



**Charakterisierung der zytoplasmatischen
Funktion von Num1 und Nma1 in
*Ustilago maydis***

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

von der KIT-Fakultät für Chemie und Biowissenschaften
des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)

genehmigte

DISSERTATION

von

M.Sc. Theresa Obhof

aus

Oberderdingen-Flehingen

Dekan:	Prof. Dr. Willem Klopper
Referent:	Prof. Dr. Jörg Kämper
Korreferent:	Prof. Dr. Peter Nick
Tag der mündlichen Prüfung:	28.04.2017

Eigenständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich meine Dissertation mit dem Titel „Charakterisierung der zytoplasmatischen Funktion von Num1 und Nma1 in *Ustilago maydis*“ selbstständig verfasst, keine anderen als die angegebenen Quellen oder Hilfsmittel verwendet und alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen wurden, als solche kenntlich gemacht habe. Die Regelung zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis im Karlsruher Institut für Technologie (KIT), in gültiger Fassung vom 27.11.2014, habe ich beachtet.

Ort/Datum

Theresa Obhof

Publikationsliste

KELLNER, N., HEIMEL, K., OBHOF, T., FINKERNAGEL, F., UND KÄMPER, J. (2014).
The SPF27 homologue Num1 connects splicing and kinesin 1-dependent cytoplasmic trafficking in *Ustilago maydis*. *PLoS Genet* **10**, e1004046.

Abkürzungsverzeichnis

Amp ^R	Ampicilin-Resistenz
AS	Aminosäure
bE	b-East Allel
bp	Basenpaare
bW	b-West Allel
Cbx ^R	Carboxin-Resistenz
CM	Komplett-Medium
CMAC	7-Amino-4-Chlormethylcumarin
Co-IP	Co-Immunopräzipitation
CORVET	class C core vacuole/endosome tethering
C-terminal	Carboxy-terminal
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DIC	Differentialinterferenzkontrast Mikroskopie
DIG	Digoxigenin
dpi	Tage nach Infektion
EE	frühe Endosomen
f.c.	Finale Konzentration
FM4-64	N-(3-Triethylammoniumpropyl)-4-(6-(4-(Diethylamino)Phenyl)Hexatrienyl)Pyridinium Dibromid
GEF	Guanine nucleotide exchange factor
GFP	grün fluoreszierendes Protein
HOPS	homotypic fusion and protein sorting
Hyg ^R	Hygromycin-Resistenz
Kan ^R	Kanamycin-Resistenz
Kb	Kilobasenpaare
MAP	Mikrotubuli-assoziierte Proteine
mRNP	Messenger ribonucleoprotein
MT	Mikrotubuli
MTOC	Mikrotubuli Organisationszentrum
Nat ^R	Nourseothricin-Resistenz
nosT	Nos-Terminator
NES	Nuclear export signal
NLS	Nuclear localization signal
NPC	Nuclear pore complex
NTC	NineTeen complex
ORF	Offener Leserahmen
PALM	photoactivated localization microscopy
P _{xy}	Promotor
Phleo ^R	Phleomycin-Resistenz
SNARE	soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor
SPK	Spindelpolkörper
SMZ	spindle mid-zone
Δ	Deletion

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	1
Summary.....	3
1 Einleitung.....	5
1.1 <i>Ustilago maydis</i> – ein Modellorganismus für Zellbiologie und polares Wachstum.....	5
1.2 Das Zytoskelett eukaryotischer Zellen.....	6
1.3 Das Mikrotubuli-Zytoskelett in <i>U. maydis</i>	8
1.4 Die Mitose-Spindel.....	13
1.5 Intrazelluläre Transportprozesse	16
1.6 Die Komplexe CORVET und HOPS vermitteln Membranfusion.....	19
1.7 Das Num1-Protein	21
1.8 Das Nma1-Protein	24
Zielsetzung	26
2 Ergebnisse	28
2.1 Das Num1-Protein	28
2.1.1 Untersuchung der zytoplasmatischen Lokalisierung von Num1	29
2.1.2 Charakterisierung des Num1-Proteins	39
2.2 Charakterisierung des Nma1-Proteins.....	48
2.2.1 Charakterisierung der Nma1 Transportprozesse	48
2.2.2 Nma1 und frühe Endosomen lokalisieren am Spindelpolkörper	60
2.2.3 Nma1 interagiert mit Komponenten des CORVET-Komplexes.....	76
2.2.4 Nma1 lokalisiert entlang von Mikrotubuli in <i>A. nidulans</i>	80
3 Diskussion	81
3.1 Charakterisierung des Num1-Proteins.....	81
3.1.1 Num1 bewegt sich im Zytoplasma	81
3.1.2 Der zytoplasmatische Num1-Transport ist Kin1-abhängig.....	84
3.1.3 Num1 – ein Spleißfaktor auf Abwegen?.....	86
3.1.4 Untersuchung spezifischer Num1-Domänen	91
3.2 Charakterisierung des zytoplasmatischen Proteins Nma1	94
3.2.1 Nma1 interagiert direkt mit Vps3.....	94
3.2.2 Vps9 erfüllt in <i>U. maydis</i> nicht die Funktion eines GEFs für Rab5a.....	97
3.2.3 Nma1 bewegt sich mit frühen Endosomen entlang von Mikrotubuli	98
3.2.4 Nma1 – ein MAP in <i>U. maydis</i> ?	100
3.2.5 Nma1 und frühe Endosomen lokalisieren an den Spindelpolen	106

Inhaltsverzeichnis

4	Material und Methoden.....	114
4.1	Material und Bezugsquellen	114
4.2	Mikrobiologische, genetische und zellbiologische Methoden	127
4.3	Mikroskopie und Bildverarbeitung.....	134
4.4	Molekularbiologische Standardmethoden.....	137
4.5	PCR-Methoden.....	144
5	Literaturverzeichnis	149
6	Appendix	160
6.1	Funktionelle Analyse von Num1-Interaktionspartnern	160
6.1.1	Die Lokalisierung von UMAG_03539 ist Num1-abhängig.....	160
6.1.2	UMAG_10905 lokalisiert im Zytoplasma und hat keinen Einfluss auf die Zellmorphologie oder Pathogenität	162
6.2	Num1 interagiert mit Kin1	163
6.3	Nma1 interagiert nicht mit sich selbst.....	164
6.4	Rab11 lokalisiert nicht am Spindelpolkkörper von <i>U. maydis</i>	166
6.5	RealTime PCR Num1 Δ 8AS - Fehlerbestimmung	167
7	Digitale Daten.....	168

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Der dimorphe Lebenszyklus von <i>U. maydis</i>	6
Abb. 2:	Das eukaryotische Zytoskelett.....	8
Abb. 3:	Der Zellzyklus in <i>U. maydis</i>	11
Abb. 4:	Die Mitose-Spindel in <i>U. maydis</i>	14
Abb. 5:	19
Abb. 6:	CORVET und HOPS vermitteln Membranfusion verschiedener Endosomen-Populationen.	21
Abb. 7:	Das Num1 Protein in <i>U. maydis</i>	23
Abb. 8:	Das Nma1-Protein in <i>U. maydis</i>	25
Abb. 9:	Herstellung eines EosFP für <i>U. maydis</i>	30
Abb. 10:	Vergleich zwischen Num1:tdEosFP und Num1:mEos2FP.	32
Abb. 11:	Num1:tdEos lokalisiert im Zellkern und bewegt sich im Zytoplasma.	33
Abb. 12:	Num1:tdEos lokalisiert an Strukturen im Zytoplasma.	33
Abb. 13:	Num1 lokalisiert teilweise entlang von Mikrotubuli in Sporidien.....	35

Abb. 14: Num1 lokalisiert teilweise entlang von Mikrotubuli in Filamenten.....	36
Abb. 15: Die Deletion von <i>kin1</i> beeinträchtigt die Num1-Lokalisierung.....	38
Abb. 16: Num1 lokalisiert nicht an frühen Endosomen im Zytoplasma.....	39
Abb. 17: Das Num1-Protein hat einen spezifischen N-terminalen Bereich.....	40
Abb. 18: AN4244 und Num1 ₁₋₆₆ :AN4244 können den polaren Wachstumsdefekt von $\Delta num1$ nicht retten.	41
Abb. 19: AN4244 und Num1 ₁₋₆₆ :AN4244 sind nicht in der Lage die Deletion von <i>num1</i> zu komplementieren.	42
Abb. 20: Die Deletion der C-terminalen 8 Aminosäuren von Num1 beeinträchtigt die Funktion des Proteins nicht.....	44
Abb. 21: Num1 enthält ein zweites Start-Codon im selben Leserahmen.....	45
Abb. 22: AN4244:gfp lokalisiert in Zellkernen von <i>A. nidulans</i>	46
Abb. 23: Nukleäre Ausstülpungen sind Num1-unabhängig.....	47
Abb. 24: Nma1 bewegt sich entlang von Mikrotubuli.	49
Abb. 25: Das überexprimierte Nma1-Protein lokalisiert entlang von Mikrotubuli.	50
Abb. 26: P _{otef} :Nma1:gfp bewegt sich bidirektional entlang von Mikrotubuli.....	51
Abb. 27: Die Nma1-Bewegung ist abhängig von Kin3.	53
Abb. 28: Die Nma1-Bewegung ist abhängig von Kin1.	54
Abb. 29: Nma1 ist assoziiert mit Rab5-markierten frühen Endosomen.....	55
Abb. 30: Nma1 bewegt sich gemeinsam mit frühen Endosomen entlang von Mikrotubuli.	56
Abb. 31: Die Deletion von <i>vps9</i> beeinträchtigt Rab5 nicht wie erwartet.....	58
Abb. 32: Die Deletion von <i>vps9</i> beeinträchtigt die Bewegung von Nma1 und Rab5.	59
Abb. 33: Nma1 lokalisiert am Spindelpolkörper.	61
Abb. 34: Nma1 lokalisiert an der Mitosespindel.	62
Abb. 35: Nma1 ist während der gesamten Mitose mit der Spindel assoziiert.	64
Abb. 36: Frühe Endosomen sind assoziiert mit der Mitosespindel.....	66
Abb. 37: Rab5 lokalisiert an den Spindelpolen.....	67
Abb. 38: Die Deletion von <i>rab5a</i> beeinflusst die Lokalisierung von Nma1 in der Hyphe.	68
Abb. 39: Die Deletion von <i>rab5a</i> hat keinen Einfluss auf die Mitosespindel.	69
Abb. 40: Motordelationen haben keinen eindeutigen Einfluss auf Nma1 an der Mitosespindel.	71
Abb. 41: Die Deletion von <i>nma1</i> hat keinen Einfluss auf das Mikrotubuli-Zytoskelett und die Zahl der Zellkerne.....	72
Abb. 42: Die Mitose wird durch <i>nma1</i> -Deletion nicht beeinträchtigt.....	73
Abb. 43: Die Deletion von <i>nma1</i> hat keinen Einfluss auf die Mitosespindel.	75

Inhaltsverzeichnis

Abb. 44: Die Deletion von <i>vps3</i> führt zu einer erhöhten Zahl von Zellkernen.....	77
Abb. 45: Die Deletion von <i>vps3</i> führt zum Abbau von Rab5.....	78
Abb. 46: Nma1 interagiert direkt mit Vps3.....	79
Abb. 47: Nma1 lokalisiert entlang von Mikrotubuli in <i>A. nidulans</i>	80
Abb. 48: Modell zur zytoplasmatischen Funktion von Num1.....	91
Abb. 49 Modell der Nma1-Bindung an frühe Endosomen (EE).)	101
Abb. 50: Schematische Darstellung des Nma1-Transports.....	105
Abb. 51: Schematische Darstellung der Nma1-Lokalisierung an der Mitosespindel.	108
Abb. 52: Schematische Darstellung der Lokalisierung von frühen Endosomen an der Mitosespindel.....	110
Abb. 53: Die Lokalisierung von UMAG_03539 ist Num1-abhängig.....	161
Abb. 54: Charakterisierung von UMAG_10905.....	162
Abb. 55: Darstellung der getesteten Num1- und Kin1-Klone in einem direkten Hefe- Zwei-Hybrid Interaktionstest.....	164
Abb. 56: Nma1 interagiert nicht mit sich selbst.....	165
Abb. 57: Rab11 lokalisiert an den Zellpolen von Sporidien.....	166

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Messwerte der Geschwindigkeitsbestimmung von Nma1.....	51
Tabelle 2: Die Lautweite von Nma1 und Rab5 wird durch die Deletion von <i>vps9</i> reduziert.....	59
Tabelle 3: Quantifizierung der Nma1-Lokalisierung an Mitosespindeln.....	71
Tabelle 4: In dieser Arbeit verwendete Antikörper, Enzyme, Proteine und Substrate	114
Tabelle 5: In dieser Arbeit verwendete Medien.....	115
Tabelle 6: Ausgangsstämme und verwendete Stämme von <i>U. maydis</i>	117
Tabelle 7: In dieser Arbeit hergestellte und verwendete <i>U. maydis</i> Stämme.....	118
Tabelle 8: In dieser Arbeit hergestellte und verwendete <i>A. nidulans</i> Stämme.....	119
Tabelle 9: In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide.....	120
Tabelle 10: In dieser Arbeit verwendete Plasmide.....	123
Tabelle 11: In dieser Arbeit hergestellte Plasmide.....	124
Tabelle 12: Obere und untere Grenzen der Exon/Intron-Quotienten.....	167

Zusammenfassung

Der phytopathogene Pilz *Ustilago maydis* durchläuft verschiedene morphologische Stadien während seines Lebenszyklus, da er als haploid Hefe-artige Sporidien oder infektiöses dikaryotisches Filament wachsen kann. Die Entwicklung erfordert eine präzise Kontrolle des polaren Wachstums, der Zellkern-Verteilung und der Zellzyklus-Kontrolle. Die Deletion des *num1*-Gens führt in Hyphen zu starken Polaritätsdefekten und beeinträchtigt die Septierung und den vesikulären Transport. Num1 ist ein Homolog des humanen SPF27, einer Kernkomponente des hoch konservierten Prp19/CDC5-Komplexes (NineTeen Complex), der essentielle Funktionen beim Spleißprozess hat. Die Identifizierung zytoplasmatisch lokalisierter Interaktionspartner, wie dem Motorprotein Kin1 und dem Mikrotubuli-assoziierten Nma1-Protein, legen eine Verbindung zwischen der Spleiß-Maschinerie und intrazellulären Transportprozessen nahe. Num1 lokalisiert hauptsächlich im Zellkern, es gibt jedoch auch Evidenzen für zytoplasmatische Subpopulationen, deren genaue Lokalisierung aufgrund des niedrigen Signals und der Auflösungsgrenze der konventionellen Fluoreszenzmikroskopie nicht bestimmt werden konnten. Mit Hilfe der hochauflösenden PALM-Technik war es nun erstmals möglich die Num1-Lokalisierung außerhalb des Zellkerns zu verfolgen. Die Bewegung von Num1 ist in Abhängigkeit vom Motor-Protein Kin1, während die Prozesse unabhängig vom Motorprotein Kin3 und frühen Endosomen (EE) ablaufen. In dieser Arbeit war es erstmals möglich, die zytoplasmatische Lokalisierung und Motorprotein-abhängige Motilität eines Spleiß-Faktors zu zeigen.

Das als Num1-Interaktor isolierte Protein Nma1 bewegt sich bidirektional entlang von Mikrotubuli (MT) und interagiert mit Komponenten des CORVET-Komplexes, der die Fusion von Membranen vermittelt. Co-Lokalisierungen mit dem EE-Markerprotein Rab5 zeigen den Co-Transport von Nma1 und EEs. Die Deletionen von *kin3*, *kin1*, *rab5* und der CORVET-Komponente *vps3* beeinträchtigen die Motilität von Nma1 und führen zu stationären Nma1-Signalen entlang von MT. Diese Beobachtungen sprechen für einen

Zusammenfassung

EE-abhängigen Transport und einer zusätzlichen direkten Bindung von Nma1 an MT. Während der Mitose kondensiert Nma1 gemeinsam mit Tubulin am Spindelpolkörper (SPK) und später auf astralen MT. Deletionen von *kin3*, *kin1* und *rab5* führten zu keiner Veränderung der Nma1-Lokalisierung an den SPK, dies spricht für eine EE-unabhängige direkte Bindung des Proteins an MT. Die Beobachtung von Rab5- und Yup1 markierten EEs am SPK impliziert eine zusätzliche EE-abhängige Lokalisierung von Nma1 am SPK. Untersuchungen in Metazoa ergaben vielfältige Funktionen von Endosomen an der Mitosespindel, wie zum Beispiel bei der Assemblierung der Kernmembran.

Summary

During its lifecycle, the phytopathogenic basidiomycete *Ustilago maydis* passes through different morphological stages, as the haploid yeast-like sporidia and the infectious dikaryotic filament. Proper development requires an accurate controlling between polar growth, nuclear distribution and cell cycle coordination. Deletion of the *num1* gene leads to strong polarity defects and impairs septation and vesicular transport. Num1 is a homolog of the human SPF27, a central component of the highly conserved Prp19/CDC5-complex (NineTeen Complex), an integral component of the spliceosome. Interaction with several proteins implicated in cytoplasmic transport, as Kin1 and the microtubule-associated Nma1-protein, suggest a connection between the nuclear splicing machinery and intracellular trafficking processes. Num1 localizes mainly in the nucleus, but there is evidence for an additional cytoplasmic subpopulation. However, due to weak signals and diffractions limits of conventional microscopy techniques, it was not possible to visualize the cytoplasmic localization. With the approach of using the super-resolution microscopy method PALM we were able for the first time to track the presence of Num1 outside the nucleus. Num1 transport is Kin1-dependent, but independent from Kin3 and the motility of early endosomes (EE). In this study, the cytoplasmic localization and motor protein-dependent motility of a splicing factor was shown for the first time.

The Num1 interacting protein Nma1 shuttles bidirectionally along microtubules and interacts with components of the membrane tethering CORVET complex. Co-localization experiments with the EE marker protein Rab5 displayed a co-transport of Nma1 and EE. Deletions of *kin3*, *kin1*, *rab5* and the CORVET-component *vps3* altered Num1 motility and led to additional stationary signals along microtubules (MT). These findings suggest an EE-dependent transport of Nma1 and an additional ability to bind directly to microtubules. During mitosis Nma1 condensed together with tubulin and localized at the spindle pole bodies (SPB) and later on astral microtubules. Deletions of *kin3*, *kin1* and *rab5* did not alter localization of Nma1 on mitotic spindles. Thus this data

Summary

proposes EE-independent Nma1 binding to microtubules. Further experiments revealed accumulation of Rab5 and Yup1 marked EEs on SPBs that suggest an additional EE-dependent localization of Nma1. Investigation in metazoan cells uncovered multiple functions of endosomes at mitotic spindles, as the assembly of nuclear membranes.

1 Einleitung

1.1 *Ustilago maydis* – ein Modellorganismus für Zellbiologie und polares Wachstum

Die Basidiomycota (Ständerpilze) umfassen circa 30% aller bekannten Pilzarten und beinhalten die Gruppen der Rost- und Brandpilze, welche als Pflanzen-Pathogene bekannt sind. Die *Ustilaginaceae* sind eine der am besten erforschten Gruppe unter den Pflanzenparasiten und enthalten den Erreger des Maisbeulenbrands *Ustilago maydis*, sowie die nah verwandten Spezies *Ustilago hordei* (Erreger des Gerstenbeulenbrands) und *Sporisorium reilianum* (Begerow *et al.*, 2006; Abb. 1B). Erst vor kurzer Zeit wurde mit Hilfe komparativer Analysen der Genome von Rostpilzen vorgeschlagen *U. maydis* oder synonym auch *Mycosarcoma maydis* in eine neue Klade der *Mycosarcoma* einzuordnen (McTaggart *et al.*, 2016). Der Lebenszyklus von *U. maydis* wird in eine pathogene und eine apathogene Phase untergliedert, wobei wie bei allen Brandpilzen die pathogene und die sexuelle Entwicklung eng aneinander gekoppelt sind (Bakkeren *et al.*, 2008). Die apathogene, saprophytische Phase ist gekennzeichnet durch hefeartige, vegetative Knospung zigarrenförmiger Sporidien, wohingegen für die pathogene und sexuelle Entwicklung ein mehrzelliges, dikaryotisches Filament charakteristisch ist. Die Bildung der infektiösen Hyphe findet durch Fusion zweier kompatibler Sporidien statt (Vollmeister *et al.*, 2012). Die Kompatibilität wird dabei von einem tetrapolaren System, bestehend aus den zwei Paarungstyp-Loci, dem *a*- und dem *b*-Locus gesteuert (Bölker, 2001, Feldbrügge *et al.*, 2004, Kahmann und Kämper, 2004, Abb. 1).

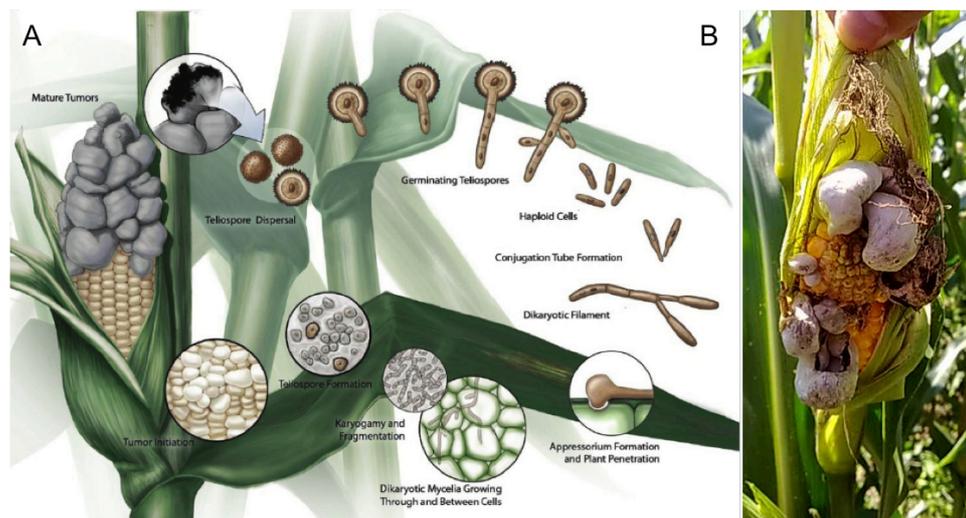


Abb. 1: Der dimorphe Lebenszyklus von *U. maydis*. (A) Schematische Darstellung der verschiedenen Phasen des Lebenszyklus von *U. maydis*. Die haploiden Sporen teilen sich durch hefeartige Knospung. Gesteuert durch das tetrapolare Paarungstyp-Loci System sind die Zellen jedoch in der Lage auf der Pflanzenoberfläche zu fusionieren und das pathogene Dikaryon zu bilden. Durch die Ausbildung einer speziellen Penetrationsstruktur, dem Appressorium, dringen die Hyphen in das Pflanzengewebe ein ohne dieses zu zerstören. Innerhalb der Pflanze kommt es zur Proliferation des Myzels und zur Ausbildung von Teliosporen, welche die Überdauerungsform von *U. maydis* sind. Abbildung nach (Saville, 2012) (B) Infizierter Maiskolben, Karlsruhe 2011.

U. maydis ist eines der führenden Modellsysteme für Pilz-Pflanzen Interaktionen. Zusätzlich wurde der Pilz in den letzten zwei Jahrzehnten als Modellsystem für die Erforschung des Zytoskeletts und intrazellulären Transports in polaren Zellen etabliert (Matei und Doehlemann, 2016). Da diese Komponenten hoch konserviert sind bieten sich polare Pilzhyphen als Modellsystem für komplexere Zelltypen wie zum Beispiel Neuronen an. Seit Ende der 1990er Jahre wurden das Zytoskelett, die damit assoziierten Motorproteine und intrazellulärer Transportprozesse von G. Steinberg und M. Feldbrügge und Mitarbeitern sehr eingehend studiert und viele Marker für intrazelluläre Strukturen etabliert. Im Gegensatz zu anderen Pilzen ist die Mitose von *U. maydis* wie bei höheren Eukaryoten eine sogenannte „offene Mitose“, was die Forschung an diesem Organismus in vielen Aspekten relevant macht (Straube *et al.*, 2005).

1.2 Das Zytoskelett eukaryotischer Zellen

Die Funktionalität von Zellen ist davon abhängig, ob sie in der Lage sind sich im Raum zu organisieren und mechanisch miteinander und ihrer Umwelt interagieren können. Dafür ist die korrekte Zellform, Stabilität und eine innere Strukturiertheit notwendig. Diese innere Struktur muss jedoch so flexibel sein, dass sie innerhalb

kurzer Zeit verändert werden kann, sei es für Wachstum, Zellteilung oder für die Anpassung an äußere Gegebenheiten. Diese Funktion beruht auf einem speziellen System aus Filamenten, dem Zytoskelett.

Das Zytoskelett ist verantwortlich für viele Aspekte der internen und externen Organisation der Zelle, es verleiht Form und mechanische Stabilität. Die verschiedenen Funktionen beruhen auf drei verschiedenen Familien von Protein-Filamenten: Mikrotubuli, Aktinfilamenten und Intermediärfilamenten. Mikrotubuli und Aktin sind mit Motorproteinen assoziiert, die entlang der Filamente Vesikel und Organellen durch die Zelle transportieren. Motorproteine sind molekulare Maschinen, welche die Energie einer ATP-Hydrolyse nutzen und sie in mechanische Kraft umsetzen, um entweder Fracht jeglicher Art entlang der Filamente zu transportieren oder die Filamente selbst zu bewegen. Aktinfilamente sind helikale Polymere gebildet aus dem Protein Aktin, die einen Durchmesser von 8 nm haben und sich in linearen Bündeln aneinanderlagern (Abb. 2B). Die mit Aktinfilamenten assoziierten Motorproteine heißen Myosine. Mikrotubuli sind lange, hohle Zylinder, die aus 13 parallel angeordneten Protofilamenten, bestehend aus α - und β -Tubulin Heterodimeren, gebildet werden. Ihr Außendurchmesser beträgt 25 nm, was sie zu den größten der Zytoskelett-Komponenten macht. In einem steten Wechsel aus Polymerisation und Katastrophe wachsen die Mikrotubuli an ihrem Plus-Ende, während das Minus-Ende die Basis bildet, diesen Vorgang nennt man dynamische Instabilität (Abb. 2A/D). Entlang dieser Filamente wird intrazelluläre Fracht wie Vesikel mit den Motorproteinen Kinesin und Dynein transportiert. In höheren Eukaryoten gibt es zudem aus Proteinen einer sehr großen und heterogenen Familie gebildete Intermediärfilamente, welche den Zellen vor allem mechanische Stabilität verleihen (Abb. 2C). In filamentösen Pilzen gelten Septine als vierte Komponente des Zytoskeletts (Mostowy und Cossart, 2012). Septine sind GTP-bindende Proteine, die von Pilzen bis zu *H. sapiens* hoch konserviert sind und in einer Vielzahl von Prozessen wie Zytokinese und Etablierung der Zellpolarität eine Rolle spielen (Zander *et al.*, 2016, Mostowy und Cossart, 2012).

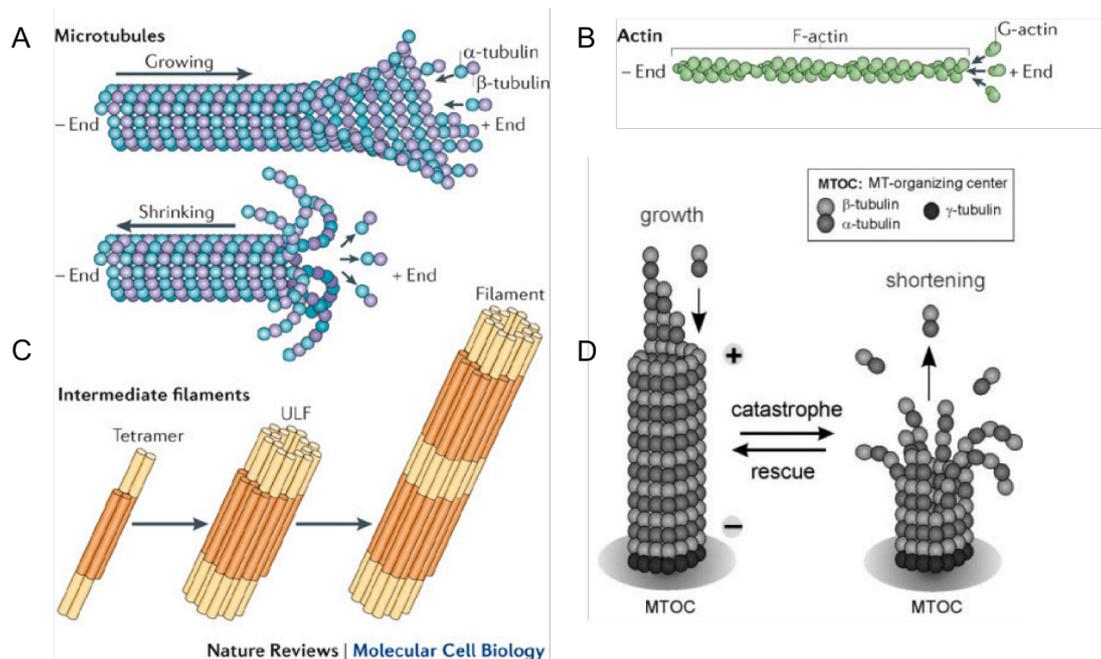


Abb. 2: Das eukaryotische Zytoskelett. (A/D) Mikrotubuli sind polare, zylindrische Strukturen die aus 13 Protofilamenten, bestehend aus α - und β -Tubulin, gebildet werden. Charakteristisch ist ein sehr dynamischer Wechsel zwischen Wachsen (*rescue*) und Schrumpfen (*catastrophe*) am Plus-Ende der Filamente. (B) Aktin ist ein globuläres Protein, das mit Hilfe von ATP-Hydrolyse in langen Ketten polymerisiert. Diese helikal ineinander gewundenen Aktin-Filamente sind wie Mikrotubuli polar mit einem Plus- und einem Minus-Ende. (C) Intermediärfilamente werden aus antiparallel angeordneten Proteinen gebildet. Dabei lagern sich Tetramere zu sogenannten ULFs (*unit length filament*) zusammen, die wiederum durch Anlagerung unpolare Filamente ausbilden. (A-C) Modifiziert nach (Mostowy und Cossart, 2012). (D) Das Minus-Ende von Mikrotubuli sitzt am sogenannten Mikrotubuli-Organisationszentrum (MTOC), das γ -Tubulin enthält (Steinberg, 2007b).

1.3 Das Mikrotubuli-Zytoskelett in *U. maydis*

Viele pathogene Pilze wie das Humanpathogen *Candida albicans* oder das Pflanzenpathogen *U. maydis* vollziehen einen phänotypischen Wandel von einem Hefe-artigen Stadium zur filamentös wachsenden Hyphe, der eine komplette Umorganisation des Zytoskeletts notwendig macht (Kron und Gow, 1995). Im Kontrast zu Aktin-Filamenten unterstützen Mikrotubuli in diesen Organismen den Langstreckentransport innerhalb der Zelle und bestimmen so die Richtung des Zellwachstums (Nabi, 1999). In *U. maydis* sind Aktin-Filamente notwendig für viele Prozesse, unter anderem für das Wachstum Hefe-artiger Sporidien und Zell-Zell-Fusion, wohingegen sie beim intrazellulären Langstreckentransport keine Rolle spielen (Fuchs *et al.*, 2005).

In *U. maydis* setzen sich Mikrotubuli aus dem α -Tubulin Homolog Tub1 und den β -Tubulinen Tub3 und Tub4 zusammen (*tub1*: UMAG_01221; *tub3*: UMAG_10558, *tub4*: UMAG_05828, Shiel, 2014). Die *in vivo* Beobachtung von GFP-markierten Mikrotubuli in *U. maydis* ergab vier unterschiedliche Klassen (Abb. 3): (1) Lange

Spindelpolkkörper unabhängige Mikrotubuli: diese sind während der Interphase detektierbar und normalerweise Teil von Mikrotubuli-Bündeln. (2) kurze Spindelpolkkörper unabhängige Mikrotubuli (1-5 μm), die keinen Kontakt/Verbindung zu anderen Mikrotubuli haben und oft schnelle Ortswechsel vollziehen. (3) Spindelpolkkörper und astrale Mikrotubuli, die während der Mitose in das Zytoplasma reichen. (4) Spindel Mikrotubuli (Steinberg *et al.*, 2001). In *U. maydis* unterschieden sich die Wachs- und Schrumpfgeschwindigkeit der Mikrotubuli zwischen haploiden Sporidien und Filamenten nicht (Steinberg *et al.*, 2001). Einzelne Mikrotubuli und Mikrotubuli-Bündel krümmen sich (*bending*) und verändern dadurch häufig ihre Position innerhalb der Zelle. (Steinberg *et al.*, 2001). Interphasezellen weisen normalerweise 2-5 lange filamentöse Strukturen auf, die als Mikrotubuli-Bündel bezeichnet werden. Innerhalb dieser Bündel sind die Mikrotubuli Hyphen antipolar zu beiden Zellenden angeordnet (Lenz *et al.*, 2006), die Nukleationsstellen befinden sich im Zytoplasma (Steinberg, 2007b; Abb. 3A+B). Beim Eintritt in die G2-Phase mit beginnendem Wachstum der Tochterzelle lagern sich die meisten der Nukleationsstellen am Sprosshals an, die Mikrotubuli sind von diesem Zeitpunkt ab parallel zueinander angeordnet bis zum Ende der Mitosephase (Abb. 3A). Ab dem Eintritt in die G1-Phase kann wieder eine antipolare Mikrotubuli-Anordnung beobachtet werden (Steinberg, 2007b). Zur Stabilisierung der Mikrotubuli Plus-Enden interagieren diese mit verschiedenen Proteinen wie zum Beispiel Mitglieder der EB-Familie, welche zwischen Hefe und Mensch hochkonserviert sind (Tirnauer und Bierer, 2000). Ein Vertreter davon ist *peb1* (*plus end binding 1*), das wachsende Mikrotubuli-Enden markiert und verschwindet sobald die MT wieder schrumpfen (Straube *et al.*, 2003). Neben den Plus-End-Bindeproteinen gibt es noch viele weitere Mikrotubuli-assoziierte Proteine (MAP). Diese werden zwar unter dem Begriff MAP zusammen gefasst, erfüllen aber durchaus divergente Aufgaben und umfassen neben den Motorproteinen auch Proteine zur Stabilisierung, Plus- oder Minusend-Bindung, Quervernetzung oder Nukleation neuer Mikrotubuli (Alfaro-Aco und Petry, 2015).

Die Minusenden der Mikrotubuli werden stabilisiert durch Kontakt zum perinukleär gelegenen Mikrotubuli-Organisationszentrum (MTOC), das in Wirbeltieren Zentrosom (Kirschner, 1978) und in Pilzen Spindelpolkkörper (SPK) genannt wird. Das MTOC enthält eine besondere Tubulin-Isoform, das γ -Tubulin, welches zuerst in *Aspergillus nidulans* beschrieben wurde, jedoch auch in vielen weiteren Eukaryoten identifiziert werden konnte (Oakley und Oakley, 1989, Joshi, 1994). γ -Tubulin wird benötigt für die Mikrotubuli-Nukleation an den Zentrosomen und am Spindelpolkkörper (Oakley *et al.*, 1990, Horio *et al.*, 1991, Joshi *et al.*, 1992, Felix *et al.*, 1994). Mikrotubuli

Einleitung

müssen nicht zwingend an MTOCs gebildet werden, in *A. nidulans* können sie beispielsweise an Septen entstehen (Veith *et al.*, 2005b, Zekert *et al.*, 2010). Auch in *U. maydis* gibt es MTOC-unabhängige Mikrotubuli, die im Zytoplasma entstehen (Wedlich-Söldner *et al.*, 2000, Steinberg *et al.*, 2001, Wedlich-Söldner *et al.*, 2002; Abb. 3A+B). Es gibt in Eukaryoten ein bis drei Gene, die für γ -Tubulin codieren (Findeisen *et al.*, 2014). Tub2, das γ -Tubulin in *U. maydis* (UMAG_03803) besteht aus 455 AS, enthält zwei Introns und teilt die größte Sequenzidentität mit dem γ -Tubulin aus *S. pombe* (72 %) (Straube *et al.*, 2003). Tub2 lokalisiert während der Interphase in einem Punkt direkt am Zellkern. Vor der Mitose verdoppelt sich diese Struktur und ist während der gesamten Mitose mit den Spindelpolkörpern assoziiert (Straube *et al.*, 2003) (Abb. 4D/E). Tub2 konnte während der Interphase auch im Zytoplasma lokalisiert werden, eine mögliche Erklärung könnte eine Rolle von γ -Tubulin bei der Nukleation von MT ausgehend von nicht-zentrosomalen Stellen sein (Straube *et al.*, 2003, Chabin-Brion *et al.*, 2001, Heitz *et al.*, 2001). Denkbar wäre auch eine Funktion als Minus-End-Kappe für freie oder beschädigte Mikrotubuli, um sie vor Depolymerisierung vom Minus-Ende her zu schützen (Wiese und Zheng, 2000). Die Konzentration von γ -Tubulin am Spindelpolkörper wird am höchsten beim Eintritt in die Mitose, wenn die verdoppelten Spindelpolkörper aktiv werden und die Bildung der Spindel und der astralen Mikrotubuli initiieren.

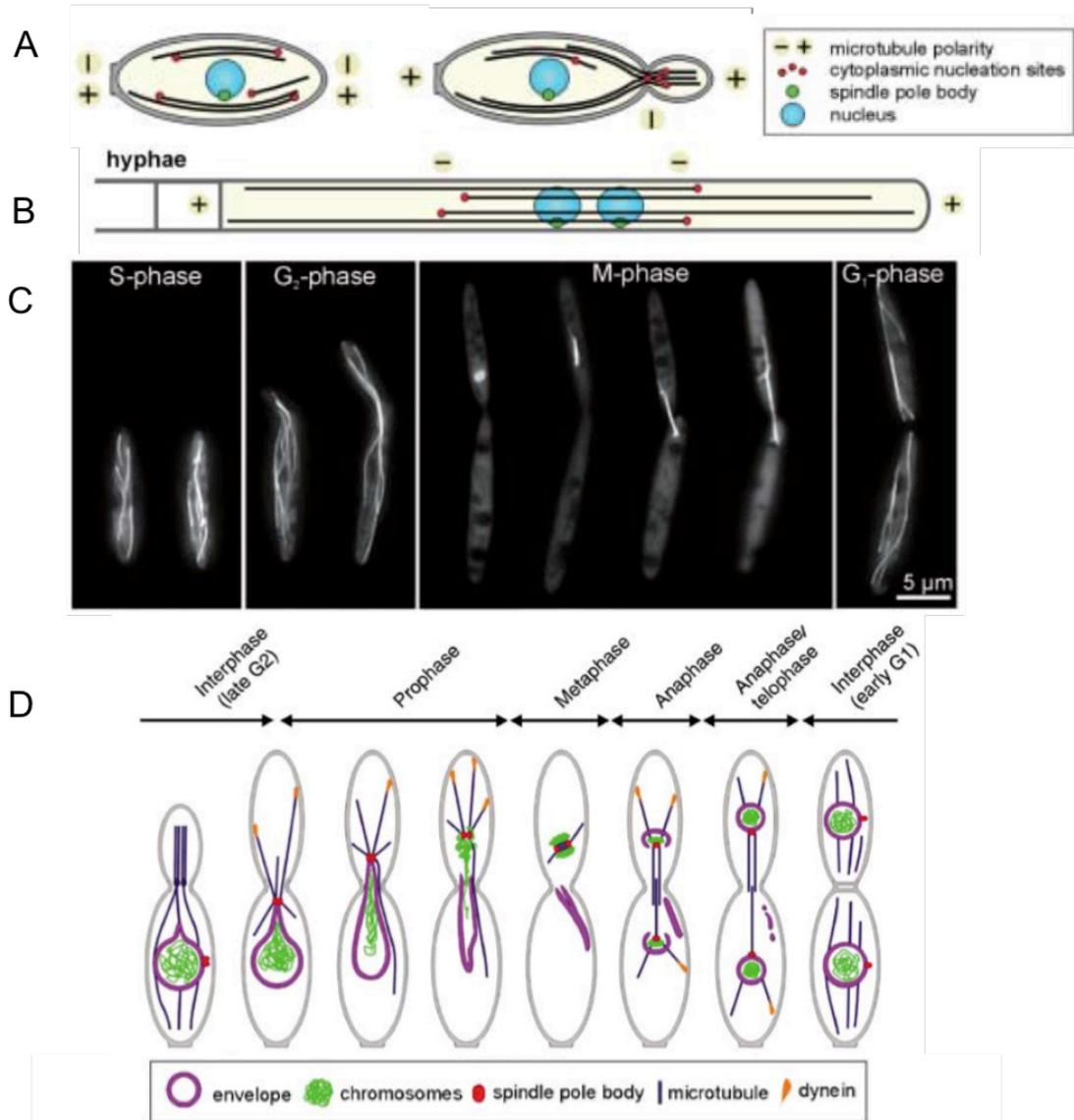


Abb. 3: Der Zellzyklus in *U. maydis*. (A/B) Mikrotubuli sind während der Interphase und im Filament antiparallel angeordnet, da sie an Nukleationsstellen im Zytoplasma entstehen können. Beim Eintritt in die G₂-Phase werden sie parallel am Sprosshals ausgerichtet, der Spindelpolkörper (SPK) ist zu diesem Zeitpunkt noch inaktiv. (C) Während der Interphase sind in Sporidien 2-5 Mikrotubuli-Bündel sichtbar. Beim Eintritt in die Mitose kondensieren die Mikrotubuli zusammen mit dem SPK und wandern in die Tochterzelle ein, wo der SPK sich teilt und das Zentrum von je einem der Mitosespindelpole bildet. In der G₁-Phase wird ein Septum zwischen Mutter- und Tochterzelle gebildet und die antiparallele Mikrotubuli-Ordnung wird wieder hergestellt. Gezeigt sind fluoreszent-markierte Mikrotubuli, modifiziert nach (Steinberg, 2007b) (D) Während der späten G₂-Phase wird der SPK aktiviert und führt zur Nukleation von Mikrotubuli, die in die Tochterzelle hinein reichen. Die Kernmembran wird dadurch in die Länge gezogen und die kondensierten Chromosomen wandern so in die Tochterzelle ein. Durch die angewendete Kraft wird die Kernmembran permeabel, reißt schließlich und wird in der Mutterzelle zurück gelassen. Während der Anaphase erscheinen neue Kernmembranen an den distalen Polen der Spindel um die Chromosomen herum. In der Telophase schließt sich die Kernhülle, die Chromosomen decondensieren wieder und der SPK wird wieder inaktiviert. Nach (Straube *et al.*, 2005).

Einleitung

Entlang der Mikrotubuli findet ein aktiver gerichteter Transport vermittelt von Motorproteinen statt. Diese sind in zwei Klassen unterteilt: die Kinesine und Dyneine. Die Motoren verwenden die Mikrotubuli als eine Art Schiene und bewegen sich bidirektional entlang dieser. Kinesin-3 (Kin3, UMAG_06251) läuft zum Plus-Ende der Mikrotubuli, Dynein vom Zellpol in Richtung des Minusendes. Die Geschwindigkeit von Kin3-Fusionsproteinen lag bei $2,87 \pm 0,19 \mu\text{m/s}$ (Wedlich-Söldner et al., 2002). Dynein ist ein Komplex aus den zwei Polypeptiden Dyn1 und Dyn2. Diese codieren für die schwere Kette von Dynein (*dynein heavy chain*), Dyn1 enthält die ATPase-Region und Dyn2 codiert für den C-terminalen Bereich inklusive der Mikrotubuli-Bindestelle (Straube et al., 2001).

Die Polarität der Zellen wird durch den bidirektionalen Langstreckentransport bestimmt, da für das Spitzenwachstum notwendige Komponenten von Motorproteinen an die Plus-Enden der Mikrotubuli transportiert werden. In der Hyphenspitze befindet sich der Spitzenkörper, in dieser Vesikel-reichen Zone sammeln sich Vesikel für die Exozytose (Bartnicki-Garcia et al., 1995). Daneben befinden sich auch Ribosomen in diesem Bereich, was auf eine lokale Translation von Proteinen in der Hyphenspitze hindeutet (Steinberg, 2007a). In *U. maydis* konnte gezeigt werden, dass das RNA-Bindeproteine Rrm4 zusammen mit mRNA-haltigen mRNPs (*messenger ribonucleoprotein*) auf frühen Endosomen mit Kin3 und Dynein innerhalb der Zelle und zur Hyphenspitze transportiert werden, was diese Vermutung unterstützt (Baumann et al., 2012). In Der Spalt- und Bäckerhefe sowie in *A. nidulans* sind darüber hinaus Zellendmarker bekannt, die zur Aufrechterhaltung der Polaritätsachse beitragen (Fischer et al., 2008a).

Damit Dynein an das Plus-Ende der Mikrotubuli gelangt, wird es vom konventionellen Kinesin-1 (Kin1) dahin transportiert (Ligon et al., 2004, Zhang et al., 2003, Lenz et al., 2006), wo es akkumuliert (*dynein loading zone*) um dort oder auch in subapikalen Teilen der Zelle die Endosomen aufzuladen (Lenz et al., 2006, Schuster et al., 2011a). Kinesin-1, das konventionelle Kinesin ist ein ATP-abhängiges Motorprotein, das den unidirektionellen Transport von Membrankompartimenten entlang von Mikrotubuli vermittelt (Brady, 1985, Scholey et al., 1985, Vale et al., 1985). In *U. maydis* spielt Kin1 (UMAG_04218) außer beim Transport von Dynein eine Rolle beim Krümmen (*bending*) der MT, Assemblierung der mitotischen Spindel, Vermittlung von Mikrotubuli-Mikrotubuli Interaktion, Unterstützung der Motilität von Interphase Mikrotubuli und Funktion beim Bündeln von Mikrotubuli (Steinberg et al., 2001, Straube et al., 2006). Die Deletion führt zu starken Defekten des polaren Wachstums und intrazellulären Prozessen (Lehmler et al., 1997, Steinberg et al., 1998) sowie einer starken Reduktion der Mikrotubuli-Bündelung (Straube et al.,

2006). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass Kin1 mit Kernporen interagiert und eine Rolle bei deren Bewegung hat (Steinberg *et al.*, 2012).

1.4 Die Mitose-Spindel

Die Segregation der Chromosomen stellt den zentralen Vorgang der Mitose dar und wird in allen eukaryotischen Zellen von der Mitose-Spindel vermittelt. Die Spindel besteht aus bipolar angeordneten Mikrotubuli, die während der Anaphase Schwesterchromatide in die gegenüberliegenden Enden der Zelle auseinanderzieht, wo diese wieder in Zellkerne verpackt werden (Abb. 4A). Die Minus-Enden der Mikrotubuli sitzen an den Spindelpolen von denen sie in einer radiären Anordnung ausgehen. Die Plus-Enden der interpolaren Mikrotubuli überlappen mit denen des zweiten Pols, was zu einer antiparallelen Anordnung der Mikrotubuli zwischen den beiden Spindelpolen führt. Die Plus-Enden der Kinetochor-Mikrotubuli binden an die Kinetochoren der Schwesterchromatide. Die dritte Klasse, die astralen Mikrotubuli, umgeben die Spindelpole rundherum und bilden so einen Kontakt zum Zellkortex um die richtige Positionierung zu gewährleisten. In tierischen Zellen sind die Spindelpole am Zentrosom lokalisiert, ein Protein-Organell, das aus der perizentriolaren Matrix und einem Paar Zentriolen im Inneren besteht und nicht membrangebunden ist. Neben vielen Bestandteilen wie Mikrotubuli-abhängigen Motorproteinen enthält die Matrix γ -Tubulin Ring-Komplexe, die für die Nukleation von Mikrotubuli verantwortlich sind. Die Funktion der Spindel hängt von Mikrotubuli-abhängigen Motorproteinen ab, besonders Kinesin-5, Kinesin-14, Kinesin-4, Kinesin-10 und Dynein sind von spezieller Wichtigkeit. Kinesin-5 bindet an interpolare Mikrotubuli und enthält zwei Motordomänen, die mit Mikrotubuli interagieren (Sharp *et al.*, 1999). Durch Bewegung in Richtung der Plus-Enden im Bereich zwischen den Spindelpolen (*spindle mid-zone*) werden diese auseinander gedrückt. Kinesin-14 hingegen weist nur eine Motordomäne auf, ist jedoch trotzdem in der Lage durch Bindung interpolare Mikrotubuli quer zu vernetzen oder durch Minus-End gerichtete Bewegung die Spindelpole näher aneinander zu ziehen. Die Kinesine 4 und 10 werden Chromokinesine genannt, sie binden Chromosomen und vergrößern durch Plus-Ende gerichtete Bewegung die Entfernung von den Polen. Dynein ist in der Lage die Plus-Enden astraler Mikrotubuli mit Komponenten des Aktin Zytoskeletts zu verbinden, um diese am Zellkortex zu verankern und durch Bewegung zum Minus-Ende die Spindelpole weiter auseinander zu ziehen (O'Connell und Wang, 2000, Grill *et al.*, 2003; Abb. 4B).

Einleitung

In Hefen und filamentösen Pilzen ist der Spindelpolkörper das funktionelle Äquivalent des Zentrosoms. In der Bäcker- und Spalthefe liegt dieser Multiproteinkomplex eingebettet in die Kernmembran, die während der Mitose intakt bleibt (Kilmartin, 2014, Lin *et al.*, 2015). Im Gegensatz dazu sind die MTOCs von *U. maydis* und *A. nidulans* zytoplasmatisch lokalisiert (Straube *et al.*, 2003, Veith *et al.*, 2005b, Fink und Steinberg, 2006). In *A. nidulans* gibt es auch MTOCs an Septen (Veith *et al.*, 2005), die Spindel in *A. nidulans* werden über astrale Mikrotubuli zu beiden Seiten an ihrem Platz gehalten (Fischer *et al.*, 2008b).

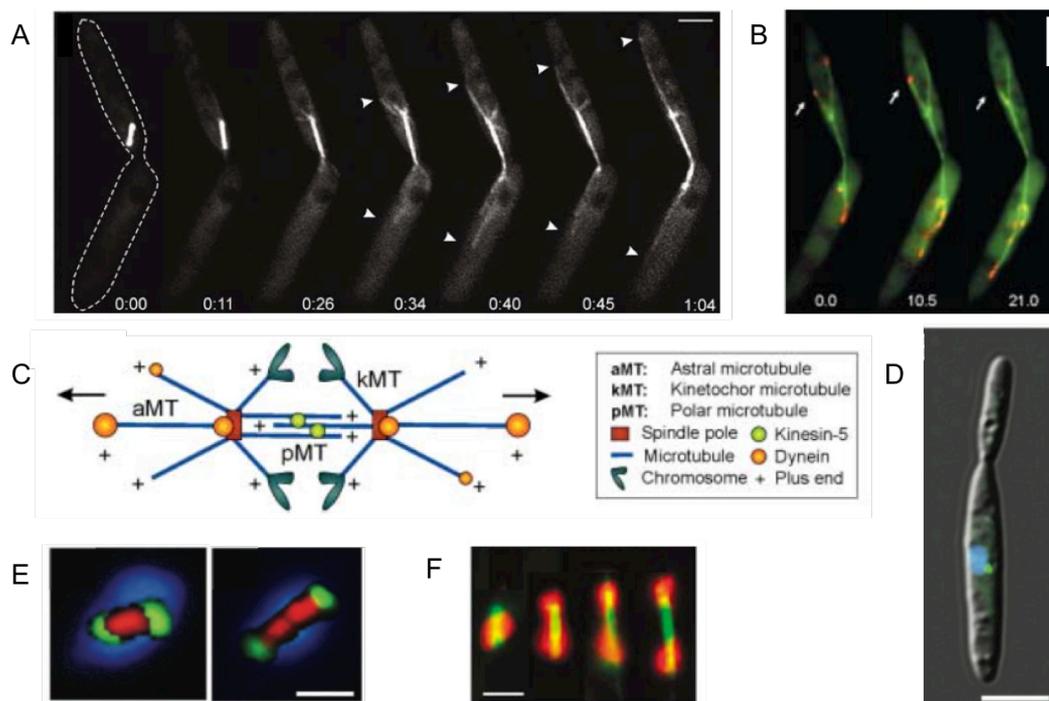


Abb. 4: Die Mitose-Spindel in *U. maydis*. (A) Gezeigt ist die Zeitreihen-Aufnahme einer Mitosespindel, mit GFP-markiertem α -Tubulin. Die astralen Mikrotubuli sind mit Pfeilen gekennzeichnet, die Umrisse der Zelle sind mit einer gestrichelten Linie markiert. Der Maßstabsbalken entspricht 3 μ m. (B) Dynein (rot) stellt während der späten Anaphase (Anaphase B) die Verbindung zwischen Zellkortex und astralen Mikrotubuli (grün) her und hilft unter Anwendung von Zugkraft die Spindelpole auseinander zu bewegen. Gezeigt ist eine Überlagerung von GFP-markierten Mikrotubuli und RFP-markiertem Dynein. Der Maßstabsbalken entspricht 5 μ m. (C) Neben Dynein sind auch Kinesin-5 Motorproteine in die Auseinanderbewegung der Spindel involviert, die zwischen den Spindelpolen auf den sogenannten polaren Mikrotubuli sitzen. Das Modell zeigt alle bisher bekannten beteiligten Komponenten. (B/C) nach (Steinberg, 2007b). (D) Tub2 (grün), das γ -Tubulin von *U. maydis*, sitzt am inaktiven SPK direkt assoziiert mit dem Zellkern (blau). Gezeigt ist eine Überlagerung von Tub2-GFP und dem Zellkern visualisiert durch DAPI-Färbung. Maßstabsbalken: 5 μ m. (E) Tub2 (grün) lokalisiert am Spindelpolkörper. Gezeigt ist die Teilung des SPK während der Metaphase, die Mikrotubuli (rot) werden von den sich auseinander bewegenden Spindelpolen in die Länge gezogen. Gezeigt ist eine Überlagerung von Tub2-GFP, roten Mikrotubuli und DNA in blau. Maßstabsbalken entspricht 1 μ m. (D/E) nach (Straube *et al.*, 2003). (F) Mikrotubuli (grün) werden bei der Teilung der Chromosomen (rot) in die Länge gezogen, bevor die unterschiedlichen Spindel-Mikrotubuli ausgebildet werden. Gezeigt ist eine Überlagerung in Falschfarben von YFP-Tub1 (grün) und dem Chromosomenmarker CFP-H4 (rot), Maßstabsbalken 2 μ m (A/F) nach (Fink *et al.*, 2006).

Zu Beginn der Mitose von *U. maydis* kondensiert die DNA und die zytoplasmatischen Mikrotubuli lösen sich auf. Die Spindelpolkörper wandern mit den kondensierten Mikrotubuli in die knospende Tochterzelle (Abb. 4D), dabei wird die Zellkernmembran abgestülpt (Straube *et al.*, 2005) (Abb. 3D). In der frühen Anaphase beginnt die Elongation der Spindel in der Tochterzelle und läuft zuerst langsam ab ($1,23 \pm 0,18 \mu\text{m min}^{-1}$), in diesem Schritt werden die Chromosomen getrennt (Fink *et al.*, 2006; Abb. 4A), es werden drei bis fünf kurze astrale Mikrotubuli ausgebildet, die mit dem Zellkortex in Verbindung stehen und als Anker für die Spindel fungieren (Abb. 4B+C). Nachdem die Spindel eine Größe von $1,5\text{-}2 \mu\text{m}$ erreicht hat, steigert sich die Bewegungsgeschwindigkeit stark ($5,34 \pm 0,14 \mu\text{m min}^{-1}$). Ab diesem Zeitpunkt können auch lange astrale Mikrotubuli an beiden Spindelpolen beobachtet werden, die im Kontakt zum Zellkortex stehen, welche in die Mutter- und Tochterzelle hinein reichen (Fink *et al.*, 2006). Es verbleibt eine Brücke aus Mikrotubuli, die die beiden Zellkerne miteinander verbindet, während astrale Mikrotubuli an den Spindeln ziehen und so eine laterale Bewegung verursachen. Je größer der Abstand zwischen den Zellkernen wird, desto flexibler wird auch die verbindende Brücke (Steinberg *et al.*, 2001). Während die Zellkerne wieder im Zentrum der Zellen positioniert werden, stehen die astralen Mikrotubuli noch im Kontakt zum Zellkortex (Steinberg *et al.*, 2001). Anschließend depolymerisieren die astralen Mikrotubuli und die Spindelpolkörper-unabhängigen Mikrotubuli-Bündel erscheinen wieder (Steinberg *et al.*, 2001).

In *U. maydis* ist die frühe Elongation der Spindel abhängig von Kinesin-5, während Dynein eine Rolle bei der späteren schnellen Bewegung der Spindel an den Plus-Enden der astralen Mikrotubuli spielt (Fink *et al.*, 2006). Kin5 lokalisiert zuerst entlang der Anaphase-Spindel (Anaphase A) und konzentriert sich danach in dem Bereich zwischen den Spindeln (*spindle mid-zone*) und an den Spindelpolen (Anaphase B), bis die astralen Mikrotubuli eine gewissen Länge erreichen ($<7 \mu\text{m}$). Mit Hilfe von Kin5 werden die Mikrotubuli und somit die Spindeln voneinander weg geschoben (Fink *et al.*, 2006). Dynein hingegen akkumuliert an den Enden kurzer und langer astraler Mikrotubuli, wird am Zellkortex abgeladen und zieht von dort aus die Spindeln weiter in die Mutter- und Tochterzelle hinein (Fink *et al.*, 2006) (Abb. 4B).

1.5 Intrazelluläre Transportprozesse

Jede Zelle ist den Einflüssen der Umwelt ausgesetzt und muss in der Lage sein schnell auf eine Änderung der äußeren Bedingungen zu reagieren. Aus diesem Grund wird die Zusammensetzung der Plasmamembran und der inneren Kompartimente ständig angepasst. In eukaryotischen Zellen knospen Transportvesikel von einer Membran ab und fusionieren wiederum mit einer anderen, um die Fracht, die sie in ihrem Lumen enthalten, durch die Zelle zu befördern. Über den sekretorischen Signalweg werden neu gebildete Proteine und andere Moleküle zur Plasmamembran oder in den extrazellulären Raum geliefert, diesen Prozess nennt man Exozytose. Bei der Endozytose dagegen werden Komponenten aus dem extrazellulären Raum oder aus der Plasmamembran in die Zelle aufgenommen, indem diese sich einstülpt und schließlich abschnürt. Die meisten der endozytotischen Vesikel fusionieren dann mit einem Kompartiment, welches frühes Endosom genannt wird. Hier wird die Fracht der Vesikel sortiert und in andere Endosomen verpackt: entweder zum Weitertransport innerhalb der Zelle oder zum Recycling oder dem Abbau. Eine typische Transport-Reaktion kann als ein vierstufiger Prozess angesehen werden: Die Bildung eines Vesikel oder einer tubulären Struktur, die Bewegung dieser Struktur zur Ziellmembran wo sie an die Akzeptor-Membran andockt (*tethering und docking*) und letztlich die Fusion der Lipiddoppelmembranen (Zerial und McBride, 2001). Bei diesen Vorgängen spielt die Spezifität der Membran-Erkennung für die Bindung (*tethering*) und Fusion eine kritische Rolle, um die Identität der Organellen zu bewahren und die richtige Verteilung der Fracht innerhalb der Zelle zu gewährleisten. Zentrale Begriffe in der Literatur zum Thema intrazelluläre Transportprozesse sind die Begriffe *tethering* und *docking*, leider fällt es schwer diese scharf voneinander zu trennen, da es sich um den gleichen Vorgang der Anhaftung eines Endosoms an eine Ziellmembran handelt. Um den geordneten Fluss von Transportvesikeln garantieren zu können, muss die Erkennung der Ziellmembran durch die Vesikel extrem akkurat ablaufen. Die Spezifität einer Membran wird durch Oberflächenmarker gewährleistet, anhand dessen die Herkunft und Fracht identifiziert werden kann. Der erste spezifische Schritt ist die Rab-vermittelte Bindung eines Vesikels an das korrekte Ziel-Organell. Frühe Endosomen binden die kleine GTPase Rab5, die gemeinsam mit ihren Effektoren die Biogenese, Membranfusion und Mikrotubuli-abhängige Bewegung kontrolliert (Zerial und McBride, 2001). Rab GTPasen bilden die größte Familie aus kleinen, monomerischen GTPasen (Zerial und McBride, 2001), die für die Identität von Membranen essenziell sind und Teilung, Entpacken, Bewegung und Fusion von

Vesikeln mit Hilfe ihrer Effektoren vermitteln. Rab GTPasen fungieren als molekulare Schalter und alternieren zwischen zwei Konformationen: der GTP-gebundenen aktiven und der GDP-gebundenen inaktiven Form. GAPS (*GTPase activating proteins*) sind in der Lage durch Hydrolyse von GTP die Rab-Proteine zurück in den inaktiven, GDP-gebundenen Zustand zu überführen (Stenmark, 2009, Barr und Lambright, 2010). Hauptsächlich binden Effektoren jedoch Rab-Proteine im aktiven Stadium, nur wenige Beispiele sind bekannt für eine Bindung von Rabs in ihrer GDP-Form oder dass Effektoren keine Präferenz in der Bindung haben (Pfeffer, 2013). Rabs werden zu den Membranen in ihrer inaktiven Form gebracht, um erst dort von GEFs aktiviert zu werden (Ullrich *et al.*, 1994, Soldati *et al.*, 1994). Das Rab5 GEF-Protein Rabex5, in *S. cerevisiae* Vps9, könnte bereits auf endozytotischen Vesikeln gebunden sein vor der Fusion mit Endosomen (Carney *et al.*, 2006). Inaktive Rab Proteine binden an GDI (*Rab-GDP dissociation inhibitor*), um löslich im Zytoplasma zu bleiben.

Frühe Endosomen reifen zu späten Endosomen heran, die ihre Fracht zur Degradierung zu den Lysosomen oder in Pilzen zu den Vakuolen transportieren. Die zuständigen Marker verändern sich in diesem Vorgang mit. Rab5-Domänen werden auf endosomalen Membranen durch Rab7-Domänen ersetzt, da Rab7 andere Effektoren rekrutiert und bindet als Rab5 findet eine Umprogrammierung der Endosomen statt. Diesen Vorgang nennt man Rab-Kaskade. Die Rab-Proteine und Effektoren lenken die Vesikel zu einer spezifischen Stelle an der Zielmembran, wo dann die SNARE (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor*) Proteine und Regulatoren die Fusion der Membranen vermitteln. Wenn ein Endosom seine Zielmembran erkannt und angedockt hat, wird die Fracht durch Membranfusion entladen. SNARE-Proteine katalysieren die Membran-Fusion Reaktionen während des Vesikeltransports. Es gibt mindestens 35 verschiedene SNAREs in tierischen Zellen und jedes ist assoziiert mit einem speziellen Organell im endozytotischen oder sekretorischen Signalweg. Die Transmembranproteine bestehen aus komplementären Sets, den v-SNAREs, die sich in Vesikelmembranen befinden und den t-SNAREs, die in den Zielmembranen (*target membrane*) zu finden sind und welche hochspezifisch aneinander binden (Rothman, 1996). Die SNAREs bestehen aus helikalen Peptidketten (v-SNARE: 1 Protein, t-SNAREs: 3 Proteine), die sich bei gegenseitiger Bindung umeinander winden und ein stabiles 4-helikales Bündel bilden. Daraus entsteht der stabile trans-SNARE Komplex, der die beiden Membranen fest aneinander bindet.

Die beschriebenen Transportprozesse konnten auch in *U. maydis* und anderen filamentösen Pilzen wie *A. nidulans* aufgeklärt werden (zusammengefasst in

Einleitung

Penalva, 2010 und Steinberg, 2014). Der intrazelluläre Transport von Vesikeln wird in *U. maydis* von den Motorproteinen Kin3, Dynein und Kin1 vermittelt (Abb. 5). Der Transport von frühen Endosomen erfolgt durch Kin3 und Dynein, sekretorische Vesikel werden von Kin1 zur Hyphenspitze transportiert (Wedlich-Söldner *et al.*, 2002, Lenz *et al.*, 2006, Schuster *et al.*, 2012). Dynein und Kinesin-3 binden in höheren Eukaryoten und *A. nidulans* gleichzeitig an das zu transportierende Vesikel (Jolly und Gelfand, 2011, Egan *et al.*, 2012). In *U. maydis* binden frühe Endosomen, die in anterograde Richtung (Kin3) transportiert werden kein Dynein. Ein Wechsel der Transportrichtung kann auf zwei unterschiedliche Weisen stattfinden: jedes frühe Endosom bindet drei bis fünf Kin3-Moleküle, die es ermöglichen in einem antiparallelen Mikrotubuli-Bündel auf benachbarte Mikrotubuli zu wechseln (*hopping*) (Schuster *et al.*, 2011b). Als Adapter zwischen frühen Endosomen und Motorproteinen konnten in *A. nidulans* und *U. maydis* sogenannte Hook-Proteine identifiziert werden (Bielska *et al.*, 2014b, Zhang *et al.*, 2014).

Auch die aus höheren Eukaryoten bekannten Rab- und SNARE Proteine sind in *U. maydis* vorhanden und wurden als wichtige Marker für intrazelluläre Transportprozesse etabliert (Wedlich-Söldner *et al.*, 2000). In *U. maydis* gibt es zwei Rab5-Proteine: Rab5a (UMAG_10615) und Rab5b (UMAG_02485), Fuchs *et al.*, 2006, Higuchi *et al.*, 2014), ein weiteres Rab-Protein, das an frühe Endosomen bindet ist Rab4 (Higuchi *et al.*, 2014). Die Marker für späte und Recycling Endosomen, Rab7 (UMAG_05511) und Rab11 (UMAG_01651), sind in *U. maydis* vorhanden und funktionell (Higuchi *et al.*, 2014, Schneider, 2016). Für alle zellbiologischen Untersuchungen in dieser Arbeit wurde das Gen *rab5a* verwendet. Das Gen *yup1* (UMAG_05406) codiert für ein t-SNARE und lokalisiert mit motilen Organellen, die sich nach Aufnahme des endozytotischen Farbstoffs FM4-64 schnell entlang von Mikrotubuli bewegen. Aus diesem Grund konnten sie als frühe Endosomen (EE) identifiziert werden (Wedlich-Söldner *et al.*, 2000).

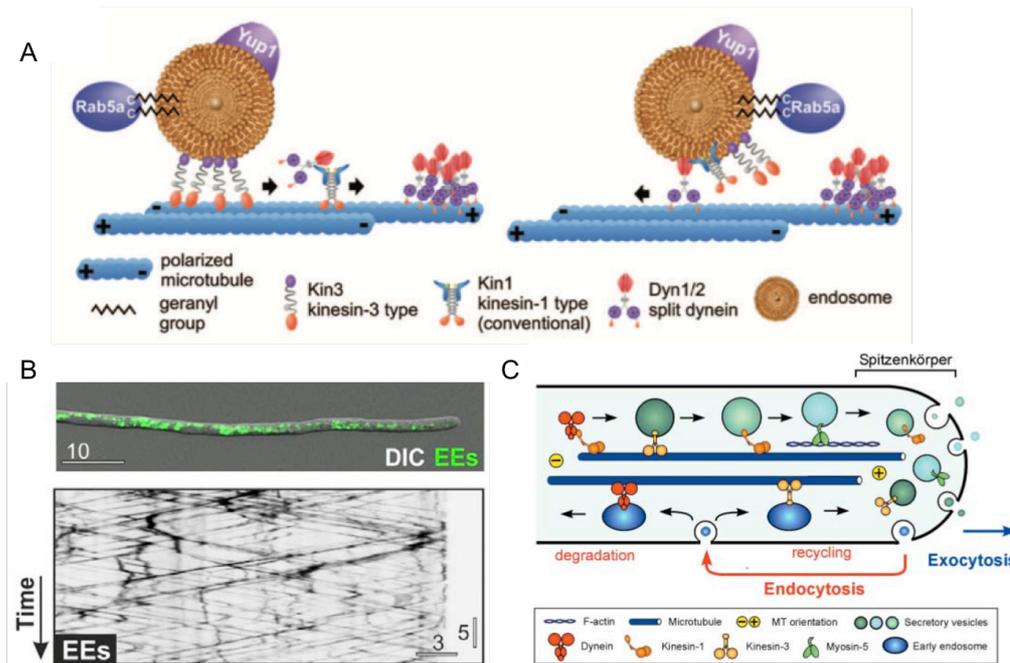


Abb. 5: Frühe Endosomen in *U. maydis* spielen eine zentrale Rolle während des intrazellulären Transports. (A) Der Transport erfolgt über die Motorproteine Kin3 (anterograd) und Dynein (retrograd) entlang von Mikrotubuli. Die kleine GTPase Rab5 bindet im aktiven Zustand an die Oberfläche von frühen Endosomen und ist essentiell für die Membranerkennung, ebenso wie das t-SNARE Yup1. Rab5 und Yup1 werden als Markerproteine für frühe Endosomen in *U. maydis* verwendet. Modell aus (Göhre *et al.*, 2012). (B) GFP-Rab5-markierte frühe Endosomen (*early endosomes* = EE) bewegen sich bidirektional entlang von Mikrotubuli, die Bewegung wurde gegen die Zeit aufgetragen in einem Kymograph. (Bielska *et al.*, 2014b). (C) Vereinfachte Darstellung einer Hyphenspitze von *U. maydis* und die bei der Endozytose involvierten Faktoren. Kin3 transportiert sekretorische Vesikel in Richtung der Plus-Enden der Mikrotubuli. Dynein wird von Kin1 zur Hyphenspitze transportiert, wo es frühe Endosomen auflädt und in Richtung der Mikrotubuli-Minus-Enden transportiert. Modell aus (Steinberg, 2007b).

1.6 Die Komplexe CORVET und HOPS vermitteln Membranfusion

Rab5 und Rab7 interagieren jeweils mit einem hexameren Komplex, dem endosomalen CORVET (*class C core vacuole/endosome tethering*) und dem spätendosomalen/lysosomalen HOPS (*homotypic fusion and protein sorting*) Komplex, die Membranfusion von Endosomen vermitteln (zusammengefasst in (Balderhaar und Ungermann, 2013), Abb. 6A). Klassifizierungen von Hefemutanten ergab, dass die Mutation der vier Proteine Vps11, Vps16, Vps18 und Vps33 in schweren Defekten der Endosomen-Biogenese und Vakuolenmorphologie resultierte (Banta *et al.*, 1988, Raymond *et al.*, 1992). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Proteine auch in mehrzelligen Tieren gemeinsam im endozytotischen Signalweg fungieren (Peterson und Emr, 2001). Diese vier Proteine fungieren jedoch in zwei unterschiedlichen Komplexen, dem CORVET und dem HOPS Komplex, was in Hefe und *A. nidulans* gezeigt werden konnte (Peplowska *et al.*, 2007, Seals *et al.*, 2000, Wurmser *et al.*, 2000, Abenza *et al.*, 2010, Abenza *et al.*, 2012). Die Komplexe

Einleitung

bestehen aus 4 Klasse C Kern-Komplex und spezifischen Untereinheiten, die deren Spezifität herstellen. Die Proteine Vps3 und Vps8 spezifizieren den Komplex zum sogenannten CORVET Komplex, wohingegen Vps39 und Vps41 zum HOPS Komplex führen (Balderhaar und Ungermann, 2013; Abb. 6B). Die Deletion dieser zusätzlichen Proteine hat keinen essentiellen Einfluss, woraus man eine gewisse funktionelle Redundanz der Komplexe vermuten könnte (zusammengefasst in (Balderhaar und Ungermann, 2013)). Die CORVET-Untereinheiten Vps3 und Vps8 enthalten Rab5-Bindestellen, während die HOPS-Proteine Vps 39 und Vps41 Bindestellen für Rab7 enthalten (in *A. nidulans*: Azena *et al.*, 2010, Azena *et al.*, 2012, für weitere Organismen: zusammengefasst in Balderhaar und Ungermann, 2013). Vps33, das in beiden Komplexen vorhanden ist, gehört zu einer Familie SNARE-interagierender Proteine (Sec1/Munc18, Seals *et al.*, 2000, Subramanian *et al.*, 2004). Auf Grund dessen wurde die Hypothese aufgestellt, dass HOPS und CORVET mit Rab-Proteinen an einer Membran und SNARE-Proteinen an der zweiten Membran interagieren (Ostrowicz *et al.*, 2010). CORVET ist in Hefe und *A. nidulans* ein Rab5-Effektor (Peplowska *et al.*, 2007, Azena *et al.*, 2010, Balderhaar *et al.*, 2013). In Hefe konnte eine Bindung von Vps3 und Vps8 an das Rab5-artige Vps21 gezeigt werden (Horazdovsky *et al.*, 1996, Plemel *et al.*, 2011). Die Deletion dieser Proteine führt zu einer Vergrößerung der Vakuolen in Hefe (Banta *et al.*, 1988, Raymond *et al.*, 1992). Vps3 und Vps8 benötigen aktivierte Rab5 Proteine für ihre Lokalisierung und Funktion (Cabrera *et al.*, 2013). Die Bindestellen legen nahe, dass es sich beim CORVET Komplex um einen *tethering*-Faktor handelt, der durch Bindung an Rab5 die homotypische Fusion von Endosomen vermittelt (Balderhaar *et al.*, 2013, Cabrera *et al.*, 2013). Der HOPS Komplex wurde in den letzten Jahren sehr intensiv studiert in Hefe, Säugerzellen, *Drosophila melanogaster* und *Caenorhabditis elegans*, wohingegen über den CORVET Komplex noch nicht sehr viel bekannt ist. Es scheint jedoch als hätten mehrzellige Organismen alle notwendigen Komponenten, um diese Komplexe auszubilden, so wird vorgeschlagen dass der human CORVET Komplex aus Vps11, Vps18, Vps8, hVps39-1, Vps16B und Vps33B besteht (Balderhaar *et al.*, 2013). Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden dass noch andere Varianten dieser Komplexe gebildet werden, analog zu den Hybrid-Komplexen in Hefe (Peplowska *et al.*, 2007).

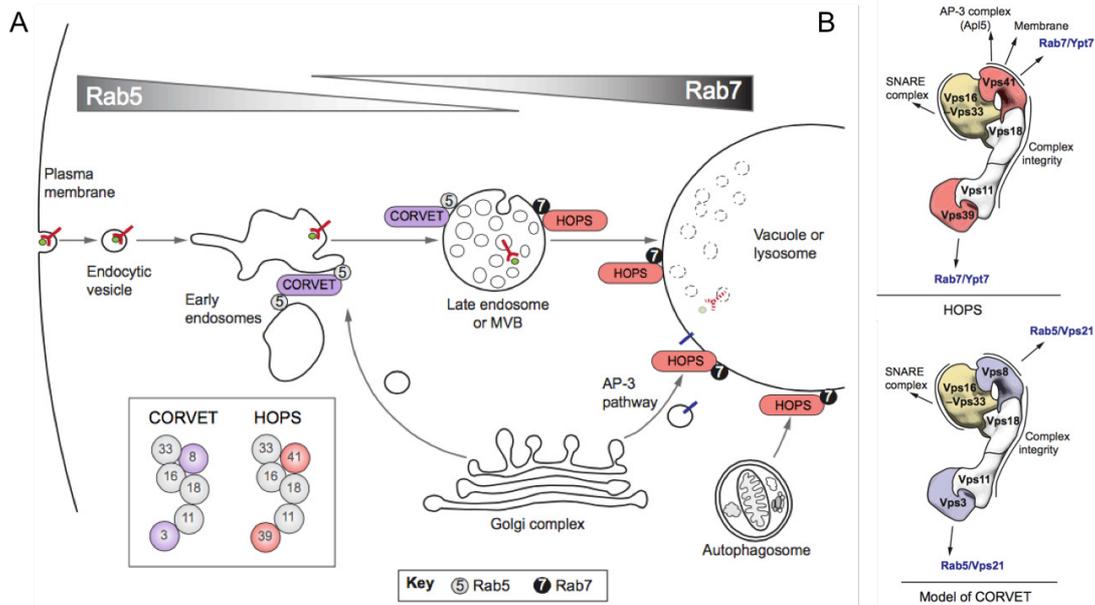


Abb. 6: CORVET und HOPS vermitteln Membranfusion verschiedener Endosomen-Populationen. (A) Diese schematische Darstellung beschreibt die Funktionsweise der Komplexe CORVET und HOPS. CORVET interagiert mit Rab5 und ist für die Bindung und Fusion (*tethering and fusion*) früher Endosomen verantwortlich, während HOPS ein Effektor von Rab7 ist und die Fusion später Endosomen vermittelt. (B) Die 3D-Struktur der Komplexe wurde in *S. cerevisiae* aufgeklärt. Beide Komplexe bestehen aus vier Klasse C-Untereinheiten (Vps11/18/16/33), HOPS (oben) enthält als zusätzliche Proteine Vps39 und Vps41, die spezifisch an Rab7 binden und CORVET (unten) enthält stattdessen Vps3 und Vps8, die in der Lage sind Rab5 zu binden. Modifiziert nach (Balderhaar und Ungermann, 2013).

1.7 Das Num1-Protein

Das Mikrotubuli Zytoskelett und intrazelluläre Transportprozesse sind eng miteinander verwoben, da der Langstreckentransport ein wichtiger Faktor für die Aufrechterhaltung der Zellpolarität ist. Ein in diesem Zusammenhang identifiziertes Gen ist *num1* (UMAG_01682). Num1 wurde erstmals im nah verwandten Basidiomyzeten *Coprinus cinereus* beschrieben, wo eine Funktion beim interzellulären Kerntransport (*nuclear migration*), welcher bei der Kreuzung von Zellen eine entscheidende Rolle spielt, postuliert wurde (Makino und Kamada, 2004). Das *U. maydis* Num1 weist eine Sequenzhomologie von 40% zu dem Protein aus *C. cinereus* auf und eine Homologie von 32% zum humanen BCAS2 (breast cancer amplified sequence 2), welches in humanen Brustkrebs Zelllinien verstärkt exprimiert wird und daher als Markergen verwendet wird (Nagasaki *et al.*, 1999). Neben BCAS2 ist das Protein in der Literatur als SPF27 bekannt, welches eine Kernkomponente des Spleißosom-assoziierten Prp19/CDC5L-Komplexes ist. Die Deletion von *num1* führt in axenischer Kultur zu keinem Phänotypen, ebenso sind die Kreuzung von kompatiblen Sporidien und die Infektion der Wirtspflanze nicht beeinträchtigt. In

Einleitung

Filamenten hingegen konnten deutlich Defekte des polaren Wachstums festgestellt werden. Die Hyphen waren verkürzt, kurvig, verzweigt und bipolar (Kellner *et al.*, 2014; Abb. 7A). Darüber hinaus konnte eine Delokalisierung der Septen und daraus resultierende inkorrekte Kompartimentierung der Filamente gezeigt werden (Kellner *et al.*, 2014). Der bidirektionale Transport Yup1-markierter früher Endosomen kam zum Erliegen durch die *num1*-Deletion (Kellner *et al.*, 2014; Abb. 7C). Als Interaktionspartner von Num1 konnten in einer Hefe-Zwei-Hybrid Analyse Proteine mit zytoplasmatischer Lokalisierung identifiziert werden (Kellner, 2009). Neben dem Mikrotubuli-assoziierten Kinesin-1 Motorprotein und dem bis dahin nicht charakterisierten UMAG_00933 (Nma1, Pinter, 2012) wurde UMAG_10958, ein Protein das während der Mitose an den Spindelpolkörpern bindet und das möglicherweise während der Endozytose bedeutende UMAG_03539 isoliert (Kellner, 2012). Darüber hinaus wurde Cef1, eine weitere Komponente aus dem Spleißosom-assoziierten Prp19/Cdc5L-Komplex identifiziert (Kellner, 2009). Der Prp19/CDC5- oder NineTeen Komplex (NTC) ist eine essentielle Komponente während des prä-mRNA Spleißens und für beide Schritte der Intron-Entfernung in allen beschriebenen Organismen hoch konserviert (Hogg *et al.*, 2010), Tarn *et al.*, 1993). In weiterführenden Untersuchungen zur Funktion des Num1-Proteins in *U. maydis* konnte die Interaktion mit den *U. maydis* Homologen von Cef1 (UMAG_04411, entspricht CDC5L) und Prp19 (UMAG_10027) bestätigt werden (Kellner, 2012, Kellner *et al.*, 2014). Daneben konnte auch gezeigt werden, dass es sich bei Cef1 und Prp19 wie in Hefe (Cheng *et al.*, 1993, Chen *et al.*, 1999) auch in *U. maydis* um essenzielle Faktoren handelt (Ort, 2011). Somit konnte bestätigt werden, dass das Num1-Protein in *U. maydis* eine strukturelle Komponente des Spleißosom-assoziierten NTC ist und impliziert, dass Num1 dieselbe Rolle in *U. maydis* wie SPF27 in *H. sapiens* erfüllt. Dies ließ vermuten, dass die zu beobachtenden Phänotypen in $\Delta num1$ -Mutanten einem durch die Deletion entstehenden Spleiß-Defekt zu Grunde liegen könnten. Aus diesem Grund wurde in vorhergehenden Studien (Kellner, 2012) eine Genom-weite Transkriptomanalyse (mRNA-Seq) durchgeführt, um zu überprüfen, ob Num1 tatsächlich einen Einfluss auf das korrekte Spleißen von prä-mRNA ausübt. In $\Delta num1$ -Stämmen konnte eine erhöhte Intron-Retentionsrate von ca. 80% festgestellt werden das bewies, dass es sich bei Num1 um einen globalen Spleiß-Faktor handelt (Kellner *et al.*, 2014). Im Gegensatz zum humanen System handelt es sich bei Num1 in *U. maydis* nicht um einen essentiellen Faktor. Die Liste von interagierenden Proteinen schlägt eine einzigartige Verbindung eines Spleiß-Faktors zu einer möglichen zweiten zytoplasmatischen Funktion vor (Kellner *et al.*, 2014).

Die Expression eines Num1-Fusionsproteins mit GFP ergab eine klare Lokalisierung im Zellkern, es konnten jedoch auch schwache Signale im Zytoplasma wahrgenommen werden (Abb. 7D). Diese waren selten als deutliche Strukturen zu erkennen, die Fluoreszenz war jedoch so stark, dass es nicht als Autofluoreszenz interpretiert wurde. Die Interaktion von Num1 und Kin1 konnte über verschiedenen Techniken wie einem direkten Hefe-Zwei-Hybrid Test und sowohl *in vitro* als auch *in vivo* durch Co-Immunopräzipitation bestätigt werden (Kellner *et al.*, 2014). Die Deletion von *num1* beziehungsweise *kin1* führte zu überlappendenden Phänotypen wie bipolarem Wachstum und einer Fragmentierung der Vakuolen, was weitere Hinweise darauf gibt, dass die Proteine in einem funktionellen Zusammenhang zueinander stehen (Kellner *et al.*, 2014; Abb. 7B). Eine Co-Lokalisation von Num1- und Kin1-Fusionsproteinen ist jedoch nicht möglich, da Kin1 im gesamten Zytoplasma lokalisiert (nicht veröffentlichte Experimente, Schuchardt *et al.*, 2005).

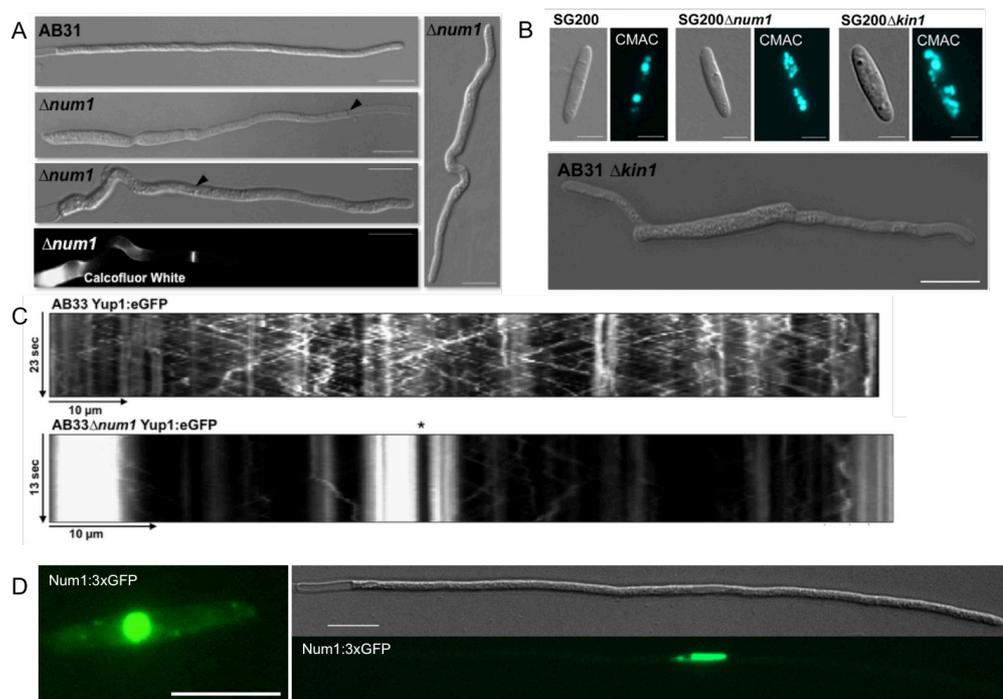


Abb. 7: Das Num1 Protein in *U. maydis*. (A) Die Deletion von *num1* in AB31 führt zu schweren morphologischen Defekten der Hyphen. Zellen wuchsen verkürzt, verdickt, verzweigt, kurvig und bipolar. Zusätzlich waren delokalisierte Septen detektierbar (Pfeil). Zellen wurden 12-14 h nach Induktion des bE/bW-Heterodimers mit Arabinose-haltigem Medium untersucht. (B) Es konnte eine Interaktion von Num1 und Kin1 gezeigt werden. Die Deletion dieser Gene führt zu überlappendenden Phänotypen bezüglich der Zellform und Vakuolenmorphologie. Maßstabsbalken entsprechen 5 μm . Filamente mit $\Delta kin1$ -Hintergrund zeigen nach 14-stündiger Induktion des bE/bW-Heterodimers einen bipolaren Phänotyp (Maßstabsbalken 10 μm aus Kellner, 2012). (C) Die Motilität von Yup1:GFP markierten frühen Endosomen im Wildtyp- und Deletionshintergrund wurde mit Hilfe von Kymographen ausgewertet. Die Analyse ergab eine drastische Reduktion der Endosomen-Bewegung in $\Delta num1$ -Filamenten. Eine Akkumulation der Endosomen fand an delokalisierten Septen (Stern) statt. Die Hyphen wurden 14 h in Arabinose-haltigem Medium induziert. (D) Das Num1:3xGFP Fusionsprotein lokalisiert in Sporidien und Filamenten vorherrschend im Nucleus. In Sporidien sind jedoch auch zytoplasmatische Aggregate sichtbar. Die Untersuchung des Filaments fand 14 h nach Induktion des bE/bW-Heterodimers statt. Abbildungen modifiziert aus (Kellner *et al.*, 2014).

1.8 Das Nma1-Protein

Das Nma1 Protein (UMAG_00933) wurde in einem Hefe-zwei-Hybrid Screen als Interaktionspartner von Num1 identifiziert (Kellner, 2009). Dieses Protein ist einzigartig im Genom von *U. maydis* und konnte in keinem anderen Organismus identifiziert werden. Die Fusion von Nma1 mit einem grün fluoreszierenden Protein zeigt eine Lokalisierung auf und eine bidirektionale Bewegung entlang von langen fibrillären Strukturen innerhalb des Zytoplasmas (Abb. 8A). Benomyl-Behandlung der Zellen führte zu einer Mislokalisierung des Nma1-Fusionproteins und die Co-Lokalisierung mit einem mCherry:Tub1 Fusionsprotein bestätigte, dass es sich bei der beobachteten Struktur um Mikrotubuli handelt (Pinter, 2012). Aus diesem Grund wurde UMAG_00933 *Num1-interacting microtubule-associated protein 1* genannt (Pinter, 2012). Die Deletion von *nma1* wirkte sich nicht auf das Wachstum in axenischer Kultur aus und die Infektion von Mais-Pflanzen mit Deletionsstämmen unterschied sich nur gering von infizierten Wildtypstämmen (Schneider, 2016). In Filamenten von Deletions-Mutanten konnte man delokalisierte Septen und eine erhöhte Zahl der Zellkerne zu beobachten (Pinter, 2012). Frühe Endosomen, die mit Yup1 markiert wurden, akkumulierten an diesen zusätzlichen, delokalisierten Septen, jedoch war die Bewegung der Vesikel nicht wesentlich beeinflusst (Kellner, 2012). Auch die Bewegung von Rab5-markierten frühen Endosomen wurde durch eine *nma1*-Deletion nicht stark beeinflusst, lediglich die Anzahl der sich bewegenden Endosomen war reduziert (Schneider, 2016). Das Nma1-Protein ist 1290 Aminosäuren groß und bioinformatische Analysen ergaben, dass es keinerlei Domänen aufweist, denen eine Funktion zugeordnet werden könnte. Die einzige strukturelle Ähnlichkeit, die über eine WoLF PSORT-Vorhersage identifiziert werden konnte, ist ApsB aus *A. nidulans*, jedoch handelt es sich in diesem Fall nur um 17% Identität (Pinter, 2012). Interessant an diesem Zusammenhang ist jedoch die Lokalisierung von ApsB am Spindelpolkörper. Bereits in Vorarbeiten konnte beobachtet werden, dass Nma1 während der Mitose eine Rolle spielt, da es über dem Zellkern kondensiert und an die Lokalisierung von Tub1 während der Ausbildung der Mitosespindel erinnert (Abb. 4F und 8B). Des Weiteren konnte während der Mitose eine Lokalisierung von Nma1 zwischen den Chromosomen und an den astralen Mikrotubuli detektiert werden, diese Beobachtung wurde jedoch noch nicht weiter untersucht (Pinter, 2015). Um weitere Einblicke in die Funktion von Nma1 zu erlangen, wurde eine Co-Immunopräzipitation mit anschließender Massenspektrometrie-Analyse durchgeführt, um Interaktionspartner zu identifizieren, dabei konnten als sehr eindeutige Treffer die Proteine UMAG_01668, UMAG_03820

und UMAG_05292 identifiziert werden. BLASTp-Analysen ergaben Homologien zu den CORVET-Komponenten Vps3, Vps11 und Vps18 aus *S. cerevisiae* (Pinter, 2015) (Abb. 8C). Vps3 und Vps18 aus *U. maydis* haben eine Sequenzidentität von 24% gegenüber den Homologen aus *S. cerevisiae*, bei Vps11 handelt es sich um 23% (Pinter, 2015). Die Deletion der CORVET Komponente *vps3* führte zu einem statischen Nma1-Signal, welches die Mikrotubuli dekorierte (Schneider, 2016), daraus kann man schließen dass der Transport von Nma1 im Zusammenhang mit dem CORVET-Komplex steht. Die Deletion führte darüber hinaus zu einem starken Wachstumsdefekt. Weitere wissenschaftliche Vorarbeiten zum CORVET-Komplex in *U. maydis* sind bisher nicht bekannt. Die Deletion der GTPase *rab5a*, die ein Marker für frühe Endosomen, hatte analog zu $\Delta vps3$ eine starke Auswirkung auf das Morphologie der Zellen und führte zum Erliegen der Nma1-Motilität (Schneider, 2016).

