

**Die Rolle von RNA-bindenden Proteinen bei der
pathogenen Entwicklung von *Ustilago maydis***

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Philip Becht
aus Bad Bergzabern

Marburg/Lahn 2005

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg
als Dissertation angenommen am: 13/05/2005

Erstgutachter: Prof. Dr. Regine Kahmann
Zweitgutachter: Prof. Dr. Renate Renkawitz-Pohl

Tag der mündlichen Prüfung: 14/06/2005

Die Untersuchungen zur Vorliegenden Arbeit wurden vom Januar 2002 bis zum Februar 2005 am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie in der Abteilung Organismische Interaktionen unter Betreuung von Frau Prof. Dr. Regine Kahmann und Herrn Dr. Michael Feldbrügge durchgeführt.

Teile dieser Arbeit sind veröffentlicht in:

Becht, P., Vollmeister, E. und Feldbrügge, M. (2005) A Role for RNA-Binding Proteins Implicated in Pathogenic Development of *Ustilago maydis*. *Eukaryot Cell*, **4**, 121-133.

Kommentiert in: Research Highlights. *Nature Reviews Microbiology*, **3**,195 (2005)

Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation mit dem Titel „Die Rolle von RNA-bindenden Proteinen bei der pathogenen Entwicklung von *Ustilago maydis*“ selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

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

Marburg, 6. April 2005

(Philip Becht)

ZUSAMMENFASSUNG

Ustilago maydis ist der Erreger des Maisbeulenbrands. Eine erfolgreiche Infektion der Maispflanze durch den phytopathogenen Basidiomyzeten ist abhängig von zahlreichen morphologischen Transitionen, wie beispielsweise die pheromoninduzierte Bildung von Konjugationshyphen, der Wechsel zum dikaryotischen Wachstum nach der Fusion zweier kompatibler Sporidien und das verzweigte Wachstum des Myzels nach dem Eindringen des Pilzes in die Wirtspflanze. Unter Verwendung einer bioinformatischen Analyse konnten im Vorfeld dieser Arbeit bereits 24 offene Leserahmen (ORF) identifiziert werden, die für potenziell RNA-bindende Proteine kodieren und den Ausgangspunkt dieser Arbeit darstellten. In dieser Arbeit wurde der Einfluss von 3 PUM-, 4 KHD- und 11 RRM-Proteinen auf die Entwicklungsprogramme über einen revers-genetischen Ansatz untersucht. Durch eine extensive phänotypische Analyse konnte für die Genprodukte dreier ORFs ein Einfluss auf die Entwicklung von *U. maydis* festgestellt werden; die Proteine wurden mit Khd1, Khd4 bzw. Rrm4 bezeichnet. Während die Deletion von *khd1* zu einem kältesensitiven Verhalten führt, hat die Deletion von *khd4* Veränderungen der Sporidienmorphologie, Wachstumsrate, Pheromonantwort sowie der Pathogenität zur Folge. Die Deletion von *rrm4* führt zu einem Verlust des schnellen polaren Wachstums und zu einer reduzierten Virulenz. Die Domänenarchitektur von Rrm4 zeigt Ähnlichkeiten mit Proteinen der ELAV-Familie (*embryonic lethal and abnormal vision*). Neben den drei für ELAV-Proteine typischen Modulen der RRM-Domäne im N-Terminus, besitzt Rrm4 eine zusätzliche C-terminale PABC-Domäne (*poly[A]-binding protein C-terminal domain*), die als Proteininteraktionsdomäne bekannt ist. Rrm4 akkumuliert PABC-abhängig in zytoplasmatischen Partikeln, die sich bidirektional entlang des Mikrotubulizytoskeletts bewegen. Bei der Untersuchung des Transportmechanismus konnte eine indirekte Beteiligung des konventionellen Kinesins Kin2 gezeigt werden, weshalb die Beteiligung eines weiteren Motorproteins am plusendgerichteten und des Dyneins am minusendgerichteten Partikeltransport vermutet wird. Darüber hinaus lassen Mutationsstudien an den RRM-Domänen eine Beteiligung der ersten beiden RRM-Domänen an der RNA-Bindung vermuten. Die Bedeutung von Rrm4 auf die Pathogenität von *U. maydis* und die Bewegung des RNA-bindenden Proteins entlang des Mikrotubulizytoskeletts deuten auf eine wichtige Funktion von RNA-Transport während der pathogenen Entwicklung von *U. maydis* hin.



SUMMARY

Ustilago maydis is the causative agent of corn smut disease. Successful infection of corn plants by this phytopathogenic basidiomycete is dependent on various morphological transitions including pheromone-induced conjugation hyphae formation, formation of a dicaryotic filament after fusion of two compatible haploid sporidia and the branched mycelial growth after plant penetration. In previous analysis 24 open reading frames coding for putative RNA-binding proteins could be identified using a bioinformatic candidate gene approach. On this basis the effect of 18 genes coding for proteins that harbouring PUM-, KHD- and RRM domains, has been studied using a revers-genetic approach. Gene deletion mutants were generated and subsequently characterised by extensive phenotypic analysis. Three genes could be identified having an influence on development of *U. maydis* designated *khd1*, *khd4* and *rrm4*. Deletion of *khd1* leads to cold sensitivity, whereas deletion of *khd4* influences morphology of the haploid sporidia, growth rate, pheromone response as well as pathogenicity. Deletion of *rrm4* leads to a loss of fast polar growth and reduced virulence. Rrm4 harbours three modules of RRM-type RNA-binding domains. The RRM domain architecture shows similarity to ELAV-like (embryonic lethal abnormal vision) proteins. In addition to the RNA-binding domains, Rrm4 contains a C-terminal PABC domain (poly[A]-binding protein C-terminal domain), that is known as a protein interaction interface. Rrm4 accumulates PABC-dependent in cytoplasmic particles that move bidirectionally along the microtubule cytoskeleton. Investigating the mechanism of Rrm4 particle movement, an indirect influence of conventional kinesin Kin2 of *U. maydis* could be shown. Therefore, a participation of another plus-end directed kinesin motor-protein as well as the minus-end directed dynein motorprotein is expected. By analysis of strains expressing site-mutagenised Rrm4 proteins RNA binding is expected to be carried out by the first and second RRM domains. The importance of Rrm4 for pathogenic development and its movement along the microtubule cytoskeleton leads to the assumption that this protein plays a crucial role in RNA transport during pathogenic development of *U. maydis*.



GLOSSAR

Ac	Acetat	Gfp	grün fluoreszierendes Protein
Amp	Ampicillin	g	Erdbeschleunigung ($9,81\text{ms}^{-2}$); Gramm
As	Aminosäuren	HECT	<i>homologous to E6-AP carboxyl terminus</i> (Domäne mit Ubiquitin-Protein-Ligaseaktivität)
bp	Basenpaar(e)	HMG	<i>high mobility group</i>
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat	Hyg	Hygromycin
C-	carboxy-...	[hyg ^R]	Hygromycin Resistenzkassette
Cbx	Carboxin	<i>ip^f</i>	Cbx-resistentes Allel der Eisen-Schwefel-Untereinheit der Sukzinat-Dehydrogenase aus <i>U. maydis</i>
CC	<i>charcoal</i> (Aktivkohle)	<i>ip^s</i>	Cbx-sensitives Allel der Eisen-Schwefel-Untereinheit der Sukzinat-Dehydrogenase aus <i>U. maydis</i>
CM	<i>complete medium</i> (Vollmedium)	kb	Kilobasenpaare
dATP	Deoxyadenosintriphosphat	KH	K-Homologie (vgl. KHD)
dCTP	Deoxycytosintriphosphat	KHD	KH-Domäne (RNA-bindende Domäne die ursprünglich im hnRNP K Protein identifiziert wurde)
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser	Mb	Megabasenpaare
dGTP	Deoxyguanidintriphosphat	mRNA	<i>messenger RNA</i> (Boten-RNA)
DIC	<i>differential interference contrast</i> (Differenzieller Interferenzkontrast)	N-	amino-...
DIG	Digoxigenin-11-dUTP	Nat	Nourseothricin
DMSO	Dimethylsulfoxid	[nat ^R]	Nourseothricin-Resistenzkassette
DNA	Desoxyribonukleinsäure	NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i> (magnetische Kernresonanz)
DNase	Desoxyribonuklease	OD _x	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von x nm
DSRM	dsRNA-bindendes Motiv	otef-Promotor .	Promotor des Translations-Elongationsfaktors 1 aus <i>U. maydis</i> , durch 14 Tetracyclin-Operatorsequenzen 8fach verstärkt
dsRNA	doppelsträngige RNA	ORF	<i>open reading frame</i> (offener Leserahmen)
dNTP	Desoxinukleotid		
dTTP	Deoxythymidintriphosphat		
dUTP	Deoxyuridintriphosphat		
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure		
eGfp	<i>enhanced Gfp</i> (verstärktes Gfp)		
EGTA	Ethylenglykoltetraessigsäure		
EJC	<i>exon-exon junction complex</i> (Proteinkomplex am Exon-Exon-Übergang)		
ELAV	<i>embryonic lethal and abnormal vision</i> (RBP kodiert vom <i>elav</i> Gen, wurde ursprünglich in <i>D. melanogaster</i> identifiziert. Der Name stammt vom initialen Phänotyp ab.)		

PABC.	Poly[A]-bindendes Protein C-terminale Domäne	WT, wt	Wildtyp
PABP.	Poly[A]-bindendes Protein		Sowie Aminosäuren im Einbuchstabenkode
PCR	Polymerase-Kettenreaktion		
PDB ID	<i>protein data bank identifier</i> (Kennung für die RCSB (<i>Research Collaboratory for Structural Bioinformatics</i>) Protein-Datenbank) URL: http://www.rcsb.org/pdb/		
PEG	Polyethylenglykol		
[phleo ^R]	Phleomycin-Resistenzkassette		
PUM	Pumilio-Domäne (RNA-bindende Domäne)		
pUMa _{Zahl}	Bezeichnung für Plasmide (Die Beschreibung der Plasmide ist auf Seite 83 ff. zu finden.)		
RBD	RNA-bindende Domäne		
RBP	RNA-bindendes Protein		
RNA	Ribonukleinsäure		
RNAi	RNA-Interferenz (RNAi ist ein Prozess bei dem dsRNA dazu führt, dass die Genexpression posttranskriptionell unterdrückt wird.)		
RNP	Ribonukleoproteinkomplex		
RRM	<i>RNA recognition motif</i> (RNA-Erkennungsmotiv)		
RT	Raumtemperatur		
SDS	Natriumdodecylsulfat		
TAE.	Tris-Acetat + Na ₂ EDTA		
TBE	Tris-Borat + Na ₂ EDTA		
TE	Tris-HCl + Na ₂ EDTA		
Tris.	Trishydroxymethylaminomethan		
U	<i>unit</i> (Enzymaktivitätseinheit)		
UARS	<i>U. maydis autonomously replicating sequence</i> (autonom replizierende Sequenz aus <i>U. maydis</i>)		
Upm	Umdrehung pro Minute		
URL	<i>uniform resource locator</i> (Internetadresse)		
UTR	untranslatierte Region		
UV	ultraviolettes Licht		
X-Gal	5-Chlor-4-Brom-3-Indolyl-β-D-Galaktosid		

INHALTSVERZEICHNIS

ZUSAMMENFASSUNG	ix
SUMMARY	xi
GLOSSAR	xiii
INHALTSVERZEICHNIS	xv
1 EINLEITUNG	1
1.1 Der Modellorganismus <i>Ustilago maydis</i>, Erreger des Maisbeulenbrands	1
1.2 Ribonukleoproteinkomplexe	5
1.2.1 RNA-bindende Domänen	6
1.2.2 Funktionen von RNA-bindenden Proteinen	11
1.2.3 mRNA-Lokalisation	13
1.3 Zielsetzung und Fragestellung	17
2 ERGEBNISSE	19
2.1 Identifizierung von weiteren potenziellen RNA-bindenden Proteinen in <i>U. maydis</i>	19
2.1.1 Bioinformatische Analyse zur Identifizierung von RBPs	19
2.1.2 Phänotypisierung der PUM-, KHD- und RRM-Deletionsstämmen	22
2.2 <i>Khd4</i> spielt eine Rolle bei der Morphologie, der Paarung und der Pathogenität von <i>U. maydis</i>	26
2.3 <i>Rrm4</i> aus <i>U. maydis</i> ist wichtig für das polare Wachstum der <i>b</i>-abhängigen Hyphen ..	30
2.3.1 <i>rrm4</i> Δ Stämme zeigen ein reduziertes Filamentwachstum	31
2.3.2 Die Deletion von <i>rrm4</i> führt zu reduzierter Virulenz	35
2.3.3 <i>Rrm4</i> ist am unipolaren filamentösen Wachstum beteiligt	36
2.3.4 Lokalisation der <i>Rrm4</i> Fusionsproteine in vivo	42
2.3.5 Funktion der Domänen in <i>Rrm4</i>	48
3 DISKUSSION	55
3.1 Die Bedeutung von RNA-bindenden Proteinen in <i>U. maydis</i>	56
3.1.1 Pumilio-ähnliche Proteine in <i>U. maydis</i>	56
3.1.2 KHD-Proteine in <i>U. maydis</i>	58
3.1.3 RRM-Proteine in <i>U. maydis</i>	61

3.2	Die Bedeutung von Rrm4 für das filamentöse Wachstum von <i>U. maydis</i>	63
3.2.1	Die Funktion des RRM-Proteins Rrm4 aus <i>U. maydis</i>	63
3.2.2	Die pendelnde Bewegung der Rrm4 Partikel entlang des Mikrotubulizytoskeletts	69
3.2.3	Modellvorstellung zur Funktion von Rrm4	72
3.3	Ausblick	74
4	MATERIAL UND METHODEN	77
4.1	Material und Bezugsquellen	77
4.1.1	Medien, Lösungen, Enzyme	77
4.1.2	Oligonukleotide	77
4.1.3	Stämme	82
4.1.4	Plasmide und Plasmidkonstruktionen	83
4.2	Mikrobiologische, genetische und zellbiologische Methoden	91
4.2.1	<i>Escherichia coli</i>	91
4.2.2	<i>Ustilago maydis</i>	93
4.2.3	Fixierung und Anfärbung von Zellen	97
4.2.4	Mikroskopie und Bildverarbeitung	98
4.3	Molekularbiologische Standardmethoden	99
4.3.1	Isolierung von Nukleinsäuren	99
4.3.2	Bestimmung der DNA-Konzentration	100
4.3.3	Modifikation von Nukleinsäuren in vitro	100
4.3.4	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	102
4.3.5	TOPO-TA-Klonierung von PCR-Produkten	104
4.3.6	Nachweis von Nukleinsäuren im Southern-Blot	104
4.3.7	Bioinformatische Analysen	106
	ANHANG A	109
A.1	Wachstumsverhalten von <i>rrm4</i> Mutanten	109
	ANHANG B	111
B.1	CD-ROM und Dateiübersicht	111
	LITERATURVERZEICHNIS	113
	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	127
	TABELLENVERZEICHNIS	129
	DANKSAGUNG	131
	LEBENS LAUF	133

1.1 DER MODELLORGANISMUS *USTILAGO MAYDIS*, ERREGER DES MAISBEULENBRANDS

Ustilago maydis gehört derzeit neben dem Humanpathogen *Cryptococcus neoformans* zu den bestuntersuchten Modellorganismen auf dem Gebiet der pathogenen Basidiomyceten (Hull und Heitman, 2002; Bölker, 2001). Sein enges Wirtsspektrum begrenzt die Pathogenität auf den kultivierten Mais (*Zea mays* ssp. *mays* Linné) und dessen Urform Teosinte (*Zea mays* ssp. *mexicana* (Schrader) Iltis und ssp. *parviglumis* Iltis und Doebley). Eine Infektion der Wirtspflanzen ist leicht zu erkennen, da sie zur Bildung von tumorähnlichen Brandgallen an den oberirdischen Pflanzenteilen führt. Während ihrer Reifung verfärben sich die darin befindlichen Brandsporen schwarzbraun und geben der Galle ein verbranntes Aussehen — daher auch der Name: Maisbeulenbrand (Brefeld, 1893; Christensen, 1963).

Der Lebenszyklus von *U. maydis* vereint die vegetative Vermehrung durch Knospung mit der sexuellen Vermehrung durch die Transition zum filamentösen Wachstum. Diese morphologische Veränderung initiiert die sexuelle Entwicklung und ist Voraussetzung für die pathogene Entwicklung des Brandpilzes (Kahmann und Kämper, 2004; Banuett, 1995; Christensen, 1963). Während des nicht-pathogenen, vegetativen Wachstums existiert der Organismus als einzellige, haploide Basidiospore (auch: Sporidie), die sich hefeartig durch Knospung vermehrt (Abb. 1-1 ①). Unter geeigneten Umweltbedingungen wechselt *U. maydis* zur sexuellen Vermehrung, die durch die Paarung zweier kompatibler Sporidien auf der Pflanzenoberfläche initiiert wird. Die für dieses Ereignis notwendige Zell-Zell-Erkennung wird durch den biallelischen *a*-Lokus (*a1* und *a2*) reguliert, dessen Genprodukte ein Pheromon/Pheromonrezeptorsystem bilden und für das Pheromonvorläuferprotein Mfa (*mating factor a*) sowie den Pheromonrezeptor Pra (*pheromone receptor a*) kodiert. Die membranständigen Pheromonrezeptoren erkennen das Lipopeptid, welches aus dem Vorläuferprotein des jeweils anderen allelischen Ursprungs entsteht (Bölker et al., 1992). Auf die Pheromonperzeption antworten die Zellen mit einem Arrest in der G2-Phase des Zellzyklus (Garcia-Muse et al., 2003) und der darauf folgenden Ausbildung einer polar wachsenden Konjugationshyph (Spellig et al., 1994). Diese filamentösen

Strukturen zweier kompatibler Sporidien wachsen entlang des konträren Pheromongradienten aufeinander zu, fusionieren an ihren Spitzen und bilden eine dikaryotische Hyphe¹ aus (Snetselaar et al., 1996). Die Stabilität dieser Infektionshyphe ist gegeben, wenn beide Kerne unterschiedliche Allele eines zweiten Paarungstyplokus besitzen. Dieser multiallelische *b*-Lokus kodiert für zwei Homeodomänenproteine (bE und bW), die nach der Heterodimerisierung zweier Proteine unterschiedlichen allelischen Ursprungs als aktiver Transkriptionsfaktor agieren (Kämper et al., 1995; Gillissen et al., 1992). Besitzen die fusionierten Zellen also kompatible *b*-Lozi, so kommt es zu einer morphologischen Veränderung, wodurch der Pilz zum filamentösen Wachstum wechselt (Abb. 1-1 ②). Die Antwort auf die Pheromonerkennung, in Form der *a*- und *b*-Genexpression, wird durch das Zusammenwirken zweier verschiedener Signalwege hervorgerufen, welche die Protein Kinase A bzw. die Mitogen-aktivierte Protein Kinase als Effektorinasen verwenden. Beide Signalkaskaden regulieren aber einen gemeinsamen, zentralen Transkriptionsfaktor, das HMG-Box Protein Prf1, das durch eine nuancierte Phosphorylierung seine Regulations-eigenschaften erlangt und so eine differenzierte *a*- und *b*-Gentranskription hervorruft (Kaffarnik et al., 2003; Feldbrügge et al., 2004). Das polare Wachstum des Dikaryons führt zu einer verstärkten distalen Vakuolenbildung und in regelmäßigen Abständen zu einer Septierung. Es entstehen so die für das filamentöse Wachstum charakteristischen leeren Abschnitte (Steinberg et al., 1998; Christensen, 1963). An geeigneter Stelle bildet die Infektionshyphe eine appressorienähnliche Struktur aus und penetriert die Pflanze (Abb. 1-1 ③). Der Mechanismus, den der Pilz dabei nutzt, ist derzeit noch wenig verstanden (Snetselaar und Mims, 1992). In der Pflanze wächst das Dikaryon zunächst überwiegend intrazellulär, und es bildet sich ein stark verzweigtes, septiertes Myzel (Banuett und Herskowitz, 1996; Snetselaar und Mims, 1992). Wenige Tage nach der Pflanzeninfektion lassen sich nahe der Penetrationsstelle erste Krankheitssymptome in Form von Nekrosen, Chlorosen und Anthocyanbildung feststellen (Banuett und Herskowitz, 1996). Zirka sechs Tage nach der Infektion lässt sich die Bildung von Tumoren beobachten, in denen das Myzel auch interzellulär wächst. Es kommt in der weiteren Entwicklung zu einer starken Proliferation der pilzlichen Filamente (Abb. 1-1 ④). Durch die Kernfusion erreicht *U. maydis* seine dritte Kernphase, das diploide Stadium. Es kommt später zur Bildung von sporogenen Hyphen, aus denen massenhaft Teliosporen hervorgehen (ca. $2,5-6 \cdot 10^9$ Telio-

1. im Folgenden auch Infektionshyphe genannt

sporen/cm³; Abb. 1-1 ⑤; Banuett und Herskowitz, 1996; Christensen, 1963). Die ausgereiften Tumore brechen auf, wodurch die stark melanisierten, diploiden Teliosporen entweichen können und durch Umwelteinflüsse verbreitet werden. Nach der Auskeimung dieser Teliosporen kommt es zur Meiose und der Freisetzung von einzelligen, haploiden Sporidien, wodurch sich der Lebenszyklus schließt (Abb. 1-1 ⑥; Christensen, 1963).

Unter artifiziellen Bedingungen kann der Lebenszyklus von *U. maydis* derzeit nicht vollendet werden, jedoch lassen sich viele Entwicklungsprozesse auch unter Laborbedingungen beobachten. Die Vermehrung der saprophytischen, haploiden Sporidien ist in Flüssig- sowie Festmedium leicht möglich und auch die filamentösen Entwicklungsstadien sind unter artifiziellen Bedingungen induzierbar. Die Ausbildung von Konjugationshyphen kann unter künstlichen Bedingungen auf zwei Arten induziert werden: zum einen

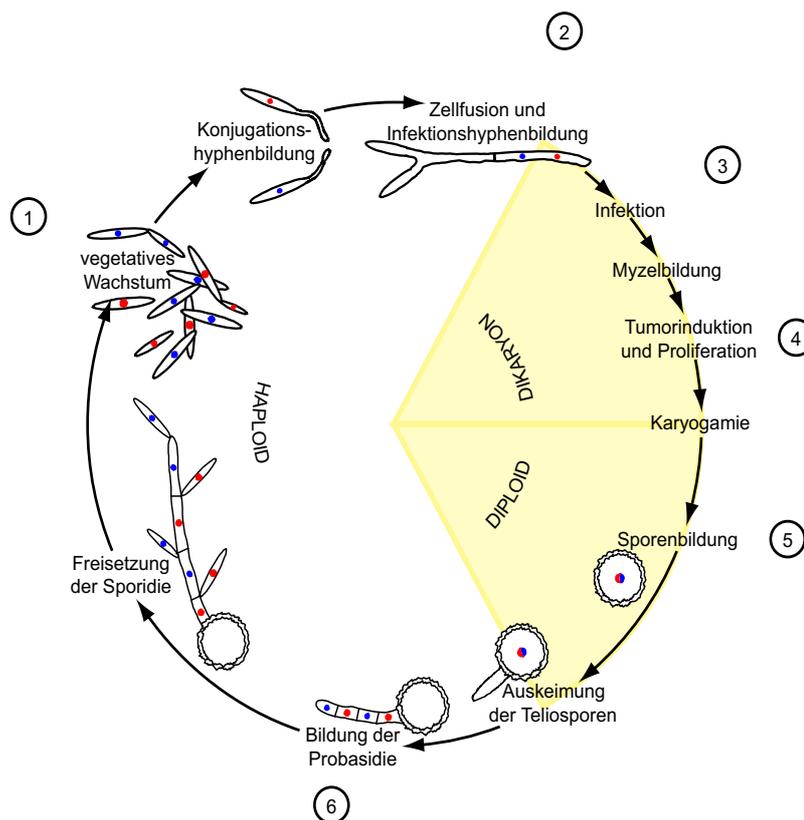


ABB. 1-1 Der Lebenszyklus von *Ustilago maydis*

Der gelb schattierte Bereich zeigt die pflanzenabhängigen Entwicklungsstadien des Lebenszyklus. Die vegetative Vermehrung der haploiden Sporidien erfolgt durch Knospung ①. Nach der Fusion zweier kompatibler Sporidien kommt es zu einer morphologischen Veränderung, und es bildet sich ein dikaryotisches Filament ②, welches über eine appressorienähnliche Struktur die Pflanze penetriert ③. Im Tumor (Galle) findet eine starke Proliferation des Pilzmycels statt ④. Nach der Kernfusion kommt es zur Bildung der Brandsporen ⑤, die durch Ausbilden des Promycels auskeimen ⑥ und Sporidien freisetzen.

durch die Gabe von synthetischem Pheromon in Flüssigmedium (Spellig et al., 1994), zum anderen durch die Stimulation mit einer kompatiblen Sporidie, was zur Paarung führt. Die Paarung von kompatiblen Sporidien und die darauf folgende Bildung einer dikaryotischen Hyphe kann im Labor auf aktivkohlehaltigem Festmedium erfolgen (Schulz et al., 1990; Spellig et al., 1994; Szabo et al., 2002). Kolonien von filamentös wachsenden Zellen besitzen durch ihr ausgeprägtes Luftmyzel ein weißes, pelzartiges Aussehen. Kolonien von haploiden Sporidien besitzen, im Gegensatz zu den filamentös wachsenden Zellen, auf aktivkohlehaltigem Festmedium ein grüliches Aussehen (Puhalla, 1968). Der Entwicklungsabschnitt von der Bildung appressorienähnlichen Infektionsstrukturen, über die Karyogamie, bis hin zur Produktion von sexuellen Sporen ist derzeit noch strikt an die Interaktion mit der Wirtspflanze gekoppelt und konnte unter künstlichen Bedingungen noch nicht beobachtet werden. Das Auskeimen der diploiden Teliosporen und die Bildung der haploiden Sporidien können allerdings unter Laborbedingungen wieder erfolgen.

In den vergangenen Jahrzehnten wurde für *U. maydis* ein großes Spektrum an molekularen Methoden entwickelt. Dadurch ist eine detaillierte molekulargenetische Untersuchung des Organismus möglich. Die Integration von Vektoren mit unterschiedlichen Resistenzmarkern durch die homologe Rekombination ermöglicht das Erzeugen von Gendelektionsmutanten für revers-genetische Ansätze. Ein PCR-basiertes Genaustauschsystem ermöglicht einen effizienten Austausch von endogenen Sequenzabschnitten durch veränderte Bereiche (Kämper, 2004). Brachmann et al. bauten dieses System aus und stellten ein Kassettensystem für die einfache Klonierung von Genmanipulationswerkzeugen (Gendelektion, Promotoraustausch, Genaustausch, kombinatorischer Promotor- und Genaustausch) zur Verfügung. Durch den modularen Aufbau ist dieses System problemlos durch weitere Reporter-, Resistenz- und Promotorkassetten erweiterbar (Brachmann et al., 2004). Für zellbiologische Untersuchungen sind verschiedene Färbetechniken zur Visualisierung subzellulärer Strukturen etabliert (Steinberg et al., 2001; Banuett und Herskowitz, 2002; Wedlich-Söldner et al., 2002a; Straube et al., 2003). Und für eine Echtzeit-Beobachtung können verschiedene Varianten des grün fluoreszierenden Proteins (Gfp) (Spellig et al., 1996; Steinberg et al., 2001; Wedlich-Söldner et al., 2002b; Straube et al., 2003; Weber et al., 2003) und eine monomere Variante des rot fluoreszierende Proteins (mRfp) (diese Arbeit; Toews et al., 2004; Campbell et al., 2002) exprimiert werden.

Darüber hinaus sind Stämme verfügbar, die ein aktives bE/bW-Heterodimer exprimieren und dadurch zum filamentösen Wachstum wechseln können, ohne dass zuvor ein Fusionsereignis benötigt wird (Bölker et al., 1995; Brachmann, 2001).

Der kurze Lebenszyklus und die leichte Kultivierbarkeit unter Laborbedingungen, seine pflanzenpathogenen Eigenschaften und die Verfügbarkeit zahlreicher etablierter, molekularbiologischer Untersuchungsmethoden haben dazu beigetragen, dass *U. maydis* heute ein wichtiges, molekulargenetisches Modellsystem zur Untersuchung von DNA-Reparatur- (Holliday, 2004) sowie pathogenitätsrelevanten Mechanismen und zur Untersuchung des Zytoskeletts darstellt (zusammengefasst in Kahmann und Kämper, 2004; Feldbrügge et al., 2004; Basse und Steinberg, 2004).

Durch die im Juni 2003 von der Pilzgenominitiative des Broad Instituts veröffentlichte, 20,5 Mb große Genomsequenz wurde der Modellcharakter von *U. maydis* unterstrichen. Seit März 2004 stehen die Daten des *U. maydis* Genomprojekts in der zweiten Version zur Verfügung, die u. a. die Ergebnisse einer automatischen Genannotation bereitstellt (http://www.broad.mit.edu/annotation/fungi/ustilago_maydis/).

1.2 RIBONUKLEOPROTEINKOMPLEXE

Eukaryontische Zellen haben zahlreiche Mechanismen zur Regulation einer Genfunktion entwickelt. Heute geht das Interesse weit über die initiale Promotormodulation hinaus, weshalb in den letzten Jahren intensiv auch an ko- und posttranskriptionellen Prozessen geforscht wurde. Während der Transkription erhält die entstehende Prä-mRNA an ihrem 5'-Ende eine modifizierte CAP-Struktur, Introns werden durch Spleißen entfernt und das 3'-Ende der Prä-mRNA wird abgetrennt und polyadenyliert (Maniatis und Reed, 2002). Die reife mRNA wird anschließend aus dem Zellkern, in das Zytoplasma exportiert und dort translatiert. Diese Ereignisse beruhen auf ko- und posttranskriptionellen Prozessen, die in einem hohen Maße abhängig von (Prä-)mRNA-erkennenden *trans*-aktiven Proteinfaktoren sind. Durch die Rekrutierung von Kofaktoren werden funktionelle Ribonukleoproteinkomplexe (RNP) zusammengesetzt, die bestimmte katalytische Funktionen besitzen. Der RNP stellt die funktionelle Form dar, in der Prä-mRNA und mRNA in der Zelle vorkommen und ist entscheidend für das RNA-Schicksal und somit für die spätere Genfunktion (Dreyfuss et al., 2002). Eine Schlüsselrolle bei RNA/Protein-

Interaktionen und der RNP-Assemblierung nehmen die RNA-bindenden Proteine (RBP) ein, die meist einen modularen Aufbau besitzen und eine bis mehrere RNA-bindende Domänen von jeweils 60 - 320 Aminosäuren Länge enthalten (Kielkopf et al., 2004; Musco et al., 1996; Mian, 1997; St Johnston et al., 1992; Zhang et al., 1997; Zamore et al., 1997). Die verschiedenen Struktur motive der an der RNA-Bindung beteiligten Domänen definieren die verschiedenen Klassen von RNA-bindenden Proteinen. In Eukaryonten gehören die meisten Domänen einer der folgenden vier, durch ihre Primär-, Sekundär- und Tertiärstruktur gut definierten Proteinklassen an: die Pumilio-Homologie-Domäne, das doppelsträngige RNA bindende Motiv, die K-Homologie-Domäne und das RNA Erkennungsmotiv (<http://smart.embl.de/>).

1.2.1 RNA-bindende Domänen

Das RNA-Erkennungsmotiv

Das RNA-Erkennungsmotiv (*RNA recognition motif*, RRM) ist das in den letzten 20 Jahren am besten untersuchte Strukturmotiv der RNA-bindenden Domänen. Dies begründet sich darauf, dass es, mit derzeit mehr als 7000 identifizierten Domänen in über 4100 bekannten Proteinen, die am weitesten verbreitete RNA-Bindedomäne ist (<http://smart.embl.de/>). Die Konsensussequenz der RRM-Domäne besteht aus 90 - 100 Aminosäuren, die in ihrer Sekundärstruktur zu einem α/β -Sandwich mit einer $\beta_1\text{-}\alpha_1\text{-}\beta_2\text{-}\beta_3\text{-}\alpha_2\text{-}\beta_4$ Topologie gepackt sind (Kielkopf et al., 2004). Die Kristallstruktur konnte erstmals für die RRM-Domäne von U1A ermittelt werden (Nagai et al., 1990) und durch Kristallstrukturen anderer Proteine bestätigt werden (Handa et al., 1999; Price et al., 1998; Deo et al., 1999; Oubridge et al., 1994; Wittekind et al., 1992). In ihrer Tertiärstruktur bilden die beiden α -Helices die Grundlage für die Ebene aus den vier antiparallel angeordneten Faltblättern. Die zentralen β -Stränge der Tertiärstruktur (β_1 und β_3 ; Abb. 1-2A und B) enthalten die für diese Domänenklasse typischen Submotive RNP1 und RNP2. Das Sequenzmotiv RNP1 ist acht Aminosäuren lang und besitzt die Konsensus-Sequenz [RK]-G-[FY]-[GA]-[FY]-[ILV]-X-[FY]². Bei dem Sequenzmotiv RNP2 handelt es sich um ein Hexamer mit der Konsensus-Sequenz [ILV]-[FY]-[ILV]-X-N-L³, das ungefähr 30

2. X stellt eine beliebige Aminosäure dar

3. X stellt eine beliebige Aminosäure dar

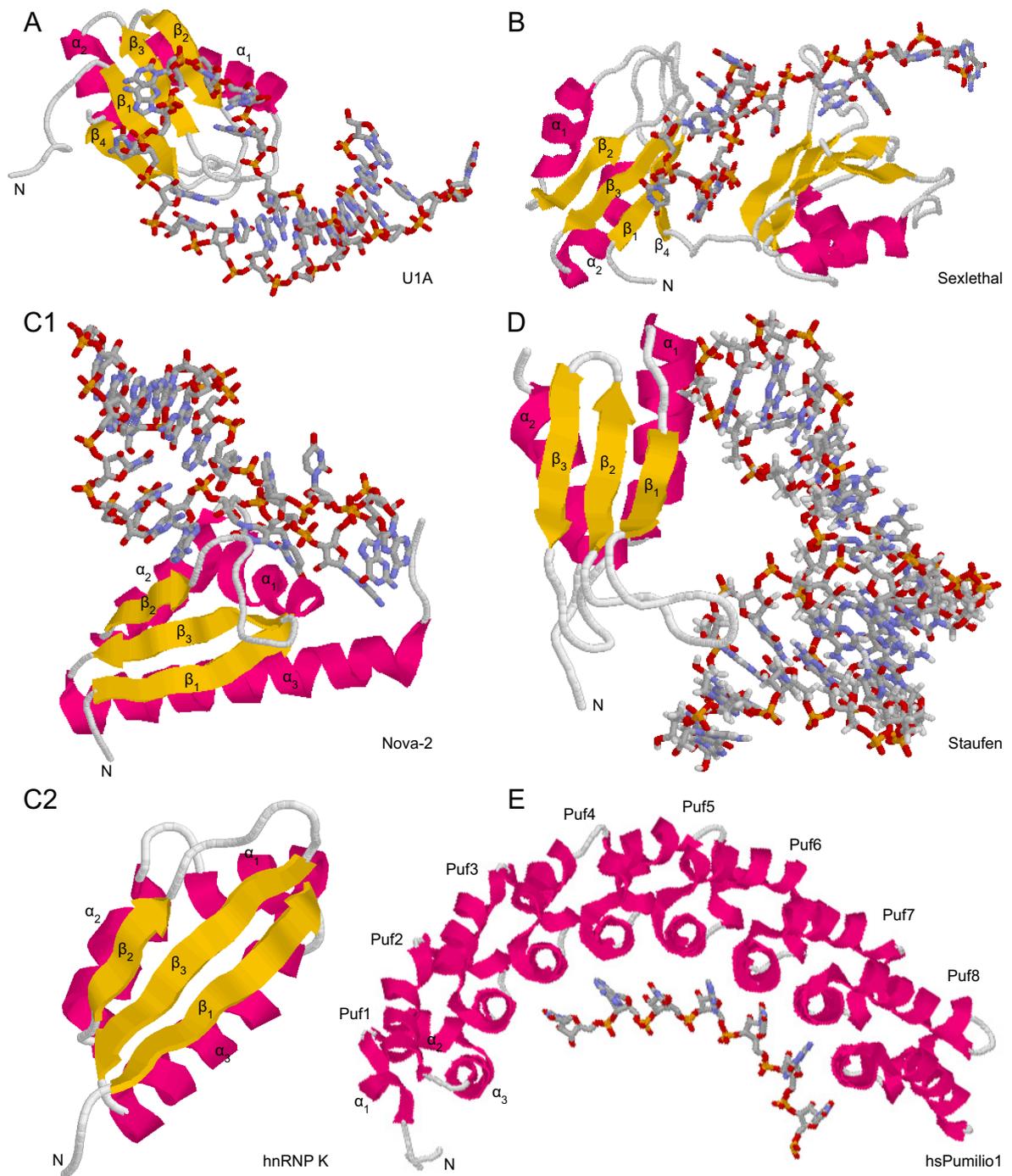


ABB. 1-2 Struktureller Vergleich von verschiedenen RNA-Bindedomänen komplexiert mit RNA

Die Banddiagramme der RRM- (A und B), KH- (C), DSRM- (D) und Pumilio-Domänen (E) sowie die Strichdiagramme der gebundenen RNAs wurden mit RasMol V2.6 (Sayle und Milner-White, 1995) erzeugt. Die N-Termini der Strukturen sowie deren α -Helices und β -Stränge sind entsprechend der Beschreibung im Text markiert. Äquivalente Strukturelemente sind entsprechend farblich markiert. (A und B) Kristallstruktur der alleinstehenden RRM-Domäne von hsU1A (PDB ID: 1URN; Oubridge et al., 1994) und der gemeinsam agierenden RRM-Domänen RRM1 und RRM2 aus dem *D. melanogaster* Sxl Protein (PDB ID: 1B7F; Handa et al., 1999) — beide mit gebundener RNA. (C) Repräsentative Faltung der dritten KH-Domäne aus dem menschlichen Nova-2 Protein (C1; PDB ID: 1EC6; Lewis et al., 2000) und dem menschlichen hnRNP K (C2; PDB ID: 1KHM). Es handelt sich hierbei um zwei Domänen vom Typ I. (D) NMR-Struktur des dritten DSRM aus dem *D. melanogaster* Staufen Protein komplexiert mit einer RNA-Haarnadelschleife (PDB ID: 1EKZ; Ramos et al., 2000). (E) Kristallstruktur der Pumilio-Homologie-Domäne aus dem menschlichen Pumilio1 Protein im Komplex mit RNA (PDB ID: 1M8W; Wang et al., 2002).

Aminosäuren N-terminal zu RNP1 liegt (Kielkopf et al., 2004). Konservierte, geladene und aromatische Aminosäuren der RNP-Regionen sind durch ihre exponierte Lage an der RNA-Bindung beteiligt (Deardorff und Sachs, 1997; Lisbin et al., 2000; Wan et al., 2001). Kristallstrukturen wurden von Einzel-RRM/RNA-Komplexen für die Proteine U1A (Abb. 1-2 A) und U2B^{''} und von Tandem-RRM/RNA-Komplexen u. a. für Sexlethal (Sxl) aus *Drosophila melanogaster* ermittelt (Abb. 1-2 B; Price et al., 1998; Oubridge et al., 1994; Handa et al., 1999; Deo et al., 1999; Allain et al., 2000b).

Die RRM-Domäne bindet sequenz- oder strukturspezifisch einzelsträngige RNA. Für die spezifische Bindung ist eine einzelne Domäne zwar hinreichend (Allain et al., 1996; Deardorff und Sachs, 1997; Query et al., 1989; Scherly et al., 1990a; Scherly et al., 1990b), deutlich häufiger wird die Spezifität aber durch die Interaktion mehrerer zusammenarbeitender RRM-Domänen vermittelt (Allain et al., 2000b; Allain et al., 2000a; Deo et al., 1999; Wang und Tanaka Hall, 2001).

Die K-Homologie-Domäne

Eine weitere sehr häufige RNA-Bindedomäne ist die K-Homologie-Domäne (KHD), die erstmals in einem zentralen Prä-mRNA-bindenden Protein, dem menschlichen heterogenen nuklearen Ribonukleoprotein (hnRNP) K, identifiziert wurde. Sie ist, ähnlich wie die RRM-Domäne, in sehr vielen RNA-assoziierten Proteinen vertreten (2630 Domänen in 1510 Proteinen; <http://smart/embl.de/>), die sehr unterschiedliche zelluläre Funktionen übernehmen. Die KH-Domäne ist ein evolutionär hoch konserviertes Motiv (Siomi et al., 1993), das aus ungefähr 70 Aminosäuren gebildet wird (Musco et al., 1996). Interessanterweise findet man zwei unterschiedliche KH-Domänen, die in eine $\beta_1\text{-}\alpha_1\text{-}\alpha_2\text{-}\beta_2$ -Einheit gefaltet sind. Zu diesem Core-Motiv besitzen die KH-Domänen vom Typ II (z. B. ribosomales Protein S3 aus *Thermus thermophilus*) eine zusätzliche N-terminale $\alpha_0\text{-}\beta_0$ -Verlängerung, wohingegen die KH-Domänen vom Typ I (z. B. hnRNP K) eine C-terminale $\beta_3\text{-}\alpha_3$ -Verlängerung besitzen (Grishin, 2001). Durch eine evolutionäre Veränderung der Proteinfaltung und die Reorganisation der β -Faltblätter zeigen beide Typen, unabhängig davon wie sie entstanden sind, eine architektonisch identische Struktur. NMR-Spektroskopie (Musco et al., 1997; Musco et al., 1996) und röntgenkristallographische Untersuchungen (Lewis et al., 1999) zeigten, dass die KH-Domäne eine α/β -Struktur besitzt, die den DSRM- (siehe unten) und RRM-Domänen gleicht (Abb. 1-2). So sind

auch hier die β -Faltblätter antiparallel angeordnet und auf eine Ebene aus α -Helices gepackt. Charakteristisch für die KH-Domäne sind zwei invariable Glycinreste, welche die C- bzw. N-Kappe der beiden α -Helices darstellen und zwei variable Aminosäuren einfassen. Diese bilden eine exponierte Schleife zwischen beiden α -Helices (α_1 und α_2) der Core-Sequenz, die an der RNA-Bindung beteiligt ist. Den extensiven, sequenzspezifischen RNA-Kontakt vermittelt ein darüber hinausgehender Bereich, der aus der α -Helix α_1 , dem folgenden Turn und dem β -Strang β_2 besteht (Abb. 1-2C1 und C2; Lewis et al., 2000; Grishin, 2001). Die Anzahl, mit der KH-Domänen innerhalb eines Proteins auftreten, ist unterschiedlich: Sie können einzeln, aber auch in multiplen Kopien vorliegen. Im Hühner-Vigilin Protein und auch im *Saccharomyces cerevisiae* Scp160p liegt die KH-Domäne beispielsweise in 14facher Kopie vor (Musco et al., 1996; Siomi et al., 1993; Wintersberger et al., 1995).

Das dsRNA-bindende Motiv (DSRM)

Das dritthäufigste RNA-Bindemotiv (Fierro-Monti und Mathews, 2000) ist ungefähr 65 Aminosäuren lang und in zahlreichen dsRNA-bindenden Proteinen zu finden, wie z. B. Staufen aus *D. melanogaster* und RNaseIII aus *Escherichia coli* (Mian, 1997; St Johnston et al., 1992). Insgesamt konnte die DSRM-Domäne bisher 927-mal in 576 Proteinen identifiziert werden (<http://smart.embl.de/>). Die zwei α -Helices und drei β -Faltblätter, aus denen die Domäne besteht, sind in eine α_1 - β_1 - β_2 - β_3 - α_2 Topologie gepackt. Es entsteht eine Ebene aus antiparallelen β -Faltblättern, die auf den beiden α -Helices liegt. Für die RNA-Bindung sind drei Bereiche wichtig: (1) Die Schleife zwischen den β -Strängen, β_1 und β_2 , interagiert mit verschiedenen 2'-OH-Gruppen der dsRNA. (2) Mit dem Rückrad des von der ersten Schleife gebundenen Bereichs interagiert die zweite große Schleife, die von den Aminosäuren zwischen dem β_3 -Strang und der α_2 -Helix gebildet wird. (3) Die α_1 -Helix bindet ebenfalls an die RNA, wobei der Mechanismus noch unklar ist (Abb. 1-2 D; Ramos et al., 2000; Ryter und Schultz, 1998).

Die Pumilio-Homologie-Domäne

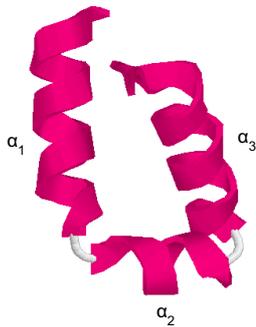


ABB. 1-3 Kristallstruktur des PUM-Repeats
Vergrößerung eines einzelnen Repeats aus der PUM-Domäne (PDB ID: 1M8W; Wang et al., 2002). Es besteht aus drei, triangulär angeordneten Helices. Siehe auch Abb. 1-2 E.

Die Pumilio-Homologie-Domäne (PUM, auch: PUF) ist eine konservierte RNA-bindende Domäne, die sich strukturell von den bisher beschriebenen Domänen unterscheidet, aber eine ähnliche Funktionsweise besitzt: Sie kann ebenfalls an *cis*-Elemente binden (Wickens et al., 2002). Die PUM- oder PUF-Domäne ist benannt nach dem *D. melanogaster* Pumilio Protein und dem *Caenorhabditis elegans* Translationsregulator FBF (*fem3-binding factor*; Zamore et al., 1997; Zhang et al., 1997). Die Pumilio-ähnlichen Proteine besitzen eine charakteristische Domäne, die sich in der Regel aus acht aufeinander folgenden Repeats (jeder aus ungefähr 40 Aminosäuren) zusammensetzt (Zamore et al., 1997; Zhang et al., 1997). Jedes Repeat wird aus drei α -Helices (α_1 - α_2 - α_3) gebildet, die triangulär angeordnet sind und dem gesamte Cluster eine sichelförmig Struktur verleihen (Abb. 1-3 und Abb. 1-2 E).

Auf der Innenseite des Clusters liegen die zentralen α_3 -Helices der Tandem-Repeats nebeneinander, wodurch die konservierten Aminosäuren benachbarter α_3 -Helices ausgerichtet werden (Wang et al., 2001; Edwards et al., 2001). Aufgrund der strukturellen Anordnung der einzelnen Repeats bilden sich zwei ausgedehnte Oberflächen, in Form einer konkaven Innenseite und einer konvexen Außenseite. Die sequenzspezifische Bindung von RNA findet auf der Innenseite der Domäne statt. Es ist hierfür das gesamte Cluster der PUM-Domäne notwendig (Edwards et al., 2001; Wang et al., 2001; Zhang et al., 1997; Zamore et al., 1997; Wharton et al., 1998). Im Gegensatz zu den anderen bisher beschriebenen Domänen, ist für die PUM-Domäne bekannt, dass sie synchron zur RNA-Bindung mit Koregulatorproteinen interagieren kann (Kraemer et al., 1999; Luitjens et al., 2000; Sonoda und Wharton, 1999; Sonoda und Wharton, 2001). Diese Protein/Protein-Wechselwirkungen finden vermutlich an der konvexen Außenseite der Domäne statt (Sonoda und Wharton, 1999; Sonoda und Wharton, 2001; Wang et al., 2001; Edwards et al., 2001). Die bisher bekannten Interaktionspartner von PUM-Proteinen stammen aus Familien, deren Vertreter ebenfalls mit RNA interagieren. Es können so Ribonukleoproteinkomplexe gebildet werden, die je nach mRNA-Sequenz differieren. Man kann aus den bis heute untersuchten Interaktionen zwischen PUM-Proteinen und RNA ableiten, dass

Pumilio-ähnliche Proteine die Expression ihrer Target-RNA entweder durch die Repression der Translation oder durch Verstärken des RNA-Abbaus mindern (Wickens et al., 2002).

1.2.2 Funktionen von RNA-bindenden Proteinen

Wie oben bereits erwähnt, spielen RNA-bindende Proteine in Eukaryonten eine zentrale Rolle bei der posttranskriptionellen Regulation der Genexpression. Die vermittelten Prozesse sind durch die hoch dynamische Zusammensetzung der RNPs sehr facettenreich und ermöglichen dadurch eine feine Regulation. Die Informationen dafür stellt das mRNA-Molekül in Form von spezifischen Nukleotidsequenzen und/oder sekundären Strukturen zur Verfügung, wodurch viele verschiedene regulierende Ereignisse (z. B. der Spleißprozess, die mRNA-Stabilität und der Translationsprozess) gesteuert werden.

Das an C-reiche Sequenzabschnitte bindende hnRNP K Protein ist u.a. an der Rekrutierung von Spleißfaktoren beteiligt, dient darüber hinaus aber auch als integrative Plattform zur Kopplung von Signalkaskaden und RNA-prozessierender Faktoren (Bomsztyk et al., 2004). Das neuronale HuD Protein aus der ELAV-Familie (*embryonic lethal and abnormal vision*) ist ein RRM-Protein, welches aus drei RRM-Domänen besteht. Es ist ein entwicklungspezifisches, in wachsenden Neuronen, stark exprimiertes Protein, das an der posttranskriptionellen Regulation des *GAP-43*⁴ Gens beteiligt ist. HuD bindet AU-reiche Elemente in der 3'-UTR der *GAP-43* mRNA, stabilisiert sie und verhindert dadurch ihren Abbau (Perrone-Bizzozero und Bolognani, 2002).

Die Definition der Körperachsen während der transkriptionell stillen Phase der Embryonalentwicklung von *D. melanogaster* ist ein klassisches Beispiel für die posttranskriptionelle Regulation durch Translationsinhibition. Die Entstehung von Kopf und Abdomen wird durch die Translationsregulation zweier maternalen mRNAs (*bunchback* (*hb*) und *caudal*) initiiert. Für die Entwicklung des Abdomens wird eine effiziente Translationsinhibition der *caudal* mRNA im Anterior benötigt, die Entwicklung des Kopfs wiederum benötigt die Inhibition der *hb* mRNA-Aktivität im Posterior des Embryos (Palacios und St Johnston, 2001). Der Prozess der *hb* Translationskontrolle wird durch die sequenz-

4. GAP-43 (*growth associated protein*) wird hauptsächlich während des neuronalen Verbindungsaufbaus exprimiert. Es stellt eine wesentliche Determinante für die neuronale Entwicklung und synaptische Plastizität dar (Benowitz und Routtenberg, 1997).

spezifische Rekrutierung des RNA-bindenden Pumilio Proteins an *cis*-Elementen in der 3'-UTR der *hb* mRNA eingeleitet (Palacios und St Johnston, 2001). Pumilio rekrutiert dann RNA-abhängig, über seine Protein/Protein-Interaktionsdomäne (siehe oben), das Nanos Protein in einen ternären Komplex an die *hb* 3'-UTR und in einem dritten Schritt das Brat Protein in den dann aktiven quartären Translationsinhibitionskomplex (Sonoda und Wharton, 1999; Sonoda und Wharton, 2001).

Meist gibt es aber ein Zusammenspiel verschiedener regulatorischer Prozesse, wie es am Beispiel der *D. melanogaster* Dosiskompensation deutlich wird. Hier sind die Kontrolle des Spleißereignisses und der Translation eng miteinander verknüpft. Bei der Dosiskompensation männlicher Fliegen werden die Gene des einzelnen X-Chromosoms etwa zweifach hypertranskribiert. Hierfür wird die Translation und Akkumulation der *msl-2*⁵ mRNA in weiblichen Fliegen durch das weibchenspezifische RNA-bindende Protein Sxl verhindert. Sxl fungiert in diesem Fall als Translationsregulator, ist aber auch als Spleißfaktor während der Geschlechtsentwicklung identifiziert (Bell et al., 1991; Sosnowski et al., 1989). In den UTRs der *msl-2* Prä-mRNA befinden sich sechs Uridin-reiche Regionen, die Sxl über seine Tandem-RRM-Domänen bindet. Die Bindung von Sxl an die zwei *cis*-Elemente in der 5'-UTR verhindert zum einen das Spleißen eines fakultativen Introns im Kern, zum anderen ist aber die Bindung an die 3'-gelegene Bindestelle in der 5'-UTR im Zusammenspiel mit den zwei 3'-gelegenen Bindestellen in der 3'-UTR wichtig für eine effiziente Translationsrepression im Zytoplasma. Durch die translationsreprimierende Bindung von Sxl an die Elemente in der 5'- und 3'-UTR der *msl-2* Prä-mRNA wird eine stabile Interaktion der 40S ribosomalen Untereinheit mit der *msl-2* mRNA und damit die Translationsinitiation verhindert (Gebauer et al., 2003; Kuersten und Goodwin, 2003; Dean et al., 2002). Weiter konnten Grskovic et al. zeigen, dass der C-terminal an die zweite RRM-Domäne angrenzende Bereich von sieben Aminosäuren wichtig ist für eine effiziente Translationsrepression und eine Protein/Protein-Interaktionsdomäne darstellt (Grskovic et al., 2003). Dieses anscheinend wichtige Zusammenspiel von RNA- und gleichzeitiger Proteinbindung für die Translationskontrolle ist aus dem vorangegangenen Beispiel der Pumilio-vermittelten Translationskontrolle bereits bekannt und lässt eine Systematik vermuten (Dean et al., 2002).

5. Das *msl-2* (*male specific lethal-2*) Gen kodiert für die essenzielle funktionelle Untereinheit des MSL-Komplexes, welcher die Hypertranskription der auf dem einzelnen X-Chromosom männlicher Fliegen gelegenen Gene einleitet (Bashaw und Baker, 1995).

Ribonukleoproteinkomplexe sind allerdings keine statischen Komplexe, im Gegensatz, sie stellen hoch dynamische Systeme dar, die sich permanent verändern. So verändert auch das Spleißen die Zusammensetzung eines RNP, durch Dissoziation und Assoziation von Proteinen in einem spleißabhängigen und sequenzunabhängigen Prozess. Etwa 20 Nukleotide stromaufwärts der Exon-Exon-Übergang wird dadurch ein Komplex gebildet (*exon-exon junction complex*, EJC; Le Hir et al., 2000a; Le Hir et al., 2000b; Kim et al., 2001). Komponenten des EJC sind am Kernexport und Nonsense-vermittelten mRNA-Abbau (NMD) sowie an der zytoplasmatischen Lokalisation beteiligt (Dreyfuss et al., 2002; Reed und Hurt, 2002; Schell et al., 2002; Maniatis und Reed, 2002; Mazumder et al., 2003; Kress et al., 2004). Die mRNA wird mit neuen Informationen beladen, die nicht aus Elementen in der Nukleotidsequenz zu entnehmen sind, sondern individuell erzeugt und gespeichert werden: „The message is the mRNP“ (Dreyfuss et al., 2002).

Während die RNA-bindenden Proteine in höheren Eukaryonten schon intensiv untersucht sind, befinden sich die Untersuchungen in niederen Eukaryonten mit der Ausnahme von *S. cerevisiae* noch in den Anfängen. Einen Zusammenhang zwischen Entwicklungsprozessen und RNA-bindenden Proteinen lässt sich aber auch hier beobachten. So ist beispielsweise das PufA Protein aus *Dictyostelium discoideum* an der nährstoffmangelinduzierten Transition vom vegetativen Wachstum zur Sporengese beteiligt. Das PufA Protein wird durch eine YAK-Kinase reguliert und reguliert im Gegenzug translationell die katalytische Untereinheit der cAMP-abhängigen Proteinkinase, PKA-C, durch Interaktion mit Elementen in der 3'-UTR der *pkaC* mRNA (Souza et al., 1999). In *S. cerevisiae* ist das Pumilio Protein Puf5p an der Regulation der Zellteilungsrate beteiligt. Der Verlust des *puf5* Gens führt dazu, dass sich die Hefezellen weniger oft teilen, wohingegen sich Zellen die *puf5* überexprimieren öfter teilen (Kennedy et al., 1997). Weitere Beispiele sind die, vier bzw. zwei RRM-Domänen tragenden, Proteine Nrd1 und Msa1 aus *Schizosaccharomyces pombe* die als negative Regulatoren bei der sexuellen Differenzierung agieren (Jeong et al., 2004).

