

**Charakterisierung
der chitinolytischen Maschinerie
aus *Ustilago maydis***

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Thorsten Langner

aus Karlsruhe

Düsseldorf, Mai 2015

aus dem Institut für Mikrobiologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Michael Feldbrügge
Korreferent: Prof. Dr. Joachim Ernst

Tag der mündlichen Prüfung: 22.06.2015

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere an Eides Statt, dass die Dissertation von mir selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist. Die Dissertation wurde in ihrer jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht. Ich habe zuvor keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Ort, Datum

Thorsten Langner

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

Langner, T., Öztürk, M., Hartmann, S., Cord-Landwehr, S., Moerschbacher B.M., Walton, J.D. und Göhre, V. (2015). Chitinases are essential for cell separation in *Ustilago maydis*. *Eukaryotic Cell*. doi:10.1128/EC.00022-15

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von April 2011 bis April 2015 im Institut für Mikrobiologie der Heinrich-Heine-Universität in Düsseldorf unter der Leitung und Betreuung von Herrn Prof. Dr. Michael Feldbrügge durchgeführt.

Zusammenfassung

Die Transition zwischen morphologischen Erscheinungsformen ist ein zentraler Schritt während der Entwicklung vieler Organismen. Im phytopathogenen Basidiomyceten *Ustilago maydis* ist der Wechsel zwischen Hefe-artigem und filamentösem Wachstum entscheidend für die pathogene Entwicklung. Es konnte gezeigt werden, dass das mRNA-bindende Protein Rrm4 während der Etablierung des unipolaren Wachstums eine wichtige Rolle in der Verteilung von mRNAs im Filament spielt. In *rrm4Δ*-Mutanten kommt es zu Defekten in der Sekretion der unkonventionell sekretierten Chitinase Cts1. Obwohl die gesamte Chitinaseaktivität hauptsächlich von Cts1 abzuhängen scheint, konnte ihr keine eindeutige biologische Funktion zugeordnet werden. Neben *cts1* konnten auch mRNAs mitochondrialer Proteine als Ziele von Rrm4 identifiziert werden. *rrm4Δ*-Mutanten weisen eine erhöhte Produktion von mitochondrialem Superoxid auf, was auf Defekte in der Atmungskette schließen lässt. Es wird daher vermutet, dass der Rrm4-abhängige mRNA-Transport die Proteinimportdynamik und die Assemblierung mitochondrialer Atmungskettenkomplexe beeinflusst.

In der vorliegenden Arbeit wurde die chitinolytische Maschinerie von *U. maydis* mit dem Ziel untersucht, die biologische Funktion der Chitinasen zu identifizieren. Dabei konnte gezeigt werden, dass die teilweise redundanten Chitinasen Cts1 und Cts2 während des Hefe-artigen Wachstums Chitin in der Teilungszone abbauen und dadurch zur Zellseparation beitragen. Beide Chitinasen unterscheiden sich jedoch in ihrer Substrat-Schnittstellenpräferenz. Während des filamentösen Wachstums ist lediglich Cts1 aktiv und lokalisiert in spezifischen Mustern vor allem in den leeren Abschnitten des basalen Pols. Auch dort trägt es zum Chitinabbau bei und verhindert ein Aggregieren der Filamente. Der unkonventionelle Sekretionsmechanismus von Cts1 scheint Septierungs-abhängig zu sein, wobei in Filamenten möglicherweise noch ein zweiter Mechanismus besteht.

Neben der chitinolytischen Maschinerie wurde der Einfluss von Rrm4 auf den mitochondrialen Proteinimport untersucht. Die Analyse von Proteinkomplexen der Atmungskette mittels nativer Gelelektrophorese zeigte jedoch keine offensichtlichen Unterschiede in der Größe oder Menge der Komplexe. Die Analyse der Proteinimportdynamik mittels dynamischer Lebendzell-mikroskopie zeigte eine stochastische Mitochondrienbewegung in den Messbereich was die Messung, was die Messung erschwerte. Daher wurden mit mEos2 und sfGfp zwei neue Markerproteine für die Untersuchung dynamischer Prozesse in *U. maydis* etabliert.

Summary

Transition between different morphological shapes is an essential step during development in many organisms. In the phytopathogenic basidiomycete *Ustilago maydis* the transition between yeast-like and filamentous growth is crucial for pathogenic development. It has been shown that the mRNA-binding Protein Rrm4 plays an important role in mRNA-distribution during the establishment of unipolar growth. In *rrm4Δ*-mutants unconventional secretion of the chitinase Cts1 is defective. Although the main chitinase activity relies on Cts1, its biological role is still unknown. Besides *cts1* also mRNAs of mitochondrial Proteins have been identified as targets of Rrm4. *rrm4Δ*-mutants exhibit an increased production of mitochondrial superoxide which implies defects of the respiratory chain. Thus, it is assumed that Rrm4-dependent mRNA-transport affects protein import dynamics and the assembly of respiratory chain complexes.

In this study, the chitinolytic machinery of *U. maydis* was investigated aiming to identify the biological function of chitinases. Thereby it was shown that the partly redundant chitinases Cts1 and Cts2 degrade remnant chitin in the division zone during yeast-like growth and thus contribute to cell separation. However both chitinases differ in their substrate cleavage site specificity. During filamentous growth only Cts1 is active and localizes in specific patterns mainly in the empty sections at the basal pole. There it also contributes to chitin degradation and thereby prevents aggregation of filaments. The unconventional secretion of Cts1 depends on septation events, whereas there might exist a second putative secretion mechanism in filaments.

Besides the chitinolytic machinery, the influence of Rrm4 on mitochondrial protein import was investigated. The analysis of respiratory chain complexes by blue native gel electrophoresis however, did not show differences in the size or amount of the complexes. The analysis of protein import dynamics by live-cell imaging failed due to stochastic long-range motility of mitochondria into the bleaching area. Therefore the fluorescent marker proteins mEos2 and sfGfp were established to investigate dynamic processes in *U. maydis*.

Abkürzungen und Fachbegriffe

° C	Grad Celsius	<i>in vitro</i>	Im Glas (außerhalb lebender Organismen)
µg	Mikrogramm	<i>in vivo</i>	Im lebendigen (organismus)
µl	Mikroliter	kDa	Kilodalton
µm	Mikrometer	l	Liter
Abb.	Abbildung	min	Minuten
AM	Ammonium-Minimalmedium	ml	Mililiter
APS	Ammoniumpersulfat	mm	Milimeter
AS	Aminosäure	mM	Milimolar
ATP	Adenosintri-phosphat	mRNA	Messenger RNA
bp	Basenpaar(e)	mRNP	messenger Ribonukleoprotein
BSA	Bovines Serumalbumin	MS	Massenspektrometrie
bzw.	Beziehungsweise	MT	Mikrotubuli
CBX	Carboxin	MUC	Methylumbelliferyl-Chitobiose/-triose
CM	Vollmedium	MUG	Methylumbelliferyl-Glukosaminid
C-terminal	Carboxy-terminal	MUMDB	MIPS Ustilago maydis Datenbank
CW	Calcofluor-White	Nat	Nourseothricin
D	Delta (Deletion)	NM	Nitrat-Minimalmedium
Da	Dalton	nt	Nukleotid(e)
DIC	<i>Differential interference contrast</i>	N-terminal	Amino-terminal
DIG	Digoxigenin	OD ₆₀₀	Optische Dichte (bei 600 nm)
DNA	Desoxyribonukleinsäure	ORF	Open reading frame
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat	p.a.	Pro analysis, Reinheitsstufe
DTT	Dithiotreitol	PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
ENGase	Endo-β-N-Acetylglukosaminidase	pers.	Persönlich
<i>et al.</i>	Und andere	PNGase	Peptid-β-N-Acetylglukosaminidase
FITC	Fluorescein Isothiocyanat	RNA	Ribonukleinsäure
FRAP	<i>Fluorescence recovery after photobleaching</i>	RT	Raumtemperatur
g	Schwerebeschleunigung	s	Sekunde(n)
G418	Geneticin	<i>subsp.</i>	Subspezies
GFP	Grün fluoreszierendes Protein	Tab.	Tabelle
GH	Glykosylhydrolase	U	Unit (Einheit)
GlcNac	N-Acetyl-Glukosamin	Upm	Umdrehungen pro Minute
GST	Glutathion-Serin-Transferase	UTR	Untranslatierte Region
GZE	Gesamtzellextrakt	UV	Ultraviolett
h	Stunde(n)	v/v	Volumenprozent
H ₂ O _{bid.}	zweifach destilliertes Wasser	w/v	Gewichtprozent
Hyg	Hygromycin	WGA	Weizenkeimagglutinin
Hz	Hertz	WGE	Weizenkeimextrakt
<i>in planta</i>	In der Pflanze	WT	Wildtyp
<i>in situ</i>	Am Ort (natürliche Position)		

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG	V
SUMMARY	VI
ABKÜRZUNGEN UND FACHBEGRIFFE.....	VII
INHALTSVERZEICHNIS.....	VIII
1 EINLEITUNG	1
1.1 <i>Ustilago maydis</i>	1
1.2 Der Lebenszyklus von <i>U. maydis</i>	4
1.3 Die Kontrolle der sexuellen Entwicklung durch Paarungstyp-Loci.....	6
1.3.1 Der <i>a</i> -Locus kontrolliert die Fusion kompatibler Sporidien	6
1.3.2 Der <i>b</i> -Locus als zentraler Regulator der biotrophen Entwicklung.....	7
1.4 Mikrotubuli-abhängiger mRNA-Transport in <i>U. maydis</i>	8
1.5 Chitin und chitinolytische Enzyme.....	10
1.6 Die Chitinasen in <i>U. maydis</i> und ihre Verbindung zum mRNA-Transport	15
1.8 Zielsetzung dieser Arbeit	20
2. ERGEBNISSE	21
2.1 Die Rolle der Chitinasen in <i>U. maydis</i>	21
2.1.1 Die chitinolytische Maschinerie von <i>U. maydis</i>	21
2.1.2 Proteinstruktur-Modellierung der chitinolytischen Enzyme	24
2.1.3 Identifizierung der Chitin-Monooxygenase Cmo1	27
2.1.4 Genetische Charakterisierung von Chitinase-Deletionsmutanten	31
2.1.4.1 Chitinase-Deletionen haben keinen Einfluss auf die Teilungsrate	31
2.1.4.2 Cts1 und Cts2 wirken während der Zellteilung und sind funktionell redundant.....	32
2.1.4.3 Cts1 lokalisiert in der Teilungszone zwischen Mutter- und Tochter-Zelle	36
2.1.4.4 Chitinasen werden für die Etablierung unipolaren Wachstums nicht benötigt	42
2.1.4.5 Die Chitinase Cts1 lokalisiert in Filamenten an der Zellwand leerer Abschnitte.....	45
2.1.4.6 Die Sekretion von Cts1 ist Septierungs-abhängig	48
2.1.4.7 Chitinasen werden für das biotrophe Wachstum nicht benötigt.....	50

2.1.4.8 Chitinasen werden nicht für die ernährungsbedingte Akquisition exogenen Chitins benötigt	53
2.1.4.9 Chitinasen tragen nicht zur Stresstoleranz von <i>U. maydis</i> bei.....	56
2.1.5 Biochemische Charakterisierung des chitinolytischen Repertoires.....	58
2.1.5.1 Cts1 und Cts2 sind in Sporidien aktiv, während in Filamenten lediglich Cts1 aktiv ist ...	59
2.1.5.2 Cts4 ist eine aktive N-Acetyl-Glukosaminidase.....	61
2.1.5.3 Lediglich Cts1 zeigt Aktivität gegenüber MUC ₂ und MUC ₃	62
2.1.5.4 Cts1 und Cts2 unterscheiden sich in ihrer Substratbindung oder Schnittstellenpräferenz	63
2.2 Der Rrm4-abhängige Proteinimport in Mitochondrien	67
2.2.1 Eine Inhibition der Atmungskette führt zum Verlust des filamentösen Wachstums ..	68
2.2.2 Die Deletion von <i>rrm4</i> hat keinen Einfluss auf die Assemblierung der Atmungsketten-Komplexe	69
2.2.3 Untersuchung der Dynamik des mitochondrialen Proteinimports	71
2.2.4 Etablierung neuer, genetisch kodierter Fluoreszenzmarker für die Untersuchung dynamischer Prozesse in <i>U. maydis</i>	74
3. DISKUSSION	80
3.1 Die chitinolytische Maschinerie von <i>U. maydis</i>.....	81
3.1.1 Die Rolle der Chitinasen Cts1 und Cts2 während der Zellteilung von <i>U. maydis</i>	85
3.1.2 Lediglich Cts1 ist während des filamentösen Wachstums aktiv	89
3.1.3 Chitinasen werden für die sexuelle Vermehrung nicht benötigt	92
3.1.4 Chitinasen haben keinen Einfluss auf die Stresstoleranz und die Akquisition von Chitin als C-Quelle.....	94
3.1.5 Cts1 und Cts2 unterscheiden sich in ihrer Wirkungsweise	95
3.1.6 Die Sekretionsmechanismen von Cts1 und Cts2 unterscheiden sich	98
3.2 Der Einfluss von Rrm4 auf die Biogenese von Mitochondrien	107
3.2.1 Filamentöses Wachstum hängt von der Atmungskettenfunktion ab	109
3.2.2 Einfluss von Rrm4 auf den mitochondrialen Proteinimport.....	110
3.2.3 Etablierung neuer Fluoreszenzmarker zur Untersuchung dynamischer Prozesse	112
4. MATERIAL UND METHODEN	115
4.1 Material und Bezugsquellen	115
4.1.1 Chemikalien, Puffer, Lösungen, Enzyme, Kits und Medien	115
4.1.2 Stämme	118
4.1.3 Nukleinsäuren, Oligonukleotide und Plasmide	122
4.1.4 Sonstige Materialien	136

4.2 Mikrobiologische, genetische und Zellbiologische Methoden	137
4.2.1 Arbeiten mit <i>E. coli</i>	137
4.2.2 Arbeiten mit <i>U. maydis</i>	138
4.3 Färbemethoden und Fluoreszenzmikroskopie	142
4.4 Molekularbiologische Standardmethoden	145
4.4.1 Isolierung von Nukleinsäuren	145
4.4.2 Handhabung und <i>in vitro</i> Modifikation von Nukleinsäuren	146
4.4.3 Transfer und Nachweis von DNA auf Membranen	150
4.4.4 Polymerase Kettenreaktion (PCR)	152
4.5 Biochemische Methoden	154
4.5.1 Protein-expression und -präparation	154
4.5.2 Auftrennung und Nachweis von Proteinen	156
4.5.3 Nachweis von Enzymaktivitäten	159
4.6 <i>In silico</i> Methoden	162
4.6.1 DNA- und Protein-Sequenzanalyse	162
4.6.2 Modellierung und Analyse dreidimensionaler Proteinstrukturen	163
5. LITERATURVERZEICHNIS	166
6. ANHANG	194

1 Einleitung

1.1 *Ustilago maydis*

Der phytopathogene Pilz *Ustilago maydis* ist der Erreger des Maisbeulenbrands. Taxonomisch zählt *U. maydis* in der Abteilung der Basidiomyceten (Ständerpilze) zur Unterabteilung der Brandpilze (*Ustilaginomycota*), welche etwa 1500 Arten umfasst. Brandpilze sind vorwiegend Pflanzenparasiten und können insgesamt etwa 4000 Wirtspflanzen befallen. Ein Großteil davon sind Gräser (*Graminaceae*), einschließlich einiger der landwirtschaftlich relevantesten Kulturpflanzen wie Mais (*Zea mays*), Gerste (*Hordeum vulgare*) oder Hirse (*Sorghum spec.*; Begerow *et al.*, 2006; Bakkeren *et al.*, 2008). *U. maydis* zählt zu den fakultativ biotrophen Pilzen und ist für die sexuelle Reproduktion auf seine Wirtspflanze *Z. mays* angewiesen (Christensen, 1963). Neben Kulturmais zählt lediglich Teosinte (*Zea mays subsp. parviglumis* und *Zea mays subsp. mexicana*), die ursprünglichen Wildformen von Mais, zum engen Wirtsspektrum, welches für biotrophe Pilze charakteristisch ist (Banuett, 1992; Doebley, 1992). Die Infektion kann, im Gegensatz zu vielen anderen Brandpilzen, an allen oberirdischen Pflanzenorganen etabliert werden, wobei sie jedoch nach der Penetration lokal begrenzt ist (Schirawski *et al.*, 2010; Doehlemann *et al.*, 2009; Kahmann *et al.*, 2000). Zu den Symptomen zählen, wie bereits 1754 von Charles Bonnet beschrieben (Bonnet, 1754), Chlorosen, Anthocyanosen, sowie die Ausbildung charakteristischer Tumore (Abb. 1.1 A), die in Mexiko unter dem Namen „Cuitlacoche“ als Delikatesse gehandelt werden (Abb. 1.1 B). In den Tumoren reifen die stark melanisierten Teliosporen, welche die Verbreitungsform von *U. maydis* darstellen und wegen ihres schwarzen, rußartigen Erscheinungsbildes namensgebend für die Brandpilze waren (Bölker, 2001; Brefort *et al.*, 2009). Ökonomisch spielt *U. maydis* eine eher untergeordnete Rolle. Zum einen treten die Symptome nur lokal auf und zum anderen fallen die durch *U. maydis* verursachten Ernteaufschläge durch den Einsatz teilweise resistenter Maislinien eher gering aus (Martinez-Espinoza *et al.*, 2002).

Dennoch hat sich *U. maydis* auf Grund seiner Eigenschaften in den letzten Jahrzehnten zu einem der wichtigsten Modellorganismen in der Grundlagenforschung, aber auch in der angewandten Forschung entwickelt (Dean *et al.*, 2012; Feldbrügge *et al.*, 2013). Bereits in den frühen 1960er Jahren wurde *U. maydis* für die Erforschung der homologen Rekombination und von DNA-Reparaturmechanismen genutzt. Vor allem die frühen Arbeiten von Robin Holliday lieferten bahnbrechende Erkenntnisse über die Mechanismen der Rekombination, aus denen das bis heute gültige Modell der „Holliday-Struktur“ hervorging (Abb. 1.1 E; Holliday, 1964; 1967; 2004; Gopaul *et al.*, 1998). Weitere Arbeiten von Holliday und William Holloman identifizierten unter anderem die 3' → 5' Exonuklease Rec1 als eine

zentrale Komponente der DNA-Reparatur (Holliday *et al.*, 1976; Onel *et al.*, 1996). 1996 schlug Ferguson und Holloman das „wandernde D-Loop Modell“ für die DNA-Reparatur durch homologe Rekombination vor (Ferguson und Holloman, 1996). Durch die Entdeckung und funktionelle Charakterisierung des BRCA2-Homologs Brh2, einer weiteren Komponente der DNA-Reparatur, erlangte *U. maydis* zudem medizinische Relevanz. Homozygote Mutationen im *BRCA2*-Gen führen im Menschen zu erhöhtem Brust-, Bauspeicheldrüsen- und Eierstock-Krebsrisiko (Wooster *et al.*, 1995; Marcus *et al.*, 1996; Gayther *et al.*, 1997; King *et al.*, 2003). Die Arbeiten in *U. maydis* konnten wichtige Erkenntnisse über die molekulare Funktionsweise von Brh2 erbringen (Kojic *et al.*, 2002; Mazloun und Holloman, 2009).

Das Genom von *U. maydis* ist vollständig sequenziert und manuell annotiert (Kämper *et al.*, 2006), was revers-genetische Ansätze, aber auch den Einsatz von DNA-Microarrays oder RNA-Sequenzierung erlaubt. Durch das hocheffiziente homologe Rekombinationssystem und den Einsatz dominanter Selektionsmarker ist es außerdem möglich gezielte Deletions- und Insertionsmutanten zu generieren (Holloman *et al.*, 2008; Kahmann und Kämper, 2004; Gold *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 1988; Keon *et al.*, 1991). Ein weiteres, für biotrophe Pilze seltenes, Merkmal von *U. maydis* ist, dass sich axenische Kulturen hervorragend kultivieren lassen. Aber auch die biotrophe Entwicklungsphase lässt sich in *U. maydis* durch einfache Mais-Keimlingsinfektionen studieren. Unter Laborbedingungen lässt sich so der komplette Lebenszyklus in drei bis vier Wochen durchlaufen, was schnelles, genetisches Arbeiten ermöglicht (Perkins, 1949; Holliday, 1961). Der Einsatz genetisch kodierter Fluoreszenzmarker ermöglicht des Weiteren Lokalisations- und Promotor-Studien (Spellig *et al.*, 1996). Durch die Entdeckung und Charakterisierung der Paarungstyp-Loci war es außerdem möglich, haploide, solopathogene Stämme zu entwickeln, die ohne vorhergehende Kreuzung den kompletten Lebenszyklus durchlaufen können (Stamm: SG200; Kämper *et al.*, 2006; Bölker *et al.*, 1995) oder die die artifizielle Induktion filamentösen Wachstums ohne kompatiblen Kreuzungspartner ermöglichen (Stämme: AB31 und AB33; Brachmann *et al.*, 2001).

Durch die Identifizierung von Gen-Clustern, die für Effektorproteine kodieren, entwickelte sich *U. maydis* zu einem der führenden Modelorganismen in der Erforschung von Pathogenitätsfaktoren (Abb. 1.1 C und D; Kämper *et al.*, 2006). Es wurde beobachtet, dass *U. maydis* die Immunantwort der Pflanze auf mehreren Ebenen aktiv unterdrückt (Brefort *et al.*, 2009; Skibbe *et al.*, 2010; Djamei und Kahmann, 2012). So konnte z. B. gezeigt werden, dass der Effektor Pep1 für die Penetration der Wirtspflanze essentiell ist (Doehlemann *et al.*, 2009). Pep1 interagiert dabei mit der Peroxidase POX12 der Wirtspflanze

und inhibiert deren Peroxidaseaktivität (Hemetsberger *et al.*, 2012). Dadurch wird die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies in der Pflanze inhibiert, was die weitere Kolonisierung ermöglicht. Weitere prominente Beispiele kürzlich entdeckter Effektorproteine sind die Chorismatmutase Cmu1 und der putative Lignin-Synthese-Inhibitor Tin2. Cmu1 katalysiert im Cytosol der Wirtspflanze die Reaktion von Chorismat zu Phenylpropanoiden. Dadurch wird das Gleichgewicht zwischen cytosolischem und plastididärem Chorismat verschoben, wodurch weniger Edukte für die Salicylsäure-Synthese vorhanden sind (Djamei *et al.*, 2011). Tin2 fördert hingegen durch eine Stabilisierung der Mais-Kinase ZmTTK1 die Anthocyan-Synthese der Wirtspflanze. Es wird angenommen, dass dadurch die Ausgangsstoffe für die Lignin-Synthese abgeschöpft werden, was die Infektion erleichtert (Tanaka *et al.*, 2014; Brefort *et al.*, 2014).

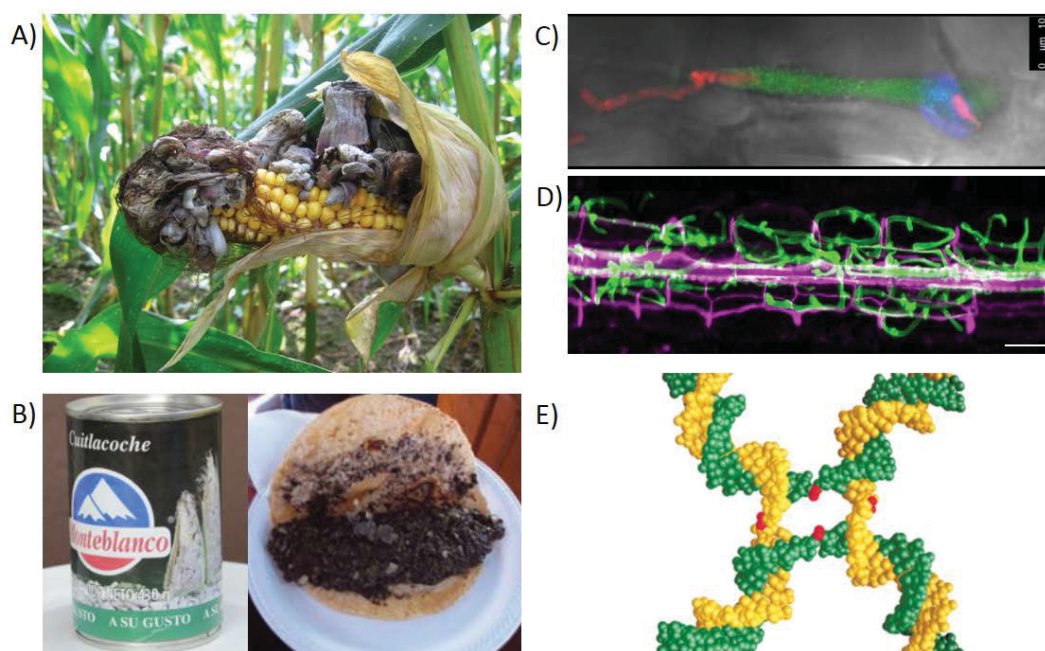


Abb. 1.1: *U. maydis* als Modellorganismus. (A) Tumorbildung durch *U. maydis*. In den Tumoren reifen die schwarzen, stark melanisierten Teliosporen, die Verbreitungsform von *U. maydis*. Foto: Rolf Rösser. (B) In Mexiko und Teilen der USA werden die Tumore unter dem Namen „Cuitlacoche“ als Delikatesse vertrieben. Abbildung aus (Feldbrügge *et al.*, 2013) und (Vollmeister *et al.*, 2012). (C) Während der biotrophen Phase sekretiert *U. maydis* Effektorproteine, die die Kolonisierung der Wirtspflanze ermöglichen. Rot: cytoplasmatisches mCherry; Grün: Pst2:eGfp (Effektorprotein); Blau: Zellkern der Wirtszelle (DAPI-gefärbt). Abbildung aus (Langner, 2010). (D) Proliferation von *U. maydis* entlang der Leitbündel der Wirtspflanze *Z. mays*. Grün: *U. maydis* Filamente (mit WGA-FITC gefärbt); Magenta: Propidium-Jodid gefärbte Pflanzenzellwand. Abbildung aus (Langner, 2010). (E) Schematische Darstellung einer Holliday Struktur, wie sie während des „Crossing-Over“ vorkommt. Abbildung aus (Gopaul *et al.*, 1998).

Auch in der angewandten Forschung hält *U. maydis* seit einigen Jahren Einzug. Durch Untersuchungen des mRNA-Transports in Filamenten (s. Kapitel 1.4) wurde ein unkonventionelles Sekretionssystem entdeckt, durch welches Glykosylierung während der Sekretion

vermieden werden kann (Koepke *et al.*, 2011, Stock *et al.*, 2012). Durch die Entwicklung neuer Expressionsstämme konnte so bereits die Expression und Sekretion aktiver Einzelketten-Antikörper in den Kulturüberstand erzielt und optimiert werden (Stock *et al.*, 2012; Sarkari *et al.*, 2014).

Des Weiteren bietet *U. maydis* hervorragende Eigenschaften als Modellsystem zur Untersuchung genereller zellbiologischer Fragestellungen. Während des dimorphen Lebenszyklus' (s. Kapitel 1.2) ergibt sich die Möglichkeit zur Untersuchung molekularer Mechanismen während des Hefe-artigen sowie filamentösen Wachstums (Steinberg und Perez-Martin, 2008; Bölker, 2001). So konnten in *U. maydis* z.B. Faktoren identifiziert werden, welche für die Septenbildung während der Cytokinese essentiell sind (Weinzierl *et al.*, 2002; Mahlert *et al.*, 2006; Böhmer *et al.*, 2008). Während des filamentösen Wachstums bietet sich *U. maydis* außerdem für die Untersuchung zellulärer Transportprozesse an, auf die an späterer Stelle näher eingegangen wird (Schuchardt *et al.*, 2005; Becht *et al.*, 2006; König *et al.*, 2009; Baumann *et al.*, 2014; Pohlmann, 2013).

1.2 Der Lebenszyklus von *U. maydis*

Der dimorphe Lebenszyklus von *U. maydis* lässt sich in eine saprotrophe und eine biotrophe Phase unterteilen. Während der saprotrophen Phase vermehren sich die haploiden Sporidien Hefe-artig durch Knospung (Abb. 1.2 [1]). Durch Perzeption des Pheromons eines kompatiblen Kreuzungspartners (s. Kapitel 1.3.1) kommt es zur Arretierung des Zellzyklus' in der G2-Phase und zur Ausbildung sog. Konjugationshyphen (García-Muse *et al.*, 2003). Diese wachsen entlang des Pheromon-Konzentrationsgradienten und fusionieren miteinander, wodurch ein dikaryotisches Filament entsteht (Abb. 1.2 [2]), das die pathogene Form von *U. maydis* darstellt (Snetselaar *et al.*, 1996; Spellig *et al.*, 1994; Christensen, 1963; Snetselaar und Mims, 1992; Snetselaar und Mims, 1994). Der Zellzyklusarrest bleibt während dieser Phase weiterhin bestehen. Das Filament wächst nun unipolar, während am basalen Pol Vakuolen akkumulieren und in regelmäßigen Abständen Septen eingezogen werden. Dadurch entstehen leere Segmente am basalen Pol und lediglich der apikale Teil des Filaments ist mit Cytoplasma gefüllt (Banuett und Herskowitz, 1994b). Auf der hydrophoben Pflanzenoberfläche und stimuliert durch Hydroxyfettsäuren wird das apikale Längenwachstum nach einiger Zeit eingestellt und *U. maydis* bildet Appressorien (Abb. 1.2 [3]; Mendoza-Mendoza *et al.*, 2009). Im Gegensatz zu vielen anderen phytopathogenen Pilzen sind die Appressorien von *U. maydis* jedoch nicht stark melanisiert und besitzen lediglich relativ dünne Zellwände (Snetselaar, 1993; Snetselaar und Mims, 1994). Daher wird davon

ausgegangen, dass die Appressorien von *U. maydis* lediglich die Stelle markieren, an der die Änderung der Wuchsrichtung und die Infektion erfolgt. Die Penetration der Wirtspflanze erfolgt höchstwahrscheinlich über die lokale Sekretion lytischer Enzyme (Doehlemann *et al.*, 2008; Schirawski *et al.*, 2005a; Kahmann und Kämper, 2000).

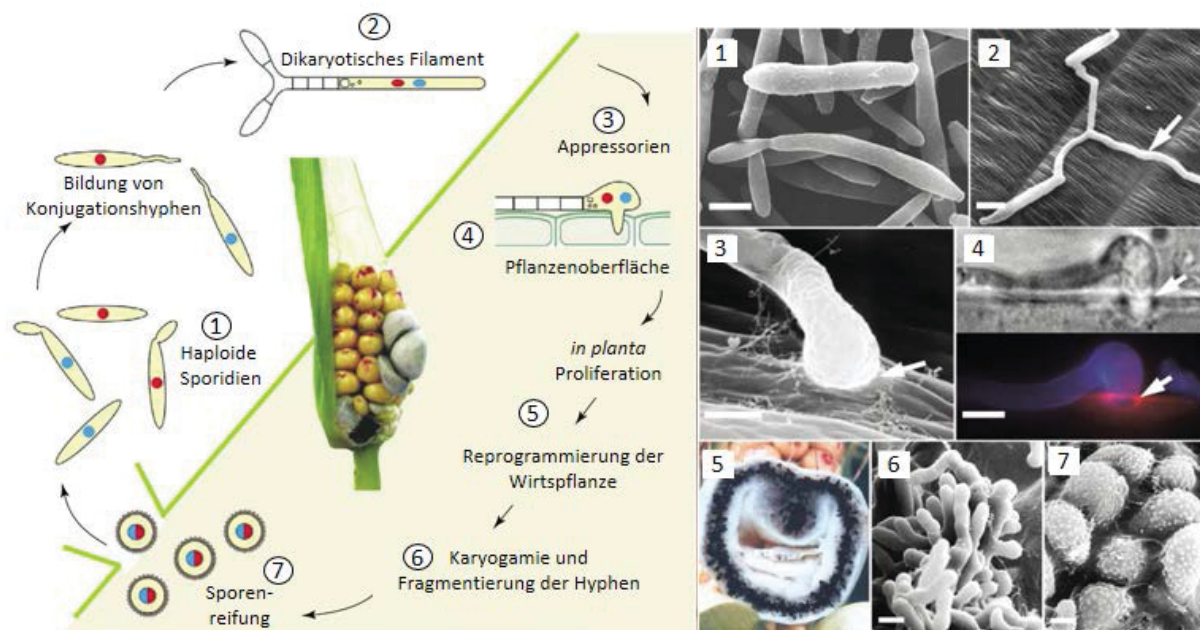


Abb. 1.2: Der Lebenszyklus von *U. maydis*. Schematische und mikroskopische Darstellung verschiedener Stadien des Lebenszyklus von *U. maydis*. Der Lebenszyklus unterteilt sich in eine saprotrophe Phase (Schritte 1 und 2; weiß hinterlegt) und eine biotrophe Phase (Schritte 3-7; gelb hinterlegt). (1) Die haploiden Sporidien vermehren sich Hefe-artig durch Knospung. Durch Perzeption kompatiblen Pheromons, kommt es zur Ausbildung sog. Konjugationshyphen, welche miteinander fusionieren. (2) Das daraus entstehende, dikaryotische Filament wächst unipolar auf der Pflanzenoberfläche. (3) Durch Pflanzenstimuli kommt es zur Appressorienbildung und zur (4) Penetration der Pflanzenoberfläche. (5) Innerhalb der Wirtspflanze kommt es zu deren Umprogrammierung und Tumorbildung. (6) Im Tumor fragmentieren die Hyphen und die Karyogamie wird eingeleitet, was zur (7) Differenzierung der diploiden Teliosporen führt aus denen die nächste Generation hervorgeht. Abbildungen modifiziert nach (Feldbrügge *et al.*, 2004) und (Kämper *et al.*, 2006). Die Zahlen markieren jeweils die gleichen Stadien in der schematischen bzw. mikroskopischen Darstellung.

Nach erfolgter Penetration (Abb. 1.2 [4]) wird der G2-Zellzyklusarrest aufgehoben und *U. maydis* proliferiert in der Wirtspflanze. Dabei wird die Plasmamembran der Wirtszellen eingestülpt, wodurch die biotrophe Interaktionszone entsteht. Während der Proliferation *in planta* werden die Zellkerne des Dikaryons über, für Basidiomyceten charakteristische, Schnallenzellen verteilt (Banuett und Herskowitz, 1996; Scherer *et al.*, 2006). *U. maydis* wächst in diesem Stadium bevorzugt entlang nährstoffreicher Gewebe der Pflanze, wie z.B. der Leitbündel (Abb. 1.1 D). Im weiteren Verlauf der Infektion kommt es zu einer stark erhöhten Teilungsrate und Hypertrophie im pflanzlichen Gewebe, wodurch die charakteristischen Tumore entstehen (Abb. 1.2 [5]; Gao *et al.*, 2013; Bruce *et al.*, 2011). In den Tumoren proliferiert das Pilz-Myzel weiter, was schlussendlich zur Fragmentierung der Hyphen (Abb. 1.2 [6]) sowie zur Differenzierung der diploiden Teliosporen führt (Abb. 1.2

[7]). Schon während der Reifung der Teliosporen werden meiotische Prozesse eingeleitet, sodass die Sporen in einem Stadium zwischen der Initiation der homologen Rekombination und der meiotischen Teilung verbleiben (Kojic *et al.*, 2013). In dieser Form werden die Sporen als Überdauerungsform in die Umwelt freigesetzt, wo sie unter geeigneten Bedingungen, wie z.B. einer guten Nährstoffversorgung, auskeimen. Während der Keimung wird die meiotische Teilung initiiert. Die vier aus der Meiose hervorgehenden Nuclei wandern in die Probasidie ein, von der sich im Anschluss durch mitotische Teilungen die haploiden Sporidien abschnüren (Christensen, 1963).

1.3 Die Kontrolle der sexuellen Entwicklung durch Paarungstyp-Loci

U. maydis ist ein heterothallischer (getrenntgeschlechtlicher) Pilz, welcher seine genetische Diversität über ein tetrapolares Paarungssystem sicherstellt. Die pathogene Entwicklung, und damit die sexuelle Reproduktion, setzen die Erkennung und Fusion zueinander kompatibler Sporidien voraus. Die Fusion und die darauf folgende Bildung des pathogenen Heterodikaryons, gebunden an die Transition von saprotrophem zu biotrophem Wachstum, hängen dabei von zwei Paarungstyp-Loci ab. Der biallelische *a*-Locus, welcher für ein Pheromon/Rezeptor-System kodiert, vermittelt die Zell-Zell-Erkennung sowie die Fusion der Konjugationshyphen. Anschließend übernimmt der multiallelische *b*-Locus, welcher für Homeodomänen-Transkriptionsfaktoren kodiert, die Kontrolle über die Aufrechterhaltung des filamentösen Dikaryons und die nachfolgende biotrophe Entwicklung (Banuett und Herskowitz, 1994a; Bölker *et al.*, 1992; Gillissen *et al.*, 1992; Schulz *et al.*, 1990; Kämper *et al.*, 1995).

1.3.1 Der *a*-Locus kontrolliert die Fusion kompatibler Sporidien

Der biallelische *a*-Locus kodiert für ein Pheromon/Rezeptor-System, welches die Sporidienfusion und die daraus resultierende Bildung des Heterodikaryons kontrolliert. Dabei besteht die Funktion zunächst darin die Zell/Zell-Perzeption zu gewährleisten, sodass sich kompatible Kreuzungspartner auf der Pflanzenoberfläche erkennen. Die Gene des *a*-Locus kodieren das Pheromon Mfa (*mating factor a*) und den Pheromonrezeptor Pra (*pheromone receptor a*) und liegen in den Allelen *a1* und *a2* vor. Mfa1 und Mfa2 werden zunächst als 40 bzw. 38 Aminosäuren (AS) große Propeptide synthetisiert und anschließend post-translational prozessiert. Dadurch entstehen die 13 (Mfa1) bzw. 9 (Mfa2) AS umfassenden Peptidpheromone, die am C-Terminus vermutlich farnesyliert und methyliert sind (Spellig *et al.*, 1994). Nach der Sekretion der Peptide bilden diese einen Konzentrationsgradienten,

welcher die direktionale Perzeption kompatibler Kreuzungspartner ermöglicht. Dabei wird das Pheromon des einen *a*-Allels jeweils vom antagonistischen *a*-Allel Rezeptor wahrgenommen (Spellig *et al.*, 1994).

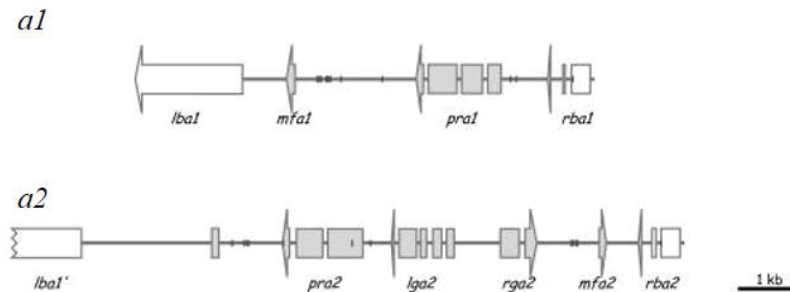


Abb. 1.3: Der *a*-Locus von *U. maydis*. Schematische Darstellung der *a*-Allele von *U. maydis*. Das *a1*-Allel trägt die Gene, die das Pheromon Mfa1 und den Rezeptor Pra1 kodieren. Das *a2*-Allel enthält neben den *mfa2* und *pra2* Genen zusätzlich die Gene *lga2* und *rga2*, welche eine Rolle in der uniparentalen Vererbung mitochondrialer DNA spielen. Abbildung modifiziert nach (Schirawski *et al.*, 2005b).

1.3.2 Der *b*-Locus als zentraler Regulator der biotrophen Entwicklung

Nach erfolgter Fusion zweier Sporidien, hängt die weitere pathogene Entwicklung und der damit verbundene Wechsel von saprotrophem zu biotrophem Wachstum von der Expression zueinander kompatibler *b*-Allele ab (Bölker *et al.*, 1995). Für den, im Gegensatz zum biallelischen *a*-Locus, multiallelisch vorliegenden *b*-Locus sind aus der Natur mindestens 19 verschiedene Varianten bekannt (Kämper *et al.*, 1995; pers. Mitteilung: J. Kämper). Der *b*-Locus enthält die Gene *bEast* (*bE*) und *bWest* (*bW*), welche unter der Kontrolle eines gemeinsamen, bidirektionalen Promotors gegenläufig transkribiert werden und für die Homeodomänen-Proteine bE (473 AS) und bW (645 AS) kodieren (Abb. 1.4 A). Trotz geringer Sequenzhomologie weisen die bE- und bW-Proteine strukturelle Ähnlichkeit auf. Sie bestehen aus einem hochkonservierten C-terminalen Bereich, welcher in den allelischen Varianten mehr als 90 % Sequenzhomologie aufweist, und einer variablen, N-terminalen Domäne. Die variablen Domänen sind essentiell für die Heterodimerisierung von bE und bW (Gillissen *et al.*, 1992; Kronstad und Leong, 1989), die nur dann stattfindet, wenn die beiden *b*-Genprodukte von verschiedenen Allelen stammen (Abb. 1.4 B; Kämper *et al.*, 1995). Für die anschließende Bindung des heterodimeren bE/bW-Transkriptionsfaktors an die DNA sind die zentral gelegenen Homeodomänen verantwortlich. Somit können Sporidien mit unterschiedlichen *a*-Allelen zwar fusionieren, die weitere sexuelle Entwicklung wird jedoch unterdrückt falls die *b*-Allele identisch, d.h. zueinander inkompatibel sind.

Im haploiden, solopathogenen Stamm SG200, welcher sowohl ein kompatibles Pheromon/Rezeptorsystem, als auch kompatible *b*-Proteine trägt, konnte gezeigt werden, dass

das b-Heterodimer der zentrale Regulator der pathogenen Entwicklung ist. SG200 kann daher den kompletten Lebenszyklus ohne vorherige Fusion mit einem Kreuzungspartner durchlaufen (Kämper *et al.*, 2006; Bölker *et al.*, 1995).

Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Expression eines kompatiblen b-Heterodimers unter der Kontrolle induzierbarer Promotoren *in vitro* filamentöses Wachstum in haploiden Stämmen induziert (Abb. 1.4 C; Stämme: AB31 und AB33; Brachmann *et al.*, 2001). Dies ermöglicht die zellbiologische Untersuchung Filament-spezifischer Prozesse unter Laborbedingungen. Die haploiden Stämme eignen sich durch die direkte Ausprägung von Mutationen besonders gut für genetische Untersuchungen pathogenitätsrelevanter Prozesse während der saprotrophen und der biotrophen Phase.

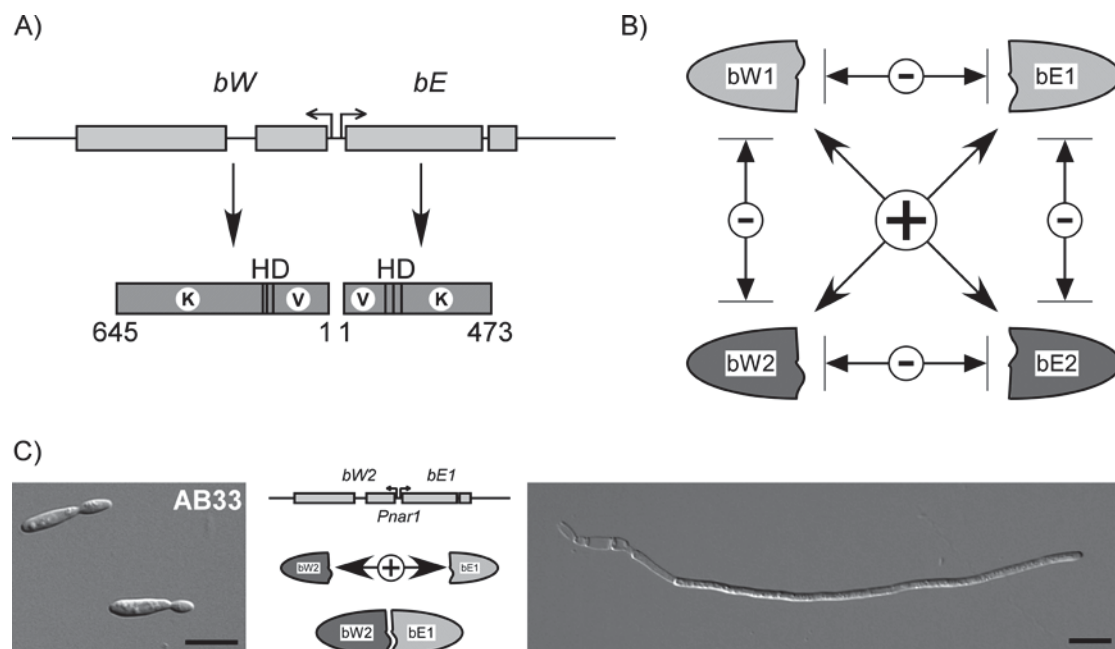


Abb. 1.4: Der b-Locus als Regulator der pathogenen Entwicklung. (A) Schematische Darstellung des b-Locus und der kodierten Homeodomänen (HD)-Transkriptionsfaktoren bE (473 AS) und bW (645 AS). bE und bW bestehen jeweils aus einer variablen (V) und einer konservierten Region (K). Abbildung modifiziert nach (Brachmann *et al.*, 2001). (B) Schematische Darstellung der allelspezifischen Dimerisierung von bE und bW. Die beiden Homeodomänen-Proteine können lediglich dann dimerisieren, wenn sie von verschiedenen Allelen stammen. Abbildung modifiziert nach (Brachmann *et al.*, 2001). (C) Filamentinduktion im haploiden Laborstamm AB33. Die Expression eines kompatiblen bE1/bW2-Heterodimers unter der Kontrolle des Nitratreduktase-Promotors (P_{nar1}) induziert filamentöses Wachstum unter Laborbedingungen. Links, Kultivierung von AB33 in CM-Medium führt zu Hefe-artigem Wachstum. Rechts, Das filamentöse Wachstum von AB33 wird durch den Wechsel der Stickstoffquelle (NM-Medium; Nitrat) induziert.