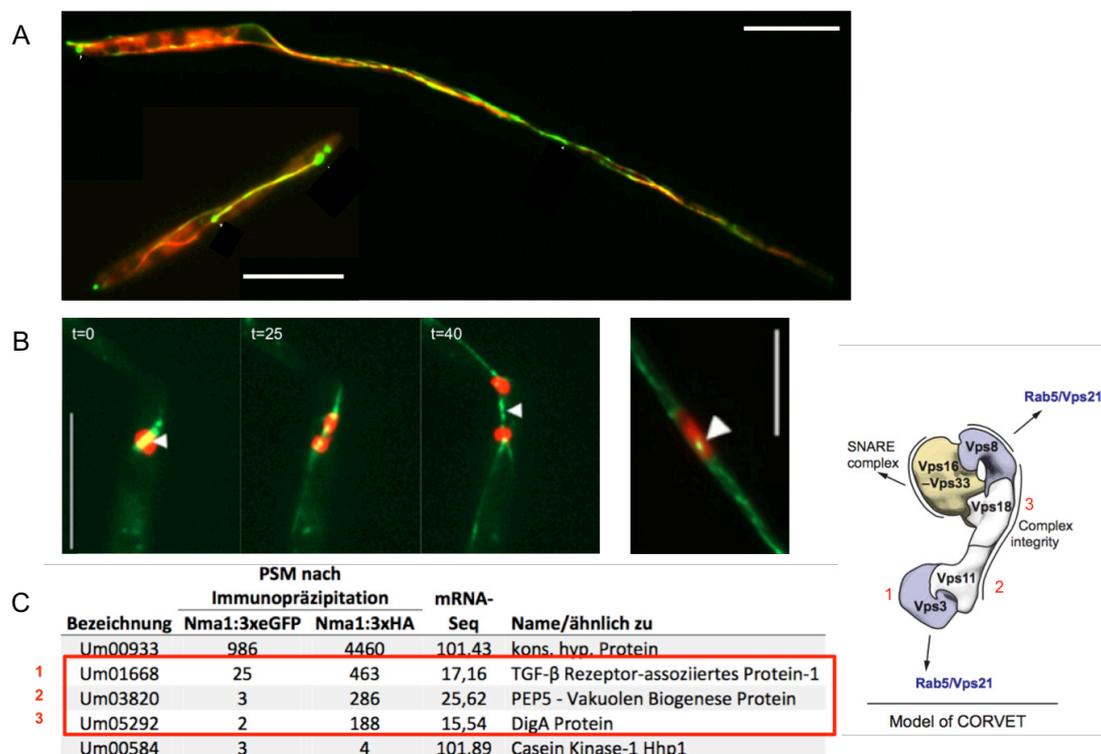


Abb. 8: Das Nma1-Protein in *U. maydis*. (A/B) Nma1:3xGFP Fusionsproteine lokalisieren entlang von Mikrotubuli. Gezeigt ist eine Überlagerung von Nma1:3xGFP (grün) und mCherry:Tub1 (rot), eine Co-Lokalisierung erscheint in gelb. Die Maßstabsbalken entsprechen 10 μ m. Modifiziert nach (Pinter, 2012) (B) Nma1 kondensiert während der Mitose und lokalisiert zwischen den getrennten Chromosomen und an Strukturen, die an astrale Mikrotubuli erinnert. Die Zeit ist in Sekunden angegeben. Darüber hinaus lokalisiert Nma1 in Filamenten (über Nacht induziert) in einem Punkt direkt am Zellkern. Die Maßstabsbalken entsprechen 10 μ m. Modifiziert aus (Pinter, 2015). (C) In *U. maydis* konnte bei Co-Immunopräzipitations Experimenten drei der CORVET-Komponenten (Vps3/11/18) als Interaktionspartner von Nma1 identifiziert werden (Tabelle). Gezeigt ist das dreidimensionale Modell des CORVET-Komplexes aus *S. cerevisiae*. Die Positionen der identifizierten Proteine im Modell wurden mit Nummern markiert. Tabelle aus (Pinter, 2015). Modell aus (Balderhaar und Ungermann, 2013).

Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es die zytoplasmatische Funktionen von Num1 und Nma1 genauer zu untersuchen und charakterisieren. Versuche Num1-Fusionsproteine außerhalb des Zellkerns zu lokalisieren scheiterten in Vorarbeiten. Auf Grund des Detektionslimits konventioneller Fluoreszenzmikroskopie, wurde eine hochauflösende Mikroskopietechnik verwendet. Die PALM (*photoactivated localization microscopy*) Technik nutzt die Photokonvertierbarkeit von fluoreszenten Proteinen, um eine Auflösung von Einzelmolekülen zu erzielen. Dazu ist ein photokonvertierbares fluoreszentes Protein notwendig. Das fluoreszente Protein Eos (EosFP) stammt ursprünglich aus der Koralle *Lobophyllia hemprichii* und ist in der Lage durch Bestrahlung mit UV-Licht seine Fluoreszenz Emission vom grünen in den roten Bereich zu verschieben. In der vorliegenden Arbeit wurde ein EosFP für *U. maydis* etabliert, um mit Hilfe der PALM-Technik die zytoplasmatische Funktion von Num1 genauer zu charakterisieren. Num1 stellt eine Ausnahme zwischen den Komponenten des NTC dar, da die Deletion nicht lethal für die Zelle ist. Außerdem sind bisher keine Spleiß-Faktoren bekannt, die eine zweite Funktion im Zytoplasma ausüben (Kellner *et al.*, 2014). Um diese aufzuklären, wurden unterschiedliche Domänen von Num1 untersucht. Angestrebt war die Generierung von Mutanten, welche die nukleäre von der zytoplasmatischen Funktion entkoppeln. Die letzten acht Aminosäuren von Num1 sind für eine Interaktion mit Cef1 notwendig (Hassinger, 2015). Die Deletion dieses Bereichs eröffnete die Möglichkeit Num1 von seiner Funktion im NTC zu entbinden. Das *U. maydis* Num1 enthält neben der BCAS2-Domäne einen zusätzlichen 65 AS langen N-terminalen Bereich (Kellner, 2012). Es konnte bereits gezeigt werden, dass dieser Bereich essentiell für die Funktionalität von Num1 ist, jedoch ist bisher nichts darüber bekannt, ob es für die zytoplasmatische Aufgabe notwendig ist. Die Expression und Fusion des *A. nidulans*-Homologs AN4244 in *U. maydis* und *A. nidulans* sollte weiteren Aufschluss über die Konservierung der Funktion von Num1 geben. Eine Chimäre aus AN4244 und dem Num1 N-Terminus sollte zeigen, ob dieser für *U. maydis* spezifische Bereich für die Funktion des Proteins eine Rolle spielt. Das als Num1-Interaktor identifizierte Protein Nma1 bewegt sich bidirektional entlang von Mikrotubuli und interagiert mit Komponenten des CORVET-Komplexes. Ziel war es die dahinter steckenden Mechanismen durch Deletionen von Motorproteinen genauer aufzuklären. Dazu sollten Nma1-Fusionsproteine und Mikrotubuli-Marker in einem Stamm co-exprimiert werden, um das Verhalten von Nma1 in verschiedenen Deletionshintergründen vergleichend zum Wildtyp zu beobachten. Zur Analyse von

vesikulären Transportprozessen eignen sich Kymographen, in denen die Vesikelbewegung über die Zeit aufgetragen wird. Nma1 sollte mit Vesikel-Markern wie Rab5 co-lokalisiert werden, um weitere Informationen zum Transport des Proteins zu erlangen. Die putative Lokalisierung von Nma1 am MTOC oder Spindelpolkörper wurde während des Zellzyklus genauer beleuchtet. Dazu wurden Nma1-Fusionsproteine zusammen mit einem Marker für γ -Tubulin exprimiert und die Co-Lokalisierung untersucht. Des Weiteren sollte die Interaktion zwischen Nma1 und den CORVET-Proteinen genauer untersucht werden. Zur Überprüfung ob die Funktion Nma1 konserviert ist, wurde das Protein in *A. nidulans* exprimiert.

2 Ergebnisse

2.1 Das Num1-Protein

Das Num1-Protein (UMAG_01682) wurde in einem Kandidatengenansatz im Basidiomyceten *C. cinereus* als wichtiger Faktor für die Migration von Zellkernen identifiziert (Makino und Kamada, 2004). Vorarbeiten in *U. maydis* zeigten, dass das Gen einen wichtigen Einfluss auf das polare Wachstum, die Zellzykluskontrolle, die Verteilung von Endosomen innerhalb der Zelle und das Spleißen von prä-mRNA hat (Kellner *et al.*, 2014). Als eine von vier Kernkomponenten des Spleißosom-assoziierten NTC wird eine Lokalisierung im Zellkern erwartet und auch beobachtet, dies wird bestätigt durch die in der Sequenz enthaltene Zellkern-Lokalisierungs-Sequenz (NLS) (Kellner *et al.*, 2014). Zusätzlich konnte ein schwaches Signal im Zytoplasma beobachtet werden, welches unabhängig von der Expressionsstärke von *num1* war (Kellner *et al.*, 2014). (Abb. 7D). Durch Epifluoreszenz-Mikroskopie konnte nicht eindeutig festgestellt werden, ob es sich um eine echte Lokalisierung oder ein Artefakt des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) handelt. Die in einem Hefe-Zwei-Hybrid Screening identifizierten, zytoplasmatisch agierenden Interaktionspartner, wie Kin1 und Nma1, verstärken jedoch die Annahme, dass es sich um eine reale zytoplasmatische Lokalisierung von Num1 handelt, was somit auf eine zweite, zusätzliche Funktion des Spleiß-Faktors hindeutet (Kellner *et al.*, 2014). Ziel dieser Arbeit war es daher die zytoplasmatische Lokalisierung und Funktion von Num1 genauer zu untersuchen und weiter aufzuklären.

Wenn nicht anders gekennzeichnet wurde für alle Experimente der Stamm AB31 bzw. AB31-Derivate verwendet (Brachmann, 2001). Dieser artifizielle Laborstamm enthält die kompatiblen *bE1* und *bW2* Gene unter der Kontrolle des mit Arabinose induzierbaren P_{crg1} -Promotors (Bottin *et al.*, 1996). Durch den Wechsel der Kohlenstoffquelle im Medium von Glucose zu Arabinose kann so das filamentöse Wachstum induziert werden, was eine Kreuzung von kompatiblen Partnern überflüssig macht. Dadurch ist es möglich sowohl haploide Sporidien als auch filamentös wachsende Hyphen im selben Stamm zu untersuchen. Für zellbiologische Untersuchungen ist dies ein großer Vorteil.

2.1.1 Untersuchung der zytoplasmatischen Lokalisierung von Num1

2.1.1.1 Num1:tdEos bewegt sich im Zytoplasma

Zur Untersuchung der Num1 Lokalisierung im Zytoplasma stößt die konventionelle Fluoreszenzmikroskopie an ihre Grenzen. Aus diesem Grund sollte die PALM (*photoactivated localization microscopy*)-Technik etabliert werden. Notwendig für diese Technik ist ein photokonvertierbares fluoreszentes Protein, ein geeignetes ist das EosFP aus der Koralle *Lobophyllia hemprichii* (Nienhaus *et al.*, 2006). Bei dieser Methode werden immer nur wenige Moleküle angeregt, ihr Emissions-Spektrum verschoben und in dem entsprechenden Kanal die Bilder aufgenommen, dieser Vorgang wird mehrere hunderte bis tausende Male wiederholt. Das Anregungs- und Emissionsspektrum des tetrameren EosFP liegt bei Raumtemperatur bei 506 nm und 516 nm im grünen Bereich. Durch Anregung mit einer Wellenlänge von 390 nm wird das Spektrum irreversibel in den roten Bereich verschoben, jetzt liegen Anregungs- und Emissionsspektrum bei 571 / 581 nm diese Werte konnten auch für monomere- und dimere Mutanten ermittelt werden (Nienhaus *et al.*, 2006). Die Aufnahmen müssen mit speziellen Algorithmen verrechnet werden und als Resultat erhält man Bilder, die einzelne Moleküle als Bildpunkte zeigen. Durch die schnelle Ausbleichung der bereits angeregten Moleküle besteht nur eine geringe Gefahr Signale doppelt aufzunehmen. Für eine Num1-Fusion wurde zuerst *mEos2* verwendet. Diese Variante des EosFP wurde durch das Einfügen weiterer Mutationen thermostabiler (McKinney *et al.*, 2009), da EosFP nur bis 30°C stabil funktioniert (Nienhaus *et al.*, 2005). Ein für *U. maydis* di-codon optimiertes Gen, welches für *mEos2* codiert, wurde von der AG Feldbrügge (Heinrich Heine Universität, Düsseldorf) zur Verfügung gestellt (Langner, 2015) Die Fusion von Num1 im endogenen Locus ergab nur eine sehr geringe Signalstärke (Abb. 10), erst die ektopische Expression unter dem konstitutiv aktiven P_{hxt1} -Promotor (Schuler *et al.*, 2015) im *ip*-Locus führte zu einer Signalstärke, mit der eine PALM-Analyse möglich war (nicht gezeigt). Der *ip*-Locus von *U. maydis* codiert für eine Untereinheit der Sukzinat-Dehydrogenase und führt durch eine gezielt eingefügte Punktmutation zur Resistenz gegen das Antibiotikum Carboxin (Brachmann, 2001). Der *ip*-Locus wird standardmäßig für die gezielte Integration von Expressionskonstrukten verwendet, um Positionseffekte, die bei der zufälligen Integration entstehen können, zu vermeiden. Die Überexpression von Num1 barg jedoch die Gefahr die Molekülzahl und das Verhalten im Zytoplasma zu verändern; daher wurde analog zur Publikation Nienhaus *et al.*, 2006 ein monomeres mEos und ein tandem-Dimer tdEos kloniert. Eos liegt normalerweise als

Ergebnisse

tetramerer Komplex vor. Für das tdEos wurden zwei Eos-Proteine, bei denen eine Mutation die Tetramerisierung (T158R) verhindert, über eine Linker-Sequenz von 12 AS verbunden. Für das mEos wurden zusätzlich eine Mutation, die die Dimerisierung verhindert, eingefügt (T158R, V123T). Mutationen zur Temperatur-Stabilisierung wurden nicht eingeführt, da dadurch die Funktion von Eos herabgesetzt wird (Wiedenmann *et al.*, 2004, Nienhaus *et al.*, 2006; Abb. 9A). Das Eos-Gen wurde für *U. maydis* di-codon optimiert von der Firma Eurofins Genomics synthetisiert (Zarnack *et al.*, 2006). Um die neu entstandenen fluoreszenten Proteine mEos und tdEos zu testen, wurden diese in p123-Vektoren ligiert und unter dem P_{oteF} -Promotor in FB1 exprimiert (pBL4+5, Lotz, 2015). Die zytoplasmatische Fluoreszenz bestätigte die Funktionalität der EosFP-Proteine, es wurde jedoch auch deutlich dass die Signalstärke des tdEos-Konstrukts dominierte (Lotz, 2015, Abb. 9B).

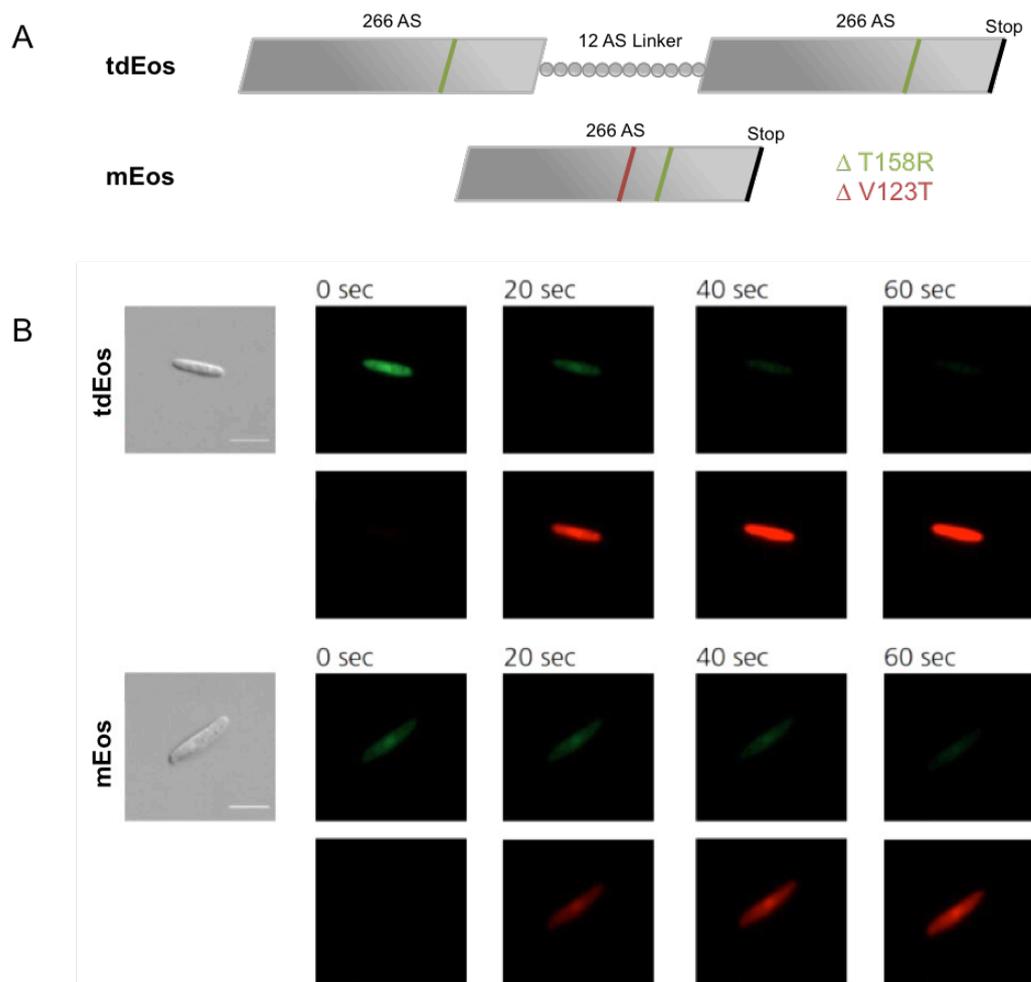


Abb. 9: Herstellung eines EosFP für *U. maydis*. (A) Schematische Darstellung der neu generierten EosFP-Moleküle. Die beiden monomeren Eos-Moleküle wurden über einen Linker verbunden, um ein Tandemdimer (tdEos) zu bilden (oben). Die dafür notwendigen Mutationen wurden farblich eingezeichnet. Eine dritte Mutation ist notwendig, um ein monomeres Eos (mEos) zu generieren (unten). (B) Der direkte Vergleich zwischen zytoplasmatisch exprimiertem tdEos und mEos zeigen einen deutlichen Unterschied in der Leuchtkraft. Gezeigt ist eine Zeitreihe in der Eos zuerst im GFP-Kanal (488 nm)

detektierbar ist und durch die Bestrahlung mit einer Wellenlänge von 405 nm (DAPI-Kanal) das Spektrum verschoben wird, sodass es im RFP-Kanal (561 nm) detektiert werden kann. DIC Aufnahme der verwendeten Sporidien aus axenischer Kultur, der Maßstabsbalken entspricht 10 µm. Abbildung zur Verfügung gestellt von Bryan Lotz.

Nachdem der *proof of principle* die Funktion der für *U. maydis* optimierten Eos-Varianten bestätigt hat, wurde als nächster Schritt eine Num1-Eos Fusionsprotein generiert. Dazu wurde ein *tdEos:hyg^R*-Konstrukt über homologe Rekombination in den nativen *num1*-Locus von AB31 integriert (Plasmid pBL11), wodurch eine Num1:tdEos Fusion unter Kontrolle des nativen *num1*-Promotors entstand. Die Sporidien einer axenischen Kultur wurden in CM-Glucose Medium kultiviert und am Fluoreszenzmikroskop analysiert. Der Vergleich zwischen *num1:tdEos* (UTO133) und dem zuvor getesteten *num1:mEos2* (UTO70) ergab einen sehr deutlichen Unterschied zwischen der Leuchtkraft der fluoreszenten Proteine. Die angegebene Zeit entspricht der Belichtungszeit mit dem DAPI-Filter (405 nm), um das Signal von grüner zu roter Fluoreszenz zu verschieben. Num1:tdEos zeigte ein klares, für die Num1 Lokalisierung typisches Signal im Zellkern, dessen Signal im grünen Kanal schwächer wurde und nach 60 s Belichtung auch im roten Kanal detektierbar war. Die Anregung mit einer HXP120 Quecksilberlampe (OSRAM GmbH) reichte nicht aus um *num1:mEos2* sichtbar zu machen (Abb. 10A), wie man im Vergleich dazu am Spinning Disc mit Laserbestrahlung feststellen konnte (Abb. 10B). Hier war ein Signal im Zellkern und wenig im Zytoplasma sichtbar, im Vergleich zur Fusion mit tdEos war dieses jedoch auch sehr gering (nicht quantifiziert). Die PALM Analyse ergab ebenfalls wesentlich geringere Signale von *num1:mEos2*. Die Untersuchung von *num1:tdEos* (UTO133) ergab eine deutliche Lokalisierung von Num1 im Zytoplasma und in Zellkern (Abb. 10C). Alle gezeigten PALM-Bilder wurden in Kooperation mit Lu Zhou (AG Nienhaus, KIT Karlsruhe) aufgenommen und zur Verfügung gestellt.

Ergebnisse

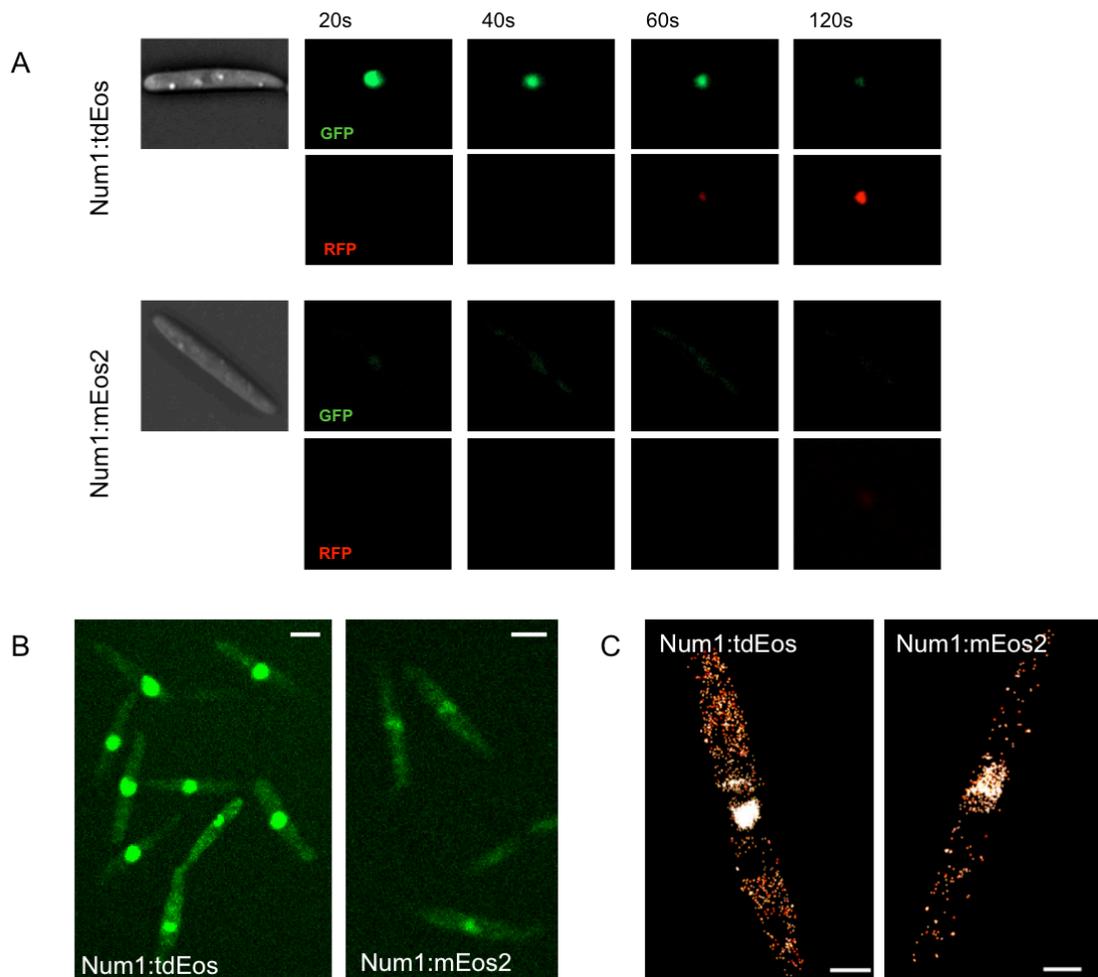


Abb. 10: Vergleich zwischen Num1:tdEosFP und Num1:mEos2FP. Die C-terminale Fusion von Num1 mit den fluoreszenten Proteinen (FP) tdEos und mEos2 ergab einen sehr deutlichen Unterschied in der Emission. Die Fluoreszenz der Proteine wurden mit Hilfe verschiedener Mikroskopietechniken miteinander verglichen, gezeigt sind (A) Aufnahmen mit einem konventionellen Fluoreszenzmikroskop. Die Bilder wurden bei einer sehr hohen Belichtungszeit von 600 ms aufgenommen, trotzdem war Num1:mEos2 nicht detektierbar. (B) Spinning Disk und (C) PALM-Aufnahmen zeigten zwar ein Signal beider Fusionsproteine, die Fluoreszenz von Num1:tdEos war jedoch wesentlich stärker. (B) Längenmaßstab 5 μm (C) Bei der Erstellung der Bilder mit Hilfe eines Matlab Algorithmus wurde derselbe *Photon threshold* für beide Bilder gewählt, um diese vergleichbar zu machen (Li *et al.*, 2013). Längenmaßstab 2 μm . Untersucht wurden Sporidien aus axenischer Kultur. (B/C) Bilder zur Verfügung gestellt von Lu Zhou.

Video-Aufnahmen von Num1:tdEos zeigten eine Bewegung innerhalb des Zytoplasmas, dies wurde durch die Erstellung von Kymographen verdeutlicht. Dargestellt ist das Num1:tdEos Fluoreszenzsignal in schwarz, der durchgängige Streifen entspricht dem Zellkern, die davon ausgehenden schwarzen Punkte entsprechen Num1-Molekülen oder Aggregaten. Die Behandlung der Zellen mit 40 μM Benomyl, einem Inhibitor des Mikrotubuli-Zytoskeletts, führte zu einer Stagnation der Num1-Bewegung, lediglich dicht um den Zellkern herum konnten noch Moleküle detektiert werden, an den Zellpolen war kein Signal mehr sichtbar (Abb. 11A). Mit Hilfe der Software Fiji wurde eine Quantifizierung der gesamten

Moleküle (=Pixel) durchgeführt, die eine Linie im Zytoplasma kreuzten, die Messung ergaben 461 Pixel in der Kontrolle und 171 Pixel nach Benomyl-Behandlung (Abb. 11B).

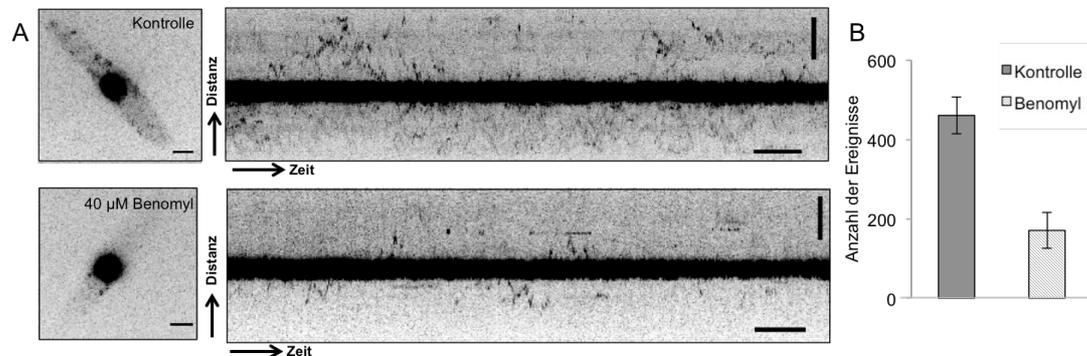


Abb. 11: Num1:tdEos lokalisiert im Zellkern und bewegt sich im Zytoplasma. (A) Die Analyse der Num1:tdEos Fusionsproteine in AB31 Sporidien (UTO133) ergab die erwartete Lokalisation von Num1 im Zellkern. Darüber hinaus konnte jedoch auch eine zusätzliche Population im Zytoplasma detektiert werden. Kymographen, die Bewegung von Partikeln über Zeit auftragen, ergaben eine rege Bewegung von Num1, besonders nahe am Zellkern (schwarzer Streifen). Die Behandlung der Zellen mit 40 µM Benomyl führte zu einer klaren Reduktion der zytoplasmatischen Bewegung. Die Maßstabsbalken entsprechen 2 µm (Zelle), Kymographen: Zeit (horizontal): 2 s, Distanz (vertikal): 5 µm. (B) Eine Pixelanalyse ergab eine klare Reduktion des zytoplasmatischen Signals nach Benomyl-Behandlung der Zellen (dargestellt sind: Mittelwert ± SD, n = 8). Bilder zur Verfügung gestellt von Lu Zhou.

Die Visualisierung von Num1 mit Hilfe der PALM-Technik zeigte eine Lokalisierung entlang von länglichen Strukturen im Zytoplasma. Auf Grund der Interaktion mit Kin1 und dem Ausbleiben der Num1-Motilität nach Benomyl-Behandlung liegt eine Lokalisierung auf Mikrotubuli nahe (Abb. 12).

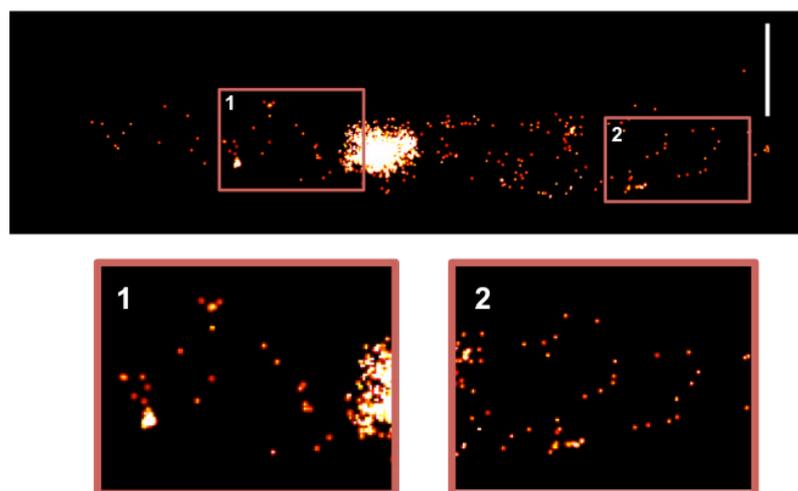


Abb. 12: Num1:tdEos lokalisiert an Strukturen im Zytoplasma. Die PALM-Analyse von Num1:tdEos ergab neben der Akkumulation im Zellkern eine große Anzahl von Molekülen im Zytoplasma. Die Auflösung von PALM geht auf Einzelmoleküle zurück, die angezeigten Punkte entsprechen einzelnen Num1:tdEos Molekülen, die in rot angezeigt werden. Je nach Molekülzahl verändert sich die Farbe des Signals über orange und gelb zu weiß. Num1 ist im Zytoplasma teilweise entlang von filamentösen Strukturen lokalisiert (vgl Vergrößerungen 1+2). Untersucht wurden Sporidien aus axenischer Kultur, der Maßstabsbalken entspricht 2 µm. Bilder zur Verfügung gestellt von Lu Zhou.

Ergebnisse

Um die mögliche Assoziation von Num1 und Mikrotubuli genauer zu untersuchen wurde ein GFP:Tub1 Marker unter dem P_{oter} -Promotor in den *ip*-Locus von AB31 *num1:tdEos* Protoplasten integriert und diese Zellen analysiert. Die gemeinsame Expression von GFP:Tub1 und Num1:tdEos ergab eine partielle Co-Lokalisierung entlang von Mikrotubuli (Abb. 13A Pfeil), es konnte jedoch auch Signal in den Vakuolen (Abb. 13A Stern) oder nicht-assoziiert im Zytoplasma detektiert werden. Die Bildaufnahme erfolgte indem im GFP-Kanal circa 50-100 Bilder aufgenommen wurden, die Anzahl der Bilder für das PALM Bild lag jedoch bei circa 1000 Stück. Da Mikrotubuli sehr dynamisch sind, verliert man durch die Überlagerung der Bilder Co-Lokalisierungspunkte. Trotzdem konnte durch eine Quantifizierung gezeigt werden, dass die Dichte an Num1-Molekülen im Mikrotubuli-Bereich höher war als in der gesamten Zelle. Es konnten $6,5 \pm 0,8$ Moleküle/ μm^2 im Bereich der Mikrotubuli gezählt werden, während in der gesamten Zelle nur $4,5 \pm 1,1$ Moleküle/ μm^2 ermittelt wurden ($n=9$) (Abb. 13C). Dafür wurde mit Hilfe der Software Fiji die Fläche der Mikrotubuli ermittelt und alle Moleküle, die in diesem Bereich lagen gezählt. Dazu wurde als Liniendicke ± 300 nm gewählt (Abb. 13B), um mit diesem relativ großen Bereich die Bewegung der Mikrotubuli mit abzudecken. Die Gesamtfläche der Zelle abzüglich des Zellkernbereichs wurde zur Berechnung der Dichte in der gesamten Zelle verwendet, die Anzahl der Moleküle abzüglich des Zellkerns wurde mit einem selbst geschriebenen Matlab Algorithmus (Li *et al.*, 2013).

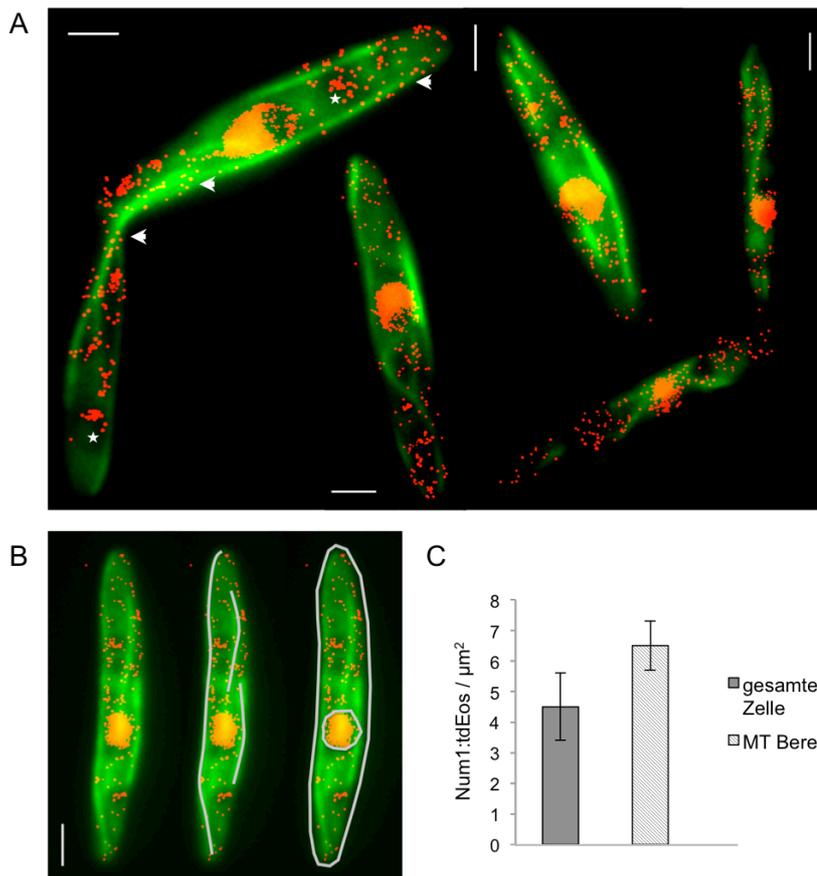


Abb. 13: Num1 lokalisiert teilweise entlang von Mikrotubuli in Sporidien. Zur genaueren Untersuchung der Lokalisierung von Num1 wurden die Zellen mit einem GFP-Marker für Mikrotubuli transformiert und die Co-Lokalisierung untersucht (UTO193). (A) Die Analyse von Sporidien ergab eine teilweise Assoziation von Num1 (rot) entlang der markierten Mikrotubuli (grün, Pfeil), es konnte jedoch auch Num1 frei im Zytoplasma oder in Vakuolen (Stern) beobachtet werden. Die Maßstabsbalken entsprechen 2 μm . (C) Eine Quantifizierung ergab einen Unterschied zwischen der Num1-Molekülzahl pro μm^2 in der gesamten Zelle abzüglich des Zellkerns im Vergleich zum Bereich der Mikrotubuli. (B) Zur Ermittlung dieser Werte wurden die Einzelmoleküle entlang der detektierten Mikrotubuli gezählt und ein Molekül/ μm^2 -Durchschnitt ermittelt, der dann mit dem der gesamten Zelle ohne Zellkern verglichen wurde (dargestellt sind: Mittelwert \pm SD, n=9). Maßstabsbalken entspricht 2 μm . Bilder zur Verfügung gestellt von Lu Zhou.

Auch nach sechs-stündiger Induktion des bE/bW-Heterodimers konnte im Filament eine Co-Lokalisierung von Num1 und Mikrotubuli beobachtet werden, die wie in Sporidien jedoch nicht hundert prozentig zutrifft (Abb. 14A). Am Zellkern war eine deutliche Bewegung ins Zytoplasma zu erkennen, jedoch meist nur auf der der Hyphenspitze zugewandten Seite (Abb. 14B). Die Motilität blieb aus nach Behandlung mit 40 μM Benomyl aus (nicht gezeigt). Besonders auffällig war die Störung der Bewegung am Zellkern, die auf null reduziert wurde. Bei dem dünnen langen Fortsatz am Zellkern der Kontrolle handelt es sich höchstwahrscheinlich um einen Teil der Kernmembran, der extrem lang gezogen wurde (vgl. 2.1.2.5).

Ergebnisse

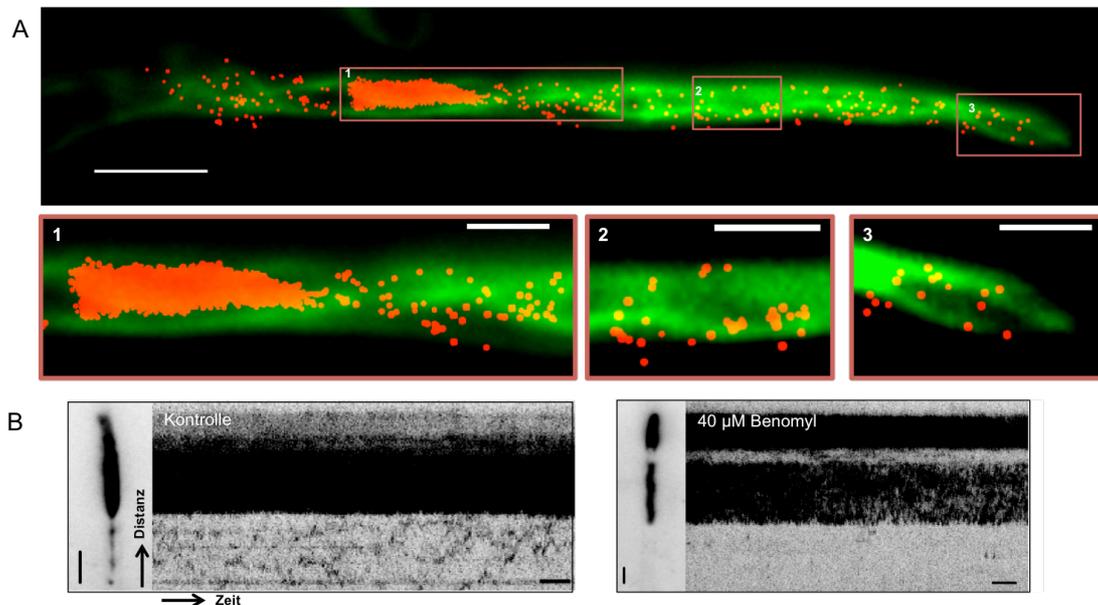


Abb. 14: Num1 lokalisiert teilweise entlang von Mikrotubuli in Filamenten. (A) Die Co-Lokalisierung von Num1:tdEos (rot) und GFP:Tub1 (grün) markierten Mikrotubuli wurde in Filamente von UTO193 nach 6-stündiger Induktion des bE/bW-Heterodimers untersucht. Auch in Filamenten konnte eine Assoziation von Num1 mit Mikrotubuli beobachtet werden. Die Maßstabsbalken entsprechen 5 μm (Filament) und 2 μm (Vergrößerungen 1-3). (B) Die Analyse von Kymographen ergab eine hohe Frequenz von Num1-Bewegung an der Seite des Zellkerns, die der Hyphenspitze zugewandt ist. Durch die Behandlung mit Benomyl wurde diese komplett aufgehoben. Kymographen: Zeit (horizontal): 1 s, Distanz (vertikal): 2 μm . Bilder zur Verfügung gestellt von Lu Zhou.

2.1.1.2 Die zytoplasmatische Lokalisierung von Num1 ist *kin1*-abhängig

Zur weiteren Aufklärung des Mechanismus wie Num1 ins Zytoplasma gelangt, wurden Deletionen der Motorproteine Kin3 und Kin1 durchgeführt. Dazu wurden die offenen Leserahmen der Gene durch homologe Rekombination von einer Nourseothricin-Resistenzkassette (Nat^R) ersetzt. Kin3 ist für den anterograden Transport von Vesikeln wie frühen Endosomen in Richtung der Plus-Enden von Mikrotubuli verantwortlich (Wedlich-Söldner et al., 2002). Das konventionelle Kinesin Kin1 hingegen transportiert den Motor Dynein und auch sekretorische Vesikel zu den Mikrotubuli-Plus-Enden in der Hyphenspitze (Schuchardt et al., 2005, Lenz et al., 2006). Zur Untersuchung wurden aus den für die PALM-Analyse generierten Videoaufnahmen Kymographen hergestellt. Ausgewählt wurden je 800 Bilder (*frames*), die bei 50 ms Belichtungszeit des Kanals (RFP) ein Video von 40 Sekunden ergeben. Zur besseren Darstellung und Signalverbesserung wurden je zwei Bilder miteinander gruppiert und so aus den resultierenden 400 Bildern ein Kymograph erstellt. Die *kin3*-Deletion führt zu einem Teilungsdefekt der Sporidien, der in den verwendeten Stämmen auch beobachtet wurde (Wedlich-Söldner et al., 2002). Da der Deletionsphänotyp bereits im Sporidien-Stadium sichtbar ist, wurden

die Zellen mit nicht induzierten Wildtyp-Zellen verglichen. Wie bereits gezeigt (Abb. 11+14) ist in Wildtypzellen die Bewegung von Num1 sehr dynamisch zwischen dem Zellkern und dem Zytoplasma. Die $\Delta kin3$ -Mutante unterschied sich nicht merklich vom Wildtyp (Abb. 15A). Die Signalstärke war etwas schwächer und einzelne Molekülbewegungen waren weniger klar sichtbar, trotzdem war eine deutliche Population im Zytoplasma detektierbar. Die Deletion von *kin1* ist in nicht induzierten Sporidien phänotypisch nicht feststellbar, nach Induktion des bE/bW-Heterodimers wachsen die Hyphen jedoch bipolar. Aus diesem Grund wurden die Zellen mit $\Delta kin1$ -Hintergrund im induzierten Zustand untersucht und mit Aufnahmen aus Wildtyp-Filamenten verglichen (Abb. 15B). Wie bereits beschrieben wurde an der dem Zellpol zugewandten Seite des Nukleus eine stärkere Bewegung von Num1 ins Zytoplasma detektiert (Stern). Es war jedoch auffällig, dass die Signale einen Mindestabstand von $5,85 \pm 0,74 \mu\text{m}$ ($n=12$) vom Zellkern nicht überschritten und im Gegensatz zur Num1-Bewegung in Sporidien nicht im gesamten zytoplasmatischen Bereich verteilt waren. Im Zytoplasma weiter entfernt vom Nukleus konnten immer noch Num1-Signale detektiert werden jedoch nur einzelne Moleküle und keine größeren Aggregate. Die Num1-Moleküle, die in *kin1*-Deletionstämmen detektierbar waren, schienen eine Grenze circa $2,94 \pm 0,28 \mu\text{m}$ vom Zellkern entfernt nicht zu überschreiten. Für die Quantifizierung wurden der Abstand von je 12 Num1-Signalen vom Zellkern ins Zytoplasma bestimmt (Abb. 15B, Bereich mit Klammern markiert). Es ist nicht klar, ob diese Moleküle sich innerhalb oder außerhalb des Kerns befinden. Trotzdem ist der Unterschied zwischen Wildtyp und *kin1*-Deletion deutlich.

Ergebnisse

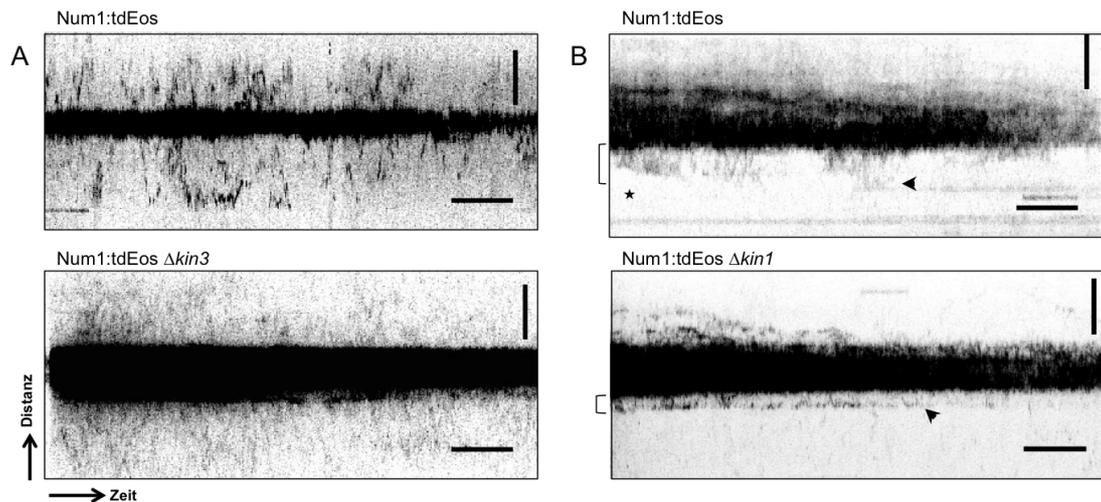


Abb. 15: Die Deletion von *kin1* beeinträchtigt die Num1-Lokalisierung. Zur Untersuchung welchen Einfluss die Motorproteine Kin3 und Kin1 auf die Verteilung von Num1 im Zytoplasma haben, wurden Deletionsstämme generiert und mit Wildtypzellen verglichen. Dafür wurden aus Videoaufnahmen Kymographen von 400 Bildern erstellt und miteinander verglichen. (A) Der $\Delta kin3$ -Phänotyp ist bereits in Sporidien ausgeprägt, daher wurden nicht-induzierten Sporidien miteinander verglichen. Im Wildtyp ist eine deutliche Bewegung von Num1 aus dem Zellkern heraus und im Zytoplasma detektierbar. Auch die $\Delta kin3$ -Mutante weist eine große zytoplasmatische Num1-Population auf und unterscheidet sich somit nicht vom Wildtyp. (B) Der $\Delta kin1$ -Phänotyp ist erst in induzierten Filamenten ausgeprägt, daher wurden Hyphen untersucht, in denen das bE/bW-Heterodimer für 6 h induziert worden war. Wie bereits beschrieben konnte optisch vorrangig auf der der Hyphenspitze zugewandten Seite (Stern) des Zellkerns Bewegung von Num1 beobachtet werden. Die Analyse der Kymographen bestätigte dieses Bild, im Gegensatz zu Sporidien schien der Num1-Transport aber in einer gewissen Distanz vom Nukleus zu stoppen (Klammer oben). Auch in $\Delta kin1$ -Zellen konnte ein Transport von Num1 aus dem Zellkern beobachtet werden, das Signal stoppte jedoch gleichmäßig an einer Linie (Klammer unten), als würde es dort durch etwas aufgehalten. Kymographen: Zeit (horizontal): 5 s, Distanz (vertikal): 10 μ m.

2.1.1.3 Num1 co-lokalisiert nicht mit frühen Endosomen

Neben den Motordeletionen sollte Num1 auch mit Vesikelmarkern co-lokalisiert werden, um die zytoplasmatische Lokalisierung genauer zu verstehen. AB31 Num1:tdEos Stämme wurden mit einem GFP:Rab5-Marker transformiert (UKS79, Stamm zur Verfügung gestellt von Karina Schneider). Rab5 bindet an die Oberfläche von frühen Endosomen und sollte nun mit Num1 co-lokalisiert werden. Da frühe Endosomen sich sehr schnell innerhalb der Zelle bewegen, wurden die Zellen fixiert (f.c. 8% Formaldehyd), damit eine Überlagerung mit einem PALM Bild möglich ist. Die Analyse der Zwei-Kanal-Bilder ergab keine eindeutige Akkumulation von Num1-Signalen an frühen Endosomen (Abb. 16).

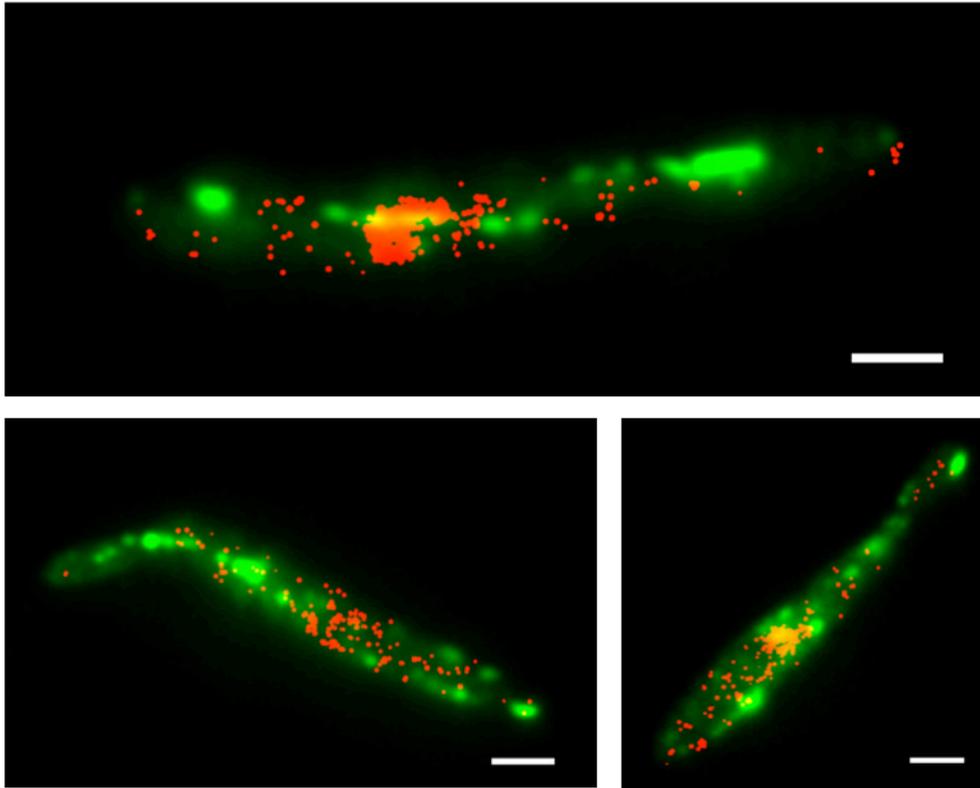


Abb. 16: Num1 lokalisiert nicht an frühen Endosomen im Zytoplasma. Die Co-Lokalisierung von GFP:Rab5 (grün) mit Num1:tdEos (rot) in fixierten Sporidien ergab keine bemerkenswerten Akkumulationen an frühen Endosomen (grün). Die Maßstabsbalken entsprechen 2 μm . Bilder zur Verfügung gestellt von Lu Zhou.

2.1.2 Charakterisierung des Num1-Proteins

2.1.2.1 Das Num1 Homolog AN4244 kann die *num1*-Deletion nicht komplementieren

Das *num1* Gen (*UMAG_01682*) in *U. maydis* besteht aus der BCAS2-Domäne (AS 66-273), die eine Zellkern-Lokalisierungs-Sequenz enthält und evolutionär konserviert ist von filamentösen Pilzen (*A. nidulans* 29 % Identität) bis hin zum Mensch (34 % Identität). Am N-Terminus gibt es jedoch einen zusätzlichen Bereich (AS 1-66), der nur in *U. maydis* und den nahe verwandten Pilzen *S. reilianum* und *U. hordei* Teil der Sequenz ist (Abb. 17, roter Kasten). In Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass dieser N-terminale Bereich essenziell für die Funktionalität des Num1-Proteins ist (Kellner, 2012). Im *num1*-Deletionshintergrund in *U. maydis* ergab die Expression des humanen Homologs SPF27/BCAS2 nur eine teilweise Komplementation des polaren Wachstumsdefekts im Filament, konnte jedoch als GFP-Fusion im Zellkern nachgewiesen werden (Kellner, 2012). Um die Möglichkeit auszuschließen, dass Num1 und SPF27 phylogenetisch zu weit voneinander entfernt

Ergebnisse

sind und daher keine Substitution stattfinden kann, wurde das Homolog aus *A. nidulans* AN4244 in *U. maydis* Stämmen exprimiert. Zudem sollte ein chimäres Protein aus dem N-Terminus des *U. maydis* Num1 und dem Homolog aus *A. nidulans* weiteren Aufschluss über die Spezifität und Funktionalität dieses Bereichs geben.

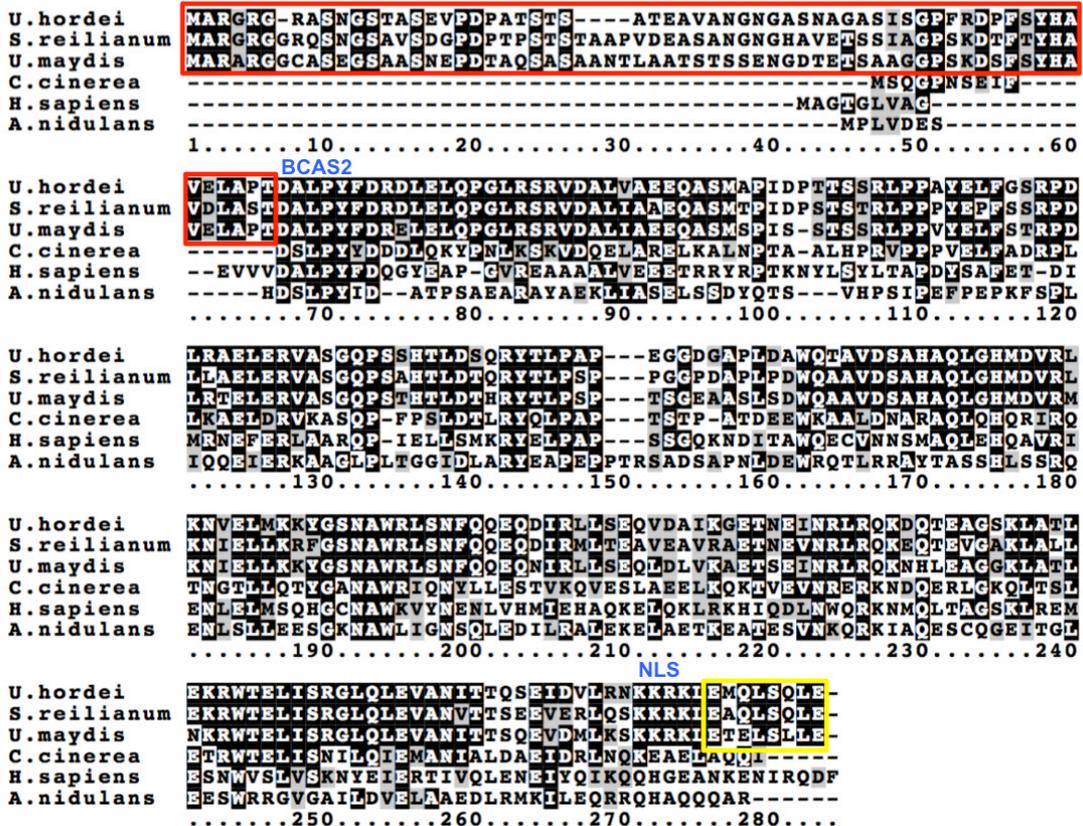


Abb. 17: Das Num1-Protein hat einen spezifischen N-terminalen Bereich. Num1, das *U. maydis* Homolog des humanen BCAS2/SPF27-Proteins, ist 279 AS groß und weist neben der konservierten BCAS2-Domäne und einer C-terminal gelegenen NLS einen zusätzlichen 65 AS großen spezifischen N-Terminus auf (rot). Dieser ist nur in *U. maydis* und den nah verwandten Spezies *S. reilianum* und *U. hordei* konserviert. Gezeigt ist ein Sequenzalignment erstellt mit der Software ClustalW der Homologe von BCAS2: *U. maydis* (Num1), *S. reilianum* (Sr12752), *U. hordei* (UHOR_02497), *C. cinerea* (Num1), *H. sapiens* (BCAS2/SPF27), *A. nidulans* (AN4244). Gleiche Aminosäuren sind in schwarz hinterlegt, ähnliche in grau.

AN4244 wurde von *Aspergillus* cDNA amplifiziert und über das Gateway-System in ein Plasmid mit P_{hxt1} -Promotor, Nos-Terminator (*nosT*) und Carboxin-Resistenz integriert. Die Fusion von AN4244 und dem Num1-N-Terminus erfolgte über eine PCR-Reaktion. Ein Überlapp von 20 bp an den Oligonukleotiden ermöglichte die Fusion der beiden Amplifikate (Abb. 19D). Die Konstrukte wurden in den *ip*-locus von AB31 $\Delta num1$ (UNK108) Protoplasten transformiert. Weder die ektopische Expression von AN4244 (UTO95) noch die Fusion aus dem *U. maydis* spezifischen N-Terminus mit AN4244 (UTO98) führte zu einer Komplementation des polaren

Wachstumsdefekts, der größte Anteil der Zellen wies nach Induktion des bE/bW-Heterodimers in AB31 kürzere und kurvige Filamente auf (Abb. 18).

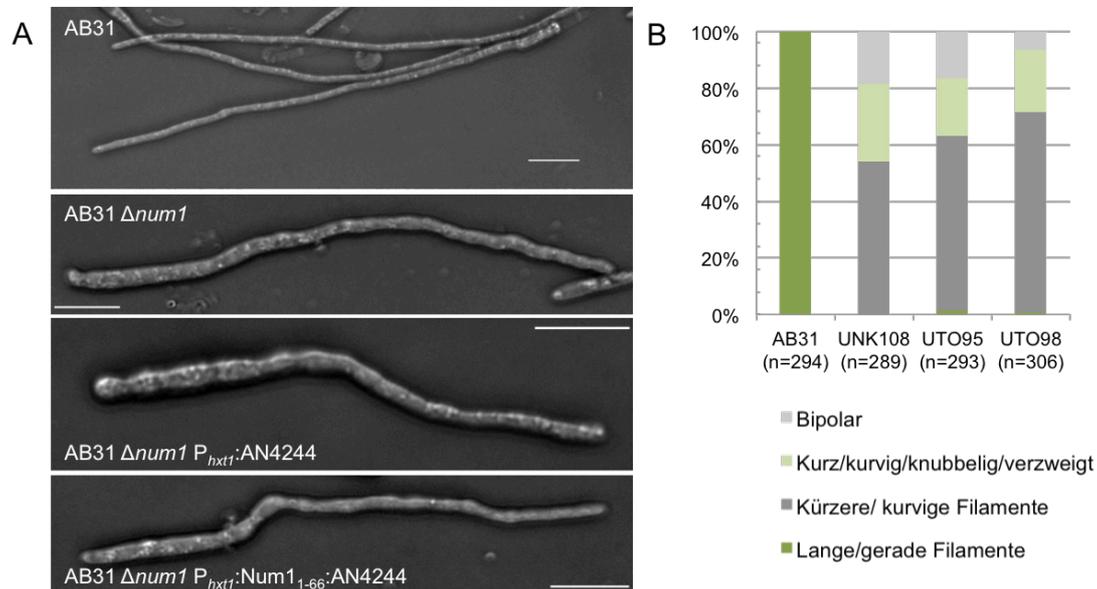


Abb. 18: AN4244 und Num1₁₋₆₆:AN4244 können den polaren Wachstumsdefekt von $\Delta num1$ nicht retten. (A) Zur Überprüfung ob das *A. nidulans* Homolog die $\Delta num1$ -Phänotypen durch ektopische Expression unter dem starken P_{hxt1}-Promotor komplementieren kann, wurden 15 h induzierte Filamente mikroskopisch analysiert (UTO95). Die Zellen waren verkürzt und verdickt und ähnelten stark $\Delta num1$ -Hyphen. Auch die Fusion von AN4244 mit den N-terminalen 65 AS von Num1 war nicht in der Lage das filamentöse Wachstum wieder herzustellen (UTO98). (B) Die Quantifizierung der Zellen von je drei unabhängigen Präparaten bestätigte diese Beobachtung. (A) Die Maßstabsbalken entsprechen 10 μ m.

Die Fusion mit einem einfachen grün-fluoreszierenden Protein (GFP) ergab eine Lokalisation der Proteine im gesamten Zytoplasma, wobei das Signal in der AN4244:gfp Fusion (UTO89) wesentlich stärker war als das des chimären Fusionsproteins (UTO101), aus diesem Grund wurden in diesem Stamm auch keine Filamente zur weiteren Untersuchung induziert. Die für Num1 charakteristische Lokalisierung im Zellkern konnte in beiden Komplementations-Stämmen nicht beobachtet werden (Abb. 19A+B). Zur Überprüfung ob die Num1-Homologe noch in der Lage sind ihre Rolle während der Spleiß-Prozesse zu übernehmen, wurden analog zu Kellner *et al.*, 2014 die Transkripte von *pcna* und *ubi1* auf ihre Spleiß-Effizienz überprüft (Abb. 19C). Für die Transkripte von *pcna* (UMAG_05403, „probable proliferating factor“) und *ubi1* (UMAG_02440, „ubiquitin gene 1“) konnte bereits eine erhöhte Intron-Retentionsrate für die num1-Deletionsmutante gezeigt werden. Um dies zu zeigen wurden für die quantitative Realtime (qRT)-Analyse Oligonukleotide verwendet, die einen direkten Mengenvergleich zwischen gespleißter und ungespleißter Transkripte zulassen (Abb. 20C), die Quotienten aus den relativen Expressionswerten wurden zwischen den Stämmen verglichen. Die

Ergebnisse

Normalisierung der relativen Genexpression erfolgte mit dem eukaryotischen Translationsinitiationsfaktor 2b (*eIF2b*, *UMAG_04869*). Die Stämme wurden in CM-Glukose Komplettmedium angezogen, die mRNA wurde aus haploiden Sporidien von AB31, AB31 $\Delta num1$ (UNK108), AB31 $\Delta num1$ $P_{hxt1}:AN4244$ (UTO95) und AB31 $\Delta num1$ $P_{hxt1}:num1_{1-66}:AN4244$ (UTO98) isoliert und danach eine cDNA-Synthese durchgeführt. Die Analyse ergab einen ähnlichen Wert der AN4244- und Num1₁₋₆₆:AN4244- Komplementationsstämme im Vergleich mit der *num1*-Deletionsmutante. AN4244 scheint nicht in der Lage zu sein die Deletion von *num1* auszugleichen, auch die Fusion mit dem N-terminalen Bereich von Num1 veränderte das Ergebnis nicht.

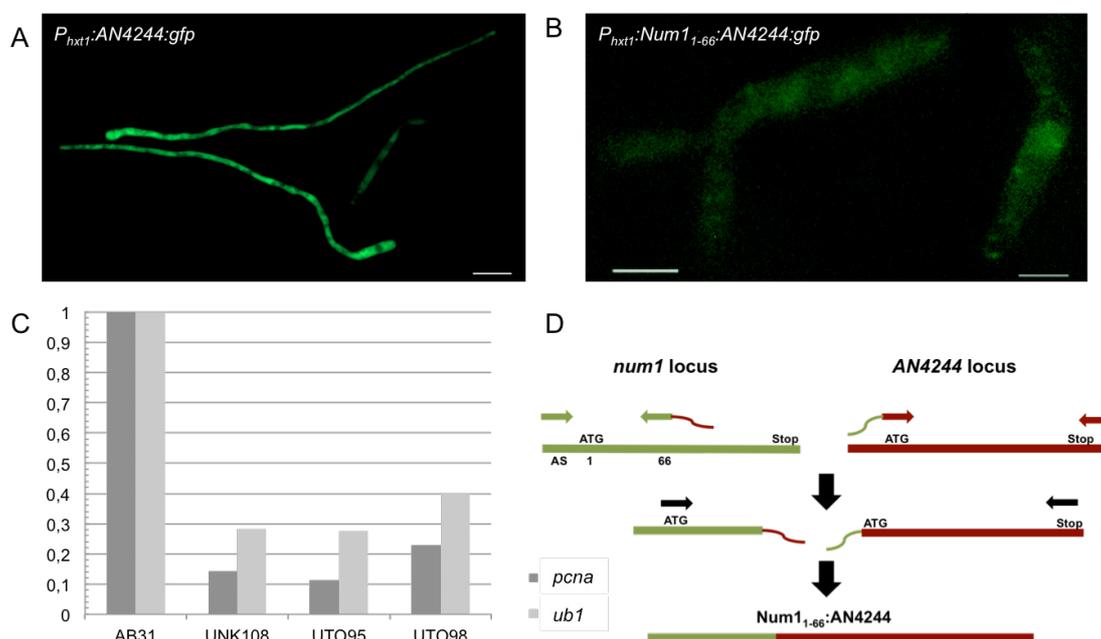


Abb. 19: AN4244 und Num1₁₋₆₆:AN4244 sind nicht in der Lage die Deletion von *num1* zu komplementieren. (A) Die Markierung des Num1 Homologs AN4244 mit GFP (UTO89) führte zu einer Lokalisierung im gesamten Zytoplasma, da die Filamente sich nicht von $\Delta num1$ -Hyphen unterschieden, kann man davon ausgehen dass das Fusionsprotein nicht funktionell ist. Untersucht wurden Zellen, die 15 h mit Arabinose-haltigem Medium induziert wurden, der Längenmaßstab entspricht 10 μ m. (B) Die C-terminale GFP-Fusion von Num1₁₋₆₆:AN4244 (UTO101) führte zu einem sehr schwachen Signal, da die *num1*-Deletionsphänotypen nicht komplementiert werden konnten, wird angenommen dass das Fusionsprotein nicht funktionsfähig ist. Untersucht wurden Sporidien aus axenischer Kultur, der Längenmaßstab entspricht 5 μ m. (C) Zur Überprüfung ob das *A. nidulans* Homolog funktionell den Ausfall von Num1 im NTC übernehmen kann, wurde die Spleiß-Effizienz der Transkripte von *pcna* (*proliferating cell nuclear antigen*) und *ubi1* (*ubiquitin gene1*) überprüft, indem das Verhältnis von gespleißtem zu ungespleißtem Transkript zueinander aufgetragen wurde. Die Normalisierung der relativen Genexpression erfolgte zum eukaryotischen Translationsinitiationsfaktor 2b (*eIF2b*) als Referenzgen. Weder AN4244 (UTO95) noch Num1₁₋₆₆:AN4244 (UTO98) waren in der Lage die Deletion von *num1* zu komplementieren und die Transkripte effizient zu spleißen. (D) Schematische Darstellung des Fusionsproteins Num1₁₋₆₆:AN4244. Durch Amplifikation von genomischer DNA wurden die zu fusionierenden Fragmente generiert, jeweils mit einem überlappenden Bereich von 20 bp. In einer zweiten PCR-Reaktion wurden die Fragmente zu einem verbunden.

2.1.2.2 Die C-terminale Verkürzung von Num1 hat keinen Einfluss auf die Funktion

In einem direkten Hefe-Zwei-Hybrid Interaktionstest konnte gezeigt werden, dass die letzten 8 Aminosäuren von Num1 für die Interaktion mit Cef1 notwendig sind (Hassinger, 2015) (Abb. 17, gelber Kasten). Cef1 (UMAG_04411) ist eine von vier Kernkomponenten im Spleißosom-assoziierten NTC (Kellner *et al.*, 2014). Dies ließ die Vermutung zu, dass eine Num1-Mutante, die nicht mehr in der Lage ist mit dem NTC zu interagieren eventuell weitere Aufschlüsse über die Funktion im Zytoplasma geben könnte. Zur Herstellung einer solchen Mutante wurde das endogene *num1* über homologe Rekombination durch eine mit GFP-fusionierte und um 24 Basenpaaren (8 AS) verkürzte *num1*-Version in AB31 ersetzt (UTO162). Zellen wurden in CM-Glucose Medium angezogen und Sporidien einer axenischen Kultur wurden mikroskopisch auf die Lokalisierung des verkürzten Fusionsproteins (Num1_{Δ814-837}:gfp) hin analysiert. Die Lokalisierung entspricht der für Num1-typischen nukleären Akkumulation, darüber hinaus konnte jedoch vor allem in Sporidien ein klares zytoplasmatisches Signal beobachtet werden. Die Fusionsproteine schienen sich im Zytoplasma zu bewegen jedoch eher ungerichtet und langsam (Abb. 20A). Diese Beobachtung wurde nicht weiter verfolgt, da die Bewegung von Num1 mit einer anderen Mikroskopietechnik genauer untersucht wurde. Nach 15-stündiger Induktion in Arabinose-haltigem Medium konnte festgestellt werden, dass die Deletion der letzten 8 Aminosäuren außerdem zu keinem Defekt des polaren Wachstums von Filamenten führte. Zur Überprüfung der Spleiß-Effizienz wurde eine qRT-PCR durchgeführt, als Zielgene wurden *pcna* und *rpb3* (UMAG_03550, „DNA-directed RNA polymerase II chain“) verwendet (Kellner *et al.*, 2014). Als Ausgangsmaterial für die cDNA Synthese dienten jeweils drei unabhängige biologische Replikate der Stämme AB31, AB31 $\Delta num1$ (UNK108) und AB31 Num1_{Δ814-837}:gfp (UTO162). Verwendet wurden Primer, die an den Exon-Exon-Grenzen oder im Intron des selben Gens binden, aus der Menge der Transkripte wurde ein Quotient gebildet und gegeneinander aufgetragen (Abb. 20C). Die Verkürzung von Num1 verhält sich in seiner Spleiß-Effizienz wie der Wildtyp, was im Vergleich zu einem *num1*-Deletionsstamm sehr deutlich wird. Zusammengefasst scheint die C-terminale Deletion von 24 bp keinen Einfluss auf die Funktionalität des Num1-Proteins zu haben.

Ergebnisse

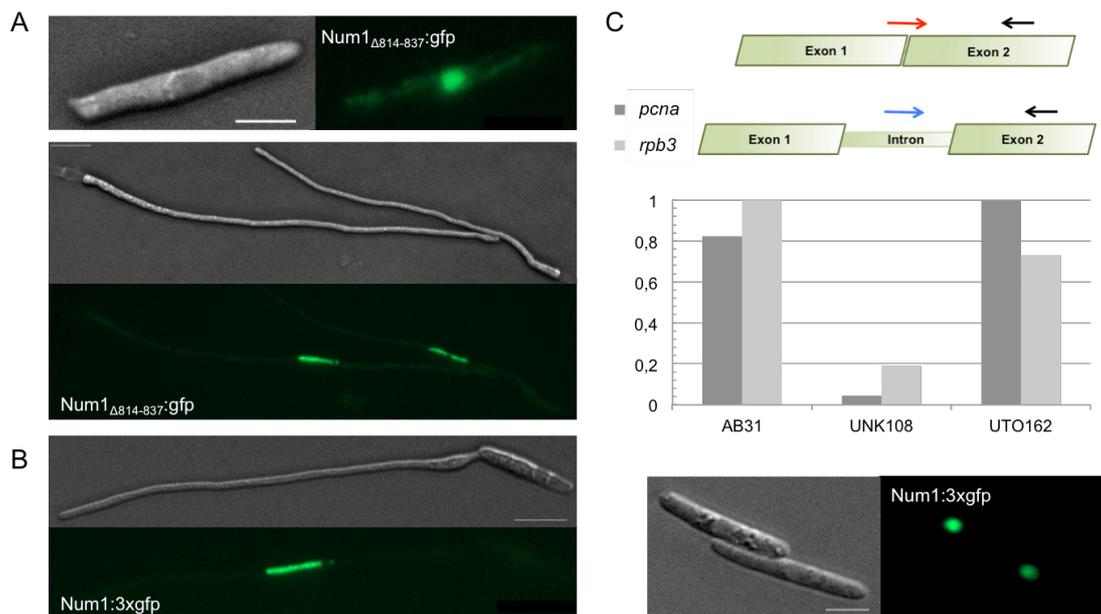


Abb. 20: Die Deletion der C-terminalen 8 Aminosäuren von Num1 beeinträchtigt die Funktion des Proteins nicht. In Vorarbeiten wurden die letzten 8 Aminosäuren von Num1 als Interaktionsdomäne für Cef1 identifiziert (Hassinger, 2015), die endogene Deletion dieses Bereichs sollte Aufschluss über seine genaue Funktion geben. (A) Die Lokalisation von Num1 $_{\Delta 814-837}$:gfp (C-terminale GFP Fusion, UTO162) wurde in Sporidien und 15 h induzierten Filamenten mikroskopisch analysiert und ergab ein Signal des Fusionsproteins im Zellkern und eine zum Wildtyp (B) stark erhöhte Population im Zytoplasma, welche sich auch bewegte. Das filamentöse Wachstum war nicht beeinträchtigt. Dargestellt sind Aufnahmen von DIC- und GFP-Kanälen. Maßstabsbalken: Sporidien 5 μ m, Filamente 10 μ m. (C) Zur Überprüfung ob das verkürzte Num1 immer noch seine Funktionen innerhalb des NTC übernehmen kann, wurde die Spleiß-Effizienz der Transkripte von *pcna* (*proliferating cell nuclear antigen*) und *rpb3* (*DNA-directed RNA polymerase II chain*) überprüft, indem das Verhältnis von gespleißtem zu ungespleißtem Transkript zueinander aufgetragen wurde. Die Spleiß-Effizienz von Num1 $_{\Delta 814-837}$:gfp erreichte das Wildtyp-Niveau. Die Normalisierung der relativen Genexpression erfolgte zum eukaryotischen Translationsinitiationsfaktor 2b (*eIF2b*) als Referenzgen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus je drei biologischen und zwei technischen Replikaten. Die obere und untere Grenze der Quotienten sind aufgeführt in 6.5, Tabelle 12.

2.1.2.3 Das Num1 $_{289-837}$ -Fusionsprotein lokalisiert im Zellkern

Während dieser Arbeit wurde zufällig ein Num1-Fusionsprotein generiert, das eine deutliche zytoplasmatische Lokalisierung und Bewegung aufwies. Zusätzlich konnte eine klare nukleäre Lokalisierung festgestellt werden (UTO122, Abb. 21B). Die Analyse des Konstrukts ergab, dass das erste Start-Codon des Gens durch einen Restriktionsverdau entfernt worden war, jedoch konnte innerhalb der 837 bp des *num1* ORFs noch ein zweites Start-Codon (ATG ab Position 289) identifiziert werden, das für ein verkürztes Protein im gleichen Leserahmen codiert (Num1 $_{289-837}$, Abb. 21A). Um die Frage zu klären, ob der zweite ORF wichtig für die zytoplasmatische Funktion des Proteins ist, wurde dieses zufällig generierte Produkt gezielt reproduziert und als Fusionsprotein im ektopischen *ip*-Locus exprimiert. Das Fusionsprotein mit einfachen GFP und unter der Regulation des P_{otef}-Promotors wurde in AB31-Protoplasten transformiert, das bedeutet es ist noch eine intakte

endogene Kopie von *num1* im Genom vorhanden (UTO178-181). Die mikroskopische Analyse von Sporidien aus einer axenischen Kultur angezogen in CM-Glucose ergab eine Lokalisierung von Num1₂₈₉₋₈₃₇:gfp im Zellkern. In zwei von vier Transformanden war innerhalb des Zellkerns ein besonders heller Punkt, der sich nicht bewegte, zu sehen. Im Zytoplasma konnte jedoch nur ein schwaches Signal detektiert werden, eine gerichtete Bewegung der Fusionsproteine im Zytoplasma fand nicht statt. Die Induktion über 15 Stunden resultierte wie zu erwarten in langen, geraden Filamenten.

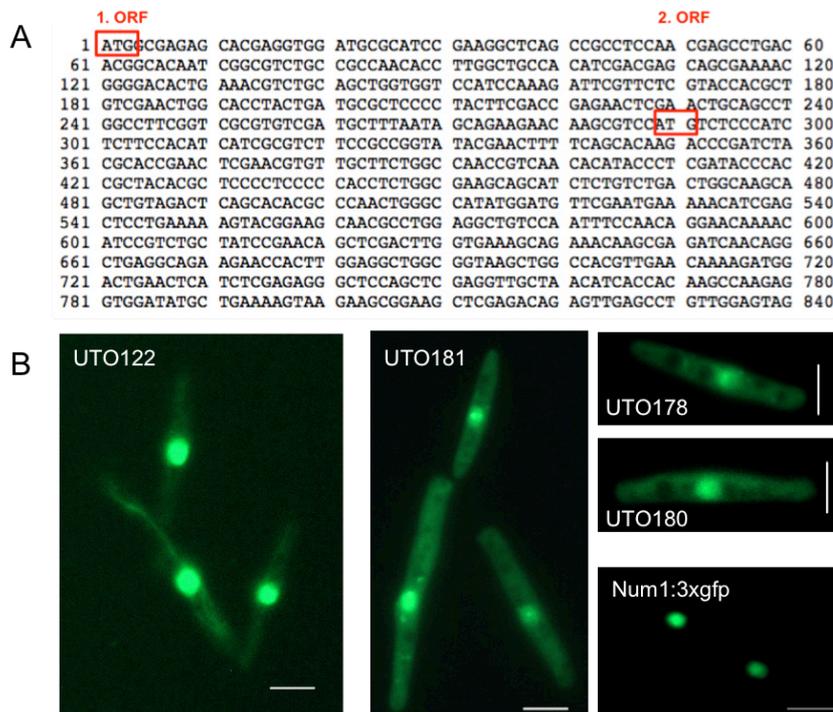


Abb. 21: Num1 enthält ein zweites Start-Codon im selben Leserahmen (A). (B) Durch Zufall wurde ein Num1-Fusionsprotein ohne das erste ATG generiert. Trotz zusätzlichem Stop-Codon konnte eine sehr deutliche Lokalisierung im Zellkern und Bewegung von Num1 im Zytoplasma detektiert werden (UTO122). Um diese Beobachtung gezielt zu reproduzieren, wurde der zweite Leserahmen von Num1 ohne Stop-Codon als C-terminale GFP-Fusion unter dem P_{oter} -Promotor ektopisch exprimiert (UTO178-181). Sporidien aus axenischer Kultur zeigten ein klares Signal im Zellkern, in zwei der Transformanden konnten im Nukleus zusätzliche sehr helle Punkte beobachtet werden (UTO178/UTO181). Im Vergleich zum wildtypischen Num1 (Num1:3xgfp) wurde in den Transformanden ein starkes zytoplasmatisches Signal festgestellt, das jedoch keine Strukturen oder Bewegung erkennen ließ. Dargestellt sind Aufnahmen des GFP-Kanals. Die Maßstabsbalken entsprechen 5 μ m.

2.1.2.4 Untersuchung der AN4244 Lokalisierung in *A. nidulans*

Num1 lokalisiert in *U. maydis* zum größten Teil im Zellkern, es sind jedoch auch Moleküle im Zytoplasma detektierbar. Um zu überprüfen ob die Lokalisierung von Num1 im Zytoplasma auch in anderen Organismen beobachtet werden kann, wurden Fusionsproteine des homologen Proteins AN4244 in *A. nidulans*

Ergebnisse

mikroskopisch analysiert. Über homologe Rekombination im nativen Locus von *AN4244* wurde das Gen am N-Terminus mit einem einfach GFP und dem Glycerin-induzierbaren *alcA*-Promotor fusioniert. Für die mikroskopische Analyse wurden die Zellen über Nacht in Glycerin-haltigem Medium kultiviert. Die Betrachtung der Zellen ergab eine klare Lokalisierung des Fusionsproteins im Zellkern (Abb. 22A). Dies konnte mit einer Co-Lokalisierung mit dem Farbstoff DAPI bestätigt werden. Im Zytoplasma war bei geringer Anregungsstärke kein Signal zu sehen, bei Überbelichtung und Kontrastverstärkung konnte jedoch Signal detektiert werden (Abb. 22B). Ohne weitere Untersuchungen kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob das AN4244-Fusionsprotein im Zytoplasma von *A. nidulans* lokalisiert ist, da auch in *U. maydis* die zytoplasmatische Fraktion der Fusionsproteine auch nur mit hochauflösenden Mikroskopie-Techniken visualisiert werden kann.



Abb. 22: AN4244:gfp lokalisiert in Zellkernen von *A. nidulans*. Zur genaueren Charakterisierung von Num1 wurde das Homolog AN4244 in *A. nidulans* im endogenen Locus N-terminal mit dem Glycerin-induzierbaren *alcA*-Promotor und GFP fusioniert. (A) AN4244:gfp war gleichmäßig über die Hyphe in runden Aggregaten verteilt, die Vermutung lag nahe dass es sich dabei um Zellkerne handelt. Dies konnte mit einer Co-Lokalisierung mit dem Farbstoff DAPI bestätigt werden. Gezeigt sind eine Überlagerung aus DIC und GFP und GFP-Bild (links) und Bilder erstellt mit GFP- und DAPI-Kanal (rechts). (B) Die Lokalisierung des Num1-Homologs war in den Zellkernen der Hyphen, bei Überbelichtung der Bilder war jedoch auch Signal im Zytoplasma detektierbar. Die Zellen wurden über Nacht in Glycerin-haltigem Medium induziert und mikroskopisch analysiert. Die Maßstabsbalken entsprechen (A links) 10 μ m und (A rechts/B) 5 μ m.

2.1.2.5 Ausstülpungen des Zellkerns sind Num1-unabhängig

Die Lokalisierung von Num1:3xgfp wird auf Grund seiner Funktion im NTC vorhergesagt und auch beobachtet. Besonders in Filamenten, in denen der Zellkern durch die gegebene Zellform schmaler und in die Länge gezogen ist, wurden oft fädige Strukturen, die vom Zellkern weg zu ziehen schienen beobachtet (Abb. 23A). Auf Grund der postulierten zytoplasmatischen Funktion von Num1 war es nicht auszuschließen, dass es sich dabei um ein Num1-spezifisches Phänomen handelt. Eine Co-Lokalisierung mit dem Histon Marker H1 (B. Faist, unpubliziert) sollte darüber weiteren Aufschluss geben. Eine endogene Fusion von *h1:mCherry:nat* wurde in AB31 *num1:3xgfp* (UTO108) Stämmen durchgeführt und Sporidien aus axenischer Kultur mikroskopisch untersucht. Das Signal der beiden Fusionsproteine zeigte im Zellkern eine klare Überlagerung lediglich das zytoplasmatische Num1-Signal zeigte keine Co-Lokalisierung mit H1:mCherry. Auch die fädigen Strukturen zeigten ein H1-Signal auf, daher kann man davon ausgehen, dass es sich um eine Ausstülpung des Zellkerns handelt und keine spezifische Struktur von Num1 ist (Abb. 23B).

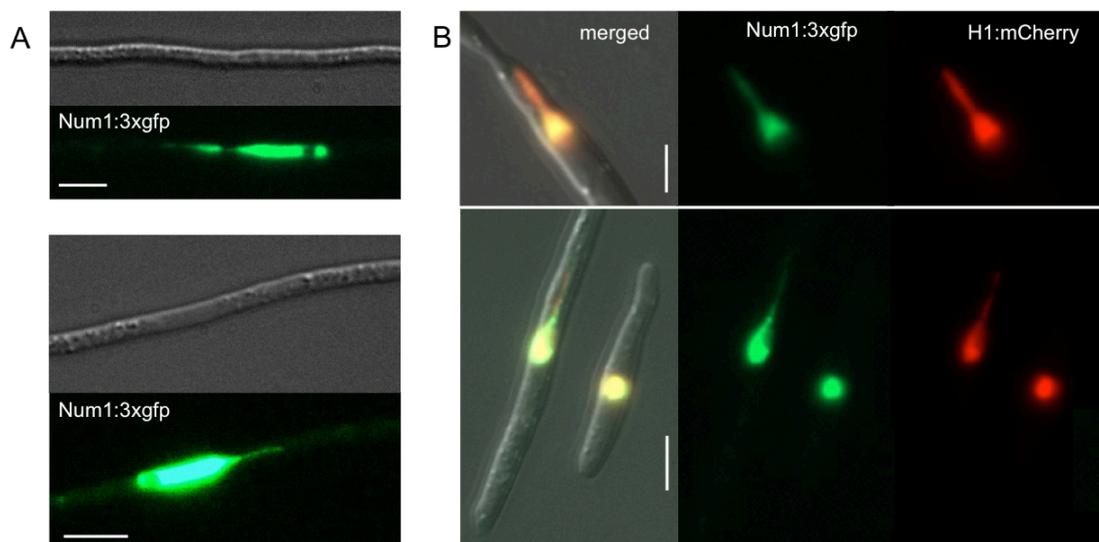


Abb. 23: Nukleäre Ausstülpungen sind Num1-unabhängig. (A) Bei der Beobachtung der Num1-Fusionsproteine konnten Ausstülpungen am Zellkern beobachtet werden. (B) Um die Frage zu klären, ob diese spezifisch für Num1 sind, wurde eine Co-Lokalisierung mit dem Histon-Marker H1 durchgeführt. Die mikroskopische Analyse von Sporidien aus axenischer Kultur ergab eine Co-Lokalisierung der Signale, es handelt sich aus diesem Grund höchst wahrscheinlich um extrem langgezogene Bereiche des Nukleus. Gezeigt sind (A) DIC und GFP-Aufnahmen und (B) eine Überlagerung von DIC und den Fluoreszenzkanälen GFP und RFP und jeweils Einzelbilder dieser. (A/B) Die Maßstabsbalken entsprechen 5 μ m.

2.2 Charakterisierung des Nma1-Proteins

Das Protein von UMAG_00933 wurde als Interaktor von Num1 in einem Hefe-Zwei-Hybrid Screen identifiziert (Kellner, 2009). Eine Fusion mit GFP ergab eine Lokalisierung an Mikrotubuli sowie eine Bewegung entlang dieser, wovon der Proteinname Nma1 (*num1-interacting microtubule-associated protein 1*) abgeleitet wurde (Pinter, 2012). Bioinformatische Analysen ergaben keine spezifischen Domänen, die einen Schluss auf die intrazelluläre Bewegung zulassen würden (Pinter, 2012). Eine Co-Immunopräzipitation deckte die Interaktion von Nma1 mit drei Komponenten des CORVET-Komplexes auf, einem Komplex der essenziell für die Fusion von Endosomen ist (Pinter, 2015, Balderhaar und Ungermann, 2013). Ziel der vorliegenden Arbeit war die Aufklärung der Mechanismen, denen der Transport von Nma1 durch die Zelle zu Grunde liegt und in welchem Zusammenhang das Protein mit dem CORVET-Komplex steht.

2.2.1 Charakterisierung der Nma1 Transportprozesse

2.2.1.1 Nma1 bewegt sich entlang von Mikrotubuli

In Vorarbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass Nma1 sich entlang der Mikrotubuli bewegt (Pinter, 2012). Die Lokalisierung erinnert an die Motilität von Endosomen in anterograder und retrograder Richtung innerhalb der Zelle. Es ist jedoch zu beachten, dass sich die Form des Signals teilweise von den publizierten morphologischen Rab5- und Yup1-Strukturen unterscheidet (Wedlich-Söldner *et al.*, 2000, Fuchs *et al.*, 2006). Zur mikroskopischen Analyse wurde ein AB31 *nma1:3xgfp* mit ekotpisch exprimiertem $P_{otef}:mCherry:tub1$ Stamm (UNP2) verwendet. Statt heller, motiler Punkte wurden häufig zusätzliche längere, kometenhafte Strukturen an den Mikrotubuli beobachtet, die sich ebenfalls bewegten (Abb. 24A+B). Die Anzahl der sich bewegenden sichtbaren Einzelstrukturen ist in Spordien erhöht im Vergleich zum Nma1:3xgfp Signal in Filamenten (Abb. 24C). Trotz einer geringen Belichtungszeit von 200 ms schien es als würden die Nma1-Moleküle die Filamente oft komplett dekorieren, statt sich entlang dieser zu bewegen. Die Analyse von Kymographen ergab jedoch bidirektionale Einzelbewegungen von Molekülen (Abb. 26C).

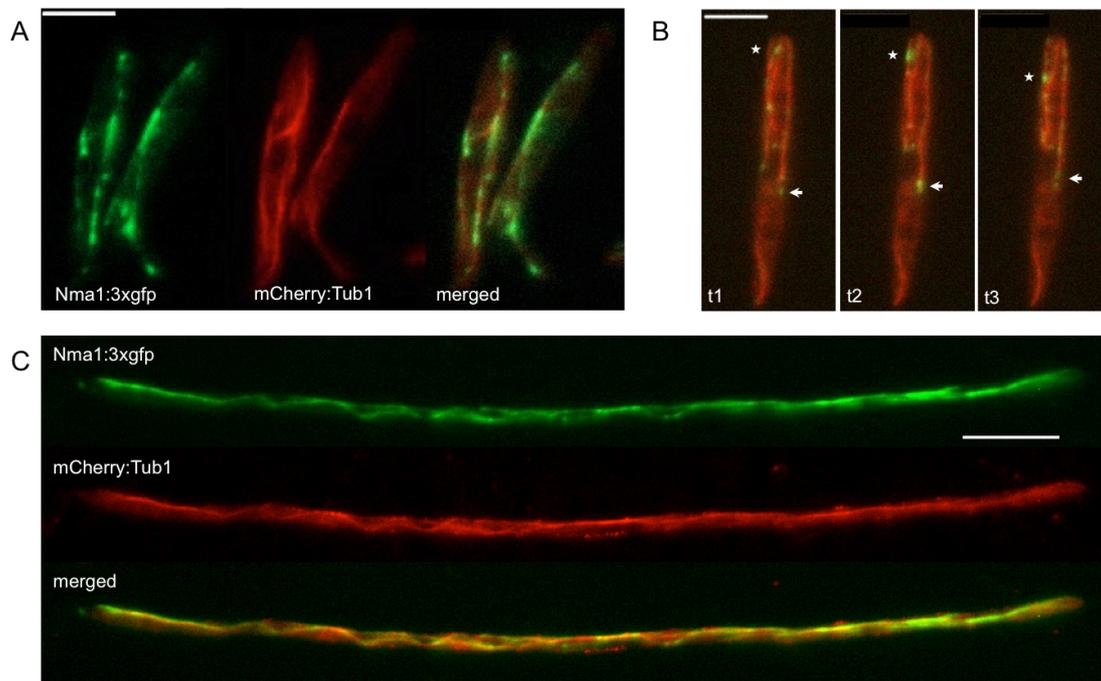


Abb. 24: Nma1 bewegt sich entlang von Mikrotubuli. (A) Nma1:3xgfp Fusionsproteine lokalisieren entlang von mCherry-markierten Mikrotubuli. Nma1 (grün) ist in Punkten und länglichen, kometenhaften Strukturen detektierbar. Gezeigt sind Bilder von Sporidien aufgenommen im GFP- und RFP-Kanal und eine Überlagerung (merged). (B) Die Proteine sind nicht statisch sondern bewegen sich bidirektional entlang des Mikrotubuli-Zytoskeletts durch die Zelle. Gezeigt ist die Zeitreihe, die Bildaufnahme erfolgte alle 2,8 Sekunden. Gezeigt sind Überlagerungen von Bildern des GFP- und RFP-Kanals. (C) Auch in 15 Stunden induzierten Filamenten wurde bidirektionale Motilität von Nma1 entlang von Mikrotubuli beobachtet. Der Überlapp der Signale ist groß, erfolgt jedoch nicht vollständig. Nma1-Signale können in Filamenten selten als einzelne Punkte detektiert werden. Gezeigt sind Überlagerungen von Bildern des GFP- und RFP-Kanals (merged) und die entsprechenden Einzelkanäle. Die Maßstabsbalken entsprechen (A/B) 5 μm und (C) 10 μm .