1.2.3 mRNA-Lokalisation

Im vorangegangenen Abschnitt wurde aufgezeigt, dass die RNPs (und die RBPs im Speziellen) das Schicksal eines RNA-Moleküls auf vielen Ebenen differenziert steuern, wodurch ein entscheidender individueller Einfluss auf die Genexpression genommen wird. Ein Mechanismus dieser regulatorischen Prozesse ist die mRNA-Lokalisation. Sie

stellt einen extrem effizienten Mechanismus zur asymmetrischen Verteilung von Genprodukten in ein subzelluläres Kompartiment oder in eine spezifische Region einer Zelle oder Embryos dar und ermöglicht dadurch u. a. die Zellpolarisation oder -prädestination. (Kloc et al., 2002; Palacios und St Johnston, 2001). Die Transkriptlokalisation ist für sehr unterschiedliche Prozesse wichtig: Hühner-Fibroblasten akkumulieren große Mengen β -aktin mRNA an ihrer Vorderseite, um dort lokal große Mengen des für eine gerichtete Bewegung notwendigen β -Aktin zu produzieren (Condeelis und Singer, 2005). *D. melanogaster* erzeugt durch die Transkriptlokalisation eine lokale Translation (*oskar* mRNA-Lokalisation) oder einen Proteingradienten (*bunchback* mRNA-Lokalisation). Beides sind essenzielle Prozesse während der Embryonalentwicklung (Palacios und St Johnston, 2001). Darüber hinaus kann durch eine spezifische Verteilung von mRNA eine Zellspezifität vermittelt werden, wie beispielsweise bei der Regulation des Paarungstypwechsels in *S. cerevisiae*.

So verschieden wie die Prozesse, sind auch die Mechanismen mit denen eine asymmetrische Transkriptverteilung erwirkt werden kann: (1) lokaler Abbau/lokale Stabilisierung, (2) Retention⁶ und (3) der weit verbreitete aktive Transport (Kloc et al., 2002). Diese Mechanismen treten oft in Kombination auf und sind nur schwer voneinander zu trennen, was in den kommenden Beispielen noch deutlich wird. Im Gegensatz zur Lokalisierung durch Abbau bzw. Stabilisierung von mRNA, wodurch z. B. der maternale *hsp83* mRNA-Gradient in der befruchteten Eizelle von *D. melanogaster* erzeugt wird, sind der aktive mRNA-Transport und die Transkriptverankerung abhängig vom Zytoskelett.

Im vorangegangenen Abschnitt 1.2.2 wurde bereits beschrieben, dass die Prozesse des RNA-Metabolismus keine separaten Ereignisse darstellen, sondern meist eng zusammenspielen. Die Verknüpfung von mRNA-Lokalisation und Translationskontrolle ist oftmals obligatorisch und nur schwer voneinander zu trennen, so im oben beschriebenen Beispiel zur Pumilio-abhängigen Translationsinhibition während der Embryonalentwicklung von *D. melanogaster*. Die Translation der *hb* mRNA wird dabei nur im Posterior des Embryos inhibiert. Dies liegt an der posterioren Lokalisation des Nanos Proteins, das essenziell für den aktiven Translationsinhibitionskomplex ist — Pumilio und Brat Protein sind hingegen gleichmäßig im Embryo verteilt (Sonoda und Wharton, 2001; Palacios und St Johnston, 2001). Die lokale Akkumulation des Nanos Proteins wird durch eine kortikale aktinabhän-

6. RNA-Lokalisation durch Verankerung der diffundierenden Transkripte

gige Retention der *nanos* mRNA erzielt (Forrest und Gavis, 2003). Der einheitlich im Embryo verteilte Translationsrepressor Smaug unterdrückt die Translation der *nanos* mRNA durch die Bindung an Elemente in ihrer 3'-UTR (Ephrussi et al., 1991; Smith et al., 1992). Erst nach der Lokalisation im Posterior wird die mRNA aktiviert und translatiert (Gavis und Lehmann, 1992). Für die Aktivierung der *nanos* mRNA ist das im Posterior lokalisierte Oskar Protein essenziell, dessen Lokalisation wiederum vom Mikrotubulizytoskelett abhängt (Brendza et al., 2000) und darüber hinaus einen intakten EJC benötigt (Palacios et al., 2004; Mohr et al., 2001; Hachet und Ephrussi, 2001). Bereits im Zellkern wird also das zytoplasmatische Schicksal einer mRNA durch die Bildung von RNPs und der darin gespeicherten Information auf zahlreichen Ebenen mitbestimmt (Kuersten und Goodwin, 2003).

Die aktive mRNA-Lokalisation in den Embryos und Eizellen von *D. melanogaster* und *X. laevis* (Palacios und St Johnston, 2001; King et al., 2005), aber auch in Neuronen (Job und Eberwine, 2001) und in Oligodendrozyten (Carson et al., 1998) ist meist abhängig vom Zytoskelett: so auch bei der Lokalisation der *myelin basic protein* mRNA in Oligodendrozyten. Die Kinesin-abhängige Lokalisation der *myelin basic protein* mRNA in das Myelinkompartiment wird für die Bildung der Myelinscheide neuronaler Axone benötigt (Ainger et al., 1997). In Neuronen ist noch verhältnismäßig wenig über den aktiven mRNA-Transport bekannt. Es wurden die zwei Isoformen des tierischen Staufens Proteins, Staufen1 und Staufen2 als Bestandteile von Ribonukleoproteinkomplexen identifiziert. Der kleinere, Staufen1-haltige Komplex war mit zwei Transkripten stark angereichert: *BC1*, ein nicht-kodierendes Transkript und *CaMKII α* RNA, die α -Untereinheit der Ca^{2+} /Calmodulin-abhängigen Kinase II. Zusätzlich kofraktionierte mit Staufen1 auch die schwere Kinesin-Kette (Mallardo et al., 2003). Für die zweite, gehirnspezifische Isoform, Staufen2 konnte kürzlich gezeigt werden, dass es im Zellkern von hippokampalen Neuronen in RNPs assembliert. Diese werden anschließend exportiert und in distale Dendriten transportiert, wobei die vom Staufen2-RNP transportierten mRNAs derzeit noch unbekannt sind. Macchi et al. identifizierten aber auch in den Staufen2-RNPs die schwere Kinesin-Kette als Teil des Komplexes. Sie stellt die motoraktivitätsvermittelnde Untereinheit des Kinesin-Motorproteins dar und lässt durch ihre Anwesenheit einen mikrotubuliabhängigen Transport vermuten (Macchi et al., 2004).

Während der Langstreckentransport von mRNA in somatischen Zellen und wachsenden Neuronen meist über das Mikrotubulizytoskelett stattfindet, dient das Aktinzytoskelett überwiegend für den Kurzstreckentransport und ist an der Transkriptlokalisation beispielsweise in Hühner-Fibroblasten (β -aktin mRNA-Lokalisation), *D. melanogaster* (*prospero* mRNA-Bewegung in Neuroplasten) sowie *S. cerevisiae* beteiligt (Kloc et al., 2002).

Obwohl die aktive mRNA-Lokalisation überwiegend in höheren Eukaryonten untersucht wird, lässt sie sich auch in niederen Eukaryonten beobachten. Das heute wohl am besten untersuchte und am weitesten aufgeklärte System zur Transkriptlokalisation stammt aus *S. cerevisiae*. Es zeigt eine entwicklungsabhängige Regulation der Genexpression in der Bäckerhefe. Die homothallische Hefe *S. cerevisiae* kommt in den zwei kompatiblen Paarungstypen a bzw. α vor. Die Fusion zweier kompatibler haploider Zellen führt zur Bildung einer a/α diploiden Zelle, der sich Möglichkeiten zum Durchlaufen evolutionär vorteilhafter Prozesse eröffnen, z. B. die Meiose mit anschließender Sporenbildung. Während der Knospung hat eine Hefezelle die Möglichkeit ihren Paarungstyp von a nach α (oder vice versa) zu wechseln, wodurch einzelne Zellen einer Kolonie einen kompatiblen Paarungstyp erhalten und eine Selbstdiploidisierung stattfinden kann (Haber, 1998). Die Expression der für den Paarungstypwechsel wichtigen HO-Endonuklease wird von dem DNA-bindenden Protein Ash1p Tochterzellkern-spezifisch reprimiert. Während der Anaphase wird die für Ash1p kodierende *ash1* mRNA durch einen aktiven, aktinabhängigen Prozess an der distalen Knospenspitze lokalisiert. Der Prozess kommt durch die Assoziation des mRNA-Kargos mit dem Myosin V She1p/Myo4-Motorprotein zustande. Initiiert wird der Prozess durch die Bindung der *ash1* mRNA von dem RNA-bindenden Protein She2p im Zellkern der Mutterzelle. Vermutlich wird die *ash1* mRNA dadurch als Lokalisationstarget markiert. She2p besitzt im Gegensatz zu den an der Verankerung und der Translationskontrolle des mRNA-Kargos beteiligten Multi-KHD- und PUM-Proteine keine bisher bekannte RNA-bindende Domäne (Niessing et al., 2004). Der *ash1*/She2p-RNP wird im Zytoplasma durch das Linkerprotein She3p mit dem Motorprotein verbunden. Der Lokalisationsprozess ist derzeit noch unklar, da das Motorprotein Myo4p als *non-processive* Motorprotein identifiziert wurde. Es gibt daher zwei Hypothesen zum Transportmechanismus: Zum einen könnten die multiplen *cis*-Elemente in der *ash1* mRNA eine Bewegung des RNP erzeugen, zum anderen könnte das RNP die Funktion des Motorproteins über eine mögliche Wechselwirkung mit She4p, das vermutlich die Myosinmotorak-

tivität reguliert, kontrollieren. Unabhängig von der unklaren Motoraktivität, lokalisiert der heterotrimere Komplex die *ash1* mRNA in die Spitze der Tochterzelle, wo sie abhängig von weiteren RNA-bindenden Proteinen schwach verankert wird. Erst kürzlich konnte das Pumilio-ähnliche Protein Puf6p im *ash1* mRNP identifiziert werden (Gu et al., 2004). Es unterdrückt die Translation der *ash1* mRNA während des Transportprozesses. Erst nach einer erfolgreichen Lokalisation wird sie translatiert. Ash1p wird dann in den Nukleus der Tochterzelle segregiert und der Paarungstypwechsel durch die Repression der HO-Endonuklease-Expression unterdrückt (zusammengefasst in Gonsalvez et al., 2005). Durch eine Mikroarray-Analyse konnten bisher 22 weitere knospenlokalisierte Transkripte identifiziert werden, die alle mit Myo4p, She3p und She2p assoziieren. Es wird davon ausgegangen, dass sie dem gleichen Lokalisationsmechanismus unterliegen (Shepard et al., 2003).

1.3 ZIELSETZUNG UND FRAGESTELLUNG

Im Vorfeld dieser Arbeit konnten unter Verwendung einer bioinformatische Analyse 24 offene Leserahmen identifiziert werden, die für putativ RNA-bindende Proteine kodieren (M. Feldbrügge, pers. Mitteilung). Aufbauend auf diese Analyse war das Ziel dieser Arbeit, den Einfluss von RNA-bindenden Proteinen während der pathogenen Entwicklung von *U. maydis* näher zu untersuchen. Im Fokus der Untersuchungen sollte die für die Pathogenität von *U. maydis* essenzielle morphologische Transition vom hefeähnlichen ins filamentöse Wachstum und damit verbundene Prozesse liegen. Die Charakterisierungen der Deletionsmutanten sollten daher vornehmlich auf das Kreuzungsverhalten, das Filamentwachstum und die Pathogenität konzentriert sein. Die identifizierten Schlüsselproteine sollten im Kontext ko- bzw. posttranskriptioneller Prozesse detaillierter untersucht werden. Durch die subzelluläre Lokalisation und die Charakterisierung des Proteins sollten Rückschlüsse auf die Funktion der Proteine gezogen werden und der Zusammenhang zwischen der Funktion des Proteins und dem Phänotyp der Deletionsmutante hergestellt werden.



2.1 IDENTIFIZIERUNG VON WEITEREN POTENZIELLEN RNA-BINDENDEN PROTEINEN IN *U. MAYDIS*

2.1.1 Bioinformatische Analyse zur Identifizierung von RBPs

Durch eine bioinformatische Analyse zur Identifizierung von potenziell RNA-bindenden Proteinen (RBP) in *U. maydis*, konnten im Vorfeld dieser Arbeit bereits 24 offene Leserahmen identifiziert werden (M. Feldbrügge, pers. Mitteilung). Nach der Veröffentlichung der Genomsequenz durch das Broad Institut wurden weitere, in der von Bayer CropScience veröffentlichten Genomsequenz nicht enthaltene offene Leserahmen (ORF) identifiziert, deren Produkte RNA-bindende Domänen tragen. Hierfür wurden, analog zur initialen Analyse, bekannte RNA-bindende Proteine von Pilzen und Modellorganismen wie *Arabidopsis thaliana*, *D. melanogaster*, *C. elegans* und *Homo sapiens* mit Hilfe der SMART Datenbank ausgewählt (<http://smart.embl.de/>; Schultz et al., 1998; Letunic et al., 2004; Becht et al., 2005; siehe in “Material und Methoden”, S. 107). Die Proteinsequenzen dieser Beispiel-Proteine wurden dann mittels BLAST (Altschul et al., 1990) mit den vorhergesagten ORFs von *U. maydis* verglichen (http://www.broad.mit.edu/annotation/fungi/ustilago_maydis/). Anschließend wurden die ermittelten Proteine aus *U. maydis* einer SMART-Analyse unterzogen. Ein Protein wurde als mögliches RBP eingestuft, wenn für eine RNA-Bindedomäne die Wahrscheinlichkeit der Vorhersage höher als der etablierte Schwellenwert war (<http://smart.embl.de/>; Abb. 2-1; Tabelle 2-1). Durch diese bioinformatische Analyse konnten drei weitere offene Leserahmen identifiziert werden, die für PUM- bzw. KHD-Proteine kodieren; sie wurden mit *pum4*, *pum5* bzw. *khd5* bezeichnet. Das durch *pum4* kodierte Protein Pum4 trägt eine typische Pumilio-Domäne aus acht Tandem-Repeats im C-Terminus. Bei dem Protein Pum5 hingegen handelt es sich um ein eher atypisches Pumilio-ähnliches Protein, das sechs, über das gesamte Protein verstreute, Pumilio-Repeats enthält (Tabelle 2-1 und Abb. 2-1). Das von *khd5* kodierte Protein Khd5 ist 1330 Aminosäuren lang und trägt 11 KH-Domänen. Sehr wahrscheinlich ist es das homologe

2.1 Identifizierung von weiteren potenziellen RNA-bindenden Proteinen in *U. maydis*

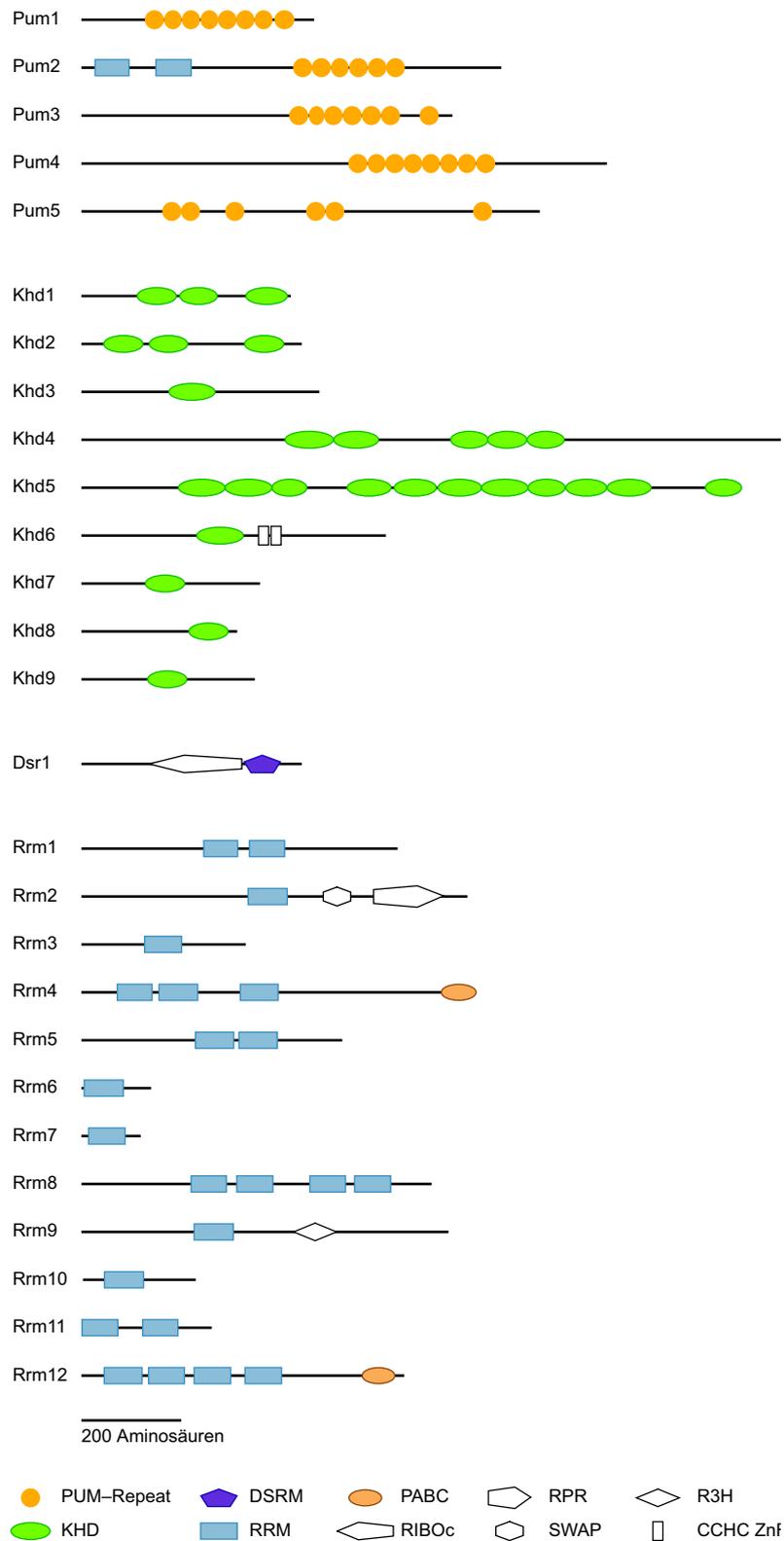


ABB. 2-1 Schematische Darstellung der modularen Struktur der RNA-bindenden Proteinen aus *U. maydis*

Nach Familien sortierte Liste der identifizierten RBP. Die offenen Leserahmen sind maßstabsgetreu als Linien, die darin identifizierten Domänen sind, wie in der Legende angegeben, als Symbole dargestellt. Die Bezeichnung der Proteine ist jeweils links vor der graphischen Darstellung des offenen Leserahmens angegeben.

Domänen-Abkürzungen: PABC, Poly[A]-bindendes Protein C-terminale Domäne; CCHC ZnF, Zinkfinger vom Typ CCHC; SWAP, Spleißregulator *suppressor-of-white-abricot*; RPR, Regulation der Prä-RNA; R3H, konservierte Arginin Histidin Domäne; RIBOc, Domäne der Ribonuklease III Familie.

2.1.1 Bioinformatische Analyse zur Identifizierung von RBPs

TABELLE 2-1 RNA-bindende Proteine in *U. maydis*^a

Gen	Anzahl der potenziellen RBD ^b	Länge des offenen Leserahmens [As]	homologes Gen aus <i>S. cerevisiae</i> ^c	e-Wert ^d (<e-15)	Länge des homologen Gens aus <i>S. cerevisiae</i> [As]	Contig ^e	Nukleotidposition	deletierte Region	Chromosom ^l
<i>pum1</i>	1	467	Puf3p	7e-58	879	14	1433-2836	1779-2669	I
<i>pum2</i>	3	845	Jsn1p/Puf1p	2e-52	1091	4	78730-76193	77494-76581	I
<i>pum3</i>	1	748				197	19370-21616	20583-20831	XVIII
<i>pum4</i>	1	1058	Puf4p	5e-72	888	115	115768-118711		n.v. ^m
<i>pum5</i>	1	921				101	44697-47462		n.v.
<i>khd1</i>	3	422	Pbp2p	4e-26	413	215	157776-156339 ^g	157387-156576	XX
<i>khd2</i>	3	442	Pbp2p	1e-23	413	124	7412-6173	7330-6459	X
<i>khd3</i>	1	479				139	71807-70368	71480-70994	XI
<i>khd4</i>	5	1416				129	47506-43256	46492-45548	X
<i>khd5</i>	11	1330	Scp160p	9e-42	1222	245	18952-14960		n.v.
<i>khd6</i>	2	614	Msl5p	2e-58	476	247	93724-95568		XXIII
<i>khd7</i>	1	364	Krr1p	1e-107	316	109	110546-109452		VIII
<i>khd8</i>	1	313	Pno1p	4e-67	274	117	28298-27357		IX
<i>khd9</i>	1	347	Rps3p	9e-83	240	101	137517-136474		VIII
<i>dsr1</i>	1	444	Mrpl3p	1e-24	390	103	133224-134558		VII
<i>rrm1</i>	2	638				83	396083-397999	396806-397324	V
<i>rrm2</i>	1	779				124	43778-41439	43133-41881	X
<i>rrm3</i>	1	332				34	72086-73354 ^h	72518-73235	II
<i>rrm4</i>	3	792				112	120505-118126 ⁱ	120357-119302	VIII
<i>rrm5</i>	2	525				101	247488-249232 ^j	248295-248884	VII
<i>rrm6</i>	1	139				109	85216-84797	85182-84979	VIII
<i>rrm7</i>	1	121				86	175280-175645	175292-175649	VI
<i>rrm8</i>	4	704	Ylp184p	3e-96	612	157	28299-26185	27551-26442	XIV
<i>rrm9</i>	1	740	Pin4p	9e-37	668	126	64830-62611	64209-63824	X
<i>rrm10</i>	1	228				148	37894-37208	37726-37460	XII
<i>rrm11</i>	2	263				208 ^f	732-30560 ^k	1468-1463	XVI
<i>rrm12</i>	4	651	Pab1p	1e-132	577	117	24758-26713		IX

- in Zusammenarbeit mit M. Feldbrügge
- RNA-bindende Domänen
- Es sind nur Proteine aufgelistet, die einen BLAST e-Wert unter e-15 lieferten
- BLAST Erwartungswert
- Genomsequenz Version 1 (http://www.broad.mit.edu/annotation/fungi/ustilago_maydis/)
- Fusion von Contig 1.208 mit 1.207
- Vorhergesagte Introns bei Positionen 157314-157244 und 157174-157077
- Vorhergesagte Introns bei Positionen 72310-72489 und 72745-72832
- Leserahmenverschiebung bei Position 119257, vorhergesagt durch einen Sequenzvergleich mit der Genomsequenz von Bayer CropScience
- Vorhergesagte Introns bei Positionen 248204-248343 und 248477-248557
- Vorhergesagtes Intron bei Position 651-585
- nach der Genomsequenz von Bayer CropScience
- Information war nicht verfügbar, da diese Gene im Sequenzprojekt von Bayer CropScience fehlen.

Protein zu Scp160p aus *S. cerevisiae*. (BLAST e-Wert: 9e-42; Tabelle 2-1; Abb. 2-1; Frey et al., 2001; Weber et al., 1997). Die Zahl der RRM-Proteine in einem Organismus ist bekanntermaßen wesentlich höher als die Zahl anderer RNA-bindende Domänen enthaltender Proteine. So konnten z. B. in *S. cerevisiae* 10 KHD- und 53 RRM-Proteine identifiziert werden (<http://smart.embl.de/>, Stand: 02/2005). Da eine automatische Annotation des Broad Instituts bereits 43, für RRM-Proteine kodierende, ORFs vorhergesagt hatte,

wurde keine weitere bioinformatische Analyse zur Identifizierung von an RRM-Proteinen durchgeführt. Es wurde sich in der Liste vielmehr auf zwölf RRM-Proteine beschränkt (Tabelle 2-1; Abb. 2-1).

Folglich konnten in Zusammenarbeit mit M. Feldbrügge mit Hilfe eines bioinformatischen Ansatzes 27 offene Leserahmen identifiziert werden, die für mögliche RNA-bindende Proteine kodieren. Fünf der Proteine gehören zur Familie der PUM-Proteine, neun zur Familie der KHD-Proteine, ein einziges zur Familie der DSRM-Proteine und zwölf zählen zur Familie der RRM-Proteine.

2.1.2 Phänotypisierung der PUM-, KHD- und RRM-Deletionsstämmen

Für die weiteren Untersuchungen wurden aus den 27 identifizierten Genen 18 ausgewählt: *pum1* bis *pum3*, *khd1* bis *khd4* und *rrm1* bis *rrm11* (Tabelle 2-1 und Tabelle 4-1, S. 78). Der Fokus richtete sich dabei auf Gene die keine hohe Sequenzähnlichkeit zu essenziellen Genen aus *S. cerevisiae* haben. Die Proteine Khd6 und Khd9, die vermutlich an ribosomalen Prozessen beteiligt sind sowie das potenzielle Poly[A]-bindende Protein Rrm12 wurden daher in die weiteren Analysen nicht einbezogen. Um erste Hinweise auf die Funktion der Proteine zu bekommen, wurden in einem revers-genetischen Ansatz Deletionsstämme mittels einer PCR-basierten Methode hergestellt, wobei jeweils zwei unabhängigen Deletionsstämme in den beiden Wildtypstämmen FB1 (*a1b1*) und FB2 (*a2b2*) erzeugt wurden^{7,8} (Tabelle 4-1, S. 78; siehe in “Material und Methoden”, S. 95; Brachmann et al., 2004; Kämper, 2004).

7. in Zusammenarbeit mit M. Feldbrügge

8. in Zusammenarbeit mit J. Hohenner

2.1.2 Phänotypisierung der PUM-, KHD- und RRM-Deletionsstämmen

TABELLE 2-2 Phänotypisierung der PUM-, KHD- und RRM-Deletionsstämme^{a,8,9}

Gendeletion Δ	Koloniemorphologie und -pigmentierung ^b	Wachstum auf Festmedium				Zellmor- phologie ^e	cAMP Antwort ^g	Paarung ^h	Patho- genität ^j
		CM- Platten bei 28 °C	NM-Platten						
			28 °C	15 °C	34 °C				
<i>pum1</i>	wt ^c	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt
<i>pum2</i>	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt
<i>pum3</i>	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt
<i>khd1</i>	wt	wt	wt	kältesens. ^d	wt	wt	wt	wt	wt
<i>khd2</i>	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt
<i>khd3</i>	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt
<i>khd4</i>	wt	wt	wt	wt	wt	abw. ^f	abw.	red. ⁱ	red.
<i>rrm1</i>	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt
<i>rrm2</i>	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt
<i>rrm3</i>	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt
<i>rrm4</i>	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	red.	red. ^k
<i>rrm5</i>	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt
<i>rrm6</i>	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt
<i>rrm7</i>	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt
<i>rrm8</i>	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt
<i>rrm9</i>	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt
<i>rrm10</i>	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt
<i>rrm11</i>	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt

- Es wurden jeweils die Deletionen im Hintergrund von FB1 und FB2 untersucht, mit der Ausnahme der Antwort auf extern gegebenes cAMP (nur FB1 Hintergrund).
- Die Koloniemorphologie und -pigmentierung wurde sowohl auf Komplet- und Minimalmedium-Platten (vgl. Abschnitt 4.2.2 (S. 93 ff.)) bestimmt.
- Vergleichbar mit dem Phänotyp des Wildtyp
- kältesensitiv
- Die Zellmorphologie wurde bei Zellen während der exponentiellen Wachstumsphase in Kompletmedium mikroskopisch bestimmt.
- abweichend
- Die cAMP Antwort wurde durch die Quantifizierung der in der Zytokinese defekten Zellen eines Stammes bei 15mM cAMP bestimmt (Abb. 2-2).
- Das Paarungsverhalten wurde durch Kotropfen von kompatiblen Deletionsstämmen auf aktivkohlehaltigen Platten untersucht.
- reduziert
- Die Pathogenität wurde durch die Infektion von Maiskeimlingen mit Kreuzungen von kompatiblen Deletionsstämmen untersucht.
- Die Pathogenität wurde mit einer differenzierteren Bonitur bestimmt (siehe in "Material und Methoden", S. 97 und siehe Abschnitt 2.3.2).

Um den Einfluss der ausgewählten potenziellen RNA-bindenden Proteine auf die Entwicklungsprozesse und die Pathogenität von *U. maydis* zu untersuchen, wurden die Deletionsmutanten einer umfangreichen Analyse zur Identifizierung aberranter Phänotypen unterzogen. Die Stämme wurden systematisch auf ihre Koloniemorphologie und -pigmentierung⁸, ihr Wachstumsverhalten auf Kompletmediumplatten⁸, ihr Wachstumsverhalten auf Minimalmediumplatten bei verschiedenen Temperaturen⁸, ihre Zellmorphologie⁹, ihre Fähigkeit cAMP-abhängig Zellaggregate zu bilden⁹, ihrem Paarungsverhalten⁸ sowie ihre Fähigkeit zur Infektion von Maiskeimlingen^{8,9} untersucht.

9. in Zusammenarbeit mit E. Vollmeister, im Rahmen eines Laborpraktikums

Keine der Gendelektionen war letal, die analysierten Stämme zeigten keine veränderte Koloniemorphologie oder -pigmentierung verglichen mit dem entsprechenden Wildtypstamm und es wurde keine Veränderung des Koloniewachstums auf Kompletmedium- bzw. Minimalmediumplatten bei einer Temperatur von 28 °C festgestellt. Die Untersuchung der Temperatursensitivität (15 °C und 34 °C) identifizierte den *khd1Δ* Stamm als kältesensitiv sowohl beim Wachstum auf Nitrat-Minimalmediumplatten (NM-Platten) als auch beim Wachstum in NM-Flüssigmedium (Tabelle 2-2; Daten nicht gezeigt). Die mikroskopischen Untersuchungen der vegetativ wachsenden Sporidien ließen eine starke Veränderung der Zellmorphologie durch die Deletion des *khd4* Gens erkennen (vgl. Abschnitt 2.2).

Für die Untersuchung der Antwort auf extern gegebenes cAMP wurden die Zellen in Anwesenheit von 15mM cAMP angezogen. Die Wildtypstämme reagieren auf die Zugabe von cAMP dieser Konzentration mit einem Zelltrennungsdefekt und einer darauf beruhenden Bildung von Zellketten (Gold et al., 1994; Krüger et al., 1998). Ein dem Wildtyp FB1 vergleichbares Verhalten zeigten 17 der 18 untersuchten Stämme (Abb. 2-2). Eine Ausnahme bildeten die *khd4Δ* Zellen, allerdings zeigten diese auch ohne Zugabe von cAMP eine deutliche Neigung zur Bildung von Zellaggregaten. Dieser Effekt wurde durch die Zugabe von 15mM cAMP nicht weiter verstärkt (Abb. 2-2; Tabelle 2-2).

Das Paarungsverhalten und die Auswirkung auf die Pathogenität wurden durch die Kreuzung kompatibler Stämme auf aktivkohlehaltigen Festmediumplatten und durch die Infektion von Maiskeimlingen mit den jeweils kompatiblen Deletionsstämmen untersucht. Nur die Deletionen von *khd4* bzw. *rrm4* führten zu einer reduzierten Filamentbildung – als Antwort auf die Paarung zweier kompatibler Sporidien – (Tabelle 2-2; Tabelle 2-3; siehe auch Abschnitt 2.2 und 2.3.1) und zu einer reduzierten Pathogenität im Vergleich zu den entsprechenden Wildtypstämmen (Tabelle 2-2; Tabelle 2-3; siehe auch Abschnitt 2.2 und 2.3.2).

2.1.2 Phänotypisierung der PUM-, KHD- und RRM-Deletionsstämmen

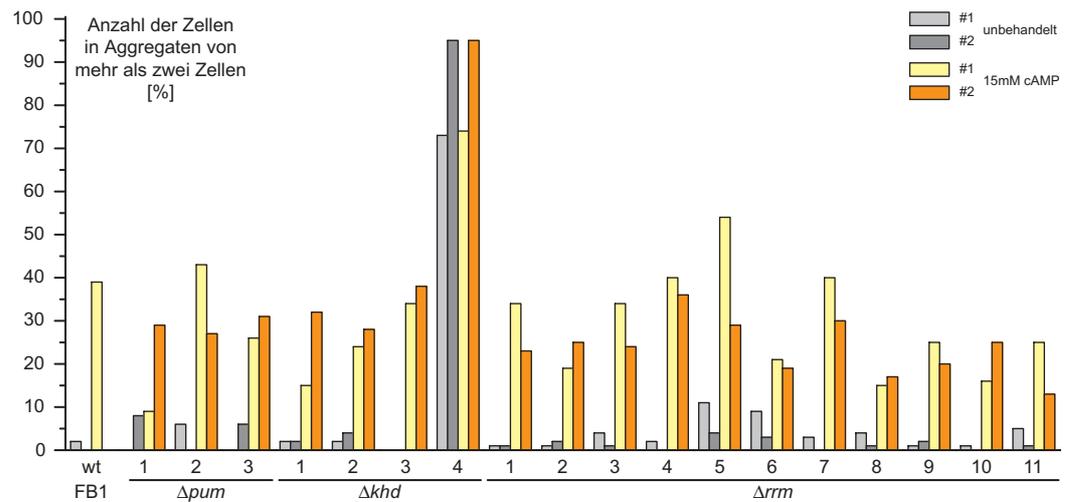


ABB. 2-2 Die Antwort der Deletionsstämmen auf extern zugegebenes cAMP⁹

Die Anzahl von Zellaggregaten mit mehr als zwei Zellen wurde quantifiziert bei Kulturen, die 18 Stunden mit (hellgelb bzw. orange) und ohne (weiß bzw. grau) 15mM extern gegebenem cAMP wuchsen. Es wurden, wie in der Legende gezeigt, jeweils zwei unabhängige Deletionsstämmen im Hintergrund FB1 (wt) getestet.

TABELLE 2-3 Pflanzeninfektionen mit PUM-, KHD- und RRM-Deletionsstämmen^{8,9}

Gen	infizierte Keimlinge		Keimlinge mit Tumoren		Tumore [%]		Infizierte Keimlinge ^c	Keimlinge mit Tumoren	Tumore [%]
	#1 ^b	#2	#1	#2	#1	#2	WT ^d	WT	WT
<i>pum1</i>	59	55	57	48	97	87	58	52	90
<i>pum2</i>	57	58	54	54	95	93	58	52	90
<i>pum3</i>	54	50	52	44	96	88	52	43	83
<i>khd1</i>	78	58	70	45	90	78	109	99	91
<i>khd2</i>	59	58	54	55	92	95	66	61	92
<i>khd3</i>	59	65	56	63	95	97	66	61	92
<i>khd4</i>	73	67	12	18	16	27	78	62	79
<i>rrm1</i>	67	58	56	51	84	89	66	62	94
<i>rrm2</i>	80	71	77	63	96	89	80	73	91
<i>rrm3</i>	60	56	58	56	97	100	54	54	100
<i>rrm4^a</i>	359	412	260	305	72	74	369	335	91
<i>rrm5</i>	70	46	60	45	86	98	107	96	90
<i>rrm6</i>	65	58	58	53	99	91	99	89	90
<i>rrm7</i>	50	46	47	43	94	93	47	47	100
<i>rrm8</i>	80	74	72	61	90	82	75	64	85
<i>rrm9</i>	45	46	39	41	87	89	57	45	79
<i>rrm10</i>	51	46	47	37	92	80	57	45	79
<i>rrm11</i>	64	55	48	40	75	73	99	81	82

- Die Pathogenität von *rrm4*-Deletionsstämmen wurde mit einer differenzierteren Symptombewertung detaillierter bestimmt (siehe Abb. 2-11 auf Seite 35)
- Kreuzung von zwei kompatiblen Deletionsstämmen, z. B. FB1*pum1*Δ#1 x FB2*pum2*Δ#2
- Die Pflanzeninfektionen mit den Deletionsstämmen wurden durch eine gleichzeitig durchgeführte Infektion mit Wildtypstämmen validiert.
- Kreuzung der kompatiblen Wildtypstämme FB1 und FB2

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass nur drei der 18 Deletionen Veränderungen des Phänotyps zur Folge hatten. Die Deletion von *khd1* führte im Vergleich zum Wildtyp bei 15 °C auf Fest- und in Flüssigmedium zu einem reduzierten Wachstum, was auf eine Kältesensitivität schließen lässt. Die Deletion von *khd4* bzw. *rrm4* beeinträchtigte sowohl das Kreuzungsverhalten als auch die Pathogenität. *khd4Δ* zeigte darüber hinaus auch eine veränderte Zellmorphologie und ein reduziertes Wachstum in Komplet-Flüssigmedium (Daten nicht gezeigt). Da die Deletionen von *khd4* und *rrm4* einen Einfluss auf die Pathogenität zeigten, wurden die entsprechenden Stämme im Folgenden näher untersucht.

2.2 **Khd4 SPIELT EINE ROLLE BEI DER MORPHOLOGIE, DER PAARUNG UND DER PATHOGENITÄT VON *U. MAYDIS***

Die Deletion von *khd4* führte zu einem vom Wildtyp stark abweichenden Phänotyp und einer Beeinträchtigung der Pathogenität (siehe Abschnitt 2.1.2). Um das Ausmaß der Defekte näher zu beschreiben, wurden initiale Experimente durchgeführt, die die Bedeutung von *Khd4* auf die verschiedenen Schritte der pathogenen Entwicklung von *U. maydis* klären sollten. Die Zellen der *khd4* Deletionsstämmen zeigten zumeist eine zitronen- oder tropfenförmige Gestalt und einen Defekt bei der Zelltrennung, was zur Bildung von Zellketten führte (Abb. 2-3; vgl. auch Abb. 2-2).

Zur Untersuchung des Kreuzungsverhalten und der Fähigkeit filamentös zu wachsen, wurden kompatible *khd4Δ* Stämme auf aktivkohlehaltiges PD-Festmedium getropft. Kreuzungen mit den entsprechenden Wildtypstämmen FB1 und FB2 dienen zur Kontrolle. In solchen Kreuzungstests erscheint das aus der Fusion zweier kompatibler Wildtypsporidien hervorgehende Dikaryon als weißes Myzel (Holliday, 1974). Bei dem gemeinsamen Aufbringen zweier kompatibler *khd4Δ* Stämme unterblieb die Ausbildung dikaryotischer Filamente. Auch bei der Kreuzung eines *khd4Δ* Stammes mit einem kompatiblen Wildtypstamm wurde eine signifikante Verringerung der Filamentbildung beobachtet (Abb. 2-4), was einen Fusionsdefekt vermuten lässt. Um dies näher zu untersuchen, wurden die Stämme in Konfrontationstests analysiert. Dazu wurden kompatible Partner (Wildtypen bzw. Deletionsmutanten) in einer Distanz von ungefähr 150µm auf Wassera-

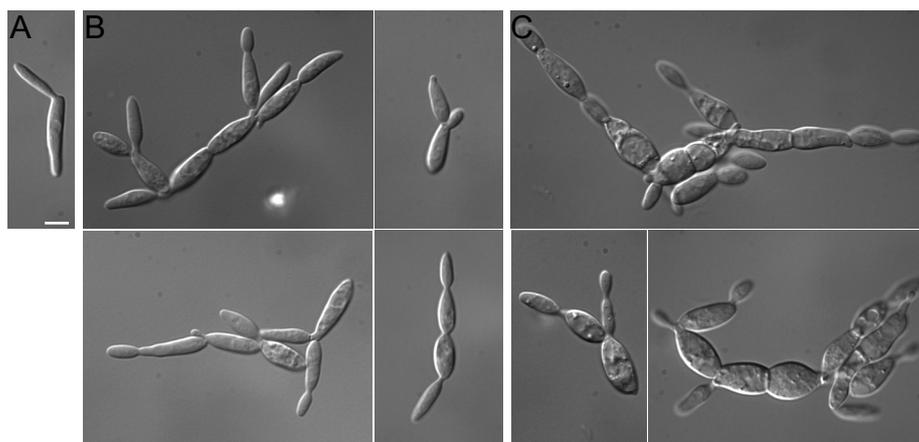


ABB. 2-3 Deletion von *khd4* in haploiden Sporidien

Die Deletion von *khd4* führt zu einer ungleichmäßigen Zellform und Zelltrennungsdefekten in haploiden Sporidien. Im Vergleich zu (A) Wildtypzellen (FB2) zeigen (B) FB2khd4 Δ und (C) FB1khd4 Δ Zellen eine meist zitronen- oder tropfenförmige Gestalt und beide Stämme bilden Zellaggregate aus. DIC (differenzielle Interferenz-Kontrast)-Bilder, Balken in A = 5 μ m

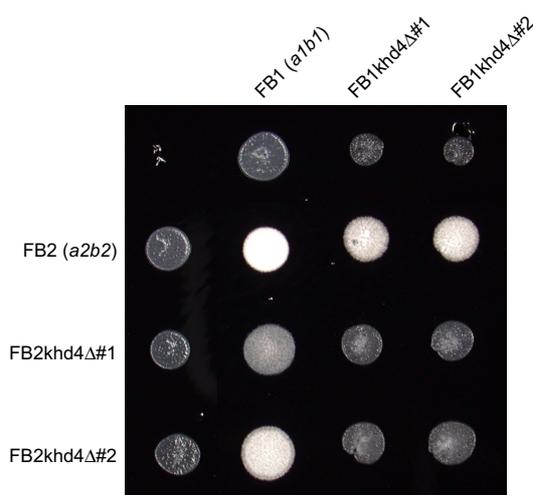


ABB. 2-4 Kreuzungsverhalten der *khd4 Δ Stämmen*

(A) Die oben und links angegebenen Stämme wurden einzeln und in Kombination auf aktivkohlehaltige Platten getropft. Bei einem erfolgreichen Kreuzungsereignis werden diploide Filamente gebildet, die der Kolonie eine weiße Farbe und ein pelzartiges Aussehen geben. Die Deletion von *khd4* führt bei der Kreuzung mit einem Wildtypstamm zu einer deutlichen, bei der Kreuzung mit einem kompatiblen *khd4 Δ Stamm zu einer substantiellen Reduktion der Filamentbildung.*

gar getropft (vgl. in "Material und Methoden", S. 96) und nach 12 Stunden mikroskopisch analysiert (Snetselaar et al., 1996). Im Kontrollexperiment mit den Wildtypstämmen FB1 und FB2 konnte eine starke Konjugationshyphenbildung beobachtet werden, wohingegen bei der Konfrontation kompatibler *khd4 Δ Stämme nur vereinzelte Konjugationshyphen beobachtet wurde (Abb. 2-5). Diese verringerte Konjugationshyphenbildung könnte sowohl durch einen Defekt bei der Ausbildung von Konjugationshyphen als auch durch eine gestörte Pheromonsekretion erklärt werden.*

Um zu untersuchen, ob die reduzierte Konjugationshyphenbildung auf einer verminderten Pheromonssekretion beruht, wurde FB1khd4 Δ gemeinsam mit dem diploiden Pheromontesterstamm FBD12-17 (*a2a2b1b2*) auf aktivkohlehaltige Platten getropft. Der Pheromontesterstamm bildet, nach der Stimulation mit α 1-Pheromon, das in diesem Fall vom kompatiblen FB1 bzw. FB1khd4 Δ Stamm sekretiert wurde, ein *b*-abhängiges Filament. Für den Test wurde FB1khd4 Δ in einer Verdünnungsreihe (ausgehend von $5 \cdot 10^7$ Zellen \cdot ml $^{-1}$; vgl. in "Material und Methoden", S. 97) mit dem Pheromontesterstamm FBD12-17 (konstante Zellzahl von $5 \cdot 10^7$ Zellen \cdot ml $^{-1}$) auf aktivkohlehaltige Platten getropft. Nach 24 Stunden zeigte sich, dass FB1khd4 Δ die Filamentbildung des diploiden Stamms FBD12-17 deutlich schlechter elizitiert als der Wildtypstamm FB1. Bei einer Zellzahl von $5 \cdot 10^6$ Zellen \cdot ml $^{-1}$ des Stamms FB1khd4 Δ konnte kaum noch eine Filamentbildung des Pheromontesterstamms ausgelöst werden. Bei gleicher Zellzahl konnte FB1 noch eine deutliche Reaktion des Testerstamms hervorrufen (Abb. 2-6 Asterisk). Vergleichbare Beobachtungen wurden auch mit dem FB2 sowie FB2khd4 Δ und dem Pheromontester FBD11-7 (*a1a1b1b2*) gemacht (Daten nicht gezeigt). Aus diesen Experimenten lässt sich schließen, dass die Pheromonssekretion in den *khd4* Δ Stämmen deutlich reduziert ist.

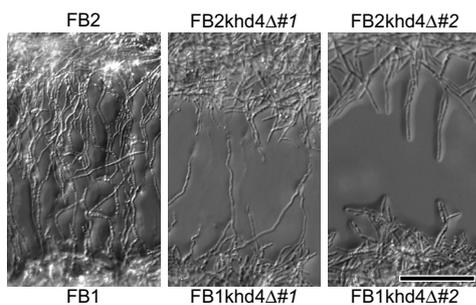


ABB. 2-5 Defekte von *khd4* Δ Stämmen im Konfrontationstest

Die kompatiblen *khd4* Δ Zellen zeigten im Konfrontationstest eine deutlich gestörte Antwort verglichen mit kompatiblen Wildtypstämmen. Balken = 50 μ m.

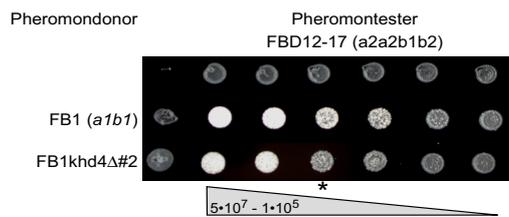


ABB. 2-6 Die *khd4* Δ Mutante zeigt eine reduzierte Pheromonssekretion⁸

Die links angegebenen Stämme wurden in einer Verdünnungsreihe (beginnend bei $5 \cdot 10^7$ Zellen \cdot ml $^{-1}$; vgl. in "Material und Methoden", S. 97) in Kombination mit dem diploiden Pheromontesterstamm FBD12-17 ($5 \cdot 10^7$ Zellen \cdot ml $^{-1}$) auf aktivkohlehaltiges CM-Festmedium getropft. Der Pheromontesterstamm wird durch das von den kompatiblen Stamm sekretierte Pheromon stimuliert und bildet ein *b*-abhängiges Filament. Die Pheromonssekretion von FB1khd4 Δ #2 im Vergleich zu FB1 ist sichtlich reduziert; bei einer Zelldichte von $5 \cdot 10^6$ Zellen \cdot ml $^{-1}$ ist FB1khd4 Δ kaum noch in der Lage die Filamentbildung zu elizitieren (Asterisk). Die Filamentbildung des Testerstamms hängt von der Menge des vom Pheromondonor sekretierten Pheromons ab (Szabo et al., 2002).

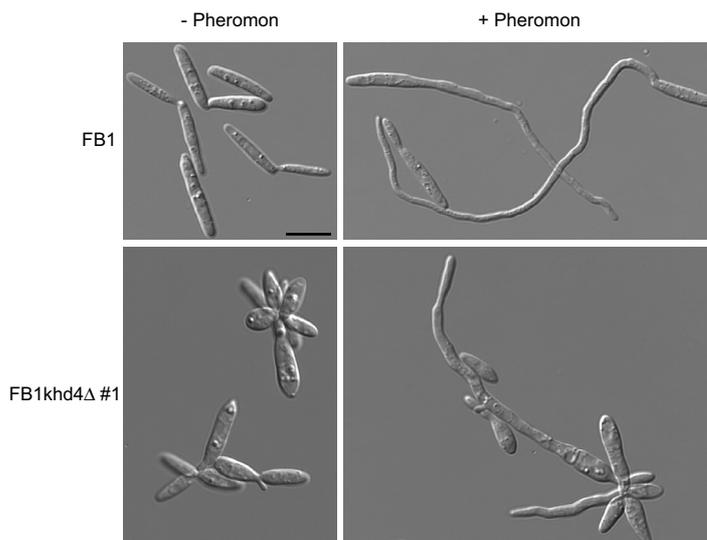


Abb. 2-7 Pheromonstimulation von FB1 und FB1khd4 Δ ⁷

Die Stimulation mit synthetischem a₂-Pheromon für 5h in CM-Flüssigmedium induzierte im Wildtyp FB1 die Bildung von Konjugationshyphen. Die *khd4* Deletionsmutante reagierte nach der Stimulation mit synthetischem a₂-Pheromon ebenfalls mit der Ausbildung von filamentösen Strukturen, diese waren aber deutlich kürzer und dicker. Balken = 10 μ m.

Ob die Konjugationshyphenbildung durch die Deletion von *khd4* ebenfalls beeinträchtigt ist, wurde durch die Stimulation der *khd4* Δ Zellen mit kompatibelem, synthetischem Pheromon in Flüssigmedium untersucht. Es wurden dazu FB1khd4 Δ Zellen (und FB1-Wildtypzellen zur Kontrolle) für 5 Stunden in Kompletmedium bei Anwesenheit von a₂-Pheromon angezogen. FB1 antwortet auf die Zugabe von synthetischem Pheromon mit der Ausbildung von Konjugationshyphen. Im Gegensatz dazu induzierte das kompatible Pheromon bei *khd4* Δ Zellen nur in wenigen Fällen die Bildung von Konjugationshyphen. Diese waren im Vergleich zu den Konjugationshyphen des Wildtypstamms sichtlich kürzer und dicker (Abb. 2-7). Somit wird durch die Deletion von *khd4* die Bildung Konjugationshyphen als Antwort auf kompatibles Pheromon beeinträchtigt.

Die Bedeutung von *khd4* für das *b*-abhängige Filamentwachstum wurde im Weiteren mit einer *khd4* Deletion in dem Stamm SG200 (*a2mfa2bE1bW2*) untersucht. Der haploide Laborstamm SG200 kann, auf aktivkohlehaltige Platten getropft, sich mit eigenem Pheromon stimulieren und somit die Expression des aktiven bE/bW-Heterodimers triggern, was zur Ausbildung eines *b*-abhängigen Filaments führt. Es handelt sich in diesem Fall um eine pheromon- und *b*-abhängige, aber fusionsunabhängige Filamentbildung (Bölker et al., 1995). SG200khd4 Δ bildete im Vergleich zu SG200 nach dem Tropfen auf aktivkohlehaltige Platten nur noch wenige Filamente aus (Abb. 2-8). Dieses Ergebnis schließt einen reinen Fusionsdefekt durch die Deletion von *rrm4* aus.

Um den Einfluss des defekten Filamentwachstums auf die Pathogenität der *khd4Δ* Stämme zu testen, wurden sieben Tage alte Maiskeimlinge mit einer Kreuzung kompatibler *khd4Δ* Stämmen bzw. Wildtypstämmen infiziert. Nach 14 Tagen zeigten 79 % der mit kompatiblen Wildtypstämmen (FB1 × FB2) infizierten Pflanzen (n=78) Tumorbildung (Tabelle 2-3, S. 25). Die mit kompatiblen *khd4Δ* Stämmen infizierten Pflanzen (n=73 bzw. 67) dagegen zeigten nach 14 Tagen eine deutlich geringere Tumorbildung. So rief die Infektion mit FB1khd4Δ#1 × FB2khd4Δ#1 nur bei 12 Pflanzen (16 %), die Infektion mit FB1khd4Δ#2 × FB2khd4Δ#2 nur bei 18 Pflanzen (27 %) eine Tumorbildung hervor (Tabelle 2-3, S. 25). Vergleichbare Ergebnisse konnten auch bei Pflanzeninfektionen mit den solopathogenen SG200 Stämmen beobachtet werden. 14 Tage nach der Infektion der Maiskeimlinge (n=15) mit dem Stamm SG200 konnte bei 87% der Pflanzen Tumorbildung beobachtet werden, die Infektion der Maiskeimlinge (n=16 bzw. n=10) mit dem *khd4* Deletionsstamm SG200khd4Δ#1 bzw. SG200khd4Δ#2 rief nur bei 25 % bzw. 20% der Pflanzen Tumorbildung hervor. Die Fähigkeit zur Tumorbildung war somit etwa 3,5-mal niedriger, verglichen mit der Infektionsrate bei Wildtypinfektionen.

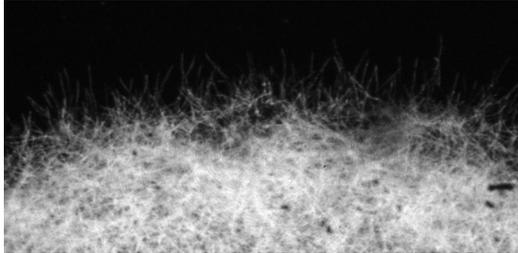
Folglich hat die Deletion von *khd4* weitreichende Auswirkungen zur Folge: Sie führt zu einem Zelltrennungsdefekt während des vegetativen Wachstums, beeinträchtigt die Pheromonsekretion und die Konjugationshyphenbildung als Antwort auf kompatibles Pheromon. Darüber hinaus waren die *khd4Δ* Stämme im filamentösen Wachstum gestört und weisen eine reduzierte Pathogenität auf.

2.3 Rrm4 AUS *U. MAYDIS* IST WICHTIG FÜR DAS POLARE WACHSTUM DER *b*-ABHÄNGIGEN HYPHEN

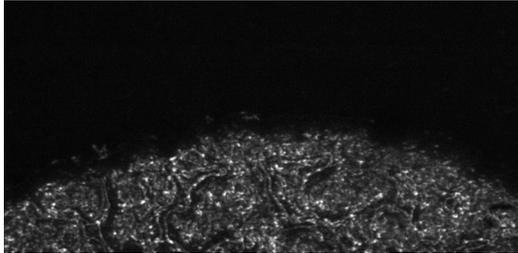
In den Vortests zeigten *rrm4Δ* Stämme ein reduziertes filamentöses Wachstum und eine reduzierte Virulenz (vgl. Abschnitt 2.1.2). Um die Funktion von Rrm4 auf das filamentöse Wachstum und die pathogene Entwicklung von *U. maydis* zu klären, wurden die Auswirkungen der *rrm4* Deletion näher untersucht.

2.3.1 *rrm4*Δ Stämme zeigen ein reduziertes Filamentwachstum

G200 (a2mfa2bE1bW2)



G200khd4Δ#1



G200khd4Δ#2

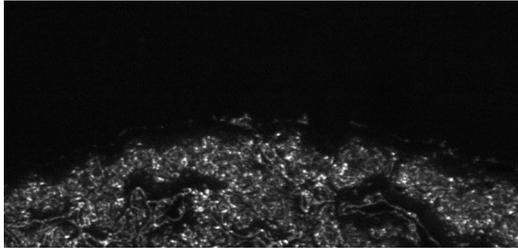


ABB. 2-8 *khd4* spielt bei der Ausbildung von Filamenten eine Rolle

Gezeigt ist jeweils der Rand einer Kolonie auf aktivkohlehaltigem Festmedium. Der Stamm SG200 bildet auf Grund seiner autokrinen Pheromonstimulation und der daraus resultierenden Expression des aktiven, heterodimeren bE/bW-Transkriptionsfaktors, weiße, pelzartige Kolonien. Die Deletion von *khd4* führte in den beiden, unabhängig erzeugten Stämmen SG200khd4Δ#1 und SG200khd4Δ#2 zu einer substantziellen Reduktion der Filamentbildung.

