sup>	Clontech
<b>pGBKT7-lamC</b>	Y2H Kontroll-Vektor	Kan <sup>R</sup> , Trp <sup>+</sup>	Clontech
<b>pGADT7-T</b>	Y2H Kontroll-Vektor	Amp <sup>R</sup> , Leu <sup>+</sup>	Clontech
<b>pGBKT7-num1</b>	Y2H Ködervektor	Kan <sup>R</sup> , Trp <sup>+</sup>	(Kellner, 2012)
<b>pGBKT7-P53</b>	Kan <sup>R</sup>	Clontech	Hefe-Zwei-Hybrid-Vektor
<b>pGBKT7-lamC</b>	Kan <sup>R</sup>	Clontech	Hefe-Zwei-Hybrid-Vektor
<b>pGADT7-T</b>	Amp <sup>R</sup>	Clontech	Hefe-Zwei-Hybrid-Vektor
<b>pNK51</b>	„pGBKT7-num1 <sub>1-197</sub> “. Hefe-Zwei-Hybrid Ködervektor. Enthält ein C-terminal verkürztes 591 bp <i>Sfil</i> -Fragment des offenen Leserahmens von <i>num1</i> .	Kan <sup>R</sup> , Trp <sup>+</sup>	(Kellner, 2012)
<b>pNK52</b>	„pGBKT7-num1 <sub>1-147</sub> “. Hefe-Zwei-Hybrid Ködervektor. Enthält ein C-terminal verkürztes 441 bp <i>Sfil</i> -Fragment des offenen Leserahmens von <i>num1</i> .	Kan <sup>R</sup> , Trp <sup>+</sup>	(Kellner, 2012)
<b>pNK53</b>	„pGBKT7-num1 <sub>1-66</sub> “. Hefe-Zwei-Hybrid Ködervektor. Enthält ein C-terminal verkürztes 198 bp <i>Sfil</i> -Fragment des offenen Leserahmens von <i>num1</i> .	Kan <sup>R</sup> , Trp <sup>+</sup>	(Kellner, 2012)

<b>pNK54</b>	„pGBKT7-num1ΔNterm“. Hefe-Zwei-Hybrid Ködervektor. Enthält ein N-terminal verkürztes 702 bp <i>SfiI</i> -Fragment des offenen Leserahmens von <i>num1</i> .	Kan <sup>R</sup> , Trp <sup>+</sup>	(Kellner, 2012)
<b>pNK24</b>	Für die C-terminale <i>num1:3xha</i> Fusion <i>in locus</i> , <i>SfiI</i> -Fragment (3xHA-Hyg <sup>R</sup> aus pUMa792)	Amp <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup>	(Kellner, 2012)
<b>pUMa317</b>	Enthält eine 3733 bp eGFP-Hygromycin-Kassette als <i>SfiI</i> -Fragment für die C-terminale Fusion mit GFP	Amp <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup>	(Brachmann <i>et al.</i> , 2004)
<b>pUMa389</b>	Enthält eine 2434 bp eGFP-Nourseothricin-Kassette als <i>SfiI</i> -Fragment für die C-terminale Fusion mit GFP	Amp <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup>	(Brachmann <i>et al.</i> , 2004)
<b>pUMa647</b>	Enthält eine 5158 bp 3xeGFP-Hygromycin-Kassette als <i>SfiI</i> -Fragment für die C-terminale Fusion mit GFP	Amp <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup>	(Baumann <i>et al.</i> , 2012a)
<b>pUMa737</b>	Enthält eine 2987 bp eGFP-TapTag-Nourseothricin-Kassette als <i>SfiI</i> -Fragment für die C-terminale Fusion mit dem GFP-TapTag	Amp <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup>	(Brachmann <i>et al.</i> , 2004)
<b>pUMa793</b>	Enthält eine 1819 bp 3xHA-Nourseothricin-Kassette als <i>SfiI</i> -Fragment für die C-terminale Fusion mit dem 3xHA	Amp <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup>	(Brachmann <i>et al.</i> , 2004)
<b>pUMa797</b>	Enthält eine 1819 bp 3xmyc-Nourseothricin-Kassette als <i>SfiI</i> -Fragment für die C-terminale Fusion mit dem 3xmyc	Amp <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup>	(Brachmann <i>et al.</i> , 2004)
<b>pDONR221</b>	Donorvektor mit M13 Forward und M13 Reverse Primer-Bindestellen, ermöglicht eine GATEWAY® <i>in vitro</i> Klonierung von PCR Fragmenten mittels BP Klonase. Trägt eine GATEWAY®-Klonierungskassette mit Chloramphenicol-Resistenz-kassette und <i>ccdB</i> - Selbstmordgen.	Kan <sup>R</sup>	Invitrogen
<b>p123-GW-BB</b>	Zielvektor mit M13 Forward und M13 Reverse Primer-Bindestellen, ermöglicht eine GATEWAY® <i>in vitro</i> Klonierung mittels LR Klonase. Trägt eine GATEWAY®-Klonierungskassette mit <i>attb1</i> und <i>attb1</i> sites	Amp <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	(M. Vranes, pers. Mitteilung)
<b>pNEBUH</b>	frei replizierendes Plasmid mit Hygromycin-Resistenz-Kassette	Amp <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup>	Laborsammlung
<b>pNEBUN</b>	frei replizierendes Plasmid mit Nourseothricin-Resistenz-Kassette	Amp <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup>	Laborsammlung

Amp<sup>R</sup> – Ampicillin-Resistenzgen, Kan<sup>R</sup> – Kanamycin-Resistenzgen, Hyg<sup>R</sup> – Hygromycin-Resistenzgen, Cbx<sup>R</sup> – Carboxin-Resistenzgen, Phleo<sup>R</sup> – Phleomycin-Resistenzgen, Nat<sup>R</sup> – Nourseothricin-Resistenzgen, Leu<sup>+</sup> – Leucin-Auxotrophiemarkergen, Trp<sup>+</sup> – Tryptophan-Auxotrophiemarkergen

Tabelle 17: In dieser Arbeit generierte Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Resistenz
pSH1	Für die C-terminale <i>cef1:3xHA</i> -Fusion in <i>locus</i> , <i>Sfil</i> -Fragment (3xHA:Nat <sup>R</sup> ) aus pUMA793	Amp <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup>
pSH2	Für die C-terminale <i>prp19:3xHA</i> -Fusion in <i>locus</i> , <i>Sfil</i> -Fragment (3xHA:Nat <sup>R</sup> ) aus pUMA793	Amp <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup>
pSH3	Für die C-terminale <i>cef1:eGFP:tap</i> -Fusion in <i>locus</i> , <i>Sfil</i> -Fragment (eGFP:tap:Nat <sup>R</sup> ) aus pUMA737	Amp <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup>
pSH4	Für die C-terminale <i>prp19:eGFP:tap</i> -Fusion in <i>locus</i> , <i>Sfil</i> -Fragment (eGFP:tap:Nat <sup>R</sup> ) aus pUMA737	Amp <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup>
pSH5	Für die C-terminale <i>cef1:3xmyc</i> -Fusion in <i>locus</i> , <i>Sfil</i> -Fragment (3xmyc:Nat <sup>R</sup> ) aus pUMA797	Amp <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup>
pSH6	Für die C-terminale <i>syf1:3xmyc</i> -Fusion in <i>locus</i> , <i>Sfil</i> -Fragment (3xmyc:Nat <sup>R</sup> ) aus pUMA797	Amp <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup>
pSH7	Für die C-terminale <i>prl1:3xmyc</i> -Fusion in <i>locus</i> , <i>Sfil</i> -Fragment (3xmyc:Nat <sup>R</sup> ) aus pUMA797	Amp <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup>
pSH8	Für die C-terminale <i>num1</i> <sub>Δ1-65</sub> :3xHA-Fusion in <i>locus</i> , <i>Sfil</i> -Fragment (3xHA:Nat <sup>R</sup> ) aus pUMA793	Amp <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup>
pSH9	Für die C-terminale <i>num1</i> <sub>Δ1-65</sub> :3xHA-Fusion in <i>locus</i> , <i>Sfil</i> -Fragment (3xHA:gen <sup>R</sup> ) aus pMF5-9g	Amp <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> , Gen <sup>R</sup>
pSH10	Für die C-terminale <i>num1</i> <sub>Δ1-65</sub> :3xHA-Fusion in <i>locus</i> , <i>Sfil</i> -Fragment (3xHA:gen <sup>R</sup> ) aus pUMA1886	Amp <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> , Gen <sup>R</sup>
pSH11	„pGBKT7-num1 <sub>1-263</sub> “. Hefe-Zwei-Hybrid Ködervektor. Enthält ein C-terminal verkürztes 790 bp <i>Sfil</i> -Fragment des offenen Leserahmens von <i>num1</i> .	Kan <sup>R</sup>
pSH12	„pGBKT7-num1 <sub>1-246</sub> “. Hefe-Zwei-Hybrid Ködervektor. Enthält ein C-terminal verkürztes 739 bp <i>Sfil</i> -Fragment des offenen Leserahmens von <i>num1</i> .	Kan <sup>R</sup>
pSH13	„pGBKT7-num1 <sub>1-229</sub> “. Hefe-Zwei-Hybrid Ködervektor. Enthält ein C-terminal verkürztes 688 bp <i>Sfil</i> -Fragment des offenen Leserahmens von <i>num1</i> .	Kan <sup>R</sup>
pSH14	„pGBKT7-num1 <sub>1-212</sub> “. Hefe-Zwei-Hybrid Ködervektor. Enthält ein C-terminal verkürztes 637 bp <i>Sfil</i> -Fragment des offenen Leserahmens von <i>num1</i> .	Kan <sup>R</sup>
pSH15	„pGBKT7-num1 <sub>198-280</sub> “. Hefe-Zwei-Hybrid Ködervektor. Enthält ein N-terminal verkürztes 246 bp <i>Sfil</i> -Fragment des offenen Leserahmens von <i>num1</i> .	Kan <sup>R</sup>
pSH16	„pGBKT7-num1 <sub>1-188</sub> “. Hefe-Zwei-Hybrid Ködervektor. Enthält ein C-terminal verkürztes 564 bp <i>Sfil</i> -Fragment des offenen Leserahmens von <i>num1</i> .	Kan <sup>R</sup>
pSH17	„pGBKT7-num1 <sub>1-176</sub> “. Hefe-Zwei-Hybrid Ködervektor. Enthält ein C-terminal verkürztes 528 bp <i>Sfil</i> -Fragment des offenen Leserahmens von <i>num1</i> .	Kan <sup>R</sup>
pSH18	„pGBKT7-num1 <sub>1-168</sub> “. Hefe-Zwei-Hybrid Ködervektor. Enthält ein C-terminal verkürztes 504 bp <i>Sfil</i> -Fragment des offenen Leserahmens von <i>num1</i> .	Kan <sup>R</sup>
pSH19	„pGBKT7-num1 <sub>1-158</sub> “. Hefe-Zwei-Hybrid Ködervektor. Enthält ein C-terminal verkürztes 474 bp <i>Sfil</i> -Fragment des offenen Leserahmens von <i>num1</i> .	Kan <sup>R</sup>
pSH20	„pGBKT7-num1 <sub>1-271</sub> “. Hefe-Zwei-Hybrid Ködervektor. Enthält ein C-terminal verkürztes 813 bp <i>Sfil</i> -Fragment des offenen Leserahmens von <i>num1</i> .	Kan <sup>R</sup>
pSH21	Für die C-terminale <i>cef1:eGFP</i> -Fusion in <i>locus</i> , <i>Sfil</i> -Fragment (eGFP:Hyg <sup>R</sup> ) aus pUMA312	Amp <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup>
pSH22	Für die C-terminale <i>cef1:eGFP</i> -Fusion in <i>locus</i> , <i>Sfil</i> -Fragment (eGFP:Nat <sup>R</sup> ) aus pUMA389	Amp <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup>
pSH23	Für die C-terminale <i>prp19:eGFP</i> -Fusion in <i>locus</i> , <i>Sfil</i> -Fragment (eGFP:Hyg <sup>R</sup> ) aus pUMA312	Amp <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup>

<b>pSH24</b>	Für die C-terminale <i>prp19:eGFP</i> -Fusion in <i>locus</i> , <i>Sfil</i> -Fragment ( <i>eGFP:Nat<sup>R</sup></i> ) aus pUMA389	Amp <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup>
<b>pSH25</b>	Für die C-terminale <i>cef1:3xeGFP</i> -Fusion in <i>locus</i> , <i>Sfil</i> -Fragment ( <i>3xeGFP:Hyg<sup>R</sup></i> ) aus pUMA647	Amp <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup>
<b>pSH26</b>	Für die C-terminale <i>prp19:3xeGFP</i> -Fusion in <i>locus</i> , <i>Sfil</i> -Fragment ( <i>3xeGFP:Hyg<sup>R</sup></i> ) aus pUMA647	Amp <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup>
<b>pSH27</b>	Für die C-terminale <i>nup192:3xmyc</i> -Fusion in <i>locus</i> , <i>Sfil</i> -Fragment ( <i>3xmyc:Nat<sup>R</sup></i> ) aus pUMA797	Amp <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup>
<b>pSH28</b>	„pGBKT7-num1 <sub>1-247</sub> “. Hefe-Zwei-Hybrid Ködervektor. Enthält ein C-terminal verkürztes 741 bp STOP (TAG) <i>Sfil</i> -Fragment des offenen Leserahmens von <i>num1</i> .	Kan <sup>R</sup>
<b>pSH29</b>	„pGBKT7-num1 <sub>1-230</sub> “. Hefe-Zwei-Hybrid Ködervektor. Enthält ein C-terminal verkürztes 690 bp STOP (TAG) <i>Sfil</i> -Fragment des offenen Leserahmens von <i>num1</i> .	Kan <sup>R</sup>
<b>pSH30</b>	„pGBKT7-num1 <sub>1-213</sub> “. Hefe-Zwei-Hybrid Ködervektor. Enthält ein C-terminal verkürztes 639 bp STOP (TAG) <i>Sfil</i> -Fragment des offenen Leserahmens von <i>num1</i> .	Kan <sup>R</sup>
<b>pSH31</b>	„pGBKT7-num1 <sub>1-188</sub> “. Hefe-Zwei-Hybrid Ködervektor. Enthält ein C-terminal verkürztes 564 bp STOP (TAG) <i>Sfil</i> -Fragment des offenen Leserahmens von <i>num1</i> .	Kan <sup>R</sup>
<b>pSH32</b>	„pGBKT7-num1 <sub>1-176</sub> “. Hefe-Zwei-Hybrid Ködervektor. Enthält ein C-terminal verkürztes 528 bp STOP (TAG) <i>Sfil</i> -Fragment des offenen Leserahmens von <i>num1</i> .	Kan <sup>R</sup>
<b>pSH33</b>	„pGBKT7-num1 <sub>1-168</sub> “. Hefe-Zwei-Hybrid Ködervektor. Enthält ein C-terminal verkürztes 504 bp STOP (TAG) <i>Sfil</i> -Fragment des offenen Leserahmens von <i>num1</i> .	Kan <sup>R</sup>
<b>pSH34</b>	„pGBKT7-num1 <sub>1-158</sub> “. Hefe-Zwei-Hybrid Ködervektor. Enthält ein C-terminal verkürztes 474 bp STOP (TAG) <i>Sfil</i> -Fragment des offenen Leserahmens von <i>num1</i> .	Kan <sup>R</sup>
<b>pSH35</b>	„pGBKT7-num1 <sub>1-271</sub> “. Hefe-Zwei-Hybrid Ködervektor. Enthält ein C-terminal verkürztes 813 bp STOP (TAG) <i>Sfil</i> -Fragment des offenen Leserahmens von <i>num1</i> .	Kan <sup>R</sup>
<b>pSH36</b>	Für Gateway Klonierung für C-terminale <i>P<sub>num1</sub>:num1:3xeGFP</i> -Fusion in <i>ip-locus</i> , <i>P<sub>num1</sub>:num1:3xeGFP</i> -Fragment aus PCR auf UNK108 genomische DNA mit Primern mit <i>attb1</i> und <i>attb2</i>	Kan <sup>R</sup>
<b>pSH37</b>	Für C-terminale <i>P<sub>num1</sub>:num1:3xeGFP</i> -Fusion in <i>ip-locus</i> , <i>attb1:P<sub>num1</sub>:num1:3xeGFP:attb2</i> -Fragment aus pSH36	Amp <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>

Amp<sup>R</sup> – Ampicillin-Resistenzgen, Kan<sup>R</sup> – Kanamycin-Resistenzgen, Hyg<sup>R</sup> – Hygromycin-Resistenzgen, Cbx<sup>R</sup> – Carboxin-Resistenzgen, Phleo<sup>R</sup> – Phleomycin-Resistenzgen, Nat<sup>R</sup> – Nurseothricin-Resistenzgen

## 4.2 Mikrobiologische und genetische Methoden

### 4.2.1 Kultivierung von *U. maydis*

*U. maydis*-Stämme wurden standardmäßig als Schüttelkulturen bei 200 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.

#### Induktion des filamentösen Wachstums in Flüssigkultur

Die zu induzierenden Stämme wurden aus Vorkulturen in Flüssigmedien angeimpft, die reprimierende Bedingungen boten (im Falle des P<sub>crG1</sub>-Promotors mit Glukose als einziger Kohlenstoffquelle, im Falle des P<sub>nar1</sub>-Promotors mit Glutamin als einziger Stickstoffquelle), und bis zu einer OD<sub>600</sub> 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 H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub> resuspendiert. Nach erneuter Pelletierung wurden die Zellen in Flüssigmedium resuspendiert, das induzierende Bedingungen bot (im Falle des P<sub>crG1</sub>-Promotors mit Arabinose als einziger Kohlenstoffquelle, im Falle des P<sub>nar1</sub>-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 Röhrchen (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.

### 4.2.2 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/Amp-Platten, die weniger als einen Monat bei 4°C gelagert waren, angeimpft.

### 4.2.3 Kultivierung von *S. cerevisiae*

*S. cerevisiae*-Stämme wurden standardmäßig als Schüttelkulturen bei 200 Upm oder auf Festmedien unter aeroben Bedingungen bei 28°C oder 30°C kultiviert. Übernachtskulturen 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.

#### 4.2.4 Bestimmung der Zelldichte

##### *E. coli* DH5 $\alpha$

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  $1 \times 10^9$  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.

##### *U. maydis* und *S. cerevisiae*

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.

#### 4.2.5 Wachstumsuntersuchungen mit *U. maydis* in Flüssigkultur

##### Klassische Wachstumskurve

Von einer auf Platte wachsenden Kultur wurde morgens eine 10 ml Flüssigkultur angesetzt und bei 28°C und 180 Upm geschüttelt. Abends wurde die  $OD_{600}$  der Kultur bestimmt und wiederum eine 10ml Kultur so angeimpft, dass sie sich am nächsten Morgen in der exponentiellen Wachstumsphase befindet. Mit dieser Kultur wurde eine Start-Kultur mit einer  $OD_{600}$  von 0,05 beimpft (50 ml). Die anschließende Inkubation erfolgte bei 28°C und 180 Upm, wobei jede Stunde jeweils zwei Proben zur photometrischen Bestimmung entnommen wurden. Die Mittelwerte beider Proben wurden jeweils gegen die Zeit in einem Diagramm aufgetragen.