1.4 Mikrotubuli-abhängiger mRNA-Transport in *U. maydis*

Für unipolares, filamentöses Wachstum von *U. maydis* sind das Mikrotubuli-Cytoskelett und Mikrotubuli-abhängige Transportprozesse essentiell (Fuchs *et al.*, 2005; Schuchardt *et al.*, 2005; Lehmler *et al.*, 1997). Der Transport entlang von Mikrotubuli hängt von den

Motorproteinen Kin1, Kin3 sowie dem geteilten Dynein Dyn1/Dyn2 ab (Wedlich-Söldner *et al.*, 2002; Schuchardt *et al.*, 2005; Straube *et al.*, 2001). Die Depolymerisierung der Mikrotubuli oder eine Deletion von Genen für Motorproteine führen zu Defekten des filamentösen Wachstums. Es konnte gezeigt werden, dass frühe Endosomen direkt mit den Motorproteinen interagieren und so bidirektional im Filament transportiert werden (Schuster *et al.*, 2011a; Lenz *et al.*, 2006; Wedlich-Söldner *et al.*, 2002). Dabei übernimmt das Kinesin Kin3 den anterograden, Plusend-gerichteten Transport der Endosomen (Lenz *et al.*, 2006; Schuster *et al.*, 2011b). Dynein ist für den retrograden, Minusend-gerichteten Transport früher Endosomen verantwortlich. Dazu akkumuliert Dynein an den Zellpolen (Plusenden der Mikrotubuli) und bildet so ein Reservoir für den retrograden Transport (Schuster *et al.*, 2011a). Der Transport von Dynein zu den Zellpolen wird durch das konventionelle Kinesin Kin1 sichergestellt (Lenz *et al.*, 2006; Lehmler *et al.*, 1997). Der Verlust von Kin3 führt daher zur Akkumulation von Endosomen in der Nähe des Zellkerns, während ein Verlust von Dynein zur Akkumulation an den Zellpolen führt (Lenz *et al.*, 2006; Schuster *et al.*, 2011b).

Ein weiterer, an Endosomentransport gekoppelter und somit Mikrotubuli-abhängiger Transportprozess in *U. maydis* Filamenten ist der Transport von mRNA (Baumann *et al.*, 2012; Becht *et al.*, 2006; König *et al.*, 2009). Der Langstreckentransport von mRNAs spielt vor allem während des filamentösen Wachstums eine wichtige Rolle. So führt z.B. der Verlust des RNA-bindenden Proteins Rrm4 zu beeinträchtigter Filamentbildung, woraus eine stark erhöhte Rate bipolar auswachsender Zellen resultiert (Becht *et al.*, 2006). Rrm4 bindet im Cytoplasma an mRNAs und ist ein zentraler Bestandteil von mRNPs (*messenger ribonucleoprotein complexes*), welche gekoppelt an Endosomen bidirektional transportiert werden (König *et al.*, 2009; Baumann *et al.*, 2012). Rrm4 zählt zu den sog. ELAV (*embryonic lethal abnormal vision*)-ähnlichen Proteinen, die eine charakteristische Anordnung RNA-bindender Domänen besitzen, evolutionär konserviert sind und wichtige Funktionen in Entwicklungsprozessen haben (Becht *et al.*, 2006; Macknight *et al.*, 1997; Peng *et al.*, 1998; Sakakibara *et al.*, 1996; Robinow und White, 1991). Neben drei N-terminalen RRM (*RNA recognition motif*)-Domänen, welche die RNA-Bindung vermitteln, besitzt Rrm4 eine sog. MLLE-Domäne im C-terminalen Bereich (Becht *et al.*, 2006), deren Funktion noch nicht vollständig geklärt ist (Pohlmann, 2013). Durch *in vivo* UV-Kreuzvernetzung und Immunoprecipitation (CLIP; *UV-crosslinking immune precipitation*) konnten einige Ziel-mRNAs von Rrm4 identifiziert werden (König *et al.*, 2009; Haag, 2013). Der genaue Einfluss des gerichteten mRNA Transports auf die Synthese und Funktion der korrespondierenden Proteine ist noch nicht vollständig geklärt. Co-Lokalisationsstudien von Rrm4 mit dem Septin

Cdc3 und dessen mRNA, sowie ribosomaler Proteine, deuten jedoch darauf hin, dass es während des Transports zu Endosomen-assoziiierter, lokaler Translation kommt (Baumann *et al.*, 2014; Higuchi *et al.*, 2014). Zu den signifikantesten der identifizierten Ziel-Transkripte gehören unter anderem einige mRNAs, die für mitochondriale Proteine kodieren (König *et al.*, 2009; Haag, 2013; Koepke, 2011). Zu diesen zählen die mRNAs der Atmungskettenproteine Nuo1 (Komplex I), Qcr10 (Komplex III) und Atp4 (Komplex V). Neben den mRNAs mitochondrialer Proteine, wurde auch die mRNA der Chitinase Cts1 als direktes Ziel des Rrm4-abhängigen mRNA-Transports identifiziert (König *et al.*, 2009; Koepke *et al.*, 2011). Die Funktion von Cts1 während der Entwicklung von *U. maydis* ist jedoch noch unklar.

1.5 Chitin und chitinolytische Enzyme

Chitin (gr.: *chítōn*: Hülle, Panzer, Tunika) ist nach Cellulose das zweithäufigste, natürlich vorkommende Biopolymer. Die weltweite, jährliche Chitinproduktion wird auf 10^{10} - 10^{12} Tonnen geschätzt (Gortari und Hours, 2013; Synowiecki und Al-Khateeb, 2003; Tharanathan und Kittur, 2003). Als strukturbildendes Material kommt es vor allem im Exoskelett bzw. der Cuticula der Ecdysozoa (Überstamm: Häutungstiere, nach früherer Taxonomie: Articulata, Gliedertiere; Abb. 1.5 B), in Gehäusen von Mollusken (Weichtiere), dem Schulp von Cephalopoden (Kopffüßer) und in der Zellwand von Pilzen vor (Abb. 1.5 C). Chitin wurde als erstes bekanntes Polysaccharid erstmals 1811 von Henri Braconnot aus Pilzen isoliert und als „Fungin“ bezeichnet (Braconnot, 1811). 1823 wurde Chitin durch Antoine Odier auch aus den Flügeln des Maikäfers isoliert. In Anlehnung an den Insektenpanzer wurde der Name von Fungin in Chitin geändert. Die Struktur von Chitin wurde 1929 von Albert Hoffman aufgeklärt (Karrer und Hofmann, 1929). Als Polymer aus β -1-4-glykosidisch verknüpften N-Acetylglukosamin (GlcNAc)-Einheiten (Abb. 1.5 A, B) kann kristallines Chitin in zwei allomorphen Formen vorliegen, dem α - und β -Chitin. Diese unterscheiden sich in der Art der Zusammenlagerung einzelner Stränge und somit in ihrer Verdichtung und Polarität (Aam *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2010). In α -Chitin, welches vor allem in Crustaceen vorkommt, sind die Ketten anti-parallel, im β -Chitin, welches unter anderem in Cephalopoden zu finden ist, parallel angeordnet. Die antiparallele Anordnung verleiht α -Chitin durch stärkere intermolekulare Interaktionen eine größere Festigkeit. Neben α - und β -Chitin existiert noch ein Intermediat, das γ -Chitin, welches häufig in Insekten vorkommt (Yang *et al.*, 2004; Alvarez, 2014). γ -Chitin besteht aus jeweils zwei parallel angeordneten Strängen, gefolgt von einem anti-parallelen Strang. Chitin ist jedoch meist kein homogenes Polymer. Häufig besteht es aus acetylierten und deacetylierten Glukosamin-Einheiten. Ab einem Deacetylierungsgrad

von 40-50 % spricht man von Chitosan. Chitin und Chitinderivate sind biotechnologisch von Interesse, da sie Anwendung in vielen Bereichen des täglichen Lebens finden. So dienen sie z.B. als Flockungsmittel in der Abwasseraufbereitung, werden als Additiv in der Papierproduktion eingesetzt und dienen als Chromatographie-Material. Auch im medizinischen Bereich sind Chitinderivate von Bedeutung und werden als biologisch abbaubares Biopolymer in Wundverbänden, künstlicher Haut oder künstlichen Gelenken verarbeitet, was zu einer verbesserten Verträglichkeit und besserer Wundheilung führt. Außerdem können chirurgische Materialien aus Chitinderivaten durch körpereigenes Lysozym und Chitinasen abgebaut werden, wodurch eine post-operative Entfernung entfällt.

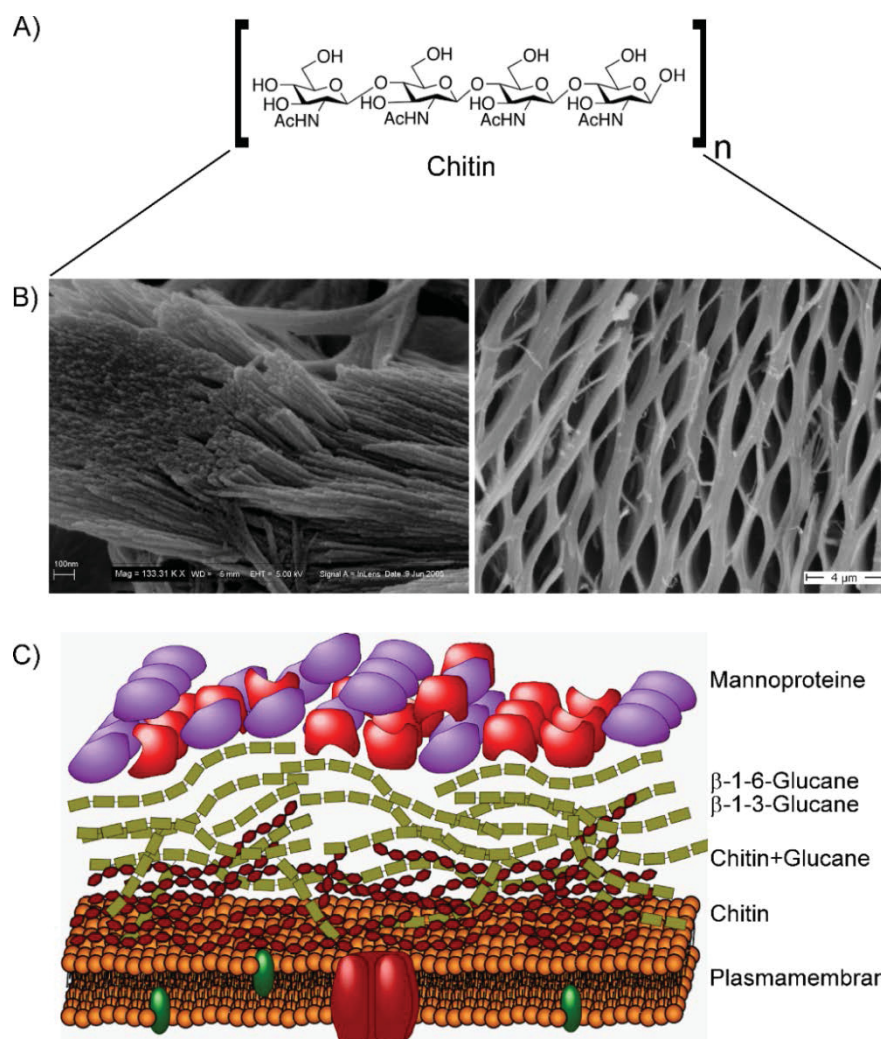


Abb. 1.5: Struktur und Vorkommen von Chitin. (A) Strukturformel von Chitin. Chitin besteht aus β -1-3-glykosidisch verknüpften N-Acetylglukosamin Bausteinen, welche sich parallel oder anti-parallel zu Strängen zusammenlagern können. (B) Elektronenmikroskopische Aufnahme der Chitinstruktur in Hummerschalen. Die einzelnen Chitinketten lagern sich mit Strukturproteinen zu Strängen zusammen (links), welche wiederum hochgradig geordnete, fast hexagonale „Bienenwaben-Strukturen“ bilden. Abbildungen aus (Raabe *et al.*, 2005 und Nikolov *et al.*, 2010). (C) Schematische Darstellung der Zellwand von Pilzen. Verschiedene Schichten aus Mannoproteinen, Glukanen und Chitin, welche der Plasmamembran aufgelagert sind verleihen dem Pilz strukturelle Integrität.

In Zellwänden von Pilzen übernimmt Chitin zusammen mit Glukanen, Mannanen und Proteinen die Stützfunktion der Zelle (Abb. 1.5 C). Um während des Wachstums die Plastizität der Zellwand zu gewährleisten, verfügen Pilze über Enzyme mit deren Hilfe Chitin synthetisiert oder degradiert werden kann. Die Chitin-Neusynthese wird von Chitinsynthasen (EC 2.4.1.16), der Abbau von Chitinasen (EC 3.2.1.14) katalysiert. Pilzliche Chitinasen gehören der Glykosylhydrolase 18 (GH18) Familie an. Allgemein werden Chitinasen in zwei Familien unterteilt. Neben der GH18 Familie, welche vor allem bakterielle, pilzliche und pflanzliche Chitinasen der Klassen III und V enthält, zählen auch die GH19 Hydrolasen zu den Chitinasen. Die GH19 Familie enthält bakterielle und pflanzliche Chitinasen der Klassen I, II und IV (<http://www.cazy.org/>). Die Chitinasen der beiden Familien unterscheiden sich vor allem in ihrem Reaktionsmechanismus. Während GH18 Chitinasen die anomere Konfiguration der Edukte beibehalten, weisen GH19 Chitinasen einen invertierenden Reaktionsmechanismus auf, was bedeutet, dass die anomere Konfiguration der Edukte im Reaktionsprodukt geändert wird. Die Unterklassifizierung basiert vor allem auf Sequenzhomologie, dem isoelektrischen Punkt, der Größe und der Lokalisation der Enzyme. Aufgrund dieser Merkmale, können sich Chitinasen in ihrer molekularen Struktur und ihrer Substratspezifität stark unterscheiden (Patil *et al.*, 2000; Hamid *et al.*, 2013). GH18 Chitinasen weisen eine charakteristische dreidimensionale Proteinstruktur auf. Das enzymatische Zentrum besteht aus acht parallel verlaufenden β -Faltblättern, welche ein β -Fass formen. Stabilisiert wird diese Struktur durch acht α -Helices, welche wiederum ringförmig um das β -Fass angeordnet sind. Diese charakteristische Struktur wird durch ihre Analogie zum aktiven Zentrum der Triosephosphat-Isomerase „ α/β -TIM-Barrel“ genannt (Perrakis *et al.*, 1994, Hartl *et al.*, 2012). Neben der aktiven GH-Domäne besitzen Chitinasen oft noch weitere Domänen wie z.B. Kohlenhydrat-Bindedomänen (CBM, *carbohydrate binding module*), Fibronectin III (FNIII)-ähnliche Chitin-Bindedomänen oder GPI (Glykosylphosphatidylinositol)-Anker (Boraston *et al.*, 2004; Henrissat *et al.*, 2000; Yamazaki *et al.*, 2008). Neben Chitinasen werden auch N-Acetylglukosaminidasen (GH20; EC 3.2.1.52) und sog. Kupfer-abhängige lytische Polysaccharid-Monooxygenasen (LPMOs) den chitinolytischen Enzymen zugeordnet. LPMOs zählten bisher zur CBM33 (*carbohydrate binding module*) Familie, wurden jedoch kürzlich neu klassifiziert und gehören nun zur AA10 (*auxiliary activity*) Familie. LPMOs spalten Chitin an zufälligen Positionen, was zu Strangbrüchen führt. Dies wiederum erhöht die Effektivität der Chitinasen (Vaaje-Kolstad *et al.*, 2010; Vaaje-Kolstad *et al.*, 2012; <http://www.cazy.org/>). N-Acetylglukosaminidasen spalten hauptsächlich $(\text{GlcNAc})_2$ in GlcNAc-Monomere, welche anschließend resorbiert und

wiederverwertet werden können. So ergibt sich eine hierarchische Kaskade enzymatischer Reaktionen während des Chitinabbaus (Abb. 1.6).

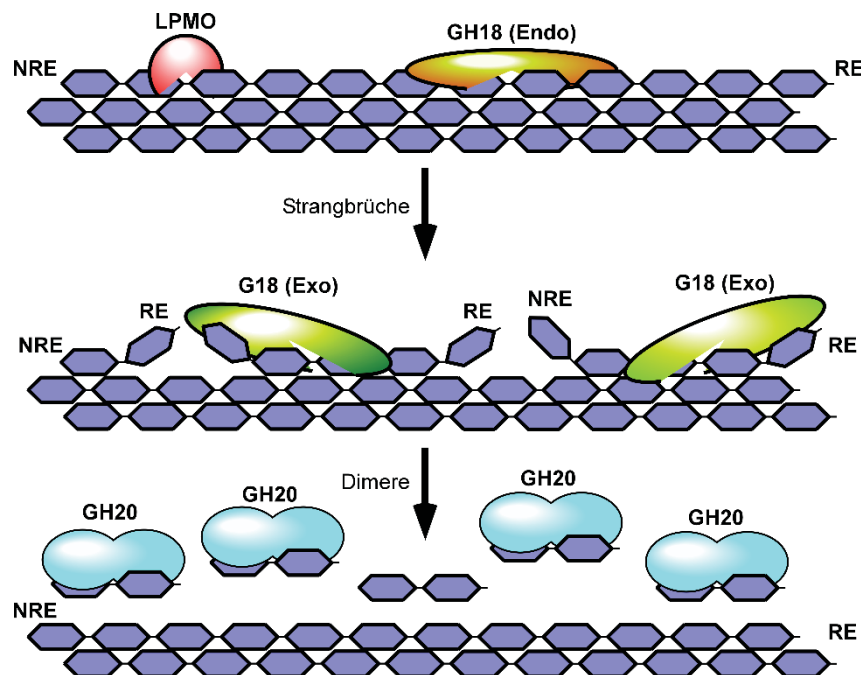


Abb. 1.6: Schematische Darstellung der enzymatischen Reaktionen während des Chitinabbaus. In der Zellwand von Pilzen liegt Chitin dicht gepackt als kristallines Chitin vor. Lytische Polysaccharid-Monooxygenasen und GH18 Endo-Chitinasen fügen zufällig Strangbrüche ein und erzeugen auf diese Weise reduzierende (RE) und nicht-reduzierende Enden (NRE) im Chitinstrang. Diese werden von GH18 Exo-Chitinasen erkannt, welche den Chitinstrang, ausgehend von einem der beiden Enden, prozessiv abbauen. Dabei werden vorwiegend (GlcNAc)-Dimere produziert, welche von GH20 N-Acetylglucosaminidasen weiter zu (GlcNAc)-Monomeren degradiert werden. Diese können sowohl als Kohlenstoff-, als auch als Stickstoff-Quelle dienen.

Das meiste Wissen über chitinolytische Enzyme und deren Wirkmechanismen stammt aus dem Gram-negativen Enterobakterium *Serratia marcescens*. Die chitinolytische Maschinerie des Bakteriums setzt sich aus drei GH18 Chitinasen (ChiA, ChiB, ChiC), einer GH20 N-Acetylglucosaminidase (Chitobiase) und einer AA10 Chitin-Monooxygenase (LPMO; Cbp21) zusammen (zusammengefasst in Vaaje-Kolstad *et al.*, 2013).

Es konnte gezeigt werden, dass eine der Chitinasen Endo- (ChiC) und zwei Exo-Charakter haben, wobei eine der Exochitinasen (ChiA) vom reduzierenden Ende der Chitinkette und die andere (ChiB) vom nicht-reduzierenden Ende prozessiv (GlcNAc)₂ abspalten (Hult *et al.*, 2005). Durch Messung des (GlcNAc)₂ / (GlcNAc)₃ Verhältnisses nach der Degradierung von β -Chitin konnte außerdem gezeigt werden, dass ChiA und ChiB wesentlich mehr Dimere (ChiA_{2/3}: 7,3; ChiB_{2/3}: 12,6) produzieren als ChiC (ChiC_{2/3}: 4,1; Horn *et al.*, 2006). In Kombination mit Röntgendiffraktions-Experimenten konnte so zwischen prozessiven und nicht-prozessiven Chitinasen unterschieden werden (Hult *et al.*, 2005; Sikorski *et al.*, 2006). Für Cbp21, der LPMO aus *S. marcescens*, und dem homologen Protein EfCBM33A aus

Enterococcus faecalis konnte durch Analyse der Proteinstruktur eine Beteiligung von Kupfer-Ionen im aktiven Zentrum gezeigt und dessen katalytische Wirkung experimentell bestätigt werden (Vaaje-Kolstad *et al.*, 2010).

In Bakterien dienen Chitinasen meist der Akquisition von Chitin als Kohlenstoff- und Stickstoff-Quelle (Frederiksen *et al.*, 2013). In Pilzen sind sie, neben der ernährungsbedingten Akquisition von Chitin, vor allem an der Remodellierung der Zellwand beteiligt. Obwohl die Aktivität vieler Chitinasen experimentell bestätigt wurde, ist ihre biologische Funktion und Spezifität oft unbekannt, da besonders in der Genfamilie der GH18-Chitinasen ein hoher Grad an funktioneller Redundanz herrscht (Jaques *et al.*, 2003; Yamazaki *et al.*, 2007; Alcazar-Fuoli *et al.*, 2011). Die Anzahl kodierter Chitinasen variiert in Genomen von Pilzen stark und reicht von nur einer in *Schizosaccharomyces pombe* bis hin zu mindestens 20 in *Aspergillus nidulans* (Karlsson und Stenlid, 2008; Amselem *et al.*, 2011). Im Rahmen einer genetischen Analyse, in der fünf der 18 und damit das gesamte Repertoire der Pflanzen-ähnlichen (Klasse III) Chitinasen aus *Aspergillus fumigatus* deletiert wurden, konnte lediglich eine verringerte Chitinaseaktivität beobachtet werden. Jedoch hatten die Deletionen keine morphogenetischen Effekte (Alcazar-Fuoli *et al.*, 2011). Auch die Deletion der bakterienähnlichen Chitinase *CHIB1* hatte keine Auswirkung auf das Wachstum, obwohl sie die aktivste, extrazelluläre Chitinase aus *A. fumigatus* ist (Shin *et al.*, 2009). In *A. nidulans* konnte anhand von ChiB gezeigt werden, dass Chitinasen an autolytischen Prozessen beteiligt sind und unter Kohlenstoff-Mangelbedingungen differenziell exprimiert werden (Yamazaki *et al.*, 2007; Jaques *et al.*, 2003). ChiA aus *A. nidulans* lokalisiert spezifisch an polarisierten Wachstumszonen in auskeimenden Sporen und in Hyphen (Yamazaki *et al.*, 2008). Es wurde daher angenommen, dass ChiA eine biologische Funktion während des filamentösen Wachstums hat. In *chiA*-Deletionsmutanten konnten jedoch keine Defekte im Wachstum beobachtet werden (Takaya *et al.*, 1998b; Yamazaki *et al.*, 2007). In *Trichoderma atroviride* und *Trichoderma harzianum* wurde, neben einer Funktion in autolytischen Prozessen, für die Chitinase Ech42 eine Rolle im Mycoparasitismus beobachtet (Carsolio *et al.*, 1999; Carsolio *et al.*, 1994; Gruber und Seidl-Seiboth, 2011). Da filamentöse Pilze in der Regel weitaus mehr, zum Teil funktionell redundante Chitinasen kodieren und es daher schwierig ist einzelnen Mitgliedern dieser Familie eine Funktion zuzuordnen, stammt das meiste Wissen über deren biologische Rolle aus Hefen (Adams, 2004).

Für die Chitinase Cts1p aus *Saccharomyces cerevisiae* und deren Homolog CHT3 aus *Candida albicans* konnte z.B. eine Funktion in der Zellseparation beobachtet werden (Dünkler *et al.*, 2005; Kuranda und Robbins, 1991). In *Ashbya gossypii* führt die Deletion des

Chitinasegens *cts2* zu einem Defekt während der Sporulation (Dünkler *et al.*, 2008). Dieser Defekt kann mit den Chitinasegenen *CHT4* aus *C. albicans* oder *CTS2* aus *S. cerevisiae* komplementiert werden, was auch für eine Funktion dieser Chitinasen in der Zellwandremodellierung während Sporulationsprozessen spricht. In *S. cerevisiae* selbst führt die *CTS2*-Deletion zu einer abnormalen Asci-Bildung (Giaever *et al.*, 2002). Im opportunistisch pathogenen Basidiomyceten *Cryptococcus neoformans* hat die Deletion aller GH18-Chitinasen eine erhöhte Stressempfindlichkeit gegenüber SDS, sowie Defekte während der Kreuzung zur Folge (Baker *et al.*, 2009). Über die Lokalisation von Chitinasen ist jedoch auch in Hefen sehr wenig bekannt. Lediglich aus *S. cerevisiae* weiß man, dass die Chitinase Cts1p am Septum zwischen Mutter- und Tochterzelle lokalisiert (Colman-Lerner *et al.*, 2001). Die Expression von *CTS1* ist in *S. cerevisiae* Tochterzell-spezifisch und wird durch das sog. RAM (*regulation of Ace2 and morphogenesis*)-Netzwerk reguliert (Colman-Lerner *et al.*, 2001; Saputo *et al.*, 2012; Bogomolnaya *et al.*, 2006). Die Rolle von Chitinasen während der biotrophen Entwicklung phytopathogener Pilze ist bisher nicht näher charakterisiert worden.

1.6 Die Chitinasen in *U. maydis* und ihre Verbindung zum mRNA-Transport

Das Genom von *U. maydis* kodiert für drei putative Chitinasen der GH18-Familie (*cts1*, *um10419*; *cts2*, *um02758*; *cts3*, *um06190*; <http://pedant.helmholtz-muenchen.de>). Laut einer phylogenetischen Analyse mit 80 repräsentativen Chitinasesequenzen (GH18-Domäne) aus Pilzen, Pflanzen und Bakterien lassen sich die Enzyme aus *U. maydis* in drei monophyletische Kladen einordnen (Abb. 1.7). Während Cts1 zu den Bakterien-ähnlichen Chitinasen (Klasse V) zählt, gruppiert Cts2 mit den Pflanzen-ähnlichen (Klasse III) und Cts3 mit den Basidiomyceten-spezifischen Vertretern der GH18-Familie.

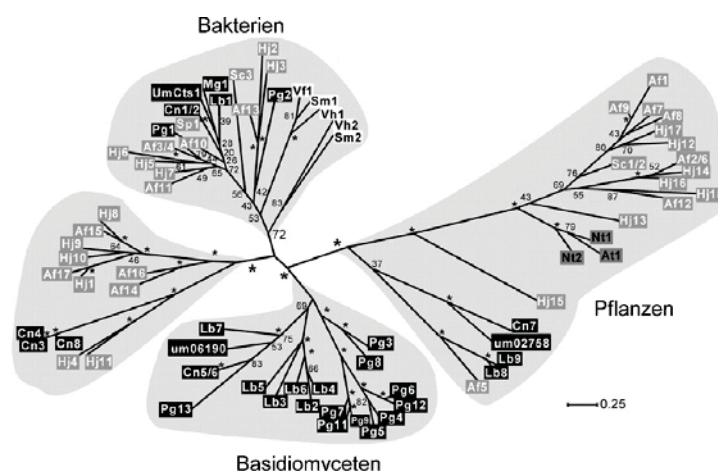


Abb. 1.7: Phylogenetische Analyse der GH18-Chitinasen aus *U. maydis*. Das Genom von *U. maydis* kodiert für drei GH18-Chitinasen, die in drei monophyletischen Kladen gruppieren. Cts1 gehört zu den Bakterien-ähnlichen, Cts2 zu den Pflanzen-ähnlichen und Cts3 zu den Basidiomyceten-spezifischen Chitinasen. Abbildung modifiziert nach (Koepeke *et al.*, 2011).

Chitinasegens *cts2* zu einem Defekt während der Sporulation (Dünkler *et al.*, 2008). Dieser Defekt kann mit den Chitinasegenen *CHT4* aus *C. albicans* oder *CTS2* aus *S. cerevisiae* komplementiert werden, was auch für eine Funktion dieser Chitinasen in der Zellwandremodellierung während Sporulationsprozessen spricht. In *S. cerevisiae* selbst führt die *CTS2*-Deletion zu einer abnormalen Asci-Bildung (Giaever *et al.*, 2002). Im opportunistisch pathogenen Basidiomyceten *Cryptococcus neoformans* hat die Deletion aller GH18-Chitinasen eine erhöhte Stressempfindlichkeit gegenüber SDS, sowie Defekte während der Kreuzung zur Folge (Baker *et al.*, 2009). Über die Lokalisation von Chitinasen ist jedoch auch in Hefen sehr wenig bekannt. Lediglich aus *S. cerevisiae* weiß man, dass die Chitinase Cts1p am Septum zwischen Mutter- und Tochterzelle lokalisiert (Colman-Lerner *et al.*, 2001). Die Expression von *CTS1* ist in *S. cerevisiae* Tochterzell-spezifisch und wird durch das sog. RAM (*regulation of Ace2 and morphogenesis*)-Netzwerk reguliert (Colman-Lerner *et al.*, 2001; Saputo *et al.*, 2012; Bogomolnaya *et al.*, 2006). Die Rolle von Chitinasen während der biotrophen Entwicklung phytopathogener Pilze ist bisher nicht näher charakterisiert worden.

1.6 Die Chitinasen in *U. maydis* und ihre Verbindung zum mRNA-Transport

Das Genom von *U. maydis* kodiert für drei putative Chitinasen der GH18-Familie (*cts1*, *um10419*; *cts2*, *um02758*; *cts3*, *um06190*; <http://pedant.helmholtz-muenchen.de>). Laut einer phylogenetischen Analyse mit 80 repräsentativen Chitinasesequenzen (GH18-Domäne) aus Pilzen, Pflanzen und Bakterien lassen sich die Enzyme aus *U. maydis* in drei monophyletische Kladen einordnen (Abb. 1.7). Während Cts1 zu den Bakterien-ähnlichen Chitinasen (Klasse V) zählt, gruppiert Cts2 mit den Pflanzen-ähnlichen (Klasse III) und Cts3 mit den Basidiomyceten-spezifischen Vertretern der GH18-Familie.

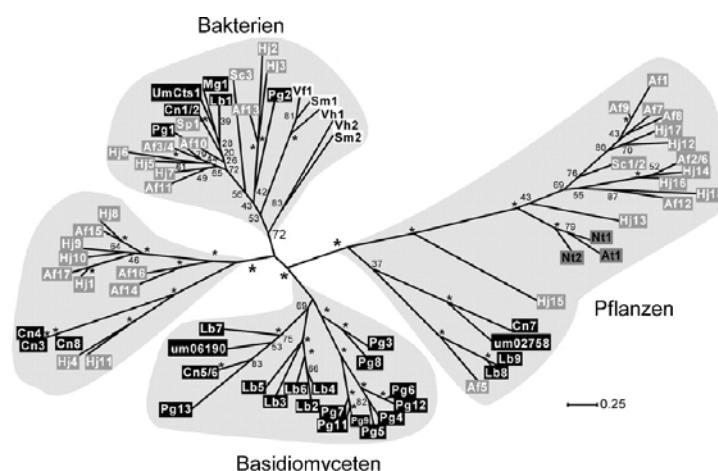


Abb. 1.7: Phylogenetische Analyse der GH18-Chitinasen aus *U. maydis*. Das Genom von *U. maydis* kodiert für drei GH18-Chitinasen, die in drei monophyletischen Kladen gruppieren. Cts1 gehört zu den Bakterien-ähnlichen, Cts2 zu den Pflanzen-ähnlichen und Cts3 zu den Basidiomyceten-spezifischen Chitinasen. Abbildung modifiziert nach (Koepeke *et al.*, 2011).

In CLIP-Experimenten wurde die mRNA der Chitinase Cts1 als direktes Ziel des Rrm4-abhängigen mRNA-Transports entlang des Mikrotubuli-Cytoskeletts identifiziert (König *et al.*, 2009; Haag, 2013). Die Anreicherung der *cts1*-mRNA in Rrm4 positiven mRNPs konnte durch Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) bestätigt werden (Koepke *et al.*, 2011). Durch differenzielle Proteomanalysen mittels zweidimensionaler, differenzieller Gelelektrophorese (2D-DIGE) und anschließender massenspektrometrischer Analyse wurde außerdem gezeigt, dass die Proteinmenge von Cts1 in der membranassoziierten Fraktion von *rrm4Δ*-Mutanten deutlich erhöht ist (Koepke *et al.*, 2011). Die intrazelluläre Lokalisation eines Cts1:eGfp-Fusionsproteins (Cts1G) ist in *rrm4Δ*-Mutanten unverändert und wurde als gradueller Anstieg zur Hyphenspitze beschrieben (Abb. 1.8, links). Dennoch ist die Sekretion der Chitinase in Abwesenheit von Rrm4 gestört, was zu einer drastischen Reduktion der extrazellulären Chitinaseaktivität führt (Abb. 1.8, rechts). Cts1 enthält kein Signalpeptid für die konventionelle Sekretion. Die Abhängigkeit der Sekretion von Rrm4 deutet auf einen unkonventionellen Sekretionsweg hin, der bisher noch nicht näher charakterisiert ist. Bekannt ist jedoch, dass Cts1 nicht über den klassischen ER- und Golgi-Apparat-abhängigen Weg sekretiert wird (Stock *et al.*, 2012; Stock, 2013).

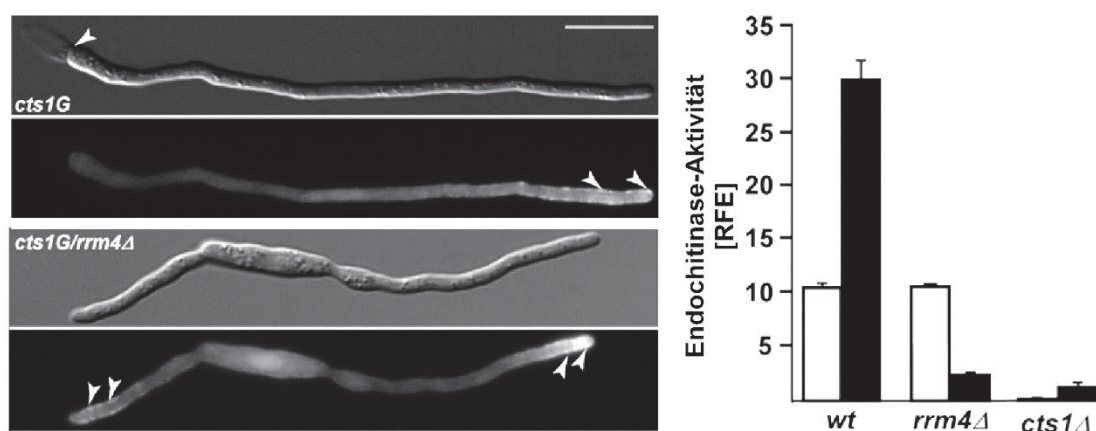


Abb. 1.8: Die Deletion von *rrm4* führt zu verringerter Sekretion der Chitinase Cts1. Während die intrazelluläre Lokalisation von Cts1G in *rrm4Δ*-Mutanten unverändert ist, ist die Sekretion Rrm4-abhängig. Weiße Balken: Sporidien. Schwarze Balken: Filamente. Abbildung modifiziert nach (Koepke *et al.*, 2011).

Die Deletion von Cts1 führt zu einem vollständigen Verlust der extrazellulären Chitinaseaktivität gegenüber dem Substrat 4-Methylumbelliferyl β -D-N,N',N''-Triacetylchitotriosid (MUC₃; Koepke *et al.*, 2011), was darauf hindeutet, dass keine weiteren Chinasen zu der Gesamtchitinaseaktivität beitragen. Dennoch sind die morphogenetischen Auswirkungen der Deletion marginal. Sowohl während des Hefe-artigen, als auch während des filamentösen Wachstums sind keine zellmorphologischen Unterschiede zwischen Wildtyp und *cts1Δ*-Mutante zu erkennen (Koepke *et al.*, 2011; Abb. 1.9 B). Lediglich in

Flüssigkulturen filamentös wachsender *cts1Δ*-Zellen kommt es zu einer Aggregation der Zellen, was zu schnellerer Sedimentation führt (Abb. 1.9 A). Auch die biotrophe Entwicklung ist durch die Deletion von *cts1* nicht beeinflusst (Abb. 1.9 C).

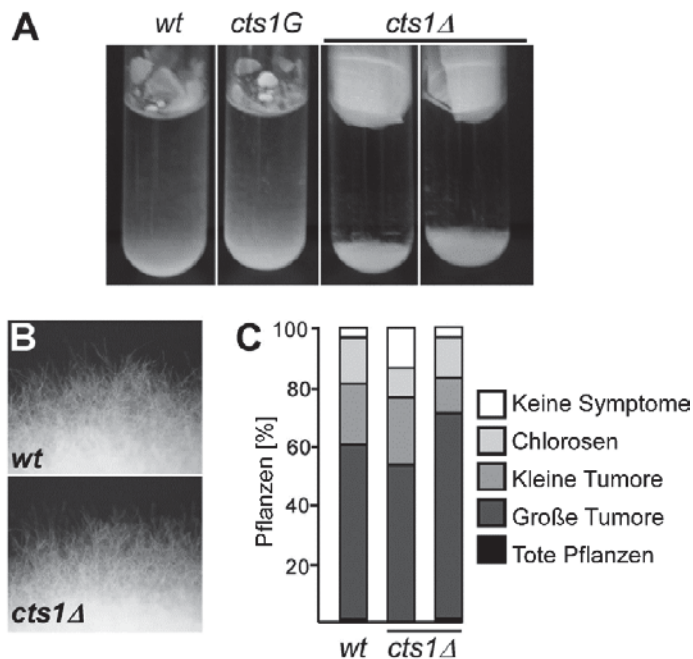


Abb. 1.9: Phänotypische Analyse der *cts1Δ*-Mutante. (A) *cts1Δ*-Filamente aggregieren in Flüssigkultur und weisen eine erhöhte Sedimentationsgeschwindigkeit auf. (B) Das filamentöse Wachstum auf Festmedium ist unverändert. (C) Die Deletion von *cts1* hat keinen Einfluss auf die Virulenz von *U. maydis*. Abbildung modifiziert aus (Koepeke *et al.*, 2011).

1.7 Der Einfluss des mRNA-Transports auf Mitochondrien

Neben *cts1* wurden mRNAs einiger mitochondrialer Proteine als direkte Ziele von Rrm4 identifiziert (König *et al.*, 2009; Koepeke *et al.*, 2011). Dies führte zu der Vermutung, dass der Langstreckentransport dieser mRNAs auch eine Rolle während der Verteilung mitochondrialer Proteine in Filamenten von *U. maydis* spielt. Mehrere Studien haben gezeigt, dass mitochondriale Proteine im Cytoplasma als Vorläufer synthetisiert werden, die anschließend, unter Beteiligung von Chaperonen, post-translational importiert werden (Abb. 1.10; Schatz, 1979; Neupert und Schatz, 1981; Reid und Schatz, 1982a; Reid und Schatz, 1982b; Reid *et al.*, 1982). Dazu binden sie an Rezeptoren der äußeren Mitochondrienmembran (Hennig *et al.*, 1983; Zwizinski *et al.*, 1984), wodurch die Translokation eingeleitet wird. Der Translokationsprozess hängt vom Membranpotential, der ATP-Verfügbarkeit und der Atmungskettenfunktion ab (Pfanner *et al.*, 1987; Martin *et al.*, 1991). In der Mitochondrienmatrix wird die N-terminale Importsequenz (MTS) durch eine Signalpeptid-Peptidase (MPP, *matrix processing peptidase*) entfernt, wodurch das reife Protein entsteht (Schleyer und Neupert, 1985; Hawlitschek *et al.*, 1988).

Neben dem post-translationalen Proteinimport existiert jedoch auch ein co-translatiionaler Translokationsmechanismus für mitochondriale Proteine. Erste Hypothesen dazu wurden bereits vor etwa 40 Jahren postuliert, als beobachtet wurde, dass Ribosomen mit Mitochondrien assoziiert vorliegen können (Kellems und Butow, 1972). Daraus wurde geschlossen, dass für Mitochondrien ein Translokationsprozess existiert, der Ähnlichkeit mit dem co-translationalen Transport in das ER hat. In *S. cerevisiae* und Säugerzellen liegen in der Tat einige mRNAs mitochondrialer Protein assoziiert mit Mitochondrien und Ribosomen vor, was die Hypothese des co-translationalen Proteinimports bekräftigt (Kaltimbacher *et al.*, 2006; Sylvestre *et al.*, 2003; Suissa und Schatz, 1982). Die lokale Translation mitochondrialer Proteine wurde kürzlich experimentell bestätigt (Williams *et al.*, 2014) und mit dem Rezeptor OM14 der äußeren Membran, sowie dem Ribosomen-assoziierten Chaperon NAC (*nascent chain-associated complex*) wurden weitere Komponenten der Translokationsmaschinerie identifiziert (Abb. 1.10; Lesnik *et al.*, 2014; del Alamo *et al.*, 2011). Für eine effiziente mRNA-Lokalisation an Mitochondrien benötigen einige mRNAs außerdem die naszierende MTS des jeweiligen Zielproteins und Tom20, eine Komponente des Translokase-Komplexes der äußeren Membran (Eliyahu *et al.*, 2010). Eine weitere Gruppe von mRNAs etabliert außerdem eine Bindung ihrer 3'UTR (untranslatierte Region) mit dem Mitochondrien-assoziierten, RNA-bindenden Protein Puf3p, um eine effiziente Lokalisation an Mitochondrien zu gewährleisten (Corral-Debrinski *et al.*, 2000; Margeot *et al.*, 2002; Saint-Georges *et al.*, 2008; García-Rodríguez *et al.*, 2007). Inwiefern die Dynamik des co-translationalen Proteinimports durch gerichtete Transportprozesse beeinflusst wird ist bisher jedoch noch nicht bekannt.

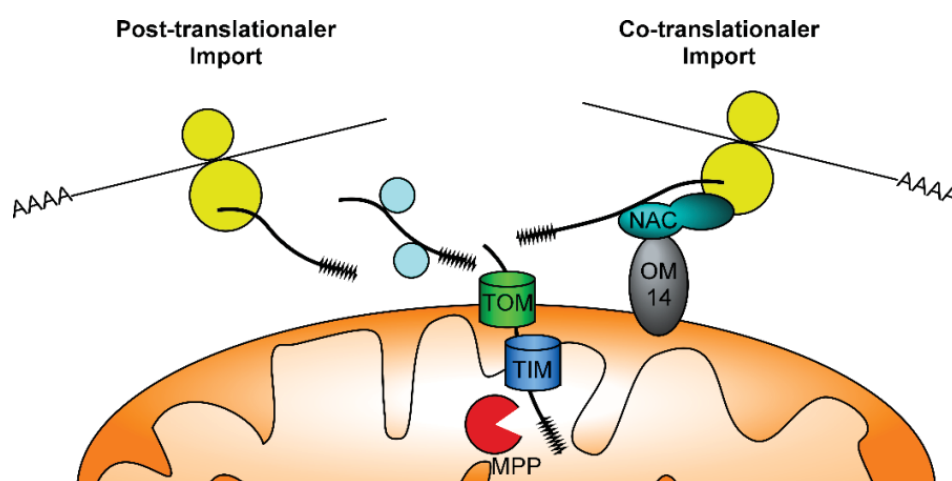


Abb. 1.10: Zwei Mechanismen des mitochondrialen Proteinimports. Schematische Darstellung des post-translationalen (links) und co-translationalen Proteinimports (rechts) in Mitochondrien. Während des post-translationalen Imports werden Proteine im Cytoplasma synthetisiert. Chaperone (hellblau) binden an die vollständig translatierten Proteine und unterstützen den Import der ungefalteten Peptidketten durch die Translokasen der äußeren (TOM) und inneren (TIM) Mitochondrienmembran.

Abb. 1.10 (fortgesetzt): Zwei Mechanismen des mitochondrialen Proteinimports. Für den co-translationalen Import binden sog. NAC-Chaperone an die naszierenden Proteine. Außerdem interagieren sie mit dem Rezeptor OM14 der äußeren Mitochondrienmembran und fixieren so die Translationsmaschinerie. Dadurch wird der Import durch die Translokase-Komplexe ermöglicht. In der Mitochondrienmatrix entfernt eine Protease (MPP) die mitochondriale Zielsequenz (schwarz, gezackt) vom N-Terminus des Proteins, wodurch das reife Protein entsteht. Abbildung modifiziert nach (Lesnik *et al.*, 2014).

In *U. maydis* konnte durch 2D-DIGE Analysen gezeigt werden, dass die Deletion von *rrm4* zu differenzieller Expression mitochondrialer Proteine während des filamentösen Wachstums führt (Koepke, 2010). Auffällig ist, dass die Menge der mitochondrialen Atmungskettenproteine Nuo2 und Atp4 aus Komplex I und V in *rrm4Δ*-Mutanten geringer ist als im Wildtyp. Die mitochondriale Matrixprotease Afg3 hingegen ist in *rrm4Δ*-Filamenten stärker repräsentiert als im Wildtyp. Afg3 zählt zu den sog. AAA-Proteasen, die in Mitochondrien an der Qualitätskontrolle und an der Assemblierung der Atmungskettenkomplexe beteiligt sind (Arlt *et al.*, 1996; Arlt *et al.*, 1998). Dies spricht dafür, dass es in Abwesenheit von Rrm4 zu Defekten während der Biogenese von Mitochondrien kommt, wodurch die Assemblierung der Atmungskettenkomplexe gestört wird. Dadurch kommt es möglicherweise zu erhöhtem Bedarf proteolytischer Degradation durch die Protease Afg3 (Koepke, 2010). Die eigentliche Lokalisation der identifizierten Zielproteine wird durch den Verlust von Rrm4 jedoch nicht beeinflusst. Dennoch scheint der Rrm4-abhängige mRNA-Transport die Mitochondrien-funktion zu beeinflussen, was zu einer erhöhten mitochondrialen Superoxid-Produktion in *rrm4Δ*-Filamenten führt (Koepke, 2010). Der genaue Zusammenhang zwischen mRNA-Transport, mitochondrialem Proteinimport und Biogenese der Atmungsketten-Komplexe ist jedoch noch unklar.