2.2.1.2 Die Überexpression von Nma1 führt zu motilen Partikeln

Um Nma1 genauer zu untersuchen wurde überprüft, ob eine Komplementation des Gens in einem ektopischen Locus funktionell ist. Dazu wurde in einem AB31 Stamm mit *nma1*-Deletionshintergrund eine $P_{otef}:nma1:gfp$ Fusion, einfach integriert, im *ip*-Locus unter dem starken P_{otef} -Promotor exprimiert (UTO165). Wie im Wildtyp konnte in den Komplementations-Stämmen eine Bewegung von Nma1 entlang fibrillärer Strukturen im Zytoplasma beobachtet werden (Abb. 25). Das Signal war schwächer als das der endogenen Fusion, jedoch wurde hierbei nur ein einfaches GFP statt eines dreifachen als Marker verwendet.

Ergebnisse

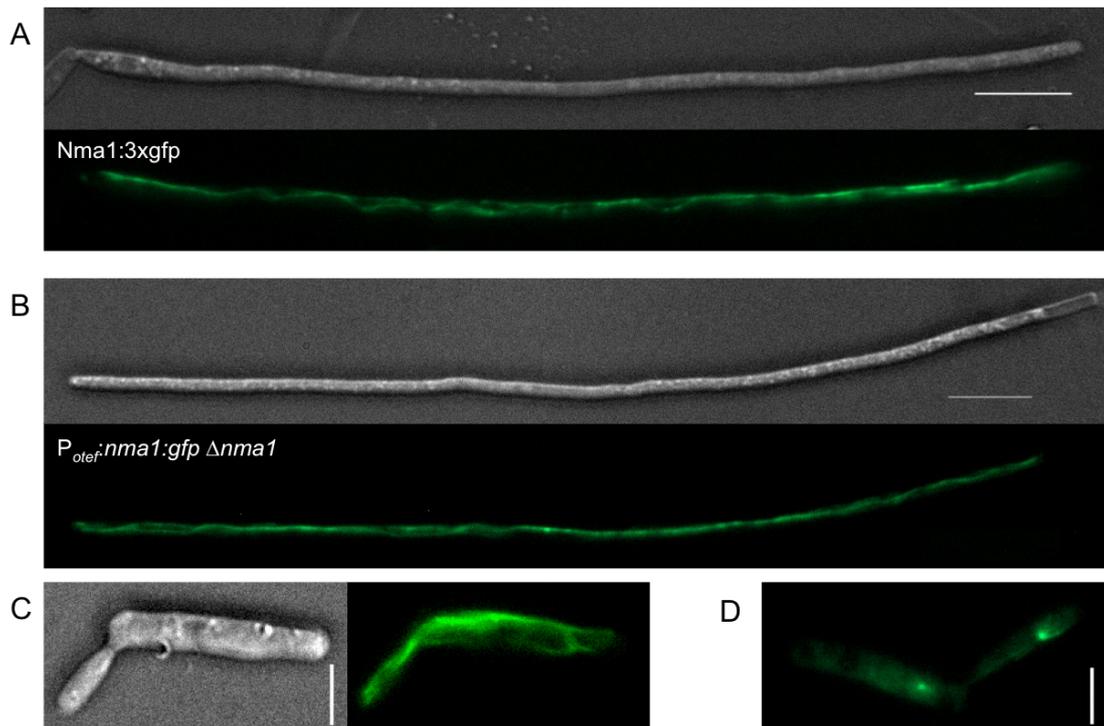


Abb. 25: Das überexprimierte Nma1-Protein lokalisiert entlang von Mikrotubuli. Zur Überprüfung ob eine ektopische Expression von Nma1 in der Lage ist eine *nma1*-Deletion zu komplementieren, wurde Nma1 unter dem starken P_{otef} -Promotor und C-terminalem GFP-tag im *ip*-Locus eines $\Delta nma1$ -Stamms exprimiert (UTO165). Sowohl in Sporidien (C) als auch 15 h in CM-Arabinose induzierten Filamenten (B) konnte kein Unterschied zum Wildtyp (A) festgestellt werden. (D) Nma1 lokalisierte während der Interphase an Strukturen, die an Spindelpole erinnern. Gezeigt sind DIC- und GFP-Aufnahmen. Die Maßstabsbalken entsprechen (A/B) 10 μm und (C/D) 5 μm .

Die sich bewegenden Moleküle erinnerten besonders in Sporidien eher an lange, fädige Strukturen als an einzelne sich bewegende Punkte. Trotzdem war es möglich Kymographen zu erstellen und die Bewegungsgeschwindigkeit der Proteine zu messen (Abb. 26). Dazu wurden ein-minütige Videos bei einer Belichtungszeit von 200 ms aufgenommen und darin die Bewegung von jeweils 10 sich bewegenden Partikeln gemessen, fünf in anterograde und fünf in retrograde Richtung. Das Resultat der Untersuchung zeigte, dass $P_{otef}::nma1:gfp$ in der Lage ist die Deletion zu komplementieren, die für das überexprimierte Nma1 ermittelte Geschwindigkeit lag sogar über der des nativen Proteins. In Sporidien wurde nach Auswertung von 90 Endosomen im Wildtyphintergrund (UNP2) eine anterograde Nma1 Geschwindigkeit von $2,84 \pm 0,73 \mu\text{m/s}$ und retrograd von $2,82 \pm 0,7 \mu\text{m/s}$ gemessen. Die Geschwindigkeit der Nma1-Überexpression war leicht erhöht (anterograd: $3,23 \pm 1,08 \mu\text{m/s}$; retrograd: $2,88 \pm 0,92 \mu\text{m/s}$). In den Komplementations-Stämmen konnten jedoch insgesamt nur 50 motile Signale in die Auswertung mit einbezogen werden, da die Qualität der Videos auf Grund schwacher Fluoreszenz nicht ausreichend war. In Wildtyp Filamenten, die 15 h in Arabinose-haltigem Medium induziert wurden, konnte eine Geschwindigkeit von $3,28 \pm 0,68 \mu\text{m/s}$ anterograd und $3,2 \pm 0,6 \mu\text{m/s}$

retrograd ermittelt werden. Erneut war die Geschwindigkeit leicht erhöht auf eine anterograde Bewegungsgeschwindigkeit von $3,6 \pm 0,7 \mu\text{m/s}$ und retrograd: $3,28 \pm 0,73 \mu\text{m/s}$ in $P_{otef}::nma1:gfp$ exprimierenden Stämmen (Tabelle 1). Die ektopische Expression von Nma1 ist somit in der Lage eine *nma1*-Deletion zu komplementieren.

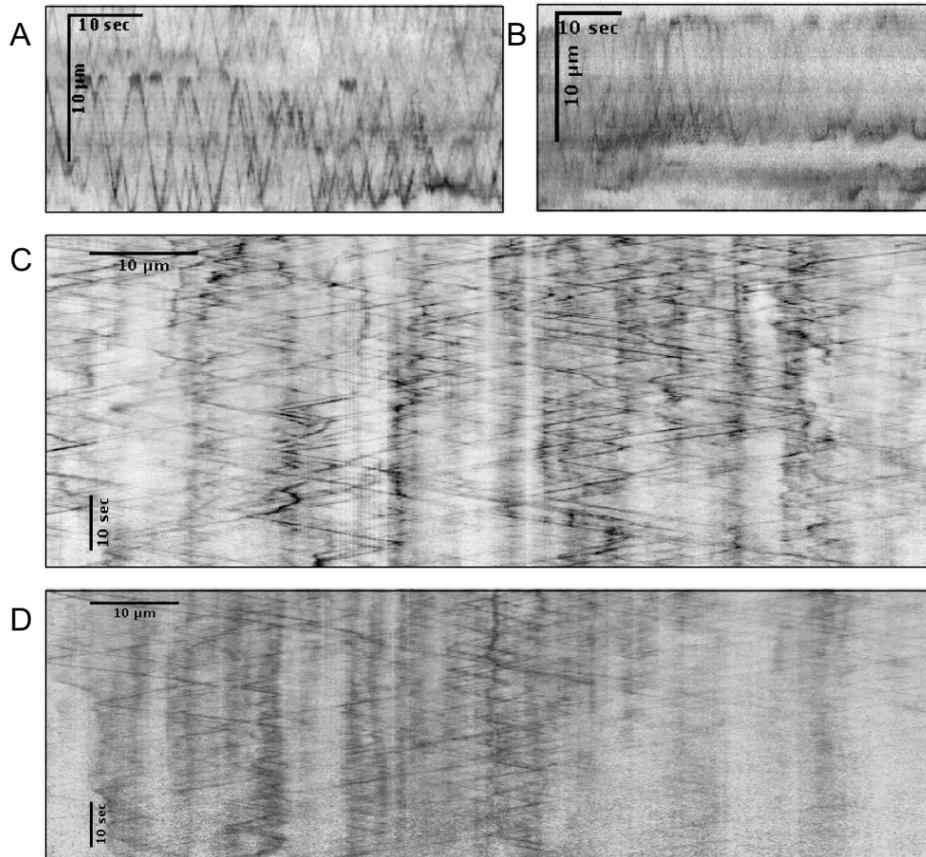


Abb. 26: $P_{otef}::Nma1:gfp$ bewegt sich bidirektional entlang von Mikrotubuli. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Überexpression von Nma1 zu einer wildtypischen Lokalisierung des Fusionsproteins führt. Mit Hilfe von Kymographen sollte überprüft werden, ob auch die intrazelluläre Bewegung ohne Beeinträchtigung abläuft. Dazu wurden ein-minütige Videoaufnahmen bei 200 ms Belichtungszeit im GFP-Kanal aufgenommen und die Partikelbewegung über die Zeit aufgetragen. Die Analyse der Nma1-Bewegung in Sporidien (A/B) und 15 h induzierten Filamenten (C/D) ergab eine leichte Erhöhung der Geschwindigkeit der antero- und retrograden Bewegung von Nma1 in Komplementations-Stämmen (B/D) verglichen zum Wildtyp (A/C).

Tabelle 1: Messwerte der Geschwindigkeitsbestimmung von Nma1 in Wildtyp Zellen und unter Überexpressionsbedingungen. Gemessen wurden je 10 Signale pro Zelle (5 anterograd, 5 retrograd). Analysiert wurden Sporidien aus axenischer Kultur und Filamente nach 15-stündiger Induktion.

	Nma1 anterograd	Motilität Nma1 retrograd	Motilität
Sporidien			
<i>nma1:3xgfp</i> (n= 9)	$2,84 \pm 0,73 \mu\text{m/s}$	$2,82 \pm 0,7 \mu\text{m/s}$	
$P_{otef}::nma1:gfp$ (n=5)	$3,23 \pm 1,08 \mu\text{m/s}$	$2,88 \pm 0,92 \mu\text{m/s}$	
<i>t-test</i>	$P = 0,403$	$P = 0,296$	
Filamente			
<i>nma1:3xgfp</i> (n=12)	$3,28 \pm 0,68 \mu\text{m/s}$	$3,2 \pm 0,6 \mu\text{m/s}$	
$P_{otef}::nma1:gfp$ (n=9)	$3,6 \pm 0,7 \mu\text{m/s}$	$3,28 \pm 0,73 \mu\text{m/s}$	
<i>t-test</i>	$P = 0,294$	$P = 0,483$	

Das Ergebnis ist nicht signifikant bei $p < 0,05$

2.2.1.3 Der Nma1-Transport ist abhängig von Kin3 und Kin1

Mit Hilfe bioinformatischer Analysen konnten keine Domänen identifiziert werden, die Aufschluss über Bewegung von Nma1 entlang von Mikrotubuli geben (Pinter, 2012). Auf Grund dessen sollte die Untersuchung bekannter Motorproteine weitere Hinweise dazu geben. Das Motorprotein Kin3 kann deletiert werden, wohingegen die Funktion von Dynein in *U. maydis* nur durch eine Temperatur-sensitive Mutation ausgeschaltet werden kann (Wedlich-Söldner *et al.*, 2002). Trotz mehrfacher Versuche war die Expression von Nma1:3xgfp in einem Dyn^{ts}-Stamm nicht funktionell, daher wurde stattdessen das konventionelle Kinesin Kin1 deletiert, das Dynein zum Plus-Ende der Mikrotubuli transportiert (Lenz *et al.*, 2006). Durch diese Mutation kann man indirekt Rückschlüsse auf die Funktion von Dynein ziehen.

Für die Herstellung einer $\Delta kin3$ -Mutante wurde der offene Leserahmen (ORF) des Gens durch eine Nourseothricin-Resistenzkassette (Nat^R) ersetzt. Die Deletion wurde in einem AB31-Derivat, welcher ein Nma1:3xgfp-Fusionsprotein und einen Tubulin-Marker enthält, durchgeführt (UTO142). Die phänotypische Analyse der Zellen ergab den bereits beschriebenen Defekt bei der Zellteilung (Wedlich-Söldner *et al.*, 2002), der sowohl bei Sporidien aus axenischer Kultur als auch in induzierten Zellen nach 17h in CM-Arabinose Medium festgestellt werden konnte. Das Mikrotubuli-Zytoskelett erschien nicht beeinträchtigt. Nma1:3xgfp war in den Deletionsstämmen weiterhin entlang der Mikrotubuli lokalisiert. Meist konnte das Protein in Aggregaten detektiert werden, was zu einer reduzierten Signal-Anzahl verglichen zum Wildtyp resultierte (Abb. 27). Ob die Gesamtmenge des Proteins reduziert ist, wurde nicht überprüft. Auswertungen von Kymographen ergaben, dass sowohl in Sporidien als auch in induzierten Zellen die bidirektionale Motilität von Nma1 komplett aufgehoben war. In seltenen Fällen konnte eine leichte Bewegung einzelner Proteine bzw. Proteinaggregate detektiert werden (Pfeil). Dies zeigt, dass die Nma1-Bewegung von Kin3 abhängig ist (Abb. 27C+D).

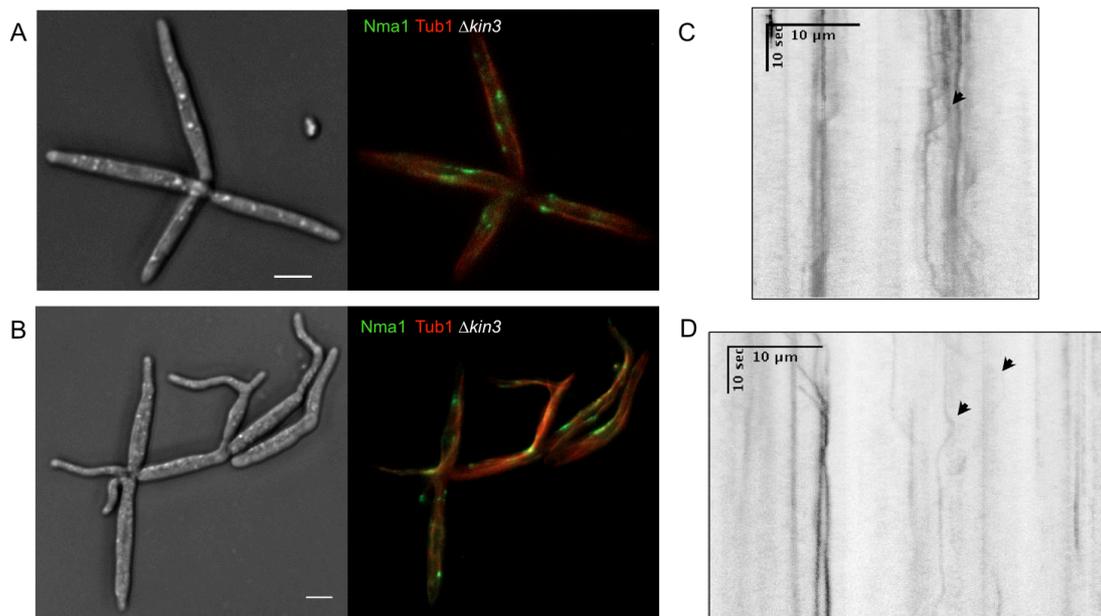


Abb. 27: Die Nma1-Bewegung ist abhängig von Kin3. Um die Bewegung von Nma1 genauer zu untersuchen, wurde der offene Leserahmen des Motorproteins Kin3 in einem Stamm, der Nma1:3xgfp und mCherry:Tub1 enthält, deletiert (UTO142). Sowohl in Sporidien (A) als auch in 5h induzierten Zellen (B) war der *kin3*-Deletionsphänotyp feststellbar. Nma1 (grün) war weiterhin entlang von Mikrotubuli (rot) lokalisiert und hauptsächlich in Akkumulationen detektierbar. Die Protein-Menge schien reduziert zu sein (nicht quantifiziert). Optisch konnten reduzierte Nma1-Bewegungen, die eher als Taumeln zu beschreiben sind, beobachtet werden. Zur besseren Darstellung wurden aus ein-minütigen Videos mit 200 ms Belichtungszeit des GFP-Kanals Kymographen erstellt. In nicht-induzierten (C) und 17 h induzierten Zellen (D) konnte bis auf sehr wenige Ausnahmen (Pfeil) keine Bewegung mehr detektiert werden. (A/B) Dargestellt sind DIC-Aufnahmen und Überlagerungen des GFP- und RFP-Kanals. Die Maßstabsbalken entsprechen 5 μm.

Die Herstellung von *Δkin1*-Mutanten erfolgte analog zu der von *Δkin3*-Deletionsstämmen. Die Deletion von *kin1* führt zu keinem morphologischen Phänotyp bei Sporidien, bei Induktion des bE/bW-Heterodimers kommt es jedoch zu bipolarem Wachstum der Pilzhyphen (Schuchardt *et al.*, 2005). Dies konnte auch in den erzeugten AB31 Nma1:3xgfp *P_{otef}*:mCherry:Tub1 *Δkin1*-Stämmen (UTO145) beobachtet werden. Die sichtbaren Mikrotubuli in *Δkin1*-Zellen erschienen feiner und häufiger, was auf einen Defekt bei der Bündelung von Mikrotubuli schließen lässt. Das Fehlen von Kin1 führt zu einer Lokalisierung von Nma1:3xgfp an den Polen der Zellen. In Sporidien aus axenischer Kultur wurde die Signal-Akkumulation nur an einem der beiden Zellpole beobachtet, dabei handelte es sich um den Pol gegenüber des Sprosshalses (Abb. 28A). Zusätzlich konnte vereinzelt Nma1-Signal im Zytoplasma oder entlang von Mikrotubuli detektiert werden. Bei Filamenten konnte bereits nach fünf-stündiger Induktionszeit mit CM-Arabinose der bipolare Phänotyp festgestellt werden. In diesen Zellen wurden große Nma1:3xgfp-Aggregate an beiden Zellpolen beobachtet (Abb. 28D). Darüber hinaus war vorherrschend in der Zellmitte eine weitere Nma1-Population vorhanden, die entlang der Mikrotubuli lokalisierte. Die Auswertung mit Hilfe von Kymographen ergab einen kompletten Verlust der

Ergebnisse

Motilität von Nma1 (Abb. 28B+C). Die optische Beobachtung der Aufnahmen vermittelte den Eindruck, dass sich wenige Nma1-Signale noch bewegen bzw. eher hin und her zu taumeln scheinen (Abb. 28B+C,Pfeil). Trotzdem kann die Aussagen getroffen werden, dass die Motilität von Nma1 durch den Verlust von Kin1 aufgehoben wird.

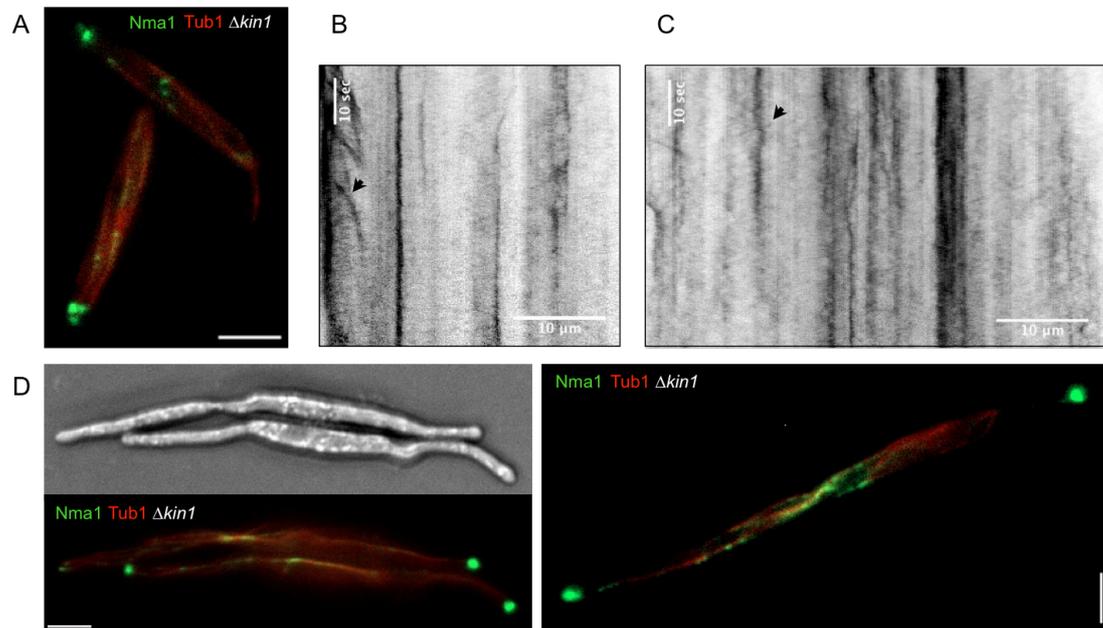


Abb. 28: Die Nma1-Bewegung ist abhängig von Kin1. Um die Bewegung von Nma1 genauer zu untersuchen, wurde der offene Leserahmen des Motorproteins Kin1 in einem Stamm, der Nma1:3xgfp und mCherry:Tub1 enthält, deletiert (UTO145). Der *kin1*-Deletionsphänotyp ist nur in induzierten Filamenten ausgeprägt, trotzdem konnte auch in (A) Sporidien eine veränderte Lokalisierung von Nma1 (grün) festgestellt werden. Nma1 war vorherrschend in den beiden Zellpolen akkumuliert, teilweise war noch eine Assoziation mit Mikrotubuli (rot) innerhalb der Zelle vorhanden. (D) Auch nach 5 h Induktionszeit des bE/bW-Heterodimers waren große Num1-Aggregate in beiden Polen der bipolar wachsenden Zellen vorhanden. Zur Darstellung der Nma1-Bewegung wurden aus ein-minütigen Videos mit 200 ms Belichtungszeit des GFP-Kanals Kymographen erstellt. Sowohl in nicht induzierten (B) als auch nach 17 h Induktion des bE/bE-Heterodimers konnte bis auf sehr wenige Ausnahmen (Pfeil) kaum mehr Bewegung detektiert werden. Dargestellt sind eine DIC-Aufnahme und Überlagerungen des GFP- und RFP-Kanals. Die Maßstabsbalken entsprechen 5 μm .

2.2.1.4 Nma1 bewegt sich gemeinsam mit frühen Endosomen entlang von Mikrotubuli

Die Beobachtung, dass die Nma1-Motilität Kin3 und, indirekt durch Kin1 gezeigt, Dynein-abhängig ist, legte die Vermutung nahe, dass Nma1 wie Endosomen transportiert wird. Aus diesem Grund wurde überprüft, ob sich Nma1 gemeinsam mit bekannten Endosomen-Markern innerhalb der Zelle bewegt. Für eine Co-Lokalisierung von Nma1 mit frühen Endosomen wurde ein AB31-Stamm mit einem *nma1:3xgfp* unter dem nativen Promotor und einem Rab5-Marker ($P_{tef}:mCherry:rab5:nosT$) im *ip*-Locus verwendet (UTO148). Die Signale von Nma1

und Rab5 waren sowohl in Sporidien als auch in induzierten Filamenten gleichmäßig in der Zelle verteilt (Abb. 29). Die Bewegung der Fusionsproteine erfolgte entlang von Mikrotubuli. Die Untersuchung mit einem konventionellen Fluoreszenzmikroskop ließ zwar auf eine Co-Lokalisierung der beiden Signale schließen, jedoch war die Bewegung der Endosomen zu schnell, um Zwei-Kanal Bilder oder Videos aufzunehmen und eine Überlagerung der Signale zu sehen, auch nicht bei sehr geringen Belichtungszeiten (Abb. 29C). Die Fixierung der Zellen ließ zwar eine Überlagerung der Nma1- und Rab5-Signale erkennen, die Motilität konnte so jedoch nicht überprüft werden (Abb. 29D).

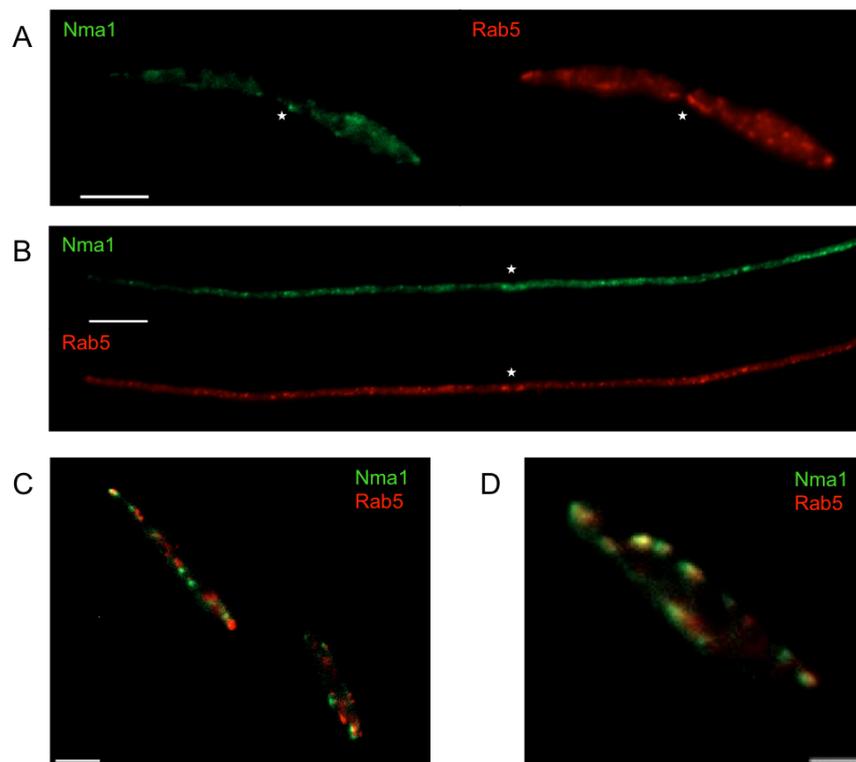


Abb. 29: Nma1 ist assoziiert mit Rab5-markierten frühen Endosomen. Um die Bewegung von Nma1 genauer zu untersuchen, wurde eine Co-Lokalisierung mit Rab5-markierten frühen Endosomen durchgeführt. AB31-Stämme, die Nma1:3xgfp und mCherry:Rab5 enthalten (UTO148) wurden mikroskopisch analysiert. Sowohl in Sporidien (A) als auch in 15 h induzierten Filamenten (B) waren Nma1 (grün) und Rab5 (rot) gleichmäßig über die Zellen verteilt. Manche Bereiche ließen die Vermutung zu, dass die Partikel co-lokalisieren könnten (Stern). (C) Überlagerungen des GFP- und RFP-Kanals direkt nacheinander aufgenommener Bilder waren auf Grund der schnellen Bewegungsgeschwindigkeit nicht sinnvoll. (D) Erst die Fixierung der Zellen konnte eine Co-Lokalisierung der Nma1- und Rab5- zeigen (gelbes Signal). Gezeigt sind Aufnahmen der GFP- und RFP-Kanäle und Überlagerungen dieser Bilder. Die Länge der Maßstabsbalken entspricht (A/C/D) 5 μ m und (B) 10 μ m.

Damit die Co-Migration von Nma1:3xgfp und mCherry:Rab5 in lebendigen Zellen beobachtet werden kann, wurden die Zellen an einem Spinning Disk Mikroskop untersucht. Spinning Disk ist eine konfokale Mikroskopietechnik, die in Kombination mit hochauflösenden Hochgeschwindigkeits-Kamerasystemen optimal für die

Ergebnisse

Aufnahme extrem dynamischer Prozesse wie der Bewegung von Vesikeln geeignet ist (Nakano, 2002). Durch Anregung der fluoreszenten Proteine mit einem Laser war es möglich Aufnahmen bei einer Belichtungszeit von nur 50 ms zu machen. Videoaufnahmen in zwei Kanälen ergaben innerhalb einer Minute circa 410 Bilder pro Kanal, was gegen 300 Bilder pro Kanal bei 200 ms Belichtungszeit durch eine Quecksilberlampe bei der konventionellen Epifluoreszenz steht. Videoaufnahmen und die Analyse der resultierenden Kymographen ergaben eine Co-Lokalisierung und einen Co-Transport der Mehrheit der Nma1- und Rab5a-Moleküle. Es ist jedoch zu beachten, dass eine kleine Population keine Überlagerung des Signals zeigte (Abb. 30, Pfeil).

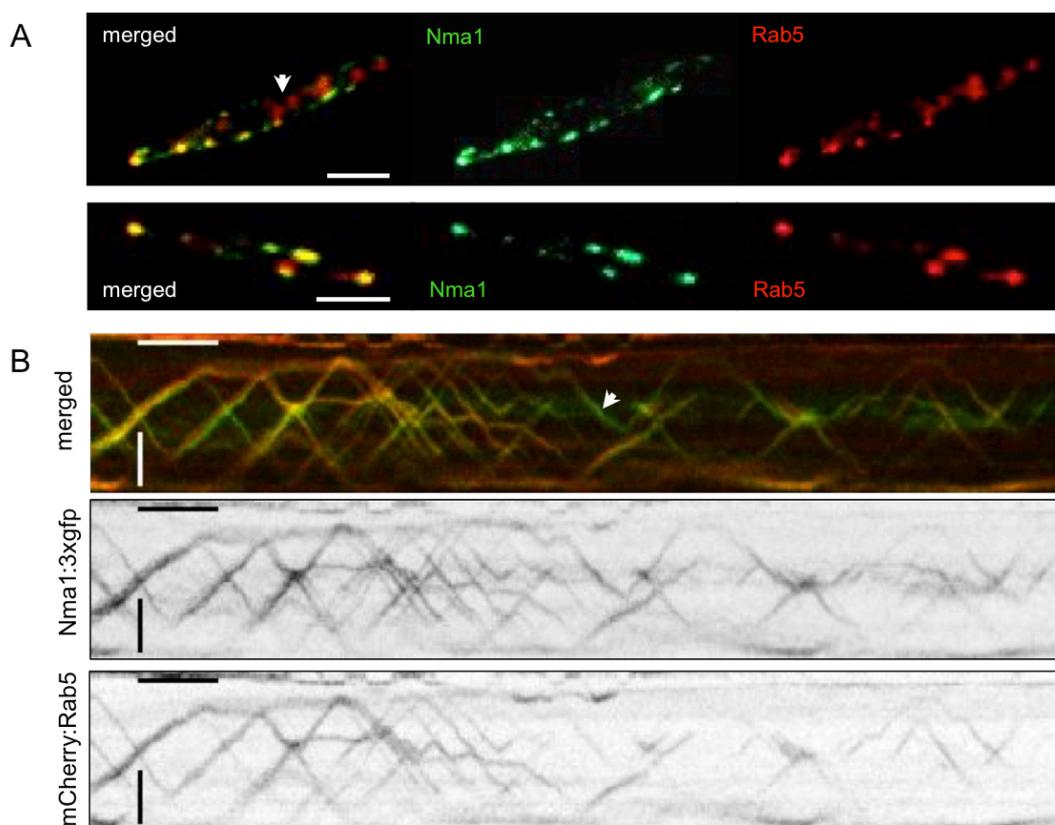


Abb. 30: Nma1 bewegt sich gemeinsam mit frühen Endosomen entlang von Mikrotubuli. (A) Zur Beobachtung des putativen Nma1- und Rab5-Co-Transports *in vivo* wurde als Methode die Spinning Disk Mikroskopie gewählt. Es wurden Videoaufnahmen erstellt, die mit einer Belichtungszeit von 100 ms pro Kanal die Bewegung von Nma1 (grün) und Rab5 (rot) aufzeichneten. Die Überlagerung der Signale wird in gelb dargestellt (merged). (B) Die Kymographen ergaben eine deutliche Überlagerung des Signals, was die Vermutung bestätigte, dass sich Nma1 und Rab5-markierten frühen Endosomen gemeinsam bidirektional durch die Zelle bewegen. Zur besseren Darstellung wurden die einzelnen Kanäle in schwarz-weiß gezeigt und nur die Überlagerung in Farbe. Gelbe Spuren bedeuten Co-Transport, teilweise konnten auch nicht überlagerte Signale detektiert werden (Pfeil). Kymographen: Zeit (horizontal): 5 s, Distanz (vertikal): 5 μm . (A) Die Maßstabsbalken entsprechen 5 μm .

2.2.1.5 Die Deletion von *vps9* hat keinen Einfluss auf die Motilität von Rab5

In Vorarbeiten konnte eine Interaktion von Nma1 mit Komponenten des CORVET-Komplexes gezeigt werden (Pinter, 2015). In *S. cerevisiae* steht dieser Komplex direkt in Verbindung mit Rab5 (Balderhaar und Ungermann, 2013). Um die Rab5-Nma1-Interaktion genauer zu beleuchten, sollte eine Deletion eines Rab5-GEFs weitere Informationen geben. GEFs überführen inaktive Rab-Proteine in den GTP-gebundenen aktiven Zustand. Eine Deletion sollte dazu führen, dass Rab5-Proteine nicht mehr in ihrer aktiven Form vorliegen können. In Hefe ist Vps9 der GEF für das Rab5-Homolog Vps21p. Eine BLASTp-Suche des Hefe Vps9 im *U. maydis* Genom ergab mit einer Identität von 56 % als Homolog das Protein UMAG_10209. Die Deletion erfolgte, indem der offene Leserahmen von *vps9* durch homologe Rekombination mit einer Nat^R -Resistenzkassette in einem AB31-Derivat, mit Nma1:3x:gfp und mCherry:Rab5 Marker, ersetzt wurde (UTO200). Sporidien und induzierte Filamenten wiesen starke morphologische Defekte auf (Abb. 31). Die Zellen waren ähnlich zur Deletion von *vps3* (Schneider, 2016) nicht mehr in der Lage sich voneinander abzuschnüren, wuchsen bipolar und teilweise stark verzweigt. Dies wirkte sich auch auf die Zahl der Zellkerne aus (Abb. 31C). Da der Wachstumsdefekt in allen Zellen sehr schwerwiegend war, wurde keine Quantifizierung durchgeführt. Das Hauptinteresse bei diesem Experiment war die Untersuchung des Verhaltens von Nma1 und Rab5 nach Deletion des putativen GEFs *vps9*. Die mikroskopische Beobachtung von Nma1 ergab keinen Unterschied zwischen Wildtyp und der $\Delta vps9$ -Mutante. Nma1 war weiterhin entlang von Mikrotubuli lokalisiert und eine antero- sowie retrograde Bewegung konnte detektiert werden (Abb. 31A+B). Die Bewegung von Rab5-markierten frühen Endosomen schien entgegen der Annahmen nicht stark beeinträchtigt zu sein. Die mikroskopische Analyse ergab eine Bewegung von Rab5 entlang fibrillärer Strukturen, die die Zelle durchspannten (Abb. 31A+B).

Ergebnisse

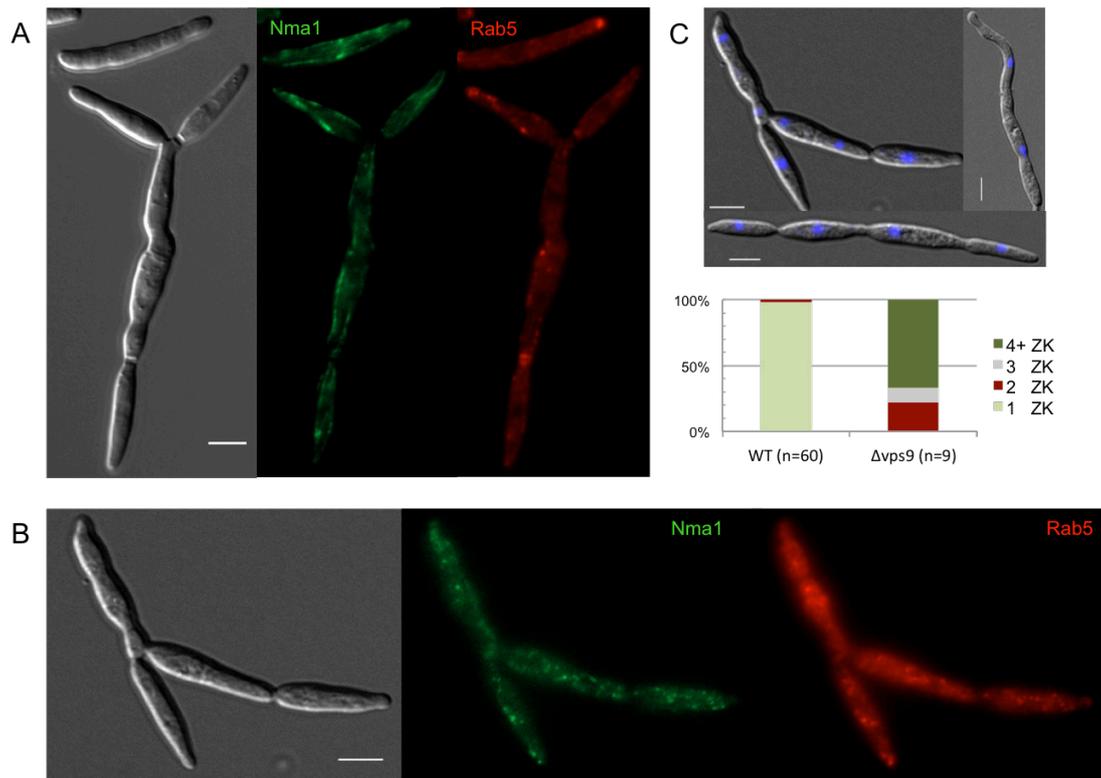


Abb. 31: Die Deletion von *vps9* beeinträchtigt Rab5 nicht wie erwartet. Rab-Proteine werden durch ihre GEFs aktiviert, so ist Vps9 in Hefe für Rab5 verantwortlich. Die Deletion des *U. maydis* Homologs führte zu starken Wachstumsschäden, die sich in verzweigt und verdickt wachsenden Zellen äußerten. Der Phänotyp wurde sowohl in nicht-induzierten Zellen (A) als auch nach 17-stündiger Induktion des bE/bW-Heterodimers (B) beobachtet. Nma1 (grün) und Rab5 (rot) waren weiterhin entlang von Mikrotubuli lokalisiert und optisch konnte auch eine Bewegung der Fusionsproteine wahrgenommen werden. Das Signal von Rab5 schien etwas diffuser in der gesamten Zelle verteilt zu sein. (C) Eine Färbung von fixierten Zellen mit DAPI ergab, dass alle $\Delta vps9$ -Zellen mindestens zwei oder mehr Zellkerne enthielten. Gezeigt sind Aufnahmen der DIC-, GFP- und RFP-Kanäle und (C) eine Überlagerung von DIC und DAPI. (A-C) Alle Maßstabsbalken entsprechen 5 μm .

Die Analyse der Kymographen von 15-17 Stunden induzierten Filamenten ergab jedoch ein etwas anderes Bild als die mikroskopische Beobachtung: Zu Beginn der Aufnahmen des Nma1-Signals waren noch motile Partikel detektierbar, die aber nach kurzer Zeit ihre Bewegung einstellten und stationär blieben (Abb. 32). Auch die Strecke der Bewegung war sehr kurz verglichen zu Wildtypzellen. Bewegten sich Nma1-Partikel in Wildtyp-Filamenten durchschnittlich in einer Distanz von $12,04 \pm 4,12 \mu\text{m}$ ($n = 119$), war die Strecke die Nma1 und Rab5 zurücklegten auf $5,14 \pm 2,05 \mu\text{m}$ ($n = 89$; $P = 0,34$) beziehungsweise $5,82 \pm 2,3 \mu\text{m}$ ($n = 113$; $P = 0,27$) signifikant reduziert im $\Delta vps9$ -Hintergrund (Tabelle 2). Die Signifikanz wurde mit einem *t-test* (nicht signifikant bei $P < 0,05$) überprüft, dazu wurden auch die Werte von Rab5 in $\Delta vps9$ mit Nma1 im Wildtyphintergrund verglichen, da bereits gezeigt werden konnte, dass Rab5 und Nma1 gemeinsam durch die Zelle migrieren. Auf Grund der reduzierten motilen Partikelzahl und der kurzen Bewegungsdauer war es nicht möglich eine durchschnittliche Geschwindigkeit zu ermitteln. Die Stagnation von

Nma1 nach kurzer Zeit konnte in allen analysierten Kymographen bestätigt werden ($n = 8$). Die Motilität von Rab5 war weiterhin anter- und retrograd durch die Zelle detektierbar. Die Auswertung der Kymographen zeigte, dass der Großteil der Rab5-Population noch in der Lage war sich zu bewegen, es konnten jedoch auch stationäre Partikel detektiert werden (Abb. 32). Diese Ergebnisse zeigen auf, dass Rab5 trotz der *vps9*-Deletion weiterhin an frühe Endosomen rekrutiert werden kann und sich mit diesen entlang von Mikrotubuli durch die Zelle bewegt.

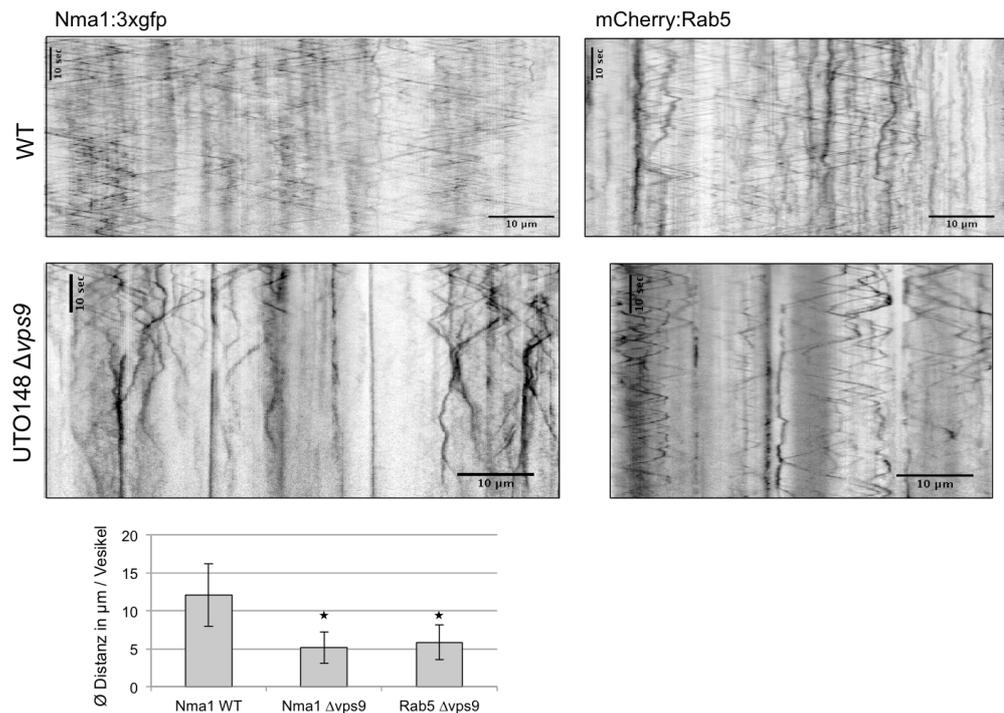


Abb. 32: Die Deletion von *vps9* beeinträchtigt die Bewegung von Nma1 und Rab5. Durch die Deletion des putativen GEFs *vps9* wurde eine Inhibierung der Rab5-Bewegung erwartet. Die Verteilung der Rab5-Proteine erschien zwar etwas diffuser innerhalb der Zelle, die optische Betrachtung von Nma1 und Rab5 ließ jedoch keinen deutlichen Unterschied zum Wildtyp bezüglich der Bewegung erkennen. Dies sollte mit Hilfe von Kymographen genauer überprüft werden. Dazu wurden ein-minütige Videoaufnahmen bei 200 ms Belichtungszeit im GFP- (Nma1) und RFP-Kanal (Rab5) aufgenommen und die Vesikelbewegung über die Zeit aufgetragen. Zu Beginn der Aufnahme konnten noch antero- sowie retrograde Bewegungen von Nma1 detektiert werden, diese endeten jedoch nach ca. einem Drittel der Zeit. Im Gegensatz dazu schien die Rab5-Motilität nicht eingeschränkt zu sein. Auffällig war jedoch die stark verkürzte Distanz, die von den beobachteten Vesikeln zurückgelegt wurde. Die durchschnittliche Distanz in μm pro Vesikel wurde ermittelt und mit der Bewegung von Nma1 in Wildtypfilamenten verglichen. Sowohl Nma1 Δvps9 also auch Rab5 Δvps9 wurden mit Nma1 aus Wildtyp-Filamenten verglichen. Die Distanz war jeweils signifikant um mehr als die Hälfte verringert. Kymographen: Zeit (vertikal): 10 s, Distanz (horizontal): 10 μm .

Tabelle 2: Die Lautweite von Nma1 und Rab5 wird durch die Deletion von *vps9* reduziert. Wildtyp-Filamente wurden nach 15 h Induktionszeit ausgewertet, die Δvps9 -Stämme nach 17 h Induktion. Die ermittelten Distanzen der Mutanten wurden jeweils mit Nma1 aus Wildtypzellen verglichen.

	Nma1 WT	Nma1 Δvps9	Rab5 Δvps9
Ø Distanz/Vesikel	12,04 \pm 4,12 μm	5,14 \pm 2,05 μm	5,82 \pm 2,3 μm
	n = 119	n = 89	n = 113
t-test (not significant at $P > 0,05$)		$P = 0,34$	$P = 0,27$

2.2.2 Nma1 und frühe Endosomen lokalisieren am Spindelpolkkörper

2.2.2.1 Nma1 lokalisiert am Spindelpolkkörper

Nma1-Fusionsproteine bewegen sich bidirektional durch die Zelle und lokalisieren entlang von Mikrotubuli. In Sporidien und Filamenten konnte jedoch neben den motilen Signalen auch ein zusätzliches stationäres Signal nah am Zellkern detektiert werden. Eine zusätzliche Lokalisierung am MTOC/SPK wurde deshalb bereits diskutiert (Pinter, 2012). Für weitere Untersuchungen wurde eine Co-Lokalisierung von Nma1:3xgfp und dem MTOC/SPK-Marker Tub2, dem γ -Tubulin aus *U. maydis*, vorgenommen. Dazu wurde *tub2* in AB31 *nma1:3xgfp in locus* C-terminal mit einer RFP-Nat^R Kasette fusioniert und untersucht (UNK265, N. Kellner unveröffentlicht). In Sporidien aus axenischer Kultur konnte während der Interphase keine Überlagerung der Signale beobachtet werden. Beim Eintritt in die Mitose konzentrierte sich das Nma1-Signal jedoch in einem Punkt, der mit dem Signal von Tub2 co-lokalisierte (Abb. 33A, Stern), innerhalb kurzer Zeit verringerte sich auch die Menge des zytoplasmatischen Nma1 (Abb. 33A, Pfeil). Filamente des AB31-Stamms verbleiben durch das aktive *b*-Heterodimer im Zellzyklusarrest und können daher keine Mitose vollziehen. Aus diesem Grund konnte in AB31 Filamenten nur der Zustand der Interphase beobachtet werden, in dem Nma1 zum größten Teil entlang von Mikrotubuli lokalisierte, ein geringer Teil jedoch auch mit dem Spindelpolkkörper assoziiert war (Abb. 33B).

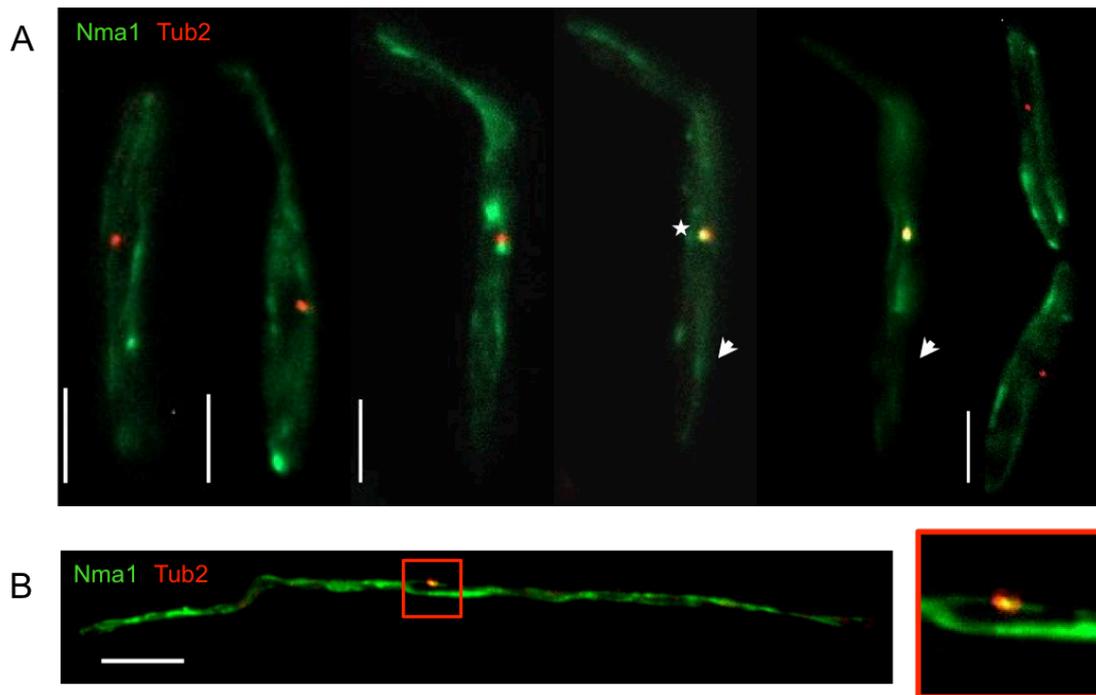


Abb. 33: Nma1 lokalisiert am Spindelpolkörper. Tub2 ist das γ -Tubulin aus *U. maydis* und lokalisiert am SPK/MTOC. (A) In Sporidien konnte Tub2 (rot) während der Interphase dicht am Zellkern (nicht angefärbt) beobachtet werden. Nma1 (grün) war gleichmäßig entlang von Mikrotubuli lokalisiert und bewegte sich bidirektional entlang dieser. Beim Eintritt in die Mitosephase kondensierte das gesamte Signal jedoch in einer Akkumulation, die mit Tub2 co-lokalisierte (Stern). (B) In Filamenten, die durch die Induktion des bE/bW-Heterodimers (16 h) im Zellzyklus-Arrest verbleiben, wurde eine partielle Co-Lokalisierung von Nma1 (grün) und Tub2 (rot) am SPK beobachtet (Vergrößerung, gelbes Signal). Untersucht wurde der Stamm UNK265 (Zur Verfügung gestellt von N. Kellner, nicht publiziert). Die Maßstabsbalken entsprechen (A) in Sporidien 5 μm und im (B) Filament 10 μm .

Die interessanteren Phänomene konnten während der Mitose beobachtet werden (Abb. 34A). Nma1 konzentrierte sich am Spindelpol und wanderte mit diesem in die Knospe der Tochterzelle ein. Dort fand die Teilung der Spindelpolkörper statt. Nma1 war bei der Teilung zwischen den beiden Polen detektierbar. Nach einiger Zeit war im Bereich zwischen den Spindeln (*spindle mid-zone* = SMZ) das Nma1-Signal verschwunden und dafür an Strukturen lokalisiert, die an astrale Mikrotubuli erinnern. Dort verließ Nma1 bis die beiden Spindelpole in der Mitte der Mutter- und Tochterzellen platziert waren und sich wieder auflösten. Nach Ausbildung von Interphasen-Mikrotubuli konnte Nma1 wieder entlang dieser Strukturen beobachtet werden.

Einen weiteren Hinweis auf die Beteiligung von Nma1 während der Ausbildung der Mitose-Spindel ergab eine Co-Lokalisierung von Nma1:3xgfp und H1:mCherry (UNP3, Pinter, 2015). Während der Teilung der Chromosomen, die durch H1 markiert wurden, konnte eine langgezogene Struktur von Nma1 detektiert werden (Abb. 34B). In der Literatur findet man die gleiche Struktur von Tub1 während der Chromosomensegregation (Straube *et al.*, 2003; Abb. 4F), was auf eine Co-

Ergebnisse

Lokalisierung von Nma1 und Tub1 während der Spindelteilung hindeutet. Bei der Migration der Spindeln in die Mutter- und Tochterzelle war Nma1 erneut auf der den Spindeln abgewandten Seite entlang von filamentösen Strukturen detektierbar. Durch den beschriebenen Zusammenhang mit Tub1 kann man davon ausgehen, dass es sich um astrale Mikrotubuli handelt.

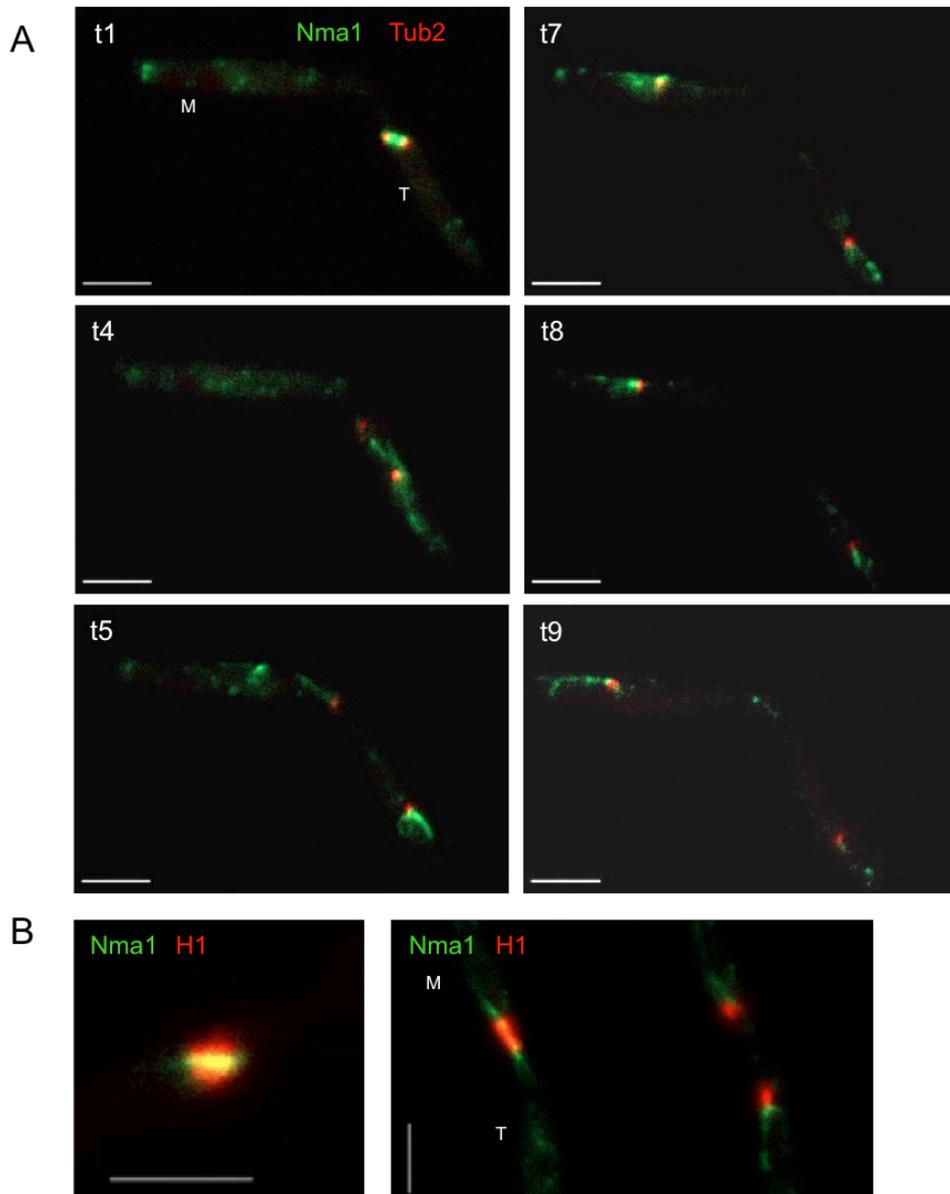


Abb. 34: Nma1 lokalisiert an der Mitosespindel. Die Beobachtung von Nma1 und Tub2 während der Mitosephase ließ eine klare Lokalisierung von Nma1 an der Mitosespindel erkennen. (A) Nma1 (grün) migrierte gemeinsam mit Tub2 (rot) in die Tochterzelle (nicht gezeigt), wo der Spindelpolkörper sich teilte (t1) um anschließend in das Zentrum der Mutter (M)- und Tochterzelle (T) zu wandern. Nma1 war zuerst zwischen den Spindelpolen lokalisiert (t1/t4), verschwand jedoch nach kurzer Zeit aus der SMZ und lagerte sich an anderen Strukturen an, die wahrscheinlich astrale Mikrotubuli sind. Die Bildaufnahme erfolgte alle 27 s. (B) Die Betrachtung von Nma1 und dem Histonmarker H1 (rot) zeigte ein kondensiertes Nma1-Signal (grün) über dem Zellkern kurz vor der Teilung. Bei der Migration der Chromosomen (rot) markierte Nma1 erneut filamentöse Strukturen, die auf astrale Mikrotubuli hindeuten. (A/B) Gezeigt sind Überlagerungen der GFP- und RFP-Aufnahmen. Alle Maßstabsbalken entsprechen 5 μm .

2.2.2.2 Nma1 lokalisiert zusammen mit α -Tubulin an der Mitosespindel

Nach der Beobachtung, dass Nma1 an Spindel-assoziierten Strukturen lokalisiert, sollte eine Co-Lokalisierung mit Tub1, dem α -Tubulin aus *U. maydis*, einen genaueren Einblick in das Verhalten des Proteins während der Mitose geben. Zur Analyse wurden Sporidien aus axenischer Kultur von AB31 Nma1:3xgfp P_{otef} :mCherry:Tub1 (UNP2) mikroskopisch analysiert. Beim Übergang der G2- in die Mitosephase kondensieren die Mikrotubuli in einem Punkt Nahe dem Sprosshals zwischen Mutter- und Tochterzelle, in der Nähe des Zellkerns (nicht gezeigt). Die kondensierten Mikrotubuli wandern mit dem Spindelpolkörper in die Tochterzelle ein. Dort teilt sich der Spindelpolkörper und Tub1 ist als längliches Signal sichtbar. Mit Hilfe der Mikrotubuli bewegen sich die Spindelpolkörper voneinander weg. Im Bereich zwischen den Spindeln werden sie mittels Kin5 auseinander geschoben, wobei die astralen Mikrotubuli am Zellcortex mit Dynein verbunden sind und gezogen werden (Fink *et al.*, 2006). So werden die Spindeln in das Zentrum der Mutter- und Tochterzelle bewegt. Es ist eine Co-Lokalisierung von Nma1 und Tub1 zu beobachten, die vom Kondensieren des Signals bis zur Elongation der Spindel verfolgbar ist (Abb. 35). Zur beginnenden Elongation ist das Nma1-Signal zwischen den Spindeln klar detektierbar, mit fortschreitender Bewegung verliert sich das Signal und ist gegen Ende der Mitose nur noch an der Spindel selbst und den astralen Mikrotubuli sichtbar. Das Nma1-Signal in der SMZ wurde an Spindeln von einer Länge zwischen $3,95 \pm 0,8 \mu\text{m}$ bis $6,39 \pm 1,07 \mu\text{m}$ ($n = 6$) detektiert und konnte in allen auswertbaren Spindeln ($n = 9$) beobachtet werden. Ab einer Länge von $9,87 \pm 2,86 \mu\text{m}$ ($n = 5$) waren keine Nma1-Spots mehr zwischen den Spindeln zu beobachten, auf Grund der schnellen auseinander gleitenden Bewegung der Mitosespindel ist es nur in den früheren Stadien detektierbar. Während der gesamten Migration der Spindel durch die Zelle lokalisiert Nma1 auf den astralen Mikrotubuli. Kurze astrale Mikrotubuli wurden von Nma1 komplett überlagert, wohingegen auf längeren astralen Mikrotubuli einzelne Punkte beobachtet werden konnten (Abb. 35, Pfeil). In manchen Fällen konnte Nma1 nicht nur direkt auf den astralen Mikrotubuli, sondern auch an deren Plus-Enden detektiert werden (63%, $n = 19$ von 30 ausgewerteten Mitosespindeln). Dies wurde jedoch nur von späten Spindeln mit einer Länge von $12,1 \pm 2,97 \mu\text{m}$ ($n = 4$) festgestellt. Der Großteil der Nma1-Signale war mit der Spindel assoziiert, es konnte jedoch immer noch zytoplasmatisches Nma1 nachgewiesen werden. Die Schwierigkeit einer solchen Quantifizierung besteht darin, bei einem dynamischen Prozess wie der Spindel-Elongation, eine punktgenaue Lokalisierung in jeder Zelle zu bestimmen. Des Weiteren sind die

Ergebnisse

Zellen unterschiedlich groß was sich auch auf der Größe der Spindelstruktur auswirkt.

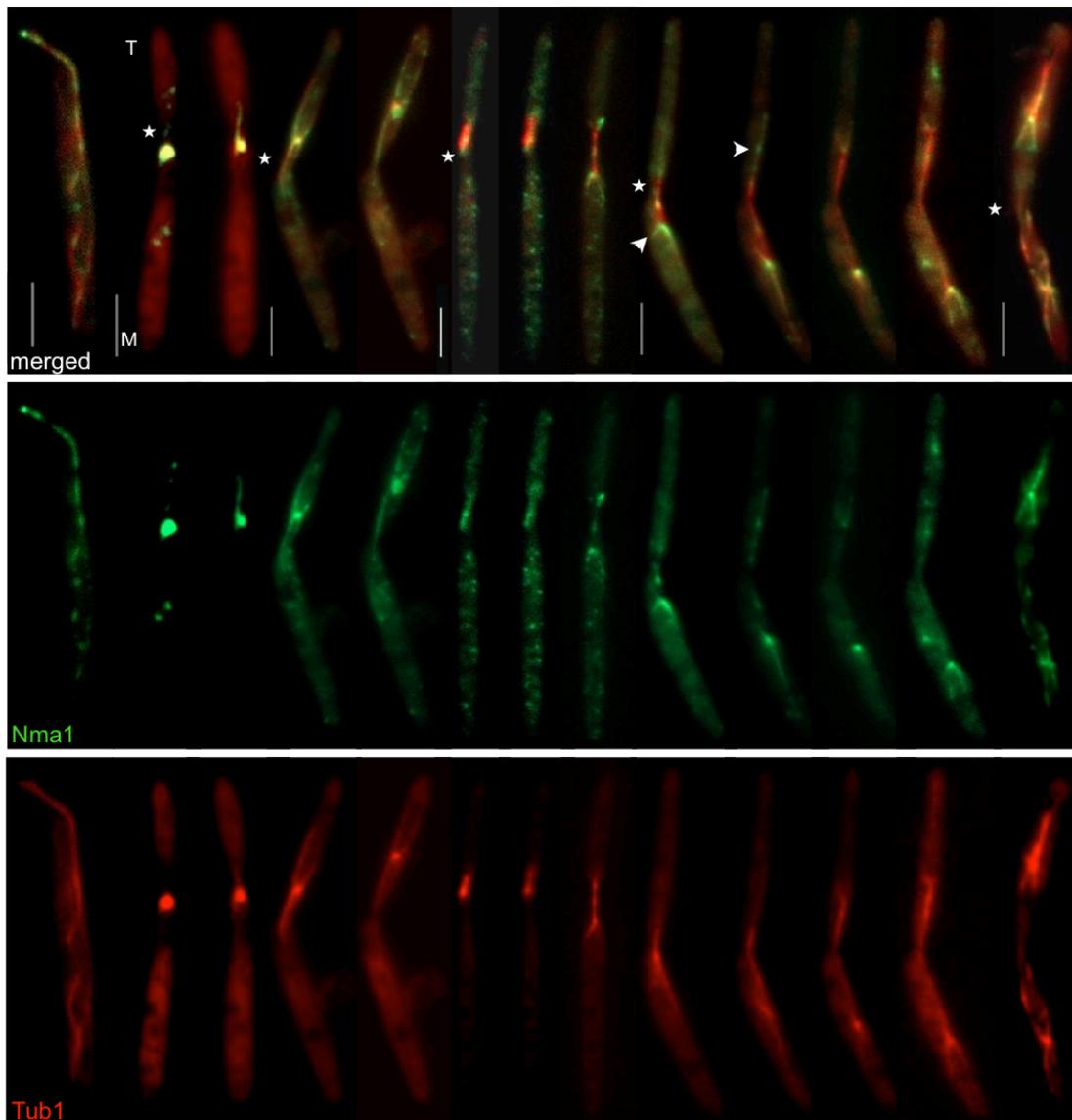


Abb. 35: Nma1 ist während der gesamten Mitose mit der Spindel assoziiert. Zur weiteren Untersuchung der Rolle von Nma1 am Spindelpolkkörper, sollte eine Co-Lokalisierung von Nma1 mit Mikrotubuli durchgeführt werden. Dafür wurden verschiedene Mitosephasen von Sporidien aus axenischer Kultur untersucht, welche Nma1:3xgfp und mCherry:Tub1-Marker enthalten (UNP2). Nma1 kondensierte zusammen mit Tub1 in einem Punkt und migrierte in den Spross der Tochterzelle ein. Dort teilte sich der Spindelpolkkörper und wanderte in entgegengesetzte Richtungen. Nma1 ist an der Position der SPK und in der SMZ detektierbar, nach einer gewissen Länge der Spindel jedoch nur noch an den astralen Mikrotubuli. Gezeigt sind Aufnahmen unterschiedlicher Zellen. Die Bilder sind Überlagerungen der GFP- und RFP-Kanäle sowie Bilder der Einzelkanäle (GFP = grün, RFP = rot). Der Sprosshalt ist mit einem Stern markiert, Mutter- und Tochterzelle mit M bzw. T. Die Maßstabsbalken entsprechen 5 μm.

2.2.2.3 Frühe Endosomen lokalisieren an der Mitosespindel

Die Beobachtungen dass sich Nma1 gemeinsam mit Rab5 entlang von Mikrotubuli bewegt und während der Zellteilung an der Mitosespindel lokalisiert (Abb. 35+36A), warf die Frage auf ob auch in *U. maydis* frühe Endosomen in diese Vorgänge involviert sind. Um dies weiter zu klären wurde ein Stamm mit einem Nma1:3xgfp und einem $P_{tef}:mCherry:rab5:nosT$ Endosomen-Marker mikroskopisch untersucht (UTO148). Es wurde festgestellt, dass Rab5 genauso wie Nma1 in einem Punkt nahe des Sprosshalses kondensiert (Abb. 36D). Der Vergleich mit einer Nma1/Tub1-Co-Lokalisierung lässt darauf schließen, dass Rab5 sich an derselben Struktur konzentriert (Abb. 36A). Zur genaueren Untersuchung sollte ein zweiter Endosomen-Marker Aufschluss geben. Verwendet wurde ein AB33 Derivat, das ein Yup1-Fusionsprotein und einen Mikrotubuli-Marker enthält (Stamm 1075). Die Beobachtung des t-SNARES Yup1 zeigte im frühen Stadium keine Anlagerung an den Spindelpolkkörper, die markierten Endosomen bewegten sich weiterhin bidirektional durch die Zelle. Während der Mitose war eine Assoziation von Yup1 mit dem SPK detektierbar (Abb. 36B+C). Eine Co-Lokalisierung mit astralen Mikrotubuli konnte nicht festgestellt werden. Die Beobachtung, dass frühe Endosomen mit der Mitosespindel assoziieren, eröffnet für *U. maydis* ein neues Feld, das genauere Untersuchungen erfordert. Um zu überprüfen ob es sich um einen generellen oder für *U. maydis* spezifischen Phänotyp handelt, wurde die Lokalisierung von Rab5-markierten frühen Endosomen auch in *A. nidulans* überprüft. Ein Stamm mit GFP:RabA (Rab5-Homolog) und mRFP:TubA (Tub1-Homolog) Markern unter dem Glycerin-induzierbaren *alcA*-Promotor (SNG57, Grün, 2015) wurden über Nacht in Glycerin-haltigem Medium angezogen und die entstandenen Filamente wurden mikroskopisch analysiert. *A. nidulans* Hyphen sind polynukleär und durchlaufen leicht zeitversetzt eine synchrone Mitose (Suelmann *et al.*, 1997). In den untersuchten Hyphen waren Spindeln zu erkennen, da in diesen Bereichen das reguläre Mikrotubuli-Zytoskelett aufgelöst war und TubA in einer länglichen Struktur stark kondensiert vorlag. In früheren Stadien konnte RabA nicht mit TubA co-lokalisiert werden, nach fortschreitender Zeit konnte RabA zuerst an einer Seite der Spindel und danach an beiden detektiert werden (Abb. 36E). RabA ist also auch in *A. nidulans* während der Mitose mit der Spindel assoziiert, es bedarf jedoch noch genauerer Untersuchungen, um die Lokalisierung während der gesamten Kernteilung genauer zu beschreiben.

Ergebnisse

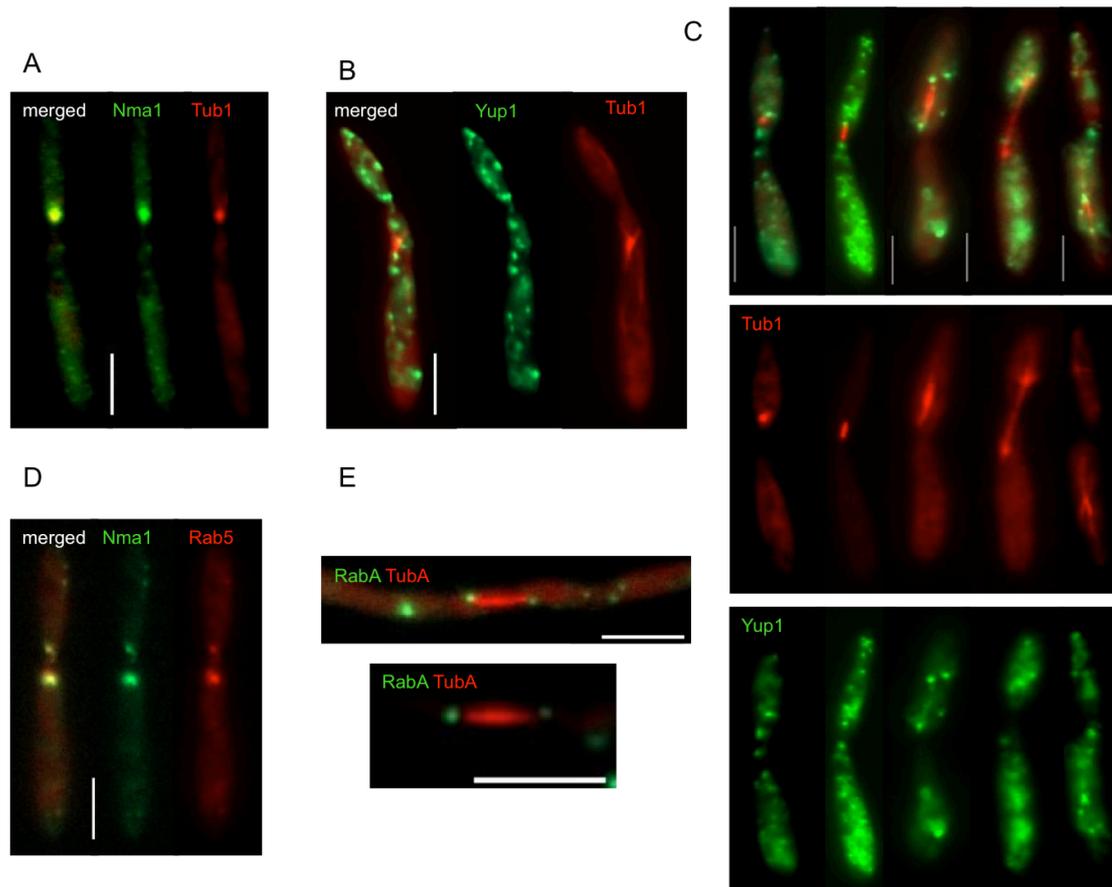


Abb. 36: Frühe Endosomen sind assoziiert mit der Mitosespindel. Zu Beginn der Mitose kondensieren die Mikrotubuli (markiert mit Tub1) in einem Punkt nah am Sprosshals und wandern in die Tochterzelle ein. (A) Nma1 (grün) lokalisiert ebenso an dieser Tubulin-Struktur (rot) wie auch (D) der frühen Endosomen (EE) Marker Rab5 (rot). (B) Untersuchungen des SNARES Yup1 (grün), das auch an EE bindet, ergaben jedoch keine Co-Lokalisierung mit den kondensierten Mikrotubuli (rot). Die Yup1-markierten EE bewegten sich weiterhin bidirektional durch die Zelle. An welcher Struktur dies erfolgt, muss noch geklärt werden. (C) Die Beobachtung von Yup1 während der gesamten Mitosephase zeigte jedoch, dass Yup1 während der Elongation der Spindel an den Spindelpolen akkumuliert. Trotzdem war Yup1 zusätzlich in der gesamten Zelle nachweisbar. Gezeigt sind Aufnahmen unterschiedlicher Zellen. (E) Zur Überprüfung ob die Lokalisierung früher Endosomen am SPK eine Besonderheit für *U. maydis* ist, wurde ein *A. nidulans* Stamm untersucht, welcher Tubulin (TubA) und RabA Marker enthält. Auch hier konnten EE (grün) an den beiden Enden der elongierenden Spindel (rot) festgestellt werden. (A-E) Gezeigt sind Überlagerungen (merged) der GFP- und RFP-Aufnahmen und die entsprechenden Einzelkanäle von Sporidien aus axenischer Kultur der Stämme UNP2 (A), 1075 (B/C), UTO148 (D) und Hyphen von *A. nidulans* SNG57. Alle Maßstabsbalken entsprechen 5 μm .

Um das Verhalten von Rab5 in *U. maydis* während der Mitose genauer zu verstehen, wurde die Lokalisation des Endosomen-Markers während der gesamten Zellteilung beobachtet. Während der Interphase und zu Beginn der Knospung der Tochterzelle waren Nma1 und Rab5 gleichmäßig über die gesamte Zelle verteilt. Nma1 kondensierte wie Tub1 beim Übergang von der G2- in die Mitosephase (Abb. 35). Die Überlagerung des Nma1- und Rab5-Signals zeigte, dass Rab5-markierte Endosomen ebenso an einer Stelle in der Zelle kondensieren und anschließend langsam von der Mutter- in die Tochterzelle einwandern. Bei der fädigen Struktur, die von dem Aggregat der Fusionsproteine in die Tochterzelle hineinreicht, könnte es

sich um Mikrotubuli handeln. Trotz der Konzentration von Rab5 in einem Punkt konnten dennoch noch weitere Signale im Zytoplasma detektiert werden, die entlang von Mikrotubuli zu lokalisieren schienen (Abb. 37, Pfeil). Auch nach der Teilung der Spindelpolkörper und der Wanderung in das Zentrum der Mutter- bzw. Tochterzelle konnte noch eine Überlagerung des Nma1- und Rab5-Signals festgestellt werden (Abb. 37, Stern). Zusätzlich konnten Spindel-unabhängige Rab5-Signale im Zytoplasma detektiert werden, es ist jedoch nicht klar an welchen Strukturen diese lokalisierten. Nach Beendigung des Zyklus waren die Nma1- und Rab5-Fusionsproteine wieder gleichmäßig in der Zelle verteilt. Ohne eine Co-Lokalisierung mit einem Mikrotubuli-Marker ist es jedoch sehr schwierig die Stadien zu bestimmen und scharf von einander zu trennen.

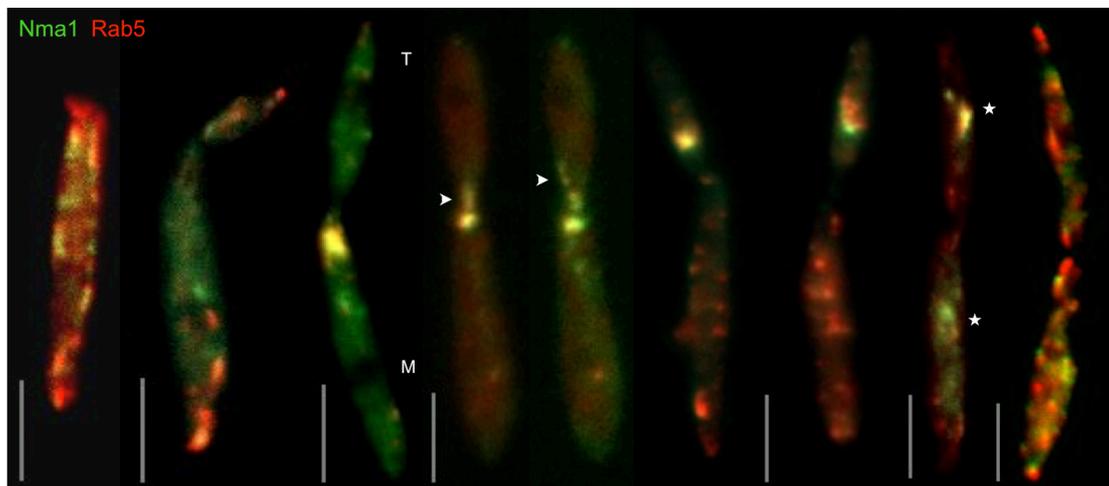


Abb. 37: Rab5 lokalisiert an den Spindelpolen. Die Vorexperimente legen einen Zusammenhang von Rab5 und der Mitosespindel nahe. Aus diesem Grund wurden die Co-Lokalisierung von Nma1 (grün) und Rab5 (rot) in verschiedenen Mitosestadien untersucht (UTO148). Nma1 und Rab5 waren während der Interphase und beginnenden G2-Phase gleichmäßig entlang von Mikrotubuli verteilt. Mit der Kondensation der Mikrotubuli (nicht gezeigt) konzentrierte sich auch das Signal der beobachteten Proteine auf einen Punkt innerhalb der Zelle nahe am Sprosshals in der Mutterzelle (M). Bei der Migration des SPK in die Tochterzelle (T) konnten Mikrotubuli-ähnliche Strukturen ausgemacht werden (Pfeil), an denen Nma1 und Rab5 co-lokalisieren. Nach der Teilung des SPK wurden die Fusionsproteine an beiden Spindelpolen detektiert (Stern). Rab5 konnte weiterhin an zusätzlichen Strukturen im Zytoplasma festgestellt werden. Nach der abgeschlossenen Mitose waren Nma1 und Rab5 wieder gleichmäßig über die Zellen verteilt. Gezeigt sind Überlagerungen von GFP- und RFP-Kanal Aufnahmen unterschiedlicher Zellen. Alle Maßstabsbalken entsprechen 5 µm.

2.2.2.4 Die Nma1-Lokalisierung an der Spindel ist nicht von Rab5-abhängig

Mikroskopische Analysen ergaben, dass Yup1- und Rab5-markierte frühe Endosomen während der Mitose an den Spindelpolkörpern lokalisieren. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass auch Nma1 während der Mitose an der Spindel lokalisiert. Um das Zusammenspiel von Nma1 und frühen Endosomen genauer zu verstehen, sollte die Lokalisierung von Nma1 an der Mitosespindel in einem $\Delta rab5$ -Hintergrund untersucht werden. Dafür wurde der offene Leserahmen von *rab5a* durch homologe Rekombination von einer Nourseothricin-Resistenzkassette (Nat^R) ersetzt in einem Stamm mit Nma1:3xgfp und mCherry:Tub1 Markern (UTO210). Die Deletion der Rab-GTPase führt in induzierten Filamenten zu bipolarem Wachstum und einer Akkumulation von frühen Endosomen in den beiden Zellpolen (Bielska *et al.*, 2014a). Dieser Phänotyp wurde auch in den untersuchten Stämmen beobachtet. Das Verhalten von Nma1 im $\Delta rab5a$ -Hintergrund wurde bereits in vorhergehenden Arbeiten beschrieben (Schneider, 2016). In dieser Studie wurde jedoch zusätzlich eine extreme Akkumulation von Nma1 in den Polen induzierter Hyphen festgestellt. Diese Beobachtung deckt sich mit bereits publizierten Daten und erinnert zudem stark an die Nma1-Lokalisierung im $\Delta kin1$ -Hintergrund (Abb. 38). Die Färbung der Zellen mit dem endozytotischen Farbstoff FM4-64 ergab ebenso eine Akkumulation des Signals in den Zellpolen, motile gefärbte Endosomen konnten jedoch zusätzlich beobachtet werden (nicht gezeigt). Darüber hinaus erschien die Zahl der Mikrotubuli erhöht, diese Beobachtung wurde nicht quantifiziert.

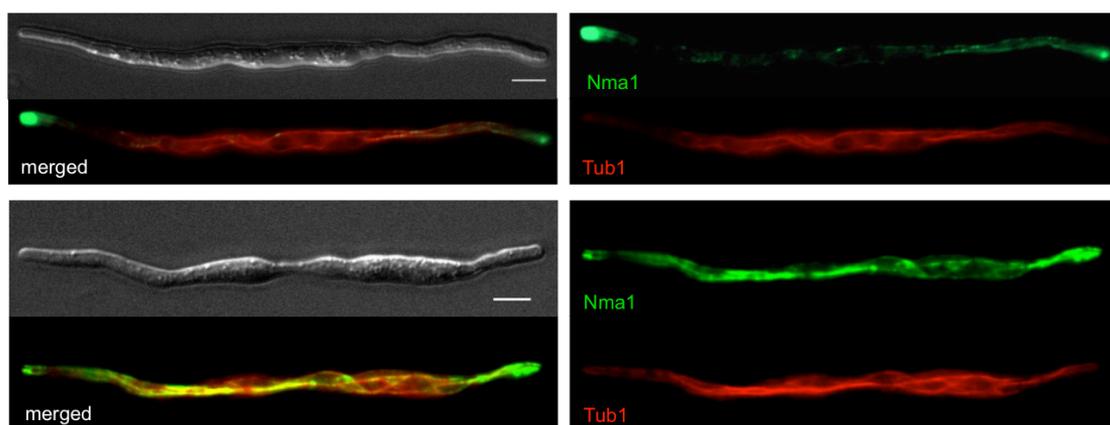


Abb. 38: Die Deletion von *rab5a* beeinflusst die Lokalisierung von Nma1 in der Hyphe. Nach 16-stündiger Induktion des bE/bW-Heterodimers konnte bipolares Wachstum von $\Delta rab5a$ -Stämmen beobachtet werden (UTO210). Darüber hinaus wurde eine auffällige Akkumulation von Nma1 (grün) in den beiden Zellpolen beobachtet. Die Mikrotubuli (rot) erschienen feiner und in größerer Anzahl. Gezeigt sind Aufnahmen von DIC-, GFP- und RFP-Kanal sowie eine Überlagerungen von GFP- und RFP. Die Maßstabsbalken entsprechen 5 μ m.

Zur Untersuchung der Mitose wurden Sporidien aus axenischer Kultur verwendet. In diesem Stadium waren keine Deletionsphänotypen feststellbar. Die Beobachtung der verschiedenen Mitosephasen ergab keinen Unterschied zum Wildtyp, die Formierung der Spindel erfolgte in denselben Schritten. Auch die Lokalisierung von Nma1 glich der von Zellen mit Wildtyphintergrund (Abb. 39). Das Nma1-Signal sammelte sich zuerst in der Mutterzelle in der Nähe des Sprosshalses zusammen mit α -Tubulin (nicht gezeigt) und wanderte dann in die Tochterzelle ein. Dort teilten sich die Spindelpolkkörper und zogen die Spindel mit Hilfe astraler Mikrotubuli auseinander (Stern). Es konnte bereits gezeigt werden, dass Nma1 mit γ -Tubulin, welches an den Spindelpolkörpern sitzt, co-lokalisiert. Daher kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei dem grünen Nma1-Signal um eine Co-Lokalisierung mit den beiden Spindelpolkörpern handelt, die in das Zentrum der Mutter- und Tochterzelle migrieren. Eine Quantifizierung ergab, dass Nma1 in allen betrachteten Zellen an den Spindelpolkörpern lokalisierte und in 92 % der Zellen auch an den Mikrotubuli ($n = 13$, Abb. 40, Tabelle 3). Ein Signal in der SMZ wurde in 85 % der Zellen festgestellt, Nma1 an den Plus-Enden der astralen Mikrotubuli konnte nur in einem Drittel der Zellen beobachtet werden. Trotz der Deletion von *rab5* scheint die Mitose morphologisch ohne Beeinträchtigung abzulaufen, um darüber definitive Aussagen treffen zu können, müsste jedoch auch noch der zeitliche Ablauf untersucht werden.

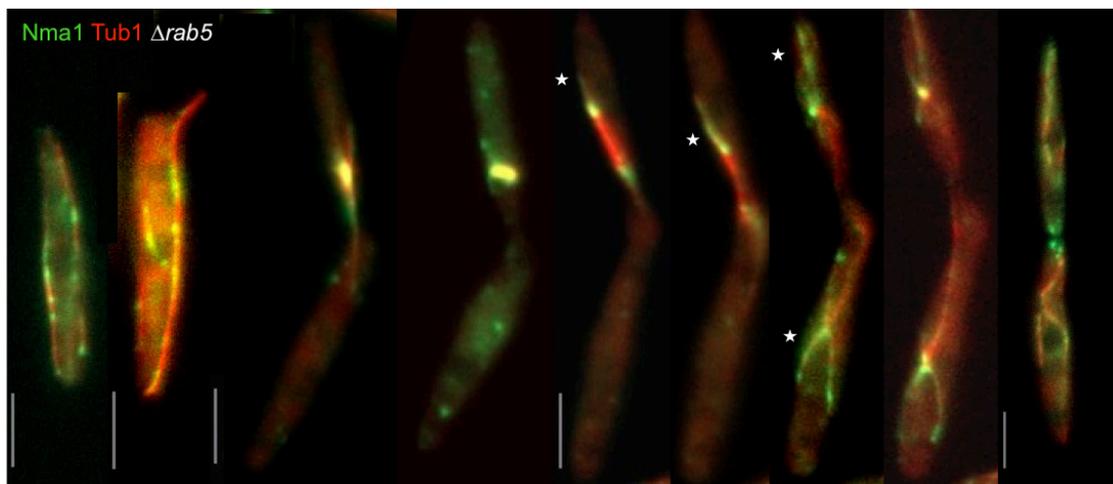


Abb. 39: Die Deletion von *rab5a* hat keinen Einfluss auf die Mitosespindel. Die Beobachtung verschiedener Mitosestadien in Sporidien aus axenischer Kultur ergab keinen Unterschied zwischen Wildtyp und $\Delta rab5a$ -Zellen. Die Mikrotubuli (rot) verhielten sich wie in zuvor beobachteten Stämmen mit Wildtyphintergrund und die Ausbildung der Mitosespindel schien nicht beeinträchtigt zu sein. Nma1 (grün) lokalisierte an beiden Seiten der elongierenden Spindel und an den astralen Mikrotubuli (Stern). Nma1 in der SMZ ist in dieser Abbildung nicht sichtbar, wurde aber in 85% der quantifizierten Zellen festgestellt. Gezeigt sind Überlagerungen von GFP- und RFP-Kanal Aufnahmen unterschiedlicher Zellen. Alle Maßstabsbalken entsprechen 5 μ m.

2.2.2.5 Motordeletionen haben keinen Einfluss auf die Lokalisierung von Nma1 an der Spindel

Nma1 und Rab5 lokalisieren gemeinsam an den Spindelpolen, es ist jedoch nicht bekannt welchem Mechanismus diese Beobachtung zu Grunde liegt. Die Deletion der Mikrotubuli-assoziierten Motorproteine Kin3 und Kin1 sollte dazu weiteren Aufschluss geben, um das Verhalten von Nma1 während der Mitose zu untersuchen. Zur Generierung der $\Delta kin3$ - und $\Delta kin1$ -Mutanten wurde der jeweilige offene Leserahmen durch eine Nat^R-Kassette ersetzt (UTO142, UTO145). Als Ausgangsstamm wurde UNP2 verwendet, ein AB31-Derivat, das ein endogen fusioniertes Nma1:3xgfp Fusionsprotein und einen Tubulin-Marker (mCherry:Tub1) enthält. Die Beobachtung der Spindeln in *kin1*-Deletionsmutanten ergab keine Abweichungen zum Wildtyp. Sämtliche analysierten Zellen wiesen Nma1-Signale an den astralen Mikrotubuli auf und in 67 % der Zellen lokalisierte Nma1 in der SMZ. Die Lokalisierung von Nma1 an der Plus-Enden der astralen Mikrotubuli trat lediglich in 33 % der quantifizierten Zellen auf (n = 12). Die Deletion von *kin3* zeigte stärkere Abweichungen im Vergleich zu der Deletion von *kin1*. Nma1 co-lokalisierte nur in 71 % der Fälle mit astralen Mikrotubuli. Das Signal war in Vergleich zum Wildtyp und den anderen Deletionsmutanten in den meisten analysierten Zellen sehr diffus und schwer detektierbar. Es konnten in 54 % der Zellen Nma1-Proteine in der SMZ ermittelt werden, auch hier war das Signal aber oft weniger stark und deutlich, die Plus-Enden waren nur in 21 % der Fälle mit Nma1 dekoriert (n = 24) (Abb. 40, Tabelle 3).

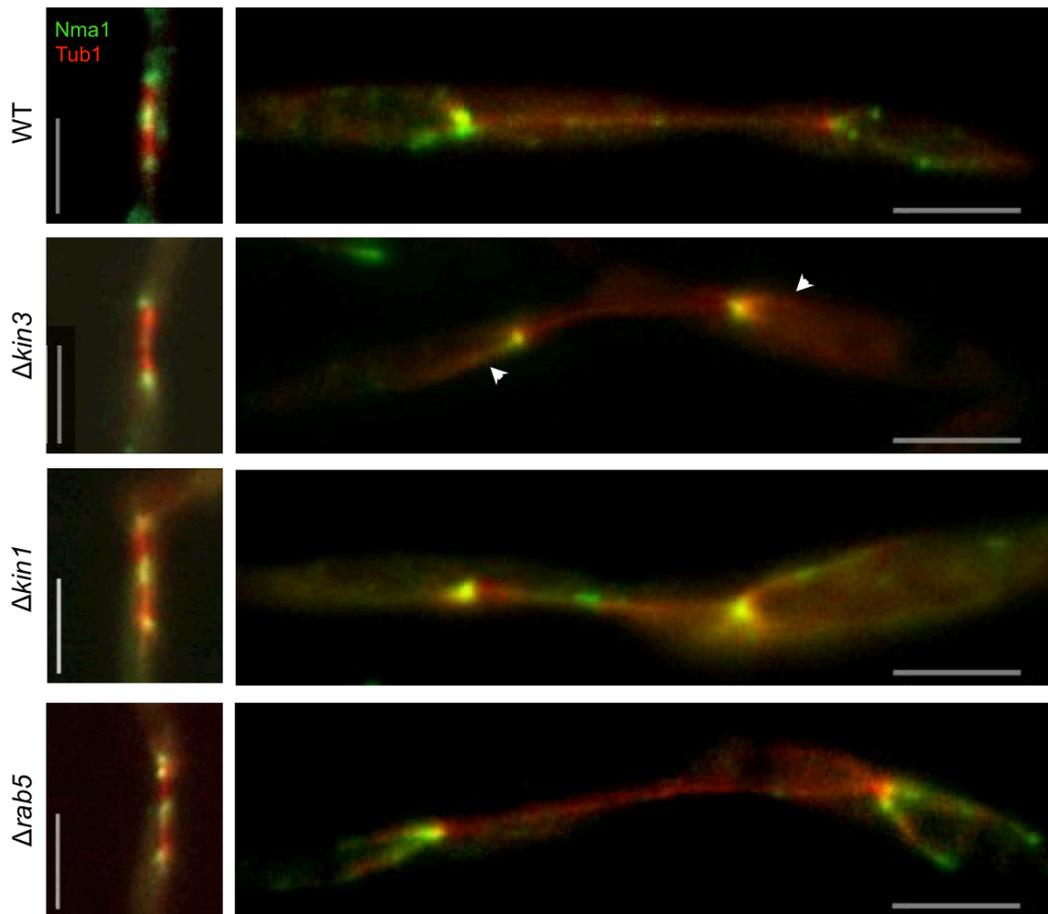


Abb. 40: Motordelationen haben keinen eindeutigen Einfluss auf Nma1 an der Mitosespindel. Zur genaueren Untersuchung wie Nma1 (grün) an die Spindel (rot) gelangt, wurden Motordelationen von *kin3* und *kin1* durchgeführt. Des Weiteren wurde erneut die $\Delta rab5$ -Mutante untersucht. Nma1 war an den Spindelpolen, der SMZ, den astralen Mikrotubuli und teilweise an den Plus-Enden der astralen Mikrotubuli detektierbar. Die Nma1-Population in der SMZ war nur bis zu einer gewissen Länge der elongierenden Spindel vorhanden. Eine Quantifizierung ergab, dass sich die Mutanten nicht wesentlich vom Wildtyp unterschieden. Die *kin3*-Deletion führte zu einer veränderten Nma1-Lokalisierung an astralen Mikrotubuli. Im Wildtyp und den $\Delta kin1$ - und $\Delta rab5$ -Mutanten waren deutliche Nma1-Aggregate auf den astralen Mikrotubuli und an deren Plus-Enden feststellbar, wohingegen $\Delta kin3$ -Zellen nur ein sehr diffuses Nma1-Signale aufwiesen (Pfeil). Gezeigt sind Überlagerungen von GFP- und RFP-Kanal Aufnahmen. Alle Maßstabsbalken entsprechen 5 μm .