##### Wachstumskurve in einem Plate Reader

Bis zur Beimpfung der Startkultur ist diese Protokoll identisch zum klassischen. Die Startkultur wurde auch hier auf eine  $OD_{600}$  von 0,05 eingestellt. Jedoch wurden pro Stamm

mehrere Proben in eine 96 well Mikrotiter Platte (flacher und durchsichtiger Boden) gegeben. Dabei kamen jedes Mal 100 µl zum Einsatz. In gleicher Anzahl und gleicher Menge sollte auch eine Medienkontrolle mit aufgetragen werden. Anschließend wurde die Platte mit einer selbstklebenden PCR Folie verschlossen.

Die Ermittlung der Werte erfolgte an einem Perkin Elmer Enspire Multimode Plate Reader. Dabei erfolgte die Inkubation und die Messung der OD<sub>600</sub> in dem Gerät mit folgendem Programm:

- Lineares Schütteln für 30 s (maximale Geschwindigkeit / Durchmesser 0,1)
- Erste Messung der OD<sub>600</sub> (Absorption, 50 Blitze)
- 10 Minuten Pause
- Lineares Schütteln für 30 s (maximale Geschwindigkeit / Durchmesser 0,1)
- 10 Minuten Pause
- Lineares Schütteln für 30 s (maximale Geschwindigkeit / Durchmesser 0,1)
- Alle 1 800 s das ganze Programm wiederholen (48 Mal entsprechen 24 h)

Die ermittelten Werte wurden anschließend aus dem Gerät ausgelesen und abzüglich der Medienkontrolle gegen die Zeit aufgetragen. Dabei wurde jeweils der Mittelwert mehrerer wells verwandt.

#### **4.2.6 Transformation von *E. coli***

##### Transformation von CaCl<sub>2</sub>-behandelten *E. coli* (modifiziert nach Cohen *et al.*, 1972)

Zur Herstellung transformationskompetenter Bakterienzellen wurden 100 ml LB-Medium, dem je 10 mM MgCl<sub>2</sub> und MgSO<sub>4</sub> zugesetzt wurde, mit 1 ml einer frischen TOP10-Übernachtskultur angeimpft und bis zu einer OD<sub>600</sub> = 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  $\mu\text{g}$  eingesetzter Plasmid-DNA erreicht werden.

**RF1-Lösung:**

100 mM RbCl  
50 mM  $\text{MnCl}_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$   
30 mM K-Acetat  
10 mM  $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$   
15% (v/v) Glycerin in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid.}}$   
mit Essigsäure auf pH 5,8 eingestellt und sterilfiltriert.

**RF2-Lösung:**

10 mM MOPS  
10 mM RbCl  
75mM  $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$   
15% (v/v) Glycerin  
in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid.}}$  mit NaOH  
auf pH 5,8 eingestellt und sterilfiltriert.

Elektroporations-Transformation von *E. coli*

Eine frische Übernachtskultur von *E. coli* DH5 $\alpha$  wurde 1:100 in 500 ml LB-Medium verdünnt und bei 37°C und 200 Upm bis zu einer  $\text{OD}_{600} = 0,7$  geschüttelt. Die Zellen wurden dann für 15-30 min auf Eis auf 0°C herunter gekühlt und anschließend abzentrifugiert (15 min, 3.000 Upm, 4°C, Heraeus Varifuge 3.0R). Das Pellet wurde in 500 ml eiskaltem Wasser resuspendiert, abzentrifugiert (s.o.), erneut in eiskaltem Wasser (250 ml) resuspendiert und wieder pelletiert. Anschließend wurden die Zellen in 10 ml eiskaltem 10 %-igem Glycerin resuspendiert, abzentrifugiert und schließlich in 0,5-1 ml eiskaltem 10 %-igem Glycerin aufgenommen. Die transformations-kompetenten Zellen wurden aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

Für die Transformation wurden die elektrokompenten Zellen langsam auf Eis aufgetaut. 40  $\mu\text{l}$  der Zellsuspension wurden mit bis zu 5  $\mu\text{l}$  DNA aus einem Ligationsansatz gemischt und 1 min auf Eis inkubiert. Vorher wurde die Plasmid-DNA auf einer Nitrozellulose-Membran gegen 10 % Glycerin dialysiert, um alle Salze restlos zu entfernen. Der Transformationsansatz wurde daraufhin in eine vorgekühlte 0,2 cm breite Elektroporationsküvette überführt und die Küvette in die vorgesehene Halterung des Gene Pulsers gestellt (Gene Pulser, BioRad). Direkt danach wurde der Puls ausgelöst (25 mF, 2,5 kV, 200  $\Omega$ ). Die Entladungszeit sollte dabei zwischen 4 und 5 msec liegen. Im Anschluss an die Entladung wurde sofort 1 ml dYT-Medium zum Transformationsansatz in die Küvette pipettiert. Zur Regeneration wurden die Zellen 60 min bei 37°C und 1.400 Upm in einem Eppendorf-Wärmeblock inkubiert und anschließend auf antibiotikahaltigen YT-Platten ausgestrichen.

#### 4.2.7 Transformation von *U. maydis* nach (Gillissen *et al.*, 1992; Schulz *et al.*, 1990)

##### Herstellung von Protoplasten von *U. maydis*:

Von einer auf Platte wachsenden Kultur wurde eine 10 ml YEPS<sub>light</sub>-Flüssigkultur angesetzt und über Nacht bei 28°C und 200 Upm geschüttelt. Diese Vorkultur wurde anschließend 1:100, 1:300 oder 1:1.000 in 50 ml frischem YEPS<sub>light</sub>-Medium verdünnt und bei 28°C und 200 Upm bis zu einer Zelldichte von ca.  $5 \times 10^7$  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 drei mal 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 µl aliquotiert. Die so behandelten Protoplasten können 3-4 h auf Eis oder bei -80°C mehrere Monate (bzw. Jahre) aufbewahrt werden.

##### Transformation von *U. maydis* Protoplasten

Zur integrativen Transformation wurden 50 µl Protoplasten mit 1-5 µl linearisierter Plasmid-DNA oder einem PCR-Produkt (optimal 3-5 µg) und 1 µl Heparin-Lösung für 10-15 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 500 µl STC/PEG-Lösung folgte eine weitere Inkubation von 15 min auf Eis. Anschließend wurde der gesamte Transformationsansatz auf einer kurz vorher mit Top-Agar überschichteten Bottom-Agar-Platte mit Antibiotikum ausgestrichen. Nach 3-5 Tagen Inkubation bei 28°C wurden die gewachsenen Kolonien mit flachen Zahnstochern auf PD- oder CM-Platten, die ein entsprechendes Antibiotikum zur Selektion enthielten, vereinzelt.

##### **SCS-Puffer:**

20 mM Na-Citrat, pH 5,8  
1 M Sorbitol  
in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>, autoklaviert

##### **STC-Puffer:**

10 mM Tris-Cl, pH 7,5  
100 mM CaCl<sub>2</sub>  
1 M Sorbitol  
in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>, autoklaviert

##### **STC/PEG:**

15 ml STC-Puffer  
10 g PEG4000

#### 4.2.8 Transformation von *S. cerevisiae* (modifiziert nach 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<sub>2</sub>O 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 max. 10 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 1 ml YEPDA-Medium oder TE-Puffer 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<sub>2</sub>-EDTA, pH 8,0  
 1 M Sorbitol  
 in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>, sterilfiltriert

##### **Lit/PEG:**

50 g PEG-3500  
 10 ml Lithium-Acetat-Lösung (100 mM)  
 in 100 ml H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>, sterilfiltriert

### 4.3 Fluoreszenzmikroskopie

#### Mikroskopie und Bildbearbeitung

Die Betrachtung der Zellmorphologie von *U. maydis*-Sporidien und –Filamenten wurde an einem Lichtmikroskop (Axiolmanager.Z1, Carl Zeiss) mittels Nomarski-Optik durchgeführt. Für die Aufnahmen wurde ein 63-faches Plan-Apochromat Ölimmersions-Objektiv (Carl Zeiss) mit einer numerischen Apertur von 1,4 eingesetzt. Als UV-Lichtquelle diente die HBO103 Quecksilberdampf-Lampe (Osram). Für Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von eGFP getagten Proteinen wurden der Filter 450-490 nm für das Anregungsspektrum und der Filter 515-565 nm für das Emissionsspektrum benutzt. Die digitalen Aufnahmen wurden mit einer hochauflösenden CCD-Kamera (Axiocam MRm (Carl Zeiss)) aufgenommen. Das

Mikroskop mit Kamera und Lampen wurde mit der Software ZEN (Carl Zeiss) gesteuert. Die Nachbearbeitung der Bilder erfolgte ebenfalls mit der ZEN Software.

#### Vorbereitung von *U. maydis* Sporidien bzw. Filamenten für die Mikroskopie

Zur mikroskopischen Analyse wurden 4µl einer exponentiell wachsenden *U. maydis* Kultur ( $OD_{600} = 0,3$  bis 0,6) oder einer induzierten Kultur (filamentöses Wachstum) auf ein Agarosekissen getropft. Dieses Kissen wurde aus 2 %-iger Agarose (in  $H_2O_{bid.}$  gelöst) gegossen und wurde auf einem Objektträger vorbereitet indem der tropfen zwischen zwei Objektträgern flach gedrückt wurde.

Alternativ wurden 8µl einer exponentiell wachsenden *U. maydis* Kultur auf dem Objektträger mit 8µl einer 2 % wässrigen Lösung von Low-Melting-Agarose (37°C; Sigma-Aldrich) vermischt und mit einem Deckglas bedeckt. Das „Einbetten“ in Agarose verhindert jegliche Bewegung der zu beobachtenden Probe.

## **4.4 Molekularbiologische Standardmethoden**

### **4.4.1 Handhabung von Nukleinsäuren**

#### Ethanol-Fällung von DNA

Die Reinigung und Konzentrierung von Nukleinsäuren aus wässrigen Lösungen erfolgte durch Ethanol-Fällung. Hierzu wurde die Probe mit 1/10 Volumen 3 M Na-Acetat (pH 5,3) und dem 2,5-fachen Volumen an reinem Ethanol versetzt, gemischt und für 1 h bei -20°C inkubiert. Das Präzipitat wurde durch 20-minütiges Zentrifugieren (13.000 Upm und Raumtemperatur in einer Heraeus Biofuge pico) pelletiert. Der Niederschlag wurde mit 70 %-igem Ethanol gewaschen, um Salze zu entfernen. Nach erneuter einminütiger Zentrifugation wurde das Pellet bei Raumtemperatur getrocknet und in einem kleinen Volumen  $H_2O_{bid.}$  oder TE-Puffer gelöst.

#### PEG-Fällung von DNA

Die Reinigung und Konzentrierung von Nukleinsäuren aus wässrigen Lösungen erfolgte durch PEG-Fällung: Dazu wurde die Probe mit ½ Volumen 30%iger PEG-Lösung mit  $Mg_2Cl$  versetzt, gemischt und für 15min. bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das Präzipitat durch 15-minütiges Zentrifugieren (13.000 Upm und Raumtemperatur in einer Heraeus Biofuge pico) pelletiert. Der Niederschlag wurde mit 70 %-igem Ethanol gewaschen. Nach erneuter einminütiger Zentrifugation wurde das Pellet bei Raumtemperatur getrocknet und in einem kleinen Volumen  $H_2O_{bid.}$ , TE-Puffer oder EB-Puffer gelöst.

### Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde photometrisch bestimmt. Bei einer Wellenlänge von 260 nm und einer Schichtdicke von 1 cm entspricht ein Absorptionswert 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 auf Verunreinigungen mit Proteinen hin, höhere Werte zeigen Verunreinigungen mit Salzen oder Zuckern an.

Alle Messungen erfolgten in einem Nanodrop-ND1000-Spektralphotometer.

### **4.4.2 Isolierung von Nukleinsäuren**

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

Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte durch „Lyse durch Kochen“ (nach Sambrook *et al.*, 1989): 1,5 ml einer *E. coli* Übernachtskultur wurden 60 sec bei 13.000 Upm (Raumtemperatur, Heraeus Biofuge pico) pelletiert. Das Zellpellet wurde in 300 µl STET-Puffer resuspendiert, nach Zugabe von 20 µl Lysozym-Lösung kräftig geschüttelt, zur Vorinkubation 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 60 sec bei 95°C in einem Eppendorf-Heizblock inkubiert. Die so lysierten Zellen und die denaturierte genomische DNA wurden anschließend 9 min bei 8.500 Upm (Raumtemperatur, Heraeus Biofuge pico) und danach mit einem sterilen Zahnstocher aus der wässrigen Lösung entfernt. Die Aufreinigung der Plasmid-DNA erfolgte durch Fällung mit 30 µl Minilysat(III)-Lösung (3 M NaAc, pH 4,8) und 500 µl Isopropanol für 5 min bei Raumtemperatur und anschließender Zentrifugation für 15 min bei 13.000 Upm (Heraeus Biofuge pico). Das Pellet wurde mit 70 %-igem Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen bei Raumtemperatur in 100 µl TE-Puffer mit 50 µg/ml RNaseA aufgenommen. Mit dieser Methode gelang es routinemäßig, aus 1,5 ml Übernachtskultur etwa 50 µg Plasmid-DNA zu isolieren.

#### **STET-Puffer**

10 mM Tris-HCl, pH 8,0  
100 mM NaCl  
1 mM Na<sub>2</sub>-EDTA  
5% (v/v) TritonX-100  
in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>

#### **Lysozym-Lösung**

10 mg/ml Lysozym  
in 1x TE-Puffer

#### **Minilysat(III)-Lösung**

3 M NaAc, pH 4,8  
in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>

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

Für die Isolierung genomischer DNA wurden zunächst 2 ml einer *U. maydis* Übernachtskultur, die in 2,5 ml YEPS<sub>light</sub>-Medium angezogen wurde, abzentrifugiert (1 min, 13.000 Upm, Raumtemperatur, Heraeus Biofuge pico) und der Überstand abgenommen. Zum Pellet wurden 400 µl Lysis-Puffer, 500 µl Phenol/Chloroform sowie 300 mg Glasperlen gegeben. Das Gemisch wurde für 6-10 min auf hoher Stufe auf einem Vibrax-Schüttler geschüttelt, um die Zellen aufzuschließen. Zur Phasentrennung wurde dann 15 min bei 13.000 Upm (Raumtemperatur, Heraeus Biofuge pico) zentrifugiert. Von der wässrigen Phase im Überstand wurden ca. 400 µl in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, 1 ml 100 % Ethanol zugesetzt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 13.000 Upm (Raumtemperatur, Heraeus Biofuge pico) wurde das Pellet ca. 5 min bei Raumtemperatur getrocknet und in 50 µl TE-Puffer mit 50 µg/ml RNaseA aufgenommen. Anschließend wurde die DNA bei 50°C und 850 Upm für 15-30 min in einem Eppendorf-Thermomixer gelöst. Zur Qualitätskontrolle wurde 1 µl der genomischen DNA auf ein 0,8 %-iges Agarosegel aufgetragen und analysiert.

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

50 mM Tris-HCl, pH 7,5  
50 mM Na<sub>2</sub>-EDTA  
1% (w/v) SDS  
in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>

**TE-Phenol/Chloroform**

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

Alternative Präparation von genomischer DNA aus *U. maydis* (M. Vranes)

Zunächst wurden 2 ml Reaktionsgefäße mit je 300 mg Glasperlen versehen. Für die Isolierung genomischer DNA wurden zunächst 2 ml einer *U. maydis* Übernachtskultur, die in 2,5 ml YEPS<sub>light</sub>-Medium angezogen wurde, in den vorbereiteten Reaktionsgefäßen abzentrifugiert (1 min, 13.000 Upm, Raumtemperatur, Heraeus Biofuge pico) und der Überstand abgenommen. Das Pellet wurde in 500 µl Lysis-Puffer (1/2 mit 1xTE verdünnt) aufgenommen und für 10-15 min auf einem Vibrax-Schüttler bei 1400 Upm geschüttelt. Es folgte ein 65°C Schritt für 15 min auf einem Heizblock. Nach weiteren 5 min auf Eis wurden je 100 µl 8 M Kaliumacetat zugegeben. Nun wurden die Reaktionsgefäße zum Mischen 8-10 mal invertiert. Es folgte ein Zentrifugierschritt für 15 min bei >13.000 Upm. Der Überstand wurde mit 300 µl Isopropanol in frischen 1,5 ml Reaktionsgefäßen versetzt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 15-minütiger Zentrifugation bei 13.000 Upm (Raumtemperatur, Heraeus Biofuge pico) wurde das Pellet einmal mit 70% EtOH gewaschen und danach maximal 5 min bei Raumtemperatur getrocknet. Anschließend wurde die DNA in 50 µl TE-Puffer mit 50 µg/ml RNaseA aufgenommen und bei 50°C und 850 Upm für 15-30

min in einem Eppendorf-Thermomixer gelöst. Zur Qualitätskontrolle wurde 1 µl der genomischen DNA auf ein 0,8 %-iges Agarosegel aufgetragen und analysiert.

#### 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  $OD_{600} = 0,5$  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  $-80^{\circ}\text{C}$  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 fünfminütiger 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  $55^{\circ}\text{C}$  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-Bioanalyser (siehe Angaben des Herstellers).

#### **4.4.3 *in vitro*-Modifikationen von DNA (Sambrook et al., 1989)**

##### Restriktion von DNA

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

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

Nach Inkubation für 1 h bei 37°C (bzw. der für das jeweilige Enzym optimalen Temperatur) wurden dem Ansatz 2 µl nativer Auftragspuffer zugesetzt und die Reaktionsprodukte auf Agarosegelen 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 eine Religation von linearisierter Plasmid-DNA verhindert werden. Ein typischer Reaktionsansatz enthielt:

- 1 µg linearisierte Plasmid-DNA
- 1 U Antarktische Phosphatase
- in 100 µl Antarktische Phosphatase-Puffer

Der Ansatz wurde 30 min bei 37°C und anschließend weitere 10 min bei 65°C zur Hitzeinaktivierung des Enzyms inkubiert. Die DNA wurde durch Zugabe von 10 µl Na-Acetat (pH = 5,3) und 250 µl reinem Ethanol gefällt. Das Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen, bei Raumtemperatur getrocknet und in TE-Puffer aufgenommen.

#### Auffüllen von 5'-überhängenden DNA-Fragmenten

Die Taq-Polymerase ist in der Lage, 5'-überhängende DNA-Fragmentenden in Anwesenheit von Desoxynukleotiden und Magnesiumionen aufzufüllen und so glatte Enden zu erzeugen. Dieses Vorgehen ist die Methode der Wahl, um nicht-kompatible Fragmentenden ligierbar zu machen. Ein typischer Reaktionsansatz enthielt:

- 1 µg DNA-Fragmente
- 50 µM dNTPs
- 1 U Taq-Polymerase
- in 50 µl Taq-PCR-Puffer

Der Ansatz wurde 30 min bei 72°C inkubiert. Derartig behandelte DNA-Fragmente können direkt in eine Ligationsreaktion eingesetzt werden.