1.8 Zielsetzung dieser Arbeit

Der Rrm4-abhängige Transport von mRNAs entlang des Mikrotubuli-Cytoskeletts ist während der Etablierung des filamentösen Wachstums von *U. maydis* von zentraler Bedeutung. Zu den Zielen von Rrm4 gehören unter anderem die mRNAs der Chitinase Cts1 und einiger mitochondrialer Atmungskettenproteine.

Der Verlust von Rrm4 verringert in Filamenten die unkonventionelle Sekretion von Cts1 und führt so zu verringerter, extrazellulärer Chitinaseaktivität in Filamenten. Der exakte Mechanismus, welcher der unkonventionellen Sekretion zugrunde liegt und die biologische Funktion von Cts1 sind jedoch noch unbekannt.

Das Ziel dieser Arbeit ist es daher, durch die detaillierte Charakterisierung der chitinolytischen Maschinerie, Hinweise auf die biologische Funktion und Wirkungsweise von Cts1 zu erlangen. Dazu sollen zunächst alle chitinolytischen Enzyme identifiziert und ihre Funktion in einer genetischen Analyse, sowohl während der saprotrophen als auch während der biotrophen Phase untersucht werden. Des Weiteren soll die subzelluläre Lokalisation aller Chitinasen analysiert werden, um zusätzliche Hinweise auf die Funktion und Wirkungsweise zu erlangen. Durch eine biochemische Charakterisierung der enzymatischen Aktivitäten, sollen außerdem Einblicke in die Spezifität der Chitinasen gegenüber bestimmter Substrate gewonnen werden. Daraus lassen sich möglicherweise auch putative Mechanismen der unkonventionellen Sekretion von Cts1 ableiten.

Zusätzlich zu Cts1 wird auch die Menge mitochondrialer Atmungskettenproteine durch den Verlust von Rrm4 beeinflusst, was zu erhöhter Superoxid-Produktion führt. Dies ist ein Hinweis auf eine gestörte Funktion der Atmungskette, der ein gestörter Proteinimport oder fehlerhafte Assemblierung der Atmungskettenkomplexe zugrunde liegen könnte.

Im zweiten Teil der Arbeit soll deshalb der Einfluss von Rrm4 auf den mitochondrialen Proteinimport und die Assemblierung der Atmungskettenkomplexe untersucht werden. Dazu sollen die Atmungskettenkomplexe in Wildtyp und *rrm4Δ*-Stämmen isoliert und mittels nativer Gelelektrophorese auf fehlerhafte Assemblierung untersucht werden. Außerdem sollen eGfp-Fusionsproteine von Zielproteinen erstellt und die Dynamik des Proteinimports mittels FRAP (*fluorescence recovery after photobleaching*)-Analyse verglichen werden.

2. Ergebnisse

2.1 Die Rolle der Chitinasen in *U. maydis*

In Vorarbeiten wurde bereits dargelegt, dass die Chitinase Cts1 für das Hefe-artige und das filamentöse Wachstum sowie für darauf folgende Infektionsprozesse nicht essentiell ist (Koepke *et al.*, 2011). Aufgrund einer phylogenetischen Analyse wurde vermutet, dass genetische Redundanz zwischen den *U. maydis* Chitinasen eine untergeordnete Rolle spielen sollte (Koepke, 2010). Experimentelle Beweise dafür fehlten jedoch bislang.

Um die Funktionen der einzelnen Chitinasen zu verstehen und somit die chitinolytische Maschinerie von *U. maydis* beschreiben zu können, wurde zunächst ein klassischer, revers-genetischer Ansatz gewählt. Dazu wurde zunächst eine umfassende bioinformatische Analyse durchgeführt, um alle Gene, die für potentiell chitinolytische Proteine kodieren, zu identifizieren. Zusätzlich wurden mit Hilfe von Röntgenstruktur-gestützter Proteinstruktur-Modellierung strukturelle Eigenschaften der Chitinasen prognostiziert. Anschließend wurden die Chitinase-Deletionsmutanten während den unterschiedlichen Stadien des Lebenszyklus phänotypisch charakterisiert und die Aktivität der Chitinasen mit Hilfe verschiedener biochemischer Methoden analysiert.

2.1.1 Die chitinolytische Maschinerie von *U. maydis*

Im Genom von *U. maydis* konnten durch eine umfassende Datenbankanalyse Gene für vier chitinolytische Enzyme identifiziert werden (Abb. 2.1 A; http://pedant.helmholtz-muenchen.de/pedant3htmlview/pedant3view?Method=_method&Db=p3_t237631_Ust_maydim_y2). Davon zählen laut Proteindomänenvorhersage drei zur Familie der bereits zuvor beschriebenen Chitinasen (Cts1, *um10419*; Cts2, *um02758*; Cts3, *um06190*; GH18; SMART; Schultz *et al.*, 1998; Letunic *et al.*, 2004; <http://www.cazy.org/>; Lombard *et al.*, 2014). Das vierte, bislang nicht als chitinolytisches Enzym identifizierte Protein, gehört zur Familie der N-Acetyl-Glukosaminidasen (Cts4, *um00695*; GH20). Chitinolytische Enzyme zählen in der Regel zu den sekretierten Proteinen. Ein auffälliges Merkmal von Cts1 ist jedoch, dass das Protein kein vorhersagbares, konventionelles Signalpeptid aufweist (Koepke *et al.*, 2011; Stock *et al.*, 2012). Dennoch wird für das Protein, welches hohe Sequenzähnlichkeit zu bakteriellen Chitinasen aufweist, in einer SecretomeP-Analyse (Bendtsen *et al.*, 2004; Bendtsen *et al.*, 2005) Sekretion prognostiziert (P-Wert: 0,7 mit Einstellung „Säugetiere“; P-Wert: 0,9 mit Einstellung „Gram-Negative Bakterien“; ein Wert von > 0,5 deutet auf unkonventionelle Sekretion hin), was in vorangegangenen Arbeiten bereits experimentell verifiziert wurde (Stock *et al.*, 2012). Alle anderen *U. maydis* Chitinasen enthalten laut

SignalP-Analyse (Version 4.0; Petersen *et al.*, 2011) prognostizierte Signalpeptide (Abb 2.1; Cts2, AS 1-25; Cts3, AS 1-20; Cts4, AS 1-18). Des Weiteren sind die, für die jeweilige Enzymklassen charakteristischen katalytischen GH18- (Cts1: AS 115-457; Cts2: AS 102-364; Cts3: AS 166-519; PF00704) bzw. GH20-Domänen (Cts4: GH20b, AS 24-240; GH20, AS 271-640; PF00728) in allen Enzymen vorhanden. Weitere AS-Sequenzanalysen zeigten, dass alle katalytischen Domänen das für die jeweilige Enzymklasse typische Konsensus-Motiv aufweisen (Abb. 2.1 B; für GH18: [LIVMFY]-[DN]-G-[LIVMF]-[DN]-[LIVMF]-[DN]-x-E, vereinfacht DXXDXDXE; für GH20: HXGGDE; in Cts4 SSGGDE; Peterbauer *et al.*, 1996). Darin ist jeweils der Glutamatrest die katalytische Aminosäure, welche als generelle Säure/Base wirkt und zur Protonierung des glykosidischen Sauerstoff-Atoms am C1-Atom führt (<http://www.cazypedia.org/>; Synstad *et al.*, 2004). Dies deutet darauf hin, dass alle von *U. maydis* kodierten chitinolytischen Enzyme potentiell aktiv sind. Andere für Chitinasen typische Domänen oder Sequenzmotive, wie z. B. Chitinbindedomänen (CBD), Kohlenhydrat-Bindemotive (CBM, engl. „carbohydrate binding modules“), Fibronectin-III-ähnliche Chitinbindedomänen (FnIII) oder Transmembran-domänen (zusammengefasst in Vaaje-Kolstad *et al.*, 2013) konnten nicht vorhergesagt werden.

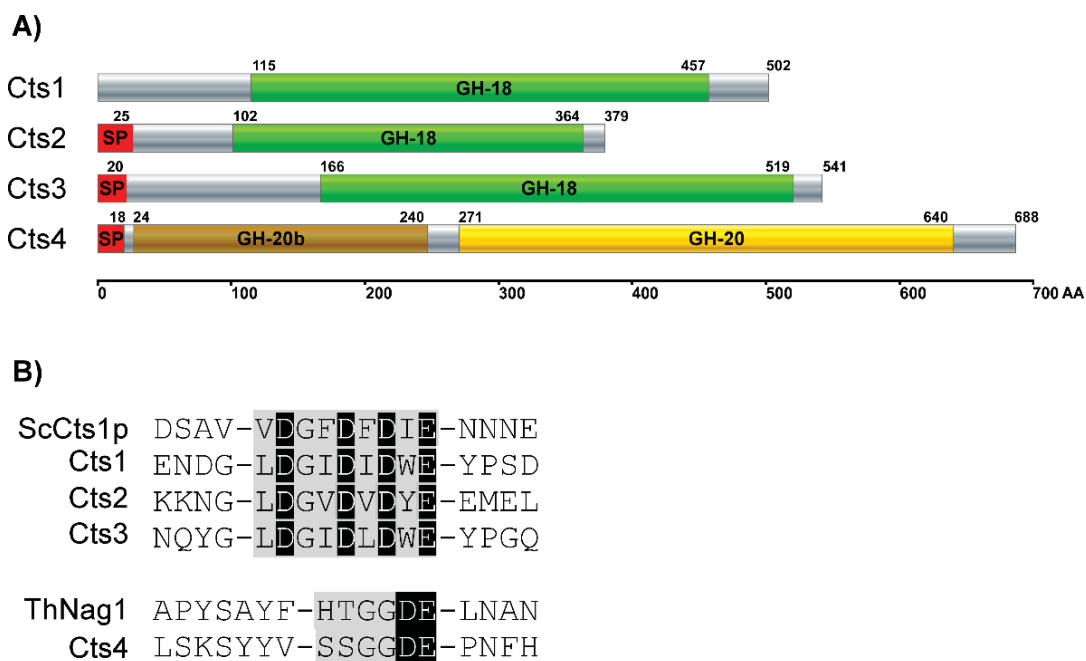


Abb. 2.1: Die chitinolytische Maschinerie von *U. maydis*. (A) SMART-Domänenstruktur und SignalP-Vorhersage der chitinolytischen Enzyme aus *U. maydis*. Das Genom von *U. maydis* kodiert für drei Chitinasen der GH18 Familie und einer N-Acetylglukosaminidase der GH20 Familie. Cts1 enthält als einzige der Chitinasen kein Signalpeptid für die konventionelle Sekretion. (B) Die Konsensus-Motive der GH18- und GH20-Glykosylhydrolasen. Alle chitinolytischen Enzyme aus *U. maydis* enthalten die katalytisch aktiven Aminosäuren (DXXDXDXE in den GH18-Domänen, SSGGDE in der GH20-Hydrolasedomäne). Das Glutamat ist die generelle Säure/Base, die während der Katalyse zur Protonierung des glykosidischen Sauerstoffs führt. Zum Vergleich sind die Sequenzen der aktiven Zentren bereits charakterisierter GH18- und GH20-Enzyme dargestellt (Cts1p aus *S. cerevisiae*; UniProt: P29029 und Nag1 aus *T. harzianum*; UniProt: P87358).

Eine vergleichende AS-Sequenzanalyse von Cts1 ergab weiterhin, dass Orthologe, wie z.B. SrCts1 aus *S. reilianum* oder die Bakterien-ähnliche Chitinase Cts2p aus *S. cerevisiae*, ebenfalls kein klassisches Signalpeptid aufweisen (Abb. 2.2). Dies deutet darauf hin, dass der unkonventionelle Sekretionsmechanismus aus *U. maydis* (Stock *et al.*, 2012; Sarkari *et al.*, 2014) evolutionär konserviert ist.

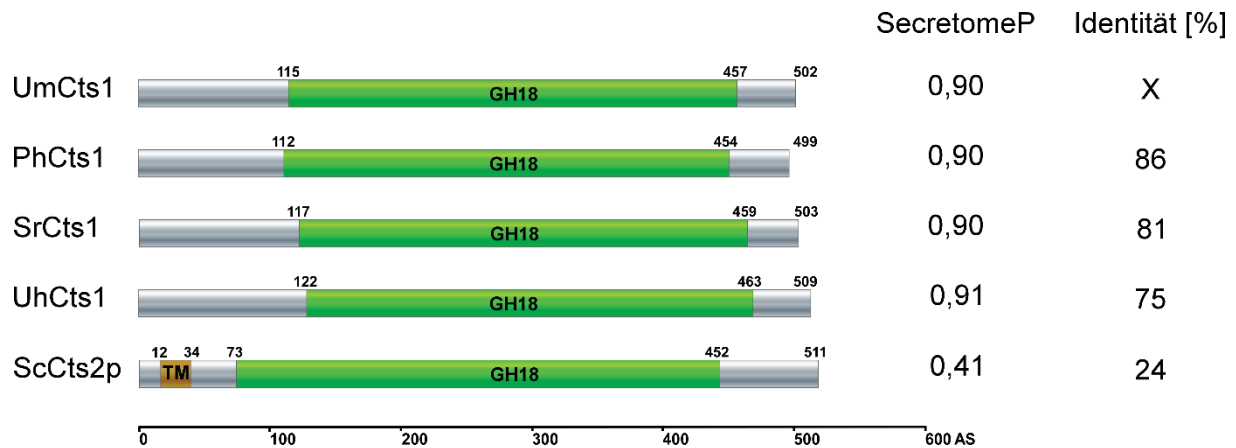


Abb. 2.2: Die Abwesenheit eines Signalpeptids in Bakterien-ähnlichen Chitinasen ist evolutionär konserviert. Schematische Darstellung der Domänenarchitektur von Cts1 und homologen Proteinen, sowie der Chitinase Cts2p aus *S. cerevisiae*. Keine der Chitinasen enthält ein N-terminales Signalpeptid. Dennoch werden die Proteine von SecretomeP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SecretomeP/>; Bendtsen *et al.*, 2005) als putativ unkonventionell sekretiert prognostiziert. ScCts2p enthält eine putative, N-terminale Transmembrandomäne und eine Sekretion des Proteins wird als weniger wahrscheinlich prognostiziert. Die Sequenzidentität der Proteine ist rechts angegeben.

Neben der Konsensus-Sequenz DXXDXDXE der GH18-Chitinasen, welche die katalytische Triade enthält, wurde die Sequenz SXGG als zweites diagnostisches Motiv beschrieben (Synstad *et al.*, 2004; Vaaje-Kolstad *et al.*, 2013). Dieses zweite Motiv trägt in bakteriellen Chitinasen zusammen mit einigen anderen Aminosäureresten entscheidend zur Hydrolase-Reaktion bei (van Aalten *et al.*, 2001; Synstad *et al.*, 2004). Um weitere Aminosäuren zu identifizieren, die für die Funktion der Chitinasen in *U. maydis* potenziell relevant sein könnten, wurden evolutionär konservierte Aminosäuren mittels einer Co-Factor Analyse (Roy *et al.*, 2012a, b; <http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/COFACTOR/>) identifiziert (Anhang: Abb. 6.1). Die Analyse ergab, dass alle von *U. maydis* kodierten Chitinasen evolutionär schwach konservierte N- und C-Termini aufweisen. Innerhalb der katalytischen Glykosylhydrolase-Domäne steigt der mittlere Grad der Konservierung wie zu erwarten an. Interessanterweise liegen hochkonservierte Aminosäuren in kleinen Clustern vor, welche über die gesamte GH18-Domäne verstreut sind, sodass eine funktionelle Zuordnung zum katalytischen Zentrum durch reine Sequenzanalyse nicht prognostiziert werden kann.

2.1.2 Proteinstruktur-Modellierung der chitinolytischen Enzyme

Die dreidimensionale Struktur von Chitinasen wurde bereits, exemplarisch für alle Reiche, experimentell durch Röntgendiffraktionsanalyse beschrieben und ist hochkonserviert (Song und Sung, 1996; Perrakis *et al.*, 1994; van Aalten *et al.*, 2001; Fusetti *et al.*, 2002). Einige strukturelle Merkmale, wie z.B. die Architektur der Bindestelle, korrelieren direkt mit der Funktionsweise der Enzyme und beeinflussen deren Bindeeigenschaften und Prozessivität. Der hohe Grad der Konservierung auf Sequenz-, aber auch auf struktureller Ebene, besonders innerhalb der katalytischen Domäne, schafft eine gute Grundlage zur Röntgenstruktur-gestützten Proteinstruktur-Modellierung. Um einen Einblick in die strukturellen Eigenschaften der Chitinasen aus *U. maydis* zu gewinnen wurden Proteinstrukturmodelle erstellt.

Die Analyse der Strukturmodelle ergab, dass sowohl die Chitinasen als auch die N-Acetylglukosaminidase aus *U. maydis* die charakteristische $(\alpha\beta)_8$ -barrel-Struktur ($(\alpha\beta)_8$ -Fass; Tews *et al.*, 1996) im Zentrum der katalytischen Domäne enthalten (Anhang Fig. XX). Das katalytische Zentrum, mit der generellen Säure/Base Glutamat sitzt am C-terminalen Ende des vierten β -Faltblattes der GH18-Domäne. Interessanterweise besitzt Cts1 einige hochkonservierte, aromatische Aminosäuren auf der Oberfläche des Proteins (Abb. 2.3 A; F², W¹²⁴, Y¹²⁷, W¹⁶⁴, W¹⁷⁶, W²⁰⁹, W³²³). Homologe AS begünstigen in ChiA aus *S. marcescens* die Bindung an Chitin und fördern die Hydrolyse langkettiger Substrate (Uchiyama *et al.*, 2001; Zakariassen *et al.*, 2009). Einige dieser aromatischen AS in der unmittelbaren Nähe des katalytischen Zentrums von Cts1 sind in *S. marcescens* und *Bacillus circulans* näher charakterisiert und spielen dort eine Rolle in der Hydrolyse und erhöhen die Prozessivität (Anhang: Abb. 6.6; Watanabe *et al.*, 2003, Payne *et al.*, 2012). Die weitere Analyse der Oberflächenstruktur der Chitinasen aus *U. maydis* zeigte, dass sich die Architektur der Bindestelle von Cts1 und Cts3 gegenüber der von Cts2 deutlich unterscheidet (Abb. 2.3 B). Während Cts1 und Cts3 eine tiefe, tunnelförmige Bindestelle aufweisen, ist die prognostizierte Struktur der Bindestelle in Cts2 eher flach und offen, was ein typisches Merkmal vieler Pflanzen-ähnlicher Chitinasen ist. Außerdem wird deutlich, dass weder in Cts2 noch in Cts3 der in Cts1 beschriebene Verlauf aromatischer, oberflächenexponierter Aminosäuren vorhanden ist (Anhang: Abb. 6.5)

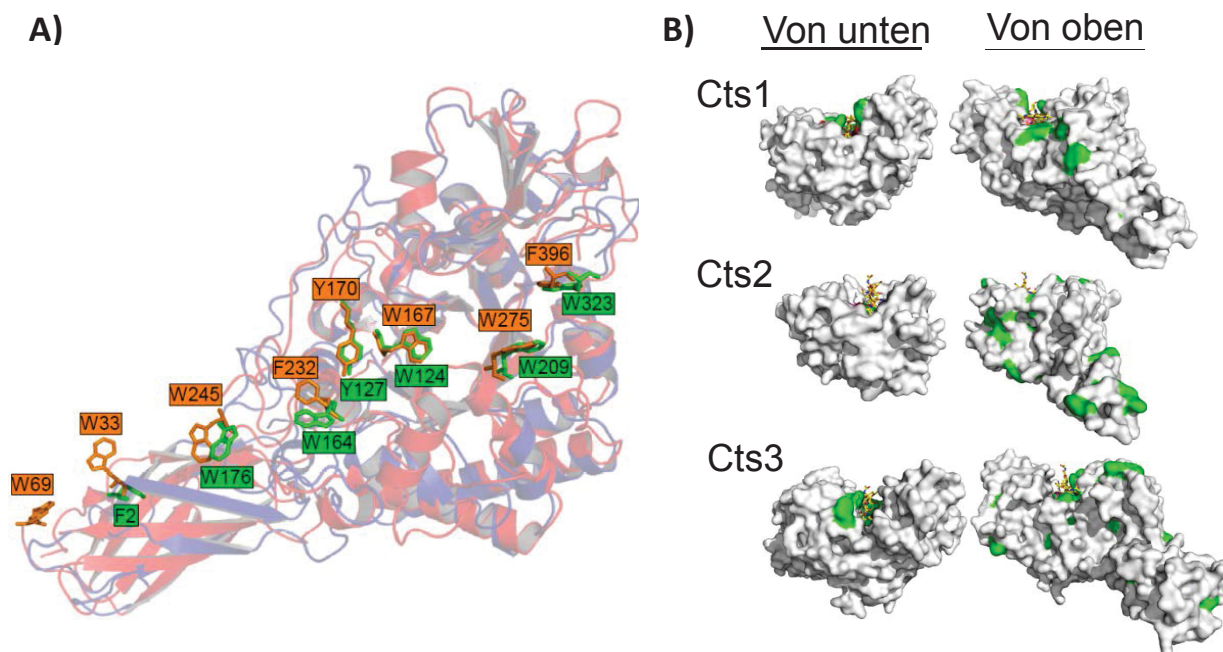


Abb. 2.3: Die oberflächenexponierten, aromatischen AS in Cts1 sind konserviert. (A) Überlagerung der Proteinstruktur von SmChiA (rot) mit der prognostizierten Struktur von Cts1 (blau). Aromatische AS aus SmChiA sind in orange, aus UmCts1 in grün gekennzeichnet. (B) Oberflächenprojektion von Cts1, Cts2 und Cts3 aus Sicht des C- (von unten) bzw. des N-Terminus (von oben). Darstellung als Komplex mit dem Substrat (GlcNAc)₆ (gelb). Aromatische AS auf der Oberfläche sind in grün dargestellt.

Um herauszufinden, ob die in Kapitel 2.1 identifizierten, evolutionär hochkonservierten AS (Abb. 6.1) strukturelle Funktionen haben und somit zur Substratbindung beitragen könnten, wurden sie in den dreidimensionalen Strukturmodellen visualisiert. Die Analyse ergab, dass sich alle hochkonservierten AS in unmittelbarer Nähe der Substratbindestelle befinden und somit höchswahrscheinlich direkt an der Bindung und Hydrolyse des Substrates beteiligt oder aber innerhalb der Bindestelle strukturell formgebend sind (Abb. 2.4).

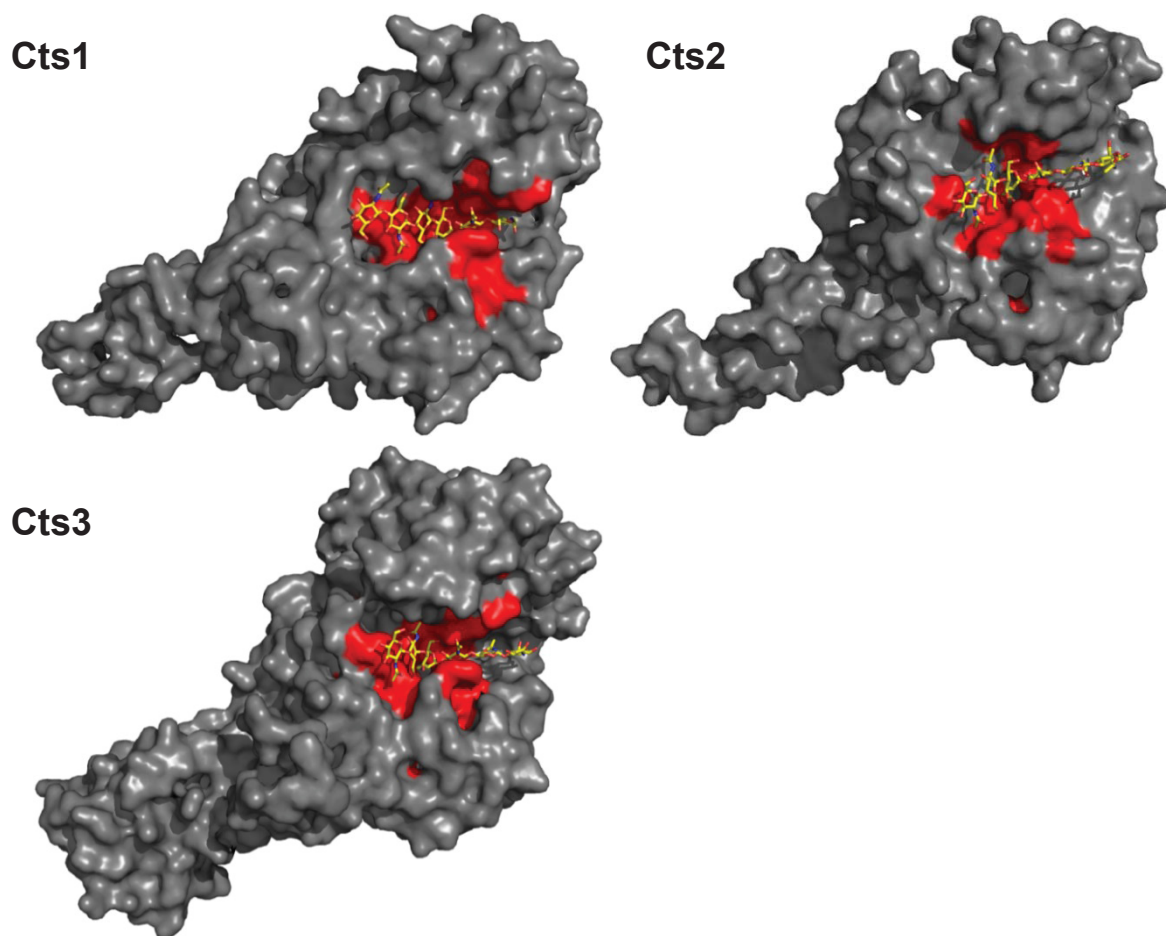


Abb. 2.4: Hochkonservierte AS formen die Substratbindestellen von Cts1, Cts2 und Cts3. Oberflächenprojektionen der prognostizierten Proteinstrukturen von Cts1, Cts2 und Cts3. Die in Kapitel 2.1 identifizierte, konservierte Aminosäuren (rot) formen jeweils die Substratbindestelle. Das Substrat (GlcNAc)₆ ist in gelb dargestellt. Die Oberflächenstruktur ist in grau dargestellt.

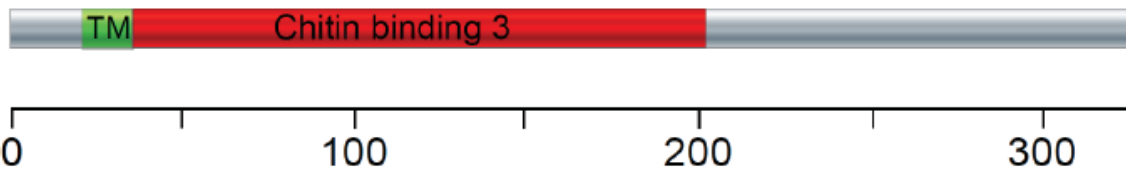
Zusammenfassend ergab die Analyse der Strukturmodelle, dass alle von *U. maydis* kodierten chitinolytischen Enzyme, konservierte Strukturelemente, wie z.B. die typische $(\alpha/\beta)_8$ -barrel Struktur aufweisen. Zusätzliche Domänen in den C- oder N-terminalen Bereichen der Enzyme konnten auch durch die Analyse der putativen Proteinstrukturen nicht ermittelt werden. Jedoch wurden konservierte, aromatische Aminosäuren auf der Oberfläche von Cts1 identifiziert, die höchstwahrscheinlich zur Substratbindung beitragen und die Effizienz des Enzyms beeinflussen. Des Weiteren wurden hochkonservierte Aminosäuren identifiziert, die formgebend für die Substratbindestelle sind. Durch gezielte Mutation dieser Aminosäuren könnten die Eigenschaften von Cts1, wie beispielsweise die Substratbindeeffizienz verändert werden, wodurch potentiell die Sekretionsleistung erhöht werden könnte, was für die biotechnologische Anwendung dieses Proteins von Vorteil wäre.

2.1.3 Identifizierung der Chitin-Monooxygenase Cmo1

Vorarbeiten haben bereits gezeigt, dass die Chitinase Cts1 aus *U. maydis* zu den Bakterien-ähnlichen Chitinasen zählt (Koepke *et al.*, 2011). Auch in der Analyse der Strukturmodelle zeigte Cts1 große, strukturelle Ähnlichkeit zu der Chitinase ChiA aus dem Gram-negativen Bakterium *S. marcescens*. Die chitinolytische Maschinerie dieses Bakteriums zählt zu den effektivsten und am besten charakterisierten (Monreal und Reese, 1969; Fuchs *et al.*, 1986; Suzuki *et al.*, 1998). Erstaunlicherweise ähnelt auch die gesamte Zusammensetzung der chitinolytischen Enzyme aus *U. maydis* der aus *S. marcescens* sehr stark. Beide Spezies enthalten drei GH18-Chitinasen und eine GH20-N-Acetylgukosaminidase. Zusätzlich kodiert das Genom von *S. marcescens* für das 21 kDa große Protein Cbp21 (*chitin binding protein*, 21 kDa), von welchem gezeigt wurde, dass es mittels Monooxygenaseaktivität die chitinolytische Aktivität der Chitinasen deutlich verstärkt (Vaaje-Kolstad *et al.*, 2005). Um herauszufinden, ob *U. maydis* ebenfalls für ein weiteres, bisher nicht identifiziertes chitinolytisches Enzym kodiert, wurden Cbp21-Homologe in einer BLAST-Analyse des *U. maydis* Genoms identifiziert. *U. maydis* enthält laut Annotation tatsächlich ein 326 AS langes Protein (*um05439*), welches laut Clustal-W Analyse im N-terminalen Teil hohe Sequenzhomologie zu CBP21 aufweist (39 % Identität, 69 % Ähnlichkeit; Abb. 2.5 B). Eine SMART-Analyse des Proteins prognostizierte eine Transmembrandomäne (TM) im N-terminalen Bereich und eine Chitin-Bindedomäne (CBD3) im Anschluss an die TM-Domäne (Abb. 2.5 A). Der C-Terminus dieses Proteins weist dagegen eine nicht-homologe, C-terminale Verlängerung ohne prognostizierbare Domänen auf. Interessanterweise fehlt laut SignalP-Analyse (Petersen *et al.*, 2011) auch in diesem Bakterienähnlichen Enzym ein N-terminales Signalpeptid für die konventionelle Sekretion (Abb. 2.5 A).

Zwei Histidinreste, die in *S. marcescens* essentiell für die Spaltung von Chitin sind, sind auch in der Sequenz von Cmo1 enthalten (Abb. 2.5 B; rot). Um herauszufinden, ob auch die Struktur der Proteine und damit die Positionen der katalytisch aktiven Histidinreste konserviert sind, wurde auch die Struktur von Cmo1 mittels I-Tasser modelliert. Als Strukturvorlage diente das Protein Cbp21 (PDB-Eintrag: 2BEN; Vaaje-Kolstad *et al.*, 2005). Die Analyse des prognostizierten Strukturmodells von Cmo1 ergab, dass der N-terminale Teil, der die katalytische Domäne enthält, in der Tat hohe strukturelle Ähnlichkeit zu Cbp21 aufweist (Abb. 2.6 A). Besonders auffällig ist, dass die Positionen der Histidine (H^{33} , H^{118}), welche in Cbp21 das katalytische Zentrum bilden, hochkonserviert sind.

a)



b)

um05439	MVFSNSNASVSLFRLVALVATLSHLVFTFVDAHGYVTFPASRAYMCKQGQAKNCGEIQYE 60	
CBP21	----MNKTSRTLLS-LGLLSAAMFGVSQQANAHGYVESPASRAYQCKLQINTQCGSVQYE 55	
	.:* :*: :*::: . * .:***** ***** ** .:*.:**	
um05439	PQSVEAPKGLPFARKGDGQLCSAGLGQFSQLDRQGSAWPTTK-ASGVHSFSWTFTACHA 119	
CBP21	PQSVEGLKGFPOAGPADGHASADKSTFFELDQQTPTRWKLNLTGPNSFTWKLTARPS 115	
	*****. *: * * .*:::* * . * :*: * *: * . : : * .*:*.:**:*	
um05439	TTDFKYFITKANWDSSKTSGLSASDLESDFLTVSMNGKAPRRTMNHDLKAMPSSRSGYH 179	
CBP21	TTSWRYFITKPNWDASQPLT--RASFDLTPFCQFNDGGAIPAAQVTHQC-NIPADRSRSGH 172	
	.:*** **:*.: :::: * * .. * * :*: : .*** *	
um05439	VVYAVWTVDNNTANAFYQCLDLDFGGGNSSSSSSSSSSSATSTTGSSSAASAATSSTSSS 239	
CBP21	VILAVWDIADTANAFYQAIDVNLK----- 197	
	*: * * : :*****.:*:::	
um05439	VSESGTASTASGSGSDDSSSSSGDSSNGSSSDNNGSSSGSTTMPKSQIAQSGACRMKKRR 299	
CBP21	----- 197	
um05439	RSPNASVLAARGDYRRHKSQMRRDRQG 326	
CBP21	----- 197	

Abb. 2.5: Das *U. maydis* Genom kodiert für das Cbp21-Homolog Cmo1. (A) Domänenstruktur der putativen Chitin-Monooxygenase Cmo1 (*um05439*). Das Protein ist 326 AS lang und enthält eine prognostizierte TM-Domäne im N-terminalen Teil, gefolgt von einer Chitin-Bindedomäne. (B) Clustal-W Sequenzvergleich von Cmo1 und dem *S. marcescens* Homolog Cbp21. Der N-terminale Teil von Cmo1 zeigt hohe Sequenzidentität zu Cbp21. Zwei katalytische Histidinreste, welche in *S. marcescens* für die Spaltung von Chitin essentiell sind, sind in Cmo1 konserviert (rot hinterlegt).

Im Protein Cbp21, das zu der Familie der lytischen Polysaccharid-Monooxygenasen (LPMOs) gehört, binden die Histidinreste Kupfer als Zentralatom, welches die Substrathydrolyse durch eine Radikalisierung von Sauerstoff einleitet (Abb. 2.6 C). Ein ähnlicher Mechanismus ist für das *U. maydis* Protein Cmo1 sehr wahrscheinlich, da die Positionen der Histidinreste zueinander und zum Peptidrückgrat eine elektrostatische Bindung von Kupfer theoretisch ermöglichen (Abb. 2.6 B).

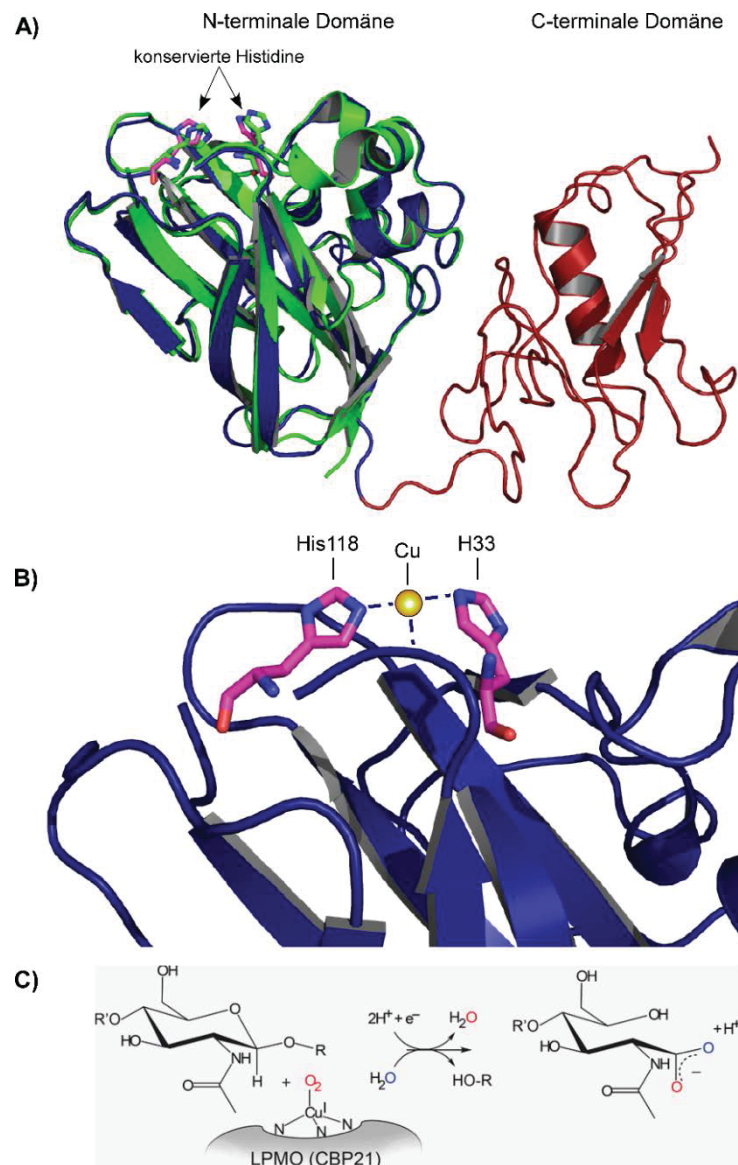


Abb. 2.6: Die Struktur von Cmo1 ist konserviert und suggeriert einen konservierten Reaktionsmechanismus. (A) Überlagerung der Struktur von Cbp21 (grün) mit der vorhergesagten Struktur der Chitin-Monooxygenase Cmo1 aus *U. maydis* (rot/blau). Der N-terminale Teil von Cmo1, welcher die katalytische Domäne enthält, weist eine hohe strukturelle Konservierung zu Cbp21 auf. Die Positionen der katalytischen Histidinreste sind fast identisch. (B) Strukturmodell von Cmo1 aus *U. maydis*. Die Histidinreste H³³ und H¹¹⁸ in Cmo1 aus *U. maydis* sind so zueinander ausgerichtet, dass eine Binding des Zentralatoms Kupfer ermöglicht wird. (C) Schematische Darstellung des Reaktionsmechanismus der lytischen Polysaccharid-Monooxygenase Cbp21 aus *S. marcescens*. Das Enzym beinhaltet ein reduziertes Kupfer-Ion, welches ein Elektron auf molekularen Sauerstoff überträgt. Das daraus entstehende Superoxo-Intermediat initiiert die Spaltung von Chitin über einen Mechanismus, der noch nicht vollständig geklärt ist. Durch die Spaltung entsteht ein nicht oxidiertes Produkt (HO-R) und eine Aldonsäure, welche ein Sauerstoff des aktivierten O₂ und ein Sauerstoff aus Umgebungswasser enthält. Abbildung aus (Aachmann *et al.*, 2012).

Wie oben bereits erwähnt, ist im Gegensatz zur katalytischen Domäne im N-terminalen Bereich, der C-terminale Teil des Enzyms in *S. marcescens* nicht konserviert (Abb. 2.6 B). Außerdem ist die C-terminale Domäne über einen ungewöhnlich langen Abschnitt aus acht Serinresten mit der katalytischen Domäne verbunden.

Um auszuschließen, dass es sich bei der prognostizierten, C-terminalen Domäne um einen Annotationsfehler handelt und um zu untersuchen, ob diese Eigenschaft in LPMOs verwandter Spezies konserviert ist, wurden in einer BLAST-Suche die ähnlichsten Homologe zu Cmo1 identifiziert. Dabei handelt es sich um Cmo1-Homologe aus den Brandpilzen *P. hubeiensis*, *Melanopsichium pennsylvanicum*, *S. reilianum* und *U. hordei*, sowie dem Cbp21-Homolog aus *Streptomyces spec.*, einem Gram-positiven Actinobakterium. Der N-terminale Bereich ist sowohl in den eukaryotischen als auch in den prokaryotischen Enzymen konserviert. Der C-terminale Bereich fehlt in Prokaryoten. In allen analysierten Brandpilzen hingegen ist der C-terminale Bereich vorhanden und besteht aus einem variablen und einem konservierten Bereich (Abb. 2.7). Interessanterweise enthält keines der Proteine ein eukaryotisches Sekretionssignal, was darauf hinweisen könnte, dass Cmo1 evolutionär konserviert, unkonventionell sekretiert wird.

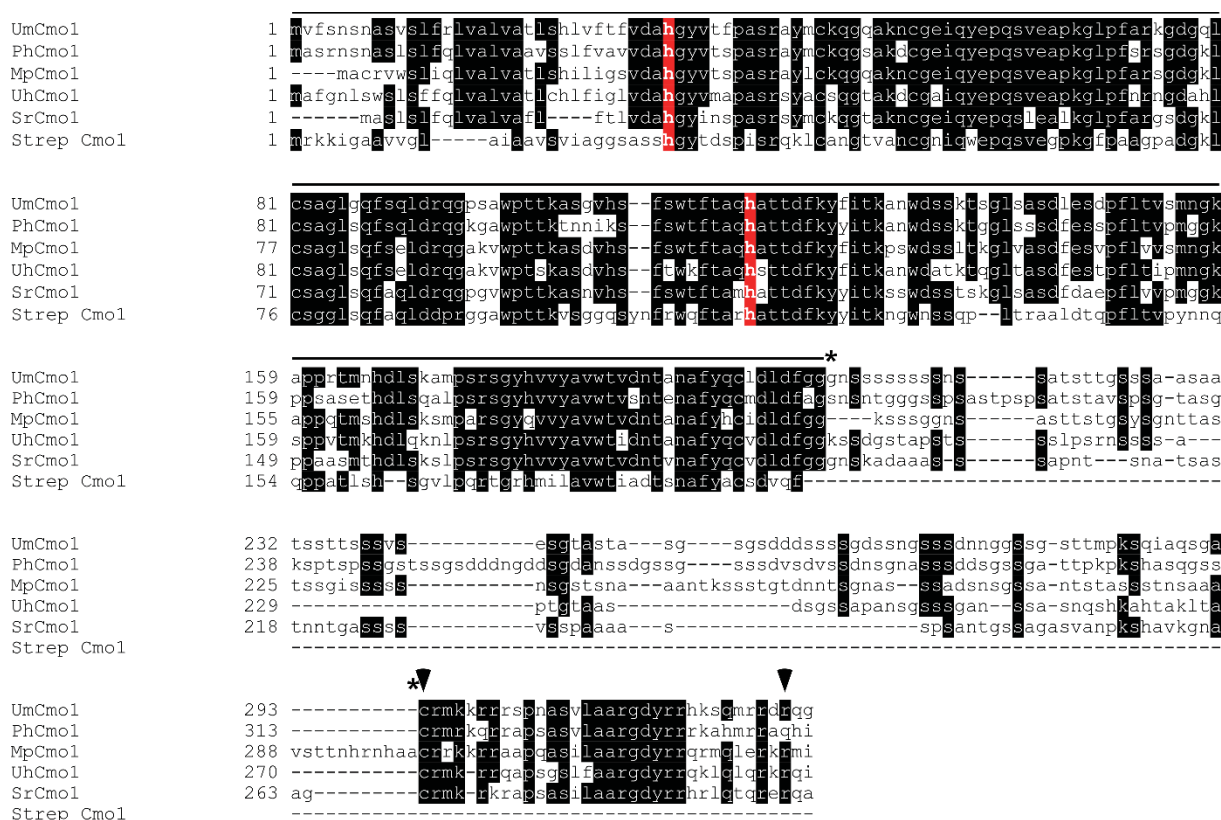


Abb. 2.7: Sequenzvergleich von Cmo1 und homologen Proteinen. Cmo1 besteht aus einer in Eukaryoten und Prokaryoten konservierten, N-terminalen Domäne und einer C-terminalen Verlängerung, die spezifisch für Eukaryoten ist. In der N-terminalen Domäne sind die an der Kupfer-Bindung beteiligten Histidine konserviert. N-terminale Domäne: Schwarzer Strich; C-terminale Domäne, variabler Bereich: Sterne; C-terminale Domäne, konservierter Bereich: Pfeilspitzen; Histidinreste des aktiven Zentrums: Rot. Schwarz hinterlegt sind Bereiche mit > 60 % Sequenzidentität.

2.1.4 Genetische Charakterisierung von Chitinase-Deletionsmutanten

Um einen Einblick in die biologische Funktion der Chitinasen in *U. maydis* zu erlangen, wurde eine umfangreiche genetische Analyse von Chitinase-Deletionsmutanten durchgeführt. Dazu wurden sowohl Einzel-Deletionsmutanten von *cts1*, *cts2*, *cts3* und *cts4*, als auch die korrespondierenden Doppel-, Tripel- und Quadrupel-Mutanten mittels homologer Rekombination hergestellt (s. auch Kapitel 4.2.2 und Tab. 4.6). Da während der genetischen Analyse die Funktion der Chitinasen sowohl während der saprotrophen, als auch während der biotrophen Phase untersucht werden sollte, wurden die Deletionen im AB33 und SG200 Stammhintergrund (Brachmann *et al.*, 2004; Kämper *et al.*, 2006) hergestellt. Anschließend wurde die biologische Funktion der Chitinasen durch detaillierte phänotypische Untersuchungen während verschiedener Phasen des Lebenszyklus' von *U. maydis* untersucht.