2.3.1 *rrm4*Δ Stämme zeigen ein reduziertes Filamentwachstum

Da bei den initialen Kreuzungsexperimenten zweier kompatibler *rrm4* Deletionsmutanten nur ein reduziertes filamentöses Wachstum beobachtet wurde, wurde dieser Defekt in Kreuzungen, bei denen Verdünnungsreihen des kompatiblen Wildtypstamms eingesetzt wurden, näher untersucht. Der Stamm FB2*rrm4*Δ (konstante Zellzahl von $5 \cdot 10^7$ Zellen \cdot ml⁻¹) wurde mit Verdünnungen (ausgehend von $5 \cdot 10^7$ Zellen \cdot ml⁻¹) der Stämme FB1 bzw. FB1*rrm4*Δ gemischt und auf aktivkohlehaltige Platten getropft. Die Kreuzung von FB2*rrm4*Δ mit der Verdünnungsreihe des Wildtyps FB1 führte mit abnehmender Zellzahl des Wildtyps zu einer abnehmenden Filamentbildung (Abb. 2-9A). Nach 24 Stunden war zu beobachten, dass kompatible *rrm4*Δ Stämme in ihrem filamentösen Wachstum deutlich beeinträchtigt waren (Abb. 2-9A). In einem weiteren Kreuzungstest wurde analog zu dem oben beschriebenen Experiment eine Verdünnungsreihe des kompatiblen *rrm4*Δ Stamms eingesetzt. Der Wildtyp FB2 (konstante Zelldichte von

$5 \cdot 10^7$ Zellen \cdot ml⁻¹) wurde jeweils mit Verdünnungen (ausgehend von $5 \cdot 10^7$ Zellen \cdot ml⁻¹) der Stämme FB1 bzw. FB1rrm4 Δ gemischt und auf aktivkohlehaltige Platten getropft. Hierbei war kein unterschiedliches Verhalten bei der Filamentbildung zu beobachten.

Das beobachtete reduzierte filamentöse Wachstum nach der Paarung zweier kompatibler Deletionsstämme könnte das Ergebnis einer verringerten Pheromonausschüttung sein, weshalb im Folgenden die Pheromonsekretion der *rrm4* Deletionsmutanten untersucht wurde. Dafür wurden Verdünnungsreihen der Stämme FB1, FB1rrm4 Δ #1 und #2 mit dem Pheromontesterstamm FBD12-17 (*a2a2b1b2*, konstante Zellzahl von $5 \cdot 10^7$ Zellen \cdot ml⁻¹) auf aktivkohlehaltigen Platten gekreuzt. Nach 24 Stunden war bei der Kreuzung FBD12-17 \times FB1 ein deutliches, pheromoninduziertes Filamentwachstum des Pheromontesterstamms zu beobachten. Durch die Reduktion der Zellzahl von FB1, und der damit verbundenen Reduktion der sekretierten Pheromonmenge, nahm das Filamentwachstum des Pheromontesterstamms ab (Abb. 2-9C). Bei der Kreuzung des Pheromontesterstamms mit *rrm4* Δ Stämmen konnte kein Unterschied zu den Kontrollreihen der Wildtypkreuzungen festgestellt werden. Die Deletionsmutanten waren vergleichbar mit dem Wildtyp in der Lage, durch ihre Pheromonsekretion die Filamentbildung des Pheromontesterstamms zu elizitieren (Abb. 2-9C). Diese Ergebnisse schließen einen Effekt auf die Pheromonsekretion durch die Deletion von *rrm4* aus.

Mit Hilfe eines Konfrontationstests wurde darüber hinaus die Konjugationshyphenbildung von *rrm4* Δ Zellen untersucht. In den durchgeführten Tests wurden die kompatiblen Partner mit einer Distanz von ungefähr 150 μ m auf Wasseragar aufgetragen. Nach 12 Stunden wurden die Konjugationshyphenbildung mikroskopisch analysiert (Snetselaar et al., 1996). Die Antwort der kompatiblen *rrm4* Δ Stämme unterschied sich in keiner Weise von der Antwort der Wildtypstämme (Abb. 2-10). Dies war in Einklang mit der Stimulation der *rrm4* Δ Stämme durch a1- bzw. a2-Pheromon, wobei keinen Unterschied zu einer Wildtypbehandlung festgestellt werden konnte (Daten nicht gezeigt). Die Deletion von *rrm4* hat keinen Effekt auf die Konjugationshyphenbildung als Antwort auf eine Stimulation mit kompatibelem Pheromon.

Es lag deshalb die Vermutung nahe, dass die Deletion von *rrm4* die Filamentbildung nach der Fusion beeinflusst. Um diese Vermutung zu untermauern, wurde analog zu FB1rrm4 Δ und FB2rrm4 Δ ein Bereich von Nukleotidposition 149-1202bp des *rrm4* ORF (2379bp; vgl. Tabelle 2-1) auch im solopathogenen Stamm SG200 (*a2mfa2bW1bE2*) durch

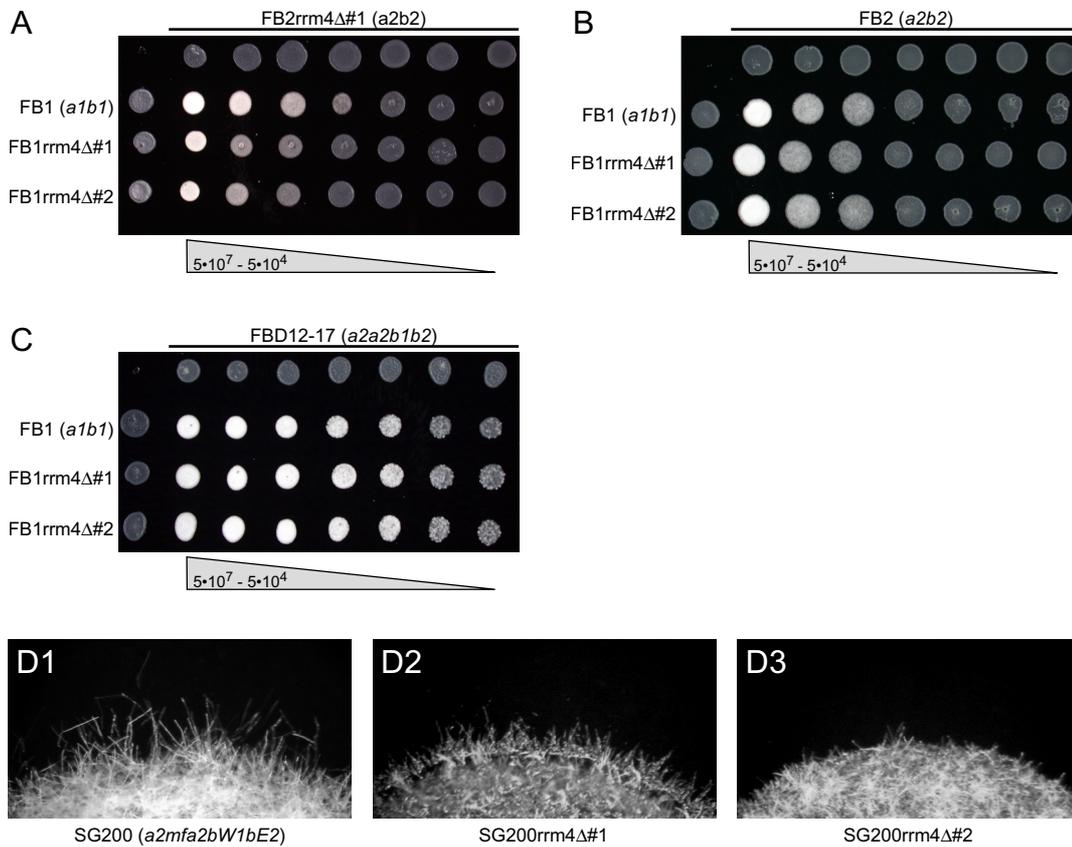


ABB. 2-9 *rrm4* ist wichtig für die einwandfreie Ausbildung von b-abhängigen Filamenten
 In den Tropfexperimenten auf aktivkohlehaltigen Platten sind die links beschrifteten Stämme (A bis C) von links nach rechts in einer Verdünnungsreihe (jeder zweite Tropfen entspricht einer 10fachen Verdünnung) gemeinsam mit kompatiblen haploiden Stämmen (A und B) bzw. dem diploiden Pheromontesterstamm FBD12-17 (C; oben beschriftet, konstante Zellzahl von $5 \cdot 10^7$ Zellen \cdot ml $^{-1}$) getropft. (A, B) Ein erfolgreiches Fusionsereignis ist durch das Ausbilden des diploiden Filaments gekennzeichnet, was zur Bildung von weißen und flaumigen Kolonien. In Kreuzungen zweier kompatibler haploider *rrm4*Δ Stämme ist das Wachstum des diploiden Filaments deutlich reduziert, wobei ein kompatibler Wildtypstamm ausreicht, das Phänomen zu unterbinden. (C) Der Pheromontesterstamm FBD12-17 reagiert auf a1-Pheromon von Pheromondonorstämmen mit dem Ausbilden von Filamenten, die den Kolonien ein weißes und flaumiges Aussehen geben. Die *rrm4* Deletionsstämme und der Wildtypstamm FB1 zeigen die selbe Sensitivität beim Elizitieren der Filamentbildung im Pheromontesterstamm. (D) Gezeigt ist der Rand einer Kolonie auf aktivkohlehaltigem Festmedium. Die unten beschrifteten Stämme wurden auf Festmediumplatten getropft. Nach 24 Stunden zeigen die *rrm4*Δ Stämme, im Vergleich zum Ausgangsstamm SG200 (D1), ein stark reduziertes filamentöses Wachstum (D2 und D3).

2.3 *Rrm4* aus *U. maydis* ist wichtig für das polare Wachstum der *b*-abhängigen Hyphen

die Hygromycin-Resistenzkassette ersetzt. Aus der homologen Integration der Resistenzkassette resultierte der Stamm SG200rrm4 Δ (vgl. Tabelle 2-1, S. 21 und Tabelle 4-6, S. 83), der möglicherweise ein 68 Aminosäuren langes Restprotein exprimierte. Wird der haploide Laborstamm SG200 auf aktivkohlehaltiges Festmedium getropft, kommt es zu einer Autostimulation und der Expression des aktiven bE/bW-Heterodimers, was zur Bildung eines *b*-abhängigen Filaments führt (Abb. 2-9D1). Der Stamm SG200rrm4 Δ bildete zwar noch Filamente aus (Abb. 2-9D2 und D3), diese waren aber sichtlich kürzer als die des Ausgangsstamms SG200 (Abb. 2-9D1). Dieses Experiment bekräftigt einen Postfusionsdefekt durch die Deletion von *rrm4* und bestätigt die Beteiligung von Rrm4 am filamentösen Wachstum von *U. maydis*.

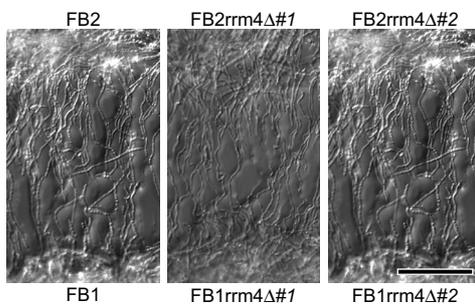


ABB. 2-10 Rrm4 hat keinen Einfluss auf die Konjugationshyphenbildung

Die kompatiblen *rrm4*Δ Zellen zeigen im Konfrontationstest keine von kompatiblen Wildtypstämmen abweichende Antwort. Balken = 50μm.

Im Ergebnis kann festgehalten werden, dass die Deletion von *rrm4* zu einem reduzierten Filamentwachstum führte, sowohl bei der Kreuzung zweier kompatibler *rrm4*Δ Stämme als auch im Stamm SG200rrm4 Δ . Auf Grund der Tatsache, dass die Deletion von *rrm4* keinen Einfluss auf die Pheromonesekretion und Konjugationshyphenbildung hat, deuten diese Resultate auf einen reinen Postfusionsdefekt in den *rrm4*Δ Stämmen hin. Diese Vermutung wird bekräftigt durch die Beobachtung, dass das filamentöse Wachstum einer FB2×FB1rrm4 Δ Kreuzung nicht beeinträchtigt ist; folglich ist Rrm4 wichtig für das *b*-abhängige Filamentwachstum von *U. maydis*.

2.3.2 Die Deletion von *rrm4* führt zu reduzierter Virulenz2.3.2 Die Deletion von *rrm4* führt zu reduzierter Virulenz

Um den Einfluss von Rrm4 auf die Pathogenität zu ermitteln, wurden Pflanzeninfektionsexperimente mit den Deletionsstämmen durchgeführt. Da Vorexperimente (Tabelle 2-3, S. 25) gezeigt hatten, dass *rrm4*Δ Stämme Tumorbildung mit einer dem Wildtyp vergleichbaren Frequenz induzierten, die durch *rrm4*Δ Stämme induzierten Tumore jedoch sichtlich kleiner waren, wurde eine deutlich detailliertere Bonitierung etabliert. Die verursachten Symptome wurden in fünf Klassen eingeteilt: (1) welke/tote Pflanzen, (2) Bildung von großen Tumoren am Stengel, (3) Bildung von kleinen Tumoren am Stengel, (4) Bildung von großen Tumoren am Blatt, (5) Bildung von kleinen Tumoren am Blatt und (6) keine Tumorbildung (vgl. in “Material und Methoden”, S. 97).

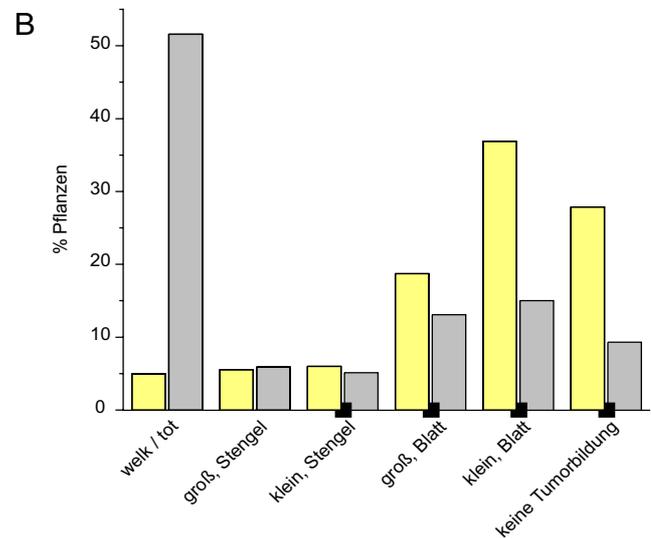


Abb. 2-11 *rrm4*Δ Stämme sind in ihrer Virulenz beeinträchtigt

Pflanzeninfektionen wurden durchgeführt mit kompatiblen *rrm4*Δ Stämmen (#1, 368 Pflanzen; #2, 403 Pflanzen, Daten nicht gezeigt) und mit kompatiblen Wildtypstämmen (369 Pflanzen). (A) Symptomatisch für eine Infektion mit kompatiblen *rrm4*Δ Stämmen war eine geringe Tumorentwicklung an den Blättern der Maiskeimlinge. (B) Eine detaillierte Bewertung der Krankheitssymptome und der Vergleich zwischen einer Infektion mit Wildtyp- (grau) und *rrm4*Δ Stämmen (#1, gelb) zeigt eine deutlich schwächere Virulenz der Deletionsmutanten und einer Verschiebung der Symptome in Richtung geringerer Virulenz.

Für die Datenerhebung wurden kompatible *rrm4*Δ Stämme gekreuzt (FB1*rrm4*Δ #1 × FB2*rrm4*Δ #1 und FB1*rrm4*Δ #2 × FB2*rrm4*Δ #2) und jeweils mehr als 360 Maiskeimlinge in fünf unabhängigen Experimenten infiziert (Abb. 2-11B). Diese Experimente zeigten eine deutliche Abschwächung der Symptome im Vergleich zu einer Wildtypinfektion.

2.3 *Rrm4* aus *U. maydis* ist wichtig für das polare Wachstum der b-abhängigen Hyphen

Die Anzahl an welken und toten Pflanzen nach einer *rrm4Δ* Infektion war etwa 10-mal geringer und die Zahl an Pflanzen ohne Symptome bzw. mit einer geringen Tumorbildung am Blatt nahm, im Vergleich zur Wildtypinfektion, etwa um das dreifache zu (Abb. 2-11B). Das bedeutet, dass *rrm4Δ* Stämme noch in der Lage sind Tumore auszubilden, ihre Virulenz ist aber deutlich beeinträchtigt.

2.3.3 *Rrm4* ist am unipolaren filamentösen Wachstum beteiligt

Um die makroskopische beobachteten Konsequenzen einer *rrm4* Deletion weitergehend zu untersuchen, wurden zellbiologische Analysen durchgeführt. Als Voraussetzung für diese Arbeiten war es zunächst notwendig einen Stamm herzustellen, in dem der gesamte ORF von *rrm4* deletiert ist, um die homologe Rekombination von *rrm4*-Allelen in den endogenen Locus zu erleichtern. Darüber hinaus wurde, auf Grund der postfusionalen Auswirkung der *rrm4* Deletion auf das Filamentwachstum (vgl. Abschnitt 2.3.1), für die weiteren Untersuchungen der Laborstamm AB33 (*a2P_{nar}:bW1bE2*) verwendet. Dieser Stamm ermöglicht durch einen Wechsel der Stickstoffquelle ($\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{NO}_3^-$) im Medium, die Induktion filamentöser Strukturen (Abb. 2-12A1), die morphologisch den dikaryotischen Hyphen gleichen (Brachmann, 2001). Durch die homologe Rekombination des Plasmids pUMa495 wurde der Stamm AB33*rrm4Δ*-2 hergestellt, in dem der Bereich von Nukleotidposition 120525-117997 auf dem Contig 1.112 der Genomsequenz

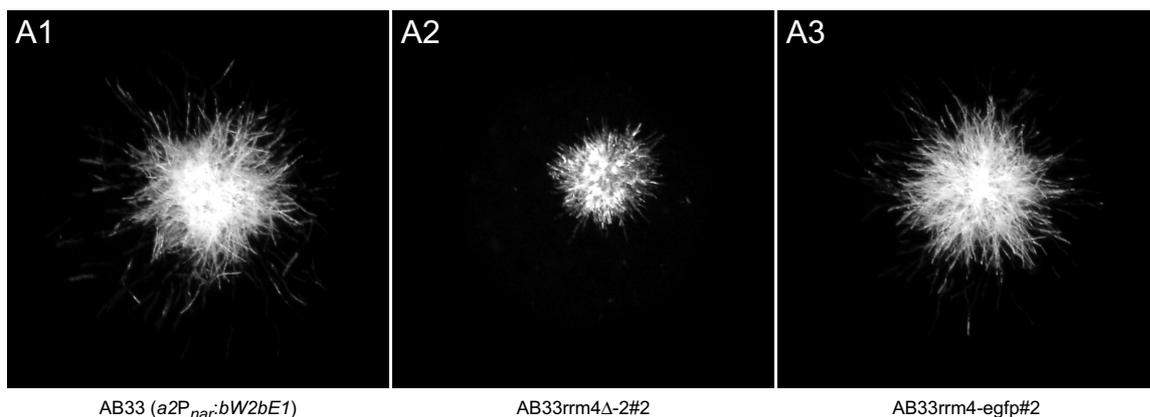


ABB. 2-12 Auch die Deletion des gesamten offenen Leserahmens von *rrm4* führt zu verkürzten Filamenten

(A1) Der Stamm AB33 wächst auf aktivkohlehaltigen Nitrat-Minimalmedium-Platten filamentös. Es bilden sich weiße, pelzartige Kolonien. (A2) Die Bildung verkürzter Filamente ist auch bei der Deletion des gesamten ORF von *rrm4* in AB33*rrm4Δ*-2 zu beobachten. Der Effekt ist vergleichbar mit der *rrm4* Deletion im Stamm SG200 (Abb. 2-9, S. 33). (A3) Der Stamm aus AB33*rrm4Δ*-2 entstandene Stamm AB33*rrm4-egfp*#2 exprimiert ein *Rrm4*-eGfp Fusionsprotein und zeigt ein dem Ausgangsstamm AB33 vergleichbares Filamentwachstum.

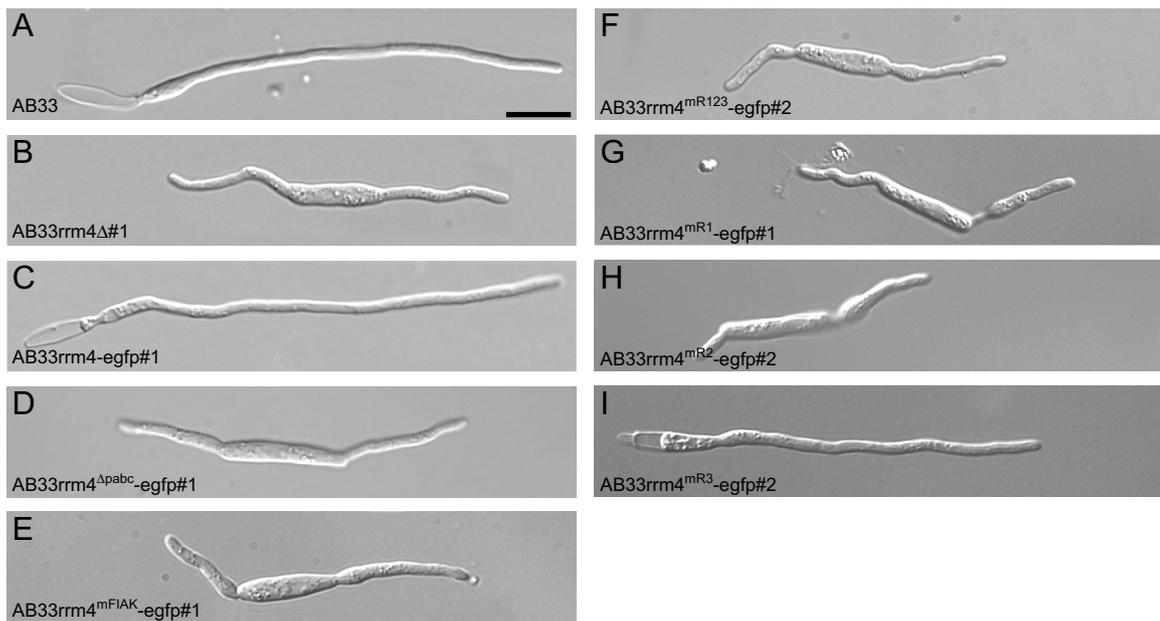


ABB. 2-13 Das filamentöse Wachstum verschiedener *rrm4* Mutanten im Vergleich

Die Zellen wurden vier Stunden nach der Induktion des filamentösen Wachstums mikroskopiert. (A) Der Ausgangsstamm AB33 zeigt ein unipolares filamentöses Wachstum. (B) Die Deletion von *rrm4* ruft in der Zelle ein überwiegend bipolares Filamentwachstum hervor. (C) Die Expression eines Rrm4-eGfp Fusionsproteins hat keine Auswirkungen auf Filamentbildung. (D und E) Die Deletion und die Mutation der C-terminalen PABC-Domäne führt zu einem verstärkten bipolaren Filamentwachstum. (F, G und H) Das Einführen von Mutationen in die RRM-Domänen führt im Falle der dreifach Mutation mR123 (F) sowie bei der Mutation der ersten (mR1; G) und zweiten (mR2; H) RRM-Domäne zu bipolarem Wachstum. (I) Die Expression eines in der dritten RRM-Domäne mutierten Rrm4-eGfp Fusionsproteins (Rrm4^{mR3}-eGfp) hat keine Auswirkungen auf das filamentöse Wachstum. Balken in A = 10µm

(http://www.broad.mit.edu/annotation/fungi/ustilago_maydis/) durch die Hygromycin-Resistenzkassette ersetzt wurde. In AB33rrm4Δ-2 wurde somit ein 2527bp langer Bereich beginnend 19 Nukleotiden stromaufwärts des ORF (2376bp) deletiert. Dieser Stamm zeigte nach der Induktion des filamentösen Wachstums auf Nitrat-Minimalmediumpplatten die für eine *rrm4* Deletion typischen verkürzten Filamente (Abb. 2-12A2), wie sie auch auf aktivkohlehaltigen Platten mit dem Stamm SG200rrm4Δ zu beobachten waren (vgl. Abb. 2-9D2 auf Seite 33).

Ausgehend von AB33rrm4Δ-2 wurden Stämme hergestellt, die ein Gfp markiertes Rrm4 exprimierten. Hierfür wurde das endogene *rrm4*Δ-2 Allel durch *rrm4-egfp* ersetzt. Der so hergestellte Stamm AB33rrm4-egfp exprimiert das Fusionsprotein unter der Kontrolle des *rrm4* Promotors. Da AB33rrm4-egfp keine Beeinträchtigung im filamentösen Wachstum aufweist (Abb. 2-12B3), ist davon auszugehen, dass das Rrm4-eGfp Fusionsprotein funktionell ist und das eGfp als Teil des Rrm4-eGfp Fusionsproteins keine Auswirkung auf die Funktion von Rrm4 hat. Außerdem schließen diese Ergebnisse einen

dominant negativen Effekt des in den Stämmen FB1rrm4 Δ , FB2rrm4 Δ , und SG200rrm4 Δ möglicherweise exprimierten, 68 Aminosäuren langen Restproteins aus (vgl. Tabelle 2-1, S. 21). Zudem zeigen diese Ergebnisse, dass das beobachtete reduzierte Filamentwachstum eine Folge der *rrm4* Deletion darstellt.

Mikroskopische Analysen der Stämme AB33, AB33rrm4 Δ -2 und AB33rrm4-egfp zeigten bei hefeähnlichem Wachstum in Kompletต์flüssigmedium keine phänotypischen Unterschiede (Daten nicht gezeigt). Bei Betrachtung der filamentösen Strukturen auf zellulärer Ebene bereits vier Stunden nach der Induktion des filamentösen Wachstums konnte der bisher nur makroskopisch definierten Effekt einer *rrm4* Deletion verdeutlicht werden. Der Ausgangsstamm AB33 zeigte ein unipolares, filamentöses Wachstum und die Zellen bildeten bereits die ersten leeren Abschnitte am distalen Ende der Spitzenzelle (Abb. 2-13A). Im Gegensatz dazu führte die Deletion von *rrm4* zu bipolarem Wachstum und einem Defekt bei der Bildung leerer Abschnitte (Abb. 2-13 B). Der aus AB33rrm4 Δ -2 entstandene Stamm AB33rrm4-egfp zeigte ein unipolares Filamentwachstum und die Hyphen bildeten, analog zu AB33, bereits nach vier Stunden erste leere Abschnitte (Abb. 2-13C). Das bipolare, filamentöse Wachstum von AB33rrm4 Δ -2 konnte, vier Stunden nach der Induktion, bei 56 ± 5 % ($n=383$) der Zellen beobachtet werden. Beim Ausgangsstamm AB33 und bei AB33rrm4-egfp zeigten nach vier Stunden nur 12 ± 8 % ($n=375$) bzw. 17 ± 8 % ($n=533$) der Zellen ein bipolares Wachstum (Abb. 2-14A). Die Deletion von *rrm4* führt also zu einem vertärkt bipolaren Filamentwachstum.

Ob das bipolare Wachstum der Zelle einen Einfluss auf die maximale Länge der hyphalen Spitzenzelle hat, wurde in einer weiteren Berechnung ermittelt. Es wurde die Länge von Spitzenzellen sechs Stunden nach der Induktion des filamentösen Wachstums bestimmt. Die Bandbreite der Messwerte (z. B.: 25-102 μ m bei AB33) war sehr hoch. Dies war zu erwarten, da nicht alle Zellen direkt nach dem Wechsel in Nitrat-Minimalmedium mit der Ausbildung von Filamenten beginnen. Aus diesem Grund wurden für die Evaluation nur solche Zellen verwendet, die länger waren als der Median der Länge eines Stammes zum jeweiligen Zeitpunkt. Die Zellen von AB33 und AB33rrm4-egfp besaßen sechs Stunden nach der Induktion eine durchschnittliche Länge von 87 ± 10 μ m ($n=20$) bzw. 83 ± 9 μ m ($n=51$; Abb. 2-14B). Die bipolar wachsenden Zellen von AB33rrm4 Δ -2 hatten eine durchschnittliche Länge von 82 ± 10 μ m ($n=26$; Abb. 2-14B). Folglich zeigt sich keine Veränderung in der Maximallänge der Spitzenzellen durch die Deletion von *rrm4*.

2.3.3 *Rrm4* ist am unipolaren filamentösen Wachstum beteiligt

Die Bildung leerer Abschnitte wird durch die Deletion von *rrm4* allerdings gänzlich verhindert. Sechs Stunden nach der Induktion des filamentösen Wachstums haben ~60 % der AB33 Zellen bzw. ~70 % der AB33*rrm4*-egfp Zellen leere Abschnitte gebildet. AB33*rrm4* Δ -2 bildeten hingegen keine leeren Abschnitte aus (Abb. 2-14C). Die Deletion führt folglich zu einem Defekt bei der Bildung leerer Abschnitte.

Um die Geschwindigkeit des Hyphenwachstums zu bestimmen, wurde die Länge der hyphalen Spitzenzelle (Abb. 2-15A) und die Anzahl der Zellen mit leeren Abschnitten von mindestens 41 Zellen 0, 2, 4 und 6 Stunden nach der Induktion des filamentösen Wachstums bestimmt (Abb. 2-15B). Es zeigt sich in diesem Experiment ein im Vergleich zu AB33 und AB33*rrm4*-egfp signifikant retardiertes Wachstum der AB33*rrm4* Δ -2 Spitzenzellen. Diese Verzögerung war bereits zwei Stunden nach der Induktion zu detektieren (Abb. 2-15B) und wurde im Verlauf des Experiments deutlicher. Nach vier Stunden waren 18 ± 2 % der Zellen von AB33 und AB33*rrm4*-egfp in einem Längenbereich von 60 μ m-80 μ m und 7 ± 1 % dieser Zellen hatten bereits erste leere Abschnitte gebildet. Durch das verzögerte Wachstum der AB33*rrm4* Δ -2 Spitzenzellen konnten vier Stunden nach der Induktion hatten erst 3 ± 1 % der Zellen eine Länge von 60-80 μ m erreicht (Abb. 2-15B). Wie oben erwähnt, ging das Wachstum der Spitzenzellen in den Stämmen AB33 bzw. AB33*rrm4*-egfp mit dem Ausbilden leerer Abschnitten einher. Alle Filamente von AB33 mit einer Länge von mehr als 80 μ m hatten sechs Stunden nach der Induktion leere Abschnitt gebildet (Abb. 2-15B). Im Gegensatz dazu waren bei AB33*rrm4* Δ -2 sechs Stunden nach der Induktion des filamentösen Wachstums keine Bildung leere Abschnitte zu beobachten (Abb. 2-15B). Folglich führt der durch die Deletion von *rrm4* hervorgerufene Defekt bei der Bildung leerer Abschnitte zu einer dramatisch verkürzten Hyphe, da die Länge der Hyphe auf die maximale Länge der Spitzenzelle von ~85 μ m begrenzt ist. Eine Wildtypyphe mit einer ~85 μ m langen Spitzenzelle und vier leeren Abschnitten¹⁰ wäre hingegen doppelt so lang, und würde durch die Bildung weiterer leerer Abschnitte stetig an Länge zulegen.

10. Die durchschnittliche Länge eines leeren Abschnitts beträgt ungefähr 23 μ m (Steinberg et al., 1998).

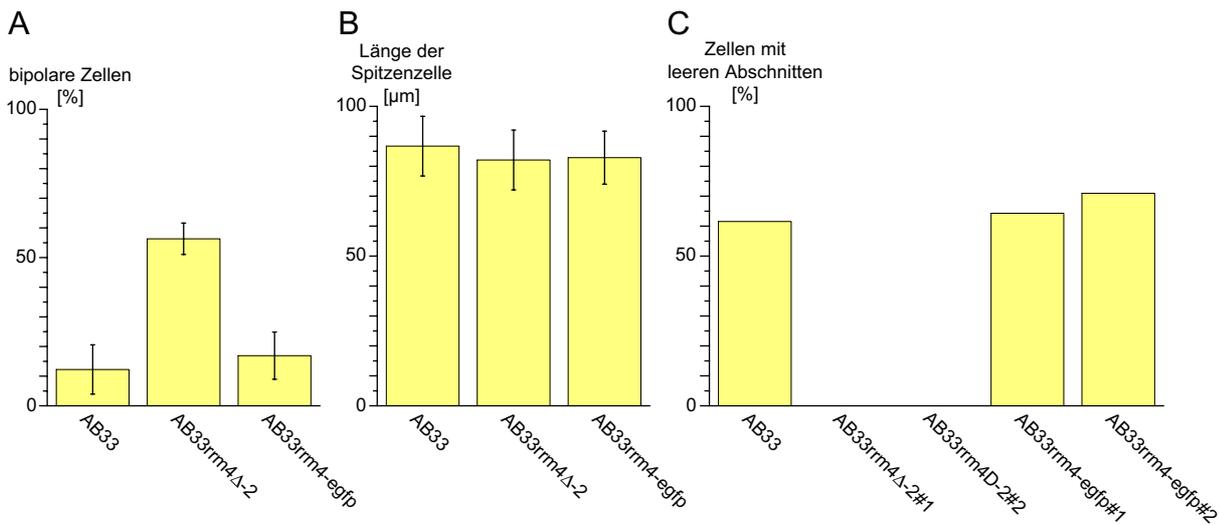
2.3 *Rrm4* aus *U. maydis* ist wichtig für das polare Wachstum der *b*-abhängigen Hyphen

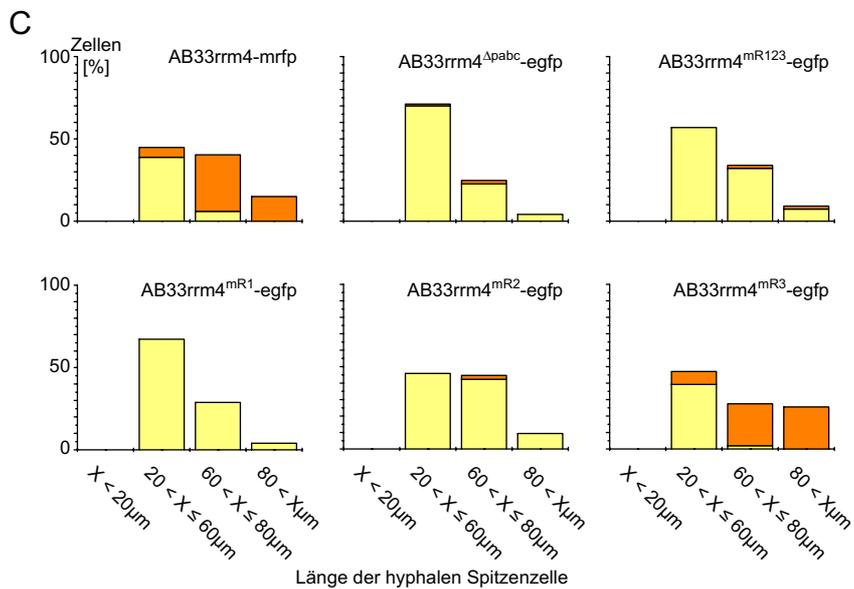
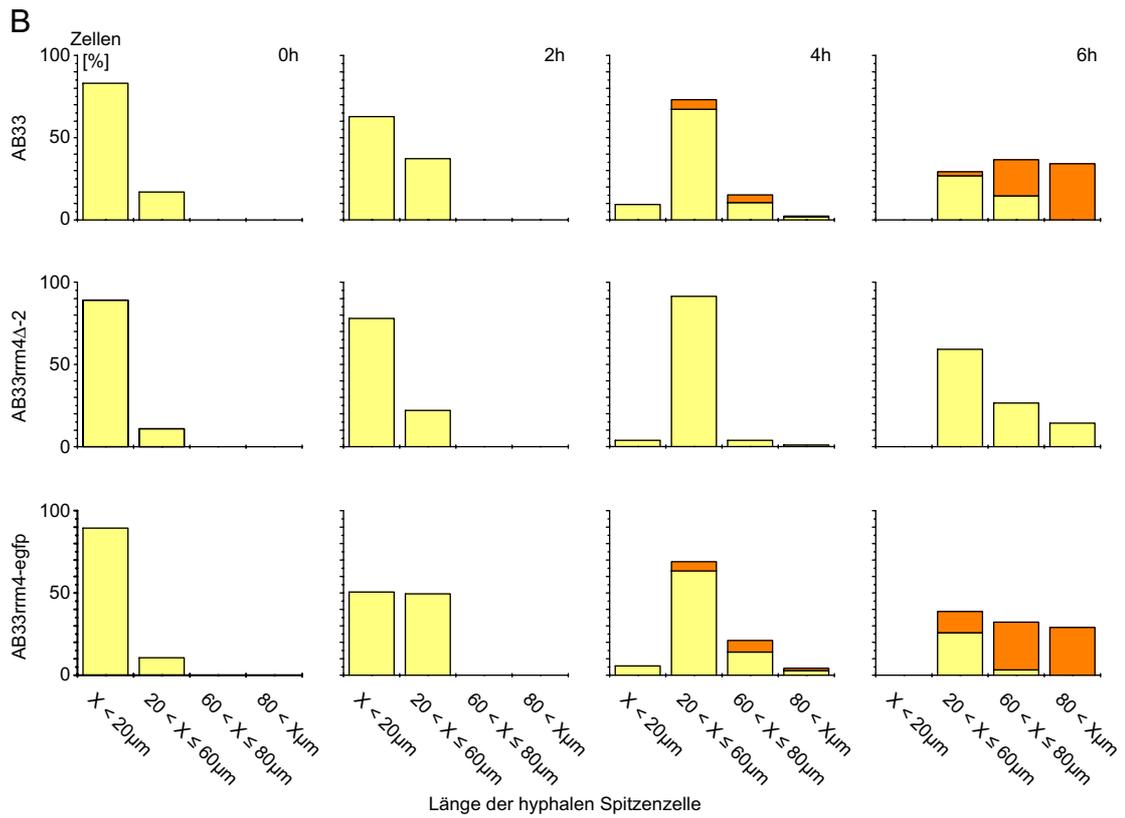
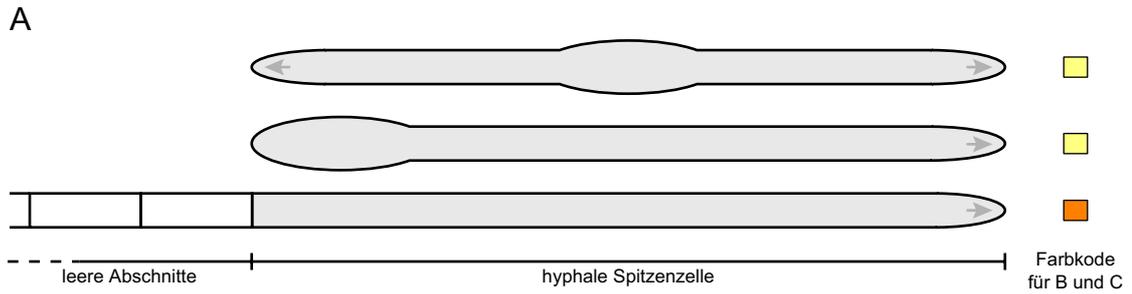
ABB. 2-14 Die Deletion von *rrm4* verhindert die Bildung leerer Abschnitte und beeinflusst die Polarität der Zellen.

(A) Die Deletion von *rrm4* führt zu einer signifikanten Steigerung von bipolaren Filamenten. Vier Stunden nach der Induktion des filamentösen Wachstums ist bei 56 ± 5 % der *rrm4*Δ Zellen ein bipolares Filamentwachstum zu beobachten, der Ausgangsstamm AB33 und der Komplementationsstamm (AB33rrm4-egfp) bilden nur in 12 ± 8 % bzw. 17 ± 8 % der Fälle bipolare Hyphen. Die gezeigten Ergebnisse stammen aus zwei Experimenten mit jeweils zwei unabhängigen Stämmen. (B) Die Maximallänge der hyphalen Spitzenzelle ist durch eine *rrm4* Deletion nicht beeinträchtigt. Sechs Stunden nach der Induktion des filamentösen Wachstums haben die *rrm4*Δ Zellen mit 82 ± 10 μm eine sowohl mit AB33 (87 ± 10 μm) als auch mit AB33rrm4-egfp (83 ± 9 μm) vergleichbare Länge. In die Berechnung der durchschnittlichen Länge der Spitzenzelle wurden nur Zellen einbezogen, die länger waren als der Wert für den Median. Die Messungen stammen aus einem Experimenten mit zwei unabhängigen Stämmen. (C) Durch die Deletion von *rrm4* bleibt die Bildung leerer Abschnitte aus. Bis sechs Stunden nach der Induktion des filamentösen Wachstums konnte die Bildung leerer Abschnitte nicht beobachtet werden. Die Daten entstammen den Messwerten für Abb. 2-15.

ABB. 2-15 Wachstumsverhalten von *rrm4* Mutanten im Vergleich zum Ausgangsstamm AB33

Wachstumsverhalten des *U. maydis* Stamms AB33 in Flüssigmedium nach der Induktion des filamentösen Wachstums durch einen Wechsel der Stickstoffquelle. (A) Schematische Darstellung des filamentösen Wachstums von AB33. Nach dem Medienwechsel bildet die Zelle ein *b*-abhängiges Filament (oben). Nach ca. 4 Stunden beginnt die Spitzenzelle (grau) mit der Ausbildung von leeren Abschnitten (weiß) an ihrem distalen Ende (unten). Die Wachstumsrichtung ist durch einen Pfeil dargestellt. (B) Zeitlicher Längenzuwachs der hyphalen Spitzenzelle. Die farbliche Unterscheidung zwischen Zellen vor und nach dem Beginn der Bildung leerer Abschnitte ist entsprechend der Darstellung in A. Die Deletionsmutante AB33rrm4Δ-2 zeigt, im Vergleich zum Ausgangsstamm AB33 und der Komplementationsmutante AB33rrm4-egfp, einen deutlich verlangsamten Längenzuwachs und eine Repression der Ausbildung leerer Abschnitte. (C) Längenverteilung der Spitzenzellen weiterer Stämme 6h nach der Induktion des filamentösen Wachstums. Die farbliche Kodierung der Balken entspricht der Darstellung in A. Nur die Stämme AB33rrm4-mrfp und AB33rrm4^{mR3}-egfp zeigen ein Wachstum wie es in B für den Ausgangsstamm AB33 gezeigt ist, die anderen Stämme zeigen den für AB33rrm4Δ-2 gezeigten, verlangsamten Längenzuwachs und eine Repression der Ausbildung leerer Abschnitte.

[Eine tabellarische Darstellung der gesamten Daten ist in Anhang A, S. 109 zu finden.]



2.3 Rrm4 aus *U. maydis* ist wichtig für das polare Wachstum der *b*-abhängigen Hyphen

Zusammenfassend kann man festhalten, dass die Deletion von *rrm4* keine Auswirkungen auf die Maximallänge der Spitzenzelle hat. Sie reduziert aber die Wachstumsgeschwindigkeit der Spitzenzelle und hat Auswirkungen auf die Polarität der Zellen während des filamentösen Auswachsens, was zu einem verstärkt bipolarem Filamentwachstum führt. Darüber hinaus verhinderte die Deletion von *rrm4* die Bildung leerer Abschnitte, was zu einer dramatischen Verkürzung der Hyphenlänge führt.

2.3.4 Lokalisation der Rrm4 Fusionsproteine in vivo

Die Lokalisation von Rrm4 im *b*-abhängigen Filament

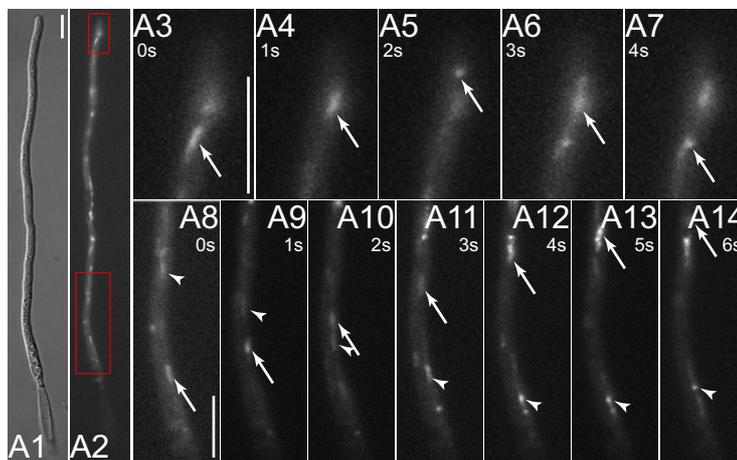


ABB. 2-16 Rrm4-eGFP akkumuliert in bewegten Partikeln

Das zytoplasmatisch lokalisierte Rrm4-eGFP bewegt sich entlang von Bahnen durch das Filament (hier: 4 Stunden nach der Induktion). Es ist eine bidirektionale Partikelbewegung zu beobachten (A3-A14). Ein Richtungswechsel ist nur dann zu beobachten, wenn ein Partikel das Ende der Zelle (A3-A7, Pfeil; A11-A14, Pfeilspitze) erreicht. Siehe auch Film 2-1. Balken in A1, A3 und A8 = 5 µm

Der in Abschnitt 2.3.3 beschriebene Stamm AB33rrm4-egfp diente auch der Lokalisation des Rrm4 Proteins in vivo. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen zeigten, dass Rrm4-eGFP zytoplasmatisch in Form von Partikeln lokalisierte. Diese Partikel bewegten sich entlang von definierten Bahnen durch die filamentöswachsende Zelle,

wobei ein Pendeln der Partikel zwischen dem zentralen Bereich des Filaments und den Zellpolen zu beobachten war. Eine Richtungsänderung der Partikelbewegung konnte nur an den Zellpolen beobachtet werden (Abb. 2-16; Film 2-1). Nach der vollzogenen Richtungsänderung bewegten sich die Partikel auf vermutlich der selben Bahn in die entgegengesetzte Richtung (Abb. 2-16A3-A7 und A11-A14 „Pfeilspitze“; Film 2-1). Die Geschwindigkeit mit der sich die Partikel im Stamm AB33rrm4-egfp bewegten, betrug

durchschnittlich $1,6 \pm 0,7 \mu\text{m} \cdot \text{sec}^{-1}$ (#1; n=40) bzw. $1,6 \pm 0,6 \mu\text{m} \cdot \text{sec}^{-1}$ (#2; n=40), die Bandbreite betrug $0,5\text{-}3,6 \mu\text{m} \cdot \text{sec}^{-1}$ (AB33rrm4-egfp#1) und $0,2\text{-}3,6 \mu\text{m} \cdot \text{sec}^{-1}$ (AB33rrm4-egfp#2).

FILM 2-1 Rrm4-eGfp bewegt sich bidirektional durch das Filament
 Zeitraffer zu Abb. 2-16 mit dem Stamm AB33rrm4-egfp#2.
 (siehe Anhang B)



Die Abhängigkeit der Bewegung der Rrm4-haltigen Partikel vom Zytoskelett

Die Bewegung der Rrm4-Gfp Partikel entlang von definierten Bahnen zu den distalen Zellpolen ließ eine Verbindung zum Mikrotubulizytoskelett vermuten. Um diese Annahme zu untersuchen, wurde der Stamm AB33rrm4-egfp (etwa sechs Stunden nach der Induktion des filamentösen Wachstums) mit dem Mikrotubuli-Inhibitor Benomyl (Urani et al., 1995; Steinberg et al., 2001; Straube et al., 2003) und in Kontrollexperimenten mit dem Lösungsmittel DMSO behandelt. Durch die Kontrollbehandlung mit DMSO konnte keine Änderung der Partikelzahl und -bewegung festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu führte die Zerstörung des Mikrotubulizytoskeletts durch $20 \mu\text{M}$ Benomyl zu einer signifikanten Reduzierung der Partikelzahl (Abb. 2-17A2 und A3). Einige Partikel akkumulierten während der Behandlung, sodass wenige größere, immobile Partikel entstanden (Abb. 2-17A3 und Film 2-2A).

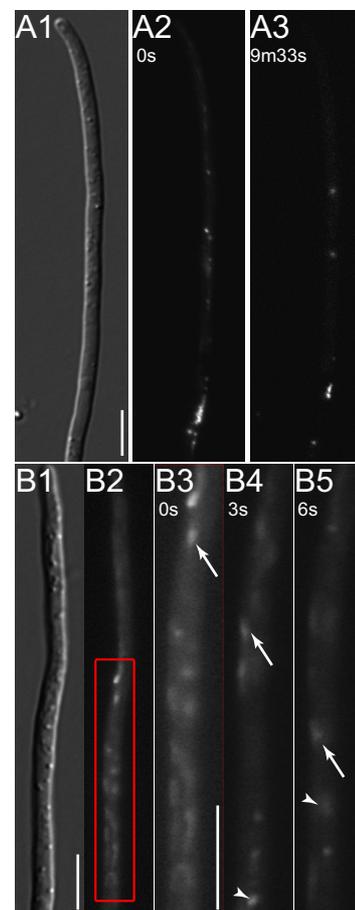


ABB. 2-17 Die Partikelbildung ist mikrotubuliabhängig.

(A) Durch die Behandlung mit $20 \mu\text{M}$ Benomyl nahm die Zahl der Rrm4-eGfp Partikel im Filament stark ab (vgl. A2 mit A3). Etwa 9,5 min nach der Zugabe von Benomyl waren nur noch wenige große, immobile Partikel in der Zelle zu beobachten (A3). (B) Nach dem Auswaschen des Benomyls, bildeten sich unmittelbar bewegende Partikel (B3 bis B5, Pfeil und Pfeilspitze). Balken in A1, B1 und B3 = $5 \mu\text{m}$.

2.3 Rrm4 aus *U. maydis* ist wichtig für das polare Wachstum der b-abhängigen Hyphen

Das Auswaschen von Benomyl führte zu einer erneuten Formation der Rrm4-eGfp Partikel, die sich wieder bidirektional im Filament bewegten (Abb. 2-17B3-B5; Film 2-2B). Die Reversibilität der Benomylbehandlung ist weiteres Indiz für einen mikrotubuliabhängigen Prozess (Straube et al., 2002).



FILM 2-2 Die Rrm4 Partikelbildung ist mikrotubuliabhängig

(A) Zeitraffer zu Abb. 2-17A mit dem Stamm AB33rrm4-egfp.
(B) Zeitraffer zu Abb. 2-17B mit dem Stamm AB33rrm4-egfp.
(siehe Anhang B)

Zur endgültigen Konsolidierung der Annahme, dass es sich um einen mikrotubuliabhängigen Prozess handelte, sollte die Bewegung der Rrm4 Partikel entlang des mit Gfp markierten Mikrotubulizytoskeletts beobachtet werden. Hierzu wurde zunächst der Stamm AB33rrm4 Δ -2/egfp-tub1 durch die homologe Integration des *P_{otef}-egfp-tub1* Konstrukts (Plasmid pOtefGFPTub1¹¹) in den *ip* Locus des Stamms AB33rrm4 Δ -2 hergestellt. Das *rrm4* Δ -2 Allel von AB33rrm4 Δ -2/egfp-tub1 wurde dann durch das *rrm4-mrfp* Fusionsgen ersetzt, wodurch der Stamm AB33egfp-tub1/rrm4-mrfp entstand. Dieser exprimiert Rrm4 als Fusionsprotein mit dem monomeren rot-fluoreszierenden Protein (mRfp) (Toews et al., 2004; Campbell et al., 2002) unter der Kontrolle des *rrm4* Wildtyppromotors und das N-terminal mit Gfp fusionierte α -Tubulin unter der Kontrolle des konstitutiv aktiven *otef*-Promotors (Abb. 2-18A2).

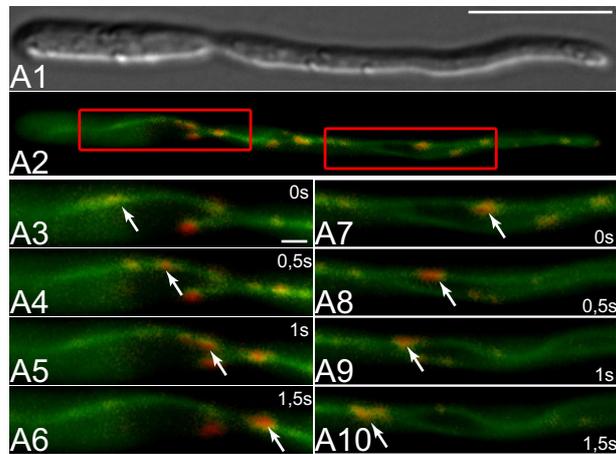


ABB. 2-18 Rrm4-mRfp-Bewegung entlang des Mikrotubulizytoskeletts

Die Rrm4-mRfp Partikel (rot) kolokalisieren in der Hyphe mit dem Gfp- α -Tubulin-enthaltenden Mikrotubulizytoskelett (grün; A2). Die der Partikel im Filament ist bidirektional (A3 bis A6, Pfeil; A7 bis A10, Pfeil) entlang der Mikrotubuli-Bahnen. Richtungswechsel waren nur an den Zellpolen zu beobachten (siehe Film 2-3 und Film 2-1). Balken in A1 = 5 μ m, in A3 = 1 μ m.

11. Das Plasmid pOtefGFPTub1 wurde freundlicherweise von G. Steinberg zur Verfügung gestellt

In Übereinstimmung mit den Beobachtungen der Benomyl-Behandlung, kolokalisiert Rrm4-mRfp mit dem Mikrotubulizytoskelett im Stamm AB33egfp-tub1/rrm4-mrfp. Wie in Abb. 2-18 gezeigt, bewegten sich die Rrm4 Partikel bidirektional entlang des dynamischen Mikrotubulizytoskeletts (Abb. 2-18A3-A6 und A7-A10; Film 2-3).

FILM 2-3 Rrm4-mRfp Partikel kolokalisieren mit dem Mikrotubulizytoskelett
 Zeitraffer zu Abb. 2-18 mit dem Stamm AB33egfp-tub1/rrm4-mrfp.
 (siehe Anhang B)



Um festzustellen, ob ein Defekt bei der Kernpositionierung die Ursache für das bidirektionale Wachstum und das Fehlen der leeren Abschnitte ist, wurden die Stämme AB33rrm4 Δ -2/gfp-tub1 und AB33gfp-tub1/rrm4-mrfp nach einer Kernfärbung mit DAPI mikroskopisch untersucht. Wie in Abb. 2-18A2 und Abb. 2-19A gezeigt ist, besitzt das *b*-abhängige Filament von AB33egfp-tub1/rrm4-mrfp zwei bis vier lange Mikrotubulibündel, die eine typische Mikrotubulidynamik zeigen (Abb. 2-18A7 bis A10). Diese Beobachtungen stehen in Einklang mit dem von Steinberg et al. beschriebenen Mikrotubulizytoskelett im *b*-abhängigen Filament von *U. maydis* (Steinberg et al., 2001). Man kann somit davon ausgehen, dass weder die Deletion von *rrm4* noch durch die Expression des Rrm4-mRfp Fusionsproteins eine Auswirkung auf das Mikrotubulizytoskelett hat. Ein intaktes Mikrotubulizytoskelett ist für die Kernmigration und -positionierung während des polaren Wachstums von *U. maydis* von essenzieller Bedeutung: Eine Depolymerisierung der Mikrotubuli während des filamentösen Wachstums von AB33 verhindert die Kernmigration und hat gleichzeitig ein bipolares Filamentwachstum zur Folge (G. Steinberg und U. Fuchs, pers. Mitteilung).

