



**Untersuchung der Interaktion und  
dynamischen Regulation des STRIPAK-  
Komplexes in *Ustilago maydis***

*Investigation of the interaction and dynamic regulation of the  
STRIPAK complex in Ustilago maydis*

Zur Erlangung des akademischen Grades einer  
**DOKTORIN DER NATURWISSENSCHAFTEN**  
**(Dr. rer. nat.)**

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

genehmigte  
**DISSERTATION**  
von  
**M.Sc. Julia Dennig**  
Karlsruhe 2024

Dekan: Prof. Dr. Martin Bastmeyer  
Referent: Prof. Dr. Jörg Kämper  
Korreferent: Prof. Dr. Reinhard Fischer  
Tag der mündlichen Prüfung: 05.02.2024



Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von Juli 2020 bis Dezember 2023 am Institut für Angewandte Biowissenschaften des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT) in der Abteilung Genetik unter der Leitung von Prof. Dr. Jörg Kämper durchgeführt.



## Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich meine Dissertation mit dem Titel „Untersuchung der Interaktion und dynamischen Regulation des STRIPAK-Komplexes in *Ustilago maydis*“ selbstständig angefertigt habe, keine anderen als die im Text angegebenen Hilfsmittel verwendet habe und sämtliche Quellen, die dem Wortlaut oder dem Sinn nach aus anderen Werken entnommen wurden, mit Quellenangaben kenntlich gemacht sind. Dies schließt Zeichnungen und Skizzen mit ein. Die Regelung zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis im Karlsruher Institut für Technologie (KIT), in gültiger Fassung vom 27.11.2014, habe ich beachtet.

Karlsruhe, den 08.01.2024

---

Julia Dennig



# Inhalt

---

Abkürzungen und Fachbegriffe.....	I
Abbildungsverzeichnis.....	II
Tabellenverzeichnis.....	IV
Zusammenfassung.....	V
Abstract.....	VII
1. Einleitung.....	1
1.1. <i>Ustilago maydis</i> .....	1
1.2. Lebenszyklus.....	4
1.3. Paarungstyploci.....	6
1.3.1. <i>a</i> -Locus.....	7
1.3.2. <i>b</i> -Locus.....	9
1.4. Vesikuläre Transportprozesse.....	12
1.5. STRIPAK-Komplex.....	16
1.5.1. Der Far-Komplex in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	19
1.5.2. STRIPAK in <i>Sordaria macrospora</i> .....	22
1.5.3. STRIPAK in <i>Neurospora crassa</i> .....	25
1.5.4. STRIPAK in <i>U. maydis</i> .....	29
1.6. Zielsetzung.....	31
2. Ergebnisse.....	33
2.1. Die regulatorische Untereinheit Far8 und das Entwicklungsprotein Far11 sind essenziell in <i>U. maydis</i> .....	33
2.2. Deletion des Ankerproteins <i>far10</i> .....	35
2.2.1. Deletion von <i>far10</i> resultiert in verfrühter Rückkehr aus <i>a</i> -abhängigem Zellzyklusarrest und abnormaler Zellkern-Verteilung.....	36
2.2.2. Verminderte Anzahl an Fusionsereignissen nach Deletion von <i>far10</i> .....	38
2.2.3. Reduziertes <i>b</i> -abhängiges filamentöses Wachstum nach Deletion von <i>far10</i> .....	42
2.2.4. Keine differentielle Expression der Gene der <i>a</i> -Signalkaskade nach Deletion von <i>far10</i> .....	44

2.2.5. <i>far10</i> -Deletion resultiert in Apathogenität .....	46
2.2.6. Far10 hat keinen Einfluss auf die Sekretion, die Endozytose, die Lokalisation von $\alpha$ -Tubulin und Reaktion auf ER-Stress.....	48
2.2.7. <i>far10</i> -Deletion führt zu reduzierter Anzahl an Vakuolen in Sporidien .....	54
2.2.8. Reduzierte Zellwand- und Membranintegrität nach Deletion von <i>far10</i> ....	56
2.2.9. Far10 hat keinen Einfluss auf die Verstoffwechslung von verschiedenen Zuckern.....	60
2.3. Lokalisation des STRIPAK-Komplexes in <i>U. maydis</i> .....	61
2.3.1. Far8, Far10 und Far11 lokalisieren in Sporidien an Mitochondrien und dem ER oder der Kernhülle .....	61
2.3.2. Far8, Far10 und Far11 colokalisieren in Sporidien.....	63
2.3.3. Ausschließlich Far8 lokalisiert in Filamenten an Mitochondrien .....	64
2.3.4. Während der Bildung des Filaments schwindet die Lokalisation von Far8, Far10 und Far11 an ER und Kernhülle .....	65
2.3.5. Während der Bildung des Filaments schwindet die Colokalisation der STRIPAK-Komponenten.....	68
2.3.6. <i>far10</i> -Deletion hat keinen Einfluss auf die Colokalisation der STRIPAK-Komponenten mit den Mitochondrien .....	71
2.4. Zusammensetzung und Interaktion innerhalb des STRIPAK-Komplexes in <i>U. maydis</i> .....	72
2.4.1. Co-Immunopräzipitationen zeigten Interaktion der STRIPAK-Komponenten in Sporidien.....	73
2.4.2. Massenspektrometrie bestätigt bekannte STRIPAK-Komponenten in <i>U. maydis</i> .....	77
3. Diskussion .....	81
3.1. Die regulatorische Untereinheit Far8 und das Entwicklungsprotein Far11 sind essenziell in <i>U. maydis</i> .....	81
3.2. Deletion des Ankerproteins <i>far10</i> .....	84
3.3. Lokalisation des STRIPAK-Komplexes in <i>U. maydis</i> an ER, Kernmembran und Mitochondrien .....	92
3.4. Zusammensetzung und Interaktion innerhalb des STRIPAK-Komplexes in <i>U. maydis</i> .....	96
4. Material und Methoden.....	102
4.1. Material und Bezugsquellen.....	102





4.3.1. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	140
4.3.2. Isolierung von Nukleinsäuren.....	141
4.3.3. In-vitro-Modifikationen von DNA.....	143
4.3.4. Gelelektrophorese.....	144
4.3.5. Transfer und Analyse von DNA auf Membranen.....	144
4.4. PCR-Techniken.....	146
4.4.1. Polymerasekettenreaktion (PCR).....	146
4.4.2. PCR-Generierung von Gen-Fusionskonstrukten für <i>U. maydis</i> .....	147
4.4.3. Gibson-Assembly®.....	149
4.4.4. Real-Time-PCR (qRT-PCR).....	150
4.5. Sequenzanalysen und <i>in silico</i> Methoden.....	151
4.5.1. Sequenzierung von DNA.....	151
4.5.2. Analyse von LC-MS-Daten.....	152
4.5.3. Sonstige Sequenz- und Strukturanalyse.....	152
4.6. Biochemische Methoden.....	153
4.6.1. Isolierung von Gesamtprotein.....	153
4.6.2. Aufreinigung von Proteinen und Proteinkomplexen.....	154
4.6.3. Auftrennung und Nachweis von Protein (SDS-PAGE).....	155
4.6.4. Nachweis von immobilisierten Proteinen (Western-Analyse).....	156
4.6.5. Analyse von Proteinen und Proteinkomplexen.....	157
5. Anhang.....	159
5.1. $\Delta far10$ : Expression der <i>a</i> - und <i>b</i> -abhängigen Gene.....	159
5.2. BLAST®-Analyse der STRIPAK-Komponenten.....	160
6. Literaturverzeichnis.....	161
Danksagung.....	191

# Abkürzungen und Fachbegriffe

---

Amp	Ampicillin
<i>bE</i>	<i>bEast</i>
<i>bW</i>	<i>bWest</i>
CM	Komplett-Medium
DIG	Digoxigenin
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
GFP	grün fluoreszierendes Protein
Gent	Geneticin
Hyg	Hygromycin
MAPK-Kaskade	mitogenaktivierte Proteinkinase-Kaskade
mCherry	monomeres rot fluoreszierendes Protein
Nat	Nourseothricin
OD <sub>600</sub>	optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm
ORF	offener Leserahmen
PEG	Polyethylenglykol
rpm	Umdrehungen pro Minute
TE	Tris-HCl/EDTA
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
SDS	Natriumdodecylsulfat
STRIPAK-Komplex	<i>striatin-interacting protein phosphatase and kinase complex</i>
(v/v)	Volumen pro Volumen
WT	Wildtyp
(w/v)	Gewicht pro Volumen
Δ	Deletion

# Abbildungsverzeichnis

---

Abbildung 1: Infizierter Maiskolben.....	4
Abbildung 2: Dimorpher Lebenszyklus von <i>U. maydis</i> .....	6
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Gene des biallelen <i>a</i> -Locus von <i>U. maydis</i> .....	7
Abbildung 4: Schematische Darstellung der <i>a</i> -vermittelten Pheromonkaskade.....	9
Abbildung 5: Schematische Darstellung des multiallelen <i>b</i> -Locus von <i>U. maydis</i> und dessen Produkte.....	10
Abbildung 6: Schematische Darstellung der <i>b</i> -Regulationskaskade.....	11
Abbildung 7: Komponenten der Endozytose.....	13
Abbildung 8: Lokalisierung von Rab5a und Rab7 in <i>U. maydis</i> .....	15
Abbildung 9: Pheromonabhängiger Signalweg in <i>S. cerevisiae</i> .....	20
Abbildung 10: Schema der physikalischen Interaktionen im Far-Komplex von <i>S. cerevisiae</i> .....	21
Abbildung 11: STRIPAK-Komplex in <i>S. macrospora</i> .....	23
Abbildung 12: Aufbau und Interaktionen des STRIPAK-Komplexes in <i>N. crassa</i> .....	27
Abbildung 13: Phänotyp der Deletion des Ankerproteins <i>far10</i> .....	30
Abbildung 14: Die regulatorische Untereinheit Far8 und das Entwicklungsprotein Far11 sind essenziell in <i>U. maydis</i> .....	35
Abbildung 15: Verfrühte Rückkehr aus dem Zellzyklusarrest und abnormale Zellkernverteilung während des <i>a</i> -abhängigen filamentösen Wachstums nach Deletion des Ankerproteins <i>far10</i> .....	37
Abbildung 16: Eingeschränkte Fusion nach Deletion des Ankerproteins <i>far10</i> .....	41
Abbildung 17: Reduziertes <i>b</i> -abhängiges Wachstum nach <i>far10</i> -Deletion in Flüssigmedium.....	43
Abbildung 18: Normale Expression der <i>a</i> - und <i>b</i> -abhängigen Gene nach <i>far10</i> -Deletion.....	45
Abbildung 19: Pflanzenantwort auf nichtpathogene Sporidien mit <i>far10</i> -Deletion im Vergleich zum haploiden Wildtyp signifikant reduziert.....	47
Abbildung 20: Deletion von <i>far10</i> besitzt keinen Einfluss auf die Expression und Sekretion der Invertase Suc2 und der Effektoren Cmu1, Pep1 und Tin2.....	50
Abbildung 21: Die <i>far10</i> -Deletion hat keinen Einfluss auf die Reaktion auf ER-Stress, die Endozytose und die Lokalisierung von $\alpha$ -Tubulin.....	53

Abbildung 22: Reduzierte Anzahl der Vakuolen nach <i>far10</i> -Deletion .....	55
Abbildung 23: Reduzierte Membran- und Zellwandintegrität nach <i>far10</i> -Deletion ....	59
Abbildung 24: Normale Verstoffwechslung von Zuckern nach <i>far10</i> -Deletion .....	60
Abbildung 25: Colokalisation der STRIPAK-Komponenten mit Mitochondrien in Sporidien .....	62
Abbildung 26: Colokalisation von Far10 und Far11 mit der Kernhülle und Far8 mit dem ER und der Kernhülle in Sporidien .....	63
Abbildung 27: Colokalisation der STRIPAK-Komponenten Far8, Far10 und Far11 in Sporidien .....	64
Abbildung 28: Far8 lokalisiert in Filamenten an Mitochondrien, keine Colokalisation von Far10 und Far11 an Mitochondrien im Filament .....	65
Abbildung 29: Mit zunehmender Filamentlänge schwindet die Colokalisation der STRIPAK-Komponenten mit dem ER und der Kernhülle .....	68
Abbildung 30: Rückläufige Colokalisation der STRIPAK-Komponenten Far8, Far10 und Far11 in Filamenten.....	69
Abbildung 31: Colokalisation der STRIPAK-Komponenten Far8, Far10 und Far11 in Sporidien mit Zellzyklusarrest in der S-Phase .....	70
Abbildung 32: Lokalisation der STRIPAK-Komponenten Far8 und Far11 an den Mitochondrien nach Deletion von <i>far10</i> .....	72
Abbildung 33: Interaktion der regulatorischen Untereinheit Far8 mit dem Ankerprotein Far10 und mit dem Entwicklungsprotein Far11 in Sporidien und Filamenten .....	75
Abbildung 34: Interaktion des Ankerproteins Far10 mit dem Entwicklungsprotein Far11 in Sporidien und Filamenten.....	76
Abbildung 35: Durch Co-IP mit anschließender MS bestätigte STRIPAK-Komponenten und neue identifizierte potenzielle Interaktionspartner .....	79
Abbildung 36: Modell des STRIPAK-Komplexes in <i>U. maydis</i> .....	94
Abbildung 37: Interaktionsnetzwerk der durch LC-MS identifizierten Proteine .....	99
Abbildung 38: Protein Größenstandards.....	109
Abbildung 39: DNA Größenstandard .....	109
Abbildung 40: Auskeimen der Spore .....	136
Abbildung 41: Expression der <i>a</i> - und <i>b</i> -abhängigen Gene nach <i>far10</i> -Deletion.....	159

# Tabellenverzeichnis

---

Tabelle 1: Komponenten der STRIPAK-Komplexe in Eukaryoten .....	18
Tabelle 2: Lokalisation der STRIPAK-Komponenten in <i>U. maydis</i> .....	93
Tabelle 3: BLAST®-Analyse der bekannten STRIPAK-Komponenten .....	97
Tabelle 4: Ausgangsstämme .....	102
Tabelle 5: In dieser Arbeit hergestellte Stämme .....	104
Tabelle 6: In dieser Arbeit verwendete Enzyme und Proteine .....	108
Tabelle 7: In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide.....	110
Tabelle 8: In dieser Arbeit verwendete Plasmide.....	115
Tabelle 9: In dieser Arbeit hergestellte Plasmide.....	117
Tabelle 10: In dieser Arbeit verwendete Puffer und Lösungen .....	120
Tabelle 11: Medien für <i>E. coli</i> .....	125
Tabelle 12: Medien für <i>U. maydis</i> .....	126
Tabelle 13: Für Western-Analysen verwendete Antikörper.....	156
Tabelle 14: BLAST®-Analyse der bekannten STRIPAK-Komponenten .....	160

## Zusammenfassung

---

Der *striatin-interacting protein phosphatase and kinase complex* (STRIPAK-Komplex) ist ein in Eukaryoten hoch konservierter Proteinkomplex, der an der Regulation diverser zellulärer Prozesse beteiligt ist. So steuert er in Säugetieren die Organisation des Zytoskeletts, die Zellmigration und die Zellmorphologie. In pilzlichen Zellen nimmt der Komplex Einfluss auf die sexuelle Entwicklung, das Wachstum und die Zellfusion. Zu den Hauptkomponenten des STRIPAK-Komplexes zählen Kinasen, Ankerproteine, Entwicklungsproteine und die Phosphatase bestehend aus der strukturellen, der katalytischen und der regulatorischen Untereinheit. Die regulatorische Untereinheit ist das Striatin-Homolog. Sie vermittelt die Interaktion des Ankerproteins und des Entwicklungsproteins und fungiert daher als inneres Gerüst des Komplexes. Das Ankerprotein sichert die Lokalisation des STRIPAK-Komplexes an den Membranen des Nukleus und der Mitochondrien. Das Entwicklungsprotein koppelt den Komplex an interne Membransysteme.

Der bereits in einigen Ascomyzeten analysierte STRIPAK-Komplex wurde im biotrophen, pflanzenpathogenen Modellorganismus *Ustilago maydis* das erste Mal in einem Basidiomyceten untersucht. Ebenso wie die Deletion einer beliebigen Komponente des STRIPAK-Komplexes in *Saccharomyces cerevisiae* resultierte die Deletion des Ankerproteins in *U. maydis* in der verfrühten Rückkehr aus dem pheromonabhängigen Zellzyklusarrest. Die reduzierte Anzahl von Vakuolen nach Deletion des Ankerproteins in *U. maydis* zeigt den Einfluss des STRIPAK-Komplexes auf die Vakuolen, der aufgrund von einer abnormalen Vakuolenmorphologie in Folge der Deletion des Ankerproteins auch in *S. cerevisiae* beobachtet werden konnte. Die Deletion des Ankerproteins in *U. maydis* führte zudem zu Defekten in der Fusion von Konjugationshyphen, was auch für die Deletion einer der Hauptkomponenten des STRIPAK-Komplexes in *Sordaria macrospora* beobachtet werden konnte. Auch die Länge der *b*-abhängigen Filamente ist nach Deletion des Ankerproteins in *U. maydis* reduziert, was dem Phänotyp der Deletion einer beliebigen Komponente des STRIPAK-Komplexes in *Neurospora crassa* ähnelt, der eine reduzierte Wachstumsrate aufweist. Zusätzlich zu den aus Ascomyzeten bekannten Auswirkungen der Deletion von STRIPAK-Komponenten führt die Deletion des Ankerproteins in *U. maydis* zu Zytokinese- und Polaritätsdefekten, Apathogenität

## Zusammenfassung

verbunden mit der fehlenden Anheftung an die Pflanzenoberfläche, reduzierter Zellwand- und Plasmamembranintegrität und reduzierter Anzahl an motilen frühen Endosomen. Einzigartig ist zudem, dass sich die regulatorische Untereinheit und das Entwicklungsprotein als essenziell in *U. maydis* herausstellten. Aufgrund des vorliegenden Phänotyps der Deletion des Ankerproteins in *U. maydis* wird ein Einfluss des STRIPAK-Komplexes auf Cla4, Smu1 und UmSepA, welche Teil des Cdc42-Rac1-Signalweges sind, vermutet. Dieser reguliert in *U. maydis* die Hyphenfusion, Endozytose, Polarität, Zytokinese und das filamentöse Wachstum. Auch die Rolle des STRIPAK-Komplexes als Antagonist des TORC2-Komplexes, welche bereits in *S. cerevisiae* beschrieben wurde, wird aufgrund der reduzierten Zellwand- und Membranintegrität vermutet, da der TORC2-Komplex wesentlich für die Aktivierung des Zellwandintegritätssignalweges ist. Das Ankerprotein und das Entwicklungsprotein des STRIPAK-Komplexes wurde zudem in Sporidien von *U. maydis* durch Fluoreszenzmikroskopie wie in den bereits untersuchten Ascomyzeten an der Kernhülle und an Mitochondrien lokalisiert. Die regulatorische Untereinheit der Phosphatase lokalisiert zusätzlich am Endoplasmatischen Reticulum (ER), was die Lokalisation des STRIPAK-Komplexes an Mitochondrien, Kernhülle und ER in Ascomyzeten widerspiegelt. Eine Colokalisation der drei STRIPAK-Komponenten konnte ebenfalls durch Fluoreszenzmikroskopie in Sporidien gezeigt werden. Zusätzlich konnte in *U. maydis* durch Co-Immunopräzipitationen die Interaktion der regulatorischen Untereinheit, des Ankerproteins und des Entwicklungsproteins in Sporidien gezeigt und diese als Komponenten des STRIPAK-Komplexes bestätigt werden. Die abnehmende Colokalisation der STRIPAK-Komponenten mit dem ER, der Kernhülle, den Mitochondrien und untereinander während des filamentösen Wachstums deutet auf die Auflösung des Komplexes in Subkomplexe in Filamenten hin. LC-MS-Messungen bestätigten zudem UMAG\_02960 als strukturgebende Untereinheit, UMAG\_10198 als katalytische Untereinheit und UMAG\_00493 als Kinaseaktivator des STRIPAK-Komplexes in *U. maydis*. Außerdem konnten durch die LC-MS-Messung weitere potenzielle Interaktionspartner des STRIPAK-Komplexes in *U. maydis* identifiziert werden. Dazu gehören Proteine der Fettsäuresynthese, Proteinbiosynthese und Ergosterolbiosynthese. Da Ergosterol eine wichtige Rolle in der Fluidität und Permeabilität der Plasmamembran spielt, ist die reduzierte Integrität der Plasmamembran nach Deletion des Ankerproteins auf den Einfluss des STRIPAK-Komplexes auf die Ergosterolbiosynthese zurückzuführen.



## Abstract

---

The *striatin-interacting phosphatase and kinase complex* (STRIPAK complex) is highly conserved in eucaryotes. In mammals the complex regulates the organisation of the cytoskeleton, cell migration and cell morphology. In fungal cells STRIPAK influences sexual development, growth, and cell fusion. The main components of STRIPAK are kinases, tail-anchored proteins, developmental proteins, and the phosphatase which consists of the regulatory, the catalytic and the structural subunit. The regulatory subunit is a striatin-homolog and mediates the interaction of the tail-anchored protein and the developmental protein and thereby works as the inner framework of the complex. The tail-anchored protein ensures the localisation at the membrane of the mitochondria or the nucleus. The developmental protein is linked to internal membrane systems.

The STRIPAK complex was already analysed in some ascomycetes and the biotrophic, plant pathogenic model organism *Ustilago maydis* is the first basidiomycete wherein STRIPAK is now investigated in. Like in the deletion of any of the STRIPAK components in *Saccharomyces cerevisiae* the deletion of the tail-anchored protein in *U. maydis* lead to a premature return of the pheromone dependent cell cycle arrest. The reduced number of vacuoles after the deletion of the tail-anchored protein in *U. maydis* shows the influence of the STRIPAK complex on the vacuoles, which could also be observed in *S. cerevisiae* due to an abnormal vacuole morphology as a result of the deletion of the tail-anchored protein. The deletion of the tail-anchored protein in *U. maydis* also resulted in defects in the fusion of conjugation tubes similar to the fusion defects found after the deletion of one of the main components of the STRIPAK complex in *Sordaria macrospora*. The length of *b*-dependent filaments was also reduced after the deletion of the tail-anchored protein in *U. maydis*, which is similar to the phenotype of the deletion of any of the components of the STRIPAK complex in *Neurospora crassa* resulting in a reduced growth rate. Additionally, deletion of the tail-anchored protein in *U. maydis* lead to cytokinesis and polarity defects, apathogenicity related to absent adhesion to the plant surface, reduced cell wall and plasma membrane integrity and a reduced amount of motile early endosomes. Uniquely, the regulatory subunit and the developmental protein were found to be essential in *U. maydis*. Because of the deletion phenotype, a connection of the STRIPAK complex

## Abstract

with Cla4, Smu1 and UmSepA, proteins of the Cdc42-Rac1-pathway is assumed. In *U. maydis* hyphal fusion, endocytosis, cytokinesis, polarity, and filamentous growth is regulated by the Cdc42-Rac1-pathway. A role of the STRIPAK complex antagonizing the TORC2 complex like it was described for *S. cerevisiae* is hypothesized because of the reduced cell wall and plasma membrane integrity after the deletion of the tail-anchored protein and the function of TORC2 in activating the cell wall integrity pathway. The tail-anchored and the developmental protein were localized to the nuclear membrane, and mitochondria in sporidia of *U. maydis* by fluorescence microscopy. In Sporidia, the regulatory subunit of the phosphatase was localized to the ER, nuclear membrane, and mitochondria, which resembles the localization of the STRIPAK complex in ascomycetes. A colocalization of those three components was also shown in sporidia by fluorescence microscopy. Interactions of the regulatory subunit, the tail-anchored protein and developmental protein were proven in sporidia by co-immunoprecipitation and therefore the three components were confirmed as part of the STRIPAK complex in *U. maydis*. The decreasing colocalization of the STRIPAK components with the ER, the nuclear membrane, the mitochondria, and with each other during filamentous growth indicates the dissolution of the STRIPAK complex into subcomplexes in filaments. LC-MS measurements confirmed UMAG\_02960 as the scaffolding subunit, UMAG\_10198 as the catalytic subunit and UMAG\_00493 as the kinase activator of the STRIPAK complex in *U. maydis*. Additionally, more potential interaction partners of the STRIPAK complex in *U. maydis* were identified by LC-MS measurements. These include proteins involved in fatty acid synthesis, protein biosynthesis and ergosterol biosynthesis. Since ergosterol plays an important role in the fluidity and permeability of the plasma membrane, the reduced integrity of the plasma membrane after deletion of the anchor protein is due to the influence of the STRIPAK complex on ergosterol biosynthesis.

# 1. Einleitung

---

## 1.1. *Ustilago maydis*

Das Reich der Pilze verfügt mit humanpathogenen und phytopathogenen Pilzen über zwei große Gruppen an Organismen, die das Leben der Menschen einschränken. So sind allein in Nordamerika mehr als 8000 humanpathogene Pilzarten für über 100 000 Krankheiten verantwortlich (Agrios, 1997) und treten im Laufe des 20. Jahrhunderts aufgrund der Zunahme immunsuppressiver Menschen durch Krankheiten, wie HIV, oder Behandlungen, wie Chemotherapien vermehrt in Erscheinung (Nucci and Marr, 2005; Low and Rotstein, 2011; Armstrong-James *et al.*, 2014). Zu den bedeutendsten und am besten erforschten Pilzen gehören *Aspergillus fumigatus* (Latgé and Chamilos, 2019), *Candida albicans* (Poulain, 2015) und *Cryptococcus neoformans* (Kwon-Chung *et al.*, 2014). Die hohe Mortalitätsrate von 28 % infolge einer Ansteckung mit humanpathogenen Pilzen zeigt zudem den Optimierungsbedarf aktueller Therapieansätze (Bitar *et al.*, 2014; Zhang and Zhu, 2020). Gleichzeitig mit dem vermehrten Auftreten von Krankheiten, die durch humanpathogene Pilze hervorgerufen werden, steigt jedoch auch die Resistenz ebendieser Pilze gegen antimykotische Pharmazeutika (Fairlamb *et al.*, 2016; Jensen, 2016; Perlin *et al.*, 2017). Es wird außerdem vorhergesagt, dass die Erderwärmung zum Auftreten weiterer, neuer pilzlicher Infektionskrankheiten führen soll (Garcia-Solache and Casadevall, 2010). Im Gegensatz zu den humanpathogenen Pilzen spielen die phytopathogenen Pilze, welche Pflanzen infizieren, schon seit der landwirtschaftlichen Revolution und dem Beginn des Ackerbaus um etwa 10 000 v.Chr. eine Rolle. Der Zusammenhang zwischen Ernteverlusten und phytopathogenen Pilzen wurde jedoch erst nach der mikroskopischen Beobachtung von Mikroorganismen durch Antoni van Leeuwenhoek und Robert Hooke (Chung and Liu, 2017) und der Beobachtung des Zusammenhangs von Erreger und Krankheit durch Robert Koch hergestellt. Im Laufe der Zeit hat das Wissen um die pilzlichen Erreger und die dadurch hervorgerufenen Krankheiten stetig zugenommen. Berechnungen zufolge könnte man mit dem durch phytopathogene Pilze verdorbenen Getreide heutzutage etwa 8.5 % der Weltbevölkerung ernähren (Almeida *et al.*, 2019). Die weltweiten Ernteverluste durch phytopathogene Pilze werden auf mindestens 13 % geschätzt (Oerke, 2006; Fisher *et al.*, 2012). Zur Eindämmung phytopathogener Pilze werden hauptsächlich Fungizide

## Einleitung

verwendet, welche in Deutschland etwa 30 % der zugelassenen Pflanzenschutzmittel ausmachen und jährlich mehr als eine Milliarde Euro umsetzen. Nachteile der Fungizide sind jedoch die toxischen Auswirkungen, welche sie auch auf andere Organismen haben, was wiederum zu Ungleichgewichten in Ökosystemen führt. Zudem degradieren Fungizide nur langsam, verbleiben somit lange im Boden und kontaminieren unter Umständen ganze Wassersysteme, wodurch die Verwendung von Fungiziden auch Auswirkungen auf den Konsumenten agrarwirtschaftlicher Erzeugnisse haben kann (zusammengefasst in Shuping and Eloff, 2017).

Dem phytopathogenen Pilz *U. maydis* kommt ökonomisch kaum Bedeutung zu, da er lediglich zu zwei bis zwanzig Prozent Ernteverlust führt (Martinez-Espinoza *et al.*, 2002; Fisher *et al.*, 2012). Da der Pilz jedoch eine starke Ähnlichkeit zu den Rostpilzen besitzt, welche deutlich mehr Schaden hervorrufen (Vivek *et al.*, 2010; Bandara *et al.*, 2020), wird er als Modellorganismus für phytopathogene Pilze verwendet und zählt damit zu den zehn wichtigsten phytopathogenen Pilzen (Dean *et al.*, 2012). *U. maydis* besitzt im Gegensatz zu den Rostpilzen einen dimorphen Lebenszyklus und kann in seiner saprophytischen, haploiden Phase auf einer Vielzahl von Labormedien kultiviert werden. In der biotrophen Phase wächst der Pilz in der Maispflanze und bildet Sporen, weshalb hier die Interaktion zwischen Pilz und Pflanze studiert werden kann. Der Wechsel zwischen saprophytischem (hefeartigem) und filamentösem Wachstum wird durch evolutionär hoch konservierte MAP-Kinase- und cAMP-Kaskaden reguliert (Madhani and Fink, 1998; Lengeler *et al.*, 2000). Auch in der Grundlagenforschung kommt *U. maydis* eine wichtige Rolle zu, da mit ihm das Verständnis über grundlegende Prozesse des pilzlichen Metabolismus vergrößert und somit Angriffspunkte für Fungizide gefunden werden können. Zellbiologisch ist in *U. maydis* zudem der Langstreckentransport und die Endo- bzw. Exozytose sehr interessant, da es einige Parallelen zwischen den Hyphenzellen filamentöser Pilze und den Neuronen von Säugern gibt (Steinberg and Perez-Martin, 2008; Matei and Doehlemann, 2016). Insbesondere die Ähnlichkeiten des Zytoskeletts in Neuronen von Säugetieren und von *U. maydis* sind hierbei hervorzuheben. Auch die Tatsache, dass *U. maydis* die für höhere Eukaryoten charakteristische offene Mitose durchläuft (zusammengefasst in Steinberg and Perez-Martin, 2008) und eine cyclinvermittelte Regulation des Zellzyklus ähnlich der der höheren Eukaryoten stattfindet (Furuno *et al.*, 1999; García-Muse *et al.*, 2004), zeigt auf, wie interessant der Pilz für die Grundlagenforschung ist. Zu einem exzellenten Modellorganismus macht den Pilz außerdem, dass sein

gesamter Lebenszyklus innerhalb von drei bis vier Wochen komplettiert wird (Banuett, 1995). Aufgrund des engen Wirtsspektrums ist zudem die Gefahr einer Infektion anderer Organismen absent. Da *U. maydis* nicht nur Fruchtstände infiziert, kann eine Infektion auch bereits an jungen Maispflanzen untersucht werden. Da das 20.5 Mb große Genom des Pilzes mit haploidem Chromosomensatz sequenziert ist (Kämper *et al.*, 2006), ist die Anwendung reverser Genetik möglich. Auch die Deletion oder Fusion von Genen (Brachmann *et al.*, 2004; Kämper, 2004; Böhmer *et al.*, 2009) wird durch effiziente homologe Rekombination ermöglicht (Holliday, 1974). Außerdem ist die Verwendung von metabolisch oder durch Pflanzensignale regulierbaren Promotoren etabliert (Banks *et al.*, 1993; Bottin *et al.*, 1996; Brachmann *et al.*, 2004; Farfsing *et al.*, 2005; Mendoza - Mendoza *et al.*, 2009; Schmitz *et al.*, 2020). Auch Resistenzgene und Auxotrophiemarker finden für eine effiziente Selektion der eingebrachten genetischen Veränderungen in *U. maydis* Anwendung (Keon *et al.*, 1991; Gold *et al.*, 1994; Kojic and Holloman, 2000) und können durch ein etabliertes Rekombinasesystem wiederverwendet werden (Khrunyk *et al.*, 2010). Zusätzlich kann auch das CRISPR/Cas9-System zur simultanen und spezifischen Manipulation mehrerer Gene in *U. maydis* angewendet werden (Schuster *et al.*, 2016; Schuster *et al.*, 2018; Zuo *et al.*, 2020).

*U. maydis* gehört zu den Basidiomyceten, welche 30 % aller Pilze ausmachen und sich durch ein dikaryotisches Myzel und eine Basidie mit davon abschnürenden Basidiosporen auszeichnen. Außerdem wird der Pilz der Unterabteilung der Ustilaginomycotina (Brandpilze) zugeordnet, welche etwa 1500 Arten umfasst und fast ausschließlich Poaceen und Cyperaceen parasitieren (Begerow *et al.*, 2006). Der in seinem Wirtsspektrum stark spezifische *U. maydis* infiziert lediglich *Zea mays* (Mais) und dessen Urverwandte *Zea mexicana* (Teosinte) (Doebley, 1992). Nahe Verwandte wie *Ustilago hordei* und *Ustilago tritici* infizieren hingegen Getreide wie Gerste beziehungsweise Weizen.



Abbildung 1: Infizierter Maiskolben

Die Infektion mit *U. maydis* führt zu gallenartigen, weißen Tumoren, welche schwarze Teliosporen beinhalten. Tumore können sowohl am Kolben als auch an Blättern und Stamm entstehen.

Bereits vier Tage nach Infektion mit *U. maydis* können erste Anzeichen in Form von Chlorosen und einer erhöhten Anthocyanbildung, welche durch eine dunkelrote bis blauviolette Färbung des Gewebes erkennbar ist, an der Maispflanze beobachtet werden. Die für eine Infektion typischen lokal begrenzten Gallen, welche durch pilzliche Effektoren induziert werden, sind sieben Tage nach der Infektion mit *U. maydis* zu sehen (Doehlemann *et al.*, 2011). Innerhalb der Gallen, welche lediglich an den oberirdischen Teilen der Maispflanze, wie Stängel, Blätter und Kolben, zu finden sind (Christensen, 1963), findet die Bildung der melaninverstärkten und daher schwarz gefärbten Teliosporen statt. Aufgrund dieser typischen schwarzen Färbung, die dem Pilz ein verbranntes Aussehen verleiht (Abbildung 1), wurde der Pilz *Ustilago maydis* (ustilare, lat. brennen) beziehungsweise Maisbeulenbrand genannt.

## 1.2. Lebenszyklus

Der Lebenszyklus von *U. maydis* lässt sich in zwei Phasen unterteilen: die saprophytische und die pathogene Phase. Während der saprophytischen Phase betreiben die haploiden Sporidien hefeartiges, vegetatives Wachstum außerhalb der Maispflanze. Die pathogene Phase hingegen kennzeichnet das biotrophe Wachstum und die Sporenbildung innerhalb der Maispflanze. Die haploiden Sporidien (Abbildung 2.1) verfügen über eine zigarrenförmige Zellform. Mittels eines Pheromon-Rezeptor-Systems mit Sieben-Transmembrandomänen-Rezeptor und Lipopeptidpheromon (Spellig *et al.*, 1994a; Szabo *et al.*, 2002), welche durch den *a*-Locus codiert werden (Bölker *et al.*, 1992), erfolgt die Erkennung und im tetrapolaren System in Zusammenarbeit mit Genen des *b*-Locus die Bestimmung der Kompatibilität (Bölker, 2001; Feldbrügge *et al.*, 2004; Kahmann and Kämper, 2004). Die Nähe zweier kompatibler Sporidien führt zur Ausbildung von Konjugationshyphen (Abbildung 2.2),

welche entlang eines Pheromongradienten aufeinander zuwachsen, um zu fusionieren (Snetselaar and Mims, 1992; Snetselaar and Mims, 1993; Snetselaar *et al.*, 1996). Simultan erfolgt die Induktion des Zellzyklusarrests in der G<sub>2</sub>-Phase (Garcia-Muse *et al.*, 2003). Die Verschmelzung des Zellplasmas beider Pilzzellen, auch Plasmogamie genannt, folgt auf die Fusion der kompatiblen Sporidien. Das entstandene Dikaryon (Abbildung 2.3) mit definierter Polaritätsachse ist nunmehr auf die Pflanze angewiesen und befindet sich somit in der pathogenen Phase. *U. maydis* betreibt mittels eines dikaryotischen Filaments Spitzenwachstum auf der Blattoberfläche (Spellig *et al.*, 1994b), wobei keine Teilungen, sondern lediglich eine Septierung stattfindet, bei der sich die Zellkerne und das Zytoplasma nur im apikalen Kompartiment befinden (Banuett and Herskowitz, 1994). Andere phytopathogenen Pilzen penetrieren die Pflanze über ein Appressorium mittels mechanischer Krafteinwirkung, welche über Melanineinlagerung und die Erhöhung des Turgordrucks durch Akkumulation von Osmolyten erzeugt wird (Bechinger *et al.*, 1999; Talbot, 2003). *U. maydis* hingegen nutzt die appressorienähnlichen Strukturen (Abbildung 2.4 und Abbildung 2.5) lediglich zur Bestimmung des Eintrittspunktes in die Pflanze, führt einen Polaritätswechsel durch und sekretiert zur Penetration der Pflanze zellwanddegradierende Enzyme (Snetselaar and Mims, 1992; Snetselaar and Mims, 1993; Kahmann *et al.*, 2000; Kahmann and Kämper, 2004; Schirawski *et al.*, 2005). Aufgrund der biotrophen Lebensweise bleiben die Pflanzenzellen intakt und die Plasmamembran wird lediglich eingestülpt. Über eine Interaktionszone an der Plasmamembran findet der Austausch von Signal- und Nährstoffen zwischen Pilz und kolonisierter Pflanzenzelle statt (Brefort *et al.*, 2009). Der Pilz wächst in späteren Infektionsstadien interzellulär in Richtung der Gefäßbündel und der Zellzyklusarrest in der G<sub>2</sub>-Phase wird aufgehoben. Aus der Proliferation und dem verzweigten Wachstum des Pilzes (Abbildung 2.6) resultieren tumorartige Wucherungen, in welchen die Karyogamie und die Differenzierung zu diploiden Teliosporen stattfindet (Abbildung 2.7) (Snetselaar and Mims, 1993; Banuett and Herskowitz, 1996). Die für die Verzweigung des Myzels wichtige korrekte Zellkernverteilung wird über Schnallenzellen, welche in Basidiomyceten üblich sind, sicher gestellt (Scherer *et al.*, 2006). Bei ausreichender Größe platzen die Wucherungen und die Sporen von *U. maydis* werden durch Wind, Regen oder Insekten verbreitet. Nach dem Auskeimen der Sporen erfolgt die meiotische Teilung, in Folge derer aus dem diploiden Kern vier haploide Kern entstehen, die in die

## Einleitung

Probasidie wandern und dort als Sporidien abgeschnürt werden, woraufhin der Zyklus von vorne beginnen kann (zusammengefasst in Christensen, 1963).

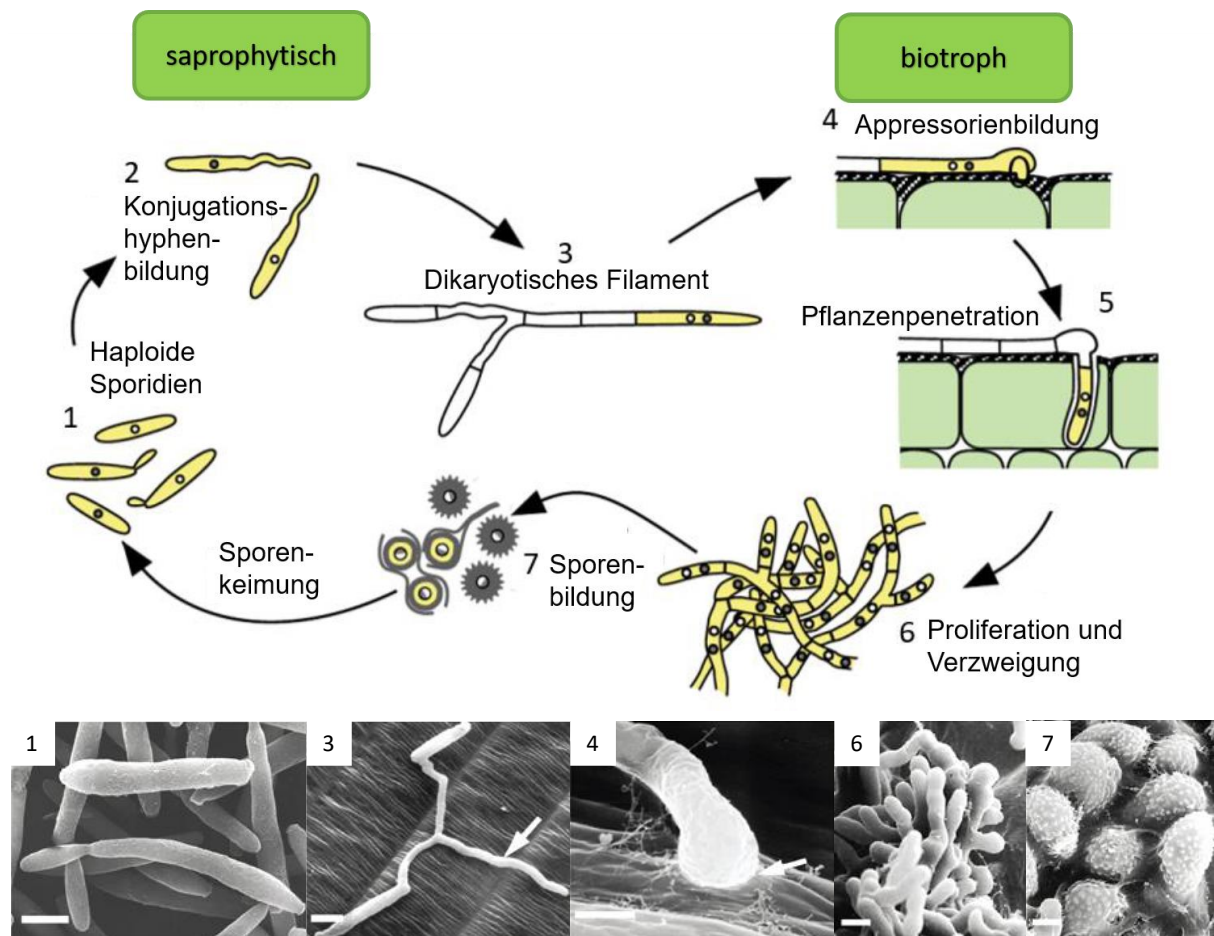


Abbildung 2: Dimorpher Lebenszyklus von *U. maydis*

Schematische Darstellung der verschiedenen Phasen des Lebenszyklus von *U. maydis*. (1) Knospung der haploiden Sporen führt zu hefeartigem, vegetativem Wachstum. (2) Bildung von Konjugationshyphen und die Zellfusion kontrolliert durch den *a*-Locus. (3) Entstehung eines pathogenen, dikaryotischen Filaments, filamentöses Wachstum und Wechsel von der saprophytischen zur biotrophischen Phase. (4) Bildung von Appressorien auf der Blattoberfläche der Pflanze (5) Penetration der Wirtspflanze, Aufhebung des Zellzyklusarrests, biotrophes Wachstum und Schnallenbildung. (6) Proliferation, Tumorinduktion und Karyogamie. (7) Teliosporendifferenzierung (modifiziert nach Kämper *et al.*, 2006)

### 1.3. Paarungstyploci

Bei *U. maydis* handelt es sich um einen heterothallischen Brandpilz mit tetrapolarem Paarungssystem (Kothe, 1996; Hsueh and Heitman, 2008). Der Wechsellpunkt von sexueller zu pathogener Phase, welcher durch die Ausbildung eines Dikaryons gekennzeichnet ist, wird durch die Paarungstyploci *a* und *b* kontrolliert und ist typisch für Brandpilze (Bakkeren *et al.*, 2008). Dabei spielt der bialelele *a*-Locus, welcher für ein Pheromonrezeptorsystem codiert, eine wichtige Rolle in der Zell-Zell-Erkennung und der Fusion kompatibler Sporidien (Bölker *et al.*, 1992). Der multiallele *b*-Locus, welcher



über 19 Allele mit unterschiedlichem N-Terminus verfügt, codiert für einen Homeodomänen-Transkriptionsfaktor (Schulz *et al.*, 1990; Gillissen *et al.*, 1992; Kämper *et al.*, 2020) und hat Einfluss auf die pathogene Entwicklung. Eine vom *b*-Locus ausgelöste Kaskade führt dabei zu filamentösem Wachstum, der Penetration der Pflanze und damit zur Sporenbildung (zusammengefasst in Bölker, 2001). Die Erhaltung der Diversität wird gewährleistet, da lediglich im *a*- und *b*-Locus kompatible Sporidien fusionieren und den Lebenszyklus komplettieren können.

### 1.3.1. *a*-Locus

Der *a*-Locus, welcher die Perzeption und Fusion von Sporidien kontrolliert, codiert für das Lipopeptidpheromon Mfa (*mating factor a*) und den Rezeptor Pra (*pheromone receptor a*) (Abbildung 3) (Bölker *et al.*, 1992). Zusätzlich codiert der *a2*-Locus die Proteine Lga2 und Rga2 (Bölker *et al.*, 1992; Urban *et al.*, 1996b), welche nach der Fusion der Sporidien induziert werden und die uniparentale Vererbung mitochondrieller DNA durch Fusions- und Spaltungsprozesse der Mitochondrien im Dikaryon sicherstellen (Bortfeld *et al.*, 2004; Fedler *et al.*, 2009; Mahler *et al.*, 2009). Aus dem 40 bzw. 38 Aminosäuren umfassenden Vorläufermolekül von Mfa1 bzw. Mfa2 entsteht nach posttranslationaler Modifikation am C-Terminus durch Farnesylierung und Methylierung das 13 bzw. 9 Aminosäuren umfassende Pheromon Mfa1 bzw. Mfa2 (Spellig *et al.*, 1994a). Der Sieben-Transmembranrezeptor Pra1 bzw. Pra2 besteht aus 357 bzw. 346 Aminosäuren, besitzt starke Homologien zu anderen pilzlichen Pheromonrezeptoren und kann daher der Familie der Ste3p-ähnlichen Rezeptoren aus *Saccharomyces cerevisiae* zugeordnet werden (Bölker *et al.*, 1992).

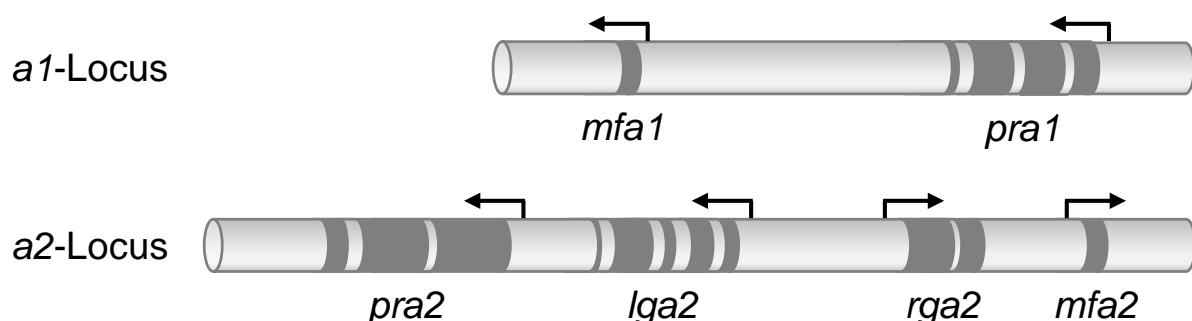
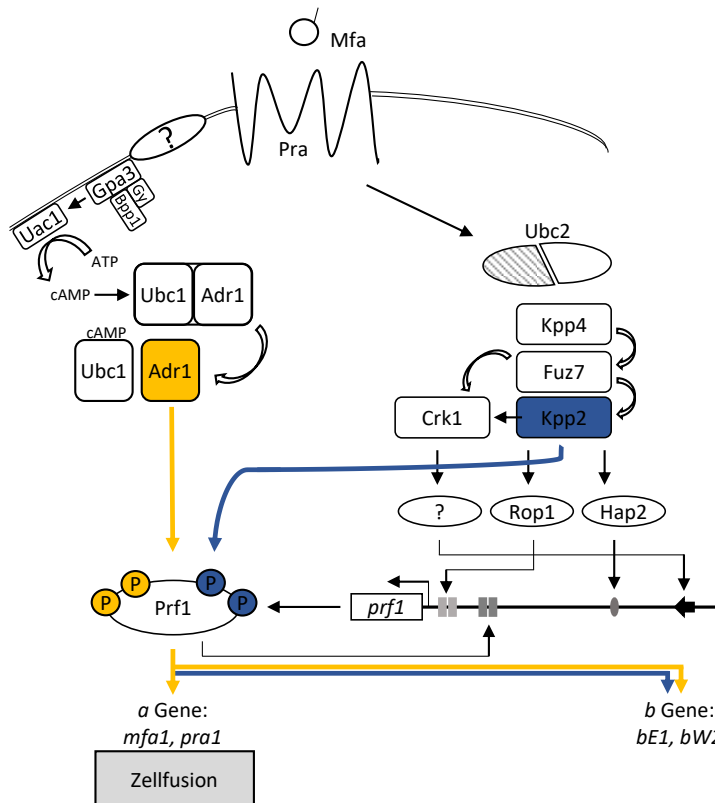


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Gene des biallelen *a*-Locus von *U. maydis*

Der *a1*-Locus codiert für das Lipopeptidpheromon Mfa1 (*mating factor a*) und den Sieben-Transmembranrezeptor Pra1 (*pheromone receptor a*) wohingegen der *a2*-Locus für das Lipopeptidpheromon Mfa2, den Sieben-Transmembranrezeptor Pra2 und zusätzlich die Proteine Lga2 und Rga2, welche die uniparentale Vererbung der mitochondrialen DNA sicherstellen, codiert (modifiziert nach Urban *et al.*, 1996a).

## Einleitung

Kompatible Sporidien in räumlicher Nähe können sich gegenseitig perzipieren, bilden daraufhin Konjugationshyphen aus, wachsen aufeinander zu und fusionieren (Spellig *et al.*, 1994a; Snetselaar *et al.*, 1996). Zusätzlich wird der Zellzyklus in der G<sub>2</sub>-Phase arretiert, um die synchrone Entwicklung des Dikaryons sicherzustellen (Garcia-Muse *et al.*, 2003). Die Bindung kompatibler Pheromone an Rezeptoren führt zur Signaltransduktion über die cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA) (Hartmann *et al.*, 1999) und die pheromonabhängige mitogenaktivierte Proteinkaskade (MAPK-Kaskade) (Abbildung 4) (Müller *et al.*, 2003), wodurch der HMG-Transkriptionsfaktor Prf1 (*pheromone response factor 1*) durch differentielle Phosphorylierung aktiviert wird. Die Phosphorylierung von Prf1 über die Proteinkinase A ist dabei ausreichend, um die Gene des *a*-Locus zu induzieren. Für die Induktion der Gene des *b*-Locus ist zusätzlich die Phosphorylierung der MAPK Kpp2, welche neben Kpp4 und Fuz7 ein Teil der MAPK-Kaskade ist, nötig (Kaffarnik *et al.*, 2003). Die Expression des zentralen Regulators Prf1 (Hartmann *et al.*, 1999) ist neben Prf1 selbst abhängig von Rop1, Hap2 und einem unbekanntem Faktor, welche alle drei von Kpp2 und Crk1 reguliert werden (zusammengefasst in Brefort *et al.*, 2009). Abhängig vom Phosphorylierungsstatus von Prf1 bindet dieser die Zielgene *mfa*, *pra*, *prf1* und die *b*-Locusgene über *pheromone response elements* (PRE) (Hartmann *et al.*, 1996; Kaffarnik *et al.*, 2003; Zarnack *et al.*, 2008). Durch die transkriptionelle Regulation von *prf1* im eigenen Promotor entsteht eine positive Rückkopplung, wodurch die Pheromonantwort und vermutlich das polare Wachstum der Hyphen entlang des Pheromongradienten amplifiziert wird (Snetselaar *et al.*, 1996; Urban *et al.*, 1996b). Mit der Expression der *b*-Gene wird die autokrine Stimulation und damit die Expression von *mfa* und *pra* reprimiert, wodurch auch das polare Wachstum zum Erliegen kommt (Urban *et al.*, 1996b; Hartmann, 1997). Trotz fehlender PRE sind die *b*-Gene und *rbf1* (*regulator of b-filament 1*), welche die pathogene Entwicklung steuern, weitere (indirekte) Zielgene von Prf1 (Hartmann *et al.*, 1996; Zarnack *et al.*, 2008; Heimel *et al.*, 2010).



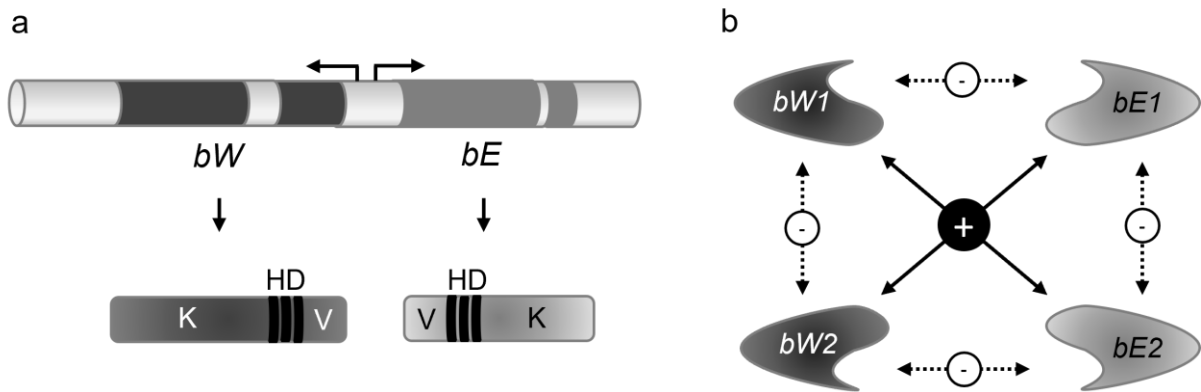
**Abbildung 4: Schematische Darstellung der a-vermittelten Pheromonkaskade**

Nach der Aktivierung des Pheromonrezeptorsystems über Mfa und Pra wird die MAPK-Kaskade, mit Ubc2, Kpp4, Fuz7 und Kpp2, induziert, welche wiederum den zentralen Transkriptionsfaktor Prf1 phosphoryliert. Die durch Kpp2 regulierten Proteine Rop1 und Hap2 binden gemeinsam mit einem unbekanntem Protein, welches durch Crk1 aktiviert wird, und Prf1 selbst an den Promotor von Prf1 und führen somit zur Expression von Prf1. Aktiviert durch Phosphorylierung beeinflusst Prf1 die Zellfusion und die b-Regulationskaskade. Für die Induktion der a-Gene ist die Phosphorylierung über die Proteinkinase A ADR1 (gelb) ausreichend, wohingegen für die Induktion der b-Gene zusätzlich die Phosphorylierung durch die MAPK Kpp2 notwendig ist (blau). Die inhibitorische und katalytische Untereinheit der Proteinkinase erreichen die äußeren Signale über ein heterotrimeres G-Protein und die Adenylatcyclase Uac1 (modifiziert nach Fortenbacher, 2019; Jurca, 2021).

### 1.3.2. b-Locus

Der multiallele b-Locus mit mindestens 19 verschiedenen Allelen spielt eine wichtige Rolle im Wechsel von saprophytischer zu biotropher Phase (Bölker *et al.*, 1995; Kämper *et al.*, 1995; Wahl *et al.*, 2010). Er codiert dabei für die Proteine bEast (bE) und bWest (bW), deren Gene durch einen 200 bp großen intergenischen Promotorbereich getrennt und daraus divergent transkribiert werden (Abbildung 5). bE (473 Aminosäuren) und bW (644 Aminosäuren) verfügen über einen zu 90 % übereinstimmenden, konservierten C-Terminus und einen variablen, aber strukturell gleichenden N-Terminus, welcher die Interaktion beider Proteine und damit die Bildung eines Heterodimers erlaubt (Kronstad and Leong, 1990; Schulz *et al.*, 1990; Kämper *et al.*, 2006). Um die Diversität zu erhalten, kann ein solches Heterodimer jedoch nur aus sich im variablen N-Terminus unterscheidenden bE/bW-Proteinen gebildet werden, weshalb die Stämme verschiedene Allele benötigen (Kämper *et al.*, 1995). Ebenfalls besitzen beide Proteine ein Homeodomänenmotiv, welches zur Bindung an DNA befähigt (Gillissen *et al.*, 1992; Bölker *et al.*, 1995), und dadurch die Funktion des Heterodimers als Transkriptionsfaktor ermöglicht.

## Einleitung

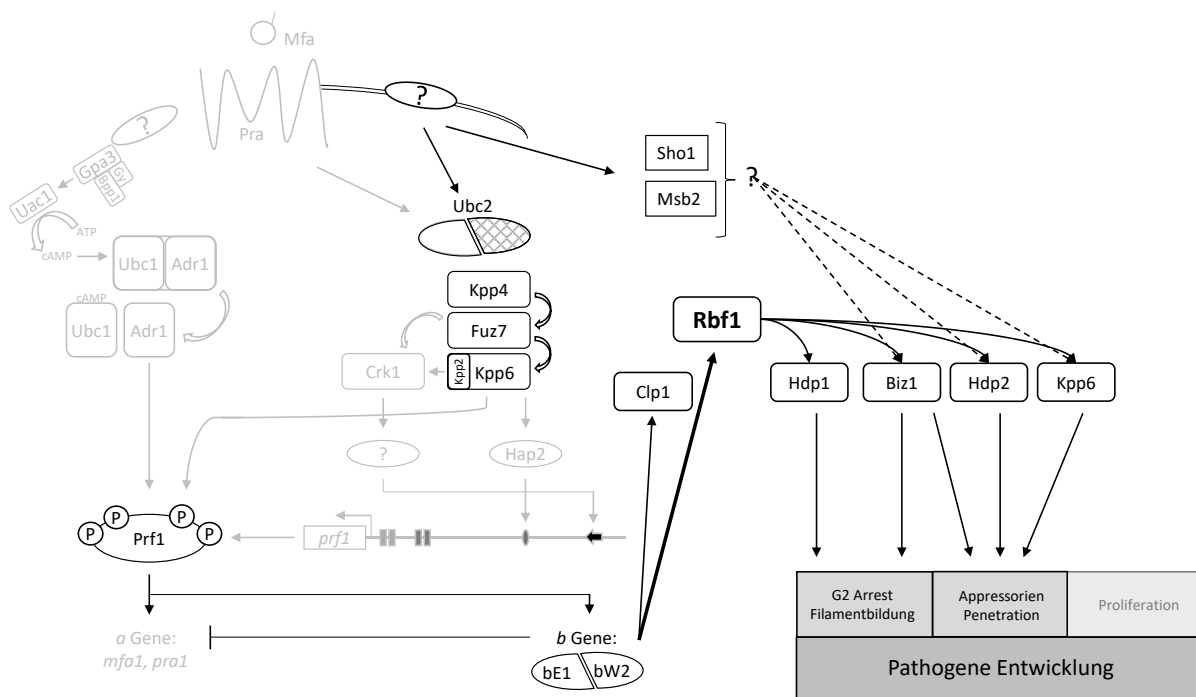


**Abbildung 5: Schematische Darstellung des multiallelen *b*-Locus von *U. maydis* und dessen Produkte**

(a) Genomische Struktur des *b*-Locus mit den divergent, von einer Promotorregion transkribierten *bW* und *bE* Genen. Zwischen dem variablen (V) und konstanten (K) Bereich befindet sich die Homeodomäne (HD). (b) Bei kompatiblen Homeodomänenproteinen findet eine Dimerisierung zu einem funktionellen Transkriptionsfaktor statt. (nach Brachmann *et al.*, 2001)

In seiner Rolle als Transkriptionsfaktor reguliert das *bE/bW*-Heterodimer direkt, aber auch indirekt andere Gene (Romeis *et al.*, 2000; Brachmann *et al.*, 2001; Heimel *et al.*, 2010) und ist damit notwendig, aber auch ausreichend für die sexuelle Entwicklung, den Wechsel zur pathogenen Phase und den Zellzyklusarrest in der  $G_2$ -Phase (Bölker *et al.*, 1995; Brachmann *et al.*, 2001; Heimel *et al.*, 2010). Die Regulationskaskade ausgelöst durch das *bE/bW*-Heterodimer etabliert ein stabiles Dikaryon, führt zu filamentösem Wachstum auf der Pflanzenoberfläche, welches sich durch verstärktes Spitzenwachstum und leere Zellkompartimente aufgrund von Septierung auszeichnet, und Proliferation in der Pflanze. Die Proteine, welche Teil der *b*-Regulationskaskade sind, können dabei in Klasse I-Gene und Klasse II-Gene unterschieden werden (Abbildung 6). Klasse I-Gene werden direkt vom *bE/bW*-Heterodimer reguliert, verfügen daher über eine *b*-Bindestelle (*bbs*, *b-binding site*) im Promotorbereich und wirken als Transkriptionsfaktoren bei der Regulation der Klasse II-Gene. Entdeckt wurde die *bbs* im *a*-Locusgen *Iga2* (Romeis *et al.*, 2000). Zu den Klasse I-Genen gehören *clp1* (*clampless 1*), *frb52*, *dik6* und *rbf1* (Brachmann *et al.*, 2001; Weinzierl, 2001; Heimel *et al.*, 2010). Bei *Frb52* handelt es sich um eine putative DNA-Polymerase X (Brachmann *et al.*, 2001), wohingegen *Dik6* ein Sieben-Transmembranprotein mit unbekannter Funktion ist (Weinzierl, 2001). Der C2H2-Zinkfinger-Transkriptionsfaktor *Rbf1* reguliert 90 % der Klasse II-Gene und *Clp1*, welches eine wichtige Rolle in der Bildung von Schnallenzellen und in der Proliferation in der Wirtspflanze spielt (Scherer *et al.*, 2006) und hohe Sequenzähnlichkeiten zu *Clp1* in *Coprinopsis cinerea* besitzt (Kamada, 2002). Nach Deletion von *clp1* ist zwar die Penetration der Pflanzenzelle noch möglich, die Bildung von Schnallenzellen,

welche die richtige Verteilung der Zellkerne während der Zellteilung sichert, bleibt jedoch aus (Scherer *et al.*, 2006). *U. maydis* bildet während der Kernteilung am apikalen Ende der dikaryotischen Hyphe seitlich an der Position, an der das Septum entstehen soll, eine Schnallenzelle. In diese Schnallenzelle migrieren zwei identische Kerne des Heterokaryons. Ein Y-förmiges Septum verschließt die Schnallenzelle, die beiden in der Hyphe verbleibenden Kerne werden in die apikale und subapikale Zelle der Hyphe aufgeteilt. Im Gegensatz zu anderen Organismen findet keine Fusion der Schnallenzelle mit der subapikalen Hyphenzelle statt (Snetselaar and Mims, 1994; Banuett and Herskowitz, 1996). Im letzten Schritt migriert je ein Kern aus der Schnallenzelle durch das Septum in die subapikale bzw. apikale Hyphenzelle, sodass in beiden Zellen jeweils beide Kerne des Dikaryons vorhanden sind (Scherer *et al.*, 2006).



**Abbildung 6: Schematische Darstellung der b-Regulationskaskade**

Durch den Transkriptionsfaktor Prf1 wird das bE/bW-Heterodimer induziert, welches wiederum Clp1 und Rbf1 induziert und die vorangegangenen a-Gene reprimeriert. Die Induktion von Hdp1, Biz1, Hdp2 und Kpp6 durch den Transkriptionsfaktor Rbf1 führen zum Zellzyklusarrest in der G<sub>2</sub>-Phase, zu Filamentbildung, zu Appressorien, Penetration und zu Proliferation. Biz1, Hdp2 und Kpp6 werden auch unabhängig von Rbf1 über Sho1 und Msb2, die als Relay äußerer Pflanzensignale dienen, beeinflusst. Stabiles Clp1 tritt erst nach der Penetration der Pflanze auf und spielt eine Rolle in der Reinitiation des Zellzyklus (modifiziert nach Ulrich, 2020; Jurca, 2021).

Eine Microarrayanalyse hat ergeben, dass der b-Locus insgesamt 345 Gene reguliert, wobei neben *clp1* und *rbf1* lediglich *hdp1* (homeodomain protein 1), *hdp2* (homeodomain protein 2) und *biz1* (b-induziertes Zinkfingerprotein 1), drei weitere Gene der Klasse II Einfluss auf die Infektion der Wirtspflanze und die Pathogenität von

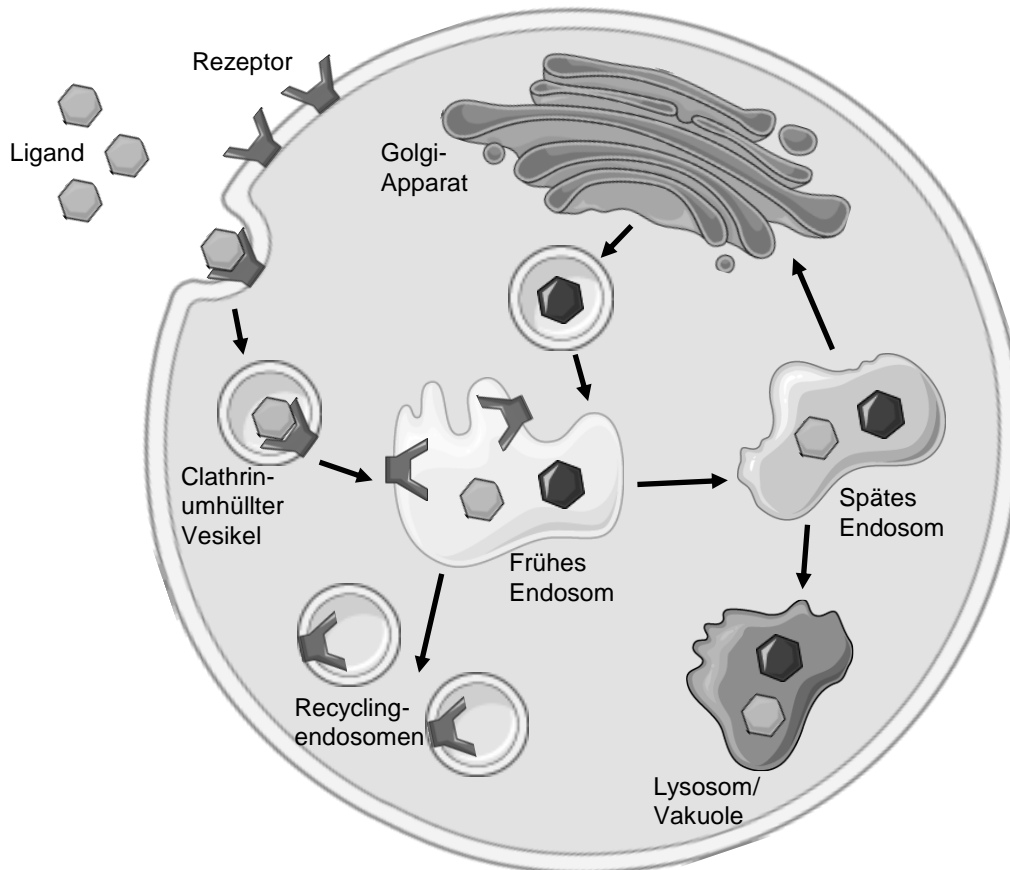
## Einleitung

*U. maydis* haben (Heimel *et al.*, 2010). Der Zinkfinger-Transkriptionsfaktor Biz1 spielt eine wichtige Rolle in der Penetration der Wirtspflanze und bei der Ausbildung von Appressorien (Flor-Parra *et al.*, 2006). *biz1* kann auch von Sho1 (*synthetic high osmolarity sensitive 1*) und Msb2 (*multicopy suppressor of a budding defect 2*), welche in die Perzeption der hydrophoben Pflanzenoberfläche involviert sind, mitgesteuert werden (Lanver *et al.*, 2014). Dasselbe gilt auch für *hdp1*, dessen Protein ebenfalls Einfluss auf die Appressorienbildung hat (Pothiratana, 2008; Lanver *et al.*, 2014). Auch Hdp2 beeinflusst die Appressorienbildung, weshalb Hdp1, Hdp2 und Biz1 durch ihre Rolle in der Regulation der biotrophen Interaktion essenziell für die pathogene Entwicklung von *U. maydis* sind (Scherer *et al.*, 2006). Das Klasse II-Gen *kpp6*, dessen Expression sowohl von Rbf1 als auch von Sho1 und Msb2 beeinflusst wird, sorgt durch die positive Rückkopplung auf die MAPK-Kaskade für eine effektive Penetration der Pflanzenoberfläche und ist dafür essenziell (Brachmann *et al.*, 2003; Lanver *et al.*, 2014). Die Kontrolle der *b*-Regulationskaskade ist aufgrund der hohen Relevanz der Pflanzenpenetration und der pathogenen Entwicklung essenziell für das Überleben von *U. maydis*.

## 1.4. Vesikuläre Transportprozesse

Der Transport zellulärer Bestandteile zwischen Zellmembran und Zellinnerem z.B. den Organellen ist in filamentösen Pilzen essenziell für das apikale Wachstum (Penalva, 2010). Membranfragmente und Protein werden hierfür kontinuierlich mittels Endosomen zum Spitzenkörper transportiert (Grove and Bracker, 1970; Crampin *et al.*, 2005). Dabei bestimmt die Position des Spitzenkörpers als Zellendmarker den Ort des apikalen Wachstums (Riquelme *et al.*, 2018). Die Komponenten der Transportmaschinerie sind dabei in filamentösen Pilzen wie *Ustilago maydis* bzw. *Neurospora crassa* und nichtfilamentösen Pilzen wie *Saccharomyces cerevisiae* konserviert (Read and Kalkman, 2003; Fuchs and Steinberg, 2005). Die Homöostase der Zelle wird über Endozytose, der kontinuierlichen und gleichzeitig gesteuerten Bildung von Membranvesikeln an der Plasmamembran, sichergestellt. Der in Eukaryoten hochkonservierte Prozess der Endozytose (Geli and Riezman, 1998) spielt eine wichtige Rolle in der Rückgewinnung von Protein- und Lipidkomponenten, die während der Sekretion in die Plasmamembran eingebaut wurden (Helenius *et al.*, 1983). Zusätzlich werden über Endosomen auch Membranbestandteile und zellwandmodifizierende Enzyme transportiert, Zellendmarker und Rezeptoren recycelt

sowie RNA transportiert (Becht *et al.*, 2006; Penalva *et al.*, 2012; Riquelme *et al.*, 2018). Durch die Endozytose werden außerdem metabolische und proliferative Signale weitergeleitet, essenzielle Nährstoffe aufgenommen, Mikroorganismen abgewehrt und reguliert mit der Umwelt interagiert.



**Abbildung 7: Komponenten der Endozytose**

Die Interaktion zwischen Liganden und Rezeptoren führt zu Bildung von clathrinumhüllten Vesikeln an der Plasmamembran. Die Vesikel transportieren den Ligandenrezeptorkomplex zum frühen Endosom, in dem er aufgrund des niedrigen pH-Werts aufgespalten wird. Die frei gewordenen Rezeptoren knospen in Vesikeln vom frühen Endosom ab und werden zu Recyclingendosomen und von dort zurück zur Plasmamembran transportiert. Liganden und Makromoleküle verbleiben aufgrund der Größe in den frühen Endosomen, welche zu späten Endosomen und letztendlich zu Lysosomen reifen. In späten Endosomen und Lysosomen sinkt der pH-Wert weiter, wodurch die Moleküle weiter degradiert werden. (nach Mellman, 1996)

Der Ablauf der Endozytose in tierischen Zellen ist in Abbildung 7 dargestellt. Die Interaktion von Rezeptor und Ligand führt dabei zunächst dazu, dass durch eine Ansammlung von Hüllproteinen an der inneren Schicht der Plasmamembran und der Rekrutierung zusätzlicher Hüllproteine aus dem Zytosol die Endozytose initiiert wird (Kalthoff *et al.*, 2002). Im Folgenden kommt es zu einer aktinvermittelten Membrankrümmung, wodurch die Einstülpung der Membran aufgrund der Polymerisation von Aktinfilamenten und der Nukleation neuer Filamente induziert wird (Picco *et al.*, 2018). Die Abschnürung der Vesikel findet infolge der Kontraktion der

## Einleitung

Membran aufgrund mit dem Vesikel assoziierter Proteine wie Dynamin statt (Danino *et al.*, 2004; Ferguson *et al.*, 2009; Shi *et al.*, 2019). Alternativ wird vermutet, dass die Abschnürung des Vesikels durch eine Lipidphasentrennung, welche durch einen Filter angelagerter Proteine entsteht, hervorgerufen wird (Liu *et al.*, 2006). Die entstandenen clathrinumhüllten Vesikel, deren Membrankomponenten über den Zielort innerhalb der Zelle entscheiden (Mellman, 1996), werden zu den frühen Endosomen transportiert, in welchen durch eine ATP-getriebene Protonenpumpe ein saurer pH von 6.3 – 6.8 herrscht, und daher zur Dissoziation der Rezeptorligandenkomplexe führt (Yamashiro *et al.*, 1984; Al-Awqati, 1986; Mellman *et al.*, 1986; Kornfeld and Mellman, 1989; Forgac, 1992). Die dadurch frei gewordenen Rezeptoren akkumulieren in schlauchförmigen Fortsätzen der frühen Endosomen, knospen ab, werden zu Recyclingendosomen und letztendlich zur Plasmamembran transportiert. Aufgrund des Größenunterschieds verbleiben lösliche Liganden und Makromoleküle in den frühen Endosomen (Geuze *et al.*, 1983; Mellman, 1996). Diese binden über Hookproteine an Dynein für den retrograden Transport bzw. an Kinesin-3 für den anterograden Transport entlang der Mikrotubuli durch die Zelle (Wedlich-Söldner *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2010; Bielska *et al.*, 2014). Der bidirektionale Transport früher Endosomen entlang der Mikrotubuli sorgt für den Transport zur pilzlichen Vakuole, die Verteilung der RNA, die schnelle Proteintranslation während des Transports zum Zielort und für die Verteilung der Translationsmaschinerie (Steinberg, 2014). Zudem werden das Wachstum und die Zellteilung gefördert. Verantwortlich für die Verteilung und Fusion der frühen Endosomen in *U. maydis* ist dabei der CORVET-Komplex, welcher aus den Komponenten Vps3, Vps8, Vps11, Vps16, Vps18 und Vps33 besteht. Über die Interaktion von Vps3 mit Nma1 wird außerdem die Fusionsrate der frühen Endosomen reguliert (Schneider *et al.*, 2022). Als Marker für die frühen Endosomen dient die Rab-GTPase (*Ras-like proteins from rat brain*) Rab5 (Touchot *et al.*, 1987), welche in *U. maydis* gemeinsam mit den frühen Endosomen bidirektional entlang der Mikrotubuli transportiert wird (Abbildung 8A). *U. maydis* verfügt mit Rab5a, Rab5b und Rab5c über drei Rab5-Isoformen. Rab5a, welches über Nma1 an die Spindelpolkkörper lokalisiert, ist während der mitotischen Zellteilung für die Spindelstabilität, die zellzyklusabhängige Koordination der Ausbildung der astralen Mikrotubuli und die auf die Mitose folgende Zytokinese relevant (Schneider, 2021). Sowohl Rab5a als auch Rab5b lokalisieren zudem während der Zytokinese an der Zytoplasmabrücke, weshalb eine Funktion beim Transport von Septinen und Proteinen vermutet wird, welche



relevant für die Abschnürung Mutter- und Tochterzelle sind (Schneider, 2021). Für Rab5b wird außerdem eine Rolle in der Chromosomensegregation während der Meiose für möglich gehalten (Schneider, 2021). Rab5c lokalisiert in *U. maydis* cytoplasmatisch und seine Funktion ist bisher noch unbekannt. Neben der Rab-Familie, zu denen die Rab-GTPasen gehören, zählen auch die Arf/Sar-, die Rho- und die Ral-Familie zur Ras-Superfamilie der kleinen GTPasen (Wennerberg *et al.*, 2005; Mizuno-Yamasaki *et al.*, 2012). Die Rab-GTPasen verfügen über eine GTP-Binde- und Hydrolysedomäne und eine C-terminale Domäne, die Einfluss auf die Lokalisierung an speziellen Membranen hat (Chavrier *et al.*, 1991; Itzen and Goody, 2011). Zudem können sie ein spezifisches Set an Effektoren binden (Mizuno-Yamasaki *et al.*, 2012), zu denen Motoren für den Transport entlang des Cytoskeletts, Proteine für die Erkennung des Zielkompartiments und die Regulatoren für die Assemblierung der SNARE-Komplexe gehören (Grosshans *et al.*, 2006), und dadurch die Transportmaschinerie beeinflussen. Die Initiation der Aktivierung der Rab-GTPase Rab7, welche der Marker für späte Endosomen ist, führt zur Reifung von frühen zu späten Endosomen und gleichzeitig zur Transformation der Endosomenmembran. Dabei gibt es verschiedene Theorien über die Rekrutierung bzw. Aktivierung von Rab7 (Seals *et al.*, 2000; Wurmser *et al.*, 2000; Poteryaev *et al.*, 2010). Rab7 lokalisiert in den späten Endosomen, welche auch als prälysosomales Kompartiment bezeichnet werden können, ringförmig um die Vakuole und auf kleinen beweglichen Strukturen (Abbildung 8B). Bei der Reifung der Endosomen verbleiben die löslichen Moleküle im Endosomenlumen, weshalb der Transport der Moleküle sehr effizient ist (Maxfield and McGraw, 2004). Aufgrund des in späten Endosomen weiter sinkenden pH-Werts kommt es zu weiteren Degradierungsprozessen und in tierischen Zellen zusätzlich auch zur Prozessierung von Antigenen (Berg *et al.*, 1995; Luzio *et al.*, 2007). Letztendlich werden die späten Endosomen in tierischen Zellen zu Lysosomen, in denen durch weiteres Absinken des pH-Werts und lytische Enzyme die Moleküle weiter degradiert werden (Mellman, 1996).