2.1.4.1 Chitinase-Deletionen haben keinen Einfluss auf die Teilungsrate

Chitinasen können das Wachstum von Pilzen auf unterschiedliche Weise beeinflussen. Während von endogenen Chitinasen gezeigt wurde, dass sie das Wachstum des jeweiligen Pilzes positiv beeinflussen (Takaya *et al.*, 1998b), können exogene Chitinasen, welche z.B. von Wirtsorganismen produziert oder in aufgereinigter Form appliziert werden, das Wachstum von Pilzen inhibieren (Schlumbaum *et al.*, 1986).

Um herauszufinden, welche Rolle endogene Chitinasen für das Wachstum von *U. maydis* spielen, wurden zunächst die Teilungsraten von Chitinase-Deletionsmutanten anhand von Wachstumskurven in Vollmedium (CM) bestimmt. Dazu wurden exponentiell wachsende AB33-Kulturen sowie entsprechende Kulturen der Chitinase-Deletions-mutanten in CM auf eine OD₆₀₀ von 0,05 eingestellt. Anschließend wurde das Wachstum aller Kulturen anhand des Anstiegs der optischen Dichte bei 600 nm alle zwei Stunden über einen Zeitraum von zwölf Stunden gemessen. Die Ergebnisse dieser Analyse zeigten, dass endogene Chitinasen aus *U. maydis* keinen Einfluss auf die Teilungsrate in CM-Flüssigkulturen haben. So zeigten auch vollständig Chitinase-defiziente Stämme (AB33cts1Δcts2Δcts3Δcts4Δ) Teilungsraten, die mit der von AB33 vergleichbar waren (Abb. 2.8).

Abb. 2.8 (nächste Seite): Chitinasen haben keinen Einfluss auf die Teilungsrate von *U. maydis* in Flüssigkultur. Wachstumskurven von AB33 sowie der Chitinase-Deletionsmutanten in CM. Das Wachstum aller Mutanten gleicht dem von AB33 und folgt dem erwarteten exponentiellen Verlauf. Vorkulturen der gezeigten Stämme wurden in CM bis zu einer OD₆₀₀ von 1 herangezogen und zu Beginn der Messung in CM auf 0,05 eingestellt. Die OD₆₀₀ wurde anschließend alle zwei Stunden photometrisch bestimmt. Die durchgezogene Linie zeigt eine exponentielle Trendlinie auf Basis der Daten der Quadrupel-Mutante (AB33cts1Δcts2Δcts3Δcts4Δ) zur Verdeutlichung des unveränderten, exponentiellen Wachstums. Fehlerbalken: Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten.

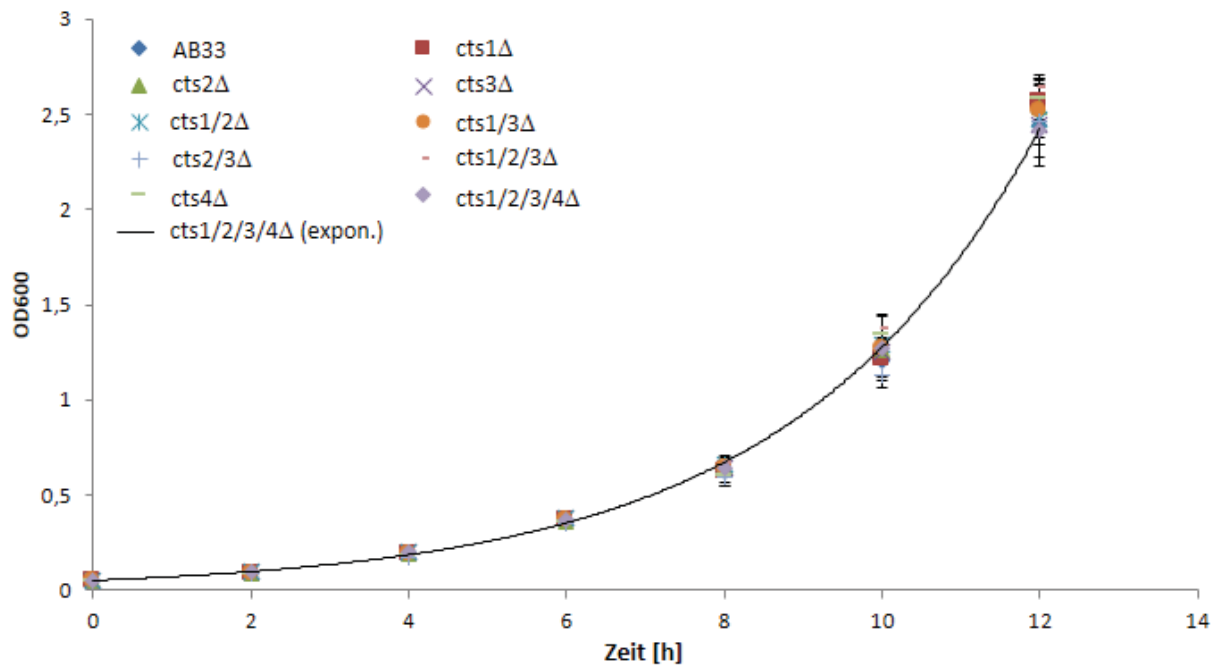


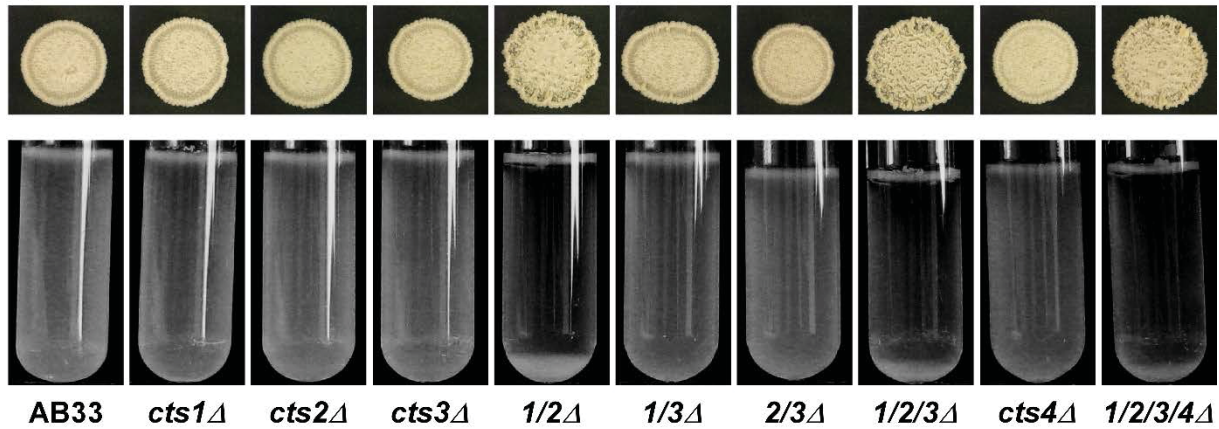
Abb. 2.8: Chitinasen haben keinen Einfluss auf die Teilungsrate von *U. maydis* in Flüssigkultur.

2.1.4.2 Cts1 und Cts2 wirken während der Zellteilung und sind funktionell redundant

In *S. cerevisiae* führt die Deletion des Gens, welches für die Pflanzen-ähnliche Chitinase Cts1p kodiert zu Defekten während der Zellteilung (Kuranda und Robbins, 1991). Mutanten, denen Cts1p fehlt, können zwar noch normal durch Knospung wachsen, jedoch ist die physische Trennung der Zellen gestört. Ein ähnlicher Effekt wurde auch in *Cts1*-Deletionsmutanten in *Kluyveromyces lactis* beobachtet (*KlCts1*; Colussi *et al.*, 2005). Interessanterweise führt die Deletion der Endo-Glukanasen *Eng1* und *Agn1* in *S. pombe* ebenfalls zu Defekten in der Zellseparation (Martin-Cuadrado *et al.*, 2003; Dekker *et al.*, 2004 Santos *et al.*, 2005). Vorarbeiten in *U. maydis* haben hingegen gezeigt, dass die Deletion von *cts1* keinen Einfluss auf das Wachstum oder die Zellteilung während des hefeartigen Wachstums hat (Koepke *et al.*, 2011). Eine mögliche Erklärung dafür könnte genetische Redundanz der drei GH18-Chitinasen sein, welche laut bioinformatischer Vorhersage alle potenziell chitinolytisch aktiv sind (s. Abb. 2.1).

Um zu überprüfen, ob die Chitinasen aus *U. maydis* funktionell redundant sind und ob die entsprechenden Deletionen zu morphologischen Veränderungen führen, wurden die Chitinase-Deletionsmutanten phänotypisch untersucht (Abb. 2.9 A). Dafür wurde zunächst die Koloniemorphologie auf CM-Agar Platten betrachtet. Die Ergebnisse dieser Analyse ergaben, dass Einzeldeletionen der Chitinasegene *cts1*, *cts2* und *cts3* sowie die Deletion des N-Acetyl-Glukosaminidasegens *cts4* keinen Einfluss auf die Morphologie von *U. maydis* Kolonien haben.

A)



B)

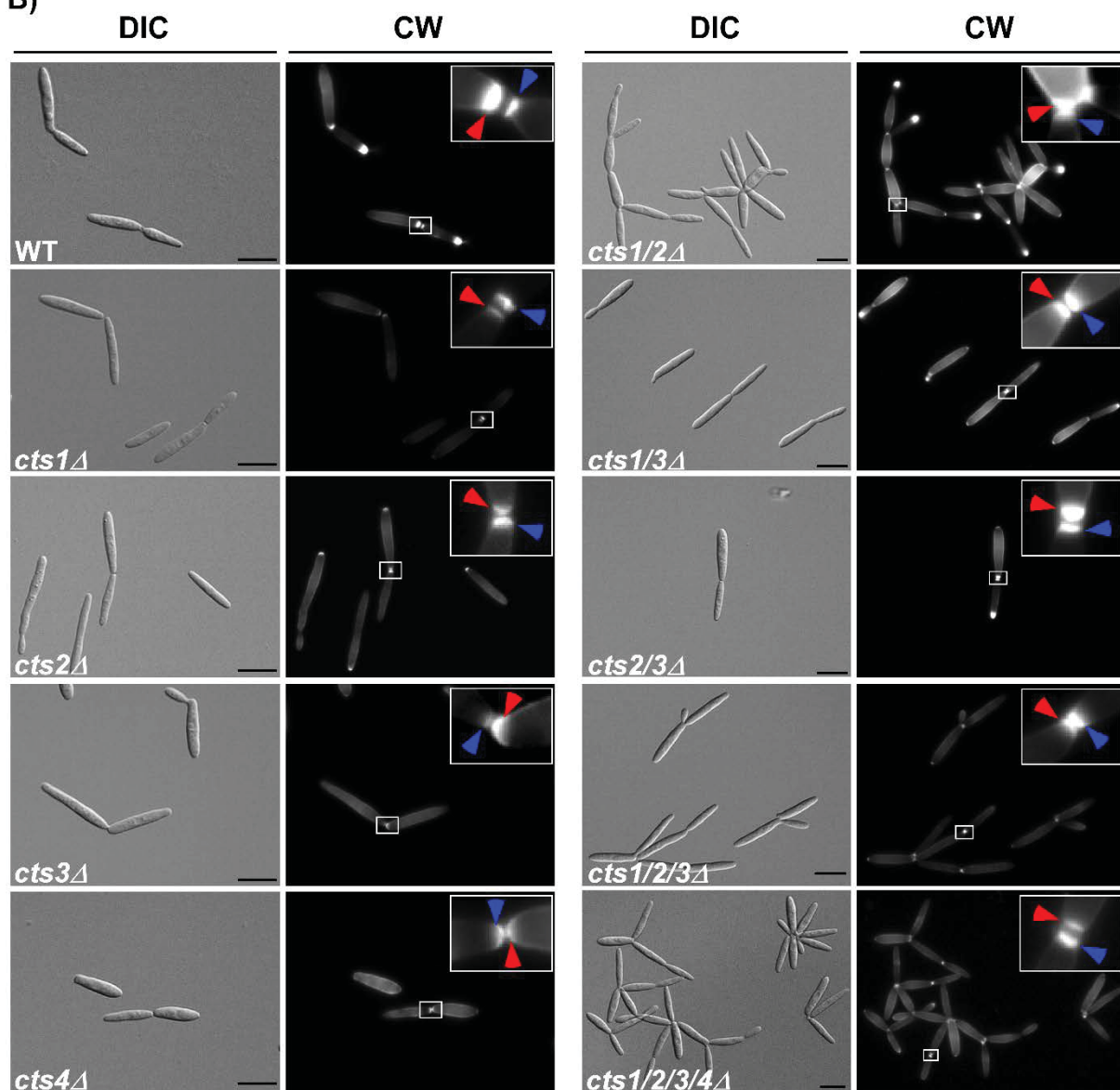


Abb. 2.9: Die Doppeldeletion von *cts1* und *cts2* führt zu Defekten während der Zellteilung. (A) Kolonie-Morphologie und Sedimentationsverhalten von *U. maydis* Chitinase-Deletionsmutanten. *cts1*Δ*cts2*Δ-Doppelmutanten haben eine veränderte Koloniemorphologie gegenüber AB33. Die Kolonien erscheinen rauer, mit gekräuseltem Rand und weisen einen größeren Durchmesser auf (obere Reihe). In Flüssigkultur aggregieren *cts1*Δ*cts2*Δ-Doppelmutanten und sedimentieren schneller (untere Reihe).

Abb. 2.9 (fortgesetzt): Die Doppeldeletion von *cts1* und *cts2* führt zu Defekten während der Zellteilung. (B) Zellmorphologie und Septenbildung der Chitinase-Mutanten. Die Zellmorphologie von Einzelmutanten ist unverändert. *cts1Δcts2Δ*-Doppelmutanten zeigen hingegen Defekte während der Cytokinese. Die physische Trennung der Zellen ist nicht möglich. Die Septenbildung ist in den Chitinase-Deletionsmutanten jedoch nicht beeinträchtigt. Die Färbung der Septen erfolgte mittels Calcofluor-White (CW). Rote Pfeilspitze: Primärseptum; Blaue Pfeilspitze: Sekundärseptum. DIC: Differentialinterferenzkontrast; CW: Calcofluor-White. Größenstandard: 10 µm

Die *cts1Δcts2Δ*-Doppelmutanten sowie alle weiteren Mutanten, in denen sowohl *cts1* als auch *cts2* deletiert war, zeigten hingegen eine veränderte Koloniemorphologie gegenüber AB33 (nachfolgend erfolgt der Bezug lediglich auf den Doppelmutanten-Phänotyp). Die Kolonien erscheinen rauer als AB33-Kolonien und haben einen stark gekräuselten Rand (Abb. 2.9 A, obere Reihe). Außerdem weisen *cts1Δcts2Δ*-Kolonien einen größeren Koloniedurchmesser auf (Anhang: Abb. 6.7). In Flüssigkulturen bildeten *cts1Δcts2Δ*-Zellen Aggregate, die eine deutlich schnellere Sedimentation zeigten (Abb. 2.9 A, untere Reihe). Eine vergleichbare Form der Flokkulation und Sedimentation ist in Brauereistämmen von *S. cerevisiae* und *S. carlsbergensis* gut bekannt (Verstrepen und Klis, 2006; Verstrepen *et al.*, 2003) und wird unter anderem durch Adhäsine, Flokkulations-Proteine (kurz Flo Proteine) und Calcium reguliert (Bony *et al.*, 1997; Rigden *et al.*, 2004; Stratford, 1992). Diese Proteine sind als Oberflächenproteine Teil der Zellwand und beeinflussen neben der Oberflächen- auch die Zell-Zell-Adhäsion. Daraus ergibt sich die Vermutung, dass eine veränderte Zellwandzusammensetzung in den Chitinase-Deletionsmutanten zur Aggregation und dem beobachteten Sedimentationsverhalten führt. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde die Zellmorphologie der entsprechenden Stämme mikroskopisch untersucht. Wie vermutet hatten Einzeldelationen von *cts1*, *cts2*, *cts3* und *cts4* keinen Einfluss auf die Zellmorphologie oder das Aggregationsverhalten (Abb. 2.9 B). Mutanten, in denen sowohl *cts1* als auch *cts2* deletiert waren, zeigten jedoch auch auf zellulärer Ebene eine Bildung von Zellaggregaten, die durch einen Zellteilungsdefekt ausgelöst wird. Eine ähnliche Aggregatbildung ist in *U. maydis* bereits für Mutanten mit deletiertem GTP-Austauschfaktors (engl. GEF, guanine exchange factor) *don1* oder der Ste20-ähnlichen Proteinkinase *don3* bekannt (Weinzierl *et al.*, 2002). Deletionen dieser Gene führen zu Defekten in der Sekundärseptenbildung und rufen somit einen Cytokinesedefekt hervor. Um herauszufinden, ob der beobachtete Zellteilungsdefekt in *cts1Δcts2Δ*-Doppelmutanten ebenfalls durch eine defekte Septenbildung und Cytokinese ausgelöst wird, wurden Zellwandfärbungen mit dem Farbstoff Calcofluor-White (CW) durchgeführt. CW markiert unspezifisch Zellwand-polymere, hat jedoch eine Präferenz gegenüber Septen (Ram und Klis, 2006). Die Analyse der Septenfärbung zeigte jedoch, dass in Chitinase-Deletionsmutanten weder die Bildung des primären noch des

sekundären Septums gestört ist (Abb. 2.9 B). Dies deutet darauf hin, dass der beobachtete Zellteilungsdefekt in *cts1Δcts2Δ*-Doppelmutanten durch nachfolgende Prozesse, wie z.B. dem Abbau von überflüssigem Zellwandmaterial zwischen Mutter- und Tochter-Zelle, hervorgerufen wird. Da beide Septen vorhanden sind, müsste ein solcher Abbau von Zellwandmaterial extrazellulär, durch sekretierte Chitinasen katalysiert werden. Daher müsste der beobachtete Zellseparationsdefekt in der *cts1Δcts2Δ*-Doppelmutante durch Gabe von exogenem Cts1 ausgeglichen werden können. Um diese Hypothese zu testen, wurde eine His₆-Cts1 (N-terminaler His-Tag) Variante in *Escherichia coli* exprimiert, über Nickel-Affinitätschromatographie aufgereinigt (Jankowski, 2013) und zu exponentiell wachsenden AB33 und AB33*cts1Δcts2Δ*-Kulturen gegeben. Als zusätzliche Kontrolle dienten jeweils unbehandelte Kulturen. Die mikroskopische Analyse der Zellmorphologien zeigte, dass der Zellteilungsdefekt durch dreistündige Inkubation mit 1,5 mg/ml exogenem Cts1 zumindest teilweise aufgehoben wurde (Abb. 2.14). In einigen Zellen führte die Behandlung mit exogener Chitinase His₆-Cts1 jedoch zu einer veränderten Zellmorphologie. Die Zellen erschienen bipolar elongiert und tendierten dazu Aggregate zu bilden (Abb. 2.10, rechte Spalte).

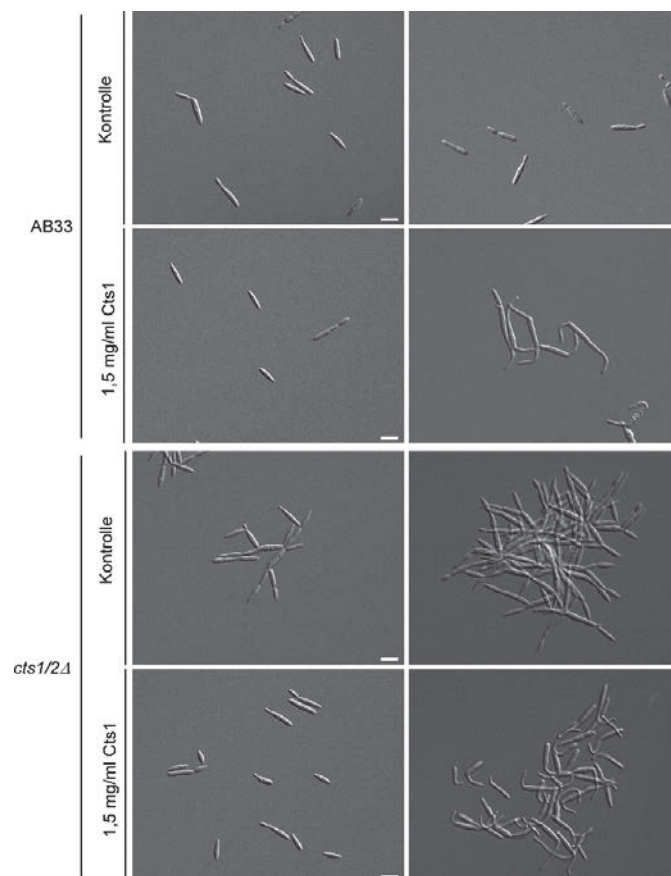


Abb. 2.10: Der Cytokinesedefekt in *cts1Δcts2Δ*-Mutanten kann durch exogenes Cts1 partiell aufgehoben werden. Mikroskopische Analyse der Zellmorphologie von AB33 und *cts1Δcts2Δ*-Kulturen. Unbehandelte *cts1Δcts2Δ*-Zellen zeigen die typische Aggregatbildung. Durch dreistündige Behandlung mit exogenem His₆-Cts1 kann dieser Phänotyp teilweise ausgeglichen werden. Größenstandard: 10 µm.

2.1.4.3 Cts1 lokalisiert in der Teilungszone zwischen Mutter- und Tochter-Zelle

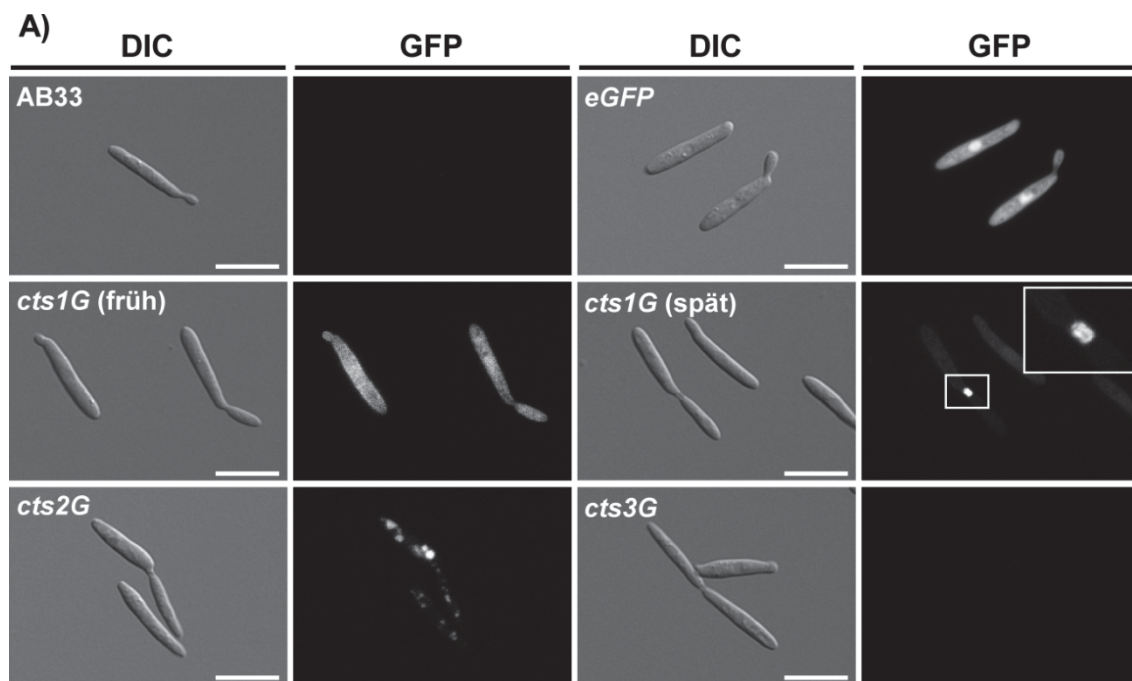
Über die Lokalisation von pilzlichen Chitinasen ist sehr wenig bekannt. Bisher wurde lediglich beobachtet, dass die Chitinase ChiA aus *A. nidulans* während der Keimung der Conidiosporen an den Keimungsstellen lokalisiert. Im Myzelium lokalisiert ChiA an den Hyphenspitzen, an Verzweigungsstellen und Septen (Yamazaki *et al.*, 2008). Eine spezifische Lokalisation einer Chitinase während des Hefe-artigen Wachstums konnte bisher lediglich für die Chitinase Cts1p aus *S. cerevisiae* gezeigt werden. Cts1p wird während der Knospung ausschließlich in der Tochterzelle exprimiert und lokalisiert am „Knospungshals“ (Colman-Lerner *et al.*, 2001).

Die beobachtete Funktion der Chitinasen Cts1 und Cts2 während der Cytokinese Hefe-artiger Zellen von *U. maydis* lässt vermuten, dass auch diese Chitinasen zwischen Mutter- und Tochterzelle lokalisieren, um durch den Abbau von Zellwandmaterial die physische Trennung der Zellen zu ermöglichen.

Um zu untersuchen, ob Chitinasen in *U. maydis* spezifische Lokalisationsmuster aufweisen, wurden C-terminale, translationale eGfp-Fusionen am endogenen Locus hergestellt. Auf diese Weise kann nicht nur die Lokalisation der Chitinasen, sondern auch ihre jeweilige Expressionsstärke auf Proteinebene untersucht werden. Um die Expression der Fusionsproteine und deren Stabilität zu verifizieren, wurde die Expression mikroskopisch und mittels Western-Blot Analyse untersucht (Abb. 2.11). Die mikroskopische Analyse zeigte, dass sowohl Cts1G als auch Cts2G exprimiert wurden. In beiden Fällen konnte bereits mikroskopisch ein deutliches eGFP-Signal detektiert werden (Abb. 2.15 A). Das Cts3G Fusionsprotein konnte hingegen mikroskopisch nicht detektiert werden. Für Cts1G konnte in knospenden Sporidien sowohl eine gleichmäßige, cytoplasmatische Lokalisation, als auch eine Akkumulation in der Teilungszone beobachtet werden. Cts2G dagegen akkumuliert in Endomembran-ähnlichen Strukturen innerhalb der Zellen. Um die Stabilität der Fusionsproteine zu überprüfen, wurden Gesamtproteinextrakte mittels Western-Blot Analyse untersucht. Die Analyse bestätigte, dass lediglich Cts1G und Cts2G während des Hefe-artigen Wachstums exprimiert werden. Cts3G war auch in der Immundetektion nicht nachweisbar, was dafür spricht, dass Cts3 in diesem Stadium nicht exprimiert wird. Das beobachtete Expressionsmuster konnte auch auf Transkriptebeine mittels semi-quantitativer RT-PCR bestätigt werden und stimmt mit publizierten Microarray-Analysen überein (Anhang: Abb. 6.9).

Für Cts1G und Cts2G waren deutliche Signale erkennbar, jedoch konnte lediglich Cts1G als Volllängen-Fusionsprotein detektiert werden. Im Falle von Cts2G konnte hingegen nur eine

Abbaubande von der ungefähren Größe von freiem eGfp nachgewiesen werden, was das unerwartete Lokalisationsmuster der mikroskopischen Analyse erklären könnte. Das Cts1G Fusionsprotein weist in der Analyse ein deutlich größeres Molekulargewicht (~ 120 kDa) auf, als durch die AS-Sequenz prognostiziert wird (~ 85 kDa). Diese Größendifferenz wurde jedoch bereits in früheren Arbeiten beschrieben und könnte auf post-translationale Proteinmodifikationen zurückzuführen sein (Koepke *et al.*, 2011; Stock *et al.*, 2012). Um zu überprüfen, ob das Cts2G Fusionsprotein durch die beobachtete Spaltung inaktiviert wird, wurde das Fusionskonstrukt zusätzlich in die AB33cts1 Δ -Mutante eingebracht. Falls Cts2 durch die Spaltung inaktiviert wird, sollte in diesem Stammhintergrund der zuvor beobachtete Cytokinesedefekt auftreten. Die Western-Blot Analyse zeigte, dass auch in diesem genetischen Hintergrund eine Spaltung von Cts2G stattfindet (Abb. 2.11 B).



B)

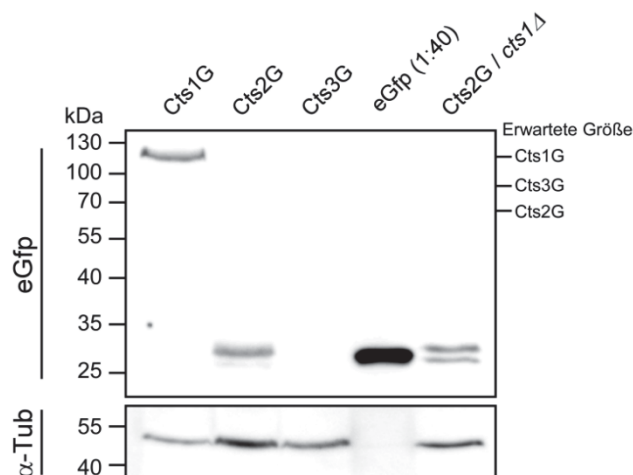


Abb. 2.11: Das Cts1G Fusionsprotein ist stabil und zeigt unterschiedliche Lokalisationsmuster.

Abb. 2.11 (fortgesetzt): Das Cts1G Fusionsprotein ist stabil und zeigt unterschiedliche Lokalisationsmuster. (A) Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Expression und Lokalisation von Cts1G, Cts2G und Cts3G. Cts1 zeigt eine gleichmäßige, cytoplasmatische Lokalisation in frühen Teilungsstadien und akkumuliert später in der Teilungszone zwischen Mutter- und Tochter-Zelle. Cts2G akkumuliert in Endomembran-ähnlichen Strukturen. Cts3G ist nicht detektierbar. Größenstandard: 10 µm. (B) Immundetektion von Cts1G, Cts2G und Cts3G mittels anti-Gfp Antikörper. Cts1G wird als einzige Chitinase stabil als Vollängen-Fusionsprotein exprimiert. Für Cts2G kann sowohl in AB33 als auch in AB33cts1Δ lediglich eine Degradationsbande nachgewiesen werden. Cts3G ist nicht nachweisbar. Für die Analyse wurden jeweils 10 µg Gesamtproteinextrakt verwendet. Als Größenkontrolle für freies eGfp wurde 1 µg Gesamtprotein aus AB33eGfp verwendet ($P_{\text{tef:egfp}}$). Als Ladekontrolle wurde zusätzlich α -Tubulin nachgewiesen.

Die mikroskopische Analyse des Stammes zeigte jedoch keinen Zellteilungsdefekt (Daten nicht gezeigt). Demnach kann geschlossen werden, dass durch die Spaltung freies eGFP und aktives Cts2 Protein entstehen.

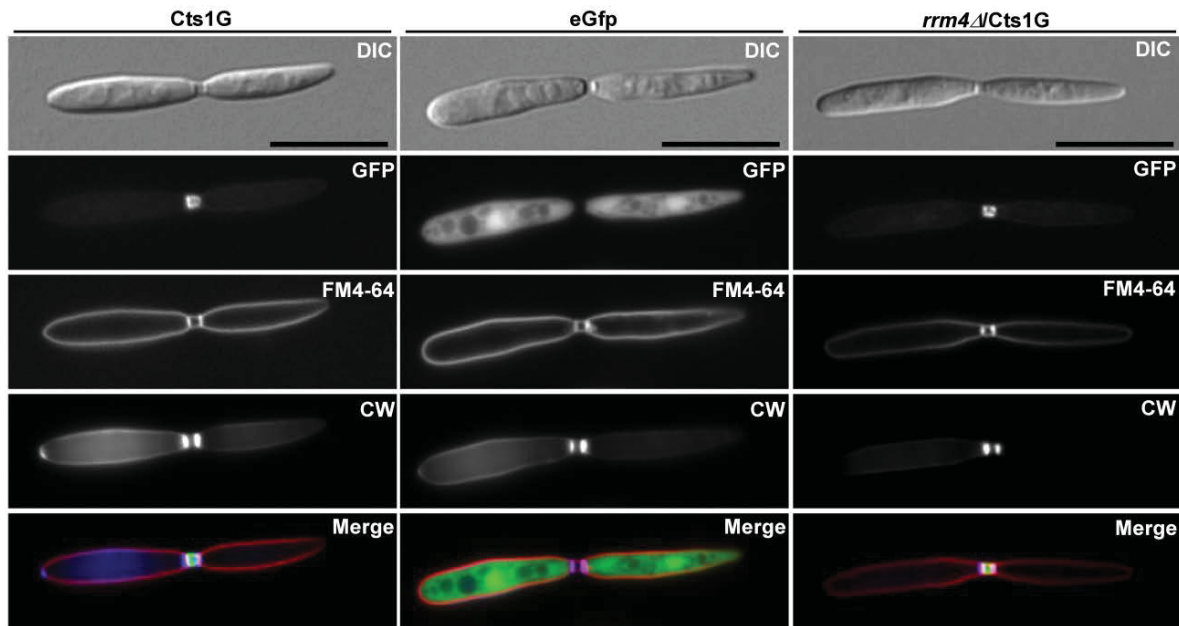
Zusammenfassend konnte durch die mikroskopischen und immunhistochemischen Analysen der Chitinase-eGfp Fusionsproteine gezeigt werden, dass lediglich Cts1G als stabiles Fusionsprotein exprimiert wird. Aus diesem Grund wurde im weiteren Verlauf lediglich die Lokalisation von Cts1G detailliert charakterisiert. Überraschenderweise divergiert diese im Verlauf der Cytokinese. In späten Stadien der Cytokinese lokalisiert Cts1G in der Teilungszone zwischen Mutter- und Tochter-Zelle.

In Vorarbeiten zu Cts1 wurde bereits eine gleichmäßige Verteilung von Cts1G in Sporidien beschrieben (Koepke, 2010). Außerdem wurde gezeigt, dass Cts1 unkonventionell sekretiert wird (Koepke *et al.*, 2011; Stock *et al.*, 2012). Die Sekretion hängt jedoch lediglich in Filamenten von Rrm4 ab. Interessanterweise wurde in der vorliegenden Arbeit zusätzlich eine Lokalisation in der Teilungszone beobachtet. Diese spezifische Akkumulation wurde in Zellen beobachtet, bei denen die Teilungs- oder Fragmentierungszone (Weinzierl *et al.*, 2002; Mahlert *et al.*, 2006) bereits im Differentialinterferenzkontrast (DIC)-Bild deutlich zu erkennen war. Diese Beobachtung stimmte mit der Hypothese überein, dass Cts1 (und Cts2) in der Teilungszone den Abbau von Zellwandmaterial katalysiert und somit zur physischen Trennung der Zellen beiträgt.

Um die beobachtete Lokalisation zu verifizieren und um zu überprüfen, ob Cts1G in ein solches extrazelluläres Kompartiment exportiert wird, wurde die Akkumulation von Cts1G in einer Co-Lokalisationsstudie mit dem Zellwandmarker CW und dem Membranmarker FM4-64 überprüft. Um eine „zufällige“ Akkumulation von eGfp in einem solchen Kompartiment auszuschließen, wurde AB33eGfp mit in die Studie einbezogen. Um zu überprüfen, ob die Lokalisation in der Teilungszone Rrm4-abhängig ist, wurde außerdem der Stamm AB33rrm4Δ,cts1:egfp untersucht. Für die Analyse wurden Zellen ausgewählt, die sich in einem späten Teilungsstadium befanden und bei denen somit eine Fragmentierungszone

klar erkennbar war. Insgesamt wurden 117 Teilungsereignisse des Stammes AB33cts1:egfp, 104 des Stammes AB33egfp und 110 des Stammes AB33rrm4 Δ ,cts1:egfp ausgewertet. Die Analyse ergab, dass Cts1G in 98,2 % aller Fälle in der Teilungszone akkumuliert (Abb. 2.12 B, rechts unten). Diese Akkumulation tritt nicht zufällig auf, da sie für freies eGfp in keinem Fall (0 %) beobachtet werden konnte. Außerdem ist die Lokalisation nicht von Rrm4 abhängig, da die Akkumulation auch in 96,9 % der *rrm4*-defizienten Zellen beobachtet wurde.

A)



B)

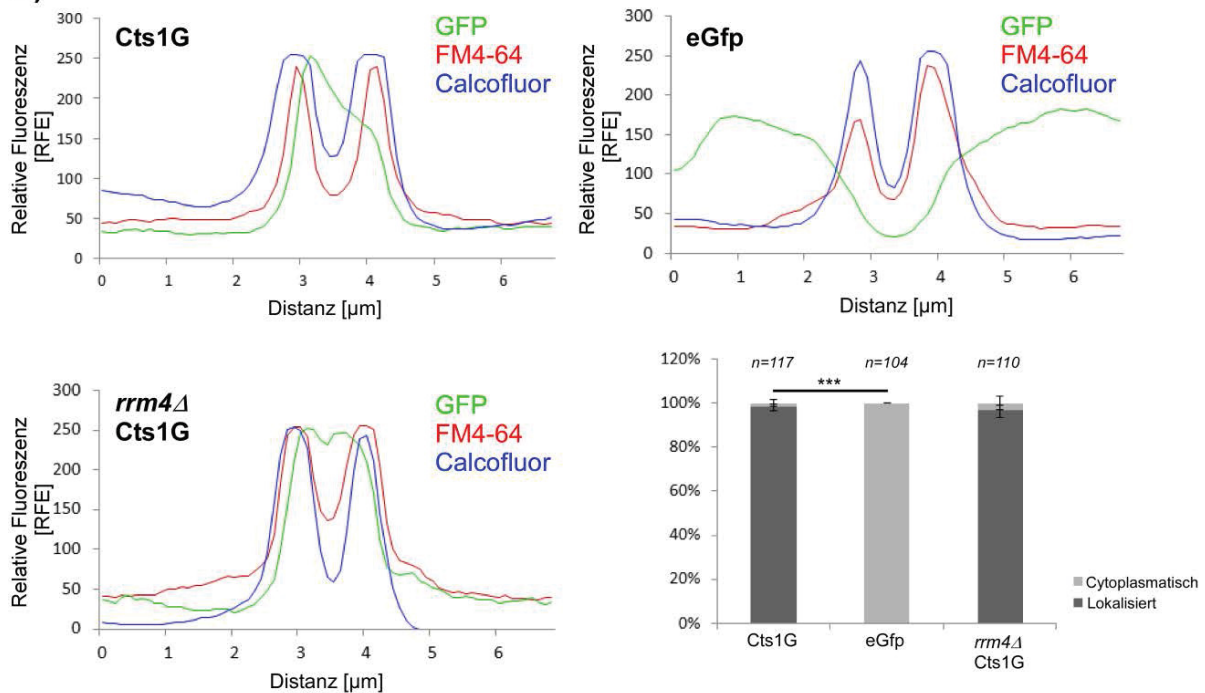


Abb. 2.12: Cts1G lokalisiert in der Teilungszone zwischen Mutter- und Tochter-Zelle.

Abb. 2.12 (fortgesetzt): Cts1G lokalisiert in der Teilungszone zwischen Mutter- und Tochter-Zelle. (A) Co-Lokalisationsstudie von Cts1G mit den Markern CW (Septen) und FM4-64 (Membran). Cts1G akkumuliert in der Teilungszone, welche durch Membranen und Septen vollständig vom Cytoplasma abgegrenzt ist (links). Freies eGfp bleibt aus dieser Zone ausgeschlossen und lokalisiert ausschließlich cytoplasmatisch (Mitte). Die Lokalisation von Cts1G ist nicht Rrm4-abhängig (rechts). Größenstandard: 10 μ m. **(B)** Linescan-Analyse und Quantifizierung der Cts1G-Lokalisation. Die Linescan-Analyse verdeutlicht, dass Cts1G in AB33 und AB33rrm4 Δ hauptsächlich in der Teilungszone zwischen Septen und Membranen lokalisiert (linke Spalte), während freies eGfp ausschließlich cytoplasmatisch lokalisiert und durch die Septen und Membranen aus der Teilungszone ausgeschlossen wird (rechte Spalte, oben). Grün: Cts1G oder eGfp; rot: FM4-64 (Membranen); blau: CW (Septen/Zellwand). Cts1G lokalisiert in AB33 und AB33rrm4 Δ Zellen, welche sich in einem späten Teilungsstadium befinden, zu 98,2 % bzw. 96,9 % in der Teilungszone. Eine solche Lokalisierung ist in keiner der Zellen, welche cytoplasmatisches eGfp exprimieren, zu finden. Fehlerbalken: Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten. ***, $p < 0,0005$ (T-Test).

Die Co-Lokalisationsstudie konnte des Weiteren bestätigen, dass Cts1G wie erwartet in einem extrazellulären Kompartiment zwischen Mutter- und Tochter-Zelle akkumuliert, welches vollständig von Zellmembranen und Septen vom Cytoplasma abgegrenzt ist (Abb. 2.12 A, B). In *S. cerevisiae* wird die Chitinase Cts1p während der Zellteilung spezifisch von der Tochterzelle exprimiert und lokalisiert am „Knospungshals“ (Colman-Lerner *et al.*, 2001). Eine ähnliche Lokalisation ist für die Endo-1,3- β -Glukanase Eng1p in *S. cerevisiae* nachgewiesen worden (Baladron *et al.*, 2002). Auch in *S. pombe* lokalisiert die homologe Endo-1,3- β -Glukanase Eng1p am primären Septum zwischen Mutter- und Tochter-Zelle (Martín-Cuadrado *et al.*, 2008). Jedoch ist nicht bekannt ob die Lokalisation des Enzyms durch die Tochterzelle reguliert wird. In *U. maydis* konnte bisher lediglich gezeigt werden, dass nach der Bildung des Primärseptums massiver Vesikeltransport von der Tochterzelle zur Teilungszone stattfindet, wodurch z.B. Septine zur Teilungszone rekrutiert werden (Böhmer *et al.*, 2009; Freitag *et al.*, 2012).

Um herauszufinden, ob die Chitinase Cts1 in *U. maydis* auch durch ähnliche, Tochterzell-spezifischen Transportmechanismen zur Teilungszone rekrutiert wird, wurde die Cts1G-Lokalisation während der Zellteilung im Detail fluoreszenzmikroskopisch charakterisiert. Dazu wurden AB33cts1:egfp Zellen selektiert, die eine Cts1G-Akkumulation in der Teilungszone zeigten. Interessanterweise konnten zwei Lokalisationsmuster identifiziert werden (Abb. 2.13 A). Entweder akkumulierte Cts1G symmetrisch in der Teilungszone oder Cts1G lokalisierte an der Teilungszone mit einem graduell abfallenden Cts1G-Signal. Die Analyse von insgesamt 145 Zellen, welche eine Cts1G Akkumulation zeigten, ergab, dass 48,3 % der Zellen eine symmetrische Verteilung von Cts1G aufwiesen. 51,7 % der Zellen zeigte hingegen eine asymmetrische Verteilung von Cts1G, welche ausschließlich auf der Tochterzellseite der Teilungszone auftrat (Abb. 2.13 B). Eine Linescan-Analyse durch die Teilungszone von jeweils 13 Zellen mit symmetrischer und 13 Zellen mit asymmetrischer Cts1G-Verteilung konnte bestätigen, dass ein Anteil von Cts1G in der Nähe der Teilungszone

auf Tochterzellseite akkumuliert (Abb. 2.13 C). Die Co-Lokalisation mit Septen und Membranen zeigte, dass die Lokalisierung zur Teilungszone nach der Bildung des primären Septums stattfindet (Abb. 2.13 D).