Im Stamm AB33egfp-tub1/rrm4-mrfp war ein Einwandern des Zellkerns in das Filament erst zu beobachten, wenn das Verhältnis der Distanzen „distales Ende-Zellkern“ zu „Zellkern-Hyphenspitze“ etwa 1:3 betrug (Daten nicht gezeigt). Die Migration des Zellkerns ins Filament führte auch zu einer Streckung der ursprünglich kreisrunden Form (Abb. 2-19). In der ausgewachsenen Spitzenzelle war eine etwa mittige Position des Zellkerns zu konstatieren (Abb. 2-19A). Wie in Abb. 2-19B1 zu sehen ist, fand eine Migration des Zellkerns in das Filament auch im Stamm AB33rrm4 Δ -2 statt. Die ins Filament migrierten Zellkerne zeigten auch die längliche zu erkennen (vgl. Abb. 2-19A). Dies war aber nur in langen (vgl. oben), unipolar wachsenden Filamenten zu beobachten. In den

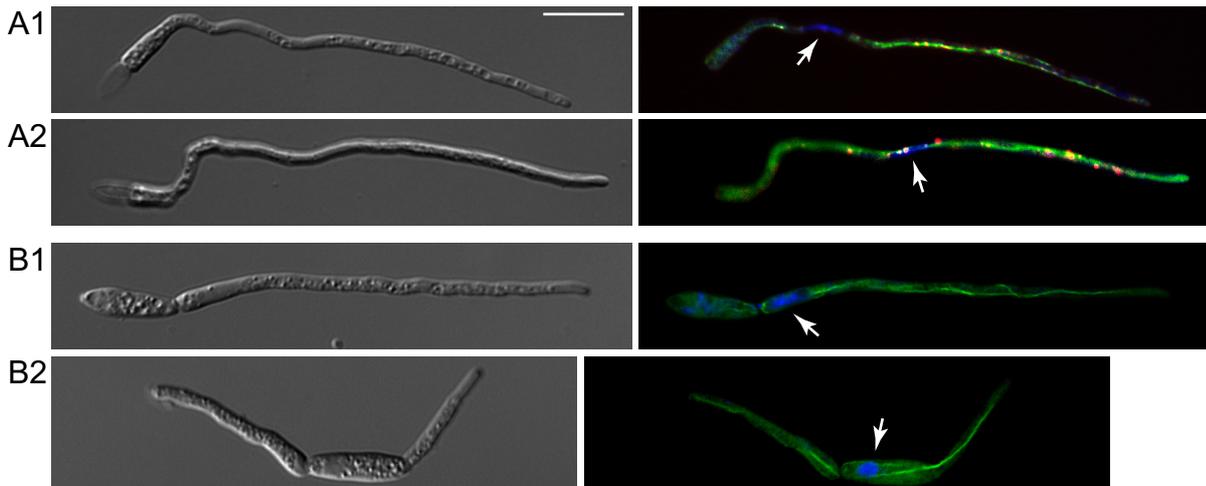


Abb. 2-19 Kernmigration im Filament ist unabhängig von *Rrm4*

Sechs Stunden nach der Induktion des filamentösen Wachstums ist durch eine Kernfärbung mit DAPI (blau) die Lage des Zellkerns (Pfeil) zu beobachten. (A) Im Stamm AB33gfp-tub1/*rrm4*-mrfp ist der in das Filament eingewanderte Zellkern (blau) sowie die Mikrotubuli (grün)-assoziierten *Rrm4*-mRfp Partikel (rot) zu beobachten. Der Zellkern ist im Filament meist zentral positioniert (A2). (B) Im Stamm AB33*rrm4* Δ -2/gfp-tub1 ist die Kernpositionierung in unipolar wachsenden Filamenten nicht beeinträchtigt (B1). In bipolar wachsenden Filamenten verbleibt der Zellkern an einer zentralen Position in der initialen Zelle (B2). Man beachte, dass die Zellen mit 3 % (f.c.) Formaldehyd fixiert wurden. Balken in A = 10 μ m.

häufiger auftretenden, bipolar wachsenden Filamenten (Abb. 2-14A, S. 40) der *rrm4* Δ Mutante verblieb der Zellkern in der initialen Zelle, eine Kernwanderung war hier nicht zu beobachten (Abb. 2-19B2). In bipolar wachsenden Filamenten besitzt der Zellkern in der initialen Zelle eine zentrale Position (Abb. 2-19B2).

Im Ergebnis kann festgehalten werden, dass *Rrm4* mikrotubuliabhängig in zytoplasmatischen Partikeln akkumuliert, die sich bidirektional zu den Zellpolen bewegen. Das Fehlen der *Rrm4* Partikel hat aber im Gegenzug keine Auswirkungen auf das Mikrotubulizytoskelett und auch nicht auf die Kernpositionierung.

Das konventionelle Kinesin Kin2 ist an der Partikelbewegung beteiligt

Die Bewegung der *Rrm4* Partikel entlang des Mikrotubulizytoskeletts legt eine Beteiligung von Kinesin- bzw. Dynein-Motorproteinen nahe. In *U. maydis* gibt es neun Motorproteine aus der Familie der Kinesine (<http://mips.gsf.de/genre/proj/ustilago/>) und ein Dynein-Motorprotein (Straube et al., 2001). Die Deletion des für das konventionelle Kinesin Kin2 kodierenden ORFs führt im dikaryotischen Filament zu einem Defekt bei

der Bildung leerer Abschnitte (Steinberg et al., 1998). Die Induktion des filamentösen Wachstums im AB33kin2 Δ Stamm führt außerdem zu einem bipolaren Auswachsen der Zellen (G. Steinberg, pers. Mitteilung).

Da sowohl die Deletion von *rrm4* als auch die Deletion von *kin2* zu einem bipolaren Filamentwachstum und Defekten bei der Bildung leerer Abschnitte führt, wurde die Lokalisation von Rrm4-eGfp in einem *kin2* Δ Stamm untersucht. Hierzu wurde im Stamm AB33rrm4-egfp der ORF von *kin2* durch eine Hygromycin-Resistenzkassette ersetzt, wodurch der Stamm AB33rrm4-egfp/*kin2* Δ entstand. Durch die Homologe Integration der Resistenzkassette wurde die Region von Nukleotidposition 12321-9284 auf dem Contig 1.149 der Genomsequenz deletiert (http://www.broad.mit.edu/annotation/fungi/ustilago_maydis/). Die Induktion des bE/bW Heterodimers führte zu einem bipolaren Wachstum (Abb. 2-20A). Die Lokalisation von Rrm4-eGfp in vivo zeigte die Bildung von mobilen, zytoplasmatische Partikeln, die sich entlang des Mikrotubulizytoskeletts bewegten (Abb. 2-20B). Diese Bewegung war vornehmlich im zentralen Bereich der Zelle zu beobachten (Film 2-4). Interessanterweise akkumulierte Rrm4-eGfp aber an den Spitzen der bipolar wachsenden Hyphen (Abb. 2-20B; Film 2-4). Das konventionelle Kinesin Kin2 ist folglich am Transport der Rrm4 Partikel beteiligt.

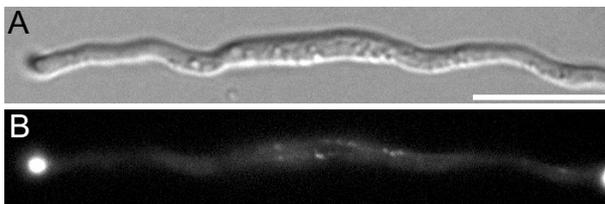


ABB. 2-20 Die Deletion von *kin2* führt zu einer Lokalisation von Rrm4-eGfp in der Hyphenspitze

(A) Der Stamm AB33rrm4-egfp/*kin2* Δ ein bipolares Filamentwachstum. (B) Die Deletion von *kin2* führt zu einer Akkumulation von Rrm4 in den Hyphenspitzen. Balken in A = 10 μ m

FILM 2-4 Die Deletion von *kin2* führt zu einer Akkumulation der Rrm4 Partikel in der Hyphenspitze

Zeitraffer zu Abb. 2-20 mit dem Stamm AB33rrm4-egfp/*kin2* Δ #2.
 (siehe Anhang B)



2.3.5 Funktion der Domänen in *Rrm4*

Mit *rrm4* wurde ein offener Leserahmen identifiziert, der für ein Protein mit drei RRM-Domänen (As-Positionen: 73-141, 157-231 und 322-394) und einer C-terminalen PABC-Domäne (As-Position: 727-792) kodiert. Die Domänenanalyse mittels SMART (<http://smart.embl.de/>; Letunic et al., 2004; Schultz et al., 1998) identifizierte das dritte RRM-Motiv als am besten konserviert (SMART e-Wert: $1,89e-24$), wohingegen die erste und zweite RRM-Domäne mit einer deutlich geringeren Wahrscheinlichkeit vorhergesagt wurden (SMART e-Wert $8,67e-1$ bzw. $7,60e-6$). Der im C-Terminus befindliche, für Poly[A]-bindende Proteine typische Bereich wurde, wenn auch nur mit einer geringen Wahrscheinlichkeit, als PABC-Domäne identifiziert (Poly[A]-bindendes Protein C-terminale Domäne; SMART e-Wert: $3,46e-1$; vgl. Abschnitt 2.1.1). Diese Domäne ist im menschlichen Poly[A]-bindenden Protein an der Rekrutierung verschiedener Proteinfaktoren beteiligt (Craig et al., 1998; Khaleghpour et al., 1999; Hoshino et al., 1999; Mangus et al., 1998). Um den Einfluß dieser bioinformatisch vorhergesagten Domänen auf die Funktion von *Rrm4* zu untersuchen, wurden Mutationsstudien durchgeführt.

Mutationen der PABC-Domäne führen zum Verlust der Partikelbildung

Für drei Poly[A]-bindende Proteine und das menschliche HYD konnte die Struktur der PABC-Domäne durch NMR-Spektroskopie und Röntgenkristallographie ermittelt werden (Deo et al., 2001; Kozlov et al., 2001). Ihre Struktur in den verschiedenen Proteinen ist weitestgehend gleich und besteht aus ungefähr 70 Aminosäuren, die eine stark hydrophobe Tasche aus vier bis fünf α -Helices bilden (Abb. 2-21A, Kozlov et al., 2001). Diese Tasche bindet β -Turn-bildende Peptide durch extensive hydrophobe und elektrostatische Interaktionen sowie durch Wechselwirkungen überlappender, aromatischer Aminosäurereste (Kozlov et al., 2004). Die Sequenzen der verschiedenen PABC-Domänen besitzen ihre höchste Ähnlichkeit im Bereich der zweiten, dritten und fünften α -Helix, dem Bereich, den Kozlov et al. als hydrophobe Bindetasche identifizierten, die an der Peptidbindung beteiligt ist. Die Aminosäuren F22, I25, A33 und K35 der menschlichen PABC-Domäne konnten als Begrenzungen dieser Bindetasche identifiziert werden (Kozlov et al., 2001). F22 und K35 sind essenziell für die Interaktion der PABC-Domäne des menschlichen Pabp1 mit den Interaktionspartnern Paip1 bzw. Paip2 (Kozlov et al., 2004). Der Sequenzvergleich mit den PABC-Domänen aus hPabp1, Pab1p aus *S. cerevisiae* sowie

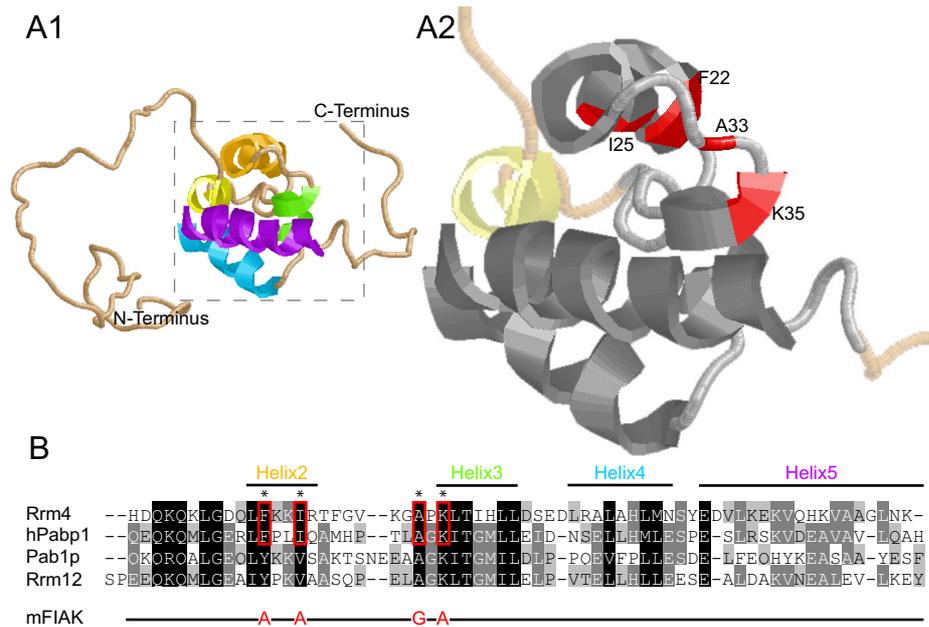


ABB. 2-21 Struktur und Sequenz der PABC-Domäne

(A) Band-Diagramme der hPabp1 PABC-Domäne (*H. sapiens*; PDB ID: 1G9L) wurden mit RasMol V2.6 (Sayle und Milner-White, 1995) erzeugt. Die Farben der Helices entsprechen der Farbkodierung in B. Der eingerahmte Bereich in A1 ist in A2 als Vergrößerung abgebildet. Die an der Protein/Protein-Wechselwirkung beteiligten und die Peptidbindetasche begrenzenden Aminosäuren F22, I25, A33 und K35 sind rot markiert. Der in grau dargestellte Bereich entspricht dem in B verwendeten Sequenzausschnitt. (B) Aminosäuresequenzvergleich ausgewählter PABC-Domänen vom Menschen (hPabp1), der Bäckerhefe (Pab1p, *S. cerevisiae*) und *U. maydis* (Rrm4 und Rrm12). Die gezeigte Sequenz von hPabp1 entspricht dem in A2 gezeigten Ausschnitt und die in der Rrm4 PABC-Domäne konservierten Aminosäuren sind durch eine rote Umrandung hervorgehoben. Die in A2 rot markierten Aminosäuren sind durch einen Asterisk über den Sequenzen gekennzeichnet, die Sequenz von Rrm4^{mFIAK}-eGfp ist unter den Sequenzen als mFIAK graphisch dargestellt. Die Linie zeigt identische As zu Rrm4.

Rrm4 und Rrm12 aus *U. maydis* zeigte eine hohe Ähnlichkeit der Domänen untereinander. Interessanterweise waren die oben beschriebenen, an den Protein/Protein-Wechselwirkungen beteiligten Aminosäuren F22, I25, A33 und K35 auch in der PABC-Domäne aus Rrm4 zu 100 % konserviert (im Gegensatz zu Pab1p und Rrm12; Abb. 2-21B).

Um zu untersuchen, welche Funktion die PABC-Domäne in Rrm4 besitzt und ob die konservierten Aminosäuren einen Einfluss auf die PABC-Funktion haben, wurden die Stämme AB33rrm4^{Δpabc}-egfp und AB33rrm4^{mFIAK}-egfp hergestellt. Hierzu wurde das *rrm4Δ-2* Allel des Stamms AB33rrm4^{Δ-2} durch die homologe Integration des Fusionsgens *rrm4^{Δpabc}-egfp* bzw. *rrm4^{mFIAK}-egfp* ersetzt. AB33rrm4^{Δpabc}-egfp exprimiert ein Rrm4-eGfp Fusionsprotein in dem der Aminosäurebereich 689-794 deletiert ist und AB33rrm4^{mFIAK}-egfp exprimiert ein Rrm4-eGfp Fusionsprotein mit den Mutationen F740A, I743A, A751G und K753A (Abb. 2-21B). Beide Stämme zeigten – wie die

2.3 *Rrm4* aus *U. maydis* ist wichtig für das polare Wachstum der b-abhängigen Hyphen

Deletionsmutante – ein retardiertes bipolares Wachstum der Filamente (Abb. 2-13D und E, S. 37; Abb. 2-15C, S. 40; Abb. 2-22A1 und B1) sowie Defekte beim Ausbilden leerer Abschnitte (Abb. 2-15C, S. 40). Durch die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Stämme konnte ein fast gänzlicher Verlust der Partikelbildung festgestellt werden. In den Filamenten waren nur wenige, immobile Partikel zu beobachten, die sichtbar größer waren als die mobilen Partikel in den Stämmen AB33rrm4-egfp und AB33rrm4-mrfp (Abb. 2-22A2 und B2). Darüber hinaus war in beiden Stämmen eine erhöhte, diffuse Fluoreszenz um den Zellkern zu beobachten (Abb. 2-22A2 und B2). Es lässt sich folglich festhalten, dass die C-terminale PABC-Domäne, und im speziellen die Aminosäuren F740, I743, A751 und K753, wichtig für die Partikelbildung, das polare Filamentwachstum und die Bildung leerer Abschnitte sind.

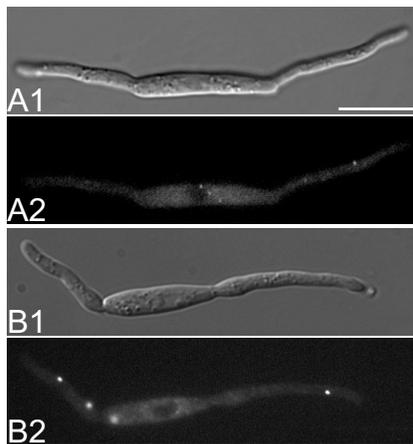


ABB. 2-22 Zellulare Lokalisation der $Rrm4^{\Delta pabc}$ -eGfp bzw. $Rrm4^{mFlAK}$ -eGfp Fusionsproteine

(A) Die Deletion der PABC-Domäne führte zu einem bipolarem Hyphenwachstum (A1, DIC-Bild) und zu einem fast kompletten Verlust der Partikelbildung (A2). Mobile Partikel wurden nicht mehr gebildet. (B) Die Mutation der PABC-Domäne hat den gleichen Effekt wie die Deletion. Es ist ein bipolares Hyphenwachstum zubeobachten (B1, DIC-Bild) und ein fast kompletter Verlust der Partikelbildung (B2). Auch das Einführen der Mutationen führt zu einem Verlust der Motilität der Partikel. Balken in A1 = 10 μ m

Die Domänen RRM1 und RRM2 übernehmen eine essenzielle Funktion von *Rrm4*

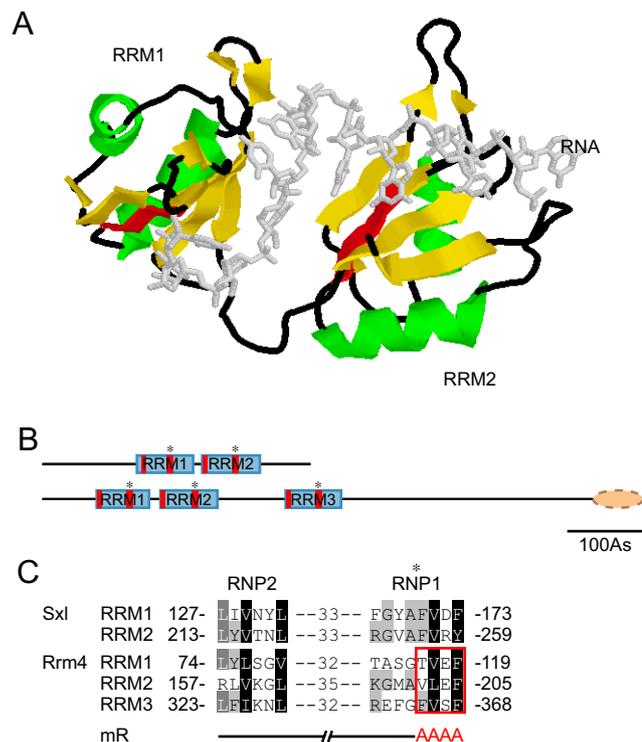
Um den Einfluß der drei identifizierten RNA-Bindedomänen vom Typ des RRM näher zu untersuchen, wurden die Bindedomänen mutagenisiert. Hierfür wurde die RNP1-Region der RRM-Domänen ausgewählt, die an der RNA-Bindung beteiligt ist (Abb. 2-23A; Lisbin et al., 2000). In der acht Aminosäuren langen RNP1-Region wurde jeweils ein konservierter Bereich von vier Aminosäuren mutiert (Abb. 2-23B). Hierzu wurde das jeweilige Konstrukt homolog in den *rrm4* Δ -2 Locus des Stamms AB33rrm4 Δ -2 integriert. Die hergestellten Stämme AB33rrm4^{mR123}-egfp, AB33rrm4^{mR1}-egfp, AB33rrm4^{mR2}-egfp und AB33rrm4^{mR3}-egfp exprimieren jeweils als Rrm4-eGfp Fusi-

onsprotein die folgenden Rrm4-Mutantenproteine: mR1: T116A, V117A, E118A und F119A; mR2: V202A, L203A, E204A und F205A; mR3: F365A, V366A, S367A und F368A; mR123: mR1 + mR2 + mR3 (Abb. 2-23B).

Alle vier Stämme zeigten während des vegetativen Wachstums keine morphologischen Unterschiede zum Ausgangsstamm AB33 (Daten nicht gezeigt). Nach der Induktion des filamentösen Wachstums zeigte sich jedoch bei AB33rrm4^{mR123}-egfp, AB33rrm4^{mR1}-egfp und AB33rrm4^{mR2}-egfp das typische, bipolare Filamentwachstum (Abb. 2-13F, S. 37), das retardierte Wachstum der Spitzenzelle und der Defekt bei der Bildung leerer Abschnitte (Abb. 2-15C, S. 40). Im Gegensatz dazu, zeigte der Stamm AB33rrm4^{mR3}-egfp keine Veränderung des filamentösen Wachstums im Vergleich zum Ausgangsstamm AB33 (Abb. 2-13I, S. 37). In Bezug auf die Partikelbildung zeigten die vier Stämme keine Unterschiede: In allen Stämmen bildeten sich mobile Partikel, die sich bidirektional entlang des Mikrotubulizytoskeletts durch die Zelle bewegten (Abb. 2-24; Film 2-5; Film 2-6; Film 2-7; Daten für AB33rrm4^{mR123}-egfp nicht gezeigt). Die Mutatio-

ABB. 2-23 Mutationen im RNP1-Submotiv der RRM-Domänen

(A) Band-Diagramm (RasMol; Sayle und Milner-White, 1995) der Tandem-RRM-Domänen (RRM1 und RRM2) aus Sxl mit gebundener RNA (*D. melanogaster*; PDB ID: 1B7F). Die vier C-terminalen As der RNP1 Regionen sind rot markiert. (B) Maßstabsgetreue, schematische Darstellung von Sxl aus *D. melanogaster* und Rrm4 aus *U. maydis*. Die RNP1 und RNP2 Submotive sind als rote Bänder in den RRM-Domänen dargestellt. Das RNP1 Oktamer ist mit einem Asterisk markiert. (C) Die Mutationen wurden im RNP1-Submotiv (Asterisk, wie in B) der jeweiligen RRM-Domäne eingefügt, so dass die vier C-terminalen, konservierten Aminosäurereste des RNP1 Oktamers (roter Kasten) durch Alanine ersetzt wurden. Es ist jeweils die Position der ersetzten und letzten Aminosäure einer Zeile angegeben. Die Zeile mR ist eine schematische Darstellung für die Mutationen, wobei die Linie identische Aminosäuren mit der jeweils mutierten RRM-Domäne aus Rrm4 darstellt.



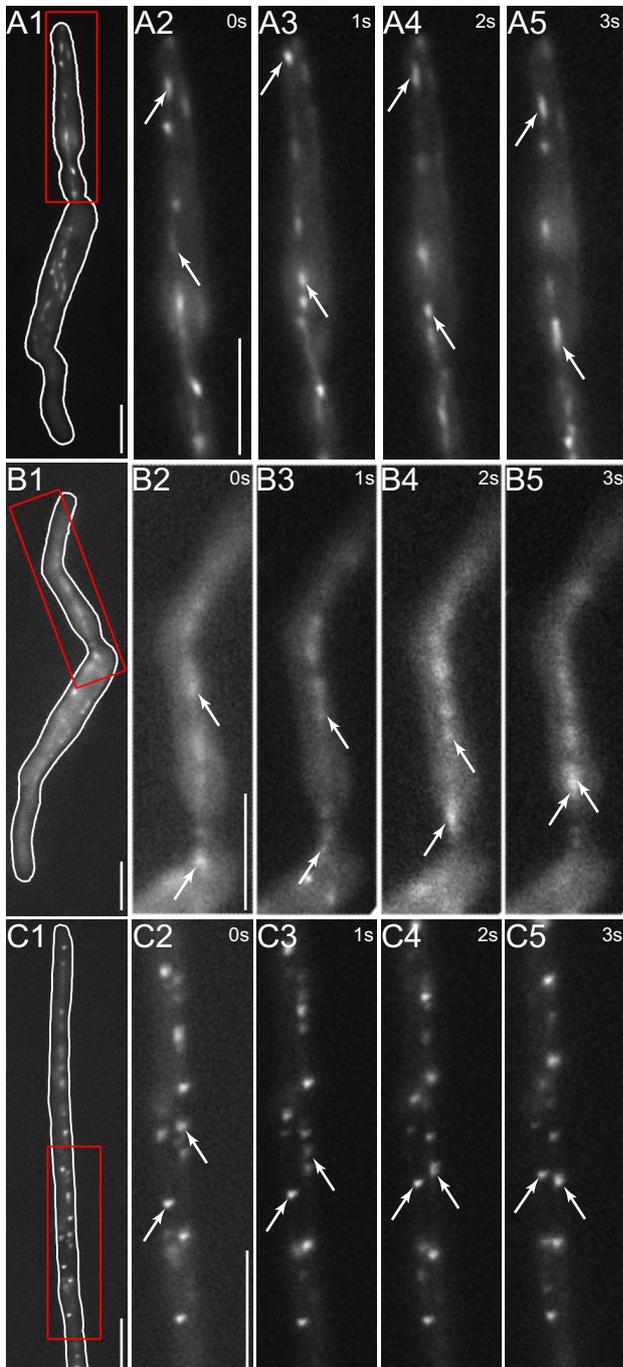
2.3 *Rrm4* aus *U. maydis* ist wichtig für das polare Wachstum der *b*-abhängigen Hyphen

ABB. 2-24 Zellulare Lokalisation der Rrm4-eGfp Mutantenproteine

Fluoreszenzmikroskopie von Rrm4^{mR1}-eGfp- (A), Rrm4^{mR2}-eGfp- (B) und Rrm4^{mR3}-eGfp Partikeln (C) im Stamm AB33 etwa vier Stunden nach der Induktion der *b*-Gene.

(A) Die Mutation mR1 beeinträchtigt weder die Partikelbildung noch die Partikelbewegung (A2 bis A5, Pfeile). Sie ist aber essenziell für das Ausbilden eines unipolaren Filaments(A1).

(B) Die Mutation mR2 beeinträchtigt die Partikel nicht (B2 bis B5, Pfeile), ist aber ebenfalls essenziell für das unipolare Filamentwachstum (B1).

(C) Im Gegensatz zu mR1 und mR2 behindert die Mutation mR3 weder die Partikelbildung und -bewegung (C2 bis C5, Pfeile) noch das reguläre filamentöse Wachstum(C1).

Balken in A1, B1 und C1 = 5 µm, Balken in A2, B2 und C2 = 5 µm.

nen in den RRM-Domänen haben offensichtlich keinen Einfluss auf die Partikelbildung, die Funktionalität der ersten und zweiten RRM-Domäne ist aber wichtig für das polare Wachstum und die Bildung leerer Abschnitte.

FILM 2-5 Zellulare Lokalisation des Rrm4^{mR1}-eGfp Mutantenproteins
Zeitraffer zu Abb. 2-24A mit dem Stamm AB33rrm4^{mR1}-egfp#2.
(siehe Anhang B)



FILM 2-6 Zellulare Lokalisation des Rrm4^{mR2}-eGfp Mutantenproteins
Zeitraffer zu Abb. 2-24B mit dem Stamm AB33rrm4^{mR2}-egfp#1.
(siehe Anhang B)



FILM 2-7 Zellulare Lokalisation des Rrm4^{mR3}-eGfp Mutantenproteins
Zeitraffer zu Abb. 2-24C mit dem Stamm AB33rrm4^{mR3}-egfp#1.
(siehe Anhang B)



Die Mutationsanalysen ergaben, dass die bioinformatisch identifizierten Domänen wichtig für die Funktion von Rrm4 sind. Die C-terminale PABC-Domäne ist essenziell für die Bildung der mobilen Rrm4 Partikel. Deletion oder Mutationen dieser Domäne führten zu einem verstärkt bipolaren Filamentwachstum und einem Defekt bei der Bildung leerer Abschnitte. Die Mutationen der ersten beiden RRM-Domänen führen ebenfalls zu diesen Defekten, während des filamentösen Wachstum, haben aber keinen Einfluss auf die Partikelbildung. RRM1 und RRM2 spielen daher eine wichtige Rolle bei der Funktion von Rrm4.

Um die Genexpression zu regulieren, sind Mechanismen erforderlich, die über die Transkriptionsregulation hinausgehen. Eine wichtige Rolle bei dieser posttranskriptionellen Regulation der Genexpression spielt die Regulation der mRNA, beispielsweise durch die Beeinflussung der Stabilität, Lokalisation oder Translation. Die Informationen für solche Regulationsprozesse werden meistens von spezifischen RNA-bindenden Proteinen zur Verfügung gestellt, die assoziiert mit den Transkripten als RNPs über das Schicksal der RNA und damit über die Funktion des Proteins entscheiden. Die Beispiele für den Einfluss von RNPs aus höheren Eukaryonten werden immer zahlreicher und detaillierter beschrieben, wohingegen die Untersuchungen in filamentösen Pilzen noch in den Anfängen stecken (Sachs, 1998; Vilela und McCarthy, 2003); Beispiele sind die Translationsregulation der *arg-2* und *opcA* mRNA durch kleine stromaufwärtsliegende ORFs in *N. crassa* bzw. *A. nidulans* (Gaba et al., 2001; Hoffmann et al., 2001) und die transgeninduzierte, posttranskriptionelle Regulierung der Genexpression (*gene silencing*) durch die RNAi (RNA-Interferenz)-Maschinerie in *N. crassa* (Catalanotto et al., 2004).

Im Vorfeld dieser Arbeit wurde das Genom des Pflanzenpathogens *U. maydis* unter Verwendung eines bioinformatisch gestützten Ansatzes systematisch nach RNA-bindenden Proteinen mit PUM-, KH-, DSRM- oder RRM-Domänen durchsucht. Aufbauend auf die initiale bioinformatische Analyse wurden im Rahmen dieser Arbeit die identifizierten potenziell RNA-bindenden Proteine mit einem revers-genetischen Ansatz auf ihren Einfluss auf die Entwicklung von *U. maydis* untersucht. Durch die phänotypischen Charakterisierungen der hergestellten Deletionsmutanten konnte für zwei Genprodukte eine substantielle Beteiligung an der pathogenen Entwicklung gezeigt werden. Es handelt sich dabei um das KHD-Protein Khd4, welches zu einer neuartigen Familie von Multi-KHD-Proteinen gehört und um das RRM-Protein mit einer bislang einmaligen Domänenorganisation (vgl. Abschnitt 2.1, S. 19 ff.). Es konnte gezeigt werden, dass das putativ RNA-bindende Protein Rrm4 am polaren Filamentwachstum beteiligt ist und in zytoplasmatischen Partikeln akkumuliert. Diese Partikel bewegen sich bidirektional entlang des Mikrotubulizytoskeletts und pendeln zwischen den Zellpolen.

3.1 DIE BEDEUTUNG VON RNA-BINDENDEN PROTEINEN IN *U. MAYDIS*

3.1.1 Pumilio-ähnliche Proteine in *U. maydis*

U. maydis besitzt fünf offene Leserahmen, die für Pumilio-ähnliche Proteine kodieren. Durch die konservierte Sequenz eines einzelnen PUM-Repeats und dem iterativen Aufbau der Domäne (Wickens et al., 2002), sind Proteine dieser Familie leicht zu identifizieren. Es kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei den fünf identifizierten ORFs um alle Pumilio-ähnlichen Proteine des Proteoms von *U. maydis* handelt. Eine phylogenetische Analyse von pilzlichen PUM-Proteinen unterstützt diese Auffassung: Die Proteine Pum1, Pum2, Pum3 und Pum4 gruppieren mit Vertretern anderer Pilzgenome in vier Cluster, das *U. maydis* Protein Pum5 fällt in einen Bereich nicht-gruppierender Sequenzen (Abb. 3-1; Becht et al., 2005). Auf Grund dieser unterschiedlichen Gruppierung der *U. maydis* PUM-Proteine und der Tatsache, dass die *bootstrap*-Werte¹² des Dendrogramms bis auf wenige Ausnahmen über 70 liegen, ist eine Entstehung der *U. maydis* PUM-Proteine durch Genduplikation sehr unwahrscheinlich. Für Puf1p und Puf2p aus *S. cerevisiae* sowie Sp2a und Sp2b aus *S. pombe* scheint dies hingegen wahrscheinlich (Abb. 3-1) und könnte die mit jeweils sieben Vertretern höhere Zahl an PUM-Proteinen in diesen Organismen erklären. Bei den durchgeführten phänotypischen Analysen konnte für die Deletion von *pum1*, *pum2* bzw. *pum3* kein Einfluss auf die Lebensfähigkeit, die Morphologie und Pigmentierung der Kolonien, das Wachstum auf NM-Festmedium bei verschiedenen Temperaturen, die Zellmorphologie, die cAMP-abhängige Zellkettenbildung, das Kreuzungsverhalten und die Pathogenität von *U. maydis* festgestellt werden (Becht et al., 2005). Folglich sind diese drei Pumilio-ähnlichen Proteine aus *U. maydis* weder lebensnotwendig noch haben sie nachweisbare Auswirkungen auf die untersuchten Phänotypen. Über die Auswirkungen einer Deletion der erst kürzlich identifizierten Gene *pum4* bzw. *pum5* kann derzeit noch keine Aussage getroffen werden.

Diese Beobachtung stimmt mit Berichten aus *S. cerevisiae* überein: In der Bäckerhefe waren die Einzel-Deletionsmutanten von fünf Genen, die für PUM-Proteine kodieren, (*puf1-puf5*) sowie die Fünffachdeletionsmutante in einem Temperaturbereich von

12. Der *bootstrap*-Wert im Konsensusbaum gibt die prozentuale Häufigkeit an, mit der ein Teilbaum in allen errechneten und im Konsensusbaum berücksichtigten Bäumen gefunden wurde.

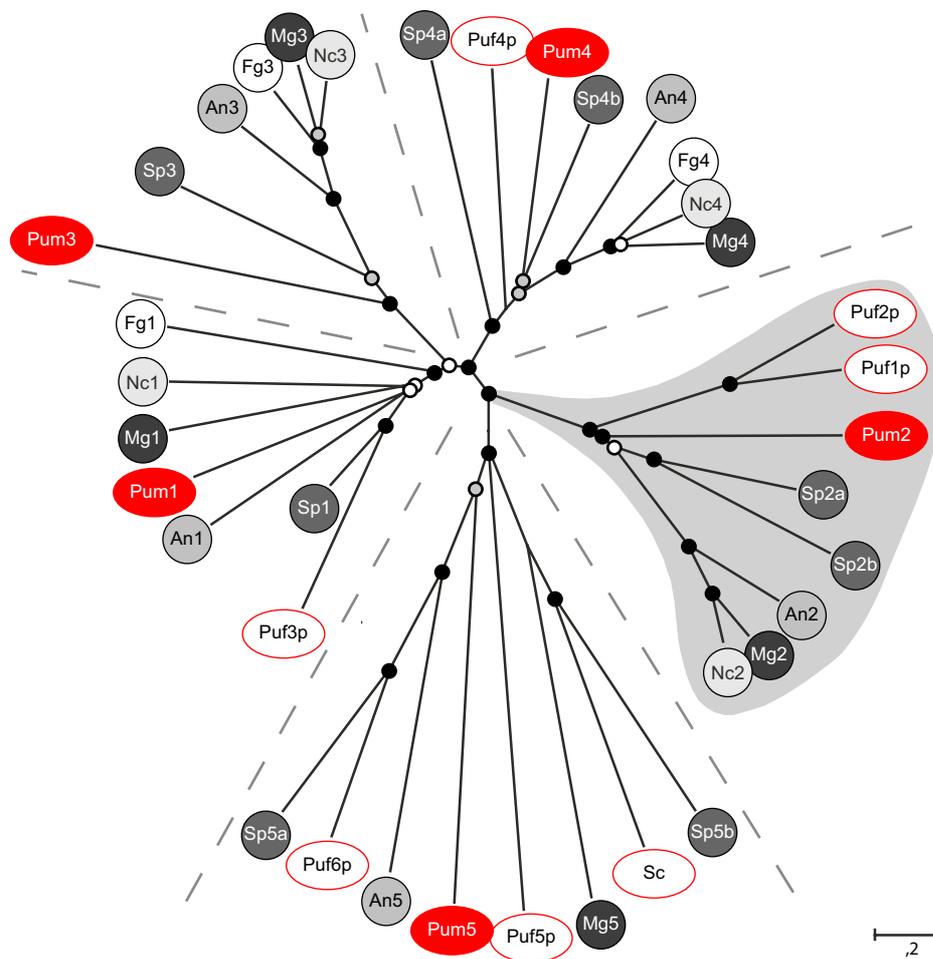


ABB. 3-1 Phylogenetisches Dendrogramm ausgewählter Pumilio-ähnlicher Proteine aus Pilzen

Es wurden Proteinsequenzen mit PUM-Repeats aus Pilzen, die im Rahmen der Pilzgenom-Initiative sequenziert wurden (*A. nidulans*, An; *F. graminearum*, Fg; *M. grisea*, Mg; *N. crassa*, Nc; *U. maydis*, Um; <http://www.broad.mit.edu/annotation/fungi/fgi/index.html>) sowie aus *S. cerevisiae* (Sc) und *S. pombe* (Sp) ausgewählt. Die Farbgebung der Symbole ist für Proteine des selben Organismus identisch. Um-Proteine sind durch rote Ovale, Sc-Proteine durch eine rote Umrandung hervorgehoben. Für Um- und Sc-Proteine sind – soweit vorhanden – die gängigen Namen in Ovalen angegeben. Die gestrichelten Linien kennzeichnen die verschiedenen Cluster, grau hinterlegt ist eine Gruppe von PUM-Proteinen, die zusätzlich eine oder mehrere RRM-Domänen besitzen. Die Accession-Nummern sind wie folgt: An1, AN6587.2; An2, AN7474.2; An3, AN4285.2; An4, AN0320.2; An5, AN1235.2; Fg1, FG06710.1; Fg3, FG05203.1; Fg4, FG00841.1; Mg1, MG04985.4; Mg2, MG06318.4; Mg3, MG03158.4; Mg4, MG06982.4; Mg5, MG03872.4; Nc2, NCU06199.1; Nc3, NCU01760.1; Nc4, NCU01775.1; Puf3p (Sc), Q07807; Puf2p (Sc), NP_015367; Puf1p/Jsn1p (Sc), P47135; Puf4p (Sc), P25339; Puf5p/Mpt5p/Uth4p (Sc), P39016; Puf6p (Sc), Q04373; Puf7p (Sc), P47077; Sp1, NP_593141; Sp2a, CAA18887; Sp2b, NP_595389; Sp3a, NP_593687; Sp3b, Q10238; Sp4a, Q09829; Sp4b, Q92359; Sp5a, NP_588564; Sp5b, Q92347; Pum2 (Um), UM00268.1; Pum3 (Um), UM05467.1; Pum4 (Um), UM03431.1; und Pum1 (Um) and Pum5 (Um), diese Arbeit (Tabelle 2-1 auf Seite 21). *Bootstrap*-Werte: schwarzer Kreis ≥ 90 , grauer Kreis ≥ 70 , weißer Kreis ≥ 50 . Balken: 0,2 Austausch pro Aminosäure (vgl. Material und Methoden, S. 107).

3.1 Die Bedeutung von RNA-bindenden Proteinen in *U. maydis*

18-37 °C lebensfähig (Olivas und Parker, 2000). Kürzlich wurde gezeigt, dass auch die Einzel-Deletion von *puf6* hat keine drastische Veränderung des Phänotyps zur Folge (Gu et al., 2004). Es ist aber ebenso bekannt, dass Pumilio-ähnliche Proteine sehr diverse Prozesse kontrollieren (Wickens et al., 2002), weshalb es wiederum überraschend war, dass keine der *U. maydis* PUM-Deletionsmutanten in der detailreichen Analyse ein aberrantes Verhalten zeigte. Ein Einfluss der Deletionen auf das Paarungsverhalten, die Differenzierung, die cAMP-Antwort und das Wachstumsverhalten war durchaus denkbar, da diese Prozesse in Mikroorganismen bereits in Verbindung mit Pumilio-ähnlichen Proteinen gebracht wurden. In *D. discoideum* fördert PufA die Fortsetzung der vegetativen Zellteilung, durch die Translationsrepression der *pkaC* mRNA. Eine Deletion führte zu einem vorzeitigen Abbruch der Mitose durch das Einsetzen des Differenzierungsprozesses (Souza et al., 1999). In *S. cerevisiae* wurde für die *puf5* Deletionsmutante ein temperatursensitives Wachstumsverhalten, eine verstärkte Pheromonsensitivität und ein Defekt bei der Erholung nach dem pheromoninduzierten Zellzyklusarrest berichtet (Chen und Kurjan, 1997). Darüber hinaus werden Puf5p gemeinsam mit Puf4p für das Erreichen der normalen Lebensdauer benötigt (Kennedy et al., 1997). Das erst kürzlich identifizierte Protein Puf6p aus *S. cerevisiae* ist vermutlich als Translationsrepressor an der *ash1* mRNA-Lokalisation beteiligt (Gu et al., 2004). Die fehlenden Phänotypen der *U. maydis* PUM-Deletionsmutanten könnte sicherlich an einer möglichen fehlenden Sensitivität der Analysen liegen. Es ist aber auch eine funktionelle Redundanz durch mögliche überlappende Funktionen der drei PUM-Proteine nicht ausgeschlossen; eine solche funktionelle Redundanz wurde bereits für Puf4p und Puf5p aus *S. cerevisiae* beschrieben (Kennedy et al., 1997). Abschließend kann nicht ausgeschlossen werden, dass durch die Deletion der kürzlich mit Hilfe der öffentlichen Genomsequenz des Whitehead-Instituts identifizierten Gene *pum4* bzw. *pum5* ein Einfluss von Pumilio-ähnlichen Proteinen auf Differenzierungsprozesse, die cAMP-Antwort oder das Paarungsverhalten gezeigt werden kann.

3.1.2 KHD-Proteine in *U. maydis*

Im Genom von *U. maydis* konnten neun ORFs identifiziert werden, die für KHD-Proteine kodieren. Diese Zahl liegt in einer vergleichbaren Größenordnung zur Anzahl identifizierter KHD-Proteinen aus *S. cerevisiae* (10) und *S. pombe* (8) (<http://smart.embl.de>; Becht et al., 2005). Die meisten der *U. maydis* KHD-Proteine besitzen, wie in Tabelle 2-1

auf Seite 21 gezeigt, homologe Proteine in *S. cerevisiae*. Bei der Analyse der Deletionsmutanten zeigten *kbd1Δ* und *kbd4Δ* Mutanten einen aberranten Phänotyp (Becht et al., 2005). Das Protein Khd1 hat eine zu Khd2 vergleichbare Domänenorganisation aus zwei eng beieinander liegenden KH-Domänen und einer davon separierten, dritten KH-Domäne. Beide Proteine zeigten im Sequenzvergleich mittels BLAST eine Ähnlichkeit zu Pbp2p¹³ aus *S. cerevisiae*. Interessanterweise war das kaltesensitive Wachstumsverhalten der *kbd1Δ* Mutante nicht in der *kbd2Δ* Mutante zu beobachten. Die hohe Sequenzidentität der beiden Proteine ist auf die Bereiche der KH-Domänen (KHD1 35 %, KHD2 43 %, KHD3 53 %) beschränkt; die Sequenzidentität insgesamt beträgt lediglich 20 %. Diese Tatsachen lassen unterschiedliche biologische Funktionen der beiden architektonisch ähnlichen Proteine annehmen.

Eine weitaus stärkere Veränderung des Phänotyps rief die Deletion des *kbd4* Gens hervor. Zellen, denen *kbd4* fehlte, waren in ihrer Morphologie, Wachstumsrate, Pheromonantwort sowie in ihrem filamentösen Wachstum und ihrer Pathogenität beeinträchtigt. Außerdem hatte die Deletion einen Zelltrennungsdefekt zur Folge (vgl. Abschnitt 2.2, S. 26 ff.) (Becht et al., 2005). Die durchgeführte Domänenanalyse mit SMART identifizierte fünf KH-Domänen in der Sequenz von Khd4. Lediglich in dem Protein Khd5 konnten mehr KH-Domänen identifiziert; es enthielt elf KH-Domänen (Abb. 2-1, S. 20; <http://smart.embl.de/>). Durch Sequenzvergleiche von Multi-KHD-Proteinen aus *D. melanogaster*, *X. laevis* und *H. sapiens* sowie aus anderen pilzlichen Modellorganismen wie *A. nidulans*, *C. cinereus*, *C. neoformans*, *Fusarium graminearum*, *N. crassa* und *Magnaporthe grisea* konnte Khd4 in eine neue Gruppe von Proteinen mit 3-5 KH-Domänen eingeordnet werden (Abb. 3-2; Becht et al., 2005; http://smart.embl.de). Interessanterweise besaßen *S. cerevisiae* und *S. pombe* als einzige der in dem Sequenzvergleich untersuchten Pilze kein Protein, welches mit dem *U. maydis* Khd4 gruppiert. Diese neue Gruppe von KHD-Proteinen zeigt Verwandtschaft mit Multi-KHD-Proteinen aus der Vigilin-Familie¹⁴, für deren Vertreter 9-14 KH-Domänen vorhergesagt wurden (http://smart.embl.de). In diese Gruppe wurde auch das Protein Khd5 aus *U. maydis* sortiert (Abb. 3-2). Das zu Khd4 und Khd5 nächstverwandte Protein aus *S. cerevisiae* ist das Multi-KHD-Protein

13. Pbp2p aus *S. cerevisiae* ist ein hnRNP K-ähnliches Protein, dass an an der Regulation der Telomere-modifikation beteiligt ist (Denisenko und Bomsztyk, 2002).

14. Das Vigilin Protein wurde erstmals im Huhn (Schmidt et al., 1992) identifiziert, Orthologe wurden anschließend auch im Menschen (Plenz et al., 1994) sowie in *X. laevis* (Dodson und Shapiro, 1997), *C. elegans* (Weber et al., 1997) und *D. melanogaster* gefunden (Cortes et al., 1999).

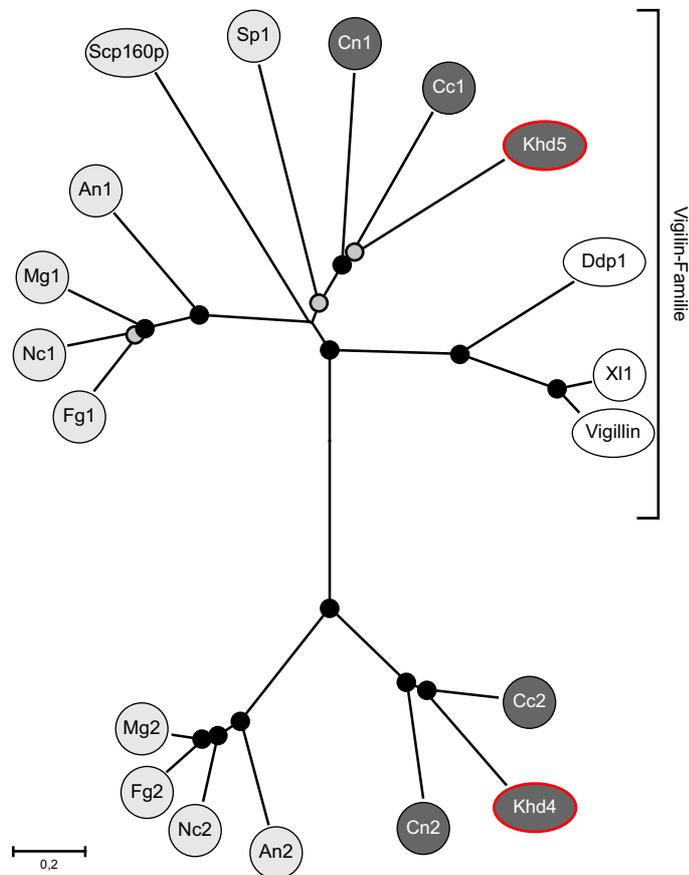
3.1 Die Bedeutung von RNA-bindenden Proteinen in *U. maydis*

Scp160p (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>), welches zur großen Familie der Vigilin-Proteine gehört. Die Deletion des für Scp160p kodierenden Gens in *S. cerevisiae* führt zu einem pleiotropen Phänotyp mit einer anormalen Zellmorphologie und einer defekten Chromosomensegregation, die zu einem erhöhten DNA-Gehalt führt (Wintersberger et al., 1995). Es bindet verschiedene RNAs in vivo, ist mRNA-abhängig mit Polysomen sowie der Membran des Endoplasmatischen Retikulums (ER) assoziiert und an der zyttoplasmatischen Translationskontrolle beteiligt (Wintersberger et al., 1995; Li et al., 2003; Frey et al., 2001; Mendelsohn et al., 2003). Darüber hinaus konnten Guo et al. einen Einfluss von Scp160p auf das Paarungsverhalten durch die Interaktion des Proteins mit dem heterotrimeren G-Protein Gpa1p während der Pheromonantwort zeigen (Guo et al., 2003).

Um die Funktion von Khd4 zu klären, wäre ein wichtiger Schritt die subzelluläre Lokalisation zu bestimmen und die von Khd4 regulierten RNAs zu identifizieren. Bei einer nukleären Lokalisation könnte über eine RNA-prozessierende Funktion spekuliert wer-

ABB. 3-2 Phylogenetisches Dendrogramm ausgewählter KHD-Proteine

Es wurden KHD-Proteinsequenzen aus *S. cerevisiae* (Sc), *S. pombe* (Sp), *D. melanogaster* (Dm), *X. laevis* (Xl) und *H. sapiens* (Hs) sowie aus Pilzen, die im Rahmen der Pilzgenom-Initiative sequenziert wurden, ausgewählt (*A. nidulans*, An; *C. neoformans*, Cn; *Coprinus cinereus*, Cc; *F. graminearum*, Fg; *M. grisea*, Mg; *N. crassa*, Nc; *U. maydis*, Um). Die Hintergrundfarbe der Symbole beschreibt die Herkunft der Organismen: dunkelgrau, Basidiomycet; hellgrau, Ascomycet; weiß, höherer Eukaryont. Um-Proteine sind durch rote Rahmen hervorgehoben. Für Um-, Sc-, Dm- und Hs-Proteine sind die gängigen, aus der Literatur bekannten, Namen in Ovalen angegeben. Die Accession-Nummern sind wie folgt: An1, AN2068.2; An2, AN6326.2; Dm1 (Ddp1), CAB52798; Fg1, FG09491.1; Fg2, FG06181.1; Hs1 (Vigilin), Q00341; Mg1, MG06496.4; Mg2, MG01781.4; Nc1, CAB91673; Nc2, XP_324623; Sc1 (Scp160p), CAA46597; Sp1, NP_588106; Xl1, AAH44314; Die Proteine Khd5 und Khd4 wurden im Rahmen dieser Arbeit identifiziert und die Sequenzen für die Proteine Cc1 und Cc2 sowie Cn1 und Cn2 wurden durch eine konzeptionelle Translation ermittelt (vgl. Material und Methoden, S. 107). *Bootstrap*-Werte: geschlossener schwarzer Kreis ≥ 90 , geschlossener grauer Kreis ≥ 70 . Balken: 0,2 Austausch pro Aminosäure (vgl. Material und Methoden, S. 107).



den, bei einer zytoplasmatischen, ER-assoziierten Lokalisation könnte eine Scp160-ähnliche Funktion vermutet werden. Darüber hinaus wäre es interessant, die Auswirkungen einer Deletion von *khd5* zu klären und zu untersuchen, ob Khd4 und Khd5 überlappende Funktionen besitzen.

3.1.3 RRM-Proteine in *U. maydis*

Zu den zwölf in Tabelle 2-1 aufgeführten RRM-Proteinen konnten durch die im Laufe der Arbeit vom Whitehead-Institut zur Verfügung gestellte Genomsequenz und deren automatische Annotation weitere offene Leserahmen identifiziert werden, die für RRM-Domänen tragende Proteine kodieren (http://www.broad.mit.edu/cgi-bin/annotation/fungi/ustilago_maydis/findfeatures.cgi). Dies war nicht überraschend, da es sich bei der Familie der RRM-Proteine um die – verglichen mit der PUM-, KHD- und DSRM-Familie – am weitesten verbreitete Proteinfamilie handelt (vgl. Tabelle 3-1). In *U. maydis* konnten insgesamt 43 RRM-Proteine vorhergesagt werden, eine gegenüber 56 identifizierten RRM-Proteinen in *S. cerevisiae* vergleichbare Größenordnung (<http://smart.embl.de/>; Tabelle 3-1).

TABELLE 3-1 Verbreitung von RBPs aus der PUM-, KHD-, DSRM- und RRM-Protein-Familie

	Anzahl ^a der identifizierten RNA-bindenden Proteine mit folgenden Domänen:			
	PUM	KHD	DSRM	RRM
Eukaryonten (total)	150	805	378	4517
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	8	10	2	56
<i>Ustilago maydis</i>	5	9	1	43
<i>Caenorhabditis elegans</i>	13	42	17	152
<i>Drosophila melanogaster</i>	4	74	44	302
<i>Homo sapiens</i>	10	122	72	713

a. identifiziert in nicht-redundanten Sequenzdatenbanken (Quelle: <http://smart.embl.de/>). Stand 02/2005.

Zur Untersuchung der elf ausgewählten offenen Leserahmen wurden in dieser Arbeit entsprechende Deletionsstämme hergestellt. Mit der in Abschnitt 2.1.2 (S. 22 ff.) beschriebenen Analyse der Phänotypen konnte nur bei der Deletion von *rrm4* ein vom Wildtyp abweichender Phänotyp nachgewiesen werden (Becht et al., 2005; siehe Abschnitt 3.2). Dies war ein überraschendes Ergebnis, da RRM-Proteine bekanntermaßen an entscheidenden Entwicklungsprozessen beteiligt sind. Man hätte demnach eine stärkere Ausbeute erwarten können, zumal homologe Proteine in anderen Organismen auch an Entwick-

3.1 Die Bedeutung von RNA-bindenden Proteinen in *U. maydis*

lungsprozessen beteiligt sind. So zeigt das Protein Rrm8 in Bezug auf die Domänenorganisation und die flankierenden Sequenzen eine hohe Ähnlichkeit zu Nrd1 aus *S. pombe*, das als negativer Regulator der Differenzierung den Beginn der sexuellen Entwicklung unter normalen Nahrungsbedingungen verhindert. Nrd1 reprimiert die Expression der Ste11-regulierten Gene, die essenziell für Konjugation und Meiose sind. Die Deletion von *nrd1* führt zur aktiven Konjugation bei einem gutem Nährstoffangebot. Wildtypzellen beginnen ihre sexuelle Entwicklung in der Regel erst bei Nährstoffmangel (Tsukahara et al., 1998). In *U. maydis* hatte die Deletion von *rrm8* keine offensichtliche phänotypische Veränderung zur Folge.

Das Protein Rrm2 aus *U. maydis* gehört zu einer bislang nicht beschriebenen Proteinfamilie, die jeweils eine RRM-, SWAP- (*suppressor-of-white-apricot splicing regulator*) und RPR-Domäne (Regulation der Prä-mRNA) tragen. Es konnte jeweils ein Vertreter dieser Familie in höheren Eukaryonten und *C. neoformans* identifiziert werden, im Gegensatz zu *S. cerevisiae*, *S. pombe*, *Ashbya gossypii*, *C. cinereus*, *M. grisea*, *F. graminearum* und *A. nidulans* die kein solches Protein besitzen. Über die Funktion dieser Proteinfamilie ist bislang nichts bekannt, auf Grund der Domänen kann aber über eine Beteiligung an der RNA-Prozessierung spekuliert werden. Die SWAP-Domäne ist aus Regulatoren des alternativen Spleißens bekannt, wie beispielsweise dem menschlichen Spleißfaktor Sip1, der am Spleißen von Prä-mRNA beteiligt ist und eine wichtige Rolle bei der Bildung des Spleißosoms spielt (Zhang und Wu, 1998). Die RPR-Domäne konnte in prä-mRNA-regulierenden Proteinen identifiziert werden (Doerks et al., 2002), zu denen auch Nrd1 und Pcf11 aus *S. cerevisiae* zählen. Nrd1 besitzt neben der RPR- auch eine RRM-Domäne und ist an der polyadenylierungsunabhängigen Bildung des RNA-3'-Endes beteiligt (Steinmetz et al., 2001). Pcf11 ist eine essenzielle Untereinheit des Spleißfaktors IA, der für die Prozessierung des RNA-3'-Endes und die Transkriptionstermination benötigt wird (Barilla et al., 2001). Die Deletion von *rrm2* aus *U. maydis* hatte keine Auswirkungen auf den Phänotyp. Da bislang nur elf von 43 identifizierten RRM-Proteinen untersucht wurden, kann auch hier nicht ausgeschlossen werden, dass es neben Rrm4 weitere Proteine dieser Familie gibt, die an Differenzierungs- bzw. Entwicklungsprozessen von *U. maydis* beteiligt sind.