#### Ligation von DNA-Fragmenten

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

- 100 ng linearisierter, dephosphorylierter Vektor
- dreifach molarer Überschuss an linearem Fragment

1 U T4 DNA-Ligase  
in 10 µl Ligase-Puffer

Der Ansatz wurde entweder ca. 6 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 16°C inkubiert. Die so behandelte DNA konnte entweder direkt in chemisch kompetente *E. coli* Zellen transformiert werden, oder wurde, für eine anschließende Transformation durch Elektroporation ca. 45 min gegen 10 % Glycerin dialysiert.

#### 4.4.4 Gelelektrophorese von Nukleinsäuren

##### Nicht-denaturierende Agarose-Gelelektrophorese

Im Agarosegel können Nukleinsäuren in einem elektrischen Feld entsprechend ihrer Größe aufgetrennt, identifiziert und isoliert werden (Sambrook *et al.*, 1989). In der Regel wurden Gele hergestellt, die zwischen 0,8 und 2 % Agarose enthielten. Hierfür wurde die entsprechende Menge an Agarose in 0,5x TBE-Puffer aufgekocht, nach Abkühlung auf ca. 60°C mit Ethidiumbromid versetzt (Endkonzentration 0,5 µg/ml) und in einen Elektrophoreseschlitten gegossen. Nach Erstarren des Gels wurde die Gelkammer mit 0,5x TBE-Puffer gefüllt. Vor dem Auftragen der Proben wurden diese im Verhältnis 6:1 mit nativem Auftragspuffer gemischt. Die Elektrophorese erfolgte bei konstanter Spannung (5-10 V/cm). Die DNA-Banden konnten im UV-Durchlicht (Wellenlänge - 254 nm) mit einem E-BOX Videodokumentationssystem (Peqlab) detektiert und auf Thermalpapier photographisch dokumentiert werden.

##### **5x TBE-Puffer**

500 mM Tris-Borat, pH 7,9  
10 mM Na<sub>2</sub>-EDTA  
in H<sub>2</sub>O<sub>bid</sub>.

##### **6x Auftragspuffer, nativ**

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

#### 4.4.5 Transfer und Nachweis von DNA auf Membranen (Southern, 1975)

##### Transfer von DNA (Southern Blot)

Der Transfer der in einem 0,8 %-igem Agarosegel aufgetrennten, mit Restriktionsenzymen verdauten DNA-Fragmente auf eine Nylonmembran erfolgte durch Kapillar-Blot. Hierbei wird die Transferlösung (20x SSC-Puffer) aus einem Pufferreservoir über Kapillarkräfte durch das Gel hindurch in einen auf dem Gel platzierten Stapel Papierhandtücher gesaugt. Die DNA-Fragmente werden durch den Pufferstrom aus dem Gel eluiert und binden an die darüber liegende, positiv geladene Nylonmembran. Ein gleichmäßig verteiltes Gewicht auf dem Papierstapel garantiert eine dichte Verbindung zwischen den jeweiligen Lagen des

Transfersystems. Vor dem Transfer wurde das Agarosegel 20 min in 0,25 M HCl inkubiert, um einen Teil der Purine abzuspalten. So wird der Transfer großer DNA-Fragmente erleichtert. Anschließend wurde das Gel erst 20 min in DENAT-Lösung, dann weitere 20 min in RENAT-Lösung gewaschen. Der Aufbau des Blots von unten nach oben geschah folgendermaßen:

- Whatman 3MM-Brücke zum Pufferreservoir
- Agarosegel
- Nylonmembran (Roti®-Nylon Plus)
- drei Lagen Whatman 3MM
- Stapel Papierhandtücher
- Glasplatte
- Gewicht (ca. 500 g)

Der Kapillar-Blot erfolgte über Nacht. Anschließend wurde die Membran bei Raumtemperatur getrocknet und die DNA wurde in einem UV Stratalinker 1800 (Stratagene) für 1 min pro Seite auf der Membran fixiert.

**20x SSC-Puffer**

3 M NaCl  
0,3 M Na-Citrat \* 2 H<sub>2</sub>O  
in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>, pH-Wert mit  
HCl auf 7,0 eingestellt

**DENAT-Lösung**

1,5 M NaCl  
0,4 M NaOH  
in H<sub>2</sub>O<sub>bid</sub>

**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 H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>)
- 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 Na<sub>2</sub>-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 Hybridisierungssofen 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 H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>

**DIG-Waschpuffer**

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

**DIG1**

0,1 M Maleinsäure  
0,15 M NaCl  
in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>, 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 MgCl<sub>2</sub>  
in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>, pH-Wert auf 9,5 eingestellt

#### 4.4.6 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 H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub> 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 Clone Manager oder ApE exportiert werden.

Zur Sequenzanalyse und für Homologievergleiche wurden folgende Programme benutzt.

- BLAST 2 (Altschul *et al.*, 1990; Altschul *et al.*, 1997) zur Identifikation ähnlicher Proteine oder DNA-Sequenzen in öffentlichen Datenbanken
- ApE- A plasmid Editor v1.17 zur Bearbeitung von Sequenzrohdaten und zum Vergleich von DNA-Sequenzen
- Clone Manager 9 (Sci-Ed Software) zur Erstellung und Bearbeitung von Plasmid- und genomischen Sequenzen

### 4.5 Biochemische Methoden

#### 4.5.1 Proteinextraktion aus *U. maydis* für Proteinnachweis

Aus einer exponentiell wachsenden Vorkultur wurden 50-100 ml CM-Medium auf eine OD<sub>600</sub> = 0,1-0,2 eingestellt. Diese Kultur wurde bis zu einer OD<sub>600</sub> = 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 einmal mit PBS-Puffer oder H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub> gewaschen. Anschließend wurde das Pellet in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Anschließend wurde das Pellet in 1 ml PBS-Puffer mit Protease-Inhibitoren (je 10 ml Puffer 200 µl 50x Complete Protease-Inhibitor Cocktail, 100 µl 0,1 M PMSF, 100 µl 0,5 M Benzamidin) resuspendiert. Die Zellen wurden für 10 Minuten und 30 Hz in einem vorgekühlten Stahlbehälter mit zwei Stahlkugeln in einer Kugelmühle (Retsch) aufgeschlossen. Das 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 mit der entsprechenden Menge Laemmli-Puffer versetzt. Anschließend wurde das Gemisch für drei Minuten bei 95°C denaturiert und für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese verwendet.

#### 4.5.2 Anreicherung der zytoplasmatischen Proteinfraktion

Aus einer exponentiell wachsenden *U. maydis* Kultur wurden 500 ml CM-Glukose so eingestellt, dass sie am darauf folgenden Tag eine OD<sub>600</sub> von ungefähr 0,8-1 erreicht hat. Die Zellen wurden dann in einer Thermo Scientific Sorvall RC 6+ Zentrifuge in zwei Durchgängen bei 3500 Upm abzentrifugiert. Der dabei entstandene Überstand wurde verworfen. Das Zellpellet wurde zum Waschen in 50 ml ddH<sub>2</sub>O aufgenommen und anschließend in ein 50 ml Reaktionsgefäß (Greiner) überführt. Nach einem weiteren Zentrifugierschritt bei 3500Upm in einer Heraeus Laborfuge 400R wurde der Überstand entfernt und die sauberen Zellen in 5 ml Zellkernextraktionspuffer mit 1x Complete Protease Inhibitor Cocktail (Roche) aufgenommen. Die Zellen wurden in einer French Press (American instrument company) bei einem Druck von 1.500 PSIG in drei Durchgängen aufgeschlossen. Das resultierende Zellysat wurde in vier 1,5ml Eppendorf Reaktionsgefäße überführt und in einer Heraeus Biofuge stratos bei 7.000 Upm für 10 min pelletiert. Der Überstand direkt für western Analysen oder für Pull-Down Experimente verwendet.

#### 4.5.3 Coimmunoprecipitation (Co-IP) von Proteinen

Aus einer exponentiell wachsenden *U. maydis* Kultur wurden 300 ml CM-Glukose so eingestellt, dass sie am darauf folgenden Tag eine OD<sub>600</sub> von ungefähr 0,8-1 erreicht hat. Die Zellen wurden dann in einer Thermo Scientific Sorvall RC 6+ Zentrifuge bei 3500 Upm abzentrifugiert. Der dabei entstandene Überstand wurde verworfen. Das Zellpellet wurde zum Waschen in 50ml ddH<sub>2</sub>O oder PBS aufgenommen und anschließend in ein 50 ml Reaktionsgefäß (Greiner) überführt. Nach einem weiteren Zentrifugierschritt bei 3500 Upm in einer Heraeus Laborfuge 400R wurde der Überstand entfernt und das Pellet in flüssigem Stickstoff schockgefroren (Nun Lagerung bei -80°C möglich). Das Pellet mit den sauberen Zellen wurde auf Eis aufgetaut und in 1 ml IP Puffer (nach Pierce) mit 1x Complete Protease Inhibitor Cocktail (Roche) aufgenommen. Die Zellen wurden für 10 Minuten und 30 Hz in einem vorgekühlten Stahlbehälter mit zwei Stahlkugeln in einer Kugelmühle (Retsch) aufgeschlossen. Das Zellextrakt wurde auf Eis aufgetaut, in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und für 30 Minuten bei 22.000 Upm und 4°C in einer Hereus Biofuge stratos zentrifugiert. Nach der Zentrifugierung wurden 20 µl Überstand mit 40 µl IP Puffer (nach Pierce) und 20 µl 4x Laemmli Puffer (Roth) versetzt und bei 95°C für 3 min denaturiert (Input Kontrolle). Währenddessen wurden 50µl einer, mit Anti-HA Antikörper gekoppelten, Agaroselösung (Sigma A2095) in einem 1,5ml Eppendorf Reaktionsgefäß gewaschen. Hierfür wurde vier mal PBS Puffer und einmal IP-Puffer (nach Pierce) verwendet (je 1 ml). Die Waschung erfolgte durch das Zugeben des Puffers und der anschließenden Invertierung des Reaktionsgefäßes (10 bis 15x). Es folgte ein Zentrifugierschritt bei 8.000Upm für 30s.

Nach Verwerfen des Überstandes konnte erneut frischer Waschpuffer zugegeben werden. Die proteinhaltige Überstand aus der Hochgeschwindigkeitszentrifugation wurden nun mit der vorgereinigten Anti-HA-Agarose in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß vereinigt und bei 4°C auf einem vertikalen Drehrad für 3h bis ÜN inkubiert. Nach weiteren drei bis fünf Waschsritten mit je 1000µl IP-Puffer (nach Pierce) + 1x Complete (Roche) (Zentrifugation 2000Upm für 30s) wurde die Agarose in 500µl IP Puffer (nach Pierce) + 1x Complete (Roche) aufgenommen und in ein frische 1.5ml Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. Das leere Reaktionsgefäß wurde erneut mit 500µl IP Puffer (nach Pierce) + 1x Complete (Roche) durchgespült, welcher anschließend zu der restlichen Probe gegeben wurde. Die Anti HA-Agarose wurde erneut bei 2000Upm für 30s pelletiert. Anschließend konnte der Überstand nahezu vollständig entfernt werden. Um die gebundenen Proteine von dem, an die Agarose gebundenen Antikörper zu lösen, wurden 20µl 4x Laemmli Puffer (Roth) zugegeben. Die Elution erfolgte durch Aufkochen bei 95°C für 3 min. Die erhaltenen Proteinextrakte (Eluat und Input) wurden nun auf ein SDS Polyacrylamidgel geladen und anschließend per Western Blot nachgewiesen (s.u.).

**IP Puffer (nach Pierce)**

25 mM Tris-HCL, pH 7.4

150 mM NaCl

1 mM EDTA

1% (v/v) NP-40

5% (v/v) Glycerol

**4.5.4 Immunoprecipitation (Pull-Down) von Proteinkomplexen aus *U. maydis***

Aus einer exponentiell wachsenden *U. maydis* Kultur wurden 500 ml CM-Glukose so eingestellt, dass sie am darauf folgenden Tag eine OD<sub>600</sub> von ungefähr 0,8-1 erreicht hat. Die Zellen wurden dann in einer Thermo Scientific Sorvall RC 6+ Zentrifuge in zwei Durchgängen bei 3500 Upm abzentrifugiert. Der dabei entstandene Überstand wurde verworfen. Das Zellpellet wurde zum Waschen in 50 ml ddH<sub>2</sub>O aufgenommen und anschließend in ein 50 ml Reaktionsgefäß (Greiner) überführt. Nach einem weiteren Zentrifugierschritt bei 3500 Upm in einer Heraeus Laborfuge 400R wurde der Überstand entfernt und die sauberen Zellen in 5 ml IP Puffer (nach Pierce) mit 1x Complete Protease Inhibitor Cocktail (Roche) aufgenommen. Die Zellen wurden in einer French Press (American instrument company) bei einem Druck von 1.500 PSIG in drei Durchgängen aufgeschlossen. Das resultierende Zellysate wurde in vier 1,5ml Eppendorf Reaktionsgefäße überführt und in einer Heraeus Biofuge stratos bei 22.000 Upm für 30 min bei 4°C pelletiert. Nach der Zentrifugierung wurden 1 µl Überstand mit 149 µl IP Puffer (nach Pierce) und 50 µl 4x Laemmli Puffer (Roth) versetzt und bei 95°C für 3 min denaturiert (Input Kontrolle).

Währenddessen wurden 50µl einer, mit Anti-HA Antikörper gekoppelten, Agaroselösung (Sigma A2095) in einem 1,5ml Eppendorf Reaktionsgefäß gewaschen. Hierfür wurde vier mal PBS Puffer und einmal IP-Puffer (nach Pierce) verwendet (je 1 ml). Die Waschung erfolgte durch das Zugabe des Puffers und der anschließenden Invertierung des Reaktionsgefäßes (10 bis 15x). Es folgte ein Zentrifugierschritt bei 8.000Upm für 30s. Nach Verwerfen des Überstandes konnte erneut frischer Waschpuffer zugegeben werden. Die proteinhaltigen Überstände aus der Hochgeschwindigkeitszentrifugation wurden nun mit der vorgereinigten Anti-HA-Agarose in einem 15ml Greiner Gefäß vereinigt und bei 4°C auf einem vertikalen Drehrad für 3h (Prp19) bis ÜN (Num1) inkubiert. Nach weiteren drei bis fünf Waschschritten mit je 1000µl IP-Puffer (nach Pierce) + 1x Complete (Roche) (Zentrifugation 2000Upm für 30s) wurde die Agarose in 500µl IP Puffer (nach Pierce) + 1x Complete (Roche) aufgenommen und in ein frische 1.5ml Eppenforf Reaktionsgefäß überführt. Das leere Reaktionsgefäß wurde erneut mit 500µl IP Puffer (nach Pierce) + 1x Complete (Roche) durchgespült, welcher anschließend zu der restlichen Probe gegeben wurde. Die Anti HA-Agarose wurde erneut bei 2000Upm für 30s pelletiert. Anschließend konnte der Überstand nahezu vollständig entfernt werden. Um die gebundenen Proteine von dem, an die Agarose gebundenen Antikörper zu lösen, wurden 20µl einer HA-Peptidlösung (2,5mg/ml in PBS) hinzugegeben. Die Elution erfolgte in einem Thermomixer comfort der Firma Eppendorf bei 30°C für 40min. Dabei wurde das Gerät so eingestellt, dass alle 60s ein Schüttelschritt von 5s bei 1000Upm erfolgte. Dieser Schüttelschritt verhinderte das Absetzen der Agarose. Um die Proteinlösung von der Anti HA-Agarose zu trennen, wurde das Gemisch nun über eine zwei-fach mit IP-Puffer (nach Pierce) gewaschene Mobitec T100 Säule aufgereinigt. Für alle Waschschrritte und die folgende Proteinreinigung wurde die Säule je 1min bei 8000Upm zentrifugiert. Das resultierende „saubere“ Proteingemisch wurde anschließend mit der entsprechenden Menge 4x Laemmli Puffer (Roth) versetzt und 3 min bei 95°C aufgeköcht. Anschließend konnten die Proben für SDS-Page und anschließende Silberfärbung (Input Kontrolle und Eluat) oder für den In-Gel Trypsinverdau (nur Eluat) verwendet werden.

**IP Puffer (nach Pierce)**

25 mM Tris-HCL, pH 7.4

150 mM NaCl

1 mM EDTA

1% (v/v) NP-40

5% (v/v) Glycerol

#### 4.5.5 In-Gel Trypsinverdau von Proteinen

Die betreffenden Proben wurden zunächst in die Taschen eines 10%-igen SDS-Gels geladen und bei 100V so lange aufgetrennt, bis die Lauffront 1,5 bis 2cm in das Trenngel eingelaufen ist. Dabei wurden die Proben immer mit mindestens einer Tasche Abstand beladen, um eine Vermischung der Proben zu verhindern. Anschließend wurde die Elektrophorese gestoppt. Auf die Glasscheibe wurde nun pro Probe ein Raster gezeichnet, welches von Lauf-/Trenngelrand bis zur Lauffront reichte. Die Vertikale Begrenzung bildete jeweils der Rand der anschließenden Taschen. Dieses Raster wurde anschließend horizontal in vier gleich große Stücke geteilt. Nun wurden die Glasscheiben von einander getrennt und das Gel konnte anschließend mit einer frischen Skalpellklinge (je Probe) zerteilt werden. Dabei wurde das Raster als Vorlage verwendet. Die Gelstücke wurden in je ein 1,5ml Eppendorf Gefäß überführt. Um die Proteine im Gel zu fixieren wurde jedes Gelstück mit 1 ml Fixierlösung überschichtet und für 1 h bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Fixierlösung verworfen und durch 1ml ddH<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> ersetzt. Die Inkubation erfolgte für mindestens 30min bei RT oder ÜN bei 4°C. Als Nächstes wurde der Überstand abgenommen und die Gelstücke jeweils auf einem frischen Objektträger mit einer frischen Skalpellklinge in ungefähr 1 mm<sup>2</sup> große Stücke geschnitten. Die Stücke wurden jeweils wieder in die 1,5ml Eppendorf Reaktionsgefäße überführt und mit 200 µl Acetonitril (Roth) überschichtet. Die Inkubation erfolgte für 10min bei RT. Um die Gelstücke komplett zu trocknen wurde der Überstand verworfen und die Stücke in der Speed Vac bei hoher Temperatur für 20 min inkubiert. Zur Reduzierung der Proben wurden 300 µl DTT (in 100 mM Ammoniumhydrogencarbonat (Roth)) zugesetzt. Die Inkubation erfolgte für 1 h bei 56°C. Nach dem Entfernen des Überstandes wurden die Proben mit 300 µl 55 mM Iodocetamid (in 100 mM Ammoniumhydrogencarbonat (Roth)) alkyliert. Dies geschah bei RT im Dunkeln für 45 min. Nach dem Entfernen des Überstandes wurden 300 µl 100 mM Ammoniumhydrogencarbonat zugesetzt und für 10 min bei RT inkubiert. Der Überstand wurde verworfen. Es wurden nun 300 µl Acetonitril (Roth) zugesetzt und erneut für 10 min bei RT inkubiert. Die Waschschrte mit Ammonium Hydrogencarbonat und Acetonitril wurden ein weiteres Mal wiederholt. Anschließend konnten die Gelstücke erneut bei hoher Temperatur in der Speed Vac getrocknet werden (20 min). Nun wurden 150 µl Trypsinlösung (25 µg Trypsin in 80 µl Promega Resuspension Buffer, 1:20 mit 100 mM Ammoniumhydrogencarbonat verdünnt) zugegeben. Die Inkubation erfolgte für 45 min auf Eis. Die überschüssige Trypsinlösung wurde verworfen. Für die anschließende Inkubation ÜN bei 37°C wurden die Gelstücke mit 100 µl 50 mM Ammoniumhydrogencarbonat überschichtet. Die Proben wurden nun kurz mit 13000 Upm pelletiert und der Überstand je in ein neues 1,5ml Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurden 70 µl 20 mM Ammoniumhydrogencarbonat auf die Gelstücke gegeben. Die Inkubation erfolgte für 10 min

bei RT. Der Überstand wurde dann mit dem vorherigen vereint. Nun wurden 90µl einer Lösung aus 50% Acetonitril, 5% Ameisensäure (Roth) und 45% ddH<sub>2</sub>O zu den Gelstücken gegeben. Nach einer 20 minütigen Inkubation bei RT wurde erneut kurz bei 13000 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut mit den vorherigen vereint. Dieser Extraktionsschritt wurde so lange wiederholt (mindestens 2 mal), bis die Gelstücke innen weiß wurden. Nachdem alle Überstände vereint waren, konnte die Peptidlösung vollständig eingetrocknet werden. Dies erfolgte in der Speed Vac für mindestens 5h (je nach Menge) bei höchster Temperatur. Die gewonnenen Peptidpellets konnten nun verschickt werden. Die anschließenden Mass spec experimente wurden von unseren Kooperationspartnern in Göttingen durchgeführt.