Abbildung 8: Lokalisierung von Rab5a und Rab7 in *U. maydis*

(a) Lokalisation von Rab5a, welches sich bidirektional entlang der Mikrotubuli durch den Organismus bewegt. (b) Lokalisation von Rab7, welches die Vakuolen ringförmig umgibt und auf kleinen, beweglichen Strukturen (Pfeil) lokalisiert (Bielska *et al.*, 2014).

## 1.5. STRIPAK-Komplex

Der *striatin-interacting protein phosphatase and kinase complex* (STRIPAK-Komplex) ist in Eukaryoten hochkonserviert und wurde auf der Suche nach Interaktionspartnern der katalytischen Untereinheit der Proteinphosphatase 2A durch Massenspektrometrie in Säugern entdeckt (Goudreault *et al.*, 2009). Er ist an der Regulation diverser Prozesse beteiligt (Xiang *et al.*, 2002; Pöggeler and Kück, 2004; Shim *et al.*, 2006; Goudreault *et al.*, 2009; Maerz *et al.*, 2009; Bloemendal *et al.*, 2010; Engh *et al.*, 2010; Simonin *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2010; Bernhards and Pöggeler, 2011; Bloemendal *et al.*, 2012; Santarpia *et al.*, 2012; Dettmann *et al.*, 2013; Nordzieke *et al.*, 2015; Beier *et al.*, 2016; Green *et al.*, 2016; Kück *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2016) und beeinflusst in Säugern die Organisation des Zytoskeletts, die Zellmigration und die Zellmorphologie (Goudreault *et al.*, 2009). In pilzlichen Zellen hingegen reguliert der Komplex die sexuelle Entwicklung, das Wachstum und die Zellfusion (Simonin *et al.*, 2010; Dettmann *et al.*, 2013; Kück *et al.*, 2016). Aufgrund der enthaltenen Far-Proteine (*factor arrest*) wird das Analogon zum STRIPAK-Komplex in *Saccharomyces cerevisiae* Far-Komplex genannt. Zu den typischen Komponenten gehören neben der Phosphatase mit der strukturgebenden, der katalytischen und der regulatorischen Untereinheit, Kinasen, Ankerproteine und Entwicklungsproteine (zusammengefasst in Reschka *et al.*, 2018). Bei der regulatorischen Untereinheit der Phosphatase handelt es sich um ein Homolog des für den Komplex namensgebenden Striatins (STRN1), welches zunächst als synaptosomales Protein im Hirn von Ratten entdeckt wurde (Castets *et al.*, 1996; Goudreault *et al.*, 2009), jedoch auch in anderen Geweben wie der Leber und dem Herzmuskel gefunden wurde. Das 780 Aminosäuren umfassende Protein STRN1 verfügt dabei über eine Calveolinbindedomäne, eine Ca<sup>2+</sup>-Calmodulinbindedomäne, eine *coiled-coil* Struktur und mehrere WD40 Wiederholungen. Menschen besitzen zudem die Striatinparalogue STRN3 und STRN4, was die Rolle des STRIPAK-Komplexes in verschiedenen zellulären Prozessen reflektiert. Die Varianz der Kinasen des STRIPAK-Komplexes, welche zur GCK-Familie (*germinal center kinases*) gehören (Kyriakis, 1999), spiegelt die Rolle des Komplexes in der eukaryotischen Entwicklung wieder. In Säugern sind dabei acht verschiedene Subfamilien, mit jeweils zwei bis vier Mitgliedern, der GCK-Familie bekannt. Die Kinasen übertragen extrazelluläre Signale auf MAPK oder agieren als *signaling hubs* in konservierten Komplexen (Delpire, 2009) und sind dadurch bekannt für ihren Einfluss auf die Organisation des Cytoskeletts, den Zellzyklus und die

Apoptose. In einigen Organismen zählen auch Aktivatoren für die Kinase und Proteine für die neuronale Migration zu den Komponenten des STRIPAK-Komplexes. Auch kleine *coiled-coil* (CC) Proteine unbekannter Funktion mit einer bis vier *coiled-coil* Regionen sind in manchen STRIPAK-Komplexen zu finden. Das in tierischen Systemen entdeckte CCM3 (*cerebral cavernous malformations 3*) ist die einzige nicht konservierte Komponente und besitzt auch keine bekannte funktionelle Domäne. Dennoch konnte gezeigt werden, dass CCM3 die Kinasen an den STRIPAK-Komplex bindet und gemeinsam mit dem Striatin als Adaptermolekül fungiert, das die katalytische Aktivität von Phosphatase und Kinase überbrückt (Kean *et al.*, 2011). Die Analyse der Kristallstruktur des menschlichen STRIPAK-Komplexes zeigt eine Homodimerisierung des Striatins, stabile Kernkomplexe der *coiled-coil* Regionen des Striatins mit der strukturgebenden Untereinheit und die Interaktion der Kinase mit dem Komplex über den Adapter CCM3 (Chen *et al.*, 2014). Auch im Ascomycet *Aspergillus nidulans* konnte der strukturelle Aufbau des STRIPAK-Komplexes, welcher aus drei Subkomplexen zusammengesetzt ist, gezeigt werden (Elramli *et al.*, 2019). Der erste Subkomplex beinhaltet den Kinaseaktivator SipA (*striatin interacting protein A*) und die regulatorische Untereinheit StrA (*striatin A*). Der zweite Subkomplex umfasst das kleine *coiled-coil* Protein SipB (*striatin interacting protein B*) und das Ankerprotein SipD (*striatin interacting protein D*). Der dritte Subkomplex setzt sich aus dem Entwicklungsprotein SipC (*striatin interacting protein C*), der strukturgebenden Untereinheit SipF (*striatin interacting protein F*) und der katalytischen Untereinheit SipE (*striatin interacting protein E*) der Phosphatase zusammen. Alle Modelle zum strukturellen Aufbau des STRIPAK-Komplexes haben gemeinsam, dass sie die regulatorische Untereinheit als zentrale Komponente des Komplexes sehen, welche alle anderen Komponenten des Komplexes bindet.

## Einleitung

Tabelle 1: Komponenten der STRIPAK-Komplexe in Eukaryoten (modifiziert nach Reschka *et al.*, 2018)

Komponente	<i>Homo sapiens</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Neurospora crassa</i>	<i>Sordaria macrospora</i>	<i>Ustilago maydis</i>
<b>Strukturgebende Untereinheit</b>	PP2AA	Tpd3	PP2AA	SmPP2AA	UMAG_02960
<b>Katalytische Untereinheit</b>	PP2Ac	Ppg1	PP2Ac	SmPP2Ac1	UMAG_11525
<b>Regulatorische Untereinheit</b>	Striatin/ SG2NA/ Zinedin	Far8	HAM-3	PRO11	Far8 (UMAG_03784)
<b>Entwicklungsprotein</b>	STRIP1/2	Far11	HAM-2	PRO22	Far11 (UMAG_10285)
<b>Ankerprotein</b>	SLMAP/ TRAF3IP3/ CTTNBP2	Far9/10	HAM-4	PRO45	Far10 (UMAG_04391)
<b>Kinasen</b>	MST4, STK24/ STK25	Kic1, Sps1	STK-3/ STK-24	SmKIN3/ SmKIN24	UMAG_10496, UMAG_05543
<b>Kleine <i>coiled-coil</i> Proteine</b>	SIKE/FGFR1OP2	Far3/7	NCU04324 <sup>a</sup>	SCI1 <sup>b</sup>	-
<b>Kinaseaktivator</b>	MOB3 (Phocein)	-	MOB-3	SmMOB3	UMAG_00493
<b>Neuronale Migration</b>	CCM3	-	-	-	-

Eine Lokalisierung des STRIPAK-Komplexes an der Kernhülle konnte in Säugern, Insekten, Würmern und Pilzen gezeigt werden (zusammengefasst in Hwang and Pallas, 2014). Verantwortlich für diese Lokalisation sind dabei die regulatorische Untereinheit und das Entwicklungsprotein (Dettmann *et al.*, 2013; Nordzieke *et al.*, 2015; Elramli *et al.*, 2019). An der Kernhülle erfüllt der STRIPAK-Komplex eine seiner Funktionen in der Kontrolle der zellulären Verteilung der MAPK. Für einzelne Komponenten des Komplexes konnten auch andere Lokalisationen gezeigt werden. So finden sich die regulatorische Untereinheit und das Entwicklungsprotein auch am Golgi-Apparat und das Ankerprotein an Mitochondrien und am Endoplasmatischem Retikulum (ER) (Byers *et al.*, 2009; Frost *et al.*, 2012; Nordzieke *et al.*, 2015). Die Lokalisation an verschiedenen Organellen wird beim Ankerprotein durch unterschiedliche Domänen ermöglicht. Da Komponenten des STRIPAK-Komplexes mit verschiedenen Strukturen, wie beispielsweise Kernhülle, Golgi-Apparat und Zentrosom colokalisieren, wird vermutet, dass der STRIPAK-Komplex unter anderem eine Kommunikation zwischen Organellen während der Zellteilung ermöglicht (Frost *et al.*, 2012).

### 1.5.1. Der Far-Komplex in *Saccharomyces cerevisiae*

Bei potenzieller Paarung werden bei *S. cerevisiae* spezielle Paarungsgene induziert, welche die Zellpolarität reorganisieren und den Zellzyklus inhibieren, um die potenziellen Paarungspartner in der G<sub>1</sub>-Phase zu synchronisieren (Mendenhall and Hodge, 1998; Chant, 1999; Elion, 2000). Die Bindung von a bzw.  $\alpha$  an den passenden G-Protein-gekoppelten Serpentinrezeptor führt zur Paarung und dadurch zur Abspaltung der G $\beta\gamma$ -Untereinheit von der G $\alpha$ -Untereinheit (Whiteway *et al.*, 1989; Nomoto *et al.*, 1990). Infolgedessen wird eine MAPK-Kaskade induziert (Leberer *et al.*, 1992), welche wiederum den Transkriptionsfaktor Ste12 aktiviert (Abbildung 9), der die Expression paarungsspezifischer Gene steuert. Die MAPK-Kaskade reguliert zudem den Zellzyklusarrest (McCaffrey *et al.*, 1987; Elion *et al.*, 1993). Auch das polare Wachstum in Richtung des Paarungspartners wird induziert (Chant, 1999). In *S. cerevisiae* wird der Zellzyklus über die cyclinabhängige Kinase Cdc28 reguliert, deren Spezifität durch Cycline kontrolliert wird (Mendenhall and Hodge, 1998). Zu den Cyclinen, welche nur in der G<sub>1</sub>-Phase hochreguliert sind, gehören Cln1, Cln2 und Cln3 (Tyers *et al.*, 1993; Schneider *et al.*, 1998; Wigge and Kilmartin, 2001). Der pheromonabhängige Zellzyklusarrest tritt in Kraft, wenn Cdc28 inhibiert wird, die Transkription von *cln1* und *cln2* reprimiert wird und Cln1 und Cln2 abgebaut werden (Mendenhall *et al.*, 1987; Wittenberg *et al.*, 1990; Tyers *et al.*, 1993). Der Ablauf der Einflussnahme des Pheromons auf die Regulation des Zellzyklus ist noch unklar. Mit *far1* (*factor arrest 1*) und *far3* (*factor arrest 3*) wurden jedoch zwei Gene entdeckt deren Mutation zu einem Defekt im pheromonabhängigen Zellzyklusarrest führt, wohingegen die pheromonabhängige Signaltransduktion weiter intakt ist (Chang and Herskowitz, 1990). Es wurde gezeigt, dass es sich bei Far1 um einen pheromoninduzierten cyclinabhängigen Kinaseinhibitor für Cdc28 handelt (Peter and Herskowitz, 1994; Shimada *et al.*, 2000), welches Teil der Regulation des initialen G<sub>1</sub>-Zellzyklusarrests ist (Peter *et al.*, 1993; Valdivieso *et al.*, 1993) und eine Rolle in der Regulation von Zellpolarität, vegetativem und generativem Wachstum spielt (Nern and Arkowitz, 2000; O'shea and Herskowitz, 2000). Far3 hingegen besitzt keinen Einfluss auf das Cyclinlevel in der G<sub>1</sub>-Phase und ist kein Teil des Far1-abhängigen Signalweges (Horecka and Sprague, 1996), verfügt jedoch über eine CC-Domäne für die Protein-Protein-Interaktion mit Far7, Far8, Far9, Far10 und Far11. Die Proteine Far8, Far9, Far10 und Far11 besitzen ebenfalls eine CC-Domäne und die Interaktion der Far-Proteine konnte mittels Hefe-Zwei-Hybrid-Studien oder Co-Immunopräzipitation

## Einleitung

gezeigt werden (Abbildung 10) (Uetz *et al.*, 2000; Ito *et al.*, 2001; Kemp and Sprague, 2003). Die Deletion der *far*-Gene zeigte, dass eine gegenseitige Komplementation nicht möglich ist und die Far-Proteine somit in einem Komplex und nicht einem hierarchischen Signalweg miteinander interagieren müssen.

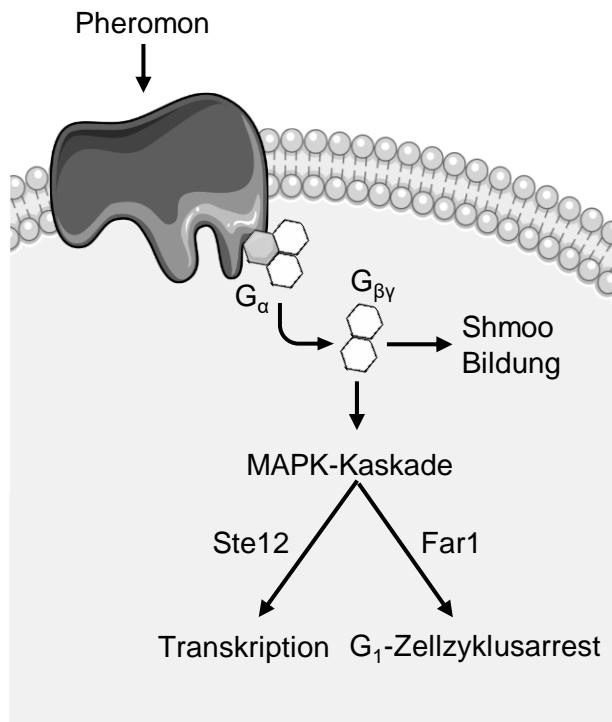
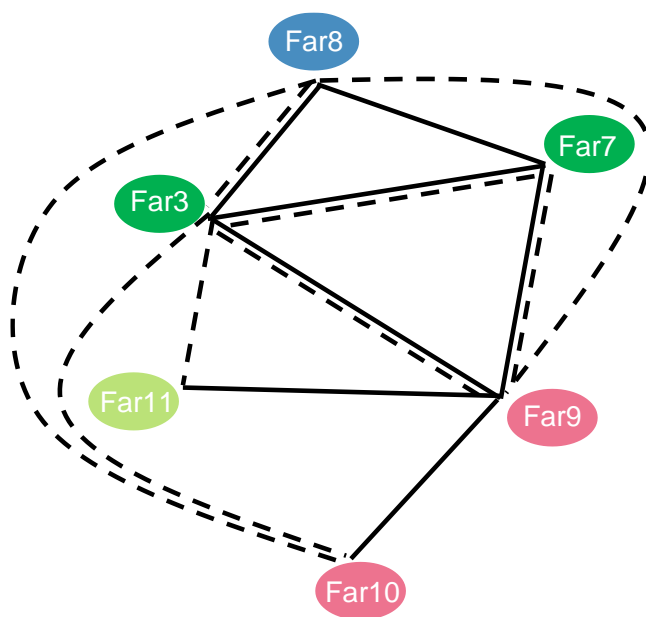


Abbildung 9: Pheromonabhängiger Signalweg in *S. cerevisiae*

Die Bindung des Pheromons an den G-Protein-gekoppelten Serpentinrezeptor resultiert in der Abspaltung der G $\beta\gamma$ -Untereinheit von der G $\alpha$ -Untereinheit. Die abgespaltene G $\beta\gamma$ -Untereinheit induziert eine MAPK-Kaskade, die durch Ste12 die Expression paarungsrelevanter Gene und durch Far1 den G $_1$ -Zellzyklusarrest reguliert. (modifiziert nach Kemp and Sprague, 2003)

Es wird vermutet, dass der sogenannte Far-Komplex neben Far3, Far7, Far8, Far9, Far10 und Far11 noch weitere Komponenten oder mehr als eine Kopie der Far-Proteine beinhaltet, da das Gewicht des Komplexes mit 900 kDa die einfache Summe der Masse der Far-Proteine mit 600 kDa übersteigt (Tabelle 1). Die Deletion einer beliebigen Komponente des Far-Komplexes führt zur verfrühten Rückkehr aus dem Zellzyklusarrest nach zehn Stunden (Kemp and Sprague, 2003). Dabei gleicht der Phänotyp der Einzeldelation dem Phänotyp der Sechsfachdelation. Das Striatin-Homolog Far8 verfügt im Gegensatz zum humanen Striatin nicht über C-terminale WD40 repeats (Kemp and Sprague, 2003; Frost *et al.*, 2012; Pracheil and Liu, 2013). Das Transmembranprotein Far11 enthält neben einer 700 Aminosäuren langen Region mit lediglich 15–27-prozentiger Übereinstimmung mit Proteinen anderer Organismen, zwei stark konservierte Regionen (Xiang *et al.*, 2002; Kemp and Sprague, 2003). Aufgrund der Rolle, die Far11 in anderen Organismen übernimmt (Xiang *et al.*, 2002), wird vermutet, dass es Einfluss auf die Zellfusion während der Paarung hat. Es konnte zudem ein Zusammenhang zwischen dem Far-Komplex und der Signalweitergabe mittels des TORC2-Komplexes gezeigt werden, da eine Mutation

von *far11* die Letalität von TORC2-Mutanten supprimiert und die Deletion von *far11* die Phosphorylierung zweier Substrate des TORC2-Komplexes komplementiert (Pracheil *et al.*, 2012). Aufgrund der Dephosphorylierung von TORC2-Substraten durch den Far-Komplex kann dieser als Gegenspieler des TORC2-Komplexes mit der Hauptkomponente Tor2 (*target of rapamycin 2*) gesehen werden. Die hochkonservierte Serin-Threonin-Proteinkinase Tor2 reguliert als Teil des TORC2-Komplexes zelluläre Prozesse wie das Zellwachstum und die zellzyklusabhängige Polymerisation des Aktinzytoskeletts (Cybulski and Hall, 2009; Pracheil and Liu, 2013; Bartlett and Kim, 2014).



**Abbildung 10: Schema der physikalischen Interaktionen im Far-Komplex von *S. cerevisiae***  
Die regulatorische Untereinheit Far8 interagiert mit dem Ankerprotein Far9/Far10 und den kleinen coiled-coil Proteinen Far3 und Far7. Far3 interagiert neben Far8 mit Far9/Far10 und dem Entwicklungsprotein Far11. Far7 interagiert ebenfalls mit Far8 und Far9/Far10. Far11 interagiert zudem mit Far9. Interaktionen wurden durch Hefe-Zwei-Hybrid-Studien (durchgängige Linien) (Uetz *et al.*, 2000; Ito *et al.*, 2001; Kemp and Sprague, 2003) oder Co-Immunopräzipitationen (gestrichelte Linien) (Gavin *et al.*, 2002; Ho *et al.*, 2002; Kemp and Sprague, 2003) nachgewiesen (modifiziert nach Kemp and Sprague, 2003).

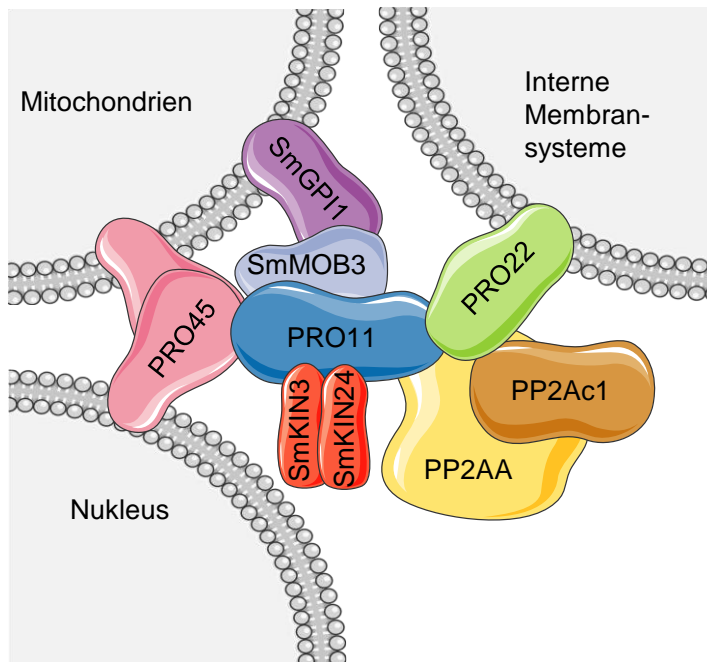
Far10, welches zu 41 % identisch mit Far9, jedoch funktionell nicht redundant ist, verfügt über eine FHA-Domäne (*fork head associated domain*) für die Phosphopeptidinteraktion. Sowohl Far9 als auch Far10 sind im Gegensatz zu den homologen Proteinen anderer Organismen für den Aufbau des Komplexes essenziell, was auf eine andersartige Funktion der Proteine in *S. cerevisiae* schließen lässt (Frost *et al.*, 2012; Pracheil and Liu, 2013). So sind in *S. cerevisiae* im Gegensatz zu anderen Pilzen Far9/Far10 für die Lokalisation des Far-Komplexes am ER und der Kernhülle nötig (Pracheil and Liu, 2013). Der N-Terminus von Far9, welches eine Brücke für die Interaktion zwischen Far3 und Far10 bzw. Far11 ist, inhibiert ebendiese Interaktion, weshalb es möglich ist, dass weitere Faktoren oder eine Modifikation für die Interaktion nötig sind (Kemp and Sprague, 2003). Unabhängig vom Far-Komplex wird vermutet, dass Far9 außerdem Einfluss auf die Sekretion der Carboxypeptidase Y (CPY) und der alkalischen Phosphatase (ALP) besitzt. Aus diesem Grund wird Far9 auch als

Vps64 (*vacuolar protein sorting 64*) bezeichnet (Bonangelino *et al.*, 2002). CPY ist Teil des gleichnamigen Carboxypeptidase-Y-Signalwegs und daher zuständig für den Transport neu synthetisierter, vakuolärer Proteine zur Vakuole (Burd *et al.*, 1998; Conibear and Stevens, 1998; Mullins and Bonifacino, 2001). Diese Proteine erfüllen dort entweder an die Membran der Vakuole gebunden oder im Lumen der Vakuole ihre Funktion. Einige Protein werden dabei vom Golgi-Apparat zu einem Vorkompartiment der Vakuole andere zum späten Golgi-Apparat transportiert. Auch die membrangebundene Hydrolase ALP ist gemeinsam mit den SNAREs (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor*) Vam3p und Nyv1p für den Transport vom Golgi-Apparat zur Vakuole zuständig (Cowles *et al.*, 1997; Piper *et al.*, 1997; Burd *et al.*, 1998; Conibear and Stevens, 1998; Rehling *et al.*, 1999; Reggiori *et al.*, 2000; Mullins and Bonifacino, 2001). Neben dem Defekt im pheromonabhängigen Zellzyklusarrest führt die Deletion von *far9* zu Defekten in der Sortierung von CPY und ALP, Defekten in der Sekretion des  $\alpha$ -Faktors und zu einer abnormaler Vakuolenmorphologie (Bonangelino *et al.*, 2002).

### 1.5.2. STRIPAK in *Sordaria macrospora*

Der Pilz *Sordaria macrospora* vollzieht seinen Lebenszyklus innerhalb von sieben Tagen. Zu Beginn steht die Ausdifferenzierung des vegetativen Myzels in Ascogonia (Gametangien) nach zweitägigem Wachstum, welche den Beginn der Fruchtkörperentwicklung markiert. Zunächst entsteht dabei ein Präfruchtkörper (Protoperithecium), welcher aus dem Ascogonium und sterilen umhüllenden Hyphen besteht und einen Durchmesser von 30 bis 90  $\mu\text{m}$  besitzt. Nach sieben Tagen Fruchtkörperreife (Perithecie nreife) werden die Ascosporen durch eine Pore des Peritheciums abgegeben (Engh *et al.*, 2010; Teichert *et al.*, 2014a; Kück *et al.*, 2016). Auf die Fruchtkörperentwicklung haben dabei verschiedene Faktoren, zu denen auch der STRIPAK-Komplex zählt, Einfluss (Kück *et al.*, 2016). Dieser besteht in *S. macrospora* aus der regulatorischen Untereinheit PRO11, der katalytischen Untereinheit SmPP2Ac, der strukturgebenden Untereinheit SmPP2AA, dem Ankerprotein PRO45, dem Entwicklungsprotein PRO22, den Kinasen SmKIN3 und SmKIN24, dem Aktivator der Kinasen SmMOB3 und dem kleinen *coiled-coil* Protein SC11 (*STRIPAK complex interactor 1*) (Tabelle 1, Abbildung 11).





**Abbildung 11: STRIPAK-Komplex in *S. macrospora***

Der STRIPAK-Komplex wird durch die Membranproteine PRO45 und PRO22 an die Kernhülle, Mitochondrien und andere interne Membransysteme rekrutiert. Die Interaktion der Proteine wird von PRO11 vermittelt. Die Phosphorylierung und Dephosphorylierung der Zielproteine wird durch die regulatorische Untereinheit PP2AA und die katalytische Untereinheit PP2Ac1 der Phosphatase und die Kinasen SmKIN3 und SmKIN24 hervorgerufen (modifiziert nach Kück *et al.* 2016).

Die Deletion einer der STRIPAK-Komponenten führt zum Fehlen von Perithecia, einem sterilen Organismus und dem Ausbleiben der Hyphenfusion (Pöggeler and Kück, 2004; Bloemendal *et al.*, 2010; Bernhards and Pöggeler, 2011; Bloemendal *et al.*, 2012; Nordzieke *et al.*, 2015; Beier *et al.*, 2016). Wie auch in anderen Organismen vermittelt PRO11 die Interaktion zwischen dem an die Kernmembran gebundenen PRO45 und dem an interne Membranen gebundenen PRO22 und ist somit das innere Gerüst des STRIPAK Komplexes (Bloemendal *et al.*, 2012). Es ist während der frühen und späten Entwicklung im Vergleich zur vegetativen Entwicklung hochreguliert (Bernhards and Pöggeler, 2011) und eine Deletion führt zur Reduktion der Menge an rudimentären Ascogonia, dem Fehlen von Properithecia und damit auch zum Fehlen von Perithecia (Bloemendal *et al.*, 2012). Die katalytische Untereinheit SmPP2Ac hingegen spielt eine Rolle in der Bildung interkalärer Septen in Ascogonia, in der sexuellen Entwicklung und ist notwendig für die Aktivität des STRIPAK-Komplexes in *S. macrospora* (Beier *et al.*, 2016). Das Ankerprotein PRO45, welches mit PRO11 und SmMOB3 interagiert, bringt so den Kern, Mitochondrien und andere interne Membransysteme zusammen, wodurch die Signalweiterleitung zwischen den Organellen möglich wird (Nordzieke *et al.*, 2015). Es besitzt in vegetativem und sexuellem Myzel jedoch nur ein niedriges Level der Transkription (Teichert *et al.*, 2012), gleichwohl die Deletion von *pro45* neben einem Defekt in der Hyphenfusion und einem sterilen Organismus durch das Ausbleiben von Perithezien zu reduziertem vegetativem Wachstum führt (Nordzieke *et al.*, 2015). Das Entwicklungsprotein PRO22, welches mit PRO11 interagiert, spielt eine wichtige Rolle in der Septierung

während der Entwicklung. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von PRO22 am vierten Tag nach Beginn der sexuellen Entwicklung um das Vierfache erhöht ist (Bloemendal *et al.*, 2010). Innerhalb der Zelle assoziiert PRO22 mit tubulären Vakuolen und Intermembransystemen nahe der Hyphenspitze (Bloemendal *et al.*, 2010), während die Deletion von *pro22* zu defekten Protoperithecia und dem Ausbleiben der Hyphenfusion führt. *S. macrospora* besitzt mit SmKIN3 und SmKIN24 zwei mit dem STRIPAK assoziierte GCKs (*germinal center kinases*), wobei pilzliche GCKs die Zytokinese, das Hyphenwachstum und die Differenzierung der asexuellen Entwicklung regulieren (Frey *et al.*, 2015). Die Deletion der Kinase SmKIN3 führt zu stark reduzierter Septierung und einem Stopp während der frühen sexuellen Entwicklung. Auch eine Mutation in der ATP-Bindedomäne von SmKIN3 resultiert in starken Entwicklungsdefekten. Es konnte zudem eine Interaktion von SmKIN3 mit PRO11 über das Hefe-Zwei-Hybrid-System und *in vivo* über Co-Immunopräzipitation gezeigt werden (Frey *et al.*, 2015; Radchenko *et al.*, 2018). Der Kinaseaktivator des STRIPAK-Komplexes in *S. macrospora* ist in den Vesikeltransport involviert und seine Expression wird während der frühen und späten Entwicklung hochreguliert (Bernhards and Pöggeler, 2011). Das kleine *coiled-coil* Protein SCI1, welches ein Homolog zu Far3 bzw. Far7 in *S. cerevisiae* ist (Tabelle 1), besteht aus 298 Aminosäuren und verfügt neben den vier *coiled-coil* Regionen über eine zentrale Region für die Dimerisierung und eine Region für die Interaktion mit PRO11, PRO45 und anderen Proteinen (Huang *et al.*, 2005; Lin *et al.*, 2010; Lai *et al.*, 2011; Singh *et al.*, 2011). Die wichtigste Region ist die dritte *coiled-coil* Region zwischen Aminosäure 63 und Aminosäure 207, da diese essenziell für die Rekrutierungsfunktion von SCI1 ist (Beier *et al.*, 2016). SCI1 wird am dritten Tag der frühen Entwicklung am stärksten exprimiert und ist als Teil des STRIPAK-Komplexes involviert in die Fruchtkörperentwicklung, das vegetative Wachstum und die Zellfusion (Reschka *et al.*, 2018). Die Interaktion von SCI1 mit PRO22 erfolgt über PRO11. Die Deletion von *sci1* resultiert in einem sterilen Organismus, Defekten in der Hyphenfusion, reduziertem vegetativen Wachstum und dem Fehlen der Anastomose. Es wird daher vermutet, dass SCI1 die Interaktion der Kinasekaskaden mit dem STRIPAK-Komplex vermittelt, welche die Entwicklung des Organismus steuern (Reschka *et al.*, 2018).

### 1.5.3. STRIPAK in *Neurospora crassa*

Der Ascomycet *Neurospora crassa* kann sich sowohl sexuell als auch vegetativ fortpflanzen. Die sexuelle Reproduktion ist nur zwischen Individuen mit gegenteiligen und daher kompatiblen Paarungstypen möglich, jedoch können im hermaphroditen Pilz *N. crassa* beide Paarungstypen weiblichen Fortpflanzungsorgane (Protoperithezien) und Konidiosporen ausbilden. Initiiert wird die sexuelle Reproduktion durch das Wachstum der fertilen Hyphe (Trichogyne) innerhalb des Protoperitheziums in Richtung des Konidiums mit gegensätzlichem Pheromon (Kim and Borkovich, 2004; Kim and Borkovich, 2006). Während der Zellfusion wird der Kern des Konidiums durch die Trichogyne in das Protoperithezium transportiert. Durch die Replikation der Kerne aus Trichogyne und Konidium entsteht die ascogene Hyphe (Backus, 1939). Die Entwicklung der Ascosporen folgt auf die Karyogamie und die Meiose innerhalb des Fruchtkörpers (Raju, 1980; Fleißner *et al.*, 2008). Auch während des vegetativen Zyklus von *N. crassa* spielt die Zellfusion eine wichtige Rolle. So führt die Keimung und das chemotrophe Wachstum auf adäquatem Substrat zur Fusion asexueller Sporen. Auch die Fusion von Hyphen findet innerhalb der Pilzkolonie statt, um ein Myzelnetzwerk zu bilden. Für eine erfolgreiche Fusion ist die Auflösung der Zellwand, der Umbau der Plasmamembran und die Vermischung des Zytoplasmas nötig (Hickey *et al.*, 2002; Goryachev *et al.*, 2012). Ein Defekt in der Keimlingsfusion führt neben einem Defekt in der Hyphenfusion (Fleißner *et al.*, 2008; Fu *et al.*, 2011) auch zu Defekten in der Luftmyzelbildung und der Protoperithezienbildung. In *N. crassa* wurden 70 Gene entdeckt, die bei der Kommunikation und Fusion eine Rolle spielen. Bei einem dieser Gene handelt es sich um *ham-2* (*hyphal anastomosis mutant 2*), welches nötig ist für die Hyphenfusion (Xiang *et al.*, 2002) und das Homolog zur STRIPAK-Komponente Far11 in *S. cerevisiae* darstellt (Tabelle 1).

Auch in *N. crassa* nimmt der STRIPAK-Komplex Einfluss auf die sexuelle Entwicklung, das Wachstum und die Zellfusion. Er besteht aus der strukturgebenden Untereinheit (PP2A-A), der regulatorischen Untereinheit (HAM-3), der katalytischen Untereinheit (PPG-1) der Phosphatase, dem Entwicklungsprotein (HAM-2), dem Ankerprotein (HAM-4) und dem Aktivator der Kinase (MOB-3) (Tabelle 1, Abbildung 11) (Simonin *et al.*, 2010; Dettmann *et al.*, 2013). Die regulatorische Untereinheit HAM-3, welche das Homolog zum humanen Striatin und Far8 aus *S. cerevisiae* ist (Tabelle 1), besitzt die konservierte Domänenstruktur der Striatinfamilie (Simonin *et al.*, 2010). Diese besteht

## Einleitung

aus einer Caveolinbindedomäne, einer *coiled-coil* Domäne und WD-Wiederholungen zur Protein-Protein-Interaktion (Smith *et al.*, 1999). Zusätzlich verfügt HAM-3 über eine Calmodulinbindedomäne und kann somit als Calciumionensensor fungieren (Bartoli *et al.*, 1998). Die Deletion von *ham-3* führt zu einem Defekt in der Hyphenfusion, geringerem Wachstum, weniger Luftmycel und weniger Konidiosporen. Zudem ist nach *ham-3* Deletion die sexuelle Entwicklung deutlich reduziert, da die Protoperithezienbildung nur verspätet stattfindet, sukzessiv keine Perithezien gebildet werden und somit keine Ascosporen entstehen (Simonin *et al.*, 2010; Dettmann *et al.*, 2013). Das 761 Aminosäuren umfassende Ankerprotein HAM-4 besitzt eine FHA-Domäne (*forkhead associated domain*) mit Phosphopeptiderkennungssequenz am N-Terminus und eine *coiled-coil* Domäne und eine Transmembrandomäne am C-Terminus (Simonin *et al.*, 2010). Es ist das Homolog zu Far9 bzw. Far10 in *S. cerevisiae* (Tabelle 1). Auch die Deletion von *ham-4* führt zu einem Defekt in der Hyphenfusion und verspäteter Protoperithezienbildung. Außerdem verfügt die *ham-4* Deletion über vergrößerte Vakuolen und einen abnormalen Meiosephänotyp (Simonin *et al.*, 2010). Im Gegensatz zur Deletion anderer STRIPAK-Komponenten ist *N. crassa* nach Deletion von *ham-4* weiterhin fertil, es entstehen jedoch ausschließlich morphologisch abnormale Ascosporen (Simonin *et al.*, 2010). Da das Entwicklungsprotein HAM-2 in *N. crassa* gemeinsam mit der regulatorischen Untereinheit HAM-3 für die Lokalisation des STRIPAK-Komplexes an der Kernhülle verantwortlich ist, besitzt die Deletion von *ham-2* den gleichen Phänotyp wie die *ham-3* Deletion (Simonin *et al.*, 2010; Dettmann *et al.*, 2013). Eine weitere Komponente des STRIPAK-Komplexes ist die Kinase MST-1, welche das Homolog zur Kinase KIN-24 in *S. macrospora* ist. MST-1 lokalisiert am Spindelpolkkörper und an Septen, weshalb eine Rolle in der Septierung und dem polaren Wachstum vermutet wird (Heilig *et al.*, 2014; Frey *et al.*, 2015). Die Kinase ist jedoch nicht nötig für die Kommunikation von Keimlingen und die Fusion. Es konnte zudem eine Interaktion von MST-1 mit NRC-1 aus dem Zellwandintegritätssignalweg und MEK-2 aus dem MAK-2-Signalweg nachgewiesen werden (Abbildung 11). Dies zeigt eine Verknüpfung des STRIPAK-Komplexes mit Signalwegen in *N. crassa* und lässt vermuten, dass die Phosphatase in eben diesen Signalwegen agiert. Neben der Phosphorylierung der STRIPAK-Komponenten HAM-3, HAM-4 und PP2A-A durch das dem MAK-2-Signalweg namensgebende MAK-2, phosphoryliert MAK-2 auch MOB-3, wodurch MAK-1 in den Nukleus gelangt (Dettmann *et al.*, 2013). Diese Akkumulation von MAK-1 im Nukleus

bleibt durch die Deletion von *ham-2*, *ham-3* oder *mob-3* aus. Es gibt zudem eine schwache Interaktion zwischen MAK-2 und PPG-1, PP2A-A, HAM-3 und MOB-3 (Dettmann *et al.*, 2013). Davon sind MOB-3 und HAM-3 nötig für die vollständige Phosphorylierung von MAK-1.

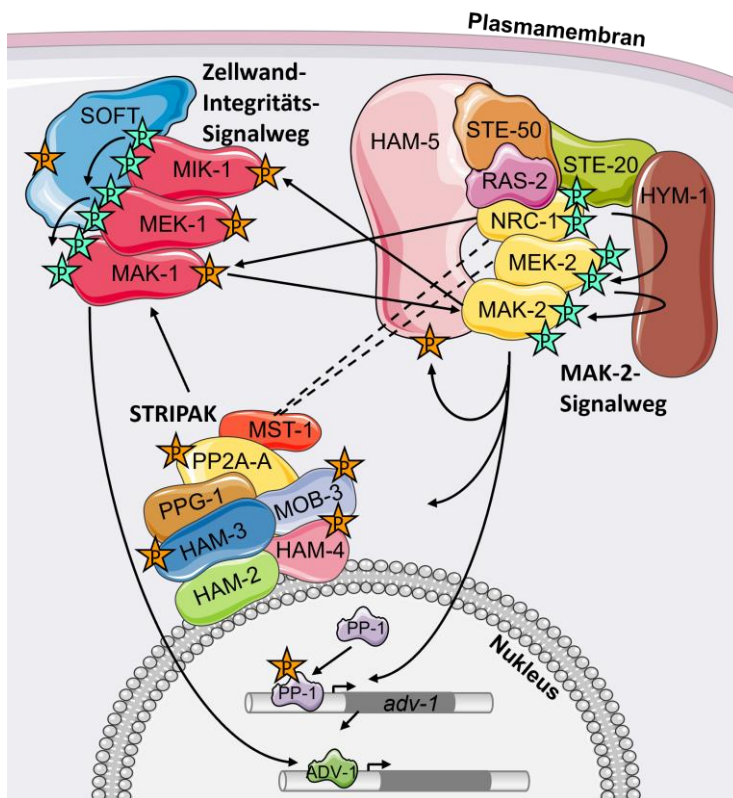


Abbildung 12: Aufbau und Interaktionen des STRIPAK-Komplexes in *N. crassa*

Interaktion des STRIPAK-Komplexes mit dem Zellwand-Integritäts-Signalweg und dem MAK-2-Signalweg. Die Komponenten der MAPK-Kaskade des Zellwand-Integritäts-Signalwegs sind in Rot und die des MAK-2-Signalwegs in Gelb dargestellt. Zu den Komponenten des STRIPAK-Komplexes in *N. crassa* gehören PP2A-A, HAM-3, PPG-1, HAM-2, HAM-4, MOB-3 und MST-1. Bei *pp-1* und *adv-1* handelt es sich um die Gene von Transkriptionsfaktoren, deren Expression durch die zwei Signalwege und den STRIPAK-Komplex beeinflusst werden. Die türkisen P (Sterne) stehen für die schrittweise Phosphorylierung der Komponenten der Signalwege im Rahmen der MAPK-Kaskaden. Die orangenen P (Sterne) stehen für die MAK-2-abhängige Phosphorylierung. (nach Fischer and Glass, 2019)

Der MAK-2-Signalweg, welcher ortholog zur Pheromonantwort in *S. cerevisiae* ist, besteht aus NRC-1 (Kinase-Kinase-Kinase), MEK-2 (Kinase-Kinase), MAK-2 (Kinase), HYM-1 und das nur in filamentösen Ascomyzeten vorkommende HAM-5, welches als Gerüst fungiert und für Kommunikation, Fusion, Wachstum, Perithezienbildung und die Funktion der MAK-2-Kaskade nötig ist (Abbildung 12) (Dettmann *et al.*, 2014; Jonkers *et al.*, 2014). Der dynamische Komplex aus HAM-5, MAK-2, MEK-2, NRC-1 und dem Kinase-regulator STE-50 lokalisiert im assemblierten Zustand an der Plasmamembran und im disassemblierten Zustand im Zytoplasma (Fleißner *et al.*, 2009; Dettmann *et al.*, 2012; Jonkers *et al.*, 2014). HYM-1 colokalisiert mit dem Komplex am Zellapex, interagiert aber nicht physisch mit diesem. Auch während der Zellfusion ist HYM-1, ebenso wie NRC-1, MEK-1 und MAK-1, am Ort des Zell-Zell-Kontaktes zu finden (Dettmann *et al.*, 2012). Die Deletion von *hym-1* gleicht im Phänotyp der *mak-2* Deletion, was bestätigt, dass HYM-1 essenziell für den MAK-2-Signalweg ist. HYM-1 wirkt dabei als Adapterkomplex und bringt die einzelnen Komponenten zusammen, was die Signalweitergabe sichert (Dettmann *et al.*, 2012). Zusätzlich zu STE-50 verfügt

## Einleitung

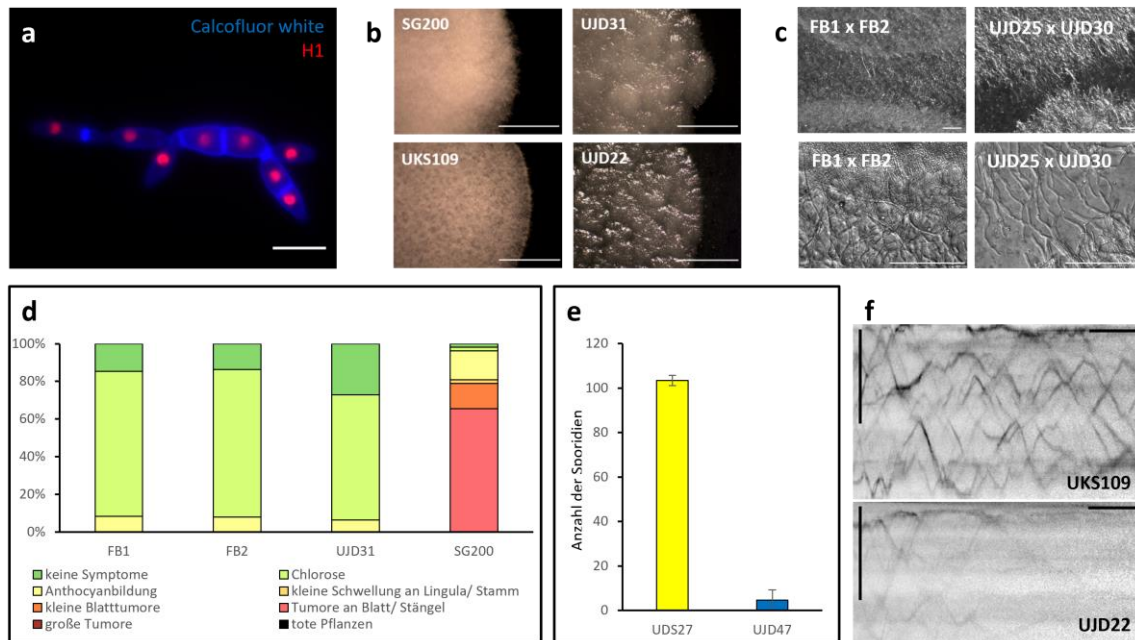
*N. crassa* mit der PAK-Kinase STE-20 (p21-aktivierte Kinase) und der GTPase RAS-2 über weitere Regulatoren, welche durch die Phosphorylierung des MAK-2-Komplexes den MAK-2-Signalweg beeinflussen (Dettmann *et al.*, 2014). Zielprotein des MAK-2-Signalwegs ist, unter anderem, der Transkriptionsfaktor PP-1, welcher über mehrere Regionen verfügt, die abhängig von MAK-2 phosphoryliert werden. Der Phänotyp einer Deletion von *pp-1* gleicht daher auch dem Phänotyp einer *mak-2* Deletion. Zudem konnte eine Überlappung der MAK-2-abhängigen und der PP-1-abhängigen Genexpression gezeigt werden (Leeder *et al.*, 2013). PP-1 aktiviert direkt die Transkription des Transkriptionsfaktors *adv-1* (*arrested development 1*), der wiederum die Transkription von Genen aktiviert, die für Kommunikation, Fusion, Wachstum und die Reaktion auf Zellwandstress nötig sind (Leeder *et al.*, 2013; Dekhang *et al.*, 2017; Fischer *et al.*, 2018). Die Transkription von *adv-1* kann auch unabhängig von PP-1 durch MAK-1, welches Teil des Zellwandintegritätssignalwegs ist, aktiviert werden (Fischer *et al.*, 2018). Dieser überträgt externe Signale von Zellwandsensoren, wie beispielsweise WSC-1 und HAM-7, auf eine MAPK-Kaskade. Bei WSC-1 und HAM-7 handelt es sich um GPI (Glycosylphosphatidylinositol) verankerte Proteine, welche für die Erhaltung der Zellwand, die Resistenz gegen Zellwandstress und die Phosphorylierung von MAK-1 nötig sind (Maddi *et al.*, 2012). Die Deletion der Zellwandsensoren führt zu Defekten in der Keimlings- und Hyphenfusion (Maddi *et al.*, 2012). Neben der MAPK-Kaskade, welche aus MIK-1 (Kinase-Kinase-Kinase), MEK-1 (Kinase-Kinase) und MAK-1 (Kinase) besteht, ist auch HAM-1, welches auch SOFT benannt wurde, Teil des Zellwandintegritätssignalweg (Abbildung 12). HAM-1 interagiert dabei mit MIK-1 und MEK-1, nicht jedoch mit MAK-1 (Teichert *et al.*, 2014b; Weichert *et al.*, 2016) und verfügt während der chemotrophen Interaktion genetisch identischer Zellen über ein dynamisches Lokalisationsmuster (Roca *et al.*, 2005; Fleißner *et al.*, 2009). MAK-1 lokalisiert an der Spitze der Keimschläuche, welche Ort der Fusion sind (Dettmann *et al.*, 2013; Weichert *et al.*, 2016). Insgesamt ist der Zellwandintegritätssignalweg im Zytoplasma und im Nukleus lokalisiert. Der Zellwandintegritätssignalweg führt zudem zu veränderter Transkription. Bei einer Fusion ist im ersten Keimschlauch der MAK-2-Signalweg und im zweiten Keimschlauch der Zellwandintegritätssignalweg aktiv (Herzog *et al.*, 2015; Fleißner and Herzog, 2016), weshalb vermutet wird, dass SOFT für die Signalsekretion und MAK-2 für die Signalperzeption verantwortlich ist und auf diese Weise eine Selbststimulation verhindert werden kann (Goryachev *et al.*, 2012).

#### 1.5.4. STRIPAK in *U. maydis*

Als einer der ersten Basidiomyceten wurde auch in *U. maydis* der STRIPAK-Komplex untersucht. Eine BLAST Analyse der Komponenten des STRIPAK-Komplexes identifizierte dabei Homologe des Ankerproteins (Far10 – UMAG\_04391), des Entwicklungsproteins (Far11 – UMAG\_10285), des Aktivators der Kinase (UMAG\_00493), der Kinasen (UMAG\_10496, UMAG\_05543), der strukturgebenden Untereinheit (UMAG\_02960), der regulatorischen Untereinheit (Far8 – UMAG\_03784) und der katalytischen Untereinheit (Upa2 – UMAG\_11525) der Phosphatase in *U. maydis* (Tabelle 1). Um die Rolle des STRIPAK-Komplexes und seiner einzelnen Komponenten zu verstehen, wurden das Ankerprotein, das Entwicklungsprotein und die regulatorische Untereinheit der Phosphatase in Vorarbeiten bereits genauer untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Deletion der regulatorischen Untereinheit der Phosphatase in *U. maydis* letal ist (Dennig, 2020). Da es nicht gelungen war, das Entwicklungsprotein zu deletieren, wird vermutet, dass die Deletion des Entwicklungsproteins ebenfalls letal ist (Dennig, 2020). Gegensätzlich dazu ist bisher kein anderer Organismus bekannt, in dem die regulatorische Untereinheit oder das Entwicklungsprotein essenziell sind. Für die katalytische Untereinheit der Phosphatase konnte jedoch schon gezeigt werden, dass sie in *S. macrospora*, *N. crassa* und auch in *U. maydis* essenziell ist (Yatzkan and Yarden, 1995; Egan *et al.*, 2009; Beier *et al.*, 2016). Auch die strukturgebende Untereinheit der Phosphatase ist in *Aspergillus nidulans* essenziell (Elramli *et al.*, 2019).



## Einleitung



**Abbildung 13: Phänotyp der Deletion des Ankerproteins *far10***

(a) *far10*-Deletion zeigte Zytokinese- und Polaritätsdefekt mit normaler Zellkernverteilung visualisiert durch Histon1-mCherry (H1) und Anfärbung der Septen und Zellwände mittels Calcofluor white. Maßstab: 10 µm. (b) Ausbleiben von *b*-abhängigem filamentösem Wachstum des solopathogenen *far10*-Deletionsstammes UJD31 (*SG200 Δfar10*) im Vergleich zum solopathogenen Wildtypstamm SG200. Das *b*-abhängige filamentöse Wachstum wurde durch Charcoal-Glukose-Medium induziert. Ausbleiben des *b*-abhängigen filamentösen Wachstums, induziert durch Charcoal-Arabinose-Medium, im *far10*-Deletionsstamm UJD22 (*UKS109 Δfar10*) im Gegensatz zum Wildtypstamm UKS109 (*a2 P<sub>erg</sub>:bW2, P<sub>erg</sub>:bE1 ip[rab7:mCherry]ip<sup>s</sup> gfp-rab5a*). Maßstab: 1 mm. (c) Keine Fusion der *far10*-Deletionsstämme UJD25 (*FB1 Δfar10*) und UJD30 (*SG200 Δfar10*) im Konfrontationsassay. Maßstab: 100 µm. (d) Mehr als 90 % der mit dem solopathogenen Wildtypstamm SG200 infizierten Pflanzen zeigten Symptome. Lediglich 10 % der mit dem solopathogenen *far10*-Deletionsstamm UJD31 (*SG200 Δfar10*) infizierten Pflanzen zeigten schwache Symptome. Der solopathogene *far10*-Deletionsstamm UJD31 (*SG200 Δfar10*) ist apathogen. (e) Deutlich reduzierte Anzahl an verbliebenen Sporidien des *far10*-Deletionsstammes UJD47 (*a1mfa2 bW2bE1 (ip[P<sub>hxt1</sub>:cfp]ip<sup>s</sup>)\*n Δfar10*) auf der Blattoberfläche drei Tage nach Infektion der Maispflanzen im Vergleich zum Wildtypstamm UDS27. (f) Verminderte Anzahl an sich bewegendem frühen Endosomen in den Sporidien (hier gezeigt) und in den Filamenten (nicht gezeigt) des *far10*-Deletionsstammes UJD22 (*UKS109 Δfar10*) im Vergleich zum Wildtypstamm UKD109 (*a2 P<sub>erg</sub>:bW2, P<sub>erg</sub>:bE1 ip[rab7:mCherry]ip<sup>s</sup> gfp-rab5a*). Vertikaler Maßstab: 10 µm; horizontaler Maßstab: 10 s (modifiziert nach Dennig, 2020).

Die Deletion des Ankerproteins *far10* führt hingegen zu einem Zytokinese- und Polaritätsdefekt mit gleichzeitig normaler Kernverteilung, was sich durch Sporidien, die sich nach der Mitose nicht voneinander trennen und eine baumartige Struktur bilden, zeigt (Abbildung 13a) (Dennig, 2020). Zudem ist im Vergleich zum Wildtyp kein *b*-abhängiges Wachstum auf Charcoalmedium zu erkennen, welches die hydrophobe Oberfläche einer Pflanzenoberfläche simuliert und damit *b*-abhängiges Wachstum induziert. Dies ist sowohl bei solopathogenen Stämmen, als auch bei direkter Induktion des *b*-abhängigen filamentösen Wachstums der Fall (Abbildung 13b) (Dennig, 2020). Da auch im Konfrontationsassay, bei dem zwei kompatible Stämme aufeinander zuwachsen, keine Fusion erkennbar ist, wird vermutet, dass die Deletion des Ankerproteins zudem zum Ausbleiben der Hyphenfusion führt (Abbildung 13c)



(Dennig, 2020). Die Deletion des Ankerproteins resultierte auch schon in *S. macrospora* und in *N. crassa* in einem Fehlen der Hyphenfusion (Simonin *et al.*, 2010; Nordzieke *et al.*, 2015). Pflanzen, die mit einem *U. maydis far10*-Deletionsstamm infiziert wurden, zeigten lediglich zu 10 % unspezifische Symptome zeigen, die durch die Erkennung des Pathogens auf der Blattoberfläche entstehen; die Deletionsstämme waren nicht in der Lage, die Pflanzenoberfläche zu penetrieren und die sind daher apathogen (Abbildung 13d) (Dennig, 2020). Drei Tage nach der Infektion mit dem Deletionsstamm konnten nur sehr wenige Sporidien und keine Filamente auf bzw. in der Pflanze nachgewiesen werden (Abbildung 13e) (Dennig, 2020). Es wird daher vermutet, dass die Deletion des Ankerproteins die Anheftung der Sporidien auf der Blattoberfläche verhindert. Sowohl in Sporidien als auch in Filamenten ist die Anzahl der sich bewegenden frühen Endosomen, welche als Teil der Endozytose eine wichtige Rolle in gerichteten Zelltransportprozessen spielen und daher eine große Bedeutung für die Pflanzeninfektion haben, nach Deletion des Ankerproteins *far10* ebenfalls reduziert (Abbildung 13f) (Dennig, 2020).

## 1.6. Zielsetzung

Beim STRIPAK-Komplex (*striatin interacting phosphatase and kinase complex*) handelt es sich um einen in Eukaryoten hochkonservierten Komplex. In verschiedenen Vertretern der Ascomyzeten konnte eine Rolle des STRIPAK-Komplexes in der Aufrechterhaltung des Zellzyklusarrests, der Fruchtkörperbildung, der Hyphenfusion und im Wachstum gezeigt werden (Xiang *et al.*, 2002; Kemp and Sprague, 2003; Pöggeler and Kück, 2004; Simonin *et al.*, 2010; Bernhards and Pöggeler, 2011; Bloemendal *et al.*, 2012; Nordzieke *et al.*, 2015; Beier *et al.*, 2016). Auch in *U. maydis*, dem ersten Basidiomyzeten, in dem der STRIPAK-Komplex untersucht wurde, besitzt der STRIPAK-Komplex augenscheinlich eine wichtige Rolle. So sind mit der regulatorischen Untereinheit der Phosphatase und dem Entwicklungsprotein zwei der Hauptkomponenten des Komplexes essenziell in *U. maydis* (Dennig, 2020), weshalb vermutet wird, dass diese Komponenten oder der gesamte Komplex weitere unbekannte und für den Pilz unabdingbare Aufgaben erfüllt. Zudem führt die Deletion des Ankerproteins, ähnlich wie auch bei Ascomyzeten, zum Ausbleiben der Hyphenfusion und zu vermindertem *b*-abhängigem filamentösem Wachstum (Dennig, 2020). Des Weiteren resultiert die Deletion des Ankerproteins in einem Zytokinese- und Polaritätsdefekt, einer verminderten Anzahl von motilen frühen Endosomen, der

## Einleitung

Apathogenität und einer deutlich verminderten Anheftung des Pilzes auf der Blattoberfläche von Mais (Dennig, 2020).

Im Rahmen dieser Arbeit sollen die Auswirkungen der Deletion des Ankerproteins weiter untersucht und bestätigt werden. So soll aufgrund der verminderten Anheftung an die Blattoberfläche von Mais die Endo- und Exozytose mittels eines Canavaninassays, aber auch die konventionelle Sekretion durch den Nachweis sekretierter Proteine im Medium überprüft werden. Zudem soll die Reaktion auf ER-Stress mittels Messung der Expression von Genen der *unfolded protein response* und die Lokalisation von  $\alpha$ -Tubulin durch Fluoreszenzmikroskopie genauer betrachtet werden. Da ein bekannter Zusammenhang zwischen einem der Ankerproteine des STRIPAK-Komplexes in *S. cerevisiae* und der vakuolären Proteinsortierung besteht und die Deletion des Ankerproteins in *U. maydis* zu einer verminderten Anzahl an motilen frühen Endosomen führt, soll auch die Anzahl der Vakuolen mikroskopisch überprüft werden. Aufgrund des verminderten *b*-abhängigen Wachstums in Folge der Deletion des Ankerproteins und der verfrühten Rückkehr aus dem Zellzyklusarrest nach Deletion des Ankerproteins in *S. cerevisiae* soll außerdem der Verbleib im Zellzyklusarrest während des *a*-abhängigen filamentösen Wachstums und die Expression der *a*- und *b*-abhängigen Gene kontrolliert werden. Da die Kreuzung zweier, kompatibler Deletionsstämme nicht zur Fusion führt, soll zudem die Fähigkeit der Deletionsstämme zur Fusion mit Wildtypstämmen untersucht werden. Auch die Überprüfung der Integrität von Zellwand und Plasmamembran und die Verstoffwechslung verschiedener Zucker nach Deletion des Ankerproteins waren Ziele dieser Arbeit. Die Interaktion von Ankerprotein, Entwicklungsprotein und der regulatorischen Untereinheit der Phosphatase soll durch Co-Immunopräzipitation bestätigt werden. Eine ergänzende Massenspektrometrie soll die bekannten Komponenten des STRIPAK-Komplexes in *U. maydis* bestätigen. Auch die Lokalisation der einzelnen STRIPAK-Komponenten soll Aufschluss über die Rolle des Komplexes in *U. maydis* geben. Aufgrund der für andere Pilze bekannte Lokalisation der STRIPAK-Komponenten sollen hierfür Colokalisationsstudien mit dem ER, der Kernhülle und den Mitochondrien durchgeführt werden. Auch eine erwartete Colokalisation der regulatorischen Untereinheit, dem Ankerprotein und des Entwicklungsprotein miteinander sollen mikroskopisch überprüft werden. Die Untersuchung der Funktion der Komponenten des STRIPAK-Komplexes in *U. maydis* trägt allgemein zum Verständnis der Regulation von zellulären Prozessen bei.

## 2. Ergebnisse

---

Um Wissen über die Funktion und Rolle des STRIPAK-Komplexes in Basidiomyzeten zu gewinnen, wurde im Rahmen dieser Arbeit die Lokalisation, Zusammensetzung und Interaktion des STRIPAK-Komplexes und die Deletion des Ankerproteins *far10* in *U. maydis* untersucht. Der in Eukaryoten hochkonservierte STRIPAK-Komplex spielt eine wichtige Rolle in der Regulation diverser Signalwege innerhalb der Zelle (Reschka *et al.*, 2018). Für eine erste Untersuchung des STRIPAK-Komplexes in Basidiomyzeten wurde der Modellorganismus *U. maydis* verwendet. Vorarbeiten zeigten, dass die Deletion des Ankerproteins *far10* in *U. maydis* zu einem Zytokinese- und Polaritätsdefekt, zu Apathogenität und zu Defekten in der Hyphenfusion führt (Dennig, 2020).

Der für die Mikroskopie verwendete Stamm AB31 (*a2 P<sub>crg</sub>:bW2, P<sub>crg</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>*) (Brachmann *et al.*, 2001) und die daraus entstandenen AB31-Derivate zeichnen sich durch induzierbares filamentöses Wachstum aus. Die dafür notwendigen *b*-Gene befinden sich unter der Kontrolle des *crg*-Promotors  $P_{crg}$  (Bottin *et al.*, 1996). Der Wechsel der einzigen Kohlenstoffquelle von reprimierender Glukose zu induzierender Arabinose im Medium führt zur Expression des bE/bW-Heterodimers und damit zu filamentösem Wachstum. Die Induktionsdauer betrug dabei, wenn nicht anders aufgeführt, 14-20 Stunden. Fluoreszenzaufnahmen wurden in den GFP-, RFP-, YFP- und DAPI-Kanälen durchgeführt (Wellenlängen und Belichtungszeit siehe Kapitel 4.2.7). Die Überlagerung des RFP-Kanals (rot) und des GFP-Kanals (grün) wird in Gelb und die Überlagerung des YFP-Kanals (gelb) und des DAPI-Kanals (blau) wird in Hellgrün dargestellt.

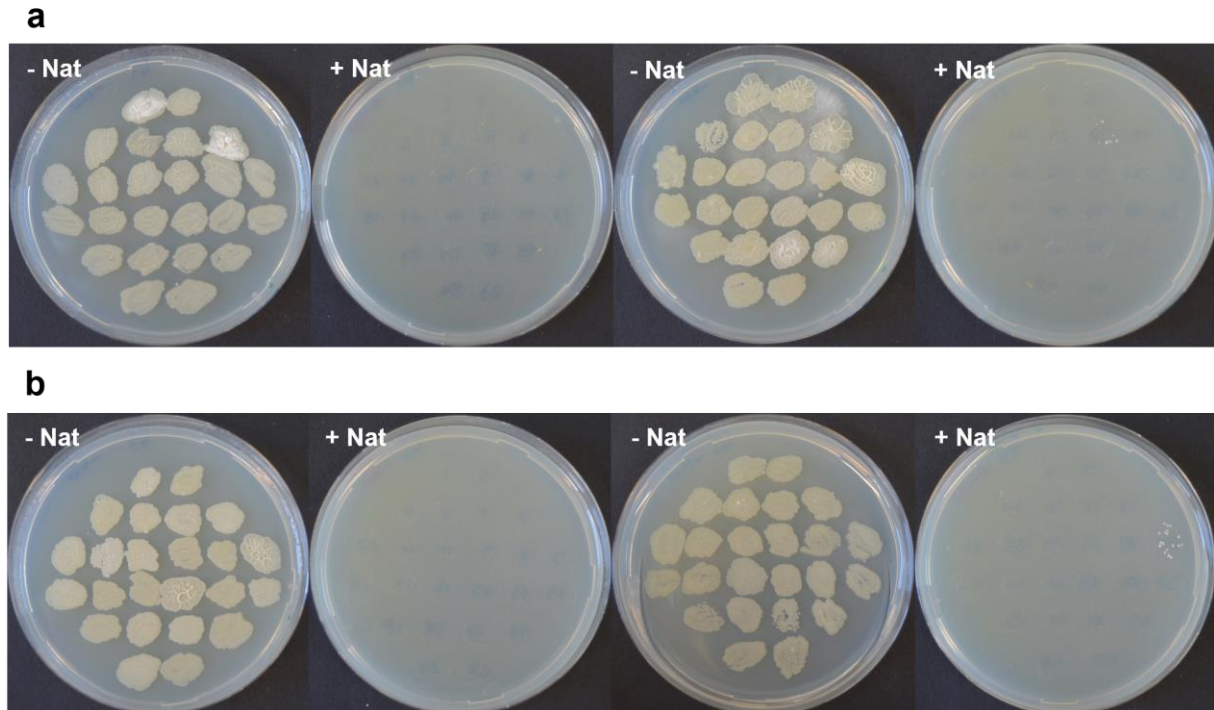
### 2.1. Die regulatorische Untereinheit Far8 und das Entwicklungsprotein Far11 sind essenziell in *U. maydis*

Aufgrund wiederholter erfolgloser Transformationsversuche eines Konstruktes zur Deletion von *far8*, wurde überprüft, ob das Gen essenziell ist. Dazu wurde bereits in Vorarbeiten das Konstrukt erfolgreich in den diploiden Stamm FBD11 (*a1a2 b1b2*) transformiert und Stämme, die sowohl über ein Allel mit Deletion als auch ein Allel mit

## Ergebnisse

nativem Gen verfügen, selektiert. Mit dem *far8*-Deletionsstamm (UJD41: *FBD11 umag\_03784, Δumag\_03784::nat<sup>R</sup>*) wurden sieben Tage alte Maispflanzen der Sorte „Early Golden Bantam“ infiziert. Sporen, welche aus Tumoren infizierter Pflanzen entnommen wurden, resultierten nach Auskeimung und abgeschlossener Meiose in haploiden Sporidien (Mioseprodukte). Diese wurden vereinzelt, auf Wachstum auf Nourseothricin-haltigem Medium getestet, um so zu prüfen, ob *Far8* essenziell ist. Bei ausbleibendem Wachstum auf Nourseothricin-haltigem Medium wurde *Far8* nicht durch die Resistenzkassette ersetzt, was zeigt, dass Zellen, in denen das Gen deletiert ist, nicht überleben konnten und *Far8* somit essenziell ist. Keine der getesteten Sporidien konnte Kolonien auf Nourseothricin bilden, was zeigt, dass *Far8* essenziell in *U. maydis* ist (Dennig, 2020). Dies wurde durch Wiederholung des Experiments erneut bestätigt (Abbildung 14a). Sechs der ausgekeimten Sporen des *far8*-Deletionsstamms (UJD41: *FBD11 umag\_03784, Δumag\_03784::nat<sup>R</sup>*) wurden vereinzelt und davon jeweils acht Kolonien auf Kolonienbildung auf CM-Medium ohne Nourseothricin und CM-Medium mit Nourseothricin überprüft. Alle 48 Sporidien konnten lediglich auf Medium ohne Nourseothricin Kolonien bilden (Abbildung 14a), was bestätigt, dass *Far8* in *U. maydis* essenziell ist.

Gleichzeitig wurde auch vermutet, dass das Entwicklungsprotein *Far11* ebenfalls essenziell in *U. maydis* ist, da es nicht möglich war, *Far11* durch eine Nourseothricin-Resistenz in *U. maydis* zu ersetzen (Dennig, 2020). Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit wurde daher auch dieses Konstrukt in den diploiden Stamm *FBD11* transformiert und mittels Southern Blot auf Stämme mit Deletion in einem Allel und nativem Gen im anderen Allel selektiert. Sieben Tage alte Maispflanzen der Sorte „Early Golden Bantam“ wurden mit dem *far11*-Deletionsstamm (UJD43: *FBD11 umag\_10285, Δumag\_10285::nat<sup>R</sup>*) infiziert und Tumore nach drei Wochen geerntet. Diese wurden für zwei Wochen getrocknet und die darin enthaltenen Sporen ausgekeimt. Die nach abgeschlossener Meiose entstandenen haploiden Sporidien (Mioseprodukte) wurden vereinzelt und geprüft, ob sie Kolonien auf Nourseothricin bilden können, um auch hier nachzuweisen, dass *Far11* in *U. maydis* essenziell ist.



**Abbildung 14: Die regulatorische Untereinheit Far8 und das Entwicklungsprotein Far11 sind essenziell in *U. maydis***

(a) Wachstum der Sporidien des Deletionsstamms UJD41 (*FBD11 umag\_03784*,  $\Delta$ *umag\_03784::nat<sup>R</sup>*) auf CM ohne Nourseothricin (- Nat), jedoch nicht auf CM mit Nourseothricin (+ Nat) zeigte Nourseothricin-Sensitivität der Sporidien. Far8 ist damit essenziell in *U. maydis*. (b) Sporidien des Deletionsstamms UJD43 (*FBD11 umag\_10285*,  $\Delta$ *umag\_10285::nat<sup>R</sup>*) bildeten Kolonien auf CM ohne Nourseothricin (- Nat), jedoch nicht auf CM mit Nourseothricin (+ Nat) und zeigten damit die Nourseothricin-Sensitivität der Sporidien. Far11 ist folglich essenziell in *U. maydis*.

Sechs der ausgekeimten Sporen wurden vereinzelt und davon jeweils acht Kolonien auf Wachstum auf CM-Medium ohne Nourseothricin und CM-Medium mit Nourseothricin überprüft. Alle 48 Sporidien konnten lediglich auf Medium ohne Nourseothricin Kolonien bilden (Abbildung 14b). Die Ergebnisse bestätigen die Hypothese, dass Far11 in *U. maydis* essenziell ist.

## 2.2. Deletion des Ankerproteins *far10*

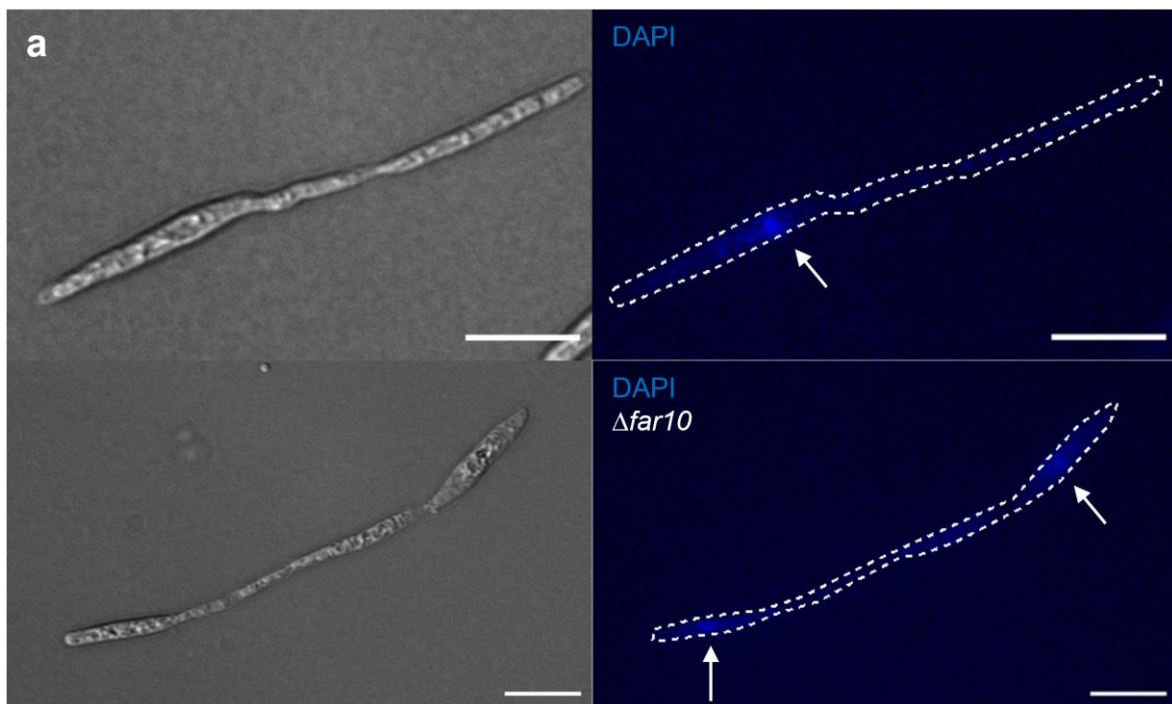
Im Gegensatz zur regulatorischen Untereinheit Far8 und dem Entwicklungsprotein Far11 ist das Ankerprotein Far10 in *U. maydis* nicht essenziell und Deletionsstämme wurden bereits in Vorarbeiten erstellt (Dennig, 2020). Das Konstrukt für die Deletion beinhaltet dabei wie auch bei Far8 und Far11 eine Nourseothricin-Resistenz, die in diesem Fall von den *upstream* und *downstream* Bereichen von Far10 flankiert wurde. Eine in Vorarbeiten bereits erfolgte Analyse des Phänotyps der Deletion ergab einen Zytokinese- und Polaritätsdefekt, fehlendes *b*-abhängiges Wachstum auf induzierendem Festmedium, ein Ausbleiben der Fusion von kompatiblen Deletionsstämmen, eine Apathogenität von solopathogenen Deletionsstämmen, eine

## Ergebnisse

verminderten Anheftung von Sporidien des Deletionsstamms an die Blattoberfläche nach Infektion von Maispflanzen und eine verminderte Anzahl an motilen frühen Endosomen (Abbildung 13). Auf Grundlage dieser Resultate wurden die Auswirkungen der Deletion weiter untersucht.

### 2.2.1. Deletion von *far10* resultiert in verfrühter Rückkehr aus $\alpha$ -abhängigem Zellzyklusarrest und abnormaler Zellkernverteilung

Da bereits in *S. cerevisiae* beschrieben wurde, dass die Deletion einer beliebigen STRIPAK-Komponente nach zehn Stunden zur verfrühten Rückkehr aus dem pheromonabhängigen Zellzyklusarrest führt (Kemp and Sprague, 2003), wurden auch die Folgen der Deletion des Ankerproteins *far10* auf die Induktion und den Verbleib in einem  $\alpha$ -abhängigen Zellzyklusarrest untersucht. Generierte Stämme (UJD74/UJD76/UJD79: *FB2*  $\Delta mfa2::P_{crg1}:mfa1$ ,  $\Delta umag\_04391::gent^R$ ) enthalten neben der Deletion von *Far10* das native Gen *pra2* (*pheromon receptor a*) und anstelle des Gens *mfa2* (*mating factor a*) das mittels Arabinose induzierbare Gen *mfa1*. Durch Zugabe von Arabinose kann so der  $\alpha$ -abhängige Zellzyklusarrest induziert werden. Zudem wurde die Deletion in den Stamm *FB2* (*a2 b2*) eingebracht, in welchem mittels Zugabe von  $\alpha 1$ -Pheromon das  $\alpha$ -abhängige filamentöse Wachstum und der  $\alpha$ -abhängige Zellzyklusarrest induziert werden können.