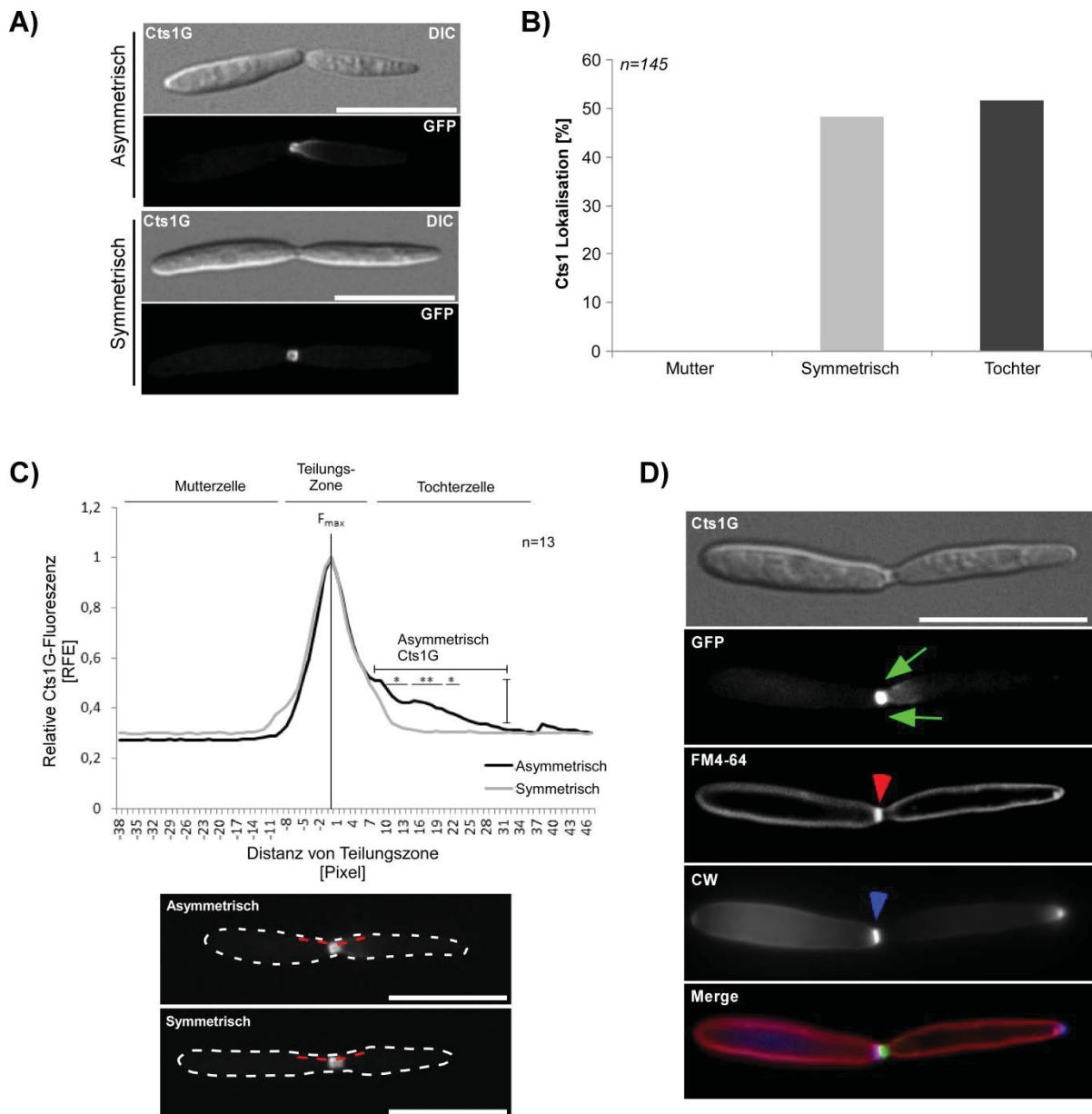


Abb. 2.13: Cts1 wird von der Tochterzelle zur Teilungszone rekrutiert. (A) Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Cts1G-Lokalisation. Während später Zellteilungsstadien akkumuliert Cts1G symmetrisch oder asymmetrisch an der Teilungszone. Größenstandard: 10 µm. (B) Quantifizierung der Cts1G-Lokalisation. Eine asymmetrische Verteilung von Cts1G tritt lediglich in der Tochterzelle auf. Insgesamt wurden n=145 Zellen, welche eine Cts1G Akkumulation zeigten, bewertet. Das Lokalisationsmuster wurde in die Kategorien „Symmetrisch“, „Mutter“ (asymmetrische Verteilung mit Akkumulation auf Seiten der Mutterzelle) und „Tochter“ (asymmetrische Verteilung mit Akkumulation auf Seiten der Tochterzelle) eingeteilt. 70 Zellen (48,3 %) zeigten symmetrische Cts1G-Verteilung und 75 Zellen (51,7 %) zeigten eine asymmetrische Cts1G-Lokalisation auf der Tochterzellseite. Keine der untersuchten Zellen zeigte eine Cts1G-Akkumulation auf der Mutterzellseite. (C) Linescan-Analyse der asymmetrischen Cts1G-Lokalisation. Ein Anteil von Cts1G akkumuliert asymmetrisch nahe der Teilungszone auf der Tochterzellseite, wobei die Menge an cytoplasmatischem Cts1G (Hintergrundfluoreszenz) in beiden Zellen identisch bleibt. Insgesamt wurden 26 Zellen (13 mit symmetrischer Cts1G-Verteilung, 13 mit asymmetrischer Cts1G-Verteilung), wie unten exemplarisch dargestellt, analysiert. Das Fluoreszenzmaximum (F_{max}) markiert die Teilungszone zwischen Mutter- und Tochterzelle.

Abb. 2.13 (fortgesetzt): Cts1 wird von der Tochterzelle zur Teilungszone rekrutiert. Cts1G ist auf der Tochterzellseite signifikant angereichert. Fehlerbalken (Standardabweichung aus jeweils 13 Zellen) wurden in der Abbildung aus Illustrationsgründen entfernt. *, $p < 0,05$ (T-Test). **, $p < 0,005$ (T-Test). **(D)** Co-Lokalisationsstudie von asymmetrischem Cts1G mit den Membranmarker FM4-64 (Membran) und dem Zellwandmarker CW (Septen). Cts1G relokalisiert zur Teilungszone, nachdem von der Mutterzelle das Primärseptum gebildet wurde. Auf der Tochterzellseite ist noch kein Septum gebildet und die Membran ist noch nicht vollständig geschlossen. Grüne Pfeile: Cts1G; rote Pfeilspitze: Membran der Mutterzelle; blaue Pfeilspitze: Primärseptum. Größenstandard: 10 μm

2.1.4.4 Chitinasen werden für die Etablierung unipolaren Wachstums nicht benötigt

In den filamentös wachsenden Ascomyceten *A. nidulans* und *N. crassa* konnte gezeigt werden, dass die Deletion von Chitinase-Genen zu reduziertem filamentösem Wachstum, einer veränderten Koloniemorphologie und zu veränderter Conidien-Bildung führt (Tzelepis *et al.*, 2012; Takaya *et al.*, 1998b). In *U. maydis* wurde bisher lediglich nachgewiesen, dass die Deletion von *cts1* während des filamentösen Wachstums eine Aggregation der Hyphen am basalen Pol zur Folge hat (Koepke *et al.*, 2011).

Um zu untersuchen, ob die anderen Chitinasen an der Etablierung von unipolarem Wachstum beteiligt sind oder sie diesbezüglich funktionell redundant sind, wurde die Zellmorphologie von Chitinase-Deletionsmutanten sechs Stunden nach Filamentinduktion mikroskopisch analysiert. Zusätzlich wurden die Zellwandmarker CW und WGA-FITC (*wheat germ agglutinin fluorescein isothiocyanat*) genutzt um Zellwandmaterial zu visualisieren. CW färbt im Filament hauptsächlich leere Abschnitte am basalen Pol, Septen sowie die Hyphenspitze, während WGA hauptsächlich das wachsende Filament anfärbt. Somit können verschiedene Bereiche des Filaments sichtbar gemacht werden und neben der allgemeinen Morphologie gegebenenfalls Defekte in der Septenbildung oder der Zellwandzusammensetzung erkannt werden.

Die fluoreszenzmikroskopische Analyse zeigte, dass alle Chitinase-Deletionsmutanten dazu in der Lage waren, filamentöses, unipolares Wachstum zu etablieren (Abb. 2.14). Es konnten keinerlei Defekte in der Etablierung eines Wachstumspoles oder in der Insertion von Septen (blaue Pfeilspitzen) am basalen Ende des Filaments beobachtet werden. Auch die Färbung der Filamente mittels WGA-FITC zeigte keine offensichtlichen Differenzen, was darauf hindeutet, dass kein gravierender Unterschied in der Zellwandzusammensetzung der Filamente besteht. Als Kontrollstamm wurde AB33rrm4 Δ verwendet, welcher eine deutlich veränderte Filamentmorphologie, in Form von bipolarem Wachstum aufweist (Becht *et al.*, 2006). In Vorarbeiten wurde gezeigt, dass es in Abwesenheit der Chitinase Cts1 zu einer verstärkten Aggregation der Filamente der leeren Abschnitten an den basalen Polen führt kommt (Koepke *et al.*, 2011). Jedoch führt die Deletion von *cts1* nicht zu einer Beeinträchtigung der Filamentbildung. Daher liegt die Vermutung nahe, dass Cts1 durch

autolytische Prozesse die Zellwandzusammensetzung der leeren Abschnitte beeinflusst. In *A. nidulans* ist z.B. eine Rolle der Chitinase ChiB in solchen autolytischen Prozessen und während der Sporulation bekannt (Shin *et al.*, 2009; Pócsi *et al.*, 2009).

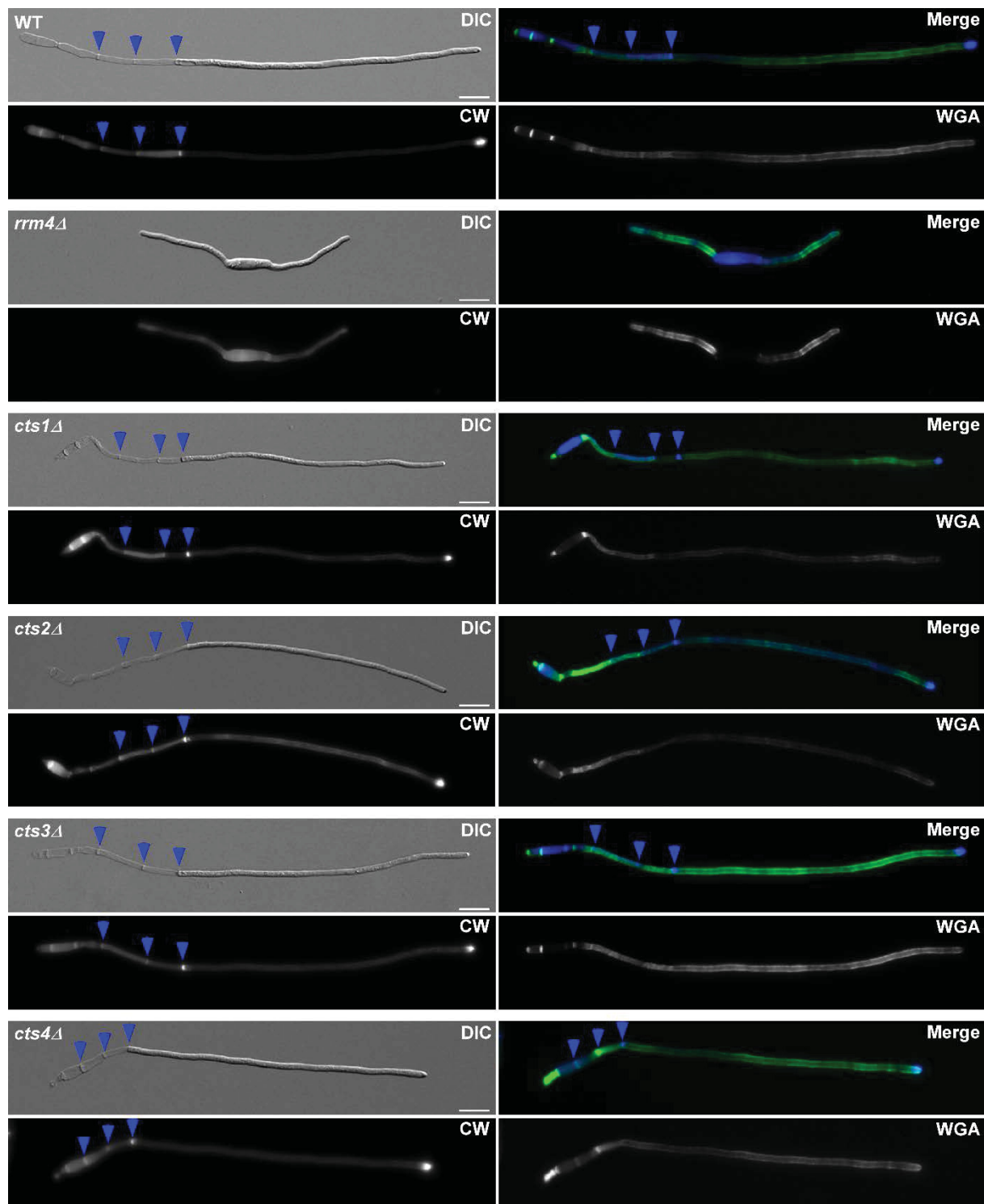


Abb. 2.14: Die Deletion von Chitinasegenen hat keinen Einfluss auf das filamentöse Wachstum. Fluoreszenzmikroskopische Analyse des filamentösen Wachstums von *U. maydis* Chitinase-Deletionsmutanten. Weder die Deletion einzelner Chitinasegene, noch die Deletion multipler Chitinasegene verändert die Morphologie filamentös wachsender Zellen. Die Etablierung eines unipolaren Wachstumspols und die Insertion von Septen zur Bildung leerer Abschnitte am basalen Pol sind ebenfalls vergleichbar mit AB33-Filamenten. Auch die Färbung der Zellwand mittels CW und dem Lektin WGA-FITC unterscheidet sich nicht von AB33-Filamenten.

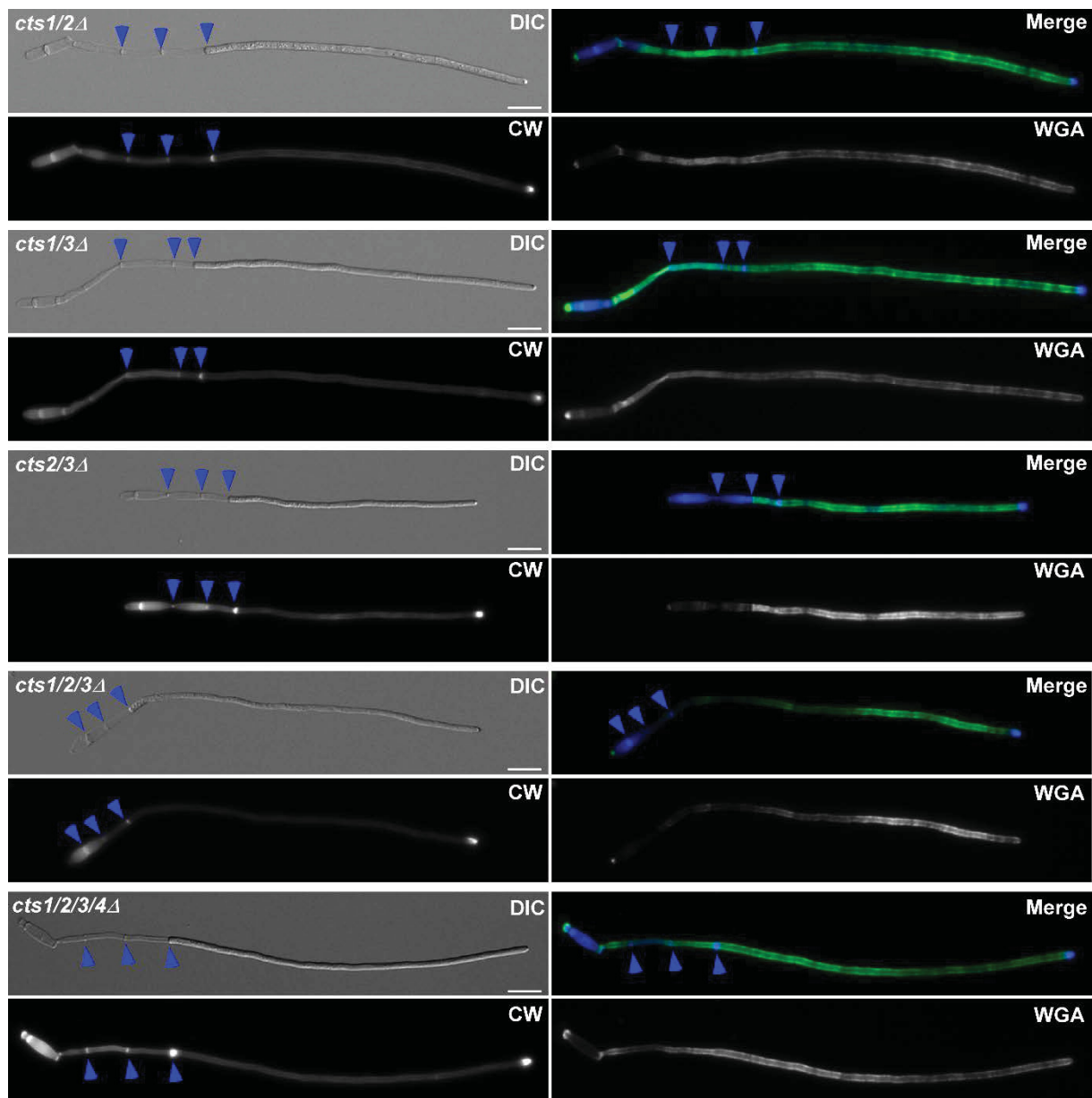


Abb. 2.14 (fortgesetzt): Die Deletion von Chitinasegenen hat keinen Einfluss auf das filamentöse Wachstum. Für die Filamentinduktion wurden die Zellen bei einer OD_{600} von 1 von CM in NM überführt und auf eine OD_{600} von 0,5 eingestellt. Die Filamentinduktionsdauer betrug sechs Stunden. Blau: CW; grün: WGA-FITC; blaue Pfeilspitzen: Septen mit CW gefärbt. Größenstandard: 10 μ m

Um zu testen, ob weitere *U. maydis* Chitinasen die Aggregation von Hyphen an den leeren Abschnitten beeinflussen und somit zu einem veränderten Sedimentationsverhalten führen, wurde die Filamentbildung Chitinase-defizienter Stämme unter aggregationsfördernden Bedingungen induziert. Dazu wurden die Kulturen in NM auf eine OD_{600} von 0,5 eingestellt und in Reagenzgläser überführt. Das Sedimentationsverhalten wurde 24 Stunden nach Induktion beobachtet. Außerdem wurde untersucht, ob Chitinase-Deletionen eine Auswirkung auf das filamentöse Wachstum auf Festmedium haben. In der Sedimentationsanalyse konnte der zuvor beschriebene Sedimentationsphänotyp der *cts1Δ*-Mutante reproduziert werden.

Jedoch zeigte keine der anderen Chitinase-Deletionsmutanten ein verändertes Sedimentationsverhalten gegenüber AB33 (Abb. 2.15 B), sodass geschlossen werden kann, dass lediglich Cts1 die Aggregation der leeren Abschnitte beeinflusst. Die Analyse auf Festmedium ergab, dass auch hier keine der Chitinase-Deletionsmutanten einen Defekt im Hyphenwachstum hat (Abb. 2.15 A). Sowohl die Kolonimorphologien als auch die an den Rändern der Kolonien auswachsenden Filamente waren mit denen von AB33 vergleichbar.

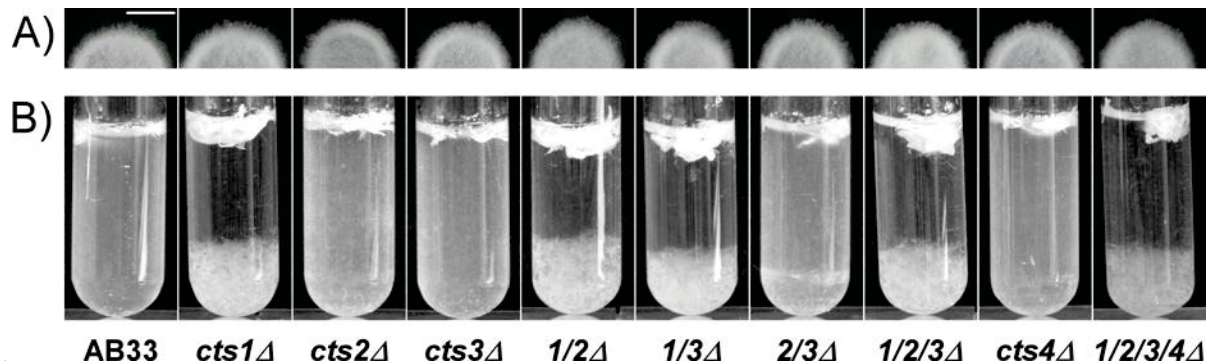


Abb. 2.15: Lediglich Cts1 hat eine Funktion während des filamentösen Wachstums. (A) Kolonimorphologie filamentös wachsender *U. maydis* Chitinase-Deletionsmutanten auf NM-Festmedium. Die Morphologie der entsprechenden Stämme ist mit der von AB33 vergleichbar. Größenstandard: 0,3 cm. (B) Sedimentationstest filamentös wachsender Chitinase-Deletionsmutanten. Lediglich die *cts1Δ*-Mutante zeigt verstärkte Aggregation an den leeren Abschnitten (Daten nicht gezeigt) und eine erhöhte Sedimentationsgeschwindigkeit in Flüssigkultur. Dieser Effekt wird durch die Deletion weiterer Chitinasen nicht beeinflusst. Die Kulturen wurden in NM-Flüssigmedium auf eine OD₆₀₀ von 0,5 eingestellt und in Reagenzgläser überführt und für 24 Stunden bei 28 °C und 200 Upm inkubiert. Die Sedimentation erfolgte 5 min stehend bei RT.

2.1.4.5 Die Chitinase Cts1 lokalisiert in Filamenten an der Zellwand leerer Abschnitte

Der beschriebene Effekt von Cts1 auf die Aggregation leerer Abschnitte lässt vermuten, dass Cts1 eine Funktion in der Degradierung oder Remodellierung von Zellwandmaterial am basalen Pol des Filaments hat. Eine Voraussetzung dafür ist, dass Cts1 am basalen Septum oder extrazellulär in den leeren Abschnitten lokalisiert, um dort an die Chitinfraktion der Zellwand zu binden. Bisher konnte Cts1G jedoch lediglich an der Hyphenspitze von AB33-Filamenten nachgewiesen werden (Koepke *et al.*, 2011).

Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde in den Stämmen AB33cts1:egfp und AB33egfp filamentöses Wachstum in NM induziert. Sechs Stunden nach Induktion wurde die Cts1G-Lokalisation in einer Co-Lokalisationsanalyse mit CW untersucht. Die fluoreszenzmikroskopische Analyse zeigte, dass Cts1G tatsächlich verschiedene Lokalisationsmuster während des filamentösen Wachstums aufweist (Abb. 2.16 A), welche durch eine Linescan-Analyse verdeutlicht werden konnten (Abb. 2.16 B).

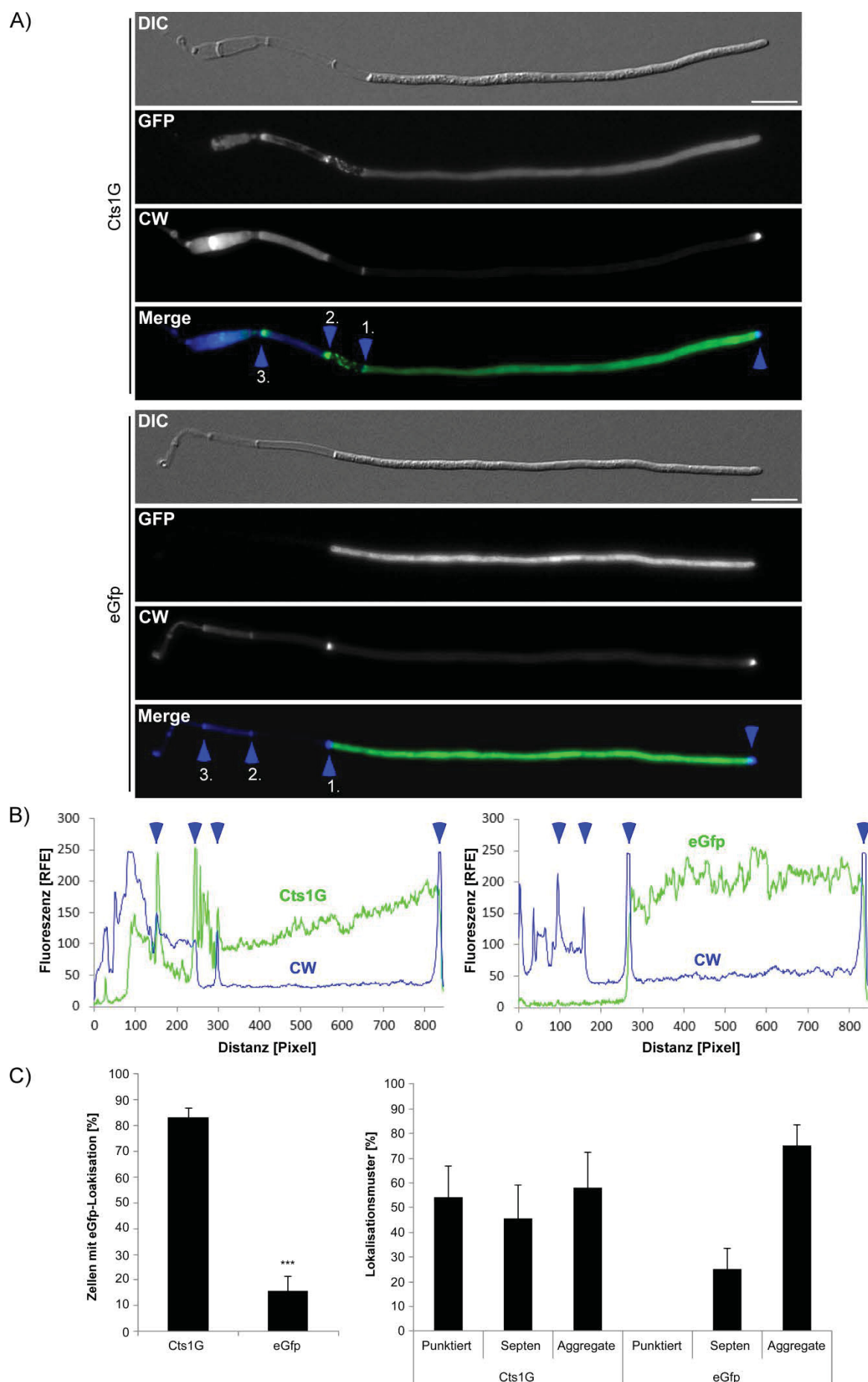


Abb. 2.16: Cts1 lokalisiert an der Zellwand leerer Abschnitte.

Abb. 2.16 (fortgesetzt): Cts1 lokalisiert an der Zellwand leerer Abschnitte. (A) Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Cts1G-Lokalisation. Cts1G lokalisiert in punktiertem Muster im ersten leeren Segment und an den Septen des ersten und zweiten leeren Segments. Derartige Lokalisationsmuster sind im Kontrollstamm AB33egfp nicht zu erkennen. Blau: CW; grün: Cts1G bzw. eGfp; blaue Pfeilspitzen: Septen und Hyphenspitze. Zahlen markieren die jeweiligen Septen. Größenstandard: 10 μm . **(B)** Linescan-Analyse der in (A) dargestellten Filamente zur Verdeutlichung der Cts1G-Lokalisation im Filament. Cts1G zeigt einen graduellen Konzentrationsanstieg zur Hyphenspitze. Multiple Signalmaxima zwischen dem ersten und zweiten Septum verdeutlichen das punktierte Lokalisationsmuster. Überlagerte Signalmaxima von CW und Cts1G verdeutlichen die Akkumulation von Cts1G an Septen (blaue Pfeilspitzen). Cytoplasmatisches eGfp ist im Filament gleichmäßig verteilt (rechts). Ein deutlicher Einbruch der Signalintensität ist im Bereich des ersten Septums zu erkennen. Blau: CW; grün: Cts1G bzw. eGfp; blaue Pfeilspitzen: Septen und Hyphenspitze. **(C)** Quantifizierung der Cts1G-Lokalisation. 83,1 % aller AB33cts1:egfp Zellen (n=181) zeigten eine Lokalisation von Cts1G in den leeren Segmenten am basalen Pol (linkes Balkendiagramm). Nur 15,9 % der Zellen des Kontrollstamms AB33egfp (n=139) zeigten eine Lokalisation freien eGfps in leeren Segmenten. Vor allem die punktierte Lokalisation und die Akkumulation an Septen sind spezifisch für Cts1G. In Kontrollzellen des Stammes AB33egfp konnten vor allem zufällig erscheinende eGfp-Aggregate in den leeren Abschnitten beobachtet werden (rechtes Balkendiagramm). Fehlerbalken: Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten. ***, $p < 0,0005$ (T-Test).

Zunächst konnte der bereits zuvor beschriebene, graduelle Anstieg der Cts1G-Konzentration zum apikalen Pol (Koepke *et al.*, 2011) verifiziert werden. Außerdem lokalisierte Cts1G in einem punktierten Muster im ersten leeren Abschnitt am basalen Pol (Abb. 2.16 A, B). Zusätzlich konnte eine starke Cts1G-Akkumulation am zweiten und dritten Septum beobachtet werden. Eine etwas schwächere Akkumulation war auch am ersten Septum zu beobachten. Neben diesen sehr spezifischen Lokalisationsmustern traten zusätzlich zufällig erscheinende Cts1G-Aggregationen hauptsächlich in älteren leeren Bereichen des Filaments auf (Abb. 2.16 A). Im Kontrollstamm AB33egfp, welcher cytoplasmatisches eGfp exprimiert, traten wesentlich seltener Lokalisationsereignisse in leeren Bereichen des Filaments auf (Abb. 2.16 C, links). Insgesamt zeigten 81,3 % aller AB33cts1:egfp Zellen eines der genannten Lokalisationsmuster, während lediglich 15,9 % des Kontrollstamms eine eGfp-Lokalisation in leeren Bereichen zeigten. Insbesondere die spezifischen, punktartigen Signale am ersten leeren Abschnitt und die Akkumulation an Septen traten im Kontrollstamm wesentlich seltener auf als in AB33cts1:egfp (Abb. 2.16, rechts). In vorangegangenen Arbeiten wurde gezeigt, dass Cts1 unkonventionell sekretiert wird. An der Sekretion in Filamenten ist das RNA-bindende Protein Rrm4 beteiligt (Koepke *et al.*, 2011, Stock *et al.*, 2012). Die Analyse von AB33rrm4 Δ -Filamenten zeigte jedoch, dass die Lokalisation von Cts1G in leeren Abschnitten wie auch die subapikale Lokalisation (Koepke *et al.*, 2011) nicht von Rrm4 abhängen (Anhang: Abb. 6.8).

Zusammenfassend konnte durch die Analyse von Filamenten gezeigt werden, dass lediglich Cts1 eine Rolle während des filamentösen Wachstums spielt. Die Lokalisation lässt vermuten, dass Cts1 vor allem in leeren Abschnitten am basalen Pol der Filamente eine autolytische Funktion besitzt, wodurch verhindert wird, dass Filamente an den leeren Abschnitten

aggregieren. Dennoch konnte der Mechanismus, über den Cts1 sekretiert wird und in der Teilungszone bzw. den leeren Abschnitten lokalisiert durch die Analyse der Proteinlokalisierung nicht geklärt werden.

2.1.4.6 Die Sekretion von Cts1 ist Septierungs-abhängig

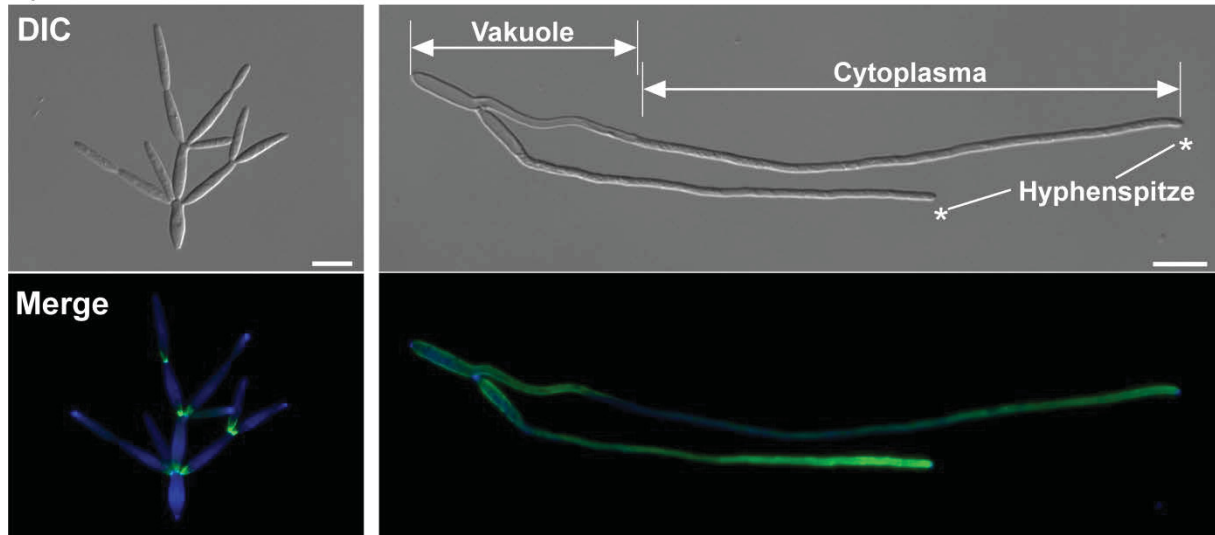
Die Lokalisation von Cts1G lässt darauf schließen, dass die Chitinase Cts1 vor allem extrazellulär zwischen Mutter- und Tochter-Zelle bzw. in den leeren Abschnitten von Filamenten wirkt. Diese Hypothese wird durch die Beobachtung gestützt, dass der Zellteilungsdefekt, der in *cts1Δcts2Δ*-Doppelmutanten beobachtet wurde, durch die Gabe exogener Chitinase partiell aufgehoben werden konnte (Abb. 2.10). Cts1 enthält jedoch im Gegensatz zu Cts2 kein Signalpeptid für die konventionelle Sekretion. Obwohl die unkonventionelle Sekretion von Cts1 bereits experimentell bestätigt werden konnte (Stock *et al.*, 2012; Sarkari *et al.*, 2014), ist der zugrundeliegende Mechanismus weiterhin unklar.

Durch die Beobachtung, dass Cts1 in späten Cytokinesestadien (nach Bildung des primären Septums) von der Tochterzelle zur Teilungszone rekrutiert wird, ist es jedoch denkbar, dass Cts1 nicht direkt sekretiert, sondern zunächst lediglich intrazellulär tranloziert wird. Nach erfolgter Lokalisation in der Nähe des primären Septums, könnte Cts1 dann durch die Bildung des sekundären Septums, durch die Tochterzelle, in den extrazellulären Raum gelangen. Ein ähnlicher Mechanismus wäre auch in Filamenten denkbar. Auch hier könnte Cts1 am basalen Pol der Zelle lokalisieren und durch die regelmäßige Insertion von Septen in den extrazellulären Raum gelangen. Durch den Abbau der Zellwand und eine dadurch hervorgerufene Lyse der Teilungszone bzw. der leeren Abschnitte könnte Cts1 schlussendlich in den Kulturüberstand gelangen oder extrazellulär mit der Zellwand assoziieren.

Um diese Hypothese zu überprüfen wurde die Lokalisation von Cts1G in *don1Δ*-Mutanten untersucht. Die Deletion des GTP-Austauschfaktors *don1* führt zu einer defekten Sekundärseptenbildung (Weinzierl *et al.*, 2002). Dadurch kann keine vollständige Teilungszone etabliert werden und die Zellteilung wird nicht abgeschlossen. Außerdem ist die Septenbildung am basalen Pol während des filamentösen Wachstums in diesem Stamm defekt, was zur Ausbildung eines großen, durchgängigen leeren Abschnitts führt (Freitag *et al.*, 2011). Die fluoreszenzmikroskopische Analyse der Lokalisation in AB33don1Δ zeigte, dass Cts1G in Sporidien tatsächlich an den Teilungszonen akkumuliert (Abb. 2.17 A). Die beobachtete Akkumulation geht auch nach mehreren erfolgten Zellteilungen nicht verloren. Auch in Filamenten kommt es zu einer Lokalisation von Cts1G im leeren Abschnitt am basalen Pol, wobei auch weiterhin der graduelle Anstieg der Cts1G-Konzentration zum

apikalen Pol bestehen bleibt. Dies deutet darauf hin, dass die Sekretion von Cts1 bei defekter Septenbildung tatsächlich nicht möglich ist. Ein solcher Verlust der Sekretion müsste demnach zu einem Verlust der extrazellulären Cts1-Aktivität führen.

A)



AB33cts1G, don1Δ

B)

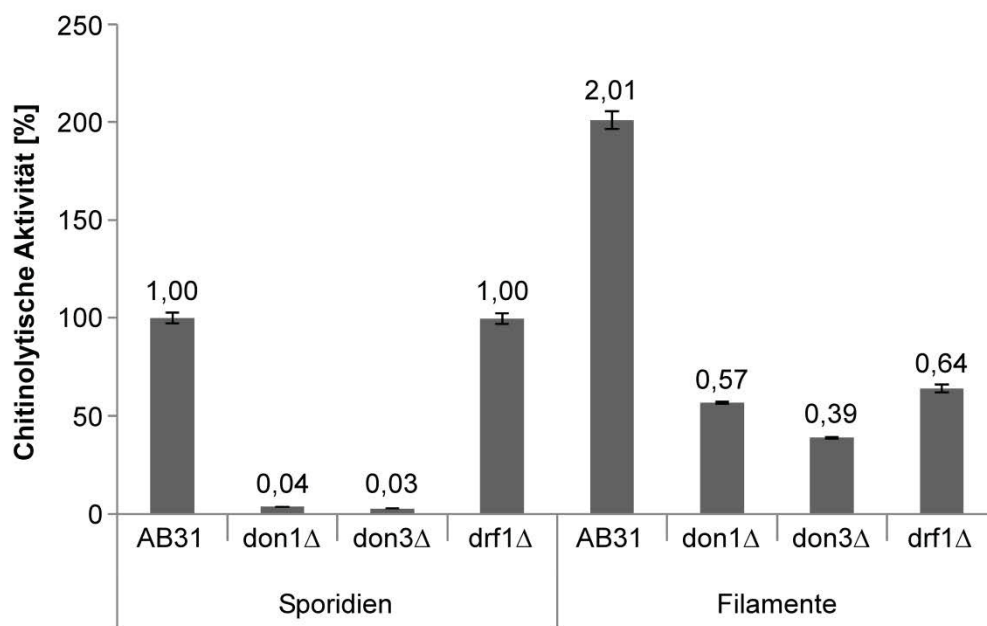


Abb. 2.17: Die Sekretion von Cts1 hängt von der Septenbildung ab. (A) Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Cts1G-Lokalisation in Sporidien und Filamenten des Stammes AB33cts1G, don1Δ. Der Cytokinesedefekt der *don1Δ*-Mutante führt zur Akkumulation von Cts1G an jeder vollständig ausgebildeten Teilungszone (links). Während des filamentösen Wachstums lokalisiert Cts1G im leeren Abschnitt am basalen Pol. Größenstandard: 10 µm. (B) Test der extrazellulären Chitinase-Aktivität mittels des Substrats MUC₃. Während des Hefe-artigen Wachstums ist die chitinolytische Aktivität in AB31don1Δ und AB31don3Δ drastisch reduziert, während *drf1Δ*-Zellen volle Aktivität aufweisen. Während des filamentösen Wachstums nimmt die Aktivität in *drf1Δ*-Mutanten stark ab, während sie in den *don1Δ*- oder *don3Δ*-Stämmen zunimmt. Die Zahlen über den Balken geben die Aktivitätsänderung relativ zum Stamm AB31 während des Hefe-artigen Wachstums an.

Um diese Annahme zu überprüfen wurde die Cts1-Aktivität von intakten Zellen der Stämme AB31, AB31don1Δ, AB31don3Δ und AB31drf1Δ (Mutanten freundlicherweise zur Verfügung gestellt von M. Bölker) während des Hefe-artigen und filamentösen Wachstums mittels des fluorogenen Chitinase-Substrats MUC₃ untersucht. *don1Δ*- sowie *don3Δ*-Stämme weisen beide einen vollständigen Verlust der Sekundärseptenbildung auf (Weinzierl *et al.*, 2002). Die Deletion des Diaphanous-ähnlichen Formins *drf1* (*diaphanous-related formin 1*) führt in Hefezellen dagegen lediglich zu einer verlangsamten Cytokinese (Freitag *et al.*, 2011). Die Teilungszone kann jedoch noch vollständig etabliert und auch aufgelöst werden. In Filamenten weist dieser Stamm jedoch auch eine defekte Septenbildung am basalen Pol auf. Falls die Sekretion von Cts1 tatsächlich von der Septenbildung abhängt, sollten *don1*- und *don3*-Deletionsstämme in beiden Wuchsformen eine verringerte Cts1-Aktivität aufweisen, während sie in *drf1Δ*-Mutanten lediglich während des filamentösen Wachstums sein sollte.

Die Analyse zeigte, dass die chitinolytische Aktivität in Abwesenheit von Don1 oder Don3 in Sporidien tatsächlich drastisch verringert war, während die Deletion von *drf1* keinen Einfluss hatte (Abb. 2.17 B). Dies deutet darauf hin, dass die Ausbildung des sekundären Septums für die Sekretion von Cts1 in Sporidien essentiell ist. Während des filamentösen Wachstums konnte auch in *drf1Δ*-Mutanten eine Reduktion der Chitinase-Aktivität beobachtet werden, was wiederum für eine Septierungs-abhängige Sekretion spricht. Jedoch kam es in AB31don1Δ- und AB31don3Δ-Filamenten zu einem Anstieg der Aktivität. Dieser Anstieg könnte entweder auf verstärkte Zelllyse zurückzuführen sein oder es existiert ein zweiter, Septierungs-unabhängiger Sekretionsweg während des filamentösen Wachstums.

2.1.4.7 Chitinasen werden für das biotrophe Wachstum nicht benötigt

Pilzliche Chitinasen spielen während des saprotrophen Wachstums (Hefe-artig oder filamentös) verschiedener Spezies eine Rolle (Kuranda und Robbins, 1991; Dünkler *et al.*, 2005; Dünkler *et al.*, 2008). Die mehrzahl der Studien zur biologischen Funktion von Chitinasen wurden dabei in typischen Modellorganismen, wie z.B. *S. cerevisiae*, *A. nidulans* oder *C. albicans* durchgeführt. Jedoch ist bisher nichts über die Funktion von Chitinasen während des biotrophen Wachstums phytopathogener Pilze bekannt.

Während des Infektionsprozesses kommt die pilzliche Zellwand in der Interaktionszone in engen Kontakt mit der Wirtszelle (Kämper *et al.*, 2006). Dabei kann Chitin von pflanzlichen Rezeptoren erkannt werden und eine Abwehrreaktion auslösen (Wan *et al.*, 2008). Die Erkennung von Chito-Oligosacchariden (CHOS) hängt dabei von der Bindung zweier Rezeptor-ähnlicher Kinasen (*receptor-like kinases*, RLK; Liu *et al.*, 2012) an ein CHOS ab.

Für eine effiziente Bindung und anschließende Homo- oder Hetero-Dimerisierung der Rezeptoren werden Oligomere mit einer Kettenlänge von $n \geq 8$ benötigt (Hayafune *et al.*, 2014). Endogene Chitinasen von *U. maydis* könnten daher dazu beitragen, langkettige CHOS abzubauen und dadurch eine Erkennung durch das pflanzliche Immunsystem zu verhindern.

Um zu untersuchen, ob Chitinasen während der biotrophen Entwicklung von *U. maydis* eine Rolle spielen, wurden Chitinase-Deletionsmutanten im Hintergrund des solo-pathogenen Stammes SG200 (Kämper *et al.*, 2006) hergestellt. SG200 ist in der Lage, die Wirtspflanze *Z. mays* ohne vorangegangene Paarung als haploider Stamm zu infizieren. Die Proliferation der Stämme *in planta* sowie die Virulenz der Chitinase-Deletionsmutanten wurden anschließend in standardisierten Mais-Keimlingsinfektionen untersucht. Dazu wurden sieben Tage alte Keimlinge mit einer Suspension des jeweiligen Stammes mit Hilfe einer Spritzinfektion inokuliert. Nach vier Tagen wurden Blattproben entnommen und Pilzhyphen mittels WGA-FITC angefärbt. Der Farbstoff bindet dabei an die Zellwand des Pilzes und ermöglicht so die Visualisierung der Hyphen sowie der Septen. Außerdem wurde die Virulenz der Stämme neun Tage nach Infektion evaluiert. Als Kontrollstamm mit reduzierter Virulenz diente der Stamm SG200khd4Δ (Vollmeister *et al.*, 2009). Erstaunlicherweise zeigten alle Chitinase-Mutanten eine zu SG200 vergleichbare Proliferation und Virulenz (Abb. 2.18 B, C). Außerdem blieb die Fähigkeit Schnallenzellen auszubilden in allen Deletionsmutanten erhalten (Abb. 2.18 B). Daher kann geschlussfolgert werden, dass Chitinasen für die initiale Infektion sowie für die Proliferation in der Wirtspflanze und anschließende Tumorinduktion unter den getesteten Bedingungen nicht essentiell sind.

Weitere Funktionen von Chitinasen während der biotrophen Entwicklung von *U. maydis*, könnten in der Sporulation oder der Sporenkeimung liegen. In *Ashbya gosipii*, *Aspergillus niger* und *A. nidulans* konnte eine spezifische Funktion von Chitinasen in der Zellwand-Remodellierung während der Sporulation gezeigt werden (Pócsi *et al.*, 2009; van Munster *et al.*, 2013; Dünkler *et al.*, 2008).

Abb. 2.18 (nächste Seite): Chitinasen haben keinen Einfluss auf die Virulenz von *U. maydis*. (A) Beispielhafte Darstellung der beobachteten Symptome. Im Infektionsassay sind, nach Schweregrad geordnet, folgende Symptome aufgetreten (von leicht nach schwer): Anthocyanbildung, kleine Tumore (< 1 mm), mittlere Tumore (> 1 mm), große Tumore (> 1 mm, mit Änderung der Wuchsrichtung). Die Entwicklung großer Tumore geht mit einer deutlich veränderten Morphologie der Pflanzen einher, da diese in ihrem natürlichen Wuchs eingeschränkt sind. (B) Fluoreszenzmikroskopische Analyse der *in planta* Proliferation 4 Tage nach Infektion. Die Zellmorphologie und die Bildung von Schnallenzellen werden durch die Deletion von Chitinasen nicht beeinflusst. Die Pilzhyphen innerhalb der Pflanze wurden mit WGA-FITC angefärbt. Rote Pfeilspitzen kennzeichnen Pilzhyphen. Blaue Pfeilspitzen kennzeichnen Schnallenzellen. Vergrößerte Darstellung: Schnallenzellen. Größenstandard: 20 µm.