#### 4.5.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen

Zur Auftrennung der Proteine wurde die Methode der diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) angewendet (Laemmli, 1970). Als Laufkammer wurde eine Mini Protean II Apparatur (Biorad) verwendet. Die Auftrennung erfolgte bei 20 mA (pro Gel) für 25-30 min bis die Auftragspufferbande die Trenngelschicht erreicht hatte. Die Auftrennung im Trenngel erfolgte bei 30-40 mA (pro Gel) und maximal 200 V für 40-60 min. Alternativ wurden die Protein auf den Gelen bei 100V für ungefähr 70 min. aufgetrennt. Je nach Proteingröße, wurden die Gele mit 7-12% Acrylamid hergestellt.

##### **Sammelgel (5%)**

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

##### **Sammelgel-Puffer (4x)**

55 mM Tris-Base  
 445 mM Tris-HCl  
 Mit H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub> 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 H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>  
 50 µl 10% SDS  
 40 µl 10% APS (w/v in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>)  
 4 µl TEMED

##### **Trenngel-Puffer (4x)**

1,27 M Tris-Base  
 0,23 M Tris-HCl  
 Mit H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub> 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 H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>

##### **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

#### 4.5.7 Färbung von Proteingelen

##### Coomassie-Färbung:

Für die Coomassie Färbung von Proteinen wurde Roti-blue quick (Carl Roth) verwendet. Hierzu wurde das Gel in eine Färbeschale gegeben und mit Roti-blue quick Lösung übergossen. Die Färbung erfolgte für 15 min bis ÜN bei RT.

##### Silbernitrat-Färbung:

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 einer Färbeschale 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, nach dessen Entfernung, 20 Minuten in Farbe-Lösung inkubiert. Nun wurde das Gel in eine neue Färbeschale überführt. 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 H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>, frisch angesetzt

##### **Farbe-Lösung**

0,2% (w/v) AgNO<sub>3</sub>  
0,015% (v/v) Formaldehyd (37%ig)

##### **Entwickler**

6% (w/v) NaCO<sub>3</sub>  
0,05% (v/v) Formaldehyd (37%ig)  
2% Thiosulfat-Lösung

##### **Stopper**

18% Essigsäure  
75% Methanol

#### 4.5.8 Nachweis von immobilisierten Proteinen

Western Blot (Towbin *et al.*, 1979)

Der Transfer der Proteine aus SDS-Polyacrylamid-Gelen auf eine PVDF Membran (Carl Roth) erfolgte mittels Elektro-Blot in einer Semi-Dry-Blotter-Apparatur für 1 h mit 2 mA pro cm<sup>2</sup> PVDF-Membran. Der Blot von der Kathode in Richtung Anode wurde für das diskontinuierliche Puffersystem folgendermaßen aufgebaut:

- drei Lagen Whatman 3MM (in Kathodenpuffer getränkt)
- SDS-Polyacrylamid-Gel (für 10 min in Kathodenpuffer äquilibriert)
- PVDF-Membran (10 sec in Methanol gewaschen, mit H<sub>2</sub>O gespült und für 10min in Anodenpuffer 2 äquilibriert)
- eine Lage Whatman 3MM (in Anodenpuffer 2 getränkt)
- zwei Lagen Whatman 3MM (in Anodenpuffer 1 getränkt)

Western Blot (Garic *et al.*, 2013)

Der Transfer der Proteine aus SDS-Polyacrylamid-Gelen auf eine PVDF Membran (Carl Roth) erfolgte mittels Elektro-Blot in einer Semi-Dry-Blotter-Apparatur für 1 h mit 2 mA pro cm<sup>2</sup> PVDF-Membran. Der Blot von der Kathode in Richtung Anode wurde für das Fastblot Puffersystem folgendermaßen aufgebaut:

- zwei Lagen Whatman 3MM (in Fastblotpuffer getränkt)
- SDS-Polyacrylamid-Gel (für 5 min in Fastblotpuffer äquilibriert)
- PVDF-Membran (1 min in Methanol aktiviert, 5 min in Fastblotpuffer äquilibriert)
- zwei Lagen Whatman 3MM (in Fastblotpuffer getränkt)

Spezifischer Nachweis der immobilisierten Proteine

Der immunologische Nachweis von Proteinen erfolgte mit Hilfe der an den sekundären Antikörper gekoppelten Meerrettich-Peroxidase (HRP). Nach dem Elektro-Blot wurde die PVDF-Membran zunächst in ein 50 ml Gefäß (Greiner) überführt und anschließend für 30 min bis 5 h in 4 % Magermilchpulver in TBST-Puffer auf einem Taumelrollenmischer geblockt, um eine unspezifische Bindung der Antikörper an die Membran zu verhindern. Anschließend wurde die Membran für 30 min bis 12 h mit 3 ml des primären Antikörpers, verdünnt in TBST-Puffer mit 4 % Magermilchpulver, bei 4°C (bei 30-60 min bei RT) auf einem Taumelrollenmischer inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für 10 min in TBST-Puffer wurde die Membran für 30 min bis 12 h mit 3 ml der sekundären Antikörper-Lösung, verdünnt in TBST-Puffer mit 4 % Magermilchpulver, inkubiert. Darauf folgten drei Waschschrte für 10 min mit TBST-Puffer und ein weiterer Waschschrte für 10 min in TBS-

Puffer. Die Antikörper wurden in einer 1:3000 Verdünnung eingesetzt. Für die Detektion wurden 1,5 ml der ECL 1-Lösung mit 1,5 ml ECL 2-Lösung gemischt, auf die Membran gegeben und für 1 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Die Membran wurde dann in einen Plastikbeutel gelegt. Das Fluoreszenzsignal wurde anschließend mit Hilfe der CCD-Kamera einer CHEMI-SMART-5100 (PeqLab) fotografiert. Die Belichtungszeit betrug zwischen 10 sec und fünfzehn min.

**Anodenpuffer 1**

300 mM Tris-HCl, pH 10,4  
15% (v/v) Methanol  
in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>

**Anodenpuffer 2**

30 mM Tris-HCl, pH 10,4  
15% (v/v) Methanol  
in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>

**Kathodenpuffer**

25 mM Tris-HCl, pH 9,4  
40 mM  $\gamma$ -Aminocaprinsäure  
15% (v/v) Methanol  
in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>

**TBST-Puffer**

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

**Fastblotpuffer**

45 mM Tris  
20mM HEPES  
20% (v/v) Methanol  
in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>

**ECL 1-Lösung**

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

**ECL 2-Lösung**

10 ml 100 mM Tris-HCl pH 8,5  
6  $\mu$ l 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

#### 4.5.9 Massenspektroskopische Analysen

Die LCMS Experimente wurden zusammen mit Oliver Valerius am Institut für Mikrobiologie und Genetik in der Abteilung Molekulare Mikrobiologie und Genetik (Leitung: Prof. Gerhard Braus) an der Georg-August Universität in Göttingen durchgeführt.

##### Nano LC – RSLCnano Ultimate 3000 System (Thermo Scientific)

Peptide des In-Gel Trypsinverdau wurden zum Entsalzen auf eine Acclaim PepMap 100 Säule (75  $\mu$ m x 2 cm, C18, 3  $\mu$ m, 100 Å; Thermo Scientific) geladen und bei einer Flussrate von 25  $\mu$ l/min für 6 min mit Lösung A (98% H<sub>2</sub>O, 2% Acetonitril, 0,07% TFA) gespült. Die folgende Peptidseparation durch *reverse phase* Chromatographie wurde mit einer Acclaim PepMap RSLC Säule (75  $\mu$ m x 25 cm, C18, 3  $\mu$ m, 100 Å; Thermo Scientific) durchgeführt. Standardmäßig wurde dafür ein Gradient von 98% Lösung A (H<sub>2</sub>O, 0,1% Ameisensäure) und 2% Lösung B (80% Acetonitril, 20% H<sub>2</sub>O, 0,1% Ameisensäure) bis 42% Lösung B in 95 min und 65% Lösung B innerhalb der nächsten 26 min verwendet. Die Flussrate betrug hierbei

300 nl/min. Die verwendeten Reinstchemikalien wurden alle von Fisher Chemicals (LCMS grade) bezogen.

#### Nano ESI Massenspektrometrie (Orbitrap Velos Pro, Thermo Scientific)

Peptide aus der Chromatographie wurden online durch nano-electrospray (nESI) mit einer Nanospray Flex Ion Source (Thermo Scientific) bei 2,4 kV on-line ionisiert. Dadurch erfolgte ein kontinuierlicher Transfer der Peptide in das Massenspektrometer. Vollständige Scans innerhalb eines Massenbereichs von 300-1850 m/z wurden von dem Orbitrap-FT analyzer bei einer Auflösung von 60.000 mit paralleler datenabhängiger top 10 MS2-Fragmentierung mit der LTQ Velos Pro linear ion trap (CID) durchgeführt. Die LCMS Einstellungen und die Datenerfassung wurden mithilfe der XCalibur 2.2 (Thermo Fisher) Software durchgeführt.

#### MS-Datenanalyse mit ProteomeDiscoverer 1.4 (Thermo Scientific)

Die ProteomeDiscoverer 1.4 Software wurde zur Proteinidentifizierung verwendet. Die MS Daten mit SequestHT und Mascot gegen eine *Ustilago maydis* spezifische Proteindatenbank von MIPS *Ustilago maydis* DataBase (MUMDB) abgefragt. Die False Discovery Rate (FDR) für die Peptidzuordnungen wurde auf  $\leq 1\%$  gesetzt.

## **4.6 PCR-Techniken**

### **4.6.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (Innis et al., 1990)**

Die PCR bietet die Möglichkeit, definierte DNA-Bereiche selektiv zu amplifizieren. Dazu sind zwei Oligonukleotide (Primer) nötig, von denen einer zum 3'-Bereich der gewünschten Sequenz, der andere zum Gegenstrang des 5'-Bereichs komplementär ist. Die Reaktionen wurden in einem Peltier Thermal Cycler PTC-100 (MJ Research) Gerät durchgeführt. Als Standard-Protokoll wurden folgende Ansätze verwendet:

- 100 ng Matrizen-DNA
- 2 U Taq DNA-Polymerase
- 0,4  $\mu$ l 25 mM dNTPs
- 0,3  $\mu$ l je Primer (100 pmol/ $\mu$ l)
- in 50  $\mu$ l Taq PCR-Puffer

94°C/5 min – [94°C/1 min – 65°C/1 min – 72°C/1 min] x 30 – 72°C/10 min

Für die Amplifikation genomischer Fragmente *U. maydis* oder der Amplifikation von DNA Fragmenten, welche für Klonierungsansätze verwendet wurden, kam die Phusion DNA-Polymerase (New England Biolabs) zum Einsatz. Die Phusion Polymerase besitzt eine

höhere Rezessivität bei niedriger Fehlerrate, verglichen zur Taq DNA-Polymerase. Es wurde folgender Standard-Ansatz verwendet:

100 ng Matrizen DNA

2 U Phusion DNA-Polymerase

0,4 µl 25 mM dNTPs

0,3 µl je Primer (100 pmol/µl)

in 50 µl Phusion PCR-Puffer (New England Biolabs)

98°C/30 sec – [98°C/10 sec – 65°C/30 sec – 72°C/1 min] x 30 – 72°C/5 min

#### **4.6.2 PCR-Generierung von Gen-Deletionskonstrukten für *U. maydis* (Kämper, 2004)**

Mit dieser Methode können gezielt offene Leserahmen von Genen mit bekannter Sequenz in *U. maydis* deletiert werden. Man bedient sich dabei des Mechanismus der homologen Rekombination über die angrenzenden genomischen Flanken. Eine Klonierung der Fragmente ist dabei nicht notwendig. Prinzipiell erfolgt eine PCR-Amplifikation des 5'- und 3'-gelegenen Bereichs des zu deletierenden Gens. Die Fragmente sollen dabei etwa eine Länge von 1 kb besitzen. Über geeignete PCR-Primer werden an dem offenen Leseraster zugewandten Enden der Amplifikate *Sfi*I-Restriktionsschnittstellen eingebracht. Nach Restriktion der PCR-Produkte wird über die asymmetrischen *Sfi*I-Restriktionsschnittstellen eine *Sfi*I-geschnittene Hygromycin-Resistenzkassette aus dem Vektor pBS-hhn direkt zwischen die amplifizierten Flanken ligiert. Mit einer weiteren PCR mit entsprechenden nested-Primern für die Flanken wird das komplette Deletionskonstrukt amplifiziert, aufgereinigt und für die Transformation von *U. maydis* verwendet.

##### PCR-Amplifikation der Flanken

Amplifikation der linken Flanke (left border (lb)): Ein Außenprimer lb1 und ein Innenprimer lb2 mit *Sfi*I-Restriktionsschnittstelle wurden zusammen mit genomischer DNA von *U. maydis* als Matrize einer PCR unterzogen. Die Produkte wurden auf einem Agarosegel überprüft und das gewünschte DNA-Fragment, d.h. die linke (3'-) genomische Flanke des zu deletierenden Gens wurde aus dem Gel extrahiert. Durch die Wahl der Primer sollte ihre Länge 1 kb nicht über- oder unterschreiten.

Amplifikation der rechten Flanke (right border (rb)): Ein Außenprimer rb1 und ein Innenprimer rb2 mit *Sfi*I-Restriktionsschnittstelle wurden zusammen mit genomischer DNA von *U. maydis* als Matrize einer PCR unterzogen. Die Produkte wurden auf einem Agarosegel überprüft und das gewünschte DNA-Fragment, d.h. die rechte (5'-) genomische Flanke des zu deletierenden Gens wurde aus dem Gel extrahiert. Durch die Wahl der Primer sollte auch ihre Länge 1 kb nicht über- oder unterschreiten. Für die PCR wurden Standardbedingungen

gewählt, die sich aus den Parametern der Primer ergaben. Die aus dem Gel eluierten Flanken wurden anschließend gefällt und mit *Sfi*I nachgeschnitten (30 U, 3 h, 50°C, Gesamtvolumen 50 µl).

Ligation des Gen-Deletionskonstrukts: 1 µg left border-DNA, 1 µg right border-DNA, 10 µg Hygromycin-Resistenzkassette (Länge: 1884 bp) (oder die entsprechende Menge einer anderen Kassette) wurden in 25 µl Gesamtvolumen bei 16°C über Nacht mit 2,5 U T4 DNA-Ligase und entsprechendem Ligasepuffer ligiert.

PCR mit nested-Primern zur Amplifikation des Deletionskonstrukts: Vor der PCR wurde der Ligationsansatz komplett gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die erwartete Ligationsbande, bestehend aus lb-Flanke, Hygromycin-Resistenzkassette und rb-Flanke hat eine Größe von etwa 4 kb und wurde aus dem Gel eluiert. Für die Standard-Amplifikation des Deletionskonstrukts wurden 1-5 µl der aufgereinigten Ligationsbande und die nested-Primer verwendet. Dieser PCR-Ansatz wurde gelelektrophoretisch aufgereinigt und einer NaAc/Ethanol-Fällung unterzogen. Von der amplifizierten DNA des Deletionskonstrukts wurden 3-5 µg für die Transformationen von *U. maydis* verwendet.

### 4.6.3 Real Time PCR (qRT-PCR) Analysen

#### DNaseI-Behandlung und Reverse Transkription

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 DNA-free™ Kit). Die reverse Transkription wurde mit Hilfe des RevertAid™ First Strand cDNA Synthese Kit (Fermentas/Thermo) 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 (s.o.) eingesetzt. Die Analyse erfolgte auf einem Bio-Rad CFX96 unter der Verwendung des folgenden Programms:

Initiale Denaturierung:	95°C für 7 min
Amplifikation (45 Zyklen):	30 sec bei 95°C
	20 sec bei 60°C
	40 sec bei 72°C

Im Anschluss an den Lauf wurde die Spezifität der Amplifikation anhand einer Schmelzkurve am BioRad CFX96 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.

## 5 Literaturverzeichnis

**ADAMS, A. E., BOTSTEIN, D., UND DRUBIN, D. G.** (1989). A yeast actin-binding protein is encoded by SAC6, a gene found by suppression of an actin mutation. *Science* **243**, 231-233.

**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.

**AMBROSIO, D. L., BADJATIA, N., UND GUNZL, A.** (2014). The spliceosomal PRP19 complex of trypanosomes. *Mol Microbiol.*

**ANTON, F., DITTMAR, G., LANGER, T., UND ESCOBAR-HENRIQUES, M.** (2013). Two deubiquitylases act on mitofusin and regulate mitochondrial fusion along independent pathways. *Mol Cell* **49**, 487-498.

**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., 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.

**BAR-NUN, S., UND GLICKMAN, M. H.** (2012). Proteasomal AAA-ATPases: structure and function. *Biochim Biophys Acta* **1823**, 67-82.

**BAUMANN, S., POHLMANN, T., JUNGBLUTH, M., BRACHMANN, A., UND FELDBRUGGE, M.** (2012a). Kinesin-3 and dynein mediate microtubule-dependent co-transport of mRNPs and endosomes. *J Cell Sci* **125**, 2740-2752.