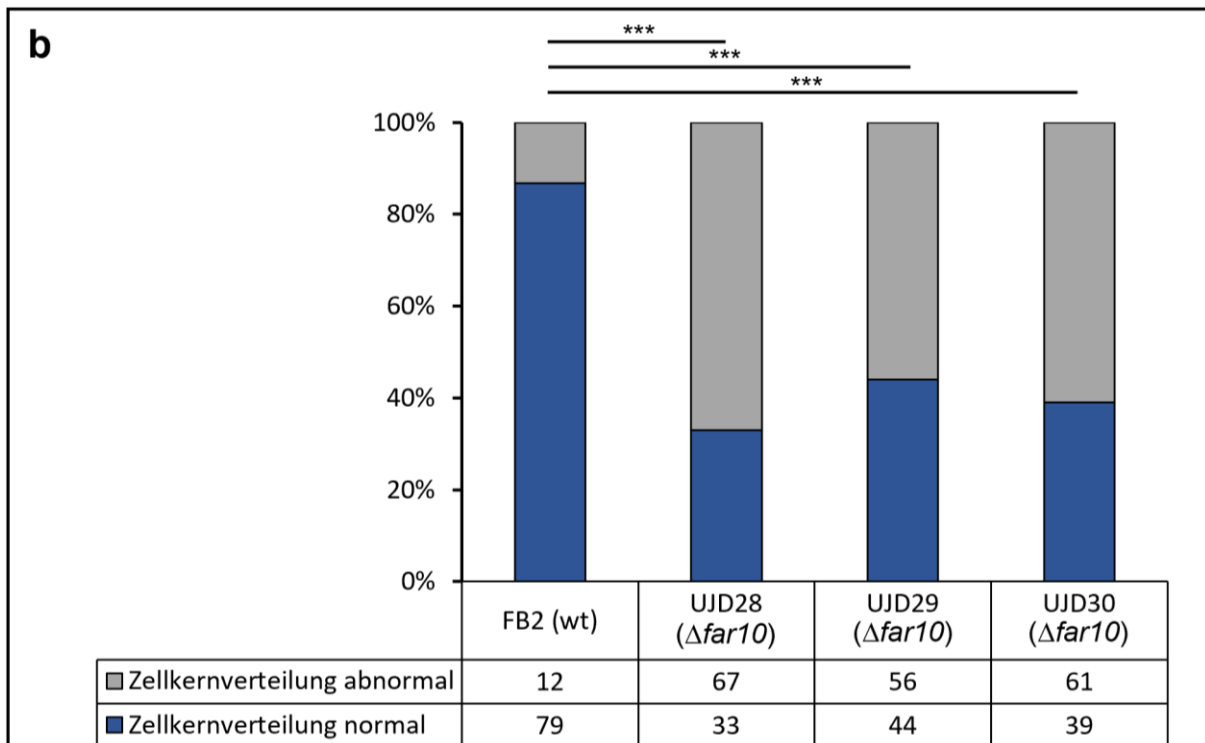


Abbildung 15: Verfrühte Rückkehr aus dem Zellzyklusarrest und abnormale Zellkernverteilung während des *a*-abhängigen filamentösen Wachstums nach Deletion des Ankerproteins *far10*

(a) Mikroskopie des Deletionsstamms UJD74 (*FB2*  $\Delta mfa2::P_{crg1}:mfa1$ , *Δumag\_04391::gent<sup>rs</sup>*) und des Wildtypstamms UMJ62 (*FB2*  $\Delta mfa2::P_{crg1}:mfa1$ ) zeigte erneute Knospung der Deletionsstämme nach *a*-abhängigem filamentösem Wachstum und damit die verfrühte Rückkehr aus dem  $G_2$ -Zellzyklusarrest nach Beginn des *a*-abhängigen filamentösen Wachstums induziert durch einen Arabinose-induzierbaren Promotor. Beide durch die Konjugationshyphne verbundenen Sporidien enthielten einen Zellkern. Färbung der Zellkerne mittels DAPI. Zellkerne sind durch Pfeile markiert. Maßstab: 10  $\mu$ m. (b) Quantifizierung der Zellkernverteilung zeigt doppelt so hohe abnormale Zellkernverteilung in den Deletionsstämmen UJD28/UJD29/UJD30 (*FB2*  $\Delta umag_04391::gent<sup>rs</sup>) im Vergleich zum Wildtypstamm FB2 während des *a*-abhängigen, filamentösen Wachstums nach Induktion durch  $\alpha 1$ -Pheromon. Quantifizierung mittels Mann-Whitney-U-Test als signifikant eingestuft. Signifikanz * p-Wert<0.05, ** p-Wert<0.01, *** p-Wert<0.001.$

Der Wildtypstamm (UMJ62: *FB2*  $\Delta mfa2::P_{crg1}:mfa1$ ) und die Deletionsstämme (UJD74/UJD76/UJD79: UMJ62  $\Delta far10$ ) wurden 18 Stunden nach Induktion des *a*-abhängigen Zellzyklusarrests und des *a*-abhängigen Wachstums durch die Zugabe von Arabinose mikroskopiert. Dafür wurden die Zellen fixiert und die Zellkerne mit DAPI angefärbt. Es konnte gezeigt werden, dass die Deletionsstämme nach Beginn des *a*-abhängigen Wachstums wieder Knospen bilden, da Zellen gefunden wurden, bei denen zwei Sporidien durch einen Konjugationsschlauch verbunden waren. Die Entstehung des Konjugationsschlauchs durch eine Kreuzung zweier Sporidien kann aufgrund ihrer genetischen Inkompatibilität ausgeschlossen werden (Abbildung 15a). Jede dieser durch die Konjugationshyphne verbundenen Sporidien enthielt dabei einen mit DAPI angefärbten Zellkern. Dies deutet auf eine abnormale Zellkernverteilung als Folge der verfrühten Rückkehr aus dem *a*-abhängigen Zellzyklusarrest hin, da der Zellkern im Laufe des *a*-abhängigen, filamentösen Wachstums zwar in die

## Ergebnisse

Konjugationshyphen einwandert, sich jedoch aufgrund des Zellzyklusarrests nicht teilen kann. Um dies zu quantifizieren und mögliche Einflüsse des Arabinose-induzierbaren  $a$ -abhängigen Wachstums auszuschließen, wurde die Induktion mit dem Wildtypstamm FB2 und den Deletionsstämmen (UJD28/UJD29/UJD30: *FB2 Δumag\_04391::gent<sup>R</sup>*) mit  $a1$ -Pheromon über 18 Stunden wiederholt. Die Zellen wurden ebenfalls fixiert, die Zellkerne mit DAPI gefärbt und anschließend mikroskopiert. Auch hier wurde eine erneute Knospung nach Beginn des  $a$ -abhängigen filamentösen Wachstums beobachtet. Die Quantifizierung der Zellkernverteilung ergab für den Wildtyp bei über 80 % der Zellen eine normale Zellkernverteilung, wohingegen für die Deletionsstämmen lediglich eine 33 %-ige (UJD28), 44 %-ige (UJD29) oder 39 %-ige (UJD30) Normalverteilung der Zellkerne auftrat (Abbildung 15b). Somit war in mindestens 50 % der Zellen der Deletionsstämmen die Zellkernverteilung nach Induktion des  $a$ -abhängigen Wachstums und  $a$ -abhängigen Zellzyklusarrests durch Zugabe von  $a1$ -Pheromon gestört. Dies zeigt, dass die Deletion des Ankerproteins *far10* wie in *S. cerevisiae* auch in *U. maydis* zur verfrühten Rückkehr aus dem  $a$ -abhängigen Zellzyklusarrest führt.

### 2.2.2. Verminderte Anzahl an Fusionsereignissen nach Deletion von *far10*

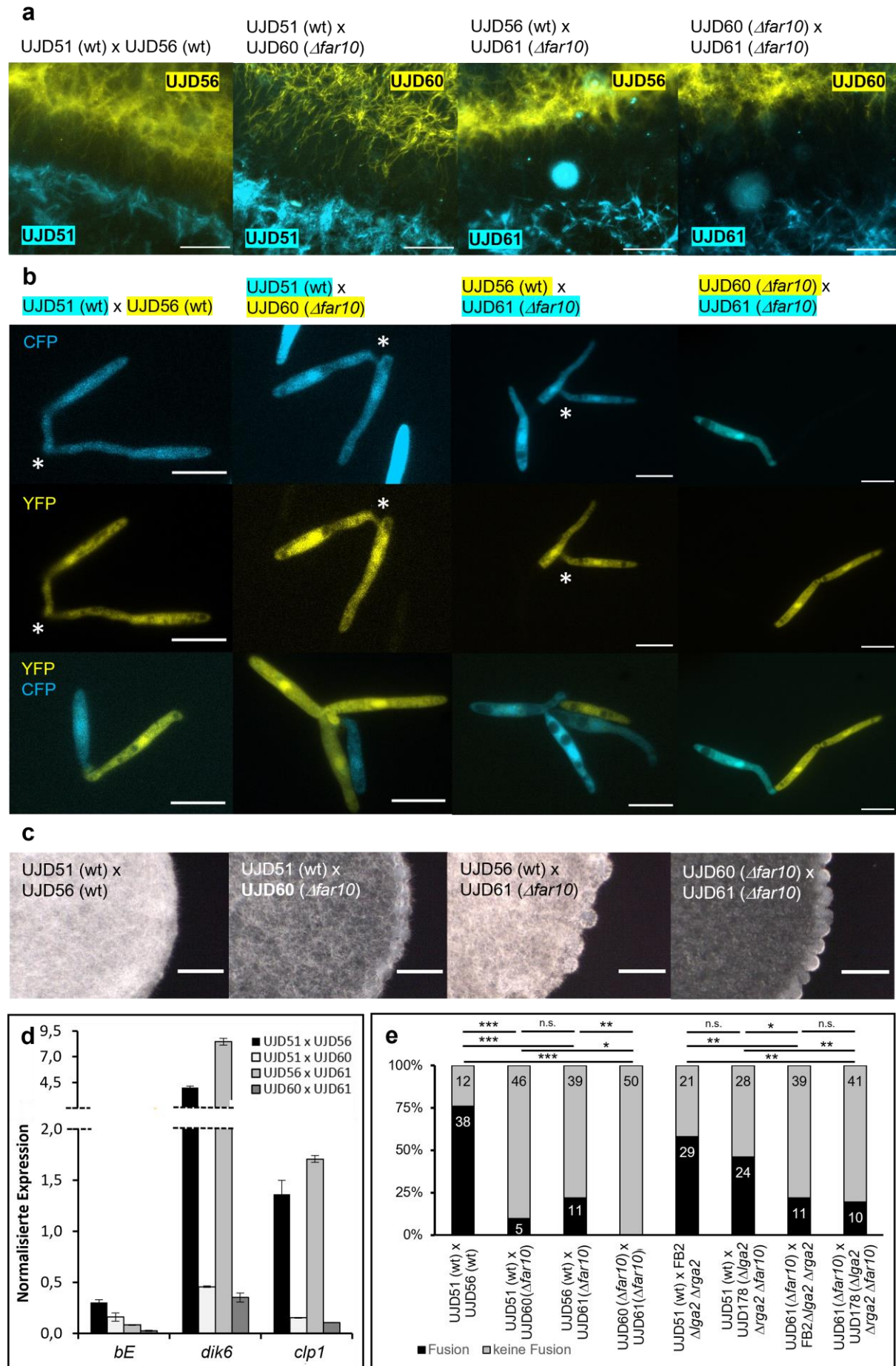
Basierend auf Erkenntnissen aus vorherigen Arbeiten, in denen mittels Kreuzung auf Aktivkohlemedium und Konfrontationsassay bereits gezeigt werden konnte, dass nach der Kreuzung zweier kompatibler Deletionsstämmen deren Fusion ausbleibt (Dennig, 2020), wurde die Fähigkeit zur Fusion nach Deletion des Ankerproteins *far10* weiter untersucht. Hierfür wurde zunächst der Konfrontationsassay mit fluoreszenz-mikroskopisch unterscheidbaren Deletionsstämmen erneut durchgeführt. In den *ip*-Locus der dafür verwendeten Stämme wurde hierfür mehrfach *cfp* bzw. *yfp* unter der Kontrolle des konstitutiven *hxt*-Promotors integriert. Die Kreuzung der beiden Deletionsstämmen UJD60 (*FB2 (ip'[P<sub>hxt1</sub>:yfp]ip<sup>S</sup>)\*n Δumag\_04391::gent<sup>R</sup>*) und UJD61 (*FB1 (ip'[P<sub>hxt1</sub>:cfp]ip<sup>S</sup>)\*n Δumag\_04391::gent<sup>R</sup>*), aber auch die Kreuzung des Deletionsstamms UJD61 mit  $a1$ -Hintergrund mit dem kompatiblen Wildtypstamm UJD56 (*FB2 (ip'[P<sub>hxt1</sub>:yfp]ip<sup>S</sup>)\*n*) zeigte dabei nahezu keine Konjugationshyphen (Abbildung 16a). Bei der Kreuzung des Deletionsstamms UJD60 mit  $a2$ -Hintergrund mit dem kompatiblen Wildtypstamm UJD51 (*FB1 (ip'[P<sub>hxt1</sub>:cfp]ip<sup>S</sup>)\*n*) und der Kreuzung der beiden Wildtypstämmen konnte jedoch die Bildung von Konjugationshyphen



beobachtet werden (Abbildung 16a). Da aber eine Fusion auch in der Kombination der beiden Wildtypstämme im Konfrontationsassay schwer zu erkennen war, wurde mit denselben Stämmen auch ein Mating-Test in flüssigem Aktivkohlemedium durchgeführt. Hierfür wurden die Deletionsstämme und Wildtypstämme in den kompatiblen Kombinationen gemeinsam in flüssigem Aktivkohlemedium inkubiert. In der darauffolgenden Mikroskopie können bei erfolgreicher Fusion zwei Sporidien verbunden durch eine Konjugationshyphale, mit vermischem, und damit aufgrund der CFP- und YFP-Markierung der Ausgangsstämme sowohl blau als auch gelb erscheinendem Zytoplasma beobachtet werden (Abbildung 16b). Nach Kreuzung der beiden Deletionsstämme (UJD60: *FB2 yfp Δfar10* / UJD61: *FB1 cfp Δfar10*) konnten keine fusionierten Sporidien identifiziert werden (Abbildung 16e). Da die Kreuzung der beiden Wildtypstämme eine Fusionsrate von 76 % besaß, die Kreuzung des *far10*-Deletionsstamms mit *a1*-Hintergrund (UJD61: *FB1 cfp Δfar10*) mit dem kompatiblen Wildtypstamm jedoch nur eine Fusionsrate von 22 % und die Kreuzung des *far10*-Deletionsstamms mit *a2*-Hintergrund (UJD60: *FB2 yfp Δfar10*) mit dem kompatiblen Wildtypstamm lediglich eine Fusionsrate von 10 %, konnte eine deutliche Reduktion der Fusionsrate in Kreuzungen mit *far10*-Deletionsstämmen beobachtet werden (Abbildung 16e).

Zusätzlich wurden die Kreuzungen der Deletionsstämme UJD60 (*FB2 yfp Δfar10*) und UJD61 (*FB1 cfp Δfar10*) mit dem jeweils kompatiblen Wildtypstamm UJD51 (*FB1 cfp*) oder UJD56 (*FB2 yfp*) auf Aktivkohlemedium, welche filamentöses Wachstum infolge der Fusion induzieren, wiederholt. Die Kreuzung der beiden Wildtypstämme UJD51(*FB1 cfp*) mit UJD56 (*FB2 yfp*) zeigt filamentöses Wachstum in Form einer flaumigen Kolonie, wohingegen die Kreuzung der beiden Deletionsstämme UJD60 (*FB2 yfp Δfar10*) und UJD61 (*FB1 cfp Δfar10*) kein filamentöses Wachstum, sondern eine eher glatte Kolonie zeigt (Abbildung 16c). Sowohl die Kreuzung des Deletionsstamms UJD60 (*FB2 yfp Δfar10*) mit dem kompatiblen Wildtypstamm UJD51 (*FB1 cfp*) als auch die Kreuzung des Deletionsstamms UJD61 (*FB1 cfp Δfar10*) mit dem kompatiblen Wildtypstamm UJD56, führt zu einer etwas flaumigeren Kolonie (Abbildung 16c). Da die Kolonie der Kreuzung von UJD56 (*FB2 yfp*) und UJD61(*FB1 cfp Δfar10*) flaumiger ist als die Kreuzung von UJD51 (*FB1 cfp*) und UJD60 (*FB2 yfp Δfar10*), wurde ein Zusammenhang mit dem Genotyp des *a*-Locus vermutet.

# Ergebnisse



**Abbildung 16: Eingeschränkte Fusion nach Deletion des Ankerproteins *far10***

**(a)** Konfrontationsassay der Deletionsstämme UJD60 (*FB2* (*ip*<sup>s</sup>[*P*<sub>hxt1</sub>:*yfp*]*ip*<sup>s</sup>)\**n* *Δumag\_04391::gent*<sup>R</sup>) und UJD61 (*FB1* (*ip*<sup>s</sup>[*P*<sub>hxt1</sub>:*cfp*]*ip*<sup>s</sup>)\**n* *Δumag\_04391::gent*<sup>R</sup>) mit kompatibelem Wildtypstamm UJD51 (*FB1* (*ip*<sup>s</sup>[*P*<sub>hxt1</sub>:*cfp*]*ip*<sup>s</sup>)\**n*) / UJD56 (*FB2* (*ip*<sup>s</sup>[*P*<sub>hxt1</sub>:*yfp*]*ip*<sup>s</sup>)\**n*) und untereinander zeigt, dass sowohl in Kombination mit dem Wildtypstamm als auch untereinander lediglich aufeinander zu wachsende Konjugationshyphen jedoch kein Fusion beobachtbar war. Maßstab: 100  $\mu$ m. **(b)/(e)** Kreuzung von UJD60 (*FB2 yfp Δfar10*) und UJD61 (*FB1 cfp Δfar10*) mit kompatibelem Wildtypstamm UJD51 (*FB1 cfp*) / UJD56 (*FB2 yfp*) und untereinander in flüssigem Aktivkohlemedium besitzt deutlich weniger Fusionsereignisse als die Kreuzung von UJD51 (*FB1 cfp*) und UJD56 (*FB2 yfp*). Fusionsereignisse markiert mit einem Stern. Maßstab: 10  $\mu$ m. **(c)** Reduziertes filamentöses Wachstum auf Aktivkohlemedium nach Kreuzung von UJD60 (*FB2 yfp Δfar10*) und UJD61 (*FB1 cfp Δfar10*) mit dem jeweiligen kompatiblen Wildtypstamm UJD51 (*FB1 cfp*) / UJD56 (*FB2 yfp*) und untereinander, weist auf eingeschränkte Fusion nach *far10*-Deletion hin. Maßstab: 1 mm. **(d)** Dargestellt ist die normalisierte Expression ( $\Delta$ Ct) von *bE* und der *b*-abhängigen Gene *dik6* und *clp1* in der Kreuzung der Wildtypstämme (UJD51: *FB1 cfp* / UJD56: *FB2 yfp*), der Kreuzung der Wildtypstämme mit den kompatiblen *far10*-Deletionsstämmen (UJD60: *FB2 yfp Δfar10* / UJD61: *FB1 cfp Δfar10*) und der Kreuzung der *far10*-Deletionsstämmen (UJD60: *FB2 yfp Δfar10* / UJD61: *FB1 cfp Δfar10*) miteinander. Zur Normalisierung diente das Gen *eIF2B*. Das Experiment wurde mit technischen Duplikaten durchgeführt und die Mittelwerte davon sind hier dargestellt. Der Fehlerbalken zeigt die zugehörige Standardabweichung der Mittelwerte der technischen Duplikate. Reduzierte Expression von *b*-abhängigen Genen in Kreuzungen mit *far10*-Deletion im *a2*-Hintergrund, jedoch normale Expression in Kreuzungen mit *far10*-Deletion im *a1*-Hintergrund. **(e)** Quantifizierung der Fusionsereignisse zeigt weniger Fusionen in Kreuzungen von *far10*-Deletion im *a1*-Hintergrund (UJD61: *FB1 cfp Δfar10*) mit Deletion von *lga2* und *rga2* im Wildtyp (*FB2 Δlga2Δrga2*) Anzahl an Fusionen in Kreuzung von *far10*-Deletion im *a2*-Hintergrund mit Deletion von *lga2* und *rga2* (UJD178: *FB2 Δlga2Δrga2, ip*<sup>s</sup>[*P*<sub>hxt1</sub>:*yfp*]*ip*<sup>s</sup>\**n, Δumag\_04391::gent*<sup>R</sup>) im Vergleich zur Kreuzung von Wildtyp mit *a1*-Hintergrund (UJD51: *FB1 cfp*) und Wildtyp mit *a2*-Hintergrund mit Deletion von *lga2* und *rga2* (*FB2 Δlga2Δrga2*) nicht reduziert. Quantifizierung mittels Mann-Whitney-U-Test als signifikant eingestuft. Signifikanz \* p-Wert<0.05, \*\* p-Wert<0.01, \*\*\* p-Wert<0.001.

Um einen Zusammenhang zwischen Genotyp im *a*-Locus und der Fusionsfähigkeit nach *far10*-Deletion zu prüfen, wurde Pilzmaterial der verschiedenen Kreuzungen von Aktivkohlemedium gewonnen, RNA extrahiert, cDNA generiert und die Expression von *b*-abhängigen Genen, welche in Folge der Fusion induziert werden, untersucht. Dazu gehören *bE* (*bEast*), welches durch den *b*-Locus codiert wird, und die Klasse I-Gene der *b*-Regulationskaskade *dik6* und *clp1*. Die Expression der *b*-abhängigen Gene in der Kreuzung des Deletionsstamms mit *a1*-Hintergrund (UJD61: *FB1 cfp Δfar10*) mit dem kompatiblen Wildtypstamm mit *a2*-Hintergrund (UJD56: *FB2 yfp*), zeigte eine mit der Kreuzung der kompatiblen Wildtypstämme UJD51 (*FB1 cfp*) und UJD56 (*FB2 yfp*) vergleichbare Expression (Abbildung 16d). Im Gegensatz dazu war die Expression der *b*-abhängigen Gene in der Kreuzung des Deletionsstamm mit *a2*-Hintergrund (UJD60: *FB2 yfp Δfar10*) mit dem kompatiblen Wildtypstamm mit *a1*-Hintergrund (UJD51: *FB1 cfp*) ebenso wie mit dem Deletionsstamm mit *a1*-Hintergrund (UJD61: *FB1 cfp Δfar10*) deutlich reduziert (Abbildung 16d). Dieses Ergebnis stützt die These, dass es einen Zusammenhang zwischen dem Genotyp im *a*-Locus und der Fusionsfähigkeit der *far10*-Deletion gibt. Dabei ist die Fusion weniger wahrscheinlich, wenn der Fusionspartner mit *a2*-Hintergrund eine *far10*-Deletion besitzt. Da sich der *a2*-Locus lediglich in den zusätzlichen Genen *lga2* und *rga2* vom *a1*-Locus unterscheidet,

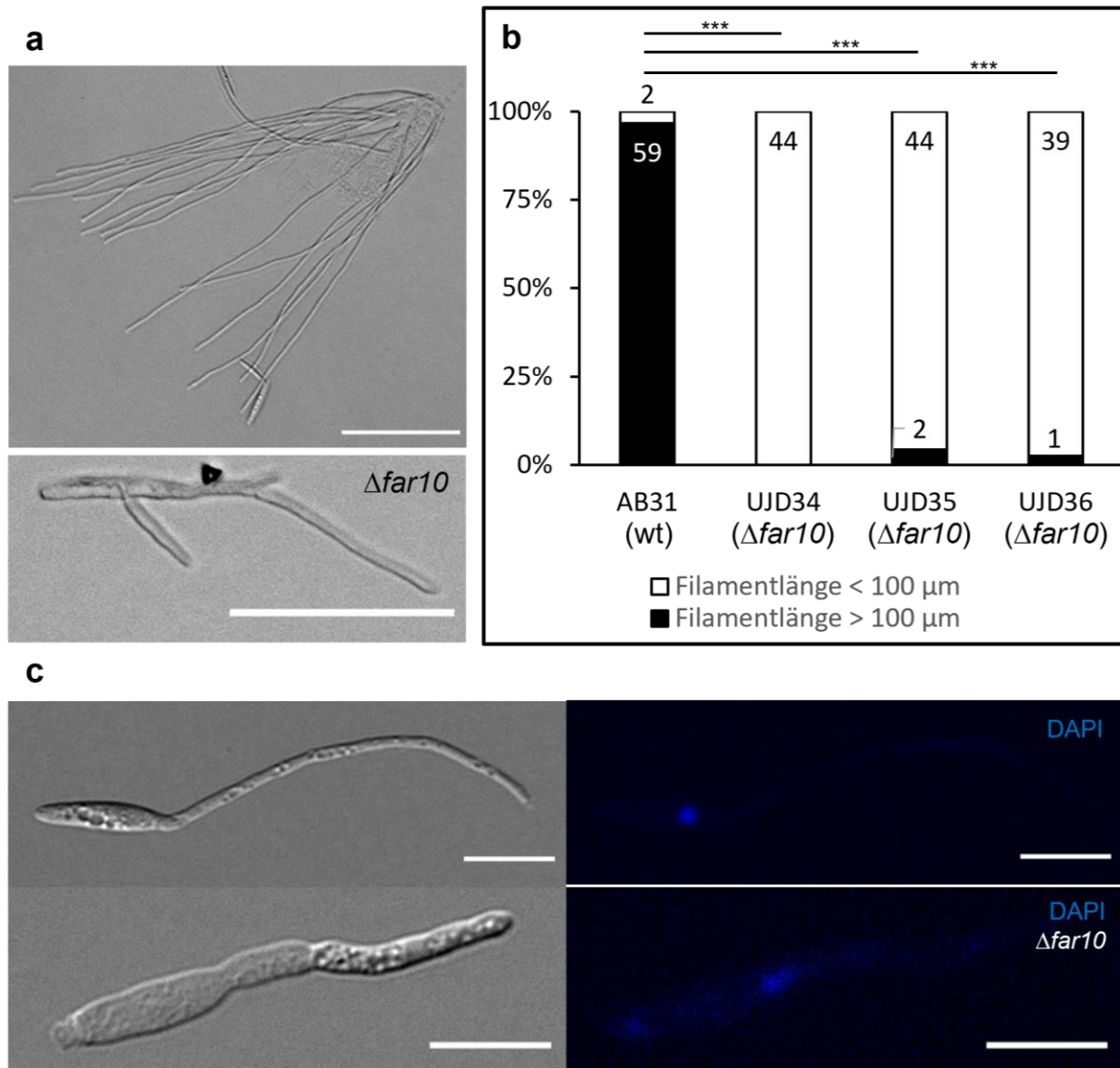
## Ergebnisse

wurden weitere Stämme generiert, die neben der Fluoreszenz zur besseren Visualisierung und der Deletion des Ankerproteins auch über die Deletion von *Iga2* und *rga2* verfügen. In dem mit den neu erstellten Stämmen erneut durchgeführten Mating-Test zeigte sich, dass bei einer Kreuzung der beiden Wildtypstämme UJD51 (*FB1 cfp*) und UJD56 (*FB2 yfp*) 76 % der Fusionsereignisse mit Austausch des Zytoplasmas erfolgreich abgeschlossen wurden (Abbildung 16e). Im Vergleich dazu reduzierte die Deletion von *Iga2* und *rga2* im Wildtypstamm mit *a2*-Hintergrund (*FB2 ΔIga2Δrga2*) bei einer Kreuzung mit dem kompatiblen Wildtypstamm mit *a1*-Hintergrund (UJD51: *FB1 cfp*) die erfolgreichen Fusionsereignisse auf 58 % (Abbildung 16e). Ähnlich dazu resultierte auch die Kreuzung des Wildtyps mit *a1*-Hintergrund (UJD51: *FB1 cfp*) mit dem Deletionsstamm mit Deletion von *Iga2* und *rga2* im *a2*-Hintergrund und *far10*-Deletion (UJD178: *FB2 ΔIga2Δrga2, ip'[P<sub>hxt1</sub>:yfp]ip<sup>s</sup>\*n, Δumag\_04391::gent<sup>R</sup>*) in 48 % erfolgreichen Fusionsereignissen (Abbildung 16e). Kreuzt man jedoch den Deletionsstamm mit *a1*-Hintergrund (UJD61: *FB1 cfp Δfar10*) mit dem Wildtypstamm mit Deletion von *Iga2* und *rga2* im *a2*-Hintergrund (*FB2 ΔIga2Δrga2*) oder mit dem Deletionsstamm mit Deletion von *Iga2* und *rga2* im *a2*-Hintergrund und *far10*-Deletion (UJD178: *FB2 ΔIga2Δrga2 yfp Δfar10*) reduzierte sich die Fusionsfrequenz weiter auf 22 % bzw. 20 % (Abbildung 16e).

### 2.2.3. Reduziertes *b*-abhängiges filamentöses Wachstum nach Deletion von *far10*

In vorhergehenden Arbeiten konnte sowohl beim solopathogenen Deletionsstamm (UJD31: *SG200 Δumag\_04391::gent<sup>R</sup>*) im Vergleich zum solopathogenen Wildtyp (SG200: *a1:mfa2 bE1, ble<sup>R</sup>, bW2*) als auch beim Deletionsstamm (UJD22: *AB31 ip'[rab7:mCherry]ip<sup>s</sup> gfp:rab5a Δumag\_04391::gent<sup>R</sup>*) im Vergleich zum Wildtyp (UKS109: *AB31 ip'[rab7:mCherry]ip<sup>s</sup> gfp:rab5a*), in denen das *b*-abhängige filamentöse Wachstum durch Arabinose im Medium induziert werden kann, kaum filamentöses Wachstum auf Aktivkohlemedium gesehen werden (Abbildung 13b). Im Rahmen dieser Arbeit wurde das verminderte *b*-abhängige filamentöse Wachstum nach Deletion des Ankerproteins *far10* bestätigt, indem in den Deletionsstämmen (UJD34/UJD35/UJD36: *AB31 Δumag\_04391::gent<sup>R</sup>*) und im Wildtypstamm (AB31) das *b*-abhängige filamentöse Wachstum in flüssigem Medium induziert und die Filamente mikroskopisch beurteilt wurden. Dabei konnten im Deletionsstamm signifikant kürzere Filamente als im Wildtypstamm beobachtet werden (Abbildung 17a). Eine

Quantifizierung ergab, dass 97 % der Filamente des Wildtypstammes länger als 100  $\mu\text{m}$  waren, wohingegen die Filamente der *far10*-Deletionsstämme zu über 95 % kürzer als 100  $\mu\text{m}$  waren (Abbildung 17b). Die Betrachtung der Zellkernverteilung ergab jedoch eine normale Verteilung der Zellkerne in den Deletionsstämmen ebenso wie im Wildtypstamm (Abbildung 17c).

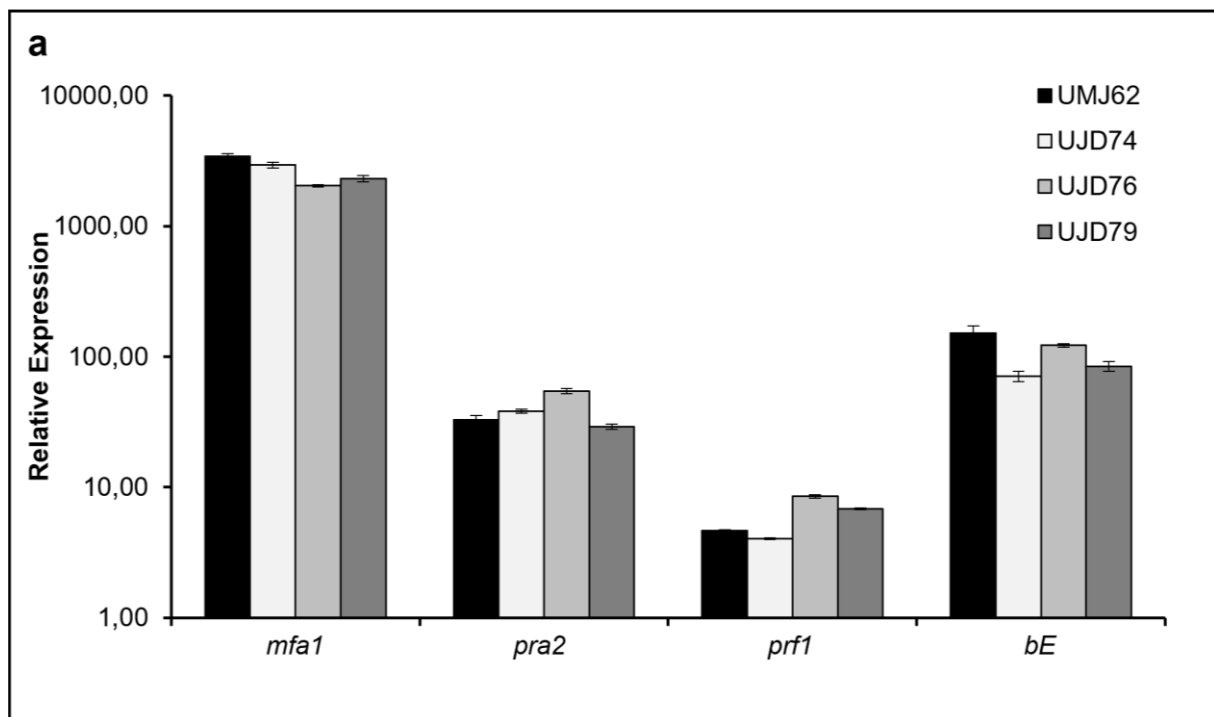


**Abbildung 17: Reduziertes *b*-abhängiges Wachstum nach *far10*-Deletion in Flüssigmedium**

(a) Inkubation in flüssigem Medium führt beim *far10*-Deletionsstamm UJD35 (*AB31  $\Delta umag_04391::gent^R$* ) zu kürzeren *b*-abhängigen Filamenten im Vergleich zum Wildtypstamm AB31. Maßstab: 50  $\mu\text{m}$ . (b) Quantifizierung der Länge der Filamente im Wildtypstamm AB31 und den *far10*-Deletionsstämmen UJD34/UJD35/UJD36 (*AB31  $\Delta umag_04391::gent^R$* ) bestätigt signifikante Reduktion des *b*-abhängigen Wachstums nach *far10*-Deletion in Flüssigmedium. Quantifizierung mittels Mann-Whitney-U-Test als signifikant eingestuft. Signifikanz \* p-Wert<0.05, \*\* p-Wert<0.01, \*\*\* p-Wert<0.001. (c) DAPI-Färbung der Zellkerne in filamentösen Wildtyp- (AB31) und *far10*-Deletionsstamm (UJD36: *AB31  $\Delta far10$* ) zeigt normale Zellkernverteilung. Maßstab: 10  $\mu\text{m}$ .

## 2.2.4. Keine differentielle Expression der Gene der *a*-Signalkaskade nach Deletion von *far10*

Da sowohl das *a*-abhängige als auch das *b*-abhängige filamentöse Wachstum nach Deletion des Ankerproteins *far10* beeinflusst sind, wurde die Expression der Gene der *a*-Signalkaskade Gene geprüft. Verglichen wurden hierzu die Deletionsstämme UJD74, UJD76 und UJD79 (*FB2 Δmfa2::P<sub>crp</sub>::mfa1, Δumag\_04391::gent<sup>R</sup>*) mit dem Wildtypstamm UMJ62 (*FB2 Δmfa2::P<sub>crp</sub>::mfa1*), in welchen mittels Arabinosezugabe ins Medium die Expression von *mfa1* und damit die *a*-abhängige Signalkaskade induziert wurde. Die relative Expression ( $\Delta\Delta C_t$ ) der Gene *mfa1*, *pra2*, *prf1*, *bE*, *rbf1rep1*, *dik6* und *egl1*, welche direkt oder indirekt über *a* induziert werden, wurden mittels qRT-PCR ermittelt. Dabei wurde das Gen *eIF2B* zur Normalisierung und das Gen *mfa1* als Induktionskontrolle verwendet.



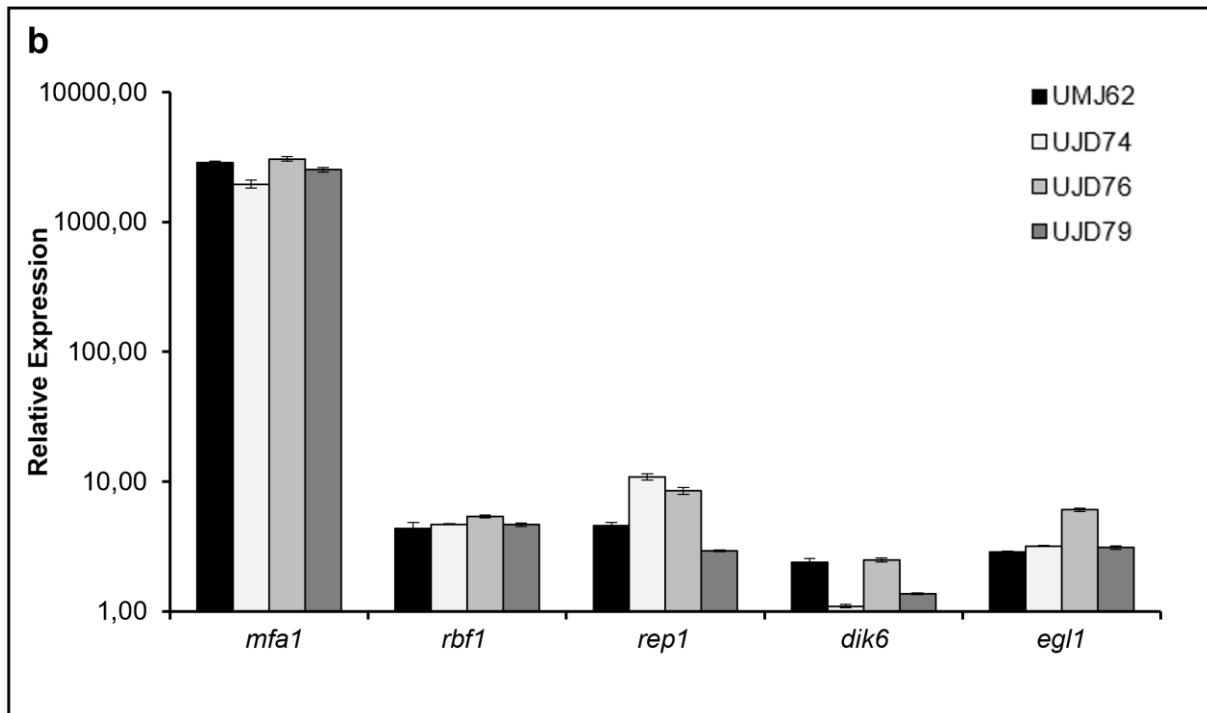


Abbildung 18: Normale Expression der *a*- und *b*-abhängigen Gene nach *far10*-Deletion

Dargestellt ist die relative Expression ( $\Delta\Delta Ct$ ) der *a*-abhängigen Gene *mfa1*, *pra2*, *prf1*, *bE* und der *b*-abhängigen Gene *rbf1*, *rep1*, *dik6* und *egl1* im Wildtypstamm UMJ62 (*FB2  $\Delta mfa2::P_{org}::mfa1$* ) und den *far10*-Deletionsstämmen UJD74/UJD76/UJD79 (*FB2  $\Delta mfa2::P_{org}::mfa1$ ,  $\Delta umag_04391::gent^R$* ). Zur Normalisierung diente das Gen *eIF2B*. Die Berechnung erfolgte relativ zur jeweiligen nicht induzierten Probe. Das Experiment wurde mit biologischen Triplikaten und jeweils technischen Duplikaten durchgeführt. Die Mittelwerte der technischen Duplikate der biologischen Triplikate sind hier dargestellt. Der Fehlerbalken zeigt die zugehörige Standardabweichung der Mittelwerte der technischen Duplikate. Der *far10*-Deletionsstamm zeigt keine veränderte Expression der *a*-abhängigen Gene (a) und *a*-, *rbf*- und filamentabhängigen Gene (b).

Die Ergebnisse der beiden qRT-PCRs zeigen keine veränderte Induktion der betrachteten Gene nach Deletion des Ankerproteins *far10*. Die relative Expression ( $\Delta\Delta Ct$ ) der Induktionskontrolle *mfa1* wird dabei in allen vier Stämmen über 2000-fach induziert, was zeigt, dass die Induktion der Stämme erfolgreich war (Abbildung 18a/b). Die Induktion der *a*-abhängigen Gene *pra2*, *prf1* und *bE* waren in den Deletionsstämmen (UJD74/UJD76/UJD79: UMJ62  $\Delta far10$ ) vergleichbar mit dem Wildtypstamm (UMJ62) induziert (Abbildung 18a). Die relative Expression von *pra2* war mehr als 30-fach, die von *prf1* mehr als vierfach und die von *bE* mehr als 70-fach induziert. Zudem wurde die Expression des sowohl *b*-abhängig als auch in geringerem Maße *a*-abhängig induzierbaren Gens *rbf1* untersucht. Auch die Expression des filamentspezifischen Gens *rep1*, des Rbf1-induzierten Gens *dik6* und des filamentspezifischen Gens *egl1* wurde gemessen. Die Induktion der Gene *rbf1*, *rep1*, *dik6* und *egl1* war in den *far10*-Deletionsstämmen vergleichbar mit dem Wildtypstamm (Abbildung 18b). Die relative Expression von *rbf1* war mehr als vierfach, die von *rep1* mehr als dreifach und die von *egl1* mehr als dreifach erhöht. Die Expression von *dik6*

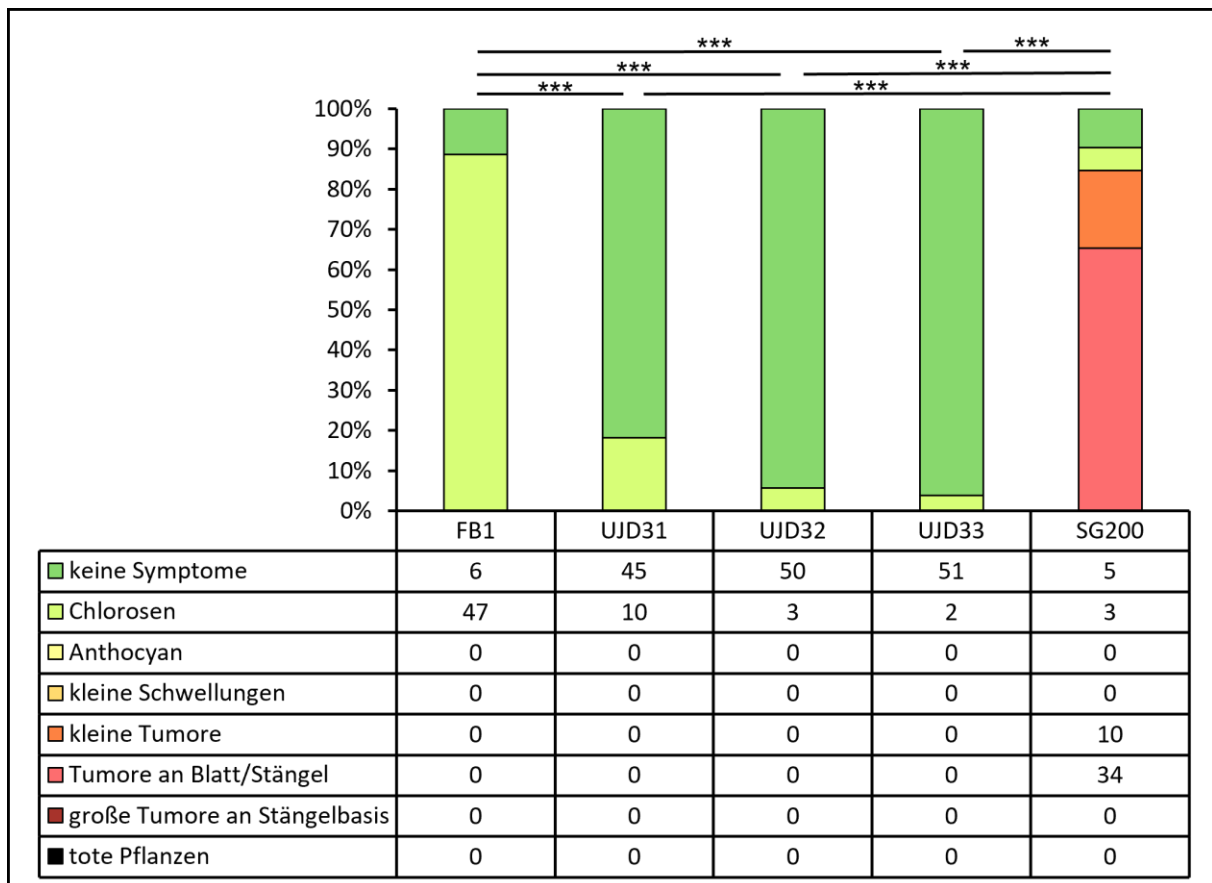
## Ergebnisse

war im Wildtypstamm UMJ62 und im Deletionsstamm UJD76 (*UMJ62 Δfar10*) mehr als zweifach induziert. In den anderen beiden Deletionsstämmen war kaum eine Induktion zu sehen, was vermutlich durch die sehr geringe Expressionswerte ( $\Delta\text{Ct}$ ) erklärbar ist (Anhang: Abbildung 41). Die Deletion von *far10* besitzt somit keinen Einfluss auf die Induktion der *a*-, *b*- und filamentabhängig induzierten Gene.

### 2.2.5. *far10*-Deletion resultiert in Apathogenität

Vorarbeiten haben gezeigt, dass die Infektion von Maispflanzen mit solopathogenen *far10*-Deletionsstämmen deutlich weniger und schwächere Symptome zeigen als die Infektion mit einem solopathogenen Wildtypstamm (Abbildung 13d). Eine Wiederholung der Infektionsstudien im Rahmen dieser Arbeit bestätigte, dass die Symptome nach *far10*-Deletion signifikant reduziert sind. Außerdem zeigte die Wiederholung, dass nach Infektion mit einem solopathogenen Deletionsstamm (UJD31/UJD32/UJD33: *SG200 Δumag\_04391::gent<sup>R</sup>*) die Menge und Stärke der Symptome sogar im Vergleich zu einer Infektion mit einem haploiden Wildtypstamm (FB1: *a1 b1*) signifikant reduziert war. So waren lediglich bei maximal 20 % der Pflanzen infiziert mit einem Deletionsstamm Chlorosen als einziges Symptom zu erkennen, wohingegen Pflanzen infiziert mit dem haploiden Wildtypstamm zu über 80 % Chlorosen aufwiesen (Abbildung 19). Eine Infektion mit dem solopathogenen Wildtypstamm (SG200) hingegen führte zu über 65 % zu Tumoren an Blatt oder Stängel, zu knapp 20 % zu kleinen Tumoren und zu knapp 6 % zu Chlorosen (Abbildung 19).



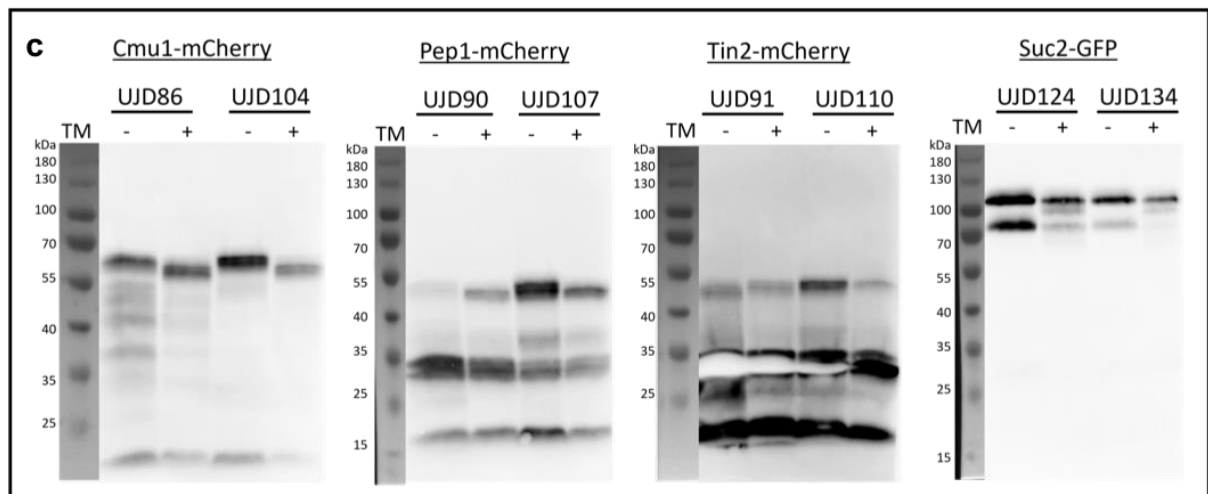
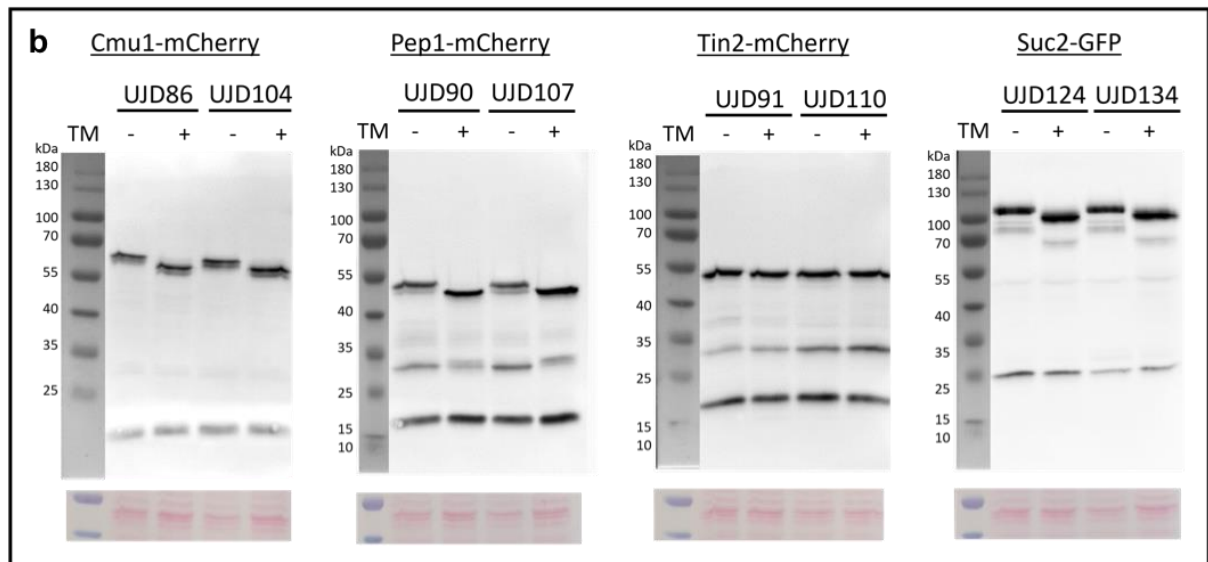
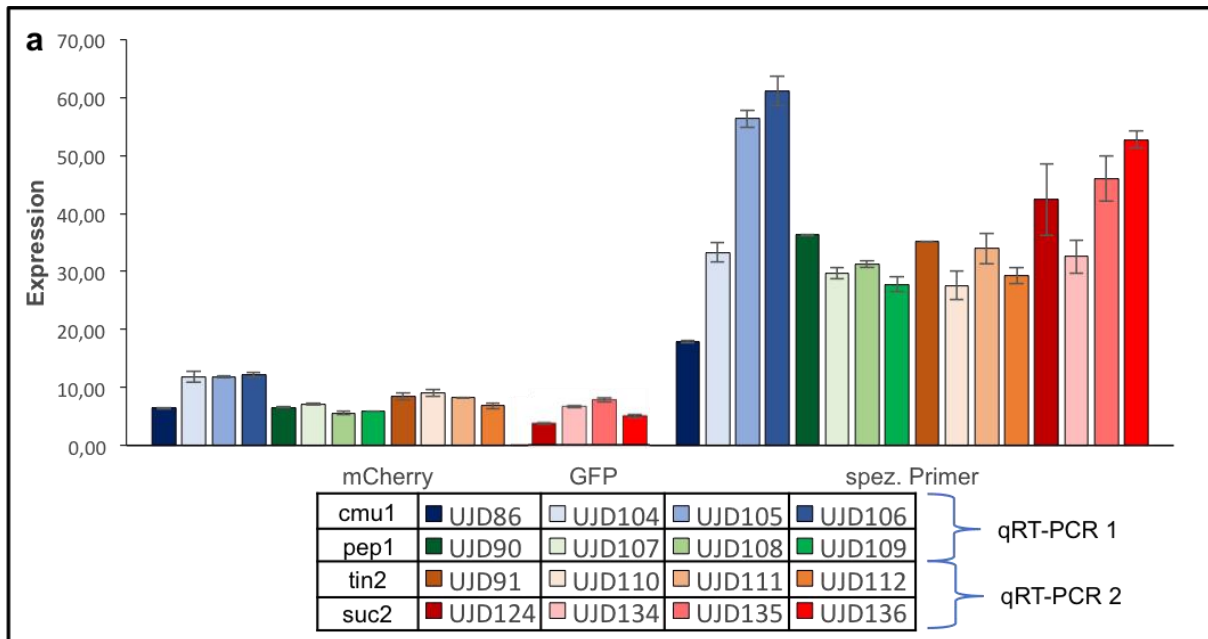


**Abbildung 19: Pflanzenantwort auf nichtpathogene Sporidien mit *far10*-Deletion im Vergleich zum haploiden Wildtyp signifikant reduziert**

Infektion von sieben Tagen alten Maispflanzen der Sorte „Early Golden Bantam“ zur Beurteilung der Infektionssymptome nach weiteren sieben Tagen. Infektion mit solopathogenem Wildtypstamm SG200, haploiden Wildtypstamm FB1 und den solopathogenen *far10*-Deletionstämmen UJD31/UJD32/UJD33 (*SG200 Δumag\_04391::gent<sup>R</sup>*). Die *far10*-Deletionstämmen zeigte dabei eine signifikante Reduktion der Infektionssymptome im Vergleich zum solopathogenen Wildtypstamm, aber auch zum ungekreuzten Wildtypstamm. Quantifizierung der Symptome mittels Mann-Whitney-U-Test als signifikant eingestuft. Signifikanz \* p-Wert<0.05, \*\* p-Wert<0.01, \*\*\* p-Wert<0.001.

### 2.2.6. Far10 hat keinen Einfluss auf die Sekretion, die Endozytose, die Lokalisation von $\alpha$ -Tubulin und Reaktion auf ER-Stress

In vorherigen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die Anzahl der Sporidien des *far10*-Deletionsstamms auf der Blattoberfläche von Maispflanzen drei Tage nach der Infektion im Vergleich zur Anzahl an Sporidien des Wildtypstammes deutlich reduziert war (Abbildung 13e). Im Gegensatz zum Wildtypstamm findet man zudem keine Filamente des Deletionsstamms auf der Blattoberfläche oder innerhalb der Pflanze. Aus diesem Grund wurde vermutet, dass die Sporidien nach Deletion von *far10* eine verminderte Fähigkeit zur Anheftung an die Blattoberfläche besitzen. Bisher ist nicht bekannt, wie *U. maydis* sich an die Blattoberfläche anheftet und auch für *Magnaporthe grisea*, welcher eine *spore tip mucilage* (STM) bildet, um sich an der Blattoberfläche von Reis anzuheften, ist die Zusammensetzung der STM nicht bekannt (Koga and Nakayachi, 2004). Die Vermutung liegt jedoch nahe, dass die Sekretion von Proteinen wichtig für die Bildung einer Anheftungsstruktur ist, weshalb im Rahmen dieser Arbeit die Expression und die Sekretion der Invertase Suc2 (*sucrose-cleaving enzyme 2*) und der Effektoren Cmu1 (*chorismate mutase 1*), Pep1 (*protein essential during penetration 1*) und Tin2 (*TRF1-interacting nuclear protein 2*) getestet wurde, welche alle über ein Signalpeptid für die konventionelle Sekretion verfügen. Da das *suc2*-Gen durch zwei ATGs für zwei distinkte mRNAs codiert, kann Suc2 sowohl zytoplasmatisch, als auch sekretiert vorliegen (Goos, 2009). Die Expression ( $\Delta$ Ct) von *cmu1*, *pep1*, *tin2* und *suc2* wurde mittels qRT-PCR geprüft (Abbildung 20a). Da es sich bei den untersuchten Proteinen um Fusionsproteine handelt, wurde auch die Expression ( $\Delta$ Ct) von mCherry und GFP untersucht.



## Ergebnisse

### Abbildung 20: Deletion von *far10* besitzt keinen Einfluss auf die Expression und Sekretion der Invertase Suc2 und der Effektoren Cmu1, Pep1 und Tin2

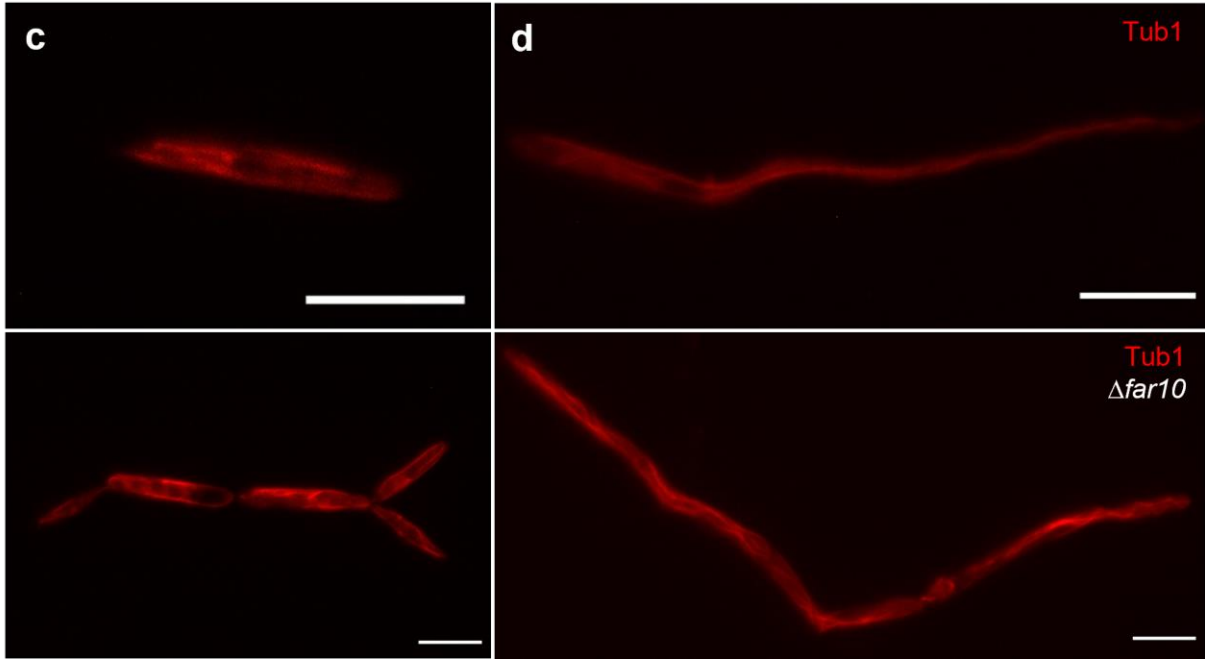
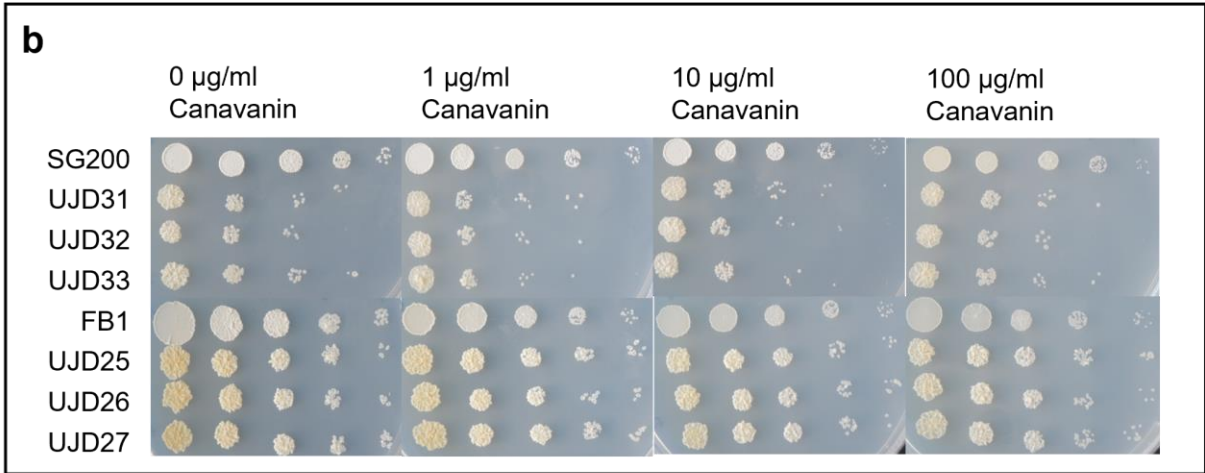
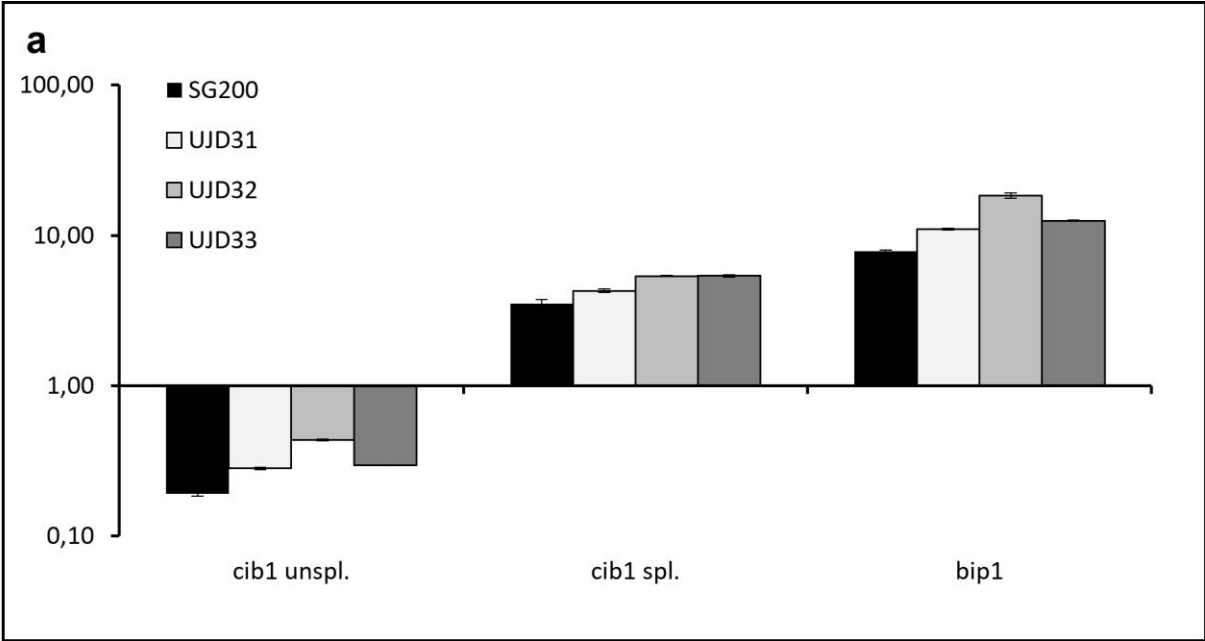
Die Wildtypstämme UJD86 (*AB31 ip'[P<sub>otef</sub>:cmu1:mcherry]ip<sup>s</sup>*), UJD90 (*AB31 ip'[P<sub>otef</sub>:pep1:mcherry]ip<sup>s</sup>*), UJD91 (*AB31 ip'[P<sub>otef</sub>:tin2:mcherry]ip<sup>s</sup>*) und UJD124 (*AB31 ip'[P<sub>otef</sub>:suc2:gfp]ip<sup>s</sup>*) wurden ebenso wie die *far10*-Deletionsstämme UJD104/UJD105/UJD106 (*AB31 ip'[P<sub>otef</sub>:cmu1:mcherry]ip<sup>s</sup>, Δmag\_04391::gent<sup>R</sup>*), UJD107/UJD108/UJD109 (*AB31 ip'[P<sub>otef</sub>:pep1:mcherry]ip<sup>s</sup>, Δmag\_04391::gent<sup>R</sup>*), UJD110/UJ111/UJD112 (*AB31 ip'[P<sub>otef</sub>:tin2:mcherry]ip<sup>s</sup>, Δmag\_04391::gent<sup>R</sup>*) und UJD134/UJD135/UJD136 (*AB31 ip'[P<sub>otef</sub>:suc2:gfp]ip<sup>s</sup>, Δmag\_04391::gent<sup>R</sup>*) in CM-Glukose angezogen. **(a)** Dargestellt ist die Expression ( $\Delta$ Ct) der Gene *cmu1*, *pep1*, *tin2*, *suc2*, *mCherry* und *gfp*. Zur Normalisierung diente das Gen *eIF2B*. Das Experiment wurde mit biologischen Triplikaten und jeweils technischen Duplikaten durchgeführt. Die Mittelwerte der technischen Duplikate der biologischen Triplikate sind hier dargestellt. Der Fehlerbalken zeigt die Standardabweichung der Mittelwerte der technischen Duplikate. Lediglich die Expression von *cmu1* im *far10*-Deletionsstamm ist im Vergleich zur Expression im Wildtypstamm erhöht. Die Expression der Gene *pep1*, *tin2* und *suc2* war in den *far10*-Deletionsstämmen vergleichbar mit der Expression im jeweiligen Wildtypstamm. **(b)-(c)** Für den Western Blot wurden im Laufe der Proteinpräparation die cytoplasmatischen Proteine (Zellpellet, **b**) von den sekretierten Proteinen (Überstand, **c**) separiert. Die Detektion des Western Blots erfolgte im Fall von Suc2 mittels GFP-Antikörpern und für die Proteine Cmu1, Pep1 und Tin2 mittels mCherry-Antikörpern. Die Proteine besitzen eine errechnete Größe von 60 kDa (Cmu1-mCherry), 46 kDa (Pep1-mCherry), 51 kDa (Tin2-mCherry) und aufgrund der zwei verschiedenen ATGs im ORF von Suc2 99 bzw. 94 kDa (Suc2-GFP). Zugabe von Tunicamycin zur zusätzlichen Induktion von Sekretion aufgrund von ER-Stress. Sowohl innerhalb der Zellen (**b**) als auch sekretiert im Überstand (**c**) konnten die Fusionsproteine unabhängig der Tunicamycinzugabe gefunden werden. Experiment durchgeführt von Nora Kühne, Georg-August-Universität Göttingen.

Die Expression von mCherry bzw. GFP war in allen untersuchten Stämmen auf einem vergleichbarem Level. Die Expression von *cmu1* war in den *far10*-Deletionsstämmen (UJD104/UJD105/UJD106: *AB31 ip'[P<sub>otef</sub>:cmu1:mcherry]ip<sup>s</sup>, Δmag\_04391::gent<sup>R</sup>*) im Vergleich zum Wildtypstamm (UJD86: *AB31 ip'[P<sub>otef</sub>:cmu1:mcherry]ip<sup>s</sup>*) erhöht. Die Expression von *pep1* war in den *far10*-Deletionsstämmen (UJD107/UJD108/UJD109: *AB31 ip'[P<sub>otef</sub>:pep1:mcherry]ip<sup>s</sup>, Δmag\_04391::gent<sup>R</sup>*) vergleichbar mit der Expression im Wildtypstamm (UJD90: *AB31 ip'[P<sub>otef</sub>:pep1:mcherry]ip<sup>s</sup>*). Auch das Expressionslevel von *tin2* in den *far10*-Deletionsstämmen (UJD110/UJD111/UJD112: *AB31 ip'[P<sub>otef</sub>:tin2:mcherry]ip<sup>s</sup>, Δmag\_04391::gent<sup>R</sup>*) entsprach dem Level im Wildtypstamm (UJD91: *AB31 ip'[P<sub>otef</sub>:tin2:mcherry]ip<sup>s</sup>*). Das Expressionslevel von *suc2* in den *far10*-Deletionsstämmen (UJD134/UJD135/UJD136: *AB31 ip'[P<sub>otef</sub>:suc2:gfp]ip<sup>s</sup>, Δmag\_04391::gent<sup>R</sup>*) glich dem Expressionslevel im Wildtypstamm (UJD124: *AB31 ip'[P<sub>otef</sub>:suc2:gfp]ip<sup>s</sup>*). Für die darauffolgende Western Blot Analyse konnte somit ausgeschlossen werden, dass ein geringeres Expressionslevel für ein fehlendes Signal verantwortlich ist. Auch besitzt Far10 in *U. maydis* somit vermutlich keinen Einfluss auf die Expression von Effektoren. Die Western Blot Analyse von Proteinen aus pelletierten *U. maydis* Zellen und dem Überstand wurde in Zusammenarbeit mit Nora Kühne von der Georg-August-Universität Göttingen durchgeführt. Die Proteine wurden mittels Vivaspin®20 (Sartorius) aus dem Überstand extrahiert und gemeinsam mit aus den Zellen extrahiertem Gesamtprotein mittels SDS-Page aufgetrennt und nachfolgend per Western Blot analysiert. Die Fusionsproteine haben eine errechnete

Größe von 60 kDa (Cmu1-mCherry), 46 kDa (Pep1-mCherry), 51 kDa (Tin2-mCherry) und aufgrund der zwei ATGs im ORF von Suc2 99 bzw. 94 kDa (Suc2-GFP). Es konnte gezeigt werden, dass auch nach Deletion von *far10* Suc2, Cmu1, Pep1 und Tin2 sowohl im Pellet (Abbildung 20b), als auch sekretiert im Überstand zu finden waren (Abbildung 20c). Zusätzliche Banden entstanden aufgrund von freiem GFP (27 kDa), freiem mCherry (28 kDa) und dessen Abbauprodukten. Durch die Zugabe von 5 µg/ml Tunicamycin wurde zudem ER-Stress herbeigeführt, um die Proteinsekretion zusätzlich zu fördern (Heimel *et al.*, 2013). Die Zugabe von Tunicamycin resultierte dabei bei Cmu1, Pep1 und Suc2 in einer leicht verminderten Bandengröße, die möglicherweise durch eine fehlende N-Glykosylierung der Proteine in Folge der Zugabe von Tunicamycin erklärbar ist (Pinter *et al.*, 2019).

Fundamental für die erfolgreiche Sekretion ist unter anderem die korrekte Faltung von Proteinen. Ausgelöst durch fehlgefaltete Proteine im ER wird bei ER-Stress die Homöostase im ER durch die *unfolded protein response* (UPR) aufrechterhalten (Walter and Ron, 2011). Die mRNA des zentralen UPR-Regulator Cib1 (*Cip1 interacting bZip 1*) wird infolge von ER-Stress gespleißt, und dadurch auch die Expression des Gens *bip1* erhöht, welches durch die UPR induziert wird (Heimel *et al.*, 2013). Nach Zugabe von 3 mM Dithiothreitol (DTT) zum Wildtypstamm (SG200) und den Deletionsstämmen (UJD31/UJD32/UJD33: *SG200 Δumag\_04391::gent<sup>R</sup>*) wurde die Menge an mRNA von nicht gespleißtem und gespleißtem *cib1* und die Expression von *bip1* geprüft (Abbildung 21a). Dabei konnte beobachtet werden, dass sich sowohl im Wildtypstamm als auch in den Deletionsstämmen nach DTT-Zugabe die Menge der nicht gespleißten *cib1*-mRNA mehr als halbiert, die Menge an gespleißter *cib1*-mRNA jedoch verfünffacht hat. Auch die Expression von *bip1* wurde durch die Zugabe von DTT in allen Stämmen um den Faktor zehn induziert.

Ergebnisse



**Abbildung 21: Die *far10*-Deletion hat keinen Einfluss auf die Reaktion auf ER-Stress, die Endozytose und die Lokalisierung von  $\alpha$ -Tubulin**

**(a)** Anzucht des Wildtypstammes SG200 und der *far10*-Deletionsstämme UJD31/UJD32/UJD33 (*SG200  $\Delta$ umag\_04391::gent<sup>r</sup>*) in YNB-Glukose. Induktion von ER-Stress über drei Stunden durch Zugabe von 3 mM DTT. qRT-PCR auf cDNA, welche aus RNA generiert wurde, die aus induzierten und uninduzierten Zellen geerntet wurde. Dargestellt ist die relative Expression ( $\Delta\Delta$ Ct) der Gene *cib1* (ungespleißt), *cib1* (gespleißt) und *bip1* in SG200 und UJD31, UJD32 und UJD33 (*SG200  $\Delta$ far10*). Zur Normalisierung diente das Gen *eIF2B*. Die Berechnung erfolgte relativ zur jeweiligen nicht induzierten Probe. Das Experiment wurde mit biologischen Triplikaten und jeweils technischen Duplikaten durchgeführt. Die Mittelwerte der technischen Duplikate der biologischen Triplikate sind hier dargestellt. Der Fehlerbalken zeigt die Standardabweichung der Mittelwerte der technischen Duplikate. Die relative Expression von nicht gespleißtem *cib1* nimmt nach Induktion des ER-Stresses in Wildtyp- und Deletionsstämmen ab, wohingegen die relative Expression von gespleißtem *cib1* und *bip1* in allen Stämmen steigt. **(b)** Wachstum der Wildtypstämme FB1 und SG200 und der Deletionsstämme UJD25/UJD26/UJD27 (*FB1  $\Delta$ umag\_04391::gent<sup>r</sup>*) und UJD31/UJD32/UJD33 (*SG200  $\Delta$ far10*) auf Minimalmedium mit verschiedenen Canavanin-Konzentrationen zeigt unverändertes Wachstum nach *far10*-Deletion und damit kein Einfluss von Far10 auf die Endozytose. Aufgrund des Zytokinesedefekts der *far10*-Deletionsstämme kam es zum heterogenen Erscheinungsbild der Kolonien. **(c)-(d)** Lokalisierung von mCherry-Tub1 im Wildtypstamm URA2m (*AB31 (ip[P<sub>otef</sub>:mcherry:tub1]ip<sup>s</sup>)\*n*) und im *far10*-Deletionsstamm UJD122 (*AB31 ip[P<sub>otef</sub>:mcherry:tub1]ip<sup>s</sup>\*n,  $\Delta$ umag\_04391::gent<sup>r</sup>*). Trotz Zytokinese- und Polaritätsdefekt in den Deletionsstämmen war keine veränderte Lokalisierung von  $\alpha$ -Tubulin in Sporidien **(c)** und Filamenten **(d)** im Vergleich zum Wildtyp erkennbar. Maßstab: 10  $\mu$ m.

Ebenfalls wichtig für die Sekretion ist eine funktionierende Endo- und Exozytose. Um zu beurteilen, ob die Endozytose nach Deletion von *far10* noch intakt ist, wurde daher ein Canavanin-Assay durchgeführt. Wenn aufgrund von Defekten in der Endozytose oder dem Recycling die Argininpermease Can1 nicht mehr aus der Plasmamembran entfernt wird, kommt es während des Canavanin-Assays zur vermehrten Aufnahme des toxischen Arginin-Analogons Canavanin in die Zelle. Dies führt zum Einbau von Canavanin in entstehende Aminosäureketten, der Falschfaltung der Canavanin-enthaltenden Proteine und dadurch zum Tod der Zelle (Lin *et al.*, 2008; Shi *et al.*, 2011; Cabrera *et al.*, 2013a). Die Wildtypstämme (FB1 und SG200) und die Deletionsstämme (UJD25/UJD26/UJD27: *FB1  $\Delta$ far10* und UJD31/UJD32/UJD33: *SG200  $\Delta$ far10*) wurden hierfür auf Minimalmedium mit Canavanin in verschiedenen Konzentrationen (1  $\mu$ g/ml, mit 10  $\mu$ g/ml und mit 100  $\mu$ g/ml) getropft. Bei den verwendeten Canavanin-Konzentrationen konnte weder bei den Wildtyp- noch den Deletionsstämmen eine Sensitivität gegenüber Canavanin beobachtet werden, weshalb davon auszugehen ist, dass die Endozytose und das Recycling auch nach Deletion von *far10* intakt sind (Abbildung 21b).