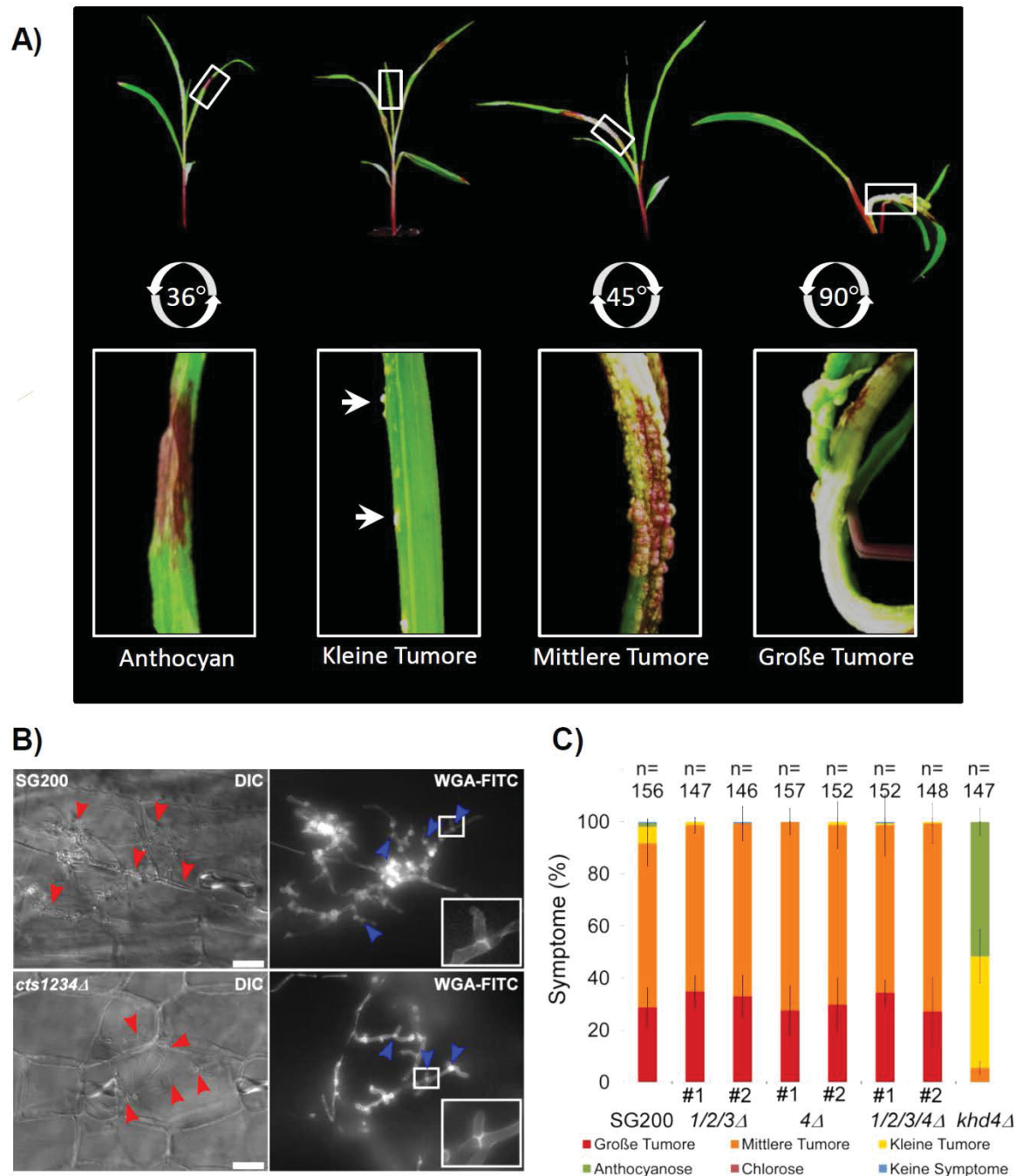


Abb. 2.18 (fortgesetzt): Chitinasen haben keinen Einfluss auf die Virulenz von *U. maydis*. (C) Bewertung der Virulenz anhand der aufgetretenen Symptome. Keine der getesteten Chitinase-Mutanten zeigte reduzierte Virulenz. Sieben Tage alte Keimlinge wurden mit einer Suspension von *U. maydis* Zellen ($OD_{600} = 3$) infiziert. Die Virulenz wurde neun Tage nach Infektion anhand der auftretenden Krankheitssymptome bewertet. Jede Pflanze wurde anhand des stärksten Symptoms in eine der Kategorien „Keine Symptome/Gesund“, „Chlorosenbildung“, „Anthocyanbildung“, „Kleine Tumore“, „Mittlere Tumore“ und „Große Tumore“ eingeteilt. Fehlerbalken: Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten. Die Anzahl der insgesamt getesteten Pflanzen ist im Diagramm angegeben (n).

Um zu überprüfen, ob Chitinasen auch in *U. maydis* einen Einfluss auf die Teliosporenentwicklung haben, wurden vier Wochen nach Infektion Tumore aus mit SG200 oder den entsprechenden Chitinase-Deletionsstämmen infizierten Pflanzen geerntet und Sporen isoliert. Um die Lebensfähigkeit der Sporen und deren Auskeimungsverhalten zu

untersuchen wurden die isolierten Sporen anschließend auf CM ausplattiert. Nach zwei Tagen Inkubation bei 28 °C zeigte keine der Mutanten Defekte bei der Sporenkeimung im Vergleich zur Kontrolle SG200 (Abb. 2.19). Dies zeigt, dass weder Chitinasen noch N-Acetyl-Glukosaminidasen in *U. maydis* für die Entwicklung und Keimung der Sporen sowie für die nachfolgende, meiotische Teilung und die Entwicklung haploider Sporidien essentiell sind.

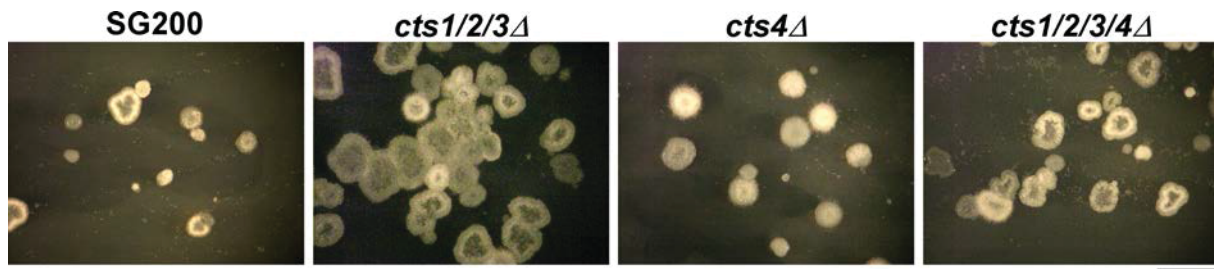


Abb. 2.19: Chitinasen sind für die Sporulation und Sporenkeimung nicht essentiell. Koloniemorphologie von *U. maydis* Chitinase-Deletionsmutanten zwei Tage nach Ausplattieren der isolierten Sporen auf CM. Keine der untersuchten Deletionsstämme zeigte Defekte bei der Auskeimung der Sporen und der Proliferation der Sporidien. Größenmaßstab: 0,5 cm.

Zusammenfassend kann durch die detaillierte Untersuchung der biotrophen Phase geschlussfolgert werden, dass Chitinasen für die Infektion der Wirtspflanze, die *in planta* Proliferation, die Tumorentwicklung, die Sporulation und die Sporenkeimung, sowie die darauf folgende meiotische Teilung zur Generierung haploider Sporidien verzichtbar sind.

2.1.4.8 Chitinasen werden nicht für die ernährungsbedingte Akquisition exogenen Chitins benötigt

Einige Organismen exprimieren Chitinasen, um exogenes Chitin abzubauen und für die ernährungsbedingte Akquisition nutzbar zu machen (Leake und Read, 1990). In *Trichoderma spec.* konnte z.B. gezeigt werden, dass die Induktion von Chitinasegenen und die daraus resultierende chitinolytische Aktivität durch exogene CHOS reguliert werden (Gruber *et al.*, 2011; Ulhoa und Peberdy, 1991). Die Regulation der Chitinasen hängt dabei auch von den N-Acetyl-Glukosaminidase-Genen *nag1* und *nag2* ab (López-Mondéjar *et al.*, 2009). Auch in Bakterien wurde eine spezifische Regulation von Chitinasen beobachtet. So konnte beispielsweise in *Streptomyces spec.* und *Vibrio spec.* gezeigt werden, dass die Expression von Chitinasen Glukose-reprimiert ist, durch Chitin jedoch aktiviert wird (Li und Roseman, 2003; Saito *et al.*, 1998; Saito *et al.*, 2000). Außerdem wird in *S. marcescens* die Expression von Chitinasen mittels spezifischer Aufnahme von (GlcNAc)₂ durch das Phosphotransferase-System reguliert (Uchiyama *et al.*, 2003), wodurch eine positive Rückkopplungsschleife

entsteht, welche den Abbau von langkettigem Chitin begünstigt und die Akquisition in Form von GlcNac und (GlcNac)₂ verbessert.

Um zu testen, ob Chitinasen in *U. maydis* ebenfalls eine Rolle für die Akquisition von exogenem Chitin spielen, wurde das Wachstum Chitinase-defizienter Stämme auf verschiedenen chitinhaltigen Medien untersucht. Dazu wurden die Stämme AB33, AB33cts1Δcts2Δcts3Δ (Mutante der gesamten GH18-Familie) und AB33cts4Δ (N-Acetyl-Glukosaminidase-Mutante) zunächst auf CM-Agar Platten und entsprechenden, mit Chitinflocken oder kolloidalem Chitin substituierten CM-Agar Platten hinsichtlich ihres Koloniewachstums untersucht.

Die Analyse der Koloniemorphologie, zwei Tage nach Auftropfen, zeigte jedoch keine offensichtlichen Unterschiede im Wachstum der Mutanten im Vergleich zum Ausgangsstamm AB33 (Abb. 2.20).

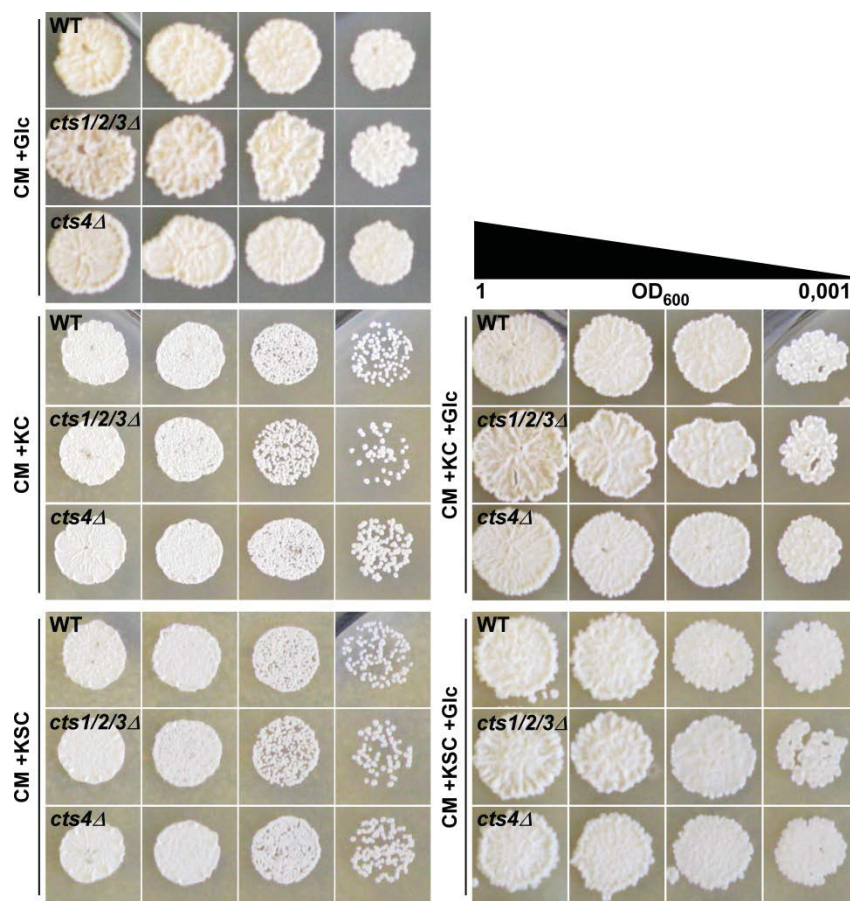


Abb. 2.20: Die chitinolytischen Enzyme werden nicht für das Wachstum auf chitinhaltigem CM Medium benötigt. Koloniemorphologie der Chitinase-Dreifach-Deletionsmutante sowie der N-Acetyl-Glukosaminidase-Mutante auf chitinhaltigem CM. Alle Stämme zeigen starkes Wachstum auf CM-Glc (oben, links). Das Wachstum auf CM mit kolloidalem Chitin (KC; mitte links) oder Chitin aus Krabbenschalen (KSC; unten, links) als vorherrschende Kohlenstoff-Quelle ist reduziert, zeigt jedoch keine Unterschiede zum Ausgangsstamm (AB33, WT). Auf Medium, welches die angegebenen Chitin-Derivate in Kombination mit Glukose enthält, ist das Wachstum vergleichbar mit dem auf CM-Glc. Kulturen der jeweiligen Stämme wurden bis zu einer OD₆₀₀ von 1 angezogen. Anschließend wurden Verdünnungen mit einer OD₆₀₀ von 0,1, 0,01 und 0,001 hergestellt und jeweils 5 µl aufgetropft. Größenstandard: 1 cm

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass Chitinasen keine Rolle in der Metabolisierung langkettiger Chitin-Derivate spielen. Außerdem zeigte die Analyse, dass Chitin keine inhibitorische Wirkung auf das Wachstum von *U. maydis* hat. Da für die Analyse CM verwendet wurde, könnten jedoch andere Medienbestandteile, wie z.B. Hefe-Extrakt, den Mangel der vorherrschenden Kohlenstoffquelle Glukose kompensieren. Daher wurde die Analyse mit Ammonium-Minimalmedium wiederholt. Jedoch zeigte auch hier keine der untersuchten Mutanten einen Unterschied zu AB33 (Abb. 2.21). Gegenüber Glukose-haltigem Medium war das Wachstum auf Medium mit kolloidalem Chitin als einziger Kohlenstoffquelle deutlich schwächer.

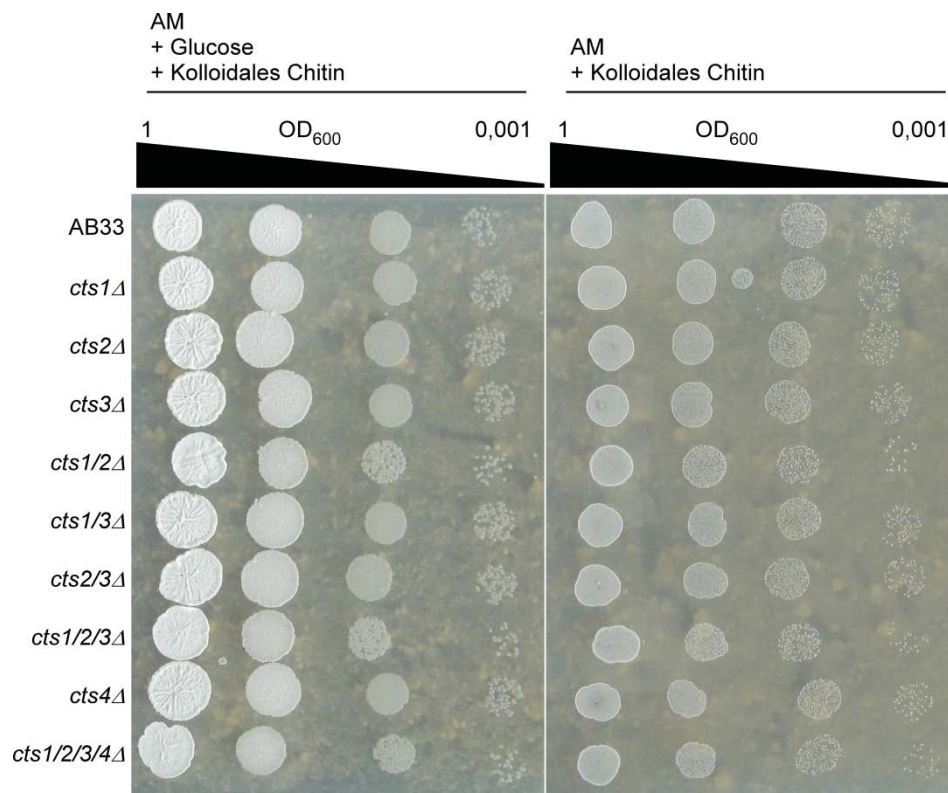


Abb. 2.21: Die chitinolytischen Enzyme aus *U. maydis* werden nicht für das Wachstum auf chitinhaltigem Minimalmedium benötigt. Koloniemorphologie der Chitinase-Dreifach-Deletionsmutanten sowie der N-Acetyl-Glukosaminidase Mutante auf chitinhaltigem Ammonium Minimalmedium (AM). Das Wachstum der Deletionsmutanten unterscheidet sich sowohl auf der Kontrollplatte (AM +Glc +KC) als auch auf der Testplatte (AM +KC) nicht von AB33. Auf Glukose-haltigem Medium ist verstärktes Wachstum zu beobachten. Kulturen der jeweiligen Stämme wurden bis zu einer OD₆₀₀ von 1 angezogen. Anschließend wurden Verdünnungen mit einer OD₆₀₀ von 0,1, 0,01 und 0,001 hergestellt und jeweils 5 µl aufgetropft. Größenstandard: 0,5 cm.

Aus der Analyse des Wachstums kann geschlossen werden, dass die Akquisition von langkettigem, exogenem Chitin zu Ernährungszwecken unter den getesteten Bedingungen irrelevant für das Wachstum von *U. maydis* ist bzw., dass Chitinasen darin keine Funktion haben.

2.1.4.9 Chitinasen tragen nicht zur Stresstoleranz von *U. maydis* bei

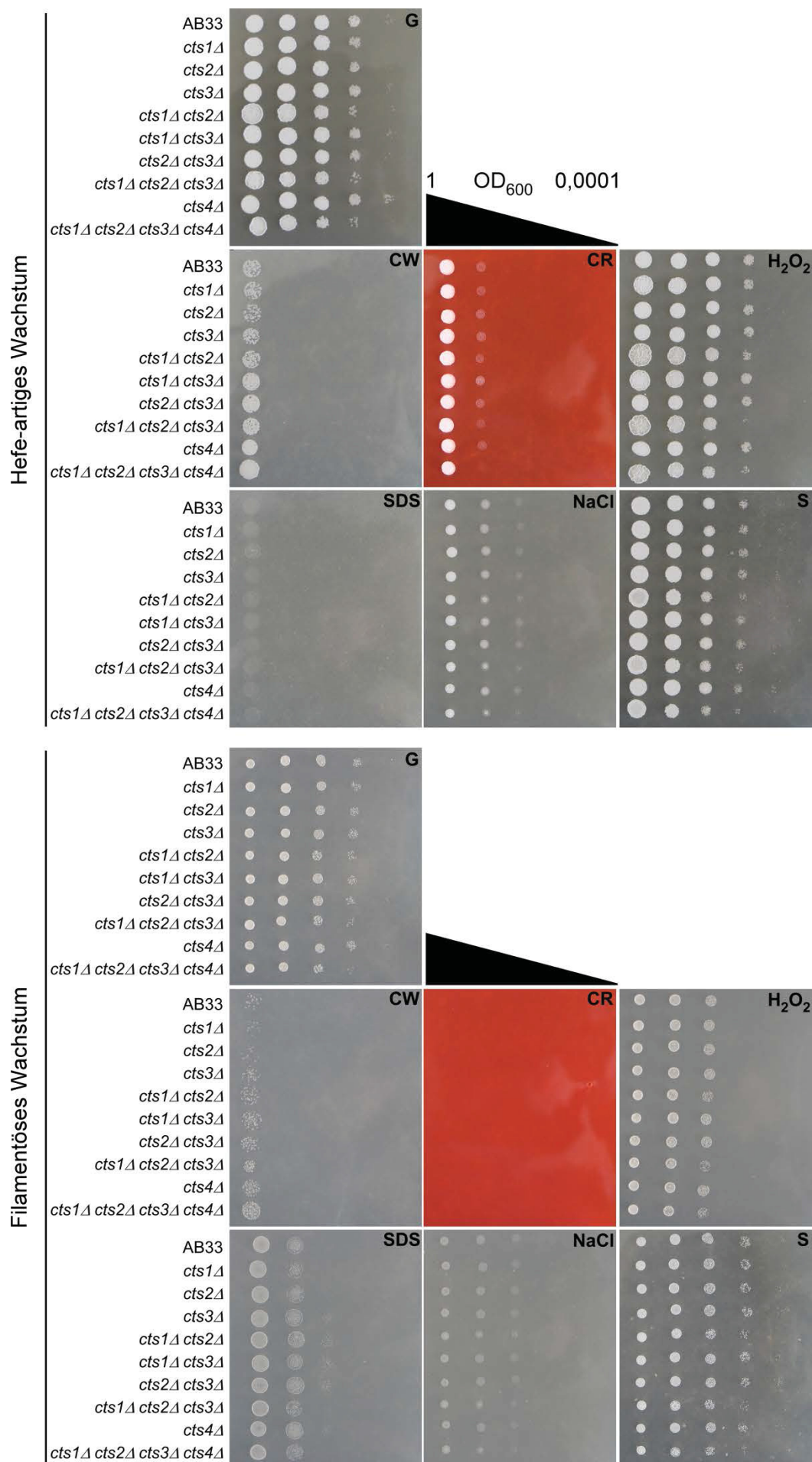
Der Einfluss von Cts1 und Cts2 auf die Zellteilung von *U. maydis*, sowie die beobachtete Lokalisation von Cts1 in der Teilungszone und an den Zellwänden der leeren Abschnitte im Filament lässt auf eine Funktion in der Remodellierung der Zellwand schließen. Eine veränderte Zellwandzusammensetzung in Abwesenheit chitinolytischer Enzyme könnte sich wiederum auf die Stresstoleranz von *U. maydis* auswirken.

Ein direkter Zusammenhang zwischen dem Chitingehalt der Zellwand und einer veränderten Stressresistenz gegenüber den Zellwandstress-induzierenden Agenzien CW und Kongorot (CR; *congo red*) wurde in *S. cerevisiae* belegt. So konnte in Chitinsynthase-Mutanten eine erhöhte Stresstoleranz beobachtet werden (Imai *et al.*, 2005; Roncero *et al.*, 1988). Anders verhält es sich in Mutanten, in welchen die Glukansynthese bzw. die Mannosylierung von Mannoproteinen der Zellwand gestört ist. In diesen Mutanten ist der Chitingehalt der Zellwand erhöht und folglich die Toleranz gegenüber CW und CR reduziert. Auch in den filamentös wachsenden Ascomyceten *A. nidulans* und *A. niger* konnten durch Stresstests mit verschiedenen Stressinduktoren Mutanten isoliert werden, die Defekte in der Zellwandassemblierung aufweisen (Damveld *et al.*, 2008; Hill *et al.*, 2006).

In *U. maydis* führte die Deletion des Chitinasegens *cts1* jedoch nicht zu einer veränderten Stresstoleranz (Koepke, 2010). Ein möglicher Grund hierfür könnte funktionelle Redundanz sein, wie sie auch für Cts1 und Cts2 während der Zellteilung beobachtet wurde (Abb. 2.9).

Um zu testen, ob multiple Deletionen chitinolytischer Enzyme zu veränderter Stress-Toleranz führen, wurden die entsprechenden Deletionsstämme während des Hefe-artigen und des filamentösen Wachstums auf Festmedium verschiedenen Stress-induzierenden Bedingungen ausgesetzt. Untersucht wurden das Wachstum und die Koloniemorphologie unter Zellwand-, Salz-, osmotischem und oxidativem Stress (auf CM 1 % Glc und NM 1 % Glc Platten versetzt mit: 150 µg/ml CW, 50 µg/ml CR, 1,5 mM Wasserstoffperoxid, 100 µg/ml SDS, 1 M NaCl oder 1 M Sorbitol). Dabei zeigte sich, dass keine der untersuchten Mutanten eine veränderte Stresstoleranz aufwies (Abb. 2.22). Daher kann geschlussfolgert werden, dass die chitinolytischen Enzyme aus *U. maydis* irrelevant für die Resistenz oder Sensitivität gegenüber den untersuchten Stressinduktoren sind.

Abb. 2.22 (nächste Seite): Die chitinolytische Maschinerie von *U. maydis* ist irrelevant für die Stresstoleranz. Koloniewachstum und Morphologie von Chitinase- und N-Acetyl-Glukosaminidase-Mutanten auf CM und NM Festmedien. Unterschiedliche Stressbedingungen wurden durch die Zugabe von CW, CR, Wasserstoffperoxid (H₂O₂), Natrium-Dodecyl-Sulfat (SDS), NaCl und Sorbitol erzeugt. Die Kulturen wurden bis zu einer OD₆₀₀ von 1 angezogen und auf 0,1, 0,01, 0,001, 0,0001 verdünnt. Jeweils 5 µl jeder Verdünnung wurden aufgetropft und 24 Stunden bei 28 °C inkubiert.



2.1.5 Biochemische Charakterisierung des chitinolytischen Repertoires

In der genetischen Analyse konnte gezeigt werden, dass Cts1 und Cts2 während der saprotrophen Phase redundante Funktionen in der Cytokinese ausüben (Abb. 2.9). Dies steht im Widerspruch zu vorangegangenen Arbeiten, in welchen gezeigt wurde, dass Cts1 die einzige aktive Chitinase in *U. maydis* ist (Koepke *et al.*, 2011). Während des Hefe-artigen Wachstums werden laut Genexpressions-Analysen die Chitinasegene *cts1* und *cts2* auf gleichem Niveau sowie die N-Acetyl-Glukosaminidase *cts4* schwach exprimiert (Anhang: Abb. 6.9; Heimel *et al.*, 2010). Nach Induktion des filamentösen Wachstums wird *cts2* drastisch herunter reguliert, sodass hauptsächlich *cts1* und *cts4* exprimiert werden (Abb. 6.9, Heimel *et al.*, 2010; Lanver *et al.*, 2014). *cts3* ist sowohl während des Hefe-artigen als auch während des filamentösen Wachstums lediglich auf einem sehr basalen Niveau exprimiert, was auch in der vorliegenden Arbeit anhand semi-quantitativer RT-PCR bestätigt und durch die Immunhistochemische Analyse eGfp-markierter Proteinvarianten bekräftigt werden konnte (Abb. 6.9, Abb. 2.11). Um einen besseren Einblick in die Wirkungsmechanismen der chitinolytischen Enzyme zu erlangen, wurden ihre Aktivitäten mit Hilfe unterschiedlicher, biochemischer Ansätze untersucht.

In vorangegangenen Arbeiten wurde Cts1 bereits heterolog in *E. coli* exprimiert und aufgereinigt (Jankowski, 2013). Zur Aufreinigung von Cts2 und Cts3 wurde daher zunächst die gleiche Expressionsstrategie gewählt. Es zeigte sich jedoch, dass die mit einem His₆-Tag markierten Proteinvarianten in den *E. coli* Expressionsstämmen „Rosetta pLys“ und „Rosetta GAMI“ in der unlöslichen Fraktion (Inkursionskörper) aggregierten (Daten nicht gezeigt). Die unter denaturierenden Bedingungen aufgereinigten Enzyme zeigten nach Rückfaltung keine Aktivität. Daher wurde im nächsten Schritt versucht, durch die Verwendung eines N-terminalen GST-Tags (Glutathion-Serin Transferase) die Löslichkeit der Proteine zu erhöhen. Die Expression GST-markierter Proteinvarianten erzeugte jedoch ebenfalls lediglich Protein in der unlöslichen Fraktion. Um das Problem der Löslichkeit der heterolog exprimierten Proteine zu umgehen, wurde im Anschluss ein zellfreies System zur Expression mittels Weizenkeimextrakt (WGE; *wheat germ extract*) verwendet. Die heterologe Expression der drei Chitinasen mittels WGE funktionierte, jedoch konnten in der Western-Blot Analyse besonders für Cts1 und Cts2 starke Abbaubanden beobachtet werden (Abb. 2.23).

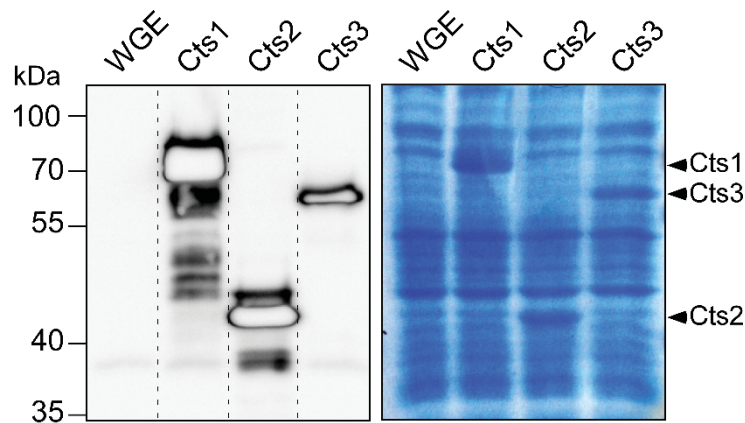


Abb. 2.23: *In vitro* Expression der Chitinasen Cts1, Cts2 und Cts3 aus *U. maydis*. SDS-PAGE und Western-Blot Analyse der His₆-markierten Chitinasevarianten nach WGE-expression. Die SDS-PAGE Analyse (rechts) zeigt, dass alle Chitinasen exprimiert wurden. Als Kontrolle diente WGE ohne Expressionsplasmid. In der Western-Blot Analyse zeigen die Chitinasen Cts1 und Cts2 Degradationsbanden. Es wurden jeweils 2 µl der WGE-Reaktion für die Detektion verwendet. Die Detektion erfolgte mittels Anti-His Antikörpers.

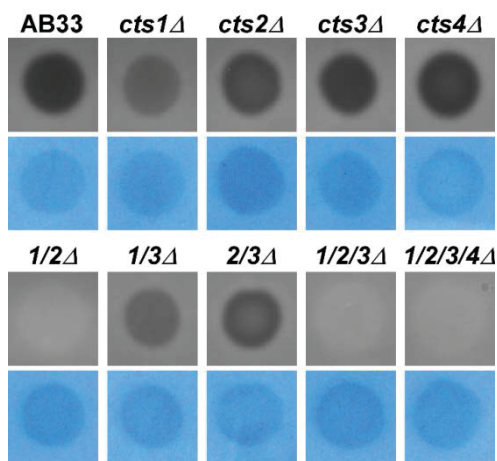
In der anschließenden Aktivitätsbestimmung der *in vitro* exprimierten Chitinasen mit Hilfe des fluorogenen Chitinasesubstrats 4-Methylumbelliferyl- β -D-N,N',N''-Triacetyl-Chitotriose (MUC₃), mittels eines Nachweises reduzierender Enden durch Dinitrosalicylsäure und eines Tropf-Aktivitätstests mit dem Substrat Glykolchitin zeigte sich jedoch, dass wiederum lediglich Cts1 aktiv war (Daten nicht gezeigt). Ein möglicher Grund für die fehlende Aktivität könnte darin liegen, dass Cts2 und Cts3 möglicherweise im ER und dem Golgi-Apparat glykosyliert werden müssen, was in der *in vitro* Expression nicht möglich ist. Aufgrund der fehlenden Aktivität *in vitro* exprimierter Enzyme war eine nähere Charakterisierung der Chitinasen Cts2 und Cts3 nicht möglich. Daher wurde die weitere Charakterisierung der Chitinaseaktivitäten direkt mit Kulturen oder mit Gesamtprotein-extrakten der jeweiligen Deletionsstämme vorgenommen.

2.1.5.1 Cts1 und Cts2 sind in Sporidien aktiv, während in Filamenten lediglich Cts1 aktiv ist

Die Funktion von Cts1 und Cts2 während der Cytokinese lässt darauf schließen, dass beide Chitinasen während des Hefe-artigen Wachstums aktiv sind, während in Filamenten lediglich eine Funktion von Cts1 beobachtet werden konnte. Um zu untersuchen welche Chitinasen in der jeweiligen Wachstumsphase *in vivo* aktiv sind, wurde die Chitinaseaktivität von Gesamtzellextrakten in einem Tropf-Gelaktivitätstests mit Hilfe des löslichen Chitinderivats Glykolchitin getestet. Die Analyse der Proteinextrakte aus Hefe-artig wachsenden Zellen ergab, dass sowohl Cts1 als auch Cts2 während des saprotrophen Wachstums aktiv sind (Abb. 2.24 A). Die Einzeldeletionen von *cts1* und *cts2* führten jeweils zu einer Verringerung der

Chitinaseaktivität. Die Doppeldeletion von *cts1* und *cts2* führte zum kompletten Verlust der Aktivität. Die Deletionen von *cts3* und *cts4* hatten, wie erwartet, keinen Einfluss auf die Aktivität gegenüber Glykolchitin. Die Doppeldeletionen von *cts1* und *cts3* sowie von *cts2* und *cts3* führten zu einer Verringerung der Aktivität, wie sie auch in den jeweiligen Einzelmутanten (AB33*cts1*Δ, AB33*cts2*Δ) zu beobachten waren. In Zellextrakten aus Filamenten führte dagegen bereits die Einzeldelation von *cts1* zu einem kompletten Verlust der Chitinaseaktivität gegenüber Glykolchitin (Abb. 2.24 B).

A)



B)

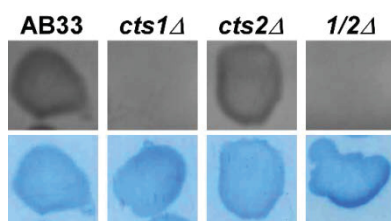


Abb. 2.24: Cts1 und Cts2 sind während des Hefe-artigen Wachstums aktiv, während lediglich Cts1 in Filamenten aktiv ist. Tropf-Gelaktivitätstest mittels Glykolchitin auf Chitinaseaktivität von Proteinextrakten aus AB33 und Chitinase-defizienten Stämmen. 20 µg des Gesamtproteinextrakts wurde auf ein 12 % Polyacrylamidgel mit 1 % Glykolchitin aufgetropft. Nach 24-stündiger Inkubation wurde das Gel mit CW gefärbt und anschließend über Nacht mit Wasser entfärbt. Chitinaseaktivität ist als dunkler Hof erkennbar. Jeweils untere Reihe: Coomassie-Färbung (Ladekontrolle). **(A)** Während des Hefe-artigen Wachstums zeigen AB33*cts1*Δ und AB33*cts2*Δ im Vergleich zu AB33 reduzierte Chitinaseaktivität. Stämme, in denen beide Chitinasen deletiert sind, zeigen einen Kompletterverlust der Chitinaseaktivität. **(B)** Während des filamentösen Wachstums ist lediglich Cts1 aktiv. Die Deletion des *cts1*-Gens führt dementsprechend zu einem Kompletterverlust der Aktivität.

Die Analyse der Chitinaseaktivitäten der Gesamtproteinextrakte Hefe-artig und filamentös wachsender Zellen zeigte, dass Cts1 und Cts2 in Sporidien aktiv sind. Proteinextrakte aus Filamenten weisen lediglich Cts1-Aktivität auf. Durch die Aktivitäten der Chitinasen können somit die in der genetischen Analyse beobachteten Phänotypen erklärt werden. Dennoch ist unklar, warum die Aktivität von Cts2 in Kulturen mittels des Substrats MUC₃ nicht nachgewiesen werden konnte. Auch die Aktivität der N-Acetyl-Glukosaminidase Cts4 konnte mittels des Substrats Glykolchitin nicht nachgewiesen werden. Eine Möglichkeit für die fehlende Cts4-Aktivität ist, dass Cts4 das Langkettige Chitin-Derivat Glykolchitin nicht als Substrat akzeptiert oder dass die Aktivität gegenüber längeren CHOS zu gering und damit unter dem Detektionslimit ist.

2.1.5.2 Cts4 ist eine aktive N-Acetyl-Glukosaminidase

Laut Domänen- und Proteinstrukturanalyse handelt es sich bei Cts4 um eine aktive N-Acetyl-Glukosaminidase. Diese Enzymfamilie spaltet hauptsächlich (GlcNAc)₂ in GlcNAc-Monomere, welche anschließend als Kohlenstoff- und Stickstoffquelle metabolisiert werden können (López-Mondéjar *et al.*, 2009).

Um herauszufinden, ob es sich bei Cts4 tatsächlich um eine funktionelle N-Acetyl-Glukosaminidase handelt, wurde die Aktivität von intakten Zellen gegenüber verschiedener fluorogener Substrate getestet (Abb. 2.25 A). 4-Methylumbelliferyl-N-Acetyl-β-D-Glucosaminid (MUG) diente als spezifisches Substrat für N-Acetyl-Glukosaminidasen. Die Substrate 4-Methylumbelliferyl-β-D-N, N'-Diacetyl-Chitobiose (MUC₂) und 4-Methylumbelliferyl-β-D-N, N', N''-Triacetyl-Chitotriose (MUC₃) dienten als Chitinase-Substrate zur Kontrolle.

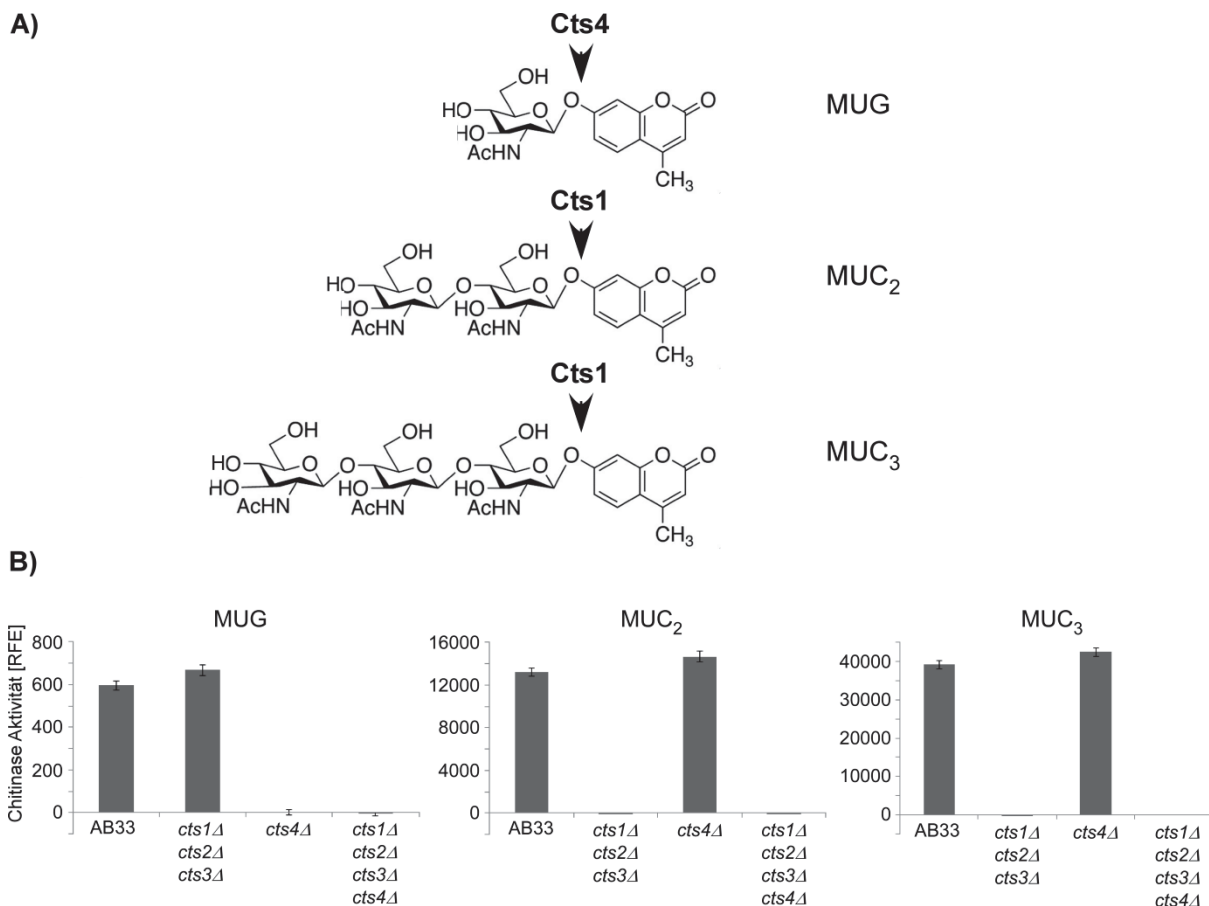


Abb. 2.25: Cts4 ist eine aktive N-Acetyl-Glukosaminidase. Aktivitätstest von intakten Zellen gegenüber verschiedener, fluorogener Substrate für Chitinasen und N-Acetyl-Glukosaminidasen. **(A)** Verwendete fluorogene Substrate zur Bestimmung der Enzymaktivität. 4-Methylumbelliferyl-N-Acetyl-β-D-Glucosaminid (MUG) diente als spezifisches Substrat für N-Acetyl-Glukosaminidasen. Die Substrate 4-Methylumbelliferyl-β-D-N, N'-Diacetyl-Chitobiose (MUC₂) und 4-Methylumbelliferyl-β-D-N, N', N''-Triacetyl-Chitotriose (MUC₃) dienten zur Kontrolle als Chitinase Substrate. Pfeile geben die Schnittstelle der jeweiligen Enzyme an. **(B)** Enzymtest für Chitinasen und N-Acetyl-Glukosaminidasen von intakten Zellen. Zellen in denen *cts4* deletiert war, verloren jegliche Aktivität gegenüber MUG. Chitinase-defiziente Zellen wiesen keine Aktivität gegenüber MUC₂ und MUC₃ auf. Für die Messung wurden 30 µl von Kulturen einer OD₆₀₀ von 1,0 verwendet.

Die Analyse bestätigte, dass es sich bei Cts4 um eine aktive N-Acetyl-Glukosaminidase handelt. Kulturen, in welchen das *cts4*-Gen deletiert war (AB33cts4Δ, AB33cts1Δcts2Δcts3Δcts4Δ), zeigten keinerlei Aktivität gegenüber MUG (Abb. 2.25 B). Umgekehrt verloren die Chitinase-defizienten Stämme, wie erwartet, jegliche Aktivität gegenüber den Chitinase-Substraten MUC₂ und MUC₃. Da die Aktivität von Cts4 für die Degradation von MUG sowohl erforderlich als auch ausreichend ist, kann geschlussfolgert werden, dass Cts4 die einzige aktive N-Acetyl-Glukosaminidase in *U. maydis* ist. Außerdem konnte durch die Analyse der Chitinaseaktivität gezeigt werden, dass neben Cts1, Cts2 und Cts3 keine weiteren aktiven Chitinasen in *U. maydis* vorhanden sind.

2.1.5.3 Lediglich Cts1 zeigt Aktivität gegenüber MUC₂ und MUC₃

Die Analyse der chitinolytischen Aktivität von AB33cts1Δcts2Δcts3Δ ergab, dass in diesem Stamm keine Chitinaseaktivität gegenüber den gängigen fluorogenen Substraten MUC₂ und MUC₃ vorhanden war. Dies ist konsistent mit vorangegangenen Analysen, wonach bereits intakte *cts1Δ*-Zellen keinerlei Aktivität gegenüber MUC₃ besitzen (Koepke *et al.*, 2011). Die Analyse der Aktivität von Zellextrakten mit Hilfe von Glykolchitin (Abb. 2.24) konnte jedoch Aktivität für Cts1 und Cts2 nachweisen, was im Widerspruch mit den Ergebnissen der Aktivitätstests mit den fluorogenen Substraten steht. Obwohl Cts2 ein N-terminales Signalpeptid enthält, könnte fehlende Sekretion ein Grund für die Diskrepanz der Analyse von Proteinextrakten und intakten Zellen sein. In Pflanzen werden z.B. Chitinasen der Glykosylhydrolase 19 Familie durch eine C-terminale Signalsequenz in die Vakuole transloziert (Neuhaus *et al.*, 1991; Stigliano *et al.*, 2014). Für fehlende Sekretion würde auch die beobachtete Akkumulation von Cts2G im Endomembransystem sprechen (Abb. 2.11).

Um zu überprüfen ob fehlende Sekretion von Cts2 zu den Unterschieden zwischen den Analysen von intakten Zellen mit MUC₃ (und MUC₂) und Gesamtzellextrakten (GZE) mit Glykolchitin führt, wurde die Aktivität von intakten Zellen und Gesamtproteinextrakten gegenüber MUC₃ und MUC₂ getestet. Wie erwartet hatte die Deletion von *cts3* keinen Einfluss auf die chitinolytische Aktivität. Die Deletion von *cts1* führte jedoch sowohl mit intakten Zellen, als auch mit Zellextrakten zu einem kompletten Verlust der Chitinaseaktivität gegenüber MUC₃ und MUC₂ (Abb. 2.26). Die Deletion von *cts2* hatte keinen Einfluss auf die Aktivität gegenüber den fluorogenen Substraten. Daher kann ausgeschlossen werden, dass intrazelluläres Cts2 gegenüber MUC₃ und MUC₂ aktiv ist.

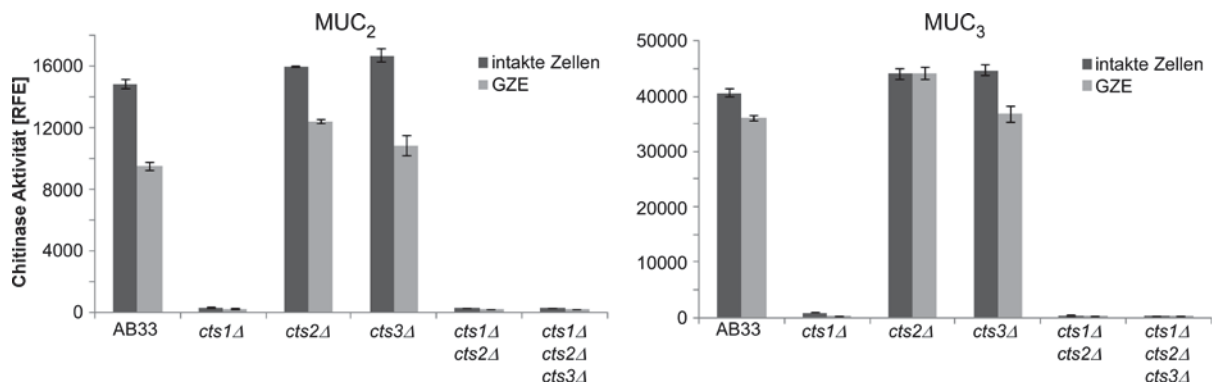


Abb. 2.26: Cts2 zeigt gegenüber den Substraten MUC₂ und MUC₃ keine Chitinaseaktivität. Chitinase-Aktivitätstest intakter Zellen und Gesamtzellextrakten (GZE) mit den Substraten MUC₂ und MUC₃. Die Deletion von *cts1* führt sowohl in intakten Zellen als auch in Proteinextrakten zu einem kompletten Verlust der Aktivität. Die Deletion von *cts2* oder *cts3* hat hingegen keinen Einfluss auf die Chitinaseaktivität. Für die Messung wurden 30 µl von Kulturen einer OD₆₀₀ von 1,0 verwendet. Gesamtzellextrakte (GZE) wurden aus denselben Kulturen hergestellt und entsprechend verdünnt. Anschließend wurden ebenfalls 30 µl der GZE für die Messung verwendet.