3.2 DIE BEDEUTUNG VON Rrm4 FÜR DAS FILAMENTÖSE WACHSTUM VON *U. MAYDIS*

Die initiale Analyse der Deletionsmutanten zeigte für *rrm4* Δ ein reduziertes filamentöses Wachstum und eine reduzierte Virulenz. Weiter konnte gezeigt werden, dass die Deletion von *rrm4* auf postfusionären Effekten beruht, die sich auf zellularer Ebene durch bipolares Filamentwachstum, retardiertem Wachstum der Spitzenzelle und durch Defekte bei der Bildung distaler, leerer Abschnitte äußerte (vgl. Abschnitt 2.3.3, S. 36 ff.; Becht et al., 2005). Der beobachtete Einfluss der *rrm4* Deletion auf das Wachstum der Infektionshyphe ist sehr wahrscheinlich auch Grund für die in den Pathogenitätstests beobachteten, reduzierten Krankheitssymptome. Es wäre denkbar, dass durch die fehlenden leeren Abschnitte und daher deutlich kürzeren Filamente die Suche nach einer geeigneten Penetrationsstelle erschwert wird.

Man kann eine wichtige Rolle des putativ RNA-bindenden RRM-Proteins Rrm4 für das filamentöse Wachstum festhalten. Die Untersuchungen zur subzellularen Lokalisation zeigten außerdem eine Akkumulation von Rrm4 in zytoplasmatischen, mobilen Partikeln. Für diese Partikel konnte eine bidirektionale Bewegung entlang des Mikrotubulizytoskeletts gezeigt werden (Abschnitt 2.3.4, S. 42 f.). Das Pendeln der Partikel – die das RNA-bindende Protein Rrm4 enthalten – zwischen den Zellpolen lässt vermuten, dass RNA-Transport für die pathogene Entwicklung von *U. maydis* entscheidend ist.

3.2.1 Die Funktion des RRM-Proteins Rrm4 aus *U. maydis*

Die neuartige Domänenkomposition von Rrm4

Das modular aufgebaute Rrm4 zeigt eine in Eukaryonten bislang einzigartige Domänenkomposition aus drei N-terminalen RRM-Domänen und einer C-terminalen PABC-Domäne (Abb. 3-3). Während die PABC-Domäne als Schnittstelle für Protein/Protein-Interaktionen (Kozlov et al., 2001) dient, konnte für RRM-Domänen eine Schnittstellenfunktion für RNA/Protein-Interaktionen gezeigt werden (Varani und Nagai, 1998).

Die Anordnung der drei N-terminalen RRM-Domänen in Rrm4 lässt eine Gruppierung der ersten beiden Domänen erkennen; die dritte RRM-Domäne ist von dieser Gruppe durch eine ~90 As lange Region separiert (Abb. 3-3). Dies grenzt Rrm4 von den

oben erwähnten PABC-haltigen Poly[A]-bindenden Proteinen ab, die typischerweise vier eng beieinanderliegende RRM-Domänen im N-Terminus enthalten (Abb. 3-3). Die Anordnung der RRM-Module ist vielmehr identisch mit der Domänenorganisation der ELAV- und Bruno-ähnlichen Proteine (Abb. 3-3). Kennzeichnend für diese RNA-bindenden Proteine ist die typische Anordnung der drei RRM-Domänen: Die zwei N-terminalen Domänen liegen eng beieinander, während die Dritte durch eine nicht-konservierte Scharnierdomäne variabler Länge separiert ist (Abb. 3-3). Es ist derzeit aber kein ELAV- oder Bruno-ähnliches Protein identifiziert, das neben den RRM-Domänen eine PABC-Domäne enthält (<http://smart.embl.de>).

Die Mitglieder dieser Proteinfamilien wurden als sequenzspezifische RBPs beschrieben (Nakamura et al., 2004; Webster et al., 1997; Wilhelm et al., 2003; Soller und White, 2003; Levine et al., 1993; Vasudevan und Peltz, 2001), besitzen aber sehr unterschiedliche Funktionen. Bruno-ähnliche Proteine sind an der Regulation bzw. Aufrechterhaltung der Zelldifferenzierung beteiligt (Good et al., 2000), so reprimiert beispielsweise das Bruno Protein aus *D. melanogaster* die Translation des für die Bildung des Posteriors wichtigen Oskar Proteins durch die spezifische Bindung von Elementen in der 3'-UTR der *oskar* mRNA (Nakamura et al., 2004; Webster et al., 1997; Wilhelm et al., 2003). Die Mitglieder der ELAV-Familie sind an verschiedene Funktions- und Regulationsmechanismen beteiligt; während das *D. melanogaster* ELAV Protein den alternativen Speißvorgang reguliert (Koushika et al., 1996), sind die ELAV-homologen Hu-Proteine der Wirbeltiere als Regulatoren der Stabilität, Translation und Lokalisation spezifischer mRNAs beschrieben (Good et al., 2000; Antic und Keene, 1997). Das ELAV-homologe Protein aus *S. cerevisiae* Pub1p beeinflusst den mRNA-Abbau durch die Regulation der Transkriptstabilität (Ruiz-Echevarria und Peltz, 2000; Vasudevan und Peltz, 2001). Es bindet wie auch das ELAV Protein und die Hu-Proteine der Vertebraten an AU-reiche Regionen in der 3'-UTR spezifischer mRNAs (Soller und White, 2003; Levine et al., 1993; Vasudevan und Peltz, 2001).

Die vielfältigen Funktionen die Bruno- bzw. ELAV-ähnliche Proteine übernehmen, lassen keine Rückschlüsse auf die Funktion von *Rrm4* anhand der Ähnlichkeit der Domänenanordnung ziehen. Man kann aber vermuten, dass es sich bei *Rrm4* um ein

3.2.1 Die Funktion des RRM-Proteins Rrm4 aus *U. maydis*

– möglicherweise sequenzspezifisches – RNA-bindendes ELAV-ähnliches Protein mit einer neuartigen Domänenkomposition handelt, dass über den C-terminus Peptidbindung eingehen kann.

Die RNA-bindenden Domänen vom Typ des RRM

Um die bioinformatische Vorhersage der RNA-bindenden RRM-Domänen von Rrm4 zu untersuchen, wurden diese zunächst in den RNP1-Submotiven mutiert. RNP1 ist ein konservierter acht Aminosäuren langer Bereich in der RNA-kontaktierenden β -Faltblattoberfläche der RRM-Domäne (siehe Abschnitt 1.2.1, S. 6 ff.), für den eine Beteiligung an RNA-Bindung gezeigt werden konnte (Varani und Nagai, 1998). Die gleichzeitige Mutation der drei RRM-Domänen hatte keine Auswirkungen auf die Bildung der mobilen zytoplasmatischen Partikel, führte aber zu einem bipolaren Filamentwachstum, einem retardierten Wachstum der Spitzenzelle und Defekten bei der Bildung leerer Abschnitte – vergleichbar mit der Deletion von *rrm4*. Somit führen die Mutationen von jeweils vier Aminosäuren in RNP1 der RRM-Domänen zu einem Verlust der Funktion von Rrm4, was eine essenzielle Beteiligung der RRM-Domänen an der Funktion von Rrm4 andeutet.

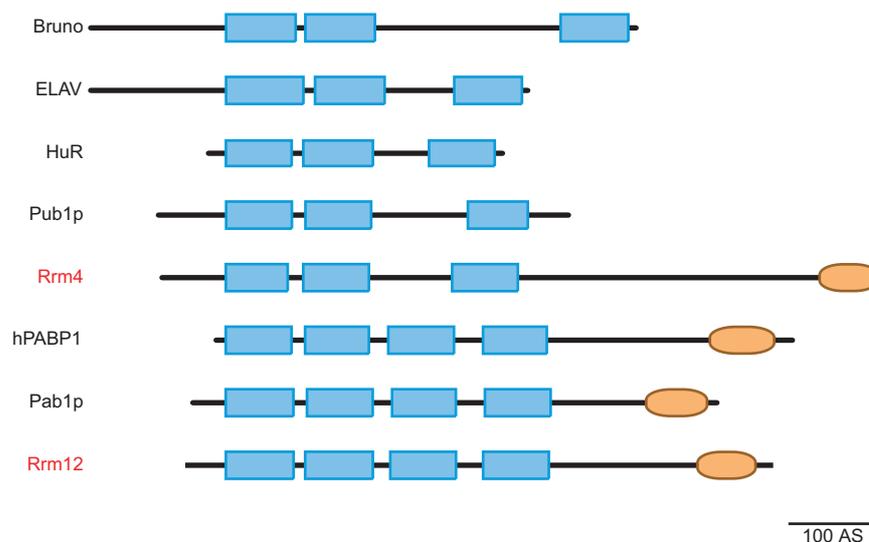


ABB. 3-3 Domänenarchitektur von ELAV-ähnlichen und Poly[A]-bindenden Proteinen

Die Darstellung der Proteine ist maßstabsgetreu. Die RRM- und PABC-Domänen sind als blaue Rechtecke bzw. braune Ovale dargestellt. *Accession* Nummern: ELAV (Dm), P16914; Bruno (Dm), AAB58464; HuR (Hs), AAH03376; Pub1p (Sc), NP014382; hPabp1 (Hs), P11940; Pab1p (Sc), P04147; Rrm4 und Rrm12, diese Arbeit (Tabelle 2-1 auf Seite 21).

Durch gleichzeitige Mutation aller RRM-Domänen kann keine Aussage über den Einfluss der einzelnen Domäne gemacht werden, weshalb darüber hinaus auch die Einzelmutationen untersucht wurden. Die Stämme die ein in der dritten RRM-Domäne mutiertes *Rrm4* Protein exprimierten, zeigten keine sichtbare Veränderung des untersuchten Phänotyps. Diese Beobachtung war auf Grund von Berichten aus anderen Systemen überraschend: Es konnte zwar für die dritte RRM-Domäne des drei RRM-Domänen enthaltenden Spleißfaktor U2AF⁶⁵ aus *H. sapiens* eine entbehrliche Funktion bei Spleißexperimenten in vitro gezeigt werden, die dritte RRM-Domäne des homologen Proteins in *S. pombe* besaß aber in vivo eine essenziell Funktion (Banerjee et al., 2004). Für die dritte RRM-Domäne der ELAV-ähnlichen Proteine HuB und HuD aus *H. sapiens* wurde eine Beteiligung an der Multimerisierung des Proteins berichtet (Kasashima et al., 2002). Davon abweichend – mit *Rrm4* aber übereinstimmend – sind Untersuchungen aus *D. melanogaster* mit einem ELAV Mutantenprotein: Die Mutation in der RNP1-Region der dritten RRM-Domäne zeigte in vivo keine Auswirkungen (Lisbin et al., 2000).

Im Gegensatz zur Mutation der dritten, führten die Mutationen der ersten und zweiten RRM-Domäne zu bipolarem Filamentwachstum, retardiertem Wachstum der Spitzenzelle und Defekten bei der Bildung leerer Abschnitte. Die identischen Auswirkungen der beiden Mutationen lassen eine gemeinsamen Funktion von der ersten und zweiten RRM-Domäne vermuten. Die Ergebnisse von Handa et al. zeigten, dass die RNP1- und RNP2-Region beider RRM-Domänen von Sxl aus *D. melanogaster* an der RNA-Bindung beteiligt sind (Handa et al., 1999). Diese Beobachtung konnte inzwischen auch für andere RNA-bindende Proteine mit zwei gruppierenden RRM-Domänen gezeigt werden, so beispielsweise für den menschlichen Spleißfaktor U2AF⁶⁵ (Banerjee et al., 2004), die ELAV-ähnlichen Hu-Proteine aus *H. sapiens* sowie für das ELAV Protein aus *D. melanogaster* (Ma et al., 1997; Lisbin et al., 2000). Angesichts dieser Berichte und der in Abb. 3-3 gezeigten Ähnlichkeit der Domänenorganisation mit sequenzspezifisch RNA-bindenden Proteinen aus der ELAV-Familie, lässt sich eine gemeinsame Funktion der ersten beiden RRM-Domänen aus *Rrm4* an der sequenzspezifischen RNA-Bindung vermuten.

Owohl RRM-Domänen in der Regel an der RNA-Erkennung und -Bindung beteiligt sind (Varani und Nagai, 1998), gibt es auch Beispiele zur Beteiligung an Protein/Protein-Interaktionen (Banerjee et al., 2004; Lau et al., 2003; Shi und Xu, 2003). Es kann daher eine proteinbindende Funktion der RRM-Domänen aus *Rrm4* derzeit nicht ausgeschlos-

3.2.1 Die Funktion des RRM-Proteins Rrm4 aus *U. maydis*

sen werden, scheint aber auf Grund der oben geführten Argumentation und den folgende Beobachtungen zumindest für die erste und zweite RRM-Domäne in Rrm4 sehr unwahrscheinlich: Erstens konnte in Vorexperimenten mit dem RNA-spezifischen Farbstoff SYTOTM RNA-Select[®] (Molecular Probes) eine Kollokalisierung der Rrm4-mRfp Partikel mit dem grün-fluoreszierenden Farbstoff gezeigt werden (Daten nicht gezeigt). Zweitens konnte in neuesten Untersuchungen mittels einer CLAP-Aufreinigung (*UV-crosslinking tandem affinity purification*) von Rrm4 in vivo die Bindung von RNA nachgewiesen werden (J. König und M. Feldbrügge, pers. Mitteilung; Ule et al., 2003). Und drittens gelang es J. König und M. Feldbrügge in einem 3-Hybrid-Ansatz in Hefe (Sengupta et al., 1999) für Rrm4 eine sequenzspezifische Bindung von RNA-Fragmenten aus dem *U. maydis* Genom zeigen (pers. Mitteilung). Die sequenzspezifische RNA-Bindung in vitro wurde durch Bindestudien unterstützt, die zeigten, dass Rrm4 keine Poly[A]- oder Poly[U]-Sequenzen bindet (C. Julius und M. Feldbrügge, pers. Mitteilung), weshalb auch eine Funktion als Poly[A]-bindendes Protein ausgeschlossen wird. Man kann daher eine sequenzspezifische RNA-Bindung durch die gemeinsam agguierenden ersten beiden RRM-Domänen von Rrm4 vermuten.

Die C-terminale PABC-Domäne

Im C-Terminus besitzt das ELAV-ähnliche Protein Rrm4 eine PABC-Domäne, die erstmals im menschlichen Poly[A]-bindenden Protein (hPABP) identifiziert wurde und eine für diese Proteine typische Domäne darstellt (Abb. 3-3; Deo et al., 1999; Kozlov et al., 2001; Kozlov et al., 2002; Melo et al., 2003; Siddiqui et al., 2003; Kozlov et al., 2004). Sie wurde darüber hinaus aber auch in der tierischen – am DNA-Reparaturmechanismus beteiligten – E3 Ubiquitin-Protein Ligase HYD (*hyperplastic discs*) gefunden (Müller et al., 1992; Mansfield et al., 1994; Callaghan et al., 1998; Deo et al., 2001), die zur Familie der HECT (*homolog zum E6-AP C-Terminus*)-Domänen Ubiquitin Ligasen gehört (Huibregtse et al., 1995). Es überraschte daher nicht, dass die PABC-Domäne – außer in Rrm4 – auch in dem zum Poly[A]-bindenden Protein Pabp1p aus *S. cerevisiae* homologen Protein Rrm12 aus *U. maydis* identifiziert werden konnte (77 % Sequenzähnlichkeit; BLAST e-Wert: 1e-132).

Die Expression der Rrm4 Mutanteproteine mit PABC-Deletion sowie FIAK-Mutation führte zu bipolarem Filamentwachstum, retardiertem Wachstum der Spitzenzelle und Defekten bei der Bildung leerer Abschnitte. Außerdem führten Deletion sowie Mutation der PABC-Domäne zum Verlust der mobilen, zytoplasmatischen Rrm4-haltigen Partikel. Es war stattdessen ein diffuses, perinukleares Fluoreszenzsignal zu beobachten. Es wurde deshalb eine Funktion bei der Partikelbildung für die PABC-Domäne von Rrm4 vermutet. Aus anderen Systemen wurde die PABC-Domäne als Schnittstelle bei Protein/Protein-Interaktionen beschrieben (Mangus et al., 1998; Hoshino et al., 1999; Kuhn und Pieler, 1996; Afonina et al., 1998). Kozlov et al. beschrieben außerdem vier für die Peptidbindung essenzielle Aminosäuren (F22, I25, A33 und K35) in der PABC-Domäne des menschlichen PABP (Kozlov et al., 2001), die in der PABC-Domäne von Rrm4 konserviert sind und ebenfalls eine essenzielle Funktion besitzen. Ein aktueller Bericht über die Kristallstruktur der PABC-Domäne des menschlichen Poly[A]-bindenden Proteins (PABP) komplexiert mit Peptiden aus Paip1 (PABP interagierendes Protein) und Paip2 verdeutlicht die Beteiligung dieser Aminosäuren an der Peptidbindung durch extensive hydrophobe und elektrostatische Interaktionen sowie Interaktionen gestapelter aromatischer Aminosäureresten (Kozlov et al., 2004). Es wäre eine vergleichbare Sequenzspezifitäten bei Protein/Protein-Wechselwirkungen beider Domänen denkbar.

Das starke Fluoreszenzsignal der Rrm4-eGfp Partikel, lässt zudem eine multiple Kopienzahl von Rrm4 in den Partikeln vermuten. Auf Grund der essenziellen Funktion der peptidbindenden PABC-Domäne bei der Partikelbildung lässt sich über die Beteiligung dieser Domäne spekulieren: Zum einen könnte die Bildung eines Partikels durch eine Multimerisierung von Rrm4 entstehen, indem die PABC-Domäne ein zweites Rrm4 N-terminal von dessen PABC-Domäne bindet. Zum anderen ist eine Rekrutierung von vielen einzelnen Rrm4 Proteinen durch einen Core-Partikel denkbar. Für die letztere Funktion sprechen zwei Gründe: Zum einen ist die PABC-Domäne bisher nicht als Multimerisierungsdomäne beschrieben – sie interagiert im Menschen mit den an der Translationsregulation beteiligten Proteine Paip1, Paip2, eRF3 und Pbp1p (Craig et al., 1998; Khaleghpour et al., 1999; Hoshino et al., 1999; Mangus et al., 1998) – und zum anderen wurde im menschlichen PABP ein an der Multimerisierung des Proteins beteiligter Bereich N-terminal der PABC-Domäne identifiziert (Melo et al., 2003). Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass Rrm4 ähnlich wie PABP eine Multimerisierungsdo-

3.2.2 Die pendelnde Bewegung der Rrm4 Partikel entlang des Mikrotubulizytoskeletts

mäne N-terminal der PABC-Domäne besitzt. Die hier diskutierte neuartige Domänenkomposition und die Ergebnisse aus den Mutationsanalysen der Domänen deuten darauf hin, dass Rrm4 mit den ersten beiden, N-terminalen RRM-Domänen RNA-Bindung eingeht und C-terminal eine Schnittstelle für Protein/Protein-Interaktionen besitzt, die essenziell für die Partikelbildung von Rrm4 ist.

3.2.2 Die pendelnde Bewegung der Rrm4 Partikel entlang des Mikrotubulizytoskeletts

Die Analysen zur subzellularen Lokalisation von Rrm4-eGfp im *b*-abhängigen Filament zeigte die Akkumulation in zytoplasmatischen Partikeln, die sich bidirektional durch das Filament bewegten. Außerdem konnte auch für die Partikelbildung eine Abhängigkeit von den Mikrotubuli gezeigt werden. Eine solche zytoplasmatische Akkumulation von ELAV- bzw. Bruno-ähnlichen Proteinen in Partikeln wurde auch aus anderen Organismen beschrieben: Das Protein Bruno aus *D. melanogaster* akkumuliert beispielsweise zytoplasmatisch in perinuklearen Partikeln (Snee und Macdonald, 2004). Und auch die Säugerproteine HuD und HuB aus der Familie der ELAV-ähnlichen Proteine akkumulieren in zytoplasmatischen Partikeln (Kasashima et al., 2002). Die aktive Bewegung der Rrm4 Partikel, die mittels Inhibitor- und Kollokalisationsstudien als mikrotubuliabhängig gezeigt werden konnte, wurde hingegen für ELAV/Bruno-ähnliche Proteine noch nicht gezeigt. Die bidirektionale Bewegung der Rrm4-eGfp Partikel zwischen den Zellpolen, lässt einen Transportprozess vermuten. In Bezug auf die oben diskutierte RNA-Bindung liegt eine Beteiligung am RNA-Transport nahe.

Der Rrm4-abhängige Transportmechanismus in *U. maydis* zeigt zudem Gemeinsamkeiten mit den RNA-Lokalisationsmechanismen höherer Eukaryonten. In *X. laevis* ist für die einwandfreie Spezifizierung von Mesoderm und Endoderm die richtige Lokalisation der *Vg1* und *VegT* mRNAs entlang der animal-vegetativen Achse in der Eizelle entscheidend. Eine Fehlverteilung führt zur Induktion von Mesoderm in Zellen, die normalerweise das Ektoderm bilden (Mowry und Cote, 1999). Die *Vg1* bzw. *VegT* mRNPs werden nach dem Kernexport reorganisiert. Neben den Proteinen des Core-RNPs, die bereits im Kern mit den mRNAs assoziierten (Kress et al., 2004; Deshler et al., 1997; Deshler et al., 1998; Cote et al., 1999; Lewis et al., 2004), enthält das Lokasom nach der Neuorganisation zwei weitere Schlüsselproteine für die vegetative Lokalisation, XStau und Prp (Zhao et al., 2001;

Yoon und Mowry, 2004). Kress et al. postulieren, dass diese Lokalisations-RNPs dann aktiv entlang von Mikrotubuli zum vegetativen Kortex transportiert werden (Kress et al., 2004). In *D. melanogaster* stellt die zytoplasmatische Vereinigung der *bicoid*¹⁵ mRNA mit dem Protein Exuperantia in Partikeln ebenfalls einen entscheidenden Schritt für die mikrotubuliabhängige Lokalisation des Transkripts im Anterior der Eizelle dar (Cha et al., 2001). Darüber hinaus findet auch die Lokalisation der *tau* mRNA in das Axon und der *myelin basic protein* mRNA in das Myelinkompartiment von Oligodendrozyten in Form von Granula statt, die mikrotubuliabhängig an ihren Bestimmungsort transportiert werden (Ainger et al., 1997; Aronov et al., 2002). In Einklang mit diesen Berichten deutet das verstärkt perinukleare Fluoreszenzsignal, welches in den Stämmen mit defekter PABC-Domäne zu beobachten war, darauf hin, dass die Bildung des funktionellen Rrm4 Partikels nach dem Kernexport der Target-RNA stattfindet.

Bei der Lokalisation der *ash1* mRNA in *S. cerevisiae* hingegen handelt es sich um einen aktinabhängigen Prozess, durch den die RNA in der Spitze der Tochterzelle transportiert wird (zusammengefasst in Gonsalvez et al., 2005). Der mikrotubuliabhängige Transportmechanismus und die von den Rrm4 Partikeln zurückgelegte Strecke, grenzen den Mechanismus aus *U. maydis* deutlich vom Lokalisationsprozess in *S. cerevisiae* ab. Mit dem RNA-bindenden Protein Rrm4 konnte somit erstmals in Mikroorganismen ein RNA-Langstreckentransport entlang des Mikrotubulizytoskeletts gezeigt werden. Man könnte daher einen evolutionär konservierten Mechanismus für den mikrotubuliabhängigen RNA-Transport vermuten.

Molekulare Motoren für den aktiven Transport der Rrm4 Partikel

Die mikrotubuliabhängige Bewegung der Rrm4 Partikel lies auf die Beteiligung mindestens eines der neun Kinesine und/oder des Dynein-Motorproteins aus *U. maydis* schließen. Die Untersuchung zur Beteiligung von Kin2, dem konventionellen Kinesin aus *U. maydis*, lag auf Grund des bipolaren Filamentwachstums der *rrm4* sowie *kin2* Deletionsmutante nahe. I. Manns und G. Steinberg konnten durch eine Deletion von *kin2* in AB33 ein bidirektionales Hyphenwachstum, gepaart mit einem Defekt bei der Ausbildung distaler, leerer Abschnitte beobachten (pers. Mitteilung). Diese Beobachtung steht in Einklang

15. Die lokalisierte *bicoid* mRNA ist, wenn das Transkript translatiert wird, essenziell für die Definition der Antero-Posterior Zellachse im Embryo von *D. melanogaster* (St Johnston et al., 1989).

3.2.2 Die pendelnde Bewegung der Rrm4 Partikel entlang des Mikrotubulizytoskeletts

mit früheren Arbeiten, die einen Defekt bei der distalen Kompartimentierung in dikaryotischen *kin2* Null-Filamenten (Steinberg et al., 1998) sowie ein reduziertes Wachstum und eine gestörte Kernverteilung beschrieben (Lehmler et al., 1997). Bei der Untersuchung der subzellularen Lokalisation von Rrm4-eGfp im *kin2Δ* Hintergrund wurde eine Akkumulation von Rrm4-eGfp in den Hyphenspitzen beobachtet (vgl. Abschnitt , S. 46 f.). Die bipolare Bewegung der Rrm4 Partikel fand nur noch im zentralen Bereich der *kin2Δ* Zellen statt und der Transport in die distalen Bereiche konnte nur noch als unipolare Bewegung zu den Zellpolen beobachtet werden. Arbeiten zur Polarität des Mikrotubulizytoskeletts während des filamentösen Wachstums von *U. maydis* zeigten, dass etwa 85 % der Mikrotubuli mit den Plusenden zur Hyphenspitze ausgerichtet sind (I. Manns und G. Steinberg, pers. Mitteilung). Dies lässt die Lokalisation von Rrm4-eGfp im *kin2Δ* Hintergrund paradox erscheinen, da die Deletion von *kin2*, das für ein plusendgerichtetes Motorprotein kodiert, führt zur Akkumulation von Rrm4-eGfp am Plusende der Mikrotubuli. Ein ähnliches Phänomen konnte auch für das am Endosomentransport beteiligte Protein Yup1 aus *U. maydis* gezeigt werden (Wedlich-Söldner et al., 2002b). In *kin2Δ* Hyphen akkumuliert das Fusionsprotein Yup1-eGfp ebenfalls in den Hyphenspitzen (I. Manns, pers. Mitteilung), obwohl für den Transport der Yup1 Partikel bereits eine Beteiligung des plusendgerichteten Kinesins Kin3 gezeigt werden konnte (Wedlich-Söldner et al., 2002b). Die Deletion von *kin3* hatte zur Folge, dass die Partikel eine deutlich reduzierte Mobilität zeigten und eine Lokalisation der Endosomen an den distalen Zellpolen und den Septa verhindert war, weshalb damals schon eine Beteiligung des minusendgerichteten Motorproteins Dynein vermutet wurde (Wedlich-Söldner et al., 2002b). Im Gegensatz zum Transport der Yup1 Partikeln, hatte eine Deletion von *kin3* keinen Einfluss auf die Bewegung der Rrm4 Partikel (Daten nicht gezeigt). Zhang et al. konnten in *A. nidulans* die Beteiligung des plusendgerichteten konventionellen Kinesins KINA an der Plusenden-Lokalisation des des minusendgerichteten, zytoplasmatischen Dyneins gezeigt werden (Zhang et al., 2003). Es lässt sich daher auch über eine Beteiligung des Kin2 an der Plusenden-Lokalisation des Dyneins in *U. maydis* spekulieren. Folglich scheint die Kooperation eines bislang nicht identifizierten Kinesin-Motorproteins und des Dyneins am bidirektionalen Transportmechanismus der Rrm4-eGfp Partikel wahrscheinlich.

Bei der mikrotubuliabhängigen RNA-Lokalisation stellt die Kooperation von Motorproteinen mit konträrer Bewegungsrichtung einen verbreiteten Mechanismus dar (Palacios und St Johnston, 2002; Januschke et al., 2002; Duncan und Warrior, 2002; Brenda et al., 2002). So ist beispielsweise die Lokalisation der maternalen *bicoid* mRNA am Anterior des *D. melanogaster* Embryos sowohl Dynein- als auch Kinesin-abhängig (Schnorrer et al., 2000; Januschke et al., 2002). Und in menschlichen, neuronalen Zellen konnte eine Kolo-kalisation des Staufens mit Dynein und Kinesin gezeigt werden (Villace et al., 2004). Die Vorstellung, dass eine verhinderte Lokalisation des Dyneins an den Plusenden der Mikrotubuli einen Einfluss auf den Transport der Rrm4 Partikel hat, lässt vermuten, dass es zu einer Umstrukturierung der Rrm4-haltigen RNPs an den Zellpolen kommt, wobei das am minusendgerichteten Transport beteiligte Dynein rekrutiert wird.

3.2.3 Modellvorstellung zur Funktion von Rrm4

Die in dieser Arbeit geführte Diskussion legt eine Beteiligung von Rrm4 an der sequenzspezifischen RNA-Lokalisation nahe. Durch die bidirektionale Bewegung aus dem zentralen Bereich der Infektionshyphye zu den Zellpolen kann man vermuten, dass der Kargo während des Filamentwachstums am vorderen und/oder hinteren Ende der Spitzenzelle benötigt wird. Die Modellvorstellung hierzu ist in Abb. 3-4 gezeigt. Im perinuklearen Raum findet die zytoplasmatische Reifung des Lokasoms durch die Rekrutierung der RNA über Rrm4 statt. Anschließend wird der Rrm4-haltige RNP entlang des Mikrotubulizytoskeletts zu den Zellpolen transportiert. Diese plusendgerichtete Bewegung ist vermutlich abhängig von einem Motorprotein aus der Familie der Kinesine. An den Zellpolen wird der Kargo freigegeben, und es kommt vermutlich zu einer Umgestaltung des Proteinkomplexes, wobei das Motorprotein Dynein in das Partikel rekrutiert wird (Abb. 3-4A). Die Mutation der ersten bzw. zweiten RRM-Domäne führt zu einem Verlust der RNA-Bindung ohne die partikelbildende Eigenschaft von Rrm4 zu beeinflussen, so dass der aktive Transportkomplex weiter gebildet werden kann. Durch die Mutationen ist die Rekrutierung des Kargos unterbunden und eine Transkriptlokalisierung verhindert. Auch in diesem Fall kommt es durch den misslokalisierten Kargo zu einem verstärkt bipolaren Filamentwachstum und dem Verlust der Bildung leerer Abschnitte (Abb. 3-4B). Die Deletion bzw. Mutation der C-terminalen PABC-Domäne führt zu einem Verlust der Partikelbildung von Rrm4, wobei unklar ist, ob die restlichen Kompo-

zenten des Lokasoms auch ohne Rrm4 akkumulieren und ein mobiler Komplex entstehen kann. Die von Rrm4 gebundene RNA wird nicht mehr lokalisiert, und es kommt zu einem verstärkt bipolaren Auswachsen der Zellen sowie einem Septierungsdefekt (Abb. 3-4C). Es lässt sich daher vermuten, dass durch die Rrm4-abhängige RNA-Lokalisation eine Polarität der Infektionshyphae erzeugt wird, die essenziell für das unipolare Filamentwachstum und die Bildung leerer Abschnitte ist.

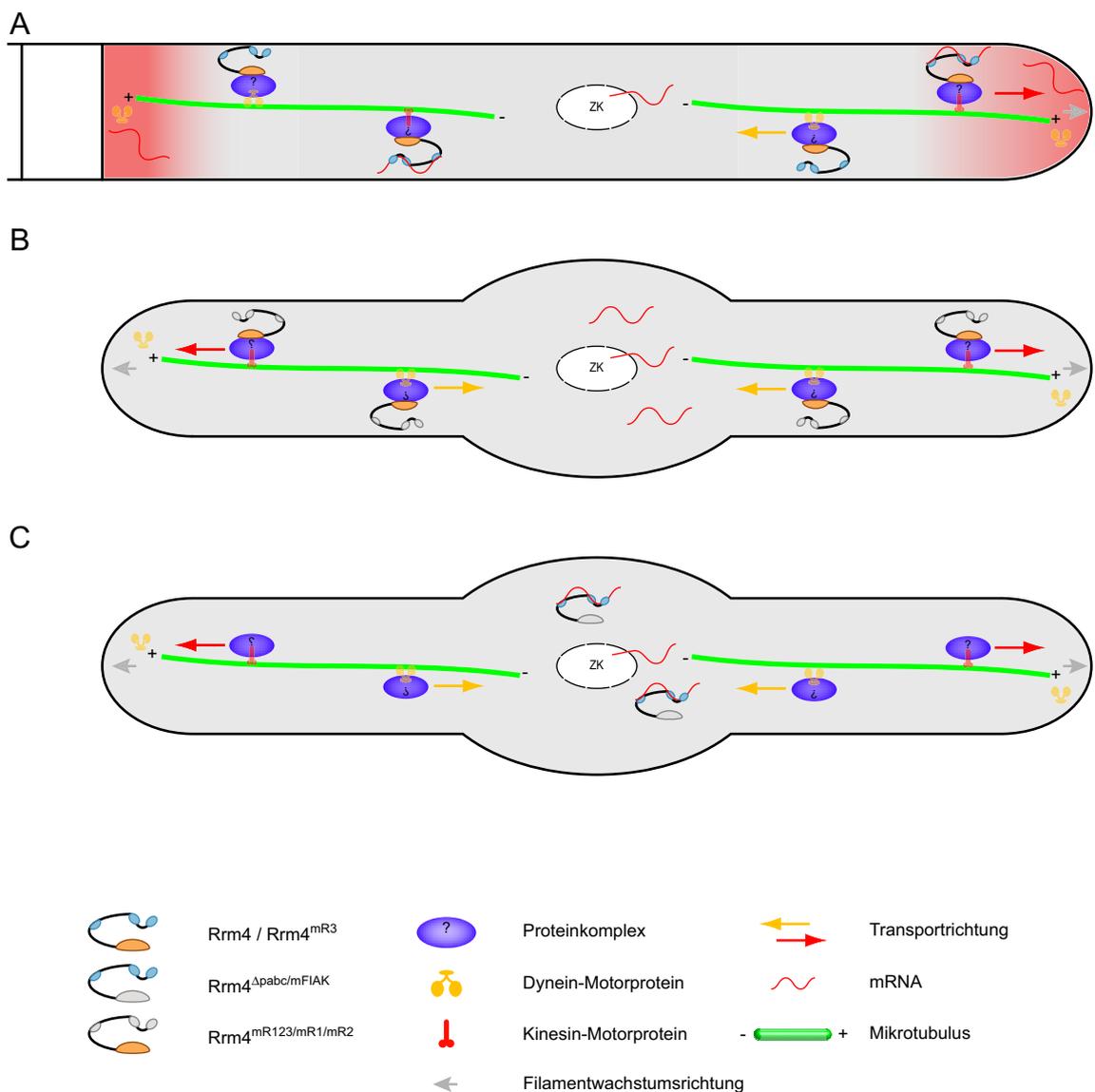


ABB. 3-4 Modellvorstellungen zur Rrm4-abhängigen RNA-Lokalisation in *U. maydis*
 Das Bild illustriert die Modellvorstellung zum Rrm4-abhängigen mRNA-Transport in der Infektionshyphae von *U. maydis*. (A) Modellvorstellung des Rrm4-abhängigen RNA-Transports. (B) Szenario durch die Mutation der ersten, zweiten bzw. durch alle drei RRM-Domänen in Rrm4. (C) Szenario durch die Mutation oder Deletion der PABC-Domäne in Rrm4. ZK: Zellkern.

Bleibt letztlich die Frage nach dem Kargo: Da dieser bislang nicht identifiziert wurde, kann darüber nur spekuliert werden. Zum einen kann es sich um eine RNA handeln, die für eine strukturelle Komponente mit Einfluss auf das Filamentwachstum kodiert. Dass die Lokalisation solcher Komponenten wichtig ist, zeigt beispielsweise die aktinabhängige Lokalisation der Chitinsynthase *Chs7* an der Wachstumsspitze (Weber, 2004). Es wäre aber auch eine Lokalisation von Septin-kodierender RNA denkbar. So konnte im Humanpathogen *C. albicans* ein Einfluss der Septin-Lokalisation auf das hyphale und pseudo-hyphale Wachstum bereits gezeigt werden (Sudbery, 2001; Warena und Konopka, 2002; Gonzalez-Novo et al., 2004). Zum anderen wäre denkbar, dass es sich um eine RNA handelt, die für eine regulatorische Komponente kodiert. So wird beispielsweise in *D. melanogaster* durch die Lokalisation von maternalen Transkripten die Zellpolarität aufgebaut. Die Lokalisation der *oskar* und *gurken* mRNAs stellt einen Schlüsselprozess für die Formation der embryonalen Zellachse dar (Johnstone und Lasko, 2001). Außerdem könnte man einen Transport von Zytoskelettkomponenten vermuten, wie dies aus Hühner-Fibroblasten bekannt ist. Dort wird β -*aktin* mRNA an die führende Seite der Zelle transportiert, um dadurch die Polarität der Bewegungsrichtung aufzubauen (zusammengefasst in Condeelis und Singer, 2005). Letztlich könnte Rrm4 eine Funktion als Ribosomentranslokator besitzen und damit eine Rolle bei der Transport- und Translationsregulation von RNAs besitzen. Eine ähnliche Funktion wird für den hStaufen Komplex vermutet, der neben dem menschlichen Staufen Protein (hStaufen) auch Ribosomen, Proteine des Zytoskeletts, Motorproteine und regulatorischen Proteine enthält (Villace et al., 2004).

3.3 AUSBLICK

Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse über ein neuartiges, ELAV-ähnliches Protein Rrm4, zeigen erstmals einen Langstreckentransport von RNPs in einem Mikroorganismus. Die Untersuchungen zur Beteiligung von Rrm4 an der mikrotubuliabhängigen RNA-Lokalisation während des filamentösen Wachstums von *U. maydis* ließen bislang aber die Frage nach dem Kargo offen. Die Klärung dieser Frage muss im Mittelpunkt der weiteren Untersuchungen stehen und wird bereits mit einem CLAP-Ansatz zur Aufreinigung und Identifizierung der von Rrm4 gebundenen RNA verfolgt (J. König und

3.2.3 Modellvorstellung zur Funktion von Rrm4

M. Feldbrügge, pers. Mitteilung). Diese Methode zur Isolation der gebunden RNAs ist an die Proteinaufreinigung mittels eines TAP-Tag (*tandem affinity purification*) Fusionsproteins angelehnt. Es könnten daher mit den selben Stämmen auch weitere Faktoren des Rrm4 Partikels isoliert und identifiziert werden. Auf Grund von Berichten aus anderen Systemen kann man davon ausgehen, dass in den Partikeln noch weitere Proteine außer Rrm4 vorhanden sind, z. B. so genannte Linker-Proteine, die als Bindeglied zwischen Rrm4 und einem Motorprotein dienen könnten.

Für die Identifizierung von Kofaktoren, die Interaktionspartner der PABC-Domäne darstellen, wäre ein Bioinformatischer Ansatz denkbar. Auf Grund der oben diskutierten möglicherweise identischen Sequenzspezifität der PABC-Domänen von hPabp1 und Rrm4, könnten potenzielle Bindepartner durch eine iterative Sequenzsuche nach dem mit der PABC-Domäne interagierenden Motiv PAM2 (Roy et al., 2002) identifiziert werden, wie dies für die PABC-Domäne des menschlichen PABP hPAB1 bereits erfolgreich durchgeführt wurde (Albrecht und Lengauer, 2004).

Durch die Untersuchungen zur bidirektionale Bewegung der Rrm4 Partikel konnten bereits erste Hinweise auf die beteiligten Motorproteine erhalten werden. Es lässt sich auf Grund der Ergebnisse dieser Arbeit eine Beteiligung des Dynein-Motorproteins aus *U. maydis* an der minusendgerichteten Bewegung der Partikel vermuten, diese muss aber noch abschließend gezeigt werden. Es würde sich hierfür die Verwendung eines Stammes anbieten, der ein temperatursensitives Dynein-Protein exprimiert, wodurch bei einer restriktiven Temperatur eine Akkumulation von Rrm4 in der Hyphenspitze zu erwarten ist. Die Beteiligung eines Kinesin-Motorproteins am plusendgerichteten Transport scheint ebenfalls wahrscheinlich. Da bisher nur eine direkte Beteiligung von Kin2 und Kin3 ausgeschlossen werden konnte, muss das am Transport beteiligte Kinesin noch identifiziert werden.

MATERIAL UND METHODEN 4

4.1 MATERIAL UND BEZUGSQUELLEN

4.1.1 Medien, Lösungen, Enzyme

Chemikalien

Alle in dieser Arbeit verwendete Chemikalien hatten Analysequalität und wurden von den Firmen Fluka, Merck, Riedel-de-Häen, Roth und Sigma bezogen.

Puffer und Lösungen

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

Enzyme

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

4.1.2 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden von den Firmen Sigma ARK Scientific, Metabion und MWG synthetisiert und in 5'-in Richtung-3'-Ende angegeben. Zur Herstellung und Bestätigung der Deletionsstämme des revers-genetischen Ansatzes wurden die in Tabelle 4-1 aufgeführten Oligonukleotide verwendet (vgl. Tabelle 4-5). Die darüber hinaus verwendeten Oligonukleotide sind in

Verwendete Kits und sonstige Materialien

In dieser Arbeit wurden folgende Kits verwendet: JETsorb (Genomed) zur Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen, JETquick Plasmid Maxi- und Miniprep Kit (Genomed) zur Präparation hochreiner Plasmid-DNA, JETquick PCR Purification Kit (Genomed) zur Aufreinigung von PCR Produkten, JETquick General DNA Clean-up Kit (Genomed) zur Aufreinigung von Plasmiden vor der Sequenzierung, TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen) zur Klonierung von PCR-Produkten, PCR-DIG-labeling Mix (Roche) zur Dioxigenin-Markierung von PCR-Produkten. Zusätzlich verwendetes Material ist unter den jeweiligen Methoden beschrieben.

Tabelle 4-2 aufgeführt, spezielle Oligonukleotide zur Sequenzierung wurden auch von der MPIZ Zentralabteilung DNA zur Verfügung gestellt (Tabelle 4-3).

TABELLE 4-1 Oligonukleotide für die Herstellung der Deletionsmutanten

Gen	Typ	Bezeichnung	Sequenz (5'-in Richtung-3'-Ende)
pum1	u1	MF123	GGG TTT GCG AGC GTC GCC AAC ATG
	u2	MF124	TGG CGC CGA TCG ACA TGT CTG GCT AC
	u3	MF125	TTC GGC CAT CTA GGC CAC TCT TCC AGA AGC GCA CTA CGC G
	d1	MF142	TGA GGC CTG AGT GGC CGC GCA ACT CCA CAC CAC AGA GCT G
	d2	MF127	GAC GAC AGC TGG GAA GAC GAC GCC
	d3	MF128	CCC CAC ACA TCA CGC ACA CCC TCC
	p1	MF181	TCG AAG AGC TGC ATG CGG
	p2	MF182	TCA TCA TGC GGA CGG CAG
pum2	u1	MF129	TAT CGA GAC TGT TCG ACT TGT GCC
	u2	MF130	CTT TAT CAA CTA CGC CGA CCT CGC
	u3	MF131	TTC GGC CAT CTA GGC CGA GAC GCT TGC GCA CTT CTT TGA GCC
	d1	MF132	TGA GGC CTG AGT GGC CGC TGG TTG CTT CCA TGA CGC CTA AC
	d2	MF133	CTT TTG CGA CAA GCT CGG TTC GCC
	d3	MF134	TCC AAC AGT CGA CAC TGC ACA GGC
	p1	MF183	CGA CGC AGA TGC TAT CGC
	p2	MF184	GTC AGC GTG CGT GCA ATC
pum3	u1	MF135	GGC TTC TGC GGC GTC CCA TTA TGC
	u2	MF136	GGA ACG GCG ACA GTC AGC TGC CTC
	u3	MF137	TTC GGC CAT CTA GGC CGC GAG TTG TGA GTC GAT CTA GCC G
	d1	MF138	TGA GGC CTG AGT GGC CAG ACA CCT CAA AGG TGC TTT CGT C
	d2	MF139	TCT CCA TGA CTT GGT CTC ATC TCC
	d3	MF140	GTA CTC TAG AGC CAA ACA GCT GGC
	p1	MF185	TCG ACA GTG ACG ACA CCG
	p2	MF186	ATC GTG CTT CGA TGG CGC
pum4	u1	MF861	AGA TCG GCT TGG AGG AGC
	u2	MF862	AGG GTG CTT GAC GCT TGC
	u3	MF863	TTC GGC CAT CTA GGC CTG GCC TGT TCT TTG CGC G
	d1	MF864	TGA GGC CTG AGT GGC CTA CGG TTG GCT CGC ATG C
	d2	MF865	TCG TCG TTG CGC ATC TCG
	d3	MF866	TGG CAA GCT TGT CGT CGG
	p1	MF867	CTC ACC ACT GCC GTC GAG
	p2	MF868	CTT TTG GTG CAT GGC GCG
khd1	u1	MF149	TCG AAC CGA CAA AGG CAA TGA CAC
	u2	MF150	CTG CAA GAG TTG GCC TGC CCT CAC
	u3	MF151	TTC GGC CAT CTA GGC CAT GCT GGC GTC GCT GGT GAC GAT C
	d1	MF152	TGA GGC CTG AGT GGC CGA TTT GGT GGG TTG CAT TAT CGG C
	d2	MF153	GGG AGG AAC ACA GTT TGG CGA TGC
	d3	MF154	GAC AGG CAG ATC TCG GAG GCG CTC
	p1	MF229	TCG GAA AGT CCG GCA AGC
	p2	MF230	TCG TGC CTG TAT GCA CGC
khd2	u1	MF143	AGA TCC AAA CTT GAT ACA CTA CAC
	u2	MF144	TCA GCA TGG AGC TGT TGA AAT GAC
	u3	MF145	TTC GGC CAT CTA GGC CGA GAG CAC GAA GCT GGA GCG TAG C
	d1	MF146	TGA GGC CTG AGT GGC CCG GCA AAG GTG GTT CCA AGA TCA C
	d2	MF147	CTG TCG AGC CAT GCA CGT GGG AAC
	d3	MF148	AGA TGA TGC GGT GCT GCC GAG GCC
	p1	MF227	TCA TGG GCA CCG TCA TCG
	p2	MF228	TTG GAC ATG GCA CCA GCG
khd3	u1	MF155	ATC GGA ATG CCT CGT CGC ATC TCC
	u2	MF156	CCT TTC AGG CTC TGG AAC AAC GGC
	u3	MF157	TTC GGC CAT CTA GGC CTC CCT TGG TGG TGA CGC TGG CTC C
	d1	MF158	TGA GGC CTG AGT GGC CAG AAG GCG TAC GAT GCC ATG AGC C
	d2	MF159	CAA CTG ATC ACT GCC GAT TTC TTC

TABELLE 4-1 Oligonukleotide für die Herstellung der Deletionsmutanten (Forts.)

Gen	Typ	Bezeichnung	Sequenz (5'-in Richtung-3'-Ende)
	d3	MF160	GAA TAT CGT CAA CGT TTC CTA GGC
	p1	MF231	AGA ATC AAC GGC CAC CGC
	p2	MF232	GCG ATA TGC ATG GGC TCG
khd4	u1	MF161	CGG CCT CAA CTC AAG TTC GCT CTC
	u2	MF162	CAG CCT CAG TAG CAT GCC CAA ACC
	u3	MF163	TTC GGC CAT CTA GGC CTC GGA TTG TGC GTT CGA TGT TAA C
	d1	MF164	TGA GGC CTG AGT GGC CCG AAG ATA ACG TCA TCG CAC GAA C
	d2	MF165	AGG AGC GCC CCA CAC ATC ACT GCC
	d3	MF166	CGT GGC GTT GCT AGC GTT ACT GGC
	p1	MF233	TTG AGC TGG CCA ACG AGC
	p2	MF234	TGT TCT TGC CAC CGA CGC
	rrm1	u1	MF302
u2		MF303	GCT CCT CGT TTG GGT GAG
u3		MF304	TTC GGC CAT CTA GGC CGT CAT CGA AAC CCC TGC C
d1		MF305	TGA GGC CTG AGT GGC CGA TGA GGA CCT CGA GTG G
d2		MF306	TGC ACC AGG TGT TAG CGG
d3		MF307	CGA GGT CGC CTA GTG TCG
p1		MF308	CTA TGA CCT TCG GTC CGC
p2		MF309	CGT TGA GAT CTT GGC GGG
rrm2		u1	MF318
	u2	MF319	CGC GAG AGT CGT GAG TAC
	u3	MF320	TTC GGC CAT CTA GGC CGT CCG TTC TTG ACC CGA C
	d1	MF321	TGA GGC CTG AGT GGC CAG CTC GTA CAC CGA TCC C
	d2	MF322	GAT CGC GCT GAT CCA CAG
	d3	MF323	GTG TAG GTG CTC CAG TGC
	p1	MF324	CAA GAC CAA CCG TAC CGC
	p2	MF325	GGA AAG CGT CTC ATG CGC
	rrm3	u1	MF211
u2		MF212	GTG AAT GGC TGT GCC GCA
u3		MF213	TTC GGC CAT CTA GGC CTG CCT CAC TGT CTG CTG C
d1		MF214	TGA GGC CTG AGT GGC CCC GAT CTC GAT GCT GAG C
d2		MF215	GTC GAA CAG ACG ACT GCG
d3		MF216	TGC AAG TGC GTA CGA GCG
p1		MF217	CAG CCT TGC GTC CTG ATG
p2		MF218	TTT GGC CTG CAA GGC GTG
rrm4		u1	MF219
	u2	MF220	GCA CGC ATC CAC AGT CCA
	u3	MF221	TTC GGC CAT CTA GGC CTT TGC TCC GCA GCG TGA C
	d1	MF222	TGA GGC CTG AGT GGC CGT CAG GAG AAG CTC GCA G
	d2	MF223	GTT GCC TTG ACC GTC GCT
	d3	MF224	CCC TGA AGC GAG TCG ATG
	p1	MF225	AAT TGA CCG CAC CGT GGG
	p2	MF226	GGC TGG ATT GGT GAG CAG
	rrm5	u1	MF237
u2		MF238	GGT AGC CTT CAG TCA GCC
u3		MF239	TTC GGC CAT CAT GGC CTC ATC CTA TTC GGC CGC G
d1		MF240	TGA GGC CTG AGT GGC CTT GGA GTC GCT CGG CTT G
d2		MF241	GTC GAT CGA GTT GTC CGC
d3		MF242	TCG TTG TCA ACG CCG CCG
p1		MF243	GCT CAG CAT GCG GTG TAG
p2		MF244	AGC CTG GCA GAG AAC GAC
rrm 6		u1	MF245

TABELLE 4-1 Oligonukleotide für die Herstellung der Deletionsmutanten (Forts.)

Gen	Typ	Bezeichnung	Sequenz (5'-in Richtung-3'-Ende)
	u2	MF246	GAG TTG GGA GCC TTC GAC
	u3	MF247	TTC GGC CAT GGC CTG CCG ACG TAG ACT GTG G
	d1	MF248	TGA GGC CTG AGT GGC CAG GTG AAT CTG GCG GAC G
	d2	MF249	GTG GAT CCG TTC GAG CTG
	d3	MF250	CTT CCG ATT CGA ACC GGC
	p1	MF251	GCA CAG CTT GAC GAG ACC
	p2	MF252	CTA CCC CGG ATC GCA TTC
rrm7	u1	MF253	AAT CTG GCC GAG CAG CGA
	u2	MF254	GCA CAA GCA TGG AGC GGG
	u3	MF255	TTC GGC CAT CTA GGC CTT GGC TAG CCA TGC CGC G
	d1	MF256	TGA GGC CTG AGT GGC CCT TTG GTC GAC TAC GCG C
	d2	MF257	GCC ATA GTG GTC GAG CAG
	d3	MF258	AGG CCG TGG CAT GAT AGG
	p1	MF259	ACA CTA CAG GTG CCG ACC
	p2	MF260	TCT GCC TTC GCT GCC AAC
rrm8	u1	MF326	CGC AGG ACC ACG CTG GAG
	u2	MF327	CGA TCA CTC TGT TCG CGC
	u3	MF328	TTC GGC CAT CTA GGC CGC ACG TTC TCT ATC GGG C
	d1	MF329	TGA GGC CTG AGT GGC CAC GGC AAG GAT CGA TGC G
	d2	MF330	ATC GTG AAT GCG CAC GGC
	d3	MF331	TCT GTC TGG CCG TGT CTC
	p1	MF332	TCC TTG ACG GCT CCA CTG
	p2	MF333	TGG TCG ATC GGA CCG AAG
rrm9	u1	MF269	TGC TTC CAC TGC GCT TCC
	u2	MF270	CGG TGG TCG GAT TCT TGG
	u3	MF271	TTC GGC CAT CTA GGC CGG TCT GTG CGA TGG GAT C
	d1	MF272	TGA GGC CTG AGT GGC CGA ACG ACG AGT ACA CCG C
	d2	MF273	GAG TTG AAC TTG CGC GCG
	d3	MF274	GTG ACG AGT AGC CAT CGC
	p1	MF426	ATT CCG ACC GCC ATC GTC
	p2	MF427	TGC GTT CCT TTT CGC CGG
rrm10	u1	MF277	GCG CTA GTC TTC CAG AGC
	u2	MF278	GGC GAG ATG GAC GAT GGA
	u3	MF279	TTC GGC CAT CTA GGC CCT CGT CTA CTG CTG CGT G
	d1	MF280	TGA GGC CTG AGT GGC CAC CGA GAG CGA CAT GCT C
	d2	MF281	GCT CAT CCT CGC ATG CTC
	d3	MF282	CAG TCC AGA GTG CAC TCG
	p1	MF283	TTC CAC AAG AGC GGA CCG
	p2	MF284	TGT TCT GCG ATC TCG CCG
rrm11	u1	MF334	TAC TCG TGA CTG AGG GCC
	u2	MF335	CCC TCT TGC ACT CGT GAC
	u3	MF336	TTC GGC CAT CTA GGC CGT CAG CAC GAC GGA CAT C
	d1	MF337	TGA GGC CTG AGT GGC CCA AGC TCC GCA TTG ACC C
	d2	MF338	GCC ACT GGT AGG ATT GCC
	d3	MF339	ACA CTG TCA GGC TGC AGG
	p1	MF340	TGT CGA GTT CGA GCA CCC
	p2	MF341	TGC AAC GGA ATT GGC CGC

TABELLE 4-2 Weitere Oligonukleotide

MF	Sequenz (5-in Richtung-3'-Ende)
45	ATC CCA CAA ATT GAT AAG
54	CAG ACA AGC TGT GAC CGT CTC C
220	GCA CGC ATC CAC AGT CCA
222	TGA GGC CTG AGT GGC CGT CAG GAG AAG CTC GCA G
224	CCC TGA AGC GAG TCG ATG
225	AAT TGA CCG CAC CGT GGG
226	GGC TGG ATT GGT GAG CAG
369	TGT GGC CGT TTA CGT CGC
434	CTA CCT GAG CAC CCA GTC
529	TCG AGG CCA ACG CGG CCA C
530	CAT GGT GGC CGC GTT GGC C
613	ATA CCG CTA CGC GCA AGG
614	GTC TGC CTC CAC TCT GAC
616	TCC CTC TCC TTG ACC GAC
617	ACA AGA CCG CTG GCA TCC
618	CTT GCG CGT AGC GGT ATC
626	ATA GGC CTG AGT GGC CCA TCG ACT CGC TTC AGG G
627	CGC GAC CTT GCA ACA TGC
630	CAA GTC GGA ACC TTG CCG
631	GGT GGC CGC GTT GGC CGC CTT GTT CAG ACC TGC CAG CAA CC
632	CGG CGG TCA AGC TGG AA CCG GTG AGT CCG GAT A
713	AAA TTG GAA GTT GGA TAT GGG
716	GTC CTT TGT CGG CCC ATC
737	CGT GCG CGC CTT TTT CGC GAG CTG ATC ACC CAG CTT CTG
738	GCG CGC ACG TTC GGC GTC AA GGC GGC CCC GCT CTC ACC ATC CAC TTG TTG GAT TCC
750	TAT CTA GAG TCT GCG CCG CGG CCG CGC CGC TGG CTG TCT GGC CC
752	CGG CGCGCT GGG CGT CTT GTTB CAG
753	CAG CGC GCC GAA TCC GAG ATG CAC TGC
754	CCG AAT TCT CTG CTC TTG CCG TTA TCG
755	GAG AAT TCG GGG CCG CGG CTG CCA CCA CTC CTGACG AAG CGC
756	CGT CGA TCA ACA CGC ACG
757	GGA CGA CGC CAT CAC AAC
758	GCT TGT CAG CGT CCA TGC
764	CGG CGC GCT GGG CGT CTT GTT CAG AGT AGG CCG CCG CGG CGG CCA TAC CCT TGA AGC C
784	CCT CGG AGG AAC GGC CCA TGG CAGATC TGG CCG CGT
787	AGT CCG ACT GTC CCA CTC
788	TCG GCC ATC TAG GCC GAC ATG ACG ACT TGG CGG
789	GAG GCC TGA GTG GCC GTA CGG ATG CTA TGG CGG
790	GCA TCG TGA TCC TCT GGC
803	TTC GGC CAT CTA GGC CGGCAA GGT TCC GAC TTG
804	TGA GGC CTG AGT GGC CTC CGA GTG ACA ACC AGA C
805	CGG TGC CAA CCT GAT CAC
808	TCA AGT ACT CCC CGT CCG

TABELLE 4-3 Oligonukleotide (ausschließlich für Sequenzierzwecke)^a

Bezeichnung	Sequenz (5-in Richtung-3'-Ende)
rev1	CAG GAA ACA GCT ATG ACC ATG
TO2f	AAC AGC TAT GAC CAT GAT TAC GCC
TO2r	GAC GTT GTA AAA CGA CGG CCA GTG
uni1	CGT TGT AAA ACG ACG GCC AGT

a. wurden von der MPIZ Zentralabteilung DNA zur Verfügung gestellt

4.1.3 Stämme

Escherichia coli

Für sämtliche Klonierungen wurden die Stämme DH5 α (Bethesda Research Laboratories) und TOP10 (Invitrogen) verwendet, bei denen es sich um Derivate des *E. coli* Stammes K12 handelt.