In vorherigen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die Deletion von *far10* zur Reduktion der Anzahl der motilen frühen Endosomen führt (Abbildung 13f). Far10 besitzt somit auf bisher unbekannte Weise Einfluss auf die Endozytose in *U. maydis*. Daher wurde die Lokalisierung von  $\alpha$ -Tubulin geprüft, welches als Bestandteil der Mikrotubuli für die Endo- und Exozytose und den Langstreckentransport in *U. maydis* Hyphen essenziell ist. Dazu wurde die Lokalisation des Fusionsproteins mCherry-Tub1

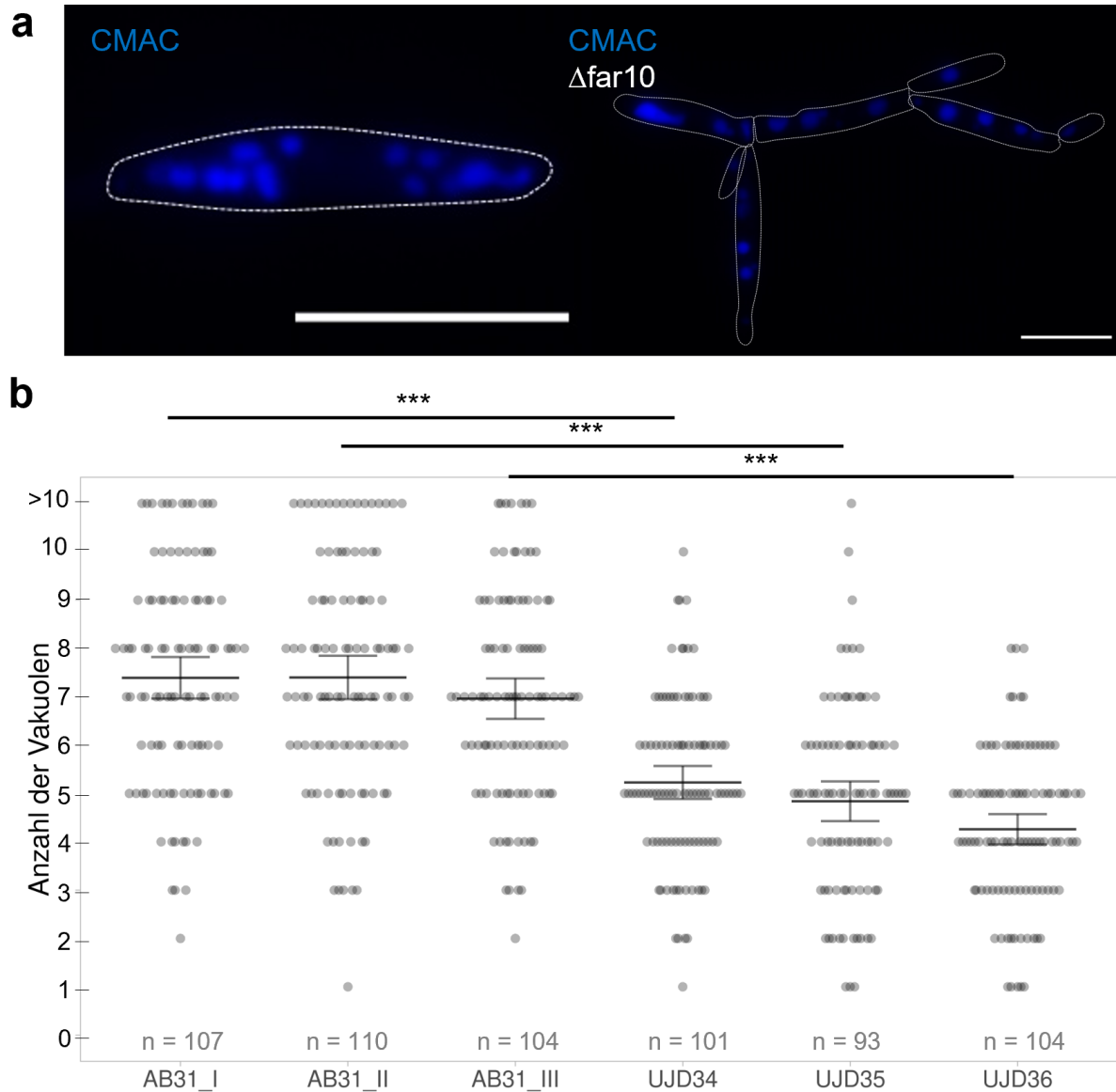
## Ergebnisse

in den *far10*-Deletionsstämmen (UJD121/UJD122/UJD123: AB31 *ip'[P<sub>otef</sub>:mcherry:tub1]jip<sup>s</sup>\*n*,  $\Delta$ *umag\_04391::gent<sup>R</sup>*) mit der Lokalisation im Wildtypstamm (URA2m: AB31 (*ip'[P<sub>otef</sub>:mcherry:tub1]jip<sup>s</sup>)\*n*) verglichen. Sowohl in den Sporidien (Abbildung 21c), als auch in den Filamenten (Abbildung 21d), konnte nach Deletion von *far10* keine veränderte Lokalisierung des  $\alpha$ -Tubulins beobachtet werden.

### 2.2.7. *far10*-Deletion führt zu reduzierter Anzahl an Vakuolen in Sporidien

Für *S. cerevisiae* konnte gezeigt werden, dass die Deletion von *far9*, dem Homolog von *far10*, zu einer abnormalen Vakuolenmorphologie führt (Bonangelino *et al.*, 2002). Da frühe Endosomen im Laufe der Endozytose zu späten Endosomen reifen, welche wiederum mit Vakuolen fusionieren, könnte die reduzierte Anzahl an motilen frühen Endosomen nach *far10*-Deletion die Anzahl der Vakuolen verändern. Aus diesem Grund wurden im Rahmen dieser Arbeit die Vakuolen nach Deletion von *far10* untersucht. Hierfür wurden die Vakuolen mittels 7-Amino-4-Chlormethylcumarin (CMAC) angefärbt und im Wildtypstamm (AB31) und den *far10*-Deletionsstämmen (UJD34/UJD35/UJD36: AB31  $\Delta$ *umag\_04391::gent<sup>R</sup>*) mikroskopisch beurteilt. Die Anzahl der Vakuolen innerhalb eines Kompartimentes war dabei nach Deletion von *far10* in Sporidien reduziert (Abbildung 22a). Im Durchschnitt besaßen Sporidien des Wildtypstammes sieben Vakuolen, wohingegen die Kompartimente der *far10*-Deletionsstämme lediglich über fünf Vakuolen verfügten. Eine Quantifizierung mit biologischen Triplikaten zeigt, dass die Reduktion der Vakuolen in den drei unabhängigen Transformanten mit *far10*-Deletion im Vergleich zum Wildtyp signifikant ist (UJD34: p-Wert  $1.0569 \cdot 10^{-11}$ , UJD35: p-Wert  $4.0234 \cdot 10^{-13}$ , UJD36: p-Wert 0) (Abbildung 22b).





**Abbildung 22: Reduzierte Anzahl der Vakuolen nach *far10*-Deletion**

(a) Reduzierte Anzahl an Vakuolen im *far10*-Deletionsstamm UJD36 (*AB31 Δumag\_04391::gent<sup>R</sup>*) mit Zytokinesedefekt im Vergleich zum Wildtypstamm AB31. Färbung der Vakuolen mittels CMAC. Maßstab: 10  $\mu$ m. (b) Quantifizierung der Vakuolenanzahl im Wildtypstamm AB31 und den Deletionsstämmen UJD34/UJD35/UJD36 (*AB31 Δumag\_04391::gent<sup>R</sup>*). Quantifizierung mittels Mann-Whitney-U-Test als signifikant eingestuft. Signifikanz \* p-Wert<0.05, \*\* p-Wert<0.01, \*\*\* p-Wert<0.001.

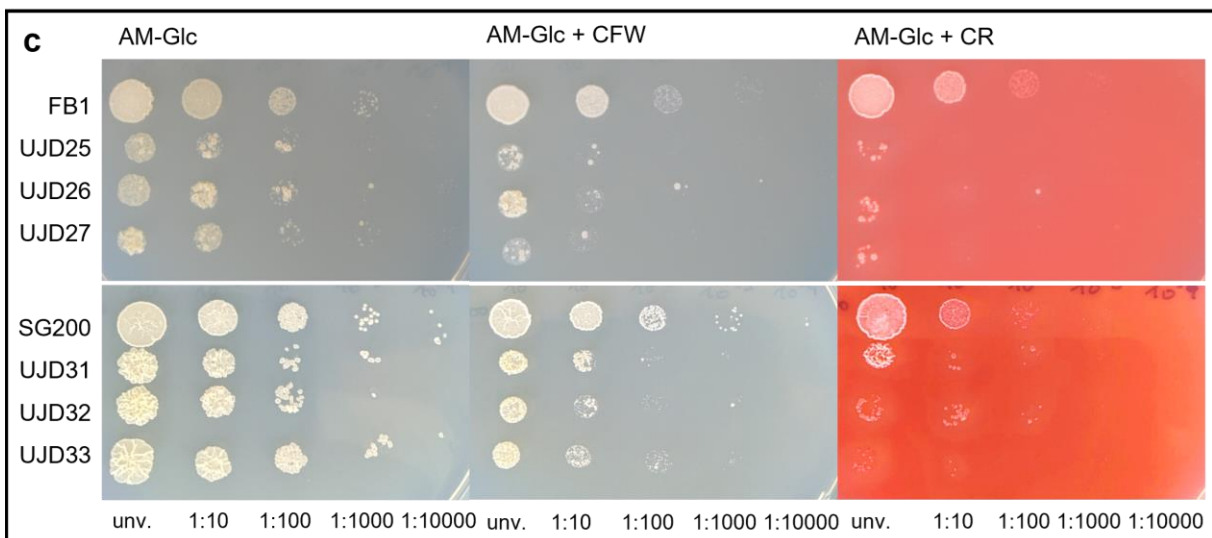
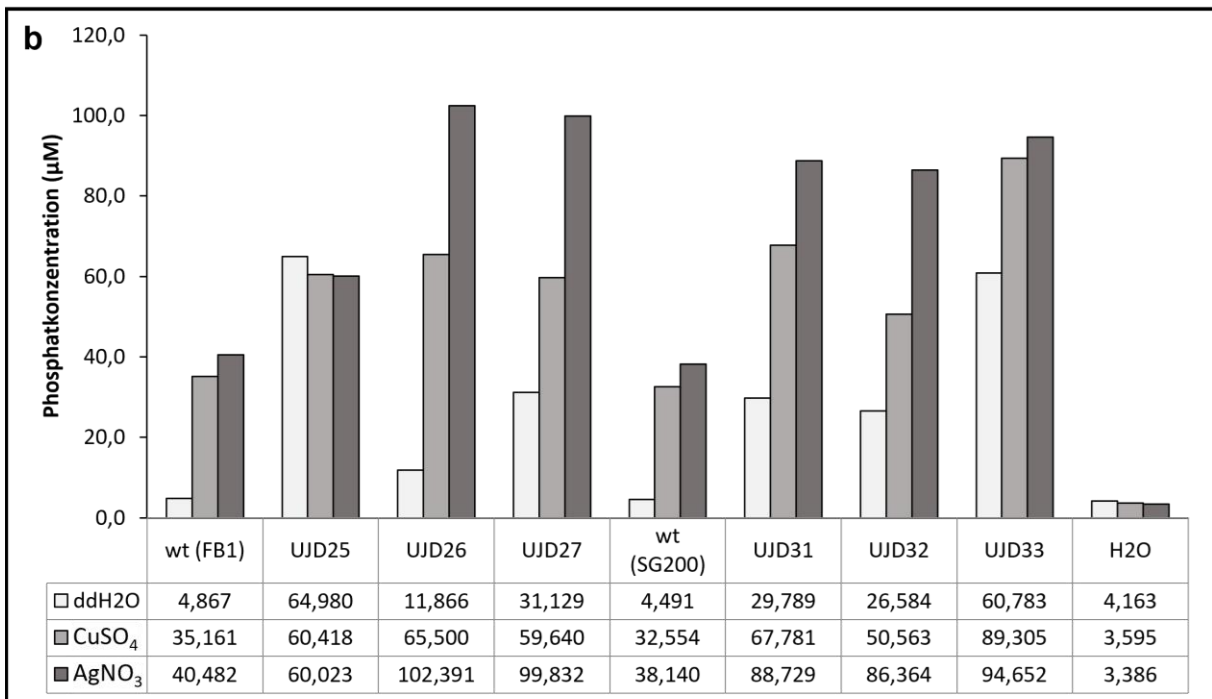
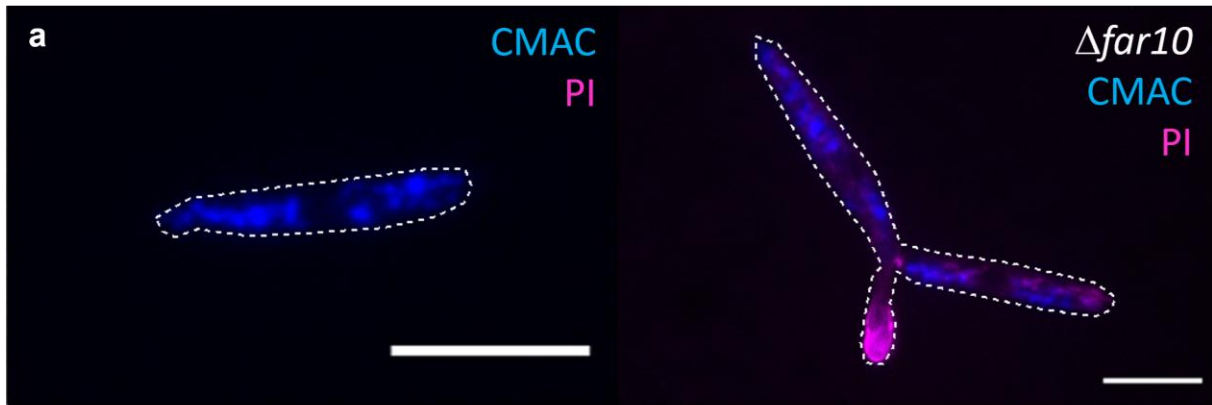
### 2.2.8. Reduzierte Zellwand- und Membranintegrität nach Deletion von *far10*

Aufgrund des Zytokinese- und Polaritätsdefekts wurde die Vitalität der Zellen mittels eines *life/death-stainings* mit CMAC und Propidiumiodid (PI) geprüft. Bei CMAC handelt es sich dabei um den Marker für lebende Zellen, da CMAC zwar frei in die Zelle diffundieren kann, jedoch innerhalb der Zelle prozessiert werden muss, um mikroskopisch detektierbar zu sein. Dabei reagiert die Chlormethylgruppe von CMAC mit Thiol-Gruppen aus Glutathion S-Transferase vermittelten Reaktionen, wodurch Glutathion-Konjugate unter ATP-Verbrauch in die Vakuole transportiert werden und diese angefärbt wird (Doenecke, 2005; Thermo-Fisher, 2018). Da PI nicht membrangängig ist, kann es nur in Zellen ohne intakte Zellwand und Plasmamembran aufgenommen werden. Innerhalb der Zellen interkaliert PI in die DNA, wodurch die rote Farbe verstärkt wird (Davey and Hexley, 2011). Aus vorhandenem PI-Signal, jedoch fehlendem CMAC-Signal, welches durch eine aktive Umsetzung von CMAC innerhalb der Zelle entsteht, wird generell auf eine absente Vitalität der Zellen geschlossen. Aufgrund der intakten Zellwand und Plasmamembran des Wildtypstammes (SG200) konnte bei der Mikroskopie der Zellen lediglich CMAC-Signal detektiert werden (Abbildung 23a). Die *far10*-Deletionsstämme (UJD31/UJD32/UJD33: SG200  $\Delta$ umag\_04391::*gent<sup>R</sup>*) verfügten jedoch sowohl über CMAC- als auch über PI-Signal (Abbildung 23a). Da beide Signale in den Deletionsstämmen detektiert werden können, sind die Zellen zwar noch vital, scheinen jedoch eine stark eingeschränkte Zellwand- und Plasmamembranintegrität zu besitzen, wodurch das nicht membrangängige PI in die Zelle gelangen kann.

Um die Integrität der Plasmamembran eingehend zu prüfen, wurde der Phosphat-Efflux gemessen. In *S. cerevisiae* konnte bereits gezeigt werden, dass sich der Phosphat-Efflux in die umgebende Flüssigkeit durch den Anstieg der Permeabilität der Plasmamembran signifikant erhöht (Trilisenko *et al.*, 2021). Die angezogenen Stämme wurden dazu 45 min in Milli-Q®-Wasser inkubiert. In separaten Ansätzen wurden dem Wasser zudem 0.1 mM Kupfersulfat (CuSO<sub>4</sub>) oder 0.02 mM Silbernitrat (AgNO<sub>3</sub>) zugegeben, um die Membranintegrität artifiziell zu reduzieren und damit den Phosphat-Efflux zu erhöhen (Trilisenko *et al.*, 2021). Die Messung des Phosphat-Effluxes wurde mittels Malachit Green Assay Kit (Merck) durchgeführt. Als Negativkontrolle wurde Milli-Q®-Wasser verwendet. Ohne Zugabe von Kupfersulfat

oder Silbernitrat konnte in den Deletionsstämmen (UJD25/UJD26/UJD27: *FB1 Δumag\_04391::gent<sup>R</sup>*) mit einer Phosphatkonzentration des umgebenden Wassers von 65 μM, 12 μM und 31 μM ein deutlicher Anstieg des Phosphat-Effluxes im Vergleich zum Wildtyp (FB1) mit einer Phosphatkonzentration von 5 μM beobachtet werden (Abbildung 23b). Ebenso war der Phosphat-Efflux der Deletionsstämmen (UJD31/UJD32/UJD33: *SG200 Δumag\_04391::gent<sup>R</sup>*) mit einer Phosphatkonzentration von 30 μM, 27 μM und 61 μM im Vergleich zum Wildtypstamm (SG200) mit einer Phosphatkonzentration von 4 μM gesteigert. Die Zugabe von Kupfersulfat oder Silbernitrat erhöhte die Abgabe von Phosphat in den Überstand in allen Stämmen (Abbildung 23b). Die Überstände der Deletionsstämmen (UJD25/UJD26/UJD27: *FB1 Δfar10*) verfügten nach Kupfersulfatzugabe jedoch mit 60 μM, 65 μM und 60 μM weiterhin über eine höhere Phosphatkonzentration als der Überstand des Wildtypstamms (FB1) mit 35 μM. Auch die Phosphatabgabe der Deletionsstämmen (UJD31/UJD32/UJD33: *SG200 Δfar10*) nach Kupfersulfatzugabe überstieg mit 68 μM, 51 μM und 89 μM die des Wildtypstamms (SG200) mit 33 μM deutlich. Nach Zugabe von Silbernitrat verfügten die Deletionsstämmen (UJD25/UJD26/UJD27: *FB1 Δfar10*) über einen Phosphat-Efflux von 60 μM, 102 μM und 100 μM, wohingegen der Phosphat-Efflux des Wildtypstammes (FB1) lediglich 40 μM betrug. Die Überstände der Deletionsstämmen (UJD31/UJD32/UJD33: *SG200 Δfar10*) hatten nach Silbernitratzugabe eine Phosphatkonzentration von 89 μM, 86 μM und 95 μM, der Überstand des Wildtypstamms (SG200) hatte jedoch nur eine Phosphatkonzentration von 38 μM. Die Negativkontrolle ( $H_2O_{bid.}$ ) verfügte über eine Phosphatkonzentration zwischen 3 und 4 μM. Die deutlich erhöhten Phosphatkonzentrationen der Überstände der Deletionsstämmen und der damit verbundene vermehrte Phosphat-Efflux aus der Zelle im Vergleich zu den Wildtypstämmen bestätigte die bereits vermutete reduzierte Membranintegrität nach Deletion von *far10*.

# Ergebnisse



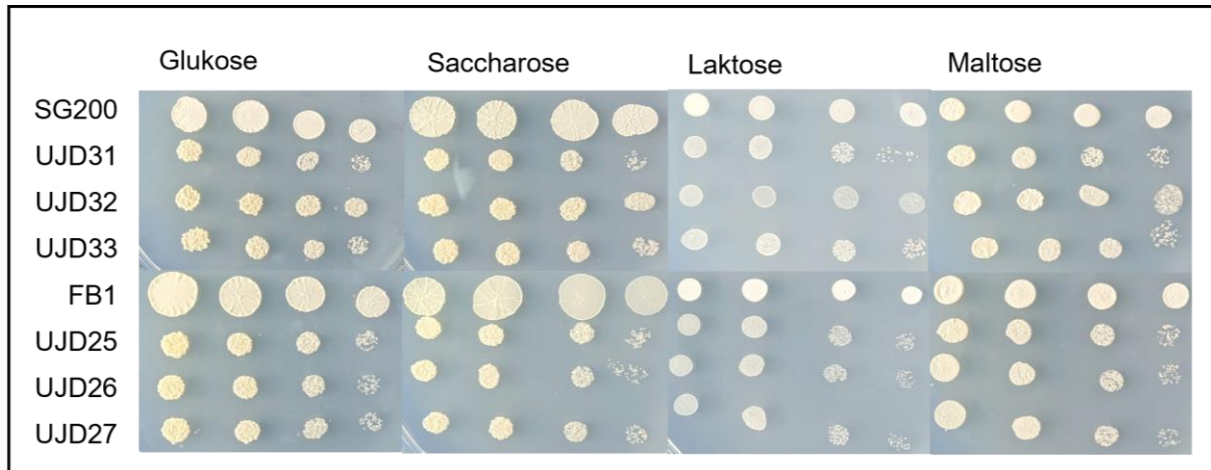
**Abbildung 23: Reduzierte Membran- und Zellwandintegrität nach *far10*-Deletion**

(a) *life/death-staining* des *far10*-Deletionsstamms UJD32 (*SG200 Δumag\_04391::gent<sup>R</sup>*) zeigte die Aufnahme von CMAC (*life-staining*) und Propidiumiodid (PI, *death-staining*) in die Zellen, wohingegen der Wildtypstamm SG200 lediglich eine CMAC-Färbung aufwies. (b) Bestimmung des Phosphat-Effluxes zur Beurteilung der Membranintegrität nach Deletion von *far10* zeigte erhöhten Phosphat-Efflux der Deletionsstämme UJD25/UJD26/UJD27 (*FB1 Δumag\_04391::gent<sup>R</sup>*) und UJD31/UJD32/UJD33 (*SG200 Δumag\_04391::gent<sup>R</sup>*) in die umgebende Flüssigkeit im Vergleich zu den Wildtypstämmen (FB1 und SG200). Zugabe von 0.1 mM Kupfersulfat ( $\text{CuSO}_4$ ) oder 0.02 mM Silbernitrat ( $\text{AgNO}_3$ ) führte zur artifizialen Reduktion der Membranintegrität. Als Negativkontrolle wurde Milli-Q®-Wasser verwendet. (c) Beurteilung der Zellwandintegrität durch Prüfung des Wachstums auf Minimalmedium mit 10 µg/ml CFW oder 10 µg/ml CR verdeutlichen reduziertes Wachstum und damit reduzierte Zellwandintegrität der Deletionsstämme UJD25/UJD26/UJD27 (*FB1 Δfar10*) und UJD31/UJD32/UJD33 (*SG200 Δfar10*) im Vergleich zu den Wildtypstämmen FB1 und SG200. Konzentration der getropften Kulturen von links nach rechts: unverdünnt ( $\text{OD}_{600} = 1$ ), 1:10, 1:100, 1:1000 und 1:10 000.

Einhergehend mit der Reduktion der Membranintegrität wurde auch eine Reduktion der Zellwandintegrität vermutet. Daher wurde die Zellwandintegrität auf Minimalmedium mit 10 µg/ml Calcofluor white (CFW) oder 10 µg/ml Kongorot (CR, *congo red*) geprüft, da Zellen mit defekter Zellwand meist sensitiver für beide anionischen Farbstoffe sind (Ram and Klis, 2006). Durch die Bindung von CFW bzw. CR an das Chitin der entstehenden Chitinketten der pilzlichen Zellwand wird die Assemblierung der Zellwand gestört und diese so geschwächt. Die dadurch aktivierte Zellwandstressantwort wird von CFW und CR aufgrund der Bindung an Chitin neutralisiert. Veränderte Mengen an Chitin in der pilzlichen Zellwand aufgrund von Mutationen der regulierenden Gene können daher durch die Sensitivität für CFW und CR beurteilt werden. Eine erhöhte Chitinmenge in der Zellwand führt dabei zur erhöhten Sensitivität für CFW und CR, eine verminderte Chitinmenge hingegen zu vermehrter Resistenz gegen CFW und CR (Ram and Klis, 2006). Die untersuchten Deletionsstämme (UJD25/UJD26/UJD27: *FB1 Δumag\_04391::gent<sup>R</sup>* und UJD31/UJD32/UJD33: *SG200 Δumag\_04391::gent<sup>R</sup>*) bildeten auf Medium mit CFW bzw. CR deutlich weniger Kolonien als auf Medium ohne CFW oder CR (Abbildung 23c). Auch waren bei den Deletionsstämmen weniger Kolonien zu erkennen als bei den beiden Wildtypstämmen (FB1 und SG200). Die vermutete Reduktion der Zellwandintegrität konnte somit bestätigt werden. Die fleckige Kolonienmorphologie der Deletionsstämme lässt sich durch den Zytokinesedefekt erklären, da die aus diesem Grund aneinanderhängenden Sporidien bei geringer Zellzahl eine eher fleckige Kolonienstruktur auf Medium zeigen.

## 2.2.9. Far10 hat keinen Einfluss auf die Verstoffwechslung von verschiedenen Zuckern

Abschließend wurde die Verstoffwechslung verschiedener Zucker nach Deletion von *far10* untersucht. Die primäre Kohlenstoffquelle von *U. maydis* ist Glukose, weshalb dieser in diesem Experiment als Positivkontrolle eingesetzt wurde. Auch Saccharose kann aufgrund der vorhandenen Invertase in Form von Glukose und Fruktose von *U. maydis* aufgenommen und verstoffwechselt werden (Kurz and Ericson, 1962; Goulet and Saville, 2017). Die Verwendung von Maltose als Kohlenstoffquelle konnte ebenfalls bereits gezeigt werden (Kurz and Ericson, 1962). Die Deletionsstämme (UJD25/UJD26/UJD27: *FB1 Δumag\_04391::gent<sup>R</sup>* und UJD31/UJD32/UJD33: *SG200 Δumag\_04391::gent<sup>R</sup>*) und die zugehörigen Wildtypstämme (FB1 und SG200) wurden in von links nach rechts absteigender Konzentration auf Minimalmedium mit Glukose, Saccharose, Laktose oder Maltose getropft. Sowohl die Deletionsstämme als auch die Wildtypstämme bildeten Kolonien auf allen vier Zuckern (Abbildung 24), was zeigte, dass die Verstoffwechslung der verschiedenen Zucker nicht von Far10 beeinflusst wird.



**Abbildung 24: Normale Verstoffwechslung von Zuckern nach *far10*-Deletion**

Die Verstoffwechslung von Zuckern wurde durch das Wachstum der Wildtypstämme FB1 und SG200 und der *far10*-Deletionsstämme UJD25/UJD26/UJD27 (*FB1 Δumag\_04391::gent<sup>R</sup>*) und UJD31/UJD32/UJD33 (*SG200 Δumag\_04391::gent<sup>R</sup>*) auf Minimalmedium mit Glukose, Saccharose, Laktose und Maltose geprüft. Die Deletionsstämme zeigten kein vermindertes Wachstum im Vergleich zu den Wildtypstämmen. Konzentration der getropften Kulturen von links nach rechts: unverdünnt ( $OD_{600} = 1$ ), 1:5, 1:25, 1:125 und 1:625.

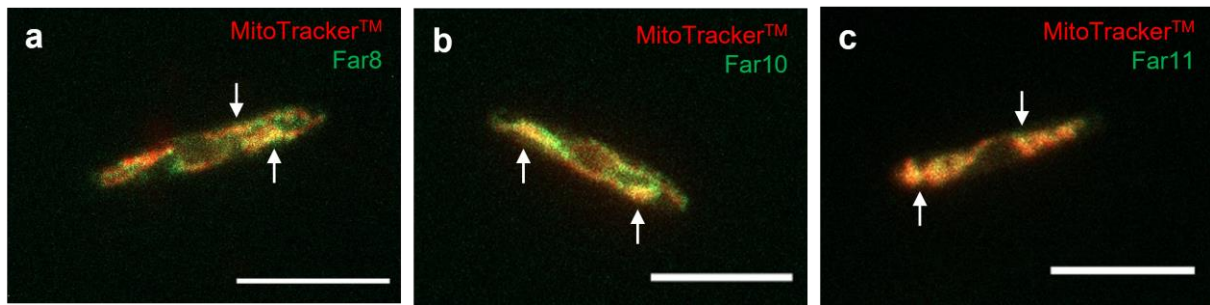
## 2.3. Lokalisation des STRIPAK-Komplexes in *U. maydis*

Die Lokalisation der einzelnen Komponenten des STRIPAK-Komplexes wurde bereits in verschiedenen Organismen untersucht. In Ascomyzeten konnte dabei eine Lokalisation des STRIPAK-Komplexes an ER, Kernhülle und Mitochondrien festgestellt werden (Wang *et al.*, 2010; Singh *et al.*, 2011; Frost *et al.*, 2012; Dettmann *et al.*, 2013; Pracheil and Liu, 2013; Nordzieke *et al.*, 2015; Reschka *et al.*, 2018; Eiramli *et al.*, 2019). Der STRIPAK-Komplex in *S. pombe* befindet sich zudem während der frühen Mitose am Spindelpolkörper (Singh *et al.*, 2011). Das Entwicklungsprotein von *S. macrospora* lokalisiert zusätzlich an tubulären Vakuolen und Intermembransystemen nahe der Hyphenspitze (Bloemendal *et al.*, 2010). Aufgrund des Einflusses, welcher die Lokalisation auf die Rolle des STRIPAK-Komplexes innerhalb der Zelle spielt, wurde im Rahmen dieser Arbeit die Lokalisation des STRIPAK-Komplexes im Basidiomycet *U. maydis* untersucht. Hierfür wurde GFP N-terminal jeweils an die STRIPAK-Komponenten Far8 (regulatorische Untereinheit), Far10 (Ankerprotein) und Far11 (Entwicklungsprotein) fusioniert und mittels homologer Rekombination in das Genom von *U. maydis* eingebracht.

### 2.3.1. Far8, Far10 und Far11 lokalisieren in Sporidien an Mitochondrien und dem ER oder der Kernhülle

Da das Ankerprotein in *S. macrospora* an den Mitochondrien lokalisiert wurde, wurde zunächst eine Colokalisierung der STRIPAK-Komponenten Far8, Far10 und Far11 mit den Mitochondrien in *U. maydis* untersucht. Die Mitochondrien wurden dazu mit MitoTracker™ (Invitrogen) angefärbt und die Stämme im GFP- und im RFP-Kanal mikroskopiert. Sowohl bei Far8 (UJD48/UJD19: *AB31 gfp:umag\_03784:hyg<sup>R</sup>*) als auch bei Far10 (UJD152/UJD153/UJD154: *AB31 gfp:umag\_04391:hyg<sup>R</sup>*) und bei Far11 (ULM1/ULM2/ULM3/ULM4: *AB31 gfp:umag\_10285:hyg<sup>R</sup>*) konnte eine Colokalisation der jeweiligen STRIPAK-Komponente mit den Mitochondrien beobachtet werden (Abbildung 25). Da die Lokalisation des Komplexes in anderen Organismen an verschiedenen Organellen gezeigt werden konnte, die Colokalisation des STRIPAK-Komplexes in *U. maydis* jedoch nur mit jeweils einem Zellorganell betrachtet wurde, wurde keine vollständige Colokalisation mit den Mitochondrien erwartet.

## Ergebnisse

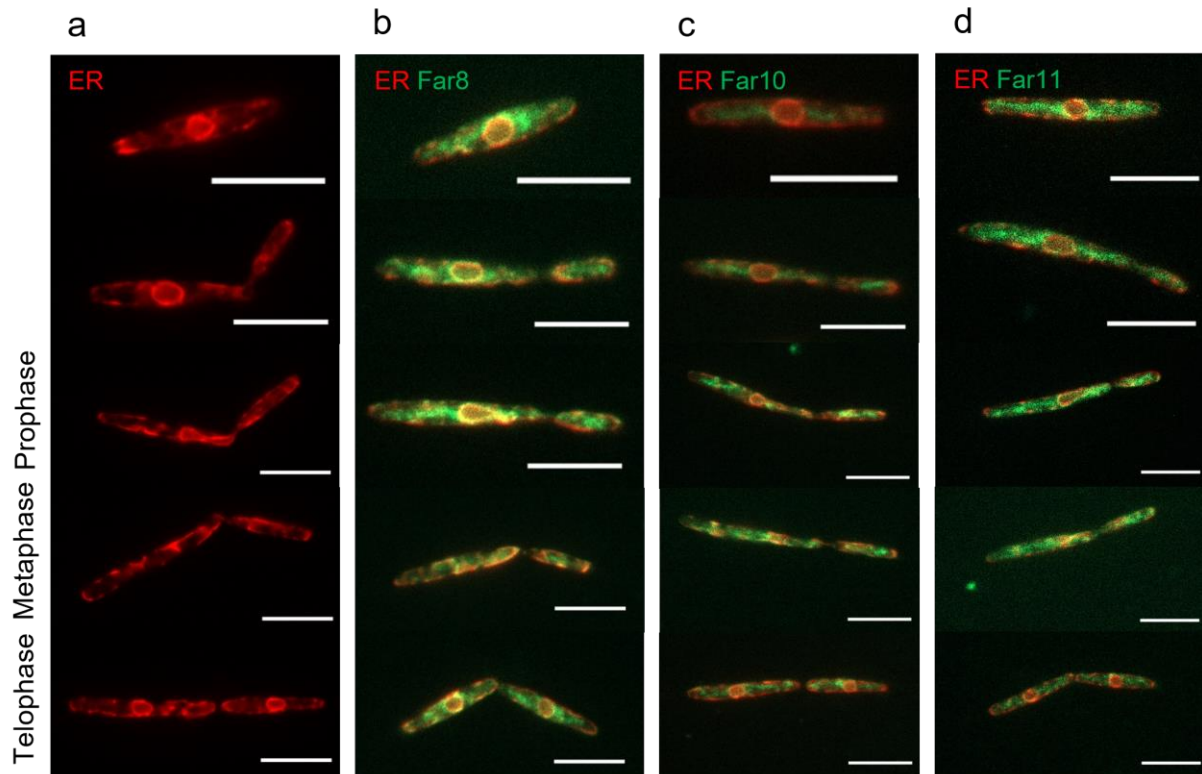


**Abbildung 25: Colokalisation der STRIPAK-Komponenten mit Mitochondrien in Sporidien**

(a) Colokalisation der regulatorischen Untereinheit Far8 (UJD48: *AB31 gfp:umag\_03784:hyg<sup>R</sup>*), (b) des Ankerproteins Far10 (UJD152: *AB31 gfp:umag\_04391:hyg<sup>R</sup>*) und (c) des Entwicklungsproteins Far11 (ULM2: *AB31 gfp:umag\_10285:hyg<sup>R</sup>*) mit den Mitochondrien. Alle Proteine wurden als N-terminale GFP-Fusionen unter dem nativen Promotor exprimiert. Mitochondrien wurden mit MitoTracker™ (Invitrogen) gefärbt. Die Colokalisation von GFP und MitoTracker™ ist in Gelb dargestellt und wurde mit Pfeilen hervorgehoben. Maßstab: 10 µm.

Durch das zusätzliche Einbringen eines Fusionsprotein aus dem rot fluoreszierenden Protein mKate und dem ER-Signalpeptid aus Calreticulin konnte die mögliche Colokalisation der STRIPAK-Komponenten mit dem ER untersucht werden (Müntjes, persönliche Mitteilung). Da durch dieses Fusionsprotein auch die Kernhülle visualisiert wurde, kann zusätzlich eine Colokalisation der STRIPAK-Komponenten mit der Kernhülle überprüft werden. Die Mikroskopie erfolgte im GFP- und im RFP-Kanal. Die alleinige Integration des ER-mKate-Fusionsproteins (UJD145/UJD147: *AB31 ip'[P<sub>otef</sub>:CALR:mKate2]ip<sup>S</sup>\*n*) zeigt die Lokalisierung des ERs und der Kernhülle in Sporidien in der S-Phase und während der Mitose (Abbildung 26). In Sporidien wurde eine Colokalisation der regulatorischen Untereinheit Far8 (UJD70/UJD71/UJD72: *AB31 gfp:umag\_03784:hyg<sup>R</sup>, ip'[P<sub>otef</sub>:CALR:mKate2]ip<sup>S</sup>*) mit dem ER und der Kernhülle beobachtet (Abbildung 26b). Auch das Ankerprotein Far10 (UJD162: *AB31 gfp:umag\_04391:hyg<sup>R</sup>, ip'[P<sub>otef</sub>:CALR:mKate2]ip<sup>S</sup>\*n*) colokalisierte in Sporidien mit der Kernhülle, jedoch nicht mit dem ER (Abbildung 26c). Ebenso wurde die Colokalisation des Entwicklungsproteins Far11 (ULM5/ULM6/ULM7/ULM8: *AB31 gfp:umag\_10285:hyg<sup>R</sup>, ip'[P<sub>otef</sub>:CALR:mKate2]ip<sup>S</sup>*) mit der Kernhülle, aber nicht mit dem ER beobachtet (Abbildung 26d). In allen Stämmen war die Colokalisierung mit der Kernhülle während der gesamten Mitose, inklusive der Entfernung der Kernhülle von den Chromosomen am Ende der Prophase im Rahmen der offenen Mitose, erkennbar. Die Lokalisierung der regulatorischen Untereinheit Far8 an Mitochondrien, ER und Kernhülle, des Ankerproteins Far10 an Mitochondrien und Kernhülle und des Entwicklungsproteins Far11 an Mitochondrien und Kernhülle in Sporidien entspricht der Lokalisation des STRIPAK-Komplexes in Ascomyzeten.





**Abbildung 26: Colokalisation von Far10 und Far11 mit der Kernhülle und Far8 mit dem ER und der Kernhülle in Sporidien**  
**(a)** Visualisierung des ER und der Kernhülle (UJD145: *AB31 ip'[P<sub>otef</sub>:CALR:mKate2]ip<sup>s</sup>\*n*) in Sporidien während der Mitose.  
**(b)** Colokalisation der regulatorischen Untereinheit Far8 mit dem ER und der Kernhülle (UJD70: *AB31 gfp:umag\_03784:hyg<sup>R</sup>, ip'[P<sub>otef</sub>:CALR:mKate2]ip<sup>s</sup>*) in Sporidien während der Mitose. **(c)** Colokalisation des Ankerproteins Far10 mit der Kernhülle (UJD162: *AB31 gfp:umag\_04391:hyg<sup>R</sup>, ip'[P<sub>otef</sub>:CALR:mKate2]ip<sup>s</sup>\*n*) in Sporidien während der Mitose. **(d)** Colokalisation des Entwicklungsproteins Far11 mit der Kernhülle (ULM5: *AB31 gfp:umag\_10285:hyg<sup>R</sup>, ip'[P<sub>otef</sub>:CALR:mKate2]ip<sup>s</sup>*) in Sporidien während der Mitose. Alle Proteine wurden als N-terminale GFP-Fusionen unter dem nativen Promotor exprimiert. Die Colokalisation von GFP und mCherry ist in Gelb dargestellt. Mikroskopie erfolgte in verschiedenen Zellen. Maßstab 10  $\mu$ m.

### 2.3.2. Far8, Far10 und Far11 colokalisieren in Sporidien

Aufgrund der ähnlichen Lokalisation der drei STRIPAK-Komponenten an Kernmembran und Mitochondrien in Sporidien wurde eine Colokalisation der STRIPAK-Komponenten untereinander vermutet. Um dies paarweise zu prüfen, wurde an jeweils eine der Komponenten N-terminal GFP und an die andere Komponente N-terminal mCherry fusioniert und mittels homologer Rekombination in das Genom von *U. maydis* integriert. Die Mikroskopie erfolgte im GFP- und im RFP-Kanal.

## Ergebnisse

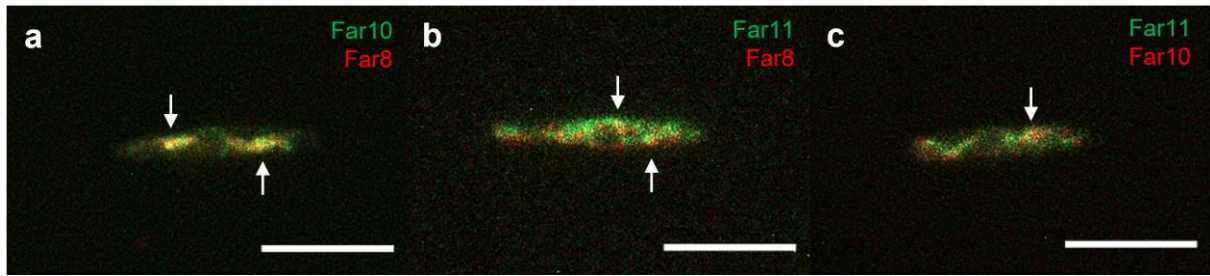


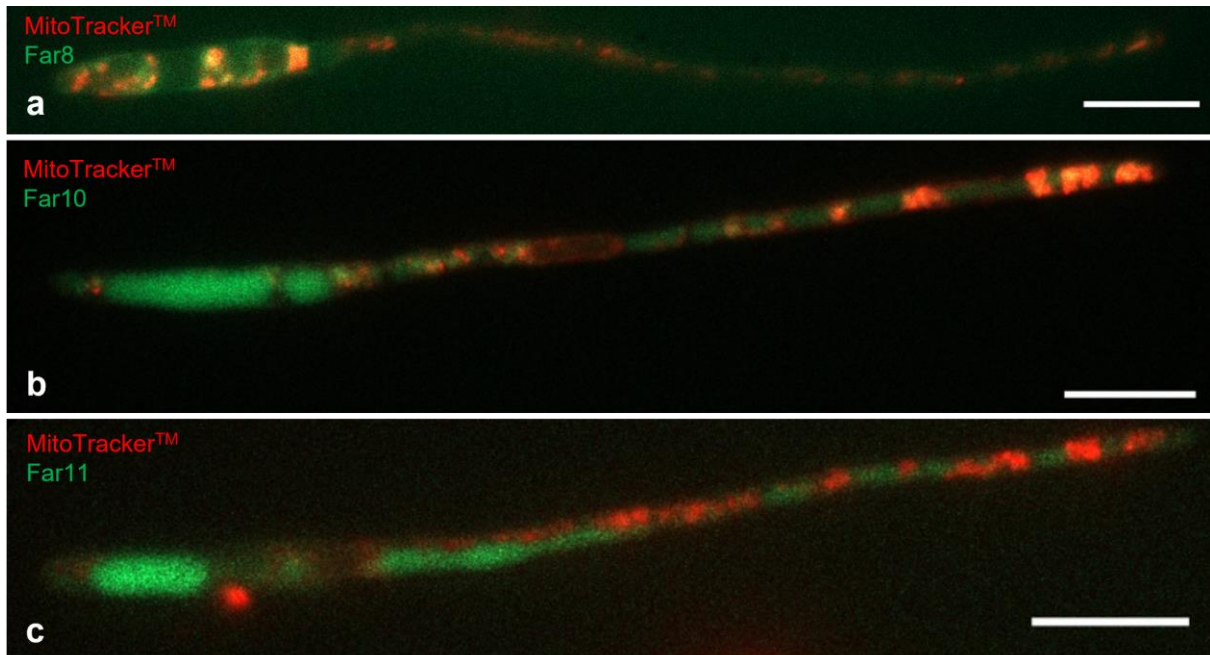
Abbildung 27: Colokalisation der STRIPAK-Komponenten Far8, Far10 und Far11 in Sporidien

(a) Colokalisation der regulatorischen Untereinheit Far8 (mCherry-Far8) mit dem Ankerprotein Far10 (GFP-Far10) in Sporidien (UJD181: *AB31 gfp:umag\_04391:hyg<sup>R</sup>, mCherry:umag\_03784:gent<sup>R</sup>*). (b) Colokalisation der regulatorischen Untereinheit Far8 (mCherry-Far8) mit dem Entwicklungsprotein Far11 (GFP-Far11) in Sporidien (ULM17: *AB31 gfp:umag\_10285:hyg<sup>R</sup>, mCherry:umag\_03784:gent<sup>R</sup>*). (c) Colokalisation des Ankerproteins Far10 (mCherry-Far10) und des Entwicklungsproteins Far11 (GFP-Far11) in Sporidien (UJD215: *AB31 gfp:umag\_10285:hyg<sup>R</sup>, mCherry:umag\_04391:gent<sup>R</sup>*). Alle Proteine wurden als N-terminale mCherry- bzw. GFP-Fusionen unter dem nativen Promotor exprimiert. Die Colokalisation von GFP und mCherry ist in Gelb dargestellt. Die Colokalisation wurde mit Pfeilen hervorgehoben. Maßstab: 10 µm.

Die regulatorische Untereinheit Far8 und das Ankerprotein Far10 (UJD181/UJD194/UJD195/UJD196: *AB31 gfp:umag\_04391:hyg<sup>R</sup>, mCherry:umag\_03784:gent<sup>R</sup>*) zeigten in Sporidien eine Colokalisation, wie sie aufgrund der gemeinsamen Colokalisation mit Mitochondrien und Kernhülle bereits vermutet wurde (Abbildung 27a). Auch für Far8 und das Entwicklungsprotein Far11 (ULM14/ULM15/ULM16/ULM17: *AB31 gfp:umag\_10285:hyg<sup>R</sup>, mCherry:umag\_03784:gent<sup>R</sup>*) konnte die Colokalisation bewiesen werden (Abbildung 27b). Die Colokalisation des Ankerproteins Far10 und des Entwicklungsproteins Far11 (UJD214/UJD215/UJD216: *AB31 gfp:umag\_10285:hyg<sup>R</sup>, mCherry:umag\_04391:gent<sup>R</sup>*) konnte ebenfalls bestätigt werden (Abbildung 27c). Die Colokalisation der STRIPAK-Komponenten zeigte zudem das gleiche Lokalisationsmuster wie die vorherigen Colokalisationen mit ER und Mitochondrien. Aufgrund der hier gezeigten Ergebnisse kann eine ähnliche Zusammensetzung des Komplexes wie in Ascomyeten vermutet werden.

### 2.3.3. Ausschließlich Far8 lokalisiert in Filamenten an Mitochondrien

Da es sich bei *U. maydis* um einen dimorphen Pilz handelt, der neben dem hefeartigen Wachstum als Sporidie auch filamentöses Wachstum betreibt, wurde im Rahmen dieser Arbeit auch die Lokalisation der STRIPAK-Komponenten Far8, Far10 und Far11 im Filament untersucht. Nach 18-stündiger Induktion des filamentösen Wachstums wurden erneut die Mitochondrien mittels MitoTracker™ (Invitrogen) angefärbt und die Zellen fluoreszenzmikroskopisch im GFP- und im RFP-Kanal untersucht.



**Abbildung 28: Far8 lokalisiert in Filamenten an Mitochondrien, keine Colokalisation von Far10 und Far11 an Mitochondrien im Filament**

18-stündige Induktion des filamentösen Wachstums durch Arabinose-haltiges Medium und Mikroskopie der Stämme UJD48 (*AB31 gfp:umag\_03784:hyg<sup>R</sup>*), UJD152 (*AB31 gfp:umag\_04391:hyg<sup>R</sup>*) und ULM2 (*AB31 gfp:umag\_10285:hyg<sup>R</sup>*) zeigte Colokalisation von Far8 (a) mit den Mitochondrien in Filamenten jedoch keine Colokalisation von Far10 (b) und Far11 (c) mit Mitochondrien in Filamenten. Alle Proteine wurden als N-terminale GFP-Fusionen unter dem nativen Promotor exprimiert. Mitochondrien wurden mit MitoTracker<sup>TM</sup> (Invitrogen) gefärbt. Die Colokalisation von GFP und MitoTracker<sup>TM</sup> ist in Gelb dargestellt. Maßstab: 10 µm.

Es konnte dabei eine Colokalisation der regulatorischen Untereinheit Far8 (UJD48/UJD19: *AB31 gfp:umag\_03784:hyg<sup>R</sup>*) mit den Mitochondrien im Filament beobachtet werden (Abbildung 28 oben). Im Gegensatz dazu konnte weder eine Colokalisation des Ankerproteins Far10 (UJD152/UJD153/UJD154: *AB31 gfp:umag\_04391:hyg<sup>R</sup>*) noch eine Colokalisation des Entwicklungsproteins Far11 (ULM1/ULM2/ULM3/ULM4: *AB31 gfp:umag\_10285:hyg<sup>R</sup>*) mit den Mitochondrien festgestellt werden (Abbildung 28 Mitte/unten).

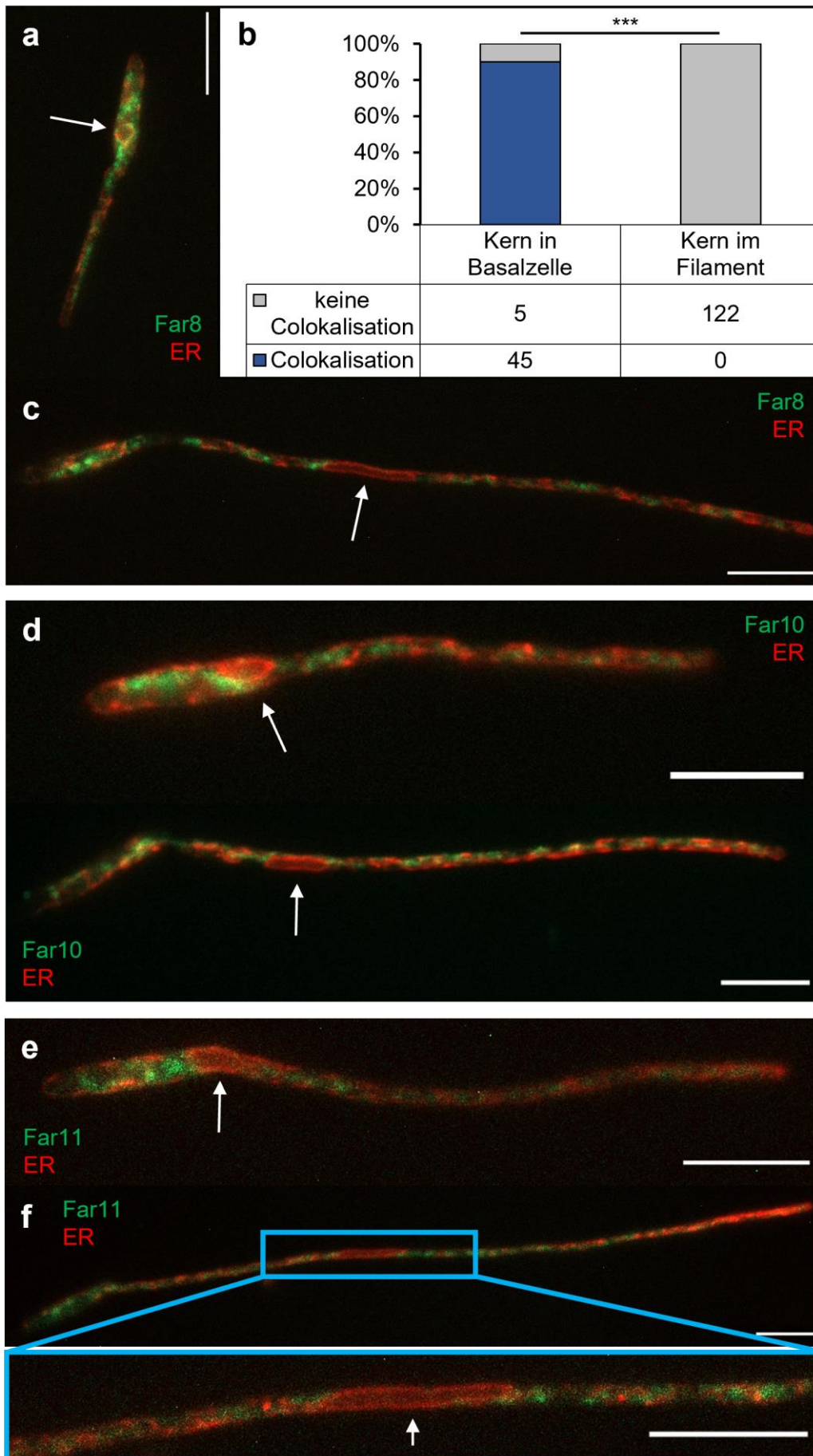
#### 2.3.4. Während der Bildung des Filaments schwindet die Lokalisation von Far8, Far10 und Far11 an ER und Kernhülle

Weiter wurde im Rahmen dieser Arbeit die Colokalisation der STRIPAK-Komponenten mit dem ER und der Kernhülle in Filamenten untersucht. Die verwendeten Stämme enthielten eine N-terminale Fusion von GFP an die STRIPAK-Komponente und das ER-mKate-Fusionsprotein. Die Induktion des filamentösen Wachstums erfolgte über 18 h. Die Colokalisation der regulatorischen Untereinheit Far8 (UJD70/UJD71/UJD72:

## Ergebnisse

*AB31 gfp:umag\_03784:hyg<sup>R</sup>, ip'[P<sub>otef</sub>:CALR:mKate2]ip<sup>s</sup>*) mit dem ER und der Kernhülle konnte lediglich in Zellen beobachtet werden, in denen sich der Nukleus noch in der Basalzelle befindet (Abbildung 29a). Der Nukleus wurde hierfür mittels DAPI gefärbt (nicht gezeigt). Befand sich der Nukleus allerdings im Filament, konnte keine Colokalisation mehr beobachtet werden (Abbildung 29c). Eine Quantifikation der Colokalisation ergab, dass in 90 % der Zellen, in denen sich der Nukleus in der Basalzelle befindet, eine Colokalisation der regulatorischen Untereinheit Far8 mit dem ER und der Kernhülle beobachtet werden konnte (Abbildung 29b). Im Gegensatz dazu konnte in keiner der betrachteten 122 Zellen, in denen der Nukleus sich im Filament befand, eine Colokalisation von Far8 mit dem ER und der Kernhülle gesehen werden. Die Colokalisation des Ankerprotein Far10 (UJD162: *AB31 gfp:umag\_04391:hyg<sup>R</sup>, ip'[P<sub>otef</sub>:CALR:mKate2]ip<sup>s</sup>\*n*) mit der Kernhülle war von der Länge des Filaments abhängig (Abbildung 29d). So war in einigen kürzeren Filamenten noch eine Colokalisation des Ankerproteins Far10 mit der Kernhülle zu erkennen, in längeren Filamenten jedoch nicht mehr. Ebenso verhielt es sich mit der Colokalisation des Entwicklungsproteins Far11 (ULM5/ULM6/ULM7/ULM8: *AB31 gfp:umag\_10285:hyg<sup>R</sup>, ip'[P<sub>otef</sub>:CALR:mKate2]ip<sup>s</sup>*). Eine Colokalisation des Entwicklungsproteins Far11 mit der Kernhülle konnte auch hier nur in kürzeren Filamenten, nicht jedoch in längeren Filamenten beobachtet werden (Abbildung 29e/f). Sowohl für die Colokalisation von Far10 mit der Kernhülle als auch für die Colokalisation von Far11 mit der Kernhülle spielte die Lokalisation des Nukleus keine Rolle.





## Ergebnisse

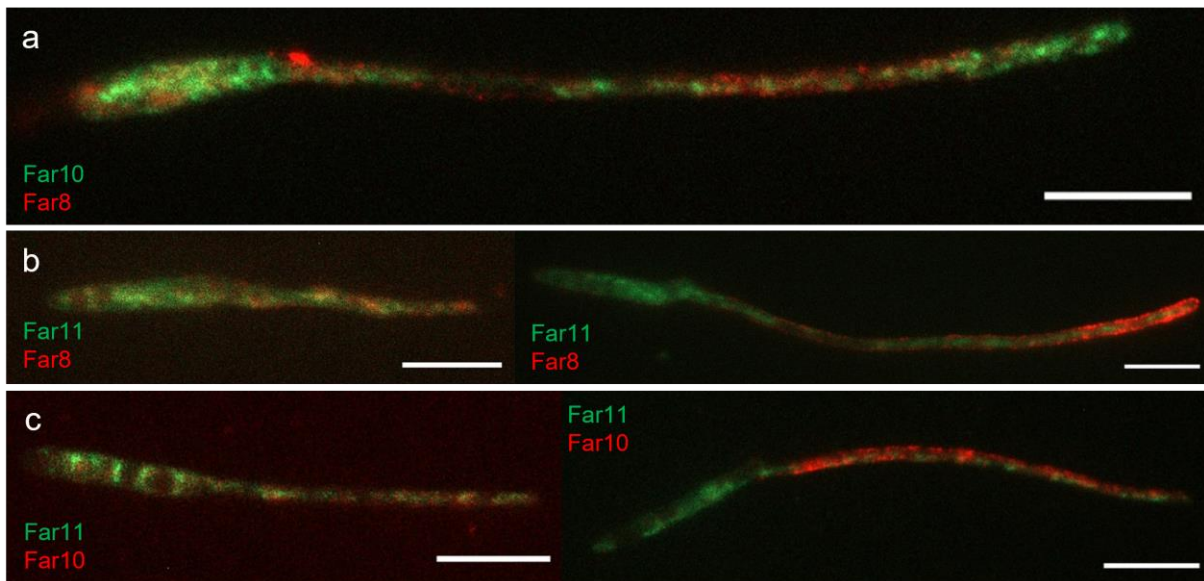
### Abbildung 29: Mit zunehmender Filamentlänge schwindet die Colokalisation der STRIPAK-Komponenten mit dem ER und der Kernhülle

Nach 18-stündiger Induktion des filamentösen Wachstums durch Arabinose-haltiges Medium erfolgte die Mikroskopie.

**(a)-(c)** Colokalisation der regulatorischen Untereinheit Far8 mit dem ER und der Kernhülle (UJD70: *AB31 gfp:umag\_03784:hyg<sup>R</sup>, ip'[P<sub>otef</sub>:CALR:mKate2]ip<sup>s</sup>\*)* sofern sich der Nukleus noch in der Basalzelle **(a)**, jedoch keine Colokalisation mehr sobald sich der Nukleus im Filament befand **(c)**. **(b)** Quantifizierung der Colokalisation der regulatorischen Untereinheit mit dem ER und der Kernhülle zeigte signifikante Reduktion der Colokalisation nach Einwanderung des Nukleus in das Filament. Quantifizierung mittels Mann-Whitney-U-Test als signifikant eingestuft. Signifikanz \* p-Wert<0.05, \*\* p-Wert<0.01, \*\*\* p-Wert<0.001. **(d)** Colokalisation des Ankerproteins Far10 mit der Kernhülle (UJD162: *AB31 gfp:umag\_04391:hyg<sup>R</sup>, ip'[P<sub>otef</sub>:CALR:mKate2]ip<sup>s</sup>\*n)* in kürzeren Filamenten, jedoch nicht in längeren Filamenten. **(e)** Colokalisation des Entwicklungsproteins Far11 mit der Kernhülle (ULM5: *AB31 gfp:umag\_10285:hyg<sup>R</sup>, ip'[P<sub>otef</sub>:CALR:mKate2]ip<sup>s</sup>\*)* in kürzeren Filamenten, jedoch nicht in längeren Filamenten. Alle Proteine wurden als N-terminale GFP-Fusionen unter dem nativen Promotor exprimiert. Die Colokalisation von GFP und mCherry ist in Gelb dargestellt. Der Nukleus ist jeweils mit einem weißen Pfeil gekennzeichnet. Maßstab: 10 µm.

### 2.3.5. Während der Bildung des Filaments schwindet die Colokalisation der STRIPAK-Komponenten

Ebenso wie in Sporidien wurde die Colokalisation der STRIPAK-Komponenten Far8, Far10 und Far11 miteinander im Filament untersucht. In den verwendeten Stämmen wurde über 18 h das filamentöse Wachstum induziert. Die Mikroskopie erfolgte im GFP- und im RFP-Kanal. Wie in Abbildung 30a dargestellt, konnte dabei keine Colokalisation von Far8 mit Far10 (UJD181/UJD182/UJD183: *AB31 gfp:umag\_04391:hyg<sup>R</sup>, mCherry:umag\_03784:gent<sup>R</sup>*) in Filamenten gefunden werden. Die Colokalisation von Far11 mit Far8 (ULM14/ULM15/ULM16/ULM17: *AB31 gfp:umag\_10285:hyg<sup>R</sup>, mCherry:umag\_03784:gent<sup>R</sup>*) bzw. mit Far10 (UJD214/UJD215/UJD216: *AB31 gfp:umag\_10285:hyg<sup>R</sup>, mCherry:umag\_04391:gent<sup>R</sup>*) war abhängig von der Länge des Filaments. In kürzeren Filamenten konnte eine Colokalisation von Far11 mit Far8 bzw. mit Far10 gezeigt werden, in längeren Filamenten jedoch nicht (Abbildung 30b/c). Insbesondere die fehlende Colokalisation von Far11 mit Far8 bzw. Far10 in längeren Filamenten und die fehlende Colokalisation von Far8 mit Far10 bestätigt die Ergebnisse der Colokalisation von Far8, Far10 und Far11 mit dem ER, der Kernhülle und den Mitochondrien in Filamenten, da beobachtet wurde, dass lediglich Far8 in Filamenten an Mitochondrien und abhängig von der Lokalisation des Nukleus am ER und der Kernhülle lokalisiert.



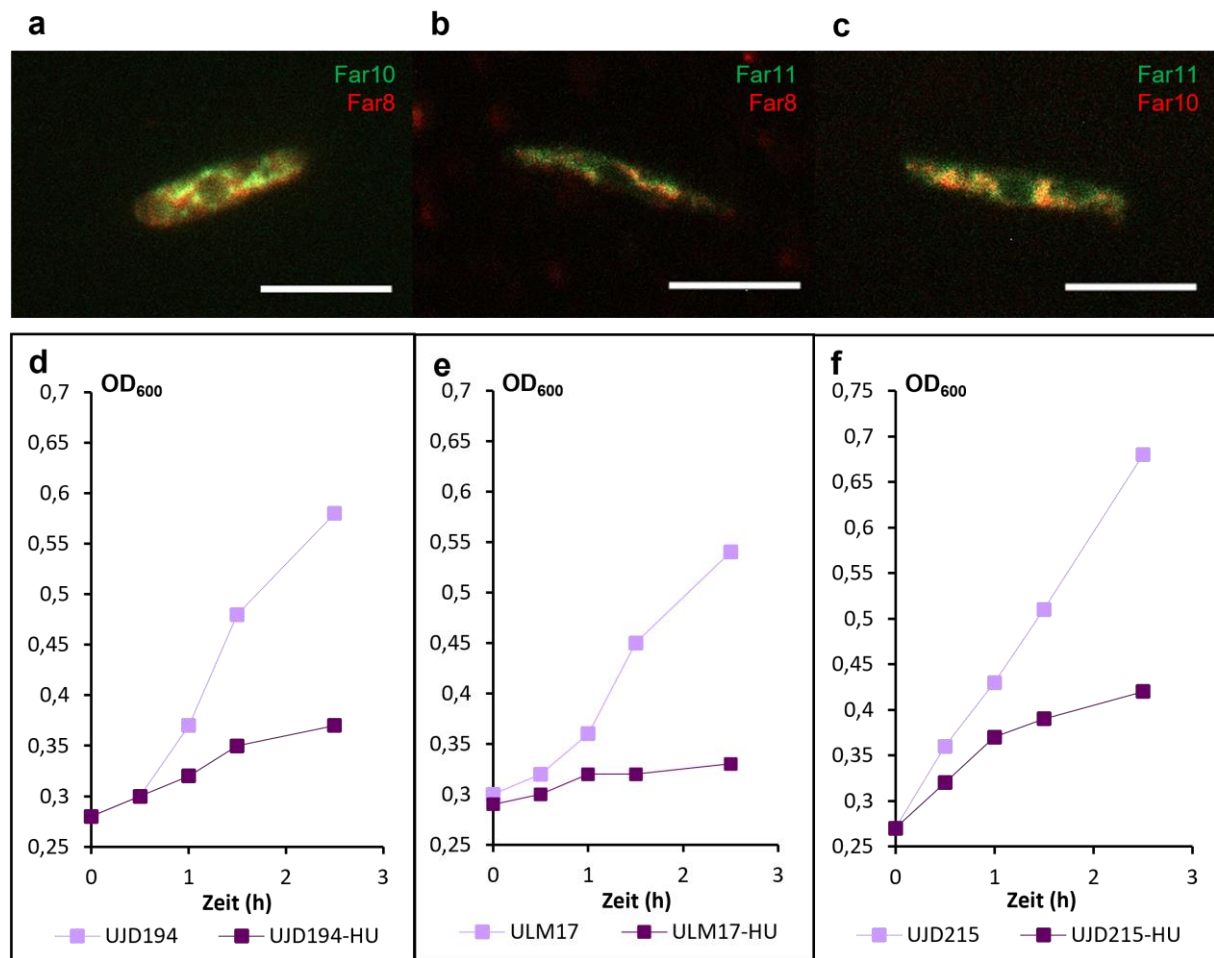
**Abbildung 30: Rückläufige Colokalisation der STRIPAK-Komponenten Far8, Far10 und Far11 in Filamenten**

Nach 18-stündiger Induktion des filamentösen Wachstums durch Arabinose-haltiges Medium erfolgte die Mikroskopie.

(a) Keine Colokalisation der regulatorischen Untereinheit Far8 (mCherry-Far8) mit dem Ankerprotein Far10 (GFP-Far10) in Filamenten (UJD181: *AB31 gfp:umag\_04391:hyg<sup>R</sup>, mCherry:umag\_03784:gent<sup>R</sup>*). (b) Colokalisation der regulatorischen Untereinheit Far8 (mCherry-Far8) mit dem Entwicklungsprotein Far11 (GFP-Far11) in kurzen Filamenten (links), jedoch keine Colokalisation in langen Filamenten (rechts) (ULM17: *AB31 gfp:umag\_10285:hyg<sup>R</sup>, mCherry:umag\_03784:gent<sup>R</sup>*). (c) Colokalisation des Ankerproteins Far10 (mCherry-Far10) und des Entwicklungsproteins Far11 (GFP-Far11) in kurzen Filamenten (links), jedoch keine Colokalisation in langen Filamenten (rechts) (UJD215: *AB31 gfp:umag\_10285:hyg<sup>R</sup>, mCherry:umag\_04391:gent<sup>R</sup>*). Alle Proteine wurden als N-terminale mCherry- bzw. GFP-Fusionen unter dem nativen Promotor exprimiert. Die Colokalisation von GFP und mCherry ist in Gelb dargestellt. Maßstab: 10 µm.

Da die Induktion des filamentösen Wachstums immer einen Zellzyklusarrest zur Folge hat, wurde zudem untersucht, ob die artifizielle Induktion eines Zellzyklusarrests ausreicht, um die Colokalisation der STRIPAK-Komponenten in Sporidien aufzuheben. Mittels Hydroxyurea wurde der Zellzyklus in der S-Phase arretiert. Hydroxyurea inhibiert dabei die Ribonukleotidreduktase (RNR), wodurch keine neuen dNTPs gebildet werden können, weshalb die Synthese der DNA-Tochterstränge während der S-Phase zum Erliegen kommt, der Zellzyklus in der S-Phase arretiert und der Zellzykluskontrollpunkt aktiviert wird (Musiałek and Rybaczek, 2021). Hierfür wurde die Sporidien mit 1 mM Hydroxyurea für 90 min bzw. 150 min inkubiert und anschließend im GFP- und RFP-Kanal mikroskopiert. Zusätzlich wurde ab dem Zeitpunkt der Zugabe von Hydroxyurea halbstündlich die optische Dichte (OD) gemessen, um zu zeigen, dass die Zellteilung aufgrund des Zellzyklusarrests zum Erliegen kam.

## Ergebnisse



**Abbildung 31: Colokalisation der STRIPAK-Komponenten Far8, Far10 und Far11 in Sporidien mit Zellzyklusarrest in der S-Phase**

Zugabe von 1 mM Hydroxyurea zur Induktion des Zellzyklusarrests in der S-Phase und Mikroskopie nach 90 min und 150 min im GFP- und im RFP-Kanal.

(a) Colokalisation der regulatorischen Untereinheit Far8 (mCherry-Far8) mit dem Ankerprotein Far10 (GFP-Far10) innerhalb in der S-Phase arretierten Sporidien (UJD181: *AB31 gfp:umag\_04391:hyg<sup>R</sup>, mCherry:umag\_03784:gent<sup>R</sup>*). (b) Colokalisation der regulatorischen Untereinheit Far8 (mCherry-Far8) mit dem Entwicklungsprotein Far11 (GFP-Far11) innerhalb von Sporidien (ULM17: *AB31 gfp:umag\_10285:hyg<sup>R</sup>, mCherry:umag\_03784:gent<sup>R</sup>*), welche in der S-Phase arretiert waren. (c) Colokalisation des Ankerproteins Far10 (mCherry-Far10) und des Entwicklungsproteins Far11 (GFP-Far11) innerhalb in der S-Phase arretierten Sporidien (UJD215: *AB31 gfp:umag\_10285:hyg<sup>R</sup>, mCherry:umag\_04391:gent<sup>R</sup>*). (d)-(f) Messung der OD<sub>600</sub> ergab exponentielles Wachstum der Kulturen ohne Hydroxyurea und beschränktes Wachstum der Kulturen nach Zugabe von Hydroxyurea. Alle Proteine wurden als N-terminale mCherry- bzw. GFP-Fusionen unter dem nativen Promotor exprimiert. Die Colokalisation von GFP und mCherry ist in Gelb dargestellt. Maßstab: 10 µm.

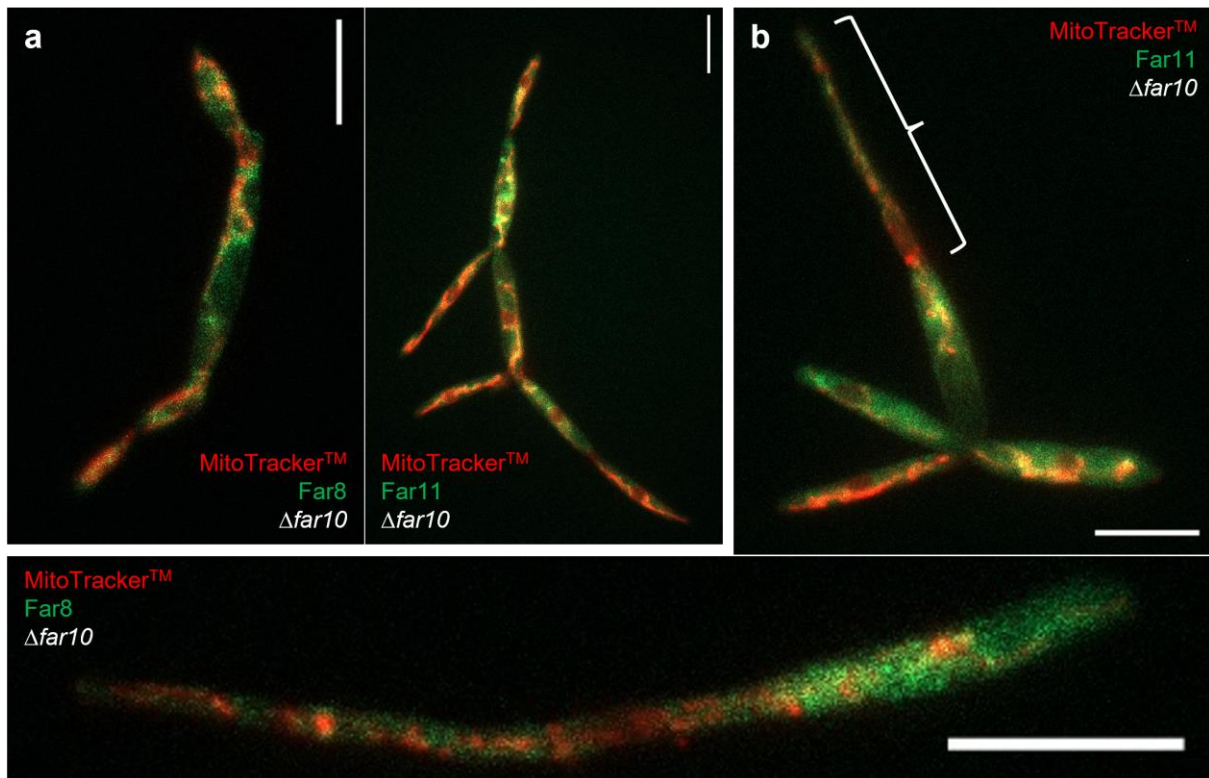
Messungen der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm ergaben bei Kulturen ohne Zugabe von Hydroxyurea einen exponentiellen Anstieg, wohingegen in Kulturen nach Zugabe von Hydroxyurea innerhalb der ersten Stunde zunächst einen Anstieg der optischen Dichte zu verzeichnen war, welcher jedoch nicht fortgesetzt wurde (Abbildung 31d-f). Demnach war die artifizielle Arretierung des Zellzyklus in der S-Phase erfolgreich. Die Mikroskopie im GFP- und im RFP-Kanal ergab weiterhin, dass weder die Colokalisation von Far8 mit Far10 (UJD181/UJD194/UJD195/UJD196:



*AB31 gfp:umag\_04391:hyg<sup>R</sup>, mCherry:umag\_03784:gent<sup>R</sup>* (Abbildung 31a), noch von Far8 mit Far11 (ULM14/ULM15/ULM16/ULM17: *AB31 gfp:umag\_10285:hyg<sup>R</sup>, mCherry:umag\_03784:gent<sup>R</sup>*) (Abbildung 31b), noch von Far10 mit Far11 (UJD214/UJD215/UJD216: *AB31 gfp:umag\_10285:hyg<sup>R</sup>, mCherry:umag\_04391:gent<sup>R</sup>*) (Abbildung 31c) durch den Zellzyklusarrest in der S-Phase in Sporidien gestört wird. Ursächlich für die fehlende Colokalisation in Filamenten wäre somit das filamentöse Wachstum selbst und nicht der gleichzeitig auftretende Zellzyklusarrest.

### 2.3.6. *far10*-Deletion hat keinen Einfluss auf die Colokalisation der STRIPAK-Komponenten mit den Mitochondrien

Aus *S. macrospora* ist bekannt, dass das Ankerprotein PRO45 an den Mitochondrien lokalisiert und so den STRIPAK-Komplex in den Mitochondrien verankert (Nordzieke *et al.*, 2015). Zudem konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass die STRIPAK-Komponenten Far8, Far10 und Far11 in Sporidien in *U. maydis* ebenfalls an den Mitochondrien lokalisieren (Abbildung 25). Die regulatorische Untereinheit Far8 lokalisiert zudem zusätzlich in Filamenten an Mitochondrien (Abbildung 28). Aus diesem Grund sollte überprüft werden, ob die Rekrutierung des STRIPAK-Komplexes in *U. maydis* auch über das Ankerprotein abläuft und eine Deletion von *far10* folglich die Lokalisierung der übrigen Komponenten beeinflusst. Die Mikroskopie nach Deletion des Ankerproteins *far10* mit gleichzeitig GFP-markiertem Far8 (UJD148/UJD149/UJD150/UJD151: *AB31 gfp:umag\_03784:hyg<sup>R</sup>, Δumag\_04391::gent<sup>R</sup>*) zeigte in Sporidien eine Colokalisation der regulatorischen Untereinheit Far8 mit den Mitochondrien ebenso wie im Wildtyp (Abbildung 32a). Auch GFP-markiertes Far11 (UJD198/UJD199/UJD200: *AB31 gfp:umag\_10285:hyg<sup>R</sup>, Δumag\_04391::gent<sup>R</sup>*) zeigte nach *far10*-Deletion weiterhin eine Colokalisation mit den Mitochondrien in Sporidien. In Filamenten konnte weder für GFP-markiertes Far8 (UJD148/UJD149/UJD150/UJD151) noch für GFP-markiertes Far11 (UJD198/UJD199/UJD200) nach Deletion von *far10* eine Colokalisation mit den Mitochondrien beobachtet werden (Abbildung 32b). Da durch die Deletion von *far10* ein Zytokinesedefekt auftritt, wurden für die Beurteilung der Colokalisation in Filamenten lediglich Bereiche mit eindeutigem filamentösem Wachstum betrachtet.



**Abbildung 32: Lokalisation der STRIPAK-Komponenten Far8 und Far11 an den Mitochondrien nach Deletion von *far10***  
**(a)** Colokalisation der regulatorischen Untereinheit Far8 (UJD150: *AB31 gfp:umag\_03784:hyg<sup>R</sup>, Δumag\_04391::gent<sup>R</sup>*) (links) und des Entwicklungsproteins Far11 (UJD198: *AB31 gfp:umag\_10285:hyg<sup>R</sup>, Δumag\_04391::gent<sup>R</sup>*) (Mitte) mit den Mitochondrien nach Deletion von *far10* in Sporidien. **(b)** Keine Colokalisation der regulatorischen Untereinheit Far8 (UJD149: *AB31 gfp:umag\_03784:hyg<sup>R</sup>, Δumag\_04391::gent<sup>R</sup>*) (unten) und des Entwicklungsproteins Far11 (UJD198: *AB31 gfp:umag\_10285:hyg<sup>R</sup>, Δumag\_04391::gent<sup>R</sup>*) (rechts) mit den Mitochondrien nach Deletion von *far10* in Filamenten. Die Klammer markiert den filamentösen Bereich der durch Zytokinesedefekt geschädigten Zelle. Alle Proteine wurden als N-terminale GFP-Fusionen unter dem nativen Promotor exprimiert. Mitochondrien wurden mit MitoTracker™ (Invitrogen) gefärbt. Die Colokalisation von GFP und MitoTracker™ ist in Gelb dargestellt. Maßstab: 10 µm.