**BAUMANN, S., POHLMANN, T., JUNGBLUTH, M., BRACHMANN, A., UND FELDBRÜGGE, M.** (2012b). Kinesin-3 and dynein mediate microtubule-dependent co-transport of mRNPs and endosomes. *Journal of cell science.*

- BECHINGER, C., GIEBEL, K. F., SCHNELL, M., LEIDERER, P., DEISING, H. B., UND BASTMEYER, M.** (1999). Optical measurements of invasive forces exerted by appressoria of a plant pathogenic fungus. *Science* **285**, 1896-1899.
- 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. *J Biol Chem* **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.
- BERNSTEIN, H. S., UND COUGHLIN, S. R.** (1998a). A mammalian homolog of fission yeast Cdc5 regulates G2 progression and mitotic entry. *J Biol Chem* **273**, 4666-4671.
- BERNSTEIN, H. S., UND COUGHLIN, S. R.** (1998b). A mammalian homolog of fission yeast Cdc5 regulates G2 progression and mitotic entry. *The Journal of biological chemistry* **273**, 4666-4671.
- BESCHE, H. C., PETH, A., UND GOLDBERG, A. L.** (2009). Getting to first base in proteasome assembly. *Cell* **138**, 25-28.
- 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.
- BÖLKER, M.** (2001). *Ustilago maydis*--a valuable model system for the study of fungal dimorphism and virulence. *Microbiology* **147**, 1395-1401.
- BÖLKER, M., BÖHNERT, H. U., BRAUN, K. H., GÖRL, J., UND KAHMANN, R.** (1995a). Tagging pathogenicity genes in *Ustilago maydis* by restriction enzyme-mediated integration (REMI). *Mol Gen Genet* **248**, 547-552.
- BÖLKER, M., GENIN, S., LEHMLER, C., UND KAHMANN, R.** (1995b). 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* *a*2 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.
- 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., 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.

- BREFELD, O.** (1875). Untersuchungen aus dem Gesamtgebiete der Mykologie: die Brandpilze II. . In (Fortsetzung des V. Heftes) : die Brandkrankheiten des Getreides.
- BREFORT, T., DOEHLEMANN, G., MENDOZA-MENDOZA, A., REISSMANN, S., DJAMEI, A., UND KAHMANN, R.** (2009). *Ustilago maydis* as a Pathogen. *Annu Rev Phytopathol* **47**, 423-445.
- 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. *Curr Biol* **12**, 1541-1545.
- 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.
- CARROLL, C. W., ALTMAN, R., SCHIELTZ, D., YATES, J. R., UND KELLOGG, D.** (1998). The septins are required for the mitosis-specific activation of the Gin4 kinase. *J Cell Biol* **143**, 709-717.
- CASSELTON, L. A.** (2002). Mate recognition in fungi. *Heredity* **88**, 142-147.
- CASSELTON, L. A., UND OLESNICKY, N. S.** (1998). Molecular genetics of mating recognition in basidiomycete fungi. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**, 55-70.
- 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 Dev* **25**, 1147-1158.
- CHANARAT, S., UND STRASSER, K.** (2013). Splicing and beyond: the many faces of the Prp19 complex. *Biochim Biophys Acta* **1833**, 2126-2134.
- CHANG, Y. F., IMAM, J. S., UND WILKINSON, M. F.** (2007). The nonsense-mediated decay RNA surveillance pathway. *Annu Rev Biochem* **76**, 51-74.
- 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, H. R., JAN, S. P., TSAO, T. Y., SHEU, Y. J., BANROQUES, J., UND CHENG, S. C.** (1998a). 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. *Mol Cell Biol* **18**, 2196-2204.
- CHEN, H. R., JAN, S. P., TSAO, T. Y., SHEU, Y. J., BANROQUES, J., UND CHENG, S. C.** (1998b). 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. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 5406-5411.

**CHEN, L., UND MADURA, K.** (2014). Degradation of specific nuclear proteins occurs in the cytoplasm in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **197**, 193-197.

**CHEN, L., ROMERO, L., CHUANG, S. M., TOURNIER, V., JOSHI, K. K., LEE, J. A., KOVVALI, G., UND MADURA, K.** (2011). Sts1 plays a key role in targeting proteasomes to the nucleus. *J Biol Chem* **286**, 3104-3118.

**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**.

**CID, V. J., ADAMIKOVA, L., CENAMOR, R., MOLINA, M., SANCHEZ, M., UND NOMBELA, C.** (1998). Cell integrity and morphogenesis in a budding yeast septin mutant. *Microbiology* **144** ( Pt 12), 3463-3474.

**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.

**COLLIER, S. E., VOEHLER, M., PENG, D., OHI, R., GOULD, K. L., REITER, N. J., UND OHI, M. D.** (2014). Structural and functional insights into the N-terminus of *Schizosaccharomyces pombe* Cdc5. *Biochemistry* **53**, 6439-6451.

**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.

**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*. *Mol Gen Genet* **217**, 419-426.

**DE HARO, L. P., WRAY, J., WILLIAMSON, E. A., DURANT, S. T., CORWIN, L., GENTRY, A. C., OSHEROFF, N., LEE, S. H., HROMAS, R., UND NICKOLOFF, J. A.** (2010). Metnase promotes restart and repair of stalled and collapsed replication forks. *Nucleic Acids Res* **38**, 5681-5691.

**DE WIND, N., DEKKER, M., BERNIS, A., RADMAN, M., UND TE RIELE, H.** (1995). Inactivation of the mouse Msh2 gene results in mismatch repair deficiency, methylation tolerance, hyperrecombination, and predisposition to cancer. *Cell* **82**, 321-330.

**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.

**DEBLER, E. W., HSIA, K. C., NAGY, V., SEO, H. S., UND HOELZ, A.** (2010). Characterization of the membrane-coating Nup84 complex: paradigm for the nuclear pore complex structure. *Nucleus* **1**, 150-157.

- DELLAGO, H., LOSCHER, M., AJUH, P., RYDER, U., KAISERMAYER, C., GRILLARI-VOGLAUER, R., FORTSCHEGGER, K., GROSS, S., GSTRALTHALER, 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.
- DEVOS, D., DOKUDOVSKAYA, S., ALBER, F., WILLIAMS, R., CHAIT, B. T., SALI, A., UND ROUT, M. P. (2004). Components of coated vesicles and nuclear pore complexes share a common molecular architecture. *PLoS Biol* **2**, e380.
- DOEBLEY, J. (1992). Mapping the genes that made maize. *Trends in genetics : TIG* **8**, 302-307.
- DOEHLEMANN, G., WAHL, R., VRANES, M., DE VRIES, R. P., KÄMPER, J., UND KAHMANN, R. (2008). Establishment of compatibility in the *Ustilago maydis*/maize pathosystem. *J Plant Physiol* **165**, 29-40.
- DUNCAN, K., UMEN, J. G., UND GUTHRIE, C. (2000). A putative ubiquitin ligase required for efficient mRNA export differentially affects hnRNP transport. *Curr Biol* **10**, 687-696.
- ENENKEL, C. (2014). Nuclear transport of yeast proteasomes. *Biomolecules* **4**, 940-955.
- 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. *Mol 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 *Iga2* and *rga2* direct uniparental mitochondrial DNA (mtDNA) inheritance and constrain mtDNA recombination during sexual development of *Ustilago maydis*. *Genetics* **181**, 847-860.
- 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.
- FOUSTERI, M., VERMEULEN, W., VAN ZEELAND, A. A., UND MULLENDERS, L. H. (2006). Cockayne syndrome A and B proteins differentially regulate recruitment of chromatin remodeling and repair factors to stalled RNA polymerase II in vivo. *Mol Cell* **23**, 471-482.
- 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.
- GALLAGHER, P. S., OESER, M. L., ABRAHAM, A. C., KAGANOVICH, D., UND GARDNER, R. G. (2014). Cellular maintenance of nuclear protein homeostasis. *Cell Mol Life Sci* **71**, 1865-1879.
- 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.
- GARIC, D., HUMBERT, L., FILS-AIME, N., KORAH, J., ZARFABIAN, Y., LEBRUN, J. J., UND ALI, S. (2013). Development of buffers for fast semidry transfer of proteins. *Anal Biochem* **441**, 182-184.

- GENG, J., NAIR, U., YASUMURA-YORIMITSU, K., UND KLIONSKY, D. J.** (2010). Post-Golgi Sec proteins are required for autophagy in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **21**, 2257-2269.
- 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.
- 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.
- GOOS, S.** (2007) Funktionelle Analyse von Hdp2, einem neuen Pathogenitätsfaktor in *Ustilago maydis*, Philipps-Universität, Marburg.
- 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., DUSTERHOFT, A., HENRIQUES, J. A., UND BRENDDEL, M.** (1996). Allelism of PSO4 and PRP19 links pre-mRNA processing with recombination and error-prone DNA repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* **24**, 4009-4014.
- 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. *Mol Cell Biol* **30**, 2105-2119.
- GUO, W., ROTH, D., WALCH-SOLIMENA, C., UND NOVICK, P.** (1999). The exocyst is an effector for Sec4p, targeting secretory vesicles to sites of exocytosis. *EMBO J* **18**, 1071-1080.
- GUTERMAN, A., UND GLICKMAN, M. H.** (2004). Complementary roles for Rpn11 and Ubp6 in deubiquitination and proteolysis by the proteasome. *J Biol Chem* **279**, 1729-1738.
- HARRIS, S. D.** (2006). Cell polarity in filamentous fungi: shaping the mold. *International review of cytology* **251**, 41-77.
- HE, W., UND PARKER, R.** (2000). Functions of Lsm proteins in mRNA degradation and splicing. *Curr Opin Cell Biol* **12**, 346-350.
- 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*. *Mutat Res* **218**, 111-124.

- 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.
- HODGES, J. L., LESLIE, J. H., MOSAMMAPARAST, N., GUO, Y., SHABANOWITZ, J., HUNT, D. F., UND PEMBERTON, L. F.** (2005). Nuclear import of TFIIB is mediated by Kap114p, a karyopherin with multiple cargo-binding domains. *Mol Biol Cell* **16**, 3200-3210.
- HOEGE, C., PFANDER, B., MOLDOVAN, G. L., PYROWOLAKIS, G., UND JENTSCH, S.** (2002). RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. *Nature* **419**, 135-141.
- HOELZ, A., DEBLER, E. W., UND BLOBEL, G.** (2011). The structure of the nuclear pore complex. *Annu Rev Biochem* **80**, 613-643.
- 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.
- HOFMANN, J. C., TEGHA-DUNGHU, J., DRAGER, S., WILL, C. L., LUHRMANN, R., UND GRUSS, O. J.** (2013). The Prp19 complex directly functions in mitotic spindle assembly. *PLoS One* **8**, e74851.
- 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.
- HOLLIDAY, R.** (1961). The genetics of *Ustilago maydis*. *Genet Res Camb* **2**, 204-230.
- HOLLIDAY, R.** (1974). *Ustilago maydis*. In Handbook of Genetics, R. C. King, ed. (New York, USA, Plenum Press), pp. 575-595.
- 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.
- HOLTZMAN, D. A., YANG, S., UND DRUBIN, D. G.** (1993). Synthetic-lethal interactions identify two novel genes, SLA1 and SLA2, that control membrane cytoskeleton assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* **122**, 635-644.
- HONG, W.** (2005). SNAREs and traffic. *Biochim Biophys Acta* **1744**, 493-517.
- HUGLE, B., KLEINSCHMIDT, J. A., UND FRANKE, W. W.** (1983). The 22 S cylinder particles of *Xenopus laevis*. II. Immunological characterization and localization of their proteins in tissues and cultured cells. *Eur J Cell Biol* **32**, 157-163.
- 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.
- ISONO, E., NISHIHARA, K., SAEKI, Y., YASHIRODA, H., KAMATA, N., GE, L., UEDA, T., KIKUCHI, Y., TANAKA, K., NAKANO, A., UND TOH-E, A.** (2007). The assembly pathway of the 19S regulatory particle of the yeast 26S proteasome. *Mol Biol Cell* **18**, 569-580.
- 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.
- 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.

- JU, D., UND XIE, Y.** (2006). A synthetic defect in protein degradation caused by loss of Ufd4 and Rad23. *Biochem Biophys Res Commun* **341**, 648-652.
- KADOWAKI, T., CHEN, S., HITOMI, M., JACOBS, E., KUMAGAI, C., LIANG, S., SCHNEITER, R., SINGLETON, D., WISNIEWSKA, J., UND TARTAKOFF, A. M.** (1994a). Isolation and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* mRNA transport-defective (mtr) mutants. *J Cell Biol* **126**, 649-659.
- KADOWAKI, T., HITOMI, M., CHEN, S., UND TARTAKOFF, A. M.** (1994b). Nuclear mRNA accumulation causes nucleolar fragmentation in yeast mtr2 mutant. *Mol Biol Cell* **5**, 1253-1263.
- 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., STEINBERG, G., BASSE, C., UND KÄMPER, J.** (2000). *Ustilago maydis*, the causative agent of corn smut disease. In Fungal Pathology, J. W. Kronstad, ed. (Dodrecht, Kluwer Academic Publishers), pp. 347-371.
- KAMADA, T.** (2002). Molecular genetics of sexual development in the mushroom *Coprinus cinereus*. *Bioessays* **24**, 449-459.
- 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.
- KATAHIRA, J., UND YONEDA, Y.** (2009). Roles of the TREX complex in nuclear export of mRNA. *RNA Biol* **6**, 149-152.
- KELLNER, N.** (2009) Funktionelle Charakterisierung des Num1 Proteins aus *Ustilago maydis*, Philipps Universität, Marburg.
- KELLNER, N.** (2012). Das Num1-Protein in *Ustilago maydis*: Regulation intrazellulärer Transportvorgänge durch einen globalen Spleißing-Faktor.
- KELLNER, N., HEIMEL, K., OBHOF, T., FINKERNAGEL, F., UND KAMPER, J.** (2014). The SPF27 homologue Num1 connects splicing and kinesin 1-dependent cytoplasmic trafficking in *Ustilago maydis*. *PLoS Genet* **10**, e1004046.
- 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.
- KIM, D. H., UND KOEPP, D. M.** (2012). Hect E3 ubiquitin ligase Tom1 controls Dia2 degradation during the cell cycle. *Mol Biol Cell* **23**, 4203-4211.
- KIM, D. H., ZHANG, W., UND KOEPP, D. M.** (2012). The Hect domain E3 ligase Tom1 and the F-box protein Dia2 control Cdc6 degradation in G1 phase. *J Biol Chem* **287**, 44212-44220.

- 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.
- KLEINSCHMIDT, J. A., HUGLE, B., GRUND, C., UND FRANKE, W. W.** (1983). The 22 S cylinder particles of *Xenopus laevis*. I. Biochemical and electron microscopic characterization. *Eur J Cell Biol* **32**, 143-156.
- KOJIC, M., UND HOLLOMAN, W. K.** (2000). Shuttle vectors for genetic manipulations in *Ustilago maydis*. *Can J Microbiol* **46**, 333-338.
- 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*. *Mol Cell* **10**, 683-691.
- KOJIC, M., MAO, N., ZHOU, Q., LISBY, M., UND HOLLOMAN, W. K.** (2008). Compensatory role for Rad52 during recombinational repair in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol* **67**, 1156-1168.
- KONIG, J., BAUMANN, S., KOEPKE, J., POHLMANN, T., ZARNACK, K., UND FELDBRUGGE, M.** (2009). The fungal RNA-binding protein Rrm4 mediates long-distance transport of ubi1 and rho3 mRNAs. *EMBO J* **28**, 1855-1866.
- KOSOVA, B., PANTE, N., ROLLENHAGEN, C., UND HURT, E.** (1999). Nup192p is a conserved nucleoporin with a preferential location at the inner site of the nuclear membrane. *J Biol Chem* **274**, 22646-22651.
- KOU, H., ZHOU, Y., GOROSPE, R. M., UND WANG, Z.** (2008). Mms19 protein functions in nucleotide excision repair by sustaining an adequate cellular concentration of the TFIIH component Rad3. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 15714-15719.
- KRONSTAD, J. W., UND LEONG, S. A.** (1990). The *b* mating-type locus of *Ustilago maydis* contains variable and constant regions. *Genes Dev* **4**, 1384-1395.
- 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.
- KURAOKA, I., ITO, S., WADA, T., HAYASHIDA, M., LEE, L., SAIJO, M., NAKATSU, Y., MATSUMOTO, M., MATSUNAGA, T., HANDA, H., et al.** (2008). Isolation of XAB2 complex involved in pre-mRNA splicing, transcription, and transcription-coupled repair. *J Biol Chem* **283**, 940-950.
- LAEMMLI, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- LAPORTE, D., SALIN, B., DAIGNAN-FORNIER, B., UND SAGOT, I.** (2008). Reversible cytoplasmic localization of the proteasome in quiescent yeast cells. *J Cell Biol* **181**, 737-745.
- LEE, D. C., UND AITCHISON, J. D.** (1999). Kap104p-mediated nuclear import. Nuclear localization signals in mRNA-binding proteins and the role of Ran and Rna. *J Biol Chem* **274**, 29031-29037.
- LEE, S. H., OSHIGE, M., DURANT, S. T., RASILA, K. K., WILLIAMSON, E. A., RAMSEY, H., KWAN, L., NICKOLOFF, J. A., UND HROMAS, R.** (2005). The SET domain protein Metnase mediates

foreign DNA integration and links integration to nonhomologous end-joining repair. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 18075-18080.

**LEHMANN, A., JANEK, K., BRAUN, B., KLOETZEL, P. M., UND ENENKEL, C.** (2002). 20 S proteasomes are imported as precursor complexes into the nucleus of yeast. *J Mol Biol* **317**, 401-413.

**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.

**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.

**LORING, G. L., CHRISTENSEN, K. C., GERBER, S. A., UND BRENNER, C.** (2008). Yeast Chfr homologs retard cell cycle at G1 and G2/M via Ubc4 and Ubc13/Mms2-dependent ubiquitination. *Cell Cycle* **7**, 96-105.

**LOSCHER, 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. *Biochem J* **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.

**MACHESKY, L. M., UND GOULD, K. L.** (1999). The Arp2/3 complex: a multifunctional actin organizer. *Curr Opin Cell Biol* **11**, 117-121.

**MADDEN, K., UND SNYDER, M.** (1998). Cell polarity and morphogenesis in budding yeast. *Annu Rev Microbiol* **52**, 687-744.

**MAHLERT, M., VOGLER, C., STELTER, K., HAUSE, G., UND BASSE, C. W.** (2009). The a2 mating-type-locus gene Iga2 of *Ustilago maydis* interferes with mitochondrial dynamics and fusion, partially in dependence on a Dnm1-like fission component. *J Cell Sci* **122**, 2402-2412.

**MAKAROVA, O. V., MAKAROV, E. M., URLAUB, H., WILL, C. L., GENTZEL, M., WILM, M., UND LUHRMANN, R.** (2004). A subset of human 35S U5 proteins, including Prp19, function prior to catalytic step 1 of splicing. *EMBO J* **23**, 2381-2391.