Tabelle 3: Quantifizierung der Nma1-Lokalisierung an Mitosespindeln. Ausgewertet wurde die Lokalisierung von Nma1 an den Spindelpolkörpern (SPK), den astralen Mikrotubuli (astrale MT), dem Bereich zwischen den Spindelpolen (SMZ) und den Plus-Enden der astralen Mikrotubuli (+Enden aMT). Analysiert wurden Sporidien aus axenischer Kultur.

	SPK	astrale MT	SMZ	+ Enden aMT
WT	100%	100%	50%	63%
n=30	30	30	15	19
$\Delta kin3$	100%	71%	54%	21%
n=24	24	17	13	5
$\Delta kin1$	100%	100%	67%	33%
n=12	12	12	8	4
$\Delta rab5$	100%	92%	85%	31%
n=13	13	12	11	4

2.2.2.6 Die Deletion von *nma1* hat keinen Einfluss auf den Zellzyklus und die Mitosespindel

In Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass die Zahl der Zellkerne in Filamenten mit *nma1*-Deletionshintergrund gegenüber dem Wildtyp erhöht ist (Pinter, 2012). Da die Zellen durch die Induktion von *b* in den Zellzyklusarrest übergehen, sollte die Quantifizierung in mitotisch aktiven Sporidien wiederholt werden. Um die Migration der Zellkerne während der Mitose zu beobachten, wurde das Histon H1 in seinem endogenen Locus am C-Terminus mit einer *mCherry:nat^R*-Kassette fusioniert und in Wildtyp und $\Delta nma1$ -Hintergrund untersucht (UTO195/218). In $\Delta nma1$ -Stämmen konnten nur eine geringe Zahl von Zellen gezählt werden, die 2 oder mehr Zellkerne enthielten im Vergleich zum Wildtyp. Über 85 % der Zellen verhielt sich wie der Wildtyp (Abb. 41B). Während der Interphase konnten in Sporidien und Filamenten vergleichbar mit Wildtypzellen zwei bis drei Mikrotubuli-Bündel beobachtet werden. Die Ausbildung der Mitosespindel und der astralen Mikrotubuli schien durch die *nma1*-Deletion nicht beeinträchtigt zu sein (Abb. 41A).

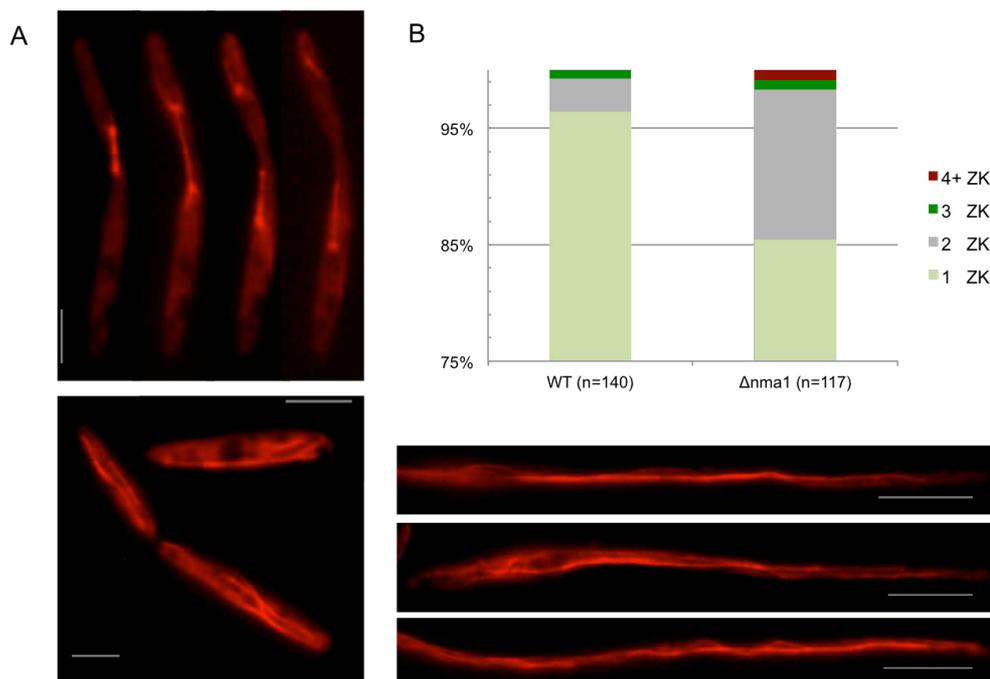


Abb. 41: Die Deletion von *nma1* hat keinen Einfluss auf das Mikrotubuli-Zytoskelett und die Zahl der Zellkerne. Nachdem gezeigt werden konnte, dass *Nma1* an der Mitosespindel lokalisiert, sollte überprüft werden, ob die Deletion des Gens einen Einfluss auf die Bildung der Spindel und das Mikrotubuli-Zytoskelett hat. (A) Weder während der Interphase (unten) noch der Mitosephase (oben) konnte in Sporidien aus axenischer Kultur ein Unterschied zum Wildtyp festgestellt werden (Abb. 35). (C) Auch bei Mikrotubuli in Filamenten, deren *bE/bW*-Heterodimer für 15 Stunden induziert worden war, konnte kein Unterschied zum Wildtyp beobachtet werden. (B) Die Färbung der Zellkerne mit DAPI in Sporidien ergab eine erhöhte Kernzahl bei weniger als 15% der Zellen. Daher kann ausgeschlossen werden, dass *Nma1* einen direkten Einfluss auf den Zellzyklus hat. (A/C) Gezeigt sind Aufnahmen von *mCherry:Tub1* mit dem RFP-Kanal. Die Maßstabsbalken der Sporidien (Mitose-/Interphase) entsprechen 5 μm , die der Filamente 10 μm .

Auch während der Mitose konnte kein Unterschied bei der Migration des Zellkerns festgestellt werden (Abb. 42). Es kann jedoch keine Aussage darüber getroffen werden, ob der zeitliche Ablauf des Mitose ebenfalls dem des Wildtyps entspricht.

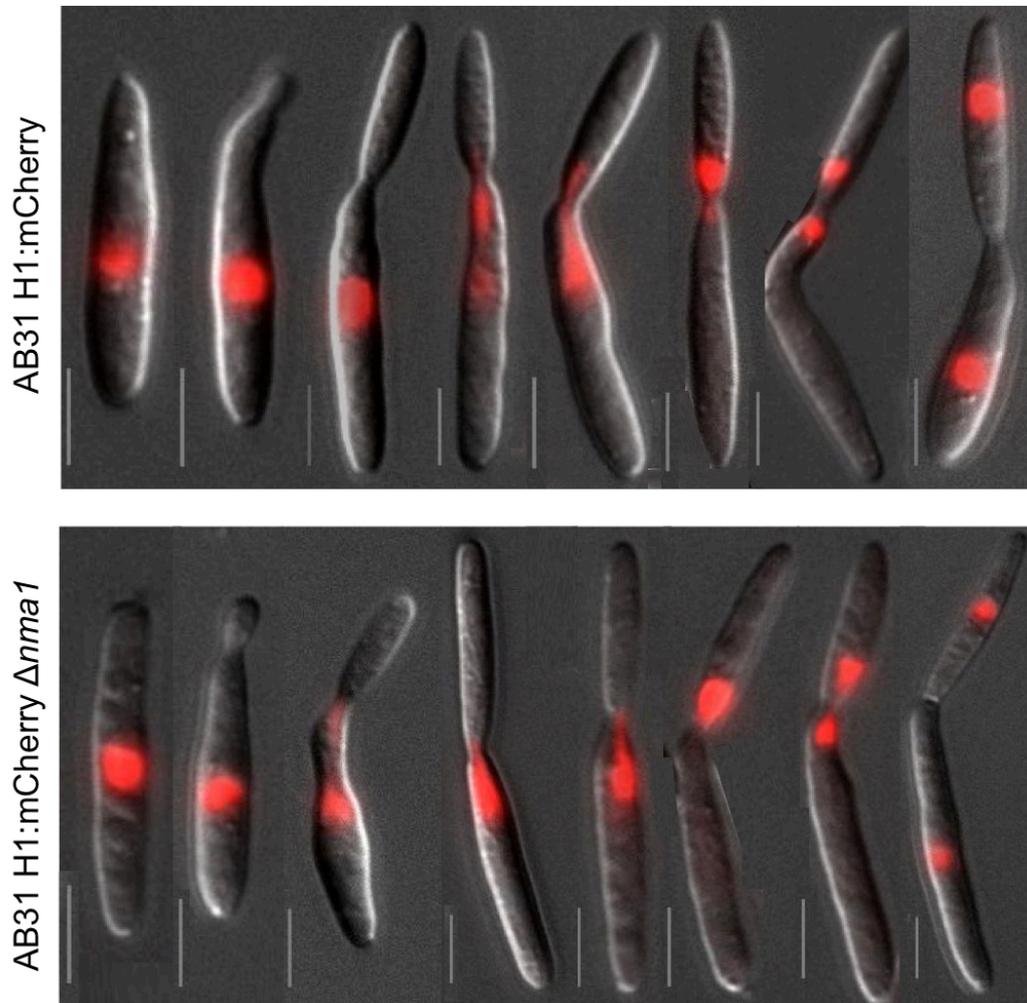


Abb. 42: Die Mitose wird durch *nma1*-Deletion nicht beeinträchtigt. Mit Hilfe des Histon-Markers H1 (rot) sollte überprüft werden, ob die Kernwanderung und Chromosomenverteilung während der Mitose durch die Deletion von *nma1* gestört werden, es konnte jedoch kein Unterschied zwischen Wildtyp (oben) und Mutante (unten) festgestellt werden. Gezeigt sind Überlagerungen von Aufnahmen des DIC- und RFP-Kanals verschiedener Zellen. Alle Maßstabsbalken entsprechen 5 μm .

Die Mitose wurde zusätzlich in einem Stamm beobachtet, welcher einen Marker für Mikrotubuli ($P_{ote1}:mCherry:tub1$) und den Kernhüllen-Marker Nup192 enthält. Nup192 ist Bestandteil von Kernporen und wurde ursprünglich als Interaktionspartner von Num1 identifiziert (Hassinger, 2015). Eine endogene Fusion von Nup192 mit einem dreifachen GFP ($nup192:3xgfp:hyg^R$) wurde in einem AB31-Derivat mit Tub1-Marker und $\Delta nma1$ -Deletionshintergrund durchgeführt (UTO176). Die Kernmembran wird

Ergebnisse

während der Mitose in der Mutterzelle abgestreift und in der Mutter- und Tochterzelle um die Spindeln herum neu ausgebildet (Straube *et al.*, 2005; Abb. 3D). Die Untersuchung sollte Aufschluss darüber geben, ob Nma1 einen Einfluss auf das Mikrotubuli-Zytoskelett und die Ausbildung der Mitosespindel hat. Der zusätzliche Marker sollte außerdem aufdecken, ob Nma1 auch die Auflösung und Neubildung der Kernmembran beeinflusst. Die Kernmembran wurde wie aus der Literatur bekannt (Straube *et al.*, 2005) abgestreift und später wieder neu um die Chromosomen herum ausgebildet. Auch bei diesem Prozess konnten keine Unregelmäßigkeiten beobachtet werden (Abb. 43). Nach der Beobachtung der Zellkerne, der Kernmembran, des Mikrotubuli-Zytoskeletts und der Mitosespindel kann man zusammenfassen, dass die Deletion von *nma1* morphologisch keinen Einfluss auf diese Prozesse hat. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die Deletion einen Einfluss auf den zeitlichen Ablauf haben könnte, dies müsste jedoch genauer untersucht werden, um darüber Aussagen treffen zu können.

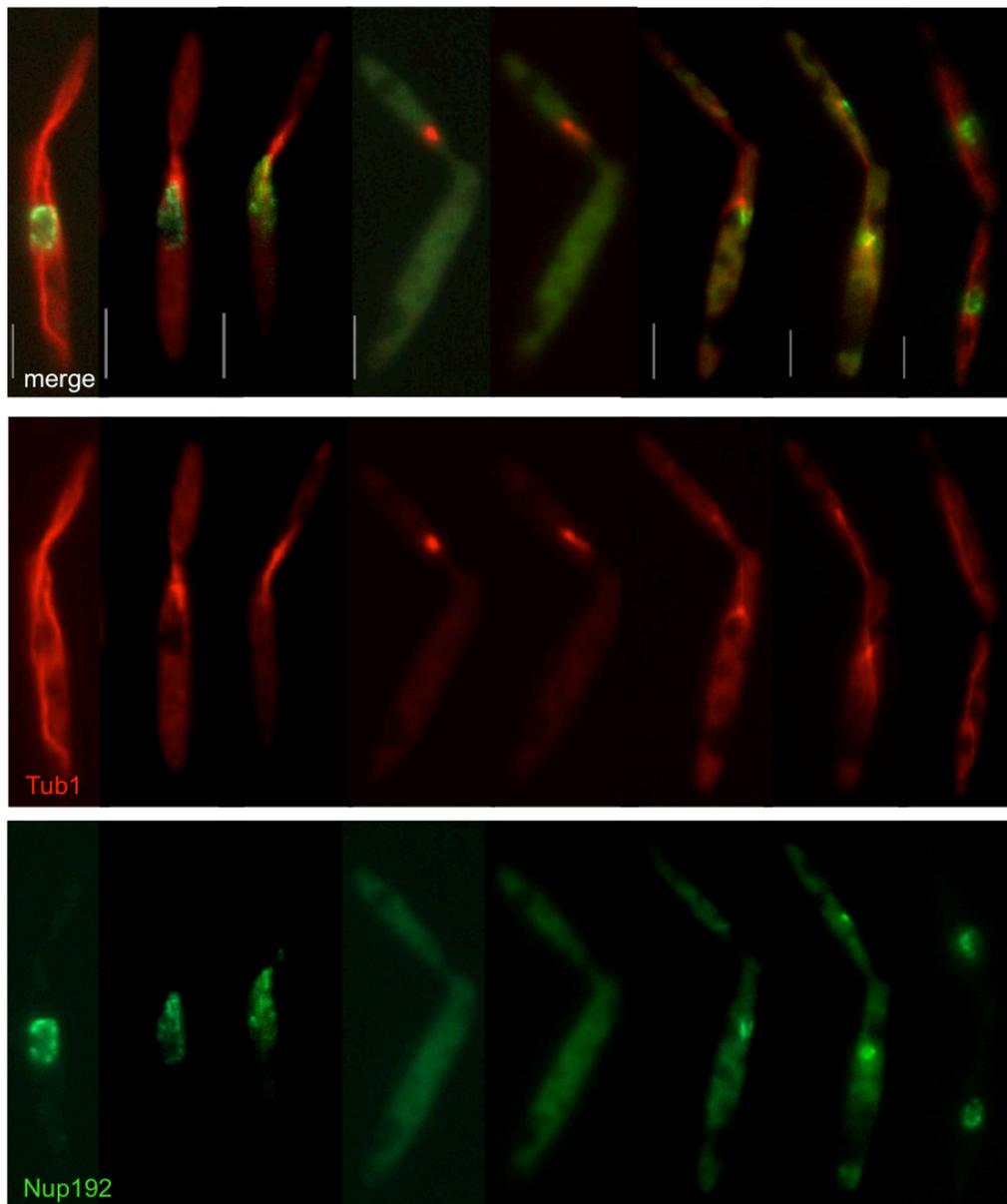


Abb. 43: Die Deletion von *nma1* hat keinen Einfluss auf die Mitosespindel. Um die Auswirkungen der *nma1*-Deletion genauer zu untersuchen, wurde ein Stamm analysiert, welcher einen Tubulin-Marker (rot) und einen Kernhüllenmarker, das Kernporen-Protein Nup192 (grün), im $\Delta nma1$ -Hintergrund trägt (UTO176). Die Kondensation, Migration und Elongation der Mitosespindel erfolgte wie in Wildtypzellen (Abb. 35). Auch das Abstreifen der Kernhülle und die Neubildung um die beiden neuen Zellkerne erfolgte wie im Wildtyp (vgl. Einleitung Abb. 3). Gezeigt sind Überlagerungen von GFP- und RFP-Kanal und Aufnahmen der Einzelkanäle unterschiedlicher Zellen. Alle Maßstabsbalken entsprechen 5 μm .

2.2.3 Nma1 interagiert mit Komponenten des CORVET-Komplexes

2.2.3.1 Die Deletion von *vps3* beeinflusst die Rab5-Lokalisierung

Durch Co-Immunopräzipitations Experimente ist gezeigt worden, dass Nma1 mit den Komponenten Vps3, Vps11 und Vps18 des CORVET-Komplexes interagiert (Pinter, 2015). Dieses Ergebnis legte eine nähere Untersuchung des CORVET-Komplexes in *U. maydis* nahe, zu dem es bisher keine publizierten Arbeiten gibt. Die Homologe der Proteine in *S. cerevisiae* Vps3, Vps11 und Vps18 konnten bereits identifiziert werden (Pinter, 2015). In Hefe teilen sich die Komplexe CORVET und HOPS die Kernkomponenten Vps11, Vps18, Vps16 und Vps33, einzigartig für CORVET sind Vps3 und Vps8 (Balderhaar und Ungermann, 2013). Für die fehlenden Komponenten Vps8, Vps16 und Vps33 wurden die homologen Proteine in *U. maydis* bioinformatisch analysiert werden. Bei dem Homolog für Vps8 handelt es sich höchstwahrscheinlich um UMAG_15064. Die Identität zum Hefeprotein Vps8 liegt nur bei 23 %, eine Homologien wurde lediglich in einer Domäne gefunden, welche sehr wahrscheinlich für die Funktion notwendig ist. Die BLASTp-Suche der Hefe Vps16 und Vps33-Homologe im *U. maydis* Genom ergab die Gene UMAG_11636 (*vps16*) und UMAG_10284 (*vps33*) als wahrscheinliche Kandidaten, wobei die Übereinstimmung (Identität) ebenfalls bei nur 24 % lag. Um über den CORVET-Komplex in *U. maydis* genauere Aussagen treffen zu können, müssen die identifizierten Komponenten zuerst auf ihre Funktion analysiert werden. Genauso kann bisher keine Aussage über die Komposition des Komplexes getroffen werden, dies erfordert noch weitere Untersuchungen. Versuche *vps11* zu deletieren scheiterten mehrmals, dies legt die Vermutung nahe, dass es sich auch in *U. maydis* um eine essentielle Kernkomponente des Komplexes handelt (diese Studie, nicht gezeigt). Die Untersuchung von $\Delta vps3$ -Deletionsmutanten ergab eine starke Störung der Zellmorphologie nach Induktion des filamentösen Wachstums. Nma1:3xgfp war in Sporidien und in induzierten Filamenten noch entlang der Mikrotubuli lokalisiert, jedoch war keine Bewegung mehr detektierbar (Schneider, 2016). Eine Färbung mit DAPI, einem Farbstoff der in die DNA interkaliert und diese so anfärbt, ergab eine erhöhte Zahl von Zellkernen in 17 Stunden induzierten $\Delta vps3$ -Zellen (Abb. 44).

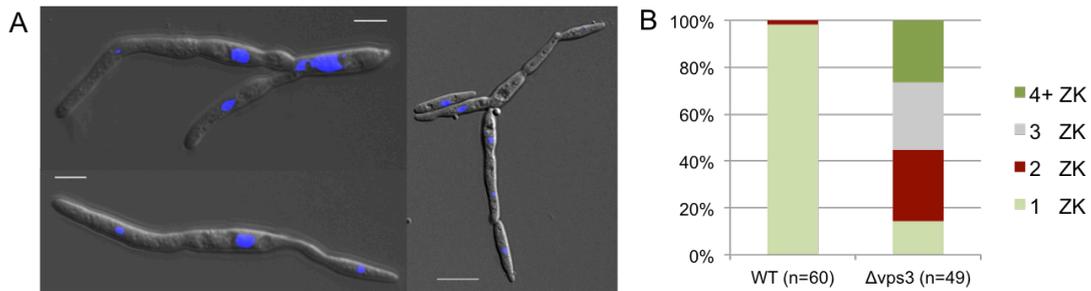


Abb. 44: Die Deletion von *vps3* führt zu einer erhöhten Zahl von Zellkernen. Die *vps3*-Deletion führt zu einem starken Wachstumsdefekt. (A) Zur Quantifizierung von Zellkernen wurden fixierte Zellen mit dem Farbstoff DAPI behandelt. (B) Die angefärbten Zellkerne ergab eine erhöhte Anzahl pro Zelle in $\Delta vps3$ -Stämmen. Gezeigt ist eine Überlagerung von DIC- und DAPI- Aufnahmen von 17 h induzierten Zellen (UTO205). Die Maßstabsbalken entsprechen 5 μ m.

Zur Untersuchung der Lokalisierung von Rab5 in Abhängigkeit von Vps3 wurde eine Co-Lokalisierung von Nma1:3xgfp und mCherry:Rab5 in einem *vps3*-Deletionshintergrund durchgeführt (UTO205). Die Untersuchung ergab die bereits beschriebene Störung bei der Zellteilung bei Sporidien (Schneider, 2016), zusätzlich war die Morphologie der Zellen verdickt und teilweise auch bipolar (Abb. 45A). Nma1-Fusionsproteine konnten vereinzelt noch an Mikrotubuli-artigen Strukturen festgestellt werden, jedoch war auch das zytoplasmatische GFP-Signal stark erhöht. Rab5 konnte nicht mehr gleichmäßig innerhalb der Zelle detektiert werden, sondern war wenn sichtbar in großen runden Strukturen angeordnet, das mCherry-Signal war immer sehr schwach. Eine Färbung mit dem Farbstoff CellTracker™ Blue CMAC, der saure Membrankompartimente anfärbt, zeigte, dass die verbliebenen Rab5-Fusionsproteine innerhalb von Vakuolen lokalisiert waren. Die Färbung machte deutlich, dass das Signal nicht in allen Vakuolen detektierbar war, sondern meist nur in den größten Vakuolen, welche zentral in der Zelle lokalisiert waren (Abb. 45B). Auch nach einer Induktionszeit der Zellen von 17h in Arabinose-haltigem CM-Medium konnte dasselbe Phänomen beobachtet werden. Falls Rab5-mCherry Signal beobachtet werden konnte, war dies nur in wenigen Vakuolen innerhalb der Zellen lokalisiert (Abb. 45C). Die Deletion von *vps3* führte zwar zu einem Verlust der Nma1-Motilität, verhinderte jedoch nicht die Interaktion von Nma1 mit der Mitosespindel. Nma1-Fusionsproteine konnten an einer späten Mitosespindel im $\Delta vps3$ -Hintergrund beobachtet werden (Abb. 45D). Die Spindelausbildung in CORVET-Mutanten wurde nicht weiter untersucht.

Ergebnisse

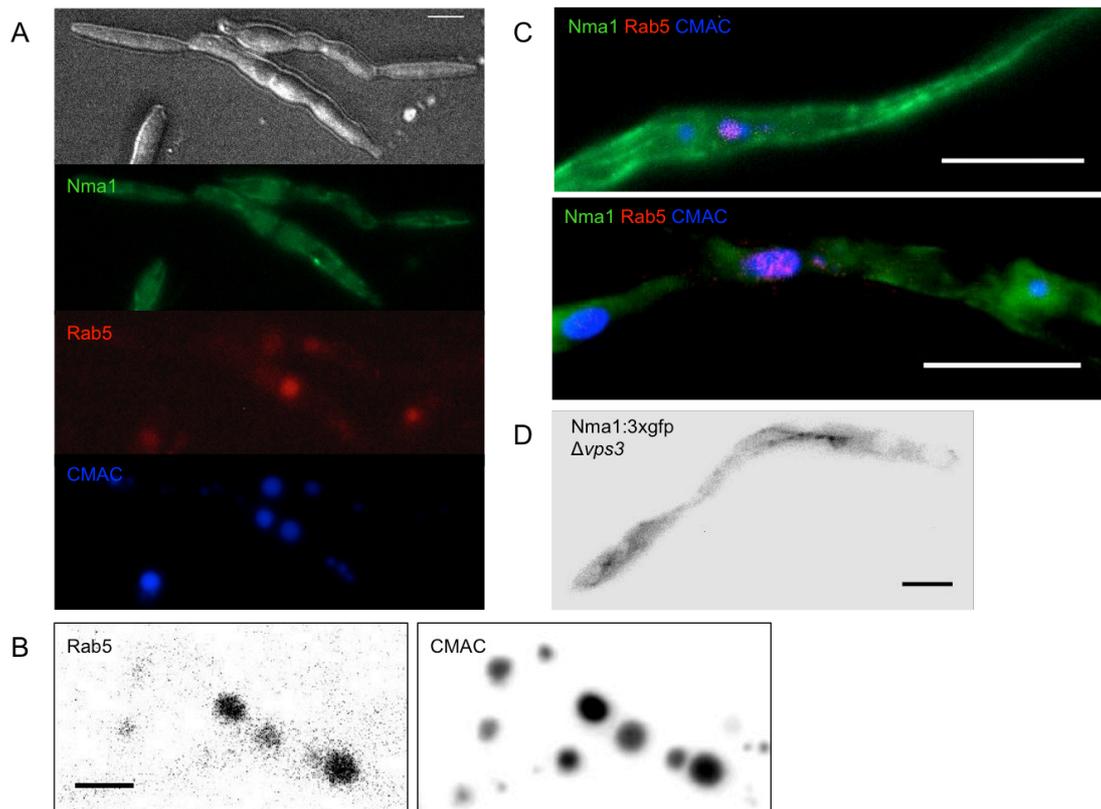


Abb. 45: Die Deletion von *vps3* führt zum Abbau von Rab5. Die Deletion von *vps3* führt zu starken Wachstums- und Polaritätsdefekten. Nma1 (grün) blieb im $\Delta vps3$ -Hintergrund weiterhin entlang von Mikrotubuli lokalisiert, war dort jedoch statisch gebunden. Rab5 (rot) war kaum mehr zu detektieren und wenn dann in runden Organellen. Die Färbung von fixierten Zellen mit CMAC (blau) ergab eine Co-Lokalisierung mit Rab5 in Vakuolen, in welchen die Proteine wahrscheinlich degradiert werden. Rab5 war nicht in allen angefärbten Vakuolen detektierbar, sondern nur in den großen zentral in der Zelle gelegenen (B). Dies unterschied sich nicht zwischen Sporidien (A/B) und Filamenten (C, 17h induziert). (D) Die Deletion von *vps3* führt zu einem Verlust der Motilität von Nma1, trotzdem konnte das Protein noch an einer späten Mitospindel beobachtet werden. (A/C) Gezeigt sind DIC-/GFP-/RFP- und DAPI-Aufnahmen. (B/D) Zur besseren Darstellung wurden die Fluoreszenzkanäle invers in Graustufen dargestellt. Die Maßstabsbalken entsprechen (A/B/D) 5 μm und (C) 10 μm .

2.2.3.2 Nma1 interagiert direkt mit Vps3

In zwei unabhängigen Co-Immunopräzipitations (Co-IP) Experimenten konnte eine Interaktion von Nma1 mit Vps3, Vps11 und Vps18 nachgewiesen werden (Pinter, 2015). Es ist bekannt, dass die drei Proteine in *S. cerevisiae* in einem Komplex interagieren. Über die Komplexzusammensetzung in *U. maydis* ist bisher in der Literatur nichts bekannt, aus diesem Grund kann auch keine Aussage darüber getroffen werden, ob Nma1 mit nur einem, zwei oder allen drei identifizierten Kandidaten direkt interagiert. Um diese Frage zu klären, sollte ein direkter Hefe-Zwei-Hybrid Interaktionstest durchgeführt werden. Nma1 wurde ursprünglich in einem Hefe-Zwei-Hybrid Screen mit Num1 identifiziert. Der Originalklon enthält nur die letzten 184 AS des Proteins, das eigentlich 1290 AS groß ist (Nma1_{1107-1290AS} = Nma1 (v), Kellner, 2009). Als Positivkontrolle wurde die Interaktion von Num1 mit der

verkürzten Version von Nma1 (v) überprüft (nicht gezeigt), da in Vorarbeiten bereits gezeigt werden konnte, dass das Nma1 Vollängen-Protein nicht in der Lage ist mit Num1 zu interagieren (Pinter, 2015). Verwendet wurden die Vektoren pGBKT7 und pGADT7 als Köder- bzw. Beute-Plasmid (Clontech). Die zu testenden Vps3 (1195 AS), Vps11 (1372 AS), Vps18 (1297 AS) und Nma1 (v) wurden in beide Plasmide kloniert und die Interaktion in beide Richtungen überprüft. Nach der Co-Transformation wurden die Hefezellen (Stamm AH109) zuerst auf Plasmidselektivmedium (SD-Leu-Trp) für zwei Tage bei 28 °C kultiviert, zum Test auf Interaktion wurden sie danach auf Hochstringenzmedium (SD-Leu-Trp-His-Ade) übertragen. Als Positivkontrolle diente die Plasmidkombination pGBKT7-p53 mit pGADT7-T und als Negativkontrolle die Kombination pGBKT7-Lam mit pGADT7-T (Clontech). Die Co-Transformationen von Nma1 mit den CORVET-Komplex Komponenten ergab eine direkte Interaktion von Nma1 und Vps3, jedoch nur in einer Plasmid-Kombination (Abb. 46). Da die CORVET-Komponenten mit dem Vollängen Nma1-Protein co-präzipitiert wurden, sollte auch der direkte Test auf Interaktion noch mit dem gesamten Nma1 und den Vps-Proteinen überprüft werden.

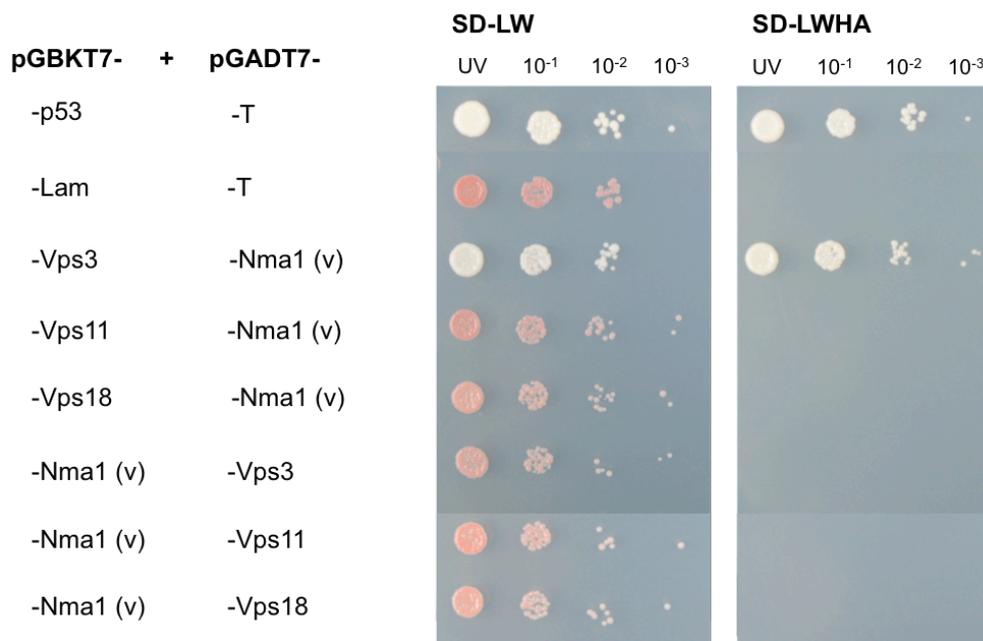


Abb. 46: Nma1 interagiert direkt mit Vps3. Die CORVET-Komponenten Vps3, Vps11 und Vps18 konnten in einem Co-IP Experiment als Interaktionspartner von Nma1 identifiziert werden. In einem Hefe-Zwei-Hybrid Test sollte die direkte Interaktion der Proteine mit Nma1 überprüft werden. Eine verkürzte Nma1-Version (Nma1-v) und die drei CORVET-Komponenten wurden in den Hefevektoren pGBKT7 und pGADT7 (Clontech) im Stamm AH109 exprimiert. Zellsuspensionen der OD₆₀₀ = 0,1 wurden in seriellen 10-fach Verdünnungen auf Plasmidselektivmedium (SD-Leu-Trp) und Hochstringenzmedium (SD-Leu-Trp-His-Ade) getropft. Das Wachstum von pGBKT7-Vps3 und pGADT7-Nma1(v) auf Hochstringenzmedium zeigt die Interaktion der Proteine. Als Positivkontrolle diente die Plasmidkombination pGBKT7-p53 mit pGADT7-T, als Negativkontrolle die Kombination pGBKT7-Lam mit pGADT7-T (Clontech). Die Platten wurden 2 Tage bei 30 °C inkubiert. In den Abbildungen sind Einbuchstaben-Codes der Aminosäuren angegeben.

2.2.4 Nma1 lokalisiert entlang von Mikrotubuli in *A. nidulans*

Das Gen *nma1* ist nur im Genom von *U. maydis* und sehr nah verwandten Spezies existent. Es konnten bioinformatisch keine spezifischen Domänen identifiziert werden, die Aufschluss über die Funktion des Proteins geben. Zur Überprüfung ob es sich um eine konservierte Funktion von Nma1 handelt, wurde die Lokalisierung des Proteins im filamentösen Ascomyceten *A. nidulans* überprüft. Dafür wurde der offene Leserahmen von *nma1* in den pCMB17apx-Vektor ligiert, welcher ein GFP zur N-terminalen Fusion unter dem Glycerin-induzierbaren *alcA*-Promotor enthält (Efimov *et al.*, 2006). Die Integration erfolgte ektopisch in das Genom eines TN02A3-Stamms. Zusätzlich wurde ein RabA-Marker (pNG45, Grün 2015) co-transformiert. Damit sollte eine mögliche Co-Lokalisierung auf frühen Endosomen festgestellt werden. Die Integration wurde nur mikroskopisch überprüft. Dazu wurden die Zellen über Nacht in Glycerin-haltigem Medium angezogen. Die mikroskopische Beobachtung ergab eine Lokalisierung von Nma1 entlang filamentöser Strukturen innerhalb des Zytoplasmas. RabA-markierte frühe Endosomen bewegten sich bidirektional entlang dieser Strukturen. Aus diesem Grund kann man annehmen, dass es sich um Mikrotubuli handelt (Abb. 47). Nma1 markiert die Mikrotubuli-Bündel, jedoch konnte keine Bewegung der Moleküle detektiert werden.

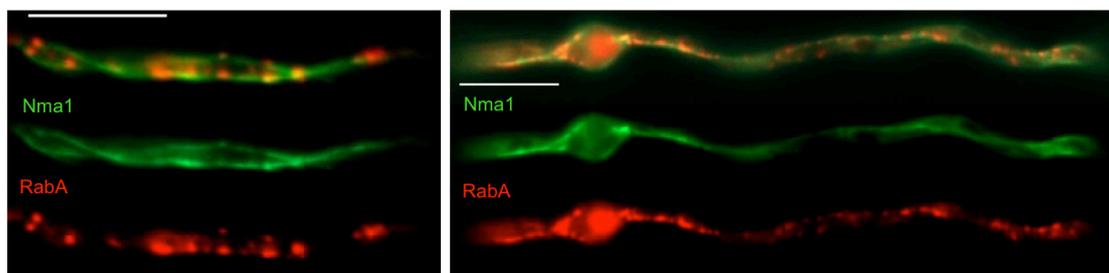


Abb. 47: Nma1 lokalisiert entlang von Mikrotubuli in *A. nidulans*. Nma1 ist einzigartig im Genom von *U. maydis*. Es konnten keine konservierten funktionellen Domänen oder strukturelle Ähnlichkeiten zu anderen Proteinen festgestellt werden. Zur Überprüfung ob die Funktion des Proteins konserviert ist, sollte Nma1 in *A. nidulans* exprimiert werden. Eine N-terminale Fusion des *U. maydis* Nma1 wurde unter dem Glycerin-induzierbaren *alcA*-Promotor ektopisch in das Genom eines TN02A3-Stamms integriert. Nach Induktion in Glycerin-haltigem Medium über Nacht wurden die Zellen mikroskopisch analysiert. Nma1 (grün) war entlang von Mikrotubuli lokalisiert, es konnte jedoch keine Bewegung detektiert werden. Als Kontrolle wurde der EE-Marker RabA (Rab5-Homolog) co-transformiert. Die Endosomen (rot) bewegten sich bidirektional entlang der Mikrotubuli, die Nma1 dekorierte. Gezeigt sind Überlagerungen des GFP- und RFP-Kanals und die entsprechenden Aufnahmen der Einzelkanäle. Die Maßstabsbalken entsprechen 10 μm .

3 Diskussion

3.1 Charakterisierung des Num1-Proteins

3.1.1 Num1 bewegt sich im Zytoplasma

Num1 wurde im Basidiomyceten *C. cinereus* als wichtiger Faktor für die Kernwanderung nach der Kreuzung von kompatiblen Zellen beschrieben (Makino und Kamada, 2004). In *U. maydis* wurde die Funktion des Proteins in den letzten Jahren eingehend untersucht. Unter anderen konnte Num1 als eine Kernkomponente des Spleißosom-assoziierten Prp19/CDC5L (NTC)-Komplex (Grote *et al.*, 2010) identifiziert werden (Kellner *et al.*, 2014). Die Identifizierung von zytoplasmatischen Proteinen wie Kin1 und Nma1 als Interaktionspartner, implizieren eine zusätzliche Funktion des Spleiß-Faktors bei zytoplasmatischen Transportprozessen (Kellner *et al.*, 2014). In der vorliegenden Arbeit sollte die zytoplasmatische Lokalisierung sowie die zytoplasmatischen Funktionen des Proteins genauer charakterisiert werden. Die Beobachtung von Num1:3xGFP enthüllte sehr dünne langgezogene Strukturen vom Zellkern ins Zytoplasma. Auf Grund der postulierten zytoplasmatischen Funktion lag die Vermutung nahe, dass Num1 direkt in die Entstehung dieser Strukturen involviert sein könnte. Möglicherweise befindet sich Num1 in diesen Strukturen und täuscht so auch nur eine zytoplasmatische Lokalisierung vor. Alternativ könnte an der Kernpore eine Interaktion von Num1 mit Kin1 stattfinden, da für Kin1 eine Lokalisierung an NPCs gezeigt werden konnte (Steinberg *et al.*, 2012). Durch Bewegung des Motors entlang von Mikrotubuli könnte die extreme Dehnung der Kernmembran zustanden kommen. Diese Theorie wird von der Beobachtung untermauert, dass der Transport von Kernporen in *U. maydis* zu langen nukleären Extensionen führt (Steinberg *et al.*, 2012). Die Co-Lokalisierung mit einem Histon-Markerprotein zeigte jedoch, dass diese Struktur nicht spezifisch für Num1 ist, sondern es sich um einen extrem verformten und verlängerten Bereich des Zellkerns handelte. Dieses Phänomen wurde bei

der Wanderung der Chromosomen in die Tochterzelle beschrieben: Die Kernmembran wurde von den beteiligten Motorproteinen extrem lang gezogen bevor sie riss und in der Mutterzelle verblieb (Straube *et al.*, 2005). In Pilzen gibt es keine Gene die für die Zellkern Lamina codieren, daher sind sie ohne dieses stützende Skelett extrem flexibel (Straube *et al.*, 2005, Melcer *et al.*, 2007). Man kann davon ausgehen, dass es sich um einen allgemeinen Mechanismus handelt der mit Migration des Zellkerns zusammenhängt.

Die zytoplasmatische Lokalisierung von Num1 kann mit der konventionellen Fluoreszenzmikroskopie nicht aufgelöst werden, daher wurden die Experimente mit einer alternativen Methode durchgeführt. Die PALM-Mikroskopie erschien ist eine hochauflösende Technik, die es erlaubt einzelne Moleküle zu visualisieren. Für diese Methode ist die Fusion mit einem photokonvertierbaren fluoreszenten Protein (FP) notwendig. Eos, genannt nach der griechischen Göttin der Morgenröte, ist ein fluoreszentes Protein aus der Koralle *Lobophyllia hemprichii*, das in der Lage ist durch Bestrahlung mit UV-Licht seine Fluoreszenz Emission vom grünen in den roten Bereich zu verschieben und daher für die PALM-Technik geeignet. Die ersten Experimente wurden mit dem fluoreszenten Protein *mEos2* durchgeführt, welches eine monomere, thermostabile Weiterentwicklung des EosFP ist (McKinney *et al.*, 2009, Langner, 2015). Die endogene *num1:mEos2* Fusion führte zu keinem detektierbaren Signal, nur durch eine Überexpression konnten Fusionsproteine festgestellt werden. Die Möglichkeit unter starken Überexpressions-Bedingungen die sensible Lokalisierung von Num1 zu verfälschen war jedoch sehr hoch. Aus diesem Grund wurde ein Eos für *U. maydis* etabliert, welches eine höhere Leuchtkraft aufweist. Die wildtypische Form von Eos ist tetramerisch, durch das Einfügen einer Mutation, die Tetramerisierung verhindert, wurden aus zwei über einen 12 AS langen Linker verbundenen monomeren Molekülen ein Tandem-Dimer hergestellt. Die Insertion einer zweiten Mutation führte zu einem monomeren *mEos* (Nienhaus *et al.*, 2006). Tests ergaben eine sehr starke Fluoreszenz des Tandem-Dimers, das aus diesem Grund für alle weiteren Experimente verwendet wurde. Die Analysen ergaben die vorherrschende Lokalisierung von Num1 im Nukleus, zusätzlich war eine zytoplasmatische Num1-Population detektierbar. Die genaue Betrachtung ergab eine mögliche

Lokalisierung entlang länglicher Strukturen, außerdem konnten auch immer wieder etwas größere Aggregate außerhalb des Zellkerns beobachtet werden. Die Auswertung von Kymographen ergab eine Bewegung von Num1 außerhalb des Zellkerns, welche durch die Behandlung der Zellen mit Benomyl aufgehoben werden konnte. Eine Pixel-Quantifizierung ergab eine mehr als doppelt so hohe Anzahl der Ereignisse im Zytoplasma der unbehandelten Zellen im Vergleich zu Benomyl-behandelten Zellen. Da Benomyl ein Inhibitor des Mikrotubuli-Zytoskeletts ist, weist diese Beobachtung auf eine Abhängigkeit zwischen der zytoplasmatischen Bewegung von Num1 und Mikrotubuli hin. Die Analyse von Zellen mit einem zusätzlichen Tubulin-Marker ergab eine teilweise Assoziation von Num1 mit den Mikrotubuli, jedoch auch einen beträchtlichen Teil der unabhängig von den sichtbaren Strukturen im Zytoplasma lokalisierte. Eine Quantifizierung in Spordien ergab eine erhöhte Dichte von Molekülen / μm^2 im Bereich der Mikrotubuli im Vergleich zu zytoplasmatischen Bereichen. Auch in Filamenten konnte eine partielle Co-Lokalisierung von Num1 mit dem Mikrotubuli-Zytoskelett beobachtet werden. Die Untersuchung der Co-Lokalisierung in fixierten Zellen könnte dazu noch genauere Hinweise geben. Nachdem gezeigt wurde, dass sich Num1 im Zytoplasma bewegt, wurden diese Transportprozess durch Deletionen der Motorproteine Kin3 und Kin1 weiter aufgeklärt. Die $\Delta kin3$ -Stämme zeigten die bereits beschriebenen Deletionsphänotypen. Die Abwesenheit von Kin3 führte zu keiner Veränderung der Lokalisierung und Motilität von Num1 im Zytoplasma. Das Signal erschien zwar wesentlich diffuser als in der Wildtyp-Kontrolle, trotzdem konnte eine Num1-Bewegung zwischen Zellkern und Zytoplasma beobachtet werden. Diese Beobachtung legt nahe, dass der Num1-Transport nicht mit frühen Endosomen assoziiert ist, welche von Kin3 entlang von Mikrotubuli transportiert werden (Wedlich-Söldner *et al.*, 2000; Schuster *et al.*, 2011a). Diese Vermutung konnte durch eine Co-Lokalisierung von Num1 und Rab5 bestätigt werden, da die Analyse keine Assoziation von Num1 mit frühen Endosomen ergab. Im Gegensatz dazu schien die Deletion von *kin1* die Bewegung der Num1-Moleküle zu inhibieren. Neben der vorherrschenden Lokalisierung von Num1 im Zellkern konnte eine zusätzliche Population im Zytoplasma festgestellt werden. Diese war jedoch nur direkt um den Nukleus

herum detektierbar. Es schien als würden die Proteine an einer Art Grenze aufgehalten sich weiter ins Zytoplasma zu bewegen. In Vorarbeiten wurde gezeigt, dass die Deletion von *num1* die Polarität der Zellen stark beeinflusst und die Motilität von frühen Endosomen aufhebt (Kellner *et al.*, 2014). In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Num1 nicht mit frühen Endosomen transportiert wird, mögliche Aufgaben des Proteins werden im Folgenden diskutiert.

3.1.2 Der zytoplasmatische Num1-Transport ist Kin1-abhängig

Das konventionelle Kinesin Kin1 vermittelt den Transport von Dynein zur den Mikrotubuli Plus-Enden (Lenz *et al.*, 2006). Als weitere direkte Fracht von Kin1 bzw. KinA konnten sowohl in *U. maydis* als auch in *A. nidulans* sekretorische Vesikel identifiziert werden (Schuster *et al.*, 2012, Penalva *et al.*, 2017). In *U. maydis* wurde gezeigt, dass ein Großteil der Chitinsynthase Mcs1 von Kin1 zur Hyphenspitze transportiert wurde. Ein Teil der Vesikel wurde nicht exozytiert und mit Hilfe von Dynein zurück zur Zellmitte transportiert. Die Geschwindigkeit von Mcs1-markierten Vesikel betrug ca. 1,5 $\mu\text{m} / \text{s}$ (Schuster *et al.*, 2012). Die subzelluläre Lokalisierung von Mcs1 war in Δkin1 und Δnum1 -Stämmen gleichermaßen beeinträchtigt (Kellner *et al.*, 2014). Die Beobachtung dass Num1-Moleküle im Δkin1 -Hintergrund nicht mehr in der Lage waren weiter in das Zytoplasma einzuwandern, spricht für einen Kin1-abhängigen Transport des Proteins. Num1 könnte analog zu Mcs1 (Schuster *et al.*, 2012) als direktes Cargo von Kin1 transportiert werden. Es handelt sich jedoch vermutlich um eine transiente Interaktion zwischen Num1 und Kin1, da die Proteine nur nach Quervernetzung in einer *in vivo* Co-IP zusammen präzipitiert werden konnten (Kellner *et al.*, 2014). Eine mikroskopische Untersuchung der Co-Lokalisierung von Num1 und Kin1 ist nicht möglich, da Kin1-Fusionsproteine im gesamten Zytoplasma lokalisieren. (nicht veröffentlicht, Schuchardt *et al.*, 2005). Eine weitere Möglichkeit wäre die Funktion eines Adapters zwischen Kin1 und seinen Cargos. Falls Num1 nur für sogenannte „*kiss and run*“-Momente mit Kin1 interagiert, könnte dies

die beobachtete erhöhte Num1-Dichte um Mikrotubuli herum erklären. Dabei könnten stationäre Num1-Proteine eine Rolle bei der Beladung von Motorproteinen oder dem Wechsel zwischen Mikrotubuli von Motorproteinen mit Fracht spielen. Num1 könnte ebenso gebunden an die Fracht von Kin1 gebunden durch die Zelle transportiert werden. Dies macht einen Co-Transport mit sekretorischen Vesikeln wahrscheinlich und würde die motile Num1-Population erklären. Num1 könnte in diesem Fall als eine Art Adapter-, Binde- oder Scaffoldprotein fungieren. Eine weitere Option wäre eine Funktion von Num1 bei der Vermittlung der Bindung zwischen Kin1 und Dynein. Die Deletion von *num1* führt zu einer Veränderung der Dynein-Lokalisierung in der Hyphenspitze („*dynein loading zone*“, Lenz *et al.*, 2006, Kellner *et al.*, 2014). Statt einer apikalen Lokalisierung war Dynein im gesamten Zytoplasma verteilt (Kellner *et al.*, 2014). Auch der Transport von frühen Endosomen war in $\Delta num1$ -Stämmen stark beeinträchtigt (Kellner *et al.*, 2014). Da bereits geklärt werden konnte, dass es sich wahrscheinlich um keinen direkten Einfluss von Num1 auf die Endosomen handelt, liegt ein indirekter, durch Dynein verursachter, Effekt nahe. Falls Dynein ohne Num1 nicht mehr an Kin1 rekrutiert werden kann und folglich nicht mehr zur Hyphenspitze transportiert wird, ist davon die gesamte intrazelluläre Transportmaschinerie beeinträchtigt. Der Vergleich der Geschwindigkeit von Num1-Molekülen mit der von sekretorischen Vesikeln, könnte diese Frage weiter klären. Eine Co-Lokalisierung mit einem Marker für sekretorische Vesikel wie zum Beispiel Sec4 könnte zeigen, ob Num1 gemeinsam mit sekretorischen Vesikeln transportiert wird. Zusätzlich würde auch die Expression von Num1:tdEos in einem für Dynein temperatursensitiven Stamm weitere Antworten geben. Fehlt Dynein am Plus-Ende der Mikrotubuli, können Vesikel nicht von der Hyphenspitze zurück ins Zellinnere transportiert und recycelt werden und akkumulieren dort. Eine Akkumulation von Num1 in der Hyphenspitze könnte einen Hinweis auf Zusammenhänge zwischen Num1 und Vesikeln geben.

3.1.3 Num1 – ein Spleißfaktor auf Abwegen?

Transporte in den Zellkern und aus diesem heraus erfolgen immer durch Kernporen (NPC), die in die Kernmembran eingebettet sind. Diese schaffen eine Permeabilitätsbarriere: Proteine die kleiner als 40 kDa sind, können frei durch die Poren diffundieren, wohingegen größere Proteine oder Komplexe auf Transportrezeptoren angewiesen sind (Di Ventura und Kuhlman, 2016). Der größte Teil dieser Rezeptoren sind Mitglieder der Karyopherin-Familie, diese fungieren als Importine oder Exportine. In vorhergehenden Untersuchungen konnten mit Hilfe von Co-IPs mehrere Komponenten des Kernporenkomplexes als Interaktionspartner von Num1 und Prp19 identifiziert werden (Hassinger, 2015). Mit den höchsten Gesamtpeptidmengen wurden die Proteine Nup192 und Nic96 ermittelt (Kosova *et al.*, 1999, Hoelz *et al.*, 2011). Diese beiden Proteine sind in Hefe Teil des ANC (*adaptor nucleoporin complex*), der an die integralen Membranelemente des NPC gekoppelt ist (Hoelz *et al.*, 2011), diese Interaktion legt den Transport von Num1 durch NPCs nahe. Außerdem konnten die Karyopherine Kap114 und Kap104 als Interaktoren von Num1 präzipitiert werden, was auf eine Beteiligung beim Kern-Import des Proteins hinweist (Hassinger, 2015). Das Num1-Protein hat jedoch eine Größe von nur 19 kDa, es kann somit nicht ausgeschlossen werden, dass Moleküle durch die Kernpore diffundieren und so eine zytoplasmatische Lokalisierung zu Stande kommt. Die Interaktion von Num1 und Kin1 wäre mit einem Transport von Num1 durch die Kernpore erklärbar, da Kin1-Motorproteine an den NPCs binden (Steinberg *et al.*, 2012). Auf Grund der bisherigen Forschungsergebnisse ist es wahrscheinlicher, dass Num1 als Teil eines Komplexes ins Zytoplasma transportiert wird und dort in einer weitere Funktion zu erfüllen. Proteine, die zwischen dem Nukleus hin und her shutteln enthalten Sequenzen für den Kernexport (NES) und den Kernimport (NLS). Num1 besitzt nur eine NLS (Kellner *et al.*, 2014), jedoch keine NES. Dies deutet darauf hin, dass Num1 nicht gezielt aus dem Kern exportiert wird, sondern als Teil eines Komplexes den Zellkern verlässt. Die Identifizierung von Zytoskelett-Bestandteilen wie Tub1 und Tub2 in Co-IP Experimenten als Interaktoren von Num1 unterstreicht zusätzlich die wahrscheinliche Verbindung zwischen Num1 und Kin1 bei

Transportprozessen (Hassinger, 2015). Des Weiteren konnten mehrere Sec-Proteine mit Num1 co-präzipitiert werden, die als Teil der Hülle von COP I- und COP II-Vesikeln eine Rolle im sekretorischen Signalweg von Proteinen spielen (Hassinger, 2015). Sec-Proteine sind wichtige Faktoren im sekretorischen Signalweg (Schekman, 2002). Dies unterstreicht erneut die Verbindung zwischen Num1 und dem Motorprotein Kin1, das als Transporter für sekretorische Vesikel bekannt ist. Die Beobachtung der $\Delta num1$ - und $\Delta kin1$ -Phänotypen legt die Vermutung nahe, dass die Proteine Funktionen erfüllen, die das polare Wachstum beeinflussen. Die *kin1*-Deletion führt zu einer Störung des Transports von Vesikeln zum Plus-Ende der Mikrotubuli und indirekt durch den Verlust des Dynein-Transports zu fehlendem Recycling der Endosomen und Motoren, die sich in der Hyphenspitze sammeln. In Filamenten findet Wachstum durch lokale Exozytose an der Hyphenspitze statt, dazu liefern Transportvesikel Zellendmarker und wichtige Komponenten und Enzyme für die Synthese neuer Membranen und Zellwand-Teile. Der sogenannte Spitzenkörper wirkt dabei als Verteiler-Zentrum für Vesikel, da er sowohl exozytotische als auch endozytotische Vesikel enthält (Harris, 2006, Steinberg, 2007a). Auch Mikrotubuli stehen im Kontakt zum Spitzenkörper, was auf einen wichtigen Einfluss des Langstreckentransport für das polare Wachstum hindeutet. (Harris, 2006, Steinberg, 2007a). Die Aufrechterhaltung der Polaritätsachse ist essentiell für die Form und das Wachstum filamentöser Pilze und wird durch die Deletion von *kin1* gestört. Warum die Deletion von *num1* ähnliche Auswirkungen auf die Zelle hat ist nicht bekannt. Eine Beteiligung von Num1 am sekretorischen Signalweg könnte somit die in $\Delta num1$ -Zellen beobachteten schwerwiegenden Wachstumsphänotypen erklären.

Die Deletion von *kin1* ergab eine Num1-Lokalisierung dicht um den Zellkern herum, welches wie an einer Grenze gehindert wurde, weiter in das Zytoplasma zu migrieren. Man kann spekulieren, dass es sich um eine Art Ladezone handelt. In diesem Bereich um den Zellkern herum wird die exportieren Fracht sortiert und ihrem Zielort zugeordnet. Es ist möglich, dass Num1 sich in diesem Bereich durch Diffusion oder gebunden an andere Faktoren unabhängig von Motorproteinen und Mikrotubuli frei bewegen kann. Für einen Transport darüber hinaus, muss das Protein jedoch an Kin1 oder

assoziierten Komplex gebunden sein. Die Interaktion von Kin1 mit den NPCs (Steinberg *et al.*, 2012) schlägt eine Rolle von Kin1 als zentralen Vermittler in dieser Ladezone vor. Die Motorproteine binden an die NPCs und können dort exportierte Moleküle in Empfang nehmen und weiter vermitteln. Ein Beispiel dafür sind mRNPs (*messenger ribonucleoprotein*), die mit Hilfe des TREX-Komplexes aus dem Zellkern exportiert werden. Diese Partikel aus Proteinen und mRNA werden auf frühe Endosomen geladen und Kin3- und Dynein-abhängig entlang von Mikrotubuli transportiert (Baumann *et al.*, 2012). Num1 könnte in diesem Kontext eine Adapter- oder Chaperon-Funktion haben und die ablaufenden Reaktionen unterstützen. Da Deletionen von *num1* und *kin1* den Vesikeltransport stark beeinträchtigen würden, würde diese Theorie die schwerwiegenden Polaritätsdefekte der Mutanten erklären. Die Deletion von *kin1* würde folglich zu einem Zusammenbruch des gerichteten mRNA-Transports führen, was Auswirkung auf die Polarität der Zelle hat. Das RNA-Bindeprotein Rrm4 stellt eine Schlüsselkomponente des Mikrotubuli-abhängigen mRNA-Transports da und vermittelt so die lokale Translation spezieller Transkripte (Becht *et al.*, 2006, Zarnack und Feldbrügge, 2010). Rrm4 bewegt sich in einem Komplex aus mRNA, Ribosomen und assoziierten Proteinen auf frühen Endosomen entlang von Mikrotubuli (Higuchi *et al.*, 2014, Haag *et al.*, 2015). Die Deletion des Gens führt wie in *num1*- und *kin1*-Deletionsstämmen zu starken Polaritätsdefekten und bipolarem Wachstum. Als Erklärung wurden verschiedene Theorien diskutiert: Als wichtiger Faktor für die mRNA-Bindung kann eine Deletion von *rrm4* durch das Ausbleiben lokaler Translation zum Beispiel an der Hyphenspitze zu einer Störung der Polaritätsachse führen (Becht *et al.*, 2006). Eine andere Untersuchung sieht den beeinträchtigten Ribosomen-Transport durch die Zelle als mögliche Ursache an (Higuchi *et al.*, 2014). Eine Ähnlichkeit der *kin1* und *rrm4* Deletionsphänotypen wird durch den Verlust des Dynein-Transports in $\Delta kin1$ -Zellen erklärt (Lenz *et al.*, 2006), da Rrm4 in der Hyphenspitze akkumuliert statt recycelt zu werden (Becht *et al.*, 2006). Spekuliert man, dass die Funktion von Num1 wichtig für den Kontakt zwischen Vesikeln und Motor ist, könnte dies erklären, warum auch Num1-defiziente Zellen den beobachteten Phänotypen aufweisen. Diesen Effekt könnte man jedoch auch beobachten, wenn Num1, wie bereits diskutiert, die Bindung von Kin1 und Dynein

vermitteln würde und eine *num1*-Deletion daher denselben Effekt wie eine *kin1*-Deletion verursacht. Weitere mögliche Funktionen von Num1 wäre eine Stabilisierung der Bindung zwischen Motoren und Cargo. In diesem Fall müsste für Num1 eine Spezifität für sekretorische Vesikel gewährleistet sein, da keine Assoziation mit frühen Endosomen beobachtet wurde. Nicht geklärt ist bisher wodurch die Num1-Bindung spezifiziert wird. Eine Erklärung wäre, dass Num1 an Oberflächenproteine spezieller Vesikelpopulationen bindet. Die Interaktion von Num1 mit Sec-Proteinen, die Teil von COP I- und COP II-Vesikeln sind, legt somit eine Bindung an sekretorische Vesikel nahe (Hassinger, 2015). Der Einfluss von Kin1 und Num1 auf den geordneten intrazellulären Vesikeltransport würde auch erklären, dass der Phänotyp von $\Delta kin1$ - und $\Delta num1$ -Mutanten nur in Filamenten und nicht in Sporidien ausgeprägt ist, denn nur bei polar wachsenden Filamenten spielt der Langstreckentransport eine zentrale Rolle (Harris, 2006, Steinberg, 2007a). In *U. maydis* konnte gezeigt werden, dass die Bewegung von Kernporen-Komplexen (NPC) von Kin3 und Dynein vermittelt wird, bisher ist jedoch noch unbekannt wie der Kontakt zwischen den NPCs und den Motorproteinen hergestellt wird (Steinberg *et al.*, 2012). Es ist nicht auszuschließen dass Kin1 in *U. maydis* alternative Funktionen neben dem Plus-End-Transport ausführt und in diesem Zusammenhang mit Num1 in Verbindung steht. Im Gegensatz zu Kin1 hatte die Deletion von *kin3* keinen Einfluss auf die Verteilung und Bewegung von Num1 innerhalb der Zelle. Dies unterstreicht, dass Num1 nicht in Kin3-abhängige Transportprozesse involviert ist. Unter Beachtung der Ladezonen-Theorie bedeutet es auch, dass Kin3 bei den beschriebenen möglichen Abläufen wie der Beladung von Motorproteinen keine aktive Rolle spielt. Nur für Kin1 und Dynein konnte ein Kontakt mit den NPCs nachgewiesen werden (Steinberg *et al.*, 2012), nicht aber für Kin3. Man kann spekulieren, dass sich freie Kin3-Motorproteine um die Ladezone herum sammeln und über Kin1 und möglicherweise auch Num1 vermittelte Reaktionen an ihre Fracht gebunden werden.

Analog zu dem bereits vorgeschlagenen Modell kann man postulieren, dass Num1 als Teil eines mRNP-Komplexes den Zellkern verlässt (Kellner *et al.*, 2014). Gestützt wird diese Hypothese durch die Befunde, dass Komponenten des NTC mit dem TREX-Komplex interagieren. In *S. cerevisiae* findet die

Verbindung zwischen dem NTC und der Transkriptionsmaschinerie über einen direkten Kontakt der RNAP II und der NTC-Komponente Syf1p statt (Chanarat *et al.*, 2011). In Vorarbeiten konnten bei Num1-Co-IP Experimenten keine Bestandteile des THREX/THO-Komplexes co-präzipitiert werden (Hassinger, 2015), obwohl Homologe der Kernkomponenten in *U. maydis* vorhanden sind (Mex67, Mtr2, Yra1, Feldbrügge *et al.*, 2008). Es ist möglich, dass der mRNP-Export in *U. maydis* über einen alternativen Signalweg abläuft, darüber sind jedoch zum jetzigen Zeitpunkt noch keine Untersuchungen bekannt. Man könnte vermuten, dass Num1 mit gespleißten mRNAs aus dem Zellkern transportiert wird. Denkbar ist eine Adapter- oder Chaperone-Funktion, die Num1 in Assoziation mit den mRNPs ausübt. Außerhalb des Zellkerns muss die exportierte Fracht für ihre weitere Bestimmung in der Zelle verteilt werden. Dabei könnte Kin1 durch die Bindung an NPCs eine zentrale Rolle spielen. Num1 könnte die Bindung zwischen Kin1 und den mRNPs vermitteln und so dazu beitragen, dass die mRNPs auf frühe Endosomen verladen werden. Eine mRNP unabhängige Rolle von Num1 sieht vor, dass sich das Protein nach dem Export aus dem Zellkern von dem Komplex löst und frei vorliegt. In diesem Fall könnte Num1 als Adapter oder Chaperon die Bindung von Cargo an Endosomen vermitteln oder auch die Bindung von Endosomen an Motorproteine. Erstmals konnte für ein Spleißosom-assoziiertes Protein eine Lokalisierung im Zytoplasma und dessen Abhängigkeit vom Motorprotein Kin1 gezeigt werden. Welche detaillierten Funktionen Num1 im Zytoplasma ausübt muss in zukünftigen Studien geklärt werden.

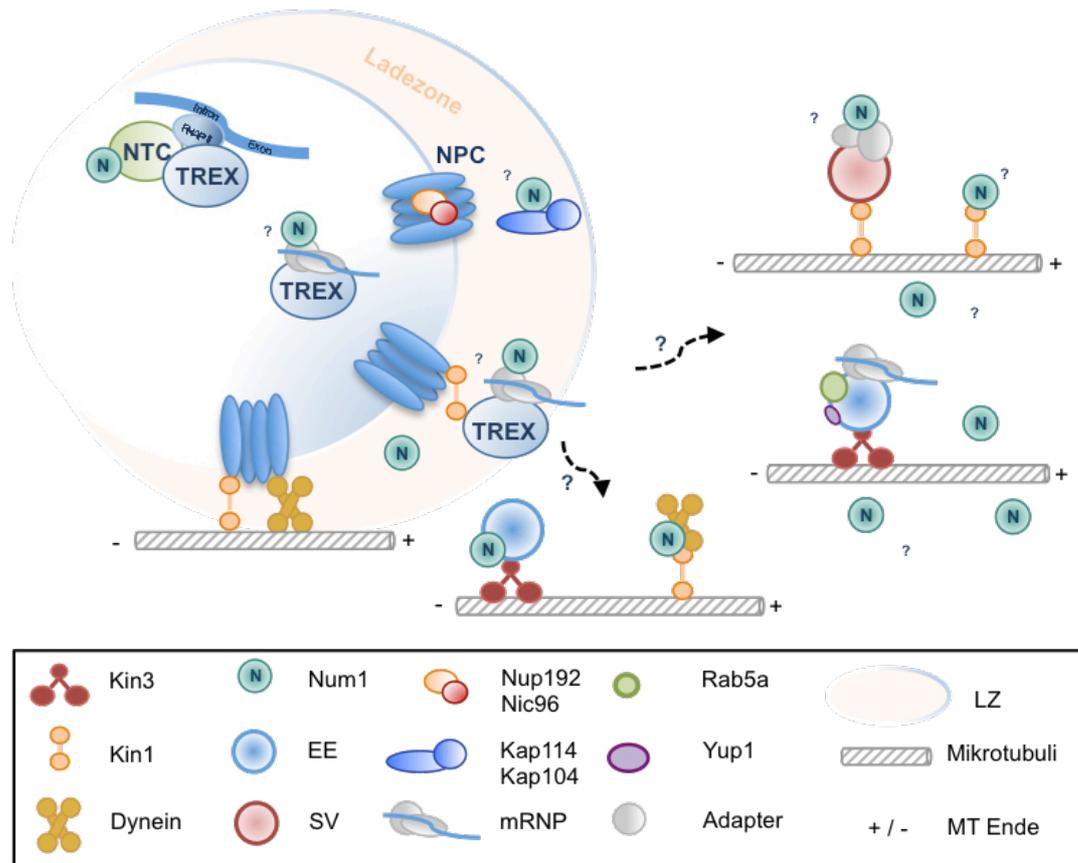


Abb. 48: Modell zur zyttoplasmatischen Funktion von Num1. Num1 ist im Zellkern (weiß) Teil des NTC, welcher Spleiß-Reaktionen vermittelt. Der TREX-Komplex wird von einer NTC Untereinheit zur RNAPII rekrutiert und die neu entstandene mRNA in mRNPs verpackt. Num1 könnte an den TREX-mRNP Komplex binden und so aus dem Zellkern exportiert werden. Die Theorie wird gestützt durch Interaktionen mit Komponenten der Kernporen (Nup192/ Nic96) und Import-Proteinen (Kap114/ Kap104). Außerhalb des Zellkerns wird eine Ladezone (LZ) postuliert. In dieser kann sich Num1 ohne Mikrotubuli-abhängigen Transport bewegen. Gestützt wird diese Vermutung durch die Lokalisierung in $\Delta kin1$ -Zellen, da Num1 nur in einem schmalen Steifen um den Zellkern herum detektierbar war. Es ist denkbar, dass Kin1, das mit den NPCs interagiert (Steinberg *et al.*, 2012), einen Kontakt zur exportierten Fracht herstellt und auf Motorproteine zum weiteren Transport verlädt. Num1 könnten in dieser Zone eine Adapter- oder Chaperone-Funktion ausüben und bei der Herstellung des Kontakts zwischen Motorproteinen und Cargo fungieren. Es konnte gezeigt werden, dass der zyttoplasmatische Num1-Transport von Kin1 abhängig ist. Der Co-Transport mit sekretorischen Vesikeln ist denkbar. Num1, das um Mikrotubuli herum im Zytoplasma aggregiert, könnte dort für transiente Interaktionen mit Kin1 zur Verfügung stehen. Modell modifiziert nach (Kellner *et al.*, 2014).

3.1.4 Untersuchung spezifischer Num1-Domänen

Ein weiterer Ansatz die zyttoplasmatische Funktion von Num1 zu evaluieren war die Trennung der nukleären von der zyttoplasmatischen Funktion durch entsprechende Mutationen in den Interaktionsdomänen. In Vorarbeiten wurde ein Bereich identifiziert, welcher die Interaktionsdomäne von Num1 und Kin1 enthält (Kellner, 2012). Während dieser Arbeit war es jedoch nicht möglich diese weiter einzugrenzen und eine Mutante zu generieren. Alternativ wurde jedoch eine Möglichkeit gefunden die Interaktionen von Num1 innerhalb des

NTC zu beeinflussen. Mit Hilfe von Hefe-Zwei-Hybrid Interaktionstests konnte gezeigt werden, dass die letzten 8 AS von Num1 notwendig sind für eine Interaktion mit Cef1 (Hassing, 2015). Die Fusionsproteine des verkürzten Num1 konnten im Zellkern lokalisiert werden und auch die Spleiß-Effizienz der Mutante war nicht beeinträchtigt. Die Induktion des filamentösen Wachstums führte zu langen, geraden Filamenten die sich nicht vom Wildtyp unterscheiden. Diese Beobachtungen sprechen für ein Num1-Protein, das in der Lage ist alle seine Funktionen zu erfüllen. Wahrscheinlich interagiert Num1 weiterhin mit den anderen Komponenten des Komplexes (Grote *et al.*, 2010, Kellner *et al.*, 2014), sodass keine Störung des Spleiß-Vorgangs stattfindet. *In vitro* Interaktionstest der humanen NTC-Komponenten ergaben, dass der C-Terminus von BCAS2 notwendig ist für die Interaktion mit CDC5L. Dies konnte im *in vivo* Test in humanen Zellen bestätigt werden. Zwei *coiled-coil* Motive spielen eine zentrale Rolle für die Interaktion. (Chen *et al.*, 2013). Mit Hilfe des Programms COILS (SIB – Swiss institute of bioinformatics) wurde die Num1-Sequenz im Vergleich mit hBCAS2 verglichen, es konnten dabei keine *coiled-coil* Motive am C-Terminus identifiziert werden. Auf Grund der strukturellen Unterschiede und beobachteten Ergebnissen kann man vermuten, dass die Interaktion von Num1 und Cef1 in *U. maydis* nicht essentiell ist. Bei der Herstellung dieser Num1-Verkürzung wurde zufällig eine Num1-Mutante, bei der der Leserahmen bei einem Startcodon bei AS 97 beginnt, generiert. Das entsprechende Fusionsprotein zeigte eine hauptsächlich zytoplasmatische Lokalisierung. Die Reproduktion dieser Mutante mit dem verkürzten ORF führte jedoch zu keiner zytoplasmatischen Lokalisierung von Num1.

Der NTC ist ein in Pilzen, Menschen bis hin zu Pflanzen hoch konservierter Komplex. SPF27, Prp19 und Cef1 sind in allen untersuchten Komplexen essentiell, das SPF27 Homolog Num1 bildet jedoch in *U. maydis* und anderen niederen Eukaryoten eine Ausnahme. Die Deletion von *num1* führt zu schweren morphologischen Defekten, trotzdem sind die Zellen lebensfähig. Um die Konservierung von Num1 zwischen Basidiomyceten und Ascomyceten genauer zu untersuchen, wurde eine endogene Fusion des Num1-Homologs AN4244 in *A. nidulans* mit GFP durchgeführt. Das Gen wurde bisher nicht charakterisiert, die Genom Datenbank

(aspergillusgenome.org) weist jedoch darauf hin, dass das Protein ein Ortholog von SPF27 und damit Teil des Prp19-Komplexes ist. Außerdem findet sich ein Verweis auf die BCAS2-Familie. Die mikroskopische Analyse der AN4244-Fusionsproteine ergab eine Lokalisierung in den Zellkernen der multinukleären Hyphe. Die Beobachtung konnte mit einer DAPI-Färbung, einen Farbstoff, der in die DNA interkaliert, bestätigt werden. Bei starker Überbelichtung der Probe konnte neben dem Signal im Nukleus auch zytoplasmatisch lokalisiertes GFP festgestellt werden. Um auszuschließen, dass es sich bei den zytoplasmatischen Signalen um ein Artefakt handelt, muss analog zu den Untersuchungen in *U. maydis* eine Alternative zur konventionellen Fluoreszenzmikroskopie gefunden werden, wobei eine mögliche Variante die hochauflösende PALM Mikroskopie-Technik wäre. AN4244 kann in *A. nidulans* deletiert werden (Kellner *et al.*, 2014). Wie in *U. maydis* überlappen auch in *A. nidulans* die Deletionsphänotypen von AN4244 und dem Kin1-Homolog KinA bezüglich der Störung des polaren Wachstums und der Zellkernverteilung innerhalb der Hyphe (Requena *et al.*, 2001, Kellner *et al.*, 2014), was auf ähnliche Funktionsweisen zwischen Num1 und AN4244 hindeutet. Auch die Akkumulation von NudA, dem Dynein-Homolog, in der Hyphenspitze war analog zur Beobachtung in *U. maydis* beeinträchtigt (Kellner *et al.*, 2014). Da AN4244 wie Num1 nicht essentiell ist, könnte man postulieren dass das SPF27-Homolog in *A. nidulans* die gleichen Funktionen wie Num1 inne hat, eventuell könnte es sich dabei um Mechanismen halten die in filamentösen Pilzen zwischen Ascomyceten und Basidiomyceten konserviert sind. Eine funktionelle Komplementation der *num1*-Deletion mit AN4244 führte jedoch zu mislokalisierten Fusionsproteinen im gesamten Zytoplasma. Die Morphologie der Filamente zeigte die gleiche Ausprägung wie $\Delta num1$ -Zellen. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass das Protein nicht funktionell ist. Es ist auch nicht ausgeschlossen, dass das nicht funktionelle Protein degradiert wurde und nur freies GFP detektiert wurde. In Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass der für *U. maydis* einzigartige N-Terminus eine essentielle Rolle für die Funktionalität des Proteins spielt (Kellner, 2012). Eine chimäres Protein aus dem *U. maydis* N-Terminus und AN4244 war jedoch auch nicht in der Lage die *num1*-Deletion zu komplementieren. Eine wahrscheinliche Erklärung ist eine schlechten

Expressionsrate des Gens, da die *Aspergillus* Sequenz nicht für *U. maydis* di-codon optimiert wurde (Zarnack *et al.*, 2006). Die Expression eines für *U. maydis* optimierten Proteins und eine Überprüfung via Western Blot könnte diese Frage klären.

3.2 Charakterisierung des zytoplasmatischen Proteins Nma1

In der vorliegenden Arbeit wurde die zytoplasmatische Funktion von Nma1 untersucht. Die Fusion von Nma1 zeigte eine bidirektionale Bewegung entlang von Mikrotubuli und bei einer Co-IP konnten Komponenten des CORVET-Komplexes als interagierende Proteine identifiziert werden (Pinter, 2012, Pinter, 2015). In der vorliegenden Arbeit sollten die dem Transport von Nma1 zu Grunde liegenden Mechanismen aufgeklärt werden.

3.2.1 Nma1 interagiert direkt mit Vps3

Als Interaktionspartner von Nma1 konnten die CORVET-Komplex Komponenten Vps3, Vps11 und Vps18 identifiziert werden (Pinter, 2015). Erste Untersuchungen ergaben, dass sich die Deletion von *vps3* auf das polare Wachstum von *U. maydis* auswirkt und wie in Hefe beschrieben die Biogenese von Vakuolen gestört ist (Balderhaar und Ungermann, 2013, Schneider, 2016). Des Weiteren wurde die Motilität von Nma1 komplett aufgehoben (Schneider, 2016). In einer direkten Hefe-Zwei-Hybrid Analyse wurde nur für die Proteine Vps3 und Nma1 eine direkte Interaktion gezeigt. Man könnte vermuten, dass Nma1 direkt an Vps3 bindet und auf Grund starker Interaktionen die beiden Proteine co-präzipitiert werden konnten. Da Vps3 im dreidimensionalen Modell des Komplexes in *S. cerevisiae* außen liegt (Balderhaar und Ungermann, 2013; Abb. 6B) und die direkte Interaktion von Nma1 mit Vps3 eine leichte Zugänglichkeit von Vps3 nahe legt, wäre es möglich dass die Architektur des CORVET-Komplexes in *U. maydis* dieser ähnelt. Da bisher noch keine Untersuchungen zur Struktur des CORVET-Komplex in *U. maydis* durchgeführt wurden, ist nicht bekannt aus wie vielen

Komponenten er besteht. In Hefe sind neben dem Holo-Komplex jedoch auch verschiedene Subkomplexe bekannt, weshalb das Auftreten von Subkomplexen in *U. maydis* auch nicht unwahrscheinlich ist (Peplowska *et al.*, 2007). Es ist denkbar, dass die Proteine Vps3-Vps11-Vps18 einen Subkomplex ausbilden und Nma1 nur mit diesem interagiert. Ungewöhnlich ist jedoch, dass Vps8 bei den Co-IP-Experimenten nicht isoliert wurde. Möglicherweise spielt Nma1 als Chaperone eine Rolle bei der Rekrutierung von Vps8 an den CORVET-Komplex. Alternativ könnte Nma1 auch eine schützende Funktion ausüben. Die Interaktion von Nma1 und Vps3 wurde nur mit einer verkürzten Nma1-Variante gezeigt, die Co-Immunopräzipitation erfolgte hingegen mit einem Volllängen-Protein. Um eine direkte Interaktion von Nma1 mit Vps11 und Vps18 ausschließen zu können, müsste diese zuerst mit dem gesamten Nma1-Protein überprüft werden.

Die Kernkomponenten, die sich CORVET und HOPS teilen sind Vps11, Vps18, Vps16 und Vps33. Deletionen dieser vier Proteine führten zu sehr starken defekten der Endosomen Biogenese und der Vakuolenmorphologie (Banta *et al.*, 1988, Balderhaar und Ungermann, 2013). Dass Vps3 als einzige Komponente spezifisch für den CORVET-Komplex ist, spricht eindeutig dafür, dass Nma1 ein Effektor des CORVET- und nicht des HOPS-Komplexes ist. In *U. maydis* scheiterten die Versuche *vps11* zu deletieren, was darauf hindeutet, dass es sich auch diesem Organismus um eine der Kernkomponenten handelt, was die Ähnlichkeit zum Komplex in Hefe weiter unterstreicht. Außerdem konnten homologe Proteine für die fehlenden Komponenten Vps8, Vps18 und Vps33 identifiziert werden. Es kann jedoch noch keine Aussage darüber getroffen werden, ob und wenn wie sich die Komplexe in Hefe und *U. maydis* gleichen. Da die Vps (*vacuolar protein sorting*)-Mutanten in *S. cerevisiae* identifiziert worden sind, wurden daher auch die meisten Forschungsarbeiten in diesem Organismus durchgeführt. Im filamentösen Pilz *A. nidulans* gibt es bereits Vorarbeiten zu den Komplexen CORVET und HOPS (Abenza *et al.*, 2010, Abenza *et al.*, 2012). Es wurde gezeigt, dass im Genom zwei Homologe für Rab5 angelegt sind: RabA und RabB (Abenza *et al.*, 2009, Abenza *et al.*, 2010). Die Untersuchung des CORVET-Komplexes zeigte, dass dieser ein Effektor von RabB ist und RabA nur mit geringerer Affinität gebunden wird (Abenza *et al.*, 2010). Da es in

U. maydis auch zwei Homologe für Rab5 gibt, Rab5a und Rab5b, könnte auch Rab5b der Effektor von CORVET sein. Zur strukturellen Aufklärung müssen verschiedene biochemische Analysen wie Western Blot und Co-Immunopräzipitations Experimente durchgeführt werden. Auch Fusionsproteine der Komponenten mit GFP und Deletionen der anderen Komponenten könnten weiteren Aufschluss über das Verhalten in der Zelle geben.

Die Deletion von *vps3* führt in Sporidien und Filamenten zu deutlichen Wachstums- und Polaritätsdefekten. Diese Phänomene wurden bereits in einer Forschungsarbeit beschrieben und diskutiert (Schneider, 2016). Aus Hefe ist eine Interaktion von Vps3 und Rab5 bekannt (Balderhaar und Ungermann, 2013), aus diesem Grund sollte Rab5a in *vps3*-defizienten Stämmen untersucht werden. Das rote mCherry-Signal der Rab5a-Fusionsproteine konnte in den meisten Zellen nicht detektiert werden. Wenn Signale auszumachen waren, befand sich dieses gesammelt in runden großen Strukturen in der Zellmitte. Eine Färbung der Zellen ergab eine Lokalisierung von Rab5a in Vakuolen. In pilzlichen Vakuolen findet ein großer Teil des Abbaus von Molekülen statt (Klionsky *et al.*, 1990). Aus dieser Beobachtung könnte man schließen, dass Rab5 durch die Deletion von *vps3* nicht mehr an Endosomen rekrutiert werden kann und daher von der Zelle degradiert wird. Eine andere Möglichkeit wäre, dass der CORVET-Komplex durch die *vps3*-Deletion destabilisiert wird und zerfällt. Somit können keine frühen Endosomen mehr heranreifen. Diese Vermutung wird unterstützt durch die Beobachtungen in Hefe, dass die $\Delta vps8$ -Stämme nicht mehr in der Lage sind den CORVET-Komplex vollständig zu assemblieren (Peplowska *et al.*, 2007). In *A. nidulans* hatte die Deletion von *vps8* schwerwiegende Folgen auf die Lebensfähigkeit der Zellen (Abenza *et al.*, 2010). Des Weiteren wurde in *S. cerevisiae* gezeigt, dass die Deletion der Proteine Vps3 und Vps8, welche Rab5/Vps21p binden, zu einer Lokalisierung von Vps21p in der Vakuolenmembran führt. Diese Vakuolen werden als Endosomen-Vakuolen-Hybride bezeichnet, die nicht in der Lage sind einen sauren pH-Wert auszubilden und Defekte bei der Fragmentierung und Vererbung aufweisen (Peplowska *et al.*, 2007). Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass Vps3 das Rab5-Homolog Vps21p präferentiell in der GDP-gebundenen Form bindet und

daher die Rolle eines GEFs einnehmen könnte (Peplowska *et al.*, 2007). In Hefe sind neben Vps21p noch Ypt52 und Ypt53 als Rab5-Homologe bekannt (Singer-Kruger *et al.*, 1994), sowie in *U. maydis* neben Rab5a auch Rab5b existiert, jedoch bisher kaum untersucht ist (Fuchs *et al.*, 2006). Sollte Vps3 als GEF für Rab5a fungieren, ist es denkbar, dass Rab5b bei Deletion von *vps3* die Rolle von Rab5a übernimmt, um das Überleben der Zelle zu gewährleisten. Eine Doppeldeletion von *rab5a* und *rab5b* könnte weitere Informationen dazu liefern. Eine Färbung der Zellen mit dem endozytotischen Marker FM4-64 könnte zeigen, ob noch Endosomen gebildet werden, oder ob die gesamte Maschinerie für Endosomenfusion durch *vps3*-Deletion nicht mehr funktionell ist.

3.2.2 Vps9 erfüllt in *U. maydis* nicht die Funktion eines GEFs für Rab5a

Um den Zusammenhang zwischen Nma1, Rab5 und CORVET genauer zu verstehen, wurde ein GEF für Rab5 in *U. maydis* untersucht. Das Homolog von Vps9 aus *S. cerevisiae* konnte auch in *U. maydis* identifiziert werden (UMAG_10209). GEFs sind molekulare Schalter, die für die Aktivierung der Rab GTPasen den Austausch von GDP zu GTP katalysieren (Carney *et al.*, 2006). Die Deletion von *vps9* führte zu starken Polaritätsdefekten der Zellen, sowohl im induzierten als auch im nicht-induzierten Zustand. Dieser Phänotyp erinnert an den der *vps3*-Deletion (Schneider, 2016) und legt als Ursache die Störung des endozytotischen Signalwegs nahe (Harris und Momany, 2004, Fuchs *et al.*, 2005). Rab5 bewegte sich weiterhin bidirektional entlang von Mikrotubuli. Auch Nma1 konnte weiterhin entlang von Mikrotubuli lokalisiert werden. Die Motilität war im Gegensatz zu der von Rab5 jedoch beeinträchtigt. Die Auswertung von Kymographen ergab einen Verlust der Nma1-Motilität nach kurzer Zeit. Die Partikel blieben stationär. Die Analyse ergab zusätzlich eine signifikant reduzierte Distanz pro Endosom im Vergleich zum Wildtyp. Die Verringerung der Laufweite kann man wahrscheinlich auf die Wachstumsdefekte und die damit einhergehenden Veränderungen des Zytoskeletts zurückführen, da die Zellen morphologisch stark gestört sind. Die Analyse der Kymographen ergab die Vermutung, dass die Nma1-Rab5

Bewegung in $\Delta vps9$ -Stämmen entkoppelt voneinander abläuft. Die Nma1-Bewegung lässt sich eventuell durch einen Verlust der Bindung des Proteins an Endosomen erklären, weshalb die Motilität nach kurzer Zeit stagniert. Denkbar ist, dass Vps3 nicht mehr in der Lage ist Rab5 zu binden und daher auch keine Assoziation von Nma1 mit frühen Endosomen stattfindet. Bevor Rab Proteine von GEFs aktiviert werden können, werden diese in ihrer inaktiven Form an die Membranen gebunden (Soldati *et al.*, 1994). Da aber offensichtlich auch eine Aktivierung der Rab5-Proteine stattfindet, da die Entstehung der Endosomen nicht beeinträchtigt zu sein scheint, legt dies den Schluss nahe, dass ein weiterer Faktor die Funktion von Vps9 übernommen hat. In *S. cerevisiae* sind die GEFs für das Rab5-Homolog Vps21p die beiden Proteine Vps9p und Muk1p, in Säugerzellen findet sich eine höhere Zahl an individuellen GEFs für Rab GTPasen (Carney *et al.*, 2006). Untersuchungen zeigten, dass die Deletionen von *vps9p* und *muk1p* alleine keinen Einfluss auf die Lokalisierung von Vps3 und Vps8 auf Endosomen hatte, eine Doppeldeletion verhinderte diese hingegen (Cabrera *et al.*, 2013). Zusätzlich wurde in Hefe für Vps3 eine Rolle als GEF von Rab5 postuliert (Peplowska *et al.*, 2007). Es ist nicht ausgeschlossen, dass Vps3 für Vps9 einspringen kann. Man könnte vermuten, dass in *U. maydis* mehr als ein GEF für Rab5 vorhanden ist. Die BLASTp-Suche nach dem *S. cerevisiae* Muk1 im Genom von *U. maydis* ergab erneut das bereits als Vps9 identifizierte Protein UMAG_10209. GEFs für Rab5 enthalten eine konservierte Vps9-Domäne, die die Spezifität des Proteins festlegt (Carney *et al.*, 2006). In *U. maydis* konnte diese jedoch nur in Vps9 identifiziert werden. Nicht ausgeschlossen ist jedoch auch, dass beide Rab5-Homologe Rab5a und Rab5b (Fuchs *et al.*, 2006) an den Endosomen binden und Vps9 nur in der Lage ist die GEF-Reaktion für eines der beiden Proteine zu vermitteln.

3.2.3 Nma1 bewegt sich mit frühen Endosomen entlang von Mikrotubuli

Zur Charakterisierung der Mechanismen, die dem bidirektionalen Nma1-Transport zu Grunde liegen, wurden Deletionen der Motorproteine *kin3* und *kin1* durchgeführt, welche zu einem Verlust der Nma1-Motilität führten.

Trotzdem konnten in beiden Mutanten noch vereinzelt Nma1-Signale entlang von Mikrotubuli beobachtet werden. Die Expression eines Nma1-Fusionsproteins in *A. nidulans* ergab ebenfalls eine Lokalisierung entlang von Mikrotubuli, Bewegung von Nma1 konnte jedoch nicht festgestellt werden. Mikroskopische Untersuchungen gaben Hinweise auf eine gemeinsame Bewegung von Nma1 und dem Endosomen-Marker Rab5 entlang von Mikrotubuli. Mit Hilfe der Spinning Disk Mikroskopie konnte ein Co-Transport von Nma1 und Rab5-markierten frühen Endosomen gezeigt werden. Die Ermittlung der durchschnittlichen Nma1-Geschwindigkeiten konnte diese Theorie zusätzlich stützen. Für Yup1-markierte frühe Endosomen konnte eine durchschnittliche bidirektionale Geschwindigkeit von $3.1 \pm 0.3 \mu\text{m/s}$ ermittelt werden (Wedlich-Söldner *et al.*, 2000), die Geschwindigkeit von Nma1 in Sporidien lag bei ca. $2,83 \mu\text{m/s}$. Die Überexpression von Nma1 führte zu einer leicht erhöhten Geschwindigkeit. Die gesteigerte Geschwindigkeit könnte auf den veränderten Locus und eine veränderte Stärke der Genexpression zurückzuführen sein. Die Deletion von *rab5* führt zum Verlust der Nma1-Motilität (Schneider, 2016), was ebenfalls die Assoziation von Nma1 mit Endosomen zeigt. Die fluoreszente Markierung von Endosomen mit Rab5 ergibt gleichmäßig große punktförmige Signale, die sich entlang von Mikrotubuli bewegen. Im Gegensatz zu Rab5-Fusionsproteinen erscheinen Nma1-Strukturen oft eher langgezogen und ungleichmäßig groß. Diese kometenhafte Signalform konnte auch bei fluoreszenz-markierten Kin3 Motorproteinen festgestellt werden, das Phänomen wurde von den Autoren jedoch nicht diskutiert (Wedlich-Söldner *et al.*, 2002). Eine mögliche Erklärung wäre eine Akkumulation mehrerer Nma1-Moleküle, was sich in einer länglichen Struktur äußert. Ein Hefe-Zwei-Hybrid Test ergab, dass Nma1 nicht in der Lage ist mit sich selbst zu interagieren, aus diesem Grund müssten für eine Komplex-Bildung noch weitere Proteine involviert sein. Als andere Erklärung könnte die Größe des Fusionsproteins angeführt werden (Nma1: 1290 AS, 3x:GFP-tag 716 AS). Möglicherweise könnte auf Grund der Bewegung während der Bildaufnahme durch die Molekülgröße ein Artefakt entstehen. Die Laufgeschwindigkeit von Rab5-markierten frühen Endosomen war in $\Delta nma1$ -Sporidien und Hyphen nicht verändert, jedoch war eine Abnahme der motilen Partikel innerhalb der Zelle detektierbar (Schneider,

2016). Möglicherweise hat die Deletion von *nma1* einen Einfluss auf die Funktionalität des CORVET-Komplexes. Das Protein könnte eine stabilisierende Funktion auf den Komplex ausüben, was bei einer Deletion in einem Defekt der Membranfusion resultiert, demzufolge würden weniger Endosomen neu gebildet werden. Um diese Theorie zu bestätigen, muss die Co-Lokalisierung von Nma1 mit einem Vps3-Fusionsprotein an Endosomen gezeigt werden. Die Deletion von *vps3* weist im Gegensatz zu *nma1* jedoch starke morphologische Defekte auf (Schneider, 2016), was einen Hinweis darauf gibt, dass Nma1 in diesem Fall nicht mehr stabilisierend wirken kann oder die Komplexbildung stark beeinträchtigt wird.