## 2.4. Zusammensetzung und Interaktion innerhalb des STRIPAK-Komplexes in *U. maydis*

Die Interaktion der STRIPAK-Komponenten wurde bereits in anderen Organismen untersucht. So konnte in *S. cerevisiae* mittels Co-Immunopräzipitationen (Co-IPs) gezeigt werden, dass Far8 mit Far9/Far10 interagiert, und Hefe-Zwei-Hybrid-Studien bestätigten die Interaktion von Far9/Far10 mit Far11 (Uetz *et al.*, 2000; Ito *et al.*, 2001; Gavin *et al.*, 2002; Ho *et al.*, 2002; Kemp and Sprague, 2003). Auch in *N. crassa* ergaben Co-IP Analysen eine Interaktion von PRO45, welches das Homolog zu Far10 ist, mit PRO11, dem Homolog von Far8, und von PRO22, dem Homolog von Far11, mit PRO11 (Bloemendal *et al.*, 2012; Nordzieke *et al.*, 2015). Im Rahmen dieser Arbeit konnten bereits die Colokalisation der STRIPAK-Komponenten Far8 (regulatorische Untereinheit), Far10 (Ankerprotein) und Far11 (Entwicklungsprotein) in Sporidien

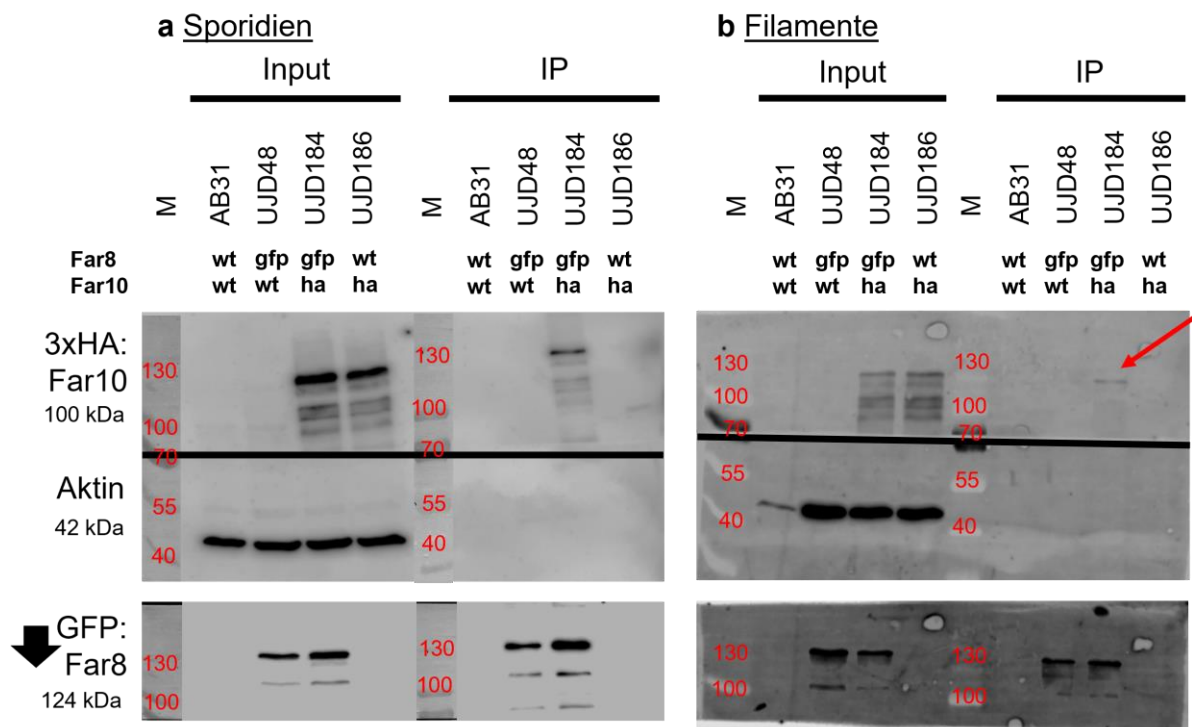
visualisiert werden. Um die Interaktion der Komponenten zu beweisen, wurden zudem Co-IPs mit anschließender Western Blot Analyse durchgeführt. Dazu wurden Stämme generiert, welche eine N-terminale Fusion von GFP mit einer der STRIPAK-Komponenten und gleichzeitig eine N-terminale Fusion von 3xHA mit einer anderen STRIPAK-Komponente enthalten. Stämme mit entweder N-terminaler GFP-Fusion oder N-terminaler 3xHA-Fusion und der Wildtypstamm ohne jegliche Markierung (AB31) wurden als respektive Kontrollen herangezogen. Zur Bestätigung bekannter STRIPAK-Komponenten und gleichzeitigen Identifikation neuer Interaktionspartner des STRIPAK-Komplexes wurde zudem eine Co-IP mit anschließender Massenspektrometrie (MS) durchgeführt.

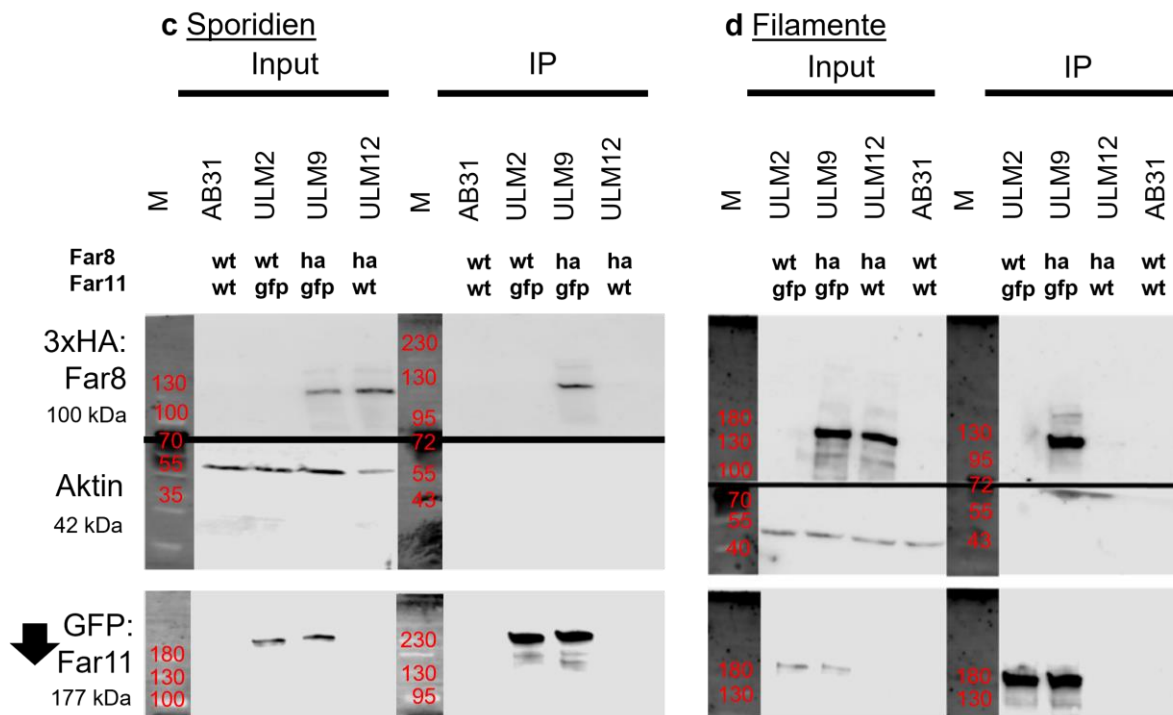
#### 2.4.1. Co-Immunopräzipitationen zeigten Interaktion der STRIPAK-Komponenten in Sporidien

Zur Bestätigung der Interaktion zwischen der regulatorischen Untereinheit Far8 und dem Ankerprotein Far10 wurde die Co-IP mit GFP-markiertem Far8 und 3xHA-markiertem Far10 unter Kontrolle der nativen Promotoren (UJD184: *AB31 gfp:umag\_03784:hyg<sup>R</sup>, 3xha:umag\_04391:gent<sup>R</sup>*) durchgeführt. Als Kontrolle für mögliche unspezifische Bindungen des angereicherten Proteins an die spezifischen Antikörper wurden Stämme verwendet, in denen entweder das Köderprotein (*bait*) (UJD186: *AB31 umag\_04391::ha:04391:gent<sup>R</sup>*) oder das Beuteprotein (*prey*) (UJD48: *AB31 gfp:umag\_03784:hyg<sup>R</sup>*) nicht mit der Markierung für die Co-IP versehen war. Aus exponentiell wachsenden Sporidien-Kulturen wurden die Proteine extrahiert, eine Co-IP durchgeführt und anschließend mittels Western Blot analysiert. GFP-markiertes Far8 wurde in der Co-IP als Köderprotein verwendet, sodass die Detektion von 3xHA-markiertem Far10 während der Western Blot Analyse einen Beweis für die Interaktion von Far8 und Far10 in Sporidien lieferte (Abbildung 33a). Die Detektion von Aktin erfolgte als Kontrolle für unspezifische Bindungen an die Beads. Es wurde ebenfalls eine Co-IP mit extrahierten Proteinen aus über 18 Stunden induzierten filamentösen Kulturen durchgeführt. Auch hier konnte in der nachfolgenden Western Blot Analysen eine schwache Interaktion gezeigt werden (Abbildung 33b). Da filamentöse Kulturen jedoch zahlreiche nicht induzierte Sporidien enthielten, könnte die in filamentösen Kulturen gefundene Interaktion auch durch die überbleibenden Sporidien begründet sein.

## Ergebnisse

Auch die Interaktion der regulatorischen Untereinheit Far8 und des Entwicklungsproteins Far11 wurde mittels Co-IP mit nachfolgender Western Blot Analyse untersucht. Die Co-IP wurde mit GFP-markiertem Far11 als Köderprotein und 3xHA-markiertem Far8 als Beuteprotein unter der Kontrolle der nativen Promotoren (ULM9: *AB31 gfp:umag\_10285:hyg<sup>R</sup>, 3xha:umag\_03784:gent<sup>R</sup>*) durchgeführt. Zum Ausschluss möglicher unspezifischer Bindungen des angereicherten Proteins wurden Stämme verwendet, in denen entweder das Köderprotein (*bait*) (ULM12: *AB31 gfp:umag\_10285:hyg<sup>R</sup>, 3xha:umag\_03784:gent<sup>R</sup>*) oder das Beuteprotein (*prey*) (ULM2: *AB31 gfp:umag\_10285:hyg<sup>R</sup>*) nicht mit der Markierung für die Co-IP versehen war. Die Detektion von Aktin erfolgte als Kontrolle für unspezifische Bindungen an die Beads.



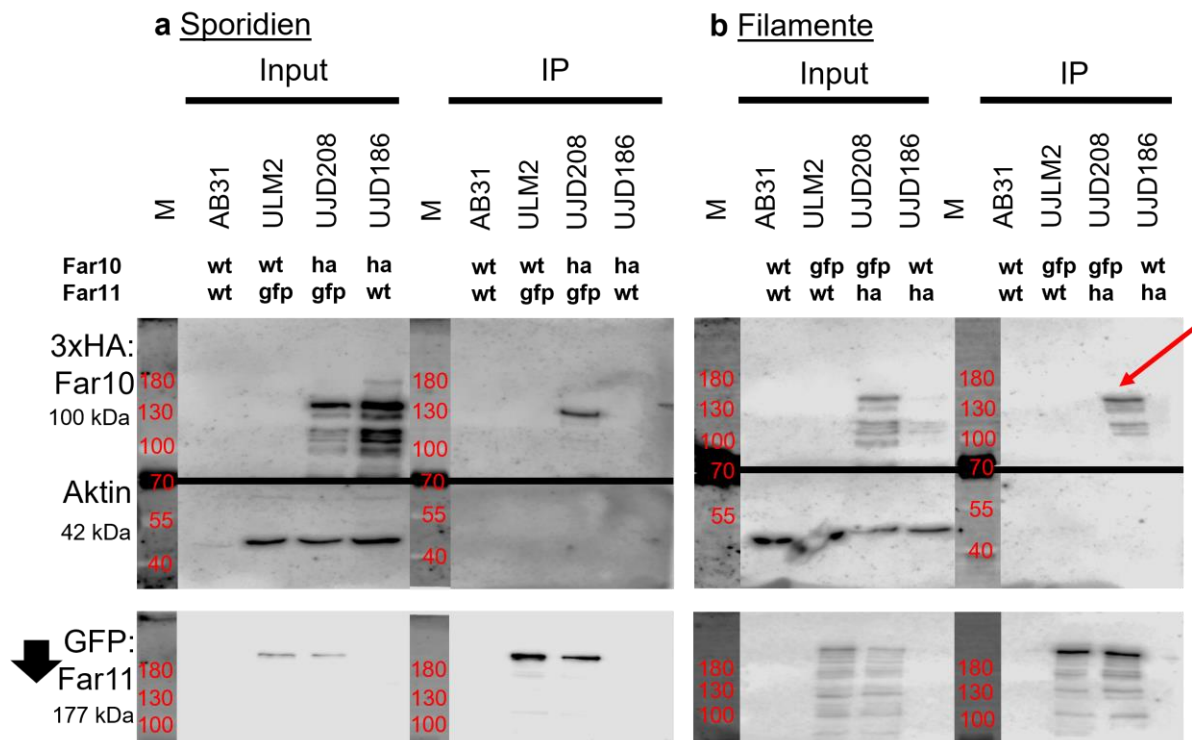


**Abbildung 33: Interaktion der regulatorischen Untereinheit Far8 mit dem Ankerprotein Far10 und mit dem Entwicklungsprotein Far11 in Sporidien und Filamenten**

(a)-(b) Western Blot der Co-IP in den Stämmen UJD48 (*AB31 umag\_03784::gfp:03784:hyg<sup>R</sup>*), UJD184 (*AB31 umag\_03784::gfp:03784:hyg<sup>R</sup>, umag\_04391::ha:04391:gent<sup>R</sup>*), UJD186 (*AB31 umag\_04391::ha:04391:gent<sup>R</sup>*) und der Negativkontrolle ohne Tags AB31. Durchführung der Co-IP mit GFP, Detektion im Western Blot mit HA und GFP. Die Detektion von Aktin erfolgte zur Kontrolle unspezifischer Proteinbindungen. Der Western Blot zeigt Interaktion der regulatorischen Untereinheit Far8 und des Ankerproteins Far10 in Sporidien (a) und in Filamenten (b). (c)-(d) Western Blot der Co-IP in den Stämmen ULM2 (*AB31 umag\_10285::gfp:10285:hyg<sup>R</sup>*), ULM9 (*AB31 umag\_10285::gfp:10285:hyg<sup>R</sup>, umag\_03784::ha:03784:gent<sup>R</sup>*), ULM12 (*AB31 umag\_03784::ha:03784:gent<sup>R</sup>*) und der Negativkontrolle ohne Tags AB31. Durchführung der Co-IP mit GFP, Detektion im Western Blot mit HA und GFP. Die Detektion von Aktin erfolgte zur Kontrolle unspezifischer Proteinbindungen. Der Western Blot zeigt Interaktion der regulatorischen Untereinheit Far8 und des Entwicklungsproteins Far11 in Sporidien (c) und in Filamenten (d, Morbé 2023).

Mit dem Gesamtproteinextrakt aus exponentiell wachsenden Sporidien-Kulturen wurde eine Co-IP mit anschließender Western Blot Analyse durchgeführt, welche die Interaktion der regulatorischen Untereinheit Far8 und dem Entwicklungsprotein Far11 bestätigt (Abbildung 33c). Die im Rahmen einer Bachelorarbeit durchgeführte Co-IP mit anschließender Western Blot Analyse aus über 18 Stunden induzierten filamentösen Kulturen ergab eine Interaktion von Far8 und Far11 in filamentösen Kulturen (Abbildung 33d) (Morbé, 2023). Jedoch sind auch hier vermutlich überlebende Sporidien in der filamentösen Kultur oder das graduelle Auflösen der Kolkolisation von Far8 und Far11 in Filamenten für die Interaktion verantwortlich.

## Ergebnisse



**Abbildung 34: Interaktion des Ankerproteins Far10 mit dem Entwicklungsprotein Far11 in Sporidien und Filamenten**

(a)-(b) Western Blot der Co-IP in den Stämmen ULM2 (*AB31 umag\_10285::gfp:10285::hyg<sup>R</sup>*), UJD208 (*AB31 umag\_10285::gfp:10285::hyg<sup>R</sup>, umag\_04391::ha:04391::gent<sup>R</sup>*), UJD186 (*AB31 umag\_04391::ha:04391::gent<sup>R</sup>*) und der Negativkontrolle ohne Tags AB31. Durchführung der Co-IP mit GFP, Detektion im Western Blot mit HA und GFP. Zur Kontrolle unspezifischer Proteinbindungen erfolgte die Detektion von Aktin. Der Western Blot zeigt Interaktion des Ankerproteins Far10 und des Entwicklungsproteins Far11 in Sporidien (a) und in Filamenten (b).

Außerdem wurde eine Co-IP mit anschließender Western Blot Analyse zur Bestätigung der Interaktion des Ankerproteins Far10 und des Entwicklungsproteins Far11 durchgeführt. Dabei wurde mit GFP-markiertes Far11 als Köderprotein und mit 3xHA-markiertes Far10 als Beuteprotein unter Kontrolle der nativen Promotoren (UJD208: *AB31 gfp:umag\_10285::hyg<sup>R</sup>, 3xha:umag\_04391::gent<sup>R</sup>*) verwendet. Als Kontrolle für mögliche unspezifische Bindungen des angereicherten Proteins wurden Stämme verwendet, in denen entweder das Köderprotein (*bait*) (UJD186: *AB31 umag\_04391::ha:04391::gent<sup>R</sup>*) oder das Beuteprotein (*prey*) (ULM2: *AB31 gfp:umag\_10285::hyg<sup>R</sup>*) nicht mit der Markierung für die Co-IP versehen war. Die Detektion von Aktin erfolgte als Kontrolle für unspezifische Bindungen an die Beads. Die Co-IP wurde mit einer Proteinpräparation aus exponentiell wachsenden Sporidien-Kulturen durchgeführt. Die nachfolgende Western Blot Analyse ergab eine Interaktion von Far10 und Far11 in Sporidien (Abbildung 34a). Ebenfalls zeigte die mit filamentösen Kulturen durchgeführte Proteinextraktion, Co-IP und Western Blot Analyse eine Interaktion von Far10 und Far11 in filamentösen Kulturen (Abbildung



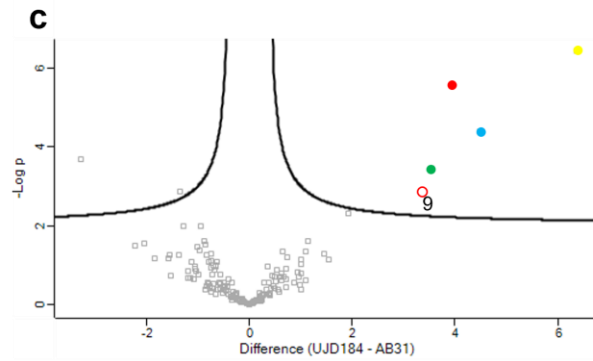
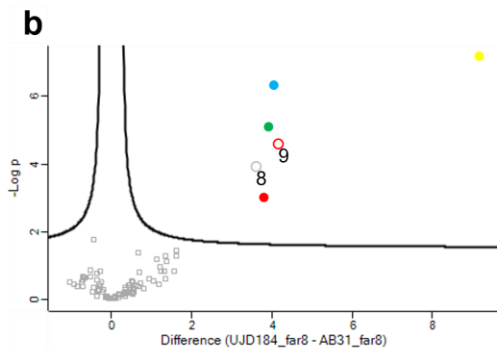
34b), wobei auch hier überlebende Sporidien und die graduelle Auflösung der Colokalisation ursächlich für die Interaktion sein könnten.

## 2.4.2. Massenspektrometrie bestätigt bekannte STRIPAK-Komponenten in *U. maydis*

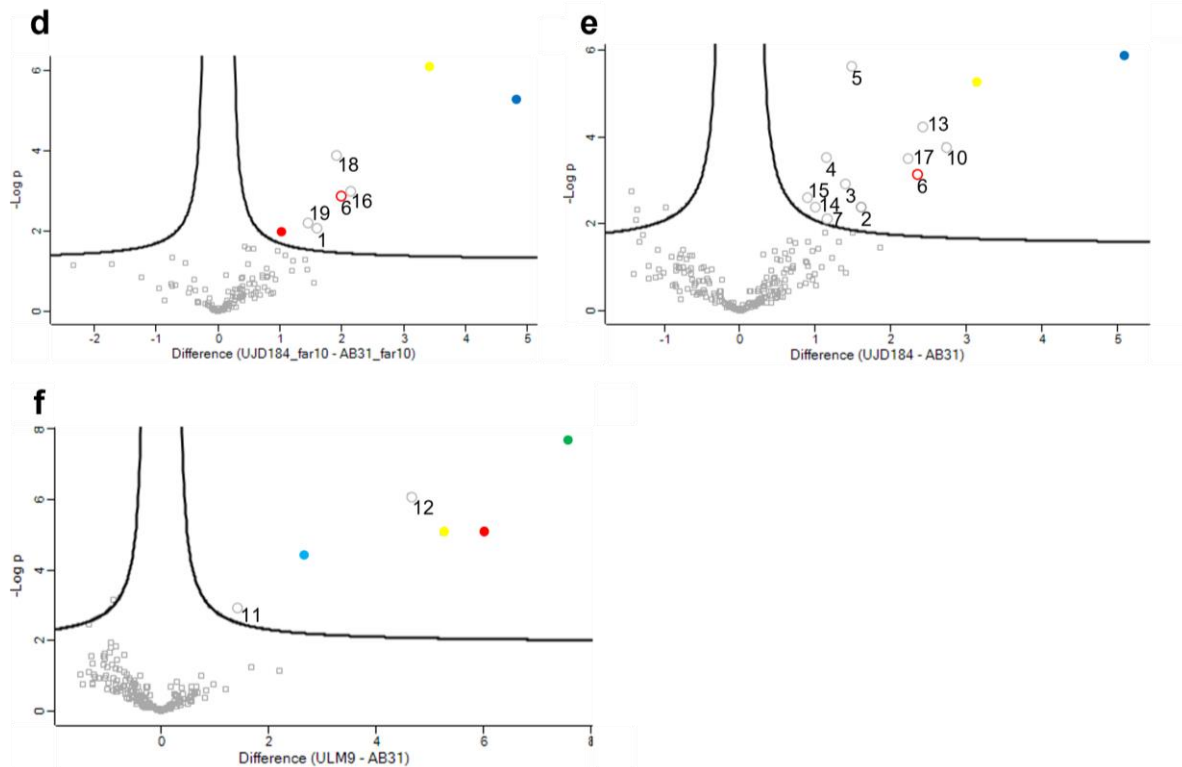
Aus anderen Organismen ist bereits mehr über die Zusammensetzung des STRIPAK-Komplexes bekannt. So besteht der Far-Komplex, das Homolog zum STRIPAK-Komplex in *S. cerevisiae*, neben der regulatorischen Untereinheit Far8, dem Ankerprotein Far10 und dem Entwicklungsprotein Far11, aus der katalytischen Untereinheit Ppg1, der strukturgebenden Untereinheit Tpd3, dem zweiten Ankerprotein Far9, den Kinasen Kic1 und Sps1 und den kleinen *coiled-coil* Proteinen Far3 und Far7 (Kemp and Sprague, 2003). Auch der STRIPAK-Komplex in *S. macrospora* verfügt neben der regulatorischen Untereinheit PRO11, dem Ankerprotein PRO45 und dem Entwicklungsprotein PRO22 über weitere Komponenten wie die katalytische Untereinheit PP2Ac1, die strukturgebende Untereinheit PP2AA, das kleine *coiled-coil* Protein SCI1, den Kinaseaktivator MOB3 und die Kinasen KIN3 und KIN24 (Kück *et al.*, 2016). Im Rahmen dieser Arbeit wurden mittels Co-IPs mit nachfolgender Massenspektrometrie mit Proteinextrakt aus Sporidien-Kulturen zusätzlich zu den drei markierten STRIPAK-Komponenten Far8, Far10 und Far11, weitere Komponenten des STRIPAK-Komplexes bestätigt und neue potenzielle Interaktionspartner des STRIPAK-Komplexes identifiziert. Dazu wurden während der Co-IP GFP-markiertes Far8 oder 3xHA-markiertes Far10 (UJD184: *AB31 gfp:umag\_03784:hyg<sup>R</sup>, 3xha:umag\_04391:gent<sup>R</sup>*) oder GFP-markiertes Far11 (ULM9: *AB31 gfp:umag\_10285:hyg<sup>R</sup>, 3xha:umag\_03784:gent<sup>R</sup>*) als Köderprotein verwendet. Die MS wurde durch den Kooperationspartner Serviceeinheit LCMS-Proteinanalytik der Georg-August-Universität in Göttingen durchgeführt. Für die Analyse wurden vier Wildtypstämme (AB31) mit vier Stämmen mit GFP-markiertem Far8 bzw. vier Stämmen mit 3xHA-markiertem Far10 verglichen. Die Ergebnisse der MS-Messung sind in Abbildung 35a dargestellt. Als Negativkontrollen wurden Wildtypstämme ohne Markierungen mit den gleichen Beads inkubiert, welche auch für die jeweiligen Proben verwendet wurden, und anschließend ebenfalls mittels MS gemessen. Proteine, die in den Negativkontrollen nachgewiesen werden konnten, wurden für die weitere Analyse nicht beachtet.

# Ergebnisse

a	Komponente	Far8↓		Far10↓		Far11↓		
		1. MS	2. MS	1. MS	2. MS	2. MS		
STRIPAK	strukturgebende UE	● UMAG_02960	18	11	10	*	28	
	katalytische UE	UMAG_10198	*	-	-	-	9	
	regulatorische UE	● UMAG_03784	72	36	14	5	22	
	Ankerprotein	● UMAG_04931	*	*	34	16	*	
	Entwicklungsprotein	● UMAG_10285	25	9	*	-	57	
	Kinasen	UMAG_10496	-	-	-	-	-	
		UMAG_05543	-	-	-	-	-	
	Kinaseaktivator	● UMAG_00493	12	13	-	-	6	
	zusätzlich gefundene Proteine	1	○ UMAG_00867	-	-	3	-	-
		2	○ UMAG_00955	-	-	-	2	-
3		○ UMAG_01209	-	-	-	6	-	
4		○ UMAG_01498	-	-	-	1	-	
5		○ UMAG_02081	-	-	-	1	-	
6		○ UMAG_03182	-	-	6	4	-	
7		○ UMAG_03622	-	-	-	1	-	
8		○ UMAG_03791	20	-	-	-	-	
9		○ UMAG_05552	25	12	-	-	-	
10		○ UMAG_05831	-	-	-	4	-	
Rvb1		○ UMAG_06201	-	-	-	-	3	
12		○ UMAG_10198	-	-	-	-	9	
13		○ UMAG_10287	-	-	-	2	-	
14		○ UMAG_10479	-	-	-	1	-	
15		○ UMAG_10701	-	-	-	1	-	
16		○ UMAG_11021	-	-	6	-	-	
17		○ UMAG_11270	-	-	-	1	-	
18		○ UMAG_11696	-	-	7	-	-	
19		○ UMAG_11952	-	-	4	-	-	







**Abbildung 35: Durch Co-IP mit anschließender MS bestätigte STRIPAK-Komponenten und neue identifizierte potenzielle Interaktionspartner**

(a) Tabellarische Auflistung der durch Co-IP und anschließender MS identifizierter und bestätigter Interaktionspartner. Die Verwendung der regulatorischen Untereinheit Far8 (UMAG\_03784) als Köderprotein bestätigte die STRIPAK-Komponenten UMAG\_02960 (strukturebende Untereinheit), Far11 (UMAG\_10285, Entwicklungsprotein) und UMAG\_00493 (Kinaseaktivator) als Interaktionspartner und identifizierte UMAG\_03791 und UMAG\_05552 als neue potenzielle Interaktionspartner. Mit dem Ankerprotein Far10 (UMAG\_04391) als Köderprotein für die Co-IP wurden die STRIPAK-Komponenten Far8 (UMAG\_03784, regulatorische Untereinheit) und UMAG\_02960 (strukturebende Untereinheit) als Interaktionspartner bestätigt und fünfzehn weitere Proteine als neue potenzielle Interaktionspartner identifiziert. Die Durchführung der Co-IP mit dem Entwicklungsprotein Far11 (UMAG\_10285) als Köder, bestätigte erneut die STRIPAK-Komponenten UMAG\_02960 (strukturebende Untereinheit), Far8 (UMAG\_03784, regulatorische Untereinheit) und UMAG\_00493 (Kinaseaktivator) und identifizierte zudem Rvb1 (UMAG\_06201) und UMAG\_10198 als neue potenzielle Interaktionspartner. Die Zahlen beziffern die gefundenen Peptide. Die Pfeile markieren das Köderprotein. Mit Stern markierte Proteine wurden als nicht signifikant herausgefiltert. (b)-(f) Die statistische Auswertung der Ergebnisse der Massenspektrometrie nach Co-IP mit Far8 (b)-(c) bzw. Far10 (d)-(e) bzw. Far11 (f) als Köderprotein erfolgte durch Perseus mittels zweiseitigem t-Test (FDR = 0.05; S0 = 0.1) und wurde mittels *volcano plot* visualisiert.

In zwei Co-IPs und nachfolgenden LC-MS-Messungen mit GFP-markiertem Far8 als Köderprotein konnte eine signifikante Anreicherung der strukturebenden Untereinheit (UMAG\_02960), des Entwicklungsproteins Far11 (UMAG\_10285) und des Kinaseaktivators (UMAG\_00493) gemessen werden, deren Homologe in anderen Organismen bereits als STRIPAK-Komponenten bestätigt wurden. Zusätzlich wurden ein ATPase der HSP70-Familie (UMAG\_03791) und ein bisher unbekanntes Protein (UMAG\_05552) durch eine signifikante Anreicherung als potenzielle Interaktionspartner von Far8 bzw. des STRIPAK-Komplexes identifiziert. UMAG\_05552 war dabei in beiden durchgeführten MS-Messungen signifikant

## Ergebnisse

angereichert. Auch in zwei Co-IPs und anschließende LC-MS-Messungen mit 3xHA-markiertem Far10 als Köderprotein konnte eine signifikante Anreicherung der regulatorischen Untereinheit Far8 (UMAG\_03784) und der strukturegebenden Untereinheit (UMAG\_02960), welche in anderen Organismen bereits als STRIPAK-Komponenten bestätigt wurden, beobachtet werden. Darüber hinaus wurden die kleine (40s) ribosomale Untereinheit S22 (UMAG\_00867), die  $\Delta$ 24-Sterol-Methyltransferase Erg6 (UMAG\_03182), die putative C24-Sterol-Reduktase (UMAG\_01498), die putative  $\Delta$ 9-Fettsäure-Desaturase (UMAG\_00955), die Trans-2-Enoyl-CoA-Reduktase Tsc13 (UMAG\_03622), Calnexin (UMAG\_10287), die 60s ribosomale Untereinheit L37 (UMAG\_10701), die ATPase der HSP70-Familie Ssc1 (UMAG\_01209) ein putativer TOM-Komplex Proteinimportrezeptor (UMAG\_11021) und das putative HSP80 Protein (UMAG\_11952) aufgrund der signifikanten Anreicherung als potenzielle Interaktionspartner von Far10 identifiziert. Die  $\Delta$ 24-Sterol-Methyltransferase Erg6 (UMAG\_03182) konnte in beiden CoIPs mit 3xHA-markiertem Far10 signifikant angereichert werden. Zusätzlich konnten die bisher nicht charakterisierten Proteine UMAG\_10479, UMAG\_11696 und UMAG\_02081 identifiziert werden. Mit GFP-markiertem Far11 konnte mittels Co-IP und anschließende LC-MS eine signifikante Anreicherung des Kinaseaktivators (UMAG\_00493), der strukturegebenden Untereinheit (UMAG\_02960), der katalytischen Untereinheit (UMAG\_10198) und der regulatorischen Untereinheit (UMAG\_03784) der Phosphatase als bekannte STRIPAK-Komponenten bestätigen. Zudem wurde die ATP-abhängige DNA-Helikase der RuvB-Familie (UMAG\_06201) aufgrund signifikanter Anreicherung als potenzieller Interaktionspartner des Entwicklungsproteins Far11 identifiziert. Lediglich das bisher uncharakterisierte Protein UMAG\_11270 und die putative HSP60 Chaperon-ATPase (UMAG\_05831) wurden als potenzielle Interaktionspartner des STRIPAK-Komplexes ausgeschlossen, da beide Proteine auch in anderen, STRIPAK-unabhängigen LC-MS-Messungen signifikant angereichert waren. Die statistische Auswertung der Ergebnisse der MS mit GFP-markiertem Far8 als Köderprotein (Abbildung 35b/c) bzw. 3xHA-markiertem Far10 als Köderprotein (Abbildung 35d/e) bzw. GFP-markiertem Far11 (Abbildung 35f) erfolgte durch Perseus mittels zweiseitigem t-Test (FDR = 0.05; S0 = 0.1) und wurde mittels *volcano plot* visualisiert.

### 3. Diskussion

---

Beim STRIPAK-Komplex handelt es sich um einen in Eukaryoten hochkonservierten Komplex, welcher bereits unter anderem in Ascomyzeten untersucht wurde. Da der Komplex eine wichtige Rolle innerhalb der Zellen einnimmt, wurde dieser im Rahmen dieser Arbeit zum ersten Mal in einem Basidiomyzeten untersucht. Hierfür wurde der Modellorganismus *U. maydis* aus der Abteilung der Basidiomyzeten verwendet. Für andere Organismen konnte der Einfluss des STRIPAK-Komplexes auf diverse Signalwege gezeigt werden. Dazu gehören Signalweiterleitung, Zellzykluskontrolle, Apoptose, Vesikeltransport, die Assemblierung des Golgi-Apparats, Zellpolarität, Zellmigration, kardiale Funktion und neuronale und vaskuläre Entwicklung (zusammengefasst in Hwang and Pallas, 2014). Zudem konnte für höhere Eukaryoten gezeigt werden, dass der STRIPAK-Komplex eine Rolle bei Krankheiten wie Diabetes, Autismus, Herzkrankheiten, Krebs und zerebralen Gefäßfehlbildungen besitzt (zusammengefasst in Hwang and Pallas, 2014). Aus diesem Grund ist es maßgeblich, die Funktion und Zusammensetzung des STRIPAK-Komplexes aufzuklären. In Vorarbeiten konnte dabei bereits gezeigt werden, dass die Deletion des Ankerproteins *far10* im Basidiomycet *U. maydis* zu einem Zytokinese- und Polaritätsdefekt, zu Apathogenität und zu Defekten in der Hyphenfusion führt (Dennig, 2020). Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Lokalisation, Zusammensetzung und Interaktion des STRIPAK-Komplexes und die Deletion des Ankerproteins *far10* im Modellorganismus *U. maydis* weiter untersucht, um das Wissen um die Funktion und Rolle des STRIPAK-Komplexes zu erweitern.

#### 3.1. Die regulatorische Untereinheit Far8 und das Entwicklungsprotein Far11 sind essenziell in *U. maydis*

Aufgrund von Resultaten aus Vorarbeiten wurde bereits vermutet, dass die regulatorische Untereinheit Far8 und das Entwicklungsprotein Far11 in *U. maydis* essenziell sind (Dennig, 2020). Die Produktion von diploiden, heterozygoten Sporen, welche die Deletion der regulatorischen Untereinheit Far8 bzw. die Deletion des Entwicklungsproteins Far11 in nur einem Allel enthalten, und deren Meiose und Auskeimung zu haploiden Sporidien, zeigte ausnahmslos Sporidien ohne Deletion

## Diskussion

(Abbildung 14). Damit konnte im Rahmen dieser Arbeit bewiesen werden, dass sowohl die regulatorische Untereinheit Far8 als auch das Entwicklungsprotein Far11 in *U. maydis* essenziell sind. Es ist kein anderer Organismus bekannt, in dem die regulatorische Untereinheit der Phosphatase oder das Entwicklungsprotein essenziell sind. Lediglich die katalytische Untereinheit der Phosphatase ist in *S. macrospora* und *N. crassa* essenziell (Yatzkan and Yarden, 1995; Egan *et al.*, 2009; Beier *et al.*, 2016). Auch für die strukturgebende Untereinheit der Phosphatase konnte gezeigt werden, dass diese in *A. nidulans* essenziell ist (Elramli *et al.*, 2019).

Eine Erklärungsmöglichkeit wären vom STRIPAK-Komplex unabhängige Interaktionen der essentiellen Komponenten. Hefe-Zwei-Hybrid-Studien identifizierten fünf potenzielle, vom Far-Komplex unabhängige Interaktionspartner von Far8 bzw. Far11 in *S. cerevisiae*. Bei den potenziellen Interaktionspartnern von Far8 handelt es sich um die nicht essenzielle DNA-Helikase und DNA-abhängige ATPase Srs2, das ER-Lumen Chaperon Lhs1, den translationalen Inhibitor Nst1 und Did2, welches eine Komponente der vakuolären Proteinsortierung ist (Chiolo *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2012). Die in *S. cerevisiae* nicht essenzielle, kleine Rho-GTPase Rho4 konnte zudem als Interaktionspartner von Far11 identifiziert werden (Uetz *et al.*, 2000). Rho4 ist in *S. cerevisiae* involviert in die Etablierung des Zellpolarität und in *U. maydis* nötig für das polare Wachstum (Banuett *et al.*, 2008). Die Deletion des Chaperons Lhs1 führt in *S. cerevisiae* zu Defekten in der posttranslationalen Proteintranslokation und in der Reparatur von fehlgefalteten Proteinen im ER (Baxter *et al.*, 1996; Craven *et al.*, 1996; Hamilton and Flynn, 1996; Saris *et al.*, 1997). Eine Deletion von *did2* in *U. maydis* führt zur gestörten Reifung früher Endosomen und Defekten im Mikrotubuli-abhängigen Transport von frühen Endosomen (Haag *et al.*, 2017). Nst1 wird als Brücke des Pheromonsignalweges und des Zellwandintegritätssignalweges in *S. cerevisiae* beschrieben (Leng and Song, 2016). Dies lässt eine mögliche Funktion der regulatorischen Untereinheit und des Entwicklungsproteins unabhängig vom STRIPAK-Komplex in *U. maydis* vermuten, welche im Folgenden weitergehend untersucht werden müsste. Hierzu könnten die in *S. cerevisiae* beobachteten Interaktionen in *U. maydis* überprüft werden.

Im Gegensatz zu *U. maydis* war in anderen Organismen eine Deletion der regulatorischen Untereinheit bzw. des Entwicklungsproteins erfolgreich und lieferte Aufschluss über die Rolle des STRIPAK-Komplexes. So führte die Deletion der regulatorischen Untereinheit *far8* bzw. des Entwicklungsproteins *far11* in *S. cerevisiae*

nach zehn Stunden zur verfrühten Rückkehr aus dem pheromonabhängigen Zellzyklusarrest (Kemp and Sprague, 2003). Das Ausbleiben der Hyphenfusion, reduziertes Wachstum, eine geringere Anzahl an Konidiosporen, vergrößerte Vakuolen, weniger Luftmycel, verspätete Bildung von Protoperithezien, keine Perithezienbildung, das Ausbleiben von Ascosporen und damit die weibliche Sterilität sind Folgen der Deletion der regulatorischen Untereinheit *ham-3* bzw. des Entwicklungsproteins *ham-2* in *N. crassa* (Raymond *et al.*, 1992; Xiang *et al.*, 2002; Simonin *et al.*, 2010; Dettmann *et al.*, 2013). Die Deletion der regulatorischen Untereinheit *pro11* in *S. macrospora* hat die Reduktion der Menge an rudimentären Ascogonien, das Fehlen der Protoperithezien und das Fehlen der Perithezien zur Folge (Bloemendal *et al.*, 2012; Reschka *et al.*, 2018). Die Deletion des Entwicklungsproteins *pro22* in *S. macrospora* resultiert hingegen in kleinen, defekten Protoperithezien, dem Fehlen von Perithezien, dem Ausbleiben der Hyphenfusion, dem Fehlen von Septen in den Ascogonien und der Sterilität (Bloemendal *et al.*, 2010).

Zur weiteren Aufklärung der Rolle der regulatorischen Untereinheit der Phosphatase *far8* und des Entwicklungsproteins *far11* in *U. maydis* müsste im Folgenden eine konditionelle Deletion von *far8* und *far11* erstellt werden. Da eine Deletion der beiden Komponenten letal in *U. maydis* ist, in anderen Organismen jedoch Auswirkungen auf die verschiedenen Bereiche des sexuellen Zyklus hatte, könnte mittels des Cre-Lox-Systems eine solche konditionelle Deletion erzeugt werden. Dabei würde das zu deletierende Gen mit den *loxP*-Erkennungssequenzen der Cre-Rekombinase in gleicher Orientierung flankiert. Die chimäre Cre-Rekombinase, welche die Spaltung und Neuverknüpfung von DNA zwischen spezifischen Basensequenzen katalysiert, würde unter der Kontrolle des *crg*-Promotors ( $P_{crg}$ ) gebunden an eine Tamoxifenempfindliche Ligandenbindedomäne des Östrogenrezeptors aus Mäusen in *U. maydis* eingebracht (De La Torre *et al.*, 2021). Durch die Zugabe von Tamoxifen und Arabinose ins Medium könnte dadurch präzise und zeitlich genau definiert die konditionelle Deletion induziert werden. Auf diese Weise könnte für eine kurze Zeit der Phänotyp der Deletion von *Far8* bzw. *Far11* beobachtet werden. Mit ersten Versuchen einer konditionellen Deletion von *Far8* bzw. *Far11* wurde bereits begonnen.

Weitere Aufschlüsse über die Rolle der regulatorischen Untereinheit der Phosphatase und des Entwicklungsproteins und den Grund der Letalität der Deletionen in *U. maydis* könnte zudem durch Co-IP und anschließende LC-MS gewonnen werden.

### 3.2. Deletion des Ankerproteins *far10*

Die einzige Komponente des STRIPAK-Komplexes in *U. maydis*, deren Deletion nicht letal ist und gleichzeitig zu einem sichtbaren Phänotyp führt, ist das Ankerprotein Far10. Durch die Deletion des Ankerproteins wurde daher versucht, Rückschlüsse auf die Rolle und Funktion des STRIPAK-Komplexes in *U. maydis* zu ziehen. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine *far10*-Deletion nach 18 Stunden die verfrühte Rückkehr aus dem pheromonabhängigen Zellzyklusarrest und damit die Knospung an der Spitze der Konjugationshyphen zur Folge hat (Abbildung 15). Auch in *S. cerevisiae* führt die Deletion des Ankerproteins *far10* bereits nach zehn Stunden zur verfrühten Rückkehr aus dem pheromonabhängigen Zellzyklusarrest (Kemp and Sprague, 2003). Es ist bisher nicht bekannt, wie genau der Far-Komplex in *S. cerevisiae* bei der Aufrechterhaltung des Zellzyklusarrest beteiligt ist, er gilt jedoch als Schnittstelle zwischen der Pheromonantwort und der Zellzyklusregulation. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass der mitotische und meiotische Zellzyklus in *S. cerevisiae* durch die cyclinabhängige Kinase Cdc28-Cln reguliert wird. Durch die Bindung von Far1 an Cdc28 wird die Aktivität von Cdc28-Cln im Zellzyklus und damit der Fortschritt von der G<sub>1</sub>- zur S-Phase verhindert (Peter *et al.*, 1993; Tyers and Futcher, 1993; Peter and Herskowitz, 1994). Zudem hält die Bindung von Far1 an Cdc28-Cln in *S. cerevisiae* Cdc24, welcher als GEF (*guanin exchange factor*) die Rho-GTPase Rac1 durch den Austausch von gebundenem GDP zu gebundenem GTP aktiviert, im Nukleus (Shimada *et al.*, 2000; Schmidt and Hall, 2002). Rho-GTPasen fungieren als molekulare Schalter der Zellpolarität, Morphogenese und Zellteilung (Takai *et al.*, 1992; Jaffe and Hall, 2005), welche hauptsächlich durch die Organisation des Aktinzytoskeletts reguliert werden (Johnson and Pringle, 1990; Ridley and Hall, 1992a; Ridley and Hall, 1992b). Die Rho-GTPase Rac1 (*ras-related C3 botulinum toxin substrate*) besitzt Einfluss auf die Bildung und die Assemblierung des Aktinzytoskeletts und reguliert auf diese Weise die Sekretion in Wachstumsrichtung, wodurch die Polarität der Zelle gewährleistet wird. Zudem wird Rac1 in *U. maydis* für die Septinorganisation und den Wechsel von saprophytischem zu biotrophem Wachstum benötigt (Mahlert, 2006). Eine Deletion von *rac1* führt in *U. maydis* zu abnormaler Zellpolarität und einem gestörten Wechsel von saprophytischem zu biotrophem Wachstum. Obwohl bei der Deletion während der Kernteilung die Kernhülle trotz offener Mitose nicht zerfällt, besitzt Rac1 keinen Einfluss auf die korrekte Kernverteilung in *U. maydis* (Mahlert, 2006). In einem Komplex mit Bem1 resultiert die

Aktivierung von Rac1 in *U. maydis* in der Degradierung von Cdc24 in Abhängigkeit von Cla4 aus der Familie der p21-aktivierten Kinasen (PAKs) (Frieser *et al.*, 2011). Die Deletion von *cla4* führt ebenso wie die *rac1*-Deletion in *U. maydis* zur Abschnürung am zentral lokalisierten Septum, verlangsamer Endozytose und zum Fehlen der Hyphenfusion (Leveleki *et al.*, 2004; Mahlert, 2006). Bei gleichzeitiger Deletion von *rac1* und *cla4* entstehen in *U. maydis* fragmentierte Vakuolen. Sowohl die Deletion von *cla4* als auch die Mutation einer Phosphorylierungsstelle innerhalb der katalytischen Domäne führten unter anderem in *S. macrospora* reduziertem Wachstum (Märker *et al.*, 2020). Es konnte gezeigt werden, dass der Phosphorylierungsstatus von Cla4 durch den STRIPAK-Komplex beeinflusst wird und Cla4 zudem mit dem Entwicklungsprotein PRO22 in *S. macrospora* assoziiert (Märker *et al.*, 2020). Da beobachtet wurde, dass die Deletion von *far10* zu reduziertem *b*-abhängigem filamentösen Wachstum (Abbildung 17) ohne veränderte Expression der *a*- und *b*-abhängigen Gene führt (Abbildung 18), ist ein Einfluss des STRIPAK-Komplexes über die PAK Cla4 auf das filamentöse Wachstum denkbar.

Cla4 zeigte sich in *S. cerevisiae* außerdem nötig für die Assemblierung des Aktinrings während der Zytokinese (Kadota *et al.*, 2004) und ist in *U. maydis* sowohl mit Rac1 als auch mit Cdc42 assoziiert (Leveleki *et al.*, 2004). Die beiden Rho-GTPasen fungieren in der Weiterleitung von Signalen als Vermittler zwischen membranständigen Rezeptoren und MAPK-Kaskaden. Eine gleichzeitige Deletion von *rac1* und *cdc42* in *U. maydis* ist letal (Mahlert *et al.*, 2006), was gemeinsame Effektoren, wie das Formin UmSepA und die PAKs Cla4 und Smu1, der beiden Proteine bestätigt (Zhang *et al.*, 1995). Die Zytokinese, welche in die Bildung eines Aktinrings durch Septine, die Septumbildung und die Zellseparation unterteilt werden kann (Böhmer *et al.*, 2008), wird in *U. maydis* über die Rho-GTPase Cdc42 reguliert (Mahlert *et al.*, 2006). Die Deletion von *cdc42* führt in *N. crassa* und *A. nidulans* zu reduziertem Wachstum, abnormalem Verzweigen und einer generell abnormalen Hyphenmorphologie (Virag *et al.*, 2007; Araujo-Palomares *et al.*, 2011). Eine *cdc42*-Deletion in *U. maydis* führt zur Apathogenität des Pilzes, zum Fehlen der Hyphenfusion und zur Clusterbildung von Sporidien, welche über primäre Septen miteinander verbunden bleiben (Mahlert *et al.*, 2006). Ein ähnlicher Phänotyp konnte nach Deletion des Ankerproteins *far10* bereits in Vorarbeiten beobachtet werden. So resultiert die *far10*-Deletion in *U. maydis* in einem Zytokinese- und Polaritätsdefekt erkennbar durch geclusterte Zellen (Abbildung 13a) (Dennig, 2020). Aufgrund der Assoziation von Cla4 mit Rac1 und Cdc42 in

## Diskussion

*U. maydis* und der Rolle, welche der STRIPAK-Komplex auf den Phosphorylierungsstatus von Cla4 besitzt, ist ein Einfluss des STRIPAK-Komplexes auf die Funktion von Cdc42 und Rac1 denkbar.

Die Deletion von *don1*, welcher der GEF der Rho-GTPase Cdc42 ist, führt ebenfalls zur Clusterbildung der durch primäre Septen verbundenen Sporidien, jedoch nicht zur Apathogenität (Mahlert, 2006; Schink and Bölker, 2009). Zusätzlich zu Don1 beeinflusst auch Don3 über einen parallelen Signalweg die Zytokinese in *U. maydis* (Weinzierl et al., 2002). Eine BLAST®-Analyse offenbarte die Kinase Don3 (UMAG\_05543) als potenzielle Komponente des STRIPAK-Komplexes in *U. maydis* (Anhang: Tabelle 14). Bei Don3 handelt es sich um das Homolog zu Sid1, welches in *S. pombe* als Teil des SIN-Komplex wirkt. Im Gegensatz zu den restlichen SIN-Komponenten von *U. maydis*, welche lediglich die Auflösung der Kernhülle während der Mitose regulieren, verfügt Don3 auch über Funktionen während der Zytokinese (Straube et al., 2005; Sandrock et al., 2006). So konnte gezeigt werden, dass sowohl Don3 als auch Cdc42 für die Bildung des kontraktiven Aktinmyosinrings im Rahmen der Zytokinese nötig sind. Es wird vermutet, dass durch Don3 ein Protein phosphoryliert wird, welches in Abhängigkeit von Cdc42 nötig für die Bildung des Aktinmyosinrings ist (Böhmer et al., 2008). Es konnte zudem gezeigt werden, dass Don3 in *U. maydis* für die unkonventionelle Sekretion der Chitinase Cts1 nötig ist, welche ebenfalls eine Rolle während der Zytokinese spielt (Aschenbroich et al., 2019). Die Chitinase lokalisiert dabei während der Zytokinese in der Fragmentierungszone und stellt durch die Degradierung von Chitin die Ablösung der Tochterzelle sicher. Sowohl Don3 als auch Cla4 bilden somit eine Verbindung der Regulation von Zytokinese und Polarität mit dem STRIPAK-Komplex und könnten den Zytokinese- und Polaritätsdefekt der *far10*-Deletion erklären. Auch das Formin und Drf-Protein (*diaphanous related formine homology protein*) UmSepA, welches als Effektor von Cdc42 und Rac1 beschrieben ist, könnte eine Verbindung des STRIPAK-Komplexes mit der Regulation von Zytokinese, Polarität und filamentösem Wachstum herstellen. So konnte in *S. macrospora* gezeigt werden, dass SepA mit dem Ankerprotein PRO45 interagiert (Nordzieke et al., 2015). UmSepA verfügt außerdem über eine GTPase-Bindedomäne, worüber es durch die Bindung an Cdc42 oder Rac1 aktiviert werden kann (Alberts, 2003). SepA besitzt in *A. nidulans* zudem Einfluss auf die Polarität und die Bildung des Aktinrings während der Zytokinese (Harris et al., 1997).



Während die Kreuzung der Wildtypstämme und die Kreuzung des Wildtypstamms mit *a1*-Hintergrund mit dem *far10*-Deletionsstamm mit *a2*-Hintergrund zu deutlichem Wachstum von Konjugationshyphen führt, konnte in Kreuzungen, in denen der *far10*-Deletionsstamm mit *a1*-Hintergrund beteiligt ist, kein Wachstum von Konjugationshyphen beobachtet werden (Abbildung 16a). Der gleiche Effekt wurde bereits für die Deletion von *smu1* im *a1*-Hintergrund beschrieben (Smith *et al.*, 2004). Die p21-aktivierte Kinase Smu1 (*Ste20p affecting mating in Ustilago*) besitzt sowohl eine N-terminale Cdc42-Rac1-Bindedomäne als auch eine C-terminale katalytische Domäne (Smith *et al.*, 2004). Ste20, das Homolog zu Smu1 in *S. cerevisiae*, spielt eine Rolle in der Regulation der Pheromonantwort, des filamentösen Wachstums, der Organisation des Aktinzytoskeletts und der Polarität (Leberer *et al.*, 1992; Liu *et al.*, 1993; Ramer and Davis, 1993; Roberts and Fink, 1994; Cvrcková *et al.*, 1995; Akada *et al.*, 1996; Wu *et al.*, 1996; Eby *et al.*, 1998; O’rourke and Herskowitz, 1998; Holly and Blumer, 1999; Raitt *et al.*, 2000; Sheu *et al.*, 2000). Ursächlich für die Reduktion des Wachstums von Konjugationshyphen war hierbei eine deutliche Reduktion der Pheromonsekretion der *smu1*-Deletionsstämmen im Vergleich mit einem Wildtypstamm. Zudem war die Expression von *mfa2* in *smu1*-Deletionsstämmen deutlich reduziert (Smith *et al.*, 2004). Kreuzungen von *smu1*-Deletionsstämmen mit kompatiblen Wildtypstämmen auf Aktivkohlemedium zeigten zudem einen stärkeren Effekt der *smu1*-Deletion im *a2*-Hintergrund auf die Fusion (Smith *et al.*, 2004). Auch die Kreuzung von *far10*-Deletionsstämmen mit *a2*-Hintergrund mit dem kompatiblen Wildtypstamm resultierten deutlich reduziertem filamentösem Wachstum auf Aktivkohlemedium (Abbildung 16c). Eine Überprüfung der *mfa2*-Expression in *far10*-Deletionsstämmen würde die Parallelen zum Phänotyp der *smu1*-Deletion untersuchen und eine Verbindung des STRIPAK-Komplexes mit der p21-aktivierten Kinase Smu1 (*Ste20p affecting mating in Ustilago*) überprüfen.

In *N. crassa* konnte außerdem gezeigt werden, dass auch Cla4 für die Zellfusion und Bildung von CATs (*conidial anastomosis tubes*) nötig ist (Lichius *et al.*, 2014). Wie die Deletion von *cla4* in *U. maydis*, aufgrund der daraus resultierenden Defekte in der Hyphenfusion zeigen konnte, besitzt Cla4 ebenfalls Einfluss auf die Hyphenfusion. Die Kreuzung eines *cla4*-Deletionsstamms mit *a1*-Hintergrund mit einem Wildtypstamm oder einem *cla4*-Deletionsstamm mit *a2*-Hintergrund führt zu einer reduzierten Anzahl an Fusionsereignissen (Leveleki *et al.*, 2004). Eine Quantifizierung ergab, dass auch die Kreuzung von *far10*-Deletionsstämmen mit dem jeweils kompatiblen Wildtypstamm

## Diskussion

in einer signifikant reduzierten Anzahl an Fusionsereignissen resultierten (Abbildung 16e). Kreuzungsexperimente auf Aktivkohlemedium und folgende Real-Time-PCRs zeigten reduziertes filamentöses Wachstum infolge einer reduzierten Anzahl von Fusionsereignissen und eine deutlich reduzierte Expression der *b*-abhängigen Gene *dik6* und *clp1* bei Kreuzung des *far10*-Deletionsstamms mit *a2*-Hintergrund mit dem Wildtyp oder mit dem *far10*-Deletionsstamm mit *a1*-Hintergrund auf Aktivkohlemedium (Abbildung 16c/d). Die reduzierte Anzahl der Fusionsereignisse nach Kreuzung des *far10*-Deletionsstamms mit *a2*-Hintergrund mit dem Wildtyp oder mit dem *far10*-Deletionsstamm mit *a1*-Hintergrund könnte dabei eine Ursache für die verminderte Expression der *b*-abhängigen Gene sein. Eine zusätzlich zu *far10* eingebrachte Deletion von *lga2* und *rga2* führte zu keiner Änderung der Anzahl der Fusionsereignisse (Abbildung 16e). Die Proteine Lga2 und Rga2 sind in *U. maydis* für die uniparentale Vererbung mitochondrieller DNA verantwortlich. Da die Elimination mitochondrieller DNA, welche für die uniparentale Vererbung essenziell ist, jedoch erst nach erfolgreicher Fusion stattfindet, die Deletion von *far10* aber die erfolgreiche Fusion verhindert (Abbildung 16b), ist ein Einfluss des STRIPAK-Komplexes auf die uniparentale Vererbung mitochondrieller DNA unwahrscheinlich.

Für die Cdc42-Effektoren Cla4 und Smu1 konnte außerdem bereits gezeigt werden, dass sie für die Pathogenität von *U. maydis* notwendig sind (Leveleki *et al.*, 2004; Smith *et al.*, 2004). Die Apathogenität, welche nach Deletion des Ankerproteins *far10* in *U. maydis* auftritt, lässt sich jedoch vermutlich eher durch die fehlende Anheftung der Sporidien an die Pflanzenoberfläche erklären. In Vorarbeiten zeigte sich eine deutlich reduzierte Pathogenität nach *far10*-Deletion (Abbildung 13d), welche im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden konnte (Abbildung 19). Die Symptome der Infektion mit dem solopathogenen *far10*-Deletionsstamm waren lediglich unspezifische Symptome wie Chlorosen und im Vergleich zu den Symptomen der Infektion mit dem solopathogenen Wildtypstamm aber auch im Vergleich zur Infektion mit einem haploiden Wildtypstamm signifikant reduziert. Bereits in Vorarbeiten konnte zudem gezeigt werden, dass die Anzahl der nach drei Tagen auf dem Blatt verbliebenen Sporidien des *far10*-Deletionsstamms im Vergleich zur Anzahl der Sporidien des Wildtypstamms deutlich reduziert ist. Nach drei Tagen konnten nahezu keine Sporidien des *far10*-Deletionsstamms auf der Pflanzenoberfläche und keine Filamente des *far10*-Deletionsstamms auf der Pflanzenoberfläche oder innerhalb der Pflanze gefunden werden (Abbildung 13e). Es wird vermutet, dass eine fehlende

Anheftung der Sporidien an die Pflanzenoberfläche daher zu den signifikant reduzierten Symptomen der Pflanzeninfektion geführt hat. Ein Ziel dieser Arbeit war es daher, weitere Auswirkungen der *far10*-Deletion in Zusammenhang mit der Anheftung an die Pflanzenoberfläche zu identifizieren. Für die Anheftung an die Blattoberfläche von Reis bildet der Pilz *M. grisea* eine *spore tip mucilage* (STM), deren Zusammensetzung jedoch nicht bekannt ist (Koga and Nakayachi, 2004). Auch die Anheftung von *U. maydis* an die Pflanzenoberfläche von Mais erfolgt über einen bisher unbekanntem Mechanismus. Die Vermutung liegt jedoch nahe, dass die Sekretion von Proteinen wichtig für die Bildung einer Anheftungsstruktur ist. Die exemplarische Untersuchung der Expression und konventionellen Sekretion der Invertase Suc2 und der Effektoren Cmu1, Pep1 und Tin1 ergab keine Veränderung nach Deletion des Ankerproteins *far10* (Abbildung 20), weshalb eine gestörte Sekretion auf konventionellem Wege als Erklärung für die fehlende Anheftung der Sporidien nach *far10*-Deletion unwahrscheinlich ist. Das uneingeschränkte Wachstum von *far10*-Deletionsstämmen auf verschiedenen Zuckern bestätigt zudem die fehlerfreie Sekretion von Zucker-spaltenden Enzymen (Abbildung 24). Vor allem das normale Wachstum von *far10*-Deletionsstämmen auf saccharosehaltigem Medium zeigt die korrekte Sekretion der Invertase Suc2, welche in *S. cerevisiae* notwendig ist, um Saccharose in Glukose und Fruktose spalten und diese im Folgenden aufnehmen zu können (Carlson *et al.*, 1981). Da jedoch nicht bekannt ist woraus die Anheftungsstruktur von *U. maydis* besteht, ist auch die unkonventionelle Sekretion beteiligter Proteine möglich. Die GCK Don3, welche als Teil des STRIPAK-Komplexes in *U. maydis* vermutet wird, besitzt eine essenzielle Rolle in der unkonventionellen Sekretion (Aschenbroich *et al.*, 2019). Aus diesem Grund müsste im Folgenden Don3 als Komponente des STRIPAK-Komplexes bestätigt und untersucht werden, ob Don3 einen Einfluss auf die Anheftung der Sporidien an die Pflanzenoberfläche besitzt, was eine unkonventionelle Sekretion der Bestandteile der Anheftungsstruktur nahelegen würden.

Ebenso ursächlich für Probleme während der Sekretion könnte die Fehlfaltung von Proteinen sein, welche im ER zur Aktivierung der UPR und damit der Aufrechterhaltung der Homöostase im ER führt (Walter and Ron, 2011). Die Deletion von *far10* besitzt jedoch nachweislich keinen Einfluss auf die Aktivierung der UPR, was durch unverändertes Spleißen der mRNA des UPR-Regulators Cib1 und eine mit dem Wildtyp vergleichbare Expression des UPR-induzierten Genes *bip1* gezeigt werden

konnte (Abbildung 21a). Die Fehlfaltung von Proteinen und die dadurch folgende Aktivierung der UPR wurde mittels Zugabe von DTT induziert, da dies als reduzierende Thiolmittel Disulfidbindungen zwischen Cysteinresten spaltet und so die Tertiärstruktur von Proteinen zerstört (Lukesh *et al.*, 2012; Schmitz *et al.*, 2020). Die Untersuchung der Endozytose, welche neben der Exozytose eine wichtige Rolle in der Sekretion spielt, ergab keine Veränderung nach Deletion von *far10* (Abbildung 21b). Auch die Lokalisation des  $\alpha$ -Tubulins, welche aufgrund von in Vorarbeiten festgestellter verminderter Anzahl an motilen frühen Endosomen (Abbildung 13f) betrachtet wurde, blieb nach *far10*-Deletion unverändert (Abbildung 21c). Die reduzierte Anzahl an motilen frühen Endosomen könnte jedoch die Ursache für die im Rahmen dieser Arbeit festgestellte reduzierte Anzahl an Vakuolen in Sporidien mit *far10*-Deletion sein (Abbildung 22) (Schneider *et al.*, 2022). Frühe Endosomen entwickeln sich im Laufe der Zeit in späte Endosomen, welche letztendlich zu Vakuolen werden. Wenn daher weniger frühe Endosomen vorhanden sind, entstehen weniger späte Endosomen und damit auch weniger Vakuolen. In *S. cerevisiae* konnte für das Far10-Paralog Far9, welches auch *Vps64* (*vacuolar protein sorting 64*) genannt wird, zudem eine Rolle in der vakuolären Proteinsortierung festgestellt werden, weshalb die Deletion von *far9* zu einer abnormalen Vakuolenmorphologie führt. Auch die Deletion der regulatorischen Untereinheit *ham-3*, des Ankerproteins *ham-4* oder des Entwicklungsproteins *ham-2* führt in *N. crassa* zu vergrößerten Vakuolen. Die Weise, auf die der STRIPAK-Komplex Einfluss auf die Vakuolenmorphologie nimmt, ist jedoch in keinem der drei Organismen bekannt.

Ein weiterer Hinweis für die Rolle des STRIPAK-Komplexes in der Regulation zellulärer Prozesse offenbarte sich durch die Deletion von *far10*, welche in *U. maydis* neben der Zytokinese- und Polaritätsdefekte eine Reduktion der Integrität von Zellwand und Plasmamembran zur Folge hatte (Abbildung 23). Sowohl die Zellwandintegrität als Zytokinese und Polarität werden in *S. cerevisiae* durch den TORC2-Komplex reguliert. In *S. cerevisiae* konnte zudem gezeigt werden, dass der Far-Komplex durch die Dephosphorylierung von Slm1 als Antagonist des TORC2-Komplexes wirkt (Pracheil *et al.*, 2012). Die hochkonservierte Serin-Threonin-Proteinkinase Tor2 reguliert als Teil des TORC2-Komplexes zelluläre Prozesse wie das Zellwachstum und die zellzyklusabhängige Polymerisation des Aktinzytoskeletts (Cybulski and Hall, 2009; Pracheil and Liu, 2013; Bartlett and Kim, 2014). Die Deletion von *tor2* führt demnach zur gestörten Verteilung des Aktinzytoskeletts. Insbesondere

die Funktion von TORC2 in der Regulation der Bildung des zytokinetischen Aktinmyosinrings könnte ebenfalls eine Erklärung für den Zytokinese- und Polaritätsdefekt in Folge der *far10*-Deletion sein. Für die Regulation der Zellwandintegrität nimmt das durch den TORC2-Komplex phosphorylierte Slm1 auf bisher unbekannt Weise Einfluss auf den GEF Rom2, welcher dadurch wiederum die Aktivierung der Rho-GTPase Rho1 initiiert (Pracheil *et al.*, 2012). Das GTP-gebundene Rho1 löst durch die Aktivierung von Pkc1 die Zellwandintegritäts-MAPK-Kaskade aus, welche aus Bck1, Mkk1/2 und Mpk1 besteht. In *N. crassa* wurde zudem beobachtet, dass das Mpk1-Homolog MAK-2 den Kinaseaktivator MOB-3 des STRIPAK-Komplexes phosphoryliert und damit den Import von MAK-1 in den Nukleus reguliert. Auch eine schwache Interaktion zwischen MAK-2 und den Untereinheiten der Phosphatase bzw. dem Kinaseaktivator des STRIPAK-Komplexes konnte in *N. crassa* beobachtet werden (Dettmann *et al.*, 2013; Fischer and Glass, 2019). In *A. nidulans* wurde außerdem die Phosphorylierung der MpkB, dem Homolog von Mpk1, durch die regulatorische Untereinheit StrA des STRIPAK-Komplexes gezeigt. Der Import des MAK-1-Homolog MpkC unter Bedingungen ohne oxidativen oder osmotischen Stress wird zudem durch den STRIPAK-Komplex in *A. nidulans* verhindert, wodurch die Regulation der Fruchtkörper- und Sekundärmetabolitbildung ermöglicht wird (Elramli *et al.*, 2019). Sowohl die Rolle als Antagonist des TORC2-Komplexes in *S. cerevisiae* als auch in der Regulation des Imports von MAK-1 bzw. MpkC in den Nukleus von *N. crassa* bzw. von *A. nidulans*, offenbart einen möglichen Einfluss des STRIPAK-Komplexes auf die Zellwandintegrität. Um diesen Einfluss zu bestätigen, müsste im Folgenden geprüft werden, ob auch in *U. maydis* ein Zusammenhang zwischen dem STRIPAK-Komplex und dem Import der mitogenaktivierten Serin/Threonin-Proteinkinase Mpk1 (UMAG\_10107), dem Homolog zu MAK-1 aus *N. crassa*, in den Nukleus existiert. Dazu würde das Ankerprotein Far10 bzw. der Kinaseaktivator UMAG\_00493 deletiert und geprüft, ob die Akkumulation von Mpk1 im Nukleus weiterhin vorhanden ist. Deletionen der regulatorischen Untereinheit *far8* und dem Entwicklungsprotein *far11* können jedoch nicht erstellt werden, da diese essenziell in *U. maydis* sind, weshalb nicht ausgeschlossen werden kann, dass diese auch wichtig für die Akkumulation von Mpk1 im Nukleus sind. Mittels Co-Immunopräzipitation könnte auch in *U. maydis* eine Interaktion zwischen dem MAK-2 Homolog UMAG\_03305 und der katalytischen Untereinheit UMAG\_10198, der

strukturgebenden Untereinheit UMAG\_02960, der regulatorischen Untereinheit Far8 und dem Kinaseaktivator UMAG\_00493 untersucht werden.

### 3.3. Lokalisation des STRIPAK-Komplexes in *U. maydis* an ER, Kernmembran und Mitochondrien

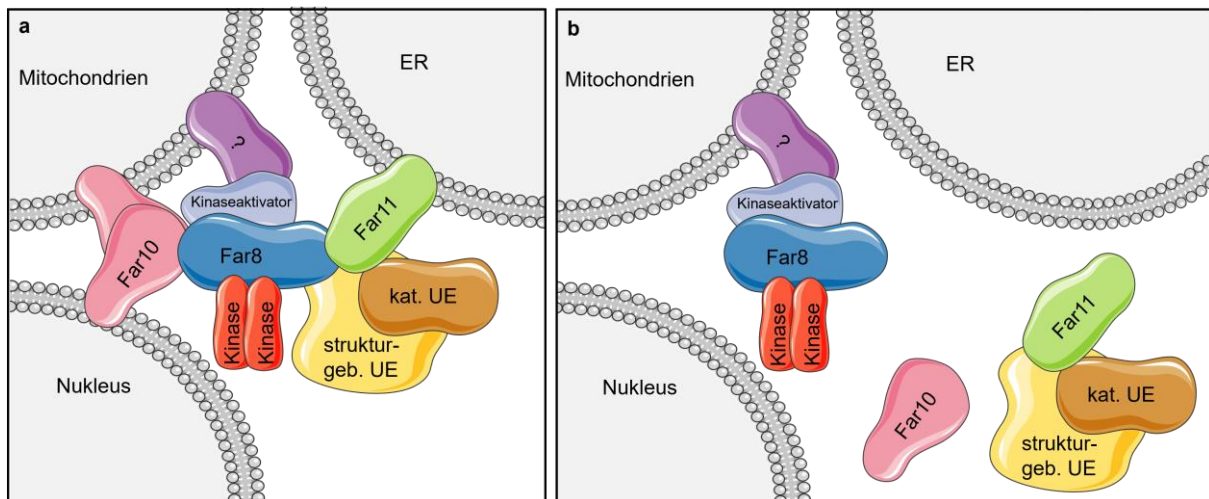
Da die räumliche Verteilung von Proteinen eine wichtige Rolle für deren Funktion innerhalb der Zelle spielt (Scott *et al.*, 2005), wurde zudem die Lokalisation des STRIPAK-Komplexes untersucht. Durch Mikroskopie konnte gezeigt werden, dass sowohl die regulatorische Untereinheit Far8 als auch das Ankerprotein Far10 und das Entwicklungsprotein Far11 in Sporidien mit den Mitochondrien colokalisieren (Abbildung 25, Tabelle 2). Auch die Deletion des Ankerproteins *far10* ändert nichts an der Colokalisation von Far8 bzw. Far11 mit den Mitochondrien (Abbildung 32a), was zeigt, dass in *U. maydis* die Lokalisation des STRIPAK-Komplexes an Mitochondrien entweder gar nicht oder aber nicht nur durch das Ankerprotein erfolgt. Einzig für *S. macrospora* wurde eine Colokalisation des Ankerproteins mit den Mitochondrien beobachtet. Da jedoch in *U. maydis* im Gegensatz zu anderen Organismen zusätzlich zum Ankerprotein weitere Komponenten des STRIPAK-Komplexes mit den Mitochondrien colokalisieren und diese Colokalisation nicht durch die Deletion des Ankerproteins beeinträchtigt war, muss diese durch eine Interaktion unabhängig vom Ankerprotein zustande kommen. Das in filamentösen Ascomyzeten konservierte GPI1, welches in *S. macrospora* mittels Hefe-Zwei-Hybrid-Studien und Co-IP als Interaktionspartner von MOB3 identifiziert wurde, assoziiert unter anderem mit Mitochondrien und könnte so alternativ zum Ankerprotein den Anknüpfungspunkt zu den Mitochondrien darstellen. Es konnte jedoch mittels BLAST® kein Homolog zu GPI1 in *U. maydis* identifiziert werden, weshalb weiterhin unklar ist, wie der STRIPAK-Komplex in Abwesenheit von Far10 an Mitochondrien lokalisieren kann. In *U. maydis* Sporidien konnte im Rahmen dieser Arbeit zudem eine Colokalisation von Far10 und Far11 mit der Kernmembran und von Far8 mit dem ER und der Kernhülle beobachtet werden (Abbildung 26, Tabelle 2). Eine Colokalisation der STRIPAK-Komponenten miteinander war in Sporidien ebenfalls festzustellen (Abbildung 27).

Tabelle 2: Lokalisation der STRIPAK-Komponenten in *U. maydis*

Komponente	Sporidie	Filament
Far8	ER, Kernhülle und Mitochondrien	ER und Kernhülle (sofern Nukleus in Basalzelle), Mitochondrien
Far10	Kernhülle und Mitochondrien	Kernhülle (kurzes Filament)
Far11	Kernhülle und Mitochondrien	Kernhülle (kurzes Filament)

Da es sich bei *U. maydis* jedoch um einen dimorphen Pilz handelt, der neben hefeartigem Wachstum in Form von haploiden Sporidien auch filamentös wachsen kann, wurde die Lokalisation des STRIPAK-Komplexes auch in Filamenten untersucht. Als Einzige der betrachteten STRIPAK-Komponenten wurde für die regulatorische Untereinheit Far8 eine Colokalisation mit den Mitochondrien in Filamenten beobachtet (Abbildung 28 oben, Tabelle 2). Die Colokalisation von Far8 mit dem ER und der Kernhülle war in Filamenten nur zu sehen, wenn sich der Nukleus noch in der Basalzelle befindet (Abbildung 30a-c, Tabelle 2). Es konnte eine schwache Colokalisation des Ankerproteins Far10 und des Entwicklungsproteins Far11 mit der Kernhülle in kurzen Filamenten gezeigt werden (Abbildung 30d-f, Tabelle 2). Mit zunehmender Filamentlänge nahm die Colokalisation von Far10 und Far11 mit der Kernhülle ab. In kürzeren Filamenten konnte eine Colokalisation von Far11 mit Far8 oder Far10 beobachtet werden, die in längeren Filamenten nicht mehr zu sehen war (Abbildung 31b-c, Tabelle 2). Lediglich eine Colokalisation von Far8 und Far10 konnte weder in kurzen noch in langen Filamenten gezeigt werden (Abbildung 31a). Es konnte somit eine unterschiedliche Lokalisation des STRIPAK-Komplexes in Sporidien und Filamenten beobachtet werden. Außerdem legt die Beobachtung der unterschiedlichen Lokalisation an ER, Kernhülle und Mitochondrien, aber auch die rückläufige Colokalisation in Filamenten eine Disassemblierung des STRIPAK-Komplexes in Subkomplexe in Filamenten nahe (Abbildung 36b). Die artifizielle Induktion eines Zellzyklusarrests in der S-Phase hatte im Gegensatz dazu keinen Einfluss auf die Colokalisation von regulatorischer Untereinheit, Ankerprotein und Entwicklungsprotein (Abbildung 32), was zeigt, dass nicht der Zellzyklusarrest, sondern ausschließlich das filamentöse Wachstum ursächlich für die Auflösung des STRIPAK-Komplexes in Filamenten ist.

## Diskussion



**Abbildung 36: Modell des STRIPAK-Komplexes in *U. maydis***

(a) Modell des STRIPAK-Komplexes in Sporidien. Lokalisation der regulatorischen Untereinheit Far8 an ER, Kernhülle und Mitochondrien. Lokalisation des Ankerproteins Far10 und des Entwicklungsproteins Far11 an Kernhülle und Mitochondrien. Colokalisation der STRIPAK-Komponenten miteinander. Modell erstellt nach Ergebnissen von Colokalisation und Co-IP in *U. maydis* und ergänzt durch Wissen aus Ascomyzeten (b) Modell des STRIPAK-Komplexes in Filamenten. Lokalisation der regulatorischen Untereinheit Far8 an Mitochondrien. Keine Lokalisation von Far8, Far10 und Far11 an Kernhülle oder ER in langen Filamenten bzw. in Filamenten mit Nucleus im Filament. Keine Lokalisation von Far10 und Far11 an Mitochondrien.