**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.

**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.

**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.

- MEINEL, D. M., BURKERT-KAUTZSCH, C., KIESER, A., O'DUIBHIR, E., SIEBERT, M., MAYER, A., CRAMER, P., SODING, J., HOLSTEGE, F. C., UND STRASSER, K. (2013). Recruitment of TREX to the transcription machinery by its direct binding to the phospho-CTD of RNA polymerase II. *PLoS Genet* **9**, e1003914.
- MELLON, I., RAJPAL, D. K., KOI, M., BOLAND, C. R., UND CHAMPE, G. N. (1996). Transcription-coupled repair deficiency and mutations in human mismatch repair genes. *Science* **272**, 557-560.
- MOREHOUSE, H., BURATOWSKI, R. M., SILVER, P. A., UND BURATOWSKI, S. (1999). The importin/karyopherin Kap114 mediates the nuclear import of TATA-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 12542-12547.
- MORROW, C. A., UND FRASER, J. A. (2009). Sexual reproduction and dimorphism in the pathogenic basidiomycetes. *FEMS Yeast Res* **9**, 161-177.
- MOSAMMAPARAST, N., EWART, C. S., UND PEMBERTON, L. F. (2002). A role for nucleosome assembly protein 1 in the nuclear transport of histones H2A and H2B. *EMBO J* **21**, 6527-6538.
- MU, R., WANG, Y. B., WU, M., YANG, Y., SONG, W., LI, T., ZHANG, W. N., TAN, B., LI, A. L., WANG, N., *et al.* (2014). Depletion of pre-mRNA splicing factor Cdc5L inhibits mitotic progression and triggers mitotic catastrophe. *Cell Death Dis* **5**, e1151.
- 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.
- MURATA, S., YASHIRODA, H., UND TANAKA, K. (2009). Molecular mechanisms of proteasome assembly. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**, 104-115.
- 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.
- NAKATSU, Y., ASAHINA, H., CITTERIO, E., RADEMAKERS, S., VERMEULEN, W., KAMIUCHI, S., YEO, J. P., KHAW, M. C., SAJO, M., KODO, N., *et al.* (2000). XAB2, a novel tetratricopeptide repeat protein involved in transcription-coupled DNA repair and transcription. *J Biol Chem* **275**, 34931-34937.
- NAKAYAMA, Y., GOEBL, M., O'BRINE GRECO, B., LEMMON, S., PINGCHANG CHOW, E., UND KIRCHHAUSEN, T. (1991). The medium chains of the mammalian clathrin-associated proteins have a homolog in yeast. *Eur J Biochem* **202**, 569-574.
- 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.
- NATALIZIO, B. J., UND WENTE, S. R. (2013). Postage for the messenger: designating routes for nuclear mRNA export. *Trends Cell Biol* **23**, 365-373.
- 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.

- NOVICK, P., MEDKOVA, M., DONG, G., HUTAGALUNG, A., REINISCH, K., UND GROSSHANS, B.** (2006). Interactions between Rabs, tethers, SNAREs and their regulators in exocytosis. *Biochem Soc Trans* **34**, 683-686.
- 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., 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. *Mol Cell Biol* **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.** (1994a). The *Schizosaccharomyces pombe* cdc5+ gene encodes an essential protein with homology to c-Myb. *EMBO J* **13**, 471-483.
- OHI, R., MCCOLLUM, D., HIRANI, B., DEN HAESE, G. J., ZHANG, X., BURKE, J. D., TURNER, K., UND GOULD, K. L.** (1994b). The *Schizosaccharomyces pombe* cdc5+ gene encodes an essential protein with homology to c-Myb. *The EMBO journal* **13**, 471-483.
- PALAZZO, A. F., SPRINGER, M., SHIBATA, Y., LEE, C. S., DIAS, A. P., UND RAPOPORT, T. A.** (2007). The signal sequence coding region promotes nuclear export of mRNA. *PLoS Biol* **5**, e322.
- PITSIKAS, P., LEE, D., UND RAINBOW, A. J.** (2007). Reduced host cell reactivation of oxidative DNA damage in human cells deficient in the mismatch repair gene hMSH2. *Mutagenesis* **22**, 235-243.
- PRUYNE, D., UND BRETSCHER, A.** (2000). Polarization of cell growth in yeast. *J Cell Sci* **113** (Pt 4), 571-585.
- 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.
- 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.
- RAPOPORT, T. A.** (1992). Transport of proteins across the endoplasmic reticulum membrane. *Science* **258**, 931-936.
- REN, L., MCLEAN, J. R., HAZBUN, T. R., FIELDS, S., VANDER KOOI, 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.
- RILEY, T., SONTAG, E., CHEN, P., UND LEVINE, A.** (2008). Transcriptional control of human p53-regulated genes. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 402-412.

- 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.
- 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.
- ROUT, M. P., AITCHISON, J. D., SUPRAPTO, A., HJERTAAS, K., ZHAO, Y., UND CHAIT, B. T.** (2000). The yeast nuclear pore complex: composition, architecture, and transport mechanism. *J Cell Biol* **148**, 635-651.
- 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.
- SAKATA, E., STENGEL, F., FUKUNAGA, K., ZHOU, M., SAEKI, Y., FORSTER, F., BAUMEISTER, W., TANAKA, K., UND ROBINSON, C. V.** (2011). The catalytic activity of Ubp6 enhances maturation of the proteasomal regulatory particle. *Mol Cell* **42**, 637-649.
- SAMBROOK, J., FRISCH, E. F., UND MANIATIS, T.** (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbour, New York, Cold Spring Harbour Laboratory Press).
- SAVULESCU, A. F., ROTEM, A., UND HAREL, A.** (2011). Proteasomes crossing the nuclear border. *Nucleus* **2**, 258-263.
- 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.
- SCHIRAWSKI, J., BÖHNERT, H. U., STEINBERG, G., SNETSELAAR, K., ADAMIKOWA, L., UND KAHMANN, R.** (2005a). Endoplasmic reticulum glucosidase II is required for pathogenicity of *Ustilago maydis*. *Plant Cell* **17**, 3532-3543.
- SCHIRAWSKI, J., HEINZE, B., WAGENKNECHT, M., UND KAHMANN, R.** (2005b). Mating type loci of *Sporisorium reilianum*: novel pattern with three a and multiple b specificities. *Eukaryot Cell* **4**, 1317-1327.
- 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.
- 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., FINK, G., COLLEMARE, J., ROGER, Y., UND STEINBERG, G.** (2011a). 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.** (2011b). 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.

**SEEDORF, M., UND SILVER, P. A.** (1997). Importin/karyopherin protein family members required for mRNA export from the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 8590-8595.

**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.

**SGARLATA, C., UND PEREZ-MARTIN, J.** (2005). The cdc25 phosphatase is essential for the G2/M phase transition in the basidiomycete yeast *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol* **58**, 1482-1496.

**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. *Biochem Biophys Res Commun* **356**, 175-180.

**SINGH, R. K., KABBAJ, M. H., PAIK, J., UND GUNJAN, A.** (2009). Histone levels are regulated by phosphorylation and ubiquitylation-dependent proteolysis. *Nat Cell Biol* **11**, 925-933.

**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.

**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.

**STAPLES, R. C.** (1985). The development of infection structures by the rusts and other fungi. *Microbiol Sci* **2**, 193-194, 197-198.

**STEHLING, O., VASHISHT, A. A., MASCARENHAS, J., JONSSON, Z. O., SHARMA, T., NETZ, D. J., PIERIK, A. J., WOHLSCHLEGEL, J. A., UND LILL, R.** (2012). MMS19 assembles iron-sulfur proteins required for DNA metabolism and genomic integrity. *Science* **337**, 195-199.

**STEINBERG, G.** (2007). Hyphal growth: a tale of motors, lipids, and the Spitzenkörper. *Eukaryotic cell* **6**, 351-360.

**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.

**STEINBERG, G., SCHUSTER, M., THEISEN, U., KILARU, S., FORGE, A., UND MARTIN-URDIROZ, M.** (2012). Motor-driven motility of fungal nuclear pores organizes chromosomes and fosters nucleocytoplasmic transport. *J Cell Biol* **198**, 343-355.

- STEPP, J. D., PELLICENA-PALLE, A., HAMILTON, S., KIRCHHAUSEN, T., UND LEMMON, S. K.** (1995). A late Golgi sorting function for *Saccharomyces cerevisiae* Apm1p, but not for Apm2p, a second yeast clathrin AP medium chain-related protein. *Mol Biol Cell* **6**, 41-58.
- 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.
- SUWAKI, N., KLARE, K., UND TARSOUNAS, M.** (2011). RAD51 paralogs: roles in DNA damage signalling, recombinational repair and tumorigenesis. *Semin Cell Dev Biol* **22**, 898-905.
- SZUL, T., UND SZTUL, E.** (2011). COPII and COPI traffic at the ER-Golgi interface. *Physiology (Bethesda)* **26**, 348-364.
- TKACH, J. M., YIMIT, A., LEE, A. Y., RIFFLE, M., COSTANZO, M., JASCHOB, D., HENDRY, J. A., OU, J., MOFFAT, J., BOONE, C., et al.** (2012). Dissecting DNA damage response pathways by analysing protein localization and abundance changes during DNA replication stress. *Nat Cell Biol* **14**, 966-976.
- TKACZ, I. D., GUPTA, S. K., VOLKOV, V., ROMANO, M., HAHAM, T., TULINSKI, P., LEBENTHAL, I., UND MICHAELI, S.** (2010). Analysis of spliceosomal proteins in Trypanosomatids reveals novel functions in mRNA processing. *J Biol Chem* **285**, 27982-27999.
- 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.
- TSUCHIYA, H., ARAI, N., TANAKA, K., UND SAEKI, Y.** (2013). Cytoplasmic proteasomes are not indispensable for cell growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun* **436**, 372-376.
- 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.
- UNGERMANN, C., NICHOLS, B. J., PELHAM, H. R., UND WICKNER, W.** (1998). A vacuolar v-t-SNARE complex, the predominant form in vivo and on isolated vacuoles, is disassembled and activated for docking and fusion. *J Cell Biol* **140**, 61-69.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- VON MIKECZ, A. (2006). The nuclear ubiquitin-proteasome system. *J Cell Sci* **119**, 1977-1984.
- WAHL, M. C., WILL, C. L., UND LUHRMANN, R. (2009). The spliceosome: design principles of a dynamic RNP machine. *Cell* **136**, 701-718.
- 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.
- 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.
- WENDLER, P., LEHMANN, A., JANEK, K., BAUMGART, S., UND ENENKEL, C. (2004). The bipartite nuclear localization sequence of Rpn2 is required for nuclear import of proteasomal base complexes via karyopherin alphabeta and proteasome functions. *J Biol Chem* **279**, 37751-37762.
- WILL, C. L., UND LUHRMANN, R. (2011). Spliceosome structure and function. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **3**.
- WINTER, D., PODTELEJNIKOV, A. V., MANN, M., UND LI, R. (1997). The complex containing actin-related proteins Arp2 and Arp3 is required for the motility and integrity of yeast actin patches. *Curr Biol* **7**, 519-529.
- WOLD, M. S. (1997). Replication protein A: a heterotrimeric, single-stranded DNA-binding protein required for eukaryotic DNA metabolism. *Annu Rev Biochem* **66**, 61-92.
- WYSOCKA, M., RYTKA, J., UND KURLANDZKA, A. (2004). *Saccharomyces cerevisiae* CSM1 gene encoding a protein influencing chromosome segregation in meiosis I interacts with elements of the DNA replication complex. *Exp Cell Res* **294**, 592-602.
- YANG, S., COPE, M. J., UND DRUBIN, D. G. (1999). Sla2p is associated with the yeast cortical actin cytoskeleton via redundant localization signals. *Mol Biol Cell* **10**, 2265-2283.
- ZARNACK, K., EICHHORN, H., KAHMANN, R., UND FELDBRUGGE, M. (2008). Pheromone-regulated target genes respond differentially to MAPK phosphorylation of transcription factor Prf1. *Mol Microbiol* **69**, 1041-1053.
- ZENKLUSEN, D., VINCIGUERRA, P., STRAHM, Y., UND STUTZ, F. (2001). The yeast hnRNP-Like proteins Yra1p and Yra2p participate in mRNA export through interaction with Mex67p. *Mol Cell Biol* **21**, 4219-4232.
- 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. *J Biol Chem* **280**, 40559-40567.

**ZHENG, N.** (2003). A closer look of the HECTic ubiquitin ligases. *Structure* **11**, 5-6.

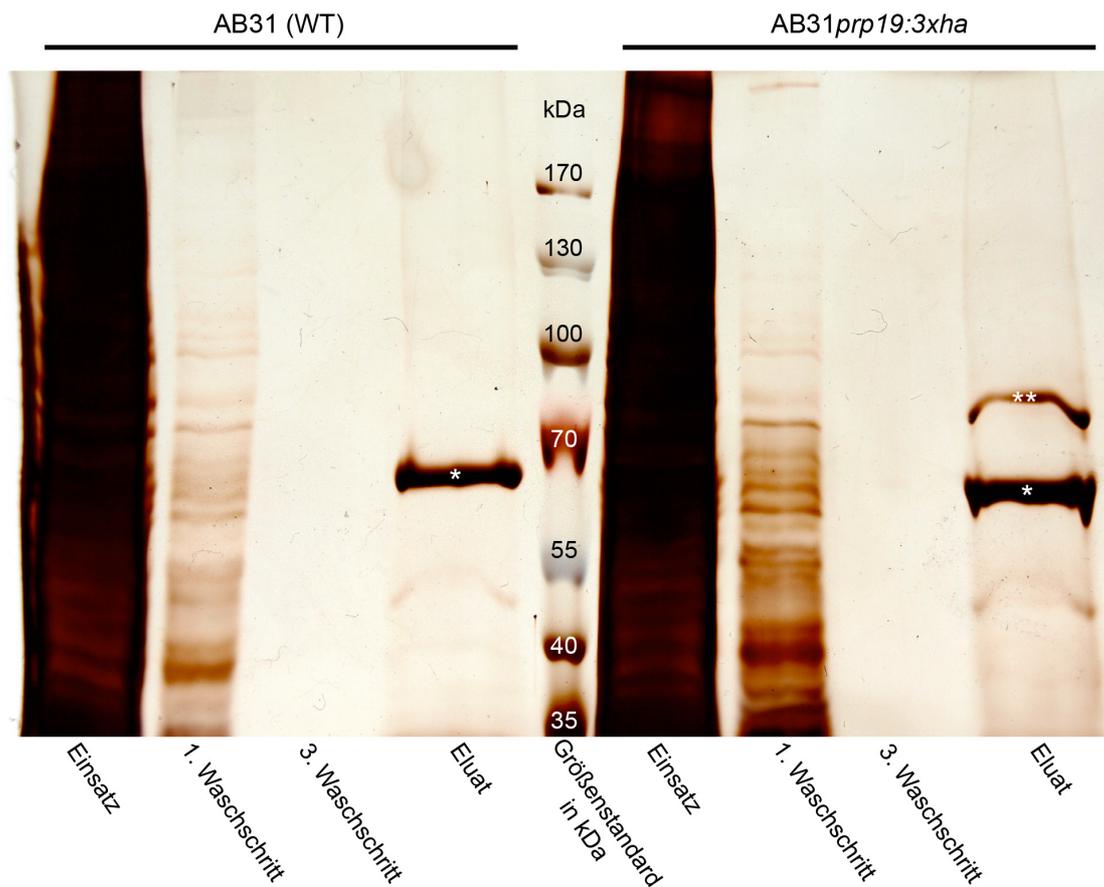
**ZHU, W., RAINVILLE, I. R., DING, M., BOLUS, M., HEINTZ, N. H., UND PEDERSON, D. S.** (2002). Evidence that the pre-mRNA splicing factor Clf1p plays a role in DNA replication in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **160**, 1319-1333.

**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.

## 6 Anhang

### 6.1 Etablierung der Immunpräzipitation von Proteinkomplexen

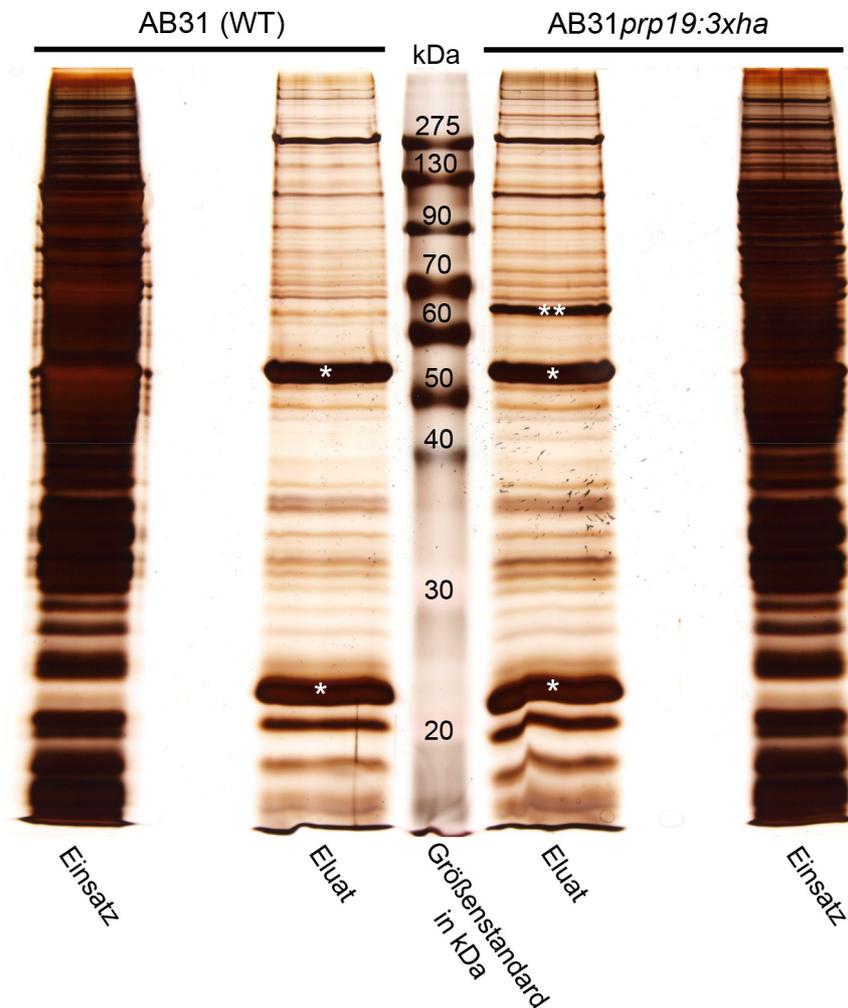
In *H. sapiens*, *S. cerevisiae* und *S. pombe* konnten viele Erkenntnisse über den NTC mittels Immunpräzipitation erlangt werden (Chanarat und Strasser, 2013; Fabrizio *et al.*, 2009; Kuraoka *et al.*, 2008; Makarova *et al.*, 2004). Um reproduzierbare Ergebnisse in der Immunpräzipitation zu erlangen, sollte zunächst die Methode etabliert werden. Die Immunpräzipitation von Proteinen bzw. Proteinkomplexen besitzt vielfältige Optimierungsansätze. Verwendete Probenmenge, verwendete Puffer, die Art des Zellaufschlusses, die Dauer der Inkubation, die Anzahl der Waschschriffe und die Elution der gebundenen Proteine sind kritische Schritte. In der vorliegenden Arbeit wurden, mit dem Hämagglutinin (HA)-Tag fusionierte Proteine mithilfe von Agarose-gekoppelten anti-HA Antikörpern präzipitiert. Dazu wurden die Gene *num1* und *prp19* in ihrem nativen (endogenen) Locus durch homologe Rekombination in dem Stamm AB31 bzw. AB31 $\Delta$ *num1* mit einem *3xha*-Tag fusioniert. Somit konnten die endogenen Expressionslevel der entstehenden Prp19:3xHA- und Num1:3xHA-Fusionsproteine erhalten bleiben. Die ersten Versuche wurden mit Prp19:3xHA durchgeführt. Dabei kamen zunächst nur die beiden Stämme AB31 (WT) und AB31*prp19:3xha* zum Einsatz. Es wurden 150 ml Kultur mit OD<sub>600</sub> von 0,8 bis 1 geerntet, in PBS aufgenommen und in einer Zelmühle aufgeschlossen. Das Proteinlysate wurde über Nacht mit der Agarose inkubiert und drei mal mit PBS gewaschen. Die Elution erfolgte durch Aufkochen der Probe in Proteinauftragspuffer (Laemmli). Die Proteine wurden in einem 8%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt und mit Silbernitrat angefärbt (4.5.4). Außer der prominenten Bande des Prp19:3xHA-Fusionsproteins, konnten keine zusätzlichen Banden in AB31*prp19:3xha* beobachtet werden (Abbildung 33). Da der erste Waschschriff bei AB31*prp19:3xha* erheblich mehr Protein enthält, könnten spezifische Proteine bereits durch diesem verloren gegangen sein. Es fällt auf, dass das voraussichtliche Prp19:3xHA (ungefähr 62 kDa) und die schwere Kette des Antikörpers (ungefähr 44 kDa) weit über ihrer vorhergesagten Masse (in kDa) laufen. Dies lässt sich auf eine falsche Gelzusammensetzung, unvollständige Gelpolymerisierung oder abweichende Probenpuffer für Marker und übrige Proben zurückführen.