Genotyp DH5 α : F⁺ *endA1*, *hsdR*, *hsdM*, *sup44*, *thi-1*, *gyrA1*, *gyrA96*, *relA1*, *recA1*, *lacZ* Δ M15.

Genotyp TOP10: F⁺ *mcrA*, Δ (*mrr*-*hsdRMS*-*mcrBC*), Φ 80*lacZ* Δ M15, Δ *lacX74*, *deoR*, *recA1*, *ara* Δ 139, Δ (*ara-leu*)7697, *galU*, *galK*, *rpsL*(Str^R), *endA1*, *nupG*.

Ustilago maydis

Die Stämme in Tabelle 4-4 dienten in dieser Arbeit als Ausgangs- und/oder Teststämme, die in Tabelle 4-5 und Tabelle 4-6 aufgelisteten Stämme wurden im Rah-

men dieser Arbeit hergestellt. In allen Fällen wurden zwei unabhängige Transformanten erzeugt, die durch eine diagnostische PCR (Stämme aus Tabelle 4-5), bzw. durch Southern-Analysen (Stämme aus Tabelle 4-6 sowie UMa121, UMa122, UMa123, UMa124, UMa125, UMa126, UMa160 und UMa163 aus Tabelle 4-5) bestätigt wurden.

Mais (Zea mays ssp. mays Linné)

Für alle Spritzinfektionen wurde die Maisvarietät Early Golden Bantam (Olds Seeds Company, Madison, Wisconsin, USA) verwendet.

TABELLE 4-4 Ausgangs- und Teststämme

Stamm	Genotyp ^a	Resistenz	Referenz
521	<i>a1 b1</i>	—	Banuett und Herskowitz, 1989
AB33	<i>a2 b2 P_{nar}:bW2 bE1</i>	Phleomycin	Brachmann, 2001
FB1	<i>a1 b1</i>	—	Banuett und Herskowitz, 1989
FB2	<i>a2 b2</i>	—	Banuett und Herskowitz, 1989
FBD12-17	<i>a2 a2 b1 b2</i>	—	Banuett und Herskowitz, 1989
SG200	<i>a1 mfa2 bW2 bE1</i>	Phleomycin	Bölker et al., 1995

a. P: Promotor

TABELLE 4-5 Für den revers-genetischen Ansatz dieser Arbeit hergestellte Stämme^{a,b}

Gen	Größe der stromabwärts flankierenden	Größe der stromaufwärts flankierenden	Größe des diagnostischen PCR-Produkts	Primer									Plasmid pUMa	Stamm a1b1 UMa	Stamm a2b2 UMa
	Region [bp]	Region [bp]	[bp]	u1	u2	u3	d1	d2	d3	p1	p2				
<i>pum1</i>	931	1085	272	MF123	MF124	MF125	MF142	MF127	MF128	MF181	MF182	215	123	124	
<i>pum2</i>	1055	1000	199	MF129	MF130	MF131	MF132	MF133	MF134	MF183	MF184	216	121	122	
<i>pum3</i>	1011	1056	225	MF135	MF136	MF137	MF138	MF139	MF140	MF185	MF186	217	125	126	
<i>khd1</i>	880	829	248	MF149	MF150	MF151	MF152	MF153	MF154	MF229	MF230	233	127	128	
<i>khd2</i>	991	1021	328	MF143	MF144	MF145	MF146	MF147	MF148	MF227	MF228	234	139	140	
<i>khd3</i>	867	966	230	MF155	MF156	MF157	MF158	MF159	MF160	MF231	MF232	235	137	138	
<i>khd4</i>	853	917	257	MF161	MF162	MF163	MF164	MF165	MF166	MF233	MF234	236 ^c	163	160	
<i>rrm1</i>	888	998	181	MF302	MF303	MF304	MF305	MF306	MF307	MF308	MF309	248	175	176	
<i>rrm2</i>	907	908	247	MF318	MF319	MF320	MF321	MF322	MF323	MF324	MF325	249	177	178	
<i>rrm3</i>	809	849	356	MF211	MF212	MF213	MF214	MF215	MF216	MF217	MF218	241	211	210	

TABELLE 4-5 Für den revers-genetischen Ansatz dieser Arbeit hergestellte Stämme^{a,b} (Forts.)

Gen	Größe der stromabwärts flankierenden Region [bp]	Größe der stromaufwärts flankierenden Region [bp]	Größe des diagnostischen PCR-Produkts [bp]	Primer u1	Primer u2	Primer u3	Primer d1	Primer d2	Primer d3	Primer p1	Primer p2	Plasmid pUMa	Stamm a1b1 UMa	Stamm a2b2 UMa
<i>rrm4</i>	1049	942	265	MF219	MF220	MF221	MF222	MF223	MF224	MF225	MF226	242 ^d	170	171
<i>rrm5</i>	839	823	258	MF237	MF238	MF239	MF240	MF241	MF242	MF243	MF244	243	146	145
<i>rrm6</i>	910	834	192	MF245	MF246	MF247	MF248	MF249	MF250	MF251	MF252	283	173	174
<i>rrm7</i>	765	905	219	MF253	MF254	MF255	MF256	MF257	MF258	MF259	MF260	246	153	162
<i>rrm8</i>	780	919	219	MF326	MF327	MF328	MF329	MF330	MF331	MF323	MF333	289	165	166
<i>rrm9</i>	995	767	236	MF269	MF270	MF271	MF272	MF273	MF274	MF426	MF427	238	154	172
<i>rrm10</i>	903	899	203	MF277	MF278	MF279	MF280	MF281	MF282	MF283	MF284	245	152	161
<i>rrm11</i>	775	871	259	MF334	MF335	MF336	MF337	MF338	MF339	MF340	MF341	253	199	200

- a. in Zusammenarbeit mit J. Hohenner
 b. Siehe "Herstellung der Deletionsstämme" auf Seite 95.
 c. Dieses Plasmid wurde auch zur Herstellung der Stämme UMA205 #1 und #2 (SG200Δ*khd4*, *a1mfa2be1bw2*) benutzt
 d. Dieses Plasmid wurde auch zur Herstellung der Stämme UMA212 #1 und #2 (SG200Δ*rrm4*, *a1mfa2be1bw2*) benutzt

TABELLE 4-6 Für die Untersuchung von Rrm4 hergestellte Stämme

Stamm UMa	Stammbezeichnung	Genotyp ^b	Resistenz	Ausgangsstamm	Plasmid pUMa
170 ^a	FB1 <i>rrm4</i> Δ	<i>a1 b1 Δrrm4::[hyg^R]</i>	Hyg	FB1	242
171 ^a	FB2 <i>rrm4</i> Δ	<i>a2 b2 Δrrm4::[hyg^R]</i>	Hyg	FB2	242
212 ^a	SG200 <i>rrm4</i> Δ	<i>a1 mfa2 bW2 bE1 Δrrm4::[hyg^R]</i>	Hyg	SG200	242
273	AB33 <i>rrm4</i> Δ-2	<i>a2 b2 P_{nar}:bW2 bE1 Δrrm4-2::[hyg^R]</i>	Phleo, Hyg	AB33	495 ^c
274	AB33 <i>rrm4</i> -egfp	<i>a2 b2 P_{nar}:bW2 bE1 Δrrm4-2::rrm4-egfp-[nat^R]</i>	Phleo, Nat	UMa 273	496
275	AB33 <i>rrm4</i> ^{Δpabc} -egfp	<i>a2 b2 P_{nar}:bW2 bE1 Δrrm4-2::rrm4^{Δpabc}-egfp-[nat^R]</i>	Phleo, Nat	UMa 273	503
276	AB33 <i>rrm4</i> ^{mR123} -egfp	<i>a2 b2 P_{nar}:bW2 bE1 Δrrm4-2::rrm4^{mR123}-egfp-[nat^R]</i>	Phleo, Nat	UMa 273	504
311	AB33 <i>rrm4</i> ^{mR1} -egfp	<i>a2 b2 P_{nar}:bW2 bE1 Δrrm4-2::rrm4^{mR1}-egfp-[nat^R]</i>	Phleo, Nat	UMa 273	634
312	AB33 <i>rrm4</i> ^{mR2} -egfp	<i>a2 b2 P_{nar}:bW2 bE1 Δrrm4-2::rrm4^{mR2}-egfp-[nat^R]</i>	Phleo, Nat	UMa 273	636
313	AB33 <i>rrm4</i> ^{mR3} -egfp	<i>a2 b2 P_{nar}:bW2 bE1 Δrrm4-2::rrm4^{mR3}-egfp-[nat^R]</i>	Phleo, Nat	UMa 273	637
304	AB33 <i>rrm4</i> ^{mFIAK} -egfp	<i>a2 b2 P_{nar}:bW2 bE1 Δrrm4-2::rrm4^{mFIAK}-egfp-[nat^R]</i>	Phleo, Nat	UMa 273	607
279	AB33 <i>rrm4</i> -mrfp	<i>a2 b2 P_{nar}:bW2 bE1 Δrrm4-2::rrm4-mrfp-[nat^R]</i>	Phleo, Nat	UMa 273	520
277	AB33 <i>rrm4</i> Δ-2/egfp-tub1	<i>a2 b2 P_{nar}:bW2 bE1 Δrrm4-2::[hyg^R] ip'[egfp-tub1]jip^s</i>	Phleo, Hyg, Cbx	UMa 273	508
299	AB33egfp-tub1/ <i>rrm4</i> -mrfp	<i>a2 b2 P_{nar}:bW2 bE1 Δrrm4-2::rrm4-mrfp-[nat^R] ip'[egfp-tub1]jip^s</i>	Phleo, Cbx, Nat	UMa 277	520
300	AB33kin2Δ/ <i>rrm4</i> -egfp	<i>a2 b2 P_{nar}:bW2 bE1 Δrrm4-2::rrm4-egfp-[nat^R] Δkin2::[hyg^R]</i>	Phleo, Hyg, Nat	UMa 274	542 ^d
301	AB33kin3Δ/ <i>rrm4</i> -egfp	<i>a2 b2 P_{nar}:bW2 bE1 Δrrm4-2::rrm4-egfp-[nat^R] Δkin3::[hyg^R]</i>	Phleo, Hyg, Nat	UMa 274	509

- a. vgl. Tabelle 4-5
 b. Δ: Deletion; ::: Austausch durch homologes Rekombinationsereignis; P: Promotor; [hyg^R]: Hygromycin-Resistenzkassette; [nat^R]: Nourseothricin-Resistenzkassette
 c. Transformiert wurde ein PCR-Fragment (MF220 und MF805) aus pUMa495
 d. Transformiert wurde ein 4358bp PCR-Fragment (MF787 und MF790) aus pUMa542

4.1.4 Plasmide und Plasmidkonstruktionen

Jedes Plasmid trägt eine Ampicillin-Resistenzkassette zur Selektion in *E. coli*. Alle Klonierungsschritte wurden durch Restriktionsanalysen überprüft und alle eingebrachten PCR-Produkte, bis auf wenige Ausnahmen,

sequenziert. Plasmide die zur Herstellung der in Tabelle 4-5 und Tabelle 4-6 beschriebenen Stämme dienen, sind durch ein  hervorgehoben.

Ausgangsplasmide

pBlueskript SKII (+)

Stratagene

pBS-hhn

pUMa194

Dieses Plasmid enthält eine 1884bp Hygromycin-Resistenzkassette [hyg^R] als *Sfi*I-Fragment. Das *hpb* Gen wird dabei von dem *hsp70* Promotor und dem *nos* Terminator flankiert (J. Kämper, pers. Mitteilung).

pCR[®] 2.1-TOPO[®]

Invitrogen; 3931bp

Vektor zur Klonierung von PCR-Produkten mittels Topoisomerase-Aktivität. Die klonierten Fragmente lassen sich mit *Eco*RI ausschneiden. Blau/Weiß-Selektion ist möglich.

pHis-mRFP1-pBS

pUMa461

Campbell et al. (2002)

pNEBUH

pUMa207

siehe Weinzierl (2001)

pNEBUN

pUMa419

siehe Weinzierl (2001)

pNEBUP

pUMa270

siehe Weinzierl (2001)

pOMA-Tc1A

pUMa465

Ladendorf (2002)

pOtefGFPTub1

pUMa508

Steinberg et al. (2001)

**pRWS74**

pUMa509

Das Plasmid ist ein Derivat von pUC18 und enthält ein *kin3* Deletionskonstrukt mit einer [hyg^R] aus pSLHyg(-) (*Bst*WI→*Nsi*I, 2936bp) (Wedlich-Söldner et al., 2002b).

**pSL1180-OMA**

pUMa464

Ladendorf (2002)

pUMa454

pLexA NcoBamNotEco

Derivat von pLexA (M. Feldbrügge, pers. Mitteilung).

pUMa429

GST-RRM4-pGEX

Das Plasmid ist ein Derivat von pGEX-2T und enthält ein GST-Rrm4 Fusionsprotein. (C. Julius und M. Feldbrügge, pers. Mitteilung)

pUMa427

RRM4-GFP-pACTIII-Ade

Das Plasmid enthält den ORF von *rrm4* mit einer C-terminalen *egfp* Fusion. (C. Julius, J. König und M. Feldbrügge, pers. Mitteilung)

4.1.4 Plasmide und Plasmidkonstruktionen

pUMa209

eGFP-Asc-nos-pBS, 3946bp

Enthält das *egfp* Gen mit einer 3'-angrenzenden Nos-Terminator, flankiert von zwei *Sfi* Schnittstellen. Entstanden aus pUMa205 und pUMa208 (J. König und M. Feldbrügge, pers. Mitteilung).

Plasmide zur Herstellung der Deletionsmutanten im Rahmen des revers-genetischen Ansatzes

Die Plasmide die zur Herstellung der Deletionsmutanten dienten, wurden alle, wie unter "Herstellung der Deletionsstämme" auf Seite 95 beschrieben, in Zusammenarbeit mit J. Hohenner und M. Feldbrügge hergestellt. Die zur Herstellung dieser Plasmide verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 4-5 aufgeführt.

Plasmide zur Untersuchung von *rrm4*

Die hier aufgeführten Plasmide wurden, sofern nicht anders angegeben, in Zusammenarbeit mit M. Feldbrügge und J. Hohenner hergestellt.

pUMa637

Rrm4-mR3-GFP-Nat-pSK; 10646bp

Plasmid für die Mutationsstudien der RRM-Domänen. Es trägt ein Nourseothricin-Resistenzkassetten ($[\text{nat}^R]$)-Konstrukt, welches für ein in der dritten RRM-Domäne mutiertes Rrm4 mit einer C-terminalen eGfp Fusion kodiert. Es dient der homologen Integration in den endogenen Locus unter der Kontrolle des Wildtyppromotors. Folgende Mutationen wurden in die Aminosäuresequenz von Rrm4 eingeführt: F365A, V366A, S367A und F368A. Kloniert aus pUMa526 (*Xba*I→*Hind*III, 1458bp) und

pUMa496 (*Hind*III→*Xma*I, 2499bp; *Xba*I→*Xba*I, 3822bp).

Sequenziert mit dem Oligonukleotid MF613.

pUMa636

Rrm4-mR2-GFP-Nat-pSK; 10646bp

Plasmid für die Mutationsstudien der RRM-Domänen. Es trägt ein Konstrukt, welches für ein in der zweiten RRM-Domäne mutiertes Rrm4 mit einer C-terminalen eGfp Fusion kodiert. Es dient der homologen Integration in den endogenen Locus unter der Kontrolle des Wildtyppromotors. Folgende Mutationen wurden in die Aminosäuresequenz von Rrm4 eingeführt: V202A, L203A, E204A und F205A. Darüber hinaus trägt das Plasmid eine $[\text{nat}^R]$. Kloniert aus pUMa594 (*Xba*I→*Hind*III, 1458bp) und pUMa496 (*Hind*III→*Xma*I, 2499bp; *Xba*I→*Xba*I, 3822bp).

Sequenziert mit dem Oligonukleotid MF225.

pUMa634

Rrm4-mR1-GFP-Nat-pSK; 10646bp

Plasmid für die Mutationsstudien der RRM-Domänen. Es trägt ein $[\text{nat}^R]$ -Konstrukt, welches für ein in der ersten RRM-Domäne mutiertes Rrm4 mit einer C-terminalen eGfp Fusion kodiert. Es dient der homologen Integration in den endogenen Locus unter der Kontrolle des Wildtyppromotors. Folgende Mutationen wurden in die Aminosäuresequenz von Rrm4 eingeführt: T116A, V117A, E118A und F119A. Kloniert aus pUMa581 (*Xba*I→*Hind*III, 1458bp) und pUMa496 (*Hind*III→*Xma*I, 2499bp; *Xba*I→*Xba*I, 3822bp).

Sequenziert mit dem Oligonukleotid MF630.

**pUMa607**

RRM4-mFIAK-GFP-Nat-pSK; 10655bp

Das Plasmid trägt ein [nat^R]-Konstrukt, welches für ein in der PABC-Domäne mutiertes Rrm4 mit einer C-terminalen eGfp Fusion kodiert. Es dient der homologen Integration in den endogenen Lokus unter der Kontrolle des Wildtyppromotors. Folgende Mutationen wurden in die Aminosäuresequenz von Rrm4 eingeführt: F740A, I743A, A751G und K753A. Kloniert aus pUMa475 (*Bam*HI→*Pst*I, 236bp) und pUMa496 (*Avr*II→*Bam*HI, 2567bp; *Pst*I→*Asc*I, 762bp; *Asc*I→*Avr*II, 7090bp).

Sequenziert mit den Oligonukleotiden MF369 und MF434.

pUMa594

RRM4-mR2-GFP-pACTII-Ade; 12930bp

Dieses Plasmid enthält ein Konstrukt, welches für ein in der zweiten RRM-Domäne mutiertes Rrm4, N-terminal eine Aktivierungsdomäne und C-terminal ein eGfp fusioniert, kodiert. Das Fusionsgen steht unter der Kontrolle eines *ADH*-Promotors. Es trägt zusätzlich ein LEU2 und ADE2 zur Selektion in Hefe. Kloniert aus pUMa427 (*Xho*I→*Rsv*II, 491bp) und pUMa591 (*Rsv*II→*Asc*I, 2591bp; *Asc*I→*Xho*I, 9848bp).

Sequenziert mit den Oligonukleotiden MF808 und MF716.

pUMa591

RRM4-mR12-gfp-pACT-Ade; 12930bp

Dieses Plasmid enthält ein Konstrukt, welches für ein in der ersten und zweiten RRM-Domäne mutiertes Rrm4, N-terminal eine Aktivierungsdomäne und C-terminal eGfp fusioniert, kodiert. Das Fusionsgen steht unter der Kontrolle eines *ADH*-Promotors. Es

trägt zusätzlich ein LEU2 und ADE2 zur Selektion in Hefe. Kloniert aus pUMa427 (*Sal*I→*Asc*I, 2170bp) und pUMa545 (*Nco*I→*Sal*I, 953bp; *Asc*I→*Nco*I, 9807bp).¹⁶

Sequenziert mit den Oligonukleotiden MF808 und MF617.

pUMa581

RRM4-mR1-GFP-pACTIIAde; 12930bp

Dieses Plasmid enthält ein Konstrukt, welches für ein in der ersten RRM-Domäne mutiertes Rrm4, N-terminal an eine Aktivierungsdomäne und C-terminal an eGfp fusioniert, kodiert. Das Fusionsgen steht unter der Kontrolle eines *ADH*-Promotors. Es trägt zusätzlich ein LEU2 und ADE2 zur Selektion in Hefe. Kloniert aus pUMa427 (*Rsv*II→*Asc*I, 2591bp) und pUMa545 (*Xho*I→*Rsv*II, 491bp; *Asc*I→*Xho*I, 9848bp).

Sequenziert mit dem Oligonukleotid MF808.

pUMa545

RRM4-mR123-gfp-pACTIIAde; 12930bp

Dieses Plasmid enthält ein Konstrukt, welches für ein in allen drei RRM-Domänen mutiertes Rrm4, N-terminal an eine Aktivierungsdomäne und C-terminal an *egfp* fusioniert, kodiert. Das Fusionsgen steht unter der Kontrolle eines *ADH*-Promotors. Es trägt zusätzlich ein LEU2 und ADE2 zur Selektion in Hefe. Kloniert aus pUMa427 (*Bam*HI→*Xho*I, 10846bp) und pUMa497 (*Xho*I→*Bam*HI, 2084bp).¹⁶

Sequenziert mit den Oligonukleotiden MF617 und MF808.

16. Kloniert von J. König im Rahmen seiner Diplomarbeit

4.1.4 Plasmide und Plasmidkonstruktionen

**pUMa542**

Kin2Δ-hyg-topo, 8267bp

Dieses Plasmid trägt ein Konstrukt, das der Deletion des *kin2* ORF durch homologe Rekombination dient. Dadurch wird die Region von Nukleotidposition 112321-109284 auf dem Contig 1.149 der Genomsequenz durch eine [hyg^R]- ersetzt (http://www.broad.mit.edu/annotation/fungi/ustilago_maydis/). Das Plasmid entstand durch eine Dreifragmentligation mit einem 990bp großen PCR-Produkt (MF787 und MF788, 5'-flankierender Bereich, MF788 führt eine *Sfi*I-Schnittstelle ein), einem 1470bp großen PCR-Produkt (MF789 und MF790, 3'-flankierender Bereich, MF 789 führt eine *Sfi*I-Schnittstelle ein) und der [hyg^R] aus pBS-hhn (*Sfi*I→*Sfi*I, 1884bp), die in den Vektor pCR[®]2.1-TOPO[®] kloniert wurden.

pUMa526

RRM4-mR3-GFP-pACTII-Ade; 12930bp

Dieses Plasmid enthält ein Konstrukt, das für ein in der dritten RRM-Domäne mutiertes Rrm4, N-terminal an eine Aktivierungsdomäne und C-terminal an eGfp fusioniert, kodiert. Das Fusionsgen steht unter der Kontrolle eines *ADH*-Promotors. Es trägt zusätzlich ein *LEU2* und *ADE2* zur Selektion in Hefe. Kloniert aus pUMa427 (*Nco*I→*Sal*I, 953bp; *Bam*HI→*Asc*I, 998bp) und pUMa497 (*Sal*I→*Bam*HI, 1172bp; *Asc*I→*Nco*I, 9807bp). Sequenziert mit den Oligonukleotiden MF617 und MF808.

**pUMa520**

RRM4-mRFP-nat-KI-pSK, 10605bp

Dieses Plasmid trägt ein Konstrukt, das für ein Rrm4 mit einer C-terminalen mRfp Fusion kodiert und eine [nat^R] trägt. Das Konstrukt kann homolog in den en-

dogenen Locus integriert werden und steht unter der Kontrolle des Wildtyppromotors. Kloniert aus pUMa502 (*Aat*II→*Sfi*I, 6448bp; *Sfi*I→*Sfi*I, 8199bp) und dem Linker aus MF713 und MF784.

pUMa504

RRM4-mR123-GFP-Nat-pSK, 10653 bp

Das Plasmid trägt ein [nat^R]-Konstrukt, welches ein *rrm4*^{mR123}-*egfp* Fusionsgen zur Komplementation der *rrm4* Deletion im endogenen Locus, unter der Kontrolle des Wildtyppromotors, enthält. In das *rrm4*^{mR123} Allel wurden folgende Mutationen der Aminosäuresequenz von Rrm4 eingeführt: T116A, V117A, E118A, F119A (mR1); V202A, L203A, E204A, F205A (mR2); F365A, V366A, S367A, F368A (mR3). Kloniert aus pUMa497 (*Xba*I→*Hind*III, 1458bp) und pUMa496 (*Hind*III→*Xma*I, 2499bp; *Xba*I→*Xma*I, 7779bp; *Xba*I→*Xba*I, 3822bp, dephosphoryliert).

pUMa503

RRM4-2kb-Δpabc-GFP-Nat-pSK, 10353 bp

Das Plasmid trägt ein [nat^R]-Konstrukt, welches ein *rrm4*^{Δpabc}-*egfp* Fusionsgen zur Integration in die *rrm4* Deletionsmutante enthält. Durch eine homologe Rekombination steht das Fusionsgen unter der Kontrolle des Wildtyppromotors. Es wurde der Bereich 689-794As der Aminosäuresequenz von Rrm4 deletiert. Kloniert aus pUMa496 (*Xma*I→*Xba*I, 2876bp) und pUMa457 (*Xba*I→*Xma*I, 7477bp, dephosphoryliert). Im Unterschied zu pUMa457 trägt das Konstrukt eine ~2 kb große Flanke aus der 3'-UTR von *rrm4*.

pUMa502

RRM4-mHRFP-NatKI-pSK, 10718bp

Dieses Plasmid ist ein Vorläufer von pUMa520, hat eine Leserahmenverschiebung am Übergang von *rrm4* zu *mfp*. Darüber hinaus trägt das Plasmid eine [nat^R]. Kloniert aus pUMa485 (*NcoI*→*Bam*HI, 117bp; *Bam*HI→*Nsi*I, 818bp) und pUMa496 (*Nsi*I→*Xma*I, 740bp; *Xma*I→*Xba*I, 2870bp; *Xba*I→*Nco*I, 6173bp, dephosphoryliert).

pUMa497

GST-RRM4-mR123-pGEX, 7321bp

Das Plasmid ist ein pGEX-2T-Derivat mit einem *rrm4* Allel, welches für ein in allen drei RRM-Domänen mutiertes (mR123) und N-terminal an GST fusioniertes Rrm4 kodiert. Kloniert aus pUMa476 (*Nco*I→*Xba*I, 364bp), pUMa493 (*Xba*I→*Bss*HIII, 273bp), pUMa478 (*Bss*HIII→*Eco*RI, 448bp), pUMa479 (*Eco*RI→*Hind*III, 414bp) und pUMa429 (*Hind*III→*Nco*I, 5822bp).

**pUMa496**

RRM4-eGFP-Nat-KnockIn-pSK, 10653 bp

Das Plasmid trägt ein [nat^R]-Konstrukt, welches ein *rrm4-egfp* Fusionsgen für die homologe Rekombination in den endogenen Locus der *rrm4* Deletion enthält. Das Fusionsgen steht somit unter der Kontrolle des *rrm4*-Wildtyppromotors. Kloniert aus pUMa481 (*Cla*I→*Xba*I, 1612bp) und pUMa430 (*Xma*I→*Cla*I, 1258bp; *Xba*I→*Xma*I, 7777bp). Im Unterschied zu pUMa430 trägt das Konstrukt eine ~2 kb große Flanke aus der 3'-UTR von *rrm4*.

pUMa495

RRM4-KO_ORF-hyg-topo; 8549bp



Das Plasmid dient der Deletion des gesamten ORF von *rrm4*, durch die homologe Integration der [hyg^R] in den Locus von *rrm4*. Die Resistenzkassette ersetzt einen 2527bp langen Bereich beginnend 19bp stromaufwärts des ORF (2376bp). Es wird die Region von Nukleotidposition 120525-117997 auf dem Contig 1.112 der Genomsequenz deletiert (http://www.broad.mit.edu/annotation/fungi/ustilago_maydis/).

Kloniert aus pUMa481 (*Sfi*I→*Xba*I, 1995bp), pBS-hhn (*Sfi*I→*Sfi*I, 1884bp) und pUMa491 (*Sfi*I→*Xba*I, 4665bp).

pUMa493

RRM4-B-mut-XbaBss-topo, 4191bp

Zwischenkonstrukt für die Mutation der ersten RRM-Domäne in Rrm4. Ein 280bp großes PCR-Produkt (MF752 und MF764 auf pUMa429 (*Eco*RV verdaut)) kloniert in den Vektor pCR[®]2.1-TOPO[®] Sequenziert mit dem Oligonukleotid TO2r.

pUMa491

RRM4-521LB1kb-topo; 4729bp

Enthält ein 880bp großes Fragment der 3'-UTR von *rrm4* (Nukleotidposition 121334-120525 auf Contig 1.112 der Genomsequenz (http://www.broad.mit.edu/annotation/fungi/ustilago_maydis/)). Kloniert für die Herstellung von Konstrukten zur homologen Rekombination in den endogenen Locus von *rrm4*. Das PCR-Produkt (MF220 und MF803 auf 521-DNA) wurde in pCR[®]2.1-TOPO[®] kloniert. Durch MF803 wurde eine stromabwärts *Sfi*I Schnittstelle eingeführt. Sequenziert mit den Oligonukleotiden TO2f und TO2r.

4.1.4 Plasmide und Plasmidkonstruktionen

pUMa485

UAS9-HismRFP1-nos-hyg, 8193bp

Plasmid mit UARS und [hyg^R]. Es wurde der HIS-Tag aus pHis-mRFP1-pBS entfernt. *mfp* ist in diesem Plasmid von der *UAS9* und dem *nos*-Terminator flankiert. Kloniert aus pSL1180-OMA (*NarI*→*NcoI*, 1484bp), pHis-mRFP1-pBS (*NcoI*→*PstI*, 460bp; *PstI*→*NotI*, 346bp), pOMA-Tc1A (*NotI*→*EcoRI*, 289bp) und pNEBUH (*EcoRI*→*NarI*, 5614bp).

pUMa481

RRM4-FB2_RB2kb(+)-topo; 5861bp

Enthält ein 1948bp großes Fragment der 5'-UTR von *rrm4*. Kloniert für die Herstellung von Konstrukten zur homologen Rekombination. Amplifiziert wurde der Bereich von der Nukleotidposition 117996-116058 auf Contig 1.112 der Genomsequenz (http://www.broad.mit.edu/annotation/fungi/ustilago_maydis/). Das PCR-Produkt (MF804 und MF805 auf FB2-DNA) wurde in pCR[®]2.1-TOPO[®] kloniert. Durch MF804 wurde eine stromaufwärts *SfiI* Schnittstelle eingeführt.

Sequenziert mit den Oligonukleotiden MF756, MF757, MF758, uni1 und rev1.

pUMa479

RRM4-D-EcoHd-TOPO, 4548bp

Ein Zwischenprodukt für die Mutation der dritten RRM-Domäne in *Rrm4*. MF755 führt die entsprechenden Nukleotidaustausche ein. Ein 640bp großes PCR-Produkt (MF755 und MF616 auf pUMa429(*EcoRI* verdaut)) wurde in den Vektor pCR[®]2.1-TOPO[®] kloniert.

Sequenziert mit den Oligonukleotiden TO2f und TO2r.

pUMa478

RRM4-C-BssEco-TOPO, 4366bp

Zwischenkonstrukt zur Herstellung der mutierten RRM-Domänen in *Rrm4*. Ein 450bp großes PCR-Produkt (MF753 und MF754 auf pUMa429(*EcoRV* verdaut)) wurde in den Vektor pCR[®]2.1-TOPO[®] kloniert. Das Amplifikat stellt den Linker zwischen der zweiten und der dritten Mutation dar und besitzt eine *BssHII*-Schnittstelle (MF753) sowie eine *EcoRI*-Schnittstelle (MF754).

Sequenziert mit den Oligonukleotiden TO2f und TO2r.

pUMa476

RRM4-A-NcoXba-TOPO, 4401bp

Zwischenkonstrukt für die Herstellung der mutierten RRM-Domänen in *Rrm4*. MF750 führt die Nukleotidaustausche in der ersten RRM-Domäne ein, und erzeugt stromabwärts der Mutation eine *XbaI*-Schnittstelle durch eine stille Mutation. Es wurde ein ~500bp großes PCR-Produkt (MF45 und MF750 auf pUMa429(*EcoRV* verdaut)) in den Vektor pCR[®]2.1-TOPO[®] kloniert.

Sequenziert mit den Oligonukleotiden TO2f und TO2r.

pUMa475

RRM4-PABC-mFLAK-pLEXA; 10406bp

Das Plasmid trägt ein Konstrukt, das für ein LexA-PABC^{mFLAK} Fusionsprotein kodiert. Die PABC-Domäne ist dabei C-terminal an LexA fusioniert. Kloniert aus pUMa456 (*BamHI*→*BssHII*, 103bp), pUMa455 (*BssHII*→*EcoRI*, 151bp) und pUMa466 (*EcoRI*→*BamHI*, 10152bp)

4.1 Material und Bezugsquellen

pUMa466

RRM4-PABC-pLexA

Dieses Plasmid ist ein Derivat von pLexA und trägt die PABC-Domäne von Rrm4 (As 709-792).

Entstanden aus pUMa429 (*Bam*HI→*Eco*RI, 254bp) und pUMa454 (*Eco*RI→*Bam*HI, 10152bp).

pUMa457

RRM4-Δpabc-GFP-Nat-pSK, 8904bp

Das Plasmid zur homologen Rekombination des *rrm4*^{Δpabc-egfp} Fusionsgens in den endogenen Locus der *rrm4* Deletionsmutante. Das Konstrukt steht danach unter der Kontrolle des Wildtyppromotors und trägt eine [nat^R]. Es wurde der Bereich 689-792As der Aminosäuresequenz von Rrm4 deletiert.

Kloniert aus pUMa430 (*Pst*I→*Xba*I, 3064bp; *Hind*III→*Pst*II, 3064bp; *Xba*I→*Hind*III, 3064bp).

Sequenziert mit dem Oligonukleotid MF369.

pUMa456

RRM4-PABC-FIAA-TOPO

Zwischenkonstrukt zum einführen der Mutationen in die PABC-Domäne. Mutation des Phenylalanins in Alanin und des Isoleucins in Alanin. Ein 650bp großes PCR-Produkt (MF614 und MF737 auf pUMa429 (linearisiert mit *Nco*I) wurde hierzu in den Vektor pCR[®]2.1-TOPO[®] kloniert.

Sequenziert mit den Oligonukleotiden TO2f und TO2r.

pUMa455

RRM4-PABC-AKGA-TOPO

Zwischenkonstrukt zum einführen der Mutationen in die PABC-Domäne. Mutation des Alanins in Glycin und des Lysins in Alanin. Das PCR-Produkt aus MF54 und MF738 (auf pUMa429 (linearisiert mit *Nco*I)) wurde hierzu in den Vektor pCR[®]2.1-TOPO[®]

kloniert.

Sequenziert mit den Oligonukleotiden TO2f und TO2r.

pUMa430

RRM4-gfp-nat-pSK; 9204bp

Plasmid zur Komplementation der *rrm4* Deletion im endogenen Locus durch ein *rrm4-egfp* Fusionsgen. Trägt im Gegensatz zu pUMa417 eine [nat^R].

Entstanden aus pUMa389 (*Sfi*I→*Sfi*I, 2448bp, [nat^R]) und pUMa417 (*Sfi*I→*Sfi*I, 3929bp).

pUMa417

RRM4-GFP-phleo-pSK; 10177bp

Plasmid zur Komplementation der *rrm4* Deletion im endogenen Locus durch ein *rrm4-egfp* Fusionsgen. Trägt im Gegensatz zu pUMa430 eine Phleomycin-Resistenzkassette ([phleo^R]). Entstanden aus pUMa413 (*Acc*65I→*Sal*I, 1908bp) und pUMa414 (*Sal*I→*Bsr*GI, 2152bp; *Bsr*GI→*Acc*65I, 6176bp).

Sequenziert mit den Oligonukleotiden MF225, MF369, MF616, MF617, uni1 und rev1.

pUMa414

RRM4-GFP-3'-pSK; 8349bp

Zwischenkonstrukt für die C-terminale Fusion von Gfp an Rrm4. Das Plasmid wurde aus pUMa391 (*Sal*I→*Sfi*I, 1427bp), pUMa392 (*Bam*HI→*Sfi*I, 578bp), pUMa398 (*Sfi*I→*Sfi*I, 3421bp und 2888bp) und pBlueskript SKII (+) (*Sal*I→*Bam*HI) kloniert.

pUMa413

RRM4-GFP-5'-pSK; 4790bp

Zwischenkonstrukt für die C-terminale Fusion von Gfp an Rrm4. Entstanden aus pUMa391 (*Acc*65I→*Avr*II, 512bp; *Avr*II→*Sal*I, 1396bp) und pBlueskript SKII (+) (*Acc*65I→*Sal*I).

pUMa398

eGFP-nos-SfiC-phleo; 6309bp

Zwischenkonstrukt für die C-terminale Fusion von Gfp an Rrm4. Schritt zur Klonierung der [phleo^R]. Kloniert aus pNEBUP (*NotI*→*NotI*, 2362bp) und pUMa311 (*NotI*→*NotI*, 3946bp).

pUMa392

RRM-GFP-RB-TOPO-rev; 4459bp

Ein 550bp großes PCR-Produkt (MF632 und MF627 auf 521-DNA) wurde in den Vektor pCR[®]2.1-TOPO[®] kloniert. Das Amplifikat enthält die *rrm4* 5'-UTR. Durch MF627 wurde 3' eine *SfiI*-Schnittstelle eingeführt.

pUMa391

RRM4-GFP-LB-TOPO; 7204bp

Zwischenkonstrukt für die C-terminale Fusion von Gfp an Rrm4. Ein 3200bp großes PCR-Produkt (MF220 und MF631 auf 521-DNA) wurde in den Vektor pCR[®]2.1-TOPO[®] kloniert. Das klonierte

Amplifikat besteht aus der 829bp großen 5'-UTR, dem 2377bp großen ORF von *rrm4* sowie zusätzliche 18bp im 3'-Bereich die eine *SfiI*-Schnittstelle anfügen. Sequenziert mit den Oligonukleotiden MF222, MF224, MF225, MF226, MF613, MF614, MF616, MF617, MF618, MF626, TO2f und TO2r.

pUMa389

eGFP-nos-SfiC-nat; 5336bp

Zwischenkonstrukt für die C-terminale Fusion von Gfp an Rrm4, das der Klonierung der [nat^R] an das 3'-Ende des *nos*-Terminators dient. Entstanden aus pUMa311 (*NotI*→*NotI*, 3946bp) und pNEBUN (*NotI*→*NotI*, 1390bp).

pUMa311

eGFP-Asc-nos-SfiF-pBS; 3946bp

Zwischenkonstrukt für die C-terminale Fusion von Gfp an Rrm4. Ein Linker aus MF529 und MF530 kloniert in pUMa209 (*NcoI*→*XhoI*, 3927bp).

Sequenziert mit den Oligonukleotiden uni1 und rev1.

4.2 MIKROBIOLOGISCHE, GENETISCHE UND ZELL-BIOLOGISCHE METHODEN

4.2.1 *Escherichia coli*

Kultivierung

Für die Kultivierung von *E. coli* wurden dYT- und LB-Flüssigmedien und YT-Festmedium verwendet (Ausubel et al., 1987; Sambrook et al., 1989). Medienzusätze wurden, soweit nicht anders vermerkt, in folgenden Konzentrationen eingesetzt: Ampicillin (Amp;

100µg · ml⁻¹), Chloramphenicol (34µg · ml⁻¹), Kanamycin (40µg · ml⁻¹), Tetracyclin (25µg · ml⁻¹) und X-Gal (40µg · ml⁻¹).

E. coli Stämme wurden entweder als Schüttelkulturen bei 200Upm oder auf Festmedien unter aeroben Bedingungen bei 37 °C kultiviert. Übernachtkulturen wurden von YT^{Amp} Festmedien angeimpft.

YT-Festmedium

(Sambrook et al., 1989)

8 g	Trypton
5 g	Hefe-Extrakt
5 g	NaCl
16g	Bacto-Agar (Difco)
ad 1 l	ddH ₂ O

LB-Medium

(Sambrook et al., 1989)

10 g	Trypton
5 g	Hefe-Extrakt
10 g	NaCl
ad 1 l	ddH ₂ O

dYT-Medium

(Sambrook et al., 1989)

16 g	Trypton
10 g	Hefe-Extrakt
5 g	NaCl
ad 1 l	ddH ₂ O

dYT-Glycerin

(Sambrook et al., 1989)

16 g	Trypton
10 g	Hefe-Extrakt
800ml	Glycerin (87 %)
ad 1 l	ddH ₂ O

Bestimmung der Zelldichte

Die Zelldichte von Flüssigkulturen wurde photometrisch in einem Novospec II Photometer (Pharmacia Biotech) bei 600nm bestimmt. Um eine lineare Abhängigkeit sicherzustellen, wurden für die Messung der OD₆₀₀ die Kulturen durch entsprechende Verdünnung auf einen Wert unterhalb von 0,8 verdünnt. Als Nullwert wurde die OD₆₀₀ des jeweiligen Kulturmediums verwendet. $OD_{600} = 1,0$ entspricht etwa 10^9 Zellen \cdot ml⁻¹.

RbCl-Transformation

Dieses Protokoll ist modifiziert nach Cohen et al. (1972). Zur Herstellung transformationskompetenter Bakterienzellen wurden 100ml LB-Medium, dem 10mM MgCl₂ und 10mM MgSO₄ zugesetzt waren, mit 1 ml einer frischen DH5 α -Übernachtskultur angeimpft

und bis zu einer OD₆₀₀ \approx 0,5 bei 37 °C und 200Upm inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation für 15min bei 3000Upm und 4 °C (Heraeus Varifuge 3.0R) pelletiert und in 33ml eiskalter RF1-Lösung resuspendiert. Nach 30-60min Inkubation auf Eis wurden die Zellen erneut abzentrifugiert (15min, 3000Upm, 4 °C, Heraeus Varifuge 3.0R), der Überstand abgenommen, die Zellen in 5 ml eiskalter RF2-Lösung resuspendiert und 15min inkubiert. Die Zellsuspension wurde zu je 100 μ l aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

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

RF1-Lösung

100mM	RbCl
50mM	MnCl ₂ \cdot 4 H ₂ O
30mM	KAc
10mM	CaCl ₂ \cdot 2 H ₂ O
15 %	Glycerin (v/v) in ddH ₂ O

pH7,0 mit HAC einstellen
sterilfiltrieren

RF2-Lösung

10mM	MOPS
10mM	RbCl
75mM	CaCl ₂ \cdot 2 H ₂ O
15 %	Glycerin (v/v)

in ddH₂O

pH5,8 mit NaOH einstellen
sterilfiltrieren

4.2.2 *Ustilago maydis*

Kultivierung

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

Ammonium-Minimalmedium (AM)

(Holliday, 1974)

3 g (NH₄)₂SO₄
62,5 ml Salz-Lösung
ad 980ml ddH₂O
pH7,0 mit NaOH einstellen
autoklavieren

nach dem Autoklavieren:
1 % (f.c.) Glucose-Lösung

Nitrat-Minimalmedium (NM)

(Holliday, 1974)

3 g KNO₃
62,5 ml Salz-Lösung
ad 980ml ddH₂O
pH7,0 mit NaOH einstellen
autoklavieren

nach dem Autoklavieren:
1 % Glucose-Lösung (f.c.)

CM-Vollmedium

(Holliday, 1974; Banuett und Herskowitz, 1989)

1,5 g NH₄NO₃
2,5 g Casaminosäuren
0,5 g DNA
1 g Hefeextrakt
10ml Vitamin-Lösung
62,5 ml Salz-Lösung
ad 980ml ddH₂O
pH7,0 mit NaOH einstellen
autoklavieren

nach dem Autoklavieren:
1 % Glucose-Lösung (f.c.)

Salz-Lösung

(Holliday, 1974)

16 g KH₂PO₄
4 g NaSO₄
8 g KCl
4 g MgSO₄ · 7 H₂O
1,32 g CaCl₂ · 2 H₂O

8 ml Spurenelement-Lösung
ad 1 l ddH₂O
sterilfiltrieren

Vitamin-Lösung

(Holliday, 1974)

100mg Thiamin
50mg Riboflavin
50mg Pyridoxin
200mg Calciumpantothenat
500mg p-Aminobenzoensäure
200mg Nikotinsäure
200mg Cholinchlorid
1000mg Myo-Inositol
ad 1 l ddH₂O
sterilfiltrieren

Spurenelement-Lösung

(Holliday, 1974)

60mg H₃BO₃
140mg MnCl₂ · 4 H₂O
400mg ZnCl₂
400mg NaMoO₄ · 2 H₂O
100mg FeCl₃ · 6 H₂O
400mg CuSO₄ · 5 H₂O
ad 1 l ddH₂O
sterilfiltrieren

PD-Medium

24 g Potato Dextrose Broth
ad 1 l ddH₂O

Aktivkohlehaltiges PD-Medium (PD-CC)

24 g Potato Dextrose Broth
10 g Aktivkohle
20 g Bacto-Agar
ad 1 l ddH₂O

YEPS_{light}-Medium

modifiziert nach Tsukuda et al. (1988):

10 g Yeast Extract
10 g Pepton
10 g Saccharose
ad 1 l ddH₂O

Für Festmedien wurde Bacto-Agar in einer Endkonzentration von 2 % zugegeben. Medienzusätze wurden, soweit nicht anders vermerkt, in folgenden Konzentrationen eingesetzt: Carboxin ($2 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$), CloNAT ($150 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$), Hygromycin ($200 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) und Phleomycin ($40 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$). Im Fall der Selektion mit Phleomycin musste zusätzlich TRIS-Cl pH8,0 in einer Endkonzentration von 100mM zugesetzt werden, da sonst das Antibiotikum wegen der Ansäuerung des Mediums durch *U. maydis* inaktiviert wird.

Bestimmung der Zelldichte

Die Zelldichte von Flüssigkulturen wurde photometrisch in einem Novospec II Photometer (Pharmacia Biotech) bei 600nm bestimmt. Um eine lineare Abhängigkeit sicherzustellen, wurden für die Messung der OD_{600} die Kulturen durch entsprechende Verdünnung auf einen Wert unterhalb von 0,8 verdünnt. Als Nullwert wurde die OD_{600} des jeweiligen Kulturmediums verwendet. $\text{OD}_{600} = 1,0$ entspricht etwa $1 \cdot 10^7$ Zellen $\cdot \text{ml}^{-1}$.

Induktion des regulierbaren *nar1*

Promotors

Die Stämme wurden aus Vorkulturen in Flüssigmedium angeimpft das repräsentierende Bedingungen bot (NH_4^+ als einzige Stickstoffquelle (AM- oder CM-Medium)) und bis zu $\text{OD}_{600} = 0,5$ bei 28 °C und 200Upm inkubiert. Die Zellen wurden in PP-Röhrchen überführt, abzentrifugiert (3000Upm, 5 min, RT, Biofuge Stratos). Anschließend wurden die Zellen im gleichen Volumen frischen Mediums mit den induzierenden Bedingungen resuspendiert, in Schikanekolben überführt und für die gewünschte Zeit bei 28 °C inkubiert. Induzierende Bedingungen sind NO_3^- als einzige Stickstoffquelle.

Transformation

Dieses Protokoll ist modifiziert nach Schulz et al. (1990) und Gillissen et al. (1992). Von einer auf Platte wachsenden Kultur wurde eine 4 ml $\text{YEPS}_{\text{light}}$ -Flüssigkultur angesetzt und für 8-10 h bei 28 °C geschüttelt. Diese Vorkultur wurde anschließend 1:400 in 50 ml frischem $\text{YEPS}_{\text{light}}$ -Medium verdünnt und bei 28 °C bis zu einer Zelldichte von $1 \cdot 10^7$ Zellen $\cdot \text{ml}^{-1}$ (bis maximal $\text{OD}_{600} = 0,9$) geschüttelt. Nach Erreichen des optimalen Zelltiters wurden die Zellen durch Zentrifugieren (3500Upm, 5 min, RT, Heraeus Varifuge 3.0R) geerntet, einmal mit 25ml SCS gewaschen und in 2 ml SCS mit $2,5 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ Novozym resuspendiert. Die in diesem Puffer bei Raumtemperatur ablaufende Protoplastierung kann mikroskopisch verfolgt werden, da die zigarrenförmigen Zellen nach Lyse der Zellwand eine kugelige Form einnehmen. Nach vollständiger Protoplastierung (5-15min) wurden 10ml eiskaltes SCS zugegeben und die Protoplasten durch fünfminütiges Zentrifugieren bei 2400Upm (4 °C, Heraeus Varifuge 3.0R) pelletiert. Um das Novozym vollständig zu entfernen, wurde dieser Waschgang dreimal wiederholt. Anschließend wurde mit 10ml eiskaltem STC gewaschen und das Pellet danach in einem Volumen von 0,5 ml eiskaltem STC aufgenommen. Die so behandelten Protoplasten können 3-4 h auf Eis oder aliquotiert bei -80 °C mehrere Monate aufbewahrt werden.

Zur integrativen Transformation wurden 50µl Protoplasten mit 1-5 µl linearisierter Plasmid-DNA (ca. 5 µg) und 1 µl Heparin-Lösung für 10min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 0,5 ml STC/PEG folgte eine weitere Inkubation von 15min auf Eis. Anschließend wurde der gesamte Transformationsansatz auf einer kurz zuvor mit Top-Agar überschichteten Regenerationsagarplatte ausgestrichen. Nach zwei bis fünf Tagen Inkubation bei 28 °C wurden die gewachsenen Kolonien mit sterilen Zahnstochern auf antibiotikumhalti-

gen CM-Platten, vereinzelt. Potenzielle Transformanten wurden mittels Ganzzell-PCR vorselektiert und abschließend durch Southern-Analyse verifiziert

0,4 % Saccharose (w/v)
0,4 % Pepton (w/v)
1 % Hefe-Extrakt (w/v)
in ddH₂O

b) Bottom-Agar

wie a), zusätzlich doppelt
konzentriertes Antibiotikum

SCS

20mM Na-Citrat (pH5,8)
1 M Sorbitol
in ddH₂O
sterilfiltrieren

STC

10mM Tris-Cl (pH7,5)
100mM CaCl₂
1 M Sorbitol
in ddH₂O
sterilfiltrieren

STC/PEG

15ml STC
10 g PEG4000

Regenerationsagar

(Schulz et al., 1990)
a) Top-Agar

1,5 % Bacto-Agar (w/v)
1 M Sorbitol

Herstellung der Deletionsstämme

Die Stämme wurden mit Hilfe eines PCR-gestützten Methode erzeugt (Brachmann et al., 2004; Kämper, 2004). Dafür wurden für jedes Deletionskonstrukt acht Oligonukleotide entworfen: u1, u2 und u3 (für die stromaufwärtsgelegene flankierende Sequenz), d1, d2 und d3 (für die stromabwärtsgelegene flankierende Sequenz) sowie p1 und p2 (für diagnostische Zwecke) (Brachmann et al., 2004) (siehe Abb. 4-1, Tabelle 4-5 und Tabelle 4-1). Mit den Oligonukleotiden u2 und u3 bzw. d1 und d2 werden die flankierenden Bereiche (~1 kb) der zu deletierenden Region mit der genomischen Matrizen-DNA des Stamms 521 amplifiziert (Abb. 4-1 Spur 1 und 2). u3 bzw. d1 führen die *Sfi*_(u) bzw. *Sfi*_(d) Restriktionsschnittstelle am 3'- bzw.

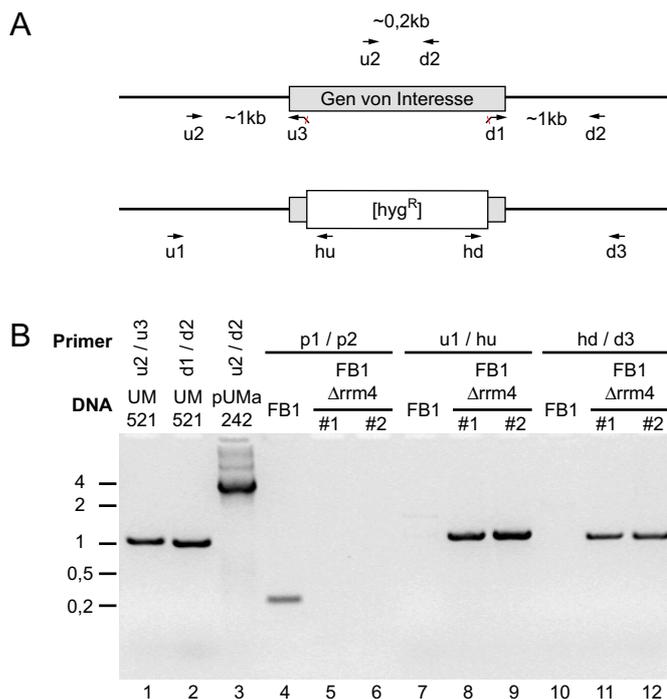


ABB. 4-1 Strategie zum Erzeugen von Gen-deletionsmutanten

(A) Schematische Darstellung eines Lokus, mit dem Gen von Interesse vor (oben) und nach (unten) der homologen Rekombination der Hygromycin-Resistenzkassette ([hyg^R]). Die beschrifteten Pfeile geben Position und Typ der verwendeten Oligonukleotide an. Die Positionen der stromaufwärts (in 'u3') bzw. stromabwärts (in 'd1') *Sfi* Schnittstellen sind als rote Linien dargestellt. (B) Die Bestätigung der homologen Rekombinationen fand mittels diagnostischer PCR statt, gezeigt am Beispiel der Stämme FB1Δrrm4 #1 und #2. Die Kombinationen der Oligonukleotide und der Matrizen-DNA sind über dem Bild angegeben. 'u1' und 'd3' liegen außerhalb des rekombinierten Bereichs. Die PCR-Produkte wurden über ein 1,5%iges Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt. Die Größenmarkierungen sind links in Kilobasen angegeben.