Die in *U. maydis* Sporidien beobachtete Lokalisation an Kernhülle und für Far8 auch am ER entspricht der Lokalisation des STRIPAK-Komplexes in Ascomyzeten (Abbildung 36a). Zusätzlich konnte eine Lokalisation der betrachteten Komponenten an den Mitochondrien beobachtet werden (Abbildung 36a). Die Lokalisation des Ankerproteins PRO45 am ER und der Kernmembran in *S. macrospora* ist abhängig von der regulatorischen Untereinheit PRO11 und vom Entwicklungsprotein PRO22 (Reschka *et al.*, 2018). Darüber hinaus lokalisiert PRO45 in *S. macrospora* an Mitochondrien (Nordzieke *et al.*, 2015). PRO22 lokalisiert zudem an tubulären Vakuolen und Intermembransystemen nahe der Hyphenspitze (Bloemendal *et al.*, 2010). Auch in *A. nidulans* lokalisiert der gesamte STRIPAK-Komplex in Abhängigkeit der regulatorischen Untereinheit StrA an der Kernhülle. Zudem konnte StrA in der Kernperipherie und an Endomembransystemen lokalisiert werden (Wang *et al.*, 2010; Elramli *et al.*, 2019). In der Spaltheife *S. pombe* wurden die regulatorische Untereinheit Csc3 und das Entwicklungsprotein Csc2 zusätzlich zur Lokalisation an ER und Kernhülle auch am Golgi-Apparat und während der frühen Mitose am Spindelpolkkörper (SPB) lokalisiert (Singh *et al.*, 2011; Frost *et al.*, 2012). Das Ankerprotein Csc1 colokalisiert während der frühen Mitose in *S. pombe* ebenfalls mit dem SPB (Singh *et al.*, 2011). In *S. cerevisiae* wurde gezeigt, dass der gesamte STRIPAK-Komplex in Abhängigkeit der Ankerproteine Far9 und Far10 mit dem ER und der Kernmembran assoziiert (Pracheil and Liu, 2013). Die Lokalisation des Ankerproteins am ER ist dabei



für die optimale TORC2-Signalweiterleitung nötig, da der STRIPAK-Komplex durch Dephosphorylierung von Substraten des TORC2 diesen negativ reguliert (Pracheil *et al.*, 2012; Pracheil and Liu, 2013). Für den Ascomycet *N. crassa* wurde gezeigt, dass der gesamte STRIPAK-Komplex in Abhängigkeit von der regulatorischen Untereinheit HAM-2 und vom Entwicklungsprotein HAM-3 mit der Kernhülle assoziiert (Dettmann *et al.*, 2013). Dort reguliert der STRIPAK-Komplex mittels Phosphorylierung des Kinaseaktivators MOB-3 durch MAK-2 den Import von MAK-1 in den Nukleus (Dettmann *et al.*, 2013). MOB-3 und HAM-3 sind zudem nötig für die vollständige Phosphorylierung von MAK-1, welches Teil des Zellwandintegritätssignalwegs ist (Dettmann *et al.*, 2013; Fischer and Glass, 2019). Sowohl MAK-1 als auch MAK-2 sind essenziell für die Kommunikation und Zellfusion in *N. crassa*. Die Kommunikation und Zellfusion ist mit der Fusion von Konjugationshyphen von kompatiblen Sporidien in *U. maydis* wesentlich für die sexuelle Entwicklung (Garcia-Muse *et al.*, 2003). Da die Fusion von vegetativen Hyphen, wie sie in Ascomyzeten bekannt ist, in *U. maydis* bislang nicht beobachtet wurde, ist es möglich, dass Kommunikation und Fusion in *U. maydis* Vorgänge sind, die sich komplett auf die sexuelle Entwicklung beschränken. Eine Erklärung für die unterschiedlichen Lokalisierungen und Zusammensetzungen des Komplexes könnte somit die Regulation der sexuellen Kommunikation und Hyphenfusion durch den STRIPAK-Komplex sein. Da in Filamenten keine Hyphenfusion mehr stattfindet, kommt es nach Induktion des filamentösen Wachstums zur partiellen Disassemblierung des STRIPAK-Komplex und zur Ablösung von ER, Kernhülle und Mitochondrien. Eine Deletion der regulatorischen Untereinheit StrA in *A. nidulans* führt ebenfalls zur Bildung von Subkomplexen, die jedoch keine bekannte Funktion besitzen (Elramli *et al.*, 2019). Einer der Subkomplexe beinhaltet dabei das Entwicklungsprotein SipC, die strukturgebende Untereinheit SipF und die katalytische Untereinheit SipE. Der zweite Subkomplex besteht hingegen aus dem Ankerprotein SipD und dem kleinen *coiled-coil* Protein SipB. Es wird vermutet, dass sich für die Assemblierung des STRIPAK-Komplexes zunächst die beiden Subkomplexe bilden, welche dann über die regulatorische Untereinheit interagieren, welche auch den Kinaseaktivator SipA zum Komplex rekrutiert (Elramli *et al.*, 2019). Dies offenbart eine Möglichkeit wie die regulatorische Untereinheit die Funktion des STRIPAK-Komplex durch die Vereinigung der Subkomplexe reguliert. Auch in *S. cerevisiae* konnte die Bildung von Subkomplexen beobachtet werden. Bestehend aus der katalytischen Untereinheit Ppg1, dem Entwicklungsprotein Far11 und der strukturgebenden

Untereinheit Tpd3 bindet ein solcher Subkomplex in Abhängigkeit von Ppg1 an die Kernkomponenten des Far-Komplexes in *S. cerevisiae* (Innokentev *et al.*, 2020). Für die Vervollständigung des Far-Komplexes ist dabei die Phosphataseaktivität von Ppg1 essenziell. Auch hier wurde bisher noch keine Far-Komplex unabhängige Funktion beschrieben. Die fehlende Colokalisation der regulatorischen Untereinheit, des Ankerproteins und des Entwicklungsproteins in Filamenten von *U. maydis* deutet auf eine vergleichbare Auflösung des STRIPAK Komplexes hin. Im Folgenden müsste durch die Colokalisation weiterer STRIPAK-Komponenten geprüft werden, ob die in anderen Organismen auftretenden Subkomplexe in *U. maydis* ebenfalls entstehen, oder ob die Subkomplexe in *U. maydis* eine andere Zusammensetzung aufweisen.

### 3.4. Zusammensetzung und Interaktion innerhalb des STRIPAK-Komplexes in *U. maydis*

Die Zusammensetzung des STRIPAK-Komplexes wurde in anderen Organismen bereits hinreichend untersucht. Zu den Hauptkomponenten des STRIPAK-Komplexes zählen Kinasen, Ankerproteine, Entwicklungsproteine und die Phosphatase bestehend aus der strukturegebenden, der katalytischen und der regulatorischen Untereinheit. Eine BLAST<sup>®</sup>-Analyse der STRIPAK-Komponenten der Organismen *Homo sapiens*, *S. cerevisiae*, *S. pombe*, *S. macrospora*, *N. crassa*, *A. nidulans* und *Arthrobotrys flagrans* lieferte die potenziellen STRIPAK-Komponenten in *U. maydis* (zusammengefasst in Tabelle 3, umfassend in Tabelle 14). Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Co-IPs mit anschließender LC-MS-Messung bestätigten mit der regulatorische Untereinheit Far8 (UMAG\_03784), dem Ankerprotein Far10 (UMAG\_04391), dem Entwicklungsprotein Far11 (UMAG\_10285), dem Kinaseaktivator (UMAG\_004391) und der strukturegebenden Untereinheit (UMAG\_02960) die bereits mittels BLAST<sup>®</sup> identifizierten STRIPAK-Komponenten in *U. maydis* (Abbildung 35). Die BLAST<sup>®</sup>-Analyse brachte neben den Kinasen UMAG\_05543 und UMAG\_10496 zusätzlich UMAG\_11396 als Homolog der in *S. pombe* zusätzlichen Kinase Nak1 hervor. Keine der Kinasen konnte jedoch in den durchgeführten LC-MS bestätigt werden. Mit UMAG\_11525, dem Homolog der katalytischen Untereinheit von *H. sapiens* und *S. macrospora*, und UMAG\_10198, dem Homolog der katalytischen Untereinheit von *S. cerevisiae*, *S. pombe*, *N. crassa*, *A. nidulans* und *A. flagrans*, identifizierte die BLAST<sup>®</sup>-Analyse zwei potenziell als regulatorische Untereinheit fungierende Proteine in *U. maydis*. In der LC-MS konnte

jedoch lediglich UMAG\_10198 gemessen werden, weshalb vermutet wird, dass die Rolle der katalytischen Untereinheit des STRIPAK-Komplexes in *U. maydis* durch UMAG\_10198 erfüllt wird.

Tabelle 3: BLAST®-Analyse der bekannten STRIPAK-Komponenten

	Komponente										
	reg. UE	strukturegeb. UE	kat. UE		Entwicklungsprotein	Kinaseaktivator	Ankerprotein	Kinasen			
<i>U. maydis</i>	Name	Far8	PP2AA	PPG1	PP2Ac	Far11		Far10	Don3		
	Gen ID	UMAG_03784	UMAG_02960	UMAG_10198	UMAG_11525	UMAG_10285	UMAG_00493	UMAG_04391	UMAG_05543	UMAG_10496	UMAG_11396
<i>Homo sapiens</i>	Name	STRN3	PP2AA	PP2Ac		STRIP1	MOB3	SLMAP	MST4	STK25	STK24
	ÜE [%]	34.13 %	55.56 %	56.99 %	86.38 %	35.65 %	37.93 %	40.48 %	57.36 %	70.11 %	46.26 %
<i>S. cerevisiae</i>	Name	Far8	Tpd3	Ppg1		Far11	-	Far9/Far10	Sps1	Kic1	
	ÜE [%]	57.45 %	47.17 %	62.62 %	53.51 %	25.79 %		39.42 % / 47.62 %	51.54 %	45.49 %	
<i>S. pombe</i>	Name	Csc3	Paa1	Ppa3		Csc2	-	Csc1	Sid1	Ppk11	Nak1
	ÜE [%]	32.35 %	59.41 %	68.51 %	56.13 %	29.25 %		47.29 %	54.09 %	51.33 %	50.76 %
<i>S. macrospora</i>	Name	PRO11	PP2AA	PP2Ac		PRO22	MOB3	PRO45	KIN3	KIN24	
	ÜE [%]	27.93 %	61.83 %	56.84 %	87.79 %	28.09 %	49.32 %	46.64 %	60.25 %	70.85 %	
<i>N. crassa</i>	Name	HAM-3	PP2AA	PP2Ac		HAM-2	MOB-3	HAM-4	PRK-9	STK-6	
	ÜE [%]	27.72 %	61.33 %	76.18 %	54.84 %	38.88 %	31.93 %	46.02 %	60.88 %	69.69 %	
<i>A. nidulans</i>	Name	StrA	SipF	SipE		SipC	SipA	SipD	-		
	ÜE [%]	28.26 %	62.44 %	75.17 %	58.82 %	45.48 %	37.33 %	61.60 %			
<i>A. flagrans</i>	Gen ID	DFL_002622	DFL_008478	DFL_003255		DFL_007682	DFL_000993	DFL_001177	DFL_007266	DFL_002427	
	ÜE [%]	28.94 %	62.83 %	73.12 %	55.44 %	43.02 %	40.10 %	50.00 %	43.30 %	71.20 %	

ÜE [%] = Übereinstimmung in %, potenzielle Homologe der katalytischen Untereinheit sind grün hinterlegt.

Co-IP-Studien in Sporidien zeigten ebenfalls die Interaktion der durch BLAST® identifizierten STRIPAK-Komponenten Far8 (UMAG\_03784), Far10 (UMAG\_04391) und Far11 (UMAG\_10285) und bestätigten diese somit als Kernkomponenten des STRIPAK-Komplexes in *U. maydis* (Abbildung 33a, Abbildung 33c, Abbildung 34a). Die Interaktion dieser drei STRIPAK-Komponenten konnte durch Co-IPs mit Proteinpräparationen aus filamentösen Kulturen auch in Filamenten gezeigt werden (Abbildung 33b, Abbildung 33d, Abbildung 34b). Da jedoch in Colokalisationsstudien gezeigt werden konnte, dass Far8, Far10 und Far11 in längeren Filamenten nicht mehr colokalisieren (Abbildung 30), wird vermutet, dass die aufgrund der Co-IP vermutete Interaktion durch in filamentösen Kulturen verbliebene Sporidien und kürzere Filamente zustande kommt. In kürzeren Filamenten konnte teilweise ebenfalls eine Colokalisation von Far11 mit Far8 bzw. Far10 gezeigt werden (Abbildung 30). Für eine weitere Aufklärung der Zusammensetzung des STRIPAK-Komplexes müssten im Folgenden die Co-IP-Studien auf die als weitere potenzielle STRIPAK-Komponenten identifizierten Proteine ausgeweitet werden. Um außerdem zu klären, ob die Komponenten des STRIPAK-Komplexes tatsächlich in Filamenten nicht mehr interagieren, müsste die Co-IP mit Proteinpräparationen von aus infizierten Pflanzen extrahierten filamentösen Pilzzellen wiederholt werden. Durch die Infektion von Maispflanzen mit *U. maydis*-Stämmen, welche GFP-markierte bzw. 3xHA-markierte STRIPAK-Komponenten enthalten, wird das filamentöse Wachstum des Pilzes innerhalb der Pflanze genutzt, um eine möglichst ausschließlich aus Filamenten

## Diskussion

bestehende Kultur zu generieren. Co-IPs, welche mit aus infizierten Pflanzen generierten Proteinextrakten durchgeführt würden, hätten somit eine deutlich größere Aussagekraft als artifizielle induzierte filamentöse Kulturen. Initial durchgeführte Experimente führten zu keinem eindeutigen Ergebnis.

Zusätzlich zu den aufgrund der BLAST®-Analyse bereits vermuteten STRIPAK-Komponenten konnten durch die LC-MS-Messungen weitere potenzielle Interaktionspartner des STRIPAK-Komplexes identifiziert werden. Das bisher uncharakterisierte Protein UMAG\_11270 und die putative HSP60 Chaperon-ATPase (UMAG\_05831) wurden aus der Analyse ausgeschlossen, da beide Proteine auch in anderen, STRIPAK-unabhängigen LC-MS-Messungen signifikant angereichert waren. Mögliche Interaktionen der durch LC-MS identifizierten Proteine wurden auf Basis von bekannten Interaktionen in *S. cerevisiae* in Abbildung 37 dargestellt. Das bisher uncharakterisierte und mittels MS identifizierte Protein UMAG\_05552 lieferte keine bekannten Homologe und besitzt auch keine Domänen, weshalb keine Rückschlüsse auf seine Funktion und den Grund der Interaktion mit dem STRIPAK-Komplex gezogen werden konnten. In beiden durchgeführten MS-Messungen mit 3xHA-markiertem Far10 als Köderprotein konnte jedoch eine signifikante Anreicherung der  $\Delta$ 24-Sterol-Methyltransferase Erg6 (UMAG\_03182) gemessen werden. Diese gehört, wie die ebenfalls gefundene putative C24-Sterol-Reduktase (UMAG\_01498) zur Ergosterolbiosynthese, welche in *S. cerevisiae* am ER stattfindet, von wo aus das Ergosterol in die Membranen der Zelle verteilt wird. Ergosterol, welches ausschließlich in Pilzen auftritt, ist als Hauptbestandteil der pilzlichen Plasmamembran insbesondere für deren Fluidität und Permeabilität verantwortlich (Kristan and Rižner, 2012). Erg6 katalysiert die Methylierung von Zymosterol zu Fecosterol und lokalisiert in *S. cerevisiae* am ER, an Mitochondrien, im Zytoplasma und in Lipidpartikeln (Kristan and Rižner, 2012). Die C24-Sterol-Reduktase, welche in *S. cerevisiae* Erg4 genannt wird, besitzt acht Transmembrandomänen, welche in der ER-Membran verankert sind. Die Deletion von *erg4* führt in *S. cerevisiae* durch das Ausbleiben der Plasmamembranfusion zu einem Defekt in der Zellfusion (Aguilar *et al.*, 2010). Infolge der Deletion des Ankerproteins *far10* kommt es sowohl zu Defekten in der Hyphenfusion, welche den Defekten der *erg4*-Deletion gleichen, als auch zur reduzierten Integrität der Plasmamembran. Aus diesem Grund wird ein Zusammenhang zwischen dem STRIPAK-Komplex und der Ergosterolbiosynthese vermutet. Ein direkte Interaktion der gefundenen Enzyme mit den Komponenten des



## Diskussion

Umsetzung von Trans-2-Stearoyl-CoA zu Stearoyl-CoA den letzten Schritt eines jeden Zyklus der Elongation während der Fettsäuresynthese (Kohlwein *et al.*, 2001). Auch Tsc13 lokalisiert in *S. cerevisiae* am ER. Weder für Tsc13 noch für Ole1 konnte in Hefe eine direkte Interaktion mit dem Far-Komplex gezeigt werden. Durch einen Proteinfragmentkomplementationsassay konnte jedoch zusätzlich zu Interaktionen der Enzyme der Ergosterolbiosynthese miteinander eine Interaktion von Ole1 mit der C22-Desaturase Erg5 der Ergosterolbiosynthese beobachtet werden (Tarassov *et al.*, 2008).

In der LC-MS mit 3xHA-markiertem Far10 als Köderprotein wurde zudem UMAG\_11696, welches mittels BLAST® als Homolog des ER-Membranproteins Scs2 aus *S. cerevisiae* ermittelt wurde, identifiziert. In *S. cerevisiae* wurden zudem Interaktionen von Scs2 mit Ole1, dem Ergosterolbiosyntheseenzym Erg11, und dem zytoplasmatische Chaperon Hsc82 aus der Hsp90-Familie nachgewiesen (Manford *et al.*, 2012; Girstmair *et al.*, 2019; Kolhe *et al.*, 2023). Auch eine Interaktion zwischen Tsc13 und Hsc82 konnte in *S. cerevisiae* beschrieben werden (Kolhe *et al.*, 2023). Hsc82 spielt in *S. cerevisiae* eine wichtige Rolle in der Regulation der Proteostase und wurde ebenfalls im Rahmen dieser Arbeit als potenzieller Interaktionspartner von Far10 identifiziert. Auch der putative TOM-Komplex Proteinimportrezeptor (UMAG\_11021), welcher das Homolog zu Tom70 in *S. cerevisiae* ist und in der Co-IP mit 3xHA-markiertem Far10 signifikant angereichert wurde, ist Teil der Proteinbiosynthese und des Proteinimports. Er agiert zudem an den Kontaktstellen von ER und Mitochondrien. MS-Experimente zeigten zudem Interaktionen zwischen Tom70, Hsc82 und der ATPase Ssc1 aus der Hsp70-Familie in *S. cerevisiae* (Böttinger *et al.*, 2015; Kolhe *et al.*, 2023). Das als potenzieller Far10-Interaktionspartner identifizierte Ssc1 ist in *S. cerevisiae* involviert in Proteintranslokation und -faltung und interagiert mit Hsc82, der ATPase der HSP70-Familie Ssa2 (UMAG\_03791) und Atg19, dem Homolog zu UMAG\_10479 (Böttinger *et al.*, 2015; Girstmair *et al.*, 2019; Kolhe *et al.*, 2023). Auch Ssa2 und Atg19 wurden im Rahmen dieser Arbeit mittels MS identifiziert. Die in die Proteinfaltung, den Proteinimport und die ubiquitinabhängige Degradation kurzlebiger Proteine involvierte ATPase Ssa2 interagiert wiederum in *S. cerevisiae* mit Erg6 und Hsc82 (Babu *et al.*, 2012; Girstmair *et al.*, 2019; Kolhe *et al.*, 2023). Mit Tom70, Ssc1, Ssa2 und Hsc82 konnten somit mehrere Proteine, welche Teil der Proteinbiosynthese und des Proteinimports sind, als potenzielle Interaktionspartner identifiziert werden. Auch Calnexin (UMAG\_10287), die 60s

ribosomale Untereinheit L37 (UMAG\_10701) und die kleine (40s) ribosomale Untereinheit S22 (UMAG\_00867) sind Teil der Proteinbiosynthese und wurden in LC-MS-Messungen aufgrund von signifikanter Anreicherung in der Co-IP mit 3xHA-markiertem Far10 gefunden. Eine Interaktion von Hsc82 mit Calnexin und der 60s ribosomalen Untereinheit L37 könnte in *S. cerevisiae* über Cdc28 vermittelt werden (Yahya *et al.*, 2014). MS-Experimente setzen das Interaktionsnetzwerk zudem in Zusammenhang mit dem Far-Komplex in *S. cerevisiae*. So konnte eine Assoziation von Ssc1 mit der regulatorischen Untereinheit Far8, dem Ankerprotein Far10 und dem kleinen *coiled-coil* Protein Far7 gefunden werden (Böttinger *et al.*, 2015). Auch Hsc82 interagiert über das Entwicklungsprotein Far11 und die katalytische Untereinheit Ppg1 mit dem Far-Komplex in *S. cerevisiae* (Uetz *et al.*, 2000; Gavin *et al.*, 2002). Aufgrund der in der MS-Messung identifizierten Proteine und deren Rolle in *S. cerevisiae* kann ein Einfluss des STRIPAK-Komplexes auf die Ergosterolbiosynthese, die Fettsäuresynthese und die Proteinbiosynthese in *U. maydis* vermutet werden. Da Ergosterol als Komponente der Plasmamembran eine wichtige Rolle in deren Fluidität und Permeabilität spielt, ist die in Folge der *far10*-Deletion beobachtete reduzierte Integrität der Plasmamembran daher vermutlich auf den Einfluss des STRIPAK-Komplexes auf die Ergosterolbiosynthese zurückzuführen. Um die Interaktionen, welche im Rahmen der durchgeführten MS-Messungen identifiziert wurden, zu bestätigen, müssten im Folgenden Co-IP-Studien mit nachfolgendem Western Blot der identifizierten Proteine durchgeführt werden. Auch die Deletion von potenziellen Interaktionspartnern des STRIPAK-Komplexes könnte Aufschlüsse über den Einfluss des Komplexes in *U. maydis* geben.

## 4. Material und Methoden

---

Die Beschreibung der verwendeten Methoden basiert auf der allgemeinen Methodensammlung der AG Kämper.

### 4.1. Material und Bezugsquellen

#### 4.1.1. *E. coli* Stamm

Für die Klonierungen wurde der *E. coli*-Stamm TOP10 (Invitrogen) verwendet. Dieser ist ein Derivat des *E. coli*-Stammes DH10B, welcher folgende genetische Merkmale besitzt: *F-mcrA*  $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$   $\phi 80lacZ\Delta M15$   $\Delta lacX74$  *nupG* *recA1* *araD139*  $\Delta(ara-leu)7697$  *galE15* *galK16* *rpsL(StrR)* *endA1*  $\lambda$ -. Die Nomenklatur der *E. coli*-Stämme richtet sich nach (Demerec *et al.*, 1966).

#### 4.1.2. *U. maydis* Stämme

Tabelle 4: Ausgangsstämme

Stamm	Genotyp	Resistenz	Referenz
FB1	<i>a1 b1</i>	-	Banuett and Herskowitz, 1989
FB2	<i>a2 b2</i>	-	Banuett and Herskowitz, 1989
FB2 $\Delta lga2\Delta rga2$	<i>a2 b2, \Delta lga2 rga2::hyg<sup>R</sup></i>	Hyg <sup>R</sup>	Bortfeld <i>et al.</i> , 2004
FB6a	<i>a2 b1</i>	-	Banuett and Herskowitz, 1989
FB6b	<i>a1 b2</i>	-	Banuett and Herskowitz, 1989
AB31	<i>a2 P<sub>crg1</sub>:bW2, P<sub>crg1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup>	Brachmann <i>et al.</i> , 2001
SG200	<i>a1:mfa2, bE1, ble<sup>R</sup>, bW2</i>	Phleo <sup>R</sup>	Bölker <i>et al.</i> , 1995



UMJ62	<i>a2b2, Δmfa2::P<sub>crg1</sub>:mfa1</i>	-	Jurca, 2021
UKS258	<i>a2 P<sub>crg1</sub>:bW2, P<sub>crg1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, gfp:rab5a:hyg<sup>R</sup>, smcherry:rab7:nat<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup>	Schneider, 2021
URA2m	<i>a2 P<sub>crg1</sub>:bW2, P<sub>crg1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, (ip<sup>r</sup>[P<sub>otef</sub>:mcherry:tub1]ip<sup>s</sup>)*n</i>	Phleo <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	Ackermann, 2021
UJD25/UJD26/ UJD27	<i>a1 b1 Δumag_04391::gent<sup>R</sup></i>	Gent <sup>R</sup>	Dennig, 2020
UJD28/UJD29/ UJD30	<i>a2 b2 Δumag_04391::gent<sup>R</sup></i>	Gent <sup>R</sup>	Dennig, 2020
UJD31/UJD32/ UJD33	<i>a1:mfa2, bE1, ble<sup>R</sup>, bW2, Δumag_04391::gent<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Gent <sup>R</sup>	Dennig, 2020
UJD34/UJD35/ UJD36	<i>a2 P<sub>crg1</sub>:bW2, P<sub>crg1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, Δumag_04391::gent<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Gent <sup>R</sup>	Dennig, 2020
UJD41	<i>a1a2 b1b2 Δumag_03784::nat<sup>R</sup></i>	Nat <sup>R</sup>	Dennig, 2020
UJD43	<i>a1a2 b1b2 Δumag_10285::nat<sup>R</sup></i>	Nat <sup>R</sup>	Dennig, 2020
ULM1/ULM2/ ULM3/ULM4	<i>a2 P<sub>crg1</sub>:bW2, P<sub>crg1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, gfp:umag_10285:hyg<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup>	Morbé, 2023
ULM5/ULM6/ ULM7/ULM8	<i>a2 P<sub>crg1</sub>:bW2, P<sub>crg1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, gfp:umag_10285:hyg<sup>R</sup>, ip<sup>r</sup>[P<sub>otef</sub>:CALR:mKate2]ip<sup>s</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	Morbé, 2023
ULM9	<i>a2 P<sub>crg1</sub>:bW2, P<sub>crg1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, gfp:umag_10285:hyg<sup>R</sup>, 3xha:umag_03784:gent<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup> , Gent <sup>R</sup>	Morbé, 2023
ULM12	<i>a2 P<sub>crg1</sub>:bW2, P<sub>crg1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, gfp:umag_10285:hyg<sup>R</sup>, 3xha:umag_03784:gent<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup> , Gent <sup>R</sup>	Morbé, 2023

## Material und Methoden

ULM14/ULM15/ ULM16/ULM17	<i>a2 P<sub>crg1</sub>:bW2, P<sub>crg1</sub>:bE1,</i> <i>ble<sup>R</sup>, gfp:umag_10285:hyg<sup>R</sup>,</i> <i>mCherry:umag_03784:gent<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup> , Gent <sup>R</sup>	Morbé, 2023
-----------------------------	--	---	-------------

Tabelle 5: In dieser Arbeit hergestellte Stämme

Stamm	Genotyp	Resistenz	Ausgangs- stamm
UJD48/UJD49	<i>a2 P<sub>crg1</sub>:bW2, P<sub>crg1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>,</i> <i>gfp:umag_03784:hyg<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup>	AB31
UJD51/UJD52	<i>a1b1, (ip<sup>r</sup>[P<sub>hxt</sub>:cfp]ip<sup>s</sup>)*n</i>	Cbx <sup>R</sup>	FB1
UJD56	<i>a2b2, (ip<sup>r</sup>[P<sub>hxt</sub>:yfp]ip<sup>s</sup>)*n</i>	Cbx <sup>R</sup>	FB2
UJD57/UJD58/ UJD59	<i>a2 P<sub>crg1</sub>:bW2, P<sub>crg1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>,</i> <i>gfp:rab5a:hyg<sup>R</sup>, smcherry:rab7:nat<sup>R</sup>,</i> <i>Δumag_04391::gent<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup> , Gent <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup>	UKS258
UJD60	<i>a2b2, ip<sup>r</sup>[P<sub>hxt</sub>:yfp]ip<sup>s</sup>*n,</i> <i>Δumag_04391::gent<sup>R</sup></i>	Cbx <sup>R</sup> , Gent <sup>R</sup>	UJD56
UJD61/UJD62/ UJD63	<i>a1b1, ip<sup>r</sup>[P<sub>hxt</sub>:cfp]ip<sup>s</sup>*n,</i> <i>Δumag_04391::gent<sup>R</sup></i>	Cbx <sup>R</sup> , Gent <sup>R</sup>	UJD51
UJD70/UJD71/ UJD72	<i>a2 P<sub>crg1</sub>:bW2, P<sub>crg1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>,</i> <i>gfp:umag_03784:hyg<sup>R</sup>,</i> <i>ip<sup>r</sup>[P<sub>otef</sub>:CALR:mKate2]ip<sup>s</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	UJD48
UJD74/UJD76/ UJD79	<i>a2b2, Δmfa2::P<sub>crg1</sub>:mfa1,</i> <i>Δumag_04391::gent<sup>R</sup></i>	Gent <sup>R</sup>	UMJ62
UJD81/UJD82	<i>a2 P<sub>crg1</sub>:bW2, P<sub>crg1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>,</i> <i>ip<sup>r</sup>[P<sub>otef</sub>:gfp:umag_04391]ip<sup>s</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	AB31
UJD84/UJD86/ UJD87	<i>a2 P<sub>crg1</sub>:bW2, P<sub>crg1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>,</i> <i>ip<sup>r</sup>[P<sub>otef</sub>:cmu1:mcherry]ip<sup>s</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	AB31
UJD90	<i>a2 P<sub>crg1</sub>:bW2, P<sub>crg1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>,</i> <i>ip<sup>r</sup>[P<sub>otef</sub>:pep1:mcherry]ip<sup>s</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	AB31

UJD91/UJD93	<i>a2 P<sub>crG1</sub>:bW2, P<sub>crG1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, ip<sup>r</sup>[P<sub>otef</sub>:tin2:mcherry]ip<sup>s</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	AB31
UJD104/UJD105/ UJD106	<i>a2 P<sub>crG1</sub>:bW2, P<sub>crG1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, ip<sup>r</sup>[P<sub>otef</sub>:cmu1:mcherry]ip<sup>s</sup>, Δumag_04391::gent<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup> , Gent <sup>R</sup>	UJD86
UJD107/UJD108/ UJD109	<i>a2 P<sub>crG1</sub>:bW2, P<sub>crG1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, ip<sup>r</sup>[P<sub>otef</sub>:pep1:mcherry]ip<sup>s</sup>, Δumag_04391::gent<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup> , Gent <sup>R</sup>	UJD90
UJD110/UJD111/ UJD112	<i>a2 P<sub>crG1</sub>:bW2, P<sub>crG1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, ip<sup>r</sup>[P<sub>otef</sub>:tin2:mcherry]ip<sup>s</sup>, Δumag_04391::gent<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup> , Gent <sup>R</sup>	UJD91
UJD121/UJD122/ UJD123	<i>a2 P<sub>crG1</sub>:bW2, P<sub>crG1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, ip<sup>r</sup>[P<sub>otef</sub>:mcherry:tub1]ip<sup>s</sup>*n, Δumag_04391::gent<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup> , Gent <sup>R</sup>	URA2m
UJD124/UJD125/ UJD127	<i>a2 P<sub>crG1</sub>:bW2, P<sub>crG1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, ip<sup>r</sup>[P<sub>otef</sub>:suc2:gfp]ip<sup>s</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	AB31
UJD134/UJD135/ UJD136	<i>a2 P<sub>crG1</sub>:bW2, P<sub>crG1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, ip<sup>r</sup>[P<sub>otef</sub>:suc2:gfp]ip<sup>s</sup>, Δumag_04391::gent<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup> , Gent <sup>R</sup>	UJD124
UJD145/UJD147	<i>a2 P<sub>crG1</sub>:bW2, P<sub>crG1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, ip<sup>r</sup>[P<sub>otef</sub>:CALR:mKate2]ip<sup>s</sup>*n</i>	Phleo <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	AB31
UJD148/UJD149/ UJD150/UJD151	<i>a2 P<sub>crG1</sub>:bW2, P<sub>crG1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, gfp:umag_03784:hyg<sup>R</sup>, Δumag_04391::gent<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup> , Gent <sup>R</sup>	UJD48
UJD152/UJD153/ UJD154	<i>a2 P<sub>crG1</sub>:bW2, P<sub>crG1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, gfp:umag_04391:hyg<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup>	AB31
UJD155/UJD156	<i>a2 P<sub>crG1</sub>:bW2, P<sub>crG1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, gfp:umag_03784:hyg<sup>R</sup>, ip<sup>r</sup>[P<sub>otef</sub>:CALR:mKate2]ip<sup>s</sup>, Δumag_04391::gent<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup> , Gent <sup>R</sup>	UJD70

## Material und Methoden

UJD157/UJD158/ UJD159	<i>a2 P<sub>crg1</sub>:bW2, P<sub>crg1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, ip'[P<sub>otef</sub>:CALR:mKate2]ip<sup>S*n</sup>, Δumag_04391::gent<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup> , Gent <sup>R</sup>	UJD145
UJD160/UJD161	<i>a2 P<sub>crg1</sub>:bW2, P<sub>crg1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, gfp:umag_04391:hyg<sup>R</sup>, ip'[P<sub>otef</sub>:CALR:mKate2]ip<sup>S</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	UJD153
UJD162	<i>a2 P<sub>crg1</sub>:bW2, P<sub>crg1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, gfp:umag_04391:hyg<sup>R</sup>, ip'[P<sub>otef</sub>:CALR:mKate2]ip<sup>S*n</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	UJD153
UJD163/UJD164/ UJD165	<i>a2 b1, ip'[P<sub>hxt1</sub>:cfp]ip<sup>S*n</sup></i>	Cbx <sup>R</sup>	FB6a
UJD166/UJD167/ UJD168	<i>a1 b2, ip'[P<sub>hxt1</sub>:yfp]ip<sup>S*n</sup></i>	Cbx <sup>R</sup>	FB6b
UJD169/UJD170/ UJD171	<i>a2 b2, lga2rga2::hyg<sup>R</sup>, ip'[P<sub>hxt1</sub>:yfp]ip<sup>S*n</sup></i>	Hyg <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	FB2Δlga2 Δrga2
UJD172/UJD173/ UJD174	<i>a2 b1, ip'[P<sub>hxt1</sub>:cfp]ip<sup>S*n</sup>, Δumag_04391::gent<sup>R</sup></i>	Cbx <sup>R</sup> , Gent <sup>R</sup>	UJD165
UJD175/UJD176/ UJD177	<i>a1 b2, ip'[P<sub>hxt1</sub>:yfp]ip<sup>S*n</sup>, Δumag_04391::gent<sup>R</sup></i>	Cbx <sup>R</sup> , Gent <sup>R</sup>	UJD167
UJD178/UJD179/ UJD180	<i>a2 b2, lga2rga2::hyg<sup>R</sup>, ip'[P<sub>hxt1</sub>:yfp]ip<sup>S*n</sup>, Δumag_04391::gent<sup>R</sup></i>	Hyg <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup> , Gent <sup>R</sup>	UJD170
UJD181/UJD194/ UJD195/UJD196	<i>a2 P<sub>crg1</sub>:bW2, P<sub>crg1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, gfp:umag_04391:hyg<sup>R</sup>, mCherry:umag_03784:gent<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup> , Gent <sup>R</sup>	UJD153
UJD182/UJD183/ UJD184	<i>a2 P<sub>crg1</sub>:bW2, P<sub>crg</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, gfp:umag_03784:hyg<sup>R</sup>, 3xha:umag_04391:gent<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup> , Gent <sup>R</sup>	UJD48
UJD185/UJD186	<i>a2 P<sub>crg</sub>:bW2, P<sub>crg1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, umag_04391::ha:04391:gent<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Gent <sup>R</sup>	AB31

UJD198/UJD199/ UJD200	<i>a2 P<sub>crg1</sub>:bW2, P<sub>crg1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, gfp:umag_10285:hyg<sup>R</sup>, Δumag_04391::gent<sup>R</sup></i>	Hyg <sup>R</sup> , Gent <sup>R</sup>	ULM2
UJD208/UJD209/ UJD210	<i>a2 P<sub>crg1</sub>:bW2, bE1, ble<sup>R</sup>, gfp:umag_10285:hyg<sup>R</sup>, 3xha:umag_04391:gent<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup> , Gent <sup>R</sup>	ULM2
UJD215/UJD216/ UJD217	<i>a2 P<sub>crg1</sub>:bW2, bE1, ble<sup>R</sup>, gfp:umag_10285:hyg<sup>R</sup>, mCherry:umag_04391:gent<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup> , Gent <sup>R</sup>	ULM2

*a, b* – Paarungstyp-Loci; E1, E2, W1, W2 – Gene des *b*-Paarungstyp-Locus; Δ – Deletion; P – Promotor, P<sub>crg</sub> – konditionaler, arabinoseinduzierter Promotor (Bottin *et al.*, 1996); :: – homologer Austausch; : – Fusion; Phleo<sup>R</sup> – Phleomycin-Resistenz; Cbx<sup>R</sup> – Carboxin-Resistenz; Hyg<sup>R</sup> – Hygromycin-Resistenz; Gent<sup>R</sup> – Geneticin-Resistenz; Nat<sup>R</sup> – Nourseothricin-Resistenz; ip[...]*ip*<sup>s</sup> – ektopisch im *ip*-Locus integriert; \**n* – mehrfache Integration

In allen für diese Arbeit hergestellten Stämmen wurden die homologen Rekombinationsereignisse mittels Southern-Blot Analyse und/oder analytischer PCR verifiziert. Die Funktionalität aller *tags* wurde ebenfalls getestet.

#### 4.1.3. Chemikalien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Ambion, Sigma-Aldrich, Merck, Fluka, Riedel-de-Han, Difco, Serva, BioRad, Amersham, New England Biolabs (NEB), Invitrogen und Carl-Roth bezogen und waren p.a. Qualität. Für weitere Einzelheiten: siehe (Brachmann *et al.*, 2001).

#### 4.1.4. Verwendete Kits

Zur Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde das JETSORB Gel Extraction Kit (Genomed) oder das Monarch DNA Gel Extraction Kit (NEB) verwendet. Die Präparation von Plasmiden aus *E. coli* in größerem Maßstab erfolgte mittels des Kits Roti®Prep Plasmid MINI-XL (Roth). Die Aufreinigung der DNA-Fragmente erfolgte mittels des Kits QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen). Plasmide für die

## Material und Methoden

Sequenzierung wurden mit dem Rotiprep Plasmid Mini-Kit (Roth) oder Monarch Plasmid Minipräp Kit (NEB) aufgereinigt. Das TOPO TA Cloning Kit pCR 2.1 TopoVector (Invitrogen) wurde zur Klonierung von TOPO-Vektoren verwendet.

### 4.1.5. Enzyme und Proteine

Wenn nicht anderweitig aufgeführt oder in einem Kit enthalten, wurden Polymerasen, Restriktionsenzyme und DNA-modifizierende Enzyme von New England Biolabs (NEB) bezogen.

Tabelle 6: In dieser Arbeit verwendete Enzyme und Proteine

Name	Hersteller
Alkalische Phosphatase (aus Kälberdarm)	New England Biolabs (NEB)
Anti-Digoxigenin, konjugiert mit alkalischer Phosphatase	Roche
BSA	NEB
<i>E. coli</i> DNA-Polymerase (Klenow-Fragment)	NEB
House Phusion	Eigene Präparation
Lysing Enzyme	Sigma
Lysozym (aus Hühnerei)	Boehringer
Q5-DNA-Polymerase	NEB
Restriktionsenzyme	NEB
RNase A	Roche
T4 DNA-Ligase	NEB
Taq-Polymerase	Eigene Präparation
VinoTaste®Pro	Novozym

Für die SDS-PAGE wurde der PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10-180 kDa (Thermo Scientific) sowie der Color Prestained Protein Standard, Broad Range 10-250 kDa (NEB) als Protein-Größenstandard verwendet.

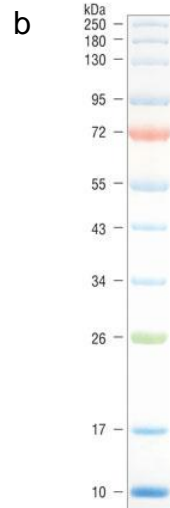
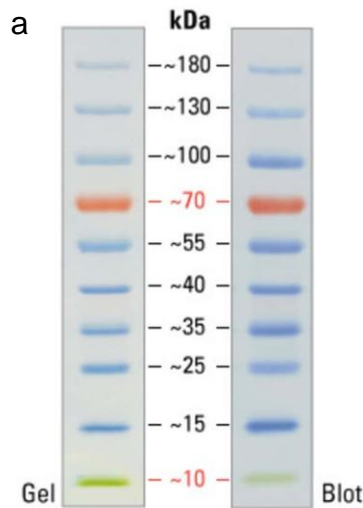


Abbildung 38: Protein Größenstandards

(a) PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10-180 kDa (Thermo Scientific) und (b) Color Prestained Protein Standard, Broad Range 10-250 kDa (NEB)

#### 4.1.6. Nukleinsäuren

Für die Agarose-Gelelektrophorese wurde der GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific) als DNA-Größenstandard verwendet.

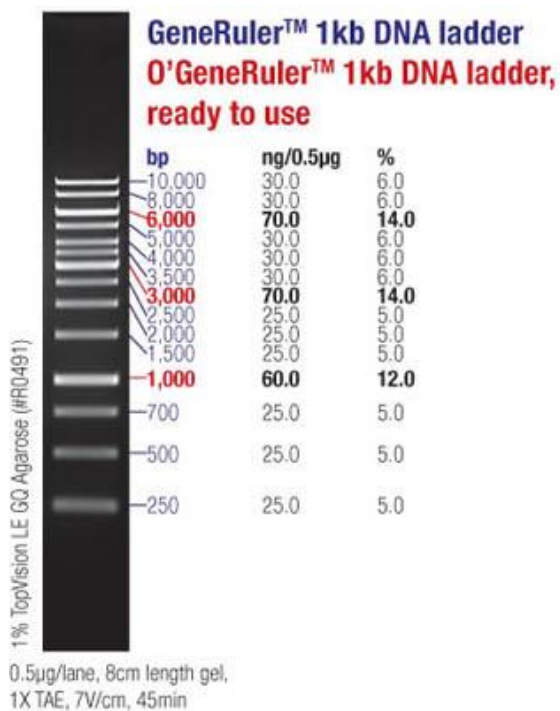


Abbildung 39: DNA Größenstandard

Generäle DNA Ladder von Thermo Scientific

Tabelle 7: In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide

<b>Nummer</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Nukleotidsequenz (5'-3')</b>
<b><i>Real Time Primer</i></b>		
P68	RT_pra2_for	CCATGGCTCTATTCGTGTTC
P69	RT_pra2_rev	CTCACGCCCGTCGGTTTGTGTT
P70	RT_egl1_for	GCCAGCGCAAGGATGACAAC
P71	RT_egl1_rev	GGATTTGCCTTTCTTACCGC
P72	RT_rep1_for	AGCCTACGACCAAGCCTGAG
P73	RT_rep1_rev	GAGGAGTAGGCTTGGGCGAA
P97	RT_cib1_rev	CATCGACGTTGTTTCCGGCCT
P98	RT_cib1_spliced_for	GCCTCCCTGCAGCGGATGC
P99	RT_cib1_unspliced_for	GGCGACCTGCTCTGATGCACC
P100	RT_bip1_um15034_for	AGGCATGGCTCGACGAGAACA
P101	RT_bip1_um15034_rev	GGTAAATCTTGGCGGTGATGGG
P132	RT_cmu1_for	AAAGTCCAAGTCGCTCTCAC
P133	RT_cmu1_rev	CTTGTTGGCGTGGTCGAG
P135	RT_pep1_rev	GCCAAACATGCTACCGATTCC
P136	RT_tin2_for	TCGACCTTCACCAACTTCTTC
P137	RT_tin2_rev	TCAAAGAGGGAAGCGAGGG
P140	RT_SmCherry_for	CAGAGGCTGAAGCTGAAGG
P141	RT_SmCherry_rev	CTCGTTGTGGGAGGTGATG
P142	RT_umag03784_for	GCTGTGACAGGAGGTGAAG
P143	RT_umag03784_rev	GCACCAGCAGAAGCAAAG
P144	RT_umag04391_for	TCCGATCAAGCACGATCAG
P145	RT_umag04391_rev	CAAGATCCAAGCGGTGAGG
P146	RT_umag10285_for	AGATGGAGCAGGTGGATGAG
P147	RT_umag10285_rev	ACCTGGCTGATCACGTACC



P148	RT_pep1_for_new	GCTCTTGGATCTCAGGCTTAC
P149	RT_suc2_for_new	CCTGCTGTTGCCTACATCG
P150	RT_suc2_rev_new	AGAGGTCCGAGAACGTACTG
<b>Allgemeine Real Time Primer</b>		
	RT_eIF2b_f	ATCCCGAACAGCCCAAAC
	RT_eIF2b_r	ATCGTCAACCGCAACCAC
	RT_mfa1_f	ATGCTTTCGATCTTCGCTCAGAC
	RT_mfa1_r	TAGCCGATGGGAGAACCGTTG
	RT_prf1_f	TCGGTAGAACGAGCTGTGATG
	RT_prf1_r	CTGTTGGACGATGTTGGAGTTG
	RT_bE_F	GCACAACACCTTCCATTGAC
	RT_bE_R	ACTGCTCCCGAATGTACT
	RT_rbf1_F	AGTACGAGCTACGACGGATTC
	RT_rbf1_R	GGGTAGGTGTTGGACACATTC
	RT_dik6_for	TTGTTCCACCCATCCTTCACGC
	RT_dik6_rev	GGATCGAGCGTCGAAACACAGC
<b>Sequenzier-Primer</b>		
P14	03784_ORF_rev	GCAGCGCGCTCTGTATG
P15	04391_ORF_for	CTCAACGACACCTTTGCC
P16	04391_ORF_rev	GTCGATACCGAACTCGACCA
P53	hsp70 Promotor_for	GTACGCCTCTACCGACACCA
P55	04391_ORF_seq_for	GCAAAACGCGAGTTGGACGC
P56	03_HAseq_for	CCGTGCAAATCCAGTAGCAG
P74	GFP_seq_rev	CTTGTACAGCTCGTCCATGCCG
P110	Nos_rev_2.0	GGCCGCAATTCTCATGTTTGAC
P113	GFP_for	GGATCACTCTCGGCATGGAC

## Material und Methoden

---

P114	10285_ORF_Seq1_rev	CGTCGGTGCGATTGACAAAG
P115	10285_ORF_Seq2_for	GGTCTCGGCGTCAAGCAATC
P116	10285_ORF_Seq3_for	TCGTCAGCGACTATTCTTGG
P117	10285_ORF_Seq4_for	TCGTAAGCCCTTCAACAACC
P123	04391_ORF_seq_rev	GCGGGAGGCAAGGAGGAA
P131	GFP_seq2_for	TACCAGCAGAACACCCCCAT
P153	hsp70rev	CCACCCTGCCTCTCTCCGAC
P172	Phxt_seq_for	CTCACCGACGGGAATACAG
P173	Phxt_seq_rev	GCCTATTCGAGTGCCAACAG
P174	GenR_seq_for	CTCCTGCCGAGAAAGTATCC
P175	GenR_seq_rev	TCGCTTGGTGGTCGAATG
<b>Allgemeine Sequenzier-Primer</b>		
	M13_for	GTAAAACGACGGCCAG
	M13_rev	CAGGAAACAGCTATGAC
	NAT cycT for	ATACTGAAAACCTTGCTTGAGAAGG
	Crg Seq	CAGTCTGGAGGCTCAAGACAAAGCG
	hhn3	AACTCGCTGGTAGTTACCAC
	hhn5	ACTAGATCCGATGATAAGCTG
	p123GFP_rev	CTGAACTTGTGGCCGTTTACGTGG
	Nos_rev	CAAGACCGGCAACAGGATTCAATC
	Nat4 (gap1-Promotor_rev)	GAAGTCGACTCTATGGACTGATCTG
	pHxt_seq_for	GCCTATCCTTCCCTCTTCAAG
	Seq_Gen_fw	GTACGGGTACATCGGATCTG
	T7-24	GAATTGTAATACGACTCACTATAG
	mCherry_Seq_for	ATGGTGAGCAAGGGCGAGGA

---

***umag\_04391: native N-terminale GFP-Fusion***

P118	04391_LB_rev_AgeI	ACCGGTGGTGGGCGAAAGATGTG
P119	04391_ORF_for_PacI	CGCGCTTAATTAATAATGCAGTCGTTGA TGGGCG
P120	04391_ORF_rev_SfiI/NotI	CGACGGCGGCCGCTGATGATCTTGGC CATCTAGGCCTCATGGTTTGCCTGTAA GCGTCATG
P121	04391_RB_for_SfiI	GCGCGGGCCTGAGTGGCCTGATGCAA AACATCCATCATCCTTTTG
P122	04391_RB_rev_NotI	CTATCGCGGCCGCAGCGAGATTCGAA ATGACGATCC
P129	04391_RB_nest_2.0	TGGTTCCGCGAATGCTCA

***umag\_10285: native N-terminale GFP-Fusion***

P124	10285_LB_rev_AgeI	ACCGGTGGTGAACGGCTGTTGCAAA
P171	10285_ORF_for_PacI_new	CGCGCTTAATTAACATGTGCGAACCCAT CCACGCAGAC
P126	10285_ORF_rev_SfiI/NotI	CGACGGCGGCCGCTGATGATCTTGGC CATCTAGGCCTCACGTACCAAAGATAT GTTTCGACCTCATC
P127	10285_RB_for_SfiI	GCGCGGGCCTGAGTGGCCTCAGCCAG GTCGGTGTAG
P128	10285_RB_rev_NotI	ATATAGCGGCCGCAGGGTGGATGGCG TGTTA
P130	10285_RB_nest_2.0	AACGGTTCGGATTGTGGAGG

***native N-terminale mCherry-Fusion***

P151	mCherry_AgeI_for	GTATAACCGGTATGGTGAGCAAGGGC GAGGAG
P152	mCherry_PacI_rev	GCGCGTTAATTAATAATGACCGCCACCGC CCTTGTAC

***umag\_03305: native C-terminale GFP-Fusion***

P180	LB_03305_for	TACAAGGTCGTCGATGTG
P181	LB_03305_rev	GGCCGCGTTGGCCGCACGCATGATCT CGTTATAAATC
P182	RB_03305_for	GGCCTGAGTGGCCATCTTGCGCCGAT TTCTG
P183	RB_03305_rev	GACAAACTCAACGCTCTCAG

***umag\_10107: native N-terminale GFP-Fusion***

P184	LB_10107_for	GGAAAAGCGCTCATTGTC
P185	LB_10107_rev	GTCGACCTTGTCTACGTCAAGATCAG
P186	pUMa389-sGFP_fwd	TGATCTTGACGTAGACAAGGATGGTGA GCAAGGGCGAG
P187	pUMa389-sGFP_rev	GTGCCGACATCTTGTACAGCTCGTCCA TGC
P188	gDNA-ORF_fwd	GCTGTACAAGATGTCGGCACATCCATC AAAC
P189	gDNA-ORF_rev	CATCTAGGCCTTACCTTGCCTGCATCA AC
P190	pUMa261-HygR_fwd	GGCAAGGTAAGGCCTAGATGGCCACC ATG
P191	pUMa261-HygR_rev	GGTGAGCTGTGGCCACTCAGGCCTATT AATG
P192	gDNA-RB_fwd	CTGAGTGGCCACAGCTCACCTCGCGG TC
P193	gDNA-RB_rev	CGGCCGCCAGTGTGATGGATCAAACG ATTGATGTAGCCGTCG

## 4.1.7. Plasmide

Tabelle 8: In dieser Arbeit verwendete Plasmide

Name	Resistenz	Referenz	Beschreibung
pCR2.1 TOPO	Amp <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	Invitrogen	Topoisomerasevermittelte Integration von PCR-Produkten mit A-Überhängen in das Vektorrückgrat
pJD8	Amp <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> , Gent <sup>R</sup>	Dennig, 2020	pCR2.1 TOPO mit Gent-Resistenzkassette aus pUMa1057 und Flanken von <i>umag_04391</i>
pJD9	Amp <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup>	Dennig, 2020	pCR2.1 TOPO mit Nat-Resistenzkassette aus pUMa262 und Flanken von <i>umag_10285</i>
pJD10	Amp <sup>R</sup>	Invitrogen	3xHA-Tag flankiert mit <i>Agel</i> - und <i>PacI</i> -Schnittstelle für N-terminale Fusion
p123-mCherry-tub1	Amp <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	Schink, 2010	N-terminale Fusion Tub1 mit mCherry im <i>ip</i> -Locus unter P <sub>otef</sub>
pDS19	Amp <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	Schuler, 2013	Enthält CFP hinter <i>hxt1</i> -Promotor im <i>ip</i> -Locus
pDS23	Amp <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	Schuler, 2013	Enthält YFP hinter <i>hxt1</i> -Promotor im <i>ip</i> -Locus
pSG1	Amp <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	Goos, 2009	C-terminale Fusion von <i>suc2</i> mit <i>egfp</i> im <i>ip</i> -Locus unter <i>otef</i> -Promotor
pNP91	Amp <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	Niko Pinter, AG Heimel, Uni Göttingen	C-terminale Fusion von <i>pep1</i> mit <i>mcherry</i> im <i>ip</i> -Locus unter <i>otef</i> -Promotor

## Material und Methoden

pNP92	Amp <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	Niko Pinter, AG Heimel, Uni Göttingen	C-terminale Fusion von <i>tin2</i> mit <i>mcherry</i> im <i>ip</i> -Locus unter <i>otef</i> -Promotor
pNP93	Amp <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	Niko Pinter, AG Heimel, Uni Göttingen	C-terminale Fusion von <i>cmu1</i> mit <i>mcherry</i> im <i>ip</i> -Locus unter <i>otef</i> -Promotor
pUMa261	Amp <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup>	Kämper, 2004	Enthält Hyg-Resistenzkassette als <i>Sfil</i> -Fragment für Gendeletionen
pUMa317	Amp <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup>	Becht <i>et al.</i> , 2006	C-terminale Fusion mit <i>egfp</i> als Reporter gen und Hyg-Resistenzkassette als <i>Sfil</i> -Fragment
pUMa389	Amp <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup>	Becht <i>et al.</i> , 2006	C-terminale Fusion mit <i>egfp</i> als Reporter gen und Nat-Resistenzkassette als <i>Sfil</i> -Fragment
pUMa1057	Amp <sup>R</sup> , Gent <sup>R</sup>	Baumann <i>et al.</i> , 2012	Enthält Gent-Resistenzkassette als <i>Sfil</i> -Fragment für Gendeletionen
pUMa4428	Amp <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	Kira Müntjes, AG Feldbrügge, Uni Düsseldorf	C-terminale Fusion von mKate2 an CALR unter <i>otef</i> -Promotor zur Integration in den <i>ip</i> -Locus um das ER und die Kernhülle zu visualisieren

Tabelle 9: In dieser Arbeit hergestellte Plasmide

Plasmid	Resistenz	Beschreibung	Klonierung
pJD11	Amp <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup>	N-terminale Fusion von <i>gfp</i> an <i>umag_03784</i> in nativen Locus	PCR-Amplifizierung LB (Template gDNA; Primer P1 und P29), GFP (Template pUMa389; Primer P57 und P58), ORF (Template gDNA; Primer P59 und P24), Hyg <sup>R</sup> (Template pUMa261; Primer P25 und P26) und RB (Template gDNA; Primer P27 und P28). Topoisomerasevermittelte Integration von LB mit A-Überhängen in das Vektorrückgrat von pCR2.1 TOPO. Restriktion LB mit <i>SaI</i> und <i>EcoRV</i> zum Öffnen des LB-Vektors. Gibson- Assembly® mit aufgereinigten PCR- Fragmenten und restringiertem LB- Vektor.
pJD12	Amp <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> , Gent <sup>R</sup>	N-terminale Fusion von <i>3xHA</i> an <i>umag_03784</i> in nativen Locus	Restriktion von pJD11 mit <i>AgeI</i> und <i>PacI</i> zur Entfernung von <i>gfp</i> . Restriktion von pJD10 mit <i>AgeI</i> und <i>PacI</i> zur Isolation von <i>3xHA</i> . Ligation von pJD11- Vektorrückgrat mit <i>3xHA</i> . Restriktion des entstandenen Plasmids mit <i>SfiI</i> zur Entfernung von <i>hyg<sup>R</sup></i> . Restriktion von pUMa1057 mit <i>SfiI</i> zur Isolation von <i>gent<sup>R</sup></i> . Ligation von TOPO- Vektorrückgrat mit <i>gent<sup>R</sup></i> .
pJD19	Amp <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup>	N-terminale Fusion von <i>gfp</i> an <i>umag_04391</i> in nativen Locus	PCR-Amplifikation von LB (Template gDNA; Primer P7 und P118), GFP (Template pUMa389; Primer P61 und P64), ORF (Template gDNA; Primer P119 und P120) und RB (Template gDNA; Primer P121 und 122).

			<p>Topoisomerasevermittelte Integration von LB mit A-Überhängen in das Vektorrückgrat von pCR2.1 TOPO. Restriktion des entstandenen Plasmids mit <i>AgeI</i> und <i>NotI</i>. Restriktion von GFP mit <i>DpnI</i>. Weitere Restriktion von GFP mit <i>AgeI</i> und <i>PacI</i>. Restriktion des ORF mit <i>PacI</i> und <i>NotI</i>. Ligation von TOPO-Vektorrückgrat mit GFP und ORF. Restriktion des entstandenen Plasmids mit <i>SfiI</i> und <i>NotI</i>. Restriktion von RB mit <i>SfiI</i> und <i>NotI</i>. Restriktion von pUMa261 mit <i>SfiI</i> zur Isolation von <i>hyg<sup>R</sup></i>. Ligation von TOPO-Vektorrückgrat mit <i>hyg<sup>R</sup></i> und RB.</p>
pJD20	Amp <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup>	N-terminale Fusion von <i>gfp</i> an <i>umag_10285</i> in nativen Locus	<p>PCR-Amplifikation von LB (Template gDNA; Primer P43 und P124), GFP (Template pUMa389; Primer P61 und P64), ORF (Template gDNA; Primer P125 und P126) und RB (Template gDNA; Primer P127 und P128). Topoisomerasevermittelte Integration von LB mit A-Überhängen in das Vektorrückgrat von pCR2.1 TOPO. Restriktion des entstandenen Plasmids mit <i>AgeI</i> und <i>NotI</i>. Restriktion von GFP mit <i>DpnI</i>. Weitere Restriktion von GFP mit <i>AgeI</i> und <i>PacI</i>. Restriktion des ORF mit <i>PacI</i> und <i>NotI</i>. Ligation von TOPO-Vektorrückgrat mit GFP und ORF. Restriktion des entstandenen Plasmids mit <i>SfiI</i> und <i>NotI</i>. Restriktion von RB mit <i>SfiI</i> und <i>NotI</i>. Restriktion von pUMa261</p>



			mit <i>SfiI</i> zur Isolation von <i>hyg<sup>R</sup></i> . Ligation von TOPO-Vektorrückgrat mit <i>hyg<sup>R</sup></i> und RB.
pJD21	Amp <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> , Gent <sup>R</sup>	N-terminale Fusion von <i>3xHA</i> an <i>umag_04391</i> in nativen Locus	Restriktion von pJD19 mit <i>AgeI</i> und <i>PacI</i> zur Entfernung von <i>gfp</i> . Restriktion von pJD10 mit <i>AgeI</i> und <i>PacI</i> zur Isolation von <i>3xHA</i> . Ligation von pJD19-Vektorrückgrat mit <i>3xHA</i> . Restriktion des entstandenen Plasmids mit <i>SfiI</i> zur Entfernung von <i>hyg<sup>R</sup></i> . Restriktion von pUMa1057 mit <i>SfiI</i> zur Isolation von <i>gent<sup>R</sup></i> . Ligation von pJD19- <i>3xHA</i> -Vektorrückgrat mit <i>gent<sup>R</sup></i> .
pJD22	Amp <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> , Gent <sup>R</sup>	N-terminale Fusion von <i>mCherry</i> an <i>umag_03784</i> in nativen Locus	Restriktion von pJD12 mit <i>AgeI</i> und <i>PacI</i> zur Entfernung von <i>gfp</i> . Restriktion von p123- <i>mCherry-tub1</i> mit <i>AgeI</i> und <i>PacI</i> zur Isolation von <i>mCherry</i> . Ligation von pJD12-Vektorrückgrat mit <i>mCherry</i> .
pJD26	Amp <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> , Gent <sup>R</sup>	N-terminale Fusion von <i>mCherry</i> an <i>umag_04391</i> in nativen Locus	Restriktion von pJD21 mit <i>AgeI</i> und <i>PacI</i> zur Entfernung von <i>gfp</i> . Restriktion von p123- <i>mCherry-tub1</i> mit <i>AgeI</i> und <i>PacI</i> zur Isolation von <i>mCherry</i> . Ligation von pJD21-Vektorrückgrat mit <i>mCherry</i> .
pJD27	Amp <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup>	N-terminale Fusion von <i>gfp</i> an <i>umag_10107</i> in nativen Locus	PCR-Amplifizierung LB (Template gDNA; Primer P184 und P185), GFP (Template pUMa389; Primer P186 und P187), ORF (Template gDNA; Primer P188 und P189), Hyg <sup>R</sup> (Template pUMa261; Primer P190 und P191) und RB (Template gDNA; Primer P192 und P193). Topoisomerasevermittelte Integration von LB mit A-Überhängen in

das Vektorrückgrat von pCR2.1 TOPO. Restriktion LB mit *SaI*l und *EcoRV* zum Öffnen des LB-Vektors. Gibson-Assembly® mit aufgereinigten PCR-Fragmenten und restringiertem LB-Vektor.

#### 4.1.8. Puffer und Lösungen

Tabelle 10: In dieser Arbeit verwendete Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Rezept
Anti-DIG-Alkalische Phosphatase	1:10000 in DIG2
Auftragspuffer für DNA-Gelelektrophorese (nativ, 6x)	50 % (w/v) Sucrose 0.25 % Bromphenolblau 0.25 % Xylencyanol FF in TE-Puffer (s.u.)
B-300	25 mM Tris-HCl 150 mM NaCl 1 mM EDTA 5 % Glycerol In H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub> , pH 7.4
CCMB 80	10 ml 1 M KOAc pH 7.0 11.8 g CaCl <sub>2</sub> * 2 H <sub>2</sub> O 4.0 g MnCl <sub>2</sub> * 2 H <sub>2</sub> O 2.0 g MgCl <sub>2</sub> 100 ml Glycerin pH mit 0.1 M HCl auf 6.4 eingestellt, mit H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub> auf 1 l aufgefüllt und sterilfiltriert
CDP-Star Lösung	1:500 in DIG3
DENAT-Lösung	1.5 M NaCl 0.4 M NaOH in H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub>

DIG1	0.1 M Maleinsäure 0.15 M NaCl in H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub> , pH 7.5
DIG2	5 % (w/v) Milchpulver in DIG1
DIG3	0.1 M Maleinsäure 0.1 M NaCl in H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub> , pH 9.5
DIG-Waschpuffer	0.3 % (v/v) Tween-20 in DIG1
EB1	50 mM Tris-HCl pH 7.5 2 M Urea 5 µg/ml Trypsin 1 mM DTT in H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub>
EB2	50 mM Tris-HCl pH 7.5 2 M Urea 5 mM Iodoacetamide in H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub>
Fast-Blot-Puffer	45 mM Tris 20 mM HEPES 20 % (v/v) Methanol in H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub>
Gibson Assembly® Master Mix	320 µl 5x ISO Puffer 0.64 µl 10 U/µl T5 Exonuklease 20 µl 2 U/µl Phusion Polymerase 160 µl 40 U/µl Taq Ligase mit H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub> auf 1.2 ml aufgefüllt und 15 µl Aliquots bei -20 °C eingefroren
Heparin-Lösung	15 mg/ml Heparin in H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub> sterilfiltriert

## Material und Methoden

---

ISO-Puffer	1 ml 1M Tris-HCl pH 7.5 50 µl 2 M MgCl <sub>2</sub> 20 µl 100 mM dGTP 20 µl 100 mM dATP 20 µl 100 mM dTTP 20 µl 100 mM dCTP 100 µl 1 M DTT (Dithiothreitol) 0.5 g PEG-8000 100 µl 100 mM NAD (Nicotinamidadenindinukleotid) mit H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub> auf 2 ml auffüllen
Lämmli-Puffer	60 mM Tris-HCl, pH 6,8 2 % (v/v) SDS 10 % (v/v) Glycerin 5 % (v/v) β-Mercaptoethanol 0.01 % (w/v) Bromphenolblau
Laufpuffer für Proteingele	25 mM Tris-HCl, pH 8,8 200 mM Glyzin 0.1 % (w/v) SDS in H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub>
Lysispuffer ( <i>Ustilago</i> -DNA)	1 % (w/v) SDS 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 50 mM Na <sub>2</sub> -EDTA, pH 8.0 in H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub>
Lysozym-Lösung	10 mg/ml Lysozym in 1x TE-Puffer (s.u.)
Minilysat III-Lösung	3 M Na-Acetat pH 4.8 in H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub>
Natriumphosphatpuffer	177.99 g/l Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> * 2 H <sub>2</sub> O (1 M) mit 156.01 g/l NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> * 2 H <sub>2</sub> O (1 M) bis pH 7.0 erreicht

---

RENAT-Lösung	1.5 M NaCl 282 mM Tris-Cl 218 mM Tris-Base in H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub>
RipA-Puffer	2 mM Tris-HCl, pH 7.5 150 mM NaCl 1 mM EDTA 10 % Glycerol 0.1 % SDS 1 % Triton X-100 1 % Na-Deoxycholat in H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub>
RNase A-Lösung	50 µg/ml RNase A in 1x TE-Puffer
Salzsäure (0.25 M)	5 ml 37 % HCl in 1 l H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub>
Sammelgel-Puffer (4x)	55 mM Tris-Base 445 mM Tris-HCl mit H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub> angesetzt und pH-Wert auf 6.8 eingestellt
SCS	20 mM Na-Citrat, pH 5.8 1 M Sorbitol in H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub> , sterilfiltriert
SDS-Sammelgel (5 %)	0.333 ml Acrylamid/Bisacrylamid (30 %) 0.25 ml Sammelgel-Puffer, pH 6.8 1.385 ml H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub> 20 µl 10 % SDS 10 µl 10 % APS (w/v in H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub> ) 2 µl TEMED

## Material und Methoden

SDS-Trenngel (10 %)	1.667 ml Acrylamid/Bisacrylamid (30 %) 1.875 ml Trenngel-Puffer, pH 8.8 1.364 ml H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub> 50 µl 10 % SDS 40 µl 10 % APS (w/v in H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub> ) 4 µl TEMED
Southern-Hybridisierungspuffer	500 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7.0 7 % (w/v) SDS in H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub>
SSC (20x)	3.0 M NaCl 0.3 M NatriumCitrat * 2 H <sub>2</sub> O in H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub> , mit HCl auf pH 7.0 eingestellt
SSPE (20x)	175,3 g/l NaCl (3 mM) 27,6 g/l Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> * H <sub>2</sub> O (227 mM) 7,4 g/l Na <sub>2</sub> -EDTA * 2 H <sub>2</sub> O (20 mM) mit H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub> Auf 1 l auffüllen mit NaOH auf pH 7,4 einstellen
STC	10 mM Tris-HCl, pH 7.5 100 mM CaCl <sub>2</sub> 1 M Sorbitol in H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub>
STC/PEG	15 g STC (s.o.) 10 g PEG 4000
STET	10 mM Tris-HCl, pH 8.0 100 mM NaCl 1 mM Na <sub>2</sub> -EDTA in H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub>
TAE (50x)	2 M Tris-Base 2 M Essigsäure 50 mM Na <sub>2</sub> -EDTA In H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub>

TBST-Puffer	20 mM Tris-HCl, pH 7.9 136 mM NaCl 0.05 % (v/v) Tween-20
TE-Puffer (10x)	100 mM Tris-HCl, pH 7.9 10 mM Na <sub>2</sub> -EDTA in H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub>
Trenngel-Puffer (4x)	1.27 M Tris-Base 0.23 M Tris-HCl mit H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub> angesetzt und pH-Wert auf 8.8 eingestellt
β-X-Gal-Lösung	2 % β-X-Gal in DMSO

#### 4.1.9. Medien

Tabelle 11: Medien für *E. coli*

Bezeichnung	Rezept
YT-Medium (Sambrook <i>et al.</i> , 1989)	8 g Bacto-Trypton 5 g Hefeextrakt 5 g NaCl 15 g Bacto-Agar mit H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub> auf 1 l auffüllen und autoklavieren
dYT-Medium (Sambrook <i>et al.</i> , 1989)	16 g Trypton 10 g Hefeextrakt 5 g NaCl mit H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub> auf 1 l auffüllen und autoklavieren

Tabelle 12: Medien für *U. maydis*

Bezeichnung	Rezept
CM-Aktivkohle (Holliday, 1974; Banuett and Herskowitz, 1989)	6 g $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 10 g Casaminosäuren 1 g Heringssperma DNA 2 g Hefeextrakt 20 ml Vitamin-Lösung 250 ml Salz-Lösung 10 g Aktivkohle 20 g Bacto-Agar mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid.}}$ auf 920 ml aufgefüllt, mit NaOH auf pH 7.0 eingestellt und autoklaviert. nach dem Autoklavieren: 80 ml 25 % (w/v) Arabinose-Lösung zugesetzt (f. c. 2 %)
CM-Festmedium (Holliday, 1974; Banuett and Herskowitz, 1989)	1.5 g $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 2.5 g Casaminosäuren 0.5 g Heringssperma DNA 1 g Hefeextrakt 10 ml Vitamin-Lösung (s.u.) 62.5 ml Salz-Lösung (s.u.) 0.5 ml Spurenelement-Lösung (s.u.) 20 g Bacto-Agar mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid.}}$ auf 980 ml auffüllen nach dem Autoklavieren 2 % (v/v) 50 % Glukose (1 % f.c.) zufügen und mit NaOH auf pH 7.0 einstellen



---

CM-Flüssigmedium (Holliday, 1974; Banuett and Herskowitz, 1989)	1.5 g NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 2.5 g Casaminosäuren 0.5 g Heringssperma DNA 1 g Hefeextrakt 10 ml Vitamin-Lösung (s.u.) 62.5 ml Salz-Lösung (s.u.) 0.5 ml Spurenelement-Lösung (s.u.) mit H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub> auf 980 ml auffüllen nach dem Autoklavieren 2 % (v/v) 50 % Glukose (1 % f.c.) oder 4 % Arabinose (1 % f.c.) zufügen und mit NaOH auf pH 7.0 einstellen
CM-Flüssigmedium mit Aktivkohle	1.5 g NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 2.5 g Casaminosäuren 0.5 g Heringssperma DNA 1 g Hefeextrakt 10 ml Vitamin-Lösung (s.u.) 62.5 ml Salz-Lösung (s.u.) 0.5 ml Spurenelement-Lösung (s.u.) 10 g Aktivkohle mit H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub> auf 980 ml auffüllen nach dem Autoklavieren 2 % (v/v) 50 % Glukose (1 % f.c.) oder 4 % Arabinose (1 % f.c.) zufügen und mit NaOH auf pH 7.0 einstellen
NSY-Glyzerin (Einfriermedium)	8 g Nutrient Broth 1 g Hefeextrakt 5 g Sucrose 800 ml mit 87 % Glyzerin mit H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub> auf 1 l auffüllen und autoklavieren

---

Regenerationsagar <sup>light</sup> (Schulz <i>et al.</i> , 1990)	a) Top-Agar: 15 g (w/v) Bacto-Agar 182.2 g (w/v) Sorbitol 10 g (w/v) Hefeextrakt 4 g (w/v) Bacto-Pepton 4g (w/v) Sucrose mit H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub> auf 1 l auffüllen und autoklavieren b) Bottom-Agar: wie a), zusätzlich Antibiotikum zugeben (s.u.)
Salz-Lösung (Holliday, 1974)	8 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 2 g Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 1 g MgSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O <sub>bid</sub> mit H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub> auf 1 l auffüllen und sterilfiltrieren
Spurenelement-Lösung (Holliday, 1974)	60 mg H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> 191 mg MnCl <sub>2</sub> 400 mg ZnCl <sub>2</sub> 47 mg NaMoO <sub>4</sub> * 2 H <sub>2</sub> O 140 mg FeCl <sub>3</sub> * 6 H <sub>2</sub> O 557 mg CuSO <sub>4</sub> * 5 H <sub>2</sub> O mit in H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub> auf 1 l auffüllen und sterilfiltrieren
Vitamin-Lösung (Holliday, 1974)	100 mg Thiamin 20 mg Calciumpanthothenat 50 mg p-Aminobenzoessäure 20 mg Nikotinsäure 20 mg Cholinchlorid 40 mg myo-Inositol 50 mg Folsäure Mit H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub> auf 1 l auffüllen und sterilfiltrieren
Wasseragar (2 %)	Agar f. c. 2 % H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub>

---

YEPS <sub>light</sub> -Flüssigmedium (Tsukuda <i>et al.</i> , 1988)	10 g Hefeextrakt 4 g Bacto-Pepton 4 g Sucrose mit H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub> auf 1 l auffüllen und autoklavieren
YNB-Canavanin-Festmedium	6.7 g YNB 20 g Agar mit H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub> auf 1 l auffüllen und autoklavieren nach dem Autoklavieren: Zugabe von 10 µl bzw. 100 µl bzw. 1 ml Canavanin (f.c. 1 µg/ml bzw. 10 µg/ml bzw. 100 µg/ml) und 2 % (v/v) 50 % Glukose (f.c. 1 %)
YNB-Ura-Flüssigmedium	6.7 g YNB 1.93 g SC Single Dropout -URA 1 ml 200 mM Inositol in H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub> mit H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub> auf 1 l auffüllen und sterilfiltrieren nach dem sterilfiltrieren: Zugabe von 2 % (v/v) 50 % Glukose (f.c. 1 %)

Alle Medien wurden, wenn nicht gesondert vermerkt, durch Autoklavieren sterilisiert. Für die Herstellung von Platten wurde den angeführten Medien 1.5 % Bacto-Agar zugesetzt. Zur Selektion der Plasmide wurden nach dem Autoklavieren folgende Antibiotika zugegeben: 100 µg/ml Ampicillin (*E. coli*), 40 µg/ml Kanamycin (*E. coli*), 50 µg/ml Nourseothricin (*U. maydis*), 200 µg/ml Hygromycin (*U. maydis*), 2 µg/ml Carboxin (*U. maydis*) oder 250 µg/ml Geneticin (*U. maydis*).

#### 4.1.10. Sonstige Materialien

Filterpapier (Whatman) 0.35 mm und 1.5 mm (Roth), Glasperlen 150-212 microns (Sigma), Nylonmembran Hybond N+ (Roth), Roti®-PVDF-Membran (Roth), Petrischalen (Greiner), 1.5 ml- 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 0,20 µm (Roth), 10 µl, 200 µl und 1000 µl Pipettenspitzen (Greiner), 10 µl Filterspitzen (Biozym).

## 4.2. Mikrobiologische und genetische Methoden

### 4.2.1. Kultivierung von *E. coli*

Die Kultivierung von *E. coli* erfolgte als Schüttelkultur bei 180 rpm oder auf Festmedium bei 37 °C unter aeroben Bedingungen. *E. coli*-Übernachtskulturen wurden aus Glycerinkulturen angeimpft, welche bei -80 °C aufbewahrt wurden, oder von YT-Ampicillin-Platten, welche für maximal vier Wochen bei 4 °C gelagert wurden.

### 4.2.2. Kultivierung von *U. maydis*

*U. maydis*-Stämme wurden als Schüttelkulturen bei 180 rpm oder auf Festmedien unter aeroben Bedingungen bei 28 °C inkubiert. *U. maydis*-Übernachtskulturen wurden aus Glycerinkulturen angeimpft, welche bei -80 °C aufbewahrt wurden, oder von CM-Platten, welche für maximal vier Wochen bei 4 °C gelagert waren.

### 4.2.3. Bestimmung der Zelldichte in Flüssigkulturen

Zur Bestimmung der Zelldichte in Flüssigkulturen wurde eine Messung mit dem Jenway 7300 Spectro-Photometer bei einer Wellenlänge von 600 nm durchgeführt. Liegt die gemessene optische Dichte im Verhältnis zum jeweiligen Kulturmedium bei 1, entspricht dies, je nach verwendetem Stamm und Wachstumsmedium, einer Zellmenge von circa  $1-5 \times 10^7$  Zellen/ml Kultur. Die lineare Abhängigkeit und ausreichende Messgenauigkeit wurden durch die Verdünnung der Kulturen für die Messung auf eine optische Dichte unterhalb von 0.5 sichergestellt.

### 4.2.4. Transformation von *E. coli*-Stämmen

Modifiziert nach Cohen *et al.*, 1972

Für die Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* wurden zunächst Top10 auf YT-Platten ausgestrichen. Unter der Vermeidung der Mitnahme von Agar wurden die Zellen über Nacht bei 37 °C in je 2 x 4 ml des SOB-Mg inkubiert. Um die Zellen im SOB-Mg zu verteilen, wurden diese vorsichtig gevortext. Am folgenden Morgen wurden die Kulturen zu je 2 x 200 ml in Schikanekolben überführt. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C und 180 rpm, bis eine OD<sub>600</sub> von 0.6 erreicht war. Das Medium mit

den Zellen wurde dann in einen 200 ml Zentrifugationsbecher gegeben und 10 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden bei 2570 rpm für 10-15 min bei 4 °C pelletiert, der Überstand verworfen und die Zellen in 66.7 ml CCMB 80 durch sanftes Vortexen resuspendiert. Die Suspension wurde für 20 min auf Eis inkubiert und erneut für 10 min bei 2570 rpm und 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen. Die Zellen wurden dann in 16.7 ml CCMB 80 resuspendiert. Die durch dieses Verfahren entstandenen kompetenten Zellen wurden aliquotiert (50 µl in 1.5 ml Reaktionsgefäße), mit flüssigem Stickstoff eingefroren und im Anschluss bei -80 °C aufbewahrt.

Zur weiteren Bearbeitung wurden transformationskompetente Bakterienzellen von -80 °C auf Eis aufgetaut. Die kompetenten *E. coli* (50 µl) wurden mit 1 µl Plasmidlösung/10-20 µl Ligationsansatz (1-5 ng Plasmid) versetzt und 15 min auf Eis inkubiert. Danach wurde ein Hitzeschock für 30 Sekunden bei 42 °C durchgeführt. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 2 Minuten auf Eis, wurde der Ansatz auf 200 µl mit dYT-Medium aufgefüllt. Die Bakterien wurden mit dem Medium 30 Minuten bei 37 °C im Wärmeblock inkubiert. Dadurch werden die Gene, wozu auch die Resistenzgene gegen ein bestimmtes Antibiotikum zählen, auf dem transformierten Plasmid exprimiert. Der Transformationsansatz wurde auf YT-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Resistenz wird als Selektionsmarker verwendet.