**Abbildung 33: Silbernitrat-Färbung eines 8%igen Polyacrylamidgels.** Geladen wurden verschiedene Schritte der Immunpräzipitation der Stämme AB31 (links) und AB31*prp19:3xha* (rechts). Die Präzipitation erfolgte mithilfe von anti-HA Antikörpern, welche an Agarose gekoppelt sind (Anti-HA Agarose / Sigma). Die Stämme AB31 (WT) und AB31*prp19:3xha* wurden in 150 ml CM<sub>GLK</sub>-Komplettmedium bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,8 bis 1 inkubiert. Als Zellaufschlusspuffer wurde zunächst PBS verwendet und der Zellaufschluss wurde in den gefrorenen Edelstahlbehältern einer Zelmühle durchgeführt. Nach der Zentrifugierung wurde das Proteinlysate UN mit der Agarose inkubiert und anschließend drei mal mit PBS gewaschen. Die Elution erfolgte durch das Aufkochen der Probe in zwei-fach Proteinauftragspuffer (Laemmli). Die Proteine wurden in einem 8%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt und mit Silbernitrat angefärbt. Die jeweilige linke Spur zeigt 20 µl des eingesetzten Protein-Rohlysats (Einsatz). Das Rohlysate wurde unverdünnt aufgetragen, was zu einer Überfärbung der Spur durch die große Menge an Gesamtprotein führte. Die jeweilige zweite Spur zeigt 20 µl des ersten Waschschriffs nach der Inkubation mit anti-HA Agarose (Sigma). Die jeweilige dritte Spur zeigt 20 µl des finalen dritten Waschschriffs. Die jeweilige vierte (rechte) Spur zeigt 20 µl der, in Probenpuffer aufgekochten anti-HA Agarose. Beim Eluieren der Proteine durch Aufkochen der anti-HA Agarose werden die anti-HA Antikörper in Lösung gebracht und denaturiert, wodurch diese bei der Silbernitratfärbung ebenfalls angefärbt wurden. Als Auftragspuffer kam Standard-Laemmli-Puffer zum Einsatz. Als Protein-Größenstandard wurden 10 µl PageRuler Prestained Protein Ladder (Fermentas) verwendet. \* zeigt die schwere Kette des anti-HA Antikörpers (ungefähr 55 kDa) an. \*\* zeigt voraussichtlich Prp19:3xHA (ungefähr 62 kDa) an.

Durch das mehrmalige Wiederholen des Experiments, die Erhöhung der eingesetzten Zellmenge auf 300 ml (OD<sub>600</sub> 0,8 bis 1) und die Optimierung des Färbe-Protokolls konnte die Proteinausbeute erhöht und die Auflösung der Proteinbanden verbessert werden. Zur vollständigeren Auftrennung der Proteine kam ein 10%iges Polyacrylamidgel zum Einsatz. Im Folgenden wurden lediglich das Protein-Rohlysate und die, durch Aufkochen eluierten Proteine auf das Gel geladen. Die 1/50 Verdünnung des Rohlysats führte auch hier erneut zu einer Überfärbung des Gels, ließ jedoch die Identifikation von einzelnen Proteinbanden zu. Sowohl im AB31- also auch im AB31*prp19:3xha*-Eluat konnte nun eine Vielzahl an

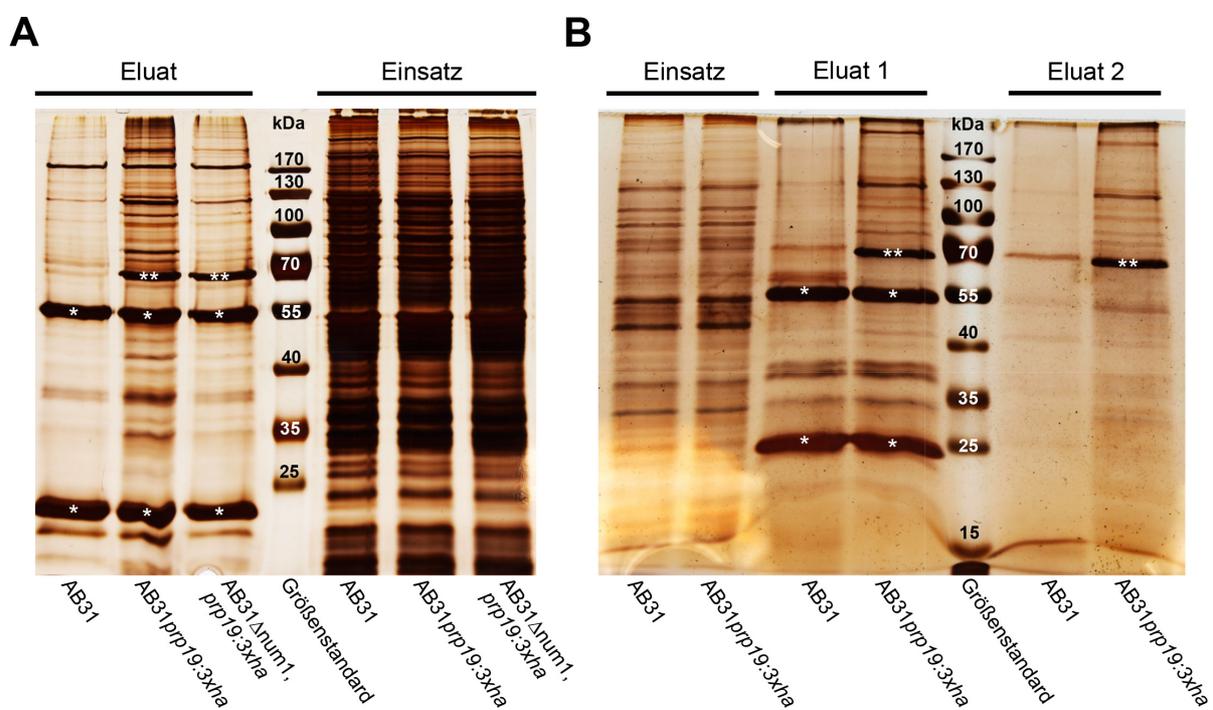
zusätzlichen Banden erkannt werden. Doch waren nur marginale Unterschiede im Bandenmuster zwischen beiden Stämmen zu beobachten (Abbildung 34).



**Abbildung 34: Silbernitrat-Färbung eines 10%igen Polyacrylamidgels.** Geladen wurden Protein-Rohlysate (Einsatz) und Eluat der Immunpräzipitation (mit anti-HA Agarose (Sigma)) der Stämme AB31 (links) und AB31*prp19:3xha* (rechts). Die jeweilige äußere Spur zeigt 20 µl des eingesetzten Protein-Rohlysats (Einsatz) in einer 1/50 Verdünnung. Die jeweilige innere Spur zeigt 20 µl der, in Probenpuffer aufgekochten Anti-HA Agarose. Als Auftragspuffer kam Standard-Laemmli-Puffer zum Einsatz. Als Protein-Größenstandard wurden 10 µl Pink Prestained Protein Marker (NIPON Genetics) verwendet. \* zeigt die schwere und die leichte Kette des anti-HA Antikörpers (ungefähr 55 bzw. 25 kDa) an. \*\* zeigt voraussichtlich Prp19:3xHA (ungefähr 62 kDa) an.

Um die Spezifität der Immunpräzipitation zu erhöhen wurde die Inkubation von anti-HA Agarose mit dem Proteinextrakt von ÜN auf drei Stunden verkürzt. Zusätzlich wurden alle Zentrifugierschritte nach der Inkubation auf 2 000 U<sub>pm</sub> begrenzt. Dadurch sollte die Bindung von unspezifischen Proteinen an den Antikörper vermindert werden. Zum gleichen Zweck wurden die Waschschrte von drei auf fünf erhöht und der verwendete Extraktions- und Waschpuffer von PBS auf IP Puffer (nach Pierce) umgestellt. Dieser sollte spezifische Interaktionen/Bindungen begünstigen und unspezifische erschweren. Die bisherige Elution durch Aufkochen führte zur Lösung aller gebundenen Proteine, ob diese spezifisch vom

Antikörper gebunden wurden oder nicht. Um die prominenten Antikörperbanden und die unspezifischen, z.B. an die Agarose gebundenen Proteine zu entfernen, erfolgte die Elution nun mit dem HA-Peptid (Sigma). Dieses acht AS lange Peptid aus der Sequenz des Hämagglutinin Protein des humanen Influenza Virus konkurriert mit dem Tag des Fusionsproteins um die Antigen-Bindungs-Region des anti-HA Antikörpers. Wird das Peptid in ausreichender Menge eingesetzt, so bewirkt es eine Ablösung der gebundenen Fusionsproteine (Prp19:3xHA) und der daran gebundenen Proteine und Proteinkomplexe. Die hier genannten Maßnahmen führten zu einer starken Abnahme der unspezifischen Proteinbanden in AB31 (WT)-Proben (Abbildung 35 A und B). Gleichzeitig eliminierte der Einsatz des HA-Peptids weitere Proteinbanden, darunter auch jene der schweren und leichten Ketten des anti-HA Antikörpers (Abbildung 35 B).



**Abbildung 35: Finale Optimierungen der Immunpräzipitation.** (A) Geladen wurden Protein-Rohlysate (Einsatz/rechts) und Eluat (links) der Immunpräzipitation (mit Anti-HA Antikörpern gekoppelte Agarose (Sigma)) der Stämme AB31, AB31*prp19:3xha* und AB31 $\Delta$ *num1*; *prp19:3xha*. Es wurden jeweils 20  $\mu$ l des eingesetzten Protein-Rohlysats (Einsatz) in einer 1/50 Verdünnung aufgetragen. Es wurden jeweils 20  $\mu$ l der, in Probenpuffer aufgekochten Anti-HA Agarose (Eluat) aufgetragen. (B) Geladen wurden Protein-Rohlysate (Einsatz/links), durch Aufkochen eluierte Proteine (Eluat 1) und durch HA-Peptid eluierte Proteine (Eluat 2). Die Immunpräzipitation erfolgte mit Protein-Rohlysaten aus den Stämmen AB31 und AB31*prp19:3xha*. Es wurden jeweils 10  $\mu$ l des eingesetzten Protein-Rohlysats (Einsatz) in einer 1/200 Verdünnung aufgetragen. Es wurden jeweils 20  $\mu$ l der, in Probenpuffer aufgekochten Anti-HA Agarose (Eluat 1) aufgetragen. Zusätzlich wurden jeweils 20  $\mu$ l der, durch HA-Peptid eluierten Proteine (Eluat 2) aufgetragen. Als Auftragspuffer kam standard Laemmli-Puffer zum Einsatz. Als Protein-Größenstandard wurden 10  $\mu$ l PageRuler Prestained Protein Ladder (Fermentas) verwendet. \* zeigt die schwere und die leichte Kette des anti-HA Antikörpers (ungefähr 55 bzw. 25 kDa) an. \*\* zeigt voraussichtlich Prp19:3xHA (ungefähr 62 kDa) an.

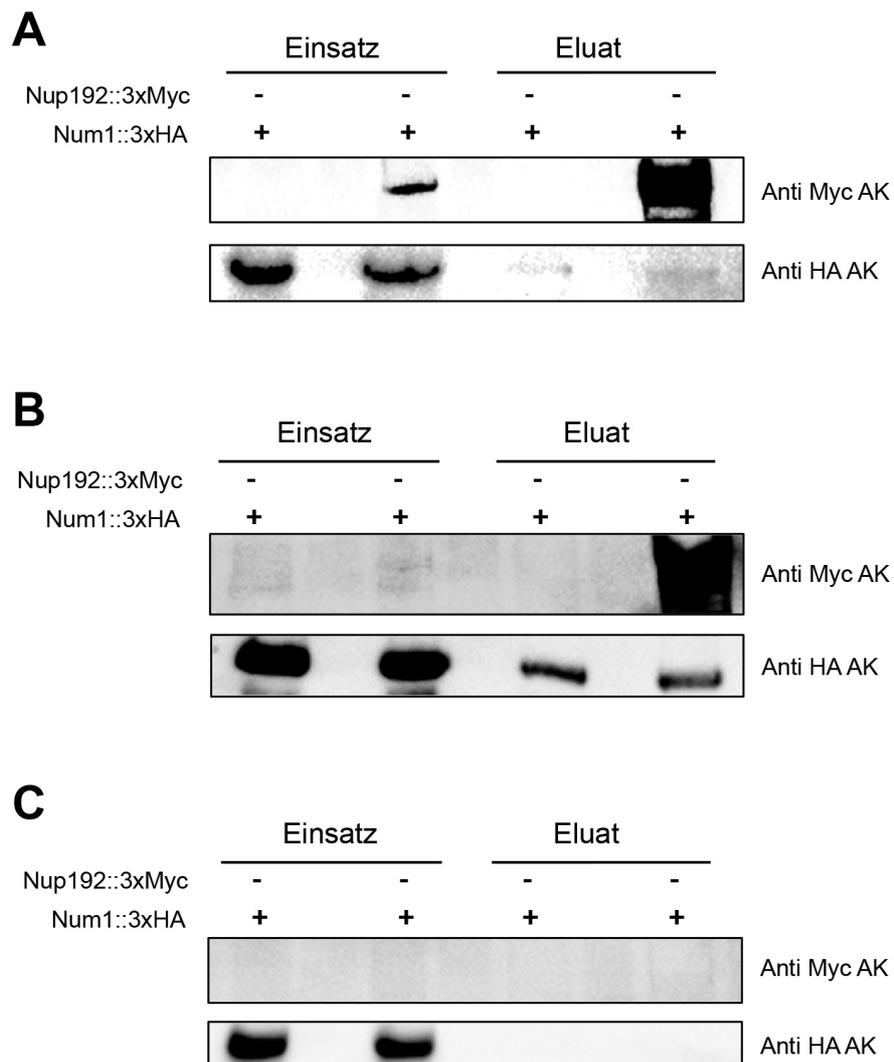
Die Präzipitation mit Prp19:3xHA im  $\Delta$ *num1*-Hintergrund führte zu einer abnehmenden Bandenanzahl und Intensität verglichen mit dem WT-Hintergrund. Dies deutet auf eine starke

Abnahme der direkt oder indirekt an Prp19 gebundenen Proteine hin (Abbildung 35 A). Zur Minimierung unspezifischer Proteinbindungen wurden zusätzlich Versuche mit vorblockierter anti-HA Agarose durchgeführt. Dazu wurde die Agarose vor ihrer Verwendung für eine Stunde bei 4°C mit 5% BSA inkubiert. BSA sollte alle unspezifischen Bindungsstellen blockieren. Dies führte nach Immunpräzipitation und Silberfärbung jedoch zu keinem beobachtbaren Unterschied im Vergleich zu unbehandelter Agarose.

Alle, durch Immunpräzipitation gewonnenen Ergebnisse dieser Arbeit wurden mit dem in diesem Abschnitt optimierten Versuchsaufbau durchgeführt.

## 6.2 Co-Immunpräzipitation von Nup192 und Num1

In den vorliegenden HPLC-MS Experimenten konnten einige Teile der NPC als mit Num1 interagierend identifiziert werden (Tabelle ). Es wurde bereits postuliert, dass Num1 den Zellkern über die Kernpore verlässt um anschließend seine zytoplasmatische Aufgabe auszuführen. Dabei wurde vermutet, dass Num1 den Kern mit mRNPs bzw. mRNA verlässt (1.8). Um die Interaktion mit Teilen der Kernpore zu bestätigen sollte die Interaktion zwischen Num1 und Nup192 mit einer Co-IP gezeigt werden. Dazu wurde das Nup192 Protein mit einem 3xMyc Tag ( $P_{nup192:nup192:3eMyc}$ ) *in locus* in den Stamme AB31*num1:3xha* transformiert. Mit Hilfe von anti-Myc Antikörpern, gekoppelt an Agarose-Partikel sollte Num1 mit Nup192 co-präzipitiert werden. Als Kontrolle diente ein Stamm, welcher nur das Num1:3HA Fusionsprotein exprimiert. Nach der Elution der an die Anti-Myc Agarose gebundenen Proteine und dem anschließenden Nachweis mittels Western Blot konnte eine Bande für das Num1 Protein detektiert werden. Es war jedoch auch ein ähnlich starkes Signal in der Kontrolle sichtbar (Abbildung 36 A). Um einen deutlichen Unterschied in der Signalstärke der beiden Banden zu erlangen wurden die Waschschrte im Co-IP-Experiment reduziert. Daraus resultierten stärkere Num1 Signale welche wiederum keinen signifikanten Unterschied in ihrer Intensität aufwiesen (Abbildung 36 B). Die Wahrscheinlichkeit war groß, dass es sich bei der Interaktion zwischen Num1 und Nup192 um eine transiente bzw. sehr schwache Interaktion handelt. Dies war auch schon bei der Interaktion von Num1 mit Kin1 der Fall (Kellner *et al.*, 2014). Für Kin1 konnte nur nach Quervernetzung der Proteine eine Interaktion nachweisbar. Aus diesem Grund wurden die hier beschriebenen Co-IP Experimente wiederholt, wobei diesmal die Proteine in den *U. maydis* Sporidien vor Aufschluss mit Dithobis[Succinimidyl-Propionat] (DSP) quervernetzt. Nach der Immunpräzipitation waren anschließend keine Signale für Num1 oder Nup192 zu erkennen. Auch im Einsatz (Gesamtzellextrakt) war kein Signal für Nup192 detektierbar.