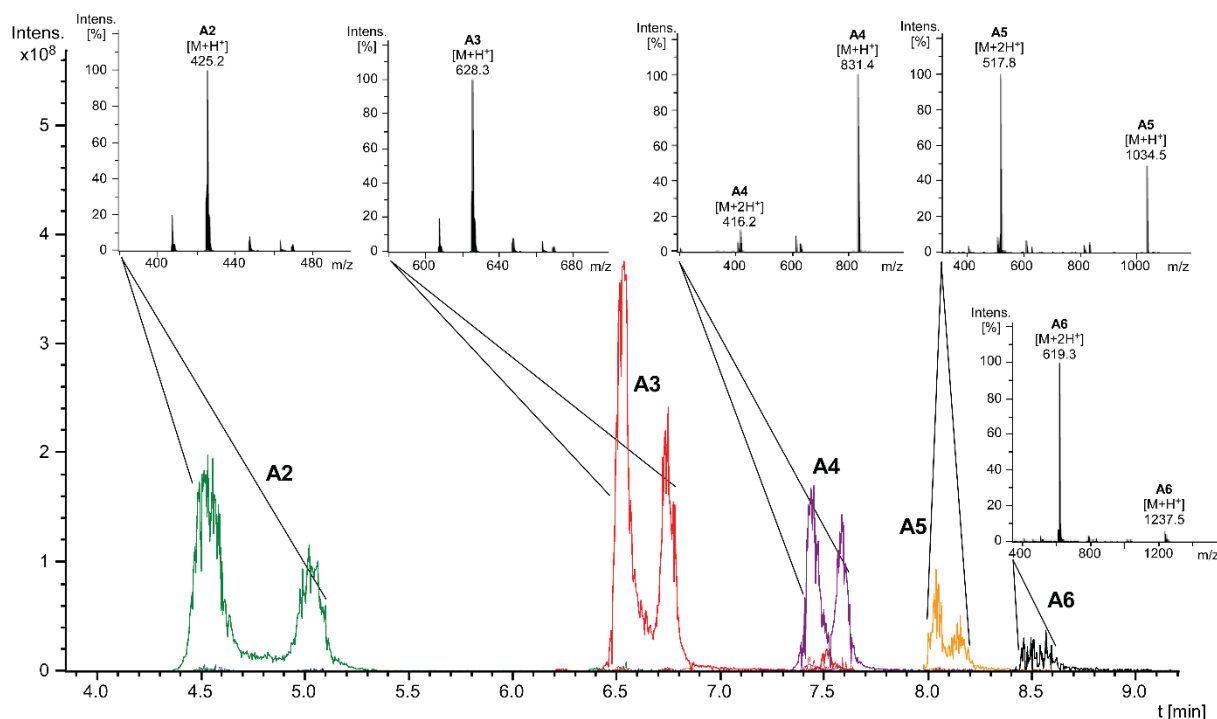
2.1.5.4 Cts1 und Cts2 unterscheiden sich in ihrer Substratbindung oder Schnittstellenpräferenz

Fehlende Sekretion von Cts2 konnte als Grund für die Diskrepanz zwischen den unterschiedlichen Aktivitätstests ausgeschlossen werden. Eine weitere Erklärung für die fehlende Aktivität von Cts2 gegenüber MUC₃ und MUC₂ könnte in der Substraterkennung von Chito-Oligosacchariden oder in der Schnittstellenpräferenz liegen. In *S. marcescens* konnte bereits gezeigt werden, dass sich die beiden prozessiv wirkenden Exochitinasen ChiA und ChiB in der Richtung unterscheiden, in der sie die Chitinpolymere abbauen (Hult *et al.*, 2005; van Aalten *et al.*, 2000). Auch im Vergleich der beiden Hefe-Chitinasen ScCts1p und KlCts1p wurde eine Substratpräferenz beobachtet (Colussi *et al.*, 2005). Während KlCts1p eine relativ hohe Affinität zu MUC₃ aufweist, kann ScCts1p das Substrat, ähnlich wie UmCts2, nicht verwerten.

Um herauszufinden ob Cts2 kurzkettige CHOS als Substrat verwerten kann, wurden die Reaktionsprodukte aus der Inkubation von Zellextrakten mit (GlcNAc)₆ und (GlcNAc)₄ mittels hydrophiler Interaktions-Flüssigchromatographie gekoppelt mit Evaporations-Lichtstreuungs-Detektion und Elektrosprayionisation-Massenspektrometrie (HILIC-ELSD-ESI-MSⁿ; Hamer *et al.*, 2015) analysiert. Dazu wurden Proteinextrakte aller Chitinase-Deletionsmutanten über Nacht mit (GlcNAc)₆ bzw. (GlcNAc)₄ inkubiert, die Reaktionsprodukte über Größenausschluss-Chromatographie aufgereinigt und die niedermolekularen Verbindungen anschließend detektiert. Als Referenz wurden zunächst die UPLC- und Massenspektren spezifischer, hochreiner acetylierter CHOS (A2 = (GlcNAc)₂ bis

A6 = (GlcNAc)₆) bestimmt (Abb. 2.27 A) und mit den theoretischen Massen der entsprechenden Addukt-Ionen abgeglichen (Abb. 2.27 B; pers. Mitteilung: B. Mörschbacher).

A)



B)

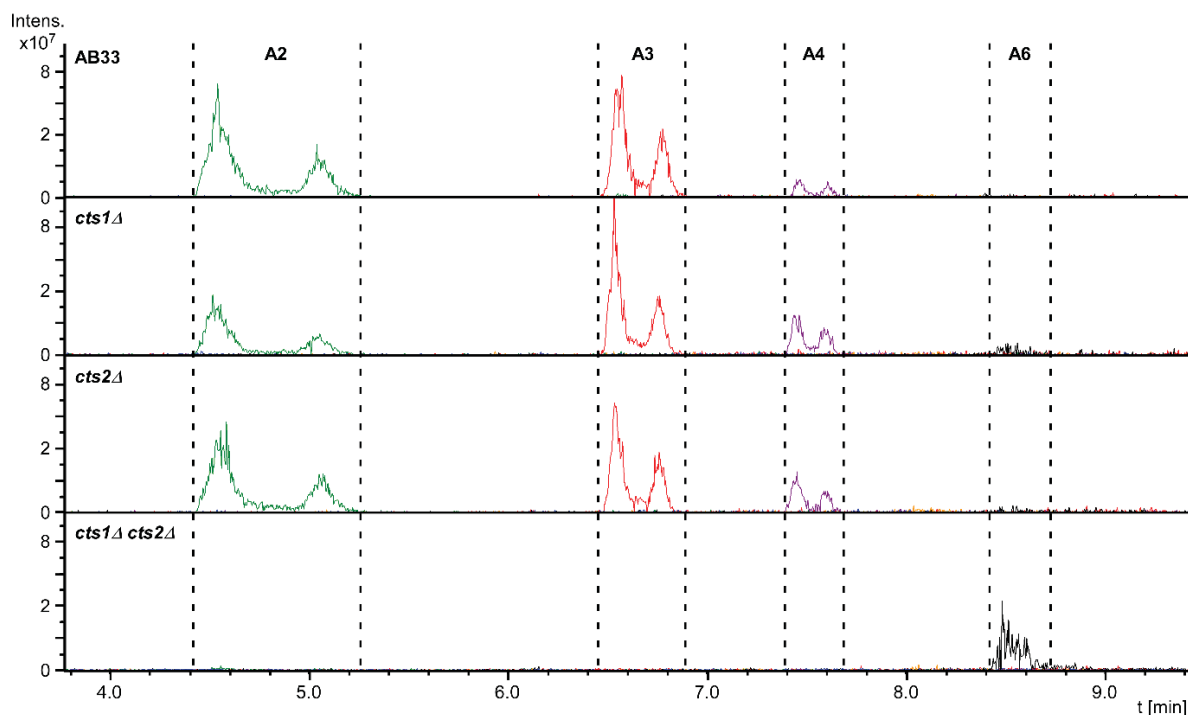
Produkt	assoziiertes Ion				
		H ⁺	2 H ⁺	3 H ⁺	Na ⁺
GlcNAc	221,0899	222,0899	111,5450	74,6966	244,0797
(GlcNAc) ₂	424,1693	425,1693	213,0847	142,3898	447,1591
(GlcNAc) ₃	627,2487	628,2487	314,6244	210,0829	650,2385
(GlcNAc) ₄	830,3281	831,3281	416,1640	277,7760	853,3178
(GlcNAc) ₅	1033,4075	1034,4075	517,7037	345,4692	1056,3972
(GlcNAc) ₆	1236,4868	1237,4868	619,2434	413,1623	1259,4766

Abb. 2.27: UPLC-MS Analyse spezifischer Chito-Oligosaccharide. (A) Extrahierte Ionen-Chromatogramme (EIC) und dazugehörige Massenspektren spezifischer CHOS nach Auftrennung und Detektion mittels HILIC-ESI-MSⁿ. (GlcNAc)₂ (A2; m/z 425,2; grün), (GlcNAc)₃ (A3; m/z 628,3; rot), (GlcNAc)₄ (A4; m/z 831,4; violett), (GlcNAc)₅ (A5; m/z 517,5; gelb) und (GlcNAc)₆ (A6; m/z 619,3; schwarz). (B) Theoretische Massen der CHOS verschiedener Ladungen und Addukte (assoziierte Ionen), die für die Erstellung der EIC verwendet wurden.

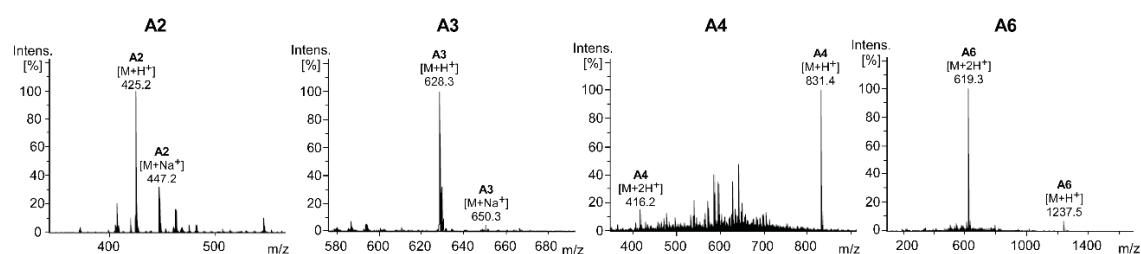
Die HILIC-ELSD-ESI-MSⁿ Analyse der Reaktionsprodukte ergab, dass AB33 (GlcNAc)₆ (A6) überwiegend in (GlcNAc)₃ (A3) und (GlcNAc)₂ (A2) spaltet (Abb. 2.28 A, B). In AB33cts1Δcts2Δ Stämmen konnte, wie erwartet, keine Chitinaseaktivität nachgewiesen werden. Sowohl AB33cts1Δ als auch AB33cts2Δ konnte (GlcNAc)₆ in (GlcNAc)₃ und

(GlcNAc)₂ spalten. Ähnliche Ergebnisse zeigten auch die Analysen der Doppel-Deletionsmutanten und die Analyse der Reaktionsprodukte aus der Inkubation mit (GlcNAc)₄ als Substrat (s. Anhang Abb. 6.10).

A)



B)



C)

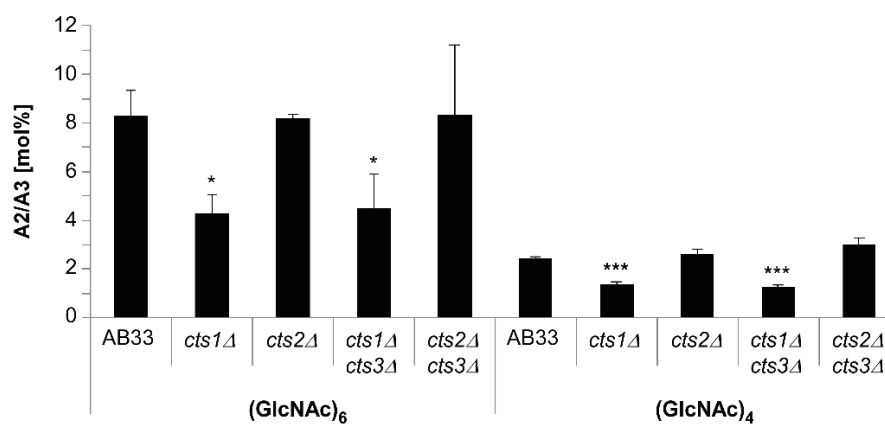


Abb. 2.28: Cts1 und Cts2 produzieren unterschiedliche Mengen von A2 und A3 aus A6.

Abb. 2.28 (fortgesetzt): Cts1 und Cts2 produzieren unterschiedliche Mengen von A2 und A3 aus A6. (A) Extrahierte Ionen-Chromatogramme (EIC) der Hydrolyseprodukte aus der Inkubation von (GlcNAc)₆ (A6) mit 5 µg *U. maydis* Gesamtproteinextrakten. Die Reaktionsprodukte wurden mittels HILIC-ELSD-ESI-MSⁿ analysiert. (GlcNAc)₂ (A2; m/z 425,2; grün), (GlcNAc)₃ (A3; m/z 628,3; rot), (GlcNAc)₄ (A4; m/z 831,4; violett) und (GlcNAc)₆ (A6; m/z 619,3; schwarz). **(B)** ESI-MS Spektrum der Hydrolyseprodukte (A2, A3, A4 und A6). Exemplarische Darstellung der Massenspektren zu den jeweiligen EIC aus (A). Die Massenspektren von A2, A3 und A4 entstammen der Analyse der AB33 Hydrolyseprodukte. Das Massenspektrum von A6 entstammt dem EIC der AB33cts1Δcts2Δ Mutante. **(C)** Molare Verhältnisse zwischen A2 und A3 nach Inkubation von A6 oder A4 mit Gesamtproteinextrakten aus AB33 oder den jeweiligen Chitinase-Deletionsmutanten. *cts1*-defiziente Stämme produzieren ein signifikant geringeres A2/A3-Verhältniss als AB33 oder *cts2*-defiziente Stämme. Die molaren Mengen des jeweiligen Chito-Oligomers wurden aus der Peak-Fläche des ELSD-Signals berechnet. Als Mengenstandard dienten definierte Mengen definierter Chito-Oligomere (A2-A6; 50 ng, 125 ng, 187,5 ng, 250 ng, 500 ng, 1 µg). Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten. *, p<0,05 (T-Test).***, p<0,0005 (T-Test).

Somit kann geschlussfolgert werden, dass sowohl Cts1 als auch Cts2 kurze CHOS der Kettenlängen n=6 und n=4 als Substrate erkennen und akzeptieren. Die weitere Analyse der molaren Verhältnisse zwischen (GlcNAc)₂ (A2) und (GlcNAc)₃ (A3) zeigte jedoch, dass Mutanten, welchen die Chitinase Cts1 fehlt, deutlich geringere A2/A3-Mengen, also deutlich weniger Dimere, produzieren (Abb. 2.28 C). *cts2*Δ-Mutanten hingegen, produzierten A2/A3-Mengen, die mit AB33 vergleichbar waren, was ein Indiz für unterschiedliche Substratbindung oder Schnittstellenpräferenz von Cts1 und Cts2 sein könnte.

Zusammenfassend kann durch die Analyse der chitinolytischen Aktivitäten geschlussfolgert werden, dass *U. maydis* mit Cts1 und Cts2 zwei aktive Chitinasen und mit Cts4 eine aktive N-Acetyl-Glukosaminidase exprimiert. Cts3 trägt unter den getesteten Bedingungen nicht zum chitinolytischen Repertoire von *U. maydis* bei. Während in Hefe-artig knospenden Zellen sowohl Cts1 als auch Cts2 aktiv sind, ist in Filamenten lediglich Cts1-Aktivität messbar. Cts1 und Cts2 scheinen sich des Weiteren in ihrer Substratbindung oder Schnittstellenpräferenz zu unterscheiden, was dazu führt, dass lediglich Cts1-Aktivität mittels MUC₃ und MUC₂ nachzuweisen ist. Somit steht mit den fluorogenen Substraten ein Chitinase-Assay zur Verfügung, der spezifisch für Cts1 ist.

2.2 Der Rrm4-abhängige Proteinimport in Mitochondrien

In Vorarbeiten wurden spezifische mRNAs mitochondrialer Proteine als Ziel-mRNAs des Rrm4-abhängigen RNA-Transports identifiziert (Abb. 2.29 A; König *et al.*, 2009; Haag, 2013). Viele dieser Ziel-mRNAs kodieren Proteine der mitochondrialen Atmungskette (Abb. 2.29 B). Außerdem wurde gezeigt, dass einige der mitochondrialen Proteine in Abhängigkeit von Rrm4 differenziell exprimiert werden und ihre Menge, vor allem in der Membran-assoziierten Fraktion, zwischen Wildtyp und *rrm4Δ*-Mutante stark variiert (Koepke, 2010). Des Weiteren konnte beobachtet werden, dass die Deletion von *rrm4* während des filamentösen Wachstums zu einer erhöhten Produktion von mitochondrialen, reaktiven Sauerstoff-Spezies (ROS, *reactive oxygen species*) führt (Abb. 2.29 C; Koepke, 2010).

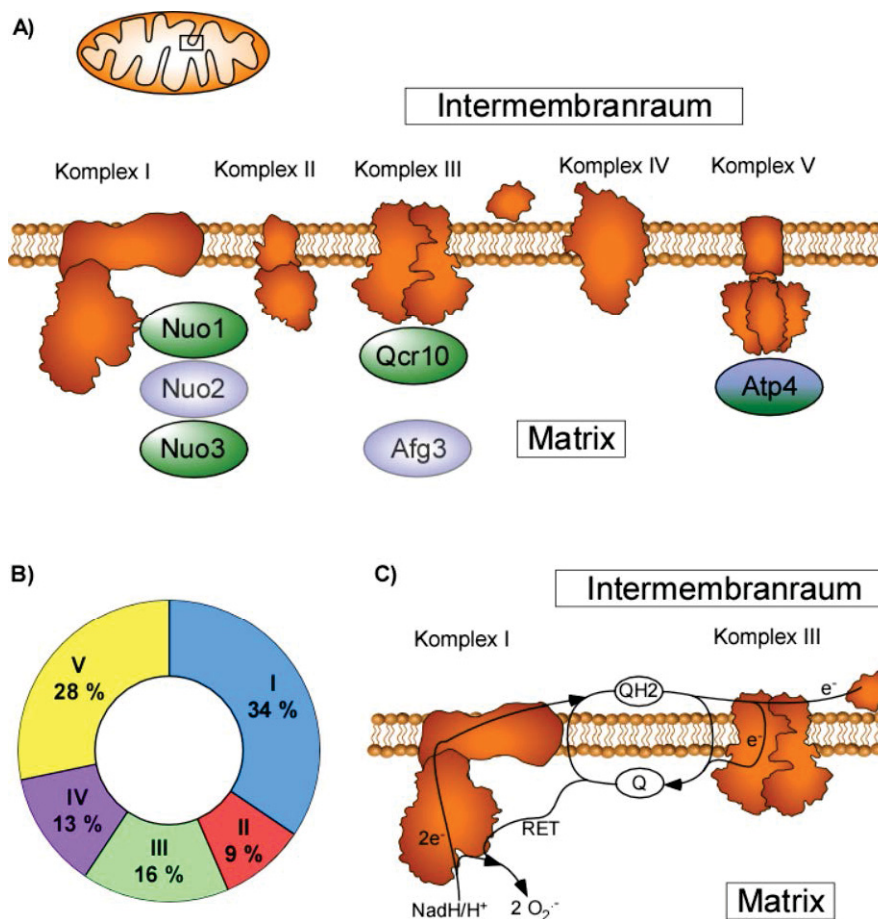


Abb. 2.29: mRNAs mitochondrialer Proteine sind Ziele des Rrm4-abhängigen Transports. (A) Ziele des Rrm4-abhängigen Transports in der Atmungskette, welche durch *in vivo* UV-Vernetzung (König *et al.*, 2009; Haag, 2013; grün, CLIP; *crosslinking immunoprecipitation*) und differenzielle Proteom-Analyse (Koepke, 2010; blau, DIGE; *2D fluorescence differential gel electrophoresis*) identifiziert wurden. Dargestellt sind die jeweils signifikantesten Ziele der Komplexe I, III und V. (B) Prozentuale Verteilung der Rrm4-Ziel-mRNAs aus der mitochondrialen Atmungskette auf die fünf Proteinkomplexe: 34 % Komplex I, 9 % Komplex II, 16 % Komplex III, 13 % Komplex IV, 28 % Komplex V. Daten extrahiert und zusammengefasst aus (König *et al.*, 2009; Haag, 2013; Koepke, 2010). (C) Komplex I-abhängiger Elektronentransport und Superoxidproduktion in der Atmungskette. Elektronen werden während des linearen Elektronentransports von $NadH/H^+$ über Komplex I auf den Ubichinon-Pool und weiter auf Komplex III übertragen. Unter Stress-Bedingungen kommt es zum reversen Elektronentransport (RET) zurück auf Komplex I, was durch die Übertragung von Elektronen auf molekularen Sauerstoff zur Bildung von Superoxid (O_2^- , SOX = ROS) führen kann.

Ein möglicher Grund für die erhöhte ROS Produktion in *rrm4Δ*-Filamenten könnte ein fehlerhafter oder verlangsamter Proteinimport in Mitochondrien in Abwesenheit eines mRNA-Longstreckentransportsystems sein. Import, Faltung und das Sortieren von Proteinen in Mitochondrien sind hochgradig regulierter Prozess (Hartl und Neupert, 1990; Ostermann *et al.*, 1989). Außerdem konnte in verschiedenen Modellsystemen gezeigt werden, dass mRNAs, welche mitochondriale Proteine kodieren (insbesondere Atmungsketten-Proteine), mit Hilfe RNA-bindender Proteine an der Oberfläche von Mitochondrien lokalisieren (Matsumoto *et al.*, 2012; Kaltimbacher *et al.*, 2006). Daher könnte besonders in Filamenten ein effizienter mRNA-Longstreckentransport wichtig für die Translokation der mRNAs bzw. der entsprechenden Genprodukte zu Mitochondrien sein und somit den Import und die Assemblierung von Proteinkomplexen der Atmungskette beeinflussen.

2.2.1 Eine Inhibition der Atmungskette führt zum Verlust des filamentösen Wachstums

rrm4Δ-Mutanten weisen während des filamentösen Wachstums einen charakteristischen bipolaren Phänotyp auf (Becht *et al.*, 2006). Um zu testen, ob Fehlfunktionen der mitochondrialen Atmungskette die Filamentmorphologie beeinflussen und somit zu dem beobachteten Phänotyp beitragen können, wurde die Auswirkung verschiedener Inhibitoren auf die Filamentmorphologie untersucht. Dazu wurde in AB33 Zellen das filamentöse Wachstum induziert und nach drei Stunden die Inhibitoren Rotenon (Komplex I Inhibitor), Antimycin-A und Myxothiazol (beides Komplex III Inhibitoren) zugegeben (Abb. 2.30 C). Sechs Stunden nach Filamentinduktion konnte in allen behandelten Kulturen eine deutliche Inhibition des filamentösen Wachstums im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle beobachtet werden (Abb. 2.30 A). Die Inhibition der Atmungskette hatte dabei keinen Einfluss auf den ATP-abhängigen molekularen Transport von Rrm4G (Abb 2.30 B). Daher ist ATP-Mangel als Grund für die Inhibition des filamentösen Wachstums unwahrscheinlich.

Abb. 2.30 (nächste Seite): Die Inhibition der Atmungskette führt zum Verlust des filamentösen Wachstums. (A) Zellmorphologie des Stammes AB33*rrm4::egfp* nach sechs-stündiger Filamentinduktion. Die Zugabe der Inhibitoren Rotenon, Antimycin-A oder Myxothiazol erfolgte drei Stunden nach Induktion. Alle Inhibitoren führen zum Verlust des filamentösen Wachstums. Größenstandard: 10 μ m. (B) Kymographen zur Darstellung der Rrm4G-Bewegung. Unter allen getesteten Bedingungen ist molekularer Transport von Rrm4G vorhanden. (C) Schematische Darstellung der Wirkungsorte der eingesetzten Inhibitoren. Rotenon inhibiert den Elektronentransport von Eisen-Schwefel-Zentren von Komplex I auf Ubichinon. Myxothiazol bindet an die Q₀-Seite (Ubichinol-Oxidationszentrum) von Komplex III und inhibiert den e⁻-Transfer auf das Rieske Eisen-Schwefel Protein. Antimycin-A bindet die Q_i-Stelle von Komplex III und inhibiert so den Elektronentransfer von Häm-b_H zu Ubichinon.

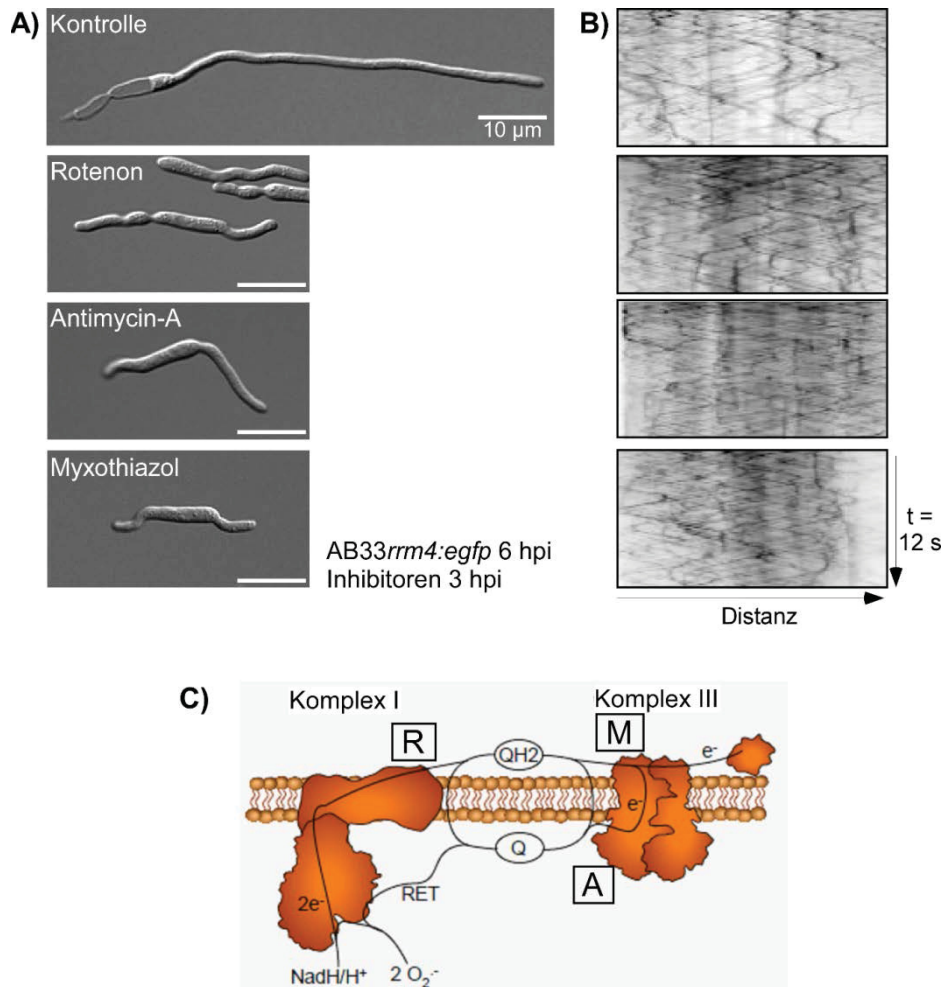


Abb. 2.30: Die Inhibition der Atmungskette führt zum Verlust des filamentösen Wachstums.

2.2.2 Die Deletion von *rrm4* hat keinen Einfluss auf die Assemblierung der Atmungsketten-Komplexe

Frühere Studien haben gezeigt, dass es in *rrm4Δ*-Mutanten zu einer erhöhten ROS-Produktion kommt. Außerdem ist die m-AAA-Protease Afg3 4,5-fach stärker exprimiert als in Wildtyp-Filamenten (Koepke, 2010). m-AAA Proteasen sind ein zentraler Bestandteil der Qualitätskontrolle während der Assemblierung von Proteinkomplexen in der inneren Mitochondrienmembran (Korbel *et al.*, 2004; Arlt *et al.*, 1996; Arlt *et al.*, 1998). Ein fehlerhafter Proteinimport und eine dadurch veränderte Assemblierung der Atmungskettenkomplexe könnten daher in *rrm4Δ*-Mutanten zu den beobachteten Effekten führen. Um zu überprüfen, ob einzelne Komplexe der Atmungskette in Abwesenheit von Rrm4 unterrepräsentiert sind wurden Mitochondrien aus AB33- und AB33rrm4Δ-Filamenten isoliert, mitochondriale Proteinkomplexe mittels nativer Polyacrylamid-Gelelektrophorese (*Blue-Native PAGE*) aufgetrennt und semi-quantitativ analysiert (Wittig *et al.*, 2006). Durch

die Analyse konnten jedoch keine eindeutigen Unterschiede in der Größe oder der relativen Menge der Atmungskettenkomplexe zwischen AB33- und *rrm4Δ*-Mutanten festgestellt werden (Abb. 2.31).

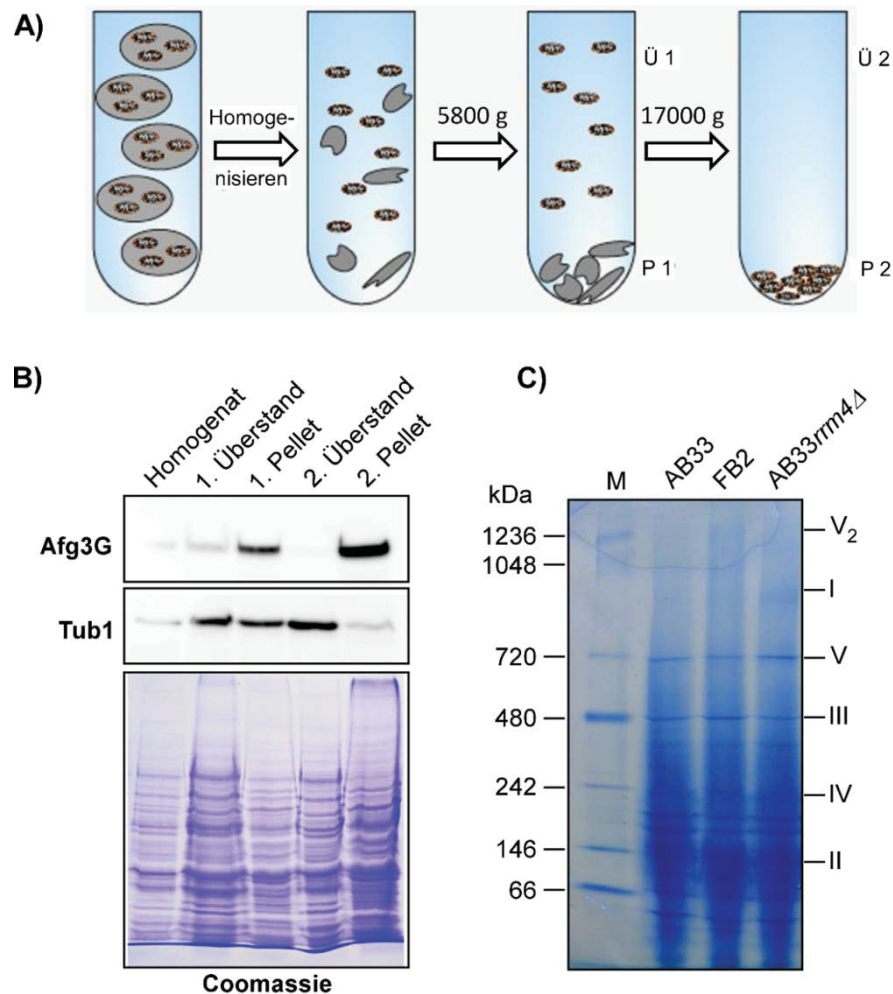


Abb. 2.31: Rrm4 hat keinen Einfluss auf die Assemblierung von Atmungskettenkomplexen. **(A)** Schematische Darstellung der Aufreinigung von Mitochondrien aus *U. maydis* Kulturen. Protoplastierte Zellen wurden homogenisiert und Mitochondrien durch differenzielle Zentrifugation aufgereinigt. Ü1: Überstand nach erster Zentrifugation bei 5800 x g; P1: Pellet nach erster Zentrifugation bei 5800 x g; Ü2: Überstand nach zweiter Zentrifugation bei 17000 x g; P2: Pellet nach zweiter Zentrifugation bei 17000 x g. **(B)** Western-Blot Analyse der Mitochondrienaufreinigung. In den Fraktionen der Aufreinigung wurden zur Kontrolle typische mitochondriale und cytoplasmatische Proteine nachgewiesen. Als Mitochondrien-Marker diente die Gfp-markierte Matrix-Protease Afg3. Als Markerprotein für cytoplasmatische Verunreinigungen diente α -Tubulin. Ladekontrolle: Coomassie Brilliant-Blau Färbung. Es wurden jeweils 10 μ g Gesamtprotein geladen. **(C)** Native gelelektrophoretische Auftrennung der Atmungskettenkomplexe. Atmungskettenkomplexe wurden mittels schonender Digitonin-Behandlung aus den Mitochondrien der P2-Fraktion (2. Pellet) gelöst, mittels Ultrazentrifugation aufgereinigt und anschließend in einem 3-12 % nativen, Bis-Tris Gradientengel elektrophoretisch aufgetrennt. Als Kontrollen dienten Filamente des Stammes AB33 und Sporidien des Stammes FB2. Jeweils 200 μ g mitochondriale Proteine wurden für die Solubilisierung eingesetzt. 30 μ l der löslichen Fraktion wurden für die Gelelektrophorese verwendet. Protokoll adaptiert von (Wittig *et al.*, 2006). Die erwarteten Größen der Komplexe sind rechts angegeben.

2.2.3 Untersuchung der Dynamik des mitochondrialen Proteinimports

Frühere Arbeiten zeigten, dass die endgültige Lokalisation mitochondrialer Proteine nicht von Rrm4 abhängt (Koepke, 2010). Dennoch sind einige der mitochondrialen Proteine differenziell exprimiert und die mitochondriale ROS-Produktion ist in *rrm4Δ*-Mutanten erhöht, was ein Indiz für Defekte in der Atmungskette ist. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte eine beeinträchtigte Proteinimport-Dynamik sein, die zu mitochondrialem Stress führen könnte. In *rrm4Δ*-Mutanten bildet sich während des filamentösen Wachstums ein mRNA-Gradient aus (Abb. 2.32), welcher dazu führen könnte, dass kernnahe und distale Mitochondrien unterschiedlich gut mit mRNA versorgt werden. Dies könnte wiederum Einfluss auf Translationsprozesse haben und somit den Proteinimport beeinflussen.

AB33

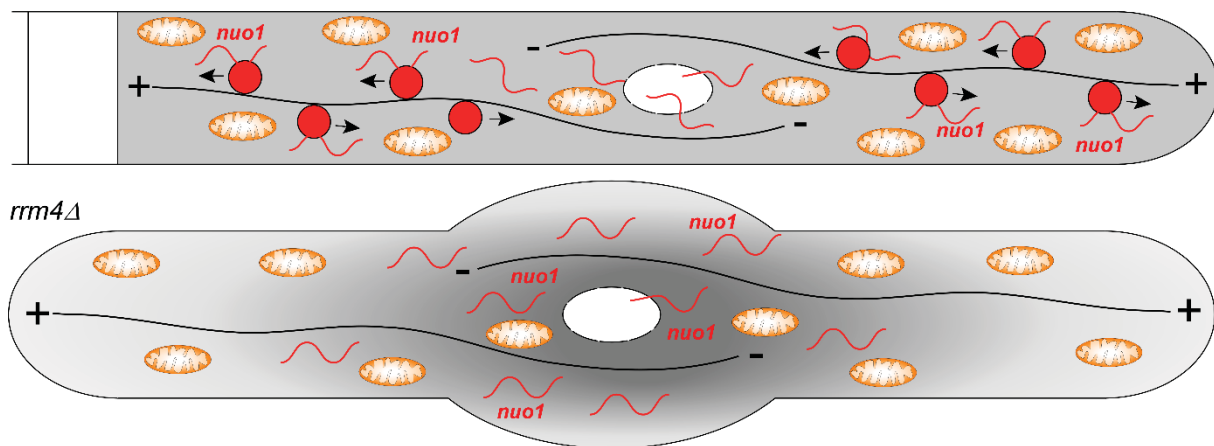


Abb. 2.32: Schematisches Modell zur mRNA-Verteilung in AB33- und *rrm4Δ*-Filamenten. In Wildtyp-Filamenten findet aktiver mRNA-Transport entlang der Mikrotubuli statt. Dadurch wird eine Gleichverteilung von mRNA im gesamten Filament sichergestellt. Die Deletion von *rrm4* führt in Filamenten zur Bildung eines mRNA-Gradienten (König *et al.*, 2009). In kernnahen Bereichen befindet sich mehr mRNA, in distalen Bereichen weniger. Dadurch könnten distale Mitochondrien unterversorgt werden, was Translationsprozesse und den Proteinimport beeinflussen könnten. Grau: mRNA-Verteilung (Gradient); rote Linien: mRNA-Moleküle; schwarze Striche: Mikrotubuli; weißes Oval: Nukleus; rote Kreise: Rrm4; orangefarbene Ovale: Mitochondrien.

Für die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der mitochondrialen Proteinimportdynamik wurden zunächst Kandidatengene identifiziert. Dazu wurden mitochondriale Ziel-mRNAs von Rrm4 mit den meisten CLIP-Tags (König *et al.*, 2009; Haag, 2013) ermittelt und jeweils diejenigen Kandidaten mit den meisten CLIP-Tags unterschiedlicher Atmungskettenkomplexe bzw. der mitochondrialen Matrix zugeordnet. Als Kandidaten der Atmungskette wurden *nuo1* (*um11731*; Komplex I) und *qcr10* (*um11097*; Komplex III) identifiziert. Zusätzlich wurde das Gen der Superoxid-Dismutase 2 (*sod2*; *um03085*) ausgewählt. Superoxid-Dismutasen spielen eine wichtige Rolle in der Vermeidung von oxidativem Stress, da sie mitochondriales Superoxid in H_2O_2 umwandeln, welches mit Hilfe des Enzyms Katalase zu Sauerstoff und

Wasser reagiert. Sod2 enthält laut Vorhersage keine MTS. Dennoch wäre es möglich, dass die 3'UTR der mRNA für die Lokalisation, lokale Translation und den co-translationalen Import ausreichend ist.

Um die mitochondriale Lokalisation der Kandidaten zu überprüfen, wurden translationale eGfp-Fusionen hergestellt. Dabei wurde darauf geachtet, dass die 3'UTR der mRNA im rekombinanten Locus erhalten bleibt (Abb. 2.33 A), da sie wichtig für den Transport und die Lokalisation der mRNA und somit für die Proteinimportdynamik sein könnte.

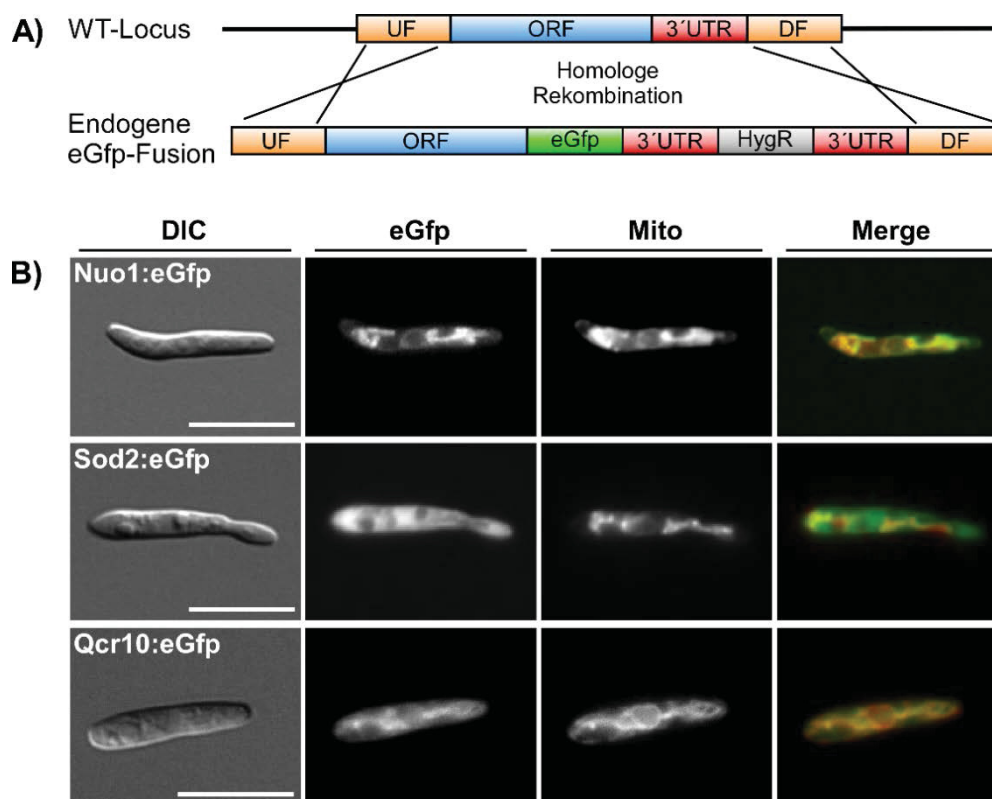


Abb. 2.33: Nuo1 und Qcr10 lokalisieren in Mitochondrien. (A) Schematische Darstellung der Generation C-terminaler, translationaler eGfp-Fusionen unter Berücksichtigung der 3'UTR im Anschluss an das Fusionskonstrukt. Die 3'UTR taucht im Fusionskonstrukt als Teil der stromabwärts gelegenen Flanke (DF) ein zweites Mal hinter der Resistenzkassette auf. (B) Fluoreszenzmikroskopische Co-Lokalisationsanalyse von mitochondrialen Kandidatenproteinen. Nuo1G und Qcr10G zeigen eine klare Co-Lokalisation mit Mito-TrackerTM (Mito), während Sod2 im Cytoplasma lokalisiert. Größenmaßstab: 10 µm.

Anschließend wurde die mitochondriale Lokalisation fluoreszenzmikroskopisch mit Hilfe des Mitochondrien-Markers Mito-TrackerTM überprüft. Dabei zeigte sich, dass Nuo1 und Qcr10 wie erwartet in Mitochondrien lokalisierten (Abb. 2.33 B). Sod2 dagegen lokalisierte gleichmäßig im Cytoplasma. Daher wurde Sod2 von weiteren Analysen ausgeschlossen. Qcr10 zeigte zwar eine klare mitochondriale Lokalisation, jedoch mit einer relativ starken cytoplasmatischen Hintergrundfluoreszenz. Daher wurde für die weitere Analyse der Proteinimportdynamik Nuo1 ausgewählt.

Um herauszufinden, ob der mitochondriale Proteinimport in *rrm4Δ*-Filamenten gestört ist, wurde die Dynamik des distalen, mitochondrialen Proteinimports von Nuo1G in sechs Stunden alten Filamenten mittels FRAP- (Fluoreszenz-Regeneration nach Photobleichung; *fluorescence recovery after photobleaching*) Analyse untersucht (Abb. 2.34).