#### 4.2.5. Protoplastierung und Transformation von *U. maydis*-Stämmen

Nach Schulz *et al.*, 1990; Gillissen *et al.*, 1992

Von einer auf Platte wachsenden Kultur wurde eine 20 ml YEPS<sub>Light</sub>-Flüssigkultur angesetzt und für 8-10 h bei 28 °C geschüttelt. Diese Vorkultur wurde anschließend in 50 ml frischem YEPS-Medium verdünnt und bei 28 °C bis zu einer Zelldichte von  $1-2 \times 10^7$  Zellen/ml (bis maximal  $OD_{600} = 1.0$ ) geschüttelt. Nach Erreichen des optimalen Zelltiters wurden die Zellen durch Zentrifugation (3500 rpm, 6 min, RT) geerntet, einmal in 20 ml SCS gewaschen und in 5 ml SCS plus 4 ml SCS mit 12.5 mg/ml Lysing Enzyme/VinoTaste®Pro resuspendiert. Die in diesem Puffer bei Raumtemperatur erfolgende Protoplastierung kann mikroskopisch verfolgt werden, da die

zigarrenförmigen Zellen nach Lyse der Zellwand eine kugelige Form annehmen. Nach vollständiger Protoplastierung (5-30 min) wurden 30 ml SCS zugegeben und die Protoplasten durch achtminütige Zentrifugation bei 2300 rpm (RT) pelletiert. Um das Lysing Enzyme/VinoTaste®Pro vollständig zu entfernen, wurde dieser Waschgang mit 10 ml SCS wiederholt. Es erfolgte ein zusätzlicher Waschschriff mit 5 ml SCS und 5 ml STC bei 4 °C. Anschließend wurde mit 10 ml STC gewaschen und das Pellet in einem Volumen von 0.5 ml eiskaltem STC aufgenommen. Die so behandelten Protoplasten können 3-4 h auf Eis oder aliquotiert bei -80 °C mehrere Monate aufbewahrt werden.

Zur integrativen Transformation wurden 50 µl Protoplasten mit 3-5 µg linearisierter Plasmid-DNA oder PCR-Produkt (in maximal 10 µl Wasser gelöst) und 1 µl Heparin-Lösung für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Bei einer Transformation mit selbstreplizierenden Plasmiden wurden nur ca. 1 µg DNA eingesetzt. Nach Zugabe von 0.25 ml STC/PEG folgte eine weitere Inkubation von 15 Minuten auf Eis. Anschließend wurde der gesamte Transformationsansatz auf einer kurz vorher mit Top-Agar überschichteten selektionsmarkerhaltigen Bottom-Regenerations-Agarplatte ausgestrichen. Nach 2 bis 5 Tagen Inkubation bei 28 °C wurden die gewachsenen Kolonien mit Zahnstochern auf CM-Platten vereinzelt, die das entsprechende Antibiotikum zur Selektion enthielten.

### 4.2.6. Induktion von *U. maydis*-Stämmen für Protein- oder RNA-Extraktion

Die Induktion des filamentösen Wachstums wurde in Stämmen durchgeführt, deren *b*-Gene unter der Kontrolle des durch Arabinose induzierten P<sub>crg1</sub>-Promotors (AB31) stehen. Dafür wurden die zu induzierenden Stämme aus einer Kolonie auf Festmedium in Flüssigkultur mit reprimierenden Bedingungen (CM-Glukose (f.c. 1 %)) angeimpft und bei 28 °C und 180 rpm in Schikanekolben inkubiert. Für die Hauptkultur wurden diese in reprimierenden Medienkonditionen so eingestellt, dass sie eine OD<sub>600</sub> von 0.2-0.3 in 120 ml Medium für Protein-Extraktion, in 10 ml Medium für RNA-Extraktion, erreichten. Nach der Zentrifugation der Zellen (Heraeus Biofuge stratos, 3500 rpm, 6 min, RT) wurde der Überstand entfernt und die Zellen in gleichem Volumen Medium mit induzierenden Bedingungen (CM-Arabinose (f.c. 1 %)) gewaschen. Auf die erneute Zentrifugation folgte die Resuspendierung der Zellen in Induktionsmedium und eine

Inkubation über Nacht (für die Protein-Extraktion) bzw. 5 h (für die RNA-Extraktion) bei 28 °C und 180 rpm in Schikanekolben. Die Zellen wurden für die RNA-Extraktion abzentrifugiert (Heraeus Biofuge stratos 3500 rpm, 6 min, RT), der Überstand verworfen und die Zellpellets in flüssigem Stickstoff eingefroren.

#### 4.2.7. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von *U. maydis*-Stämmen

Zur zellbiologischen Untersuchung von *Ustilago maydis* wurde das Nomarski-Prisma des Fluoreszenzmikroskops Axio Imager.Z1 von ZEISS benutzt. Dabei wurden die Hellfeld- und Fluoreszenzkanäle mit einem 63-fach vergrößernden Ölimmersionsobjektiv (ZEISS) oder einem 100-fach vergrößernden Ölimmersionsobjektiv (ZEISS) mit 1,4 numerischer Apertur verwendet. Zur Mikroskopie wurden Agarosekissen aus 100 µl 2 % Agarose in H<sub>2</sub>O gegossen und durch das Auflegen eines weiteren Objektträgers eine plane Oberfläche erzeugt, um eine einheitliche Fokusebene sicherzustellen. 5 µl der zu untersuchenden Kultur wurden auf das Kissen gegeben und mit einem Deckglas bedeckt. Die optimale Zelldichte für die Mikroskopie betrug  $2,5 \times 10^6$  Zellen/ml. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen wurden im GFP- (Anregung: 488 nm, Emission: 509 nm), RFP- (Anregung: 545-590 nm, Emission: 572-612 nm), YFP- (Anregung: 490-510 nm, Emission: 520-550 nm) oder DAPI-Kanal (Anregung: 353 nm, Emission: 465 nm) mit 200 ms Belichtungszeit mit einer hochauflösenden CCD-Kamera (AxioCam MRm) gemacht und mit dem Programm ZEN (blue edition) von ZEISS nachbearbeitet (Bildausschnitt, Kontrastverstärkung, Maßstabsskalierung).

#### 4.2.8. CMAC

Zur Visualisierung der Vakuolen wurde eine Färbung mit CellTracker™ Blue CMAC (7-Amino-4-Chlormethylcumarin) durchgeführt. Dabei kann der Farbstoff frei in die Zellen diffundieren und wird dort in membrandurchlässige Reaktionsprodukte transformiert. Die Chlormethylgruppe von CMAC reagiert mit Thiol-Gruppen, die in Glutathion S-Transferase-vermittelten Reaktionen vorkommen (Thermo-Fisher, 2018), wodurch Glutathion-Konjugate unter ATP-Verbrauch in die Vakuole transportiert werden und dadurch die Vakuole angefärbt wird (Doenecke, 2005). 1 ml der Flüssigkultur wurde dazu in einem 2 ml Reaktionsgefäß abzentrifugiert (Thermo Scientific Heraeus Pico21,

3500 rpm, 5 min). Das Pellet wurde in 1 ml Medium mit 10  $\mu$ M CMAC resuspendiert und 30 min bei RT im Dunkeln schüttelnd inkubiert (Eppendorf-Thermomixer, 550 rpm). Die Zellen wurden anschließend erneut abzentrifugiert, in frischem Medium gewaschen und anschließend in 1 ml Medium aufgenommen. Die Mikroskopie wurde im CFP- oder DAPI-Kanal durchgeführt.

### 4.2.9. MitoTracker™

Für die Visualisierung von Mitochondrien wurden diese mittels MitoTracker™ Red CM-H<sub>2</sub>-XRos (Invitrogen) angefärbt. Der Farbstoff diffundiert zunächst frei durch die Plasmamembran in lebende Zellen und wird dort zum Mitochondrien-spezifischen Farbstoff oxidiert, wodurch er von den Mitochondrien aufgenommen wird (Thermo Fisher Scientific). 1 ml der Flüssigkultur wurde dazu in einem 2 ml Reaktionsgefäß abzentrifugiert (Thermo Scientific Heraeus Pico21, 3500 rpm, 5 min). Das Pellet wurde in 1 ml Medium mit 0.5  $\mu$ M MitoTracker™ resuspendiert und 20 min bei RT im Dunkeln schüttelnd inkubiert (Eppendorf-Thermomixer, 550 rpm). Die Zellen wurden anschließend erneut abzentrifugiert, in frischem Medium gewaschen und anschließend in 1 ml Medium aufgenommen. Die Mikroskopie wurde im RFP- oder mCherry-Kanal durchgeführt.

### 4.2.10. Calcofluor white

Mittels der Calcofluor white Färbung können Zellwände und Septen in *U. maydis* visualisiert werden, da Calcofluor white spezifisch mit Chitin reagiert, welches sich in Zellwänden und Septen findet (Roncero and Durán, 1985). Für die Färbung wurde 1 ml *U. maydis*-Kultur mit 20  $\mu$ l Calcofluor white (1:10-Verdünnung) gemischt und 10 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Die Mikroskopie erfolgte im DAPI-Kanal.

### 4.2.11. Fixierung von Zellen und DAPI-Färbung

4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) lagert sich an die AT-reichen Region in der kleinen Furche doppelsträngiger DNA und markiert so den Zellkern einer Zelle (Wilson *et al.*, 1990). Da DAPI die intakte Zellmembran nur langsam durchdringt, werden die Zellen zunächst fixiert und die Membran permeabilisiert.



Für die Fixierung wurden die Zellen wie bereits beschrieben (siehe Kapitel 4.2.6) angezogen. Unter Rühren wurde zu 10 ml Kultur in CM-Glukose (f.c. 1 %) oder induzierten Kulturen in CM-Arabinose (f.c. 1 %) 37 %-Formaldehyd (f.c. 1 %) tropfenweise hinzugegeben und rührend für 10 min bei RT inkubiert. Durch die Zugabe von 2 M Glycin (f.c. 125 mM) wurde die Reaktion gestoppt und erneut unter Rühren für 10 min bei RT inkubiert. Der Kultur wurde 1 ml entnommen und zentrifugiert (Thermo Scientific Heraeus Pico21, 5 min, 3500 rpm). Das Pellet wurde mit 1x PBS gewaschen und in 1x PBS aufgenommen. Die fixierten Zellen können so bei 4 °C gelagert werden.

10 µl der fixierten Kultur wurden mit 1 µl DAPI Vectashield Mounting Medium (Vector Laboratories) versetzt und für einige Minuten inkubiert. 3 µl der gefärbten Zellen wurden mikroskopisch auf einem Objektträger im DAPI-Kanal analysiert.

#### 4.2.12. Propidiumiodidfärbung

Zur Visualisierung meist toter Zellen mit Defekt in Zellwand und Plasmamembran wurde eine Propidiumiodidfärbung durchgeführt, da Propidiumiodid nicht membrangängig ist und daher nur in Zellen ohne intakte Membran eindringen kann. Es interkaliert dort in die DNA, wodurch die rote Farbe verstärkt wird (Davey and Hexley, 2011). 1 ml der Zellen mit einer OD<sub>600</sub> von 0.6 bis 1 wurden in einem 2 ml Reaktionsgefäß mit 1 µl Propidiumiodidlösung (1 mg/ml, Vybrant® Apoptosis Assay Kit #2, Invitrogen) versetzt und für 15 min bei RT im Dunkeln schüttelnd inkubiert (Eppendorf-Thermomixer, 550 rpm). Im Folgenden wurden die Zellen pelletiert (Thermo Scientific Heraeus Pico21, 5 min, 3500 rpm) und im gleichen Volumen Wasser aufgenommen. Die Mikroskopie erfolgte im RFP-Kanal des Fluoreszenzmikroskops.

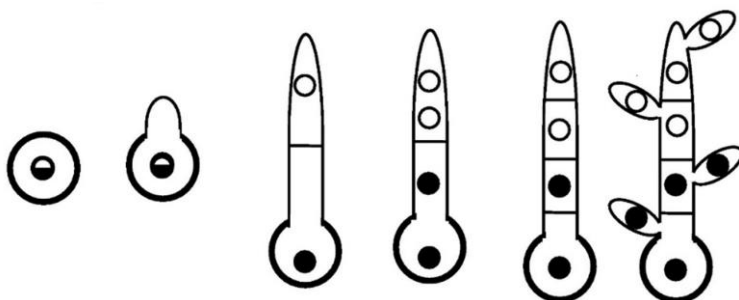
#### 4.2.13. Pflanzeninfektionsstudien

Für die Infektion mit *U. maydis* wurden „Early Golden Bantam“ Maispflanzen gepflanzt und für fünf Tage täglich gegossen. Am Tag vor der Infektion bekamen die Pflanzen nur wenig und am Tag der Infektion gar kein Wasser. Sieben Tage nach Aussaat wurden die Maispflanzen durch Injektion mit einer *U. maydis*-Lösung infiziert. Dazu wurde eine Übernachtskultur in 30 ml YEPS<sub>Light</sub>-Medium (28 °C, 180 rpm) inkubiert und

am nächsten Tag auf eine OD<sub>600</sub> von 0.25 mit frischem Medium verdünnt. Die Kulturen wurden für vier Stunden erneut bei 28 °C und 180 rpm inkubiert. Nach Kontrolle der OD<sub>600</sub> wurde das Medium abzentrifugiert (6 min, 3500 rpm, Heraeus Biofuge stratos) und das Pellet mit Wasser gewaschen. Dem Pellet wurde so viel Wasser zugegeben, dass eine OD<sub>600</sub> von 3 erreicht wurde. Die Kultur wurde mittels einer Injektionskanüle in den unteren Bereich des Sprosses in den Hohlraum injiziert. Bereits nach wenigen Tagen konnten mit Chlorosen erste Anzeichen der Infektion beobachtet werden. Sieben Tage nach der Infektion anhand der Symptome ausgewertet.

### 4.2.14. Sporenernte und Sporenkeimung zum Nachweis von essenziellen Genen

Um zu zeigen, dass ein Gen in *U. maydis* essenziell ist, wurde das Gen im diploiden Stamm FBD11 in einem der Allele deletiert. Mit diesem Stamm wurden Maispflanzen infiziert (siehe Kapitel 4.2.13) und drei Wochen nach der Infektion die Tumore mit Sporen aus der Pflanze ausgeschnitten. Die ausgeschnittenen Tumore wurden zerkleinert und in Filterpapier zwei Wochen bei 37 °C getrocknet. Die getrockneten Tumore wurden mit Mörser und Pistill zerkleinert und die Sporen in 1.5 ml Wasser aufgenommen. Die Sporensuspension wurde mittels Pasteurpipetten mit Membran gefiltert und das Filtrat bei 7000 rpm für 5 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 200 µl 100 mM Kupfersulfat aufgenommen und für 15 min inkubiert. Nachdem das Pellet mit Wasser gewaschen wurde und erneut in Wasser aufgenommen wurde, wurde ein Verdünnungsausstrich auf CM-Platten mit Glukose, 100 mg/l Ampicillin und 100 mg/l Tetracyclin durchgeführt. Es folgte die Inkubation der Platten für vier Tage bei 28 °C. Innerhalb dieser vier Tage keimten die Sporen aus und es bildete sich eine Kolonie um die Spore. Diese Kolonien wurden vereinzelt und aus jedem der Vereinzelungsstriche wiederum 20 Kolonien sowohl auf Medium mit Antibiotika als auch auf Medium ohne Antibiotika ausplattiert.



**Abbildung 40: Auskeimen der Spore**

Durch Meiose während dem Auskeimen der Sporen entstehen zwei Kerne mit der Deletion des Gens und zwei Kerne ohne die Deletion des Gens. Die Kerne mit Deletion beinhalten dafür die Antibiotikaresistenz (Donaldson and Saville, 2008)

Die Meiose während dem Auskeimen der Spore resultiert in zwei haploiden Sporidien mit je einem Kern mit der Deletion des Gens und zwei haploiden Sporidien mit je einem Kern ohne die Deletion des Gens. Die Kerne mit Deletion beinhalten die Antibiotikaresistenz. Falls das Gen jedoch essenziell ist, können die haploiden Sporidien mit Deletion und Antibiotikaresistenz nicht überleben. Daher verfügen in diesem Fall alle vereinzelt Kolonien über die Kopie des Gens und können somit nicht auf der Platte mit Antibiotika wachsen. Die Antibiotikaplatte bleibt somit leer. Ist das Gen nicht essenziell, sind 50 % der vereinzelt Kolonien antibiotikaresistent und können somit auf der Platte mit Antibiotikum wachsen.

#### 4.2.15. Untersuchung des filamentösen Wachstums auf Charcoal-Platten

Zunächst wurden *U. maydis*-Stämme in 10 ml CM-Glukose Flüssigkultur angeimpft und über Nacht bei 28 °C und 180 rpm inkubiert. Die Hauptkultur wurde am nächsten Tag so eingestellt, dass die Zellkultur nach vier Stunden Wachstum bei 28 °C und 180 rpm eine OD<sub>600</sub> von 0.8 besitzt. Nach Ablauf der vier Stunden wurde 1 ml der Kultur entnommen und bei 3500 rpm für 6 min pelletiert. Den Zellen wurde so viel Wasser zugegeben, dass eine OD<sub>600</sub> von 1 erreicht wurde. 3.5 µl der Kulturen wurde auf CM-Charcoal-Platten mit Glukose getropft und nach zwei Tagen ausgewertet. Dazu wurden mit der Visicam Plus 5 und dem Programm IS Visicam Image Analyser Aufnahmen der einzelnen Kolonien unter dem Binokular und mit einer Spiegelreflexkamera Aufnahmen der Platten gemacht.

#### 4.2.16. Konfrontationsassay

Nach Snetselaar *et al.*, 1996

Mittels Konfrontationsassay wurde die Fähigkeit zur Fusion von *U. maydis*-Sporidien untersucht. Dafür wurden die Stämme zunächst in CM-Glukose Flüssigkultur bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0.8 bei 28 °C und 180 rpm inkubiert. Nach der Zentrifugation bei 3000 rpm bei Raumtemperatur für 5 min wurden die Stämme in bidestilliertem Wasser zu einer OD<sub>600</sub> von 5 aufkonzentriert. Es wurden Objektträger vorbereitet, die mit 2 %-igem Wasseragar bis zu einer Höhe von 2 mm überschichtet wurden. Es wurden

je 0.5 µl des ersten Stammes in einer Reihe auf den Objektträger getropft und für 5 min getrocknet. Auch vom zweiten Stamm wurden je 0.5 µl große Tropfen in einer Reihe, die etwa 100 bis 200 µm von der ersten Reihe entfernt ist, auf den Objektträger aufgebracht. Die Tropfen wurden erneut getrocknet und beide Tropfen dann mit 3 µl Paraffinöl überschichtet. Die Objektträger wurden in einer feuchten Kammer bei 28 °C für zwei Tage inkubiert und dann mikroskopiert.

### 4.2.17. Mating-Test

Mithilfe des Mating-Tests kann ebenfalls die Fähigkeit zur Fusion von *U. maydis*-Sporidien untersucht werden. Im Gegensatz zum Konfrontationsassay wird die Fusion dabei aber in Flüssigmedium untersucht. Zunächst wurden die Stämme in CM-Glukose bis zu einer OD<sub>600</sub> von 1 bei 28 °C und 180 rpm inkubiert. Dann wurden jeweils 500 µl der kompatiblen Stämme in einem 15 ml Reaktionsgefäß gemischt und 1 ml CM-Charcoal-Glukose zugegeben. Einer der Stämme verfügt dabei über eine CFP-Fluoreszenz, der andere Stamm über eine YFP-Fluoreszenz. Durch Schütteln wurde alles gut vermischt und über Nacht auf dem Drehrad bei 28 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Fähigkeit der gemischten Stämme zur Fusion mikroskopisch überprüft. Neben dem für eine Fusion typischen Phänotyp, zeigt auch eine gleichzeitige CFP- und YFP-Fluoreszenz zweier verbundener Sporidien eine erfolgreiche Fusion an.

### 4.2.18. Canavanin-Assay

Unter Zuhilfenahme des Canavanin-Assays kann die Endozytose, der Transport von Plasmamembran zur Vakuole, geprüft werden. In Hefe transportiert die Argininpermease Can1 Arginin und das toxische Argininanalog Canavanin durch die Plasmamembran in die Zelle (Lin *et al.*, 2008; Shi *et al.*, 2011; Cabrera *et al.*, 2013b). Bei Substratüberschuss wird Can1 in Wildtypzellen für die Degradierung von der Plasmamembran zur Vakuole transportiert. Aus diesem Grund sind die Zellen bis zu einer gewissen Konzentration gegen Canavanin resistent. Ist die Endozytose jedoch gestört, indem zum Beispiel Can1 in der Plasmamembran fixiert ist, bleibt die Resistenz aus. Für die Durchführung des Canavanin-Assays wurden *U. maydis* Flüssigkulturen in YNB-Glukose (f.c. 1 %) bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0.25 angezogen und eine Verdünnungsreihe mit den Verdünnungen 1:5, 1:25, 1:125, 1:625 und 1:3125 hergestellt. Alle Verdünnungen und die unverdünnte Kultur wurden auf YNB-Platten

ohne Canavanin, YNB-Platten mit 0.4 µg/ml Canavanin und YNB-Platten mit 1 µg/ml Canavanin getropft. Die Platten wurden bei 28 °C inkubiert und nach zwei Tagen ausgewertet.

#### 4.2.19. Zellwandintegritätsassay

Die Integrität der Zellwand kann mittels Calcofluor white (CFW) und Kongorot (CR, *congo red*) beurteilt werden, da Zellen mit defekter Zellwand meist sensitiver für beide anionischen Farbstoffe sind (Ram and Klis, 2006). Sowohl CFW als auch das analoge CR, binden das Chitin in entstehenden Chitinketten der pilzlichen Zellwand. Dadurch wird das Enzym behindert, welches Chitin mit  $\beta$ -1,3-Glukan und  $\beta$ -1,6-Glukan verbindet, weshalb die Assemblierung der Zellwand gestört und diese so geschwächt wird (Ram and Klis, 2006). Durch die Schwächung der Zellwand wird die Zellwandstressantwort aktiviert, welche aber von CFW und CR aufgrund ihrer Bindung an Chitin neutralisiert wird. Veränderungen der Zellwandintegrität aufgrund von Mutationen der regulierten Gene und der daher veränderten Menge an Chitin in der Zellwand können daher durch die Sensitivität für CFW und CR beurteilt werden. Eine erhöhte Chitinmenge in der Zellwand führt dabei zur erhöhten Sensitivität für CFW und CR, eine verminderte Chitinmenge hingegen zu vermehrter Resistenz gegen CFW und CR (Ram and Klis, 2006).

Es wurden *U. maydis* Flüssigkulturen in CM-Glukose (f.c. 1 %) bis zu einer OD<sub>600</sub> von 1 angezogen, in Wasser gewaschen und darin aufgenommen. Es wurde eine Verdünnungsreihe mit den Verdünnungen 1:10, 1:100, 1:1000 und 1:10000 erstellt und gemeinsam mit der unverdünnten Kultur auf AM-Glukose (f.c. 1 %) Platten, AM-Glukose Platten mit 10 µg/ml CFW und auf AM-Glukose Platten mit 10 µg/ml CR getropft. Die Platten wurden für vier Tage bei Raumtemperatur im Dunklen inkubiert und dann photographisch ausgewertet.

#### 4.2.20. Messung des Phosphat-Effluxes

Zur Beurteilung der Membranintegrität wurde der Phosphat-Efflux gemessen, da die Färbung mit Propidiumiodid zur Beurteilung der Vitalität einer Zelle in einigen Fällen auch zu falsch positiven Ergebnissen führen kann (Davey and Hexley, 2011). Die Abgabe von Phosphat mittels Transporter in das die Zellen umgebende Wasser läuft dabei unabhängig von der Aufnahme von Propidiumiodid durch eine defekte

Zellmembran und kann daher zur Verifikation herangezogen werden (Trilisenko *et al.*, 2021). Gleichzeitig wurde in Vergleichsproben mittels Silbernitrat oder Kupfersulfat die Membranintegrität direkt geschwächt und diese Proben als Positivkontrolle für die korrekte Funktion des Assays verwendet (Trilisenko *et al.*, 2021).

Die *U. maydis* Flüssigkultur wurde dafür in YNB-Glukose (f.c. 1 %) bis zu einer OD<sub>600</sub> von 1 angezogen. Die Zellen wurden geerntet, in Milli-Q®-Wasser gewaschen und darin aufgenommen. Den Positivkontrollen wurde Silbernitrat (f.c. 0.02 mM) oder Kupfersulfat (f.c. 0.1 mM) zugesetzt. Alle Proben wurden für 45 min bei 28 °C schüttelnd inkubiert, danach wurden die Zellen durch Zentrifugation pelletiert (3500 rpm, 5 min, Heraeus Biofuge pico) und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Mittels dem Malachit Green Assay Kit (Merck) wurde die Phosphatmenge im Überstand gemessen und gegen Milli-Q®-Wasser normalisiert.

### 4.2.21. Induktion des Zellzyklusarrests durch Hydroxyurea

Die Induktion des Zellzyklusarrests in der S-Phase erfolgte durch die Zugabe von Hydroxyurea, welches die Ribonukleotidreduktase (RNR) inhibiert. Infolgedessen können keine dNTPs und daher auch keine DNA-Tochterstränge gebildet werden. Des Zellzyklus wird in der S-Phase arretiert und der Zellzykluskontrollpunkt aktiviert (Musiałek and Rybaczek, 2021). Die Sporidien dafür mit 1 mM Hydroxyurea für 90 min bzw. 150 min inkubiert. Zusätzlich wurde ab dem Zeitpunkt der Zugabe von Hydroxyurea halbstündlich die optische Dichte (OD) gemessen, um zu zeigen, dass die Zellteilung aufgrund des Zellzyklusarrests zum Erliegen kam.

## 4.3. Molekularbiologische Standardmethoden

### 4.3.1. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Um den Gehalt an Nukleinsäuren in einer wässrigen Lösung zu messen, wurde eine photometrische Messung mit einem Nanodrop-ND1000-Spektralphotometer durchgeführt. Der Absorptionswert 1 entspricht bei einer Wellenlänge von 260 nm und einer Schichtdicke von 1 cm einer Konzentration von circa 50 µg/ml doppelsträngiger DNA und 33 µg/ml einzelsträngiger DNA. Mittels des Quotienten aus den optischen Dichten bei 260 nm und 280 nm kann die Reinheit der Nukleinsäuren bestimmt

werden. So zeigt ein Quotient, der bei etwa 1.8 liegt, eine hohe Reinheit der Nukleinsäure an. Ist dieser Wert signifikant erhöht, ist die Nukleinsäure durch Salze oder Zucker verunreinigt. Ist der Wert hingegen vermindert, befinden sich Proteinrückstände in der Probe.

### 4.3.2. Isolierung von Nukleinsäuren

#### Mini-Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Modifiziert nach Sambrook *et al.*, 1989

Zur Isolation der Plasmid-DNA aus *E. coli* wurden 1.5 ml einer *E. coli*-Übernachtskultur 60 s bei 13000 rpm (Heraeus Biofuge pico) zentrifugiert. Das Pellet wurde in 300 µl STET resuspendiert und nach der Zugabe von Lysozym-Lösung (10 mg/ml in 1x TE) geschüttelt. Zur Lyse der Zellen wurde ein Hitzeschock bei 95 °C für eine Minute durchgeführt. Die lysierten Zellen und die denaturierte genomische DNA wurden durch 15-minütiges Zentrifugieren bei 13000 rpm (Heraeus Biofuge pico) pelletiert und im Folgenden mit einem sterilen Zahnstocher entfernt. Die Plasmid-DNA wurde durch die Fällung mit 40 µl 3 M Na-Acetat (Minilysat III) und 400 µl Isopropanol bei Raumtemperatur gereinigt. Nach fünfmaligem Invertieren wurde 15 min bei 13000 rpm (Heraeus Biofuge pico) zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 70 %-igem Ethanol gewaschen und nach der Trocknung in 100 µl TE-Puffer mit 50 µg/ml Ribonuklease A aufgenommen und bei 50 °C im Thermomixer (Eppendorf) gelöst.

#### Präparation von genomischer DNA aus *U. maydis*

Nach Vraneš, 2006

Für die Isolation von genomischer DNA aus einer 2.5 ml Übernachtskultur in YEPS<sub>Light</sub>-Medium wurden etwa 2 ml der Kultur mit circa 300 µg Glasperlen in einem Reaktionsgefäß für eine Minute bei 13000 rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert (Heraeus Biofuge pico). Der Überstand wurde abgenommen und dem Zellpellet 500 µl Lysis-Puffer zugegeben. Mittels eines Vibrax-Schüttlers wurden die Zellen bei 1400 rpm für 15 min aufgeschlossen. Nach einer Inkubation bei 65 °C und 550 rpm für 15 min mit einem Eppendorf-Thermomixer wurden die Reaktionsgefäße für 5 min auf Eis inkubiert. Es wurde 100 µl 8 M Kaliumacetat zugegeben und die Proben 8–10-mal invertiert, um die Proteine auszusalzen. Die Zelltrümmer und die ausgesalzene Proteine wurden durch Zentrifugation (15 min, 13000 rpm, RT, Heraeus Biofuge pico)

## Material und Methoden

pelletiert. 500 µl des wässrigen Überstands wurden in ein 1.5 ml Reaktionsgefäß mit 400 µl Isopropanol überführt. Durch erneutes Invertieren wurde die genomische DNA gefällt und mittels Zentrifugation (15 min, 13000 rpm, RT, Heraeus Biofuge pico) pelletiert. Die genomische DNA wurde mit 750 µl 70 %-igem Ethanol gewaschen und bei Raumtemperatur getrocknet. Im Folgenden wurde die genomische DNA bei 50 °C und 850 rpm (Eppendorf-Thermomixer) in 50 µl TE-Puffer mit 50 µg/ml RNase A gelöst. Die Qualität wurde durch das Auftragen von 1 µl der DNA auf ein 0.8 %-iges TAE-Agarosegel überprüft.

### Isolierung von RNA aus *U. maydis* Flüssigkulturen

Nach dem Protokoll der Trizol Herstellerfirma (Invitrogen).

Für die Präparation von Gesamt-RNA aus *U. maydis* Flüssigkulturen wurde ausschließlich Nuklease-freies Verbrauchsmaterial verwendet. 50 ml Zellkultur wurde, wie in Kapitel 4.2.6 beschrieben, angezogen und pelletiert. Das tiefgefrorene Pellet wurde in 1 ml Trizol (Invitrogen) resuspendiert und in 2 ml Reaktionsgefäße mit ca. 300 mg Glasperlen (Ø 150-200 µm) überführt. Die Zellen wurde dann in einer Kugelmühle (Retsch) bei 30 Hz für 5 min aufgeschlossen und weitere 5 min bei RT inkubiert. Nach einer Zentrifugation (10 min, 13000 rpm, RT, Heraeus Biofuge pico) wurde der Überstand in neue Reaktionsgefäße mit 200 µl vorgelegtem Chloroform überführt, für 15 Sekunden kräftig geschüttelt und für 2-3 min bei RT inkubiert. Auf eine erneute Zentrifugation (10 min, 13000 rpm, RT, Heraeus Biofuge pico) folgte das Waschen des Überstandes in weiteren 100 µl Chloroform. Der klare Überstand aus der folgenden Zentrifugation (10 min, 13000 rpm, RT, Heraeus Biofuge pico) wurde in neue Reaktionsgefäße mit 500 µl vorgelegtem Isopropanol überführt und für 10 min inkubiert. Die Proben wurden erneut zentrifugiert (10 min, 13000 rpm, RT, Heraeus Biofuge pico), der Überstand abgenommen und das Pellet zweimal in 70 %-igem Ethanol gewaschen. Abschließend wird der Überstand restlos entfernt, das Pellet in 50 µl RNase-freiem Wasser aufgenommen und für 10 min bei 50 °C schüttelnd inkubiert. Die Menge der isolierten RNA wird mittels Nanodrop bestimmt und gleichzeitig wird 1 µl nach dreiminütigem Erhitzen bei 75 °C über ein 0.8 %-iges Agarosegel aufgetrennt.



### 4.3.3. In-vitro-Modifikationen von DNA

Nach Sambrook *et al.*, 1989

#### Restriktion von DNA

Doppelsträngige DNA wurde mittels TypII-Restriktionsendonukleasen gespalten. Dabei wurden die empfohlenen Pufferbedingungen des Herstellers beachtet.

Ein typischer Ansatz enthielt:

- 0.5 µg DNA
- 0.5 U Restriktionsenzym
- 2 µl 10x Reaktionspuffer
- in einem 20 µl Reaktionsansatz

Der Ansatz wurde für mindestens eine Stunde bei der für das jeweilige Enzym optimalen Temperatur inkubiert und nach Zugabe von nativem Auftragspuffer mittels Gelelektrophorese in einem 0.8 %-igen TAE-Agarose-Gel aufgetrennt.

#### Ligation von DNA-Fragmenten

Die kovalente Verknüpfung von DNA-Fragmenten wurde mittels T4-DNA-Ligase erreicht. Durch eine Restriktion wurde die Plasmid-DNA linearisiert. Ein dreifacher molarer Überschuss an zu klonierendem Fragment wurde zum Plasmidrückgrat gegeben.

Ein Ligationsansatz enthielt folgende Komponenten:

- 50 ng linearisierter Vektor
- dreifacher molarer Überschuss an zu klonierendem Fragment
- 1 U T4-DNA-Ligase
- 1 µl 10x T4-DNA-Ligase-Puffer
- in 10 µl Volumen

Der Ansatz wurde für zwei Stunden bei RT inkubiert und die T4-DNA-Ligase danach für 10 min bei 65 °C inaktiviert.

#### 4.3.4. Gelelektrophorese

##### Nicht-denaturierende Gelelektrophorese

Mit Agarose-Gelen können Nukleinsäuren in einem elektrischen Feld gemäß ihrer Größe aufgetrennt werden (Sambrook *et al.*, 1989). Für die Gele wurden dabei 0.8 % (w/v) Agarose in 0.5x TAE-Puffer aufgekocht und nach der Abkühlung auf 70 °C mit Ethidiumbromid (f.c. 1 µg/ml) versetzt. Das Gel wurde in einen Schlitten gegossen. Wenn das Gel erstarrt war, wurden die Schlitten in Gelkammern gesetzt, die mit 0.5x TAE-Puffer gefüllt wurden. Die Nukleinsäuren wurden vor dem Auftragen mit nativem Auftragspuffer versetzt. Die Elektrophorese wurde bei einer konstanten Spannung von 5-10 V/cm durchgeführt. Die Banden konnten anschließend im UV-Durchlicht (254 nm) detektiert und auf Thermalpapier photographisch festgehalten werden.

##### Isolierung von Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Isolierung und Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde das Jetsorb Kit (Genomed) oder das Monarch DNA Gel Extraction Kit (NEB) verwendet. Durch die Verwendung eines UV-Lichttischs wurden die Fragmentbanden mit den richtigen Größen aus dem Gel ausgeschnitten. Das Gewicht der ausgeschnittenen Gelstücke wurde mit einer Feinwaage bestimmt. Das Kit bindet die DNA unter Hochsalzbedingungen an eine Matrix, entfernt dann Verunreinigungen und löst die DNA anschließend unter Niedrigsalzbedingungen wieder aus der Matrix. Es wurde nach Angaben des Herstellers vorgegangen und die DNA am Ende in 22 µl H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub> bei 50 °C resuspendiert. Die Konzentration wurde mittels Nanodrop-ND1000-Spektralphotometer bestimmt.

#### 4.3.5. Transfer und Analyse von DNA auf Membranen

nach Southern, 1975

##### Transfer von DNA auf Nylonmembran

Die zu untersuchende DNA wurde zuvor mit ein oder mehreren Restriktionsenzymen restringiert und über ein 0.8 %-iges TAE-Agarosegel der Größe nach aufgetrennt. Nach einer Inkubation des Gels in 0.25 M HCl für 20 min, um die Purine abzuspalten, wurde das Gel zunächst 20 min in DENAT-Lösung und danach 20 min in RENAT-Lösung gewaschen. Um die DNA vom Agarosegel auf die Nylonmembran zu übertragen, wurde ein Kapillar-Blot durchgeführt. Eine Schale, welche mit 20x SSC

befüllt ist, dient dabei als Quelle des Flüssigkeitsstroms, der durch einen Stapel saugfähiges Papier angetrieben wird. Das Gel und die Membran werden dazwischen platziert, sodass der Flüssigkeitsstrom die DNA vom Gel auf die Membran überträgt.

Der Blot ist wie folgt aufgebaut (von oben nach unten):

Gewicht (etwa 400 g)

Glasplatte

Stapel Papiertücher

3 Blätter Whatman 0.35 mm (getränkt in SSC)

Nylonmembran

Agarosegel

Brücke aus Whatman 0.35 mm (getränkt in SSC) zur Schale mit dem Puffer

Glasplatte

Schale mit Puffer

Der Blot erfolgte über Nacht. Die Membran wurde danach kurz bei RT getrocknet und die DNA in einem UV Stratalinker 180 (Stratagene) für eine Minute kovalent an die Membran gebunden.

### Herstellung der DNA-Hybridisierungssonde

Durch den Einbau von Digoxigenin-11-dUTP (DIG) in die DNA wurden Sonden zur Markierung von bestimmten Genabschnitten hergestellt. Dazu wurde die DNA für die Sonde zunächst für 10 min bei 99 °C in einem Thermocycler denaturiert. Die Reaktion lief nach der erfolgreichen Denaturierung über Nacht bei 37 °C ab.

Ein Reaktionsansatz beinhaltetete:

6.6 µl DNA (0,5-1 µg in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>)

1 µl 10x DIG-Mix

1 µl 10x Octadeoxyribonukleotide in Markierungspuffer (1 mM dATP, dCTP, dGTP, 0,65 mM dTTP, 0,35 mM DIG-dUTP)

1 µl 10x BSA (10 µg/µl)

0.4 µl DNA-Polymerase | Klenow-Fragment

Nach der Zugabe von 16 ml Southern-Hybridisierungspuffer zur Sonde wurde diese in einem Wasserbad bei 95 °C für 10 min denaturiert.

### Spezifischer Nachweis von DNA auf der Membran

Die Sättigung von unspezifischen Bindestellen auf der Membran erfolgt durch die Inkubation mit 40 ml Southern-Hybridisierungspuffer für 30 min bei 65 °C im Hybridisierungssofen. Danach wurde die Inkubation mit der Sonde bei 65 °C im Hybridisierungssofen über Nacht durchgeführt. Im Folgenden wurde die Membran für je 15 min in 2x SSPE-, 1x SSPE- und 0,1x SSPE-Lösung mit je 1 % SDS bei 65 °C inkubiert. Die Membran wurde dann mit 20 ml DIG-Waschlösung für 5 min bei RT gewaschen und anschließend sämtliche Flüssigkeitsreste entfernt. Mit 25 ml DIG2 wurde für 30 min eine erneute Blockierungsreaktion durchgeführt, um das unspezifische Binden des Anti-DIG-Antikörpers an die Membran zu verhindern. Die Membran wurde daraufhin für 30 min mit Anti-DIG-Antikörper (1:10000 in 10 ml DIG2) inkubiert und zweimal mit DIG-Waschlösung für je 15 min gewaschen. Anschließend wurde die Membran für 5 min in DIG3 und danach 5 min mit CDP-Star-Lösung (CDP-Star 1:500 in 10 ml DIG3) inkubiert. Die Detektion des Signals erfolgte mit Hilfe eines Chemilumineszenzdetektors (LI-COR ODYSSEY FC Mod. 2800) über eine CCD-Kamera. Die Membran wurde dafür 10 min exponiert.

## 4.4. PCR-Techniken

### 4.4.1. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Für die Amplifikation genomischer Fragmente von *U. maydis* oder die Amplifikation von Fragmenten, welche für Klonierungsschritte benötigt wurden, wurde die Q5 Polymerase (NEB) verwendet, welche sich durch eine hohe Prozessivität und niedrige Fehleranfälligkeit auszeichnet. Alle Reaktionen wurden in einem Peltier Thermal Cycler PTC-100 (MJ-Research) oder einem T100 Thermal Cycler (BioRad) durchgeführt.

#### MasterMix-Ansatz

- 100 ng Matrizen-DNA (genomisch) bzw. 5 ng Matrizen-DNA (Plasmid)
- 0.5 µl Q5/Phusion DNA Polymerase
- 1 µl 10 mM dNTPs
- 0.3 µl je Primer (100 pmol/µl)
- 10 µl 5x Q5/Phusion-Puffer
- Auffüllen mit H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub> auf 50 µl

Cycler Programm:

98 °C / 30 s – [98 °C / 10 s – x °C / 15 s – 72 °C / y s] x 30 – 72 °C / 10 min

Die Anlagerungstemperatur x entspricht der niedrigsten Schmelztemperatur der verwendeten Oligonukleotide + 3 °C, die Elongationszeit y entspricht 20-30 Sekunden pro 1000 bp des zu amplifizierenden Produkts.

#### 4.4.2. PCR-Generierung von Gen-Fusionskonstrukten für *U. maydis*

##### N-terminale Fusion

Durch diese Methode soll ein fluoreszierendes Protein *in frame* an den N-Terminus des zu untersuchenden Gens fusioniert werden. Dazu wurde die LB so gewählt, dass sie die letzten 1000 bp stromaufwärts des ORF des zu untersuchenden Gens umfasst. Mittels einer topoisomerasevermittelten Integrationsreaktion wurde die LB in pCR 2.1 eingebracht und nach der Transformation in *E. coli* auf *forward* Orientierung überprüft. Für die Klonierungsreaktion wurde der Vektor mit *forward* orientierter LB (Fragment 1) mit Restriktionsenzymen geöffnet, wodurch ein Vektorrückgrat entstand. N-terminale Fusionen wurden entweder mittels Gibson Assembly® (siehe Kapitel 4.4.3.) oder klassisch ligiert.

Im Falle der klassischen Ligation wurde das C-terminale Ende der LB (Fragment 1) und das N-terminale Ende des fluoreszierenden Proteins (Fragment 2) durch PCR-Amplifikation mit derselben Restriktionsschnittstelle versehen. Auch das C-terminale Ende des fluoreszierenden Proteins (Fragment 2) und das N-terminale Ende des ORFs (Fragment 3) wurde mittels PCR-Amplifikation mit derselben Restriktionsschnittstelle versehen. Bei der Amplifikation des fluoreszierenden Proteins galt es zu beachten, dass die Sequenz des fluoreszierenden Proteins (Fragment 2) ohne Stoppcodon amplifiziert wurde und nach der Reaktion *in frame* mit dem ORF des zu untersuchenden Proteins war. Das C-terminale Ende des ORFs (Fragment 3) wurde durch PCR-Amplifikation mit einer *SfiI*-Schnittstelle passend zur *SfiI*-Schnittstelle am N-terminalen Ende der Resistenzkassette (Fragment 4) und zusätzlich einer *NotI*-Schnittstelle versehen. Das N-terminale Ende der RB (Fragment 5) wurde mittels PCR-Amplifikation mit einer zum C-terminalen Ende der Resistenzkassette (Fragment 4) passenden *SfiI*-Schnittstelle und das C-terminale

## Material und Methoden

Ende der RB (Fragment 5) mit einer *NotI*-Schnittstelle versehen. Die RB (Fragment 5) umfasst dabei die ersten 1000 bp des genomischen Bereichs stromabwärts des ORFs des zu untersuchenden Proteins. Die genomische DNA von *U. maydis* wurde als Template zur Amplifikation von LB, ORF und RB verwendet. Für die Amplifikation des fluoreszierenden Proteins wurde ein entsprechendes Plasmid als Template eingesetzt. Die PCR-Produkte wurden auf einem Agarosegel überprüft und mithilfe des QIAquick PCR Purification Kits (Qiagen) aufgereinigt. Die Resistenzkassette wurde mit dem Restriktionsenzym *SfiI* aus dem entsprechenden Plasmid herausgeschnitten. Alle Fragmente wurden vor der Ligation mit den passenden Restriktionsenzymen zu den zuvor eingebrachten Erkennungssequenzen geschnitten. Im ersten Schritt wurde das Vektorrückgrat mit dem fluoreszierenden Protein und dem ORF ligiert und in *E. coli* transformiert. Nach der Überprüfung der erfolgreichen Ligation wurde das Plasmid mit *SfiI* und *NotI* linearisiert und im zweiten Schritt mit der Resistenzkassette und der RB ligiert.

Im Falle des Gibson Assembly<sup>®</sup> wurden die Fragmente mit Gibson-Überhängen amplifiziert. Auch hier musste beachtet werden, dass die Sequenz des fluoreszierenden Proteins (Fragment 2) ohne Stoppcodon amplifiziert wurde und nach der Reaktion in frame mit dem ORF des zu untersuchenden Proteins (Fragment 3) war. Die RB (Fragment 5) umfasst wie bei der klassischen Ligation 1000 bp des genomischen Bereichs stromabwärts des ORFs des zu untersuchenden Proteins. Als Template für die PCR von LB, ORF und RB wurde die genomische DNA von *U. maydis* verwendet. Das Fluoreszenzprotein und die Resistenzkassette wurden aus den entsprechenden Plasmiden heraus amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden auf einem Agarosegel kontrolliert und mithilfe des QIAquick PCR Purification Kits (Qiagen) aufgereinigt.

Für die Transformation wurde mittels einer PCR mit *nested* Primern, das in *U. maydis* einzubringende Konstrukt aus den generierten Plasmiden amplifiziert.

### C-terminale Fusion

Mit Hilfe dieser Methode soll ein fluoreszierendes Protein und eine Resistenz *in frame* an den C-Terminus des zu untersuchenden Gens fusioniert werden. Dazu wurde die linke Bande (LB) so gewählt, dass sie die letzten 1000 bp des ORF des zu untersuchenden Gens ohne das Stoppcodon umfasst. Das C-terminale Ende der LB

(Fragment 1) wurde durch PCR-Amplifikation mit einer *Sfi*I-Schnittstelle passend zur *Sfi*I-Schnittstelle am N-terminalen Ende der Kasette mit fluoreszierendem Protein und Resistenz (Fragment 2) und das N-terminale Ende der RB (Fragment 3) durch PCR-Amplifikation mit einer *Sfi*I-Schnittstelle passend zur *Sfi*I-Schnittstelle am C-terminalen Ende der Kasette mit fluoreszierendem Protein und Resistenz (Fragment 2) versehen. Bei der Amplifikation der LB galt es zu beachten, dass die Sequenz des ORFs (Fragment 1) ohne Stoppcodon amplifiziert wurde und nach der Reaktion *in frame* mit dem fluoreszierenden Protein war. Die RB (Fragment 3) umfasst dabei die ersten 1000 bp des genomischen Bereichs stromabwärts des ORFs des zu untersuchenden Proteins. Die genomische DNA von *U. maydis* wurde als Template zur Amplifikation von LB und RB verwendet. Die PCR-Produkte wurde auf einem Agarosegel überprüft und mithilfe des QIAquick PCR Purification Kits (Qiagen) aufgereinigt. Die Kasette mit fluoreszierendem Protein und Resistenz wurde mit dem Restriktionsenzym *Sfi*I aus dem entsprechenden Plasmid herausgeschnitten. Mittels einer topoisomerasevermittelten Integrationsreaktion wurde die LB und RB jeweils in pCR 2.1 eingebracht und nach der Transformation in *E. coli* auf *forward* Orientierung überprüft. Für die Klonierungsreaktion wurde der Vektor mit *forward* orientierter LB (Fragment 1) mit Restriktionsenzymen geöffnet, wodurch ein Vektorrückgrat entstand und aus dem Vektor mit *forward* orientierter RB (Fragment 3) mit denselben Restriktionsenzymen die RB herausgeschnitten. Das Vektorrückgrat wurde mit der Kasette mit fluoreszierendem Protein und Resistenz und der RB ligiert und in *E. coli* transformiert. Die erfolgreiche Ligation wurde mittels Testrestriktion überprüft.

Für die Transformation wurde mittels einer PCR mit *nested* Primern, das in *U. maydis* einzubringende Konstrukt aus den generierten Plasmiden amplifiziert.

#### 4.4.3. Gibson-Assembly<sup>®</sup>

Nach Gibson *et al.*, 2009

Diese Methode wurde bei der Assemblierung von fünf DNA-Fragmenten verwendet. Dafür wurde zunächst das linke Fragment über PCR amplifiziert und an der rechten Seite eine Schnittstelle für ein Restriktionsenzym angehängt. Die Primer für das Gibson-Assembly<sup>®</sup> wurden dabei mittels CloneManager geplant. Das PCR-Produkt wurde nach der Aufreinigung in einen TOPO-Vektor kloniert, dieser mit zwei Restriktionsenzymen restringiert und somit linearisiert. Das eine Enzym schneidet

## Material und Methoden

dabei in der *multiple cloning site (MCS)* des TOPO-Vektors und das andere in der rechten Flanke des eingebrachten Fragments. Mit weiteren PCRs wurden die übrigen Fragmente amplifiziert. Dabei wurde den Fragmenten ein etwa 20 bp großer Überhang zu den benachbarten Fragmenten angehängt. Im Verlauf der Reaktion baut die 5'-Exonuklease zunächst die 5'-Enden der Überhänge ab. Nachdem die Fragmente sich aneinandergelagert hatten, verlängerte die DNA-Polymerase die 3'-Enden. Die DNA-Ligase verknüpfte die Verbindungsstellen. Das entstandene Plasmid wurde in *E. coli* transformiert.

### PCR-Amplifikation der Fragmente

Für die PCR zur Amplifikation der Fragmente wurden Primer verwendet, welche die Fragmente um überlappende Bereiche erweitern. Die Produkte der PCR wurden über ein Agarosegel aufgereinigt und mittels QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) aufgereinigt. Die PCR lief unter Standardbedingungen ab (siehe Kapitel 4.4.1).

### Ligation der Fragmente

Alle Fragmente und der linearisierte TOPO-Vektor wurden gemeinsam mit dem Mastermix für 30-60 min bei 50 °C inkubiert. Dabei wurden 50-75 ng des Vektors und die zwei- bis dreifache Menge der Fragmente verwendet. Die Gesamtmenge der eingesetzten DNA lag zwischen 20 und 200 ng.

Ein Mastermix enthielt folgende Komponenten:

4 µl 5x ISO-Puffer

0.008 µl 10 U/µl T5 Exonuklease

0.25 µl 2 U/µl Phusion-Polymerase

2 µl 40 U/µl Taq-Ligase

In 15 µl Volumen

### 4.4.4. Real-Time-PCR (qRT-PCR)

#### DNase I-Behandlung und Reverse Transkription

Um DNA-Kontamination zu verhindern, wurde die isolierte Gesamt-RNA (siehe Gesamt-RNA-Extraktion aus *U. maydis* Flüssigkulturen in Kapitel 4.3.2) zunächst mit Turbo DNase I (Invitrogen) behandelt. Dabei wurde nach Angaben des Herstellers



vorgegangen (siehe Herstellerprotokoll Turbo DNA-free™ Kit). Mithilfe des RevertAid First Strand cDNA Synthese Kit (Thermo Fisher Scientific) wurde die reverse Transkription nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Es wurde 0.5-1 µg DNase-behandelte RNA gemeinsam mit Oligo(dT)20-Primern, den entsprechenden Puffern und Enzymgemischen für die reverse Transkription eingesetzt und bei 42 °C für 60 min inkubiert.

## Real-Time PCR

Real-Time PCR Analysen wurden mithilfe des MESA GREEN qPCR Master Mix plus for SYBR Assay + Fluorescein Kit (Eurogentech) nach Herstellerangaben durchgeführt. Es wurden 1-2 µl synthetisierte cDNA in die PCR-Reaktion eingesetzt, welche im Bio-Rad-iCycler-System unter folgendem Programm erfolgt:

Initiale Denaturierung:	95 °C / 7 min
Amplifikation (45 Zyklen):	95 °C / 30 s
	60 °C / 20 s
	72 °C / 40 s

Die Spezifität der Amplifikation wurde im Anschluss anhand einer Schmelzkurve am BioRad CFX96-System überprüft. Die Kalkulation des CT-Wertes (Threshold Cycle), welcher den Wert bzw. Zyklus beschreibt, bei dem die Fluoreszenz das erste Mal signifikant über die Hintergrundfluoreszenz steigt, wurde mithilfe der BioRad-Software Version 3.0a durchgeführt. Die relativen Expressionswerte wurden mit Microsoft Excel berechnet.

## 4.5. Sequenzanalysen und *in silico* Methoden

### 4.5.1. Sequenzierung von DNA

#### Sequenzierung von Plasmid-DNA

Durch eine Sequenzierung der erzeugten Konstrukte soll sichergestellt werden, dass diese keine Mutationen aufweisen und der Leserahmen somit erhalten bleibt. Sequenzierungen von Plasmid-DNA wurden vom Sequencing Service Department der Ludwig-Maximilian-Universität München nach dem Cycle, Clean & Run Protokoll oder mittels des Mix2Seq-Kit von Eurofins durchgeführt. Für Sequenzierungen wurde

## Material und Methoden

Plasmid-DNA verwendet, die nach dem Mini-Präparationsprotokoll für Plasmid-DNA isoliert und mit dem Roti®-Prep Plasmid MINI Kit (Carl Roth) oder dem Monarch Plasmid Minipräp Kit (NEB) aufgereinigt wurde.

Es wurden folgende Ansätze verwendet:

LMU:

- 150-300 ng Matritzen-DNA
- 1 µl Sequenzieroligo (5 pmol/µl)
- Auffüllen auf 7 µl mit H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>

Eurofins:

- 5-500 ng/µl Matrizen-DNA
- 5 µl Sequenzieroligo (5 pmol/µl)
- Auffüllen auf 10 µl mit H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>

Die erhaltenen Sequenz-Rohdaten konnten zur weiteren Bearbeitung in Sequencher 4.9 (Gene Codes Corporation) oder ApE importiert werden.

### 4.5.2. Analyse von LC-MS-Daten

Die Analyse der LC-MS Daten wurde mit MaxQuant 2.3.1.0 (Tyanova *et al.*, 2016a) und Perseus 2.0.9.0 (Tyanova *et al.*, 2016b) (<https://maxquant.org>) durchgeführt. Zur Analyse wurde die *label-free quantification* Methode angewendet. Die Protein-Sequenzen (FASTA Format) von *U. maydis* stammen von UniProt (Universal Protein Resource) (<http://www.uniprot.org>).

### 4.5.3. Sonstige Sequenz- und Strukturanalyse

Folgende Programme wurden für die Sequenz- und Strukturanalyse von DNA- und Proteinsequenzen oder zur weiteren Verarbeitung von Rohdaten verwendet:

**ApE – „A Plasmid Editor“** zur Erstellung und Bearbeitung von Plasmid- und genomischen Sequenzen, zum Erstellen von Oligonukleotiden, Zeichnen von Plasmidkarten und zum Vergleich von DNA-Sequenzen.

**BLAST** (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul *et al.*, 1990) zur Identifikation ähnlicher Proteine oder DNA-Sequenzen in den öffentlichen Datenbanken.

**CloneManager 9** zur Erstellung und Bearbeitung von Plasmid- und genomischen Sequenzen und für die Planung von zu synthetisierenden Oligonukleotiden.

**SEQUENCHER 5.3** (Gene Codes Corporation) zur Bearbeitung von Sequenzrohdaten und zum Vergleich von DNA-Sequenzen.

Zur Identifikation von orthologen Proteinsequenzen anhand annotierter Funktionen und zur Analyse von DNA- und Protein-Sequenzdaten wurden folgende Datenbanken verwendet.

***U. maydis* Genom:** NCBI, National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/>

***S. cerevisiae* Genome Database (SGD):** <https://www.yeastgenome.org/>

**Andere Genomdaten** wurden der Datenbank bei NCBI, National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine, entnommen.

## 4.6. Biochemische Methoden

### 4.6.1. Isolierung von Gesamtprotein

Analytischer Maßstab aus *U. maydis*-Flüssigkultur

Das Gesamtprotein aus *U. maydis* wurde aus 100 ml bei OD<sub>600</sub> von 0.6-1.0 für nicht induzierte Zellen isoliert. Dazu wurden die Zellen pelletiert (3500 rpm, 6 min, Heraeus Biofuge stratos) und 1x TBS gewaschen. Die gewaschenen Pellets wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C aufbewahrt. Zur Präparation wurden die Zellen auf Eis aufgetaut und in 1.5 ml B-300-Puffer (IP-Puffer nach Pierce) mit 2x Proteinase-Inhibitoren (cOmplete EDTA-free, Roche) und 1 mM Pefabloc® SC (Roth) resuspendiert. Das Gemisch wurde in metallene Mahlbecher (25 ml, MM200, Retsch) mit zwei Mahlkugeln (∅ 10 mm rostfrei, Retsch), welche mit flüssigem Stickstoff vorgekühlt wurden, übertragen. Der Zellaufschluss erfolgte in der Schwingmühle (MM200, Retsch) für 5 min bei 25 Hz. Die aufgeschlossenen Zellen wurden in 1.5 ml Reaktionsgefäße überführt und mittels Zentrifugation (20000 rpm, 30 min, 4 °C, Heraeus Biofuge stratos) das Gesamtprotein von Zelltrümmern getrennt. Das Gesamtprotein, welches sich nach der Zentrifugation im Überstand befindet, kann nach Überführung in ein frisches Reaktionsgefäß bei -20 °C aufbewahrt werden.

## Material und Methoden

Nachdem das Gesamtprotein mit der entsprechenden Menge Lämmli-Puffer vermischt wurde, konnte es mittels eines SDS-haltigen Polyacrylamid-Gels aufgetrennt werden.

### Analytischer Maßstab aus mit *U. maydis* infizierten Maispflanzen

Für die Extraktion von *U. maydis*-Proteinen aus infizierten Maispflanzen wurden diese wie in Kapitel 4.2.13 beschrieben angezogen und mit kompatiblen *U. maydis*-Stämmen nach sechs Tagen infiziert. Vier Tage nach Infektion wurde Pflanzenmaterial vom dritten und vierten Blatt unterhalb der Infektionsstelle geerntet, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Mittels Mörser und Pistill wurde das Pflanzenmaterial in flüssigem Stickstoff zu Pulver gemahlen. 3 ml des Pulvers wurde mit 3 ml B-300-Puffer mit 2x Proteinase-Inhibitoren (cOmplete EDTA-free, Roche) und 1 mM Pefabloc® SC (Roth) versetzt und in metallene Mahlbecher (25 ml, MM200, Retsch) mit zwei Mahlkugeln (Ø 10 mm rostfrei, Retsch), welche mit flüssigem Stickstoff vorgekühlt wurden, übertragen. Der Zellaufschluss erfolgt in der Schwingmühle (MM200, Retsch) für 5 min bei 25 Hz. Die aufgeschlossenen Zellen wurden in 1.5 ml Reaktionsgefäße überführt und mittels Zentrifugation (3600 rpm, 10 min, 4 °C, Heraeus Biofuge stratos) das Gesamtprotein von Zelltrümmern getrennt. Der Überstand wurde durch ein 80 µm Netzfilter aus Nylon (Merk Millipore) filtriert und anschließend wurden die löslichen Proteine mittels Zentrifugation (20000 rpm, 30 min, 4 °C, Heraeus Biofuge stratos) abgetrennt. Die löslichen Proteine, welche sich nach der Zentrifugation im Überstand befinden, können nach Überführung in einem frischen Reaktionsgefäß bei -20 °C aufbewahrt werden. Nachdem die löslichen Proteine mit der entsprechenden Menge Lämmli-Puffer vermischt wurden, konnten diese mittels eines SDS-haltigen Polyacrylamid-Gels aufgetrennt werden.

### 4.6.2. Aufreinigung von Proteinen und Proteinkomplexen

#### Immunopräzipitation von Proteinkomplexen aus *U. maydis*-Flüssigkultur und Elution

Zunächst wurden 50 µl Pierce™ Anti-HA-gekoppelte magnetische Beads (Thermo Scientific) oder 25 µl GFP Nano-Trap magnetische Beads (Chromotek) dreimal mit 1 ml 1x PBS und einmal mit 500 µl B-300-Puffer mit 2x Proteinaseinhibitor und 1 mM Pefabloc® SC gewaschen. Die Abtrennung der Beads erfolgte mit einem magnetischen Reaktionsgefäßständer (DyneMag™-2, life technologies). Zu den gewaschenen Beads wurde 500 µl Proteinlysate (siehe Kapitel 4.6.1) gegeben und für eine Stunde

(GFP) oder über Nacht (HA) bei 4 °C auf dem Drehrad inkubiert. Die Beads wurden im Folgenden bis zu fünfmal mit je 500 µl B-300-Puffer gewaschen und im letzten Waschschrift in ein neues Reaktionsgefäß übertragen. Das alte Reaktionsgefäß wurde mit 500 µl 1x PBS mit 2x Proteinaseinhibitor und 1 mM Pefabloc® SC gespült und mit dem letzten Waschschrift der Beads vereinigt. Nach Entfernung des gesamten Überstands wurden die Beads in 40 µl Lämmli-Puffer aufgenommen und für 5 min bei 85 °C auf einem Heizblock inkubiert. Der abgenommene Überstand wurde entweder direkt über ein SDS-haltiges Polyacrylamid-Gel aufgetrennt oder bei -20 °C aufbewahrt. Für die Inputkontrolle wurde jeweils 1/25 der Proteinmenge, welche in die IP eingesetzt wurde, verwendet.

#### 4.6.3. Auftrennung und Nachweis von Protein (SDS-PAGE)

Mittels diskontinuierlicher SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) wurden Proteine in einer Mini Protean II Apparatur (BioRad) aufgetrennt (Laemmli, 1970). Bis die Auftragspufferbande die Trenngelschicht erreicht hat, erfolgte die Auftrennung bei 20 mA (pro Gel) für 25-30 min. Die Auftrennung im Trenngel wurde bei 30 mA (pro Gel) für 60-90 min fortgesetzt, bis die Auftragspufferbande gerade so aus dem Gel gelaufen war. Die Gele wurden standardmäßig mit 10 % Acrylamid hergestellt und als Größenstandard wurde der Pageruler prestained Proteinmarker (Thermo Fisher) verwendet. Die Detektion der Proteinbanden nach deren Auftrennung auf dem Gel erfolgte mittels Coomassie-Färbung.

#### Coomassie-Färbung von Proteingelen

Gele wurden zur Visualisierung der Proteinbanden mit Roti®Blue quick (Roth) gefärbt. Dazu wurde das Gel in einer Färbeschale mit Roti®Blue quick Lösung übergossen und darin für 15 min bis über Nacht bei Raumtemperatur auf dem Taumelschüttler inkubiert. Bei Bedarf wurde das Gel im Folgenden mit 20 % Ethanol entfärbt.

#### 4.6.4. Nachweis von immobilisierten Proteinen (Western-Analyse)

Nach Towbin *et al.*, 1979

Für den Transfer von Proteinen aus SDS-Polyacrylamid-Gelen auf eine PVDF-Membran (Roti®-PVDF (Roth)) wurde ein Elektroblot in einer Semi-Dry Blotting Apparatur durchgeführt. Dazu wurde eine Stromstärke 2 mA pro cm<sup>2</sup> PVDF-Membran (370 mA) für 18 min angelegt. Für das Fastblot-Puffersystem wurde der Blot von der Kathode zur Anode wie folgt aufgebaut:

1 Whatman 1.5 mm (in Fastblotpuffer getränkt)

SDS-Polyacrylamid-Gel

PVDF-Membran (1 min in Methanol aktiviert, mit H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub> abgespült)

1 Whatman 1.5 mm (in Fastblotpuffer getränkt)

Mithilfe der an die sekundären Antikörper konjugierte Meerrettich-Peroxidase (HRP) wurde der spezifische, immunologische Nachweis der immobilisierten Proteine durchgeführt. Die PVDF-Membran wurde nach dem Elektroblot dafür zunächst für 30 min in 5 % (w/v) Milchpulver in TBST blockiert, wodurch unspezifische Bindungen der Antikörper an die Membran verhindert wurden. Über Nacht wurde die Membran dann mit 3 ml des primären Antikörpers (in TBST mit 5 % Milchpulver) auf einem Taumelrollenmischer bei 4 °C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für 10 min in TBST-Puffer, wurde die Membran für eine Stunde in 3 ml des sekundären Antikörpers (in TBST mit 5 % Milchpulver) inkubiert. Die Membran wurde erneut dreimal für 10 min in TBST-Puffer und einmal für 10 min in TBS-Puffer gewaschen.

Tabelle 13: Für Western-Analysen verwendete Antikörper

Antikörper	Wirt	Verdünnung	Bezugsquelle
<b>Primäre Antikörper</b>			
anti HA-Antikörper	Kaninchen	1:3000	Cell Signaling
anti GFP-Antikörper	Kaninchen	1:3000	Sigma-Aldrich
anti Actin-Antikörper	Kaninchen	1:3000	Cell Signaling
<b>Sekundäre Antikörper</b>			
Anti-Kaninchen IgG, konjugiert mit HRP	Ziege	1:3000	Promega

Zur Detektion wurde die Membran in eine Detektionsschale gegeben, 1 ml ECL1-Lösung und 1 ml ECL2-Lösung gemischt (Pierce™ ECL Western Blotting Substrat, Thermo Scientific™) und gleichmäßig auf die Membran gegeben. So wurde die Membran für 5 min bei RT inkubiert und danach die Chemilumineszenz mithilfe der LI-COR ODYSSEY FC Mod. 2800 detektiert.

#### 4.6.5. Analyse von Proteinen und Proteinkomplexen

##### On-Bead Trypsin Verdau

Für die Analyse von Proteinen und Proteinkomplexen mittels Massenspektroskopie wurden die Beads nach der IP nicht in Lämmli-Puffer erhitzt, um die Proteine von den Beads zu eluieren, sondern es wurde ein On-Bead Trypsin Verdau durchgeführt. Dazu wurden die Beads in 20 µl EB1 für 90-120 min bei 30 °C und 400 rpm auf dem Heizblock inkubiert. Der Überstand wurde danach in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Beads zweimal mit 40 µl EB2 gewaschen, wobei die Überstände der Waschschriffe im neuen Reaktionsgefäß vereinigt wurde. Der Verdau wurde über Nacht bei 32 °C und 400 rpm (Thermomixer, Eppendorf) fortgesetzt und am nächsten Tag durch die Zugabe von 0.8 µl TFA (Trifluoressigsäure) gestoppt. Das Volumen wurde notiert und die Proben in einer Vakuumzentrifuge (Concentrator 5301, Eppendorf) eingedampft und bis zum Versand zur Massenspektroskopie bei RT im Dunklen aufbewahrt.

##### Massenspektroskopische Analyse (LC-MS)

###### RSLCnano Ultimate 3000 system und Q Exactive HF

Mittels der C18 *stage tipping* Methode wurden die Peptidpellets, welche durch Trypsin Verdau entstanden sind, aufgereinigt (Rappsilber *et al.*, 2003; Rappsilber *et al.*, 2007). Nachfolgend wurde die Peptidlösung vollständig getrocknet und in Probenpuffer (2 % Acetonitril, 0.1 % Ameisensäure) für die LC-MS aufgenommen. Es wurde eine Nanoflow-Flüssigchromatographie verbunden mit einem Nano-Elektrospray Massenspektrometer durchgeführt. 4 µl der Peptidlösung wurde dazu auf eine Acclaim® PepMAP RSLC Säule (75 µm x 50 cm (#164540), C18, 3 µm, 100 Å, Thermo Fisher Scientific) mit 0.07 % Trifluoressigsäure bei einer Durchflussrate von 20 µl/min für 3 min geladen. Mittels Reversed-Phase Chromatographie wurden die Peptide über die Acclaim® PepMAP RSLC Säule mit einem Gradienten von 96 % Lösungsmittel A

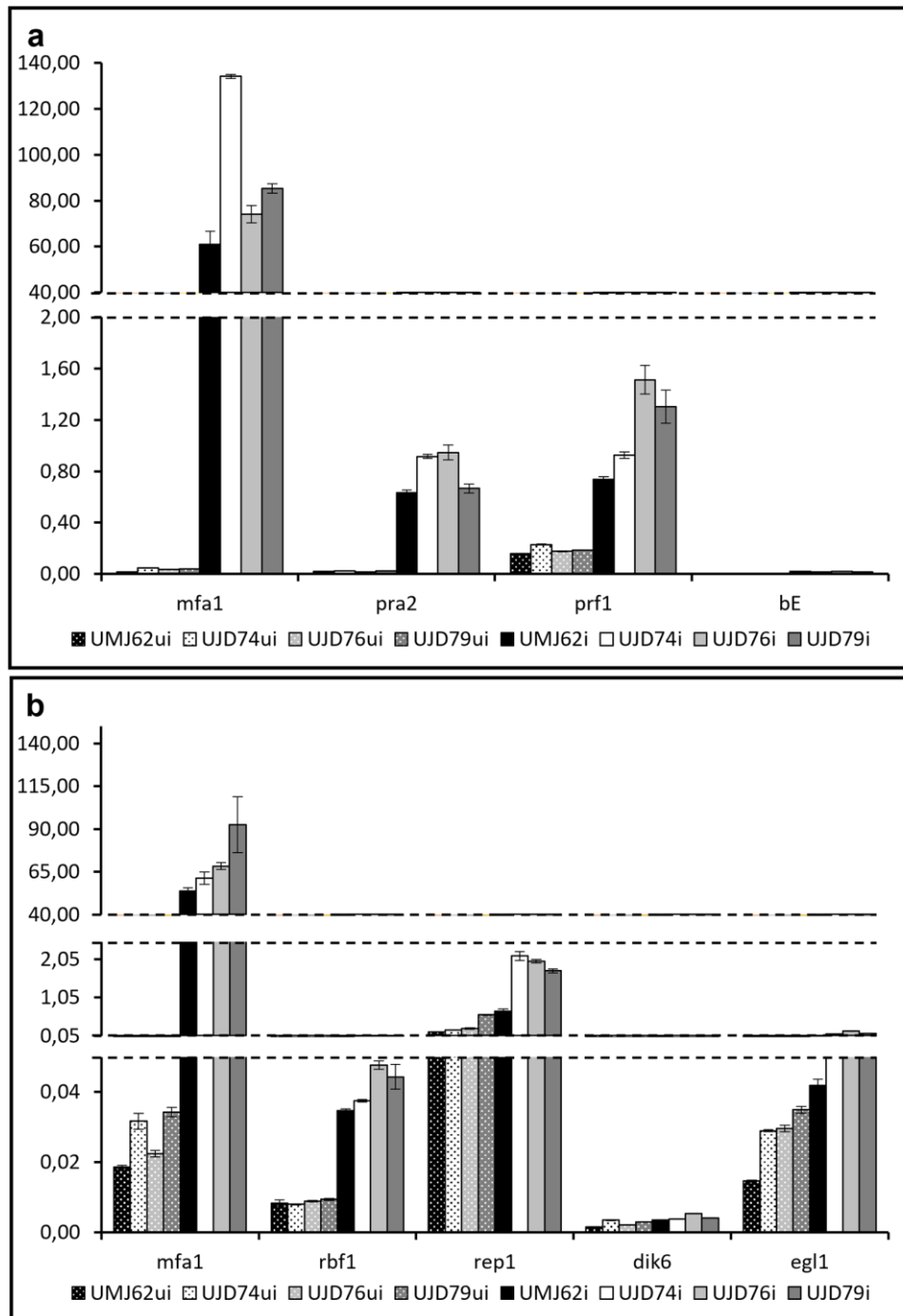
## Material und Methoden

(0.1 % Ameisensäure) und 4 % Lösungsmittel B (80 % Acetonitril, 0.1 % Ameisensäure) bis 45 % Lösungsmittel B für 82 min und nachfolgend in 90 % Lösungsmittel B für 12 min und einem Kontrastfluss von 3 min in 90 % Lösungsmittel B aufgetrennt. Der Gradient besaß eine Flussrate von 300 nl/min. Nach der *on-line* Ionisierung durch Nanoelektro-Spray bei 1.5 kV mit einer Nanospray Flex™ Ionenquelle (Thermo Fisher Scientific) wurden die ionisierten Proteine stetig in das Massenspektrometer (Q Exactive HF, Thermo Scientific) überführt. Mit einem Orbitrap-FT Analyzer wurden *full scans* für einen Massenbereich von 300-1650 m/z bei einer Auflösung von 30000 und paralleler *data-dependent* top 10 MS<sup>2</sup>-Fragmentierung (HCD) mit einer Auflösung von 15000 durchgeführt. Die XCalibur 4.0 Software (Thermo Scientific) wurde für die Programmierung und Datenerfassung verwendet.



## 5. Anhang

### 5.1. $\Delta far10$ : Expression der *a*- und *b*-abhängigen Gene



**Abbildung 41: Expression der *a*- und *b*-abhängigen Gene nach *far10*-Deletion**

Dargestellt ist die Expression ( $\Delta Ct$ ) der *a*-abhängigen Gene *mfa1*, *pra2*, *prf1*, *bE* (**a**), *rbf1*, des *rbf1*-abhängigen Gens *dik6* und der filamentspezifischen Gene *rep1* und *egl1* (**b**) im Wildtypstamm (UMJ62: *a2 b2 Δmfa2::P<sub>org</sub>:mfa1*) und den *far10*-Deletionsstämmen (UJD74/UJD76/UJD79: *a2 b2 Δmfa2::P<sub>org</sub>:mfa1 Δumag\_04391::gen<sup>f</sup>*). Zur Normalisierung diente das Gen *eIF2B*. Das Experiment wurde mit biologischen Triplikaten und jeweils technischen Duplikaten durchgeführt. Die Mittelwerte der technischen Duplikate der biologischen Triplikate sind hier dargestellt. Der Fehlerbalken zeigt die zugehörige Standardabweichung der Mittelwerte der technischen Duplikate.