3.2.4 Nma1 – ein MAP in *U. maydis*?

Der Transport von Nma1 erfolgt zusammen mit frühen Endosomen. Die direkte Interaktion von Nma1 mit Vps3 und die Co-IP mit weiteren CORVET-Proteinen zeigt die Assoziation von Nma1 mit drei Komponenten des CORVET-Komplexes (Abb. 49A). Denkbar ist eine Funktion als Stabilisator oder Adapterprotein, um den Kontakt zu Effektoren von CORVET herzustellen. Möglicherweise besetzt Nma1 auch die Bindestelle von Rab5, um unspezifische Bindung oder frühzeitige Reifung von Endosomen zu vermeiden. Da Vps8 nicht mit Vps3, Vps11 und Vps18 identifiziert werden konnte, könnte Nma1 auch in einem Subkomplex, der nicht den gesamten hexameren CORVET-Komplex umfasst, vorliegen. Alternativ könnte auch eine direkte Bindung von Nma1 an frühe Endosomen vorgeschlagen werden. (Abb. 49B). Bei der ersten Beschreibung von Nma1 konnte durch Sequenz-Vergleiche in Datenbanken eine Ähnlichkeit zu einem t-SNARE Protein identifiziert werden. Da das Ergebnis jedoch von geringer Relevanz war, wurde es nicht weiter verfolgt (Kellner, 2009, Pinter, 2015). Die für SNARE-Proteine konservierten helikalen Peptidketten sind in der Sequenz von Nma1 nicht angelegt, daher ist diese Theorie unwahrscheinlich. Es ist jedoch denkbar, dass Nma1 über weitere Mechanismen direkt an die Oberfläche von Endosomen gebunden werden kann und dort die Interaktion mit Vps3 stattfindet.

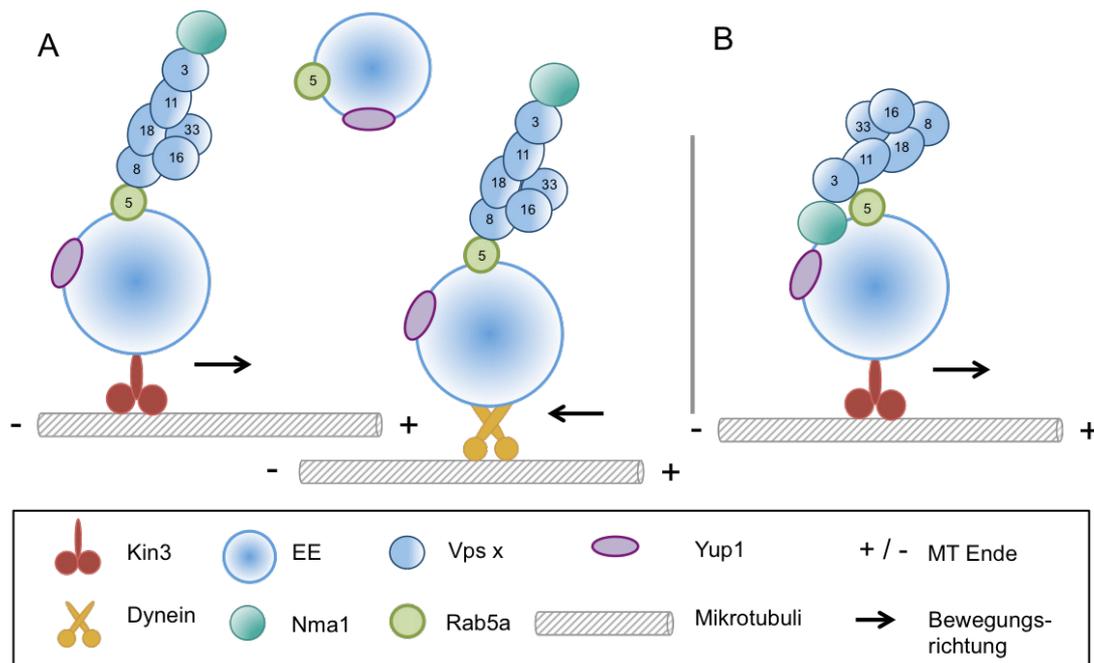


Abb. 49 Modell der Nma1-Bindung an frühe Endosomen (EE). Untersuchungen ergaben eine gemeinsame Bewegung von Nma1 und frühen Endosomen. Für die Bindung von Nma1 an die EE werden zwei mögliche Varianten vorgeschlagen. Für Nma1 konnte eine direkte Interaktion mit Vps3 gezeigt werden. (A) In Hefe wurde gezeigt, dass Vps3 und Vps8 in der Lage sind Rab5 zu binden (Balderhaar und Ungermann, 2013). Falls der Komplex in *U. maydis* die selben Funktionen ausführt, wäre eine Bindung von Nma1 über den CORVET-Komplex an das EE-Oberflächenprotein Rab5 denkbar. (B) Alternativ ist eine direkte Bindung von Nma1 an die Membran von Endosomen nicht ausgeschlossen. In diesem Fall würde das Protein auf der Oberfläche von EE sitzen und dort mit Vps3 interagieren. (A/B) Der CORVET-Komplex wurde analog zu dem aus Hefe dargestellt (Balderhaar und Ungermann, 2013).

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Nma1 gemeinsam mit frühen Endosomen entlang von Mikrotubuli co-transportiert wird. Zur genaueren Aufklärung dieses Prozesses wurden Motor-Mutanten, *rab5a*- und *vps3*-Deletionsstämme untersucht. In allen Deletionen wurde eine Störung der Nma1-Motilität beobachtet, die auf die Bindung an frühe Endosomen zurückzuführen ist. In $\Delta kin3$ -Zellen wurden Akkumulationen von Nma1 und EEs an den Minus-Enden der Mikrotubuli erwartet. Die untersuchten Zellen wiesen zytoplasmatische Nma1-Signale auf. Da in Interphasezellen die Mikrotubuli antiparallel angeordnet sind, müsste mit einem geeigneten Marker bestätigt werden, ob es sich um Mikrotubuli Minus-Enden handelt. In Kin1-defizienten Stämmen sind Kin3-Motoren zwar noch in der Lage Endosomen mit den Nma1-Proteinen an die Hyphenspitze zu transportieren, dort akkumulieren diese jedoch, weil kein Dynein für den retrograd gerichteten Rücktransport geliefert wird. Die mikroskopische Analyse bestätigte dieses

Phänomen, Nma1-Fusionsproteine akkumulierten in den beiden Polen der bipolaren Zellen. Die Deletion von *rab5a* in Filamenten führt zu einem Verlust der Motilität von frühen Endosomen und somit auch von Nma1 und einer Akkumulation der Proteine in den beiden Polen der Zelle (Schneider, 2016, diese Studie). Dieses Phänomen wurde auch in *U. maydis* nach Deletion des Endosomen-Markers *rab5a* und des Motorprotein Adapters *hok1* beobachtet. Frühe Endosomen, markiert mit dem t-SNARE Yup1, akkumulierten in den beiden Polen der bipolaren Zellen nach Deletion von *rab5a* (Bielska *et al.*, 2014a). Hok1 ist ein Adapter, der für die Bindung zwischen frühen Endosomen und den Motorproteinen Kin3 und Dynein verantwortlich ist (Bielska *et al.*, 2014b). Die *hok1*-Deletion führte analog zur *rab5a*-Deletion zu bipolarem Wachstum der Zellen und der Akkumulation von Rab5a-markierten Endosomen in den Zellpolen (Bielska *et al.*, 2014a). In beiden Mutanten konnte zusätzlich noch Signal im distalen Teil der Zelle festgestellt werden. Warum die markierten frühen Endosomen in den Zellpolen lokalisieren, wurde in den erwähnten Veröffentlichungen nicht diskutiert. Eventuell werden die in der Zellmitte verbliebenen Moleküle über einen anderen Mechanismus an die Mikrotubuli gebunden oder sind frei im Zytoplasma vorhanden. Die Frage ist offen, ob mehrere Endosomen-Populationen innerhalb der Zelle existieren und nur eine von der *rab5a*-Deletion betroffen ist. Möglicherweise wird die beobachtete Motilität in $\Delta rab5a$ -Zellen durch das zweite in der Zelle vorhandene Rab5-Homolog Rab5b vermittelt, das in diesem Fall einspringen kann (Bucci *et al.*, 1992, Fuchs *et al.*, 2006). Eine Färbung der Zellen mit FM4-64 oder eine Fusion von Rab5b könnte weitere Informationen darüber geben. In *A. nidulans* konnte gezeigt werden, dass RabB (Rab5b Homolog) für die Motilität von frühen Endosomen verantwortlich ist (Abenza *et al.*, 2010), eine Rolle von Rab5b beim Endosomentransport von *U. maydis* ist also nicht auszuschließen. Dies wird durch die Beobachtung unterstützt, dass $\Delta rabA \Delta rabB$ -Doppelmutanten in *A. nidulans* nicht lebensfähig sind, was mit dem Verlust der Bindung an den CORVET-Komplex erklärt werden könnte (Abenza *et al.*, 2010). Die Deletion von *vps8* in *A. nidulans* ergab kaum lebensfähige Zellen (Abenza *et al.*, 2010). In *U. maydis* konnten nach der Deletion von *vps3* schwere morphologische Defekte der Zellen festgestellt werden (Schneider, 2016) und die Aufhebung der Motilität von Endosomen

und Nma1. Die Beobachtung, dass eine CORVET-Komponente Einfluss auf den Endosomentransport ausübt ist eine neue Entdeckung. Man kann spekulieren, dass die Deletion von *vps3*, wie in Hefe für *Vps8* beobachtet (Peplowska *et al.*, 2007), dazu führt dass der CORVET-Komplex nicht mehr korrekt assembliert werden kann. Dadurch wäre er nicht mehr in der Lage seine Funktion auszuüben, was sich auf die Bildung von frühen Endosomen auswirkt.

Neben den motilen Nma1-Signalen wurden in allen untersuchten Deletionsstämmen noch zusätzliche stationäre Nma1-Signale entlang von Mikrotubuli beobachtet. In $\Delta kin3$ und $\Delta kin1$ -Zellen wurden vereinzelt stationäre Signale von Nma1 an den Mikrotubuli festgestellt, während in *rab5a*- und *vps3*-Mutanten teilweise nahezu die gesamten Mikrotubuli dekoriert waren. Diese Beobachtung schlägt neben der Transportfunktion eine zweite Funktion des Proteins vor. Die für Nma1 beobachteten Lokalisierungen legen eine Funktion als Mikrotubuli-assoziiertes Protein (MAP) nahe. Bisher konnte für Nma1 keine Tubulin-Bindedomäne identifiziert werden, aus diesem Grund muss man davon ausgehen, dass noch weitere Proteine involviert sein könnten und Nma1 als eine Art Adapter oder Scaffold-Protein fungiert. Die in *A. nidulans* beobachtete Nma1-Lokalisierung entlang von Mikrotubuli unterstützt die These, dass das Protein in der Lage ist am Zytoskelett zu binden. Bei der Identifikation der Vps-Proteine konnten keine weiteren Interaktoren von Nma1 identifiziert werden. Da Tubulin nicht identifiziert werden konnte, spricht dies entweder dafür, dass weitere Adapterproteine involviert sind oder die Bindung zwischen Nma1 und Tubulin sehr schwach oder transient ist. Die Möglichkeit transiente Interaktionspartner bei dieser Methode zu verlieren ist hoch, daher könnte eine Fixierung der Zellen vor einer Co-IP die Identifizierung weiterer Interaktionspartner eventuell vereinfachen. Die Gruppe der Mikrotubuli-assoziierten Proteine (MAPs) umfasst die Mikrotubuli-assoziierten Motorproteine und weitere Proteine, die die Nukleation, Dynamik und Quervernetzung von Mikrotubuli vermitteln. Diese vier Gruppen von MAPs führen zur Erstellung, Erhaltung und Disassemblierung des Mikrotubuli-Zytoskeletts (Alfaro-Aco und Petry, 2015). Eine Vielzahl dieser Proteine ist assoziiert mit Funktionen, die auch für Nma1 beobachtet werden konnten. Die EB1-Familie ist eine von Hefe bis Mensch

hoch konservierte Gruppe von Proteinen, die an Spindel-Mikrotubuli und bevorzugt an die Enden von zytoplasmatischen Mikrotubuli binden. Das EB1 Homolog Bim1p von *S. cerevisiae* ist wichtig für die Stabilität von Mikrotubuli und die Positionierung der Mitosespindel, indem astrale Mikrotubuli mit dem kortikalen Protein Kar9p in Kontakt treten (Tirnauer und Bierer, 2000). In *A. nidulans* konnte ein Kar9p Ortholog identifiziert werden, MigA, das auch bei der Positionierung der Mitosespindel eine Rolle spielt (Manck *et al.*, 2015). Peb1 ist das EB1-Homolog in *U. maydis*, es bindet jedoch ausschließlich an Mikrotubuli Plus-Enden und dekoriert nicht die gesamten Filamente (Schuchardt *et al.*, 2005). Eine WoLF PSORT Analyse ergab eine strukturelle Ähnlichkeit zwischen Nma1 und dem Protein ApsB aus *A. nidulans* (Pinter, 2015). ApsB lokalisiert an Spindelpolen, Septen und an Partikeln, die sich schnell entlang von Mikrotubuli bewegen. Die Deletion des Gens führte zu einem Defekt der Kernmigration innerhalb der Hyphe und einer Störung der zytoplasmatischen Mikrotubuli-Nukleation, während die Bildung der Mitosespindel ungestört ablief (Veith *et al.*, 2005a). AlpA in *A. nidulans* ist ein Mitglied der konservierten XMAP215/Dis1-Familie. Das Protein enthält eine konservierte TOG-Domäne, welche die Bindung an Tubulin ermöglicht (Al-Bassam *et al.*, 2006). Die Fusion des Proteins mit GFP ergab eine Lokalisierung an Spindelpolen und an Mikrotubuli Plus-Enden. Die Deletion des Gens hatte keinen Einfluss auf die Mitose und die Wanderung und Positionierung des Zellkerns, das polare Hyphenwachstum war jedoch beeinträchtigt (Enke *et al.*, 2007). Während der Teilung der Spindel konnte AlpA wie Nma1 zuerst an der gesamten kurzen Spindel beobachtet werden. Bei fortschreitender Elongation der Spindel war zunächst noch Signal im Bereich zwischen den sich auseinander bewegenden Polen feststellbar, dann nur noch an den Spindelpolen. Die Beobachtung von AlpA in der SMZ wurde als Assoziation des Proteins mit den Plus-Enden der Kinetochor-Mikrotubuli und als Kontaktstelle zu den Kinetochoren diskutiert (Enke *et al.*, 2007). Eine Akkumulation von Nma1 an den Plus-Enden der Spindel-Mikrotubuli wäre denkbar, dies würde zumindest die Nma1-Akkumulation in der SMZ erklären. Warum sich dieses Signal ab einer bestimmten Länge der Spindel verliert ist nicht klar. Die Beobachtung, dass Nma1 an der Mitosespindel unabhängig

von Kin3, Kin1 und Rab5 lokalisiert, unterstreicht die Möglichkeit einer direkten Bindung an Mikrotubuli und einer zweiten Funktion des Proteins.

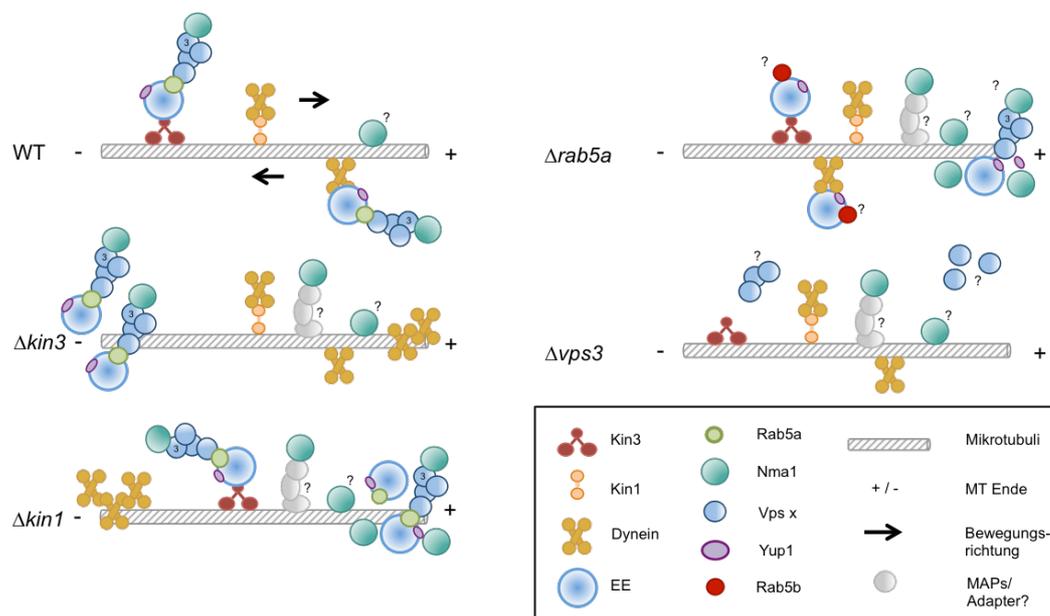


Abb. 50: Schematische Darstellung des Nma1-Transports. Nma1 bewegt sich mit frühen Endosomen (EE) bidirektional entlang von Mikrotubuli. Alle Deletionen resultierten in einem Verlust der Nma1-Motilität. In Wildtyp-Zellen wird der EE-Transport von den Motorproteinen Kin3 und Dynein vermittelt, Kin1 transportiert Dynein zum Minus-Ende der Mikrotubuli (MT). Die Deletion von *kin3* führte zu Akkumulationen von den EE-Komplexen an den Minus-Enden der MT. In *U. maydis* $\Delta kin3$ -Zellen konnten Nma1-Akkumulationen beobachtet werden. Die Deletion von *kin1* führt zu Akkumulationen der EE-Komplexe und dem Nma1-Signal an den Plus-Enden der MT. Auch die Deletion von *rab5a* verursacht eine EE-Akkumulation an den Plus-Enden von MT (Bielska et al., 2014). Ob Rab5b eine zusätzliche Rolle spielt ist bisher noch unklar. Die Deletion von *vps3* führte zum Verlust der Nma1-Motilität, dennoch waren die MT mit Nma1 dekoriert. Auch in den anderen Deletionsmutanten konnten immer zusätzliche Signale von Nma1 an Mikrotubuli festgestellt werden. Aus diesem Grund wird eine zweite Funktion von Nma1 vorgeschlagen. Diskutiert wurde eine Rolle als MAP, da in der Nma1-Sequenz keine Tubulin-Bindesequenz identifiziert werden konnte, wird eine Bindung über weitere Adapterproteine (markiert mit Fragezeichen) angenommen.

Generell kann man somit zwei unterschiedliche Funktionen von Nma1 postulieren: Nma1 wird entweder entlang von Mikrotubuli transportiert oder ist statisch an diese gebunden. Das Protein interagiert mit Vps3, einer Komponente des CORVET-Komplexes, welcher über Rab5 mit frühen Endosomen interagiert. Man kann spekulieren, dass die Funktionen von CORVET bezüglich der Membranfusion und Reifung von Endosomen in *U. maydis* den in Hefe bekannten Mechanismen ähneln. Da in Hefe jedoch kein Langstreckentransport von Endosomen entlang des Mikrotubuli-Zytoskeletts erfolgt, ist es wahrscheinlich, dass hier vom Hefe-Modell unabhängige und bisher unbeschriebene Mechanismen ablaufen. Vermutlich

bindet Nma1 während des filamentösen Hyphenwachstums zusammen mit dem Rab5-CORVET-Komplex an frühe Endosomen. Die Ergebnisse der Motor-Deletionen stützen diese Theorie. Nma1 könnte als Scaffold- oder Adapterprotein fungieren, welches den Komplex schützt oder stabilisiert. In *U. maydis* spielt der Langstreckentransport von Endosomen eine wichtige Rolle für die Polarität der Zelle. Eine Möglichkeit wäre der Schutz der Endosomen vor der Reifung während des Transports durch das Filament. Nma1 könnte beispielsweise die Rab5-Bindedomäne von Vps8 besetzen, um so Membranbindung und Fusion zu verhindern. Eine Möglichkeit wäre auch, dass nach Membranfusionen der CORVET-Komplex gezielt deassembliert wird und Nma1 den Subkomplex Vps3-Vps11-Vps18 zur Stabilisierung bindet. Denkbar wäre folgender Ablauf: Der vollständige hexamere CORVET-Komplex vermittelt die Entstehung neuer früher Endosomen. Da in der Literatur nur der Reifeprozess von frühen zu späten Endosomen im Zusammenhang mit Mikrotubuli abhängigem-Transport beschrieben wird (Huotari und Helenius, 2011), wird angenommen, dass die CORVET-vermittelte Reaktion in der Hyphenspitze abläuft. Frühe Endosomen werden danach auf Mikrotubuli verladen, um in das Zellinnere transportiert zu werden. Man könnte spekulieren, dass die CORVET-Proteine an den frühen Endosomen gebunden bleiben. Damit die Endosomen für den Transportweg geschützt sind vor weiteren Membran-Fusionsereignissen wird Vps8 aus dem Komplex entfernt. Der Komplex wird teilweise deassembliert und an den Endosomen bleiben nur noch Vps3, Vps11 und Vps18 haften. Nma1, welches inaktiv an Mikrotubuli gebunden in Depots vorliegt, wird nun rekrutiert, um den CORVET-Subkomplex zu binden und zu stabilisieren. Nma1 wird bis zum nächsten Fusionsereignis gebunden an den CORVET-Komplex von frühen Endosomen entlang von Mikrotubuli transportiert.

3.2.5 Nma1 und frühe Endosomen lokalisieren an den Spindelpolen

Nma1-Fusionsproteine werden während der Interphase als motile Partikel entlang von Mikrotubuli detektiert. In der G2-Phase kondensiert das Nma1-Signal in einem Punkt in der Nähe des Sprosshalses und wandert dann in die

Knospe der Tochterzelle ein. Die Co-Lokalisierung mit Tub2 zeigte, dass es sich um den Spindelpolkörper (SPK) handelt. Neben Nma1 und Tub2 konnte auch Tub1 in dieser Struktur beobachtet werden. Nach der Teilung der SPK wurde Nma1 zuerst zwischen den beiden Polen und wenig später auch an den astralen Mikrotubuli nachgewiesen. Diese Strukturen markierte Nma1 bis zur Auflösung der Spindeln am Ende der Mitosephase. Teilweise konnte auch eine Bindung an den Plus-Enden der astralen Mikrotubuli beobachtet werden. Zusätzlich war Nma1-Signal in der Mitte zwischen den beiden Spindeln (SMZ) nachweisbar, verschwand aber ab einer gewissen Größe. Die Deletionen der Motorproteine Kin1 und Kin3 sowie der Rab GTPase Rab5 hatte keinen Einfluss auf die Lokalisierung von Nma1 am Spindelpol und den astralen Mikrotubuli. Lediglich in den $\Delta kin3$ -Stämmen war nur ein sehr diffuses Nma1-Signal an den astralen Mikrotubuli erkennbar, während in den anderen Mutanten sowie im Wildtyp sehr deutliche Nma1-Akkumulationen festzustellen waren. Auch in den Mutanten konnten Nma1-Moleküle an den Plus-Enden der astralen Mikrotubuli festgestellt werden. Interessanterweise war in den untersuchten Mutanten der Langstreckentransport von Nma1 gestört, die Lokalisierung an der Spindel war jedoch nicht beeinträchtigt. Dies spricht ebenfalls für einen Mechanismus bei dem die Nma1-Proteine unabhängig von Motorproteinen und Rab5 an Mikrotubuli binden. Nma1 könnte direkt oder über weitere Adapter an Mikrotubuli gebunden sein, dies wäre auch eine Erklärung warum Nma1 während der Interphase- und Mitosephase mit Mikrotubuli assoziiert ist. Dies klärt jedoch nicht die Frage warum Nma1 während der Mitose nicht an allen drei Mikrotubuli-Typen bindet, sondern nur die Mitte der SMZ besetzt und die astralen Mikrotubuli dekoriert. Mikrotubuli werden oft posttranslational modifiziert (Song und Brady, 2015). Möglicherweise weisen astrale Mikrotubuli im Gegensatz zu polaren und Kinetochor-assoziierten Mikrotubuli andere Modifikationen auf, welche die Bindungspräferenz von Nma1 beeinflussen. Denkbar wäre, dass Nma1 während der Interphase auch nur bestimmte Mikrotubuli-Populationen bindet und gebunden an Tubulin-Moleküle zur Mitosespindel gelangt. Zur Spezifität der Nma1-Bindung an Mikrotubuli Plus-Enden kann zu diesem Stand der Untersuchungen jedoch noch keine Aussage getroffen werden, da in nur ca. 60% der ausgewerteten Wildtyp Zellen entsprechende Signale

gezählt werden konnten. Auch in Interphasezellen konnten manchmal Nma1-Moleküle an Mikrotubuli Plus-Enden festgestellt werden, diese Beobachtung wurde während dieser Studie nicht genauer untersucht (Abb. 19B). Für das Signal in der SMZ wäre die Assoziation mit Plus-Enden polarer oder Kinetochor-Mikrotubuli eine passende Erklärung. Zur experimentellen Überprüfung könnte eine Co-Lokalisierung von Nma1 mit einem Plus-End Bindeprotein wie zum Beispiel Peb1 durchgeführt werden (Schuchardt *et al.*, 2005). Eine weitere Möglichkeit wäre eine Assoziation von Nma1 mit Kin5-Motoren, die in der SMZ an polaren Mikrotubuli binden. Da an astralen Mikrotubuli aber auch eine Bindung von Nma1 an den Plus-Enden beobachtet werden konnte, erscheint die erste Theorie wahrscheinlicher.

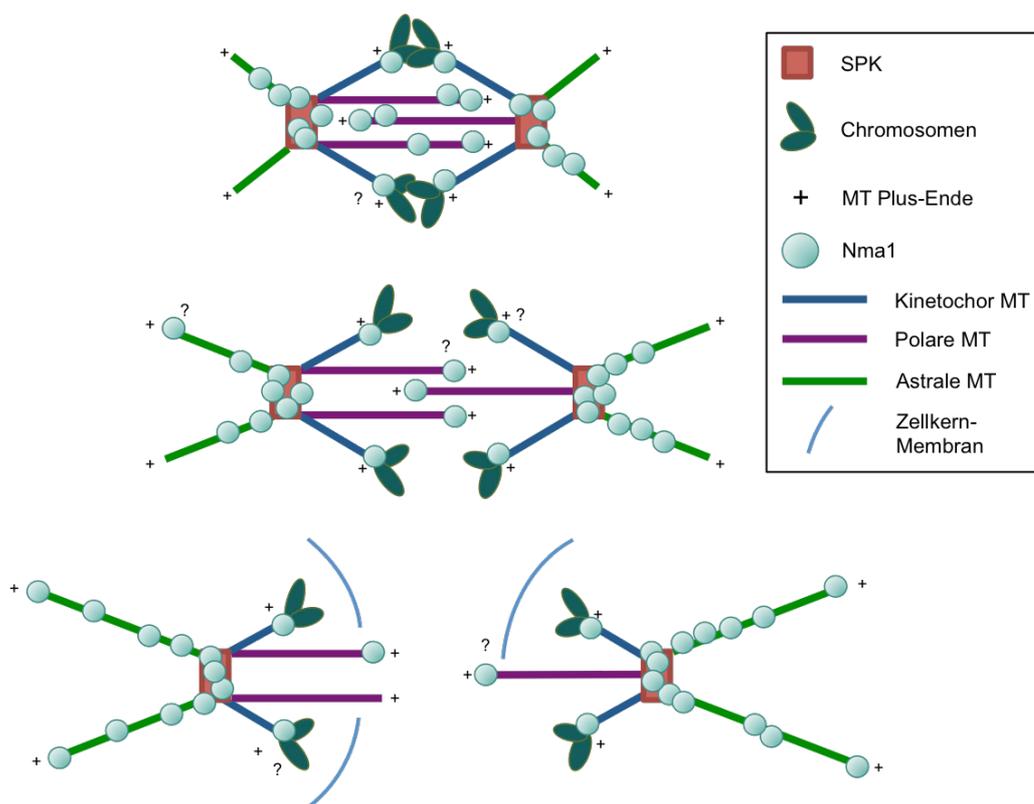


Abb. 51: Schematische Darstellung der Nma1-Lokalisierung an der Mitosespindel. Nma1 kondensiert in einem Punkt mit den Mikrotubuli und wandert von der Mutterzelle in die Knospe der Tochterzelle, wo sich der SPK teilt (nicht gezeigt). Beim Start der Elongation der Spindel sind der Mikrotubuli-Marker Tub1 und Nma1 zuerst als eine Linie sichtbar. Ab einer gewissen Länge der Spindel dekorieren Nma1-Moleküle die astralen Mikrotubuli und den Bereich zwischen den Spindelpolen (SMZ). Im späten Stadium der Mitose (angezeigt durch die wiederhergestellte Kernmembran) sind Nma1-Moleküle nur noch mit dem SPK und den astralen Mikrotubuli assoziiert. In den meisten Fällen wurde eine Lokalisierung von Nma1 an den Mikrotubuli Plus-Enden beobachtet. Die Fragezeichen markieren unbekannte Vorgänge. Modifiziert nach einem Modell aus (Steinberg, 2007b).

Mitglieder der Rab-Familie spielen eine wichtige Rolle bei Membrantransportvorgängen, zusätzlich wurde in den letzten Jahren eine weitere Funktion von während der Mitose beobachtet. Wenn der Zellzyklus in die Mitosephase übergeht, arretiert der intrazelluläre Transport und intrazelluläre Kompartimente werden disassembliert oder fragmentiert, um eine gleichmäßige Verteilung auf Mutter- und Tochterzelle gewährleisten zu können. Während dieser Studie konnte eine Lokalisierung von Rab5 und Yup1 an den Spindelpolen während der Mitose beobachtet werden. In der G2-Phase kondensierten die Mikrotubuli in einem Punkt, um gemeinsam mit dem Spindelpolkörper und den Chromosomen in die Knospe der Tochterzelle zu migrieren. In diesem Punkt konzentrierte sich auch das Rab5-Signal, während Yup1 noch in der gesamte Zelle verteilt war und sich bidirektional bewegte. Erst nach der Teilung der Spindelpole konnte eine klare Lokalisierung von Yup1 zusammen mit Rab5 an Strukturen an den Spindelpolen, an beiden Seiten der elongierten Mikrotubuli, detektiert werden. Da Untersuchungen von Rab5- und Yup1-markierten Endosomen bereits zeigten, dass kein kompletter Überlapp der Signale innerhalb der Zelle stattfindet (Fuchs *et al.*, 2006), ist es wahrscheinlich, dass es verschiedene Subpopulationen von frühen Endosomen gibt, welche nicht alle zum selben Zeitpunkt zum SPK rekrutiert werden. Die Beobachtung bidirektionaler Bewegung der Endosomen während der Mitose ist in diesem Fall ungewöhnlich, da die Mikrotubuli der Zelle komplett decondensieren, was die Beobachtung von Tub1-Markerproteinen aufzeigt. Die Überprüfung der Hypothese ist einfach mit einer FM4-64 Färbung der Zellen möglich, diese könnte zeigen ob noch frühe Endosomen durch die Zelle transportiert werden. Entlang welcher Strukturen der Transport erfolgen würde, ist bisher noch offen. Vielleicht werden nicht alle Mikrotubuli aufgelöst und einzelne Filamente bleiben während der Mitosephase bestehen. Weitere Informationen würde man durch eine Co-Lokalisierung von Rab5 und Yup1 erhalten. Welche Rolle die frühen Endosomen an der Mitosespindel von *U. maydis* spielen ist bisher noch unbekannt, da die Erforschung dieses Feldes erst am Anfang steht. Die Untersuchung von *A. nidulans* zeigte jedoch auch eine Lokalisierung von RabA an den Spindelpolen, was für einen konservierten Mechanismus spricht.

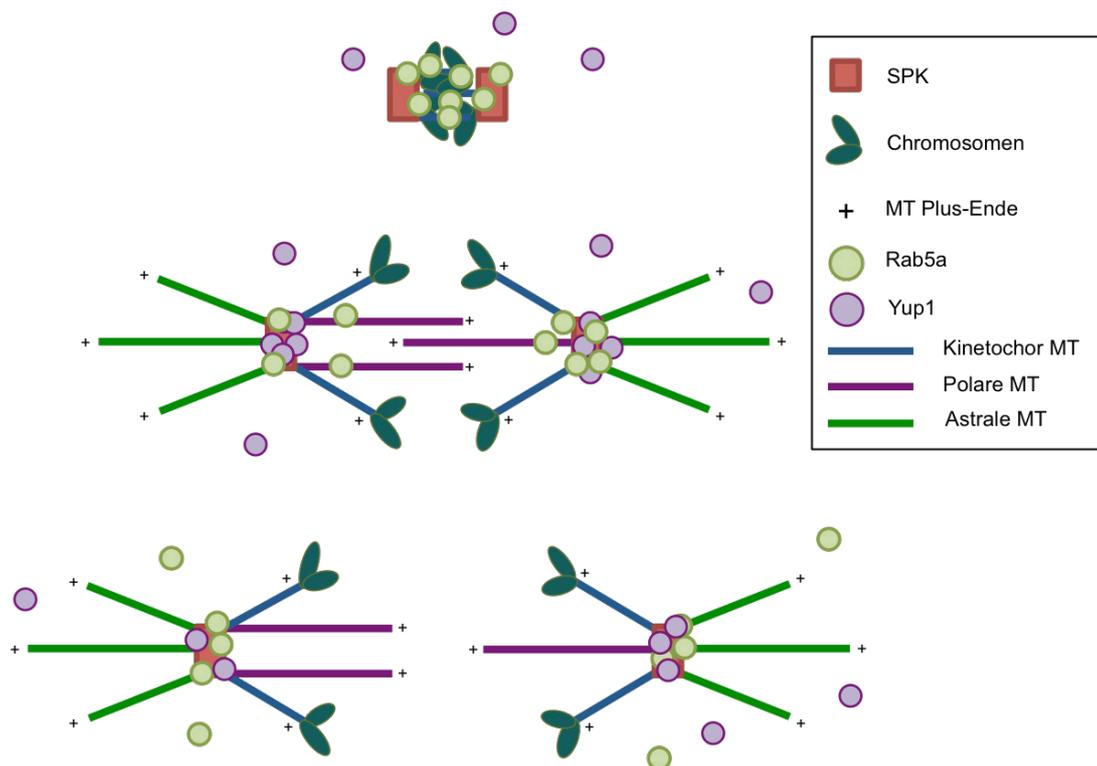


Abb. 52: Schematische Darstellung der Lokalisierung von frühen Endosomen an der Mitosespindel. Die Endosomen-Marker Rab5 und Yup1 wurden während der Mitose beobachtet. Rab5 kondensierte im selben Punkt wie Nma1 am SPK und kondensierten Mikrotubuli. Yup1 bewegte sich zu diesem Zeitpunkt noch bidirektional durch die Zelle. Während der Teilung der SPK lagerten sich Rab5 und Yup1 an die beiden Spindelpole an und blieben bis zum Ende der Mitose an diesen gebunden. Zusätzlich konnten noch freie Moleküle im Zytoplasma beobachtet werden. Es ist bisher nicht bekannt wie die Endosomen sich in der Zelle bewegen, da das Interphasen-Zytoskelett vor der Mitose aufgelöst wird.

Bislang ist zwar bekannt, dass Membrantransport eine Rolle während der Mitose spielt, jedoch nicht, dass auch Rab GTPasen in diesen Prozess involviert sind. Die ersten Hinweise darauf gaben Arbeiten in *C. elegans* (Skop *et al.*, 2001). Nur für wenige Rab-Proteine konnte eine klare Funktion gezeigt werden, wie RAB11, RAB35 und RAB21, die Signalmoleküle zur Teilungsfurche der Zelle transportieren (Miserey-Lenkei und Colombo, 2016). In *Drosophila* und humanen Zellen konnte eine Rolle von Rab5 während der frühen Mitose gezeigt werden. In Osteosarkoma-Zellen wurde eine Rab5-Akkumulation um die Spindelpole während der Prophase und der Telophase beobachtet. In *Drosophila* beobachtete man Rab5 assoziiert mit den Spindelpolen während der Meta- und Telophase und bei der Zytokinese akkumuliert um die neu gebildeten Kernhüllen (Capalbo *et al.*, 2011). Die Behandlung der Zellen mit einem Inhibitor der Bildung der astralen

Mikrotubuli, verhinderte eine solche Ansammlung von Molekülen (Serio *et al.*, 2011). Um die Rolle von Rab5 während der Mitose genauer zu untersuchen, wurden Knockdowns aller drei Rab5-Isoformen durchgeführt, was zu schwerwiegenden Fehlern in der Chromosomen-Ausrichtung während der Metaphase führte (Serio *et al.*, 2011), der selbe Effekt konnte auch in *Drosophila* Zellen beobachtet werden (Capalbo *et al.*, 2011). Dagegen hatte der individuelle Knockdown von RabA, -B und -C keine Auswirkung auf die Chromosomenverteilung (Serio *et al.*, 2011). Eine ähnliche Beobachtung wurde bei der Expression einer dominant-negativen Rab5 Mutante gemacht, die eine Affinität zu GDP aufwies, was darauf schließen lässt, dass die GTPase-Aktivität eine Rolle bei der Chromosomen-Verteilung spielt. Eine weitere Beobachtung war ein verspäteter Eintritt in die Anaphase (Serio *et al.*, 2011). Man geht davon aus dass der Transport von Rab5 gebunden an Endosomen zu den Spindelpolen von Dynein vermittelt wird (Capalbo *et al.*, 2011).

Co-Lokalisierungen von Nma1 und Rab5 zeigten, dass Nma1-Proteine sich gemeinsam mit frühen Endosomen an den SPKs sammeln und während der Mitose mit den Spindelpolen assoziiert bleiben. In den letzten Jahren konnte in vielen Studien gezeigt werden, dass Membrantransport eine wichtige Rolle an der Mitosespindel und für die nachfolgende Zellteilung spielen (Gnazzo und Skop, 2014). Des Weiteren wurden viele Proteine identifiziert, beispielsweise Rab11 oder Clathrine, die eine sogenannte zweite *moonlighting*-Funktion während der Mitose ausüben (Albertson *et al.*, 2005). Während der Interphase spielen Clathrine eine wichtige Rolle als Hüllproteine bei der Endozytose während der Mitose, stabilisieren sie jedoch Kinetochor-Mikrotubuli. Interessanterweise sind Clathrine sind nicht in der Lage direkt an Tubulin zu binden, sondern auf weitere Proteine angewiesen (Royle, 2013). Zur weiteren Untersuchung der Mechanismen in *U. maydis* müsste ein Stamm generiert werden, der neben einem Rab5-Marker auch ein Tub2- oder Mikrotubuli-Markerprotein enthält. Die Untersuchung von Rab5 während der Mitose ergab eine Lokalisierung an den Spindelpolen, was eine Assoziation von frühen Endosomen mit der Mitosespindel bedeutet. Es ist denkbar, dass die frühen Endosomen zur Spindel rekrutiert werden um die Neubildung der Zellkernmembran zu unterstützen. Im Gegensatz zu Nma1 wurde Rab5 nicht

an astralen Mikrotubuli beobachtet, was für eine direkte Bindung an astrale Mikrotubuli von Nma1 spricht. Analog zu den beschriebenen Untersuchungen könnte in *U. maydis* die Ausrichtung und Verteilung der Chromosomen von Rab5 moduliert werden. Die Untersuchung von markierten Chromosomen in einem *rab5*-Deletionshintergrund könnte darüber weiteren Aufschluss geben. Ebenso könnten die frühen Endosomen bei Assemblierungs-Prozessen der Kernmembran mitwirken, auch eine Rolle der Vererbung von Endosomen ist möglich (Lanzetti, 2012).

Bisher konnte noch keine Assoziation des CORVET-Komplexes mit der Mitosespindel gezeigt werden. Die Verbindung mit Nma1 und Rab5 macht einen Zusammenhang jedoch sehr wahrscheinlich. Die Zelle erfährt während der Teilung eine Umorganisation ihrer Struktur, dazu ist der gerichtete Transport von wichtigen Enzymen und Proteinen notwendig. Der CORVET-Komplex könnte daher auch während der Mitose Membranfusionen vermitteln. Eine Co-Lokalisierung mit den Markern Tub2 oder Tub1 mit Fusionsproteinen von Vps3 oder Vps8 könnte dazu weitere Informationen geben. Denkbar ist ein Mechanismus bei dem sich zu Beginn der Mitosephase Endosomen, an welche Nma1 und CORVET-Proteine binden, am SPK sammeln und mit diesem in die Knospe der Tochterzelle einwandern. Bei der Teilung des SPK bleiben die frühen Endosomen mit den beiden Spindelpolen assoziiert. Ab diesem Zeitpunkt wird eine zweite Nma1-Population sichtbar, welche in der Lage ist ohne die Bindung an Endosomen direkt an Mikrotubuli zu binden. Es ist nicht auszuschließen, dass die eventuell vorliegenden CORVET-Subkomplexe während der Mitose wieder komplett assemblieren und Nma1 dadurch freigegeben wird. Alternativ wird wie während der Interphase eine Stabilisierungsfunktion von Nma1 vorgeschlagen.

Für *U. maydis* konnte in dieser Arbeit erstmals eine Assoziation von frühen Endosomen mit dem SPK gezeigt werden. Es ist möglich, dass auch weitere Rab-Proteine eine Rolle während der Mitose spielen. In *C. elegans* konnte für Rab11 eine Rolle als Modulator der Mikrotubuli Dynamik während der Spindel Positionierung festgestellt werden (Zhang *et al.*, 2008) und in humanen Zellen wurde eine Assoziation von Rab11-markierten Recycling Endosomen mit der Mitosespindel beobachtet (Hehnly und Doxsey, 2014). In *A. nidulans* und im

Weizenpathogen *Zymoseptoria tritici* wurden für Rab11 bisher Funktionen als Marker für sekretorische Vesikel und des Spitzenkörpers mit apikaler Lokalisierung in der Hyphenspitze beschrieben (Pantazopoulou *et al.*, 2014, Penalva *et al.*, 2017, Guo *et al.*, 2015). Die apikale Lokalisierung wurde in einer vorhergehenden Studie auch für *U. maydis* bestätigt (Schneider, 2016). Die mikroskopische Analyse von Sporidien, die sich in der G2-Phase befanden, ergab keine Lokalisierung von Rab11 an SPK-ähnlichen Strukturen, ohne zusätzliche Tubulin-Markerproteine kann dazu jedoch keine weitere Aussage getroffen werden. Die Regulation der Zellteilung und allen involvierten Prozessen ist hoch komplex, daher kann man davon ausgehen, dass neben Rab5 noch weitere Endosomen-assoziierte Proteine wie Rab11 eine Rolle an der Spindel von *U. maydis* spielen.

4 Material und Methoden

Alle Protokolle und Methoden basieren auf der Methodensammlung der AG Kämper.

4.1 Material und Bezugsquellen

4.1.1 Chemikalien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien waren p.a. Qualität und wurden von den Firmen Ambion, Amersham, Carl-Roth, Difco, Du Pont, Fluka, Invitrogen, Jena Bioscience, Merck, New England Biolabs Riedel-de-Haen, Roche, Serva, Sigma-Aldrich, und bezogen. Für weitere Einzelheiten: siehe (Brachmann, 2001).

4.1.2 Enzyme und Proteine

Tabelle 4: In dieser Arbeit verwendete Antikörper, Enzyme, Proteine und Substrate

Name	Hersteller
Antarktische Phosphatase	New England Biolabs (NEB)
Anti-Digoxigenin-AP Fab fragments Antikörper	Roche
BSA (Bovin Serum Albumin) Lösung	NEB
CDP-Star	Roche
<i>E. coli</i> DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment)	NEB
Lysozym (aus Hühnerei)	Merck
Novozym 234	Novo Nordisc
Lysing Enzyme	Sigma
Phusion DNA-Polymerase	NEB
Q5 Polymerase	NEB
Restriktionsenzyme	NEB
Ribonuklease A (aus Rinderpansen)	Boehringer
T4 DNA-Ligase	NEB
Taq DNA-Polymerase	Eigene Herstellung

4.1.3 Verwendete Kits

In dieser Arbeit wurden die Kits JETSORB (Genomed) zur Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen und Qiaquick PCR Purification Kit (Qiagen) zur Aufreinigung von DNA-Fragmenten verwendet. Daneben wurden Roti-Prep Plasmid MINI Kit (Carl Roth) zur Isolierung und Aufreinigung von Plasmid-DNA aus *E. coli*, DIG High Prime Kit (Roche) zur

Herstellung Digoxigenin-markierter Sonden für Southern Analysen und das TOPO-TA Cloning Kit Dual Promoter (pCR2.1-TOPO, Invitrogen) zur Klonierung von DNA-Fragmenten verwendet. Zur qRT-PCR Analyse wurden das Turbo DNA-free Kit (Ambion) für die Aufreinigung von RNA, das RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fischer) und MesaGreen qPCR MasterMix für SYBR Assay Kit (Eurogentech) benutzt. Für Klonierungen im Gateway-System wurden die BP-Clonase und LR-Clonase-Enzym Mischungen (Invitrogen) verwendet.

4.1.4 Puffer und Lösungen

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

4.1.5 Medien und Lösungen

Tabelle 5: In dieser Arbeit verwendete Medien

Medien für die Kultivierung von *E. coli*

YT-Medium

(Sambrook *et al.*, 1989)

8 g Trypton

5 g Hefeextrakt

5 g NaCl

mit H₂O auf 1 l auffüllen und autoklavieren. Agar in Flasche vorlegen (13 g/l).

dYT-Medium

(Sambrook *et al.*, 1989)

16 g Trypton

10 g Hefeextrakt

5 g NaCl

mit H₂O auf 1 l auffüllen und autoklavieren

Salz-Lösung

(Holliday, 1974)

16 g KH₂PO₄

4 g Na₂SO₄

8 g KCl

2 g MgSO₄

1,32 g CaCl₂ x 2H₂O

Spurenelemente 8 ml

mit H₂O auf 1 l auffüllen und sterilfiltrieren

Spurenelement-Lösung

(Holliday, 1974)

60 mg H₃BO₃

140 mg MnCl₂ x 4H₂O

400 mg ZnCl₂

40 mg NaMoO₄ x 2 H₂O

100 mg FeCl₃ x 6 H₂O

250 mg CuSO₄

mit H₂O auf 1 l auffüllen und sterilfiltrieren

Material und Methoden

Medien für die Kultivierung von *U. maydis*

Array-Minimalmedium

(Scherer *et al.*, 2006)

62,5 ml Holliday Salz-Lösung

4,38 g L-Glutamin

Mit H₂O auf 1 l auffüllen, pH auf 7,0 einstellen und sterilfiltrieren. Immer frisch machen, ist sonst toxisch für die Zellen. Nach dem Autoklavieren 50% Glukose (1% f.c.) oder 25% Arabinose (1% f.c.) zugeben.

CM-Festmedium

(Banuett und Herskowitz, 1989); (Holliday, 1974)

2,5 g Casaminosäuren

0,5 g Heringssperma DNA

1 g Hefeextrakt

1,5 g NH₄NO₃

10 ml Vitamin-Lösung

62,5 ml Salz-Lösung

mit H₂O auf 1 l auffüllen, pH auf 7,0 mit NaOH einstellen, Agar in Flasche vorlegen (20 g/l), 5min autoklavieren. Nach dem Autoklavieren 50% Glukose (1% f.c.) oder 25% Arabinose (1% f.c.) zugeben.

CM-Flüssigmedium

(Banuett und Herskowitz, 1989; Holliday, 1974)

2,5 g Casaminosäuren

0,5 g Heringssperma DNA

1 g Hefeextrakt

1,5 g NH₄NO₃

10 ml Vitamin-Lösung

62,5 ml Salz-Lösung

mit H₂O auf 1 l auffüllen, pH auf 7,0 mit NaOH einstellen, 5min autoklavieren. Nach dem Autoklavieren 50% Glukose (1% f.c.) oder 25% Arabinose (1% f.c.) zugeben.

Vitamin-Lösung

(Holliday, 1974)

100 mg Thiamin

50 mg Riboflavin

50 mg Pyridoxin

200 mg Calciumpanthothenat

50 mg p-Aminobenzoesäure

200 mg Nikotinsäure

200 mg Cholinchlorid

1000 mg myo-Inositol

50 mg Folsäure

Mit H₂O auf 1 l auffüllen und sterilfiltrieren

NSY-Glyzerin (Einfriermedium)

8 g Nutrient Broth

1 g Hefeextrakt

5 g Saccharose

800 ml 87% Glyzerin

mit H₂O auf 1 l auffüllen und 5 min autoklavieren

Regenerationsagar^{light}

(Schulz *et al.*, 1990)

10 g Hefeextrakt

4 g Pepton aus Fleisch

4 g Saccharose

182,2 g Sorbitol

mit H₂O auf 1 l auffüllen. Agar in Flasche vorlegen (15 g/l), 5 min autoklavieren.

YEPS^{light}-Flüssigmedium

(Tsukuda *et al.*, 1989)

10 g Hefeextrakt

20 g Pepton auf Fleisch

20 g Saccharose

mit H₂O auf 1 l aufgefüllt und autoklaviert

Wenn nicht gesondert vermerkt, wurden alle Medien durch Autoklavieren sterilisiert. Zur Herstellung von Platten aus den angeführten Medien wurde 1.5 % Agar zugesetzt, für Aktivkohleplatten zusätzlich 10 g/l Aktivkohle. Zur Plasmidselektion werden nach dem Autoklavieren folgende Antibiotika zugesetzt: 200 µg/ml Hygromycin (*U. maydis*), 2 µg/ml Carboxin (*U. maydis*), 50 µg/ml Nourseothricin (clonNat) (*U. maydis*) oder 100 µg/ml Ampicillin, 40 µg/ml Kanamycin (*E. coli*).

Medien zur Kultivierung von *S. cerevisiae* und *A. nidulans* sind in den entsprechenden Kapiteln aufgeführt.

4.1.6 Stämme

***Escherichia coli*-Stämme**

Für sämtliche Klonierungen wurde der Stamm TOP10 (Invitrogen) verwendet, bei dem es sich um ein Derivat des *E.coli*-Stammes DH10B mit folgenden genetischen Markern handelt: F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 nupG recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(Str^R) endA1 λ-. Die Nomenklatur von *E. coli*- Stämmen richtet sich nach (Demerec *et al.*, 1966).

***Ustilago maydis*-Stämme**

Tabelle 6: Ausgangsstämme und verwendete Stämme von *U. maydis*

Stamm	Genotyp	Resistenz	Referenz
AB31	a2, P _{crG1} : bW2, P _{crG1} :bE1	Phleo ^R	(Brachmann <i>et al.</i> , 2001)
SG200	a1:mfa2 bE1, bW2	Phleo ^R	(Kämper <i>et al.</i> , 2006)
UKS70	a2, P _{crG1} : bW2, P _{crG1} :bE1, ip ^r [P _{otef} :mCherry:rab11:nosT]ip ^s	Phleo ^R , Cbx ^R	(Schneider, 2016)
UKS79	a2, P _{crG1} : bW2, P _{crG1} :bE1, num1:tdEos:hyg ^R , ip ^r [P _{otef} :GFP:rab5a]ip ^s	Phleo ^R , Hyg ^R , Cbx ^R	K. Schneider, unveröffentlicht
UNK10	a2, P _{crG1} : bW2, P _{crG1} :bE1, num1:3xeGFP:hyg ^R	Phleo ^R , Hyg ^R	(Kellner, 2009)
UNK108	a2, P _{crG1} : bW2, P _{crG1} :bE1, Δnum1::hyg ^R	Phleo ^R , Hyg ^R	(Kellner, 2012)
UNK119	a2, P _{crG1} : bW2, P _{crG1} :bE1, P _{otef} :mCherry:tub1	Phleo ^R , Cbx ^R	(Kellner, 2012)
UNK256	a2, P _{crG1} : bW2, P _{crG1} :bE1, Δnma1::nat ^R , P _{otef} :mCherry:tub1	Phleo ^R , Cbx ^R , Nat ^R	N. Kellner, unveröffentlicht
UNK262	a2, P _{crG1} : bW2, P _{crG1} :bE1, nma1:3xeGFP:hyg ^R , Δkin1::nat ^R	Phleo ^R , Hyg ^R , Nar ^R	N. Kellner, unveröffentlicht
UNK265	a2, P _{crG1} : bW2, P _{crG1} :bE1, nma1:3xeGFP:hyg ^R , tub2:RFP:nat ^R	Phleo ^R , Hyg ^R , Nar ^R	N. Kellner, unveröffentlicht
UNP1	a2, P _{crG1} : bW2, P _{crG1} :bE1, nma1:3xeGFP:hyg ^R	Phleo ^R , Hyg ^R , Nat ^R	(Pinter, 2012)
UNP2	a2, P _{crG1} : bW2, P _{crG1} :bE1, nma1:3xeGFP:hyg ^R , ip ^r [tub1:mCherry]ip ^s	Phleo ^R , Hyg ^R , Cbx ^R	(Pinter, 2012)

Material und Methoden

UNP3	<i>a2, P_{crG1}: bW2, P_{crG1}:bE1, nma1:3xeGFP:hyg^R, h1:mCherry:nat^R</i>	Phleo ^R , Hyg ^R , Nat ^R	(Pinter, 2015)
1075	<i>a2, P_{nar}bW2, P_{nar}bE1 /potef:rfp:tub1, /potef:yup1:egfp, cbxR, natR</i>	Phleo ^R , Cbx ^R , Nat ^R	(Lenz et al., 2006)

Die homologen Rekombinationsereignisse wurden in allen in dieser Arbeit hergestellten Stämmen, wenn nicht anders beschrieben, mittels Southern-Blot Analyse und/oder analytischer PCR verifiziert.

Tabelle 7: In dieser Arbeit hergestellte und verwendete *U. maydis* Stämme

Stamm	Genotyp	Resistenz	Ausgangsstamm
UTO70/71/72	<i>a2, P_{crG1}: bW2, P_{crG1}:bE1, num1:mEos2:hyg^R</i>	Phleo ^R , Hyg ^R	AB31
UTO82/83/84	<i>a2, P_{crG1}: bW2, P_{crG1}:bE1, ip^f[P_{hxt1}:um03539:gfp:nosT]ip^s</i>	Phleo ^R , Cbx ^R	AB31
UTO88/89/90	<i>a2, P_{crG1}: bW2, P_{crG1}:bE1, Δnum1::hyg^R, ip^f[P_{hxt1}:AN4244:gfp:nosT]ip^s</i>	Phleo ^R , Hyg ^R , Cbx ^R	UNK108
UTO91/92/93	<i>a2, P_{crG1}: bW2, P_{crG1}:bE1, Δnum1::hyg^R, ip^f[P_{hxt1}:um03539:gfp:nosT]ip^s</i>	Phleo ^R , Hyg ^R , Cbx ^R	UNK108
UTO94/95	<i>a2, P_{crG1}: bW2, P_{crG1}:bE1, Δnum1::hyg^R, ip^f[P_{hxt1}:AN4244:nosT]ip^s</i>	Phleo ^R , Hyg ^R , Cbx ^R	UNK108
UTO96/97/98	<i>a2, P_{crG1}: bW2, P_{crG1}:bE1, Δnum1::hyg^R, ip^f[P_{hxt1}:Num11-66:AN4244:nosT]ip^s</i>	Phleo ^R , Hyg ^R , Cbx ^R	UNK108
UTO99/100/101	<i>a2, P_{crG1}: bW2, P_{crG1}:bE1, Δnum1::hyg^R, ip^f[P_{hxt1}:Num11-66:AN4244:gfp:nosT]ips</i>	Phleo ^R , Hyg ^R , Cbx ^R	UNK108
UTO102/103/104/105	<i>a2, P_{crG1}: bW2, P_{crG1}:bE1, Δnum1::hyg^R, ipr[P_{hxt1}:num1:mEos2]ips</i>	Phleo ^R , Hyg ^R , Cbx ^R	UNK108
UTO106/107/108	<i>a2, P_{crG1}: bW2, P_{crG1}:bE1, num1:3xeGFP:hyg^R, h1:mCherry:nat^R</i>	Phleo ^R , Hyg ^R , Nat ^R	UNK10
UTO122	<i>a2, P_{crG1}: bW2, P_{crG1}:bE1, Δnum1::hyg^R, num1Δ8AS:3xgfp:nat^R</i>	Phleo ^R , Hyg ^R , Nat ^R	UNK108
UTO125/126	<i>a2, P_{crG1}: bW2, P_{crG1}:bE1, nup192:3xgfp:hyg^R</i>	Phleo ^R , Hyg ^R	AB31
UTO130/131/132/133/134	<i>a2, P_{crG1}: bW2, P_{crG1}:bE1, num1:tdEos:hyg^R</i>	Phleo ^R , Hyg ^R	AB31
UTO135/136/137	<i>a2, P_{crG1}: bW2, P_{crG1}:bE1, Δnma1::hyg^R</i>	Phleo ^R , Hyg ^R	AB31
UTO141/142/143	<i>a2, P_{crG1}: bW2, P_{crG1}:bE1, nma1:3xeGFP:hyg^R, ip^f[P_{otef}:tub1:mCherry]ip^s, Δkin3::nat^R</i>	Phleo ^R , Hyg ^R , Cbx ^R , Nat ^R	UNP2
UTO144/145/146	<i>a2, P_{crG1}: bW2, P_{crG1}:bE1, nma1:3xgfp:hyg^R, Δkin1:nat^R, ip^f[P_{otef}:tub1:mCherry]ip^s</i>	Phleo ^R , Hyg ^R , Cbx ^R , Nat ^R	UNK262
UTO147/148/149	<i>a2, P_{crG1}: bW2, P_{crG1}:bE1, nma1:3xgfp:hyg^R, ip^f[P_{tef}:cherry:rab5:nosT]ip^s</i>	Phleo ^R , Hyg ^R , Cbx ^R	UNP1
UTO154/155/156	<i>a2, P_{crG1}: bW2, P_{crG1}:bE1, nup192:3xgfp:hyg^R, nma1:mCherry:nat^R</i>	Phleo ^R , Hyg ^R , Nat ^R	UTO126
UTO162	<i>a2, P_{crG1}: bW2, P_{crG1}:bE1, num1Δ8AS:gfp:hyg^R</i>	Phleo ^R , Hyg ^R	AB31

UTO163/164/165	<i>a2, P_{crG1}: bW2, P_{crG1}:bE1, Δnma1:hyg^R, Phleo^R, Hyg^R, Cbx^R</i>	UTO135
	<i>ip^f[Potef:nma1:gfp:nosT]ip^s</i>	
UTO178/179/180/181	<i>a2, P_{crG1}: bW2, P_{crG1}:bE1,</i>	AB31
	<i>ip^f[Potef:num1_{2.ORF}:gfp:nosT]ip^s</i>	
UTO191/192/193	<i>a2, P_{crG1}: bW2, P_{crG1}:bE1, num1:tdEos:hyg^R,</i>	UTO133
	<i>ip^f[Potef:GFP:Tub1]ip^s</i>	
UTO194/195/196	<i>a2, P_{crG1}: bW2, P_{crG1}:bE1, Δnma1:hyg^R,</i>	UTO135
	<i>h1:mCherry:nat^R</i>	
UTO200/201/202/203/204	<i>a2, P_{crG1}: bW2, P_{crG1}:bE1, nma1:3xgfp:hyg^R,</i>	UTO148
	<i>ip^f[Ptef:cherry:rab5:nosT]ip^s, vps9::nat^R</i>	
UTO205/206/207	<i>a2, P_{crG1}: bW2, P_{crG1}:bE1, nma1:3xgfp:hyg^R,</i>	UTO148
	<i>ip^f[Ptef:cherry:rab5:nosT]ip^s, vps3::nat^R</i>	
UTO208/209/210	<i>a2, P_{crG1}: bW2, P_{crG1}:bE1, nma1:3xgfp:hyg^R,</i>	UNP2
	<i>ip^f[Potef:mCherry:tub1:nosT]ip^s, rab5a::nat^R</i>	Nat^R
UTO217/218/219	<i>a2, P_{crG1}: bW2, P_{crG1}:bE1, h1:mCherry:nat^R</i>	AB31
UTO221/222/223	<i>a2, P_{crG1}: bW2, P_{crG1}:bE1, num1:tdEos:hyg^R,</i>	UTO133
	<i>Δkin3::nat^R</i>	
UTO224/225	<i>a2, P_{crG1}: bW2, P_{crG1}:bE1, num1:tdEos:hyg^R,</i>	UTO133
	<i>Δkin1::nat^R</i>	

A. nidulans-Stämme

Tabelle 8: In dieser Arbeit hergestellte und verwendete *A. nidulans* Stämme

Stamm	Genotyp	Ausgangsstamm
TN02A3	<i>pyrG89; argB2; pyroA4, nkuA::argB,</i>	(Nayak et al., 2006)
UTO160/161	<i>pyrG89; argB2; pyroA4, nkuA::argB, alcA(P)::sgfp::AN4244, pyr4</i>	TN02A3
UTO229	<i>pyrG89; argB2; pyroA4, nkuA::argB, alcA(P)::sgfp::nma1, pyr4,</i> <i>alcA(p)::mcherry::rabA, ptrA</i>	TN02A3

Die korrekte Integration der Konstrukte wurde nicht über Southern Blot Analyse überprüft.

4.1.8 Nukleinsäuren, Oligonukleotide und Plasmide

Nukleinsäuren

Für die Herstellung von CM-Medium (siehe 4.1.6) wurde Herings-Sperma DNA (Sigma) verwendet. Als DNA-Größenstandard für die Agarose-Gelelektrophorese wurde der GeneRuler DNA Ladder Mix (Fermentas) verwendet. Für PCR-Reaktionen wurden dATP, dTTP, dCTP und dGTP (Jena Bioscience) eingesetzt. Für die Markierung Digoxigenin-markierter Sonden für Southern Blot-Analysen wurden Digoxigeninmarkierte dUTPs (Jena Bioscience) verwendet.

Material und Methoden

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

Oligonukleotide

Alle in dieser Studie verwendeten Oligonukleotide wurden über die Firma MWG Eurofins bezogen.

Tabelle 9: In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide

Bezeichnung	Nukleotidsequenz (5' – 3')
C-terminale Fusionen	
Num1 Fusion	
01682GFP_LB_se	CCAATTCTTAACGGCCGAAAAGAC
01682GFP_LB_as	GTGGGCCGCGTTGGCCCGCTCCAACAGGCTCAACTC
01682GFP_RB_Sfi	CACGGCCTGAGTGGCCTAGGCAGTGATGCGGTTTCAT
01682GFP_RB_as	GACGGCATCGTTGCGTTGGAAG
Nma1-Fusion	
um00933fusion_LB_s	GGCGCAGGGCGACCTGAAGAGG
um00933fusion_LB_as	GGCCGCGTTGGCCCGAGCTGCAGCAGCGCTGGC
um00933fusion_RB_s	GGCCTGAGTGGCCTCTTTTGTCTTGAACGATCAGGAAC
um00933fusion_RB_as	CATATTCTACCACCGGCCATTC
Nup192-Fusion	
Nup192_fus_LB_se	GCTTGCTCCCTACCACACTG
Nup192_fus_LB_as	GTGggccgcggtggccgcTTGCTCGGTAAAGAAGCTAGCC
Nup192_fus_RB_se	CACggcctgagtgccCATCACCTTAGTCGTCCGATTGG
Nup192_fus_RB_as	CCAACAAGACGATGCCGACG
Deletionen	
$\Delta nma1$	
um00933_LB_s	CGCTCATTATGAAGTCGATCATCG
um00933_LB_as	gttggccatctaggccCTTGACTAGTTCGTAAACCTGGATCTTG
um00933_RB_s	gttggcctgagtgccTCTTTTGTCTTGAACGATCAGGAAC
um00933_RB_as	CGAATATGCTATCTTTGCACAGCC
um00933_nes_s	GAGGTGCTTCCCAAGGACTCGATC
um00933_nes_as	GATTCTGCCTCGCCTGAACCTTTC
um00933_ORF_s	CAGTGACCCCAACGAGTCAGCTCT
um00933_ORF_as	CTTTGGAGTACCGGTAGCACGAGC
$\Delta kin1$	
Kin1_LB_se	GTGTGCTTTGTGGAGGAAGTCCGAC
Kin1_LB_as	gttggccatctaggccGACGACTTGGCGGTGTAAGTGTGC
Kin1_RB_se	gttggcctgagtgccCGTGGAAAGATCTATACGTTTCACCTT
Kin1fusion_RB_as	GCAATCTCAAGCGTCGCTATGA
Kin1_nested_se	CCCCTCGACTCTGTGCCTTGTGAC
Kin1_nested_as	CCAACACGGCTGCTTCCATTTCC
Kin1_ORF_se	ATGTCCAACAACATCAAGGTCGTC
Kin1_ORF_as	CGAACTCAAAGACGTGCGGTTG
$\Delta kin3$	
Kin3_LB_se_new	GAACTGCTCCAAAACCTCGTGACTCG
Kin3_LB_as_new	CATggccatctaggccGATGGCGGAGCTCTATGGAGGT
Kin3_RB_se	CATggcctgagtgcc ATTCTAGAAGGCGTCATGGCCAAA
Kin3_RB_as	ACGAATACGCTCGTGGCTAGGT
Kin3_ne_se	AGCTTCCAACATGCGCAGTCC
Kin3_ne_as	TGATCGCATCTAGTGCCGATGC8
Kin3_ORF_se	TCCGTTATGCCGATCAGGCCA
Kin3_ORF_as	GATGGGGCAGTTTCTTGGGCG

Δvps9	
Vps9_LB_se	TCCAGTTCACTGGTGTGTGAGT
Vps9_LB_as	caGGCCATCTAGGCCGATAGCCTGCGAATGATCTCTAGGTGC
Vps9_RB_se	caGGCCTGAGTGGCCCAGCGCCTGGTGTGGTATTG
Vps9_RB_as	CCGCGAGTGTGTGCGATAGTC
Vps9_ORF_se	GCAGCAAGGCACAGGCTG
Vps9_ORF_as	CAATGCGGATGCCGCCAC
Δvps11	
Vps11_LB_se	CACCGTGCTGAAAGGATCTAGACATTG
Vps11_LB_as	caGGCCATCTAGGCCGGCGGTATCGTTGAAGATGCTCGAA
Vps11_RB_se	caGGCCTGAGTGGCCTCCGAGATGGTTGCCATGCCAG
Vps11_RB_as	CGTGCCGATCGAACTCGGTGA
Vps11_ORF_se	ATCGGCAATGTCTTGACGAGA
Vps11_ORF_as	GGTCTCGGACAGCTGTAAGCC
Δvps3	
LB_nest_se	TCGTGGATCGTAGTTAGTGGCTCGT
LB_as3	GGCAGCTTGGGCGCTTCTTTGGCCTAGATGGCCTG
LB_se2 (nested)	TGACGGCCATCTGCTCGTTG
RB_se	CAGGCCTGAGTGGCCATCGCTCACGGCGTGGAGTATG
RB_as	GCACGAGTGTGCTGACTTGCA
RB_nest_as	CAGGGCTGTGTGCTGTCTCCTC
Δrab5a	
KO_Rab5_LB_for	GCCGT AGAAGGACTGCTTGG
Rab5_ODA150_rev	GTGGGCCATCTAGGCCAGGCCGGAAGTGCATCTC
Rab5_ODA149_for	CACGGCCTGAGTGGCCGACCAGACGCTTTTCGGG
Rab5_ODA148_rev	GCACGGTGATCACGCCT
Ektopische Integrationen	
Nma1	
Nma1_GW_for	ggggacaagttgtacaaaaaagcaggctATGTCCGACCCCAGTGACCCCA
Nma1_GW_rev	ggggaccactttgtacaagaaagctgggtgAGCTGCAGCAGCGCTGGC
UMAG_03539	
03539_GW_Ncol_se	catCCATGGATCAGTGAAGAAATTCACCAG
03539_GW_NotI_as	catGCGGCCGCACCACGCGAGAGACGGTAAT
AN4244	
AN4244_Ncol_se	catCCATGGGCCCTTTGGTCGATGAATCTCAC
AN4244_NotI_as	catGCGGCCGCTTACCGTGCCTGTTGCTGAG
AN4244_fu_NotI_as	catGCGGCCGCCCGTGCCTGTTGCTGAGC
N-Terminus+AN4244	
NumNterm_se	TGGTTAGGCTTATTGCAGGCC
NumNterm_fus_as	GATTCATCGACCAAAGGCATAGTAGGTGCCAGTTCGACAG
AN4244_Nfus_se	GCTGTGCGAACTGGCACCTACTATGCCTTTGGTCGATGAATCTCAC
AN4244_Nfus_as	AAGCTGACCAGAGCGTAGAG
Nterm_Ncol_se	GTTCCATGGCGAGAGCACGAGGTG
AN4244_NotI_as	GTTGCGGCCGCTTACCGTGCCTGTTGCTGAG
AN4244_fus_as	catGCGGCCGCcCCGTGCCTGTTGCTGAGCA
Num1 Δ8AS	
Num1_813_rev (Stop)	catGGCCGCGTTGGCCGCGAGCTTCCGCTTCTTACTTTTCAG
Num1_813_rev_new	catGGCCGCGTTGGCCGCGAGCTTCCGCTTCTTACTTTTCAG
Num1_fus_ne_for	CAGTCGTGAGTTACGACTTCCTCGT
Num1_fus_ne_rev	GCTGGGCAACTATTCGACGTCCTG
Num1 2. ORF	
Num1_ORF2_Ncol	catCCATGGCTCCCATCTCTTCCACATCATC
Num1_NotI_rev	gttGCGGCCGCTCCAACAGGCTCAACTCTGTCT
Num1-St-GFP_NotI	gttgcgggccgcaattctcatgtttgacagcttatcatcgg
Num1_Stop_rev_NotI	catGCGGCCGCcTAGAGCTTCCGCTTCTTACTTTTCAGC
mEos2	
mEos2_mut_for	CAACGACATCACGATGGAGGGCGAC
mEos2_mut_rev	GTCGCCCTCCATCGTGATGTGCTTG
mEos2_Ncol_for	catccatggcgccatcaagcccga
mEos2_NotI_rev	gttGCGGCCGCTtagcgacgagcgtgtcgg

Num1_Ncol_for	catCCATGGCGAGAGCACGAGGTGG
Num1_Ncol_rev	catCCATGGTCTCCAACAGGCTCAACTCTGTCTC
mEos/tdEos	
eosfor1	GCTTCACGGTCTCCcatggggccatcaagccc
eosrev1	GCTTCACGGTCTCGACCgcgacgagcgttgctggg
eosfor2	GCTTCACGGTCTCCcGGTCACGGCACCGGCTCGACCGGCT
	CGGGCTCGTCGATGGGCgcatcaagccc
eosrev2	GCTTCACGGTCTCGggccgcttagcgacgagcgtgtgc
eosmut1	CGCTTCACGGCACCAACTTCCCCGC
eosmut2	GCGGGGAAGTTGGTGCCGTGGAAGCG
eosfor_sfi	GTTGGCCAACGCGGCCATGGGCGCCATCAAGCC
eosrev_asc	GGCGCGCCGTTGCGGCCGCTTAGCGACGA
pEX_for	GGAGCAGACAAGCCCGTCAGG
pEX_rev	CAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGC
Hefe-Zwei-Hybrid Primer	Nma1/ CORVET Komplex
Vps3_Y2H_se	GGCCATTACGGCC ATGGGTTTCGCAGGAGCCGG
Vps3_Y2H_as	GGCCGAGGCGGCC CTAGGTCAAGTCGTAACCACCGTCC
Vps11_Y2H_se	GGCCATTACGGCCATGCCCCACCAAGCGGG
Vps11_Y2H_as	GGCCGAGGCGGCC TTACATCTCAACCGCATGAGCAACACC
Vps18_Y2H_se	GGCCATTACGGCC ATGTTTGACGACTTTGTTTCAGAGCTCT
Vps18_Y2H_as	GGCCGAGGCGGCC CTACAGTGCCCACTCGTCTGC
Num1/Kin1 Interaktion	
Num1_Y2H_for	GTGGGCCATTACGGCCATGGCGAGAGCACGAGGTGG
Num1_Y2H_Nrev1	ATAGGCCGAGGCGGCCCGAAGGCCAGGCTGCAGT
Num1_Y2H_Nrev2	ATAGGCCGAGGCGGCCGATGGGAGACATGGACGCTTGT
Num1_Y2H_Nrev3	ATAGGCCGAGGCGGCCCTTGCCAGAAGCAACACGTTCC
Num1_Y2H_Cfor1	GTGGGCCATTACGGCCCGTTCGCGTGTCTGATGCTTTA
Num1_Y2H_Cfor2	GTGGGCCATTACGGCCTCGCGTCTTCCGCCGGTATACG
Num1_Y2H_Cfor3	GTGGGCCATTACGGCCGGCCAACCGTCAACACATAACC
Num1_Y2H_rev	ATAGGCCGAGGCGGCCCTACTCCAACAGGCTCAACTCTGT
Kin1_Y2H_for	GTGGGCCATTACGGCCATGTCCAACAACATCAAGGTCGT
Kin1_Y2H_rev	ATAGGCCGAGGCGGCCCTCACTTGGACGAAAAGAACCAGC
Kin1_Y2H_1.8for	GTGGGCCATTACGGCCATTGCCAATCTTGAAGCCGAG
Kin1_Y2H_1for	GTGGGCCATTACGGCCGCTACGCTCGAGGCTGAGTACG
Kin1_Y2H_1.0for	GTGGGCCATTACGGCCAACGAGCTACTGCATCAAAGGC
Kin1_Y2H_1.1for	GTGGGCCATTACGGCCGCCCTCTCTGCTGACGATCT
Kin1_Y2H_1.2for	GTGGGCCATTACGGCCATGATGGCCGACTTCAACCA
Kin1_Y2H_1.3for	GTGGGCCATTACGGCCCTTGAGGAGCTGCGCAAGTC
Kin1_Y2H_1.4for	GTGGGCCATTACGGCCGAGATCAAGCTTCAACTCGAGCG
Kin1_Y2H_1.6for	GTGGGCCATTACGGCCGCCGTCTCCATCGACAAGGA
A. nidulans Vektoren	
AN4244	
AN4244_AscI_for	caGGCGCGCCTATGCCTTTGGTTCGATGAATCTCAGC
AN4244_PacI_rev	caTTAATTAATTACCGTGCCTGTTGCTGAGC
Nma1	
Nma1_Asc1	caGGCGCGCCTATGTCCGACCCCAGTGACCC
Nma1_Pac1	caTTAATTAATCTCGCCAAGGACGCAGTCG
Sequenzierprimer	
p123_ORF_GFP_rev	ctgaactgtggccggttacgtcg
hhn3	AACTCGCTGGTAGTTACCAC
hhn5	ACTAGATCCGATGATAAGCTG
Nat4 (gap1-Promotor_rev)	GAAGTCGACTCTATGGACTGATCTG
M13_for	GTA AAAACGACGGCCAG
M13_rev	CAGGAAACAGCTATGAC
mEos-pUMa_seq1_se	TGACCATGATTACGCCAAGCTC
mEos_seq2_se	CGAAGCAGCATCTCTGTCTGA
Vps3_seq1	CAGGCTCCATCACGTTGGGC
Vps3_seq2	GTCGCCAGCCAGGATACCA
Vps11_seq1	CAATGTCTTGACGAGACCGACA
Vps11_seq2	AGCTGGATGTGCTGTATCGCA

Vps11_seq3	ACTGCTCTCGTTGAGCCGT
Vps11_seq4	TCTCATCCACGCTCACGTCG
Vps18_seq1	TCTGCTGGGCACAAGATCAGG
Vps18_seq2	TCTTCGCGATGAGGACCGTC
Vps18_seq3	ACTGCTACGCTTCATCGACGA
Vps18_seq4	GAGTTTCGGCGCTAGCAAATATGG
pGBKT7_seq	actcactatagggcgagccg
Efimov-seq1	CGAAAAGAGAGACCACATGGTCCT
Nma1-seq2	GCAGCCAGATCATCCACAGC
Nma1-seq3	CTGCACACAGCAAGATTGACGAC
Nma1-seq4	AGCTAACGCCAAACATGCTGAAC

Plasmide

Tabelle 10: In dieser Arbeit verwendete Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Resistenz	Referenz
pBF18	<i>h1:mCherry:nat^R</i> , TOPO-Vektor enthält Konstrukt zur C-terminalen Fusion des Histons H1 <i>in locus</i>	Amp ^R , Nat ^R	B. Faist, pers. Mitteilung
pBL4	p123-Derivat, Enthält das <i>tdEos</i> -Gen unter der Kontrolle des <i>Potef</i> -Promotors und des <i>nosT</i> -Terminators für die homologe Integration in den <i>ip</i> -Locus.	Amp ^R	(Lotz, 2015)
pBL5	p123-Derivat, Enthält das <i>mEos</i> -Gen unter der Kontrolle des <i>Potef</i> -Promotors und des <i>nosT</i> -Terminators für die homologe Integration in den <i>ip</i> -Locus.	Amp ^R	(Lotz, 2015)
pBL11	<i>num1:tdEos:hyg^R</i> , pTO8-Derivat, enthält <i>tdEos:hyg^R</i>	Amp ^R , Hyg ^R	(Lotz, 2015)
pCMB17apx	<i>alcA(p)::gfp</i> , for N-terminal tagging of GFP to proteins of interest; contains <i>Neurospora crassa</i>	<i>pyr4</i>	(Efimov <i>et al.</i> , 2006)
pCR2.1	Vektor zur Klonierung von PCR-Produkten mittels Topoisomerase-Aktivität	Amp ^R , Kan ^R	Invitrogen
pDESTpHxt:eGFP	pHxt1:eGFP-Derivat, das die zwischen <i>hxt1</i> -Promotor und <i>egfp</i> inserierte GATEWAY®-Leserahmen-Kassette B enthält.	Amp ^R , Cm, Cbx ^R	R. Wahl/ D. Schuler pers. Mitteilung
pDONR221	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 Kanamycin-Resistenzkassette sowie eine GATEWAY®-Klonierungskassette mit Chloramphenicol-Resistenzkassette und <i>ccdB</i> -Selbstmordgen.	Kan ^R	Invitrogen
pENTRY-CFP (pDS18)	„Entry-Vektor“ aus einer GATEWAY®-BP <i>in vitro</i> -Klonierung mit dem Vektor pDONR221 und eines PCR-Produkts das mit den Primern FP_NcoI_GW_f und FP_NotI_GW_r von p123- CFP amplifiziert wurde.	Kan ^R	(Schuler, 2013)
pGBKT7	HefeZwei-Hybrid (Y2H)-Ködervektor	Kan ^R	Clontech
pGAD-DS	Y2H-Beutevektor	Amp ^R	Clontech
pGBKT7-p53	Y2H Kontroll-Vektor	Kan ^R	Clontech
pGBKT7-lamC	Y2H Kontroll-Vektor	Kan ^R	Clontech
pGADT7-T	Y2H Kontroll-Vektor	Amp ^R	Clontech
pKS4	<i>vps3::nat^R</i> , Konstrukt zur Deletion von <i>vps3</i> in TOPO	Amp ^R , Nat ^R	(Schneider, 2016)
pKS7	<i>rab5a::nat^R</i> , Konstrukt zur Deletion von <i>rab5a</i> in TOPO	Amp ^R , Nat ^R	(Schneider, 2016)

Material und Methoden

pNK3	$P_{crg1}:num1:gfp$, pRU11-Derivat für die C-terminale Num1:eGFP-Fusion unter Kontrolle des induzierbaren P_{crg1} -Promotors, Integration in den <i>ip</i> -Locus	Amp ^R , Cbx ^R	(Kellner <i>et al.</i> , 2014)
pNK24	$num1:3xha:hyg^R$, TOPO-Vektor enthält Konstrukt zur C-terminalen Fusion von Nma1 <i>in locus</i>	Amp ^R , Hyg ^R	
pNK51	pGBKT7-num1 ₁₋₁₉₇ , Y2H Ködervektor, enthält eine num1-Verkürzung angeben in AS	Kan ^R	(Kellner, 2012)
pNK52	pGBKT7-num1 ₁₋₁₄₇ , Y2H Ködervektor, enthält eine num1-Verkürzung angeben in AS	Kan ^R	(Kellner, 2012)
pNK53	pGBKT7-num1 ₁₋₆₆ , Y2H Ködervektor, enthält eine num1-Verkürzung angeben in AS	Kan ^R	(Kellner, 2012)
pNK54	pGBKT7-num1ΔNterm, Y2H Ködervektor, <i>num1</i> ohne die AS 1-66	Kan ^R	(Kellner, 2012)
Num1^{full}	pGBKT7-num1, Vollängen Num1 in Y2H-Ködervektor	Kan ^R	(Kellner, 2009)
pNP1	$nma1:3xgfp:hyg^R$, TOPO-Vektor enthält Konstrukt zur C-terminalen Fusion von Nma1 <i>in locus</i>	Amp ^R , Hyg ^R	(Pinter, 2012)
pSH19	pGBKT7- <i>num1</i> ₁₋₁₅₈ , Y2H Ködervektor, enthält ein 474 bp langes Sfil-Fragment von <i>num1</i>	Kan ^R	(Hassinger, 2015)
pSH27	$nup192:3xmyc:nat^R$, TOPO-Vektor enthält Konstrukt zur C-terminalen Fusion von Nup192 <i>in locus</i>		
pUMa261	Enthält eine 1897 bp Hygromycin-Resistenz-Kassette als Sfil-Fragment für Gendeletionen	Amp ^R , Hyg ^R	(Brachmann <i>et al.</i> , 2004)
pUMa262	Enthält eine 1437 bp Nourseothricin-Resistenz-Kassette als Sfil-Fragment für Gendeletionen	Amp ^R , Nat ^R	(Brachmann <i>et al.</i> , 2004)
pUMa647	Enthält eine $3xgfp:hyg^R$ -Kassette als Sfil-Fragment für C-terminale Fusion		(Baumann <i>et al.</i> , 2012)
pUMa1055	Enthält ein PA:gfp zur C-terminalen Fusion mit NcoI/NotI Schnittstellen in TOPO		M. Feldbrügge, pers. Mitteilung
pUMa1057	Enthält eine $3xmCherry:nat^R$ -Kassette als Sfil-Fragment für C-terminale Fusion		M. Feldbrügge, pers. Mitteilung
pUMa1712	$P_{Tef}:gfp:Rab5a:nosT$, <i>rab5a</i> unter dem P_{Tef} -Promotor für Integration in den <i>ip</i> -Locus		M. Feldbrügge, pers. Mitteilung
pUMa1806	$P_{Tef}:Cherry:Rab5a:nosT$, <i>rab5a</i> unter dem P_{Tef} -Promotor für Integration in den <i>ip</i> -Locus	Amp ^R , Cbx ^R	M. Feldbrügge, pers. Mitteilung
pUMa1904	pMA-T-mEos2, Plasmid der Firma Geneart (Life Technologies), welches das mEos2-Gen als di-Codon optimierte Variante für <i>U. maydis</i> enthält	Amp ^R	(Langner, 2015)
pUMa1908	$pP_{crg1}:mEos2$, Plasmid zur Integration von <i>mEos2</i> unter dem regulierbaren P_{crg1} -Promotor für Integration in den <i>ip</i> -Locus	Amp ^R , Cbx ^R	(Langner, 2015)
p123	Enthält das <i>egfp</i> -Gen unter der Kontrolle des P_{otef} -Promotors und des <i>nosT</i> -Terminators für die homologe Integration in den <i>ip</i> -Locus.	Amp ^R , Cbx ^R	Aichinger, unveröffentlicht
p123:$P_{otef}:mCherry:tub1:tub1T$	N-terminale Fusion von Tub1 unter Kontrolle des P_{otef} -Promotors und dem nativen Terminator für die Integration in den <i>ip</i> -Locus	Amp ^R , Cbx ^R	Kay Schink, pers. Mitteilung
p123:$P_{otef}:gfp:tub1:tub1T$	N-terminale Fusion von Tub1 unter Kontrolle des P_{otef} -Promotors und dem nativen Terminator für die Integration in den <i>ip</i> -Locus	Amp ^R , Cbx ^R	G. Steinberg, pers. Mitteilung

Tabelle 11: In dieser Arbeit hergestellte Plasmide

Plasmide	Beschreibung	Resistenz
pTO6	$mEos2:nosT:hyg^R$, Kassette für C-terminale GFP-Hyg ^R -Fusion aus pUMa317, GFP durch mEos2 ausgetauscht über eine AscI/Sfil-Klonierung (ausgeschnitten aus dem Ausgangsplasmid "2084", Codon-optimiertes <i>mEos2</i> von M. Feldbrügge)	Amp ^R , Hyg ^R
pTO7	$mEos2:nosT:nat^R$; Kassette für C-terminale GFP-Nat ^R -Fusion, GFP durch mEos2 ausgetauscht über eine AscI/Sfil-Klonierung (ausgeschnitten aus dem Ausgangsplasmid "2084", c	Amp ^R , Nat ^R

pTO8	Codon-optimiertes <i>mEos2</i> von M. Feldbrügge) <i>num1:mEos2:hyg^R</i> , mit SfiI wurde die <i>ha:hyg^R</i> -Kassette aus pNK24 geschnitten durch die <i>mEos2:hyg^R</i> -Kassette aus pTO6 ersetzt	Amp ^R , Hyg ^R
pTO9	<i>num1:mEos2:nat^R</i> , mit SfiI wurde die <i>ha:hyg^R</i> -Kassette aus pNK24 geschnitten durch die <i>mEos2:hyg^R</i> -Kassette aus pTO7 ersetzt	Amp ^R , Nat ^R
pTO11	Ausgangsplasmid pEntry:CFP, AN4244 ORF mit NcoI/NotI-Schnittstellen und Stop-Codon von <i>A. nidulans</i> cDNA amplifiziert und in Entry-Vektor kloniert	Kan ^R
pTO12	Ausgangsplasmid pEntry:CFP, AN4244 ORF mit NcoI/NotI-Schnittstellen ohne Stop-Codon für GFP-Fusion von <i>A. nidulans</i> cDNA amplifiziert und in Entry-Vektor kloniert	Kan ^R
pTO13	Ausgangsplasmid pEntry:CFP, UMAG_03539 ORF über PCR mit NcoI/NotI-Schnittstellen ohne Stop-Codon von 521 gDNA amplifiziert und in Entry-Vektor kloniert	Kan ^R
pTO14	<i>P_{hxt1}:AN4244:nosT</i> , Expressionsvektor über Gateway-Reaktion generiert (LR-Reaktion von pTO11 mit <i>P_{hxt1}:nosT</i> Destination-Vektor)	Amp ^R , Cbx ^R
pTO15	<i>P_{hxt1}:um03539:gfp:nosT</i> , Expressionsvektor über Gateway-Reaktion generiert (LR-Reaktion von pTO13 mit <i>P_{hxt1}:gfp:nosT</i> Destination-Vektor)	Amp ^R , Cbx ^R
pTO16	<i>P_{hxt1}:AN4244:gfp:nosT</i> , Expressionsvektor über Gateway-Reaktion generiert (LR-Reaktion von pTO12 mit <i>P_{hxt1}:gfp:nosT</i> Destination-Vektor)	Amp ^R , Cbx ^R
pTO17	Ausgangsplasmid pEntry:CFP, Num1 _{1-66AS} :AN4244-Fusionsprotein wurde über mehrere PCR-Reaktionen generiert, <i>U. maydis</i> N-Terminus von 521 gDNA amplifiziert, AN4244 von <i>A. nidulans</i> cDNA amplifiziert. Das chimäre Protein wurde über NcoI/NotI-Schnittstellen mit Stop-Codon in Entry-Vektor kloniert	Kan ^R
pTO18	<i>P_{erg}:num1:mEos2:nosT</i> , Ausgangsplasmid pNK3 wurde mit AscI/SfiI geöffnet und GFP gegen <i>mEos2</i> aus Plasmid 2084 ausgetauscht	Amp ^R , Cbx ^R
pTO19	<i>P_{hxt1}:num1₁₋₆₆:AN4244:nosT</i> , Expressionsvektor über Gateway-Reaktion generiert (LR-Reaktion mit <i>P_{hxt1}</i> - Destination-Vektor)	Amp ^R , Cbx ^R
pTO21	Ausgangsplasmid pEntry:CFP, Num1 _{1-66AS} :AN4244-Fusionsprotein wurde über mehrere PCR-Reaktionen generiert, <i>U. maydis</i> N-Terminus von 521 gDNA amplifiziert, AN4244 von <i>A. nidulans</i> cDNA amplifiziert. Das chimäre Protein wurde über NcoI/NotI-Schnittstellen ohne Stop-Codon für GFP-Fusion in Entry-Vektor kloniert	Kan ^R
pTO22	<i>P_{hxt1}:num1₁₋₆₆:AN4244:gfp:nosT</i> , Expressionsvektor über Gateway-Reaktion generiert (LR-Reaktion mit <i>P_{hxt1}</i> - Destination-Vektor), Num1 ₁₋₆₆ :AN4244:gfp-Fusion unter dem Hxt-Promotor	Amp ^R , Cbx ^R
pTO23	pUma1904, das <i>mEos2</i> (C728G) enthält, interne NcoI Schnittstelle in <i>mEos2</i> wurde mittels PCR mutagenisiert (C728G)	Amp ^R , Cbx ^R
pTO24	pGBKT7- <i>num1</i> ₁₋₈₃ , Hefe-Ködervektor, der ORF von <i>num1</i> wurde mit Stop-Codon von gDNA amplifiziert und über SfiI-Schnittstellen in den Zielvektor kloniert, die Zahlen geben die Größe des Proteins in AS an	Kan ^R
pTO25	pGBKT7- <i>num1</i> ₁₋₁₀₀ , Hefe-Ködervektor, der ORF von <i>num1</i> wurde mit Stop-Codon von gDNA amplifiziert und über SfiI-Schnittstellen in den Zielvektor kloniert, die Zahlen geben die Größe des Proteins in AS an	Kan ^R
pTO26	pGBKT7- <i>num1</i> ₁₋₁₃₁ , Hefe-Ködervektor, der ORF von <i>num1</i> wurde mit Stop-Codon von gDNA amplifiziert und über SfiI-Schnittstellen in den Zielvektor kloniert, die Zahlen geben die Größe des Proteins in AS an	Kan ^R
pTO27	pGBKT7- <i>num1</i> ₈₃₋₂₈₀ , Hefe-Ködervektor, der ORF von <i>num1</i> wurde mit Stop-Codon von gDNA amplifiziert und über SfiI-Schnittstellen in den Zielvektor kloniert, die Zahlen geben die Größe des Proteins in AS an	Kan ^R
pTO28	pGBKT7- <i>num1</i> ₁₀₅₋₂₈₀ , Hefe-Ködervektor, der ORF von <i>num1</i> wurde mit Stop-Codon von gDNA amplifiziert und über SfiI-Schnittstellen in den Zielvektor kloniert, die Zahlen geben die Größe des Proteins in AS an	Kan ^R
pTO29	pGBKT7- <i>num1</i> ₁₃₀₋₂₈₀ , Hefe-Ködervektor, der ORF von <i>num1</i> wurde mit Stop-Codon von gDNA amplifiziert und über SfiI-Schnittstellen in den Zielvektor kloniert, die Zahlen geben die Größe des Proteins in AS an	Kan ^R
pTO30	pGAD-DS- <i>kin1</i> _{full} (3kb), Hefe-Beutevektor, der ORF von <i>kin1</i> wurde mit Stop-Codon von gDNA amplifiziert und über SfiI-Schnittstellen in den Zielvektor kloniert, die Zahl gibt die Größe des Fragments in bp an	Amp ^R
pTO31	pGAD-DS- <i>kin1</i> _{1.8kb} , Hefe-Beutevektor, der ORF von <i>kin1</i> wurde mit Stop-Codon von gDNA amplifiziert und über SfiI-Schnittstellen in den Zielvektor kloniert, die Zahl gibt die Größe des Fragments in bp an	Amp ^R
pTO32	pGAD-DS- <i>kin1</i> _{NK960bp} , Hefe-Beutevektor, der ORF von <i>kin1</i> wurde mit Stop-Codon von gDNA amplifiziert und über SfiI-Schnittstellen in den Zielvektor kloniert, die Zahlen geben die Größe des Proteins in AS an Fragment ist 960 bp groß wie beschrieben in Kellner <i>et al.</i> , 2014 („Originalklon“ Y2H Kellner, 2009), Fragment von 521 gDNA amplifiziert und über SfiI-Schnittstellen kloniert	Amp ^R

Material und Methoden

pTO33	<i>P_{hxt1}::num1:mEos2</i> , Num1:mEos2 Fusion in p123-Derivat, Promotor ist ein 0,5 kb Stück von <i>P_{hxt1}</i> , <i>gfp</i> wurde über NcoI/NotI gegen <i>mEos2</i> ausgetauscht (aus pTO23, interne NcoI-Schnittstelle mutiert), <i>num1</i> mit NcoI zwischen Promotor und <i>mEos2</i> kloniert	Amp ^R , Cbx ^R
pTO35	pGAD-DS-num1; NICHT Hefe-Beutevektor mit Kin1-Verkürzung, es handelt sich um den Ausgangsvektor pGAD- <i>num1</i> , veröffentlicht Y2H Hassinger, 2015	Amp ^R
pTO36	pGAD-DS-kin1_1.0kb, Hefe-Beutevektor, der ORF von <i>kin1</i> wurde mit Stop-Codon von gDNA amplifiziert und über SfiI-Schnittstellen in den Zielvektor kloniert, Kin1-Insert ist 1005 bp groß	Amp ^R
pTO37	pGAD-DS-kin1_1.1kb, Hefe-Beutevektor, der ORF von <i>kin1</i> wurde mit Stop-Codon von gDNA amplifiziert und über SfiI-Schnittstellen in den Zielvektor kloniert, Kin1-Insert ist 1107 bp groß	Amp ^R
pTO38	pGAD-DS-kin1_1.2kb, Hefe-Beutevektor, der ORF von <i>kin1</i> wurde mit Stop-Codon von gDNA amplifiziert und über SfiI-Schnittstellen in den Zielvektor kloniert, Kin1-Insert ist 1206 bp groß	Amp ^R
pTO39	pGAD-DS-kin1_1.3kb, Hefe-Beutevektor, der ORF von <i>kin1</i> wurde mit Stop-Codon von gDNA amplifiziert und über SfiI-Schnittstellen in den Zielvektor kloniert, Kin1-Insert ist 1305 bp groß	Amp ^R
pTO40	pGAD-DS-kin1_1.4kb, Hefe-Beutevektor, der ORF von <i>kin1</i> wurde mit Stop-Codon von gDNA amplifiziert und über SfiI-Schnittstellen in den Zielvektor kloniert, Kin1-Insert ist 1404 bp groß	Amp ^R
pTO43	pGAD-DS-kin1_1.6kb, Hefe-Beutevektor, der ORF von <i>kin1</i> wurde mit Stop-Codon von gDNA amplifiziert und über SfiI-Schnittstellen in den Zielvektor kloniert, Kin1-Insert ist 1602 bp groß	Amp ^R
pTO45	<i>P_{otef}::num1:PAgfp:nosT</i> , der ORF von <i>num1</i> wurde von genomischer DNA mit NcoI-Schnittstellen amplifiziert und in pUMA870 inseriert	Amp ^R , Cbx ^R
pTO49	<i>nma1::mCherry:nat^R</i> in TOPO, Kasette aus pUMA1057 über SfiI in pNK58 integriert	Amp ^R , Nat ^R
pTO50	<i>num1_{Δ8AS}::3xgfp:nat^R</i> in TOPO, <i>num1</i> ORF wurde ohne die letzten 8AS und Stop-Codon amplifiziert, über SfiI wurde fälschlicherweise ein Stop-Codon wieder eingebracht (Stamm UTO122)	Amp ^R , Nat ^R
pTO52	<i>nma1::hyg^R</i> in TOPO, Flanken für Deletion des <i>nma1</i> ORFs in TOPO PCR2.1	Amp ^R , Hyg ^R
pTO53	<i>kin1::nat^R</i> in TOPO, Flanken für Deletion des <i>kin1</i> ORFs in TOPO PCR2.1	Amp ^R , Nat ^R
pTO54	<i>nup192::3xgfp:hyg^R</i> in TOPO, Generiert aus pSH27 und der 3xgfp:hyg Kasette aus pUMA647	Amp ^R , Hyg ^R
pTO55	<i>kin3::nat^R</i> in TOPO, Flanken für Deletion des <i>kin3</i> ORFs in TOPO PCR2.1	Amp ^R , Nat ^R
pTO56	<i>num1_{Δ8AS}</i> in TOPO, <i>num1</i> ORF wurde ohne die letzten 8AS und Stop-Codon mit SfiI-Schnittstellen amplifiziert, neuer reverse Primer (im Vergleich zu pTO50)	Amp ^R , Hyg ^R
pTO58	<i>num1_{Δ8AS}::stop:gfp</i> in TOPO, Amplifiziert von pTO50 und zwischenkloniert in TOPO, Num1 Volllänge ohne die letzten 8 AS und mit Stop in der SfiI-site	Amp ^R , Hyg ^R
pTO59	<i>num1_{2ORFΔ8AS}::stop:gfp</i> in TOPO, Amplifiziert von pTO50 und zwischenkloniert in TOPO, Num1 2. ORF ohne die letzten 8 AS und mit Stop in der SfiI-site	Amp ^R , Hyg ^R
pTO62	<i>num1_{Δ8AS}</i> in TOPO #1, Num1-LB um 8 AS verkürzt, mit SfiI-Schnittstellen 276 AS groß, PCR-Fragment in TOPO kloniert, gleiches Fragment wie in pTO47, aber neuer Primer mit SfiI-site, um Stop-Codon zu vermeiden	Amp ^R , Hyg ^R
pTO63	<i>num1_{Δ8AS}::gfp:hyg^R</i> in TOPO, Flanken wurden neu amplifiziert und in TOPO kloniert (pTO62 und 61), pTO62 als bb verwendet, Kasette (singe <i>gfp:hyg^R</i>) aus pUMA317, Num1 Δ 8AS = Num1 Δ 814-837AS	Amp ^R , Hyg ^R
pTO65	pEntry mit Nma1 ORF, Nma1 mit <i>attb</i> -sites amplifiziert und über BP-Reaktion in pDonor221 kloniert	Kan ^R
pTO66	pEntry, mit Num1 VL (Stop), Mit NcoI/NotI Schnittstellen amplifiziert von pTO58, Kloniert in pTO13	Kan ^R
pTO67	pEntry, mit Num1 2. ORF (Stop), Mit NcoI/NotI Schnittstellen in den Primern amplifiziert von pTO58, Kloniert in pTO13	Kan ^R
pTO68	<i>alcA(p)::sgfp::AN4244 #1, AN4244</i> von <i>A. nidulans</i> cDNA amplifiziert, über AsclI/PacI in pCMB17apx kloniert (pSH50, Satur)	<i>pyr4</i>
pTO69	<i>P_{otef}::nma1:gfp:nosT</i> Expressionsvektor, LR Reaktion von pTO65 mit pDest <i>P_{otef}::gfp:nosT</i>	Amp ^R , Cbx ^R
pTO70	<i>P_{otef}::num1_{2ORF}::stop:gfp:nosT</i> Expressionsvektor, LR Reaktion von pTO67 mit pDest <i>P_{otef}::GFP:nosT</i>	Amp ^R , Cbx ^R
pTO71	<i>P_{otef}::num1::Stop:gfp:nosT</i> Expressionsvektor, LR Reaktion von pTO66 mit pDest <i>P_{otef}::gfp:nosT</i>	Amp ^R , Cbx ^R
pTO72	<i>P_{hxt1}::tub1:gfp:nosT #1</i> Expressionsvektor, LR Reaktion von pTO46 mit pDest <i>P_{hxt1}::gfp:nosT</i>	Amp ^R , Cbx ^R
pTO73	<i>P_{hxt1}::tub1:gfp:nosT #3</i> Expressionsvektor, LR Reaktion von pTO46 mit pDest <i>P_{hxt1}::gfp:nosT</i>	Amp ^R , Cbx ^R
pTO74	pEntry-Num1-2.ORF (ohne Stop), Mit NcoI/NotI Schnittstellen in den Primern	Kan ^R

	amplifiziert von gDNA, Kloniert in pTO66	
pTO75	<i>P_{otef}::num12ORF:gfp:nosT</i> Expressionsvektor, LR Reaktion von pTO74 mit pDest <i>P_{otef}::gfp:nosT</i>	Amp ^R , Cbx ^R
pTO76	<i>nma1::nat^R</i> in TOPO, Flanken für Deletion des <i>nma1</i> ORFs in TOPO PCR2.1	Amp ^R , Nat ^R
pTO77	<i>vps9::nat^R</i> in TOPO, Flanken für Deletion des <i>vps9</i> ORFs in TOPO PCR2.1	Amp ^R , Nat ^R
pTO78	<i>vps11::nat^R</i> in TOPO, Flanken für Deletion des <i>vps11</i> ORFs in TOPO PCR2.1	Amp ^R , Nat ^R
pTO79	<i>nma1</i> in TOPO, <i>nma1</i> ORF von gDNA mit <i>Ascl</i> / <i>PacI</i> Schnittstellen von gDNA amplifiziert und in TOPO kloniert	Amp ^R
pTO80	pGBKT7- <i>vps3</i> , Hefe-Ködervektor, der ORF von <i>vps3</i> wurde mit Stop-Codon von gDNA amplifiziert und über <i>SfiI</i> -Schnittstellen in den Zielvektor kloniert	Kan ^R
pTO81	pGBKT7- <i>vps11</i> , Hefe-Ködervektor, der ORF von <i>vps11</i> wurde mit Stop-Codon von gDNA amplifiziert und über <i>SfiI</i> -Schnittstellen in den Zielvektor kloniert	Kan ^R
pTO82	pGBKT7- <i>vps18</i> , Hefe-Ködervektor, der ORF von <i>vps18</i> wurde mit Stop-Codon von gDNA amplifiziert und über <i>SfiI</i> -Schnittstellen in den Zielvektor kloniert	Kan ^R
pTO83	<i>alcA(p)::sgfp::nma1</i> , pMCB17 <i>apx</i> -Derivat	<i>pyr4</i>
pTO84	pGAD-DS - <i>vps3</i> , Beute-Ködervektor, der ORF von <i>vps3</i> wurde mit Stop-Codon von gDNA amplifiziert und über <i>SfiI</i> -Schnittstellen in den Zielvektor kloniert	Amp ^R
pTO85	pGAD-DS - <i>vps11</i> , Beute-Ködervektor, der ORF von <i>vps11</i> wurde mit Stop-Codon von gDNA amplifiziert und über <i>SfiI</i> -Schnittstellen in den Zielvektor kloniert	Amp ^R
pTO86	pGAD-DS - <i>vps18</i> , Beute-Ködervektor, der ORF von <i>vps18</i> wurde mit Stop-Codon von gDNA amplifiziert und über <i>SfiI</i> -Schnittstellen in den Zielvektor kloniert	Amp ^R
pTO87	pGBKT7- <i>nma1 (v)</i> , Hefe-Ködervektor, der ORF von <i>nma1 (v)</i> wurde mit Stop-Codon von gDNA amplifiziert und über <i>SfiI</i> -Schnittstellen in den Zielvektor kloniert, <i>Nma1 (v)</i> aus Y2H Plasmid NK	Kan ^R

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

4.1.9 Sonstige Materialien

Filterpapier 3MM (Whatman), Glasperlen 150-212 microns (eigene Herstellung), Nylonmembran (Carl Roth), Petrischalen (Greiner), 1,5ml- und 2 ml-Reaktionsgefäße (Greiner), 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäße, 15 ml und 50 ml PPN-Röhrchen (Greiner), 1,5 ml Polystyrol-Küvetten (Greiner), Sterilfilter 0,20µm (Roth).