5'-Ende des PCR-Produkts ein. Die amplifizierten Fragmente wurden mit *Sfi*I verdaut und in Anwesenheit eines ~1,8 kb großen *Sfi*I_(u)/*Sfi*I_(d) [*hyg*^R]-Fragments ligiert (Kämper, 2004). Die gelgereinigten Ligationsprodukte wurden in den Vektor pCR[®]2.1-TOPO[®] kloniert. Die erhaltenen Plasmide wurden als Matrize zur PCR-Amplifikation mit den Oligonukleotiden u2 und d2 verwendet (Abb. 4-1 Spur 3) und das Produkt anschließend in die Wildtypstämme FB1 und FB2 transformiert. Die hygromycinresistenten Kolonien wurden in einer Ganz-Zell-PCR mit den Oligonukleotiden p1 und p2 untersucht. Die Amplifikation eines ~200bp großen Produkts zeigte die Anwesenheit des Wildtyp Allels an und deutete auf eine nicht homologe Integration der [*hyg*^R] hin. Konnte das diagnostische PCR-Produkt nicht amplifiziert werden (Abb. 4-1 Spur 5 und 6), wurden die Stämme weiter untersucht: Die homologe Rekombination des Deletionskonstrukts wurde durch die Amplifikation des stromabwärts- und des stromaufwärtsflankierenden Bereichs verifiziert. Dabei wurden die Oligonukleotide u1 und d3, die außerhalb des deletierten Bereichs liegen, sowie hu und hd, die in der [*hyg*^R] liegen, verwendet. Mit u1 und hu bzw. hd und d3 lassen sich bei erfolgreicher homologer Deletion zwei ~1 kb große Produkte amplifizieren (Abb. 4-1 Spur 7-9 bzw. Spur 10-12).

Wachstumstest auf CM- und NM-Platten

Die zu testenden Stämme wurden übernachtet bei 28 °C auf einem Schüttler (200Upm) in CM-Glucose bis zu einer OD₆₀₀ = 0,8 angezogen. Mit einer Neubauer-Zählkammer wurde die Zelldichte bestimmt. Ein Aliquot wurde pelletiert (3500Upm, RT, 5 min) und die Zelldichte auf 10⁶ Zellen · ml⁻¹ mit ddH₂O eingestellt. 2 µl der schrittweise 1:5-verdünnten Zellsuspension wurden auf CM- bzw. NM-Platten getropft und für

zwei bis fünf Tage bei 15, 28 und 34 °C inkubiert. Die Koloniepigmentierung, -morphologie und das Koloniewachstum wurde visuell analysiert.

Quantifizierung der Antwort auf externes cAMP

Es wurden 1 ml der zu testenden Stämme übernachtet in einem 2 ml Reaktionsgefäß (verschlossen mit Lid_{Bac} (Eppendorf)) bei 28 °C in CM-Vollmedium auf einem Thermomixer compact (Eppendorf) bei 1100Upm angezogen. Es wurden jeweils 2 µl der Zellsuspension (stationäre Phase) in 1 ml 15mM cAMP-enthaltendes bzw. 1 ml cAMP-freies CM-Medium überimpft und für 18 Stunden bei 28 °C auf einem Thermomixer compact (Eppendorf) bei 1100Upm inkubiert. Die prozentuale Häufigkeit der Zellaggregate mit mehr als zwei Zellen wurde dann mit einer Neubauer Zählkammer bestimmt.

Pheromonstimulation in Flüssigkultur

Die zu testenden Stämme wurden in CM-Flüssigmedium bis zu einer OD₆₀₀ = 0,8 angezogen. Jeweils 500µl Kultur wurde in ein Eppendorf-Gefäß überführt und kompatibles Pheromon in DMSO in einer Endkonzentration von 1 µg · ml⁻¹ oder nur DMSO zugeben. Wenn nicht anders beschrieben wurden die Ansätze bei 20 °C auf einem Drehrad oder horizontal schüttelnd bei 200Upm für 6-8 h inkubiert.

Konfrontationstest

Diese Methode ist in Snetselaar et al. (1996) näher beschrieben. Die zu testenden Stämme wurden bei 20 °C bzw. 28 °C mit 200Upm bis zu einer OD₆₀₀ = 0,8 angezogen. Die Zellen wurden pelletiert (Heraeus Biofuge) und bis zu einer OD₆₀₀ = 5 in ddH₂O resuspendiert. Objektträger wurden mit 2%igem Wasseragar in einer Höhe von ca. 2 mm

beschichtet und je 0,5 µl der Zellsuspension in einer Reihe auf den Objektträger getropft. Nach Eintrocknung der ersten Reihe wurde der zweite Stamm in einer zweiten Reihe mit einem Abstand von 100-200µm getropft. Nachdem die zweite Reihe eingetrocknet war, wurde über die Tropfen 3 µl Paraffinöl getropft. Die Objektträger wurden in einer feuchten Kammer bei 28 °C für 12-14h inkubiert und anschließend mikroskopisch analysiert.

Test auf Paarungskompetenz, Pheromonproduktion und filamentöses Wachstum

U. maydis Stämme wurden in CM-Flüssigmedium über Nacht bis zu einer $OD_{600} = 1$ angezogen. Die Zellen wurden geerntet (Zentrifugation bei 3500Upm für 5 min bei RT in einer Heraeus Biofuge), zweimal in ddH₂O gewaschen und anschließend so in ddH₂O aufgenommen, dass in etwa eine Zelldichte von $OD_{600} = 5$ erreicht wurde. Bei Kreuzungen wurden gleiche Volumina der jeweiligen Kreuzungspartner in einem Eppendorf-Gefäß miteinander gemischt. Von diesen Ansätzen wurden 3-5 µl auf eine PD-CC-Platte getropft und wenn nicht anders beschrieben für 24-48h bei 22 °C inkubiert.

Test auf Pathogenität

Als Pathogenitätstest wurde eine Spritzinfektion verwendet, bei der 200-250µl einer Pilzsuspension in das Innere des Blattwirtels von sieben Tage alten Maispflanzen gespritzt wurden. Die Stämme wurden vorher über Nacht in YEPS_{light}-Flüssigkultur bis zu einer $OD_{600} = 0,8-1$ angezogen. Die Zellen wurden dann durch Zentrifugieren (3500Upm, 10min, Heraeus Biofuge) pelletiert und in ddH₂O zu einer $OD_{600} = 2,0$ aufgenommen. Bei Mischungen wurden diese vor der Infektion im Verhältnis 1:1 gemischt. Etwa 14 Tage nach Infektion erfolgte die Bonitur. Im Fall der *rrm4* Deletionsmutanten wurde eine detailliertere Bewertung der Symptomatik etabliert (modifiziert nach Gold et al., 1997). Es die Krankheitssymptome wurden in folgende Klassen gruppiert: (1) kein Tumor, (2) schwache Krankheitssymptome an den Blättern (Tumorbereiche nicht länger als 1,5 cm im Durchmesser und die Anzahl der Tumore übersteigt den Grenzwert von 20 nicht), (3) starke Krankheitssymptome an den Blättern (Tumorbereiche sind länger als 1,5 cm im Durchmesser und die Anzahl der Tumore übersteigt den Grenzwert von 20), (4) schwache Krankheitssymptome am Stengel (Tumorbereiche nicht länger als 4 cm im Durchmesser und nicht höher als 0,6 cm), (5) starke Krankheitssymptome am Stengel (Tumorbereiche länger als 4 cm im Durchmesser und höher als 0,6 cm) und (6) welke oder tote Pflanzen.

4.2.3 Fixierung und Anfärbung von Zellen

Fixierung von Zellen

Zellen wurden durch Zugabe von 16%iger Formaldehyd-Lösung (EM-Grade, Polyscience) bis zu einer Endkonzentration von 3 % direkt zum Medium fixiert. Nach 30min Inkubation auf einem Drehrad (Eppendorf) wurden die Zellen pelletiert (3000Upm, 1 min,

RT, Heraeus Biofuge), zweimal mit PBS gewaschen, in PBS aufgenommen und bis zur weiteren Bearbeitung bei 4 °C gelagert. Filamentöse Zellen erforderten zur Pelletierung längere Zentrifugation bei höheren Drehzahlen

PBS

7,9 mM	Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O
14,5 mM	KH ₂ PO ₄
137 mM	NaCl
0,5 mM	MgCl ₂
2,7 mM	KCl
	in ddH ₂ O

Kernfärbung mit DAPI

Die Zellen wurden mit Formaldehyd fixiert (siehe oben). Der Objektträger wurde mit einer dünnen Schicht 1%iger Wasseragarose beschichtet, darauf wur-

den dann 0,2 µl der Zellsuspension pipettiert. Nachdem der Tropfen vollständig getrocknet war, wurde er mit 5-10 µl VECTASHIELD[®] Mounting Medium with DAPI (Linaris Biologische Produkte GmbH, Wertheim) überschichtet und mit einem Deckglas abgedeckt.

4.2.4 Mikroskopie und Bildverarbeitung

Für die Beobachtung von *U. maydis*-Zellen in vivo wurden 2 µl einer logarithmisch wachsenden Kultur auf einem Objektträger mit dem gleichen Volumen vorgewärmter 2%iger Low-Melt-Agarose vermischt und sofort mit einem Zeiss Axiophot Mikroskop betrachtet. Für DIC-Mikroskopie und Fluoreszenz-Mikroskopie wurde ein 100faches Plan-Apochromat Objektiv (Zeiss) verwendet. Für die Fluoreszenz-Mikroskopie wurden Filter mit folgendem Anregungs- und Emissionsspektrum eingesetzt: DAPI-Färbung, 365nm und >397nm; Rfp, 565nm und 620nm; Gfp; 450-490nm und 515-565nm. Bilder wurden mit einer gekühlten CCD-Kamera (CoolSNAP-HQ, Photometrics) bzw. mit einer AxioCam HRm (Zeiss) aufgenommen. Die CoolSnap-HQ wurde mit dem Programm MetaMorph (Universal Imaging) gesteuert. Nachbearbeitung der Aufnahmen (Bildausschnitt, Kontrastverstärkung, Einfärbung, Maßstabskalierung) erfolgte mit MetaMorph und Photoshop 6.0 (Adobe) oder Photoshop CS (Adobe). Die Zusammenstellung und Bearbeitung der Abbildungen wurden mit Photoshop 6.0 und Photoshop CS sowie Illustrator CS (Adobe) durchgeführt. Berechnungen und statistische Analysen erfolgten mit Excel (Microsoft) und Origin (Microcal).

Längenbestimmung der Spitzenzelle

Die Längenbestimmung der Spitzenzelle erfolgte zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Induktion des filamentösen Wachstums. Dazu wurden anhand von Übersichtsbildern die fixierten Zellen (siehe „Fixierung von Zellen“, S. 97) mit MetaMorph vermessen. Für die Evaluation der Messwerte wurden nur solche Werte berücksichtigt, die größer als der Median waren. Der Median stellt den Wert dar, der eine Verteilung in zwei gleich große Teile teilt.

Geschwindigkeitsbestimmung der Rrm4-Partikel

Die Geschwindigkeit der Rrm4 Partikel wurde anhand von Bildsequenzen bestimmt. Hierfür wurde die Distanz bestimmt die ein Partikel zwischen zwei Bildern zurückgelegt hat. Die Zeit zwischen zwei Bildern in einer Bildsequenz ist abhängig von der Belichtungszeit und wird von MetaMorph mit der Bildsequenzdatei bereitgestellt.

4.3 MOLEKULARBIOLOGISCHE STANDARDMETHODEN

4.3.1 Isolierung von Nukleinsäuren

Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Isolierung erfolgte durch Lyse durch Kochen nach Sambrook et al. (1989). Hierzu wurden *E. coli* Zellen in 1 ml dYT^{Amp}-Medium übernacht bei 37 °C in einem 2 ml-Reaktionsgefäß auf einem Thermomixer compact (Eppendorf) inkubiert. Die Übernachtskultur wurde mit einer Biofuge (Heraeus) bei 14000U_{pm} (5 min, RT) pelletiert. Das Zellpellet wurde in 200µl STET-Puffer resuspendiert, nach Zugabe von 20µl Lysozym-Lösung kräftig geschüttelt und anschließend 60sec bei 95 °C in einem Thermomixer compact (Eppendorf) inkubiert. Die lysierten Zellen und die denaturierte genomische DNA wurden 10min bei 14000U_{pm} pelletiert (Heraeus Biofuge) und danach mit einem sterilen Zahnstocher aus der wässrigen Lösung entfernt. Die Reinigung der Plasmid-DNA erfolgte durch Fällung mit 20µl 3 M NaAc (pH5,3) und 500µl 2-Propanol bei RT für 5 min und anschließender Zentrifugation für 5 min bei 14000U_{pm} (Heraeus Biofuge). Das Pellet wurde mit 200µl 70%igem Ethanol gewaschen und nach Trocknen (10min, 37 °C) in 100µl TE-Puffer mit 20µg · ml⁻¹ RNase A aufgenommen.

Je nach benötigter Menge wurde auch das „Plasmid Midi Kit“ (Qiagen) verwendet.

STET-Puffer

0,1 M	NaCl
10mM	Tris-HCl (pH8,0)
1 mM	EDTA
5 %	Triton X-100 (v/v) in ddH ₂ O

TE-Puffer

10mM	Tris-HCl (pH7,9)
1 mM	Na ₂ -EDTA in ddH ₂ O

Lysozym-Lösung

10 mg · ml⁻¹ Lysozym in TE

DNA-Isolierung aus *U. maydis*

Diese Methode ist modifiziert nach Hoffman und Winston (1987). Dabei wurden 3 ml einer Übernachtskultur in YEPS_{light}-Flüssigmedium zusammen mit 0,3 g Glasperlen in einem 2 ml-Reaktionsgefäß pelletiert (13000U_{pm}, 2 min, RT, Heraeus Biofuge), der Überstand abgegossen und das Pellet in 500µl Lysispuffer und 500µl TE-Phenol/Chloroform aufgenommen. Die Proben wurden 6-10min auf einem Vibrax-VXR Schüttler (IKA) geschüttelt. Nach Phasentrennung (13000U_{pm}, 15min, RT, Heraeus Biofuge) wurden 400µl des Überstands in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und mit 1 ml Ethanol gefällt. Nach erneuter Zentrifugation (13000U_{pm}, 1 min, RT, Heraeus Biofuge) wurde das Pellet in 50µl TE mit 20µg · ml⁻¹ RNase A aufgenommen, bei 50 °C resuspendiert und bei 4 °C aufbewahrt.

Lysispuffer

50mM	Tris-Cl (pH 7,5)
50mM	Na ₂ -EDTA
1 %	SDS (w/v) in ddH ₂ O

TE-Phenol/Chloroform

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

4.3.2 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde photometrisch bestimmt. Bei einer Schichtdicke von 1 cm entspricht $OD_{260} = 1$ einer Konzentration von $50\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ doppelsträngiger DNA, $33\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ einzelsträngiger DNA, bzw. $40\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ RNA. Als Maß für die Reinheit der Desoxyribonukleinsäuren diente der Quo-

tient aus $OD_{260}:OD_{280}$. Für reine DNA und RNA sollte er bei etwa 1,8 liegen. Niedrigere Werte weisen auf Verunreinigungen mit Proteinen hin, höhere Werte auf Verunreinigungen mit Salzen oder Zuckern. Die Messungen erfolgten in einem Lambda Bio UV-Spektrophotometer (Perkin Elmer).

4.3.3 Modifikation von Nukleinsäuren in vitro

Restriktionsspaltungen

Die Restriktion doppelsträngiger DNA erfolgte mit Typ II-Restriktionsendonukleasen unter den vom Hersteller empfohlenen Pufferbedingungen. Ein durchschnittlicher analytischer Ansatz enthielt:

0,5 μg	DNA
10 μg	BSA, optional
0,5 U	Restriktionsenzym
2 μl	Reaktionspuffer (10fach)
ad 20 μl	ddH ₂ O

Nach Inkubation für 2 h bei 37 °C (bzw. einer anderen für das jeweilige Enzym optimalen Temperatur) wurden dem Ansatz 2 μl 10fach konzentrierter nativer Auftragspuffer zugesetzt und die Reaktionsprodukte auf Agarosegelen analysiert.

Dephosphorylierung von 5'- und 3'-Enden von DNA-Molekülen

Um das Risiko einer Religation zu verringern, wurden linearisierte Vektoren mit selbst-kompatiblen Überhängen vor der weiteren Verwendung dephosphoryliert. Dem Restriktionsansatz zur Gewinnung des Vektorfragments wurden nach ausreichender Inkubation des Restriktionsenzym folgende Komponenten zugesetzt

20 μl	Restriktionsansatz
5 μl	Reaktionspuffer (10fach)
3 U	Alkalische Phosphatase
ad 50 μl	ddH ₂ O

Nach 20min Inkubation auf einem Heizblock bei 37 °C wurde nochmals 1-2 U der Alkalischen Phosphatase zugegeben und der Ansatz für weitere 30min bei 50 °C inkubiert. Anschließend wurde ein einmaliger Phenol/Chloroform-Reinigungsschritt durchgeführt, die resultierende wässrige Phase direkt mit nativem DNA Auftragspuffer versetzt und auf einem TBE-Agarosegel aufgetrennt, aus dem das Fragment abschließend extrahiert wurde.

DNA-Fällung

Zur Anreicherung von DNA in einer Lösung oder zum Wechseln des Puffers wurde DNA gefällt. Zu der DNA-Lösung wurden 0,1 Volumen 3 M NaAc (pH4,8) und 2,5 Volumen Ethanol gegeben. Es wurde durch Invertieren gründlich gemischt und für 15min inkubiert. Die gefällte DNA wurde abzentrifugiert (15-30min, 12000Upm, 4 °C, Heraeus Biofuge), der Überstand verworfen und der Niederschlag mit 70%igem Ethanol gewaschen. Der leicht getrocknete DNA-Niederschlag konnte dann im gewünschten Puffer und Volumen aufgenommen werden. Zur Erleichterung des Lösens konnte optional auf 55 °C erwärmt werden.

Auftrennung von Nukleinsäuren im Agarosegel

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten wurden neutrale Gele aus Agarose verwendet. Sie erlaubten eine Trennung von Fragmenten mit einer Länge von 70bp bis zu einer Größe von 50kb Länge, wobei die Auflösung je nach Agarose-Konzentration etwa 0,5 % der Fragmentgröße betragen kann. Als Laufpuffer und als Lösungsmittel für die Agarose wurde 1x TAE oder 0,5x TBE verwendet. Die DNA-Lösung wurde vor dem Auftragen mit 0,2 Volumen Auftragspuffer versetzt. Die Gelelektrophorese wurde bei analytischen TBE-Gelen mit bis zu 150V und bei präparativen TAE-Gelen mit nicht mehr als 80V durchgeführt. Die Färbung der DNA mit Ethidiumbromid erfolgte während der Elektrophorese durch den dem Gel zugesetzten Farbstoff. Manche Anwendungen machten eine Zugabe von 10µl Ethidiumbromid-Lösung (Roth) zum Laufpuffer nötig. Die DNA-Banden wurden auf dem UV-Tisch durch Fluoreszenz des interkalierten Ethidiumbromids sichtbar. Als Marker wurde mit *Pst*I oder *Bst*EII restringierte DNA oder die 1 kb- bzw. 2log-Leiter (New England Biolabs) verwendet.

Auftragspuffer (6x)

50 %	Saccharose (w/v)
0,25 %	Bromphenolblau (w/v)
10mM	Tris-HCl (pH7,9)
1 mM	Na ₂ -EDTA in ddH ₂ O

TBE-Puffer (0,5x)

50mM	Tris-Borat (pH7,9)
1 mM	Na ₂ -EDTA in ddH ₂ O

TAE-Puffer (1x)

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

Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die entsprechende Bande wurde auf dem UV-Tisch mit dem Skalpell markiert. Es war darauf zu achten, dass eine niedrige Strahlungsintensität eingestellt war und die Dauer der Bestrahlung der DNA möglichst kurz gehalten wurde. Die Bande wurde dann in einem möglichst geringen Agarose-Volumen ausgeschnitten und in eine von unten gekürzte 20-200µl-Pipettenspitze mit Filtereinsatz (STARLab) überführt. Dann wurde die Spitze in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß gesetzt und 5 min bei 8000U_{pm} zentrifugiert. Das Filtrat wurde mit 0,1 Volumen 3 M NaAc und 2,5 Volumen Ethanol versetzt und optional 30min bei -20 °C inkubiert. Die DNA wurde sodann pelletiert (20000U_{pm}, 30min, 4 °C, Biofuge), mit 500µl 70%igem Ethanol gewaschen und in 10mM Tris-HCl (pH8,0) aufgenommen. Um das Lösen der DNA zu beschleunigen und DNasen zu inaktivieren, wurde 20min bei 55 °C und 700U_{pm} in einem Thermomixer compact (Eppendorf) inkubiert.

Alternativ wurde auch das JETsorb-Kit (Genomed) zur Extraktion von PCR-Fragmenten aus Agarosegelen verwendet.

Ligation von DNA-Fragmenten

Einfache Ligationsansätze wurden mit der Quick-DNA-Ligase nach dem vom Hersteller empfohlenen Protokoll durchgeführt. Dabei wurden Vektor und Fragment (nach Möglichkeit in ungefähr fünffachem molaren Überschuß) mit einem Gesamtvolumen von 10µl zu einer gleichen Menge Ligationpuffer gegeben, mit 1 µl des Enzyms vermischt und 5-30min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluß konnte der Ansatz direkt in kompetente *E. coli*-Zellen (siehe "RbCl-Transformation" auf Seite 92) transformiert werden.

Bei anspruchsvolleren Ligationen, z. B. durch den Einsatz von zwei oder mehr Fragmenten, erfolgte die kovalente Verknüpfung mit Hilfe der T4 DNA-Ligase. Auch hier wurden die zu klonierenden Fragmente in der Regel in fünffachem molaren Überschuss gegenüber der linearisierten und gegebenenfalls dephosphorylierten Vektor-DNA eingesetzt. Ein typischer Reaktionsansatz enthielt:

100ng	Vektor-DNA
	lineare Insertionsfragmente
	(in 5fach molaren Überschuß)
1 U	T4 DNA-Ligase
2 µl	Ligase-Puffer (10fach)
ad 20µl	ddH ₂ O

Der Ansatz wurde entweder 2 h bei Raumtemperatur oder über Nacht in einem Wasserbad (16 °C) inkubiert. Um die Häufigkeit von Religationseignissen abzuschätzen, wurde stets parallel eine sogenannte Vektor-kontrolle, d.h. ein lediglich Vektor-DNA enthaltender Ansatz, durchgeführt. Das Verhältnis der resultierenden Klone aus Ligations- und Kontrollansatz gibt einen Hinweis auf den zu erwartenden Anteil an korrekten Klonierungsergebnissen.

4.3.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Methode der Polymerase-Kettenreaktion beruht auf dem natürlichen Vervielfältigungsmechanismus der DNA. Damit können bestimmte DNA-Segmente, deren benachbarte Sequenzen bekannt sind, spezifisch amplifiziert werden. Gegen diese beiden Regionen werden komplementäre Oligonukleotide eingesetzt. Als DNA-Polymerase werden die hitzebeständige Taq-DNA-Polymerase oder eine Herculase (Stratagene) verwendet. Die Polymerase-Kettenreaktion fand vielfältige Anwendung in dieser Arbeit. Sie ist eine sehr sensitive Nachweismethode für spezifische DNA-Sequenzen und eignet sich daher zum Durchmustern transformierter Organismen ebenso, wie für die Detektion heterologer Sequenzen mit übereinstimmenden flankierenden Bereichen. Sie wurde benutzt, um Fragmente für die Klonierung mit den entsprechenden Restriktionsschnittstellen bereitzustellen. Dafür wurden Oligonukleotide verwendet, die im 5'-Bereich nicht vollständig mit der Vorlagen-DNA übereinstimmten, sondern die Erkennungssequenz einer bestimmten Restriktionseendonuklease enthielten.

Standard-PCR-Ansätze

Ein typischer PCR-Ansatz (Innis et al., 1990) enthielt etwa 10ng Matrizen-DNA, 1 µM (f.c.) Oligonukleotide, jeweils 125 nM (f.c.) der dNTPs und 1x PCR-Puffer. Ein PCR-Ansatz mit Herculase enthielt etwa 10ng Matrizen-DNA, 1 µM (f.c.) Oligonukleotide, jeweils 125 nM (f.c.) dNTPs, 33 % (v/v) DMSO und 1x Herculase-Reaktions-Puffer (Stratagene). Standardmäßig wurden die Reaktionen in einem Volumen von 50µl durchgeführt, zur Vermeidung von Kontaminationen wurden Pipettenspitzen mit Filtereinsatz benutzt. Für einen 50µl Ansatz empfiehlt es sich, 2 U der Taq-Polymerase bzw. 2,5 U der Herculase einzusetzen. Die Taq-Polymerase sollte erst nach dem initialen Denaturierungsschritt (1-2 min, 94 °C) zugegeben werden. Die Herculase erforderte einen initialen 94 °C Schritt zur Aktivierung der Polymeraseaktivität. Die Reaktion erfolgte im Thermocycler (PTC 200, MJ Research). Es wurden in der Regel zwei Standardprogramme verwendet: JS30 wurde für Taq-Ansätze, Herc4 für Herculase-Ansätze verwendet.

Standardprogramm I (JS30)

	Temp [°C]	Zeit [sec]	
Hot/D	94	300	← nach 1-2 min Taq
D	94	30	34x
H	65*	60	
V	72	60*	
V	72	600	
K	18	∞	

Hot: Heißstartschritt; D: Denaturierungsschritt;
 H: Hybridisierungsschritt; V: Verlängerungsschritt

* Je nach verwendeten Oligonukleotiden oder Länge des Amplifikats wurde die Hybridisierungstemperatur bzw. die Verlängerungszeit entsprechend angepasst.

Standardprogramm II (Herc4)

	Temp [°C]	Zeit [sec]	
Akt/Hot	94	600	
D	94	30	34x
H	65*	60	
V	72	60*	
V	72	600	
K	18	∞	

Hot: Heißstartschritt; Akt: Aktivierungsschritt;
 D: Denaturierungsschritt; H: Hybridisierungsschritt;
 V: Verlängerungsschritt

* Je nach verwendeten Oligonukleotiden oder Länge des Amplifikats wurde die Hybridisierungstemperatur bzw. die Verlängerungszeit entsprechend angepasst.

dNTP mix

25mM	dATP
25mM	dCTP
25mM	dGTP
25mM	dTTP
	in ddH ₂ O

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

500mM	KCl
100mM	Tris-HCl (pH8,3)
15mM	MgCl ₂
	in ddH ₂ O

Ganzzell-PCR aus *U. maydis*

Zur einfachen Überprüfung von Transformanten kann man eine PCR direkt aus *U. maydis* Zellen durchführen. Dabei wurden Einzelkolonien in 100µl ddH₂O resuspendiert und davon jeweils 10µl zu einem 50µl Reaktionsansatz gegeben. Der einzige Unterschied zu Standard-PCR-Ansätzen bestand in einer längeren initialen Denaturierungszeit (5-10min), um ein Platzen der *U. maydis* Zellen zu erreichen. Folgende Punkte sind zu beachten: (1) das Zellmaterial sollte frisch sein, idealerweise als zwei Tage alte Kolonie von einer PD- oder CM-Platte, (2) es sollte nicht zuviel Material eingesetzt werden, idealerweise eine Kolonie mit einem Durchmesser von etwa 1 mm, (3) die Amplifikation von Fragmenten, die länger als 1,5 kb sind, verläuft generell relativ schlecht und nicht immer reproduzierbar, die Amplifikatlängen sollten daher zwischen 200 und 500bp liegen, (4) die Elongationszeiten müssen für eine erfolgreiche Amplifikation gegenüber Standard-PCR-Ansätzen verdoppelt werden, und (5) es kommt es immer wieder zum Ausfall einzelner Reaktionen. Aus diesem Grund sollten diese Analysen so durchgeführt werden, dass sich im Fall einer erfolgreichen Transformation kein Amplifikat ergibt, dagegen im Wildtyp eine Bande erkennbar ist. Mit allen Klonen, die im Ansatz kein Amplifikat zeigten, wurde weitergearbeitet. Durch diese Vorgehensweise gingen potenziell richtige Transformanten, bei denen die PCR-Reaktion nicht funktioniert hatte, nicht verloren.

Standardprogramm (POP65)

	Temp [°C]	Zeit [sec]	
Hot/D	94	450	← nach 1-2 min T _z
D	94	30) 34x
H	65*	60	
V	72	60*	
V	72	600	
K	18	∞	

Hot: Heißstartschritt; D: Denaturierungsschritt;
H: Hybridisierungsschritt; V: Verlängerungsschritt

* Je nach verwendeten Oligonukleotiden oder Länge des Amplifikats wurde die Hybridisierungstemperatur bzw. die Verlängerungszeit entsprechend angepasst.

4.3.5 TOPO-TA-Klonierung von PCR-Produkten

Die Taq-Polymerase hängt matrizenunabhängig ein einzelnes Desoxyadenosin an die 3'-Enden von PCR-Produkten. Bei Verwendung war ein Der linearisierte Vektor pCR[®]2.1-TOPO[®] (Invitrogen) enthält überhängende 3'-Desoxythymidin- Reste. Dadurch können PCR-Produkte sehr effizient in den Vektor eingebaut werden. Das TOPO-Cloning[™]- Kit von Invitrogen nutzt die Ligase-Aktivität der Topoisomerase aus. 2-3,5 µl des gereinigten PCR-Produktes wurden mit 0,5 µl pCR[®]2.1-TOPO[®] Vektor versetzt, zu 5 µl mit

ddH₂O aufgefüllt, vorsichtig gemischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde kurz zentrifugiert und das Gefäß auf Eis gesetzt. Anschließend wurde wie unter "RbCl-Transformation" auf Seite 92 beschrieben verfahren, wobei der Transformationsansatz auf eine YT^{Amp}-Platte mit X-Gal verteilt wurde. Nach 12 h wurden die weißen oder leicht blauen Kolonien gepickt, in Flüssigmedium angezogen und die Plasmide, wie unter „Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli*“ auf Seite 99 beschrieben, isoliert.

4.3.6 Nachweis von Nukleinsäuren im Southern-Blot

Herstellung einer Digoxigenin-markierten Sonde

Sonden wurden durch Einbau von Digoxigenin-11-dUTP (DIG) während der PCR markiert. Ein Ansatz enthielt 10 bis 100pg Plasmid-DNA oder 100ng genomische DNA, 5 µl PCR-Puffer, 5 µl PCR-DIG-Labeling-Mix, je 20pmol der beiden Oligonukleotide und 0,5 µl Taq-DNA-Polymerase. Mit ddH₂O wurde zu 50µl aufgefüllt. Die Reaktion erfolgte im Thermo-

cycler PTC200 (MJ Research) analog zu den Standard-PCR-Ansätzen (S. 102). Das Produkt wurde über ein Agarose-Gel gereinigt.

PCR-DIG-Labeling-Mix (Roche)

2 mM	dATP
2 mM	dCTP
2 mM	dGTP
1,9 mM	dTTP
0,1 mM	alkali-labile DIG-11-dUTP (pH7,0) in ddH ₂ O

4.3.6 Nachweis von Nukleinsäuren im Southern-Blot

Transfer und Nachweis der DNA

Von jedem Transformanten wurden 1-5 µg vollständig restringierte genomische DNA in einem Agarosegel aufgetrennt. Als Vergleich wurde restringierte DNA des Ausgangs- bzw. Vorgängerstamms mit auf das Gel geladen. Die Elektrophorese sollte bei nicht mehr als 80 V erfolgen, um eine schöne Auftrennung der Banden zu erreichen. Das Gel wurde dann auf dem UV-Tisch mit einer computergekoppelten Digitalkamera in Originalgröße fotografiert, um ein Zuordnen der Markerbanden zu ermöglichen. Das Gel wurde dann in eine Schale gelegt. Die DNA durch eine Säurebehandlung depuriniert, indem das Gel bei Raumtemperatur für maximal 10min in 250mM HCl geschüttelt wurde. Das Gel wurde dann mit 0,4 M NaOH neutralisiert, wodurch die DNA gleichzeitig denaturiert wurde. Der Transfer der DNA vom Gel auf die HybondTM-N⁺-Membran (Amersham Life Science) erfolgte durch einen Kapillarblot mit 0,4 M NaOH als Transferlösung über Nacht. Die DNA wurde durch UV-Bestrahlung mit 1200mJ · cm⁻² in einem Stratalinker[®] (Statagene) auf der noch feuchten Membran fixiert und diese dann auf Whatman-Papier an der Luft getrocknet. Daraufhin wurde der Filter in eine Hybridisierungsröhre gesteckt, wobei die DNA-Seite nach innen zeigte. Dann wurde der Filter mit 10-20ml Southern-Hybridisierungspuffer bei 68 °C für ca. 15min prähybridisiert. Die DIG-markierte Sonde (siehe oben) wurde 10min bei 94 °C denaturiert, dann sofort auf Eis abgekühlt und der Hybridisierungslösung zugesetzt. Die Hybridisierung erfolgte bei 68 °C über Nacht. Dann wurde zweimal für 15min mit 50ml Southern-Waschpuffer bei 65 °C gewaschen. Zur Detektion wurde die Membran in eine Schale gelegt, langsam bei Raumtemperatur geschwenkt und mit den folgenden Lösungen inkubiert: Zweimal 5 min in DIG-Waschpuffer. 30min in DIG2-Lösung. 30min in Antikörperlösung. Dreimal

20min in DIG-Waschpuffer. Danach wurde die Membran 5 min in DIG3-Lösung äquilibriert und anschließend für 5 min mit 20ml Chemolumineszenz-Lösung inkubiert. Dann wurde sie kurz auf Whatman-Papier getrocknet und in noch feuchtem Zustand luftblasenfrei in eine Plastikfolie eingeschweißt. Die eingeschweißte Membran wurde zusammen mit einem Film in eine lichtdichte Kassette überführt. Normalerweise reichen Expositionszeiten von wenigen Sekunden bis 120 min aus. Der Film wurde dann entwickelt. Das Protokoll ist modifiziert nach Southern (1975).

Southern-Hybridisierungspuffer

50mM	Na-Phosphat-Puffer (pH7,0)
50mM	PIPES
100mM	NaCl
1 mM	Na ₂ -EDTA
5 %	SDS (w/v) in ddH ₂ O

Southern-Waschpuffer

1x	SSC
0,1 %	SDS (w/v) in ddH ₂ O

DIG1-Lösung

100mM	Maleinsäure
150mM	NaCl in ddH ₂ O pH7,5 mit NaOH

DIG2-Lösung

2 %	Magermilchpulver (w/v) in DIG1-Lösung
-----	--

Antikörperlösung

1:20000 Anti-Digoxigenin-AP Fab-Fragmente (Roche)
in DIG2-Lösung

DIG-Waschpuffer

0,3 %	Tween-20 in DIG1-Lösung
-------	----------------------------

DIG3-Lösung

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

Chemolumineszenz-Lösung

1:100 CPD-Star (Roche)
 in DIG3-Lösung

4.3.7 Bioinformatische Analysen**Sequenzbestimmung von DNA**

Die DNA-Sequenzierungen wurden von der Zentralabteilung DNA am Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung in Köln durchgeführt. Es wurden dafür die Sequenzierautomaten AbiPrism 377, 3100 und 3730 der Firma Applied Biosystems (Weiterstadt) verwendet. Für die Sequenzierreaktionen wurde das BigDye-terminator v3.1-Kit verwendet, das von der Firma Applied Biosystems bezogen wurde. Die für Sequenzierreaktionen verwendeten Oligonukleotide sind bei den entsprechenden Plasmiden (S. 83 ff.) und im Abschnitt 4.1.2 (S. 77 ff.) angegeben.

Programme für Sequenz- und Strukturanalysen**BLAST**

Altschul et al. (1990)

Das *basic local alignment search tool* wurde zur Identifikation ähnlicher Proteine oder DNA-Sequenzen in Datenbanken verwendet.

CloneManager

Das Programm CloneManager wurde zur Erstellung, Bearbeitung und Planung von Plasmiden und genomischen Sequenzen verwendet.

URL: <http://www.scienced.com/>

ClustalX

Thompson et al. (1997)

ClustalX wurde zum Vergleich und Ausrichten mehrerer Protein- bzw. Nukleotidsequenzen verwendet.

DNA-Strider 1.3

Marck (1988) und Douglas (1995)

DNA-Strider wurde zur Erstellung, Bearbeitung und Planung von Plasmiden und genomischen Sequenzen verwendet.

GeneDoc

Nicholas et al. (1997)

Das Programm GeneDoc wurde zur Bearbeitung und Annotation von ClustalX-Ergebnissen verwendet.

URL: <http://www.psc.edu/biomed/genedoc/>

MEGA

Kumar et al. (2001)

Mega wurde zum Erstellen von phylogenetischen Dendrogrammen aus ClustalX-Ergebnissen verwendet.

URL: <http://www.megasoftware.net>

PSIPRED

McGuffin et al. (2000) und Jones (1999)

Der *protein structure prediction server* wurde für die Strukturvorhersage von Proteinbereichen verwendet.

URL: <http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>

RasMol

Sayle und Milner-White (1995)

Das Programm RasMol Version 2.6 wurde zum Bearbeiten von 3D-Proteinstrukturen verwendet.

URL: <http://www.umass.edu/microbio/rasmol/>

SMART

Schultz et al. (1998) und Letunic et al. (2004)

Das *simple architecture research tool* wurde zur Identifikation konservierter Domänen bzw. zur Identifikation von Proteinen mit ähnlicher Domänenstruktur oder -organisation verwendet.

URL: <http://smart.embl.de/>

Identifizierung von RBPs in *U. maydis*

Zur Identifizierung von RNA-bindenden Proteinen mit PUM-Domänen wurden die folgenden Proteinsequenzen (http://smart.embl-heidelberg.de/smart/get_members.pl?WHAT=species&NAME=Pumilio&WHICH=Eukaryota) mittels des BLAST-Algorithmus (Altschul et al., 1990) mit der Genomsequenz von *U. maydis* verglichen (http://www.broad.mit.edu/annotation/fungi/ustilago_maydis/): *S. cerevisiae* (7), Q12221, P47077, P39016, Q07807, P25339, Q04373 und P47135; *S. pombe* (9), Q10238, Q09829, Q92347, O94462, O60059, Q92359, Q9P789, Q9UU76 und O74438; *N. crassa* (2), Q8X035, Q9P6D4; *D. discoideum* (1), Q9Y1J5; *A. thaliana* (6), Q9LRZ3, Q9SVZ7, BAB08273, Q95547, Q9SFL0 und Q9LVC3; *H. sapiens* (3), AAG31807, O00234 und AAG31806; *C. elegans* (6), O01322, QZ3191, Q9U2G4, Q09487, Q9N3Q2, und Q9N5M6; *D. melanogaster* (1), Q9VHH6.

Proteine mit KH-Domänen wurden mit folgenden, aus der SMART Datenbank (http://smart.embl-heidelberg.de/smart/get_members.pl?WHAT=species&NAME=KH&WHICH=Eukaryota)

entnommenen, Proteinsequenzen identifiziert: *S. cerevisiae* (6), Q07834, Q12186, YBD2, PBP2, RS3 und Q99216; *S. pombe* (7), O59810, O74359, O74919, O74555, O74777, YAJE_Schpo und O14044; *N. crassa* (1), Q9P6B5; *H. sapiens* (5), Q13601, AAG02184, AAG45476, Q9Y307 und Vigilin; *C. elegans* (1), Q9U3B2; *D. melanogaster* (1), Q9V8H6.

Proteine mit DSRM-Domänen wurden mit folgenden aus der SMART-Datenbank (http://smart.embl-heidelberg.de/smart/get_members.pl?WHAT=species&NAME=DSRM&WHICH=Eukaryota)

entnommenen Proteinsequenzen identifiziert: *S. cerevisiae* (2), RM03 und RNT1; *S. pombe* (2), O43042 und PAC1; *N. crassa* (2), Q7S6N0 und Q9P6D6; *D. melanogaster* (23), AAQ23615, Q8MRC7, Q8MRY4, Q95YG3, Q960Y4, Q961S7, Q9GNJ2, Q9NHW9, Q9NII2, Q9U6N4, Q9V847, Q9V9V7, Q9VCU9, Q9VHB0, Q9VJY9, Q9VLW8, Q9VRL8, Q9VY45, Q9VZ88, Q9W5S7, Q9XYN5, MLE und STAU.

RRM-Proteine wurden mit folgenden aus der SMART-Datenbank (http://smart.embl-heidelberg.de/smart/get_members.pl?WHAT=species&NAME=RRM&WHICH=Eukaryota) entnommenen Proteinsequenzen identifiziert: *S. cerevisiae* (6), P04147, P32588, P38922, P32831, P27476 und P34217; *S. pombe* (2), Q09702 und P08965; *H. sapiens* (3), Q9UNP9, Q15717 und Q9Y3B4; *D. melanogaster* (5), P19018, P19339, P16914, O02374 und AAF54070.

Phylogenetische Analysen

Für phylogenetische Analysen wurden die entsprechenden Sequenzen mittels ClustalX ausgerichtet (Thompson et al., 1997). Die ursprungsfreien Dendrogramme wurden mit MEGA 2.1 (<http://www.megasoftware.net>) (Kumar et al., 2001) erstellt. Dabei wurde der distanz-basierte „minimum evolution“ Algorithmus mit 1000 Replikaten gewählt. Der

initiale Baum wurde mit der „neighbor-joining“ Methode konstruiert. Für Abb. 3-2 auf Seite 60 wurden u. a. zwei vorhergesagte KHD-Proteine aus *C. neoformans* (Cn; http://www.broad.mit.edu/annotation/fungi/cryptococcus_neoformans/) und *C. cinereus* (http://www.broad.mit.edu/annotation/fungi/coprinus_cinereus/) verwendet. Das KHD-Protein Cn1 (1113 As lang) liegt auf Contig 1.77 zwischen der Nukleotidposition 175691 und 172233. Es wurden zwei Introns vorhergesagt (Intron 1 173461-1733960 und Intron 2 172828-172779). Das KHD-Protein Cn2 (891 As lang) liegt auf Contig 1.12 zwischen Nukleotidposition 65877 und 61787. Hier wurden acht Introns vorhergesagt (Intron 1 65225-65028; Intron 2 64929-64881; Intron 3 64745-64107; Intron 4 63950-63919; Intron 5 63720-63383; Intron 6 62923-62877; Intron 7 62675-62618; Intron 8 62371-62318). Das KHD-Protein Cc1 (1228 As lang) liegt auf Contig 1.44 zwischen Nukleotidposition 260066 und 264281. Sieben Introns wurden vorhergesagt (Intron 1 260264-260745; Intron 2 261695-264754; Intron 3 262019-262074; Intron 4 262244-262303; Intron 5 262418-262528; Intron 6 262595-262654; Intron 7 263275-263334). Das KHD-Protein Cc2 (797 As lang) liegt auf Contig 1.9 zwischen Nukleotidposition 41512 und 44651. Es wurden Acht Introns vorhergesagt (Intron 1 41834-41904; Intron 2 42041-42094; Intron 3 42237-42284; Intron 4 42550-42610; Intron 5 42821-43159; Intron 6 43619-43671; Intron 7 43873-43920; Intron 8 44306-44376).

A.1 WACHSTUMSVERHALTEN VON *rrm4* MUTANTEN

In Tabelle A-1 ist das Wachstumsverhalten verschiedener *rrm4* Mutanten im Hintergrund von AB33 0, 2, 4 und 6 Stunden nach der Induktion des filamentösen Wachstums gezeigt (vgl. in "Material und Methoden", Seite 98). Ein Teil der Daten ist graphisch in Abb. 2-15 auf Seite 40 dargestellt.

TABELLE A-1 Wachstumsverhalten von *rrm4* Mutanten

leere Abschnitte	-	+	-	+	-	+	-	+	Stamm
Länge d. Spitzenzelle	% nach 0h		% nach 2h		% nach 4h		% nach 6h		
X < 20	83.02	0.00	62.79	0.00	9.36	0.00	0.00	0.00	AB33
20 ≤ X < 60 μm	16.98	0.00	37.21	0.00	67.25	5.85	26.83	2.44	
60 ≤ X < 80 μm	0.00	0.00	0.00	0.00	10.53	4.68	14.63	21.95	
80 ≤ X μm	0.00	0.00	0.00	0.00	1.75	0.58	0.00	34.15	
X < 20	89.29	0.00	57.93	0.00	5.00	0.00	0.00	0.00	AB33rrm4Δ-2 #1
20 ≤ X < 60 μm	10.71	0.00	42.07	0.00	93.33	0.00	47.37	0.00	
60 ≤ X < 80 μm	0.00	0.00	0.00	0.00	1.67	0.00	43.86	0.00	
80 ≤ X μm	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	8.77	0.00	
X < 20	89.08	0.00	77.95	0.00	3.81	0.00	0.00	0.00	AB33rrm4Δ-2 #2
20 ≤ X < 60 μm	10.92	0.00	22.05	0.00	91.43	0.00	59.18	0.00	
60 ≤ X < 80 μm	0.00	0.00	0.00	0.00	3.81	0.00	26.53	0.00	
80 ≤ X μm	0.00	0.00	0.00	0.00	0.95	0.00	14.29	0.00	
X < 20	83.22	0.00	33.93	0.00	7.77	0.00	2.38	0.00	AB33rrm4-gfp #1
20 ≤ X < 60 μm	16.78	0.00	66.07	0.00	64.08	3.88	19.05	16.67	
60 ≤ X < 80 μm	0.00	0.00	0.00	0.00	8.74	7.77	2.38	28.57	
80 ≤ X μm	0.00	0.00	0.00	0.00	1.94	5.83	11.90	19.05	
X < 20	89.38	0.00	50.55	0.00	5.63	0.00	0.00	0.00	AB33rrm4-gfp #2
20 ≤ X < 60 μm	10.62	0.00	49.45	0.00	63.38	5.63	25.81	12.90	
60 ≤ X < 80 μm	0.00	0.00	0.00	0.00	14.08	7.04	3.23	29.03	
80 ≤ X μm	0.00	0.00	0.00	0.00	2.82	1.41	0.00	29.03	
X < 20	88.57	0.00	44.44	0.00	4.00	0.00	1.19	0.00	AB33rrm4 ^{Δpabc} -gfp #1
20 ≤ X < 60 μm	11.43	0.00	55.56	0.00	90.29	0.00	75.00	0.00	
60 ≤ X < 80 μm	0.00	0.00	0.00	0.00	5.71	0.00	16.67	1.19	
80 ≤ X μm	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	5.95	0.00	
X < 20	87.34	0.00	51.26	0.00	1.43	0.00	0.00	0.00	AB33rrm4 ^{Δpabc} -gfp #2
20 ≤ X < 60 μm	12.66	0.00	48.74	0.00	94.29	0.00	71.13	0.00	
60 ≤ X < 80 μm	0.00	0.00	0.00	0.00	1.43	0.00	24.74	0.00	
80 ≤ X μm	0.00	0.00	0.00	0.00	2.86	0.00	4.12	0.00	
X < 20	79.03	0.00	48.78	0.00	14.29	0.00	0.00	0.00	AB33rrm4 ^{mR123} -gfp #1
20 ≤ X < 60 μm	20.97	0.00	51.22	0.00	81.90	0.00	62.90	0.00	
60 ≤ X < 80 μm	0.00	0.00	0.00	0.00	3.81	0.00	29.03	0.00	
80 ≤ X μm	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	8.06	0.00	

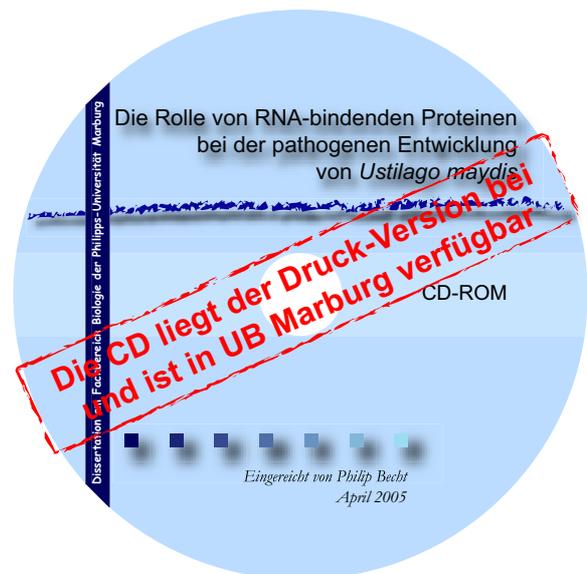
A.1 Wachstumsverhalten von *rrm4* MutantenTABELLE A-1 Wachstumsverhalten von *rrm4* Mutanten (Forts.)

leere Abschnitte		-	+	-	+	-	+	-	+	Stamm
Länge d. Spitzenzelle		% nach 0h		% nach 2h		% nach 4h		% nach 6h		
X < 20		87.84	0.00	50.30	0.00	2.84	0.00	0.00	0.00	AB33rrm4 ^{mR123} -gfp #1
20 ≤ X < 60 μm		12.16	0.00	49.70	0.00	87.94	0.00	56.88	0.00	
60 ≤ X < 80 μm		0.00	0.00	0.00	0.00	9.22	0.00	32.11	0.92	
80 ≤ X μm		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	8.26	1.83	
X < 20		86.67	0.00	65.87	0.00	5.26	0.00	1.96	0.00	AB33rrm4-mrfp #1
20 ≤ X < 60 μm		13.33	0.00	34.13	0.00	74.34	7.24	29.41	11.76	
60 ≤ X < 80 μm		0.00	0.00	0.00	0.00	2.63	7.24	5.88	19.61	
80 ≤ X μm		0.00	0.00	0.00	0.00	0.66	2.63	1.96	29.41	
X < 20		84.17	0.00	69.40	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	AB33rrm4-mrfp #2
20 ≤ X < 60 μm		15.83	0.00	30.60	0.00	53.68	9.47	38.81	5.97	
60 ≤ X < 80 μm		0.00	0.00	0.00	0.00	12.63	17.89	5.97	34.33	
80 ≤ X μm		0.00	0.00	0.00	0.00	2.11	4.21	0.00	14.93	
X < 20		78.95	0.00	47.50	0.00	3.41	0.00	1.30	0.00	AB33rrm4 ^{mR1} -gfp #1
20 ≤ X < 60 μm		21.05	0.00	52.50	0.00	90.91	0.00	57.14	0.00	
60 ≤ X < 80 μm		0.00	0.00	0.00	0.00	5.68	0.00	35.07	0.00	
80 ≤ X μm		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	6.49	0.00	
X < 20		91.41	0.00	54.67	0.00	3.03	0.00	0.00	0.00	AB33rrm4 ^{mR1} -gfp #2
20 ≤ X < 60 μm		8.59	0.00	45.33	0.00	93.94	0.00	67.20	0.00	
60 ≤ X < 80 μm		0.00	0.00	0.00	0.00	2.42	0.61	28.80	0.00	
80 ≤ X μm		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	4.00	0.00	
X < 20		86.43	0.00	46.94	0.00	1.14	0.00	0.00	0.00	AB33rrm4 ^{mR2} -gfp #1
20 ≤ X < 60 μm		13.57	0.00	53.06	0.00	78.41	1.14	56.36	0.00	
60 ≤ X < 80 μm		0.00	0.00	0.00	0.00	14.77	1.14	30.91	1.82	
80 ≤ X μm		0.00	0.00	0.00	0.00	3.41	0.00	10.91	0.00	
X < 20		81.89	0.00	30.08	0.00	3.97	0.00	0.00	0.00	AB33rrm4 ^{mR2} -gfp #2
20 ≤ X < 60 μm		18.11	0.00	69.92	0.00	85.71	0.00	45.88	0.00	
60 ≤ X < 80 μm		0.00	0.00	0.00	0.00	8.73	0.00	42.35	2.35	
80 ≤ X μm		0.00	0.00	0.00	0.00	1.59	0.00	9.41	0.00	
X < 20		88.20	0.00	59.34	0.00	6.83	0.00	1.72	0.00	AB33rrm4 ^{mR3} -gfp #1
20 ≤ X < 60 μm		11.80	0.00	40.66	0.00	68.32	1.86	31.03	12.07	
60 ≤ X < 80 μm		0.00	0.00	0.00	0.00	8.70	9.94	6.90	24.14	
80 ≤ X μm		0.00	0.00	0.00	0.00	0.62	3.73	1.72	22.41	
X < 20		89.17	0.00	49.28	0.00	2.72	0.00	0.00	0.00	AB33rrm4 ^{mR3} -gfp #2
20 ≤ X < 60 μm		10.83	0.00	50.72	0.00	52.38	1.36	39.22	7.84	
60 ≤ X < 80 μm		0.00	0.00	0.00	0.00	15.65	10.88	1.96	25.49	
80 ≤ X μm		0.00	0.00	0.00	0.00	6.80	10.20	0.00	25.49	

B.1 CD-ROM UND DATEIÜBERSICHT

Die Filme (AVI-Format), auf welche im Text verwiesen wurde, und die Arbeit (PDF-Format) liegen auf CD dieser Arbeit bei. Die Dateien sind unter der folgenden Ordnerstruktur zu finden:

- CD-Laufwerk
 - Doktorarbeit PBecht.pdf
 - Becht et al 2005-PMID 15643068.pdf
 - Filme
 - Film 2-1
 - DIC zu Film 2-1.tif
 - Film 2-1.avi
 - Film 2-2
 - Film 2-2A.avi
 - Film 2-2B.avi
 - Film 2-3
 - DIC zu Film 2-3.tif
 - Film 2-3.avi
 - Film 2-4
 - DIC zu Film 2-4.tif
 - Film 2-4.avi
 - Film 2-5
 - DIC zu Film 2-5.tif
 - Film 2-5.avi
 - Film 2-6
 - DIC zu Film 2-6.tif
 - Film 2-6.avi
 - Film 2-7
 - DIC zu Film 2-7.tif
 - Film 2-7.avi



LITERATURVERZEICHNIS

- Afonina, E., Stauber, R. und Pavlakis, G.N. (1998) The human poly(A)-binding protein 1 shuttles between the nucleus and the cytoplasm. *J Biol Chem*, **273**, 13015-13021.
- Ainger, K., Avossa, D., Diana, A.S., Barry, C., Barbarese, E. und Carson, J.H. (1997) Transport and localization elements in *myelin basic protein* mRNA. *J Cell Biol*, **138**, 1077-1087.
- Albrecht, M. und Lengauer, T. (2004) Survey on the PABC recognition motif PAM2. *Biochem Biophys Res Commun*, **316**, 129-138.
- Allain, F.H., Bouvet, P., Dieckmann, T. und Feigon, J. (2000) Molecular basis of sequence-specific recognition of pre-ribosomal RNA by nucleolin. *EMBO J*, **19**, 6870-6881.
- Allain, F.H., Gilbert, D.E., Bouvet, P. und Feigon, J. (2000) Solution structure of the two N-terminal RNA-binding domains of nucleolin and NMR study of the interaction with its RNA target. *J Mol Biol*, **303**, 227-241.
- Allain, F.H., Gubser, C.C., Howe, P.W., Nagai, K., Neuhaus, D. und Varani, G. (1996) Specificity of ribonucleoprotein interaction determined by RNA folding during complex formulation. *Nature*, **380**, 646-650.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. und Lipman, D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*, **215**, 403-410.
- Antic, D. und Keene, J.D. (1997) Embryonic lethal abnormal visual RNA-binding proteins involved in growth, differentiation, and posttranscriptional gene expression. *Am J Hum Genet*, **61**, 273-278.
- Aronov, S., Aranda, G., Behar, L. und Ginzburg, I. (2002) Visualization of translated tau protein in the axons of neuronal P19 cells and characterization of tau RNP granules. *J Cell Sci*, **115**, 3817-3827.
- Ausubel, S.F., Brenz, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. und Strukl, K. (1987) *Current Protocols on Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Inc., USA.
- Banerjee, H., Rahn, A., Gawande, B., Guth, S., Valcarcel, J. und Singh, R. (2004) The conserved RNA recognition motif 3 of U2 snRNA auxiliary factor (U2AF 65) is essential in vivo but dispensable for activity in vitro. *Rna*, **10**, 240-253.
- Banuett, F. (1995) Genetics of *Ustilago maydis*, a fungal pathogen that induces tumors in maize. *Annu Rev Genet*, **29**, 179-208.
- Banuett, F. und Herskowitz, I. (1989) Different alleles of *Ustilago maydis* are necessary for maintenance of filamentous growth but not for meiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**, 5678-5882.
- Banuett, F. und Herskowitz, I. (1996) Discrete developmental stages during teliospore formation in the corn smut fungus, *Ustilago maydis*. *Development*, **122**, 2965-2976.
- Banuett, F. und Herskowitz, I. (2002) Bud morphogenesis and the actin and microtubule cytoskeletons during budding in the corn smut fungus, *Ustilago maydis*. *Fungal Genet Biol*, **37**, 149-170.