## 5.2. BLAST®-Analyse der STRIPAK-Komponenten

Tabelle 14: BLAST®-Analyse der bekannten STRIPAK-Komponenten

	Komponente										
	reg. UE	strukturgeb. UE	kat. UE		Entwicklungsprotein	Kinaseaktivator	Ankerprotein	Kinasen			
<b>U. maydis</b>	Name	Far8	PP2AA	PPG1	PP2Ac	Far11	Far10	Don3			
	Gen ID	UMAG_03784	UMAG_02960	UMAG_10198	UMAG_11525	UMAG_10285	UMAG_04391	UMAG_05543	UMAG_10496	UMAG_11396	
	Name	STRN3	PP2AA	PP2Ac	STRIP1	MOB3	SLMAP	MST4	STK25	STK24	
<b>Homo sapiens</b>	AB [%]	53 %	98 %	92 %	97 %	57 %	14 %	78 %	65 %	63 %	
	E-Wert	6,00E-69	0	5,00E-126	0	7,00E-46	9,00E-19	1,00E-129	4,00E-143	2,00E-80	
	ÜE [%]	34.13 %	55.56 %	56.99 %	86.38 %	35.65 %	40.48 %	57.36 %	70.11 %	46.26 %	
<b>S. cerevisiae</b>	Name	Far8	Tpd3	Ppg1	Far11	Far11	Far9/Far10	Sps1	Klc1		
	Gen ID	YMR029C	YAL016W	YNR032W	YNL127W	YDR200C/YLR238W	YDR523C	YHR102W			
	AB [%]	8 %	93 %	85 %	81 %	31 %	20 % / 15 %	52 %	26 %		
<b>S. pombe</b>	E-Wert	6,00E-12	2,00E-175	6,00E-146	8,00E-114	1,00E-24	2e-11/3e-11	1,00E-81	1,00E-82		
	ÜE [%]	57.45 %	47.17 %	62.62 %	53.51 %	25.79 %	39.42 % / 47.62 %	51.54 %	45.49 %		
	Name	Csc3	Paa1	Ppa3	Csc2	Csc1	Sid1	Ppk11	Nak1		
<b>S. macrospora</b>	Gen ID	SPBC1773.01	SPAP8A3.09c	SPAC22H10.04	SPBC27B12.04c	SPBC3H7.13	SPAC9G1.09	SPAC2C4.14c	SPBC17F3.02		
	AB [%]	60 %	97 %	94 %	100 %	25 %	41 %	67 %	96 %	49 %	
	E-Wert	2,00E-15	0	2,00E-159	5,00E-125	1,00E-24	1,00E-30	6,00E-105	7,00E-105	5,00E-108	
<b>S. macrospora</b>	ÜE [%]	32.35 %	59.41 %	68.51 %	56.13 %	29.25 %	47.29 %	54.09 %	51.33 %	50.76 %	
	Name	PRO11	PP2AA	PP2Ac	PRO22	MOB3	PRO45	KIN3	KIN24		
	Gen ID	SMAC_08794	SMAC_01919	SMAC_04756	SMAC_02580	SMAC_00877	SMAC_01224	SMAC_04490	SMAC_01456		
<b>N. crassa</b>	AB [%]	69 %	94 %	86 %	92 %	77 %	26 %	37 %	36 %		
	E-Wert	1,00E-43	0	5,00E-125	0	1,00E-88	3,00E-43	2,00E-132	4,00E-157		
	ÜE [%]	27.93 %	61.83 %	56.84 %	87.79 %	28.09 %	46.64 %	60.25 %	70.85 %		
<b>A. nidulans</b>	Name	HAM-3	PP2AA	PP2Ac	HAM-2	MOB-3	HAM-4	PRK-9	STK-6		
	Gen ID	NCU08741	NCU00488	NCU06563	NCU03727	NCU07674	NCU00528	NCU04096	NCU00772		
	AB [%]	68 %	94 %	98 %	80 %	41 %	28 %	37 %	39 %		
<b>A. nidulans</b>	E-Wert	9,00E-43	0	0	1,00E-76	3,00E-32	1,00E-44	7,00E-134	1,00E-155		
	ÜE [%]	27.72 %	61.33 %	76.18 %	38.88 %	31.93 %	46.02 %	60.88 %	69.69 %		
	Name	StrA	SipF	SipE	SipC	SipA	SipD				
<b>A. nidulans</b>	Gen ID	ANIA_08071	ANIA_04085	ANIA_00164	ANIA_06611	ANIA_06190	ANIA_04632				
	AB [%]	69 %	97 %	100 %	67 %	43 %	16 %				
	E-Wert	1,00E-38	0	7,00E-166	8,00E-113	5,00E-39	8,00E-41				
<b>A. flagrans</b>	ÜE [%]	28.26 %	62.44 %	75.17 %	45.48 %	37.33 %	61.60 %				
	Name	StrA	SipF	SipE	SipC	SipA	SipD				
	Gen ID	DFL_002622	DFL_008478	DFL_003255	DFL_007682	DFL_000993	DFL_001177	DFL_007266	DFL_002427		
<b>A. flagrans</b>	AB [%]	67 %	96 %	99 %	79 %	43 %	23 %	36 %	44 %		
	E-Wert	3,00E-39	0	1,00E-177	1,00E-119	4,00E-35	3,00E-43	7,00E-83	2,00E-157		
	ÜE [%]	28.94 %	62.83 %	73.12 %	43.02 %	40.10 %	50.00 %	43.30 %	71.20 %		

AB [%] = Abdeckungsbereich, ÜE [%] = Übereinstimmung

## 6. Literaturverzeichnis

---

- Ackermann, R.**, 2021 Analyse zur Lokalisierung von Nma1 an Mikrotubuli und frühen Endosomen durch C-terminale Verkürzung. im Fakultät für Chemie und Biowissenschaften, Karlsruher Institut für Technologie, Karlsruhe.
- Agrios, G. N.**, 1997 Plant Pathology. Academic Press, New York.
- Aguilar, P. S., M. G. Heiman, T. C. Walther, A. Engel, D. Schwudke et al.**, 2010 Structure of sterol aliphatic chains affects yeast cell shape and cell fusion during mating. Proceedings of the National Academy of Sciences 107: 4170-4175.
- Akada, R., L. Kallal, D. I. Johnson and J. Kurjan**, 1996 Genetic relationships between the G protein  $\beta\gamma$  complex, Ste5p, Ste20p and Cdc42p: investigation of effector roles in the yeast pheromone response pathway. Genetics 143: 103-117.
- Al-Awqati, Q.**, 1986 Proton-translocating ATPases. Annu Rev Cell Biol 2: 179-199.
- Alberts, A.**, 2003 Diaphanous-related Formin homology proteins. Current biology : CB 12: R796.
- Almeida, F., M. L. Rodrigues and C. Coelho**, 2019 The still underestimated problem of fungal diseases worldwide. Frontiers in microbiology: 214.
- Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers and D. J. Lipman**, 1990 Basic local alignment search tool. Journal of Molecular Biology 215: 403-410.
- Araujo-Palomares, C. L., C. Richthammer, S. Seiler and E. Castro-Longoria**, 2011 Functional Characterization and Cellular Dynamics of the CDC-42 – RAC – CDC-24 Module in Neurospora crassa. PLOS ONE 6: e27148.
- Armstrong-James, D., G. Meintjes and G. D. Brown**, 2014 A neglected epidemic: fungal infections in HIV/AIDS. Trends in microbiology 22: 120-127.
- Aschenbroich, J., K. P. Hussnaetter, P. Stoffels, T. Langner, S. Zander et al.**, 2019 The germinal centre kinase Don3 is crucial for unconventional secretion of chitinase Cts1 in Ustilago maydis. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics 1867: 140154.
- Babu, M., J. Vlasblom, S. Pu, X. Guo, C. Graham et al.**, 2012 Interaction landscape of membrane-protein complexes in Saccharomyces cerevisiae. Nature 489: 585-589.

- Backus, M. P.**, 1939 The mechanics of conidial fertilization in *Neurospora sitophila*. Bulletin of the Torrey Botanical Club: 63-76.
- Bakkeren, G., J. Kämper and J. Schirawski**, 2008 Sex in smut fungi: Structure, function and evolution of mating-type complexes. Fungal Genetics and Biology 45: S15-S21.
- Bandara, A. Y., D. K. Weerasooriya, C. A. Bradley, T. W. Allen and P. D. Esker**, 2020 Dissecting the economic impact of soybean diseases in the United States over two decades. PLoS one 15: e0231141.
- Banks, G. R., P. A. Shelton, N. Kanuga, D. W. Holden and A. Spanos**, 1993 The *Ustilago maydis* nar 1 gene encoding nitrate reductase activity: sequence and transcriptional regulation. Gene 131: 69-78.
- Banuett, F.**, 1995 Genetics of *Ustilago maydis*, a fungal pathogen that induces tumors in maize. Annu Rev Genet 29: 179-208.
- Banuett, F., and I. Herskowitz**, 1989 Different a alleles of *Ustilago maydis* are necessary for maintenance of filamentous growth but not for meiosis. Proc Natl Acad Sci U S A 86: 5878-5882.
- Banuett, F., and I. Herskowitz**, 1994 Morphological transitions in the life cycle of *Ustilago maydis* and their genetic control by the a and b loci. Experimental Mycology 18: 247-266.
- Banuett, F., and I. Herskowitz**, 1996 Discrete developmental stages during teliospore formation in the corn smut fungus, *Ustilago maydis*. Development 122: 2965-2976.
- Banuett, F., R. H. Quintanilla and C. G. Reynaga-Peña**, 2008 The machinery for cell polarity, cell morphogenesis, and the cytoskeleton in the Basidiomycete fungus *Ustilago maydis*—A survey of the genome sequence. Fungal Genetics and Biology 45: S3-S14.
- Bartlett, K., and K. Kim**, 2014 Insight into Tor2, a budding yeast microdomain protein. European Journal of Cell Biology 93: 87-97.
- Bartoli, M., A. Monneron and D. Ladant**, 1998 Interaction of calmodulin with striatin, a WD-repeat protein present in neuronal dendritic spines. J Biol Chem 273: 22248-22253.
- Baumann, S., T. Pohlmann, M. Jungbluth, A. Brachmann and M. Feldbrügge**, 2012 Kinesin-3 and dynein mediate microtubule-dependent co-transport of mRNPs and endosomes. J Cell Sci 125: 2740-2752.

- Baxter, B. K., P. James, T. Evans and E. A. Craig**, 1996 SSI1 encodes a novel Hsp70 of the *Saccharomyces cerevisiae* endoplasmic reticulum. *Molecular and cellular biology*.
- Bechinger, C., K.-F. Giebel, M. Schnell, P. Leiderer, H. B. Deising et al.**, 1999 Optical measurements of invasive forces exerted by appressoria of a plant pathogenic fungus. *Science* 285: 1896-1899.
- Becht, P., J. König and M. Feldbrügge**, 2006 The RNA-binding protein Rrm4 is essential for polarity in *Ustilago maydis* and shuttles along microtubules. *Journal of cell science* 119: 4964-4973.
- Begerow, D., M. Stoll and R. Bauer**, 2006 A phylogenetic hypothesis of Ustilaginomycotina based on multiple gene analyses and morphological data. *Mycologia* 98: 906-916.
- Beier, A., I. Teichert, C. Krisp, D. A. Wolters and U. Kück**, 2016 Catalytic Subunit 1 of Protein Phosphatase 2A Is a Subunit of the STRIPAK Complex and Governs Fungal Sexual Development. *MBio* 7.
- Berg, T., T. Gjoen and O. Bakke**, 1995 Physiological functions of endosomal proteolysis. *Biochem J* 307 ( Pt 2): 313-326.
- Bernhards, Y., and S. Pöggeler**, 2011 The phocein homologue SmMOB3 is essential for vegetative cell fusion and sexual development in the filamentous ascomycete *Sordaria macrospora*. *Curr Genet* 57: 133-149.
- Bielska, E., M. Schuster, Y. Roger, A. Berepiki, D. M. Soanes et al.**, 2014 Hook is an adapter that coordinates kinesin-3 and dynein cargo attachment on early endosomes. *J Cell Biol* 204: 989-1007.
- Bitar, D., O. Lortholary, Y. Le Strat, J. Nicolau, B. Coignard et al.**, 2014 Population-based analysis of invasive fungal infections, France, 2001–2010. *Emerging infectious diseases* 20: 1149.
- Bloemendal, S., Y. Bernhards, K. Bartho, A. Dettmann, O. Voigt et al.**, 2012 A homologue of the human STRIPAK complex controls sexual development in fungi. *Mol Microbiol* 84: 310-323.
- Bloemendal, S., K. M. Lord, C. Rech, B. Hoff, I. Engh et al.**, 2010 A mutant defective in sexual development produces aseptate ascogonia. *Eukaryot Cell* 9: 1856-1866.

- Böhmer, C., M. Böhmer, M. Bölker and B. Sandrock**, 2008 Cdc42 and the Ste20-like kinase Don3 act independently in triggering cytokinesis in *Ustilago maydis*. J Cell Sci 121: 143-148.
- Böhmer, C., C. Ripp and M. Bölker**, 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.
- Bölker, M.**, 2001 *Ustilago maydis* - a valuable model system for the study of fungal dimorphism and virulence. Microbiology 147: 1395-1401.
- Bölker, M., S. Genin, C. Lehmler and R. Kahmann**, 1995 Genetic regulation of mating and dimorphism in *Ustilago maydis*. Canadian journal of botany 73: 320-325.
- Bölker, M., M. Urban and R. Kahmann**, 1992 The a mating type locus of *U. maydis* specifies cell signaling components. Cell 68: 441-450.
- Bonangelino, C. J., E. M. Chavez and J. S. Bonifacio**, 2002 Genomic screen for vacuolar protein sorting genes in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol Biol Cell 13: 2486-2501.
- Bortfeld, M., K. Auffarth, R. Kahmann and C. W. Basse**, 2004 The *Ustilago maydis* a2 mating-type locus genes lga2 and rga2 compromise pathogenicity in the absence of the mitochondrial p32 family protein Mrb1. Plant Cell 16: 2233-2248.
- Bottin, A., J. Kamper and R. Kahmann**, 1996 Isolation of a carbon source-regulated gene from *Ustilago maydis*. Mol Gen Genet 253: 342-352.
- Böttinger, L., S. Oeljeklaus, B. Guiard, S. Rospert, B. Warscheid et al.**, 2015 Mitochondrial Heat Shock Protein (Hsp) 70 and Hsp10 Cooperate in the Formation of Hsp60 Complexes <sup>\*</sup> </sup>. Journal of Biological Chemistry 290: 11611-11622.
- Brachmann, A., J. König, C. Julius and M. Feldbrugge**, 2004 A reverse genetic approach for generating gene replacement mutants in *Ustilago maydis*. Mol Genet Genomics 272: 216-226.
- Brachmann, A., J. Schirawski, P. Müller and R. Kahmann**, 2003 An unusual MAP kinase is required for efficient penetration of the plant surface by *Ustilago maydis*. EMBO J 22: 2199-2210.
- Brachmann, A., G. Weinzierl, J. Kamper and R. Kahmann**, 2001 Identification of genes in the bW/bE regulatory cascade in *Ustilago maydis*. Mol Microbiol 42: 1047-1063.

- Brefort, T., G. Doehlemann, A. Mendoza-Mendoza, S. Reissmann, A. Djamei et al.**, 2009 *Ustilago maydis* as a pathogen. Annual review of phytopathology 47: 423-445.
- Burd, C. G., M. Babst and S. D. Emr**, 1998 Novel pathways, membrane coats and PI kinase regulation in yeast lysosomal trafficking. Semin Cell Dev Biol 9: 527-533.
- Byers, J. T., R. M. Guzzo, M. Salih and B. S. Tuana**, 2009 Hydrophobic profiles of the tail anchors in SLMAP dictate subcellular targeting. BMC Cell Biol 10: 48.
- Cabrera, M., H. Arlt, N. Epp, J. Lachmann, J. Griffith et al.**, 2013a Functional Separation of Endosomal Fusion Factors and the Class C Core Vacuole/Endosome Tethering (CORVET) Complex in Endosome Biogenesis. Journal of Biological Chemistry 288: 5166-5175.
- Cabrera, M., H. Arlt, N. Epp, J. Lachmann, J. Griffith et al.**, 2013b Functional separation of endosomal fusion factors and the class C core vacuole/endosome tethering (CORVET) complex in endosome biogenesis. The Journal of biological chemistry 288: 5166-5175.
- Carlson, M., B. C. Osmond and D. Botstein**, 1981 Mutants of yeast defective in sucrose utilization. Genetics 98: 25-40.
- Castets, F., M. Bartoli, J. V. Barnier, G. Baillat, P. Salin et al.**, 1996 A novel calmodulin-binding protein, belonging to the WD-repeat family, is localized in dendrites of a subset of CNS neurons. Journal of Cell Biology 134: 1051-1062.
- Chang, F., and I. Herskowitz**, 1990 Identification of a gene necessary for cell cycle arrest by a negative growth factor of yeast: FAR1 is an inhibitor of a G1 cyclin, CLN2. Cell 63: 999-1011.
- Chant, J.**, 1999 Cell polarity in yeast. Annu Rev Cell Dev Biol 15: 365-391.
- Chavrier, P., J.-P. Gorvel, E. Stelzer, K. Simons, J. Gruenberg et al.**, 1991 Hypervariable C-terminal domain of rab proteins acts as a targeting signal. Nature 353: 769-772.
- Chen, C., Z. Shi, W. Zhang, M. Chen, F. He et al.**, 2014 Striatins contain a noncanonical coiled coil that binds protein phosphatase 2A A subunit to form a 2:2 heterotetrameric core of striatin-interacting phosphatase and kinase (STRIPAK) complex. J Biol Chem 289: 9651-9661.
- Chiolo, I., W. Carotenuto, G. Maffioletti, J. H. Petrini, M. Foiani et al.**, 2005 Srs2 and Sgs1 DNA helicases associate with Mre11 in different subcomplexes following checkpoint activation and CDK1-mediated Srs2 phosphorylation. Mol Cell Biol 25: 5738-5751.

- Christensen, J. J.**, 1963 Corn smut caused by *Ustilago maydis*. Monographs. American Phytopathology Society 2.
- Chung, K.-T., and J.-K. Liu**, 2017 *Pioneers in microbiology: the human side of science*. World Scientific.
- Cohen, S. N., A. C. Chang and L. Hsu**, 1972 Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. Proc Natl Acad Sci U S A 69: 2110-2114.
- Conibear, E., and T. H. Stevens**, 1998 Multiple sorting pathways between the late Golgi and the vacuole in yeast. Biochim Biophys Acta 1404: 211-230.
- Cowles, C. R., W. B. Snyder, C. G. Burd and S. D. Emr**, 1997 Novel Golgi to vacuole delivery pathway in yeast: identification of a sorting determinant and required transport component. EMBO J 16: 2769-2782.
- Crampin, H., K. Finley, M. Gerami-Nejad, H. Court, C. Gale et al.**, 2005 *Candida albicans* hyphae have a Spitzenkorper that is distinct from the polarisome found in yeast and pseudohyphae. J Cell Sci 118: 2935-2947.
- Craven, R. A., M. Egerton and C. J. Stirling**, 1996 A novel Hsp70 of the yeast ER lumen is required for the efficient translocation of a number of protein precursors. The EMBO journal 15: 2640-2650.
- Cvrcková, F., C. De Virgilio, E. Manser, J. R. Pringle and K. Nasmyth**, 1995 Ste20-like protein kinases are required for normal localization of cell growth and for cytokinesis in budding yeast. Genes Dev 9: 1817-1830.
- Cybulski, N., and M. N. Hall**, 2009 TOR complex 2: a signaling pathway of its own. Trends in biochemical sciences 34: 620-627.
- Danino, D., K.-H. Moon and J. E. Hinshaw**, 2004 Rapid constriction of lipid bilayers by the mechanochemical enzyme dynamin. Journal of Structural Biology 147: 259-267.
- Davey, H. M., and P. Hexley**, 2011 Red but not dead? Membranes of stressed *Saccharomyces cerevisiae* are permeable to propidium iodide. Environ Microbiol 13: 163-171.
- de la Torre, A., M. Jurca, K. Hoffmann, L. Schmitz, K. Heimel et al.**, 2021 Robust Cre recombinase activity in the biotrophic smut fungus *Ustilago maydis* enables efficient conditional null mutants in planta. Genetics.



- Dean, R., J. A. Van Kan, Z. A. Pretorius, K. E. Hammond - Kosack, A. Di Pietro et al.**, 2012 The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular plant pathology* 13: 414-430.
- Dekhang, R., C. Wu, K. M. Smith, T. M. Lamb, M. Peterson et al.**, 2017 The Neurospora Transcription Factor ADV-1 Transduces Light Signals and Temporal Information to Control Rhythmic Expression of Genes Involved in Cell Fusion. *G3 (Bethesda)* 7: 129-142.
- Delpire, E.**, 2009 The mammalian family of sterile 20p-like protein kinases. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* 458: 953-967.
- Demerec, M., E. A. Adelberg, A. J. Clark and P. E. Hartman**, 1966 A proposal for a uniform nomenclature in bacterial genetics. *Genetics* 54: 61-76.
- Dennig, J.**, 2020 Funktionelle Untersuchung des STRIPAK-Komplexes in *Ustilago maydis*. im Fakultät für Chemie und Biowissenschaften, Karlsruher Institut für Technologie (KIT), Karlsruhe.
- Dettmann, A., Y. Heilig, S. Ludwig, K. Schmitt, J. Illgen et al.**, 2013 HAM-2 and HAM-3 are central for the assembly of the Neurospora STRIPAK complex at the nuclear envelope and regulate nuclear accumulation of the MAP kinase MAK-1 in a MAK-2-dependent manner. *Mol Microbiol* 90: 796-812.
- Dettmann, A., Y. Heilig, O. Valerius, S. Ludwig and S. Seiler**, 2014 Fungal communication requires the MAK-2 pathway elements STE-20 and RAS-2, the NRC-1 adapter STE-50 and the MAP kinase scaffold HAM-5. *PLoS Genet* 10: e1004762.
- Dettmann, A., J. Illgen, S. Marz, T. Schurg, A. Fleissner et al.**, 2012 The NDR kinase scaffold HYM1/MO25 is essential for MAK2 map kinase signaling in *Neurospora crassa*. *PLoS Genet* 8: e1002950.
- Doebley, J.**, 1992 Mapping the genes that made maize. *Trends Genet* 8: 302-307.
- Doehlemann, G., S. Reissmann, D. Assmann, M. Fleckenstein and R. Kahmann**, 2011 Two linked genes encoding a secreted effector and a membrane protein are essential for *Ustilago maydis*-induced tumour formation. *Mol Microbiol* 81: 751-766.
- Doenecke, D. K., Jan; Fuchs, Georg; Gerok, Wolfgang**, 2005 *Karlsons Biochemie und Pathobiochemie*. Thieme-Verlag, Stuttgart - New York.
- Donaldson, M. E., and B. J. Saville**, 2008 Bioinformatic identification of *Ustilago maydis* meiosis genes. *Fungal genetics and biology* 45: S47-S53.

- Eby, J. J., S. P. Holly, F. Van Drogen, A. V. Grishin, M. Peter et al.**, 1998 Actin cytoskeleton organization regulated by the PAK family of protein kinases. *Current biology* 8: S1.
- Egan, J. D., M. D. García-Pedrajas, D. L. Andrews and S. E. Gold**, 2009 Calcineurin Is an Antagonist to PKA Protein Phosphorylation Required for Postmating Filamentation and Virulence, While PP2A Is Required for Viability in *Ustilago maydis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*® 22: 1293-1301.
- Elion, E. A.**, 2000 Pheromone response, mating and cell biology. *Curr Opin Microbiol* 3: 573-581.
- Elion, E. A., B. Satterberg and J. E. Kranz**, 1993 FUS3 phosphorylates multiple components of the mating signal transduction cascade: evidence for STE12 and FAR1. *Mol Biol Cell* 4: 495-510.
- Eramli, N., B. Karahoda, Ö. Sarikaya-Bayram, D. Frawley, M. Ulas et al.**, 2019 Assembly of a heptameric STRIPAK complex is required for coordination of light-dependent multicellular fungal development with secondary metabolism in *Aspergillus nidulans*. *PLoS Genet* 15: e1008053.
- Engh, I., M. Nowrousian and U. Kuck**, 2010 *Sordaria macrospora*, a model organism to study fungal cellular development. *Eur J Cell Biol* 89: 864-872.
- Fairlamb, A. H., N. A. Gow, K. R. Matthews and A. P. Waters**, 2016 Drug resistance in eukaryotic microorganisms. *Nature microbiology* 1: 1-15.
- Farfsing, J. W., K. Auffarth and C. W. Basse**, 2005 Identification of cis-active elements in *Ustilago maydis* mig2 promoters conferring high-level activity during pathogenic growth in maize. *Molecular plant-microbe interactions* 18: 75-87.
- Fedler, M., K. S. Luh, K. Stelter, F. Nieto-Jacobo and C. W. Basse**, 2009 The a2 mating-type locus genes lga2 and rga2 direct uniparental mitochondrial DNA (mtDNA) inheritance and constrain mtDNA recombination during sexual development of *Ustilago maydis*. *Genetics* 181: 847-860.
- Feldbrügge, M., J. Kämper, G. Steinberg and R. Kahmann**, 2004 Regulation of mating and pathogenic development in *Ustilago maydis*. *Curr Opin Microbiol* 7: 666-672.
- Ferguson, S. M., A. Raimondi, S. Paradise, H. Shen, K. Mesaki et al.**, 2009 Coordinated actions of actin and BAR proteins upstream of dynamin at endocytic clathrin-coated pits. *Dev Cell* 17: 811-822.

- Fischer, M. S., and N. L. Glass**, 2019 Communicate and Fuse: How Filamentous Fungi Establish and Maintain an Interconnected Mycelial Network. *Frontiers in Microbiology* 10.
- Fischer, M. S., V. W. Wu, J. E. Lee, R. C. O'Malley and N. L. Glass**, 2018 Regulation of Cell-to-Cell Communication and Cell Wall Integrity by a Network of MAP Kinase Pathways and Transcription Factors in *Neurospora crassa*. *Genetics* 209: 489-506.
- Fisher, M. C., D. Henk, C. J. Briggs, J. S. Brownstein, L. C. Madoff et al.**, 2012 Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. *Nature* 484: 186-194.
- Fleißner, A., and S. Herzog**, 2016 Signal exchange and integration during self-fusion in filamentous fungi. *Semin Cell Dev Biol* 57: 76-83.
- Fleißner, A., A. C. Leeder, M. G. Roca, N. D. Read and N. L. Glass**, 2009 Oscillatory recruitment of signaling proteins to cell tips promotes coordinated behavior during cell fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 19387-19392.
- Fleißner, A., A. R. Simonin and N. L. Glass**, 2008 Cell fusion in the filamentous fungus, *Neurospora crassa*. *Methods Mol Biol* 475: 21-38.
- Flor-Parra, I., M. Vranes, J. Kamper and J. Perez-Martin**, 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.
- Forgac, M.**, 1992 Structure and properties of the coated vesicle (H<sup>+</sup>)-ATPase. *J Bioenerg Biomembr* 24: 341-350.
- Fortenbacher, J.**, 2019 Charakterisierung des Proteinkomplexes Clp1 mit bE/bW und seine Auswirkung auf die pathogene Entwicklung in *Ustilago maydis*. im Fakultät für Chemie und Biowissenschaften, Karlsruher Institut für Technologie (KIT), Karlsruhe.
- Frey, S., E. J. Reschka and S. Poggeler**, 2015 Germinal Center Kinases SmKIN3 and SmKIN24 Are Associated with the *Sordaria macrospora* Striatin-Interacting Phosphatase and Kinase (STRIPAK) Complex. *PLoS One* 10: e0139163.
- Frieser, S. H., A. Hlubek, B. Sandrock and M. Bölker**, 2011 Cla4 kinase triggers destruction of the Rac1-GEF Cdc24 during polarized growth in *Ustilago maydis*. *Molecular Biology of the Cell* 22: 3253-3262.
- Frost, A., Marc G. Elgort, O. Brandman, C. Ives, Sean R. Collins et al.**, 2012 Functional Repurposing Revealed by Comparing *S. pombe* and *S. cerevisiae* Genetic Interactions. *Cell* 149: 1339-1352.

- Fu, C., P. Iyer, A. Herkal, J. Abdullah, A. Stout et al.**, 2011 Identification and characterization of genes required for cell-to-cell fusion in *Neurospora crassa*. Eukaryot Cell 10: 1100-1109.
- Fuchs, U., and G. Steinberg**, 2005 Endocytosis in the plant-pathogenic fungus *Ustilago maydis*. Protoplasma 226: 75-80.
- Furuno, N., N. Den Elzen and J. Pines**, 1999 Human cyclin A is required for mitosis until mid prophase. The Journal of cell biology 147: 295-306.
- Garcia-Muse, T., G. Steinberg and J. Perez-Martin**, 2003 Pheromone-induced G2 arrest in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. Eukaryot Cell 2: 494-500.
- García-Muse, T., G. Steinberg and J. Pérez-Martín**, 2004 Characterization of B-type cyclins in the smut fungus *Ustilago maydis*: roles in morphogenesis and pathogenicity. Journal of cell science 117: 487-506.
- Garcia-Solache, M. A., and A. Casadevall**, 2010 Global warming will bring new fungal diseases for mammals. MBio 1: e00061-00010.
- Gavin, A. C., M. Bosche, R. Krause, P. Grandi, M. Marzioch et al.**, 2002 Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. Nature 415: 141-147.
- Geli, M. I., and H. Riezman**, 1998 Endocytic internalization in yeast and animal cells: similar and different. J Cell Sci 111 ( Pt 8): 1031-1037.
- Geuze, H. J., J. W. Slot, G. J. Strous, H. F. Lodish and A. L. Schwartz**, 1983 Intracellular site of asialoglycoprotein receptor-ligand uncoupling: double-label immunoelectron microscopy during receptor-mediated endocytosis. Cell 32: 277-287.
- Gibson, D. G., L. Young, R. Y. Chuang, J. C. Venter, C. A. Hutchison, 3rd et al.**, 2009 Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. Nat Methods 6: 343-345.
- Gillissen, B., J. Bergemann, C. Sandmann, B. Schroeer, M. Bölker et al.**, 1992 A two-component regulatory system for self/non-self recognition in *Ustilago maydis*. Cell 68: 647-657.
- Girstmair, H., F. Tippel, A. Lopez, K. Tych, F. Stein et al.**, 2019 The Hsp90 isoforms from *S. cerevisiae* differ in structure, function and client range. Nat Commun 10: 3626.

- Gold, S. E., G. Bakkeren, J. E. Davies and J. W. Kronstad**, 1994 Three selectable markers for transformation of *Ustilago maydis*. *Gene* 142: 225-230.
- Goos, S.**, 2009 Zuckerverwertung während der biotrophen Phase von *Ustilago maydis*. im Fachbereich Biologie, Philipps-Universität Marburg, Marburg/Lahn.
- Goryachev, A. B., A. Lichius, G. D. Wright and N. D. Read**, 2012 Excitable behavior can explain the "ping-pong" mode of communication between cells using the same chemoattractant. *Bioessays* 34: 259-266.
- Goudreault, M., L. M. D'Ambrosio, M. J. Kean, M. J. Mullin, B. G. Larsen et al.**, 2009 A PP2A phosphatase high density interaction network identifies a novel striatin-interacting phosphatase and kinase complex linked to the cerebral cavernous malformation 3 (CCM3) protein. *Mol Cell Proteomics* 8: 157-171.
- Goulet, K. M., and B. J. Saville**, 2017 Carbon acquisition and metabolism changes during fungal biotrophic plant pathogenesis: insights from *Ustilago maydis*. *Canadian Journal of Plant Pathology* 39: 247-266.
- Green, K. A., Y. Becker, H. L. Fitzsimons and B. Scott**, 2016 An *Epichloë festucae* homologue of MOB3, a component of the STRIPAK complex, is required for the establishment of a mutualistic symbiotic interaction with *Lolium perenne*. *Molecular plant pathology* 17: 1480-1492.
- Grosshans, B. L., D. Ortiz and P. Novick**, 2006 Rabs and their effectors: achieving specificity in membrane traffic. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 11821-11827.
- Grove, S. N., and C. E. Bracker**, 1970 Protoplasmic organization of hyphal tips among fungi: vesicles and Spitzenkorper. *J Bacteriol* 104: 989-1009.
- Haag, C., T. Pohlmann and M. Feldbrügge**, 2017 The ESCRT regulator Did2 maintains the balance between long-distance endosomal transport and endocytic trafficking. *PLOS Genetics* 13: e1006734.
- Hamilton, T. G., and G. C. Flynn**, 1996 Cer1p, a novel Hsp70-related protein required for posttranslational endoplasmic reticulum translocation in yeast. *Journal of Biological Chemistry* 271: 30610-30613.
- Harris, S. D., L. Hamer, K. E. Sharpless and J. E. Hamer**, 1997 The *Aspergillus nidulans* sepA gene encodes an FH1/2 protein involved in cytokinesis and the maintenance of cellular polarity. *Embo j* 16: 3474-3483.
- Hartmann, A.**, 1997 Die Pheromonantwort in *Ustilago maydis*: Kontrolle von Zellfusion und Pathogenität. im Max Planck Institut für terrestrische Mikrobiologie, Ludwig-Maximilians-Universität, München.

- Hartmann, H. A., R. Kahmann and M. Bolker**, 1996 The pheromone response factor coordinates filamentous growth and pathogenicity in *Ustilago maydis*. *EMBO J* 15: 1632-1641.
- Hartmann, H. A., J. Krüger, F. Lottspeich and R. Kahmann**, 1999 Environmental signals controlling sexual development of the corn Smut fungus *Ustilago maydis* through the transcriptional regulator Prf1. *Plant Cell* 11: 1293-1306.
- Heilig, Y., A. Dettmann, R. R. Mourino-Perez, K. Schmitt, O. Valerius et al.**, 2014 Proper actin ring formation and septum constriction requires coordinated regulation of SIN and MOR pathways through the germinal centre kinase MST-1. *PLoS Genet* 10: e1004306.
- Heimel, K., J. Freitag, M. Hampel, J. Ast, M. Bölker et al.**, 2013 Crosstalk between the Unfolded Protein Response and Pathways That Regulate Pathogenic Development in *Ustilago maydis* *The Plant Cell* 25: 4262-4277.
- Heimel, K., M. Scherer, M. Vranes, R. Wahl, C. Pothiratana 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.
- Helenius, A., I. Mellman, D. Wall and A. Hubbard**, 1983 Endosomes. *Trends in Biochem Sci* 8: 245-250.
- Herzog, S., M. R. Schumann and A. Fleissner**, 2015 Cell fusion in *Neurospora crassa*. *Curr Opin Microbiol* 28: 53-59.
- Hickey, P. C., D. Jacobson, N. D. Read and N. L. Glass**, 2002 Live-cell imaging of vegetative hyphal fusion in *Neurospora crassa*. *Fungal Genet Biol* 37: 109-119.
- Ho, Y., A. Gruhler, A. Heilbut, G. D. Bader, L. Moore et al.**, 2002 Systematic identification of protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae* by mass spectrometry. *Nature* 415: 180-183.
- Holliday, R.**, 1974 *Ustilago maydis*, pp. 575-595 in *Bacteria, Bacteriophages, and Fungi: Volume 1*, edited by R. C. King. Springer US, Boston, MA.
- Holly, S. P., and K. J. Blumer**, 1999 PAK-family kinases regulate cell and actin polarization throughout the cell cycle of *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of cell biology* 147: 845-856.
- Horecka, J., and G. F. Sprague, Jr.**, 1996 Identification and characterization of FAR3, a gene required for pheromone-mediated G1 arrest in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 144: 905-921.

- Hsueh, Y. P., and J. Heitman**, 2008 Orchestration of sexual reproduction and virulence by the fungal mating-type locus. *Curr Opin Microbiol* 11: 517-524.
- Huang, J., T. Liu, L. G. Xu, D. Chen, Z. Zhai *et al.***, 2005 SIKE is an IKK epsilon/TBK1-associated suppressor of TLR3- and virus-triggered IRF-3 activation pathways. *EMBO J* 24: 4018-4028.
- Hwang, J., and D. C. Pallas**, 2014 STRIPAK complexes: Structure, biological function, and involvement in human diseases. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 47: 118-148.
- Innokentev, A., K. Furukawa, T. Fukuda, T. Saigusa, K. Inoue *et al.***, 2020 Association and dissociation between the mitochondrial Far complex and Atg32 regulate mitophagy. *eLife* 9: e63694.
- Ito, T., T. Chiba, R. Ozawa, M. Yoshida, M. Hattori *et al.***, 2001 A comprehensive two-hybrid analysis to explore the yeast protein interactome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 4569-4574.
- Itzen, A., and R. S. Goody**, 2011 GTPases involved in vesicular trafficking: Structures and mechanisms. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 22: 48-56.
- Jaffe, A. B., and A. Hall**, 2005 Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21: 247-269.
- Jensen, R. H.**, 2016 Resistance in human pathogenic yeasts and filamentous fungi: prevalence, underlying molecular mechanisms and link to the use of antifungals in humans and the environment. *Dan Med J* 63: 1-34.
- Johnson, D. I., and J. R. Pringle**, 1990 Molecular characterization of CDC42, a *Saccharomyces cerevisiae* gene involved in the development of cell polarity. *J Cell Biol* 111: 143-152.
- Jonkers, W., A. C. Leeder, C. Ansong, Y. Wang, F. Yang *et al.***, 2014 HAM-5 functions as a MAP kinase scaffold during cell fusion in *Neurospora crassa*. *PLoS Genet* 10: e1004783.
- Jurca, M.**, 2021 Die Charakterisierung des Transkriptionsfaktors Hdp2 und dessen Rolle in der biotrophen Phase von *Ustilago maydis*. im Fakultät für Chemie und Biowissenschaften, Karlsruher Institut für Technologie (KIT), Karlsruhe.
- Kadota, J., T. Yamamoto, S. Yoshiuchi, E. Bi and K. Tanaka**, 2004 Septin ring assembly requires concerted action of polarisome components, a PAK kinase Cla4p, and the actin cytoskeleton in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 15: 5329-5345.

- Kaffarnik, F., P. Muller, M. Leibundgut, R. Kahmann and M. Feldbrugge**, 2003 PKA and MAPK phosphorylation of Prf1 allows promoter discrimination in *Ustilago maydis*. EMBO J 22: 5817-5826.
- Kahmann, R., and J. Kämper**, 2004 *Ustilago maydis*: how its biology relates to pathogenic development. New Phytologist 164: 31-42.
- Kahmann, R., G. Steinberg, C. Basse, M. Feldbrügge and J. Kämper**, 2000 *Ustilago maydis*, the causative agent of corn smut disease, pp. 347-371 in *Fungal Pathology*. Springer.
- Kalthoff, C., J. Alves, C. Urbanke, R. Knorr and E. J. Ungewickell**, 2002 Unusual Structural Organization of the Endocytic Proteins AP180 and Epsin 1\*. Journal of Biological Chemistry 277: 8209-8216.
- Kamada, T.**, 2002 Molecular genetics of sexual development in the mushroom *Coprinus cinereus*. Bioessays 24: 449-459.
- Kämper, J.**, 2004 A PCR-based system for highly efficient generation of gene replacement mutants in *Ustilago maydis*. Mol Genet Genomics 271: 103-110.
- Kämper, J., M. W. Friedrich and R. Kahmann**, 2020 Creating novel specificities in a fungal nonself recognition system by single step homologous recombination events. New Phytologist 228: 1001-1010.
- Kämper, J., R. Kahmann, M. Bolker, L. J. Ma, T. Brefort et al.**, 2006 Insights from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen *Ustilago maydis*. Nature 444: 97-101.
- Kämper, J., M. Reichmann, T. Romeis, M. Bolker and R. Kahmann**, 1995 Multiallelic recognition: nonself-dependent dimerization of the bE and bW homeodomain proteins in *Ustilago maydis*. Cell 81: 73-83.
- Kean, M. J., D. F. Ceccarelli, M. Goudreault, M. Sanches, S. Tate et al.**, 2011 Structure-Function Analysis of Core STRIPAK Proteins: A SIGNALING COMPLEX IMPLICATED IN GOLGI POLARIZATION \*<sup><sup></sup>. Journal of Biological Chemistry 286: 25065-25075.</sup>
- Kemp, H. A., and J. Sprague, George F.**, 2003 Far3 and Five Interacting Proteins Prevent Premature Recovery from Pheromone Arrest in the Budding Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Mol Cell Biol 23: 1750-1763.
- Keon, J. P., G. A. White and J. A. Hargreaves**, 1991 Isolation, characterization and sequence of a gene conferring resistance to the systemic fungicide carboxin from the maize smut pathogen, *Ustilago maydis*. Curr Genet 19: 475-481.



- Khrunyk, Y., K. Münch, K. Schipper, A. N. Lupas and R. Kahmann**, 2010 The use of FLP - mediated recombination for the functional analysis of an effector gene family in the biotrophic smut fungus *Ustilago maydis*. *New Phytologist* 187: 957-968.
- Kim, H., and K. A. Borkovich**, 2004 A pheromone receptor gene, pre-1, is essential for mating type-specific directional growth and fusion of trichogynes and female fertility in *Neurospora crassa*. *Mol Microbiol* 52: 1781-1798.
- Kim, H., and K. A. Borkovich**, 2006 Pheromones are essential for male fertility and sufficient to direct chemotropic polarized growth of trichogynes during mating in *Neurospora crassa*. *Eukaryot Cell* 5: 544-554.
- Koga, H., and O. Nakayachi**, 2004 Morphological studies on attachment of spores of *Magnaporthe grisea* to the leaf surface of rice. *Journal of General Plant Pathology* 70: 11-15.
- Kohlwein, S. D., S. Eder, C. S. Oh, C. E. Martin, K. Gable et al.**, 2001 Tsc13p is required for fatty acid elongation and localizes to a novel structure at the nuclear-vacuolar interface in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 21: 109-125.
- Kojic, M., and W. K. Holloman**, 2000 Shuttle vectors for genetic manipulations in *Ustilago maydis*. *Can J Microbiol* 46: 333-338.
- Kolhe, J. A., N. L. Babu and B. C. Freeman**, 2023 The Hsp90 molecular chaperone governs client proteins by targeting intrinsically disordered regions. *Mol Cell* 83: 2035-2044.e2037.
- Kornfeld, S., and I. Mellman**, 1989 The biogenesis of lysosomes. *Annu Rev Cell Biol* 5: 483-525.
- Kothe, E.**, 1996 Tetrapolar fungal mating types: sexes by the thousands. *FEMS Microbiol Rev* 18: 65-87.
- Kristan, K., and T. L. Rižner**, 2012 Steroid-transforming enzymes in fungi. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 129: 79-91.
- Kronstad, J. W., and S. A. Leong**, 1990 The b mating-type locus of *Ustilago maydis* contains variable and constant regions. *Genes Dev* 4: 1384-1395.
- Kück, U., A. M. Beier and I. Teichert**, 2016 The composition and function of the striatin-interacting phosphatases and kinases (STRIPAK) complex in fungi. *Fungal Genet Biol* 90: 31-38.

- Kurz, W. G., and L.-E. Ericson**, 1962 Microbial production of amino acids. II. The influence of carbon and nitrogen sources and metal ions on growth of *Ustilago maydis* (DC.) Cda. and on lysine and threonine production. *Biotechnology and Bioengineering* 4: 37-52.
- Kwon-Chung, K. J., J. A. Fraser, T. L. Doering, Z. A. Wang, G. Janbon et al.**, 2014 *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*, the etiologic agents of cryptococcosis. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 4: a019760.
- Kyriakis, J. M.**, 1999 Signaling by the Germinal Center Kinase Family of Protein Kinases \*. *Journal of Biological Chemistry* 274: 5259-5262.
- Laemmli, U. K.**, 1970 Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lai, F., R. Wu, J. Wang, C. Li, L. Zou et al.**, 2011 Far3p domains involved in the interactions of Far proteins and pheromone-induced cell cycle arrest in budding yeast. *FEMS Yeast Res* 11: 72-79.
- Lanver, D., P. Berndt, M. Tollot, V. Naik, M. Vranes et al.**, 2014 Plant surface cues prime *Ustilago maydis* for biotrophic development. *PLoS Pathog* 10: e1004272.
- Latgé, J.-P., and G. Chamilos**, 2019 *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis in 2019. *Clinical microbiology reviews* 33: e00140-00118.
- Leberer, E., D. Dignard, D. Harcus, D. Y. Thomas and M. Whiteway**, 1992 The protein kinase homologue Ste20p is required to link the yeast pheromone response G-protein beta gamma subunits to downstream signalling components. *EMBO J* 11: 4815-4824.
- Leeder, A. C., W. Jonkers, J. Li and N. L. Glass**, 2013 Early colony establishment in *Neurospora crassa* requires a MAP kinase regulatory network. *Genetics* 195: 883-898.
- Leng, G., and K. Song**, 2016 Direct interaction of Ste11 and Mkk1/2 through Nst1 integrates high-osmolarity glycerol and pheromone pathways to the cell wall integrity MAPK pathway. *FEBS Lett* 590: 148-160.
- Lengeler, K. B., R. C. Davidson, C. D'souza, T. Harashima, W.-C. Shen et al.**, 2000 Signal transduction cascades regulating fungal development and virulence. *Microbiology and molecular biology reviews* 64: 746-785.
- Leveleki, L., M. Mahlert, B. Sandrock and M. Bolker**, 2004 The PAK family kinase Cla4 is required for budding and morphogenesis in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol* 54: 396-406.

- Lichius, A., A. B. Goryachev, M. D. Fricker, B. Obara, E. Castro-Longoria et al.**, 2014 CDC-42 and RAC-1 regulate opposite chemotropisms in *Neurospora crassa*. *Journal of Cell Science* 127: 1953-1965.
- Lin, A., A. Hokugo, J. Choi and I. Nishimura**, 2010 Small cytoskeleton-associated molecule, fibroblast growth factor receptor 1 oncogene partner 2/wound inducible transcript-3.0 (FGFR1OP2/wit3.0), facilitates fibroblast-driven wound closure. *Am J Pathol* 176: 108-121.
- Lin, C. H., J. A. MacGurn, T. Chu, C. J. Stefan and S. D. Emr**, 2008 Arrestin-related ubiquitin-ligase adaptors regulate endocytosis and protein turnover at the cell surface. *Cell* 135: 714-725.
- Liu, H., C. A. Styles and G. R. Fink**, 1993 Elements of the yeast pheromone response pathway required for filamentous growth of diploids. *Science* 262: 1741-1744.
- Liu, J., M. Kaksonen, D. G. Drubin and G. Oster**, 2006 Endocytic vesicle scission by lipid phase boundary forces. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103: 10277-10282.
- Low, C.-Y., and C. Rotstein**, 2011 Emerging fungal infections in immunocompromised patients. *F1000 medicine reports* 3.
- Lukesh, J. C., III, M. J. Palte and R. T. Raines**, 2012 A Potent, Versatile Disulfide-Reducing Agent from Aspartic Acid. *Journal of the American Chemical Society* 134: 4057-4059.
- Luzio, J. P., N. A. Bright and P. R. Pryor**, 2007 The role of calcium and other ions in sorting and delivery in the late endocytic pathway. *Biochem Soc Trans* 35: 1088-1091.
- Maddi, A., A. Dettman, C. Fu, S. Seiler and S. J. Free**, 2012 WSC-1 and HAM-7 are MAK-1 MAP kinase pathway sensors required for cell wall integrity and hyphal fusion in *Neurospora crassa*. *PLoS One* 7: e42374.
- Madhani, H. D., and G. R. Fink**, 1998 The control of filamentous differentiation and virulence in fungi. *Trends in cell biology* 8: 348-353.
- Maerz, S., A. Dettmann, C. Ziv, Y. Liu, O. Valerius et al.**, 2009 Two NDR kinase-MOB complexes function as distinct modules during septum formation and tip extension in *Neurospora crassa*. *Mol Microbiol* 74: 707-723.
- Mahlert, M.**, 2006 Charakterisierung kleiner G-Proteine der Ras- und Rho/Rac-Familie in *Ustilago maydis*: Zentrale Schalter in komplexen Netzwerken und ihr Einfluss auf die Organisation der Zellmorphologie.

- Mahlert, M., L. Leveleki, A. Hlubek, B. Sandrock and M. Bolker**, 2006 Rac1 and Cdc42 regulate hyphal growth and cytokinesis in the dimorphic fungus *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol* 59: 567-578.
- Mahlert, M., C. Vogler, K. Stelter, G. Hause and C. W. Basse**, 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.
- Manford, A. G., C. J. Stefan, H. L. Yuan, J. A. Macgurn and S. D. Emr**, 2012 ER-to-plasma membrane tethering proteins regulate cell signaling and ER morphology. *Dev Cell* 23: 1129-1140.
- Märker, R., B. Blank-Landeshammer, A. Beier-Rosberger, A. Sickmann and U. Kück**, 2020 Phosphoproteomic analysis of STRIPAK mutants identifies a conserved serine phosphorylation site in PAK kinase CLA4 to be important in fungal sexual development and polarized growth. *Molecular Microbiology* 113: 1053-1069.
- Martinez-Espinoza, A. D., M. D. Garcia-Pedrajas and S. E. Gold**, 2002 The Ustilaginales as plant pests and model systems. *Fungal Genet Biol* 35: 1-20.
- Matei, A., and G. Doehlemann**, 2016 Cell biology of corn smut disease - *Ustilago maydis* as a model for biotrophic interactions. *Current opinion in microbiology* 34: 60-66.
- Maxfield, F. R., and T. E. McGraw**, 2004 Endocytic recycling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5: 121-132.
- McCaffrey, G., F. J. Clay, K. Kelsay and G. F. Sprague, Jr.**, 1987 Identification and regulation of a gene required for cell fusion during mating of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 7: 2680-2690.
- McConnell, S. J., L. C. Stewart, A. Talin and M. P. Yaffe**, 1990 Temperature-sensitive yeast mutants defective in mitochondrial inheritance. *J Cell Biol* 111: 967-976.
- Mellman, I.**, 1996 Endocytosis and molecular sorting. *Annu Rev Cell Dev Biol* 12: 575-625.
- Mellman, I., R. Fuchs and A. Helenius**, 1986 Acidification of the endocytic and exocytic pathways. *Annu Rev Biochem* 55: 663-700.
- Mendenhall, M. D., and A. E. Hodge**, 1998 Regulation of Cdc28 cyclin-dependent protein kinase activity during the cell cycle of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* 62: 1191-1243.

- Mendenhall, M. D., C. A. Jones and S. I. Reed**, 1987 Dual regulation of the yeast CDC28-p40 protein kinase complex: cell cycle, pheromone, and nutrient limitation effects. *Cell* 50: 927-935.
- Mendoza - Mendoza, A., P. Berndt, A. Djamei, C. Weise, U. Linne et al.**, 2009 Physical - chemical plant - derived signals induce differentiation in *Ustilago maydis*. *Molecular microbiology* 71: 895-911.
- Mizuno-Yamasaki, E., F. Rivera-Molina and P. Novick**, 2012 GTPase networks in membrane traffic. *Annu Rev Biochem* 81: 637-659.
- Morbé, L.**, 2023 Untersuchung von Far11 als Teil des STRIPAKKomplexes in *Ustilago maydis*. im Fakultät für Chemie und Biowissenschaften, Karlsruher Institut für Technologie (KIT), Karlsruhe.
- Müller, P., G. Weinzierl, A. Brachmann, M. Feldbrügge and R. Kahmann**, 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.
- Mullins, C., and J. S. Bonifacino**, 2001 The molecular machinery for lysosome biogenesis. *Bioessays* 23: 333-343.
- Müntjes, K.**, persönliche Mitteilung.
- Musiałek, M. W., and D. Rybaczek**, 2021 Hydroxyurea—The Good, the Bad and the Ugly. *Genes* 12: 1096.
- Nern, A., and R. A. Arkowitz**, 2000 Nucleocytoplasmic shuttling of the Cdc42p exchange factor Cdc24p. *J Cell Biol* 148: 1115-1122.
- Nomoto, S., N. Nakayama, K. Arai and K. Matsumoto**, 1990 Regulation of the yeast pheromone response pathway by G protein subunits. *EMBO J* 9: 691-696.
- Nordzieke, S., T. Zobel, B. Franzel, D. A. Wolters, U. Kuck et al.**, 2015 A fungal sarcolemmal membrane-associated protein (SLMAP) homolog plays a fundamental role in development and localizes to the nuclear envelope, endoplasmic reticulum, and mitochondria. *Eukaryot Cell* 14: 345-358.
- Nucci, M., and K. A. Marr**, 2005 Emerging fungal diseases. *Clinical Infectious Diseases* 41: 521-526.
- O'Shea, E. K., and I. Herskowitz**, 2000 The ins and outs of cell-polarity decisions. *Nat Cell Biol* 2: E39-41.

- O'Rourke, S. M., and I. Herskowitz**, 1998 The Hog1 MAPK prevents cross talk between the HOG and pheromone response MAPK pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes & development* 12: 2874.
- Oerke, E.-C.**, 2006 Crop losses to pests. *The Journal of Agricultural Science* 144: 31-43.
- Penalva, M. A.**, 2010 Endocytosis in filamentous fungi: Cinderella gets her reward. *Curr Opin Microbiol* 13: 684-692.
- Penalva, M. A., A. Galindo, J. F. Abenza, M. Pinar, A. M. Calcagno-Pizarelli et al.**, 2012 Searching for gold beyond mitosis: Mining intracellular membrane traffic in *Aspergillus nidulans*. *Cell Logist* 2: 2-14.
- Perlin, D. S., R. Rautemaa-Richardson and A. Alastruey-Izquierdo**, 2017 The global problem of antifungal resistance: prevalence, mechanisms, and management. *The Lancet infectious diseases* 17: e383-e392.
- Peter, M., A. Gartner, J. Horecka, G. Ammerer and I. Herskowitz**, 1993 FAR1 links the signal transduction pathway to the cell cycle machinery in yeast. *Cell* 73: 747-760.
- Peter, M., and I. Herskowitz**, 1994 Direct inhibition of the yeast cyclin-dependent kinase Cdc28-Cln by Far1. *Science* 265: 1228-1231.
- Picco, A., W. Kukulski, H. E. Manenschijn, T. Specht, J. A. G. Briggs et al.**, 2018 The contributions of the actin machinery to endocytic membrane bending and vesicle formation. *Mol Biol Cell* 29: 1346-1358.
- Pinter, N., C. A. Hach, M. Hampel, D. Rekhter, K. Zienkiewicz et al.**, 2019 Signal peptide peptidase activity connects the unfolded protein response to plant defense suppression by *Ustilago maydis*. *PLoS Pathog* 15: e1007734.
- Piper, R. C., N. J. Bryant and T. H. Stevens**, 1997 The membrane protein alkaline phosphatase is delivered to the vacuole by a route that is distinct from the VPS-dependent pathway. *J Cell Biol* 138: 531-545.
- Pöggeler, S., and U. Kück**, 2004 A WD40 repeat protein regulates fungal cell differentiation and can be replaced functionally by the mammalian homologue striatin. *Eukaryot Cell* 3: 232-240.
- Poteryaev, D., S. Datta, K. Ackema, M. Zerial and A. Spang**, 2010 Identification of the switch in early-to-late endosome transition. *Cell* 141: 497-508.

- Pothiratana, C.**, 2008 Functional characterization of the homeodomain transcription factor Hdp1 in *Ustilago maydis*.
- Poulain, D.**, 2015 *Candida albicans*, plasticity and pathogenesis. Critical reviews in microbiology 41: 208-217.
- Pracheil, T., and Z. Liu**, 2013 Tiered Assembly of the Yeast Far3-7-8-9-10-11 Complex at the Endoplasmic Reticulum \*. Journal of Biological Chemistry 288: 16986-16997.
- Pracheil, T., J. Thornton and Z. Liu**, 2012 TORC2 signaling is antagonized by protein phosphatase 2A and the Far complex in *Saccharomyces cerevisiae*. Genetics 190: 1325-1339.
- Radchenko, D., I. Teichert, S. Poggeler and U. Kuck**, 2018 A Hippo Pathway-Related GCK Controls Both Sexual and Vegetative Developmental Processes in the Fungus *Sordaria macrospora*. Genetics 210: 137-153.
- Raitt, D. C., F. Posas and H. Saito**, 2000 Yeast Cdc42 GTPase and Ste20 PAK-like kinase regulate Sho1-dependent activation of the Hog1 MAPK pathway. The EMBO journal 19: 4623-4631.
- Raju, N. B.**, 1980 Meiosis and ascospore genesis in *Neurospora*. Eur J Cell Biol 23: 208-223.
- Ram, A. F., and F. M. Klis**, 2006 Identification of fungal cell wall mutants using susceptibility assays based on Calcofluor white and Congo red. Nat Protoc 1: 2253-2256.
- Ramer, S. W., and R. W. Davis**, 1993 A dominant truncation allele identifies a gene, STE20, that encodes a putative protein kinase necessary for mating in *Saccharomyces cerevisiae*. Proceedings of the National Academy of Sciences 90: 452-456.
- Rappsilber, J., Y. Ishihama and M. Mann**, 2003 Stop and Go Extraction Tips for Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization, Nanoelectrospray, and LC/MS Sample Pretreatment in Proteomics. Analytical Chemistry 75: 663-670.
- Rappsilber, J., M. Mann and Y. Ishihama**, 2007 Protocol for micro-purification, enrichment, pre-fractionation and storage of peptides for proteomics using StageTips. Nature Protocols 2: 1896-1906.
- Raymond, C. K., I. Howald-Stevenson, C. A. Vater and T. H. Stevens**, 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.

- Read, N. D., and E. R. Kalkman**, 2003 Does endocytosis occur in fungal hyphae? *Fungal Genet Biol* 39: 199-203.
- Reggiori, F., M. W. Black and H. R. Pelham**, 2000 Polar transmembrane domains target proteins to the interior of the yeast vacuole. *Mol Biol Cell* 11: 3737-3749.
- Rehling, P., T. Darsow, D. J. Katzmann and S. D. Emr**, 1999 Formation of AP-3 transport intermediates requires Vps41 function. *Nat Cell Biol* 1: 346-353.
- Reschka, E. J., S. Nordzike, O. Valerius, G. H. Braus and S. Poggeler**, 2018 A novel STRIPAK complex component mediates hyphal fusion and fruiting-body development in filamentous fungi. *Mol Microbiol* 110: 513-532.
- Ridley, A. J., and A. Hall**, 1992a Distinct patterns of actin organization regulated by the small GTP-binding proteins Rac and Rho. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 57: 661-671.
- Ridley, A. J., and A. Hall**, 1992b The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* 70: 389-399.
- Riquelme, M., J. Aguirre, S. Bartnicki-García, G. H. Braus, M. Feldbrügge *et al.***, 2018 Fungal Morphogenesis, from the Polarized Growth of Hyphae to Complex Reproduction and Infection Structures. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 82: 10.1128/membr.00068-00017.
- Roberts, R. L., and G. R. Fink**, 1994 Elements of a single MAP kinase cascade in *Saccharomyces cerevisiae* mediate two developmental programs in the same cell type: mating and invasive growth. *Genes and Development* 8: 2974-2985.
- Roca, M. G., J. Arlt, C. E. Jeffree and N. D. Read**, 2005 Cell biology of conidial anastomosis tubes in *Neurospora crassa*. *Eukaryot Cell* 4: 911-919.
- Romeis, T., A. Brachmann, R. Kahmann and J. Kamper**, 2000 Identification of a target gene for the bE-bW homeodomain protein complex in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol* 37: 54-66.
- Roncero, C., and A. Durán**, 1985 Effect of Calcofluor white and Congo red on fungal cell wall morphogenesis: in vivo activation of chitin polymerization. *Journal of Bacteriology* 163: 1180-1185.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis**, 1989 *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold spring harbor laboratory press.



- Sandrock, B., C. Böhmer and M. Bölker**, 2006 Dual function of the germinal centre kinase Don3 during mitosis and cytokinesis in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol* 62: 655-666.
- Santarpia, L., S. M. Lippman and A. K. El-Naggar**, 2012 Targeting the MAPK-RAS-RAF signaling pathway in cancer therapy. *Expert Opin Ther Targets* 16: 103-119.
- Saris, N., H. Holkeri, R. A. Craven, C. J. Stirling and M. Makarow**, 1997 The Hsp70 homologue Lhs1p is involved in a novel function of the yeast endoplasmic reticulum, refolding and stabilization of heat-denatured protein aggregates. *The Journal of cell biology* 137: 813-824.
- Scherer, M., K. Heimel, V. Starke and J. Kamper**, 2006 The Clp1 protein is required for clamp formation and pathogenic development of *Ustilago maydis*. *Plant Cell* 18: 2388-2401.
- Schink, K. O.**, 2010 Funktionelle Analyse von Rho-spezifischen Guaninnukleotidaustauschfaktoren in *Ustilago maydis*. im Fachbereich Biologie, Philipps-Universität Marburg, Marburg/Lahn.
- Schink, K. O., and M. Bölker**, 2009 Coordination of cytokinesis and cell separation by endosomal targeting of a Cdc42-specific guanine nucleotide exchange factor in *Ustilago maydis*. *Mol Biol Cell* 20: 1081-1088.
- Schirawski, J., H. U. Bohnert, G. Steinberg, K. Snetselaar, L. Adamikowa et al.**, 2005 Endoplasmic reticulum glucosidase II is required for pathogenicity of *Ustilago maydis*. *Plant Cell* 17: 3532-3543.
- Schmidt, A., and A. Hall**, 2002 Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch. *Genes Dev* 16: 1587-1609.
- Schmitz, L., J. W. Kronstad and K. Heimel**, 2020 Conditional gene expression reveals stage - specific functions of the unfolded protein response in the *Ustilago maydis*-maize pathosystem. *Molecular plant pathology* 21: 258-271.
- Schneider, B. L., E. E. Patton, S. Lanker, M. D. Mendenhall, C. Wittenberg et al.**, 1998 Yeast G1 cyclins are unstable in G1 phase. *Nature* 395: 86-89.
- Schneider, K.**, 2021 Regulation von frühen Endosomenpopulationen bei Transportprozessen und der Zellteilung in *Ustilago maydis*. im Fakultät für Chemie und Biowissenschaften, Karlsruher Institut für Technologie (KIT), Karlsruhe.

- Schneider, K., T. Farr, N. Pinter, K. Schmitt, O. Valerius et al.**, 2022 The Nma1 protein promotes long distance transport mediated by early endosomes in *Ustilago maydis*. *Molecular Microbiology* 117: 334-352.
- Schuler, D.**, 2013 Charakterisierung der Akquisition von Kohlenhydraten in *Ustilago maydis*. im Institut für Angewandte Biologie, Fakultät für Chemie und Biowissenschaften, KIT, Karlsruhe.
- Schulz, B., F. Banuett, M. Dahl, R. Schlesinger, W. Schafer 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.
- Schuster, M., G. Schweizer, S. Reissmann and R. Kahmann**, 2016 Genome editing in *Ustilago maydis* using the CRISPR–Cas system. *Fungal Genetics and Biology* 89: 3-9.
- Schuster, M., C. Trippel, P. Happel, D. Lanver, S. Reißmann et al.**, 2018 Single and multiplexed gene editing in *Ustilago maydis* using CRISPR-Cas9. *Bio-protocol* 8.
- Scott, M. S., S. J. Calafell, D. Y. Thomas and M. T. Hallett**, 2005 Refining protein subcellular localization. *PLoS Comput Biol* 1: e66.
- Seals, D. F., G. Eitzen, N. Margolis, W. T. Wickner and A. Price**, 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.
- Sheu, Y.-J., Y. Barral and M. Snyder**, 2000 Polarized growth controls cell shape and bipolar bud site selection in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology* 20: 5235-5247.
- Shi, X., F. Duan, L. Lin, Q. Xu, T. Xu et al.**, 2019 WIP-1 and DBN-1 promote scission of endocytic vesicles by bridging actin and Dynamin-1 in the *C. elegans* intestine. *J Cell Sci* 132.
- Shi, Y., C. J. Stefan, S. M. Rue, D. Teis and S. D. Emr**, 2011 Two novel WD40 domain-containing proteins, Ere1 and Ere2, function in the retromer-mediated endosomal recycling pathway. *Mol Biol Cell* 22: 4093-4107.
- Shim, W.-B., U. S. Sagaram, Y.-E. Choi, J. So, H. H. Wilkinson et al.**, 2006 FSR1 is essential for virulence and female fertility in *Fusarium verticillioides* and *F. graminearum*. *Mol plant-micr int* 19: 725-733.

- Shimada, Y., M. P. Gulli and M. Peter**, 2000 Nuclear sequestration of the exchange factor Cdc24 by Far1 regulates cell polarity during yeast mating. *Nat Cell Biol* 2: 117-124.
- Shuping, D., and J. N. Eloff**, 2017 The use of plants to protect plants and food against fungal pathogens: A review. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines* 14: 120-127.
- Simonin, A. R., C. G. Rasmussen, M. Yang and N. L. Glass**, 2010 Genes encoding a striatin-like protein (ham-3) and a forkhead associated protein (ham-4) are required for hyphal fusion in *Neurospora crassa*. *Fungal Genet Biol* 47: 855-868.
- Singh, N. S., N. Shao, J. R. McLean, M. Sevugan, L. Ren et al.**, 2011 SIN-inhibitory phosphatase complex promotes Cdc11p dephosphorylation and propagates SIN asymmetry in fission yeast. *Curr Biol* 21: 1968-1978.
- Smith, D. G., M. D. Garcia-Pedrajas, W. Hong, Z. Yu, S. E. Gold et al.**, 2004 An *ste20* Homologue in *Ustilago maydis* Plays a Role in Mating and Pathogenicity. *Eukaryotic Cell* 3: 180-189.
- Smith, T. F., C. Gaitatzes, K. Saxena and E. J. Neer**, 1999 The WD repeat: a common architecture for diverse functions. *Trends Biochem Sci* 24: 181-185.
- Snetselaar, K. M., M. Bölker and R. Kahmann**, 1996 *Ustilago maydis* Mating Hyphae Orient Their Growth toward Pheromone Sources. *Fungal Genet Biol* 20: 299-312.
- Snetselaar, K. M., and C. Mims**, 1993 Infection of maize stigmas by *Ustilago maydis*: light and electron microscopy. *Phytopathology* 83: 843.
- Snetselaar, K. M., and C. W. Mims**, 1992 Sporidial fusion and infection of maize seedlings by the smut fungus *Ustilago maydis*. *Mycologia*: 193-203.
- Snetselaar, K. M., and C. W. Mims**, 1994 Light and electron microscopy of *Ustilago maydis* hyphae in maize. *Mycological Research* 98: 347-355.
- Southern, E. M.**, 1975 Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 98: 503-517.
- Spellig, T., M. Bölker, F. Lottspeich, R. W. Frank and R. Kahmann**, 1994a Pheromones trigger filamentous growth in *Ustilago maydis*. *The EMBO journal* 13: 1620.

**Spellig, T., E. Regenfelder, M. Reichmann, F. Schauwecker, R. Bohlmann et al.,** 1994b Control of mating and development in *Ustilago maydis*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 65: 191-197.

**Steinberg, G.,** 2014 Endocytosis and early endosome motility in filamentous fungi. *Curr Opin Microbiol* 20: 10-18.

**Steinberg, G., and J. Perez-Martin,** 2008 *Ustilago maydis*, a new fungal model system for cell biology. *Trends in cell biology* 18: 61-67.

**Straube, A., I. Weber and G. Steinberg,** 2005 A novel mechanism of nuclear envelope break-down in a fungus: nuclear migration strips off the envelope. *The EMBO Journal* 24: 1674-1685.

**Stukey, J. E., V. M. McDonough and C. E. Martin,** 1990 The OLE1 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes the delta 9 fatty acid desaturase and can be functionally replaced by the rat stearyl-CoA desaturase gene. *J Biol Chem* 265: 20144-20149.

**Szabo, Z., M. Tönnis, H. Kessler and M. Feldbrügge,** 2002 Structure-function analysis of lipopeptide pheromones from the plant pathogen *Ustilago maydis*. *Molecular genetics and genomics* 268: 362-370.

**Takai, Y., K. Kaibuchi, A. Kikuchi and M. Kawata,** 1992 Small GTP-binding proteins. *Int Rev Cytol* 133: 187-230.

**Talbot, N. J.,** 2003 On the trail of a cereal killer: exploring the biology of *Magnaporthe grisea*. *Annual Reviews in Microbiology* 57: 177-202.

**Tarassov, K., V. Messier, C. R. Landry, S. Radinovic, M. M. Serna Molina et al.,** 2008 An in vivo map of the yeast protein interactome. *Science* 320: 1465-1470.

**Teichert, I., M. Nowrousian, S. Poggeler and U. Kuck,** 2014a The filamentous fungus *Sordaria macrospora* as a genetic model to study fruiting body development. *Adv Genet* 87: 199-244.

**Teichert, I., E. K. Steffens, N. Schnass, B. Franzel, C. Krisp et al.,** 2014b PRO40 is a scaffold protein of the cell wall integrity pathway, linking the MAP kinase module to the upstream activator protein kinase C. *PLoS Genet* 10: e1004582.

**Teichert, I., G. Wolff, U. Kuck and M. Nowrousian,** 2012 Combining laser microdissection and RNA-seq to chart the transcriptional landscape of fungal development. *BMC Genomics* 13: 511.

**Thermo-Fisher,** 2018 CellTracker™ fluorescent probes.  
<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/C2110> (12.11.2021)

- Tiedje, C., D. G. Holland, U. Just and T. Höfken**, 2007 Proteins involved in sterol synthesis interact with Ste20 and regulate cell polarity. *Journal of Cell Science* 120: 3613-3624.
- Touchot, N., P. Chardin and A. Tavitian**, 1987 Four additional members of the ras gene superfamily isolated by an oligonucleotide strategy: molecular cloning of YPT-related cDNAs from a rat brain library. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 84: 8210-8214.
- Towbin, H., T. Staehelin and J. Gordon**, 1979 Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 76: 4350-4354.
- Trilisenko, L., A. Valiakhmetov and T. Kulakovskaya**, 2021 Phosphate efflux as a test of plasma membrane leakage in *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Can J Microbiol* 67: 226-230.
- Tsukuda, T., S. Carleton, S. Fotheringham and W. K. Holloman**, 1988 Isolation and characterization of an autonomously replicating sequence from *Ustilago maydis*. *Mol Cell Biol* 8: 3703-3709.
- Tyanova, S., T. Temu and J. Cox**, 2016a The MaxQuant computational platform for mass spectrometry-based shotgun proteomics. *Nature Protocols* 11: 2301-2319.
- Tyanova, S., T. Temu, P. Sinitcyn, A. Carlson, M. Y. Hein *et al.***, 2016b The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data. *Nat Methods* 13: 731-740.
- Tyers, M., and B. Futcher**, 1993 Far1 and Fus3 link the mating pheromone signal transduction pathway to three G1-phase Cdc28 kinase complexes. *Mol Cell Biol* 13: 5659-5669.
- Tyers, M., G. Tokiwa and B. Futcher**, 1993 Comparison of the *Saccharomyces cerevisiae* G1 cyclins: Cln3 may be an upstream activator of Cln1, Cln2 and other cyclins. *EMBO J* 12: 1955-1968.
- Uetz, P., L. Giot, G. Cagney, T. A. Mansfield, R. S. Judson *et al.***, 2000 A comprehensive analysis of protein-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* 403: 623-627.
- Ulrich, J.**, 2020 Die kombinatorische Regulation eines Transkriptions-Netzwerks reguliert die Pflanzeninfektion von *Ustilago maydis*. im Fakultät für Chemie und Biowissenschaften, Karlsruher Institut für Technologie (KIT), Karlsruhe.

- Urban, M., R. Kahmann and M. Bölker**, 1996a The biallelic mating type locus of *Ustilago maydis*: remnants of an additional pheromone gene indicate evolution from a multiallelic ancestor. *Molecular and General Genetics MGG* 250: 414-420.
- Urban, M., R. Kahmann and M. Bölker**, 1996b Identification of the pheromone response element in *Ustilago maydis*. *Mol Gen Genet* 251: 31-37.
- Valdivieso, M. H., K. Sugimoto, K. Y. Jahng, P. M. Fernandes and C. Wittenberg**, 1993 FAR1 is required for posttranscriptional regulation of CLN2 gene expression in response to mating pheromone. *Mol Cell Biol* 13: 1013-1022.
- Virag, A., M. P. Lee, H. Si and S. D. Harris**, 2007 Regulation of hyphal morphogenesis by *cdc42* and *rac1* homologues in *Aspergillus nidulans*. *Molecular Microbiology* 66: 1579-1596.
- Vivek, B. S., O. Odongo, J. Njuguna, J. Imanywoha, G. Bigirwa et al.**, 2010 Diallel analysis of grain yield and resistance to seven diseases of 12 African maize (*Zea mays* L.) inbred lines. *Euphytica* 172: 329-340.
- Vraneš, M.**, 2006 Transkriptom-Analyse der frühen Infektionsphase von *Ustilago maydis*: Identifikation neuer pathogenitätsrelevanter Gene. im Fachbereich Biologie, Philipps-Universität Marburg, Marburg/Lahn.
- Wahl, R., A. Zahiri and J. Kamper**, 2010 The *Ustilago maydis* b mating type locus controls hyphal proliferation and expression of secreted virulence factors in planta. *Mol Microbiol* 75: 208-220.
- Walter, P., and D. Ron**, 2011 The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science* 334: 1081-1086.
- Wang, C. L., W. B. Shim and B. D. Shaw**, 2010 *Aspergillus nidulans* striatin (StrA) mediates sexual development and localizes to the endoplasmic reticulum. *Fungal Genet Biol* 47: 789-799.
- Wang, C. L., W. B. Shim and B. D. Shaw**, 2016 The *Colletotrichum graminicola* striatin orthologue Str1 is necessary for anastomosis and is a virulence factor. *Mol Plant Pathol* 17: 931-942.
- Wang, Y., X. Zhang, H. Zhang, Y. Lu, H. Huang et al.**, 2012 Coiled-coil networking shapes cell molecular machinery. *Mol Biol Cell* 23: 3911-3922.
- Wedlich-Söldner, R., A. Straube, M. W. Friedrich and G. Steinberg**, 2002 A balance of KIF1A-like kinesin and dynein organizes early endosomes in the fungus *Ustilago maydis*. *EMBO J* 21: 2946-2957.

- Weichert, M., A. Lichius, B. E. Priegnitz, U. Brandt, J. Gottschalk et al.**, 2016 Accumulation of specific sterol precursors targets a MAP kinase cascade mediating cell-cell recognition and fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113: 11877-11882.
- Weinzierl, G.**, 2001 Isolierung und Charakterisierung von Komponenten der b-vermittelten Regulationskaskade in *Ustilago maydis*. im Fachbereich Biologie, Philipps-Universität Marburg, Marburg.
- Weinzierl, G., L. Leveleki, A. Hassel, G. Kost, G. Wanner et al.**, 2002 Regulation of cell separation in the dimorphic fungus *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol* 45: 219-231.
- Wennerberg, K., K. L. Rossman and C. J. Der**, 2005 The Ras superfamily at a glance. *Journal of Cell Science* 118: 843-846.
- Whiteway, M., L. Hougan, D. Dignard, D. Y. Thomas, L. Bell et al.**, 1989 The STE4 and STE18 genes of yeast encode potential beta and gamma subunits of the mating factor receptor-coupled G protein. *Cell* 56: 467-477.
- Wigge, P. A., and J. V. Kilmartin**, 2001 The Ndc80p complex from *Saccharomyces cerevisiae* contains conserved centromere components and has a function in chromosome segregation. *J Cell Biol* 152: 349-360.
- Wilson, W. D., F. A. Tanious, H. J. Barton, R. L. Jones, K. Fox et al.**, 1990 DNA sequence dependent binding modes of 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). *Biochemistry* 29: 8452-8461.
- Wittenberg, C., K. Sugimoto and S. I. Reed**, 1990 G1-specific cyclins of *S. cerevisiae*: cell cycle periodicity, regulation by mating pheromone, and association with the p34CDC28 protein kinase. *Cell* 62: 225-237.
- Wu, C., S.-F. Lee, E. Furmaniak-Kazmierczak, G. P. Côté, D. Y. Thomas et al.**, 1996 Activation of myosin-I by members of the Ste20p protein kinase family. *Journal of Biological Chemistry* 271: 31787-31790.
- Wurmser, A. E., T. K. Sato and S. D. Emr**, 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.
- Xiang, Q., C. Rasmussen and N. L. Glass**, 2002 The ham-2 locus, encoding a putative transmembrane protein, is required for hyphal fusion in *Neurospora crassa*. *Genetics* 160: 169-180.
- Yahya, G., E. Parisi, A. Flores, C. Gallego and M. Aldea**, 2014 A Whi7-anchored loop controls the G1 Cdk-cyclin complex at start. *Mol Cell* 53: 115-126.

- Yamashiro, D. J., B. Tycko, S. R. Fluss and F. R. Maxfield**, 1984 Segregation of transferrin to a mildly acidic (pH 6.5) para-Golgi compartment in the recycling pathway. *Cell* 37: 789-800.
- Yatzkan, E., and O. Yarden**, 1995 Inactivation of a single type-2A phosphoprotein phosphatase is lethal in *Neurospora crassa*. *Current Genetics* 28: 458-466.
- Zarnack, K., H. Eichhorn, R. Kahmann and M. Feldbrugge**, 2008 Pheromone-regulated target genes respond differentially to MAPK phosphorylation of transcription factor Prf1. *Mol Microbiol* 69: 1041-1053.
- Zhang, H., and A. Zhu**, 2020 Emerging invasive fungal infections: Clinical features and controversies in diagnosis and treatment processes. *Infection and Drug Resistance* 13: 607.
- Zhang, J., L. Zhuang, Y. Lee, J. F. Abenza, M. A. Penalva et al.**, 2010 The microtubule plus-end localization of *Aspergillus* dynein is important for dynein-early-endosome interaction but not for dynein ATPase activation. *J Cell Sci* 123: 3596-3604.
- Zhang, S., J. Han, M. A. Sells, J. Chernoff, U. G. Knaus et al.**, 1995 Rho family GTPases regulate p38 mitogen-activated protein kinase through the downstream mediator Pak1. *J Biol Chem* 270: 23934-23936.
- Zuo, W., J. R. Depotter and G. Doehlemann**, 2020 Cas9HF1 enhanced specificity in *Ustilago maydis*. *Fungal Biology* 124: 228-234.



# Danksagung

---

Im Folgenden möchte mich bei allen bedanken, die mir diese Arbeit ermöglicht oder mich dabei unterstützt haben.

An erster Stelle gilt mein Dank Prof. Dr. Jörg Kämper. Vielen Dank Jörg, dass ich meine Bachelorarbeit, diverse Praktika, meine Masterarbeit und nun auch meine Promotion in deiner Arbeitsgruppe durchführen durfte. Danke für die Unterstützung, hilfreichen Anmerkungen und die Möglichkeit ein so interessantes Thema bearbeiten zu dürfen.

Ein herzlicher Dank geht ebenfalls an Prof. Dr. Reinhard Fischer, der sich freundlicherweise dazu bereiterklärt hat, meine Arbeit als Zweitgutachter zu bewerten.

Ein großes Dankeschön geht auch an unsere Kooperationspartner der Universität Göttingen für die Unterstützung bei den MS-Analysen. Vielen Dank an Prof. Dr. Kai Heimel und Nora Kühne für die Hilfe bei der Sekretionsanalyse.

Ich möchte mich außerdem bei meinen KollegInnen der Arbeitsgruppen AG Requena und AG Fischer für die schöne gemeinsame Zeit bedanken. Die gemeinsamen Vesper Fridays und auch unser gemeinsamer Kleinwalsertal-Retreat war ein Highlight.

Vielen Dank an Karina, Matteo, Jonas und Lukas für die jahrelange Unterstützung durch hilfreiche Tipps und eine angenehme Atmosphäre. Vielen Dank an unsere Newcomerin Cosima für die guten Gespräche. Ein besonderer Dank euch allen für die Korrektur dieser Arbeit.

Ein großes Dankeschön geht auch an meine Freunde und Familie, die sich immer wieder erkundigt haben, wie meine Promotion läuft und sich meine Erklärungen geduldig angehört haben. Vielen Dank gilt Nanni, die mir bei der Auswertung der MS-Analyse enorm geholfen hat. Danke an meine Mädels für euer offenes Ohr, unsere großartigen Wochenenden und eure Unterstützung.

Und zuletzt, ein großer Dank an Christian. Danke für deine Unterstützung und deine scheinbar nie endende Geduld. Danke, dass du mich aufheiterst, mich anspornst und dich um mich sorgst. <3