4.2 Mikrobiologische, genetische und zellbiologische Methoden

4.2.1 Kultivierung von *E. coli*

E. coli-Stämme wurden entweder als Schüttelkulturen bei 200 Upm oder auf Festmedien unter aeroben Bedingungen bei 37°C kultiviert. Übernachtskulturen wurden von YT-Amp-Festmedien angeimpft. Die bei -80°C gelagerten Glycerinkulturen wurden vor weiteren Arbeiten auf YT-Amp-Festmedien ausgestrichen.

Bestimmung der Zelldichte bei *E. coli*

Die Zelldichte von Flüssigkulturen wurde photometrisch in einem 7300 Spectrophotometer (JENWAY) bei 600 nm bestimmt. Um eine lineare Abhängigkeit sicherzustellen, wurden für die Messung der OD₆₀₀ die Kulturen durch entsprechende Verdünnung auf einen Wert unterhalb von 0,8 verdünnt. Als Nullwert wurde die OD₆₀₀ des jeweiligen Kulturmediums

Material und Methoden

verwendet. Eine OD₆₀₀ von 1,0 entspricht etwa 10⁹ Zellen/ml.

Calcium/Mangan-basierte (CCMB) Transformation von *E. coli*

TopTen Zellen von einer frisch ausgestrichenen Platte in 2 x 4 ml SOB Medium (ohne Magnesium) animpfen, vortexen und über Nacht bei 37 °C inkubieren. Übernachtskultur am nächsten Morgen in Kolben mit 400 ml SOB-Mg überführen. Zellen werden bei 37 °C und 200 rpm bis zu einer OD₆₀₀ = 0,6 geschüttelt. Zell-Suspension in sterile Zentrifugenbecher füllen (je 200 ml) und 10 min auf Eis kühlen. Pelletierung der Zellen erfolgt bei 750-1000 g (1000g = 2570 rpm im SLA-1500 Ausschwingrotor) für 10-15 min bei 4°C (Zentrifuge vorkühlen), danach den Überstand verwerfen. Resuspendieren der Zellen in 1/3 des Volumens (66,7 ml) mit CCMB80 durch vortexen und danach für 20 min auf Eis inkubieren. Zellen erneut 10 min bei 750-1000 g bei 4°C zentrifugieren und den Überstand danach verwerfen. Die Zellen werden resuspendiert mit CCMB80 in 1/12 des Gesamtvolumens (16,6 ml) und je 50 µl in 1,5 ml-Reaktionsgefäße aliquotiert. Die Zellen mit flüssigem Stickstoff schockgefrieren (überschütten) und bei -80°C aufbewahren.

SOB

Bacto-Trypton 20 g/l (fc 2%)
Hefeextrakt 5 g/l (fc 0,5 %)
NaCl 0,58 g/l (fc 10 mM)
KCl 0,19 g/l (fc 2,5 mM)

SOB-Mg

SOB-Medium 1l
MgCl₂ and MgSO₄ 10 ml
aus einer 2 M
Stammlösung (fc 20 mM)

CCMB80

KOAc pH 7,0 10 ml aus 1 M
Stammlösung (fc 10 mM)
CaCl₂·2H₂O 11,8 g/l (fc 80 mM)
MnCl₂·4H₂O 4,0 g/l (fc 20 mM)
MgCl₂·6H₂O 2,0 g/l (fc 10 mM)
Glyzerin 100 ml (fc 10%)
pH 6,4 mit HCl einstellen,
sterilfiltrieren und bei 4°C lagern

4.2.2 *Ustilago maydis*

Kultivierung von *Ustilago maydis*

U. maydis-Stämme wurden standardmäßig entweder als Schüttelkulturen bei 200 Upm oder auf Festmedien unter aeroben Bedingungen bei 28 °C kultiviert. Übernachtskulturen wurden entweder aus bei -80 °C gelagerten Glycerinkulturen oder von bewachsenen CM-Platten, die weniger als einen Monat bei 4 °C gelagert waren, angeimpft. Die bei -80°C gelagerten Glycerinkulturen wurden vor weiteren Arbeiten immer zuerst auf Festmedien ausgestrichen.

Bestimmung der Zelldichte bei *U. maydis*

Die Zelldichte von Flüssigkulturen wurde photometrisch in einem 7300 Spectrophotometer (JENWAY) bei einer Wellenlänge von 600 nm bestimmt. Um eine lineare Abhängigkeit

sicherzustellen, wurden für die Messung der OD_{600} die Kulturen durch entsprechende Verdünnung auf einen Wert unterhalb von 0,8 verdünnt. Als Nullwert wurde die OD_{600} des jeweiligen Kulturmediums verwendet, eine $OD_{600} = 1,0$ entspricht etwa $1-5 \times 10^7$ Zellen/ml

Induktion von *U. maydis*-Stämmen

Die Stämme wurden aus Vorkultur in Flüssigmedium (CM-Flüssigmedium) angeimpft, das reprimierende Bedingungen bot (im Fall des *crg1*-Promotors mit Glukose als einziger Kohlenstoffquelle) und bis zu einer $OD_{600} \approx 0,5$ bei 28°C und 180 Upm inkubiert. Die Zellen wurden daraufhin abzentrifugiert (3.500 Upm, 5 min, 28°C, Heraeus Biofuge stratos), der Überstand abgenommen und die Zellen im gleichen Volumen CM-Medium resuspendiert, welches induzierende Bedingungen bot (im Fall des *crg1*-Promotors Arabinose als einziger Kohlenstoffquelle). Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurden die Zell-Pellets in diesem Flüssigmedium resuspendiert und in frische Schikanekolben überführt. Die Kulturen wurden bei 28°C und 200 Upm für die erforderliche Zeit inkubiert. Für die Probenentnahme wurden jeweils 50 ml Kultur in 50 ml-Röhrchen (Greiner) abzentrifugiert (3.000 Upm, 5 min, 28°C, Heraeus Multifuge 4 KR), der Überstand dekantiert und die Zellpellets in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

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

Herstellung von Protoplasten von *U. maydis*

Von einer auf Platte wachsenden Kultur wurde eine 10 ml $YEPS_{light}$ -Flüssigkultur angesetzt und für 8-10 h bei 28 °C geschüttelt. Diese Vorkultur wurde anschließend in 50 ml frischem $YEPS_{light}$ -Medium verdünnt und bei 28 °C bis zu einer Zelldichte von $1 - 2 \times 10^7$ Zellen/ml (bis $OD_{600} = 0,6-1,0$) geschüttelt. Nach Erreichen des optimalen Zelltiters wurden die Zellen durch Zentrifugation (3.500 Upm, 6 min, Heraeus Biofuge stratos) geerntet, einmal mit 20 ml SCS gewaschen und in 5 ml SCS mit 12,5 mg/ml (in SCS, sterilfiltriert) Novozym oder Lysing Enzyme resuspendiert. Die in diesem Puffer bei Raumtemperatur erfolgende Protoplastierung kann mikroskopisch verfolgt werden, da die zigarrenförmigen Zellen nach Lyse der Zellwand eine kugelige Form einnehmen. Nach vollständiger Protoplastierung (5 - 8 min) wurden 30 ml SCS zugegeben und die Protoplasten durch achtminütige Zentrifugation bei 2.300 Upm pelletiert. Dieser Waschschrift wurde noch einmal wiederholt. Als nächsten Waschschrift wurden die Zellen in 5 ml SCS und 5 ml kalter STC-Puffer resuspendiert (zuerst SCS auf die Zellen geben). Danach wurden Zellen vorsichtig in 10 ml kaltem STC-Puffer aufgenommen und zentrifugiert. Alle Zentrifugationsschritte nach der Protoplastierung erfolgten für 8 min bei 2.300 Upm. Zellen wurden in 500 μ l STC-Puffer resuspendiert und auf Eis gehalten, je 50 μ l Zellen wurden in 2-ml Reaktionsgefäße portioniert. Die Lagerung der Protoplasten erfolgte bei -80°C für mehrere Monate.

Material und Methoden

SCS

20 mM Na-Citrat, pH 5.8
1 M Sorbitol
in H₂O_{bid.}, sterilfiltrieren

STC

10 mM Tris-HCl, pH 7.5
100 mM CaCl₂
1 M Sorbitol
in H₂O_{bid.}, sterilfiltrieren

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 in max. 10 µl Wasser/Puffer) und 1 µl Heparin-Lösung (15 mg/ml) für 15 min auf Eis inkubiert. Bei einer Transformation mit selbstreplizierenden Plasmiden wurden nur ca. 1 µg DNA eingesetzt. Nach Zugabe 250 µl STC/PEG folgte eine weitere Inkubation von 15 min auf Eis. Anschließend wurde der gesamte Transformationsansatz auf einer kurz vorher mit Top-Agar überschichteten Hygromycin-, Nourseothricin- bzw. Carboxin-Bottom-Agarplatte ausgestrichen. Nach 2 bis 5 Tagen Inkubation bei 28 °C wurden die gewachsenen Kolonien mit flachen Zahnstochern auf CM-Platten, die das entsprechende Antibiotikum zur Selektion enthielten, vereinzelt.

Antibiotika Konz. in Bottom Agar Platten:

Carboxin: 4 µg/ml
Hygromycin: 400 µg/ml
Nourseothricin: 100 µg/ml

STC/PEG (25ml)

60% STC-Puffer 15 ml
40% PEG 4000 10g
PEG in STC-Puffer lösen, sterilfiltrieren

Pflanzeninfektionen

Für Pathogenitätstests wurde eine Spritzinfektion verwendet, bei der 300 µl einer Pilzsuspension in das Innere des Blattwirtels sieben Tage alter Maispflanzen (Early Golden Bantam) injiziert wurden. Die entsprechenden Stämme wurden in YEPS_{Light}- Flüssigmedium bis zu einer OD₆₀₀ ≈ 0,8 angezogen, durch Zentrifugation (3500 Upm, 5 min, RT) pelletiert und in H₂O_{bid.} aufgenommen (OD₆₀₀ ≈ 3,0). Die Bonitur erfolgte 7 Tage nach Infektion.

4.2.3 Kultivierung von *A. nidulans*

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

Minimalmedium (MM)	Salzstammlösung (20x)	Spurenelementlösung (1000x)
50 ml Salz-Stammlsg.	120 g NaNO ₃	22 g ZnSO ₄ x 7H ₂ O
1 ml Spurenelementlsg.	10,4 g KCl	11 g H ₃ BO ₃
2 % Glucose, Glycerin, Threonin oder Ethanol	10,4 g MgSO ₄ x 7H ₂ O	5 g MnCl ₂ x 4H ₂ O
mit 10 M NaOH auf pH 6.5	30,4 g KH ₂ PO ₄	5 g FeSO ₄ x 7H ₂ O
zur Regeneration von Protoplasten mit 0.6 M KCl supplementiert		1,6 g CoCl ₂ x 5 H ₂ O
		1,6 g CuSO ₄ x 5 H ₂ O
		1,1 g (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ x 4 H ₂ O
		50 g Na ₄ EDTA
		mit Kaliumhydroxid-plättchen auf pH 6.5-6.8

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

Für die Transformation von *A. nidulans* wurden 500 ml Minimalmedium mit entsprechenden Auxotrophiemarkern mit etwa 10^9 Konidien inokuliert. Die Pilzsuspension inkubierte je nach Stamm für 12-15 Stunden bei 30 °C im Schüttelinkubator (180 rpm). Anschließend wurden die jungen Hyphen über ein Stück steriles Mira cloth filtriert und mit sterilem Wasser gewaschen. 1 g des gewaschenen Myzels wurde entnommen und in 10 ml Lösung 2 in einem 50 ml Falcon resuspendiert. Nach Zugabe von 200 mg VinoTaste Pro (Novozymes) wurde das Myzel für fünf Minuten auf Eis gestellt. Zum Verdau der Zellwand wurde die Myzel-Lösung in einen 100 ml Erlenmeyerkolben überführt und für 1,5 Stunden bei 30 °C und 120 rpm inkubiert. Nach mikroskopischer Kontrolle der Protoplasten wurde 10 ml Lösung 2 zugegeben und die Protoplasten auf 2 x 50ml Falcons aufgeteilt. Diese wurden dann vorsichtig mit Lösung 5 überschichtet und 12 min bei 4.000 x g bei 4 °C zentrifugiert. Die Protoplastenbande, welche sich an der Phasengrenze gebildet hatte, wurde vorsichtig entnommen, mit zweifachem Volumen von Lösung 6 gewaschen und anschließend 12 min mit 2.800 x g bei 4 °C pelletiert. Die gewaschenen Protoplasten wurden in 200- 1000 µl Lösung 7 (je nach Anzahl der Transformationsansätze; 200 µl pro Ansatz) resuspendiert. Zu den Protoplasten wurden 5-10 µg DNA (in 50 µl Lösung 7 gelöst) zugegeben und mit 50 µl Lösung 8 für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde nach Zugabe von 1 ml Lösung 8 weitere 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 4 ml Lösung 7 wurde der Ansatz mit handwarmem Top-Agar auf 30 ml aufgefüllt und auf 3 MMR-Platten aufgeteilt und für 3 Tage bei 37 °C inkubiert.

Material und Methoden

Lösung 2 (50ml)

14,9 g MgSO₄ x 7 H₂O

1,8 ml Na₂HPO₄ (0,2 M)

0,7 ml NaH₂PO₄ (0,2 M)

pH 5,5; steril filtrieren
Lagerung bei 4 °C

Lösung 5 (100 ml)

10,9 g Sorbitol

10 ml TrisHCl 1 M pH 7,5

autoklavieren

Lösung 6 (100ml)

18,22 g Sorbitol

1 ml TrisHCl 1 M pH 7,5

autoklavieren

Lösung 7 (100ml)

18,22 g Sorbitol

1 ml TrisHCl 1 M pH 7,5

1ml CaCl₂ 1 M

autoklavieren

Lösung 8 (50ml)

30 g PEG-4000 oder PEG-6000; 0,5 ml TrisHCl 1 M pH 7,5

Pyrithiamin (ptrA)

1 mg/ml in H₂O

Pyridoxin (pyro)

0,5 g/ 50 ml (1000x)
use: 1 ml/l

Ammonium Tartrat (100x)

9,2g/l (autoklavieren)

MMR (500ml)

10 ml Salzstammlösung (ohne Stickstoff)

0,5 ml Spurenelemente

benötigte Vitamine (Marker)

171 g Saccharose

7,5 g Agar

mit H₂O auf 500 ml auffüllen;
pH 6,8; nach dem
autoklavieren 10 ml
Ammoniumtartrat und 50 ml
Glukose zugeben

MMR-TOP (500ml)

10 ml Salzstammlösung
(ohne Stickstoff)

0,5 ml Spurenelemente

171 g Saccharose

3 g Agar

mit H₂O auf 500 ml auffüllen
und autoklavieren

4.2.4 Kultivierung von *S. cerevisiae*

S. cerevisiae-Stämme wurden standardmäßig als Schüttelkulturen bei 180 Upm oder auf Festmedien unter aeroben Bedingungen bei 28°C oder 30°C kultiviert. 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.

Bestimmung der Zelldichte

Die Zelldichte von Flüssigkulturen wurde photometrisch in einem Photometer bei einer Wellenlänge von 600 nm bestimmt. Dabei entspricht OD₆₀₀ = 1 im Verhältnis zum Leerwert des jeweiligen Kulturmediums je nach verwendetem Stamm und Wachstumsmedium etwa 1-

5×10^7 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.

YEPD/A	SD (5x)	H ₂ O-Agar
10g Hefeextrakt	33,5g YNB (Yeast nitrogen base)	
20g Pepton	10% (100g) Glucose	16 g auf 0,8 l H ₂ O-Agar
2% Glucose		
100 mg Adenin	7,26g Drop-Out (Formedium)	Mix In 400 ml H ₂ O-Agar
mit H ₂ O _{bid} auf 1l auffüllen, autoklavieren und danach steril zugeben	mit H ₂ O _{bid} auf 1l auffüllen, pH auf 5,8 einstellen und sterilfiltrieren	+ 100 ml 5x SD-LWHA + Aminoacid/Adenin

Aminosäure	Stocklösung (g/100 ml)	Volumen aus Stock für 1 l Medium (ml)
Adenin	0,2	10
L-Tryptophan	1	2
L-Histidin	1	2
L-Leucin	1	10

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

Von einem Verdünnungsausstrich auf YEPD-Platten ausgehend wurden 25 ml YEPD-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 YEPD-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 H₂O 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

Material und Methoden

(Invitrogen) wurde zugeben. Der Ansatz wurde für 10 min bei 100°C in einem Eppendorf-Wärmeblock denaturiert und anschließend sofort auf Eis gekühlt. An diesem Schritt können die Zellen in 50 µl Aliquots bei -80°C eingefroren werden.

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

SORB

100 mM LiAc

10 mM Tris-Cl, pH 8,0

1 mM Na₂-EDTA, pH 8,0

1 M Sorbitol

in H₂O_{bid.}, sterilfiltriert

LIT/PEG

50 g PEG-3500

10 ml Lithium-Acetat-Lösung (100 mM)

in 100 ml H₂O_{bid.}, sterilfiltriert

4.3 Mikroskopie und Bildverarbeitung

Die zellmorphologische Betrachtung von *U. maydis* erfolgte an einem Lichtmikroskop (Axiophot oder Axiomager Z1, Zeiss) mittels Nomarski-Optik. Für DIC- und Fluoreszenz-Mikroskopie wurde ein 63-faches Plan-APOCHROMAT Ölimmersions-Objektiv (Zeiss, Jena) mit 1,4 numerischer Apertur verwendet. 3 µl einer exponentiell wachsenden Kultur (OD₆₀₀ ≈ 0,3-0,5) in CM-Glucose oder CM-Arabinose Medium wurden zur Analyse auf Agarose-beschichtete Objektträger (120 µl 2% Agarose in H₂O_{bid.}) getropft oder die Zellen wurden auf dem Objektträger durch Trocknen an der Luft auf dem Objektträger fixiert. *A. nidulans* Zellen wurden über Nacht in Glycerin-haltigem Mikroskopiemedium inkubiert bei 28°C. Digitale Aufnahmen wurden mit einer hochauflösenden AxioCam MRm (Zeiss, Jena) aufgenommen, welche durch die AxioVision-Software (Zeiss, Jena) gesteuert wurde. Die Nachbearbeitung der Bilder (Bildausschnitt, Kontrastverstärkung, Maßstabsskalierung) erfolgte mit der AxioVision-Software Zen (Zeiss, Jena) oder Fiji (Schindelin *et al.*, 2012). Die Bilder wurden als PNG- und JPEG-Dateien für die weitere Bearbeitung abgespeichert. Die Bearbeitung aller Bilder umfasste Helligkeit-, Kontrast- und Gammakorrekturen.

Erstellen von Kymographen

Zur Erstellung der Kymographen wurden bei 200 ms Belichtungszeit pro Bild ein-minütige Videos aufgenommen (Einstellungen in ZEN: Dauer 1 min, „use camera streaming“). Zur Analyse der Videos wurde mit Hilfe von Fiji eine sogenannte Bleichkorrektur (*bleaching correction*) durchgeführt (Einstellung: *Histogram matching*) und in diesen Dateien eine Linie (3 pt, *segmented line*) entlang der sichtbaren Mikrotubuli gelegt. Das Plugin KymographBuilder errechnet daraus einen Kymographen, der die Partikelbewegung anhand des zurückgelegten Weges (μm) in einer bestimmten Zeit (sec) abbildet. Zur Skalierung mussten für das Bild spezifische Werte eingegeben werden: 1 μm in Bildern, die mit Hilfe der ZEN-Software am Instituts eigenen Mikroskop erstellt wurden, enthält 9,7674 Pixel. Für die Zeitangabe musste ein Quotient gebildet werden aus der Gesamtzahl der Bilder pro Sekunde (Beispiel: 300 Bilder/60 sec = 5). Diese Werte müssen im Reiter „set scale“ eingegeben werden:

Distanz:	Zeit:
Distance in pixels: 9,7674	Distance in pixels: 5
Known distance: 1,00	Known distance: 1,00
Pixel aspect ratio: 1,0	Pixel aspect ratio: 1,0
Unit: micron	Unit: sec

Zur Bestimmung der Geschwindigkeit einzelner Partikel ist die Berechnung der Steigung der Endosomen-Bewegung notwendig. Indem man eine Linie über die zu messende Linie im Kymographen legt und diese vermisst (Funktion *measure*), erhält man bei Aktivierung einer speziellen Funktion (*Analyze – set measurements* – Haken setzen bei *bonding rectangle*) die Werte *width* und *height*. Diese müssen in Excel übertragen und in folgende Formel eingesetzt werden: $width / ((60/300^1) * 9,7674 * height)$ (¹ abhängig von der Anzahl der aufgenommenen Bilder). Die Berechnung der Geschwindigkeit mit dieser Formel ergibt ein Ergebnis in der Einheit $\mu\text{m/s}$.

Spinning Disk Mikroskopie

Für die Untersuchung von Zellen an einem Spinning Disk Konfokal Mikroskop wurden Zellen über Nacht in einer Schüttelkultur in CM-Glucose auf eine $OD_{600} = 0,5$ angezogen. Für die Induktion von Filamenten wurde als alternative C-Quelle Arabinose zugegeben. 3 μl aus einer axenischen Kultur wurden auf ein Objektträger mit Agarosekissen (2% Agarose in H_2O) gegeben und sofort analysiert. Die Aufnahmen wurden mit Hilfe eines konventionellen inversen AxioObserver Z1 Mikroskop mit einem Plan-Apochromat 63x/1.40 Öl Ph3 M27 Objektiv (Zeiss, Jena), einem Zeiss Multi Laser Modul mit einem 488 Dioden Laser und einem 561nm OPAL Laser und einem CSU-X1M 5000 Spinning Disk Modul erstellt. Die Aufnahmen

Material und Methoden

wurden entweder mit einer AxioCam MRM (Zeiss, Wetzlar) oder einer Evolve 512 Kamera (Photometrics, Tucson AZ, USA) gemacht. Die Aufnahme und Bearbeitung der Bilder erfolgte mit Axiovision Software Zen (Zeiss, Wetzlar) und Fiji (Schindelin *et al.*, 2012).

PALM-Mikroskopie

PALM Bilder wurden bei Raumtemperatur mit Hilfe eines modifizierten inversen Mikroskop (Axiovert 200, Zeiss), welches mit einem hochauflösenden Wasser-Immersion Objektiv (C-Apochromat, 63x, N.A. 1,2, Zeiss) ausgestattet war, gemacht. Es wurden drei *diodepumped solid-state* Laser mit den Wellenlängen 561 nm (Cobolt Jive, Cobolt, Solna, Schweden), 473 nm (LSR473-200-T00, Laserlight, Berlin, Deutschland) und 405 nm (CLASII 405-50, Blue Sky Research, Milpitas, CA) zur Anregung und Fotoaktivierung der Fluorophore genutzt. Die Laserstrahlen wurden durch dichromatische Spiegel (AHF, Tübingen, Deutschland) gebündelt und durch einen AOTF (AOTFnC-400.650, A-A, Opto-Electronic, Orsay Cedex, Frankreich) geleitet, um die Laserintensitäten zu regulieren. Danach wurden sie in eine *single mode fibre* (OZ Optics, Ottawa, Ontario, Kanada) geleitet.

Die Zellen wurden über Nacht bei 28°C in axenischer Kultur angezogen und je 200 µl Kultur wurden mit 200 µl 4% Low-Meltung Agarose (fc 2%, Temperatur sollte nicht über 50 °C betragen) in 8 *well* Glasboden Kammern (µ-Slide 8 well, ibidi GmbH, München) untersucht. Die Fluorophore wurden, durch Bestrahlung mit einer niedrigen Intensität an (0 – 50 W/cm²) 405 nm Licht, von ihrer Grünen in ihre Rote Form konvertiert und durch gleichzeitige Bestrahlung mit 561 nm (200 – 400 W/cm²) angeregt. Nachdem die Fluoreszenz Emission den dichromatischen Spiegel für die Anregung (z 405/473/561/635, AHF, Tübingen, Deutschland) passiert hatte, wurde sie von einem 607/50 *band-pass* Filter (AHF, Tübingen, Deutschland) gefiltert. Die Fluoreszenz Emission wurde schlussendlich mit einer EMCCD Kamera (Ixon Ultra 897, Andor, Belfast, Nordirland) typischerweise mit 50 ms Zeitauflösung, wenn nicht anders gekennzeichnet, aufgenommen. Alle PALM Daten wurden mit einer von der AG Nienhaus geschriebenen Analyse Software, a- livePALM, welche unter MATLAB R2010b (The Mathworks, USA) lief, analysiert. Weitere Analysen erfolgten mit und Fiji (Schindelin *et al.*, 2012).

Fixierung von Zellen

Die Kulturen wurden bis zu einer OD₆₀₀=0,5 angezogen und je 500 µl Kultur in 2 ml Reaktionsgefäß 1:1 mit Fixierlösung gemischt. Die Zellen wurden für 30 min auf einem Drehrad inkubiert. Kulturen wurden 5 min bei 3500 Upm abzentrifugiert, einmal mit 1 ml 1x PBS gewaschen und danach in 500 µl 1x PBS aufgenommen (f.c. 8% Formaldehyd). So können die Zellen mehrere Wochen bei 4 °C gelagert werden. Zur Auflösung des Mikrotubuli-Zytoskeletts wurden 2 µl Benomyl (10mM in DMSO) zu 500 µl Kultur gegeben (f.c. 40 µM) und 5-10 min bei RT inkubiert (Fuchs *et al.*, 2005).

Fixierlösung (92,6 ml)

50 ml 200 mM PIPES (pH 6,7; set with 10M NaOH)
10 ml 500 mM EGTA(pH 8,5; set with 10M NaOH)
1 ml 1M MgSO
10 ml DMSO
21,6 ml Formaldehyd (37%)

PIPES und EGTA frisch in der benötigten Menge ansetzen, da Stoffe nur beim richtigem pH-Wert gut löslich sind

Färbung von Zellen

Zur Färbung von Zellkernen wurde das DAPI Vectashield Mounting Medium der Firma Vector Laboratories verwendet. 10 µl einer fixierten Kultur wurde mit 1 µl DAPI-Medium gemischt, nach wenigen Minuten wurden 2 µl der gefärbten Zellen auf einem Objektträger mikroskopisch analysiert. Für weniger Hintergrund können die Zellen zusätzlich gewaschen werden. Für die DAPI Färbung von *A. nidulans* Hyphen wurden Sporen auf Deckgläsern angeimpft und über nach in Medium inkubiert. Ein Tropfen DAPI Mounting Medium wurde auf ein Objektträger gegeben, das Deckglas mit den Hyphen daraufgelegt und sofort untersucht. Der Farbstoff CellTracker™ Blue CMAC (7-Amino-4-Chlormethylcumarin, Fluorescent Probes by life technologies) dient zum Anfärben saurer Membrankompartimente wie Vakuolen. 500 µl Kultur wurden mit 1 µl CMAC-Stocklösung gemischt und circa 30 min auf dem Drehrad oder Bellydancer inkubiert. Die Zellen wurden 5 min bei 3500 Upm abzentrifugiert, mit 1 ml es entsprechenden Mediums gewaschen und danach in 500 µl Medium aufgenommen. Die Detektion von DAPI und CMAC erfolgt im DAPI-Kanal.

Der Farbstoff FM4-64 (N-(3-Triethylammoniumpropyl)-4-(6-(4-(Diethylamino) Phenyl) Hexatrienyl) Pyridinium Dibromid, Invitrogen) ist ein endozytischer Marker, der zuerst in die Membran der Zellen aufgenommen wird. Nach circa 5 min ist der rot fluoreszierende Stoff in den Membranen von Endosomen feststellbar und wird über den endozytotischen Weg weiter zu den Membranen von Vakuolen geleitet. Die Färbung von 100 µl Zellen erfolgte mit 1 µl einer 100 µg/ml (in DMSO; f.c. 1 µg/ml) Stocklösung, nach ca. 5 min konnten angefärbte Endosomen detektiert werden.

4.4 Molekularbiologische Standardmethoden

4.4.1 Handhabung und *in vitro*-Modifikationen von DNA nach (Sambrook *et al.*, 1989)

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.

Material und Methoden

Als Maß für die Reinheit der Desoxyribonukleinsäuren diente der Quotient aus den optischen Dichten bei den Wellenlängen 260 nm und 280 nm. Für reine DNA sollte er bei etwa 1,8 liegen. niedrigere Werte deuten Verunreinigungen mit Proteinen, höhere Werte zeigen Verunreinigungen mit Salzen oder Zuckern an. Alle Messungen erfolgten an einem Nanodrop 2000-Spektralphotometer (NanoDrop-Technologies).

PEG Fällung von DNA

Die Reinigung und Konzentrierung von Nukleinsäuren aus wässrigen Lösungen erfolgte durch Fällung. Hierzu wurde die Probe mit H₂O auf 100 µl aufgefüllt und 1/3 des Gesamtvolumens (50 µl) PEG-4000 MgCl₂ zugegeben. Die Probe wurde gut gevortext und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Präzipitat wurde durch 15-minütiges Zentrifugieren (13.000 Upm, RT) pelletiert. Danach einmal mit 1 ml 70% EtOH gewaschen, 1 min zentrifugiert und danach das Pellet bei RT getrocknet. Gelöst wurde das Pellet in 20 µl TE, H₂O oder EB-Puffer. Falls die gefällte DNA für eine *U. maydis* Transformation verwendet werden soll, kann die gefällte DNA in PEG direkt verwendet werden (Konzentrationsbestimmung ist möglich). Dazu muss das PEG vorsichtig abgenommen werden und die DNA in TE, H₂O oder EB-Puffer gelöst werden.

Restriktion von DNA

Zur Spaltung von doppelsträngiger DNA wurden TypII-Restriktionsendonukleasen unter den vom Hersteller empfohlenen Pufferbedingungen eingesetzt. Ein typischer analytischer Ansatz enthielt: 0,5 µg DNA, 0,5 U Restriktionsenzym (New England Biolabs) im empfohlenen 10X Puffer in einem 10 µl Gesamtansatz. Nach der Inkubation für eine Stunde bei 37°C (bzw. der für das jeweilige Enzym optimalen Temperatur) wurden dem Ansatz 2 µl 6x Auftragspuffer zugesetzt und die Reaktionsprodukte wurden auf einem Agarose-Gel analysiert.

Dephosphorylierung linearer DNA-Fragmente

5'-terminale Phosphatgruppen können mit Hilfe der Antarktischen Phosphatase abgespalten werden. Da DNA-Stränge ohne 5'-terminale Phosphatgruppen nicht religieren können, kann so die Selbst-Ligation von linearisierter Plasmid-DNA verhindert werden. Ein typischer Reaktionsansatz enthielt: 1 µg linearisierte Plasmid-DNA, 1 U Antarktische Phosphatase (New England Biolabs) in 20-50 µl Antarktische Phosphatase Puffer. Der Ansatz wurde für 30 Minuten bei 37°C inkubiert und anschließend für 10 Minuten bei 65°C Hitze-inaktiviert. Die so behandelte Plasmid-DNA konnte direkt für die Ligation eingesetzt werden.

Ligation von DNA-Fragmenten

Doppelsträngige DNA-Fragmente wurden mit Hilfe der T4 DNA-Ligase kovalent miteinander verknüpft. Das zu klonierende Fragment wurde in der Regel in drei- bis sechs-fach molarem Überschuss gegenüber der linearisierten, dephosphorylierten Plasmid-DNA eingesetzt. Ein typischer Reaktionsansatz enthielt: 50-100 ng linearisierte, dephosphorylierte Plasmid-DNA, dreifach molarer Überschuss an linearem Fragment, 1 U T4 DNA-Ligase (New England Biolabs) in 20 µl T4 DNA-Ligase Puffer. Der Ansatz wurde entweder für zwei Stunden bei RT oder über Nacht bei ca. 16°C inkubiert. Die so behandelte DNA konnte direkt in chemisch kompetente *E. coli* TOP10 Zellen transformiert werden.

Sequenzierung von DNA

Für die Sequenzierung von DNA wurde der Sequenzier-Service der Ludwigs-Maximilian Universität in München in Anspruch genommen. Vor der automatischen Sequenzierung wurde die DNA mit dem RotiPrep Plasmid Mini Kit (Carl Roth) aufgereinigt, PCR-Produkte wurden mit dem PCR Purification KIT (Quiagen) aufgereinigt. Je Plasmid wurden 150-300 ng und je lineares PCR Produkt (1000-2000 bp) 40-100 ng pro Reaktion eingesetzt, zusätzlich wurden ca. 3,5 pmol Oligonukleotid hinzu gegeben. Die erhaltenen Sequenzrohdaten konnten zur weiteren Bearbeitung in die Programme Sequencer™ oder ApE exportiert werden.

4.4.2 Isolierung von Nukleinsäuren

Minipräparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Isolierung erfolgte durch „Lyse durch Kochen“ nach (Sambrook *et al.*, 1989). 1,5 ml einer *E. coli*-Übernachtskultur wurden 60 s bei 13.000 Upm (Heraeus Biofuge 15) pelletiert. Das Zellpellet wurde in 300 µl STET resuspendiert, nach Zugabe von 20 µl Lysozym-Lösung kräftig geschüttelt und anschließend 5 mins bei 37°C in einem Eppendorf-Heizblock vorinkubiert. Nach einem Hitzeschock (1 min, 95°C) wurden die lysierten Zellen und die denaturierte genomische DNA 9 min bei 8500 Upm abzentrifugiert (Heraeus Biofuge 15) und danach mit einem sterilen Zahnstocher aus der wässrigen Lösung entfernt. Die Reinigung der Plasmid-DNA erfolgte durch Fällung mit 30 µl 3 M Na-Acetat (Minilysat III), pH 4,8 und 500 µl Isopropanol bei RT für 5 min und anschließender Zentrifugation für 15 min bei 13.000 Upm (Heraeus Biofuge 15). Das Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen und nach Trocknung in 100 µl TE-Puffer mit 50 µg/ml RNase A aufgenommen und bei 50°C gelöst. Mit dieser Methode gelang es routinemäßig, aus 1,5 ml Übernachtskultur etwa 50 µg Plasmid-DNA zu isolieren.

Material und Methoden

STET-Puffer

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

Lysozym-Lösung

10 mg/ml Lysozym
in 1x TE-Puffer

Minilysat(III)-Lösung

3 M NaAc, pH 4,8
in H₂O_{bid.}

Isolierung genomischer DNA aus *U. maydis* mit Hilfe der „alternativen Präp-Methode“ (M. Vranes)

Für die Isolierung genomischer DNA aus *Ustilago maydis* wurden 2,5 ml Kulturen über Nacht in Yeps_{light} bei 28°C im Roller kultiviert, danach in 2 ml Reaktionsgefäße gegeben (Glaskugeln vorlegen), abzentrifugiert (1 min, 13.000 Upm, Heraeus Biofuge pico) und der Überstand wurde abgenommen. Zum Pellet wurden 500 µl Lysis-Puffer (50:50 mit 1x TE-Puffer gemischt) gegeben und die Zellen wurden 10-15 min auf einem Vibrax-Schüttler (1400 Upm) aufgeschlossen. Danach wurden die Zelltrümmer zuerst 15 min bei 65°C aufgeköcht und danach für 5 min auf Eis inkubiert. Zur Aussalzung der Proteine wurden 100 µl 8M Kaliumacetat zugegeben, gut gevortext oder 8-10 x invertiert und anschließend die Zelltrümmer bei 14.000 Upm für 15 min abzentrifugiert (Raumtemperatur, Eppendorf Centrifuge 5417R). 500 µl des Überstands wurden in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben, in dem bereits 300 µl Isopropanol vorgelegt worden waren. Nach sehr gutem Mischen (8-10x invertieren oder vortexen) wurde die DNA bei einem weiteren Zentrifugationsschritt (15 min, 13.000 Upm, Raumtemperatur, Heraeus Biofuge pico) ausgefällt. Anschließend wurde das Pellet einmal mit 500-1000 µl 70% Ethanol gewaschen (5 min, 13.000 Upm) und danach erneut für ca. 5 sec anzentrifugiert, um restliche Flüssigkeiten zu entfernen. Das Pellet wurde 3- 5 min bei Raumtemperatur getrocknet und danach in 50 µl TE-Puffer mit 50 µg/ml RNaseA aufgenommen. Anschließend wurde die DNA bei 50°C und 850 Upm für 20 min in einem Eppendorf-Thermomixer gelöst. Zur Qualitätskontrolle wurde 1 µl der genomischen DNA auf ein 0,8 %-iges Agarosegel aufgetragen und analysiert.

***Ustilago* Lysis-Puffer:** 1% (w/v) SDS, 50 mM Tris-Cl, pH 7,5, 50 mM Na₂-EDTA, pH 8,0 in H₂O_{bid.}

RNA-Isolierung nach der Trizol –Methode

Diese Methode orientiert sich am Protokoll der Firma Invitrogen und wurde zur Präparation von Gesamt-RNA aus *U. maydis*-Flüssigkulturen verwendet. 25 ml Flüssig-Zellkultur (OD₆₀₀ ≈ 0,8) wurden pelletiert (3.500 Upm, 5 min, RT), der Überstand verworfen und das Pellet in flüssigem Stickstoff schockgefroren (ggf. Aufbewahrung bei -80°C.). Auf das in flüssigem Stickstoff tiefgefrorene und zu feinem Pulver gemörserte Pilzmaterial wurden pro 1 gr 10 ml Trizol gegeben, gut gemischt und für 10 min bei RT inkubiert.

Auf das tiefgefrorene Zellpellet wurde 1 ml Trizol pipettiert, dieser Ansatz kurz gevortext und nach Zugabe von ca. 0,3 g Glasperlen für 5 min auf einer Retsch- Kugelmühle bei 25 Hz aufgeschlossen. Nach Inkubation bei RT für 5 min wurden pro ml Trizol 200 µl Chloroform zugegeben. Alle weiteren Angaben sind pro ml eingesetztem Trizol. Die Ansätze wurden anschließend kurz gevortext und 2-3 min bei RT inkubiert. Nach Zentrifugation (13.000 Upm, 4°C, 15 min) wurde die wässrige Phase abgenommen, in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und nach Zugabe von 500 µl Isopropanol 10 min bei RT gefällt. Nach erneuter Zentrifugation (13.000 Upm, 4°C, 10 min) wurde die pelletierte RNA mit 70% Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (13.000 Upm, 4°C, 5 min). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet für 5 min bei RT getrocknet, anschließend in 50 µl Nuclease-freiem H₂O (Ambion) aufgenommen und für 10 min bei 55°C resuspendiert. Eine Quantitäts- und Qualitätskontrolle erfolgte durch photometrische Messung am NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer sowie durch Analyse auf einem Agarose-Gel.

4.4.3 Auftrennung und Nachweis von Nukleinsäuren

Nicht-denaturierende Agarose-Gelelektrophorese

In Agarose-Gelen können Nukleinsäuren in einem elektrischen Feld gemäß ihrer Größe aufgetrennt werden (Sambrook *et al.*, 1989). Standardmäßig wurden Gele mit 0,8% (w/v) Agarose hergestellt. Für die Auftrennung von DNA-Fragmenten bis zu einer Größe von etwa 500 bp wurden 2%-ige Agarose- Gele verwendet. Die entsprechende Menge an Agarose wurde in 0,5x TBE-Puffer aufgeköcht, nach Abkühlung auf ca. 70°C mit Ethidiumbromid versetzt (f.c. 0,5 µg/ml) und in einen Elektrophorese- Schlitten gegossen. Nach Erstarren des Gels wurde die Gelkammer mit 0,5x TBE-Puffer gefüllt. Die Nukleinsäuren wurden vor dem Auftragen im Verhältnis 6:1 mit nativem Auftragspuffer versetzt. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Spannung von 5-10 V/cm. Die Banden konnten anschließend im UV-Durchlicht (254 nm) mit einer „eagle eye“-Apparatur (Stratagene) oder einem EBOX Video-Dokumentationssystem (Peqlab) detektiert und auf Thermalpapier fotografisch festgehalten werden. Für die Isolierung von Fragmenten aus Agarosegelen wurde das Gel stattdessen Zugabe von Ethidiumbromid nach Beendigung der Elektrophorese 30 min in einem GelStarTM (Lonza)-Färbebad inkubiert.

5x TBE-Puffer

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

6x Auftragspuffer, nativ

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

Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

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

Transfer von DNA (Southern-Blot)

Diese Methode ist modifiziert nach (Southern, 1975). Der Transfer der aufgetrennten DNA-Fragmente aus einem Agarosegel auf eine Nylonmembran erfolgte mittels Kapillar-Blot. Hierbei wird die Transfer-Lösung (20x SSC) 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 darüberliegende Nylonmembran (Hybond-N+, Amersham Pharmacia Biotech). Vor dem Transfer wurde das Agarosegel für jeweils 15 min in 0,25 M HCl, DENAT- und RENAT-Lösung inkubiert, um u.a. einen Teil der Purine abzuspalten und damit den Transfer großer DNA-Fragmente zu erleichtern. Der Kapillar-Blot erfolgte in der Regel über Nacht, mindestens jedoch für 2 h. Anschließend wurde die Membran kurz getrocknet und die DNA durch UV-Bestrahlung (Stratalinker 1800, Stratagene) fixiert.

Aufbau des Blots von unten nach oben:

- Whatman 3MM-Brücke zum Pufferreservoir
- Agarosegel
- Nylonmembran (Hybond N+)
- 2 Lagen Whatman 2 MM
- Stapel Papierhandtücher

DENAT-Lösung	RENAT-Lösung	SSC (20x)
1,5 M NaCl	1,5 M NaCl	3.0 M NaCl
0,4 M NaOH	282 mM Tris-HCl	0.3 M NatriumCitrat*2H ₂ O
in 1l H ₂ O _{bid.}	218 mM Tris-Base	in 1l H ₂ O _{bid.} , pH 7,0
	in 1l H ₂ O _{bid.}	

Der spezifische Nachweis immobilisierter 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 enthält:

6,6 µl DNA (0,5-1 µg in H₂O_{bid.})

1 µl 10x DIG-Mix (Jena Bioscience, siehe Herstellerangaben)

1 µl 10x Octadeoxyribonukleotide in Markierungspuffer (New England Biolabs)

1 µl BSA (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. Statt Hitzinaktivierung und anschließender Fällung wurde das Gemisch mit 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 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.

DIG 1

0,1 M Maleinsäure
0,15 M NaCl
in 1l H₂O_{bid.} pH 7,5

DIG-Waschpuffer

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

DIG 2

10 % (v/v) Blockierungslösung
in DIG 1

Southern-

Hybridisierungspuffer

500mM Natriumphosphatpuffer,
pH 7,0
7% (w/v) SDS
in 1l H₂O_{bid.}

DIG 3

0,1 M Maleinsäure
0,1 M NaCl
0,05 M MgCl₂
in 1l H₂O_{bid.} pH 9,5

SSPE

3 mM NaCl
227 mM Na₂HPO₄xH₂O
20 mM Na₂-EDTAx2H₂O
in 1l H₂O_{bid.} pH 7,4

4.5 PCR-Methoden

4.5.1 Standard-PCR-Ansätze

Die Methode ist modifiziert nach (Innis *et al.*, 1990). Ein typischer PCR-Ansatz enthielt etwa 10 ng Template-DNA, die beiden Oligonukleotide in einer Endkonzentration von 1 μ M, dNTPs in einer Endkonzentration von 200 μ M (d. h. je 200 μ M dATP, dCTP, dGTP und dTTP) in PCR- Puffer. Durch eine PCR bietet sich die Möglichkeit, definierte DNA-Bereiche selektiv zu amplifizieren. Hierfür sind zwei Oligonukleotide (Primer) nötig, von denen einer zum 3'-Bereich der gewünschten Sequenz, der andere zum Gegenstrang des 5'-Bereichs komplementär ist. Alle PCR Reaktionen wurden in einem PTC-100 Thermal Cycler (MJ Research) oder einem T100 Thermal Cycler (BioRad) durchgeführt.

Es wurden folgende Ansätze verwendet:

100 ng Matrizen-DNA
2 U Taq-DNA-Polymerase
1 μ l 10 mM dNTPs
0,5 μ l je Primer (50 pmol/ μ l)
in 50 μ l PCR-Puffer

Initiale Denaturierung: 95 °C / 10 min

Amplifikation: 95 °C / 1 min
(30 Zyklen) x °C / 1 min
72 °C / y min

Finale Elongation: 72 °C / 10 min

Die Anlagerungstemperatur x entspricht der niedrigsten Schmelztemperatur der verwendeten Oligonukleotide, die Elongationszeit y entspricht 1 Minute pro 1000 bp des zu amplifizierenden Produkts.

PHUSION/Q5-Polymerase -Protokoll

Für die Amplifikation genomischer Fragmente von *U. maydis* oder die Amplifikation von Fragmenten, welche für Klonierungsschritte benötigt wurden, wurde die Phusion oder Q5 Polymerase (NEB) verwendet, welche sich durch eine hohe Prozessivität und niedrige Fehleranfälligkeit auszeichnen.

100ng Matrizen-DNA (genomisch) bzw. 5ng Matrizen-DNA (Plasmid)
 1 U Polymerase
 1 µl 10 mM dNTPs
 0,3 µl je Primer (100 pmol/µl)
 10 µl empfohlener Puffer (5x)
 mit H₂O auf 50 µl Gesamtvolumen auffüllen

Initiale Denaturierung: 98 °C / 30 sec

Amplifikation: 98 °C / 10 sec
 (30-33 Zyklen) x °C / 15 sec
 72 °C / y sec

Finale Elongation: 72 °C / 10 min

Die Anlagerungstemperatur x entspricht der niedrigsten Schmelztemperatur der verwendeten Oligonukleotide + 3 °C, die Elongationszeit y entspricht 15 Sekunden pro 1000 bp des zu amplifizierenden Produkts.

ORF-PCR

Bei der ORF-PCR werden kleine Fragmente aus dem offenen Leserahmen eines Gens amplifiziert. Ziel ist es in Transformanten von Deletionskonstrukten zu überprüfen, ob der ORF noch vorhanden ist oder nicht. Die Oligonukleotide sollten optimalerweise einen Bereich von 100-200 bp abdecken. Zur internen Kontrolle bietet sich ein zweites Primerpaar an, das einen etwas größeren oder kleineren Bereich amplifiziert. Der Ansatz und das Programm erfolgte analog zu „Phusion/Q5-Polymerase-PCR“, jedoch enthielt jede Reaktion vier statt zwei Oligonukleotide. Die Produkte müssen auf einem 2% Agarose-Gel aufgetrennt werden.

4.5.2 PCR-Generierung von Gen-Deletions- Konstrukten für *U. maydis*

Mit dieser Methode (Kämper, 2004) können gezielt offene Leserahmen von Genen bekannter Sequenz in *U. maydis* deletiert werden. Man bedient sich hierbei des Mechanismus der homologen Rekombination über die angrenzenden genomischen Flanken. Eine Klonierung der Fragmente ist dabei nicht notwendig. Prinzipiell erfolgt eine PCR-Amplifikation des 5'- und 3'- gelegenen Bereichs des zu deletierenden Gens. Die Fragmente haben dabei etwa eine Länge von 1 kb. Über geeignete PCR-Primer wurden an den dem offenen Leseraster zugewandten Enden der Amplifikate *Sfi*I-Restriktionsschnittstellen eingebracht. Nach Restriktion der PCR-Produkte wird über die *Sfi*I-Restriktionsschnittstellen eine *Sfi*I-geschnittene Hygromycin- Resistenzkassette aus pBS-hhn direkt zwischen die

Material und Methoden

amplifizierten Flanken ligiert. Mit einer weiteren PCR mit den jeweiligen Außenprimern für die Flanken wird das komplette Deletionskonstrukt amplifiziert, aufgereinigt und für die Transformation in *U. maydis* verwendet. Für alle PCR-Amplifikationen wurde Phusion High-Fidelity DNA Polymerase oder die Q5-Polymerase (NEB) nach dem Herstellerprotokoll verwendet. Alle Änderungen im Bezug auf den in (Kämper *et al.*, 2004) publizierten Ablauf sind im Folgenden dargestellt. PCR-Amplifikation der Flanken: Amplifikation der linken Flanke (*left border*: lb): Ein Außenprimer lb1 und ein Innenprimer lb2 mit *SfiI*-Restriktionsschnittstelle werden zusammen mit genomischer DNA von *U. maydis* als Matrize in einer PCR-Reaktion eingesetzt. Die Produkte werden auf einem Agarosegel überprüft und das gewünschte DNA-Fragment, d. h. die linke (5'-) genomische Flanke des zu deletierenden Gens, über QiaQuick PCR Purification Säulen (Qiagen) aufgereinigt. Amplifikation der rechten Flanke (*right border*: rb): Ein Außenprimer rb1 und ein Innenprimer rb2 mit *SfiI*-Restriktionsschnittstelle werden zusammen mit genomischer DNA von *U. maydis* als Matrize in die PCR-Reaktion eingesetzt. Die Produkte werden auf einem Agarosegel überprüft und das gewünschte DNA-Fragment, d. h. die rechte (3'-) genomische Flanke des zu deletierenden Gens, über QiaQuick PCR Purification Säulen (Qiagen) aufgereinigt.

Für die PCR wurden Bedingungen gewählt, die sich aus den Parametern des Herstellerprotokolls und der Primer ergeben (i.d.R. 15 s/kb Extensionszeit, 30-35 Zyklen). Die eluierten Flanken wurden anschließend mit *SfiI* nachgeschnitten. (20 Units; 2 h, 50°C, Gesamtvolumen: 20-50 µl). Hiernach folgte eine Aufreinigung der restringierten Flanken über QiaQuick PCR Purification MinElute-Säulen (Qiagen). Im Anschluß erfolgte die Ligation der Flanken mit der mit *SfiI*-restringierten Resistenzkassette. Nach zweistündiger Ligation bei RT wurde der Ligationsansatz über ein 0,8%iges TBE-Agarosegel aufgetrennt, die 4 kb-Bande aufgereinigt und als Matrize in die abschließende PCR eingesetzt. Hierbei wurden Nested-Primer verwendet, um eine effiziente Amplifikation des Deletionskonstruktes zu gewährleisten. Nach der Fällung des PCR-Reaktionsgemisches wurde die DNA in 10 µl TE resuspendiert und anschließend für die Transformation eingesetzt. Das Konstrukt wurde in einen pCR2.1-Vektor („TOPO“, Invitrogen) ligiert, um es auszubewahren.

4.5.3 PCR-Generierung von Fusions- Konstrukten für *U. maydis*

Die Herstellung von Fusionskonstrukten am C-Terminus erfolgte Analog zur Herstellung von Deletions-Konstrukten (Kämper, 2004). Die linke Flanke muss jedoch ausgehend vom Stop-Codon des zu fusionierenden ORFs 1 kb in die 5'-Richtung beinhalten. Das Stop-Codon muss beim Design der Oligonukleotide ausgespart werden. Zur Verwendung des pUMa-Kassettensystems mit *SfiI*-Schnittstellen müssen noch 3 weitere Nukleotide zwischen dem ORF und der *SfiI*-Schnittstelle eingefügt werden, um den Leserahmen beizubehalten. Die linke Flanke, die den zu fusionierenden ORF enthält, muss sequenziert werden. Die rechte Flanke und sämtliche weitere Klonierungsschritte sind in 4.4.2. beschrieben.

4.5.4 Herstellung der fluoreszenten Proteine mEos und tdEOs

Die natürlich vorkommende Form der Eos-Proteine ist tetramerisch. Die Wildtypform musste durch mehrere Mutationen prozessiert werden. Das Gen wurde für *U. maydis* di-codon optimiert von der Firma Eurofins Genomics synthetisiert (Zarnack *et al.*, 2006). Bei der Synthese wurden neben *NcoI*- und *NotI*-Schnittstellen zur weiteren Klonierung eine Mutation (T158R) eingefügt. Der Aminosäureaustausch T158R führt zu Bildung funktioneller Dimere, da die Bindung zwischen den Untereinheiten A und C verhindert wird (Nienhaus *et al.*, 2006). Analog zur Publikation Nienhaus *et al.*, 2006 wurden die synthetisierten Eos-Moleküle über PCR mit einem 12 AS langer Linker verknüpft, um ein Tandem-Dimer zu bilden (Wiedenmann *et al.*, 2004, Nienhaus *et al.*, 2006). Für eine Expression als monomeres Eos musste in die synthetisierte Version noch eine weitere Mutation (V123T) über *site directed mutagenesis* PCR eingebracht werden. Der Aminosäureaustausch V123T führt in Kombination mit der schon vorhandenen Mutation T158R zu Inhibition der Oligomerisierung (Nienhaus *et al.*, 2006). Um die Emission der fluoreszenten Proteine zu testen, wurden die mEos- und tdEos-Moleküle in einem p123-Vektor exprimiert, was zu zytoplasmatischer Fluoreszenz führt (pBL4/5, Lotz, 2015).

Die Expression von Num1:mEos2 erfolgte unter dem P_{Hxt10,5kb}-Promotor (Schuler *et al.*, 2015, Optimierung D. Schuler und M. Vranes pers. Mitteilung).

4.5.5 DNase I-Behandlung und Reverse Transkription (für Real-Time-PCR)

Für die reverse Transkription wurde zunächst die isolierte Gesamt-RNA mit Turbo DNase I (Ambion) behandelt, um DNA-Kontaminationen zu entfernen. Hierbei wurde nach Herstellerprotokoll vorgegangen. Für die Reverse Transkription wurde das RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit der Firma Thermo Fischer nach Herstellerprotokoll verwendet. Für die reverse Transkription von Gesamt-RNA, die aus *U. maydis* Flüssigkulturen extrahiert wurde, wurden 2,2 µg DNase-behandelter RNA eingesetzt und zusammen mit Oligo(dT)-Primern, den entsprechenden Puffern und Enzymgemischen (siehe Herstellerprotokoll) für die Erststrang-cDNA-Synthese bei 42°C für 60 min inkubiert.

4.5.6 Real-Time-PCR (qRT-PCR)

Real-time PCR wurden mit Hilfe des MESA GREEN qPCR Master Mix plus für SYBR Assay + Fluorescein (Eurogentech) verwendet und nach Herstellerangaben durchgeführt. Für die PCR Reaktion wurde 1 µl der synthetisierten cDNA eingesetzt (s.o.). Die Reaktionen erfolgten in einem BioRad CFX96-System unter der Verwendung des folgenden Programms:

Initiale Denaturierung:	95 °C / 5 min
Amplifikation:	95 °C / 15 sec
(45 Zyklen)	62 °C / 20 sec
	72 °C / 40 sec

Material und Methoden

Im Anschluss hieran 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

ABENZA, J. F., GALINDO, A., PANTAZOPOULOU, A., GIL, C., DE LOS RIOS, V., UND PENALVA, M. A. (2010). Aspergillus RabB Rab5 integrates acquisition of degradative identity with the long distance movement of early endosomes. *Mol Biol Cell* **21**, 2756-2769.

ABENZA, J. F., GALINDO, A., PINAR, M., PANTAZOPOULOU, A., DE LOS RIOS, V., UND PENALVA, M. A. (2012). Endosomal maturation by Rab conversion in *Aspergillus nidulans* is coupled to dynein-mediated basipetal movement. *Mol Biol Cell* **23**, 1889-1901.

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

AL-BASSAM, J., VAN BREUGEL, M., HARRISON, S. C., UND HYMAN, A. (2006). Stu2p binds tubulin and undergoes an open-to-closed conformational change. *J Cell Biol* **172**, 1009-1022.

ALBERTSON, R., RIGGS, B., UND SULLIVAN, W. (2005). Membrane traffic: a driving force in cytokinesis. *Trends Cell Biol* **15**, 92-101.

ALFARO-ACO, R., UND PETRY, S. (2015). Building the Microtubule Cytoskeleton Piece by Piece. *J Biol Chem* **290**, 17154-17162.

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

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.

BALDERHAAR, H. J., LACHMANN, J., YAVAVLI, E., BROCKER, C., LURICK, A., UND UNGERMANN, C. (2013). The CORVET complex promotes tethering and fusion of Rab5/Vps21-positive membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 3823-3828.

BALDERHAAR, H. J., UND UNGERMANN, C. (2013). CORVET and HOPS tethering complexes - coordinators of endosome and lysosome fusion. *J Cell Sci* **126**, 1307-1316.

BANTA, L. M., ROBINSON, J. S., KLIONSKY, D. J., UND EMR, S. D. (1988). Organelle assembly in yeast: characterization of yeast mutants defective in vacuolar biogenesis and protein sorting. *J Cell Biol* **107**, 1369-1383.

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.

BARR, F., UND LAMBRIGHT, D. G. (2010). Rab GEFs and GAPs. *Curr Opin Cell Biol* **22**, 461-470.

BARTNICKI-GARCIA, S., BARTNICKI, D. D., GIERZ, G., LOPEZ-FRANCO, R., UND BRACKER, C. E. (1995). Evidence that Spitzenkörper behavior determines the shape of a fungal hypha: a test of the hyphoid model. *Exp Mycol* **19**, 153-159.

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

BECHT, P., KÖNIG, J., UND FELDBRÜGGE, M. (2006). The RNA-binding protein Rrm4 is essential for polarity in *Ustilago maydis* and shuttles along microtubules. *J Cell Sci* **119**, 4964-4973.

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.

BIELSKA, E., HIGUCHI, Y., SCHUSTER, M., STEINBERG, N., KILARU, S., TALBOT, N. J., UND STEINBERG, G. (2014a). Long-distance endosome trafficking drives fungal effector production during plant infection. *Nat Commun* **5**, 5097.

BIELSKA, E., SCHUSTER, M., ROGER, Y., BEREPIKI, A., SOANES, D. M., TALBOT, N. J., UND STEINBERG, G. (2014b). Hook is an adapter that coordinates kinesin-3 and dynein cargo attachment on early endosomes. *J Cell Biol* **204**, 989-1007.

BÖLKER, M. (2001). *Ustilago maydis*--a valuable model system for the study of fungal dimorphism and virulence. *Microbiology* **147**, 1395-1401.

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. (2001) Die frühe Infektionsphase von *Ustilago maydis*: Genregulation durch das bW/bE-Heterodimer. München, Ludwig-Maximilians-Universität., Ludwig-Maximilians-Universität, München.

BRACHMANN, A., KONIG, J., JULIUS, C., UND FELDBRÜGGE, M. (2004). A reverse genetic approach for generating gene replacement mutants in *Ustilago maydis*. *Mol Genet Genomics* **272**, 216-226.

BRADY, S. T. (1985). A novel brain ATPase with properties expected for the fast axonal transport motor. *Nature* **317**, 73-75.

BUCCI, C., PARTON, R. G., MATHER, I. H., STUNNENBERG, H., SIMONS, K., HOFACK, B., UND ZERIAL, M. (1992). The small GTPase rab5 functions as a regulatory factor in the early endocytic pathway. *Cell* **70**, 715-728.

CABRERA, M., ARLT, H., EPP, N., LACHMANN, J., GRIFFITH, J., PERZ, A., REGGIORI, F., UND UNGERMANN, C. (2013). Functional separation of endosomal fusion factors and the class C core vacuole/endosome tethering (CORVET) complex in endosome biogenesis. *J Biol Chem* **288**, 5166-5175.

CAPALBO, L., D'AVINO, P. P., ARCHAMBAULT, V., UND GLOVER, D. M. (2011). Rab5 GTPase controls chromosome alignment through Lamin disassembly and relocation of the NuMA-like protein Mud to the poles during mitosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 17343-17348.

CARNEY, D. S., DAVIES, B. A., UND HORAZDOVSKY, B. F. (2006). Vps9 domain-containing proteins: activators of Rab5 GTPases from yeast to neurons. *Trends Cell Biol* **16**, 27-35.

CHABIN-BRION, K., MARCELLER, J., PEREZ, F., SETTEGRANA, C., DRECHOU, A., DURAND, G., UND POUS, C. (2001). The Golgi complex is a microtubule-organizing organelle. *Mol Biol Cell* **12**, 2047-2060.

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.

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, P. H., LEE, C. I., WENG, Y. T., TARN, W. Y., TSAO, Y. P., KUO, P. C., HSU, P. H., HUANG, C. W., HUANG, C. S., LEE, H. H., et al. (2013). BCAS2 is essential for Drosophila viability and functions in pre-mRNA splicing. *RNA* **19**, 208-218.

CHENG, S. C., TARN, W. Y., TSAO, T. Y., UND ABELSON, J. (1993). PRP19: a novel spliceosomal component. *Mol Cell Biol* **13**, 1876-1882.

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.

DI VENTURA, B., UND KUHLMAN, B. (2016). Go in! Go out! Inducible control of nuclear localization. *Curr Opin Chem Biol* **34**, 62-71.

EFIMOV, V. P., ZHANG, J., UND XIANG, X. (2006). CLIP-170 homologue and NUDE play overlapping roles in NUDF localization in *Aspergillus nidulans*. *Mol Biol Cell* **17**, 2021-2034.

EGAN, M. J., MCCLINTOCK, M. A., UND RECK-PETERSON, S. L. (2012). Microtubule-based transport in filamentous fungi. *Curr Opin Microbiol* **15**, 637-645.

ENKE, C., ZEKERT, N., VEITH, D., SCHAAF, C., KONZACK, S., UND FISCHER, R. (2007). *Aspergillus nidulans* Dis1/XMAP215 protein AlpA localizes to spindle pole bodies and microtubule plus ends and contributes to growth directionality. *Eukaryot Cell* **6**, 555-562.

FELDBRÜGGE, M., KÄMPER, J., STEINBERG, G., UND KAHMANN, R. (2004). Regulation of mating and pathogenic development in *Ustilago maydis*. *Curr Opin Microbiol* **7**, 666-672.

FELDBRÜGGE, M., ZARNACK, K., VOLLMEISTER, E., BAUMANN, S., KOEPKE, J., KÖNIG, J., MÜNSTERKOTTER, M., UND MANNHAUPT, G. (2008). The posttranscriptional machinery of *Ustilago maydis*. *Fungal Genet Biol* **45 Suppl 1**, S40-46.

FELIX, M. A., ANTONY, C., WRIGHT, M., UND MARO, B. (1994). Centrosome assembly in vitro: role of gamma-tubulin recruitment in *Xenopus* sperm aster formation. *J Cell Biol* **124**, 19-31.

FINDEISEN, P., MUHLHAUSEN, S., DEMPEWOLF, S., HERTZOG, J., ZIETLOW, A., CARLOMAGNO, T., UND KOLLMAR, M. (2014). Six subgroups and extensive recent duplications characterize the evolution of the eukaryotic tubulin protein family. *Genome Biol Evol* **6**, 2274-2288.

FINK, G., SCHUCHARDT, I., COLOMBELLI, J., STELZER, E., UND STEINBERG, G. (2006). Dynein-mediated pulling forces drive rapid mitotic spindle elongation in *Ustilago maydis*. *EMBO J* **25**, 4897-4908.

FINK, G., UND STEINBERG, G. (2006). Dynein-dependent motility of microtubules and nucleation sites supports polarization of the tubulin array in the fungus *Ustilago maydis*. *Mol Biol Cell* **17**, 3242-3253.

FISCHER, R., ZEKERT, N., UND TAKESHITA, N. (2008a). Polarized growth in fungi--interplay between the cytoskeleton, positional markers and membrane domains. *Mol Microbiol* **68**, 813-826.

FISCHER, R., ZEKERT, N., UND TAKESHITA, N. (2008b). Polarized growth in fungi--interplay between the cytoskeleton, positional markers and membrane domains. *Mol Microbiol* **68**, 813-826.

FUCHS, U., HAUSE, G., SCHUCHARDT, I., UND STEINBERG, G. (2006). Endocytosis is essential for pathogenic development in the corn smut fungus *Ustilago maydis*. *Plant Cell* **18**, 2066-2081.

- FUCHS, U., MANNS, I., UND STEINBERG, G.** (2005). Microtubules are dispensable for the initial pathogenic development but required for long-distance hyphal growth in the corn smut fungus *Ustilago maydis*. *Mol Biol Cell* **16**, 2746-2758.
- 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.
- GNAZZO, M. M., UND SKOP, A. R.** (2014). Spindlegate: the biological consequences of disrupting traffic. *Dev Cell* **28**, 480-482.
- GOHRE, V., VOLLMEISTER, E., BOLKER, M., UND FELDBRUGGE, M.** (2012). Microtubule-dependent membrane dynamics in *Ustilago maydis*: Trafficking and function of Rab5a-positive endosomes. *Commun Integr Biol* **5**, 485-490.
- GRILL, S. W., HOWARD, J., SCHAFFER, E., STELZER, E. H., UND HYMAN, A. A.** (2003). The distribution of active force generators controls mitotic spindle position. *Science* **301**, 518-521.
- 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.
- GRÜN, N.** (2015) Untersuchung des Mikrotubuli-abhängigen Vesikeltransports und der Tubulin-Detyrosinierung in *Aspergillus nidulans*, KIT Karlsruhe, Karlsruhe.
- GUO, M., KILARU, S., SCHUSTER, M., LATZ, M., UND STEINBERG, G.** (2015). Fluorescent markers for the Spitzenkörper and exocytosis in *Zyoseptoria tritici*. *Fungal Genet Biol* **79**, 158-165.
- HAAG, C., STEUTEN, B., UND FELDBRUGGE, M.** (2015). Membrane-Coupled mRNA Trafficking in Fungi. *Annu Rev Microbiol* **69**, 265-281.
- HABERMANN, B.** (2004). The BAR-domain family of proteins: a case of bending and binding? *EMBO Rep* **5**, 250-255.
- HARRIS, S. D.** (2006). Cell polarity in filamentous fungi: shaping the mold. *Int Rev Cytol* **251**, 41-77.
- HARRIS, S. D., UND MOMANY, M.** (2004). Polarity in filamentous fungi: moving beyond the yeast paradigm. *Fungal Genet Biol* **41**, 391-400.
- HASSINGER, S.** (2015) Das Num1-Protein stabilisiert den Spleißosom-assozierten NineTeen-Komplex und erfüllt zusätzliche Funktionen in *Ustilago maydis*, Karlsruhe Institute of Technology.
- HEHNLY, H., UND DOXSEY, S.** (2014). Rab11 endosomes contribute to mitotic spindle organization and orientation. *Dev Cell* **28**, 497-507.
- HEITZ, M. J., PETERSEN, J., VALOVIN, S., UND HAGAN, I. M.** (2001). MTOC formation during mitotic exit in fission yeast. *J Cell Sci* **114**, 4521-4532.
- HIGUCHI, Y., ASHWIN, P., ROGER, Y., UND STEINBERG, G.** (2014). Early endosome motility spatially organizes polysome distribution. *J Cell Biol* **204**, 343-357.
- HOELZ, A., DEBLER, E. W., UND BLOBEL, G.** (2011). The structure of the nuclear pore complex. *Annu Rev Biochem* **80**, 613-643.
- HOGG, R., MCGRIL, 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. *Biochem Soc Trans* **38**, 1110-1115.

- HOLLIDAY, R. (1974). *Ustilago maydis*. In Handbook of Genetics, R. C. King, ed. (New York, USA, Plenum Press), pp. 575-595.
- HORAZDOVSKY, B. F., COWLES, C. R., MUSTOL, P., HOLMES, M., UND EMR, S. D. (1996). A novel RING finger protein, Vps8p, functionally interacts with the small GTPase, Vps21p, to facilitate soluble vacuolar protein localization. *J Biol Chem* **271**, 33607-33615.
- HORIO, T., UZAWA, S., JUNG, M. K., OAKLEY, B. R., TANAKA, K., UND YANAGIDA, M. (1991). The fission yeast gamma-tubulin is essential for mitosis and is localized at microtubule organizing centers. *J Cell Sci* **99 (Pt 4)**, 693-700.
- HUOTARI, J., UND HELENIUS, A. (2011). Endosome maturation. *EMBO J* **30**, 3481-3500.
- INNIS, M. A., GELFAND, D. H., SNINSKY, J. J., UND WHITE, T. J., eds. (1990). *PCR Protocols: a guide to methods and applications*. (San Diego, USA, Academic Press).
- ITO, H., FUKUDA, Y., MURATA, K., UND KIMURA, A. (1983). Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J Bacteriol* **153**, 163-168.
- JOLLY, A. L., UND GELFAND, V. I. (2011). Bidirectional intracellular transport: utility and mechanism. *Biochem Soc Trans* **39**, 1126-1130.
- JOSHI, H. C. (1994). Microtubule organizing centers and gamma-tubulin. *Curr Opin Cell Biol* **6**, 54-62.
- JOSHI, H. C., PALACIOS, M. J., MCNAMARA, L., UND CLEVELAND, D. W. (1992). Gamma-tubulin is a centrosomal protein required for cell cycle-dependent microtubule nucleation. *Nature* **356**, 80-83.
- KAHMANN, R., UND KÄMPER, J. (2004). *Ustilago maydis*: how its biology relates to pathogenic development. *New Phytol* **164**, 31-42.
- KÄMPER, J. (2004). A PCR-based system for highly efficient generation of gene replacement mutants in *Ustilago maydis*. *Mol Genet Genomics* **271**, 103-110.
- 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, KIT Karlsruhe, Karlsruhe.
- KELLNER, N., HEIMEL, K., OBHOF, T., FINKERNAGEL, F., UND KÄMPER, J. (2014). The SPF27 homologue Num1 connects splicing and kinesin 1-dependent cytoplasmic trafficking in *Ustilago maydis*. *PLoS Genet* **10**, e1004046.
- KILMARTIN, J. V. (2014). Lessons from yeast: the spindle pole body and the centrosome. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **369**.
- KIRSCHNER, M. W. (1978). Microtubule assembly and nucleation. *Int Rev Cytol* **54**, 1-71.
- KLIONSKY, D. J., HERMAN, P. K., UND EMR, S. D. (1990). The fungal vacuole: composition, function, and biogenesis. *Microbiol Rev* **54**, 266-292.
- 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.
- KRON, S. J., UND GOW, N. A. (1995). Budding yeast morphogenesis: signalling, cytoskeleton and cell cycle. *Curr Opin Cell Biol* **7**, 845-855.

LANGNER, T. (2015) Charakterisierung der chitinolytischen Maschinerie aus *Ustilago maydis*, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Düsseldorf.

LANZETTI, L. (2012). A novel function of Rab5 in mitosis. *Small GTPases* **3**, 168-172.

LEHMLER, C., STEINBERG, G., SNETSELAAR, K., SCHLIWA, M., KAHMANN, R., UND BÖLKER, M. (1997). Identification of a motor protein required for filamentous growth in *Ustilago maydis*. *EMBO J* **16**, 3464-3473.

LENZ, J. H., SCHUCHARDT, I., STRAUBE, A., UND STEINBERG, G. (2006). A dynein loading zone for retrograde endosome motility at microtubule plus-ends. *EMBO J* **25**, 2275-2286.

LI, Y., ISHITSUKA, Y., HEDDE, P. N., UND NIENHAUS, G. U. (2013). Fast and efficient molecule detection in localization-based super-resolution microscopy by parallel adaptive histogram equalization. *ACS Nano* **7**, 5207-5214.

LIGON, L. A., TOKITO, M., FINKLESTEIN, J. M., GROSSMAN, F. E., UND HOLZBAUR, E. L. (2004). A direct interaction between cytoplasmic dynein and kinesin I may coordinate motor activity. *J Biol Chem* **279**, 19201-19208.

LIN, T. C., NEUNER, A., UND SCHIEBEL, E. (2015). Targeting of gamma-tubulin complexes to microtubule organizing centers: conservation and divergence. *Trends Cell Biol* **25**, 296-307.

LOTZ, B. (2015) Etablierung eines photokonvertierbaren Fluorophors für Super-resolution Mikroskopie in *U. maydis*, KIT Karlsruhe, Karlsruhe.

MAKINO, R., UND KAMADA, T. (2004). Isolation and characterization of mutations that affect nuclear migration for dikaryosis in *Coprinus cinereus*. *Curr Genet* **45**, 149-156.

MANCK, R., ISHITSUKA, Y., HERRERO, S., TAKESHITA, N., NIENHAUS, G. U., UND FISCHER, R. (2015). Genetic evidence for a microtubule-capture mechanism during polarised growth of *Aspergillus nidulans*. *J Cell Sci* **128**, 3569-3582.

MATEI, A., UND DOEHLEMANN, G. (2016). Cell biology of corn smut disease-*Ustilago maydis* as a model for biotrophic interactions. *Curr Opin Microbiol* **34**, 60-66.

McKINNEY, S. A., MURPHY, C. S., HAZELWOOD, K. L., DAVIDSON, M. W., UND LOOGER, L. L. (2009). A bright and photostable photoconvertible fluorescent protein. *Nat Methods* **6**, 131-133.

McTAGGART, A. R., SHIVAS, R. G., BOEKHOUT, T., OBERWINKLER, F., VANKY, K., PENNYCOOK, S. R., UND BEGEROW, D. (2016). Mycosarcoma (Ustilaginaceae), a resurrected generic name for corn smut (*Ustilago maydis*) and its close relatives with hypertrophied, tubular sori. *IMA Fungus* **7**, 309-315.

MELCER, S., GRUENBAUM, Y., UND KROHNE, G. (2007). Invertebrate lamins. *Exp Cell Res* **313**, 2157-2166.

MISEREY-LENKEI, S., UND COLOMBO, M. I. (2016). Small RAB GTPases Regulate Multiple Steps of Mitosis. *Front Cell Dev Biol* **4**, 2.

MOSTOWY, S., UND COSSART, P. (2012). Septins: the fourth component of the cytoskeleton. *Nat Rev Mol Cell Biol* **13**, 183-194.

NABI, I. R. (1999). The polarization of the motile cell. *J Cell Sci* **112 (Pt 12)**, 1803-1811.

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 Lett* **140**, 219-226.

- NAKANO, A.** (2002). Spinning-disk confocal microscopy -- a cutting-edge tool for imaging of membrane traffic. *Cell Struct Funct* **27**, 349-355.
- NAYAK, T., SZEWCZYK, E., OAKLEY, C. E., OSMANI, A., UKIL, L., MURRAY, S. L., HYNES, M. J., OSMANI, S. A., UND OAKLEY, B. R.** (2006). A versatile and efficient gene-targeting system for *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **172**, 1557-1566.
- NIENHAUS, G. U., NIENHAUS, K., HOLZLE, A., IVANCHENKO, S., RENZI, F., OSWALD, F., WOLFF, M., SCHMITT, F., ROCKER, C., VALLONE, B., et al.** (2006). Photoconvertible fluorescent protein EosFP: biophysical properties and cell biology applications. *Photochem Photobiol* **82**, 351-358.
- NIENHAUS, K., NIENHAUS, G. U., WIEDENMANN, J., UND NAR, H.** (2005). Structural basis for photo-induced protein cleavage and green-to-red conversion of fluorescent protein EosFP. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 9156-9159.
- O'CONNELL, C. B., UND WANG, Y. L.** (2000). Mammalian spindle orientation and position respond to changes in cell shape in a dynein-dependent fashion. *Mol Biol Cell* **11**, 1765-1774.
- OAKLEY, B. R., OAKLEY, C. E., YOON, Y., UND JUNG, M. K.** (1990). Gamma-tubulin is a component of the spindle pole body that is essential for microtubule function in *Aspergillus nidulans*. *Cell* **61**, 1289-1301.
- OAKLEY, C. E., UND OAKLEY, B. R.** (1989). Identification of gamma-tubulin, a new member of the tubulin superfamily encoded by *mipA* gene of *Aspergillus nidulans*. *Nature* **338**, 662-664.
- ORT, M.** (2011) Die funktionelle Charakterisierung der „NineTeen“-Komplex-assoziierten Proteine Prp19 und Cef1 in *Ustilago maydis*, KIT Karlsruhe, Karlsruhe.
- OSTROWICZ, C. W., BROCKER, C., AHNERT, F., NORDMANN, M., LACHMANN, J., PEPLOWSKA, K., PERZ, A., AUFFARTH, K., ENGELBRECHT-VANDRE, S., UND UNGERMANN, C.** (2010). Defined subunit arrangement and rab interactions are required for functionality of the HOPS tethering complex. *Traffic* **11**, 1334-1346.
- PANTAZOPOULOU, A., PINAR, M., XIANG, X., UND PENALVA, M. A.** (2014). Maturation of late Golgi cisternae into RabE(RAB11) exocytic post-Golgi carriers visualized in vivo. *Mol Biol Cell* **25**, 2428-2443.
- PENALVA, M. A.** (2010). Endocytosis in filamentous fungi: Cinderella gets her reward. *Curr Opin Microbiol* **13**, 684-692.
- PENALVA, M. A., ZHANG, J., XIANG, X., UND PANTAZOPOULOU, A.** (2017). Transport of fungal RAB11 secretory vesicles involves myosin-5, dynein/dynactin/p25 and kinesin-1 and is independent of kinesin-3. *Mol Biol Cell*.
- PEPLOWSKA, K., MARKGRAF, D. F., OSTROWICZ, C. W., BANGE, G., UND UNGERMANN, C.** (2007). The CORVET tethering complex interacts with the yeast Rab5 homolog Vps21 and is involved in endo-lysosomal biogenesis. *Dev Cell* **12**, 739-750.
- PETERSON, M. R., UND EMR, S. D.** (2001). The class C Vps complex functions at multiple stages of the vacuolar transport pathway. *Traffic* **2**, 476-486.
- PFEFFER, S. R.** (2013). Rab GTPase regulation of membrane identity. *Curr Opin Cell Biol* **25**, 414-419.
- PINTER, N.** (2012) Funktionelle Charakterisierung des Num1 Interaktionspartners Nma1 in *Ustilago maydis*, KIT Karlsruhe, Karlsruhe.
- PINTER, N.** (2015) Identifizierung von Interaktionspartnern des Mikrotubuli-assoziierten Proteins Nma1, KIT Karlsruhe, Karlsruhe.

PLEMEL, R. L., LOBINGIER, B. T., BRETT, C. L., ANGERS, C. G., NICKERSON, D. P., PAULSEL, A., SPRAGUE, D., UND MERZ, A. J. (2011). Subunit organization and Rab interactions of Vps-C protein complexes that control endolysosomal membrane traffic. *Mol Biol Cell* **22**, 1353-1363.

RAYMOND, C. K., HOWALD-STEVENSON, I., VATER, C. A., UND STEVENS, T. H. (1992). Morphological classification of the yeast vacuolar protein sorting mutants: evidence for a prevacuolar compartment in class E vps mutants. *Mol Biol Cell* **3**, 1389-1402.

REQUENA, N., ALBERTI-SEGUI, C., WINZENBURG, E., HORN, C., SCHLIWA, M., PHILIPPSEN, P., LIESE, R., UND FISCHER, R. (2001). Genetic evidence for a microtubule-destabilizing effect of conventional kinesin and analysis of its consequences for the control of nuclear distribution in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* **42**, 121-132.

ROTHMAN, J. E. (1996). The protein machinery of vesicle budding and fusion. *Protein Sci* **5**, 185-194.

ROYLE, S. J. (2013). Protein adaptation: mitotic functions for membrane trafficking proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol* **14**, 592-599.

SAMBROOK, J., FRISCH, E. F., UND MANIATIS, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbour, New York, Cold Spring Harbour Laboratory Press).

SAVILLE, B. J., DONALDSON, M.E., AND DOYLE, C.E. (2012). Investigating host induced meiosis in a fungal plant pathogen. In *Meiosis – Molecular Mechanisms and Cytogenetic Diversity.*, A. Swan, ed. (Rijeka, Croatia, InTech).

SCHEKMAN, R. (2002). Lasker Basic Medical Research Award. SEC mutants and the secretory apparatus. *Nat Med* **8**, 1055-1058.

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.

SCHINDELIN, J., ARGANDA-CARRERAS, I., FRISE, E., KAYNIG, V., LONGAIR, M., PIETZSCH, T., PREIBISCH, S., RUEDEN, C., SAALFELD, S., SCHMID, B., et al. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* **9**, 676-682.

SCHNEIDER, K. (2016) Funktion von Nma1 bei vesikulären Transportprozessen in *Ustilago maydis*, KIT Karlsruhe, Karlsruhe.

SCHOLEY, J. M., PORTER, M. E., GRISSOM, P. M., UND MCINTOSH, J. R. (1985). Identification of kinesin in sea urchin eggs, and evidence for its localization in the mitotic spindle. *Nature* **318**, 483-486.

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.

SCHULER, D. (2013) Charakterisierung der Akquisition von Kohlenhydraten in *Ustilago maydis*, KIT Karlsruhe, Karlsruhe.

SCHULER, D., WAHL, R., WIPPEL, K., VRANES, M., MÜNSTERKOTTER, M., SAUER, N., UND KÄMPER, J. (2015). Hxt1, a monosaccharide transporter and sensor required for virulence of the maize pathogen *Ustilago maydis*. *New Phytol* **206**, 1086-1100.