- Barilla, D., Lee, B.A. und Proudfoot, N.J. (2001) Cleavage/polyadenylation factor IA associates with the carboxyl-terminal domain of RNA polymerase II in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 445-450.
- Bashaw, G.J. und Baker, B.S. (1995) The *msl-2* dosage compensation gene of *Drosophila* encodes a putative DNA-binding protein whose expression is sex specifically regulated by Sex-lethal. *Development*, **121**, 3245-3258.
- Basse, C.W. und Steinberg, G. (2004) *Ustilago maydis*, model system for analysis of the molecular basis of fungal pathogenicity. *Mol Plant Path*, **5**, 83-92.
- Becht, P., Vollmeister, E. und Feldbrügge, M. (2005) Role for RNA-Binding Proteins Implicated in Pathogenic Development of *Ustilago maydis*. *Eukaryot Cell*, **4**, 121-133.
- Bell, L.R., Horabin, J.I., Schedl, P. und Cline, T.W. (1991) Positive autoregulation of sex-lethal by alternative splicing maintains the female determined state in *Drosophila*. *Cell*, **65**, 229-239.
- Benowitz, L.I. und Routtenberg, A. (1997) GAP-43: an intrinsic determinant of neuronal development and plasticity. *Trends Neurosci*, **20**, 84-91.
- Bölker, M. (2001) *Ustilago maydis* - a valuable model system for the study of fungal dimorphism and virulence. *Microbiology*, **147**, 1395-1401.
- Bölker, M., Genin, S., Lehmler, C. und Kahmann, R. (1995) Genetic regulation of mating, and dimorphism in *Ustilago maydis*. *Canadian Journal of Botany*, **73**, 320-325.
- Bölker, M., Urban, M. und Kahmann, R. (1992) The a mating type locus of *U. maydis* specifies cell signaling components. *Cell*, **68**, 441-450.
- Bomszyk, K., Denisenko, O. und Ostrowski, J. (2004) hnRNP K: one protein multiple processes. *Bioessays*, **26**, 629-638.
- Brachmann, A. (2001) Die frühe Infektionsphase von *Ustilago maydis*: Genregulation durch das bW/bE-Heterodimer. *Fakultät für Biologie*. Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- Brachmann, A., König, J., Julius, C. und Feldbrügge, M. (2004) A reverse genetic approach for generating gene replacement mutants in *Ustilago maydis*. *Mol Genet Genomics*.
- Brefeld, O. (1893) Untersuchungen aus dem Gesamtgebiet der Mykologie. **Heft 5**, 67-75.
- Brendza, R.P., Serbus, L.R., Duffy, J.B. und Saxton, W.M. (2000) A function for kinesin I in the posterior transport of *oskar* mRNA and Staufen protein. *Science*, **289**, 2120-2122.
- Brendza, R.P., Serbus, L.R., Saxton, W.M. und Duffy, J.B. (2002) Posterior localization of dynein and dorsal-ventral axis formation depend on kinesin in *Drosophila* oocytes. *Curr Biol*, **12**, 1541-1545.
- Callaghan, M.J., Russell, A.J., Woollatt, E., Sutherland, G.R., Sutherland, R.L. und Watts, C.K. (1998) Identification of a human HECT family protein with homology to the *Drosophila* tumor suppressor gene hyperplastic discs. *Oncogene*, **17**, 3479-3491.
- Campbell, R.E., Tour, O., Palmer, A.E., Steinbach, P.A., Baird, G.S., Zacharias, D.A. und Tsien, R.Y. (2002) A monomeric red fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 7877-7882.
- Carson, J.H., Kwon, S. und Barbarese, E. (1998) RNA trafficking in myelinating cells. *Curr Opin Neurobiol*, **8**, 607-612.

- Catalanotto, C., Pallotta, M., ReFalo, P., Sachs, M.S., Vayssie, L., Macino, G. und Cogoni, C. (2004) Redundancy of the two dicer genes in transgene-induced posttranscriptional gene silencing in *Neurospora crassa*. *Mol Cell Biol*, **24**, 2536-2545.
- Cha, B.J., Koppetsch, B.S. und Theurkauf, W.E. (2001) In vivo analysis of *Drosophila* bicoid mRNA localization reveals a novel microtubule-dependent axis specification pathway. *Cell*, **106**, 35-46.
- Christensen, J.J. (1963) Corn smut caused by *Ustilago maydis*. *Am Phytopath Soc Monogr*, **2**.
- Cohen, S.N., Chang, A.C. und Hsu, L. (1972) Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **69**, 2110-2114.
- Condeelis, J. und Singer, R.H. (2005) How and why does *beta-actin* mRNA target? *Biol Cell*, **97**, 97-110.
- Cortes, A., Huertas, D., Fanti, L., Pimpinelli, S., Marsellach, F.X., Pina, B. und Azorin, F. (1999) DDP1, a single-stranded nucleic acid-binding protein of *Drosophila*, associates with pericentric heterochromatin and is functionally homologous to the yeast Scp160p, which is involved in the control of cell ploidy. *EMBO J*, **18**, 3820-3833.
- Cote, C.A., Gautreau, D., Denegre, J.M., Kress, T.L., Terry, N.A. und Mowry, K.L. (1999) A *Xenopus* protein related to hnRNP I has a role in cytoplasmic RNA localization. *Mol Cell*, **4**, 431-437.
- Craig, A.W., Haghghat, A., Yu, A.T. und Sonenberg, N. (1998) Interaction of polyadenylate-binding protein with the eIF4G homologue PAIP enhances translation. *Nature*, **392**, 520-523.
- Dean, K.A., Aggarwal, A.K. und Wharton, R.P. (2002) Translational repressors in *Drosophila*. *Trends Genet*, **18**, 572-577.
- Deardorff, J.A. und Sachs, A.B. (1997) Differential effects of aromatic and charged residue substitutions in the RNA binding domains of the yeast poly(A)-binding protein. *J Mol Biol*, **269**, 67-81.
- Denisenko, O. und Bomsztyk, K. (2002) Yeast hnRNP K-like genes are involved in regulation of the telomeric position effect and telomere length. *Mol Cell Biol*, **22**, 286-297.
- Deo, R.C., Bonanno, J.B., Sonenberg, N. und Burley, S.K. (1999) Recognition of polyadenylate RNA by the poly(A)-binding protein. *Cell*, **98**, 835-845.
- Deo, R.C., Sonenberg, N. und Burley, S.K. (2001) X-ray structure of the human hyperplastic discs protein: an ortholog of the C-terminal domain of poly(A)-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 4414-4419.
- Deshler, J.O., Highett, M.I., Abramson, T. und Schnapp, B.J. (1998) A highly conserved RNA-binding protein for cytoplasmic mRNA localization in vertebrates. *Curr Biol*, **8**, 489-496.
- Deshler, J.O., Highett, M.I. und Schnapp, B.J. (1997) Localization of *Xenopus* Vg1 mRNA by Vera protein and the endoplasmic reticulum. *Science*, **276**, 1128-1131.
- Dodson, R.E. und Shapiro, D.J. (1997) Vigilin, a ubiquitous protein with 14 K homology domains, is the estrogen-inducible *vitellogenin* mRNA 3'-untranslated region-binding protein. *J Biol Chem*, **272**, 12249-12252.

- Doerks, T., Copley, R.R., Schultz, J., Ponting, C.P. und Bork, P. (2002) Systematic identification of novel protein domain families associated with nuclear functions. *Genome Res*, **12**, 47-56.
- Douglas, S.E. (1995) DNA Strider. An inexpensive sequence analysis package for the Macintosh. *Mol Biotechnol*, **3**, 37-45.
- Dreyfuss, G., Kim, V.N. und Kataoka, N. (2002) Messenger-RNA-binding proteins and the messages they carry. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **3**, 195-205.
- Duncan, J.E. und Warrior, R. (2002) The cytoplasmic dynein and kinesin motors have interdependent roles in patterning the *Drosophila* oocyte. *Curr Biol*, **12**, 1982-1991.
- Edwards, T.A., Pyle, S.E., Wharton, R.P. und Aggarwal, A.K. (2001) Structure of Pumilio reveals similarity between RNA and peptide binding motifs. *Cell*, **105**, 281-289.
- Ephrussi, A., Dickinson, L.K. und Lehmann, R. (1991) Oskar organizes the germ plasm and directs localization of the posterior determinant nanos. *Cell*, **66**, 37-50.
- Feldbrügge, M., Kämper, J., Steinberg, G. und Kahmann, R. (2004) Regulation of mating and pathogenic development in *Ustilago maydis*. *Curr Opin Microbiol*, **7**, 666-672.
- Fierro-Monti, I. und Mathews, M.B. (2000) Proteins binding to duplexed RNA: one motif, multiple functions. *Trends Biochem Sci*, **25**, 241-246.
- Forrest, K.M. und Gavis, E.R. (2003) Live imaging of endogenous RNA reveals a diffusion and entrapment mechanism for *nanos* mRNA localization in *Drosophila*. *Curr Biol*, **13**, 1159-1168.
- Frey, S., Pool, M. und Seedorf, M. (2001) Scp160p, an RNA-binding, polysome-associated protein, localizes to the endoplasmic reticulum of *Saccharomyces cerevisiae* in a microtubule-dependent manner. *J Biol Chem*, **276**, 15905-15912.
- Gaba, A., Wang, Z., Krishnamoorthy, T., Hinnebusch, A.G. und Sachs, M.S. (2001) Physical evidence for distinct mechanisms of translational control by upstream open reading frames. *EMBO J*, **20**, 6453-6463.
- Garcia-Muse, T., Steinberg, G. und Perez-Martin, J. (2003) Pheromone-induced G2 arrest in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Eukaryot Cell*, **2**, 494-500.
- Gavis, E.R. und Lehmann, R. (1992) Localization of nanos RNA controls embryonic polarity. *Cell*, **71**, 301-313.
- Gebauer, F., Grskovic, M. und Hentze, M.W. (2003) *Drosophila* sex-lethal inhibits the stable association of the 40S ribosomal subunit with *msl-2* mRNA. *Mol Cell*, **11**, 1397-1404.
- Gillissen, B., Bergemann, J., Sandmann, C., Schroer, B., Bolker, M. und Kahmann, R. (1992) A two-component regulatory system for self/non-self recognition in *Ustilago maydis*. *Cell*, **68**, 647-657.
- Gold, S., Duncan, G., Barrett, K. und Kronstad, J. (1994) cAMP regulates morphogenesis in the fungal pathogen *Ustilago maydis*. *Genes Dev*, **8**, 2805-2816.
- Gold, S.E., Brogdon, S.M., Mayorga, M.E. und Kronstad, J.W. (1997) The *Ustilago maydis* regulatory subunit of a cAMP-dependent protein kinase is required for gall formation in maize. *Plant Cell*, **9**, 1585-1594.

- Gonsalvez, G.B., Urbinati, C.R. und Long, R.M. (2005) RNA localization in yeast: moving towards a mechanism. *Biol Cell*, **97**, 75-86.
- Gonzalez-Novo, A., Jimenez, J., Garcia, M.J., Rios-Serrano, I., Pla, J., Jimenez, A. und Sanchez-Perez, M. (2004) Dynamics of CaCdc10, a septin of *Candida albicans*, in living cells and during infection. *Int Microbiol*, **7**, 105-112.
- Good, P.J., Chen, Q., Warner, S.J. und Herring, D.C. (2000) A family of human RNA-binding proteins related to the *Drosophila* Bruno translational regulator. *J Biol Chem*, **275**, 28583-28592.
- Grishin, N.V. (2001) KH domain: one motif, two folds. *Nucleic Acids Res*, **29**, 638-643.
- Grskovic, M., Hentze, M.W. und Gebauer, F. (2003) A co-repressor assembly nucleated by Sex-lethal in the 3'UTR mediates translational control of *Drosophila msl-2* mRNA. *EMBO J*, **22**, 5571-5581.
- Gu, W., Deng, Y., Zenklusen, D. und Singer, R.H. (2004) A new yeast PUF family protein, Puf6p, represses *ASH1* mRNA translation and is required for its localization. *Genes Dev*, **18**, 1452-1465.
- Guo, M., Aston, C., Burchett, S.A., Dyke, C., Fields, S., Rajarao, S.J., Uetz, P., Wang, Y., Young, K. und Dohman, H.G. (2003) The yeast G protein alpha subunit Gpa1 transmits a signal through an RNA binding effector protein Scp160. *Mol Cell*, **12**, 517-524.
- Haber, J.E. (1998) Mating-type gene switching in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu Rev Genet*, **32**, 561-599.
- Hachet, O. und Ephrussi, A. (2001) *Drosophila Y14* shuttles to the posterior of the oocyte and is required for *oskar* mRNA transport. *Curr Biol*, **11**, 1666-1674.
- Handa, N., Nureki, O., Kurimoto, K., Kim, I., Sakamoto, H., Shimura, Y., Muto, Y. und Yokoyama, S. (1999) Structural basis for recognition of the *tra* mRNA precursor by the Sex-lethal protein. *Nature*, **398**, 579-585.
- Hoffman, C.S. und Winston, F. (1987) A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene*, **57**, 267-272.
- Hoffmann, B., Valerius, O., Andermann, M. und Braus, G.H. (2001) Transcriptional autoregulation and inhibition of mRNA translation of amino acid regulator gene *cpcA* of filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Mol Biol Cell*, **12**, 2846-2857.
- Holliday, R. (1974) *Ustilago maydis*. In King, R.C. (ed.), *Handbook of Genetics*. Plenum Press, New York, USA, pp. 575-595.
- Holliday, R. (2004) Early studies on recombination and DNA repair in *Ustilago maydis*. *DNA Repair (Amst)*, **3**, 671-682.
- Hoshino, S., Imai, M., Kobayashi, T., Uchida, N. und Katada, T. (1999) The eukaryotic polypeptide chain releasing factor (eRF3/GSPT) carrying the translation termination signal to the 3'-Poly(A) tail of mRNA. Direct association of erf3/GSPT with polyadenylate-binding protein. *J Biol Chem*, **274**, 16677-16680.
- Huibregtse, J.M., Scheffner, M., Beaudenon, S. und Howley, P.M. (1995) A family of proteins structurally and functionally related to the E6-AP ubiquitin-protein ligase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 5249.

- Hull, C.M. und Heitman, J. (2002) Genetics of *Cryptococcus neoformans*. *Annu Rev Genet*, **36**, 557-615.
- Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. und White, T.J. (eds.). (1990) *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, Inc., San Diego, CA, USA.
- Januschke, J., Gervais, L., Dass, S., Kaltschmidt, J.A., Lopez-Schier, H., St Johnston, D., Brand, A.H., Roth, S. und Guichet, A. (2002) Polar transport in the *Drosophila* oocyte requires Dynein and Kinesin I cooperation. *Curr Biol*, **12**, 1971-1981.
- Jeong, H.T., Ozoe, F., Tanaka, K., Nakagawa, T., Matsuda, H. und Kawamukai, M. (2004) A novel gene, *msa1*, inhibits sexual differentiation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics*, **167**, 77-91.
- Job, C. und Eberwine, J. (2001) Localization and translation of mRNA in dendrites and axons. *Nat Rev Neurosci*, **2**, 889-898.
- Johnstone, O. und Lasko, P. (2001) Translational regulation and RNA localization in *Drosophila* oocytes and embryos. *Annu Rev Genet*, **35**, 365-406.
- Jones, D.T. (1999) Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. *J Mol Biol*, **292**, 195-202.
- Kaffarnik, F., Müller, P., Leibundgut, M., Kahmann, R. und Feldbrügge, M. (2003) PKA and MAPK phosphorylation of Prf1 allows promoter discrimination in *Ustilago maydis*. *EMBO J*, **22**, 5817-5826.
- Kahmann, R. und Kämper, J. (2004) *Ustilago maydis*: how its biology relates to pathogenic development. *New Phytol*, **in press**.
- 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., Reichmann, M., Romeis, T., Böcker, M. und Kahmann, R. (1995) Multiallelic recognition: nonself-dependent dimerization of the bE and bW homeodomain proteins in *Ustilago maydis*. *Cell*, **81**, 73-83.
- Kasashima, K., Sakashita, E., Saito, K. und Sakamoto, H. (2002) Complex formation of the neuron-specific ELAV-like Hu RNA-binding proteins. *Nucleic Acids Res*, **30**, 4519-4526.
- Kennedy, B.K., Gotta, M., Sinclair, D.A., Mills, K., McNabb, D.S., Murthy, M., Pak, S.M., Laroche, T., Gasser, S.M. und Guarente, L. (1997) Redistribution of silencing proteins from telomeres to the nucleolus is associated with extension of life span in *S. cerevisiae*. *Cell*, **89**, 381-391.
- Khaleghpour, K., Pyronnet, S., Gingras, A.C. und Sonenberg, N. (1999) Translational homeostasis: eukaryotic translation initiation factor 4E control of 4E-binding protein 1 and p70 S6 kinase activities. *Mol Cell Biol*, **19**, 4302-4310.
- Kielkopf, C.L., Lucke, S. und Green, M.R. (2004) U2AF homology motifs: protein recognition in the RRM world. *Genes Dev*, **18**, 1513-1526.
- Kim, V.N., Yong, J., Kataoka, N., Abel, L., Diem, M.D. und Dreyfuss, G. (2001) The Y14 protein communicates to the cytoplasm the position of exon-exon junctions. *EMBO J*, **20**, 2062-2068.
- King, M.L., Messitt, T.J. und Mowry, K.L. (2005) Putting RNAs in the right place at the right time: RNA localization in the frog oocyte. *Biol Cell*, **97**, 19-33.

- Kloc, M., Zearfoss, N.R. und Etkin, L.D. (2002) Mechanisms of subcellular mRNA localization. *Cell*, **108**, 533-544.
- Koushika, S.P., Lisbin, M.J. und White, K. (1996) ELAV, a *Drosophila* neuron-specific protein, mediates the generation of an alternatively spliced neural protein isoform. *Curr Biol*, **6**, 1634-1641.
- Kozlov, G., De Crescenzo, G., Lim, N.S., Siddiqui, N., Fantus, D., Kahvejian, A., Trempe, J.F., Elias, D., Ekiel, I., Sonenberg, N., O'Connor-McCourt, M. und Gehring, K. (2004) Structural basis of ligand recognition by PABC, a highly specific peptide-binding domain found in poly(A)-binding protein and a HECT ubiquitin ligase. *EMBO J*, **23**, 272-281.
- Kozlov, G., Siddiqui, N., Coillet-Matillon, S., Trempe, J.F., Ekiel, I., Sprules, T. und Gehring, K. (2002) Solution structure of the orphan PABC domain from *Saccharomyces cerevisiae* poly(A)-binding protein. *J Biol Chem*, **277**, 22822-22828.
- Kozlov, G., Trempe, J.F., Khaleghpour, K., Kahvejian, A., Ekiel, I. und Gehring, K. (2001) Structure and function of the C-terminal PABC domain of human poly(A)-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 4409-4413.
- Kraemer, B., Crittenden, S., Gallegos, M., Moulder, G., Barstead, R., Kimble, J. und Wickens, M. (1999) NANOS-3 and FBF proteins physically interact to control the sperm-oocyte switch in *Caenorhabditis elegans*. *Curr Biol*, **9**, 1009-1018.
- Kress, T.L., Yoon, Y.J. und Mowry, K.L. (2004) Nuclear RNP complex assembly initiates cytoplasmic RNA localization. *J Cell Biol*, **165**, 203-211.
- Krüger, J., Loubradou, G., Regenfelder, E., Hartmann, A. und Kahmann, R. (1998) Crosstalk between cAMP and pheromone signalling pathways in *Ustilago maydis*. *Mol Gen Genet*, **260**, 193-198.
- Kuersten, S. und Goodwin, E.B. (2003) The power of the 3' UTR: translational control and development. *Nat Rev Genet*, **4**, 626-637.
- Kuhn, U. und Pieler, T. (1996) *Xenopus* poly(A) binding protein: functional domains in RNA binding and protein-protein interaction. *J Mol Biol*, **256**, 20-30.
- Kumar, S., Tamura, K., Jakobsen, I.B. und Nei, M. (2001) MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software. *Bioinformatics*, **17**, 1244-1245.
- Ladendorf, O. (2002) Transposition und heterologe Genexpression in *Ustilago maydis*. *Fachbereich Biologie*. Philipps-Universität, Marburg.
- Lau, C.K., Diem, M.D., Dreyfuss, G. und Van Duyne, G.D. (2003) Structure of the Y14-Magoh core of the exon junction complex. *Curr Biol*, **13**, 933-941.
- Le Hir, H., Izaurralde, E., Maquat, L.E. und Moore, M.J. (2000) The spliceosome deposits multiple proteins 20-24 nucleotides upstream of mRNA exon-exon junctions. *EMBO J*, **19**, 6860-6869.
- Le Hir, H., Moore, M.J. und Maquat, L.E. (2000) Pre-mRNA splicing alters mRNP composition: evidence for stable association of proteins at exon-exon junctions. *Genes Dev*, **14**, 1098-1108.
- Lehmler, C., Steinberg, G., Snetselaar, K.M., Schliwa, M., Kahmann, R. und Bölker, M. (1997) Identification of a motor protein required for filamentous growth in *Ustilago maydis*. *EMBO J*, **16**, 3464-3473.

- Letunic, I., Copley, R.R., Schmidt, S., Ciccarelli, F.D., Doerks, T., Schultz, J., Ponting, C.P. und Bork, P. (2004) SMART 4.0: towards genomic data integration. *Nucleic Acids Res*, **32 Database issue**, D142-144.
- Levine, T.D., Gao, F., King, P.H., Andrews, L.G. und Keene, J.D. (1993) Hel-N1: an autoimmune RNA-binding protein with specificity for 3' uridylyate-rich untranslated regions of growth factor mRNAs. *Mol Cell Biol*, **13**, 3494-3504.
- Lewis, H.A., Chen, H., Edo, C., Buckanovich, R.J., Yang, Y.Y., Musunuru, K., Zhong, R., Darnell, R.B. und Burley, S.K. (1999) Crystal structures of Nova-1 and Nova-2 K-homology RNA-binding domains. *Structure Fold Des*, **7**, 191-203.
- Lewis, H.A., Musunuru, K., Jensen, K.B., Edo, C., Chen, H., Darnell, R.B. und Burley, S.K. (2000) Sequence-specific RNA binding by a Nova KH domain: implications for paraneoplastic disease and the fragile X syndrome. *Cell*, **100**, 323-332.
- Lewis, R.A., Kress, T.L., Cote, C.A., Gautreau, D., Rokop, M.E. und Mowry, K.L. (2004) Conserved and clustered RNA recognition sequences are a critical feature of signals directing RNA localization in *Xenopus* oocytes. *Mech Dev*, **121**, 101-109.
- Li, A.M., Watson, A. und Fridovich-Keil, J.L. (2003) Scp160p associates with specific mRNAs in yeast. *Nucleic Acids Res*, **31**, 1830-1837.
- Lisbin, M.J., Gordon, M., Yannoni, Y.M. und White, K. (2000) Function of RRM domains of *Drosophila melanogaster* ELAV: Rnp1 mutations and rrm domain replacements with ELAV family proteins and SXL. *Genetics*, **155**, 1789-1798.
- Luitjens, C., Gallegos, M., Kraemer, B., Kimble, J. und Wickens, M. (2000) CPEB proteins control two key steps in spermatogenesis in *C. elegans*. *Genes Dev*, **14**, 2596-2609.
- Ma, W.J., Chung, S. und Furneaux, H. (1997) The Elav-like proteins bind to AU-rich elements and to the poly(A) tail of mRNA. *Nucleic Acids Res*, **25**, 3564-3569.
- Macchi, P., Brownawell, A.M., Grunewald, B., DesGroseillers, L., Macara, I.G. und Kiebler, M.A. (2004) The brain-specific double-stranded RNA-binding protein Staufen2: nucleolar accumulation and isoform-specific exportin-5-dependent export. *J Biol Chem*, **279**, 31440-31444.
- Mallardo, M., Deitinghoff, A., Muller, J., Goetze, B., Macchi, P., Peters, C. und Kiebler, M.A. (2003) Isolation and characterization of Staufen-containing ribonucleoprotein particles from rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 2100-2105.
- Mangus, D.A., Amrani, N. und Jacobson, A. (1998) Pbp1p, a factor interacting with *Saccharomyces cerevisiae* poly(A)-binding protein, regulates polyadenylation. *Mol Cell Biol*, **18**, 7383-7396.
- Maniatis, T. und Reed, R. (2002) An extensive network of coupling among gene expression machines. *Nature*, **416**, 499-506.
- Mansfield, E., Hersperger, E., Biggs, J. und Shearn, A. (1994) Genetic and molecular analysis of hyperplastic discs, a gene whose product is required for regulation of cell proliferation in *Drosophila melanogaster* imaginal discs and germ cells. *Dev Biol*, **165**, 507-526.
- Marck, C. (1988) 'DNA Strider': a 'C' program for the fast analysis of DNA and protein sequences on the Apple Macintosh family of computers. *Nucleic Acids Res*, **16**, 1829-1836.
- Mazumder, B., Seshadri, V. und Fox, P.L. (2003) Translational control by the 3'-UTR: the ends specify the means. *Trends Biochem Sci*, **28**, 91-98.

- McGuffin, L.J., Bryson, K. und Jones, D.T. (2000) The PSIPRED protein structure prediction server. *Bioinformatics*, **16**, 404-405.
- Melo, E.O., Dhalia, R., Martins de Sa, C., Standart, N. und de Melo Neto, O.P. (2003) Identification of a C-terminal poly(A)-binding protein (PABP)-PABP interaction domain: role in cooperative binding to poly (A) and efficient cap distal translational repression. *J Biol Chem*, **278**, 46357-46368.
- Mendelsohn, B.A., Li, A.M., Vargas, C.A., Riehm, K., Watson, A. und Fridovich-Keil, J.L. (2003) Genetic and biochemical interactions between SCP160 and EAP1 in yeast. *Nucleic Acids Res*, **31**, 5838-5847.
- Mian, I.S. (1997) Comparative sequence analysis of ribonucleases HII, III, II PH and D. *Nucleic Acids Res*, **25**, 3187-3195.
- Mohr, S.E., Dillon, S.T. und Boswell, R.E. (2001) The RNA-binding protein Tsunagi interacts with Mago Nashi to establish polarity and localize *oskar* mRNA during *Drosophila* oogenesis. *Genes Dev*, **15**, 2886-2899.
- Mowry, K.L. und Cote, C.A. (1999) RNA sorting in *Xenopus* oocytes and embryos. *Faseb J*, **13**, 435-445.
- Müller, D., Rehbein, M., Baumeister, H. und Richter, D. (1992) Molecular characterization of a novel rat protein structurally related to poly(A) binding proteins and the 70K protein of the U1 small nuclear ribonucleoprotein particle (snRNP). *Nucleic Acids Res*, **20**, 1471-1475.
- Musco, G., Kharrat, A., Stier, G., Fraternali, F., Gibson, T.J., Nilges, M. und Pastore, A. (1997) The solution structure of the first KH domain of FMR1, the protein responsible for the fragile X syndrome. *Nat Struct Biol*, **4**, 712-716.
- Musco, G., Stier, G., Joseph, C., Castiglione Morelli, M.A., Nilges, M., Gibson, T.J. und Pastore, A. (1996) Three-dimensional structure and stability of the KH domain: molecular insights into the fragile X syndrome. *Cell*, **85**, 237-245.
- Nagai, K., Oubridge, C., Jessen, T.H., Li, J. und Evans, P.R. (1990) Crystal structure of the RNA-binding domain of the U1 small nuclear ribonucleoprotein A. *Nature*, **348**, 515-520.
- Nakamura, A., Sato, K. und Hanyu-Nakamura, K. (2004) *Drosophila* cup is an eIF4E binding protein that associates with Bruno and regulates *oskar* mRNA translation in oogenesis. *Dev Cell*, **6**, 69-78.
- Nicholas, K.B., Nicholas, H.B., Jr. und Deerfield, D.W., II. (1997) GeneDoc: Analysis and Visualization of Genetic Variation. *EMBNEW.NEWS*, **4**.
- Niessing, D., Huttelmaier, S., Zenklusen, D., Singer, R.H. und Burley, S.K. (2004) She2p is a novel RNA binding protein with a basic helical hairpin motif. *Cell*, **119**, 491-502.
- Olivas, W. und Parker, R. (2000) The Puf3 protein is a transcript-specific regulator of mRNA degradation in yeast. *EMBO J*, **19**, 6602-6611.
- Oubridge, C., Ito, N., Evans, P.R., Teo, C.H. und Nagai, K. (1994) Crystal structure at 1.92 Å resolution of the RNA-binding domain of the U1A spliceosomal protein complexed with an RNA hairpin. *Nature*, **372**, 432-438.
- Palacios, I.M., Gatfield, D., St Johnston, D. und Izaurralde, E. (2004) An eIF4AIII-containing complex required for mRNA localization and nonsense-mediated mRNA decay. *Nature*, **427**, 753-757.

- Palacios, I.M. und St Johnston, D. (2001) Getting the message across: the intracellular localization of mRNAs in higher eukaryotes. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **17**, 569-614.
- Palacios, I.M. und St Johnston, D. (2002) Kinesin light chain-independent function of the Kinesin heavy chain in cytoplasmic streaming and posterior localisation in the *Drosophila* oocyte. *Development*, **129**, 5473-5485.
- Perrone-Bizzozero, N. und Bolognani, F. (2002) Role of HuD and other RNA-binding proteins in neural development and plasticity. *J Neurosci Res*, **68**, 121-126.
- Plenz, G., Kugler, S., Schnittger, S., Rieder, H., Fonatsch, C. und Muller, P.K. (1994) The human vigilin gene: identification, chromosomal localization and expression pattern. *Hum Genet*, **93**, 575-582.
- Price, S.R., Evans, P.R. und Nagai, K. (1998) Crystal structure of the spliceosomal U2B''-U2A' protein complex bound to a fragment of U2 small nuclear RNA. *Nature*, **394**, 645-650.
- Puhalla, J.E. (1968) Compatibility reactions on solid medium and interstrain inhibition in *Ustilago maydis*. *Genetics*, **60**, 461-474.
- Query, C.C., Bentley, R.C. und Keene, J.D. (1989) A specific 31-nucleotide domain of U1 RNA directly interacts with the 70K small nuclear ribonucleoprotein component. *Mol Cell Biol*, **9**, 4872-4881.
- Ramos, A., Grunert, S., Adams, J., Micklem, D.R., Proctor, M.R., Freund, S., Bycroft, M., St Johnston, D. und Varani, G. (2000) RNA recognition by a Staufien double-stranded RNA-binding domain. *EMBO J*, **19**, 997-1009.
- Reed, R. und Hurt, E. (2002) A conserved mRNA export machinery coupled to pre-mRNA splicing. *Cell*, **108**, 523-531.
- Roy, G., De Crescenzo, G., Khaleghpour, K., Kahvejian, A., O'Connor-McCourt, M. und Sonenberg, N. (2002) Paip1 interacts with poly(A) binding protein through two independent binding motifs. *Mol Cell Biol*, **22**, 3769-3782.
- Ruiz-Echevarria, M.J. und Peltz, S.W. (2000) The RNA binding protein Pub1 modulates the stability of transcripts containing upstream open reading frames. *Cell*, **101**, 741-751.
- Ryter, J.M. und Schultz, S.C. (1998) Molecular basis of double-stranded RNA-protein interactions: structure of a dsRNA-binding domain complexed with dsRNA. *EMBO J*, **17**, 7505-7513.
- Sachs, M.S. (1998) Posttranscriptional control of gene expression in filamentous fungi. *Fungal Genet Biol*, **23**, 117-124.
- Sambrook, J., Frisch, E.F. und Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York.
- Sayle, R.A. und Milner-White, E.J. (1995) RASMOL: biomolecular graphics for all. *Trends Biochem Sci*, **20**, 374.
- Schell, T., Kulozik, A.E. und Hentze, M.W. (2002) Integration of splicing, transport and translation to achieve mRNA quality control by the nonsense-mediated decay pathway. *Genome Biol*, **3**, REVIEWS1006.
- Scherly, D., Boelens, W., Dathan, N.A., van Venrooij, W.J. und Mattaj, I.W. (1990) Major determinants of the specificity of interaction between small nuclear ribonucleoproteins U1A and U2B'' and their cognate RNAs. *Nature*, **345**, 502-506.

- Scherly, D., Dathan, N.A., Boelens, W., van Venrooij, W.J. und Mattaj, I.W. (1990) The U2B" RNP motif as a site of protein-protein interaction. *EMBO J*, **9**, 3675-3681.
- Schmidt, C., Henkel, B., Poschl, E., Zorbas, H., Purschke, W.G., Gloe, T.R. und Muller, P.K. (1992) Complete cDNA sequence of chicken vigilin, a novel protein with amplified and evolutionary conserved domains. *Eur J Biochem*, **206**, 625-634.
- Schnorrer, F., Bohmann, K. und Nusslein-Volhard, C. (2000) The molecular motor dynein is involved in targeting swallow and bicoid RNA to the anterior pole of *Drosophila* oocytes. *Nat Cell Biol*, **2**, 185-190.
- Schultz, J., Milpetz, F., Bork, P. und Ponting, C.P. (1998) SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 5857-5864.
- Schulz, B., Banuett, F., Dahl, M., Schlesinger, R., Schafer, W., Martin, T., Herskowitz, I. und Kahmann, R. (1990) The *b* alleles of *U. maydis*, whose combinations program pathogenic development, code for polypeptides containing a homeodomain-related motif. *Cell*, **60**, 295-306.
- Sengupta, D.J., Wickens, M. und Fields, S. (1999) Identification of RNAs that bind to a specific protein using the yeast three-hybrid system. *Rna*, **5**, 596-601.
- Shepard, K.A., Gerber, A.P., Jambhekar, A., Takizawa, P.A., Brown, P.O., Herschlag, D., DeRisi, J.L. und Vale, R.D. (2003) Widespread cytoplasmic mRNA transport in yeast: identification of 22 bud-localized transcripts using DNA microarray analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 11429-11434.
- Shi, H. und Xu, R.M. (2003) Crystal structure of the *Drosophila* Mago nashi-Y14 complex. *Genes Dev*, **17**, 971-976.
- Siddiqui, N., Kozlov, G., D'Orso, I., Trempe, J.F. und Gehring, K. (2003) Solution structure of the C-terminal domain from poly(A)-binding protein in *Trypanosoma cruzi*: a vegetal PABC domain. *Protein Sci*, **12**, 1925-1933.
- Siomi, H., Matunis, M.J., Michael, W.M. und Dreyfuss, G. (1993) The pre-mRNA binding K protein contains a novel evolutionarily conserved motif. *Nucleic Acids Res*, **21**, 1193-1198.
- Smith, J.L., Wilson, J.E. und Macdonald, P.M. (1992) Overexpression of *oskar* directs ectopic activation of *nanos* and presumptive pole cell formation in *Drosophila* embryos. *Cell*, **70**, 849-859.
- Snee, M.J. und Macdonald, P.M. (2004) Live imaging of nuage and polar granules: evidence against a precursor-product relationship and a novel role for Oskar in stabilization of polar granule components. *J Cell Sci*, **117**, 2109-2120.
- Snetselaar, K.M., Bölker, M. und Kahmann, R. (1996) *Ustilago maydis* mating hyphae orient their growth toward pheromone sources. *Fungal Genet Biol*, **20**, 299-312.
- Snetselaar, K.M. und Mims, C.W. (1992) Sporidial fusion and infection of maize seedlings by the smut fungus *Ustilago maydis*. *Mycologia*, **84**, 193-203.
- Soller, M. und White, K. (2003) ELAV inhibits 3'-end processing to promote neural splicing of *ewg* pre-mRNA. *Genes Dev*, **17**, 2526-2538.
- Sonoda, J. und Wharton, R.P. (1999) Recruitment of Nanos to *hunchback* mRNA by Pumilio. *Genes Dev*, **13**, 2704-2712.

- Sonoda, J. und Wharton, R.P. (2001) *Drosophila* Brain Tumor is a translational repressor. *Genes Dev*, **15**, 762-773.
- Sosnowski, B.A., Belote, J.M. und McKeown, M. (1989) Sex-specific alternative splicing of RNA from the transformer gene results from sequence-dependent splice site blockage. *Cell*, **58**, 449-459.
- Southern, E.M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol*, **98**, 503-517.
- Souza, G.M., da Silva, A.M. und Kuspa, A. (1999) Starvation promotes *Dictyostelium* development by relieving PufA inhibition of PKA translation through the YakA kinase pathway. *Development*, **126**, 3263-3274.
- Spellig, T., Bölker, M., Lottspeich, F., Frank, R.W. und Kahmann, R. (1994) Pheromones trigger filamentous growth in *Ustilago maydis*. *EMBO J*, **13**, 1620-1627.
- Spellig, T., Bottin, A. und Kahmann, R. (1996) Green fluorescent protein (GFP) as a new vital marker in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Mol Gen Genet*, **252**, 503-509.
- St Johnston, D., Brown, N.H., Gall, J.G. und Jantsch, M. (1992) A conserved double-stranded RNA-binding domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 10979-10983.
- St Johnston, D., Driever, W., Berleth, T., Richstein, S. und Nusslein-Volhard, C. (1989) Multiple steps in the localization of bicoid RNA to the anterior pole of the *Drosophila* oocyte. *Development*, **107 Suppl**, 13-19.
- Steinberg, G., Schliwa, M., Lehmler, C., Bölker, M., Kahmann, R. und McIntosh, J.R. (1998) Kinesin from the plant pathogenic fungus *Ustilago maydis* is involved in vacuole formation and cytoplasmic migration. *J Cell Sci*, **111 (Pt 15)**, 2235-2246.
- Steinberg, G., Wedlich-Söldner, R., Brill, M. und Schulz, I. (2001) Microtubules in the fungal pathogen *Ustilago maydis* are highly dynamic and determine cell polarity. *J Cell Sci*, **114**, 609-622.
- Steinmetz, E.J., Conrad, N.K., Brow, D.A. und Corden, J.L. (2001) RNA-binding protein Nrd1 directs poly(A)-independent 3'-end formation of RNA polymerase II transcripts. *Nature*, **413**, 327-331.
- Straube, A., Brill, M., Oakley, B.R., Horio, T. und Steinberg, G. (2003) Microtubule organization requires cell cycle-dependent nucleation at dispersed cytoplasmic sites: polar and perinuclear microtubule organizing centers in the plant pathogen *Ustilago maydis*. *Mol Biol Cell*, **14**, 642-657.
- Straube, A., Enard, W., Berner, A., Wedlich-Söldner, R., Kahmann, R. und Steinberg, G. (2001) A split motor domain in a cytoplasmic dynein. *EMBO J*, **20**, 5091-5100.
- Sudbery, P.E. (2001) The germ tubes of *Candida albicans* hyphae and pseudohyphae show different patterns of septin ring localization. *Mol Microbiol*, **41**, 19-31.
- Szabo, Z., Tonnis, M., Kessler, H. und Feldbrügge, M. (2002) Structure-function analysis of lipopeptide pheromones from the plant pathogen *Ustilago maydis*. *Mol Genet Genomics*, **268**, 362-370.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. und Higgins, D.G. (1997) The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res*, **25**, 4876-4882.

- Toews, M.W., Warmbold, J., Konzack, S., Rischitor, P., Veith, D., Vienken, K., Vinuesa, C., Wei, H. und Fischer, R. (2004) Establishment of mRFP1 as a fluorescent marker in *Aspergillus nidulans* and construction of expression vectors for high-throughput protein tagging using recombination in vitro (GATEWAY). *Curr Genet*, **45**, 383-389.
- Tsukahara, K., Yamamoto, H. und Okayama, H. (1998) An RNA binding protein negatively controlling differentiation in fission yeast. *Mol Cell Biol*, **18**, 4488-4498.
- Tsukuda, T., Carleton, S., Fotheringham, S. und Holloman, W.K. (1988) Isolation and characterization of an autonomously replicating sequence from *Ustilago maydis*. *Mol Cell Biol*, **8**, 3703-3709.
- Ule, J., Jensen, K.B., Ruggiu, M., Mele, A., Ule, A. und Darnell, R.B. (2003) CLIP identifies Nova-regulated RNA networks in the brain. *Science*, **302**, 1212-1215.
- Urani, C., Chiesara, E., Galvani, P., Marabini, L., Santagostino, A. und Camatini, M. (1995) Benomyl affects the microtubule cytoskeleton and the glutathione level of mammalian primary cultured hepatocytes. *Toxicol Lett*, **76**, 135-144.
- Varani, G. und Nagai, K. (1998) RNA recognition by RNP proteins during RNA processing. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, **27**, 407-445.
- Vasudevan, S. und Peltz, S.W. (2001) Regulated ARE-mediated mRNA decay in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell*, **7**, 1191-1200.
- Vilela, C. und McCarthy, J.E. (2003) Regulation of fungal gene expression via short open reading frames in the mRNA 5'untranslated region. *Mol Microbiol*, **49**, 859-867.
- Villace, P., Marion, R.M. und Ortin, J. (2004) The composition of Staufen-containing RNA granules from human cells indicates their role in the regulated transport and translation of messenger RNAs. *Nucleic Acids Res*, **32**, 2411-2420.
- Wan, L., Kim, J.K., Pollard, V.W. und Dreyfuss, G. (2001) Mutational definition of RNA-binding and protein-protein interaction domains of heterogeneous nuclear RNP C1. *J Biol Chem*, **276**, 7681-7688.
- Wang, X., McLachlan, J., Zamore, P.D. und Hall, T.M. (2002) Modular recognition of RNA by a human Pumilio-homology domain. *Cell*, **110**, 501-512.
- Wang, X. und Tanaka Hall, T.M. (2001) Structural basis for recognition of AU-rich element RNA by the HuD protein. *Nat Struct Biol*, **8**, 141-145.
- Wang, X., Zamore, P.D. und Hall, T.M. (2001) Crystal structure of a Pumilio homology domain. *Mol Cell*, **7**, 855-865.
- Warena, A.J. und Konopka, J.B. (2002) Septin function in *Candida albicans* morphogenesis. *Mol Biol Cell*, **13**, 2732-2746.
- Weber, I. (2004) Die Bedeutung von Myo5 für das polare Wachstum, die pathogene Entwicklung und den Transport polarer Chitinsynthasen in *Ustilago maydis*. *Fachbereich Biologie*. Philipps-Universität, Marburg, p. 125.
- Weber, I., Gruber, C. und Steinberg, G. (2003) A class-V myosin required for mating, hyphal growth, and pathogenicity in the dimorphic plant pathogen *Ustilago maydis*. *Plant Cell*, **15**, 2826-2842.

- Weber, V., Wernitznig, A., Hager, G., Harata, M., Frank, P. und Wintersberger, U. (1997) Purification and nucleic-acid-binding properties of a *Saccharomyces cerevisiae* protein involved in the control of ploidy. *Eur J Biochem*, **249**, 309-317.
- Webster, P.J., Liang, L., Berg, C.A., Lasko, P. und Macdonald, P.M. (1997) Translational repressor Bruno plays multiple roles in development and is widely conserved. *Genes Dev*, **11**, 2510-2521.
- Wedlich-Söldner, R., Schulz, I., Straube, A. und Steinberg, G. (2002) Dynein supports motility of endoplasmic reticulum in the fungus *Ustilago maydis*. *Mol Biol Cell*, **13**, 965-977.
- Wedlich-Söldner, R., Straube, A., Friedrich, M.W. und Steinberg, G. (2002) A balance of KIF1A-like kinesin and dynein organizes early endosomes in the fungus *Ustilago maydis*. *EMBO J*, **21**, 2946-2957.
- Weinzierl, G. (2001) Isolierung und Charakterisierung der *b*-vermittelten Regulationskaskade in *Ustilago maydis*. *Fachbereich Biologie*. Philipps-Universität, Marburg.
- Wharton, R.P., Sonoda, J., Lee, T., Patterson, M. und Murata, Y. (1998) The Pumilio RNA-binding domain is also a translational regulator. *Mol Cell*, **1**, 863-872.
- Wickens, M., Bernstein, D.S., Kimble, J. und Parker, R. (2002) A PUF family portrait: 3'UTR regulation as a way of life. *Trends Genet*, **18**, 150-157.
- Wilhelm, J.E., Hilton, M., Amos, Q. und Henzel, W.J. (2003) Cup is an eIF4E binding protein required for both the translational repression of *oskar* and the recruitment of Barentsz. *J Cell Biol*, **163**, 1197-1204.
- Wintersberger, U., Kuhne, C. und Karwan, A. (1995) Scp160p, a new yeast protein associated with the nuclear membrane and the endoplasmic reticulum, is necessary for maintenance of exact ploidy. *Yeast*, **11**, 929-944.
- Wittekind, M., Gorlach, M., Friedrichs, M., Dreyfuss, G. und Mueller, L. (1992) ¹H, ¹³C, and ¹⁵N NMR assignments and global folding pattern of the RNA-binding domain of the human hnRNP C proteins. *Biochemistry*, **31**, 6254-6265.
- Yoon, Y.J. und Mowry, K.L. (2004) *Xenopus* Staufen is a component of a ribonucleoprotein complex containing *Vg1* RNA and kinesin. *Development*, **131**, 3035-3045.
- Zamore, P.D., Williamson, J.R. und Lehmann, R. (1997) The Pumilio protein binds RNA through a conserved domain that defines a new class of RNA-binding proteins. *Rna*, **3**, 1421-1433.
- Zhang, B., Gallegos, M., Puoti, A., Durkin, E., Fields, S., Kimble, J. und Wickens, M.P. (1997) A conserved RNA-binding protein that regulates sexual fates in the *C. elegans* hermaphrodite germ line. *Nature*, **390**, 477-484.
- Zhang, J., Li, S., Fischer, R. und Xiang, X. (2003) Accumulation of cytoplasmic dynein and dynactin at microtubule plus ends in *Aspergillus nidulans* is kinesin dependent. *Mol Biol Cell*, **14**, 1479-1488.
- Zhang, W.J. und Wu, J.Y. (1998) Sip1, a novel RS domain-containing protein essential for pre-mRNA splicing. *Mol Cell Biol*, **18**, 676-684.
- Zhao, W.M., Jiang, C., Kroll, T.T. und Huber, P.W. (2001) A proline-rich protein binds to the localization element of *Xenopus Vg1* mRNA and to ligands involved in actin polymerization. *EMBO J*, **20**, 2315-2325.

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

ABB. 1-1	Der Lebenszyklus von <i>Ustilago maydis</i>	3
ABB. 1-2	Struktureller Vergleich von verschiedenen RNA-Bindedomänen komplexiert mit RNA	7
ABB. 1-3	Kristallstruktur des PUM-Repeats	10
ABB. 2-1	Schematische Darstellung der modularen Struktur der RNA-bindenden Proteinen aus <i>U. maydis</i>	20
ABB. 2-2	Die Antwort der Deletionsstämmen auf extern zugegebenes cAMP ⁹	25
ABB. 2-3	Deletion von <i>khd4</i> in haploiden Sporidien	27
ABB. 2-4	Kreuzungsverhalten der <i>khd4Δ</i> Stämmen	27
ABB. 2-5	Defekte von <i>khd4Δ</i> Stämmen im Konfrontationstest	28
ABB. 2-6	Die <i>khd4Δ</i> Mutante zeigt eine reduzierte Pheromonsekretion ⁸	28
ABB. 2-7	Pheromonstimulation von FB1 und FB1 <i>khd4Δ</i> ⁷	29
ABB. 2-8	<i>khd4</i> spielt bei der Ausbildung von Filamenten eine Rolle	31
ABB. 2-9	<i>rrm4</i> ist wichtig für die einwandfreie Ausbildung von b-abhängigen Filamenten	33
ABB. 2-10	Rrm4 hat keinen Einfluss auf die Konjugationshyphenbildung	34
ABB. 2-11	<i>rrm4Δ</i> Stämme sind in ihrer Virulenz beeinträchtigt	35
ABB. 2-12	Auch die Deletion des gesamten offenen Leserahmens von <i>rrm4</i> führt zu verkürzten Filamenten	36
ABB. 2-13	Das filamentöse Wachstum verschiedener <i>rrm4</i> Mutanten im Vergleich	37
ABB. 2-14	Die Deletion von <i>rrm4</i> verhindert die Bildung leerer Abschnitte und beeinflusst die Polarität der Zellen	40
ABB. 2-15	Wachstumsverhalten von <i>rrm4</i> Mutanten im Vergleich zum Ausgangsstamm AB33	40
ABB. 2-16	Rrm4-eGfp akkumuliert in bewegten Partikeln	42
ABB. 2-17	Die Partikelbildung ist mikrotubuliabhängig	43
ABB. 2-18	Rrm4-mRfp-Bewegung entlang des Mikrotubulizytoskeletts	44
ABB. 2-19	Kernmigration im Filament ist unabhängig von Rrm4	46
ABB. 2-20	Die Deletion von <i>kin2</i> führt zu eine Lokalisation von Rrm4-eGfp in der Hyphenspitze	47
ABB. 2-21	Struktur und Sequenz der PABC-Domäne	49

Abb. 2-22	Zelluläre Lokalisation der Rrm4 ^{Dpabc} -eGfp bzw. Rrm4 ^{mFIAK} -eGfp Fusionsproteine	50
Abb. 2-23	Mutationen im RNP1-Submotiv der RRM-Domänen	51
Abb. 2-24	Zelluläre Lokalisation der Rrm4-eGfp Mutantenproteine	52
Abb. 3-1	Phylogenetisches Dendrogramm ausgewählter Pumilio-ähnlicher Proteine aus Pilzen . . .	57
Abb. 3-2	Phylogenetisches Dendrogramm ausgewählter KHD-Proteine	60
Abb. 3-3	Domänenarchitektur von ELAV-ähnlichen und Poly[A]-bindenden Proteinen	65
Abb. 3-4	Modellvorstellungen zur Rrm4-abhängigen RNA-Lokalisation in <i>U. maydis</i>	73
Abb. 4-1	Strategie zum Erzeugen von Gendeletionsmutanten	95

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 2-1	RNA-bindende Proteine in <i>U. maydis</i>	21
Tabelle 2-2	Phänotypisierung der PUM-, KHD- und RRM-Deletionsstämmen ^{8,9}	23
Tabelle 2-3	Pflanzeninfektionen mit PUM-, KHD- und RRM-Deletionsstämmen ^{8,9}	25
Tabelle 3-1	Verbreitung von RBPs aus der PUM-, KHD-, DSRM- und RRM-Protein-Familie.	61
Tabelle 4-1	Oligonukleotide für die Herstellung der Deletionsmutanten	78
Tabelle 4-2	Weitere Oligonukleotide	81
Tabelle 4-3	Oligonukleotide (ausschließlich für Sequenzierzwecke)	81
Tabelle 4-4	Ausgangs- und Teststämmen	82
Tabelle 4-5	Für den revers-genetischen Ansatz dieser Arbeit hergestellte Stämme	82
Tabelle 4-6	Für die Untersuchung von Rrm4 hergestellte Stämme	83
Tabelle A-1	Wachstumsverhalten von <i>rrm4</i> Mutanten.	109



DANKSAGUNG

Ein herzlicher Dank gilt Michael für die großartige Betreuung, die vielen Freiräume, die zahlreichen Diskussionen rund um Rrm4, für seine tatkräftige Unterstützung des Projekts sowie für sein Verständnis und seine Nachsicht. Außerdem danke ich Michael für die Bereitstellung der guten Fee mit ihren drei Wünschen, die allgegenwärtig war.

Regine Kahmann danke ich für die Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe, die Bereitstellung des hervorragenden, wissenschaftlichen Umfelds sowie Anregung und Kritik.

Für die freundliche Bereitschaft der Teilnahme an meiner Prüfungskommission danke ich Frau Kahmann und Frau Renkawitz-Pohl sowie Herrn Bölker und Herrn Maier. Darüber hinaus bedanke ich mich bei Frau Kahmann für die Übernahme des Erstgutachtens und bei Frau Renkawitz-Pohl für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Für eine nette Zeit im Labor, für Diskussionen, Ideen, Hilfestellungen und Ratschläge sowie die Kaffeepausen geht ein großes Dankeschön an das STaR-Lab! Bei Julia möchte ich mich besonders bedanken für ihre stete Unterstützung und Hilfe und für die Klonierungen zahlreicher Deletionskonstrukte. Auch Evelyn gilt ein besonderer Dank für die Unterstützung meines Projekts während ihres Praktikums, in dem die cAMP-Daten erhoben und die Tabelle 2-2 vervollständigt wurden, und für die netten Momente in der Box. Julian und Kathi sei gedankt für die schöne Zusammenarbeit, die konstruktiven Diskussionen und natürlich für die hilfreichen Korrekturen dieser Arbeit! Janine, Florian und Christian möchte ich für die schöne Zusammenarbeit, die Diskussionen und ihren aufmunternden Humor danken.

Darüber hinaus geht mein Dank an das C-Lab für die nette Zusammenarbeit. Für Diskussionen, Anregungen und seine Hilfsbereitschaft geht ein besonderer Dank an Gero Steinberg. Kathrin, Jan F. und Heiko danke ich für ihre Freundschaft und die schöne Zeit hier in Marburg. Heiko danke ich außerdem auch fürs Korrekturlesen, seine Verbesserungsvorschläge und natürlich für die schönen Abende im „Barfuß“ mit der Holzvertäfelung! Ein ganz dickes Dankeschön gilt Isabella für ihre Hilfsbereitschaft und Unterstützung, die Korrekturen und natürlich die vielen schönen Abende in der Capplerstrasse und Dreihausen. Außerdem danke ich dir für deine tolle Freundschaft!

Zum Schluss möchte ich mich ganz herzlich bei meinen Eltern für ihre immer währende Unterstützung bedanken und bei Jessica die in der letzten Phase meiner Promotion immer für mich da war, mich unterstützt und immer wieder aufgebaut hat!



LEBENS LAUF

Philip Becht

geboren am 04. August 1974 in 76887 Bad Bergzabern

SCHULBILDUNG

- 1981–1985 Grundschole Rohrbach
- 1985–1994 Gymnasium der Kooperativen Gesamtschole Bad Bergzabern,
Abschluss: Abitur

STUDIUM

- 10/1994–09/1995 Studium der Chemie an der Universität Kaiserslautern
- 10/1995–06/1998 Studium der Biologie an der Universität Kaiserslautern
Diplom-Vorprüfung im Fach Biologie
- 10/1998–07/1999 Auslands-Studienaufenthalt an der Ben-Gurion-University of the Negev and the
Institute for Agriculture & Applied Biology (Prof. Dr. Y. Mizrahi) in Beer Sheva/
Israel
- 10/1995–12/2001 Studium der Biologie an der Universität Kaiserslautern
Abschluss: Diplom
- 03/2001–10/2001 Diplomarbeit am Institut für Pflanzenphysiologie der Universität Kaiserslautern
(Prof. Dr. H. Kauss) unter der Leitung von PD Dr. R. Tenhaken.
Thema: „Molekulare und funktionelle Untersuchungen am Salicylsäure-induzier-
ten ABC-Transporter GmABC1 aus *Glycine max*“
- 05/2001 Université Neuchatel/Schweiz, Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Enrico Martinoia,
Microarray Untersuchungen, Kooperation im Rahmen der Diplomarbeit

PROMOTION

- seit 01/2002 Doktorarbeit am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie, Marburg, in
der Abteilung von Prof. Dr. R. Kahmann unter der Leitung von Dr. M. Feldbrügge
Thema: „Die Rolle von RNA-bindenden Proteinen bei der pathogenen Entwick-
lung von *Ustilago maydis*“

TÄTIGKEITEN

- 01/1998–12/2001 Freier Mitarbeiter am Pfalzinstitut für Kinder- und Jugendpsychiatrie, Klingen-
münster

SONSTIGES

- 12/2002 Fortbildung für Projektleiter und Beauftragte für die biologische Sicherheit im
Max-Planck-Institut für Biochemie Martinsried