**Abbildung 36: Co-Immunpräzipitation von Nup192 mit Num1.** Num1:3xHA und Nup192:3xMyc wurden unter der Kontrolle ihrer nativen Promotoren im Stamm AB31 simultan exprimiert. Als Kontrolle diente AB31 Num1:3xHA. Der Gesamtzellextrakt (Einsatz) wurde für eine Immunpräzipitation mit Agarose-gekoppelten anti-Myc Antikörpern verwendet. **(A)** Western Blot der Co-IP, nach der Inkubation (ÜN) von Anti-Myc Agarose (Sigma) mit dem Gesamtproteinextrakt wurde fünf mal mit Aufschlusspuffer gewaschen. **(B)** Western Blot der Co-IP, nach der Inkubation (2 h) von Anti-Myc Agarose (Sigma) mit dem Gesamtproteinextrakt wurde drei mal mit Aufschlusspuffer gewaschen. **(C)** Western Blot der Co-IP, vor dem Zellaufschluss wurden die Proteine mit Dithobis[ Succinimidyl-Propionat] (DSP) quervernetzt, nach der Inkubation (2 h) von Anti-Myc Agarose (Sigma) mit dem Gesamtproteinextrakt wurde fünf mal mit Aufschlusspuffer gewaschen.

Somit war es nicht möglich die Interaktion zwischen Num1 und Nup192 mittels Co-IP zu verifizieren. Da jedoch ohne Quervernetzung der Proteine immer (auch in der Kontrolle) ein Num1:3xHA Signal detektiert wurde, kann die Interaktion auch nicht ausgeschlossen werden.

Nup192 ist einer der Hauptbestandteile der Kernpore und ist mit einer ungefähren Größe von 250 kDa auch die größte Komponente des NPC. Dies erklärt auch das sehr schwache Nup192 Signal in Abbildung 36 B, da solch große Proteine beim hier verwendeten Semi-Dry Blot sehr schlecht übertragen werden.

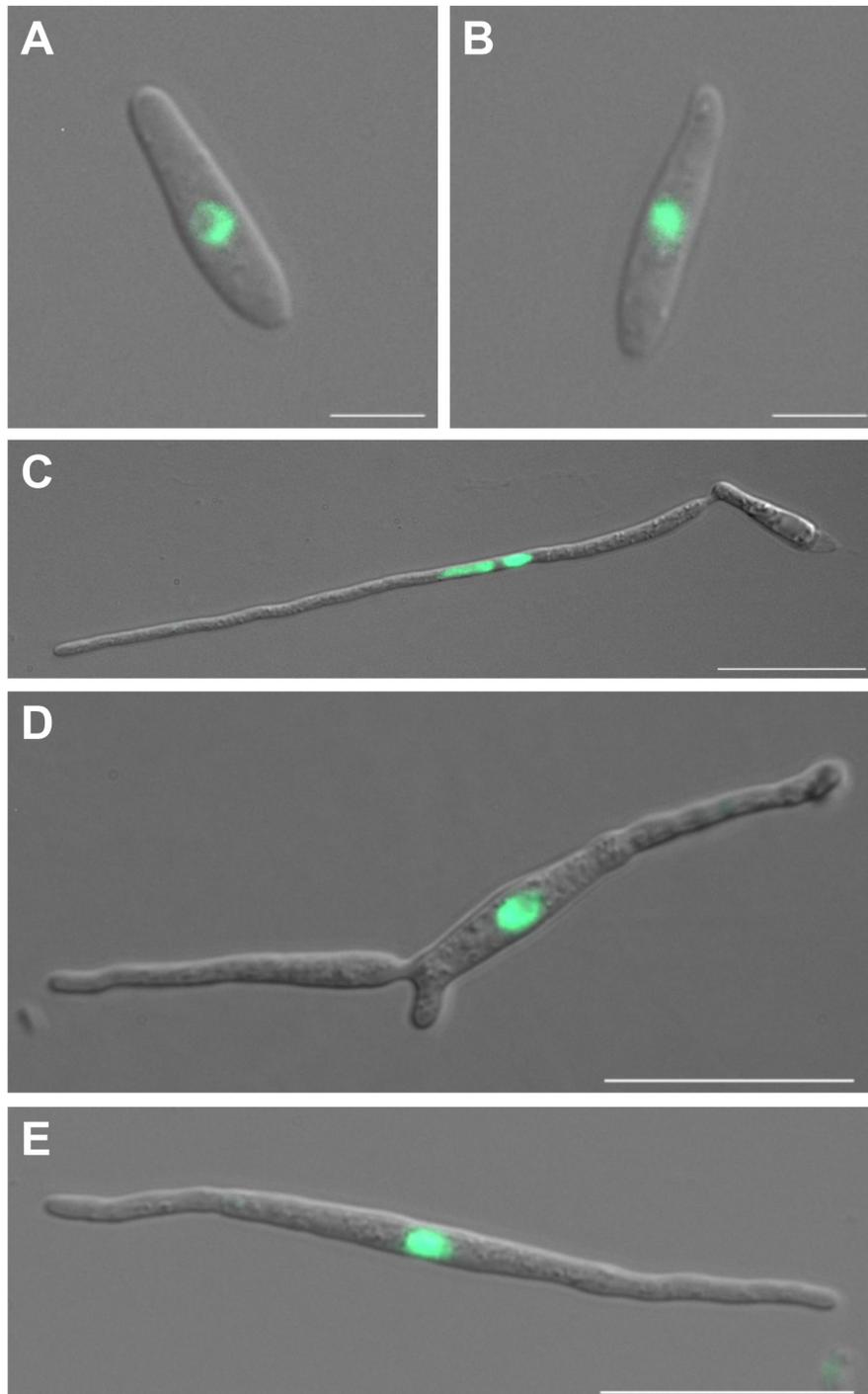
Zusätzlich ist es sehr wahrscheinlich, dass Nup192 mit dem NPC in die Kernmembran eingelassen ist bzw. dass es sich in unmittelbarer Nähe zu dieser Membran befindet. Durch die Quervernetzung der Proteine kommt es somit höchstwahrscheinlich zu einer Fixierung von Nup192 an die Kernmembran. Nach dem Zellaufschluss würde somit das Nup192 Protein mit dem Rest der Kernmembran abzentrifugiert werden. Dies erklärt warum in Abbildung 36 C im Einsatz und im Eluat kein Nup192 Signal mehr detektiert werden konnte. Um trotzdem eine Interaktion nachzuweisen wäre eine *in vitro* Co-IP von Nöten. Dabei könnten die Proteine in Abwesenheit der Kernmembran quervernetzt werden. Bei der Herstellung bzw. der Aufreinigung des Nup192 Proteins für diesen Versuch wäre seine immense Größe möglicherweise erneut ein großes Hindernis.

### 6.3 Die Lokalisierung von Cef1 mit eGFP

Num1 ist ein integraler Bestandteil des NineTeen Spleiß-Komplexes (NTC) in *U. maydis* und lokalisiert nicht ausschließlich im Zellkern, sondern auch im Zytoplasma (Kellner *et al.*, 2014). Dabei interagiert Num1 offenbar NTC unabhängig mit dem Kin1 Motorprotein. Auch die co-Lokalisierung mit Cef1 und Prp19 im Zellkern konnte bereits gezeigt werden (Kellner *et al.*, 2014). Dabei wurden Cef1 und Prp19 jeweils mit einem einfachen RFP (rot fluoreszierendes Protein) und Num1 mit einem dreifachen eGFP (grün fluoreszierendes Protein) versehen. Während Cef1 und Prp19 ausschließlich im Zellkern beobachtet wurde, konnte für Num1 eine zytoplasmatische Lokalisierung in distinkten Foci, meist nahe dem Zellkern, beschrieben (Abbildung 8). Das prominentere Signal ist jedoch auch bei der Num1-Lokalisierung das Zellkernsignal. Im  $\Delta kin1$  Hintergrund nimmt die Signalintensität von Num1:3xeGFP im Zytoplasma von Filamenten jedoch deutlich zu.

Da RFP eine schwächere Fluoreszenz aufweist als GFP und dieses in den bisherigen Stufe dreifach eingesetzt wurde, konnte eine zytoplasmatische Lokalisierung von Prp19 und Cef1 nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Um eine höhere Signalintensität zu gewährleisten wurden AB31 Stämme generiert, welche entweder Cef1 oder Prp19 als Fusionsprotein mit 3xeGFP oder 1xeGFP unter ihrem nativen Promotor exprimieren. Zusätzlich wurden die entsprechenden Konstrukte in AB31 $\Delta kin1$  transformiert, weil in diesem Stammhintergrund die zytoplasmatische Lokalisierung verstärkt erscheint (Kellner, 2012). Die Transformation mit den entsprechenden *prp19:eGFP* und *prp19:3xeGFP* Konstruktion blieb mehrfach ohne positive Transformanden. Das *prp19* Gen ist in *U. maydis* wie in den meisten anderen Organismen essentiell für das Überleben. Deshalb wird vermutet, dass die Fusionierung mit eGFP zur Expression eines nicht funktionellen Proteins führt. Im Folgenden kann somit nur auf die Lokalisierung von Cef1 eingegangen werden.

Wie die entsprechenden RFP Fusionsproteine lokalisiert auch Cef1:eGFP und Cef1:3xeGFP ausschließlich im Zellkern von haploiden Sporidien (Abbildung 37 A und B). Dabei sind keine Unterschiede in WT zum  $\Delta kin1$  Hintergrund zu beobachten. Das gleiche gilt für die Lokalisierung in Filamenten. Auch hier ist das Cef1:eGFP Signal auf den Zellkern begrenzt (Abbildung 37 C bis E).



**Abbildung 37: Lokalisierung von Cef1 in *U. maydis* Sporidien und Filamenten.** (A) Lokalisierung von Cef1:3xeGFP in AB31. Maßstabsbalken entspricht 10  $\mu\text{m}$ . (B) Lokalisierung von Cef1:eGFP in AB31 $\Delta kin1$ . Maßstabsbalken entspricht 10  $\mu\text{m}$ . (C) Lokalisierung von Cef1:3xeGFP in 13 Stunden induzierten AB31 Filamenten. Maßstabsbalken entspricht 20  $\mu\text{m}$ . (D) Lokalisierung von Cef1:eGFP in 13 Stunden induzierten AB31 $\Delta kin1$  Filamenten. Maßstabsbalken entspricht 20  $\mu\text{m}$ . (E) Lokalisierung von Cef1:eGFP in 13 Stunden induzierten AB31 $\Delta kin1$  Filamenten. Maßstabsbalken entspricht 20  $\mu\text{m}$ .

Somit bestätigen diese Ergebnisse, dass das Cef1 Protein als integraler Bestandteil des NTC ausschließlich im Zellkern vorkommt. Auch nach der Deletion von *kin1*, welches zu einer verstärkten zytoplasmatischen Lokalisierung von Num1 führt, änderte sich nichts an der Zellkern-Lokalisierung von Cef1. Auch in Filamenten ist lediglich eine Zellkern-Lokalisierung zu beobachten. Diese Ergebnisse unterstützen die Präsenz einer NTC unabhängigen zytoplasmatischen Funktion von Num1.

## 6.4 Die am stärksten vertretenen Proteine

Die Ergebnisse der HPLC-MS Experimente wurden im Hinblick auf verschiedene Num1 Funktionen in dieser Arbeit aufgeteilt. In diesem Abschnitt sollen jedoch die am stärksten vertretenen (mit den höchsten Gesamtpeptidmengen) Proteine aufgeführt werden. Dabei wird deutlich, dass diese Gruppe ausschließlich aus Spleiß-assoziierten Proteinen besteht. Die meisten dieser Spleiß-assoziierten Proteine sind dabei bekannte Komponenten des NTC in Mensch und/oder Hefe.

Tabelle 18: Proteine mit den meisten Gesamtpeptidmengen

Accession	PSM** in HA pulldown				Name
	Num1	Num1 nach Fraktionierung	Prp19	Prp19 in $\Delta num1$	
um10027	362	314	344	358	Prp19
um10807	682	104	306	157	Prp8
um03738	123	--	210	102	BRR2
um02868	445	383	196	114	EF-2
um03842	341	223	148	81	Syf1
um04411	217	239	103	60	Cef1
um04752	211	142	89	43	Cdc40
um02676	245	186	85	47	Cif1
um01682	112	188	55	--	Num1
um11036	114	84	54	32	Prp46
um12203	153	152	53	28	Cwc2
um04654	34	98	47	18	Lwa1
um11905	67	48	43	28	Cwc22
um02618.2	65	78	40	19	Snw1
um11866	99	107	36	20	Pwp2
um11043	56	115	33	7	Smd3
um12244	84	91	32	16	Smb1
um11882	61	56	31	5	PPIL1/CYPL1
um11178	33	51	28	19	Msl1
um11427	29	50	25	18	Syf2
um01323	70	101	25	10	Isy1
um00737	30	5	23	6	Rse1
um10312	27	53	20	13	Sme1
um06036	48	59	20	7	CCDC12

snRNPs

bekannte NTC Komponenten (Hefe und Mensch)

## **Digitale Datensätze**

Auf der Beiliegenden CD sind die vollständigen Daten der massenspektroskopischen Untersuchungen gespeichert. Dabei wurde jedes einzelne Experiment in einem eigenen Ordner hinterlegt. Jeder Ordner enthält eine Excel-Datei für die Kontroll-Immunpräzipitation und eine Excel-Datei für die Immunpräzipitation mit dem jeweiligen HA-Fusionsprotein. Im Root-Verzeichnis befindet sich eine Excel-Datei in der alle identifizierten Proteine zusammengefasst wurden.

## LEBENS LAUF

### PERSÖNLICHE DATEN

Name: Sebastian Hassinger  
Geburtsdatum: 10.06.1986  
Geburtsort: Homburg (Saar)  
Familienstand: ledig

### SCHULBILDUNG

1992 - 1996: Hilgard-Grundschule Zweibrücken  
1996 - 2005: Helmholtzgymnasium Zweibrücken, Abitur

### HOCHSCHULSTUDIUM

2005 - 2011: Biologie (Diplom) am Karlsruher Institut für Technologie  
Diplomarbeit: Unter der Leitung von Prof. Dr. Jörg Kämper im Institut für Angewandte Biowissenschaften, Abteilung Genetik am Karlsruher Institut für Technologie (KIT) Thema: „Die Identifikation von Cib1 Interaktionspartnern in Ustilago maydis“  
Abschluss: Diplombiologe  
Studienschwerpunkte: Hauptfach: Genetik  
Nebenfächer: Zoologie und Mikrobiologie

### PROMOTION

seit 10/2011 Anfertigung der Promotion unter Leitung von Prof. Dr. Jörg Kämper am Institut für Angewandte Biowissenschaften, Abteilung Genetik am Karlsruher Institut für Technologie (KIT)

Titel: Das Num1-Protein stabilisiert den Spleißosom-assoziierten NineTeen-Komplex und erfüllt zusätzliche Funktionen in Ustilago maydis

### **KONFERENZBEITRÄGE**

29.09 – 03.10.2013: Abstract/Poster: „A homologue of the human SPF27 protein stabilizes the NineTeen splicing-Complex in *Ustilago maydis*“, XI International Fungal Biology Conference

### **LEHRTÄTIGKEIT**

Seit 2011 Eigenständige Planung, Durchführung und Betreuung von verschiedenen Laborpraktika für Studenten in Einzel- und Gruppenbetreuung, Anleitung von Masterarbeiten und Bachelorarbeit

## Danksagung

Zunächst einen großen Dank an Jörg für die Aufnahme als Doktortand und die gute Betreuung. Danke für gute Ratschläge, ein interessantes Thema und all deine Bemühungen. Auch in schweren Zeiten hast du mich unterstützt und mir den Wiedereinstieg so einfach wie möglich gemacht. Ohne dein Zutun wäre diese Arbeit niemals verwirklicht worden. Abseits vom Labor hast du uns schöne Abende beschert. Unvergessen werden die Weihnachtsfeiern mit bester Bewirtung bleiben. Die Gespräche über jegliches Thema und deine fundierten Tipps haben mir oft weitergeholfen.

Bei Herrn Prof. Dr. Holger Puchta möchte ich mich herzlich für die Übernahme des Zweitgutachtens bedanken. Mein großer Dank geht nach Göttingen an Dr. Oliver Valerius und an Prof. Dr. Gerhard Braus für die gute Kooperation und die Durchführung der massenspektroskopischen Untersuchungen.

Nikola, deine Vorarbeiten haben meine Arbeit erst ermöglicht und du hast mich stets mit guten Ratschlägen und deinem immensen Fachwissen unterstützt. Mit dir hat unser Labor eine große Stütze verloren und ich wünsche dir für deine Zukunft in Heidelberg und dem Rest der Welt alles Gute. Sag mir bescheid wenn du mal wieder fliegen gehen willst, denn als Bodenpersonal kannst du immer auf mich zählen.

Als nächstes geht mein Dank an alle Bachelor- und Masterstudenten, die ich während meiner Zeit betreut habe. Niko, vielen Dank für ermunternde Pausen und interessante Gespräche über jegliche technischen und nichttechnischen Themen.

Ein besonderer Dank geht an alle jetzigen und ehemaligen Mitglieder der AG Kämper, die ich während meiner Zeit genießen durfte. Kai1 und Kai2, ihr habt meine Laborzeit unvergesslich gemacht. Ihr seid mir immer mit Rat und Tat zur Seite gestanden. David, vielen Dank für dein Fachwissen in und außerhalb des Labors. Sag mir bescheid, wenn da mal wieder eine Runde Gurkenwasser trinken willst. Danke Thes für die Mitarbeit an unserem Lieblingsprojekt und die schönen Abende im Luno. Lass dich nicht unterkriegen und genieße weiterhin deine Reisen in die Welt. Benni, danke die unvergesslichen Mittagspausen und für diversen Gaumenschmaus. Deiner Hilfe konnte ich mir in jeder Situation sicher sein. Danke Jonas für den Gehirnsport. Ihr seid super Kollegen und ich kann mich glücklich Schätzen, Zeit im und außerhalb des Labors mit euch verbracht zu haben.

Ohne meine Familie und vor allem meinen Eltern wäre diese Arbeit niemals entstanden. Ihr seid unvergleichlich und ich erachte es als größtes Glück, Teil dieser Familie sein. Eure Anwesenheit und Fürsorge haben mich auch durch meine allerschwersten Zeiten gebracht. Als Mitbewohner, Schwester, Bruder, Neffe, Schwager, Schwägerin, Vater, Mutter und Freund/in hattet ihr es nicht immer leicht mit mir. Ihr habt euch nie beschwert. Dafür vielen Dank!

Und zum krönenden Schluss, Danke Fathima! Meine bisherige Zeit mit dir zum gehört zum Besten was ich je erleben durfte. Ich freue mich auf unsere gemeinsame Zukunft. Ich werde dir deine bedingungslose Unterstützung nie vergessen und hoffe, dass ich sie unter glücklicheren Umständen zurückgeben kann.