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. *Mol Biol 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. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 3618-3623.
- SCHUSTER, M., TREITSCHKE, S., KILARU, S., MOLLOY, J., HARMER, N. J., UND STEINBERG, G.** (2012). Myosin-5, kinesin-1 and myosin-17 cooperate in secretion of fungal chitin synthase. *EMBO J* **31**, 214-227.
- SEALS, D. F., EITZEN, G., MARGOLIS, N., WICKNER, W. T., UND PRICE, A.** (2000). A Ypt/Rab effector complex containing the Sec1 homolog Vps33p is required for homotypic vacuole fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 9402-9407.
- SERIO, G., MARGARIA, V., JENSEN, S., OLDANI, A., BARTEK, J., BUSSOLINO, F., UND LANZETTI, L.** (2011). Small GTPase Rab5 participates in chromosome congression and regulates localization of the centromere-associated protein CENP-F to kinetochores. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 17337-17342.
- SHARP, D. J., McDONALD, K. L., BROWN, H. M., MATTHIES, H. J., WALCZAK, C., VALE, R. D., MITCHISON, T. J., UND SCHOLEY, J. M.** (1999). The bipolar kinesin, KLP61F, cross-links microtubules within interpolar microtubule bundles of *Drosophila* embryonic mitotic spindles. *J Cell Biol* **144**, 125-138.
- SHIEL, A. I.** (2014) The microtubule cytoskeleton of the corn smut fungus *Ustilago maydis*. University of Exeter, Exeter.
- SINGER-KRUGER, B., STENMARK, H., DUSTERHOFT, A., PHILIPPSEN, P., YOO, J. S., GALLWITZ, D., UND ZERIAL, M.** (1994). Role of three rab5-like GTPases, Ypt51p, Ypt52p, and Ypt53p, in the endocytic and vacuolar protein sorting pathways of yeast. *J Cell Biol* **125**, 283-298.
- SKOP, A. R., BERGMANN, D., MOHLER, W. A., UND WHITE, J. G.** (2001). Completion of cytokinesis in *C. elegans* requires a brefeldin A-sensitive membrane accumulation at the cleavage furrow apex. *Curr Biol* **11**, 735-746.
- SOLDATI, T., SHAPIRO, A. D., SVEJSTRUP, A. B., UND PFEFFER, S. R.** (1994). Membrane targeting of the small GTPase Rab9 is accompanied by nucleotide exchange. *Nature* **369**, 76-78.
- SONG, Y., UND BRADY, S. T.** (2015). Post-translational modifications of tubulin: pathways to functional diversity of microtubules. *Trends Cell Biol* **25**, 125-136.
- STEINBERG, G.** (2007a). Hyphal growth: a tale of motors, lipids, and the Spitzenkörper. *Eukaryot Cell* **6**, 351-360.
- STEINBERG, G.** (2007b). Tracks for traffic: microtubules in the plant pathogen *Ustilago maydis*. *The New phytologist* **174**, 721-733.
- STEINBERG, G.** (2014). Endocytosis and early endosome motility in filamentous fungi. *Curr Opin Microbiol* **20**, 10-18.
- STEINBERG, G., SCHLIWA, M., LEHMLER, C., BÖLKER, 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. *The Journal of cell biology* **198**, 343-355.

- STEINBERG, G., WEDLICH-SOLDNER, R., BRILL, M., UND SCHULZ, I.** (2001). Microtubules in the fungal pathogen *Ustilago maydis* are highly dynamic and determine cell polarity. *J Cell Sci* **114**, 609-622.
- STENMARK, H.** (2009). Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**, 513-525.
- STRAUBE, A., BRILL, M., OAKLEY, B. R., HORIO, T., UND STEINBERG, G.** (2003). Microtubule organization requires cell cycle-dependent nucleation at dispersed cytoplasmic sites: polar and perinuclear microtubule organizing centers in the plant pathogen *Ustilago maydis*. *Mol Biol Cell* **14**, 642-657.
- STRAUBE, A., ENARD, W., BERNER, A., WEDLICH-SOLDNER, R., KAHMANN, R., UND STEINBERG, G.** (2001). A split motor domain in a cytoplasmic dynein. *EMBO J* **20**, 5091-5100.
- STRAUBE, A., HAUSE, G., FINK, G., UND STEINBERG, G.** (2006). Conventional kinesin mediates microtubule-microtubule interactions in vivo. *Mol Biol Cell* **17**, 907-916.
- STRAUBE, A., WEBER, I., UND STEINBERG, G.** (2005). A novel mechanism of nuclear envelope break-down in a fungus: nuclear migration strips off the envelope. *EMBO J* **24**, 1674-1685.
- SUBRAMANIAN, S., WOOLFORD, C. A., UND JONES, E. W.** (2004). The Sec1/Munc18 protein, Vps33p, functions at the endosome and the vacuole of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **15**, 2593-2605.
- SUELMANN, R., SIEVERS, N., UND FISCHER, R.** (1997). Nuclear traffic in fungal hyphae: in vivo study of nuclear migration and positioning in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* **25**, 757-769.
- TARN, W. Y., LEE, K. R., UND CHENG, S. C.** (1993). Yeast precursor mRNA processing protein PRP19 associates with the spliceosome concomitant with or just after dissociation of U4 small nuclear RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 10821-10825.
- TIRNAUER, J. S., UND BIERER, B. E.** (2000). EB1 proteins regulate microtubule dynamics, cell polarity, and chromosome stability. *J Cell Biol* **149**, 761-766.
- TSUKUDA, T., BAUCHWITZ, R., UND HOLLOMAN, W. K.** (1989). Isolation of the REC1 gene controlling recombination in *Ustilago maydis*. *Gene* **85**, 335-341.
- ULLRICH, O., HORIUCHI, H., BUCCI, C., UND ZERIAL, M.** (1994). Membrane association of Rab5 mediated by GDP-dissociation inhibitor and accompanied by GDP/GTP exchange. *Nature* **368**, 157-160.
- VALE, R. D., REESE, T. S., UND SHEETZ, M. P.** (1985). Identification of a novel force-generating protein, kinesin, involved in microtubule-based motility. *Cell* **42**, 39-50.
- VEITH, D., SCHERR, N., EFIMOV, V. P., UND FISCHER, R.** (2005a). Role of the spindle-pole-body protein ApsB and the cortex protein ApsA in microtubule organization and nuclear migration in *Aspergillus nidulans*. *J Cell Sci* **118**, 3705-3716.
- VEITH, D., SCHERR, N., EFIMOV, V. P., UND FISCHER, R.** (2005b). Role of the spindle-pole-body protein ApsB and the cortex protein ApsA in microtubule organization and nuclear migration in *Aspergillus nidulans*. *J Cell Sci* **118**, 3705-3716.
- VOLLMEISTER, E., SCHIPPER, K., BAUMANN, S., HAAG, C., POHLMANN, T., STOCK, J., UND FELDBRÜGGE, M.** (2012). Fungal development of the plant pathogen *Ustilago maydis*. *FEMS Microbiol Rev* **36**, 59-77.

- WEDLICH-SÖLDNER, R., BÖLKER, M., KAHMANN, R., UND STEINBERG, G.** (2000). A putative endosomal t-SNARE links exo- and endocytosis in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *EMBO J* **19**, 1974-1986.
- WEDLICH-SÖLDNER, R., STRAUBE, A., FRIEDRICH, M. W., UND STEINBERG, G.** (2002). A balance of KIF1A-like kinesin and dynein organizes early endosomes in the fungus *Ustilago maydis*. *EMBO J* **21**, 2946-2957.
- 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*. *EMBO J* **21**, 2946-2957.
- WIEDENMANN, J., IVANCHENKO, S., OSWALD, F., SCHMITT, F., ROCKER, C., SALIH, A., SPINDLER, K. D., UND NIENHAUS, G. U.** (2004). EosFP, a fluorescent marker protein with UV-inducible green-to-red fluorescence conversion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 15905-15910.
- WIESE, C., UND ZHENG, Y.** (2000). A new function for the gamma-tubulin ring complex as a microtubule minus-end cap. *Nat Cell Biol* **2**, 358-364.
- WURMSER, A. E., SATO, T. K., UND EMR, S. D.** (2000). New component of the vacuolar class C-Vps complex couples nucleotide exchange on the Ypt7 GTPase to SNARE-dependent docking and fusion. *J Cell Biol* **151**, 551-562.
- YELTON, M. M., HAMER, J. E., UND TIMBERLAKE, W. E.** (1984). Transformation of *Aspergillus nidulans* by using a *trpC* plasmid. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 1470-1474.
- ZANDER, S., BAUMANN, S., WEIDTKAMP-PETERS, S., UND FELDBRÜGGE, M.** (2016). Endosomal assembly and transport of heteromeric septin complexes promote septin cytoskeleton formation. *J Cell Sci* **129**, 2778-2792.
- ZARNACK, K., UND FELDBRÜGGE, M.** (2010). Microtubule-dependent mRNA transport in fungi. *Eukaryot Cell* **9**, 982-990.
- ZARNACK, K., MAURER, S., KAFFARNIK, F., LADENDORF, O., BRACHMANN, A., KÄMPER, J., UND FELDBRÜGGE, M.** (2006). Tetracycline-regulated gene expression in the pathogen *Ustilago maydis*. *Fungal Genet Biol* **43**, 727-738.
- ZEKERT, N., VEITH, D., UND FISCHER, R.** (2010). Interaction of the *Aspergillus nidulans* microtubule-organizing center (MTOC) component ApsB with gamma-tubulin and evidence for a role of a subclass of peroxisomes in the formation of septal MTOCs. *Eukaryot Cell* **9**, 795-805.
- ZERIAL, M., UND MCBRIDE, H.** (2001). Rab proteins as membrane organizers. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 107-117.
- ZHANG, H., SQUIRRELL, J. M., UND WHITE, J. G.** (2008). RAB-11 permissively regulates spindle alignment by modulating metaphase microtubule dynamics in *Caenorhabditis elegans* early embryos. *Mol Biol Cell* **19**, 2553-2565.
- ZHANG, J., LI, S., FISCHER, R., UND XIANG, X.** (2003). Accumulation of cytoplasmic dynein and dynactin at microtubule plus ends in *Aspergillus nidulans* is kinesin dependent. *Mol Biol Cell* **14**, 1479-1488.
- ZHANG, J., QIU, R., ARST, H. N., JR., PENALVA, M. A., UND XIANG, X.** (2014). HookA is a novel dynein-early endosome linker critical for cargo movement in vivo. *J Cell Biol* **204**, 1009-1026.

6 Appendix

6.1 Funktionelle Analyse von Num1-Interaktionspartnern

6.1.1 Die Lokalisierung von UMAG_03539 ist Num1-abhängig

Das Protein von UMAG_03539 wurde als Interaktionspartner von Num1 in einem Hefe-Zwei-Hybrid Screen identifiziert (Kellner, 2009). Es konnte eine BAR-Domäne identifiziert werden, die für Membran-Krümmung bei der Bildung von Vesikeln eine Rolle spielt (Habermann *et al.*, 2004). Vorarbeiten zeigten, dass die Deletion des Gens keinen Einfluss auf die Pathogenität von *U. maydis* hat bei der Infektion von Maispflanzen. Auch die Motilität Yup1-markierter früher Endosomen und das polare Wachstum von Filamenten war nicht beeinträchtigt (Kellner, 2012). Um die Lokalisierung von UMAG_03539 zu untersuchen, wurde das Gen von genomischer DNA amplifiziert und über eine Gateway-Reaktion in einen Destinations-Vektor für C-Terminale Fusionen mit GFP kloniert ($P_{hxt}:UMAG_{03539}:gfp:nosT$). Das Fusionsprotein unter dem konstitutiv aktiven P_{hxt} -Promotor wurde in AB31 Protoplasten ektopisch integriert und mikroskopisch analysiert. In Sporidien konnten diffuse GFP-Signale im Zytoplasma und eine deutliche Akkumulation an den Zellpolen und am Sprosshals (*bud neck*) beobachtet werden (Abb. 53). In Filamenten war eine UMAG_03539:gfp Akkumulation in der Hyphenspitze und zur Zellmitte schwächer werdende Konzentration der Proteine detektierbar (Abb. 53).

Die Deletion von *num1* hat in nicht-induzierten Sporidien keine Auswirkungen auf die Lokalisation der Fusionsproteine. In induzierten Filamenten ist jedoch neben den typischen $\Delta num1$ -Wachstumsdefekten {Kellner, 2014 #2823} eine Veränderung der Lokalisierung zu beobachten. Filamente mit Wildtyphintergrund wiesen eine Lokalisierung von UMAG_03539 an der Hyphenspitze auf, die Deletion von *num1* führte dagegen zu mehreren zusätzlichen Akkumulationen von UMAG_03539 im Zytoplasma. An den Zellpolen konnte nach wie vor ein Signal detektiert werden, dieses erschien jedoch reduziert (Abb. 53).

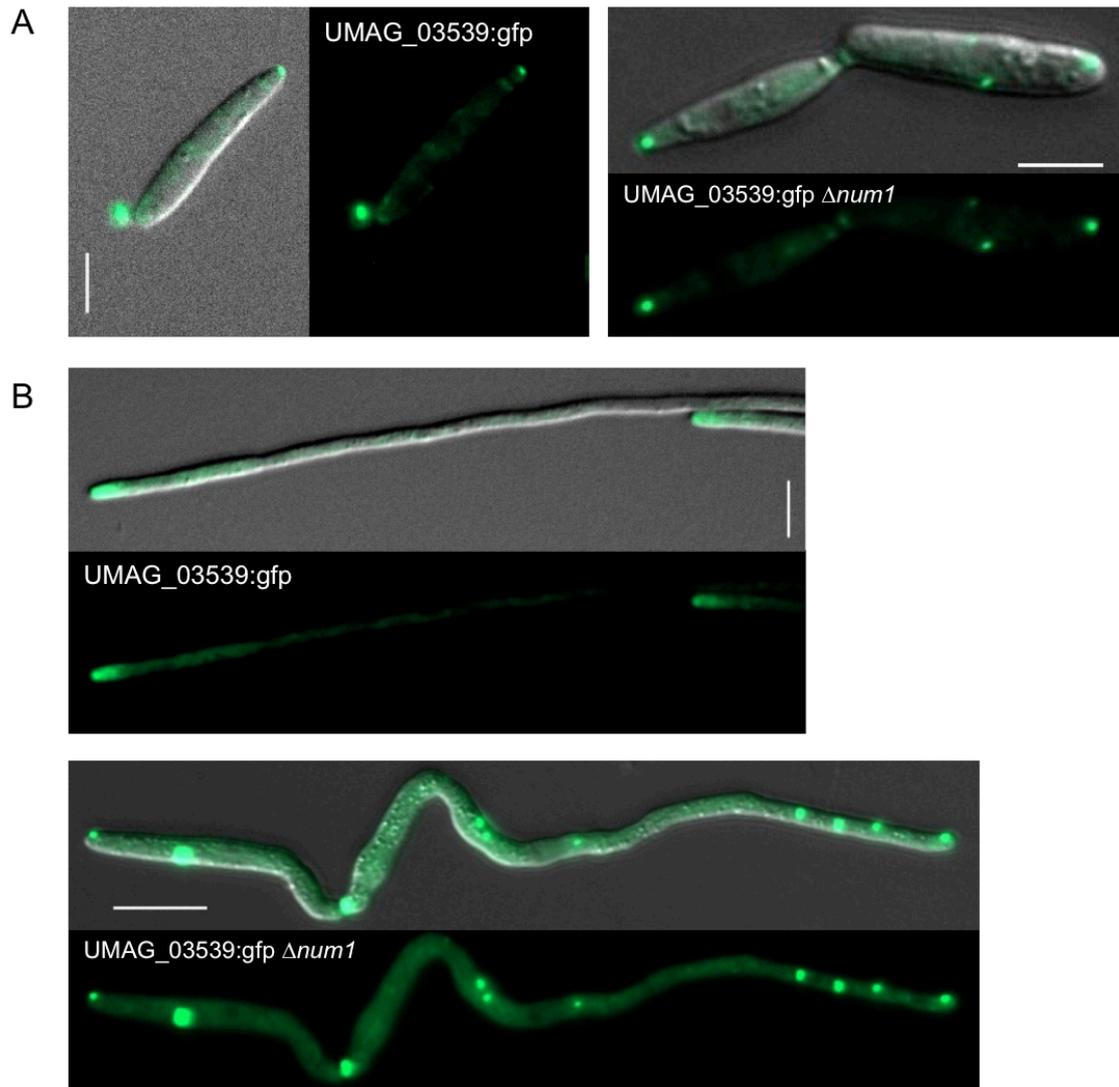


Abb. 53: Die Lokalisierung von UMAG_03539 ist Num1-abhängig. Zur Untersuchung der subzellulären Lokalisierung von *UMAG_03539* wurde das Gen am C-Terminus mit GFP fusioniert und ektopisch unter der Kontrolle des P_{hxt1} -Promotors exprimiert. (A) In Sporidien aus axenischer Kultur wurde das Fusionsprotein in den Zellpolen und am Sprosshals beobachtet, während es in Filamenten (B) ein deutliches Aggregat in der Hyphenspitze bildete und das Signal in Richtung des subapikalen Bereichs abnahm. In $\Delta num1$ -Sporidien (A) war die Lokalisierung von *UMAG_03539:gfp* nicht verändert, jedoch hatte die Deletion von *num1* einen deutlichen Einfluss in Filamenten (B). Nach 15-stündiger Induktion des bE/bW-Heterodimers wurde der typische $\Delta num1$ -Phänotyp der Hyphen beobachtet. Statt einer singulären Akkumulation in der Hyphenspitze, waren mehrere *UMAG_03539*-Aggregate verteilt in der Zelle feststellbar. Gezeigt ist eine Überlagerung von DIC- und GFP-Kanal und dem GFP-Kanal. Die Maßstabsbalken entsprechen (A) 5 μm (B) 10 μm . (A)

6.1.2 UMAG_10905 lokalisiert im Zytoplasma und hat keinen Einfluss auf die Zellmorphologie oder Pathogenität

Ein weiterer Num1-Interaktionspartner ist UMAG_10905 (Kellner, 2009). Bioinformatische Analysen konnten keinen Aufschluss über bestimmte Domänen oder Funktionen bringen. Zur genaueren Charakterisierung sollte eine Deletion und eine endogene Fusion des Gens durchgeführt werden. Für eine Fusion *in locus* wurde ein Konstrukt zur C-terminalen GFP-Fusion hergestellt (Kämper *et al.*, 2004) und in AB31 und AB31 $\Delta num1$ (UNK108) Protoplasten transformiert. Mikroskopische Untersuchungen des UMAG_10905:gfp-Fusionsproteins ergaben eine zytoplasmatische Lokalisierung in Sporidien und Filamenten. Die Deletion von *num1* veränderte diese nicht. Die Deletion von UMAG_10905 hatte keinen Einfluss auf die Morphologie von Sporidien oder Hyphen (Abb. 54), noch war die Septierung der Zellen beeinträchtigt (nicht gezeigt). Pflanzeninfektionen mit dem solopathogenen Stamm SG200 ergaben keinen Einfluss auf die Infektion, die Bonitur der 7 Tage alten Maispflanzen ergab sogar eine höhere Tumorzahl nach Infektion der Deletionsstämme als die des Wildtyps (Abb. 54). Das Experiment wurde nur mit einer geringen Anzahl von Pflanzen durchgeführt und sollte für weitere Aussagen wiederholt werden.

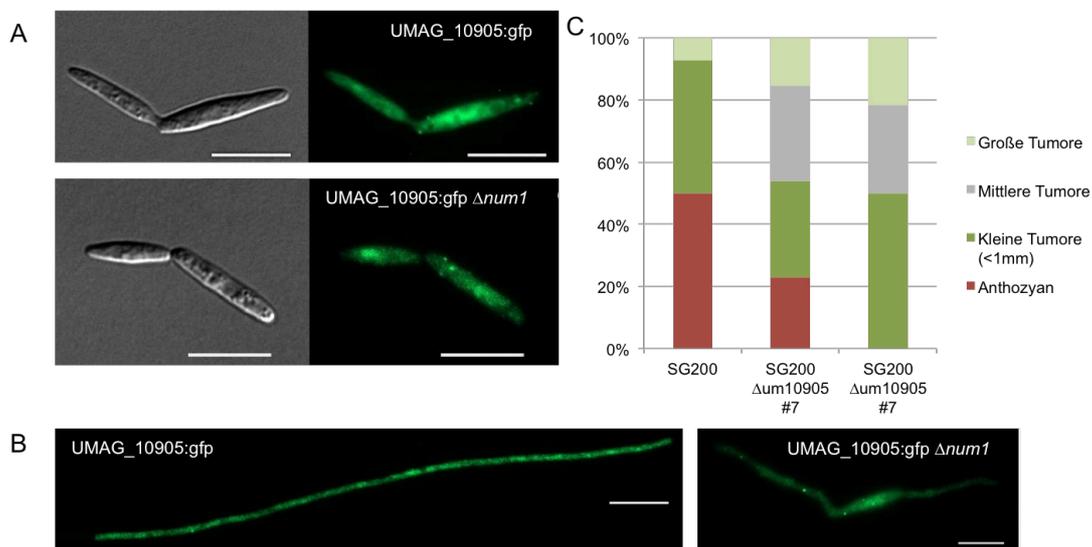


Abb. 54: Charakterisierung von UMAG_10905. (A) Eine endogene C-terminale Fusion von UMAG_10905 mit GFP ergab eine Fluoreszenz des Fusionsproteins im gesamten Zytoplasma. Die Deletion von *num1* hatte keinen Einfluss auf dessen Lokalisierung. Gezeigt sind DIC und GFP-Aufnahmen. (B) Filamente wurden 12-14 Stunden Induktion in CM-Arabinose Medium untersucht. In Wildtyp-Filamenten war das UMAG_10905:gfp Fusionsprotein im gesamten Zytoplasma verteilt, dies änderte sich auch nicht im $\Delta num1$ -Hintergrund. (C) Infektionen von *Zea mays* mit dem solopathogenen Stamm SG200 und SG200 $\Delta UMAG_10905$ ergaben 7 Tagen nach Infektion eine erhöhte Zahl von Tumoren in den Deletionsstämmen. (A/B) 10 μ m. Abbildungen zur Verfügung gestellt von Marion Gauger.

6.2 Num1 interagiert mit Kin1

In einem Hefe-Zwei-Hybrid für Num1-Interaktionspartner wurde das Motorprotein Kin1 identifiziert (Kellner, 2009). Die Interaktion wurde über weitere Methoden wie *in vitro* und *in vivo* Co-Immunopräzipitation bestätigt (Kellner *et al.*, 2014). Um die Interaktionsdomäne der Proteine genauer zu charakterisieren, wurden in Vorarbeiten verkürzte Num1-Varianten in direkten Hefe-Zwei-Interaktionstest auf die Interaktion mit Kin1 getestet. Es konnte gezeigt werden, dass die sich die Interaktionsdomäne von Num1 und Kin1 im Bereich zwischen AS 67 und 147 liegt (Kellner, 2012). Zur weiteren Eingrenzung des Bereichs in direkten Hefe-Zwei-Hybridanalysen wurden verschiedene Num1-Verkürzungen generiert und mit verschiedenen großen Kin1-Varianten getestet. Kin1 ist 986 AS (2904 bp) groß, der ursprünglich im Hefe-Zwei-Hybrid Screen identifizierte Klon wies jedoch nur eine Größe von 960 bp auf, steht jedoch nicht mehr für Experimente zur Verfügung. Die zweite Spalte der Tabelle (Y2H NK) fasst die mit dem original Kin1-Klon gezeigten Interaktionen mit Num1-Verkürzungen zusammen (Kellner, 2012; Abb. 55A). Zur Reproduktion dieser Daten wurde zuerst getestet, ob die Vollängen-Proteine Num1 und Kin1 interagieren. Dies war jedoch nicht der Fall. Daher wurden weitere Verkürzungen von Kin1 generiert, unter anderem eine dem original Kin1-Klon nachempfundene. Die Kin1-Variante der Größe 960 bp bis 1,2 kb waren zwar in der Lage mit dem Vollängen Num1-Protein zu interagieren. Die Interaktionen mit verkürzten Num1-Varianten konnten jedoch nicht zuverlässig reproduziert werden (Abb. 55B). Aus diesem Grund kann man keine genauen Aussagen zu diesen Experimenten treffen. Parallel zu diesen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass Num1 mit Cef1 über die letzten 8 AS interagiert (Hassinger, 2015). Das Ziel einen Klon zu generieren, der die nukleäre von der zytoplasmatischen Funktion trennt, konnte auch so erreicht werden. Da der Focus dieser Arbeit auf der zytoplasmatischen Funktion von Num1 liegt, war die Chance das Protein von seinen NTC-Funktionen zu entbinden besser geeignet.

Appendix

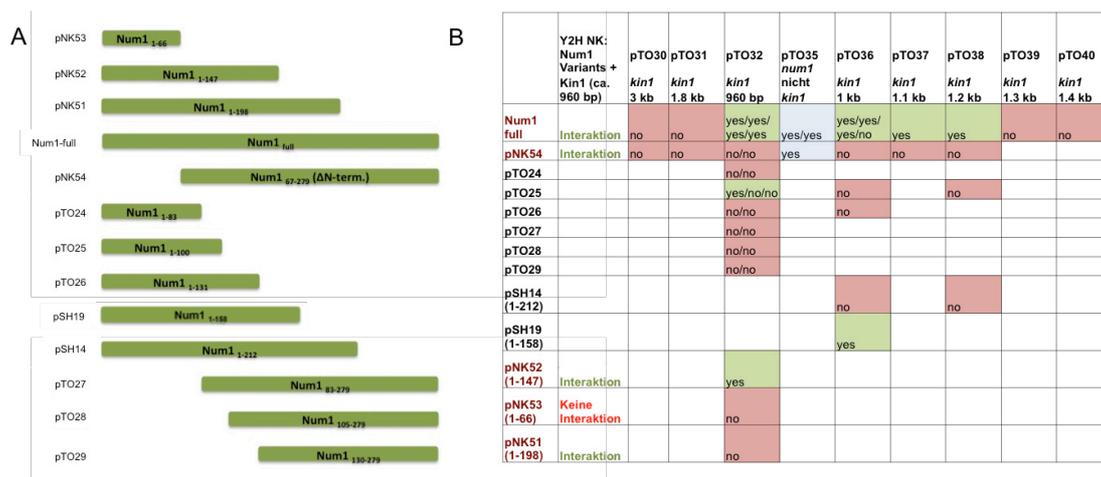


Abb. 55: Darstellung der getesteten Num1- und Kin1-Klone in einem direkten Hefe-Zwei-Hybrid Interaktionstest. (A) Schematische Darstellung der Num1-Verkürzungen. Neben den bereits veröffentlichten (pNK: Kellner, 2012; pSH: Hassinger, 2015) wurden weitere N-terminale Verkürzungen von Num1 und verschiedene Größenvarianten von Kin1 hergestellt. Die Interaktionsdomäne wurde auf die AS 67-147 bei Num1 eingegrenzt, die dafür getesteten Konstrukte sind in der zweiten Spalte dargestellt (Y2H NK). Das gesamte Num1-Protein interagiert mit den Kin1-Varianten der Größen 960 bp, 1 kb, 1,1 kb und 1,2 kb. Der Kin1-Klon der dem original isolierten nachempfunden wurde (960 bp), war außerdem noch in der Lage mit Num1_{1-100AS} (pTO25) und Num1_{1-147AS} (pNK52) zu interagieren. Die Interaktionen mit Num1_{ΔN-Term.} (pNK54) und Num1_{1-198AS} (pNK51) konnten jedoch nicht reproduziert werden. Aus diesem Grund wurde das Experiment nicht weiter fortgeführt. Grün hinterlegte Felder bedeuten Interaktion („yes“), rot hinterlegte Felder bedeuten dass keine Interaktion („no“) stattgefunden hat. Die Anzahl der Wörter (yes/no) pro Zelle repräsentiert die Anzahl der durchgeführten Experimente. Blau hinterlegtes Feld: Während dieser Arbeit wurde zufällig eine Selbstinteraktion von Num1 entdeckt, diese wurde bereits beschrieben in (Hassinger, 2015).

6.3 Nma1 interagiert nicht mit sich selbst

Nma1 bewegt sich bidirektional entlang von Mikrotubuli innerhalb der Zelle und interagiert mit Komponenten des CORVET-Komplexes. Um weitere Aufschlüsse über Nma1 zu bekommen, sollte das Protein in einem direkten Hefe-Zwei-Hybrid Interaktionstest auf Selbstinteraktion überprüft werden. Getestet wurde der ursprünglich im Num1-Hefe-Zwei-Hybrid Screen identifizierte verkürzte Nma1-Klon (Nma1 v, Kellner, 2009) und eine Vollängen-Version des Proteins (Nma1-VL). Die offenen Leserahmen von *nma1-v* und *nma1-VL* wurden in die Hefevektoren pGBKT7 und pGADT7 (Clontech) ligiert und in verschiedenen Kombinationen in kompetente Zellen des Hefestamms AH109 co-transformiert. Die Inkubation erfolgte für zwei Tage auf Plasmidselektivmedium (SD-Leu-Trp). Zum Test auf Interaktion wurden sie danach auf Hochstringenzmedium (SD-Leu-Trp-His-Ade) übertragen und erneut bei 28 °C für 1-2 Tage inkubiert. Als Positivkontrolle diente die Plasmidkombination pGBKT7-p53 mit pGADT7-T und als Negativkontrolle die Kombination pGBKT7-Lam mit pGADT7-T (Clontech). Außer der Positiv-Kontrolle konnte bei keiner der Transformanden Wachstum festgestellt werden. Aus diesem Grund kann man davon ausgehen, dass Nma1 nicht mit sich selbst interagiert (Abb. 56).

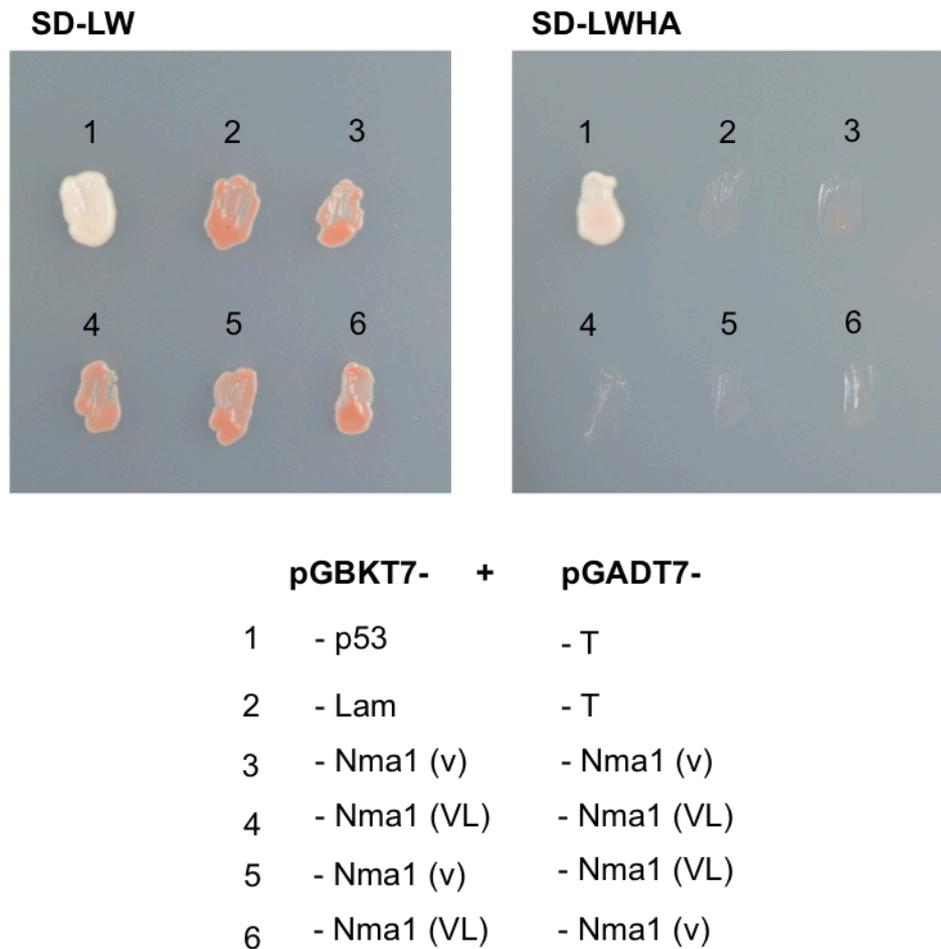


Abb. 56: Nma1 interagiert nicht mit sich selbst. Zur Überprüfung ob Nma1 in der Lage ist mit sich selbst Komplexe zu bilden, wurden in einem direkten Hefe-Zwei-Hybrid Test die direkte Interaktion verschiedener Nma1-Varianten miteinander getestet. Eine verkürzte Nma1-Version (Nma1-v) und die Volllängen-Version (Nma1-VL) wurden jeweils in Köder- und Beuteplasmide kloniert und in unterschiedlichen Kombinationen getestet. Es konnte keine Nma1-Nma1 Interaktion nachgewiesen werden. Die Proteine wurden in den Hefevektoren pGBKT7 und pGADT7 (Clontech) im Stamm AH109 exprimiert. Die Kolonien wurden auf Plasmidselektivmedium (SD-Leu-Trp) und Hochstringenzmedium (SD-Leu-Trp-His-Ade) überstrichen. Als Positivkontrolle diente die Plasmidkombination pGBKT7-p53 mit pGADT7-T, als Negativkontrolle die Kombination pGBKT7-Lam mit pGADT7-T (Clontech). Die Platten wurden 2 Tage bei 30 °C inkubiert. In den Abbildungen sind Einbuchstaben-Codes der Aminosäuren angegeben.

6.4 Rab11 lokalisiert nicht am Spindelpolkkörper von *U. maydis*

Untersuchungen aus anderen Organismen ergaben eine Rolle von Rab-Proteinen während der Mitose an den Mitosespindeln. Für Rab11 konnte eine Rolle während der Spindel-Organisation und Orientierung in Säugerzellen gezeigt werden (Hehny & Doxsey, 2014). Auf Grund dieser Erkenntnisse und der Beobachtung, dass in *U. maydis* frühe Endosomen während der Mitose mit den Spindelpolen assoziiert sind, sollte auch die subzelluläre Lokalisierung von Rab11 während der Mitose untersucht werden. Dafür wurde ein AB31-Derivat untersucht, das einen N-terminal mit mCherry fusionierten Rab11-Marker enthält (UKS70). Rab11 lokalisiert in den Zellpolen von Sporidien und Filamenten (Schneider, 2016). Während der mikroskopische Analyse von Zellen im G2- und Mitose-Stadium konnten die Rab11-Akkumulationen in den Zellpolen der Tochterzellen beobachtet werden und zusätzliches zytoplasmatisches Signal. In manchen Zellen konnten zusätzliche zytoplasmatische akkumulationen detektiert werden (Abb. 57, Pfeil). Der mit einem Pfeil markierten Signale könnten wie für Nma1 und Tub1 gezeigt auch am Spindelpolkkörper (SPK) akkumulieren. Diese Beobachtung alleine ist jedoch nicht ausreichend um eine Aussage darüber treffen zu können, ob Rab11 auch in *U. maydis* eine Rolle an der Mitosespindel spielt, weitere Experimente sind erforderlich. Essentiell sind Co-Lokalisierungen mit einem Mikrotubuli-Marker, um die Stadien der Mitosespindel deutlich zu erkennen und nicht nur über die Größe der Tochterzelle abschätzen zu müssen, und einem Marker für den SPK wie Tub2.

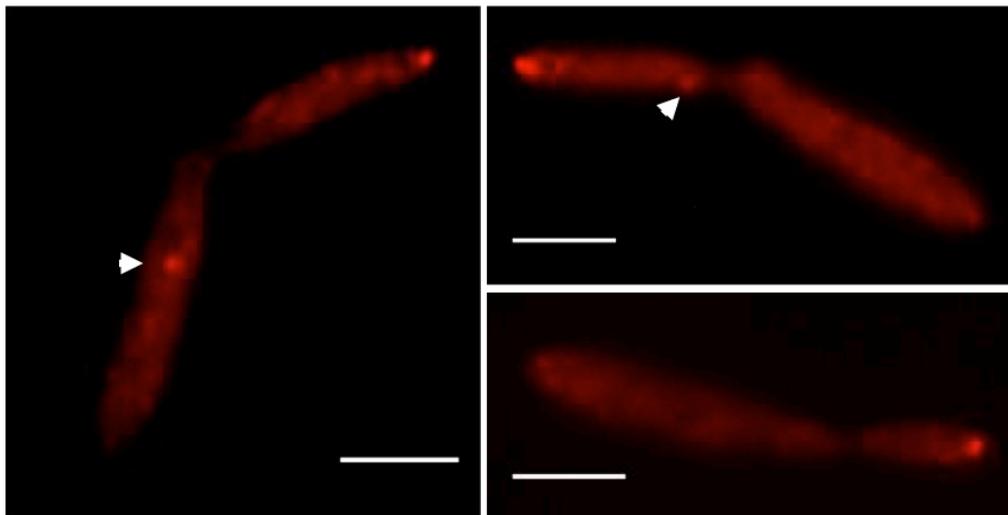


Abb. 57: Rab11 lokalisiert an den Zellpolen von Sporidien. Die Untersuchung von Sporidien in der G2- und Mitosephase ergab eine Akkumulation von Rab11 (rot) in den Zellpolen der Tochterzelle und im gesamten Zytoplasma. In manchen Zellen konnten zusätzliche Akkumulationen im Zytoplasma detektiert werden, ob diese mit dem Spindelpolkkörper assoziiert sind, muss jedoch mit geeigneten Marker-Proteinen gezeigt werden. Gezeigt sind Aufnahmen des RFP-Kanals von Sporidien aus axenischer Kultur. Alle Maßstabsbalken entsprechen 5 µm.

6.5 RealTime PCR Num1 Δ 8AS - Fehlerbestimmung

Tabelle 12: Obere und untere Grenze der Exon/Intron-Quotienten. Dargestellt die Quotienten des jeweils größten und kleinsten Expressionswertes der Num1 Δ 8AS RealTime PCR aus 2.1.2.2.

	<i>pcna</i>			<i>rpb3</i>		
	AB31	UNK108	UTO162	AB31	UNK108	UTO162
Obere Grenze	1,419288671	0,067290117	2,185841143	2,165221571	0,281503048	1,037425077
Untere Grenze	0,402375989	0,023481256	0,476991506	0,525259785	0,129671382	0,482186504

7 Digitale Daten

Video 1: Bidirektionaler Transport von Nma1:GFP entlang von Mikrotubuli in Sporidien aus axenischer Kultur. Belichtungszeit: 200 ms, Aufnahmedauer: 1 min

Video 2: Bidirektionaler Transport von Nma1:GFP entlang von Mikrotubuli in Filamenten, die 17h in CM-Arabinose induziert wurden. Belichtungszeit: 200 ms, Aufnahmedauer: 1 min

Video 3: Co-Lokalisierung von Nma1:GFP (grün) und mCherry:Rab5 (rot) in Sporidien aus axenischer Kultur. Spinning Disk Aufnahmen, Belichtungszeit: 50 ms pro Kanal, Aufnahmedauer: 1 min

Video 4: Nma1:GFP $\Delta kin3$. Bidirektionaler Transport von Nma1:GFP entlang von Mikrotubuli in Sporidien aus axenischer Kultur mit $\Delta kin3$ -Hintergrund. Belichtungszeit: 200 ms, Aufnahmedauer: 1 min

Video 5: Nma1:GFP $\Delta kin1$. Bidirektionaler Transport von Nma1:GFP entlang von Mikrotubuli in 17h induzierten Hyphen mit $\Delta kin1$ -Hintergrund. Belichtungszeit: 200 ms, Aufnahmedauer: 1 min

Video 6: Nma1:GFP $\Delta rab5a$. Bidirektionaler Transport von Nma1:GFP entlang von Mikrotubuli in 16h induzierten Hyphen mit $\Delta rab5a$ -Hintergrund. Belichtungszeit: 200 ms, Aufnahmedauer: 1 min

Video 7: Co-Lokalisierung von Yup1:GFP (grün) und mCherry:Tub1 (rot) in Sporidien aus axenischer Kultur. Belichtungszeit: 200 ms pro Kanal, die Bildaufnahme erfolgte alle 2 Sekunden

Video 8: Co-Lokalisierung von Nma1:GFP (grün) und Tub2:RFP (rot) in Sporidien aus axenischer Kultur. Belichtungszeit: 250 ms (GFP) und 500 ms (RFP), die Bildaufnahme erfolgte alle 27 Sekunden

Danksagung

Lieber Jörg, danke für die Möglichkeit meine Arbeit in deiner tollen Arbeitsgruppe anzufertigen! Das Projekt hat mich fast die letzten 7 Jahre begleitet und ich bin stolz darauf, was daraus geworden ist! Danke für die Freiheit meine kleine „Zellbio“-Einheit in deiner Genetik-Gruppe zu etablieren ☺ Vielen Dank für dein immer offenes Ohr und die ausführlichen Korrekturen in der Endphase.

Vielen Dank an Prof. Dr. Peter Nick für die Übernahme des Zweitgutachtens!

Vielen Dank an unsere Kooperationspartner Prof. Dr. Ulrich G. Nienhaus und Lu Zhou für die gute Zusammenarbeit! Ein weiterer Dank geht an die Gruppen von Prof. Dr. Michael Feldbrügge und Prof. Dr. Gero Steinberg für die Bereitstellung von Plasmiden und Stämmen.

Ich bedanke mich bei allen Kollegen und Kolleginnen der AG Fischer und AG Requena für die gute „Nachbarschaft“ in den letzten Jahren!

Nachdem ich so viele Jahre Teil der „Kämpers“ war, gilt es einigen Leuten Dank auszusprechen! Danke vor allem an dich, liebe Nikola! Du hast mich 2010 unter deine Fittiche genommen und mir alles beigebracht, was ich wissen musste- heute gebe ich meine eigene Doktorarbeit ab. Nikola, Bebby, Niko: ich hoffe ihr seid zufrieden was aus dem Projekt geworden ist!

Liebste Kämpers, ich bin wirklich traurig Euch verlassen zu müssen! Danke an die „alten Kämpers“, Miro, David, Bebby, Benni & Pinti und die „neuen Kämpers“ Jonas, Julia, Nathalie, Karina, Matteo- für die gemeinsame Zeit! Danke für viel Spaß und tolle Momente. Ich habe viel gelernt in den letzten Jahren, unter anderem auch wie man für eine ganze Kompanie auf einer Herdplatte kochen kann! Ich werde Euch und unsere Grill- und Kochsessions vermissen. Danke, dass wir immer ein tolles Team waren! Vielen Dank an die lieben Helfer, die mich in den letzten Wochen mit Korrekturlesen unterstützt haben. Ein besonderer Dank geht an Nathalie, danke für Tipps, Tricks und viel Hilfe rund um Bildbearbeitung und hilfreiche Diskussionen.

Ich danke meinen Eltern und Geschwistern für die Möglichkeit diesen Weg zu gehen und die Unterstützung in den letzten Jahren. Ebenso möchte ich mich bei meinen tollen Freund

innen bedanken fürs „da sein“, zuhören und ablenken. Das größte „Danke“ geht an dich – Benni! Du bist immer für mich da, hörst mir zu, machst mir zu essen und bringst mich zum lachen. Danke, dass es dich gibt!

The SPF27 Homologue Num1 Connects Splicing and Kinesin 1-Dependent Cytoplasmic Trafficking in *Ustilago maydis*

Nikola Kellner¹, Kai Heime^{1,2}, Theresa Obhof¹, Florian Finkernagel³, Jörg Kämper^{1*}

1 Karlsruhe Institute of Technology, Institute for Applied Biosciences, Department of Genetics, Karlsruhe, Germany, **2** Georg-August-University-Göttingen, Institute for Microbiology and Genetics, Microbial Cell Biology, Göttingen, Germany, **3** Institute for Molecular Biology and Tumor Research, Marburg, Germany

Abstract

The conserved NineTeen protein complex (NTC) is an integral subunit of the spliceosome and required for intron removal during pre-mRNA splicing. The complex associates with the spliceosome and participates in the regulation of conformational changes of core spliceosomal components, stabilizing RNA-RNA- as well as RNA-protein interactions. In addition, the NTC is involved in cell cycle checkpoint control, response to DNA damage, as well as formation and export of mRNP-particles. We have identified the Num1 protein as the homologue of SPF27, one of NTC core components, in the basidiomycetous fungus *Ustilago maydis*. Num1 is required for polarized growth of the fungal hyphae, and, in line with the described NTC functions, the *num1* mutation affects the cell cycle and cell division. The *num1* deletion influences splicing in *U. maydis* on a global scale, as RNA-Seq analysis revealed increased intron retention rates. Surprisingly, we identified in a screen for Num1 interacting proteins not only NTC core components as Prp19 and Cef1, but several proteins with putative functions during vesicle-mediated transport processes. Among others, Num1 interacts with the motor protein Kin1 in the cytoplasm. Similar phenotypes with respect to filamentous and polar growth, vacuolar morphology, as well as the motility of early endosomes corroborate the genetic interaction between Num1 and Kin1. Our data implicate a previously unidentified connection between a component of the splicing machinery and cytoplasmic transport processes. As the *num1* deletion also affects cytoplasmic mRNA transport, the protein may constitute a novel functional interconnection between the two disparate processes of splicing and trafficking.

Citation: Kellner N, Heime K, Obhof T, Finkernagel F, Kämper J (2014) The SPF27 Homologue Num1 Connects Splicing and Kinesin 1-Dependent Cytoplasmic Trafficking in *Ustilago maydis*. *PLoS Genet* 10(1): e1004046. doi:10.1371/journal.pgen.1004046

Editor: Joseph Heitman, Duke University Medical Center, United States of America

Received: May 21, 2013; **Accepted:** October 30, 2013; **Published:** January 2, 2014

Copyright: © 2014 Kellner et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by grants from the German Research Foundation (DFG) to JK (grants KA 872/6-1 and KA 872/5-1) and the Baden-Württemberg State Foundation (Landesstiftung Baden-Württemberg) to NK. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: joerg.kaemper@kit.edu

Introduction

The basidiomycete *Ustilago maydis* is the causal agent of the smut disease on corn (*Zea mays*). During its life cycle, *U. maydis* displays yeast-like, haploid cells that divide by budding, and dikaryotic cells that grow as filamentous hyphae. The filamentous stage is initiated by fusion of two yeast-like cells (sporidia) and marks the onset of the biotrophic stage in which the fungus depends on its host plant for propagation. The switch to polarized growth to form the elongated filament is indispensable for the successful infection of the host plant.

The regulatory circuits that underlie the dimorphic switch and concurrent pathogenic development in *U. maydis* have been well studied within the past years. Similar to other basidiomycetes, a heterodimeric complex of two homeodomain transcription factors, both encoded by the *b*-mating type locus, represents the major regulatory instance. The two proteins, termed bE and bW in *U. maydis*, form a functional heterodimer, but only if they originate from different *b*-alleles (e.g. bE1 and bW2). Hyphae formed upon activation of the *b*-pathway grow unipolar, but only the tip compartment is filled with cytoplasm and contains the two genetically distinct nuclei, while the distal part of the

hypha is composed of empty segments separated by evenly spaced retraction septa. Simultaneously with the switch towards filamentous growth, cells become arrested in the G2 phase of the cell cycle. Only after the penetration of the plant surface, this cell cycle block is released, and the “true” filament with multiple septated compartments is developed [for recent review, see 1].

The bE/bW-heterodimer orchestrates a hierarchic, multi-layered transcriptional network. Only few *b*-responsive genes are direct targets of the bE/bW heterodimer. The majority of the genes is regulated via the *b*-dependently induced C2H2 zinc-finger transcription factor Rbfl. Rbfl is the master regulator for several other transcription factors that coordinate expression of multiple genes associated with cell cycle coordination, morphogenesis and pathogenic development. Deletion of *rbfl* prevents the formation of the *b*-dependent filaments, and ectopic expression of *rbfl* is sufficient to induce the dimorphic transition. Thus, *rbfl* is both sufficient as well as required for the switch from budding to polarized filamentous growth [2].

Prerequisite for the growth of the filamentous hyphae is the establishment and maintenance of a defined axis of polarity. The filaments expand by polar tip growth, which is dependent on long-

Author Summary

In eukaryotic cells, nascent mRNA is processed by splicing to remove introns and to join the exon sequences. The processed mRNA is then transported out of the nucleus and employed by ribosomes to synthesize proteins. Splicing is achieved by the spliceosome and associated protein complexes, among them the so-called NineTeen complex (NTC). We have identified the Num1 protein as one of the core components of the NTC in the fungus *Ustilago maydis*, and could show that it is required for polarized growth of the filamentous fungal cells. Consistent with the NTC function, cells with a *num1*-deletion show reduced splicing of mRNA. Moreover, we uncover a novel cytoplasmic function of the Num1 protein: It physically interacts with the microtubule-associated Kinesin 1 motor protein, and phenotypic analyses corroborate that both proteins are functionally connected. Our findings reveal a yet unidentified role of a global splicing factor during intracellular trafficking processes. A possible connection between these disparate mechanisms presumably resides in mRNA-export out of the nucleus and/or the transport of mRNA within the cytoplasm.

distance transport towards the growth cones at the cell apices. This directed transport is facilitated by arrays of polarized microtubules and a highly conserved set of microtubule-dependent kinesin and dynein motor proteins [reviewed in 3]. The cellular cargos that rely on microtubule-based transport include endosomes, peroxisomes and nuclei, but also mRNA, which, as shown recently in *U. maydis*, is as well instrumental for establishment and maintenance of polarity [4–6]. The latter, however, is not a direct microtubule-based cargo, but passively travels on endosomes [7]. In *U. maydis*, transport is mainly mediated through the concerted action of the plus-end directed UNC104-like Kinesin-3 motor protein Kin3, which moves endosomes in both directions within the cell along an array of antiparallel microtubules, and the minus-end directed dynein motor protein Dyn1/2 [8–11]. The minus-end directed Dyn1/2 is particularly important at the poles of filaments, where unipolar microtubules, with their plus-ends directed to the tip, extend from the antiparallel array [9,12]. The conventional kinesin motor protein Kin1 additionally contributes to the establishment of hyphal morphology by transporting Dynein in the direction of the microtubule plus-ends within the hyphal apex where a loading zone for the retrograde transport processes is established [9,12]. Other known cargos for the Kin1 motor protein include membranous structures; Kin1 was previously described to be involved in organelle transport [13] and to foster the transport of secretory vesicles into the growing tip [14]. More recently, transport of the fungal-specific class-17 myosin Mcs1 was shown to dependent directly on Kin1. Mcs1 is attached to vesicles and contains an N-terminal myosin motor domain fused to a chitin synthase region. Anterograde trafficking of Mcs1-positive vesicles requires both microtubules and filamentous actin and depends on Myosin-5 and Kinesin-1, which cooperate in delivering vesicles to the sites of exocytosis [15–17].

In an effort to achieve a better understanding of the complex processes required for the establishment and maintenance of the dikaryotic hyphae in *U. maydis*, we employed a candidate approach with genes that, based on function or phenotype in other systems, were anticipated to be involved in nuclear migration and determination of cell polarity. Here, we describe the molecular characterization of one of these genes, *num1*. The *num1* mutation has originally been identified in the basidiomycete *Coprinopsis*

cinerea in a screen for mutants affected in the nuclear migration during the formation of the heterokaryotic hyphae [18].

We show now that Num1 is a homologue of SPF27, one of the core components of the highly conserved Prp19/CDC5L or NineTeen (NTC) splicing complex [19].

Unexpectedly, we identified the conventional Kinesin 1 motor protein Kin1 [13,20] to interact with Num1. Similar phenotypes of *Anum1* and *Akin1* hyphae corroborate a functional interconnection between the two proteins. Our data implicate a previously unidentified connection between a component of the splicing machinery and cytoplasmic (Kin1-dependent) transport processes in *U. maydis*.

Results

Num1, a conserved BCAS2/SPF27-like protein, is required for polar growth and septum formation

In the basidiomycete *Coprinopsis cinerea*, the *num1* gene was identified in a screen for mutants affected in nuclear migration during the initial phase of sexual development [18]. Unlike *U. maydis*, *C. cinerea* grows strictly as a filament, and mating is initiated by fusion of two different haploid hyphae harboring compatible alleles of the mating type loci. The dikaryotic filament is then generated upon migration of “donor”-nuclei into the “acceptor”-mycelium. The *num1* mutation results in strains that are still able to donate nuclei, but fail to accept nuclei in compatible mating reactions [18]. To examine whether the gene has a conserved function in *U. maydis* with respect to nuclear migration, we set out to analyze the potential *U. maydis* homologue. The *U. maydis* predicted protein Um01682 (MIPS *Ustilago maydis* Database (MUMDB), <http://mips.helmholtz-muenchen.de/genre/proj/ustilago/>) exhibits 43% identity and 63% similarity with the *C. cinerea* Num1 protein, and 33% identity to the human SPF27 protein (Figure S1). SPF27 homologues are found in all eukaryotic clades, with the exception of the Saccharomycetales (Figure S2). SPF27 is part of the Prp19/CDC5L complex, which is an integral component of active spliceosomes and required for intron removal [21]. Similar to the SPF27 homologues, the *U. maydis* protein harbors a BCAS2 domain (breast carcinoma amplified sequence 2) with a so far unknown function and a classical, basically charged nuclear localization signal (Figure S1) [22].

To determine the function of Num1 in *U. maydis*, the gene was deleted in the strains FB1, FB2, SG200 and AB31. FB1 (*a1 b1*) and FB2 (*a2 b2*) are compatible wild-type strains that, upon mating, form filaments on solid media supplemented with charcoal. SG200 (*a1 mfa2 bE1 bW2*) forms such filaments without a mating partner, as the strain harbors a compatible combination of the *bE1* and *bW2* genes [23]. For both FB1/FB2 and SG200, cell division upon filament formation is stalled in axenic culture, and hyphal proliferation depends on the plant host. Polarized growth in axenic culture can be best monitored in strain AB31 (*a1 P_{erg1}:bE1/P_{erg1}:bW2*), which harbors a set of compatible *bE1* and *bW2* genes under control of the arabinose-responsive *P_{erg1}*-promoter [24]. Upon arabinose-induced expression of *bE1/bW2*, AB31 switches from budding- to polarized growth and forms long filaments reminiscent of those formed after fusion of compatible FB1 and FB2 sporidia [2,24].

Yeast-like cells of AB31*Anum1*- and SG200*Anum1* showed no obvious phenotype when grown in axenic culture in complete or minimal media (Figure S3). In plant infection assays, the mixture of the compatible strains FB1*Anum1* and FB2*Anum1* as well as SG200*Anum1* showed reduced disease symptoms compared to the respective wild-type strains; both the number of plants with tumors as well as the size of tumors decreased (Figure S3). However,

microscopic observation of hyphae after plant infection did not reveal major morphological differences to wild-type strains (Figure S3). The cell-cell fusion of compatible sporidia to generate the dikaryotic hyphae, which can be visualized by the appearance of “fuzzy” colonies on charcoal containing media, is not altered by the *num1* mutation (Figure S3). However, the phenotype of conjugation hyphae upon treatment with synthetic pheromone as well as the phenotype of the dikaryotic hyphae showed considerable alterations from wild-type strains. Pheromone treatment of *Δnum1* strains led to the formation of branched conjugation tubes that are never observed in wild-type strains. Dikaryotic hyphae of *Δnum1* strains appeared thicker, branched, and fused sporidia displayed bipolar growth; in wild-type strains, however, the fusion event is initiated only from a single cell pole (Figures S4 and S5). To analyze the phenotype of the hyphae in more detail, we employed strain AB31 and induced the formation of the filament via the expression of *bE1/bW2*. Similar to the dikaryotic hyphae, AB31 *Δnum1* filaments displayed severe alterations. 95% of the filaments were significantly shorter than wild-type AB31 filaments (average length of 68.9 μm compared to 121.7 μm, t-test: $p = 6.35 \times 10^{-46}$). Filament formation upon *b*-induction in AB31 is initiated at one of the cell poles of the sporidium; the resulting hyphae grow unbranched and strictly unipolar (Figure 1A). In AB31 *Δnum1*, hyphae generally exhibited an irregular and curved morphology (Figure 1B, Table 1). In 18% of the sporidia, hyphae initiated at both cell poles (bipolar, Figure 1C, Table 1), and 4.4% exhibited a branched morphology (N = 461) (Figure 1D, Table 1). In addition, 21.2% of the AB31 *Δnum1* filaments had delocalized septa, and 2.4% of the hyphae generated empty compartments at the cell tips (Figure 1E and F, Table 1). Septa in AB31 *Δnum1* could be visualized by different chitin-stains, as Calcofluor [25], Congo Red [26] or fluorescein-conjugated wheat germ agglutinin (WGA) [27] (Figures 1E and S6; see also Figure S6 legend). However, in contrast to septa in the dikaryotic hyphae, septa in AB31 *Δnum1* were not always visible in the DIC channel, and staining with fluorescein-WGA revealed extensive chitin accumulations or ring-like chitin structures throughout the hyphae, indicating that these septa or septa-like structures may be structurally different from wild-type septa.

To ensure that the observed phenotype is due to the *num1* deletion, a construct harboring a *num1::GFP* fusion gene under control of the arabinose inducible *P_{erg1}*-promoter was introduced in single copy into the *cbx* locus. Strain UNK220 (AB31 *Δnum1* *P_{erg1}::num1::egfp*) was grown in arabinose-containing media to induce both the *bE1/bW2* heterodimer as well as the *num1::GFP* gene; the induced filaments were indistinguishable from that of the wild-type AB31 strain (Figure S7).

Num1 is a component of the highly conserved spliceosome-associated Prp19/CDC5L-complex

Num1 has striking similarities to the human BCAS2/SPF27 protein that has been identified as one of the four core components (Prp19, PLR1, CDC5L and SPF27) of the Prp19/CDC5L spliceosome-associated complex, commonly termed NineTeen Complex (NTC) (Figure 2A). To assess whether Num1 is a structural component of the putative NTC complex in *U. maydis*, we employed a directed yeast two-hybrid approach using the full-length Num1 protein as bait as well as full-length and C- and N-terminal versions of the Prp19 (Um10027) and CDC5L-homologues (termed Cef1, Um04411) as prey, respectively. Consistent with the previously identified interactions in *S. pombe* [28], Num1 interacts with the Prp19 N-terminus as well as the Cef1 C-terminus (Figure 2B). The interaction of Num1 with Prp19 and Cef1 was verified by *in vivo* co-immunoprecipitation. *num1* was

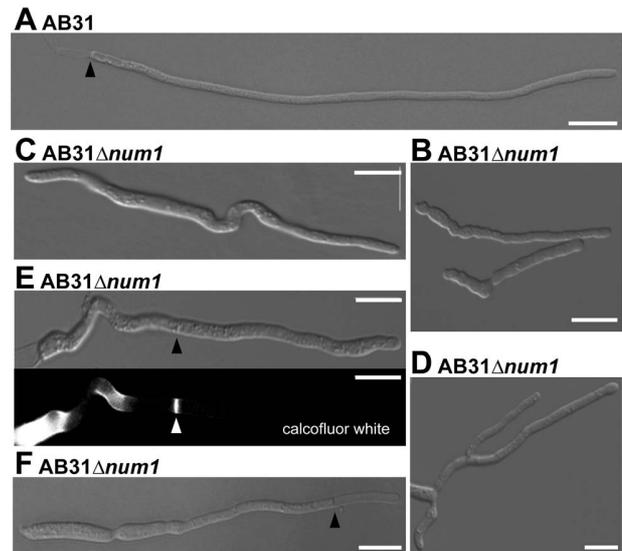


Figure 1. Num1 is required for polar growth and septum formation. Filament formation of AB31 wild-type and AB31 *Δnum1* deletion strains was monitored 12–14 hours upon induction of the *bE1/bW2* heterodimer. (A) AB31 wild-type cells grow as long, straight filaments; only the tip compartment is filled with cytoplasm, separated from highly vacuolated distal compartments by a septum (arrowhead). (B) AB31 *Δnum1* hyphae grow shorter and more curved. In AB31 *Δnum1*, bipolar (C) and branched (D) hyphae are observed frequently. (E) Septa of AB31 *Δnum1* are often formed within the compartment filled with cytoplasm (arrowheads denote delocalized septum; in lower panel, Calcofluor White staining was used to visualize the septum). (F) In approx. 2.5% of hyphae delocalized septa (arrowhead) lead to empty tip compartments. Scale bars: 10 μm.
doi:10.1371/journal.pgen.1004046.g001

replaced by an eGFP-tagged version of the gene in strain AB31 (*a2*, *P_{erg}::bW2*, *bE1*), and additionally *prp19* or *cef1* were exchanged with HA-tagged versions, resulting in strains UNK200 (AB31 *num1::3×eGFP::hyg^R*, *prp19::3×HA::cbx^R*) and UMO8 (AB31 *num1::3×eGFP::hyg^R*, *cef1::3×HA::cbx^R*), respectively. All genes were introduced via homologous recombination into their native loci to

Table 1. Quantification of phenotypes in AB31 and AB31 *Δnum1* 12 hours after the induction of the *bE1/bW2*-heterodimer.

	AB31*	AB31 <i>Δnum1</i> *
long and straight hyphae	92%±0.010	4.7%±0.029
irregular growing hyphae (short, curvy)	8%±0.015	49.13%±0.029
bipolar	0%	18.13%±0.026
branched	0%	4.4%±0.011
delocalized septa	0%	21.2%±0.005
empty compartments at hyphal tips	0%	2.43%±0.039
	N = 375	N = 461
∅ length of hyphae**	121.7 μm±15.63 μm	68.9 μm±15.37 μm
	N = 75	N = 75

*Mean values from three independent biological replicates are shown.

**t-test $p = 6.35 \times 10^{-46}$.

doi:10.1371/journal.pgen.1004046.t001

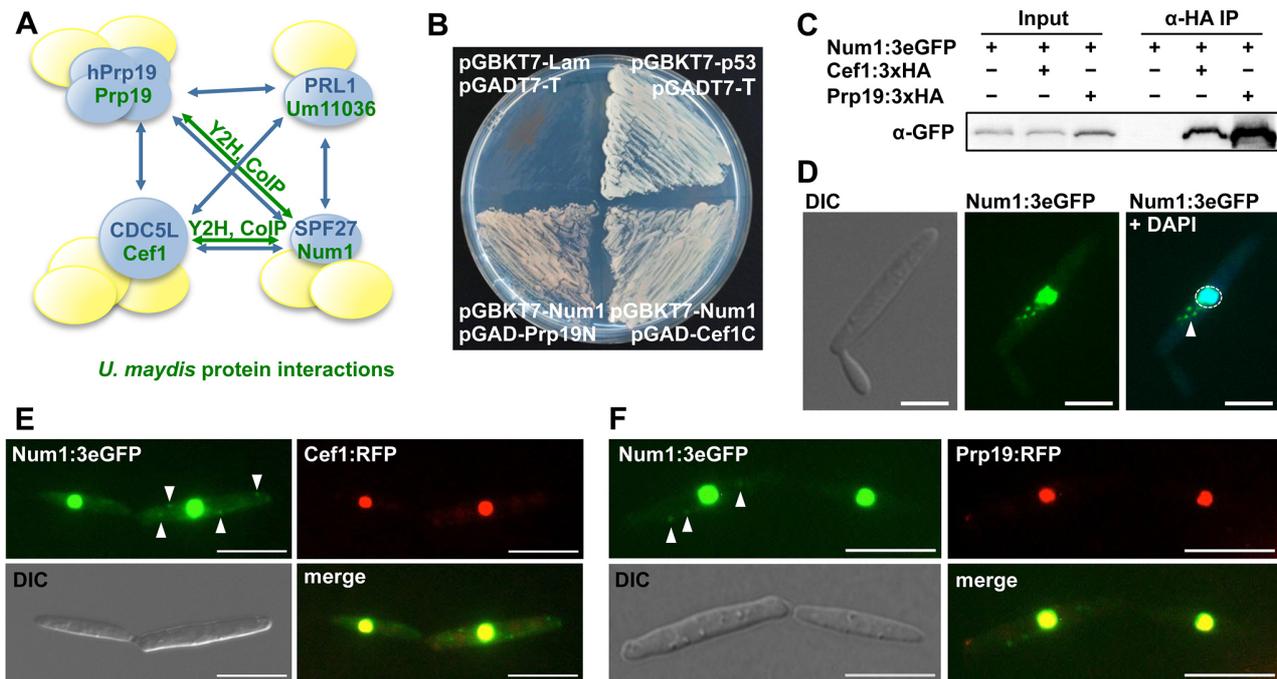


Figure 2. Num1 interacts with components of the Prp19/Cdc5L complex. (A) Schematic representation of the protein-protein interactions (blue arrows) within the human hPrp19/CDC5L-complex [21]. Proteins depicted in blue represent the core complex, additional proteins (yellow) are associated with individual proteins. Green arrows indicate *U. maydis* protein interactions identified in this study. (B) The Prp19 N-terminus and the Cef1 C-terminus interact with the full length Num1 protein in a yeast two-hybrid analysis. p53/SV40 T-antigen and Lamin/SV40 T-antigen (Clontech) serve as positive and negative control, respectively. (C) *In vivo* co-immunoprecipitation of HA-tagged Prp19 and Cef1 and 3eGFP-tagged Num1. α-HA coupled agarose beads were used to precipitate Prp19 and Cef1, respectively. The Num1 protein was detected on a Western blot using an α-GFP antibody. The negative control shows no unspecific binding of the Num1 protein to α-HA agarose. (D) Subcellular localization of the Num1:3eGFP fusion protein. In addition to the nuclear localization of Num1 (enclosed by dashed circle), a cytoplasmic distribution to distinct foci can be observed (arrowhead). Scale bar: 5 μm. (E, F) Num1:3eGFP as well as Cef1:RFP and Prp19:RFP were co-expressed in AB31 under control of their native promoters. Num1 co-localizes with both Cef1 and Prp19 in the nuclei. Additional cytoplasmic Num1:3eGFP foci are indicated by arrowheads. Scale bars: 10 μm.

doi:10.1371/journal.pgen.1004046.g002

ensure native protein levels. All fusion proteins were shown to be functional (Supporting Text S1, Figure S8). By use of an anti-HA-antibody, Num1:3eGFP was specifically co-precipitated with both Prp19:HA and Cef1:HA in protein extracts from strains UNK200 and UMO8 (Figure 2C). The interaction of Num1 with Prp19 and Cef1 was further corroborated by their localization. Num1:3eGFP and Prp19:RFP or Cef1:RFP were co-expressed in strain AB31, and all proteins co-localized in the nuclei (Figure 2E and F). While for Prp19:RFP and Cef1:RFP the fluorescence signal was exclusively localized in the nucleus, Num1:3eGFP was also detected in the cytoplasm (Figure 2D). Transformation of AB31 *Δnum1* with a *num1:eGFP* derivative harboring a mutated nuclear localization sequence (KKRK to AAAA) did not lead to complementation of the *Δnum1* phenotype, and the fusion protein localized predominantly in the cytoplasm (Figure S7), which implies that nuclear localization of Num1 is required for function of the protein.

In addition to their function in mRNA splicing, NTC and NTC-associated proteins are known to be involved in several other cellular processes. In *S. pombe* and *S. cerevisiae*, Cdc5 and Cef1p, respectively, were originally identified as cell division cycle mutants that are required for G2 progression and mitotic entry [29–31], and Prp19p has been isolated in *S. cerevisiae* in a screen for mutants conferring sensitivity to DNA damaging agents [32]. It has been proposed that Prp19p homologues play a direct role in DNA damage repair that is conserved from yeast to human [33–38].

To define whether Num1 acts in line with previously known functions of the NTC-complex, we investigated cell cycle regulation and the response to DNA damage in AB31 *Δnum1*. In AB31, the filaments generated after induction of the bE1/bW2 heterodimer are arrested in the G2 phase of the cell cycle, harboring a single haploid nucleus that is positioned in the tip compartment [39]. In filaments of AB31 *Δnum1*, however, deviations from this pattern became evident. 18% of the filaments (N = 100) exhibited two (or more) nuclei within a single hyphal compartment; additionally, compartments devoid of any nuclei were generated, most likely due to the aberrant formation of septa (Figure 3A). In accordance with this observation, FACS analysis of AB31 cells revealed that upon prolonged induction of the bE1/bW2-heterodimer cells with a 2C DNA content accumulated, whereas in AB31 *Δnum1*, an increased number of cells with both 1C and 2C DNA content was observed (Figure S9), indicative for a deregulated cell cycle. Taken together, our results implicate that the *num1* deletion affects both cell cycle regulation as well as cell division.

Consistent with the function of the NTC in response to DNA damage, we found that *Δnum1* cells exhibited increased sensitivity to UV irradiation and DNA-damaging agents. The survival rate upon UV-treatment was reduced approximately by a factor of 10 in AB31 *Δnum1* (Figure 3B). Similarly, treatment with phleomycin, causing double-strand breaks in DNA [40] or hydroxyurea, which triggers stalling of the replication fork during DNA synthesis [41], led to reduced survival of *Δnum1* cells (Figure 3B).

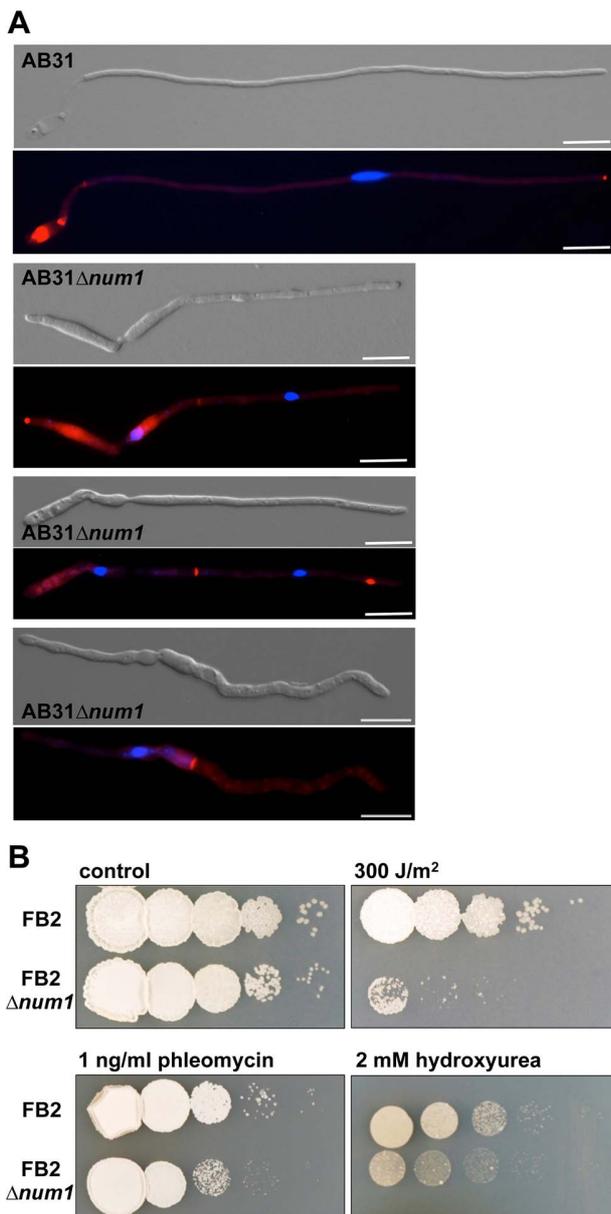


Figure 3. Num1 influences the cell cycle and cell division as well as the cellular response to DNA damage. (A) Induction of the bE1/bW2 heterodimer in wild-type cells (AB31) induces a G2 cell cycle arrest, resulting in hyphae with a single nucleus positioned in the tip compartment. In AB31 Δ num1, 18% of the hyphae contain more than one nucleus, usually separated by a septum or a septum-like chitin structure, which is not always visible in the DIC-channel (see also Figure S6). In some cases, delocalized septa give rise to compartments that are devoid of any nuclei (bottom panel). Filaments were stained with DAPI and Congo Red, which effectively stains chitin in fungal cell walls [26], to visualize nuclei and septa within the same hypha. Scale bars: 10 μ m. (B) Sensitivity of an FB2 Δ num1 deletion strain to DNA-damage in comparison to wild-type cells. Serial 10-fold dilutions were spotted on complete medium containing the indicated DNA-damage inducing supplements, or subsequently irradiated with 300 J/m² UV light (254 nm), respectively. Pictures were taken 2–3 days after incubation at 28°C.
doi:10.1371/journal.pgen.1004046.g003

Num1 affects splicing of mRNA on a global scale

To assess whether the Δ num1 mutation affects splicing, we employed next-generation RNA sequencing (RNA-Seq) to determine the transcriptome of strains AB31 and AB31 Δ num1. bE1/bW2 expression was induced for eight hours; at this time point, in both strains a comparable quantity of filamentous cells was observed. The expression levels of bW₂, of the central regulator *rbf1* (a direct b-target gene) and of *num1* were monitored by quantitative RT-PCR analysis to ensure similar expression levels (Figure S10). For both AB31 and AB31 Δ num1, RNA-Seq experiments from three independent biological samples were performed, and sequences were compared to the manually curated *U. maydis* gene models of the MIPS *Ustilago maydis* Database (MUMDB). Splicing efficiency was calculated from the normalized read number within introns in relation to the normalized read number of exon regions of a gene (for details, see Materials and Methods). Based on 2142 intron sequences, introns of AB31 genes were spliced with an average efficiency of 0.93 (\pm 0.13); splicing efficiency in AB31 Δ num1 was significantly lower (factor = 1.44, t-test $p = 6.22 \times 10^{-111}$), with an average of 0.80 (\pm 0.23). The splicing defect observed by RNA-Seq was verified for a small set of genes by qRT-PCR (Figure S11). In general, we noticed a wide variation in splicing efficiency of different introns in response to the *num1*-deletion. For 80.2% of the introns (1717 of 2142), the intron retention rate (fraction of RNA in intronic sequences in relation to exonic sequences) in AB31 Δ num1 was at least twice as high as in the wild-type strain, indicating that Num1 is required for splicing in general. We noticed, however, that for few introns (83, allowing a 10% threshold) splicing was not affected, while other introns were barely spliced at all in AB31 Δ num1. Differences in intron retention rates were specific for discrete introns, and not for particular transcripts, as we observed that in genes with more than one intron separate introns were spliced to different extent (Table S1, examples are shown in Figure S12).

It has been proposed that the function of the NTC with regards to cell cycle regulation or DNA damage repair may result from the decreased splicing efficiency of intron-containing genes involved in recombination, repair, cell cycle or chromosome segregation [42]. We did not observe an enrichment of genes with high intron retention rates in any “category for functional annotation” (FunCat). However, inspection of genes in the FunCats “cell cycle” and “DNA repair” (Table S2) revealed that for individual genes involved in DNA repair splicing is impaired, as, for example, for *rad51* (*um03290*), for the gene for the repair exonuclease *Rec1* (*um11016*), or for *mms2* (*um10097*), involved in the error-free post-replication repair. Similarly, splicing of genes involved in cell cycle control, as *cks1* (*um03210*), encoding a regulatory subunit of cyclin-dependent kinases, or the gene for the cyclin dependent kinase 1 (*cdk1*, *um10705*) is affected in AB31 Δ num1 (Table S2, Figure S13).

We have shown before that cell cycle and hyphal development are controlled by a cascade of transcription factors [2]. Intriguingly, although most *U. maydis* genes contain no introns, both bE and bE carry single introns; *rbf1* harbors even four introns. It could be well possible that the observed phenotype of the Δ num1 strains is caused by inefficiently spliced genes of the master regulators for filamentous growth and pathogenic development. In AB31, the bW₂-allele is expressed without the intron sequence [24], but we observed that bE1 is indeed spliced less efficiently in AB31 Δ num1 (Table S3). However, all direct b-target genes were induced to a similar extent in AB31 Δ num1 compared to AB31 (Table S4), which implies that expression of the bE and bW genes in the Δ num1 background is sufficient to provide full functionality of the bE/bW heterodimer.

In accordance with the unaltered functionality of bE/bW, the expression of the direct target gene *rbf1*, was not altered in AB31 Δ *Num1* (Figure 4C); however, all four introns were spliced less efficiently. Under the assumption that splicing of the introns occurs independently from each other, only in 45% of the mature mRNA in AB31 Δ *Num1* all introns were spliced correctly, compared to 80% in AB31 wild-type cells (Figure 4A, Table S3). The splicing defect in *rbf1* was validated via RT-PCR and qRT-PCR analyses (Figure S14), showing additional unspliced variants and increased intron retention, respectively, in AB31 Δ *Num1*. Consistently, we observed that the abundance of the Rbf1 protein in AB31 Δ *Num1* is reduced to about 30% of wild-type level (Figure 4B), although qRT-PCR analysis showed that the total level of the *rbf1*-transcript was not altered (Figure 4C).

Rbf1 controls the expression of *biz1*, *hdp1* and *hdp2*, encoding transcription factors that are collectively involved in cell cycle regulation, filamentous growth and pathogenic development [43, Scherer, Vranes, Pothiratana and Kämper, unpublished]. In accordance with the reduced Rbf1 levels, RNA-Seq analysis revealed that *biz1* as well as *hdp2* expression was significantly down-regulated in AB31 Δ *Num1*, which was verified by qRT-PCR (Figures 4D and S15, Table S4). *hdp1* splicing efficiency was reduced in AB31 Δ *Num1* from 0.83 to 0.14 (Table S3); interestingly, *hdp1* RNA-levels were increased about 2-fold, which may argue for a self-regulation of the gene (Figures 4D and S15, Table S5). In total, we observed an at least two-fold down-regulation for 228 genes in AB31 Δ *Num1*; intriguingly, 89 of these genes overlap with a set of 351 genes that has been identified as down-regulated in response to a deletion of *rbf1* in AB31 (Figure 4E, Table S5, [2]).

As *rbf1* is one of the major regulators implicated in filamentous growth and cell cycle regulation, it was tempting to speculate that the reduced splicing efficiency of the gene may be the cause for the observed phenotype in *Num1*-mutants. To test this hypothesis, we exchanged the *rbf1* gene with an intron-free derivative in strains AB31 and AB31 Δ *Num1*. However, we observed that the intron-free copy of *rbf1* is not capable to substitute for the native gene; despite wild-type-like expression levels the strains did not grow filamentous, nor were the known *rbf1*-target genes induced (Figure S16). Obviously, introns are essential for the expression of the Rbf1-protein. As a consequence, expression of the *rbf1* cDNA did not rescue the *Num1* phenotype either.

In summary, we conclude that Num1 is a structural component of the conserved Prp19/CDC5L complex and fulfills common functions that have previously been associated with this complex, as cell cycle control, cellular response to DNA damage, and splicing. Our data indicate that the observed phenotype in *U. maydis* hyphae may be at least in part the result of the splicing defect of genes involved in cell cycle control, DNA damage repair and of central components of the regulatory cascade controlling filamentous growth and pathogenic development.

Num1 interacts with the Kin1 motor protein

To further elaborate the molecular function of the Num1 protein, we employed the yeast two-hybrid system. Proteins identified as potential interactors for Num1 are shown in Table S6. Consistent with a putative function of Num1 within the Prp19/CDC5L complex, the CDC5L homologue Cef1 was isolated as an interacting protein.

Unexpectedly, we identified various interactions with proteins involved in cellular transport processes. Um10158 is an adaptin-like protein from clathrin/coatamer-adaptor complexes (IPR002553) mediating endocytic protein transport between ER and Golgi. Um03539 and Um11510 contain a BAR-domain (IPR004148) and a BRO1-domain (IPR004328), respectively, and

are thus likely involved in intracellular vesicular transport processes and protein targeting to endosomes or the vacuole. The conventional kinesin motor protein Kin1 [formerly named Kin2, 20] functions in long distance trafficking within fungal hyphae as it transports Dynein along the microtubule cytoskeleton towards their plus-ends directed to the hyphal tips [9,14]. We were not able to generate deletion strains for *um10158*, indicating that the respective protein might be of essential function. Deletion analysis for *um03539* and *um11510* in strain AB31 revealed no obvious phenotype with respect to polar growth and vesicular movement (data not shown), indicating that the respective proteins have no function with respect to Num1-associated processes. For *kin1*, however, it had already been demonstrated that the gene has impact on hyphal morphology [14, see below].

To confirm the interaction of Num1 with Kin1, co-immunoprecipitation analyses were carried out. A full-length Num1:Myc-tagged protein and a Kin1:HA-tagged protein fragment encompassing amino acids 650–968 were generated by coupled *in vitro* transcription/translation, and Num1:Myc was specifically co-precipitated from mixtures of Kin1:HA with an anti-HA antibody (Figure 5A). By use of the yeast two-hybrid system we mapped the interaction domain of Num1 (encompassing amino acids 67 to 147) with the C-terminal Kin1 domain used in the co-immunoprecipitation, which provides additional evidence for a specific interaction with the Kin1 motor protein (Figure S17). The interaction was further verified *in vivo*, using *U. maydis* strain UNK197 that harbors *num1:3eGFP* and *kin1:HA* fusion genes integrated into their native loci by homologous recombination, respectively. By use of dithiobis[succinimidyl]-propionate (DSP) to crosslink proteins in extracts prior to immunoprecipitation, the Num1:3eGFP protein was efficiently co-precipitated with the Kin1:HA protein using anti-HA antibodies (Figure 5B). Without cross-linking of the proteins, only a faint signal was detectable (not shown), suggesting that the interaction is only transient. Taken together, we conclude from our data that Num1 interacts with the motor protein Kin1.

Num1 and the motor protein Kin1 are functionally connected

In addition to the physical interaction, several lines of evidence argue for a functional connection between Num1 and Kin1. Induced expression of *bE1/bW2* in a Δ *kin1* strain leads to short curved hyphae with delocalized septa and the formation of bipolar filaments [14]. Similarly, the induction of hyphal growth in AB31 Δ *Num1* leads to irregular or bipolar filaments with an aberrant insertion of septa (Figure 1, Table 1). In strains deleted for *kin1* the number of vacuoles is increased, while size is reduced [13]. We observed a similar phenotype in strains SG200 Δ *Num1* (Figure 6A).

To analyze the functional relation between the two proteins further, we generated strains deleted for both genes. Filaments induced in AB31 Δ *Num1*/ Δ *kin1* displayed a more severe phenotype with respect to polarized growth, as hyphae exhibited a very irregular, swollen morphology, and also the number of branched hyphae and hyphae with an altered septation pattern was significantly higher than in AB31 Δ *Num1* or AB31 Δ *kin1* (Figure S18). Infection experiments with SG200 Δ *Num1*, SG200 Δ *kin1* and SG200 Δ *Num1*/ Δ *kin1* deletion strains revealed that the virulence of the double deletion strain is significantly reduced when compared to the respective single deletion strains (Figure S18). The more severe phenotype excludes that both genes are in pure epistatic interaction; besides their function within a common complex, both proteins must fulfill functions that are independent from each other.

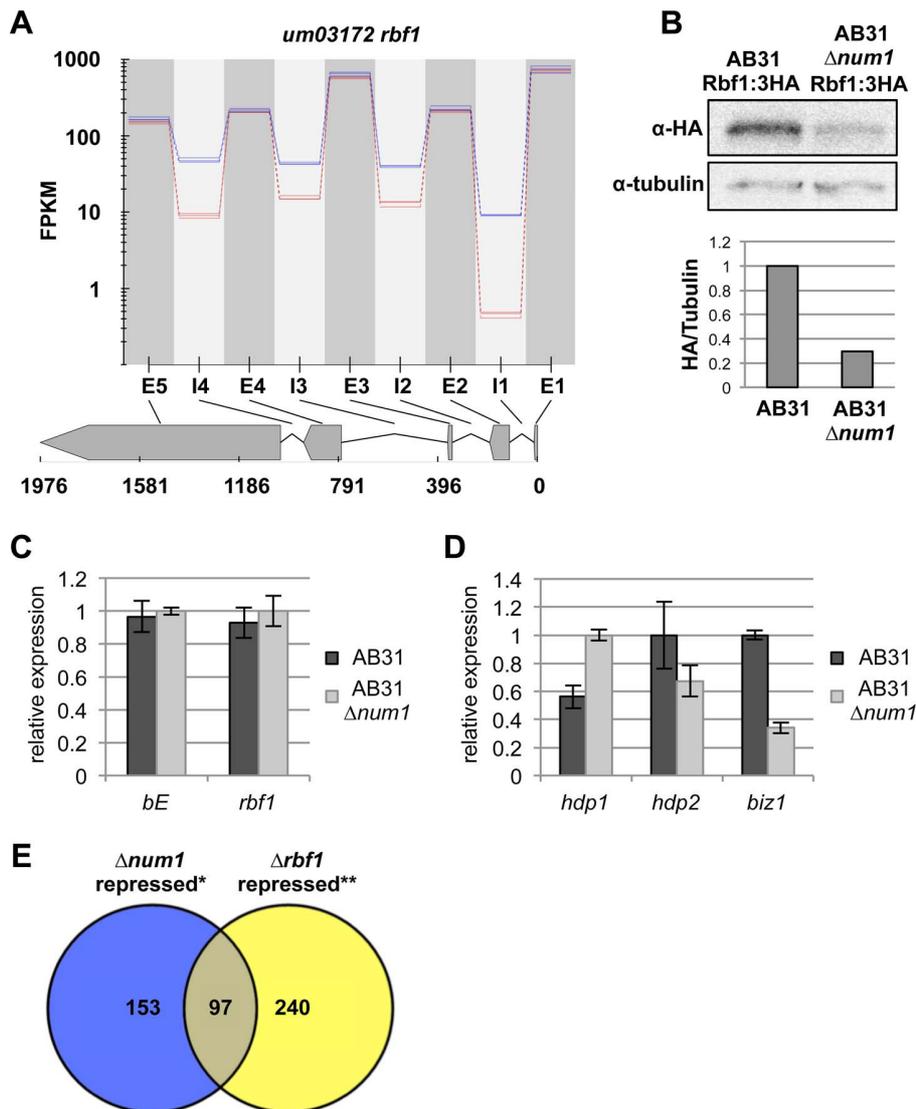


Figure 4. Reduced splicing efficiency of the *rbf1*-gene leads to impaired function of the Rbf1 master regulator. (A) Plot depicting splicing efficiency of the *rbf1*-gene. Plotted are the FPKM values (fragments per kilobase of sequence per million fragments mapped) across the genomic region indicated (coordinates in nucleotides) of three independent RNA-Seq experiments for AB31 wild-type (blue lines) and AB31 $\Delta num1$ (red lines), respectively. Exons (E) and introns (I) are indicated. All four introns show increased intron retention rates in AB31 $\Delta num1$. (B) Western analysis showing abundance of Rbf1:3xHA and α -tubulin (loading control) from AB31 wild-type and $\Delta num1$ -deletion strains. In AB31 $\Delta num1$, Rbf1 is reduced to 30% of wild-type-level (Quantification: ImageJ [109]). (C, D) Gene expression analyses of *b*- and *rbf1*-genes (C) as well as *rbf1*-target genes (D) using qRT-PCR. RNA samples were isolated from strains AB31 and AB31 $\Delta num1$ eight hours after induction of the bE1/bW2-heterodimer. Gene expression is shown relative to the highest expression value, using *actin* and *elf2b* for normalization. Shown are the mean values of three biological and two technical replicates. Error bars represent the SD. (E) Venn diagram depicting the total number of genes repressed in AB31 $\Delta num1$ and AB31 $\Delta rbf1$. * RNA-Seq analysis, this study; ** Microarray analysis conducted five hours after induction of the bE1/bW2-heterodimer [2]. doi:10.1371/journal.pgen.1004046.g004

Num1 and Kin1 are both required for trafficking of early endosomes

The deletion of *kin1* results in a loss of rapid bi-directional trafficking of early endosomes. Early endosomes visualized by a GFP-fusion with the endosomal t-SNARE Yup1 (Yup1:eGFP) [4] accumulate at the hyphal tips of *kin1*-deletion mutants [9], while in the wild-type situation Yup1:eGFP labeled vesicles shuttle bi-directionally throughout the hyphae along microtubule tracks [4]. The anterograde transport of early endosomes is mediated via the motor protein Kin3 (directed to the microtubule plus-ends at the hyphal tip), whereas the retrograde transport is accomplished by

Dynein1/2 [8,10,11]. Since the Kin1 motor protein transports Dynein toward the hyphal tips, the accumulation of early endosomes at the tip of $\Delta kin1$ hyphae can be explained indirectly by the failure of the Kin1-dependent anterograde transport of Dynein [9].

The deletion of *num1* leads to a comparable scenario in the distribution of early endosomes, which appeared to cluster at hyphal tips and the distal pole of the hyphae as well as around the delocalized septa frequently found in $\Delta num1$ -hyphae (Figure 6B). Endosomal motility was monitored in strain AB33, in which the *b*-genes are expressed under control of the nitrogen-responsive *P_{nar1}*-promoter [44]. Filamentous growth in AB33 is repressed by

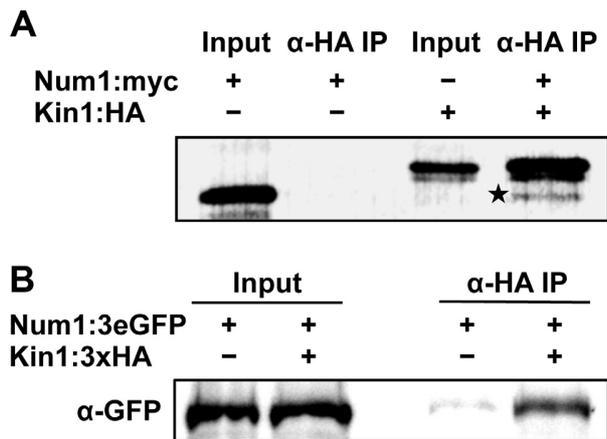


Figure 5. Num1 physically interacts with the Kin1 motor protein. (A) *In vitro* expression and co-immunoprecipitation of Myc-tagged Num1 and HA-tagged Kin1. Proteins were labeled with biotin during *in vitro* synthesis, detected with streptavidin-conjugated alkaline phosphatase, and visualized with NBT/BCIP. In the negative control (Num1:Myc), no unspecific binding of Myc-tagged Num1 to the HA-antibody was detected. In contrast, after co-incubation with HA-tagged Kin1, the Myc-tagged Num1 protein was co-immunoprecipitated (indicated by asterisk), demonstrating that the Num1 protein physically interacts with Kin1 *in vitro*. (B) *In vivo* co-immunoprecipitation of *U. maydis* strains expressing HA-tagged Kin1 and 3eGFP-tagged Num1 under control of their endogenous promoters. After crosslinking of proteins using DSP, α -HA coupled agarose beads were used to precipitate Kin1. The Num1 protein was detected on Western blots using an α -GFP antibody. As negative control, a strain expressing only Kin1:3xHA was used.
doi:10.1371/journal.pgen.1004046.g005

ammonium and can be elicited in nitrate-containing media. In AB33 Δ num1 filaments, long-distance movement of early endosomes was constrained, and velocity of the vesicles was reduced to a speed of 1.14 μ m/sec in AB33 Δ num1, in contrast to 1.46 μ m/sec in wild-type hyphae (t-test $p = 0.005$). In AB33 Δ num1 filaments with aberrant septa, long-distance trafficking of endosomes was entirely abolished, and only residual movement of vesicles was observed (Table 2, Videos S1 and S2). Next we addressed the question whether the altered movement and positioning of early endosomes in Δ num1 strains may be caused by a distortion of cytoskeletal elements. Neither the arrangement or abundance of microtubules (visualized by an α -tubulin mCherry fusion, Tub1:mCherry) nor of actin patches (visualized by LifeAct:YFP [45]) was altered in the Δ num1 mutant strain (Figure S19). To analyze the orientation of the microtubule cytoskeleton, we used strains expressing an α -tubulin GFP fusion [14] together with the microtubule plus-end marker Peb1, fused to RFP, which localizes to growing microtubule plus-ends [46]. As previously described [46], in wild-type interphase sporidia the majority of microtubule plus-ends is oriented towards the budding cell and the opposing cell pole of the mother cell; in Δ num1 sporidia, the orientation of the microtubule cytoskeleton was not considerably altered (Figure S20 A,B). Similarly, in hyphae the majority of microtubule plus-ends is oriented towards the cell poles, i.e. hyphal tips and basal retraction septa [9]. In Δ num1-mutants, we observed microtubule plus-ends also in close vicinity to the delocalized septa (Figure S20 C–E). Apparently, endosomes accumulate at microtubule plus-ends in Δ num1-deletion mutants, supporting the Kin1-dependent effect on endosomal transport. In some hyphae of the Δ num1-deletion strain we observed the appearance of mitotic spindles, which supports the defect in cell cycle regulation.

To determine whether the effect on endosomal trafficking in AB33 Δ num1 strains is attributed to an aberrant anterograde transport of Dynein towards the hyphal apex, as it was suggested for Δ kin1 mutants, we visualized the subcellular distribution of Dynein using an N-terminal 3eGFP:Dyn2 fusion protein [9]. In wild-type filaments, 3eGFP:Dyn2 fusion proteins form comet-like motile structures that accumulate at microtubule plus-ends in hyphal tips, where they reverse direction and move into retrograde direction [9]. In AB33 Δ num1 filaments, however, the number of cells harboring an apical accumulation of 3eGFP:Dyn2 was significantly reduced (t-test $p = 0.002$); concomitantly, in most cells the 3eGFP:Dyn2 signal in the cytoplasm was higher than in wild-type filaments (Figure 6C).

As Kin1 affects motility of early endosomes only indirectly (via the anterograde transport of Dynein), we set out to analyze the movement of a direct Kin1-cargo. The myosin chitin synthase Mcs1 [15] localizes to Kin1-dependently transported vesicles [17]. It has been described before that 3eGFP:Mcs1 fusion proteins localize to the poles of growing sporidia, where it is secreted and participates in the synthesis of chitin [15]. Δ num1-mutants showed reduced Mcs1-accumulations at the growth region in budding cells, which coincides with the distribution of Mcs1 in Δ kin1-deletion mutants [17] (Figure S21 A,B). In AB33 filaments, 3eGFP:Mcs1 localizes to distinct foci close to the cell membrane and forms a gradient towards the growth zone within the hyphal apex or localizes to the basal retraction septum, i.e. to sites of chitin synthesis. In contrast, in AB33 Δ num1 hyphae no tip-directed gradient was obvious and less foci were observed at the cell membrane (Figure S21 C,D), indicating an impaired delivery of Mcs1-containing vesicles. In many cases, Mcs1 was not observed at delocalized septa in Δ num1-mutant hyphae. In summary, *U. maydis* strains deleted for either *num1* or *kin1* show similar phenotypes with respect to hyphal morphology and septation, formation of vacuoles, endosomal trafficking as well as the localization of the Kin1-cargos Dynein and Mcs1, which strongly corroborates a functional interrelation of Num1 and Kin1.

Num1 is required for transport of cytoplasmic mRNA particles

Recently, it has been shown that the RNA-binding protein Rrm4 is associated with early endosomes [7]. Rrm4 is required for cytoplasmic transport of mRNAs in *U. maydis* filaments [47]. We deleted *num1* in an AB33 strain expressing an Rrm4:eGFP fusion protein. In the wild-type background vesicles associated with eGFP-labeled Rrm4 shuttled within the hyphae to the distal and proximal ends. In contrast, movement in Δ num1 was reduced, and similar to Yup1-labeled early endosomes, Rrm4-containing particles frequently accumulated in clusters at hyphal tips or around delocalized septa (Figure S22, Videos S3, S4), indicating that *num1* is required for cytoplasmic mRNA transport.

Num1 has a functional homologue in the filamentous ascomycete *Aspergillus nidulans*

To address the function of Num1 in filamentous fungi in general, we deleted a gene encoding a protein with high similarities to Num1 (AN4244, 49% similarity, 30% identity) in the ascomycete *Aspergillus nidulans* (strain TN02A3). The deletion mutants displayed smaller colonies with a reduced rate of conidiospore formation. Germination of spores was drastically reduced in the Δ AN4244 mutant strains: after eight hours of incubation at 37°C, only 5% of the spores germinated, compared to 98% in the wild-type strain. Similar to the phenotype observed in *U. maydis*, hyphae from germinating Δ AN4244 conidia were

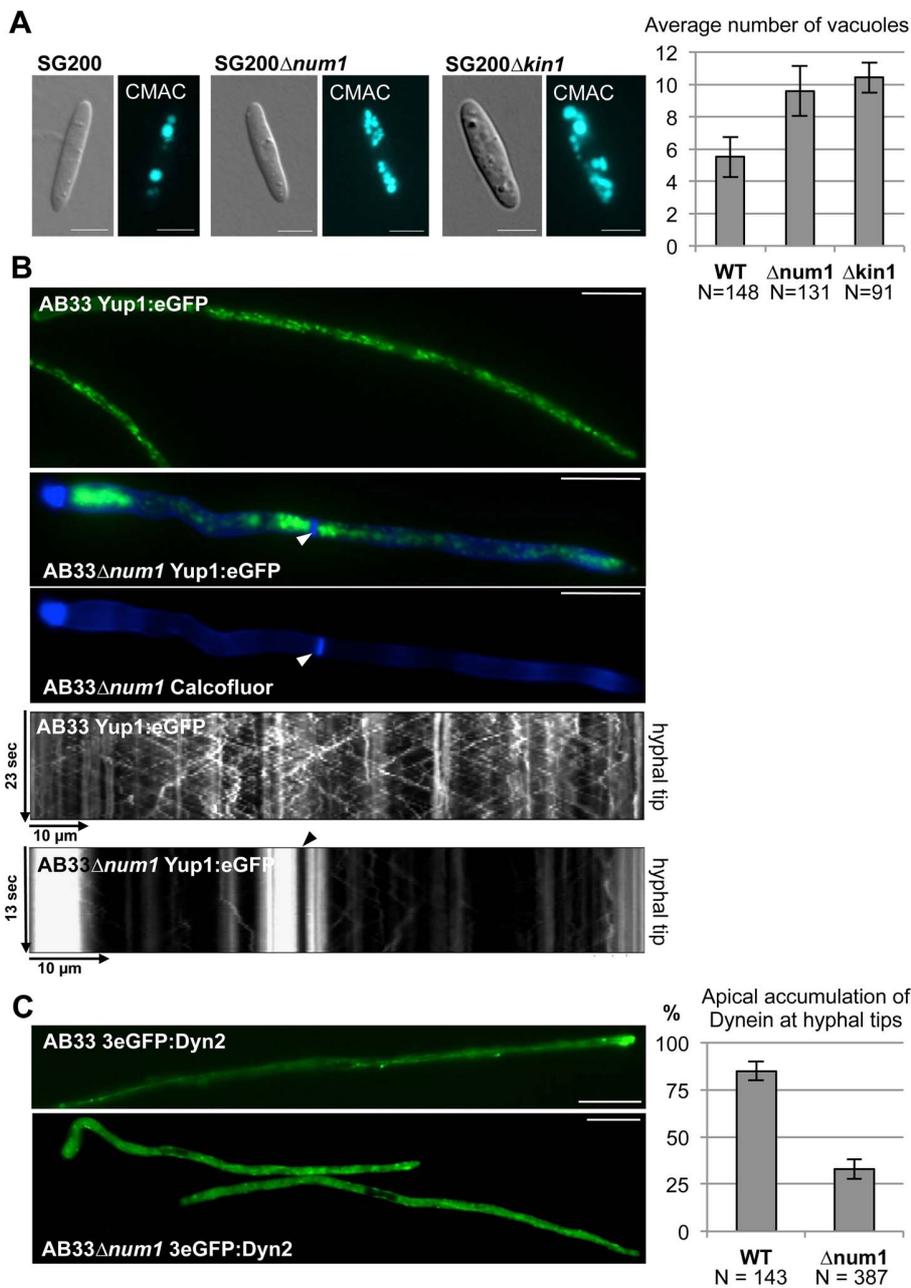


Figure 6. Num1 and Kin1 are functionally connected. (A) The *num1* deletion leads to aberrant vacuole morphology. Vacuoles were visualized by CellTracker Blue (7-amino-4-chloromethyl-coumarin, CMAC) staining. Both *num1* and *kin1* deletion strains contain more, but smaller vacuoles in comparison to wild-type sporidia. Scale bars: 5 μ m. Right panel: Quantification of the average number of vacuoles of strains indicated. N represents the number of individual cells analyzed. Mean values of three independent experiments are shown. (B) The *num1* deletion leads to an aberrant distribution of early endosomes. For visualization of early endosomes, a Yup1:eGFP fusion protein [9] was expressed under control of the constitutively active *P_{oter}*-promoter in strains AB33 and AB33 $\Delta num1$, which harbor *b*-genes under control of the nitrate-inducible *P_{nar1}*-promoter. Endosomes were analyzed 14 hours after *bE1/bW2*-induction. Septa (arrowhead) were visualized by Calcofluor White staining. Yup1-labelled early endosomes accumulate at basal and apical parts of the hyphae as well as around delocalized septa in AB33 $\Delta num1$ in contrast to wild-type hyphae. Scale bars: 10 μ m. Movies detecting Yup1:eGFP-fluorescence of the depicted hyphae are shown in Videos S1 and S2. Shown below are the corresponding kymographs (time and distance as indicated) reflecting the motility of early endosomes. In AB33 hyphae, early endosomes travel continuously towards the hyphal tip (anterograde) and reverse direction to travel back towards the septum (retrograde). Pausing organelles are reflected by a vertical line. In contrast, endosomal motility is drastically reduced in AB33 $\Delta num1$ hyphae containing additional septa, where the majority of the Yup1:eGFP-signal is non-motile. An arrowhead indicates the septum. (C) The localization of Dynein is dependent on Num1. In AB33 filaments 3eGFP:Dyn2 fusion proteins form comet-like motile structures that accumulate at the hyphal tip and from there move into retrograde direction [9]. In filaments of AB33 $\Delta num1$ strains the apical accumulation is significantly reduced ($p=0.002$); instead a stronger signal is observed in the cytoplasm. Dynein localization was monitored 14 hours after induction of the *bE1/bW2* heterodimer. Scale bars: 10 μ m. Right panel: Quantification of the apical accumulation of 3eGFP:Dyn2 fusion proteins. N represents the number of hyphae analyzed. Mean values of three independent experiments are shown.
doi:10.1371/journal.pgen.1004046.g006

Table 2. Reduced endosomal motility in *num1*-deletion strains.

	AB33 Δ <i>num1</i> (hyphae with delocalized septum)	AB33 Δ <i>num1</i> (hyphae without septum)	AB33
endosomal motility over a distance >5 μ m	13% N = 150	42% N = 150	92% N = 150
\emptyset velocity of motile endosomes	n.d.	1.14 \pm 0.25 μ m/s N = 20 *	1.46 \pm 0.42 μ m/s N = 20 *

*t-test $p = 0.005$.

doi:10.1371/journal.pgen.1004046.t002

shorter and thicker than those of the wild-type strain. Staining with CellTracker Blue revealed that in the mutant the number of vacuoles was increased, while size was reduced (Figure 7A). In contrast to *U. maydis*, *A. nidulans* hyphae have cell compartments with multiple nuclei. In wild-type hyphae, these nuclei are evenly distributed. In Δ *AN4244*, however, nuclei were often found in clusters (Figure 7B). A similar phenotype has been observed earlier for strains deleted for KinA, the homologue of the *U. maydis* Kin1 [48]. To test a potential functional relation between AN4244 and KinA in *A. nidulans*, we analyzed, in analogy to *U. maydis*, the distribution of Dynein (NudA in *A. nidulans*). We deleted *AN4244* in strain LZ12, which harbors a GFP:NudA fusion protein. Similar as described for the *U. maydis* hyphae, GFP:NudA was predominantly localized at the tip of hyphae in strain LZ12, while the apical accumulation was reduced in LZ12 Δ *AN4244* (Figure 7C). Taken together, our data suggest that the *A. nidulans* AN4244 has a conserved function as the *U. maydis* protein with respect to polarized growth and intracellular transport processes.

Discussion

In this study we have characterized the function of the Num1 protein in *U. maydis*. We show that Num1 is a functional homologue to the human SPF27 protein, which is an integral component of the conserved spliceosome-associated Prp19/CDC5L-complex (NTC). Deletion of the *num1* gene affects polar and filamentous hyphal growth, cell cycle control as well as DNA repair. Consistent with its function as component of the NTC, deletion of *num1* results in a genome-wide reduced splicing-activity, which could explain the observed pleiotropic phenotype. In addition we demonstrate a previously unknown function of an NTC-component in the cytoplasm, where Num1 interacts with the Kinesin 1 motor protein. This functional interconnection of Num1 with elements of the cytoskeleton implies additional, yet unknown functions during intracellular trafficking processes.

Num1 is a conserved component of the spliceosome-associated Prp19/CDC5L-complex (NTC)

Num1 shows significant similarities to SPF27, and its interaction with Prp19 and Cef1 is in accordance with the interactions within the NTC complex demonstrated in *S. pombe* [28], humans [21] and plants [49].

The NTC was initially identified in *S. cerevisiae* as a complex containing Prp19 and at least seven other components [50], most of which are conserved from yeast to human. The NTC is a non-snRNP (small nuclear ribonucleoprotein particle) multi-protein complex, and as a subunit of the spliceosome it is required for intron removal during pre-mRNA splicing. The complex associates with the spliceosome during or after dissociation of U4 snRNP and participates in the regulation of conformational changes of core spliceosomal components, stabilizing RNA-RNA- as well as RNA-protein interactions [reviewed in 51]. The only known

enzymatic function of the NTC is a conserved U-box domain with E3-ubiquitin ligase activity of the Prp19-protein [52,53]. It was conclusively shown that individual core components of the NTC, as Prp19, Cef1/Cdc5 in *S. cerevisiae* and *S. pombe*, or the *S. pombe* SPF27 homologue Cwf7 independently affect splicing [42,50,54–59]. However, it is mostly unresolved to which extend single components of the NTC influence splicing of individual introns. We now show that one of the core components of the NTC, the

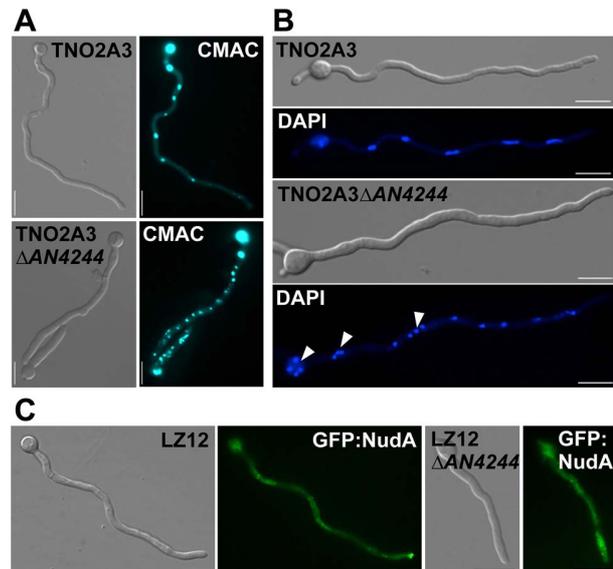


Figure 7. Deletion of the gene for a Num1-homologue in the ascomycete *Aspergillus nidulans* leads to a phenotype reminiscent to the *Anum1* phenotype in *U. maydis*. (A) The morphology of vacuoles is affected by the *AN4244*-deletion. Spore suspensions of a wild-type (TNO2A3) and the *AN4244* deletion mutant were incubated for 18 hours at 37°C and the germinated filaments were CellTracker Blue (CMAC)-stained to visualize the vacuoles. Similar to the *num1*-deletion in *U. maydis*, the *AN4244*-deletion in *A. nidulans* leads to an increased number of vacuoles. (B) Deletion of *AN4244* affects nuclear positioning. Spore suspensions of *A. nidulans* wild-type (TNO2A3) and the *AN4244* deletion mutant were incubated for 12 and 18 hours, respectively, at 37°C, and the germinated filaments were DAPI-stained to visualize nuclei. In wild-type filaments, nuclei are evenly spaced, whereas in the mutant nuclei are often found in clusters. (C) The localization of Dynein (NudA) is dependent on AN4244. Spore suspensions of strains LZ12, expressing a GFP:NudA fusion protein, and LZ12 Δ *AN4244* were incubated for 18 hours at 37°C. In LZ12 the GFP:NudA signal strongly accumulated in tips of germinating hyphae, whereas in mutant filaments, this apical accumulation was reduced; instead a stronger signal was observed in the cytoplasm. Scale bars: 10 μ m.

doi:10.1371/journal.pgen.1004046.g007

SPF27 homologue Num1, has a global effect on splicing in *U. maydis*, as retention rates of nearly 80% of all introns were significantly increased in *num1*-deletion mutants. We observed variations in intron retention between different transcripts in response to the *Anum1* mutation. Similar observations have been made in *S. cerevisiae* on a genome-wide scale for depletion of individual components of the spliceosome, including the NTC-components Prp19 and Prp17. The resulting splicing defects displayed considerable differences in different mRNAs, indicating that individual splicing factors affect a discrete set of genes [60]. It is well possible that structural alterations of the spliceosome complex after deletion of *num1* result in altered recognition/affinity of specific introns, probably caused by their different GC content or secondary structures. Following the conclusions made in *S. cerevisiae*, we favor the possibility that deletion of *num1* leads to an altered integrity of the NTC, resulting in a reduced activity and/or specificity and hence a diminished splicing efficiency. However, we cannot rule out that Num1 may recruit splicing enhancer- or inhibitor-proteins that might affect splicing of only a subset of introns.

Splicing defects can account for pleiotropic phenotypes in *num1*-deletion mutants

In addition to disturbed polarity we frequently observed delocalized septa in *num1*-deletion strains; in addition, chitin-staining indicate structural differences to wild-type septa. Formation of septa requires a highly coordinated and dynamic positioning of septins into ring-like structures [61], a process tightly regulated by the small GTPase Cdc42, its guanine exchange factor Don1 and the protein kinase Don3 [62–64] as well as by formins or Cdc4, an essential light chain of the type II myosin motor protein [65]. The genes encoding the septins Cdc3 (*um10503*) and Sep3 (*um03449*), but also Cdc4 (*um11848*) display significantly increased intron retention rates (Table S1) and the expression of *don3* (*um05543*) is reduced more than 2-fold in the *num1*-deletion strain (Table S4), which altogether might rationalize the formation of delocalized septa.

We found that Num1 affects splicing of several genes of the functional class “cell cycle”, including genes for the catalytic and regulatory subunits of cyclin-dependent kinases, for mitotic cyclins as well as for γ -Tubulin (Table S2). Similarly, several genes grouped in the functional class “DNA-repair” (e.g. for the DNA repair recombinase Rad51, the nucleotide excision machinery component Rad1 and the repair exonuclease Rec1) show increased intron retention rates (Table S2). The synergistic effect of several genes with reduced splicing efficiency (and the resulting reduced activity) within the same functional category may be sufficient to explain the effects on the corresponding cellular processes. However, various components of the NTC have been found to be directly involved in DNA damage repair. Initially, the resistance to the interstrand cross-linking reagent psoralen in a *S. cerevisiae* Prp19 mutant strain [32] has been attributed to the splicing defect of the intron containing *RAD14* gene [66]. Subsequently, it has been conclusively shown that the DNA damage phenotype is independent from the splicing defect [42]. In addition, for Prp19 several interaction partners have been identified which belong into the functional classes “cell cycle”, “chromatin structure” and “DNA repair” rather than pre-mRNA processing. For example, the human Prp19/Pso4 directly interacts with terminal deoxynucleotidyl-transferase (TdT), which is involved in DSB repair [67]. The human Cef1-homologue CDC5L interacts with the Werner syndrome protein WRN, a DNA helicase that functions during homologous recombination in

response to DNA-damage [35] and also with the non-homologous end-joining (NHEJ) factor DNA PKcs [68].

Thus, it is well possible that also in *U. maydis* the increased UV-sensitivity of *Anum1* mutants results from a direct function of Num1 in a DNA damage repair pathway. Similarly, disturbed cell cycle and cell division can be explained as indirect effect of a disturbed DNA-damage repair. Interaction of the human CDC5L with the cell cycle checkpoint kinase ATR (“ataxia-telangiectasia and Rad3-related”) was shown to be required for activation of the ATR kinase as well as for further downstream effectors and mediators of ATR function as the checkpoint kinase CHK1 [69]. In *U. maydis*, the homologues of ATR1 and CHK1 are known to be critical cell cycle regulators in addition to their decisive roles in the DNA-damage response [70,71].

We have shown previously that cell cycle and polarized growth in *U. maydis* is regulated by a cascade of transcription factors controlled by the bE/bW-heterodimer [2]. Several of the transcription factors of this b-cascade were found to have increased intron retention rates or a differential expression pattern in AB31 *Anum1* and might collectively contribute to the effects on cell cycle control and polar hyphal growth. For example, splicing efficiency of the *hdp1* gene, which encodes a homeodomain transcription factor required for filamentous growth and cell cycle control (Pothiratana and Kämper, unpublished data), was reduced from 83% in wild-type to 14% in the *num1*-deletion strain. More importantly, all four introns of *rbf1* are spliced less efficiently in the *num1*-deletion strain. As a consequence, protein levels of Rbf1, the master regulator for hyphal development, are significantly decreased in *Anum1* strains. In accordance with the reduced Rbf1 protein levels in *Anum1* strains, we observed the down-regulation of *rbf1*-dependently expressed genes. Among these are the *rbf1*-dependently expressed genes encoding the transcription factors Biz1 and Hdp2, which were previously described as cell cycle regulators and factors for filamentous growth and pathogenic development [43; Scherer and Kämper, unpublished data]. Conclusively, we can assume that the reduced splicing efficiency of the *rbf1* gene and in turn the deregulation of *rbf1*-dependently expressed genes contributes to hyphal morphology and the deregulated cell cycle in *num1*-deletion mutants. A direct proof of this hypothesis by replacing the *rbf1* open reading frame with a cDNA copy failed. The intron-free copy, although expressed to the same level as the intron-containing copy, was not able to provide wild-type Rbf1 function, even when introduced into wild-type cells. Such a reduced expression of cDNA copies in relation to intron-containing genes has been described frequently before, and in various cases this has been related to direct effects of introns to translational efficiency [reviewed in 72,73].

Num1 has a specific role in cytoplasmic trafficking processes

Aberrant or incomplete splicing events of the genes encoding motor proteins by themselves would be an explanation for the impaired endosomal trafficking processes observed in *num1*-deletion strains. However, none of the genes for the major transport-mediating motor proteins (*kin1*, *kin3*, *dyn1/2*) contains introns or show altered expression levels in the *Anum1*-mutant. Although we cannot rule out an effect caused by aberrant splicing of genes for unknown components of the transport machinery, we favor a specific role of the Num1 protein in intracellular trafficking processes, based on the observation that (a) Num1 is localized in distinct foci in the cytoplasm, implicating functions beyond its role as a splicing factor, and (b) Num1 interacts with the Kin1 motor protein, which is involved in long-distant transport processes during filamentous growth [9,12,14]. The physical interaction of

Kin1 and Num1 is in line with the similar phenotypes of the two mutant strains with respect to cell morphology, determination of polarity and septation, and morphology of vacuoles. *Anum1* and likewise *Δkin1* hyphae display impaired trafficking of early endosomes and reduced apical localization of Dynein, two interconnected phenotypes, as the transport of early endosomes relies on Dynein and the anterior transport of Dynein depends on Kinesin 1. In addition, the distribution of the direct Kin1 cargo Mcs1 is altered in both *Δkin1* and *Δnum1* mutants, which argues for a direct connection of Kin1 and Num1. However, we can rule out that Num1 is required for all Kin1-related processes, as (a) both mutations appear not to be epistatic, and (b) the *num1* and *kin1* mutant strains have overlapping, but not identical phenotypes; for example, haploid *Δkin1* strains are defective in mating [20], while *Anum1* strains are not. This is anticipated, as each of the proteins participates in different cellular processes. The conventional kinesin is best known for its function in cellular transport processes. However, conventional kinesin has also been implicated in cell signaling, or to serve as *bona fide*, static anchor for mRNA-protein complexes or vesicular compartments, or to participate in the phosphorylation of cargo proteins to which it binds [reviewed in 74]. As outlined above, also SPF27 (or the NTC) participates in a wide spectrum of processes that, however, show no overlap with Kin1-dependent processes.

Interaction of SPF27 homologues with conventional kinesin motor proteins is not specific to *U. maydis*, but appears to be conserved between basidio- and ascomycetes, as in *Aspergillus nidulans* the phenotype of deletion mutants of the SPF27 homologue AN4244 or the Kin1 homologue KinA [48] are comparable to those observed for *U. maydis*.

The association of a conventional kinesin motor protein with a component of the spliceosome-associated NTC has not been described so far and implies a novel function for SPF27-homologous proteins. The question is whether the Num1 protein fulfills dual functions, (a) during splicing as an NTC-component in the nucleus and (b) during Kin1-dependent intracellular trafficking processes in the cytoplasm, or whether these two disparate mechanisms are connected by one single function. Discrete cytoplasmic functions may serve to regulate the activity of Kin1, as described in neuronal development for the interaction of Kinesin-1 and JIP3, an interactor of the c-Jun N-terminal kinase [75]. Alternatively, Num1 could function as a scaffold or adapter molecule, providing stability to the motor protein/cargo-complex and/or to the NTC. In both scenarios, deletion of *num1* could alter the specificity/activity of Kin1-mediated transport processes, resulting in reduced motility of early endosomes and by that influence polar growth. We have not been able to visualize Num1 proteins moving or co-migrating with Kin1 along microtubule tracks. As GFP-Kin1 shows a strong cytoplasmic background, visualization of Kin1 molecules moving on microtubules has not been achieved yet [14,76]. Taken into account that the interaction of Kin1 and Num1 appears to be transient, we cannot rule out that Kin1 and Num1 may interact on microtubule tracks.

A possible process that could couple both nuclear and cytoplasmic functions of Num1 is the cytoplasmic transport of mRNAs. In *U. maydis*, the RNA binding protein Rrm4 was found to be instrumental for bidirectional transport of mRNAs in filaments [47]. Intriguingly, cytoplasmic transport of Rrm4 is dependent on Kin1, Kin3 and Dynein, and recently it was shown that Rrm4 co-localizes with early endosomes [7,77]. There is a remarkable overlap of the phenotypes of *rrm4*-, *num1*- as well as *kin1*-deletion mutants with respect to polarized growth [14,78], which raises the possibility of a concerted function of all three proteins within the same process. Indeed, the motility of early

endosomes associated with Rrm4:eGFP fusion proteins is drastically reduced in *Δkin1*-mutants [7,14] and, as we show here, also in *num1*-deletion strains.

In *Drosophila* oocytes, it has been shown that components of the exon junction complex (EJC) are essential for transport of *oskar* transcripts [79]. The EJC marks exon/exon-transitions during splicing, remains bound to the processed mRNA and serves as a quality control mechanism for the splicing reaction during translation [reviewed in 80]. Reminiscent to mRNA transport in *U. maydis*, transport of *oskar*-mRNA is also dependent on the conventional Kinesin 1 [81].

Unlike the components of the EJC that remain bound to mRNA during nuclear export, the NTC is thought to disassemble after the splicing reaction. However, recently it has been shown in *S. cerevisiae* that the NTC is required for efficient recruitment of TREX to the transcriptional machinery. This is mediated by the C-terminus of the NTC-component Syf1p, which connects TREX to Rpb1, the largest subunit of RNA-polymerase II [82]. TREX is a conserved protein complex (“transcription export”), which facilitates both transcription elongation as well as mRNA-export processes [83]. Yra1p, a component of the TREX complex, is an RNA-binding protein and interacts with the Mex67/Mtr2-receptor complex, which in turn act together with components of the nuclear pore complex (NPC) to guide the transcripts into the cytoplasm [84–86]. Thus, it appears well possible that NTC components remain tethered to the spliced mRNA. In this context it is interesting to note the recently discovered association of Kinesin 1- and Dynein to fungal nuclear pores, which mediate NPC-motility and are thus required for chromosome organization and nucleo-cytoplasmic transport [76]. This result corroborates a functional coupling between the nuclear transcription machinery and cytoplasmic transport processes in *U. maydis*.

The major finding of our study is that a component of the conserved spliceosome-associated NTC is involved in cytoplasmic trafficking processes. Due to the interaction of Num1 with the Kin1 and the functional connection to the RNA-binding protein Rrm4, it is tempting to speculate that Num1 could have a function during intracellular mRNA-transport processes. We hypothesize that one of the functions of the Num1-protein is to participate in the coordination of pre-mRNA splicing and the formation and export of mRNP-particles out of the nucleus. The transcripts would be transferred into the cytoplasm where they could be passed on to the microtubule-based transport machinery via the interaction of Num1 with Kin1 motor proteins that were found to be associated with the nuclear pore complex (Figure 8). In this model, additional adapter-proteins that act as connecting proteins between the nuclear splicing machinery and the cytoplasmic NPC-bound motor proteins cannot be excluded and remain to be identified.

Materials and Methods

Strains and growth conditions

Escherichia coli strain TOP10 (Invitrogen) was used for cloning purposes. Growth conditions and media for the cultivation of *E. coli* followed the protocols described previously [87]. The *Saccharomyces cerevisiae* strain AH109 (Clontech) was used for yeast two-hybrid interaction studies. *S. cerevisiae* cells were grown in YPGA complete medium, or on minimal medium (SD) supplemented with the dropout-mix needed for selection, as described in the Clontech Matchmaker™ GAL4 Two-Hybrid System 3 Manual (<http://www.clontech.com>). *Ustilago maydis* cells were grown in YEPSL [88], CM (complete medium) supplemented with 1% glucose (CM-G) and 1% arabinose (CM-A), respectively,

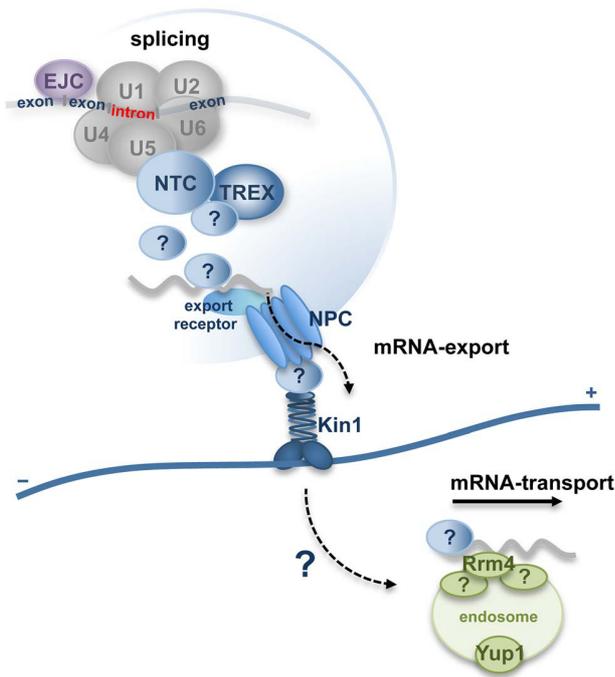


Figure 8. Hypothetical model for function of Num1 coordinating pre-mRNA splicing with nuclear pore complex-dependent export of mRNP-particles and microtubule-based mRNA-transport. Num1 is a component of the spliceosome-associated Prp19/CDC5L-complex (NTC) and has a global effect on splicing efficiency. NTC-components interact with the TREX (“transcription-coupled export”) complex [82], which mediates the export of mature transcripts into the cytoplasm via the nuclear pore complex (NPC) [83–86]. Adapter proteins connect the mRNA to NPC-bound export receptors. The Kinesin-1 motor protein has been shown to be associated to the NPC and promotes nucleocytoplasmic transport processes [76]. mRNAs within the hyphae are distributed via the RNA-binding protein Rrm4, which shuttles associated with early endosomes along the polar microtubule cytoskeleton [7,77]. Motility of the Rrm4 associated early endosomes depends both on Kin1 [7,14] and Num1. Proteins labeled with (?) depict yet unidentified adapter-proteins that might function as connectors between the nuclear splicing machinery and the cytoplasmic NPC-bound Kin1. As Num1 is a component of the NTC complex and interacts with Kin1, it might fulfill a function during mRNA export processes, possibly by connecting exported mRNP to the cytoplasmic transport machinery via its interaction with Kin1. doi:10.1371/journal.pgen.1004046.g008

or NM (nitrate minimal medium) [89] at 28°C. Solid media contained 2% agar. The induction of hyphal growth in AB31- and AB33 derivatives was done as previously described in [24]. Plate mating assays followed the protocol of [24]. Mating assays in liquid culture for the generation of dikaryotic hyphae were carried out as described in [90]. Pheromone stimulation of *U. maydis* cells was performed according to the protocol of [91]. *Aspergillus nidulans* was grown in CM (complex medium) [92] or MM (minimal medium) [93].

All *U. maydis* and *A. nidulans* strains used in this study are listed in Tables S7 and S8, respectively.

Plant infections were performed as described in [94]. For infection studies with *U. maydis*, the maize cultivar Early Golden Bantam was used under controlled conditions in a CLF Plant Climatics GroBank with a 16 h (28°C)/8 h (22°C) day/night rhythm. Disease symptoms were evaluated according to the disease rating criteria published previously [23].

Yeast two-hybrid analyses

Screening for Num1-interacting proteins was performed as previously described [95], using the Matchmaker III system (Clontech). Plasmid pGBKT7-Num1 was generated by PCR amplification of the *num1* open reading frame (ORF) from genomic DNA (strain 521 [23]), introducing two incompatible *SfiI* restriction sites at the 3′ and 5′ ends and subsequent ligation into the respective sites of pGBKT7 (Clontech). Plasmids pGAD-Prp19 and pGAD-Cef1 containing full-length as well as N- and C-terminal variants were generated by PCR amplification using either genomic DNA (for *cef1*) or a full-length cDNA library (for *prp19*) and subsequent ligation into pGAD-DS (Dualsystems Biotech) via *SfiI* sites. Oligonucleotide sequences are given in Table S9.

DNA and RNA procedures

Molecular techniques followed the protocols described in [87]. DNA from *U. maydis* was isolated according to the protocol given in [96]. Transformation procedures were performed as described in [97]. DNA from *A. nidulans* was isolated according to [98] and transformations were carried out as described in [99].

For gene deletions in *U. maydis*, a PCR-based approach [100] was used. Open reading frames were replaced by either hygromycin, carboxin or nourseothricin resistance cassettes. Similarly, for gene deletions in *A. nidulans*, a pyridoxine auxotrophic marker was used. C-terminal eGFP, RFP or 3×HA gene fusion constructs were generated in *U. maydis* via homologous recombination following the protocol given in [101], using *SfiI* cassettes from plasmids pUMA647 (eGFP) [7], pUMA738 [47] (RFP) or pUMA791 or pUMA792 (Feldbrügge, unpublished) for 3×HA fusions. Fusion constructs were subcloned in pCRII TOPO (Invitrogen), PCR-generated linear DNA was used for transformation of *U. maydis*. Homologous integration of the constructs was verified by Southern analysis. All sequences of oligonucleotides used for PCR are listed in Table S9.

Total RNA was extracted using Trizol reagent (Invitrogen) according to the manufacturer’s instructions. RNA samples to be used for real-time qRT-PCR or mRNA-Seq analysis were column purified (RNeasy; Qiagen) and the quality was checked using a Bioanalyzer with an RNA 6000 Nano LabChip kit (Agilent). Quantitative RT-PCR analysis for *pca*, *rpb3*, *ubi1*, *rho3* and *rbl1* was conducted with oligonucleotide pairs that specifically detected spliced and unspliced RNA species, respectively: forward primers used for quantification of spliced transcript were specific for exon/intron borders, whereas forward primers for the unspliced transcripts were placed within the intron sequence. Ratios of spliced vs. unspliced RNA of AB31 (wild-type) samples were set to 1.0 and compared to the ratios obtained with the AB31Δ*num1*. qRT-PCR experiments were done in three independent biological and two technical replicates each and followed the protocols given in [102] and [103].

DNA content was measured by flow cytometry. FACS analyses were performed according to [104] with the exception that 10⁵ cells were harvested for each time point and analyzed with a BD Biosciences FACSVerse flow cytometer using the FACSDiva 6.2 software. For each acquisition, 2*10⁴ events were measured at an average flow rate of 100–500 events per second.

mRNA-sequencing

mRNA was sequenced starting from total RNA isolated from strains AB31 and AB31Δ*num1* on an Illumina HiSeq 1000 using the TrueSeq mRNA sequencing kit according to the manufacturer’s instructions. Three independent libraries for each of the two strains were generated (Olivier Armant, Insitute for Toxology and

Genetics, KIT Campus North), using three independently grown cultures (biological replicates). Each library yielded an average of 60 million paired-end reads of 2×56 bp, which equals about 20×10⁹ bp sequences for each strain. Raw paired-end reads (2×56 bp) were aligned with TopHat 1.3.2 [105] to the *Ustilago* genome assembly provided by the MIPS *Ustilago maydis* Database (MUMDB, <http://mips.helmholtz-muenchen.de/genre/proj/ustilago>). TopHat was supplied with a gtf file derived from MUMDB's p3_t237631_Ust_maydi_20110629.gtf, but not restricted to known transcripts. Aligned reads were counted using custom Python scripts using the pysam library (<http://code.google.com/p/pysam/>). Gene expression values were derived by counting read pairs that were completely inside the exon regions of MUMDB-genes and differential expression was assessed with DESeq 1.6.1 [106] and BaySeq 1.8.1 [107] and filtered for an adjusted p-value ≤ 0.05 and a more than two fold change.

For comparison and visualization of splicing efficiency, read pairs overlapping the respective intron/exon with their first segment by at least three base pairs were counted and normalized to fragments per kb per million (FPKM). Intron retention was determined by calculating the ratio of introns FPKM to the gene's overall exon FPKM. Exon FPKM included all exons with more than 10 bp. Only genes with an FPKM above 10 were considered. A small number of introns with a retention rate above 0.9 were excluded, based on the assumption that they base on false gene models. Sequencing data was deposited at the EBI ArrayExpress Database (E-MTAB-1300).

Co-immunoprecipitation analysis

For *in vitro* protein expression and co-immunoprecipitation of Num1 and Kin1, the TNT quick coupled transcription/translation system (Promega) was used according to the manufacturer's protocol. For expression of Myc-tagged Num1 protein, plasmid pGBKT7-Num1 was used and HA-tagged Kin1 protein was generated using the pGAD-Kin1_{650–968} derivative identified in the yeast two-hybrid screen. All subsequent steps were carried out as described previously [103].

For *in vivo* co-immunoprecipitation, *U. maydis* sporidia were grown in 100 ml CM-G to an OD₆₀₀ of 0.8. Cells were washed once with PBS buffer, resuspended in 1 ml PBS supplemented with Complete proteinase inhibitor cocktail (Roche), frozen in liquid nitrogen and homogenized in a Retsch mill for 10 minutes at 30 Hz. The cell lysate was incubated with 40 µg monoclonal anti-HA coupled agarose (Sigma-Aldrich) on a rotating wheel at 4°C over night. Agarose beads were washed three times in PBS prior to resuspension in 20 µl Laemmli buffer. Samples were boiled for three minutes and separated by SDS-PAGE. For co-immunoprecipitation of Num1 and Kin1, a crosslinking reaction with dithiobis[succinimidylpropionate] (Thermo Fisher) was conducted according to [108] using 300 ml of cells grown in CM-G to an OD₆₀₀ of 0.8.

Proteins were transferred to PVDF nitrocellulose membranes in a semidry blot chamber. Western blots were probed with monoclonal anti-HA, anti-c-Myc, and anti-GFP (Sigma-Aldrich) antibodies. Horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse or anti-rabbit IgG (Promega) was used as secondary antibody, and an ECL system was used for protein detection.

Microscopy, image processing and quantitative analysis

For microscopic analyses, logarithmically growing *U. maydis* cells were taken from liquid cultures grown in CM-G medium. For the induction of hyphal growth, cells were shifted to CM-A or NM to induce the *P_{erg1-}* or *P_{nar1-}* promoters, respectively, for 12–14 hours. For microscopy of *A. nidulans* germlings and young hyphae, MM

on cover slips was inoculated with a small amount of spores and incubated for 12–18 hours at 37°C. Cells were then placed on top of a 2% agarose cushion placed on the microscope slide and immediately observed using an Axioimager Z1 microscope equipped with an AxioCam MRm camera (Carl Zeiss). Standard filter sets for DAPI, GFP, CFP and Rhodamine were used for epifluorescence analysis.

Nuclei were stained with DAPI Vectashield H-1200 (Vector Laboratories); chitin was stained with 2 µg/ml Calcofluor White (Sigma-Aldrich) or with Congo Red solution (1 µl/ml; stock: 1 mg/ml in H₂O). Congo Red was incubated at 25°C for 10 minutes on a turning wheel and washed twice with CM prior to microscopic analysis. Fungal cell walls in general were stained with 1 mg/ml WGA/Fluorescein (Invitrogen) in PBS. For the visualization of vacuoles, growing cells were incubated in CM supplemented with 10 µg/ml CellTracker Blue (7-amino-4-chloromethyl-coumarin, CMAC) (Invitrogen) for 30 minutes at 28°C, washed twice with CM and then subjected to microscopy. Chlorazole Black E staining was performed according to [24].

Endosome motility was measured in image sequences of 50 frames, taken with an exposure time of 500 msec. Only organelles that were moving for a distance of at least 5 µm were considered. The resulting movies were converted into kymographs using ImageJ software [109]. For quantification of Mcs1 signal intensity, the corrected total cell fluorescence (CTCF) of mid-size growing buds was calculated with ImageJ software (CTCF = integrated density – (area of selected cell × fluorescence of background reading)).

For quantification of the microtubule orientation, cells were grown to mid-log phase in YEPSL medium. Cells were analyzed via 45 sec time-lapse recordings (four frames each 15 sec). Pictures were taken with an exposure time of 90 msec for Tub1-GFP and 300 msec for Peb1:RFP signals. Movement of Peb1:RFP signals was scored at a screen as described in [46]. All image processing, including adjustment of brightness, contrast and gamma-values was performed with the AxioVision and ZEN software (Carl Zeiss), respectively.

Phylogenetic analysis

For comparative phylogenetic analysis of Num1, 65 sequences with the highest similarity to Num1 were obtained by BLASTP analysis. The sequence of *Saccharomyces cerevisiae* Snt309p was included as outgroup. Sequences were aligned with MAFFT version 6 [110] using the global alignment G-INS-i. A phylogenetic tree was calculated using the minimum linkage clustering method (<http://align.bmr.kyushu-u.ac.jp/mafft/online/server/>).

Fig Tree 1.3 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>) was used to visualize the Nexus formats of the MAFFT results.

Accession numbers

Sequence data from this article can be found at the Munich Information Center for Protein Sequences (MIPS) *Ustilago maydis* database (<http://mips.helmholtz-muenchen.de/genre/proj/ustilago/>), the *Aspergillus* genome database (<http://www.aspgd.org/>) and the National Center for Biotechnology Information (NCBI) database under the following accession numbers: *num1* (*um01682*), XP_757829; *prp19* (*um10027*), XP_756259; *cef1* (*um04411*), XP_760558; *rbf1* (*um03172*), XP_759319; *pcna* (*um05403*), XP_761550; *rpb3* (*um03550*), XP_759697; *ubi1* (*um02440*), XP_758587; *rho3* (*um04070*), XP_760217; *rad51* (*um03290*), XP_759437; *rec1* (*um11016*), XP_759527.1; *mms2* (*um10097*), XP_756467.1; *cks1* (*um03210*), XP_759357; *cdk1* (*um10705*), AAP94021.1; *hdp1* (*um12024*), XP_761909.1; *hdp2* (*um04928*), XP_761075; *biz1* (*um02549*), XP_758696; *um02704*

(related to allantoate permease), XP_758851; *um12105* (probable PUP3 – 20S proteasome subunit), XP_756658.1; *actin* (*um11232*), XP_762364; *eIF2b* (*um04869*), XP_761016; *kin1* (*um04218*), XP_760356; *dyn2* (*um04372*), XP_760519; *yup1* (*um05406*), XP_761553; *tub1* (*um01221*), XP_757368; *AN4244*, XP_661848.1; *nudA* (*AN0118*), XP_657722.1; *kinA* (*AN5343*), XP_662947.1.; the gene model for *um15049* (related to PUF3 transcript specific regulator of mRNA degradation) is implemented only at MUMDB (<http://mips.helmholtz-muenchen.de/genre/proj/ustilago>), as the predicted protein is composed of two fragments located on adjacent contig ends and, according to the sequence gap, part of the protein may be absent.

Supporting Information

Figure S1 Alignment of Num1 to SPF27 homologues. ClustalW was used to align proteins related to Num1 from *S. reilianum* (Sr12752, NCBI accession number CBQ71896), *U. hordei* (UHOR_02497, CCF53376) *C. cinerea* (Num1, BAC78620), *A. nidulans* (AN4244, XP_661848.1), *A. thaliana* (Mos4, AT3G18165.1), mouse (SPF27, BAB31409) and human (BCAS2/SPF27, CAG46834). Identical or similar residues are highlighted in black and grey, respectively. The nuclear localization signal (NLS) in the *U. maydis* sequence is highlighted in green. The red box indicates the conserved BCAS2-domain. (PDF)

Figure S2 Phylogeny of Num1 homologues. For comparative phylogenetic analysis of Num1, 65 sequences with the highest similarity to Num1 were obtained by BLASTP analysis. The sequence of *Saccharomyces cerevisiae* Snt309p was included as out-group. Sequences were aligned with MAFFT version 6 [110] using the global alignment G-INS-i. A phylogenetic tree was calculated using the minimum linkage clustering method. (PDF)

Figure S3 Deletion of *num1* does not affect growth in axenic culture, mating and dikaryon formation or proliferation *in planta*. **(A)** Growth curves of AB31 and AB31*Num1* deletion strain in YEPSL complex- (black) and glutamin/glucose-containing minimal medium (grey). The *num1*-deletion has no influence on growth in axenic culture. **(B)** SG200 (control) and SG200*Num1* sporidia were grown in glucose-containing CM-medium. No obvious phenotype could be observed, indicating that the *Num1*-mutant is not impaired during growth in axenic culture. **(C)** Mating assays on charcoal-containing CM-glucose medium by co-spotting of strains indicated. FB1 (*a1b1*) and FB2 (*a2b2*) strains are included as wild-type controls. Formation of dikaryotic aerial hyphae is visible as white mycelium. The *num1*-deletion has no influence on the formation of the dikaryon. **(D)** Pathogenicity of individual *num1*-deletion strains. Disease rating of maize seedlings seven days post inoculation with *U. maydis* strains SG200, SG200*Num1*, FB1 × FB2 (wild-type crosses) and FB1*Num1* × FB2*Num1*-derivatives. #1, #2 indicate independently obtained deletion mutants. Bars represent the percentage of infected plants with the symptoms indicated in the legend. N corresponds to the total number of plants infected. **(E)** Maize plants were inoculated with SG200 and SG200*Num1*. Infected leaves were stained with Chlorazole Black E. Samples were taken three and five days post inoculation, respectively. Clamp-like structures (arrowheads) could be observed in both strains, indicating fungal proliferation within the plant cells. Scale bars: 10 µm. (PDF)

Figure S4 Phenotype of conjugation hyphae of *num1*-deletion strains.. Strains FB1 and FB1*Num1* were treated with synthetic

a2-pheromone (2,5 µg/ml) for six hours in glucose-containing CM-medium. DMSO was used as a solvent for the a2-pheromone and served as negative control. Both FB1 and FB1*Num1* respond to the pheromone with the formation of conjugation tubes. Note the characteristic *Num1*-mutant phenotype, such as branches and irregular hyphal growth. Scale bars: 10 µm.

(PDF)

Figure S5 Phenotype of dikaryotic hyphae of *num1*-deletion strains. Compatible FB1- and FB2-strains were used to monitor the *Num1*-phenotype in dikaryotic hyphae. To demonstrate successful fusion events, FB1-strains express mitochondrial matrix-targeted RFP (mtRFP), and FB2-strains express mitochondrial matrix-targeted GFP (mtGFP), respectively, under control of the inducible *P_{erg1}*-promoter. Fusion of the strains was induced in arabinose-containing liquid charcoal medium overnight. Depicted are DIC-, GFP- and RFP-signals. Merged images show both fluorescent signals within the same hypha, indicating fusion of two sporidia in compatible FB1 × FB2 wild-type crossings (upper panel) as well as in compatible FB1*Num1* × FB2*Num1* crossings (lower panel). The two initial cells are marked with an asterisk. Note the characteristic *Num1*-mutant phenotype (thicker, irregular hyphal growth and bipolar growth of the sporidia). Scale bars: 10 µm. (PDF)

Figure S6 The *Num1*-deletion causes chitin accumulations and the insertion of unusual septa. Induction of the bE1/bW2 heterodimer in wild-type cells (AB31) induces a G2 cell cycle arrest, resulting in hyphae with a single nucleus positioned in the tip compartment. 18% of AB31*Num1* mutant hyphae contain more than one nucleus within the cell. Filaments were stained with DAPI to visualize nuclei and Fluorescein-conjugated wheat germ agglutinin (WGA), which specifically binds to *N*-acetylglucosamine [27]. In AB31 wild-type cells, chitin was intensively stained in the growth region within the hyphal apex as well as in the basal retraction septum (marked with arrowhead). In AB31*Num1* mutants, however, chitin accumulations along the hyphae (marked by asterisks) as well as septa-like chitin rings were observed frequently (middle and lower panel). In many cases, these septa were not visible in the DIC channel, indicating that these structures may not represent true septal cell walls. Scale bars: 10 µm. Septa in AB31*Num1* were also visualized by Calcofluor (Figures 1E and 6B) and Congo Red (Figure 3A). In contrast to septa in the dikaryotic hyphae, septa in AB31*Num1* were not always visible in the DIC channel, indicating that these septa or septa-like structures may be structurally different from wild-type septa.

(PDF)

Figure S7 Complementation analyses of *num1*-deletion strains. Filaments of AB31 and AB31*Num1*, expressing Num1:eGFP fusion proteins under control of the native *P_{num1}*- or the inducible *P_{erg1}*-promoter, were analyzed 12–14 hours after induction of the bE1/bW2-heterodimer and, when present, the Num1:eGFP fusion proteins. **(A)** In AB31, Num1:eGFP fusion proteins localize predominantly to the nucleus. **(B)** Complementation of the *num1*-deletion with a Num1:eGFP fusion protein restores the wild-type phenotype and the protein localizes predominantly to the nucleus. **(C)** A Num1:3eGFP fusion protein with mutated nuclear localization signal (NLS, shown in **D**) does not complement the *Num1* phenotype; filaments show the typical curved and bipolar morphology of the *num1*-deletion. In addition to the GFP-signal in the nucleus, a strong signal is observed in the cytoplasm. Scale bars: 10 µm. **(D)** Schematic representation of the Num1 protein depicting the basic amino acids within the NLS that were replaced by alanine-residues.

(PDF)

Figure S8 Prp19- and Cef1-fusion proteins are functional and are localized in the nucleus. *prp19* and *cef1* were expressed as C-terminal RFP- or HA-tagged versions under control of their endogenous promoters in strain AB31 to ensure native expression levels. Hyphal growth was analyzed 14 hours after induction of the bE1/bW2-heterodimer. **(A)** Shown are DIC- and RFP-fluorescence signals of strains UNK208 (AB31 *num1:3egfp:hyg^R, prp19::rfp:nat^R*) and **(B)** UMO10 (AB31 *num1:3egfp:hyg^R, cef1::rfp:nat^R*). As *prp19* and *cef1* are both essential genes (see Supporting Text S1), the viability of the strains proves the functionality of the fusion proteins. In addition, no altered phenotypes with respect to filamentous growth were observed, corroborating that both Prp19:RFP as well as Cef1:RFP fusion proteins are functional. Scale bars: 10 μ m.

(PDF)

Figure S9 Cell cycle analysis of AB31 vs. AB31 Δ *num1*. **(A)** FACS analysis of AB31 and AB31 Δ *num1* after induction of the bE1/bW2-heterodimer in arabinose-containing CM-medium. Samples were taken at time points indicated. The histograms show the DNA-content measured by FACS analysis. Relative fluorescence intensities are given on horizontal axes, vertical axes reflect cell numbers. In AB31, induction of the active bE1/bW2-combination resulted in an enrichment of cells with a 2C DNA-content, indicative of a G2 cell cycle arrest. In AB31 Δ *num1*, a higher amount of cells in G1 was observed, which implicates defects in cell cycle regulation. **(B)** Microscopic analysis of the filamentous growth of the strains upon *b*-induction. Scale bars: 10 μ m.

(PDF)

Figure S10 Control of *bW*-, *rbf1*- and *num1*-gene expression in samples used for RNA-Seq-analysis. RNA was isolated from strains AB31 and AB31 Δ *num1* in three biological replicates each, eight hours after induction of the bE1/bW2-heterodimer in arabinose-containing minimal medium. Expression of *bW*-, *rbf1*- and *num1* was monitored by qRT-PCR analysis. Gene expression is shown relative to the highest expression value. *Actin* and *eIF2b* were used for normalization. Shown are the mean values two technical replicates. Error bars represent the SD.

(PDF)

Figure S11 Verification of mRNA-Seq using qRT-PCR. **(A)** Plot depicting splicing efficiency of genes based on the RNA-Seq analysis. Plotted are the FPKM values (fragments per kilobase of sequence per million fragments mapped) across the genomic region indicated (coordinates in nucleotides) of three independent RNA-Seq experiments for AB31 wild-type (blue lines) and AB31 Δ *num1* (red lines), respectively. Exons (E) and introns (I) are indicated. **(B)** Schematic representation of exon-intron structures. Oligonucleotides used for qRT-PCR are depicted as arrows and allow the discrimination against spliced (primer depicted in red) and unspliced transcripts (primer depicted in green). **(C)** Gene expression analyses to verify expression of spliced vs. unspliced transcripts of the indicated genes using qRT-PCR. RNA was isolated from AB31 and AB31 Δ *num1* eight hours after induction of the bE/bW-heterodimer. *Actin* and *eIF2b* were used for normalization. Depicted are the ratios of spliced vs. unspliced transcripts of three independent biological replicates. Mean values of two technical replicates each are shown.

(PDF)

Figure S12 Individual genes show different alterations in intron retention in AB31 Δ *num1*. Splicing efficiency of the indicated genes based on the RNA-Seq analysis. Depicted are examples for genes **(A)** where splicing is not affected, **(B)** the intron is not spliced at all, or **(C)** different introns show dissimilar retention rates. Plotted are

the FPKM values (fragments per kilobase of sequence per million fragments mapped) across the genomic region indicated (coordinates in nucleotides) of three independent RNA-Seq experiments for AB31 wild-type (blue lines) and AB31 Δ *num1* (red lines), respectively. Exons (E) and introns (I) are indicated.

(PDF)

Figure S13 Reduced splicing efficiency in AB31 Δ *num1* in genes with function in DNA repair and cell cycle. Splicing efficiency based on RNA-Seq analysis. Depicted are examples for genes grouping in the functional category **(A)** “DNA repair” and **(B)** “cell cycle”. Plotted are the FPKM values (fragments per kilobase of sequence per million fragments mapped) across the genomic region indicated (coordinates in nucleotides) of three independent RNA-Seq experiments for AB31 wild-type (blue lines) and AB31 Δ *num1* (red lines), respectively. Exons (E) and introns (I) are indicated.

(PDF)

Figure S14 Splicing defect of the *rbf1*-gene in AB31 Δ *num1*. **(A)** Schematic view of *rbf1* intron/exon structure and primers used for RT-PCR (blue) and qRT-PCR (red, green and black). **(B)** RNA samples of AB31 and AB31 Δ *num1* were isolated eight hours after induction of the bE1/bW2-heterodimer. RT-PCR analysis was performed on the *rbf1* open reading frame and PCR products were separated on a 2% TAE-agarose gel. In AB31 cDNA, the spliced version of *rbf1* (430 bp) is predominantly detected. In AB31 Δ *num1* more bands spanning different sizes from 430 bp (all four introns spliced) to 1192 bp (all introns retained) are observed, validating the splicing defect of the *rbf1*-gene observed in the RNA-Seq analysis. **(C)** qRT-PCR analysis to investigate the expression of spliced vs. unspliced *rbf1*-transcripts. Primers depicted in **(A)** were used to distinguish spliced (primer depicted in red) from non-spliced (primer depicted in green) introns. *Actin* and *eIF2b* were used for normalization. Depicted are the ratios of spliced vs. unspliced transcripts of three independent biological replicates. Mean values of two technical replicates each are shown.

(PDF)

Figure S15 Splicing efficiency and expression profile of the Rbf1-target genes *hdp1*, *hdp2*, *biz1* is altered in AB31 Δ *num1*. Shown are the expression profiles based on the RNA-Seq analysis. Plotted are the FPKM values (fragments per kilobase of sequence per million fragments mapped) across the genomic region indicated (coordinates in nucleotides) of three independent RNA-Seq experiments for AB31 wild-type (blue lines) and AB31 Δ *num1* (red lines), respectively. Exons (E) and introns (I) are indicated. **(A)** Expression of the *hdp1*-gene is increased about two-fold, and splicing efficiency of both introns is reduced in AB31 Δ *num1*. **(B)** and **(C)** Expression levels of *hdp2* as well as *biz1* are significantly reduced in AB31 Δ *num1* (*hdp2*: $-3,1$ -fold, $p = 5.28 * 10^{-36}$ *biz1*: $-3,4$ -fold, $p = 5.34 * 10^{-62}$; significance according to DEseq [106]).

(PDF)

Figure S16 Introns are essential for full function of *rbf1*. **(A)** and **(B)** An intron-free derivative of *rbf1* was expressed in AB31, replacing the endogenous *rbf1*-gene. cDNA was isolated from strains AB31 and UTO62 (AB31 *rbf1::rbf1cDNA*) 10 hours after induction of filamentous growth in arabinose-containing CM-medium. qRT-PCR analysis was performed to verify unaltered expression of *bE* and *rbf1* **(A)**. The intron-free *rbf1*-derivative is not able to induce *rbf1*-target genes **(B)**. Gene expression is shown relative to the highest expression value. *Actin* and *eIF2b* were used for normalization. Mean values of two technical replicates each are shown. **(C)** Schematic representation of the construct used in

this study. *rbf1*-cDNA was expressed in the genomic *rbf1*-locus under control of the endogenous *P_{rbf1}*-promoter. 500 bp of the 3'-UTR were included as terminator. A carboxin resistance-cassette was used for selection. **(D)** SG200-derivatives were spotted on charcoal-containing CM-medium and incubated at 22°C for 3 days. The formation of filamentous hyphae is visible as white mycelium. In contrast to the complementation with a wild-type *rbf1*-copy [2], the respective intron-free *rbf1*-derivative, which replaced the endogenous *rbf1*, was not able to complement the Δ *rbf1*-phenotype. Magnified images of the colony margins were taken with a binocular assisted camera. **(E)** Maize seedlings were infected with the indicated SG200 derivatives. Disease rating and tumor formation was monitored seven days after infection. Bars represent the percentage of infected plants with symptoms indicated in the legend. N corresponds to the number of plants infected. The intron-free *rbf1*-derivative leads to a reduction in tumor formation. **(F)** and **(G)** Microscopic analysis of the indicated strains 10 hours after induction of filamentous growth in arabinose-containing CM-medium. Phenotypes were grouped into four different categories. Whereas 95% of AB31 wild-type cells grew as long, straight filaments, the intron-free *rbf1*-derivative was not able to fully complement the Δ *rbf1*-phenotype. Integration of the *rbf1*-cDNA construct into the Δ *num1*-mutant background hence did not reduce the observed phenotypes of the *num1*-deletion strain. **(G)** Representative microscopic images of the indicated strains. Shown are DIC-images. Scale bars: 10 μ m. (PDF)

Figure S17 Characterization of the interaction domain of Num1 for the Kin1 motor protein. N- and C-terminally truncated fragments of the Num1-protein were tested for interaction with Kin1 in the yeast two-hybrid system. Left panel: Schematic depiction of the constructs used in this study. Numbers represent the regions of the Num1-constructs in amino acids. The conserved BCAS2-domain is depicted in dark grey. After cloning into pGBKT7 (Clontech), the constructs were co-transformed with the pGAD-Kin1_{650–968} fragment isolated in the yeast two-hybrid screen. Serial 10-fold dilutions of cell suspensions of the respective transformants were spotted on selective media (SD –LW) and stringent media (SD –LWHA), indicating an interaction. Plates were incubated for two days at 30°C. The Num1 interaction domain resides between amino acids 67 and 147 (highlighted in red). pGBKT7-p53 with pGADT7-T served as positive control, pGBKT7-Lam with pGADT7-T (Clontech) served as negative control. (PDF)

Figure S18 The double deletion of Num1 and Kin1 has additive effects on pathogenicity as well as hyphal morphology. **(A)** Effects of the double deletion on polar hyphal growth in strain AB31 Δ *num1* Δ *kin1*. Filaments of were analyzed 12 hours after induction of the bE1/bW2-heterodimer. Compared to AB31 Δ *kin1* and AB31 Δ *num1* hyphae, which predominantly grow as bipolar filaments, the double deletion has additive effects on filament morphology, polarity and branching. **(B)** To visualize nuclear positioning and septation, filaments of AB31 Δ *num1* Δ *kin1* were treated with DAPI- and WGA/FITC. Scale bars: 10 μ m. **(C)** Pathogenicity of individual *num1*- and *kin1*-deletion strains. Maize seedlings were infected with the indicated SG200 derivatives. #1, #2, #3 indicate independently obtained deletion strains. Disease rating and tumor formation was monitored seven days after inoculation. Bars represent the percentage of infected plants with symptoms indicated in the legend. N corresponds to the total number of plants infected. Deletion of the individual *num1* or *kin1* genes results in slightly reduced pathogenicity, whereas the *num1*/

kin1-double deletion has a much stronger effect on pathogenicity. Depicted below are disease symptoms (third leaf below the site of injection) of representative maize plants seven days after inoculation. (PDF)

Figure S19 Num1 has neither influence on morphology or abundance of microtubules and actin elements, nor on the distribution of the Kin1 motor protein. Microtubules were analyzed using a Tub1:mCherry fusion protein, the actin cytoskeleton was visualized using the lifeact-method (lifeact:yfp) [44]. Both fusion proteins were expressed under control of the constitutively active *P_{osef}*-promoter in strains AB31 and AB31 Δ *num1*. For the localization of the Kin1 motor protein in strains AB33 and AB33 Δ *num1*, an N-terminal 3eGFP:Kin1 fusion was used [14]. The fluorescent cytoskeletal elements were microscopically analyzed 12–14 hours after induction of the bE1/bW2-heterodimer in arabinose-containing CM-medium for AB31 and nitrate-containing minimal-medium for AB33, respectively. mCherry, YFP- and GFP-signals are shown. Scale bars: 10 μ m. (PDF)

Figure S20 Orientation of the microtubule cytoskeleton in AB33 and AB33 Δ *num1* sporidia and hyphae. Orientation of the microtubule cytoskeleton was addressed in strain AB33Peb1R_GT (AB33 *peb1:mRFP potefGFP:Tub1*) [14] and its Δ *num1* derivative. In AB33Peb1R_GT wild-type cells, the homologue of the microtubule (MT) plus-end marker EB1, Peb1, fused to RFP, localizes to growing MT plus-ends [45], which are predominantly oriented towards the cell poles of the hyphae [9,14], or, in interphase cells, towards the budding cell and the opposing cell pole of the mother cell [46]. **(A)** Motility of Peb1:RFP in budded cells of AB33-Peb1R_GT (WT) and its Δ *num1* derivative. Peb1:RFP binds to plus-ends of microtubules, and its motility (pictures were taken in 15 sec intervals) indicates the orientation of the microtubule [46]. Arrowheads and asterisks indicate individual Peb1:RFP dots. Scale bar: 2 μ m **(B)** Quantification of microtubule orientation in interphase sporidia. AB33Peb1R_GT (WT) and its Δ *num1* derivative were grown in YEPSL medium to mid log phase. Black arrows and numbers above and below the cartoons give the percentage of Peb1-RFP dots moving to either tip of the cell. White arrows show the relative amount of Peb1-RFP to the bud neck. Numbers are based on 45 sec intervals of 30 and 46 cells in wild-type and Δ *num1*-strains, respectively. The total number of signals used for quantification and the number of cells is given in brackets. Quantification was done according to the protocol given in [46]. **(C)** In AB33Peb1R_GT wild-type hyphae, Peb1-RFP is predominantly oriented towards the cell poles. **(D)** In AB33-Peb1R_GT Δ *num1*, Peb1:RFP labeled MT plus-ends are also found at septa (marked by arrowheads), which are often placed in the middle of the hyphae. In some hyphae, mitotic spindles were observed (marked by asterisks), implicating that the *num1*-deletion leads to a deregulated cell cycle arrest. Peb1-RFP and GFP-Tub1 fluorescence was analyzed 8–10 hours after induction of hyphal growth in nitrate-containing minimal medium. Scale bars: 10 μ m. **(E)** Schematic representation of the orientation of the microtubule cytoskeleton in wild-type and Δ *num1*-hyphae. Peb1-localization indicates microtubule plus-ends. (PDF)

Figure S21 Influence of Num1 on the localization of the myosin chitin synthase Mcs1. **(A)** In wild-type cells, 3eGFP:Mcs1 localizes to growing bud tips, where it participates in the synthesis of chitin [15]. In contrast, Δ *num1*-mutants shows reduced Mcs1-accumulation at the growth region. Shown are DIC and GFP-images, as well as contrast-inverted images. Scale bars: 5 μ m.

(B) Quantitative analysis of the 3eGFP:Mcs1 signal intensity in growing bud cells. The bar diagram shows corrected total cell fluorescence (CTCF) of wild-type (control) and *Anum1*-mutant cells. ImageJ software was used for quantification. N corresponds to the number of cells analyzed. **(C)** In AB33 hyphae, 3eGFP:Mcs1 localizes to distinct foci close to the cell membrane and forms a gradient towards the growth zone within the hyphal apex or localizes to the basal retraction septum (arrowhead), respectively. In contrast, in AB33*Anum1*, no tip-ward gradient is obvious and fewer foci are observed at the cell membrane. In many cases Mcs1 does not localize to delocalized septa in the *Anum1*-mutant (lower left panel, arrowhead indicates a septum). Mcs1-fluorescence was analyzed 12 hours after induction of hyphal growth in nitrate-containing minimal medium. Scale bars: 10 μ m. **(D)** Enlarged images of the sections marked in **(C)**. Images were contrast-inverted.

(PDF)

Figure S22 Num1 influences the dynamic of the RNA-binding protein Rrm4. To analyze the impact of *num1* on Rrm4 movement, an Rrm4:eGFP fusion protein was expressed in AB33 and AB33*Anum1*. *bE1/bW2* were induced for 16 hours in nitrate minimal medium, and Rrm4:eGFP localization was analyzed by fluorescence microscopy. **(A)** In AB33, Rrm4:eGFP-fusion proteins localize on bidirectional moving particles that are evenly distributed within the hyphae, as previously described [46]; see Supporting Video S3. **(B)** In AB33*Anum1* the Rrm4-particles accumulate at the hyphal tip (asterisk, upper panel) or within the hyphae (lower panel); see also Supporting Video S4 Arrowhead indicates septum. Scale bars: 10 μ m.

(PDF)

Video S1 Motility of Yup1-labeled early endosomes in AB33. Visualization of early endosomes in strain AB33 using a Yup1:eGFP-fusion protein under control of the constitutively active *P_{atef}*-promoter as a marker. Depicted is the GFP-fluorescence 14 h after induction of the bE/bW-heterodimer in nitrate-containing minimal medium. Rapid, bi-directional motility of early endosomes is visible throughout the filament. Immobile bright fluorescent spots most likely represent vacuoles, as Yup1 was also reported to bind to vacuolar membranes [4]. The image sequence was taken using an Axioimager.Z1 microscope equipped with an AxioCam MRm camera (Carl Zeiss). In total, 50 frames with an exposure time of 253 msec were taken every 0,46 sec for 23,173 sec. Time is given in hrs:min:sec.msec. The scale bar represents 10 μ m.

(MOV)

Video S2 Motility of Yup1-labeled early endosomes in AB33*Anum1*. Visualization of early endosomes in strain AB33*Anum1* using the Yup1:eGFP-fusion protein under control of the constitutively active *P_{atef}*-promoter as a marker. Depicted is the GFP-fluorescence 14 h after induction of the bE/bW-heterodimer in nitrate-containing minimal medium. Endosomal trafficking is considerably reduced and vesicles accumulate at hyphal tips as well as around delocalized septae. The image sequence was taken using an Axioimager.Z1 microscope equipped with an AxioCam MRm camera (Carl Zeiss). In total, 50 frames with an exposure time of 44 msec were taken every 0,26 sec for 12,891 sec. Time is given in hrs:min:sec.msec. The scale bar represents 10 μ m.

(MOV)

Video S3 Motility of Rrm4-labeled particles in AB33. Visualization of the RNA-binding protein Rrm4 in strain AB33 using an Rrm4:eGFP fusion protein that was expressed under control of its native promoter. Depicted is the GFP-fluorescence 16 h after

induction of the bE/bW-heterodimer in nitrate-containing minimal medium. The protein localizes to rapid, bi-directionally transported particles. The image sequence was taken using an Axioimager.Z1 microscope equipped with an AxioCam MRm camera (Carl Zeiss). In total, 20 frames with an exposure time of 500 msec were taken every 0,96 sec for 19,266 sec. Time is given in hrs:min:sec.msec. The scale bar represents 10 μ m.

(MOV)

Video S4 Motility of Rrm4-labeled particles in AB33*Anum1*. Visualization of the RNA-binding protein Rrm4 in strain AB33*Anum1* using an Rrm4:eGFP fusion protein that was expressed under control of its native promoter. Depicted is the GFP-fluorescence 16 h after induction of the bE/bW-heterodimer in nitrate-containing minimal medium. The particles are frequently observed in accumulations at various parts of the hyphae and trafficking is considerably reduced. The image sequence was taken using an Axioimager.Z1 microscope equipped with an AxioCam MRm camera (Carl Zeiss). In total, 25 frames with an exposure time of 500 msec were taken every 1,16 sec for 29,141 sec. Time is given in hrs:min:sec.msec. The scale bar represents 10 μ m.

(MOV)

Text S1 Prp19:3×HA and Cef1:3×HA fusion proteins are functional in *U. maydis*.

(DOCX)

Table S1 Intron retention in AB31 and AB31*Anum1*.

(XLSX)

Table S2 Intron containing genes within the FunCats “cell cycle” or “DNA repair”.

(XLSX)

Table S3 Splicing defect upon *num1* deletion in genes encoding transcription factors.

(XLSX)

Table S4 Expression of b-target genes in AB31 compared to AB31*Arb1* and AB31*Anum1*.

(XLSX)

Table S5 Altered gene expression in AB31*Anum1*.

(XLSX)

Table S6 Num1 interacting proteins identified by Yeast Two-Hybrid screening.

(DOCX)

Table S7 *U. maydis* strains used in this study.

(DOCX)

Table S8 *A. nidulans* strains used in this study.

(DOCX)

Table S9 Oligonucleotides used in this study.

(DOCX)

Acknowledgments

The authors would like to acknowledge Michael Feldbrügge (Düsseldorf, Germany) and his lab for invaluable discussions on mRNA transport and for providing plasmids pUMa 647, pUMa 738, pUMa 791, pUMa 792 and strain AB33 Rrm4:GFP. Gero Steinberg (Exeter, UK) is acknowledged for providing strains AB33 Yup1:GFP, AB33 3GFP:Kin1, AB33 3GFP:Dyn2, AB33 3GFP:Mcs1 and AB33 Peb1:RFP/GFP:Tub1. Kay Schink and Michael Bölker (Marburg, Germany) provided the constructs plifect:YFP and ptub1:mCherry. Nadine Zekert and Reinhard Fischer (Karlsruhe, Germany) are acknowledged for their help on *Aspergillus nidulans* transformation and strains TNO2A3 and LZ12. We thank Alexander Bisson, Sebastian Hassinger and Melissa Ort for assistance with the

construction of several strains and we are grateful to Olivier Armant (Karlsruhe, Germany) for Illumina library preparation and sequencing. Andrea Hartwig and Christopher Krüger (Karlsruhe, Germany) provided the flow cytometer and helped performing FACS analyses. This paper is dedicated to Karl Esser (Bochum, Germany) on the occasion of his 90th birthday.

References

- Brefort T, Doehlemann G, Mendoza-Mendoza A, Reissmann S, Djamei A, et al. (2009) *Ustilago maydis* as a Pathogen. *Annu Rev Phytopathol* 47: 423–445.
- Heimel K, Scherer M, Vranes M, Wahl R, Pothiratana C, et al. (2010) The transcription factor Rbf1 is the master regulator for *b*-mating type controlled pathogenic development in *Ustilago maydis*. *PLoS Pathog* 6: e1001035.
- Steinberg G, Perez-Martin J (2008) *Ustilago maydis*, a new fungal model system for cell biology. *Trends Cell Biol* 18: 61–67.
- Wedlich-Söldner R, Bölker M, Kahmann R, Steinberg G (2000) A putative endosomal t-SNARE links exo- and endocytosis in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *EMBO J* 19: 1974–1986.
- Straube A, Enard W, Berner A, Wedlich-Söldner R, Kahmann R, et al. (2001) A split motor domain in a cytoplasmic dynein. *EMBO J* 20: 5091–5100.
- Vollmeister E, Schipper K, Feldbrügge M (2012) Microtubule-dependent mRNA transport in the model microorganism *Ustilago maydis*. *RNA Biol* 9: 261–268.
- Baumann S, Pohlmann T, Jungbluth M, Brachmann A, Feldbrügge M (2012) Kinesin-3 and dynein mediate microtubule-dependent co-transport of mRNPs and endosomes. *J Cell Sci* 125(Pt 11):2740–52.
- Wedlich-Söldner R, Straube A, Friedrich MW, Steinberg G (2002) A balance of KIF1A-like kinesin and dynein organizes early endosomes in the fungus *Ustilago maydis*. *EMBO J* 21: 2946–2957.
- Lenz JH, Schuchardt I, Straube A, Steinberg G (2006) A dynein loading zone for retrograde endosome motility at microtubule plus-ends. *EMBO J* 25: 2275–2286.
- Schuster M, Kilaru S, Fink G, Collemare J, Roger Y, et al. (2011) Kinesin-3 and dynein cooperate in long-range retrograde endosome motility along a nonuniform microtubule array. *Mol Biol Cell* 22: 3645–3657.
- Schuster M, Lipowsky R, Assmann MA, Lenz P, Steinberg G (2011) Transient binding of dynein controls bidirectional long-range motility of early endosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 3618–3623.
- Schuster M, Kilaru S, Ashwin P, Lin C, Severs NJ, et al. (2011) Controlled and stochastic retention concentrates dynein at microtubule ends to keep endosomes on track. *EMBO J* 30: 652–664.
- Steinberg G, Schliwa M, Lehmler C, Bölker M, Kahmann R, et al. (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.
- Schuchardt I, Assmann D, Thines E, Schubert C, 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.
- Weber I, Assmann D, Thines E, Steinberg G (2006) Polar localizing class V myosin chitin synthases are essential during early plant infection in the plant pathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Plant Cell* 18: 225–242.
- Treitschke S, Doehlemann G, Schuster M, Steinberg G (2010) The myosin motor domain of fungal chitin synthase V is dispensable for vesicle motility but required for virulence of the maize pathogen *Ustilago maydis*. *Plant Cell* 22: 2476–2494.
- Schuster M, Treitschke S, Kilaru S, Molloy J, Harmer NJ, et al. (2012) Myosin-5, kinesin-1 and myosin-17 cooperate in secretion of fungal chitin synthase. *EMBO J* 31: 214–227.
- Makino R, Kamada T (2004) Isolation and characterization of mutations that affect nuclear migration for dikaryosis in *Coprinus cinereus*. *Curr Genet* 45: 149–156.
- Neubauer G, King A, Rappsilber J, Calvio C, Watson M, et al. (1998) Mass spectrometry and EST-database searching allows characterization of the multi-protein spliceosome complex. *Nat Genet* 20: 46–50.
- Lehmler C, Steinberg G, Snetsekar K, Schliwa M, Kahmann R, et al. (1997) Identification of a motor protein required for filamentous growth in *Ustilago maydis*. *EMBO J* 16: 3464–3473.
- Grote M, Wolf E, Will CL, Lemm I, Agafonov DE, et al. (2010) Molecular architecture of the human Prp19/CDC5L complex. *Mol Cell Biol* 30: 2105–2119.
- Chelsky D, Ralph R, Jonak G (1989) Sequence requirements for synthetic peptide-mediated translocation to the nucleus. *Mol Cell Biol* 9: 2487–2492.
- Kämper J, Kahmann R, Bölker M, Ma IJ, Brefort T, et al. (2006) Insights from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen *Ustilago maydis*. *Nature* 444: 97–101.
- Brachmann A, Weinzierl G, Kämper J, Kahmann R (2001) Identification of genes in the bW/bE regulatory cascade in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol* 42: 1047–1063.
- Mitchison JM, Nurse P (1985) Growth in cell length in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J Cell Sci* 75: 357–376.
- Matsuoka H, Yang H-C, Homma T, Nemoto Y, Yamada S, et al. (1995) Use of Congo red as a microscopic fluorescence indicator of hyphal growth. *Appl Microbiol Biotechnol* 43: 102–108.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: NK KH JK. Performed the experiments: NK KH TO. Analyzed the data: FF. Wrote the paper: NK JK.

- Nagata Y, Burger MM (1974) Wheat germ agglutinin. Molecular characteristics and specificity for sugar binding. *J Biol Chem* 249: 3116–3122.
- Ohl MD, Gould KL (2002) Characterization of interactions among the Cef1p-Prp19p-associated splicing complex. *Rna* 8: 798–815.
- Nasmyth K, Nurse P (1981) Cell division cycle mutants altered in DNA replication and mitosis in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Gen Genetics* 182: 119–124.
- Ohl R, McCollum D, Hirani B, Den Haese GJ, Zhang X, et al. (1994) The *Schizosaccharomyces pombe* cdc5+ gene encodes an essential protein with homology to c-Myb. *EMBO J* 13: 471–483.
- Bernstein HS, Coughlin SR (1998) A mammalian homolog of fission yeast Cdc5 regulates G2 progression and mitotic entry. *J Biol Chem* 273: 4666–4671.
- Henriques JA, Moustacchi E (1980) Isolation and characterization of *pso* mutants sensitive to photo-addition of psoralen derivatives in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 95: 273–288.
- Grey M, Düsterhöft A, Henriques JA, Brendel 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.
- Brendel M, Bonatto D, Strauss M, Revers LF, Pungartnik C, et al. (2003) Role of PSO genes in repair of DNA damage of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat Res* 544: 179–193.
- Zhang N, Kaur R, Lu X, Shen X, Li L, et al. (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.
- Beck BD, Park SJ, Lee YJ, Roman Y, Hromas RA, et al. (2008) Human Pso4 is a metnase (SETMAR)-binding partner that regulates metnase function in DNA repair. *J Biol Chem* 283: 9023–9030.
- Lu X, Legerski RJ (2007) The Prp19/Pso4 core complex undergoes ubiquitylation and structural alterations in response to DNA damage. *Biochem Biophys Res Commun* 354: 968–974.
- Legerski RJ (2009) The Pso4 complex splices into the DNA damage response. *Cell Cycle* 8: 3448–3449.
- Garcia-Muse T, Steinberg G, Perez-Martin J (2003) Pheromone-induced G2 arrest in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Eukaryot Cell* 2: 494–500.
- Mazzei T (1984) Chemistry and mechanism of action of bleomycin. *Chemioterapia: international journal of the Mediterranean Society of Chemotherapy* 3: 316–319.
- Yarbro JW (1992) Mechanism of action of hydroxyurea. *Semin Oncol* 19: 1–10.
- Revers LF, Cardone JM, Bonatto D, Saffi J, Grey M, et al. (2002) Thermoconditional modulation of the pleiotropic sensitivity phenotype by the *Saccharomyces cerevisiae* PRP19 mutant allele *pso4-1*. *Nucleic Acids Res* 30: 4993–5003.
- Flor-Parra I, Vranes M, Kämper J, 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.
- Banks GR, Shelton PA, Kanuga N, Holden DW, Spanos A (1993) The *Ustilago maydis nar1* gene encoding nitrate reductase activity: sequence and transcriptional regulation. *Gene* 131: 69–78.
- Riedl J, Crevenna AH, Kessenbrock K, Yu JH, Neukirchen D, et al. (2008) Lifeact: a versatile marker to visualize F-actin. *Nat Methods* 5: 605–607.
- Straube A, Brill M, Oakley BR, Horio T, Steinberg G (2003) Microtubule organization requires cell cycle-dependent nucleation at dispersed cytoplasmic sites: polar and perinuclear microtubule organizing centers in the plant pathogen *Ustilago maydis*. *Mol Biol Cell* 14: 642–657.
- Becht P, König J, Feldbrügge M (2006) The RNA-binding protein Rrm4 is essential for polarity in *Ustilago maydis* and shuttles along microtubules. *J Cell Sci* 119: 4964–4973.
- Requena N, Alberti-Segui C, Winzenburg E, Horn C, Schliwa M, et al. (2001) Genetic evidence for a microtubule-destabilizing effect of conventional kinesin and analysis of its consequences for the control of nuclear distribution in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* 42: 121–132.
- Koncz C, Dejong F, Villacorta N, Szakonyi D, Koncz Z (2012) The spliceosome-activating complex: molecular mechanisms underlying the function of a pleiotropic regulator. *Front Plant Sci* 3: 9.
- Tarn WY, Hsu CH, Huang KT, Chen HR, Kao HY, et al. (1994) Functional association of essential splicing factor(s) with PRP19 in a protein complex. *EMBO J* 13: 2421–2431.
- Hogg R, McGrail JC, O’Keefe RT (2010) The function of the NineTeen Complex (NTC) in regulating spliceosome conformations and fidelity during pre-mRNA splicing. *Biochem Soc Trans* 38: 1110–1115.

52. Ohi MD, Vander Kooi CW, Rosenberg JA, Chazin WJ, Gould KL (2003) Structural insights into the U-box, a domain associated with multi-ubiquitination. *Nat Struct Biol* 10: 250–255.
53. Ohi MD, Vander Kooi CW, Rosenberg JA, Ren L, Hirsch JP, et al. (2005) Structural and functional analysis of essential pre-mRNA splicing factor Prp19p. *Mol Cell Biol* 25: 451–460.
54. Cheng SC, Tarn WY, Tsao TY, Abelson J (1993) PRP19: a novel spliceosomal component. *Mol Cell Biol* 13: 1876–1882.
55. Tarn WY, Lee KR, Cheng SC (1993) The yeast PRP19 protein is not tightly associated with small nuclear RNAs, but appears to associate with the spliceosome after binding of U2 to the pre-mRNA and prior to formation of the functional spliceosome. *Mol Cell Biol* 13: 1883–1891.
56. Tarn WY, Lee KR, Cheng SC (1993) Yeast precursor mRNA processing protein PRP19 associates with the spliceosome concomitant with or just after dissociation of U4 small nuclear RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 10821–10825.
57. Tsai WY, Chow YT, Chen HR, Huang KT, Hong RI, et al. (1999) Cef1p is a component of the Prp19p-associated complex and essential for pre-mRNA splicing. *J Biol Chem* 274: 9455–9462.
58. McDonald WH, Ohi R, Smelkova N, Frendewey D, Gould KL (1999) Myb-related fission yeast cdc5p is a component of a 40S snRNP-containing complex and is essential for pre-mRNA splicing. *Mol Cell Biol* 19: 5352–5362.
59. Query CC, Konarska MM (2012) *CEFI/CDC5* alleles modulate transitions between catalytic conformations of the spliceosome. *Rna* 18: 1001–1013.
60. Pleiss JA, Whitworth GB, Bergkessel M, Guthrie C (2007) Rapid, transcript-specific changes in splicing in response to environmental stress. *Mol Cell* 27: 928–937.
61. Böhmer C, Böhmer M, Bölker M, Sandrock B (2008) Cdc42 and the Ste20-like kinase Don3 act independently in triggering cytokinesis in *Ustilago maydis*. *J Cell Sci* 121: 143–148.
62. Böhmer C, Ripp C, Bölker M (2009) The germinal centre kinase Don3 triggers the dynamic rearrangement of higher-order septin structures during cytokinesis in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol* 74: 1484–1496.
63. Mahler M, Leveleki L, Hlubek A, Sandrock B, Bölker M (2006) Rac1 and Cdc42 regulate hyphal growth and cytokinesis in the dimorphic fungus *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol* 59: 567–578.
64. Weinzierl G, Leveleki L, Hassel A, Kost G, Wanner G, et al. (2002) Regulation of cell separation in the dimorphic fungus *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol* 45: 219–231.
65. Freitag J, Lanver D, Böhmer C, Schink KO, Bölker M, et al. (2011) Septation of infectious hyphae is critical for appressoria formation and virulence in the smut fungus *Ustilago maydis*. *PLoS Pathog* 7: e1002044.
66. Bankmann M, Prakash L, Prakash S (1992) Yeast RAD14 and human xeroderma pigmentosum group A DNA-repair genes encode homologous proteins. *Nature* 355: 555–558.
67. Mahajan KN, Mitchell BS (2003) Role of human Pso4 in mammalian DNA repair and association with terminal deoxynucleotidyl transferase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 10746–10751.
68. Ajuh P, Kuster B, Panov K, Zomerdijk JC, Mann M, et al. (2000) Functional analysis of the human CDC5L complex and identification of its components by mass spectrometry. *EMBO J* 19: 6569–6581.
69. Zhang N, Kaur R, Akhter S, Legerski RJ (2009) Cdc5L interacts with ATR and is required for the S-phase cell-cycle checkpoint. *EMBO Rep* 10: 1029–1035.
70. Perez-Martin J (2009) DNA-damage response in the basidiomycete fungus *Ustilago maydis* relies in a sole Chk1-like kinase. *DNA Repair* 8: 720–731.
71. Perez-Martin J, de Sena-Tomas C (2011) Dikaryotic cell cycle in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis* is controlled by the DNA damage response cascade. *Plant Signal Behav* 6: 1574–1577.
72. Chorev M, Carmel L (2012) The function of introns. *Frontiers in genetics* 3: 55.
73. Le Hir H, Nott A, Moore MJ (2003) How introns influence and enhance eukaryotic gene expression. *Trends Biochem Sci* 28: 215–220.
74. Muresan V, Muresan Z (2012) Unconventional functions of microtubule motors. *Arch Biochem Biophys* 520: 17–29.
75. Sun F, Zhu C, Dixit R, Cavalli V (2011) Sunday Driver/JIP3 binds kinesin heavy chain directly and enhances its motility. *EMBO J* 30: 3416–3429.
76. Steinberg G, Schuster M, Theisen U, Kilaru S, Forge A, et al. (2012) Motor-driven motility of fungal nuclear pores organizes chromosomes and fosters nucleocytoplasmic transport. *J Cell Biol* 198: 343–355.
77. König J, Baumann S, Koepke J, Pohlmann T, Zarnack K, et al. (2009) The fungal RNA-binding protein Rrm4 mediates long-distance transport of *ubi1* and *rho3* mRNAs. *EMBO J* 28: 1855–1866.
78. Becht P, Vollmeister E, Feldbrügge M (2005) Role for RNA-binding proteins implicated in pathogenic development of *Ustilago maydis*. *Eukaryot Cell* 4: 121–133.
79. Zimyanin VL, Belaya K, Pecreaux J, Gilchrist MJ, Clark A, et al. (2008) *In vivo* imaging of *oskar* mRNA transport reveals the mechanism of posterior localization. *Cell* 134: 843–853.
80. Chang YF, Imam JS, Wilkinson MF (2007) The nonsense-mediated decay RNA surveillance pathway. *Annu Rev Biochem* 76: 51–74.
81. Brendza RP, Serbus LR, Saxton WM, Duffy JB (2002) Posterior localization of dynein and dorsal-ventral axis formation depend on kinesin in *Drosophila* oocytes. *Curr Biol* 12: 1541–1545.
82. Chanarat S, Seizl M, Strasser K (2011) The Prp19 complex is a novel transcription elongation factor required for TREX occupancy at transcribed genes. *Genes Dev* 25: 1147–1158.
83. Katahira J, Yoneda Y (2009) Roles of the TREX complex in nuclear export of mRNA. *RNA Biol* 6: 149–152.
84. Katahira J, Strasser K, Podtelejnikov A, Mann M, Jung JU, et al. (1999) The Mex67p-mediated nuclear mRNA export pathway is conserved from yeast to human. *EMBO J* 18: 2593–2609.
85. Santos-Rosa H, Moreno H, Simos G, Segref A, Fahrenkrog B, et al. (1998) Nuclear mRNA export requires complex formation between Mex67p and Mtr2p at the nuclear pores. *Mol Cell Biol* 18: 6826–6838.
86. Segref A, Sharma K, Doye V, Hellwig A, Huber J, et al. (1997) Mex67p, a novel factor for nuclear mRNA export, binds to both poly(A)⁺ RNA and nuclear pores. *EMBO J* 16: 3256–3271.
87. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbour, New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press.
88. Tsukuda T, Carleton S, Fotheringham S, Holloman WK (1988) Isolation and characterization of an autonomously replicating sequence from *Ustilago maydis*. *Mol Cell Biol* 8: 3703–3709.
89. Holliday R (1974) *Ustilago maydis*. In: King RC, editor. *Handbook of Genetics*. New York, USA: Plenum Press. pp. 575–595.
90. Mahler M, Vogler C, Stelter K, Hause G, Basse CW (2009) The *a2* mating-type-locus gene *lga2* of *Ustilago maydis* interferes with mitochondrial dynamics and fusion, partially in dependence on a Dnm1-like fission component. *J Cell Sci* 122: 2402–2412.
91. Müller P, Weinzierl G, Brachmann A, Feldbrügge M, Kahmann R (2003) Mating and pathogenic development of the smut fungus *Ustilago maydis* are regulated by one mitogen-activated protein kinase cascade. *Eukaryot Cell* 2: 1187–1199.
92. Pontecorvo G, Roper JA, Hemmons LM, Macdonald KD, Bufton AW (1953) The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Adv Genet* 5: 141–238.
93. Hill TWuK, E. (2001) Improved protocols for *Aspergillus* minimal medium: trace element and minimal medium salt stock solutions. *Fungal Genetics Newsletter* 48: 20–21.
94. Gillissen B, Bergemann J, Sandmann C, Schröer B, Bölker M, et al. (1992) A two-component regulatory system for self/non-self recognition in *Ustilago maydis*. *Cell* 68: 647–657.
95. Mendoza-Mendoza A, Eskova A, Weise C, Czajkowski R, Kahmann R (2009) Hap2 regulates the pheromone response transcription factor prf1 in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol* 72: 683–698.
96. Hoffman CS, Winston F (1987) A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *E. coli*. *Gene* 57: 267–272.
97. Schulz B, Banuett F, Dahl M, Schlesinger R, Schäfer W, et al. (1990) The *b* alleles of *U. maydis*, whose combinations program pathogenic development, code for polypeptides containing a homeodomain-related motif. *Cell* 60: 295–306.
98. Timberlake WE, Marshall MA (1989) Genetic engineering of filamentous fungi. *Science* 244: 1313–1317.
99. Yelton MM, Hamer JE, Timberlake WE (1984) Transformation of *Aspergillus nidulans* by using a *trpC* plasmid. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81: 1470–1474.
100. Kämper J (2004) A PCR-based system for highly efficient generation of gene replacement mutants in *Ustilago maydis*. *Mol Genet Genomics* 271: 103–110.
101. Brachmann A, König J, Julius C, Feldbrügge M (2004) A reverse genetic approach for generating gene replacement mutants in *Ustilago maydis*. *Mol Genet Genomics* 272: 216–226.
102. Scherer M, Heilmel K, Starke V, Kämper J (2006) The Clp1 protein is required for clamp formation and pathogenic development of *Ustilago maydis*. *Plant Cell* 18: 2388–2401.
103. Heilmel K, Scherer M, Schuler D, Kämper J (2010) The *Ustilago maydis* Clp1 protein orchestrates pheromone and *b*-dependent signaling pathways to coordinate the cell cycle and pathogenic development. *Plant Cell* 22: 2908–2922.
104. Garrido E, Perez-Martin J (2003) The *ark1* gene encodes an Ime2-related protein that is required for morphogenesis in the plant pathogen *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol* 47: 729–743.
105. Trapnell C, Pachter L, Salzberg SL (2009) TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq. *Bioinformatics* 25: 1105–1111.
106. Anders S, Huber W (2010) Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biol* 11: R106.
107. Hardcastle TJ, Kelly KA (2010) baySeq: empirical Bayesian methods for identifying differential expression in sequence count data. *BMC Bioinformatics* 11: 422.
108. Lanver D, Mendoza-Mendoza A, Brachmann A, Kahmann R (2010) Sho1 and Msb2-related proteins regulate appressorium development in the smut fungus *Ustilago maydis*. *Plant Cell* 22: 2085–2101.
109. Abramoff MD, Magalhaes PJ, Ram SJ (2004) Image Processing with ImageJ. *Biophotonics International* 11: 36–42.
110. Katoh K, Toh H (2008) Recent developments in the MAFFT multiple sequence alignment program. *Brief Bioinform* 9: 286–298.