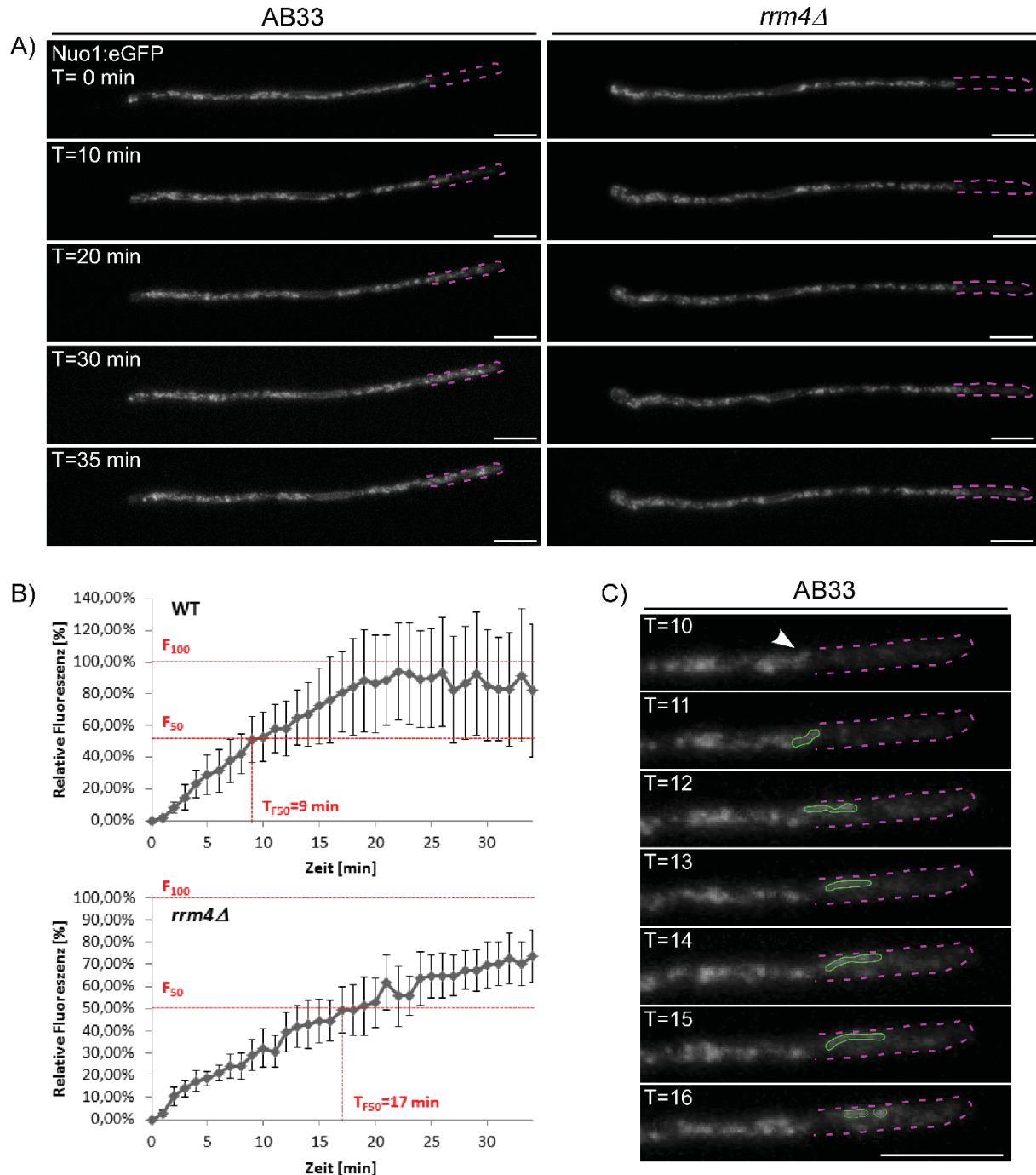


Abb. 2.34: FRAP-Analyse des Nuo1G-Proteinimports in distalen Mitochondrien. (A) Exemplarische Darstellung der Nuo1G-Fluoreszenz-Regeneration in AB33-Filamenten über einen Zeitraum von 35 Minuten. Die violette Linie markiert den gebleichten, distalen Bereich des Filaments. Größenmaßstab: 10 μm . (B) Graphische Darstellung der Fluoreszenz-Regeneration von Nuo1G in AB33- und AB33*rrm4Δ*-Filamenten. Die halbmaximale Regeneration ist in AB33-Filamenten nach 9 min., in AB33*rrm4Δ*-Filamenten nach 17 min. erreicht. Die roten Linien markieren die maximale und halbmaximale Fluoreszenz sowie die Zeit, die zum Erreichen der halbmaximalen Fluoreszenz benötigt wird ($T_{F1/2}$). Fehlerbalken: Standardabweichung aus Regenerationsmessungen von jeweils $n=3$ Zellen.

Abb. 2.34: (fortgesetzt): FRAP-Analyse des Nuo1G-Proteinimports in distalen Mitochondrien. (C) Vergrößerte Darstellung der Hyphenspitze zu verschiedenen Zeitpunkten während der Fluoreszenz-Regeneration (A). Im Zeitraum der Regeneration wandern ungebleichte Mitochondrien in den gebleichten Bereich an der Hyphenspitze ein. Die violette Linie markiert den gebleichten, distalen Bereich des Filaments. Grün: Mitochondrium. Größenmaßstab: 10 μm .

Zwischen AB33- und AB33rrm4 Δ -Filamenten war dabei ein deutlicher Unterschied in der Fluoreszenz-Regenerations-Geschwindigkeit ($T_{F1/2}$) zu erkennen. Während in AB33-Filamenten die halbmaximale Regeneration ($F_{1/2}$) bereits nach neun Minuten erreicht war, benötigte der Prozess in AB33rrm4 Δ -Filamenten 17 Minuten (Abb. 2.34 B). Dieser Unterschied ist jedoch nicht vollständig darauf zurückzuführen, dass neu synthetisierte Proteine in die distalen Mitochondrien importiert werden, da im Regenerations-Zeitraum auch ungebleichte Mitochondrien in den Messbereich einwanderten (Abb. 2.34 C). Außerdem konnten im Messbereich sowohl Mitochondrien-Teilung, als auch Fusion ungebleichter Mitochondrien beobachtet werden, was die Untersuchung der Importdynamik unter den getesteten Bedingungen unmöglich macht.

Die Analyse der Dynamik des mitochondrialen Proteinimports in Abhängigkeit von Rrm4 wird unter anderem von der Reifungszeit des verwendeten Fluorophors nach der Translation ab. eGfp benötigt für diesen Prozess etwa 30 Minuten (Sniegowski *et al.*, 2005). Diese lange Reifungszeit beeinflusst wiederum die mittlere Fluoreszenz-Regenerations-Geschwindigkeit ($T_{F1/2}$). Im vorliegenden experimentellen Ansatz konnte gezeigt werden, dass eGfp für die Analyse nicht optimal ist, da während der langen Regenerationszeit sekundäre Faktoren, wie Mitochondrien-Bewegung oder -Teilung, das Ergebnis der Messung beeinflussen.

2.2.4 Etablierung neuer, genetisch kodierter Fluoreszenzmarker für die Untersuchung dynamischer Prozesse in *U. maydis*

Die Reifungszeit ist ein limitierender Faktor für die Analyse von mRNA-Transport abhängigen Proteinimport-Prozessen. Außerdem könnte durch eine Verkürzung der Reifungszeit die Fluoreszenz-Regenerationsgeschwindigkeit erhöht, und somit ein Einwandern der Mitochondrien in den Messbereich minimiert werden. Ein weiteres Problem, das während der Untersuchung dynamischer Prozesse eine Rolle spielt, ist die Hintergrundfluoreszenz. Durch die Verwendung photokonvertierbarer Fluorophore kann zur Beobachtung dynamischer Prozesse die Ausgangsfluoreszenz durch Photokonversion in einen anderen Spektralbereich verschoben werden. Somit kann das Problem der Hintergrundfluoreszenz umgangen werden, da lediglich neu synthetisierte Proteine die gewünschten Anregungs- bzw. Emissions-Spektren aufweisen (McKinney *et al.*, 2009). Um

dynamische Prozesse besser visualisieren und untersuchen zu können, wurden in der vorliegenden Arbeit zwei neue fluoreszierende Markerproteine für die Nutzung in *U. maydis* etabliert.

Das photokonvertierbare Protein mEos2 eignet sich aufgrund seiner Eigenschaften sehr gut zur Untersuchung dynamischer Prozesse. In seinem Grundzustand hat mEos2 sein Anregungsmaximum bei 506 nm und sein Emissionsmaximum bei 519 nm. Verglichen mit eGfp weist mEos2 außerdem eine 1,4-fach gesteigerte Helligkeit auf (McKinney *et al.*, 2009). Ein weiterer Vorteil von mEos2 gegenüber vielen anderen photokonvertierbaren Proteinen ist, dass das Helligkeitsverhältnis zwischen Grün- und Rot-Zustand sehr ausgewogen ist. Im Rot-Zustand hat mEos2 sein Anregungsmaximum bei 573 nm und sein Emissionsmaximum bei 584 nm. Die Fluoreszenz im roten Spektralbereich erreicht die etwa 0,8-fache Helligkeit von eGfp. Somit ist die Helligkeit von mEos2 im roten Zustand ca. doppelt so hoch wie die von mCherry (Shaner *et al.*, 2004; <http://nic.ucsf.edu/dokuwiki/doku.php?id=fluorescent-proteins>).

Die Nukleotidsequenz von *mEos2* wurde für die Expression in *U. maydis* zunächst Di-Codon-optimiert (Anhang: Abb. 6.11; <http://dicodon-optimization.appspot.com/>) und unter der Kontrolle der P_{otef} - und P_{crg1} -Promotoren in den *ip^s*-Locus integriert. Um zu testen, ob die so exprimierte mEos2-Variante funktionell ist, wurde die Expression des Proteins fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Die Analyse ergab, dass die di-codon-optimierte Variante von mEos2 in *U. maydis* funktionell exprimiert werden kann (Abb. 2.35). Außerdem konnte mEos2 mittels N-terminaler Mitochondrien-Import Sequenz (MTS; *mitochondrial targeting signal*) erfolgreich in die Mitochondrienmatrix transloziert werden. Die Fluoreszenz-Intensität von mEos2 erreichte in *U. maydis* jedoch lediglich die 0,8-fache Intensität von eGfp (Anhang: Abb. 6.13).

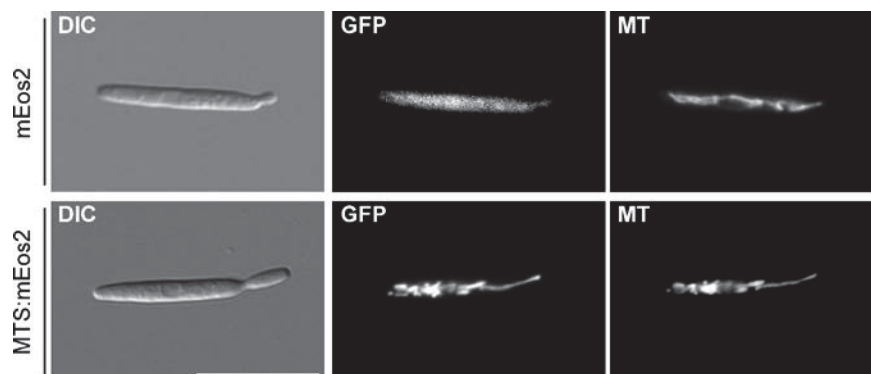


Abb. 2.35: mEos2 ist in *U. maydis* funktionell und kann mittels MTS in Mitochondrien transloziert werden. Fluoreszenzmikroskopische Co-Lokalisations-Analyse von mEos2 und Mito-Tracker™. Die mEos2 Expression wurde fünf Stunden nach Induktion des P_{crg1} -Promotors fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Freies mEos2 zeigt eine gleichmäßig verteilte, cytoplasmatische Fluoreszenz. MTS:mEos2 zeigt eine klare Co-Lokalisation mit dem Mitochondrien-Marker Mito-Tracker™ (MT). Kulturen wurden bis zu einer OD_{600} von 0,5 angezogen und in CM + 1 % Arabinose induziert. Größenmaßstab: 10 μ m.

Als nächstes wurde die Photokonvertierbarkeit von mEos2 in *U. maydis* untersucht. Dazu wurde zunächst getestet, ob das Signal einzelner Zellen mittels LASER-Impuls konvertiert werden kann. Die fluoreszenzmikroskopische Analyse der mEos2 Photokonversion ergab, dass sich mEos2 mittels LASER-Impuls (405 nm, 30 mW) aus dem Grün-Zustand in den Rot-Zustand überführen lässt (Abb. 2.36). Außerdem konnten einzelne Zellen in einem Bildausschnitt photokonvertiert werden, ohne dass andere Zellen betroffen waren.

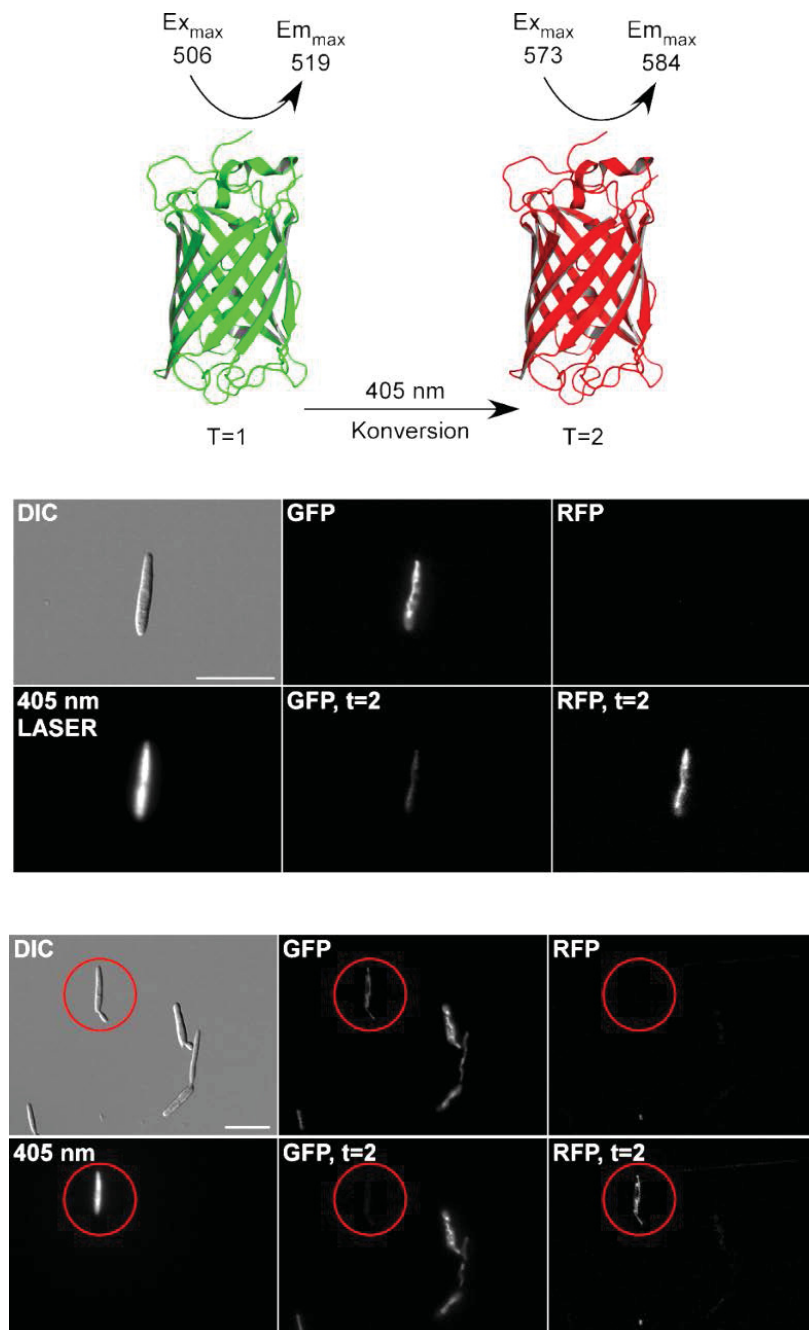


Abb. 2.36: mEos2 kann in einzelnen Zellen mittels LASER-Impuls photokonvertiert werden. Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Photokonversion von mEos2. Einzelne Zellen in einem Bildausschnitt können mittels LASER-Impuls (405 nm, 30 mW) aus dem Grün-Zustand in den Rot-Zustand überführt werden. Eine schwache Restfluoreszenz im grünen Spektralbereich bleibt nach der Photokonversion bestehen. Jeweils obere Reihe: Vor Photokonversion. Jeweils untere Reihe: Nach Photokonversion (t=2; Zeitpunkt 2). Rote Kreise markieren den Konversions-Bereich. Größenmaßstab: 10 μm .

Um dynamische Prozesse in mehreren Zellen parallel untersuchen zu können, ist es notwendig, mEos2-markierte Proteine in vielen Zellen gleichzeitig zu konvertieren. Dies ermöglicht eine schnelle Analyse von vielen Zellen und kann somit die statistische Aussagekraft von Experimenten erhöhen. Die Konversion vieler Zellen mittels LASER-Impuls stellt jedoch vor allem bei schnell ablaufenden Prozessen eine Hürde dar, da mit steigender Anzahl von Zellen die benötigte Bestrahlungszeit zunimmt. Daher wurde getestet, ob eine Photokonversion von mEos2 mittels Bestrahlung mit 405 nm Licht einer konventionellen HXP-Lampe möglich ist. Diese Art der Photokonversion würde es ermöglichen, alle Zellen eines Bildausschnittes gleichzeitig zu konvertieren.

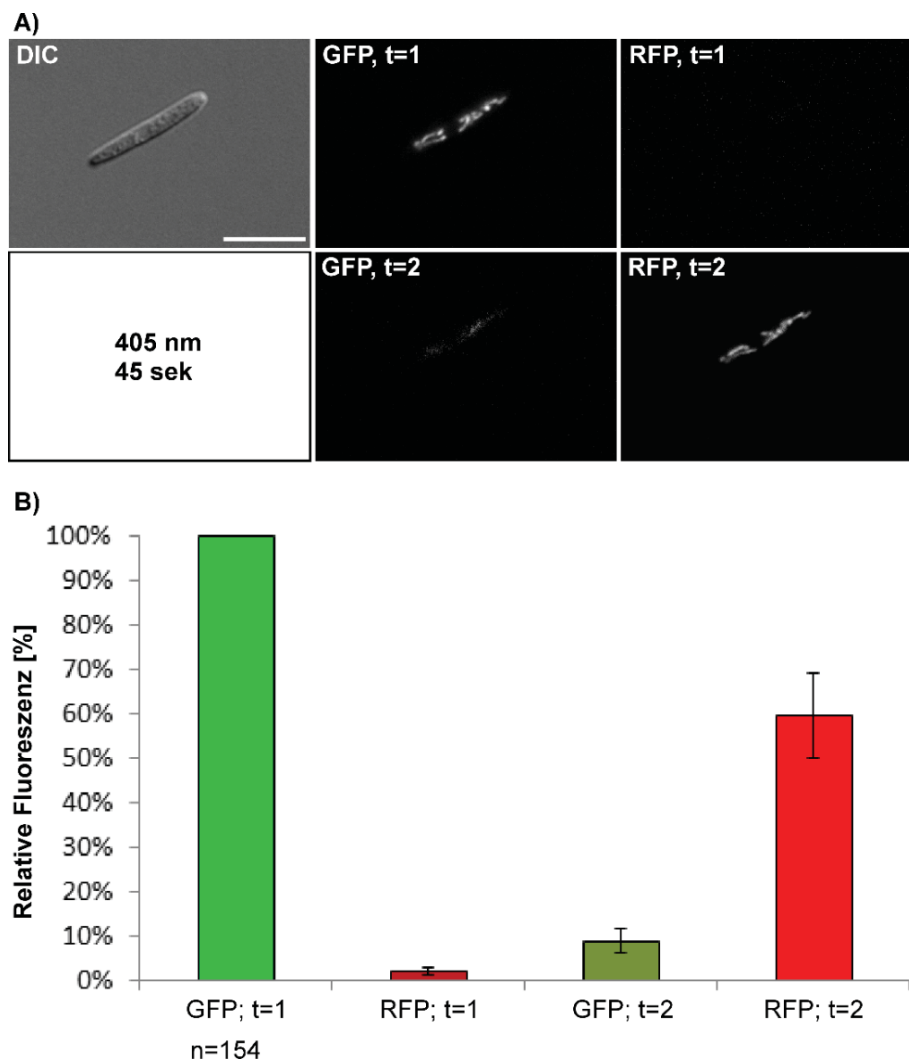


Abb. 2.37: mEos2 lässt sich durch großflächige Bestrahlung mit 405 nm photokonvertieren. (A) Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Photokonversion von mEos2 durch Bestrahlung mit Hilfe einer HXP-Lampe. Obere Reihe: Vor Konversion; Untere Reihe: Nach Konversion (t=2). Bestrahlungszeit: 45 s. **(B)** Quantifizierung der Signalintensität von mEos2 vor und nach Photokonversion. Die Gfp-Fluoreszenz lässt sich durch die Bestrahlung auf ~10 % des Ausgangswertes verringern. Die Rfp-Intensität während des Rot-Zustandes beträgt ~60 % der Ausgangsintensität. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung von n=5 Zellen aus verschiedenen Bildausschnitten.

Die Analyse zeigte, dass die Konversion von mEos2 mittels großflächiger Bestrahlung erfolgreich durchgeführt werden kann (Abb. 2.37 A). Die maximale Photokonversion war nach einer Bestrahlungszeit von 45 Sekunden erreicht (Daten nicht gezeigt). Die Reduktion des Gfp-Signals betrug $\sim 90\%$ (Abb. 2.37 B). Nach Photokonversion betrug die relative Intensität des Rfp-Signals (mEos2 im Rot-Zustand) etwa 60 % der Gfp-Ausgangsfluoreszenz, was den Literaturwerten entspricht (McKinney *et al.*, 2009).

Mit mEos2 steht daher nun ein weiterer genetisch kodierter Fluoreszenzmarker für die Untersuchung dynamischer Prozesse in *U. maydis* zur Verfügung.

Neben der Hintergrundfluoreszenz ist auch die Reifungszeit eines Fluorophors ausschlaggebend für die Untersuchung dynamischer Prozesse. Außerdem ist die Stabilität fluoreszierender Proteine stark von Temperatur, pH-Wert, Salzkonzentration sowie O₂-Verfügbarkeit abhängig (Pédelacq *et al.*, 2006; zusammengefasst in Tsien, 1998). Des Weiteren neigen einige Gfp-Varianten zur Bildung von Dimeren oder sogar Oligomeren, was zur Aggregation von Zielproteinen führen kann.

„Superfolder-Gfp“ (sfGfp) ist eine schnell faltende Gfp-Variante, die über eine hohe pH- und Salz-Toleranz verfügt (Pédelacq *et al.*, 2006). Für die Expression von sfGfp in *U. maydis*, wurde die Nukleotidsequenz zunächst di-codon-optimiert (Anang: Abb. 6.12) und unter der Kontrolle des induzierbaren P_{crg1} -Promotors in den ip^s -Locus integriert. Außerdem wurde ein Konstrukt für ein N-terminales MTS-Fusionsprotein integriert, um zu untersuchen, ob sich sfGfp in *U. maydis* funktionell in Mitochondrien translozieren lässt.

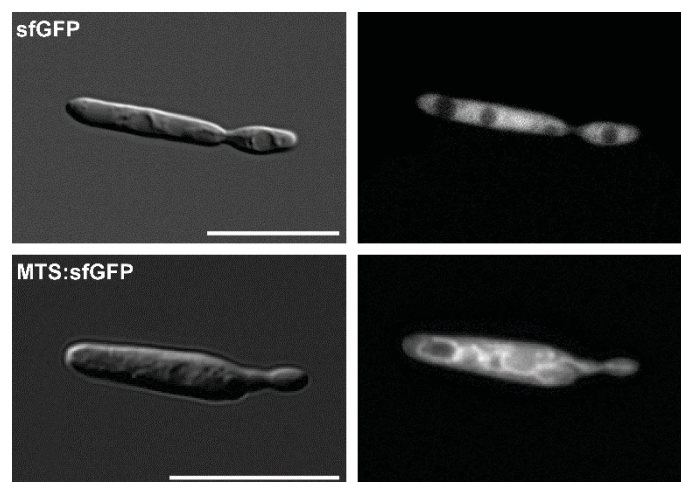


Abb. 2.38: sfGfp ist in *U. maydis* funktionell und kann mittels MTS in Mitochondrien transloziert werden. Fluoreszenzmikroskopische Analyse von sfGfp. Die Induktion der sfGfp-Expression mittels des P_{crg1} -Promotors erfolgte für fünf Stunden. Freies sfGfp zeigt eine gleichmäßig verteilte, cytoplasmatische Fluoreszenz. MTS:sfGfp zeigt eine deutliche Lokalisierung in Mitochondrien. Kulturen wurden bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 angezogen und in CM + 1 % Arabinose induziert. Die fluoreszenzmikroskopische Analyse erfolgte fünf Stunden nach Induktion. Größenmaßstab: 10 μ m.

Durch eine fluoreszenzmikroskopische Analyse der entsprechenden Stämme konnte die Funktionalität von sfGfp in *U. maydis* bestätigt werden. Auch die Translokation in Mitochondrien mittels Fusion einer N-terminalen MTS war erfolgreich (Abb. 2.38).

Zusammenfassend wurden in der vorliegenden Arbeit mit mEos2 und sfGfp zwei neue fluoreszierende Proteine für den Einsatz in *U. maydis* etabliert und optimiert.

3. Diskussion

Während des filamentösen Wachstums von *U. maydis* spielt das mRNA-bindende Protein Rrm4 eine tragende Rolle im Mikrotubuli-abhängigen Langstreckentransport von mRNPs und der Endosomen-assoziierten, lokalen Translation von Proteinen (Becht *et al.*, 2006; König *et al.*, 2009, Baumann *et al.*, 2012; Baumann *et al.*, 2014). In den letzten Jahren konnten direkte Ziel-mRNAs identifiziert und der Einfluss des Rrm4-abhängigen Transportes auf Proteomebene gezeigt werden (König *et al.*, 2009; Haag, 2013; Kopeke, 2010; Koepke *et al.*, 2011).

Eines der Proteine, deren Menge dabei am stärksten von Rrm4 beeinflusst wird, ist die Chitinase Cts1 (Koepke *et al.*, 2011). Cts1 wird in Filamenten abhängig von Rrm4 unkonventionell sekretiert (Koepke *et al.*, 2011; Stock *et al.*, 2012). Obwohl gezeigt werden konnte, dass Cts1 sowohl während des Hefe-artigen Wachstums, als auch in Filamenten exprimiert wird und in der subapikalen Zone lokalisiert, war die biologische Funktion weitestgehend unklar.

In der vorliegenden Arbeit wurde die chitinolytische Maschinerie von *U. maydis* in einer Kombination aus einer klassischen Kandidatengen-Analyse, Lokalisationsstudien, biochemischer Analyse der Enzymaktivitäten und Röntgenstruktur-gestützter Proteinstruktur-Modellierung näher charakterisiert. Damit handelt es sich um die erste umfassende Charakterisierung chitinolytischer Enzyme in einem phytopathogenen Basidiomyceten. Es konnte gezeigt werden, dass die zwei Chitinasen Cts1 und Cts2 während des saprotrophen, Hefe-artigen Wachstums aktiv sind und die physische Trennung von Mutter- und Tochter-Zelle in späten Stadien der Zellteilung gewährleisten. Dazu kommt es nach der Bildung des primären Septums zu einer Akkumulation von Cts1 in der Teilungszone, welche nach Einzug des sekundären Septums durch die Tochterzelle ein extrazelluläres Kompartiment darstellt. Durch die anschließende Lyse der Teilungszone durch Zellwandabbauende Enzyme kommt es zur Freisetzung von Cts1, was die unkonventionelle Sekretion dieser Chitinase erklären könnte. Während des filamentösen Wachstums wird die *cts2*-Expression transkriptionell herunterreguliert (Abb. 6.9; Heimel *et al.*, 2010; Lanver *et al.*, 2014), was dazu führt, dass im Filament lediglich Cts1 aktiv ist. In dieser Phase lokalisiert Cts1 in den leeren Abschnitten am basalen Ende des Filaments und hat dort höchstwahrscheinlich eine autolytische Funktion. Neben der Septierungs-abhängigen Sekretion besteht in Filamenten möglicherweise noch ein weiterer Sekretionsmechanismus für Cts1. Beide aktiven Chitinasen akzeptieren sowohl polymeres Chitin, als auch Chito-Oligomere als Substrat, wobei sich die Enzyme jedoch höchstwahrscheinlich in ihrer Substratbindung oder ihrer Schnittstellenpräferenz

unterscheiden. Diese Annahme wird durch Proteinstrukturmodelle bekräftigt, wonach Cts1 zu den Chitinasen mit einer tiefen Tunnel-artigen Bindestelle zählt, wohingegen Cts2 eine flache, offene Bindestelle besitzt. Cts3 scheint weder in Hefe-artigen Zellen, noch im Filament exprimiert zu werden. Für Cts4 konnte gezeigt werden, dass es sich um eine aktive N-Acetyl-Glukosaminidase handelt, die unter den getesteten Bedingungen spezifisch das Substrat MUG abbaut, jedoch keinen Einfluss auf das Wachstum oder die Akquisition von Chitin als Nährstoffquelle hat.

Die Analyse der Proteinstrukturen verdeutlichte die große Ähnlichkeit der chitinolytischen Maschinerie aus *U. maydis* zu der aus *S. marcescens* und führte so zur Identifizierung der putativen LPMO Cmo1 in *U. maydis*, deren Funktion jedoch noch unklar ist.

Neben der Chitinase *cts1* zählen auch mRNAs, die für mitochondriale Proteine kodieren, zu den Zielen des Rrm4-abhängigen Transportes (König *et al.*, 2009; Koepke *et al.*, 2011, Haag, 2013). Ein Verlust von Rrm4 führt zu differentieller Akkumulation mitochondrialer Proteine und zu einer erhöhten Produktion reaktiven Sauerstoffs (ROS), was auf einen Defekt in der Biogenese der Mitochondrien hindeutet (Koepke, 2010).

Als Teil dieser Arbeit wurde untersucht, ob der Rrm4-abhängige mRNA-Transport einen Einfluss auf den mitochondrialen Proteinimport und die Assemblierung der Atmungskettenkomplexe hat. In einer biochemischen Analyse der Atmungskettenkomplexe mittels nativer Gelelektrophorese konnten jedoch keine Unterschiede in der Größe oder Quantität der Atmungskettenkomplexe zwischen AB33 und *rrm4Δ*-Mutante beobachtet werden. Die Untersuchung der Proteinimportdynamik mittels FRAP-Analyse von Nuo1G wies zwar Unterschiede in der Geschwindigkeit der Fluoreszenz-Rückkehr zwischen den beiden Stämmen auf, jedoch zeigte sich, dass stochastisch Mitochondrien in den Analysebereich einwandern, was auf eine hohe, temporäre Motilität zurückzuführen ist und die FRAP-Analyse beeinflusst. Daher wurden die besser geeigneten, fluoreszierenden Marker sfGfp und mEos2 für *U. maydis* etabliert, wodurch diese nun für die Analyse dynamischer Prozesse zur Verfügung stehen.

3.1 Die chitinolytische Maschinerie von *U. maydis*

Pilzliche Chitinasen können, basierend auf der Aminosäuresequenz ihrer GH18-Domäne, allgemein in die drei Untergruppen A, B und C unterteilt werden (Abb 3.1; Seidl *et al.*, 2005). Diese Gruppen unterscheiden sich hinsichtlich der Architektur ihrer Substratbindestellen und weisen dadurch unterschiedliche, enzymatische Aktivitäten auf (Hartl *et al.*, 2012). Sie

können entweder Exo- oder Endo-Charakter haben, d.h. sie spalten Chitin entweder von einem Strangende her (Exo, meist prozessiv) oder fügen an zufälligen Positionen innerhalb des Stranges Brüche ein (Endo, meist nicht prozessiv; Gruber und Seidl-Seiboth, 2011; Seidl, 2008). Chitinasen der Gruppen A und C zählen zu den Bakterien-ähnlichen Chitinasen und besitzen oft eine tiefe, Tunnel-artige Substratbindestelle (Abb. 3.1), während Chitinasen der Gruppe B zu den Pflanzen-ähnlichen Chitinasen zählen und eine flache, offene Bindestelle besitzen (Abb. 3.1; Terwisscha van Scheltinga *et al.*, 1996; Bortone *et al.*, 2002; van Aalten *et al.*, 2000). Eine tiefe Substratbindestelle deutet meist auf Exochitinaseaktivität hin, wobei meist Dimere vom nicht-reduzierenden Ende abgespaltet werden. Chitinasen mit offener Bindestelle zählen meist zu den Endochitinasen und wirken häufig nicht bzw. weniger prozessiv.

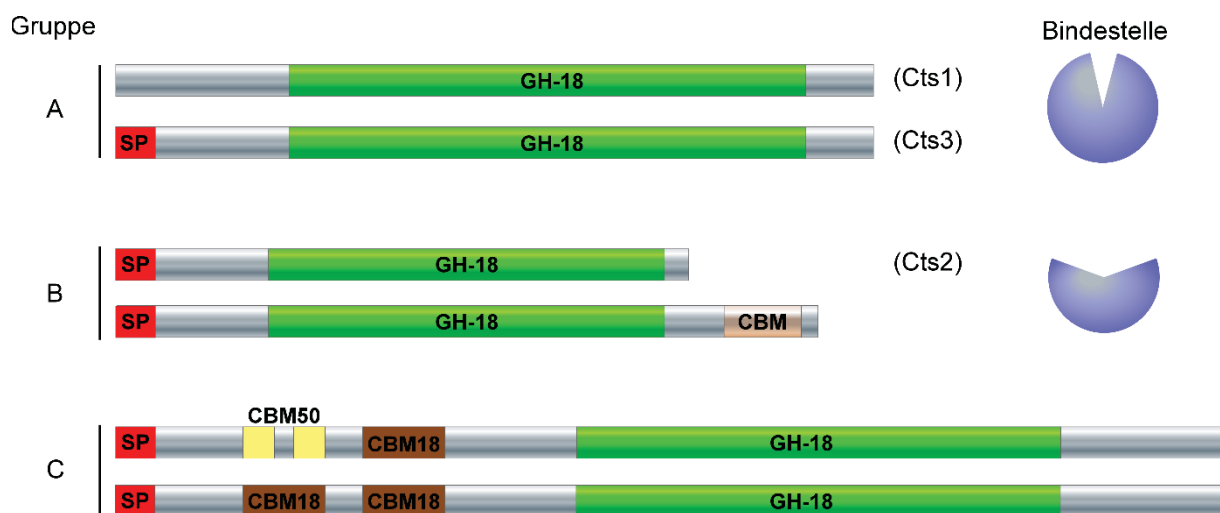


Abb. 3.1: Die Untergruppen pilzlicher Chitinasen. Pilzliche Chitinasen der Klasse V (Bakterien-ähnlich) zählen entweder zur Untergruppe A oder C. Beide besitzen eine tiefe, Tunnel-förmige Substratbindestelle (rechts oben). Vertreter der Gruppe A haben eine molekulare Masse von 40-60 kDa, haben neben der GH18-Domäne keine weiteren Domänen und können ggf. ein N-terminales Signalpeptid besitzen. Enzyme der Gruppe C sind mit einem Molekulargewicht von 120-200 kDa deutlich größer und besitzen häufig weitere Kohlenhydrat-Bindemotive (CBMs) der Familie 18 und 50. Klasse III Chitinasen (Pflanzen-ähnlich, Gruppe B) weisen eine flache, offene Bindestelle auf und sind mit einer molekularen Masse von 30-50 kDa in der Regel etwas kleiner. Außerdem können sie neben der GH18-Domäne weitere, C-terminale CBMs besitzen. Cts1 und Cts3 zählen auf Grund ihrer Größe und Substratbindestellen-Architektur zu Gruppe A (Bakterien-ähnliche Chitinasen). Cts2 zählt zu Gruppe B (Pflanzen-ähnlichen Chitinasen).

Das Genom von *U. maydis* kodiert für drei Chitinasen der GH18-Familie (Koepeke *et al.*, 2011). Alle enthalten hochkonservierte Aminosäuren, welche für die Architektur der Substratbindestelle essentiell sind und besitzen das hochkonservierte Konsensus-Motiv DXXDXDXE, was darauf hindeutet, dass sie potenziell aktiv sind (Hartl *et al.*, 2012; Hamid *et al.*, 2013). Die Analyse der Aminosäuresequenz und der putativen Struktur der Substratbindestelle lässt darauf schließen, dass Cts1 und Cts3 zu den Bakterien-ähnlichen Chitinasen der Klasse V und Untergruppe A zählen (Abb. 3.1). Cts2 zählt demnach zur Klasse III und Untergruppe B, den

Pflanzen-ähnlichen Chitinasen, welche eine ähnliche Substratbindestellen-Architektur wie die pflanzliche Chitinase Hevamin aufweisen (Terwisscha van Scheltinga *et al.*, 1996; Terwisscha van Scheltinga *et al.*, 1994).

Im Vergleich zu anderen filamentös wachsenden Pilzen besitzt *U. maydis* ein kleines Repertoire chitinolytischer Enzyme (Tzelepis *et al.*, 2012; Karlsson und Stenlid, 2008; Amselem *et al.*, 2011; Koepke *et al.*, 2011). Die Zusammensetzung der chitinolytischen Maschinerie ähnelt zudem stark der des Gram-negativen Bakteriums *S. marcescens* (Vaaje-Kolstad *et al.*, 2013). Zusätzlich zu den beschriebenen chitinolytischen Enzymen wurde in *S. marcescens* kürzlich die LPMO Cbp21 als chitinolytisches Enzym entdeckt und charakterisiert (Vaaje-Kolstad *et al.*, 2010). Bei Cbp21 handelt es sich um eine Kupfer-bindende Chitin-Monooxygenase, welche die Wirkung der Chitinasen ChiA und ChiB verstärkt. Durch reziproke BLAST-Analyse konnte in *U. maydis* das Cbp21-Homolog *um05439* identifiziert werden. Auf Grund der hohen Sequenzähnlichkeit (69%) und der strukturellen Analogie der aktiven Domäne kann geschlussfolgert werden, dass es sich auch bei *um05439* um eine Chitin-Monooxygenase handelt. Daher wurde für das Protein der Name Cmo1 (Chitin-Monooxygenase 1) vergeben. *cmo1* ist laut Transkriptom-Daten sowohl in Sporidien, als auch in Filamenten lediglich sehr schwach exprimiert (Heimel *et al.*, 2010; Lanver *et al.*, 2014) und hatte unter den untersuchten Bedingungen keinen Einfluss auf die Spaltung von Chitin. Die C-terminale Domäne, welche durch einen ungewöhnlich langen Abschnitt aus acht Serinen mit der N-terminalen Domäne verbunden ist, ist in *S. marcescens* nicht vorhanden. Auch im Gram-positiven, filamentösen Actinobakterium *Streptomyces spec.* fehlt die C-terminale Domäne. Ein Sequenzvergleich homologer Proteine aus den nahe verwandten Spezies *P. hubeiensis*, *M. pennsylvanicum*, *S. reilianum* und *U. hordei* zeigte, dass der C-terminale Bereich des Proteins konserviert ist und aus einem variablen sowie einem konservierten Bereich besteht. Die Konservierung des Eukaryoten-spezifischen C-Terminus lässt darauf schließen, dass der Bereich eine bestimmte Funktion übernimmt. Eine BLAST-Suche konnte jedoch keine homologen Proteine identifizieren, welche eine signifikante Sequenzhomologie zu diesem Bereich aufweisen. Daher kann kein Rückschluss auf eine putative Funktion der C-terminalen Domäne getroffen werden.

Ein weiteres auffälliges Merkmal von Cmo1 ist das Fehlen eines N-terminalen Sekretionssignals. Die putative Funktion von Cmo1, die Spaltung von Chitin, lässt jedoch auf eine extrazelluläre Funktion des Enzyms schließen, welche in Bakterien bereits experimentell bestätigt wurde (Vaaje-Kolstad *et al.*, 2005; Hamilton *et al.*, 2014). Für die Chitinase Cts1 aus *U. maydis*, welche auch kein Signalpeptid besitzt, konnte die Sekretion bereits experimentell

bestätigt werden (Koepke *et al.*, 2011; Stock *et al.*, 2012). Mit Hilfe der unkonventionellen Sekretion kann die Glykosylierung von Proteinen vermieden werden. Die Fusion von Zielproteinen an Cts1 ermöglicht somit die Sekretion großer, nicht glykosylierter Proteine in *U. maydis* (Stock *et al.*, 2012; Sarkari *et al.*, 2014). Durch die Identifikation von Cmo1 steht nun möglicherweise ein weiteres Kandidatenprotein für die unkonventionelle Sekretion von Zielproteinen zur Verfügung. Die geringe Größe des Proteins könnte die Sekretionsleistung im Vergleich zu Cts1-Fusionsproteinen verbessern. Außerdem stellt die starke Bindung von Cts1 an die Zellwand eine Schwachstelle in der Cts1-abhängigen Sekretion dar, da eine große Menge des Zielproteins nicht in den Kulturüberstand sekretiert wird, sondern mit der Zellwand assoziiert bleibt (pers. Mitteilung, K. Schipper). Cbp21 weist besonders in schwach azidem Milieu ($< \text{pH } 5,5$) eine deutlich schwächere Chitinbindung auf als z.B. die Chitinase ChiA aus *S. marcescens*, welche hohe strukturelle Analogie zu Cts1 aus *U. maydis* hat (Suzuki *et al.*, 1998). Da dieses Milieu in spät exponentiellen *U. maydis* Kulturen vorliegt, könnte die Sekretion in den Kulturüberstand zusätzlich verbessert werden, wodurch die anschließende Aufreinigung des Zielproteins erleichtert würde.

Neben den drei Chitinasegenen kodiert das Genom von *U. maydis* für ein weiteres chitinolytisches Enzym, einer GH20-N-Acetylglukosaminidase (Cts4) mit hoher Ähnlichkeit zur Hexosaminidase Hex1 des Maiszünslers *Ostrinia furnacalis* und der menschlichen Hexosaminidase HexB (Mark *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2011). Die Expression und Aktivität von Cts4 konnte mittels des Hexosaminidase-spezifischen Substrats MUG gezeigt werden. Außerdem konnte durch die Analyse nachgewiesen werden, dass *U. maydis* keine weitere aktive N-Acetylglukosaminidase exprimiert. Oft haben N-Acetylglukosaminidasen ein breites Substratspektrum und akzeptieren sowohl $(\text{GlcNAc})_2$ als auch Chito-Oligomere als Substrat von dem sie sukzessive GlcNAc-Monomere abspalten (Reyes *et al.*, 1989; Molloy *et al.*, 1994). Eine solche unspezifische Aktivität konnte für Cts4 weder mit den fluoreszierenden Substraten MUC₂ und MUC₃, noch mit den natürlichen Chito-Oligomeren $(\text{GlcNAc})_4$ und $(\text{GlcNAc})_6$ beobachtet werden. Cts4 spaltet demnach hauptsächlich Dimere, was auf eine physiologische Rolle in der Re-Akquisition von N-Acetylglukosamin zu Ernährungszwecken hindeutet. Eine solche Funktion von Cts4 konnte jedoch in Wachstumstests der jeweiligen Mutanten auf Chitin-haltigen Medien nicht beobachtet werden. In *Trichoderma atroviride* wurde eine Rolle der N-Acetylglukosaminidase Nag1 in der Regulation der Chitinaseaktivität in Anwesenheit von Chitin beschrieben (Brunner *et al.*, 2003; López-Mondéjar *et al.*, 2009). In *nag1Δ*-Mutanten konnte nach Inkubation mit kolloidalem Chitin keine Expression des Chitinasegens *ech42* mehr nachgewiesen werden. Auch die Gesamt-Chitinaseaktivität war

drastisch reduziert, was darauf hindeutet, dass Nag1 eine regulatorische Funktion während der Erkennung und Degradierung von Chitin hat. Eine solche Aktivität konnte jedoch in *U. maydis* *cts4Δ*-Mutanten ausgeschlossen werden, da in Deletionsstämmen weder die Aktivität gegenüber Glykolchitin, noch gegenüber den fluorogenen Substraten MUC₂ und MUC₃ verändert war. Cts4 wird sowohl in Sporidien als auch in Filamenten von *U. maydis* exprimiert (Abb. 6.9; Heimel *et al.*, 2010; Lanver *et al.*, 2014) was eine generelle Funktion von Cts4 im autolytischen Chitin-Metabolismus vermuten lässt. Die genaue biologische Rolle von Cts4 konnte in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht geklärt werden.

3.1.1 Die Rolle der Chitinasen Cts1 und Cts2 während der Zellteilung von *U. maydis*

Die Anzahl kodierter Chitinasegene variiert in pilzlichen Modellsystemen sehr stark, weshalb eine funktionelle Charakterisierung auf Grund genetischer Redundanz oft erschwert wird (Yamazaki *et al.*, 2007; Alcazar-Fuoli *et al.*, 2011; Jaques *et al.*, 2003). *U. maydis* eignet sich durch seine kleine GH18-Genfamilie daher gut, um die biologische Funktion einzelner Chitinasen zu studieren. In Vorarbeiten wurde die Chitinase Cts1 bereits charakterisiert und es konnte gezeigt werden, dass sie Rrm4-abhängig, unkonventionell sekretiert wird (Koepeke *et al.*, 2011; Stock *et al.*, 2012). Jedoch konnte ihr keine eindeutige biologische Funktion zugeordnet werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde die chitinolytische Maschinerie von *U. maydis* in einem klassischen Kandidatengen-Ansatz studiert. Dazu wurden Deletionsmutanten aller GH18-Gene und des GH20-N-Acetyl-Glukosaminidasegens *cts4* erstellt und in verschiedenen Stadien des Zellzyklus phänotypisch charakterisiert.

Während Einzeldelationen keinen Einfluss auf das saprotrophe, Hefe-artige Wachstum von *U. maydis* hatten, wies die *cts1Δcts2Δ*-Doppelmutante einen Zellteilungsdefekt auf. Daher kann geschlussfolgert werden, dass sowohl Cts1 als auch Cts2 Chitinreste in der Teilungszone degradieren. In Abwesenheit beider Enzyme bleibt die Integrität der Zellwand in der Teilungszone nach vollständiger Differenzierung der Tochterzelle erhalten, was dazu führt, dass keine physikalische Trennung der Zellen erfolgt. Dadurch entstehen die typischen Zellaggregate, welche in Flüssigmedium flokkulieren und schnell sedimentieren. Es genügen jedoch sowohl Cts1 als auch Cts2, um die vollständige Separation der Zellen zu gewährleisten.

Eine solche Funktion in der Zellteilung während des saprotrophen Wachstums konnte bisher lediglich in den Ascomyceten *S. cerevisiae*, *K. lactis* und *C. albicans* beobachtet werden (Kuranda und Robbins, 1991; Colussi *et al.*, 2005; Dünkler *et al.*, 2005). In allen Fällen reicht

die Deletion der Pflanzen-ähnlichen Chitinase *CTS1* bzw. deren Homolog *CaCHS3* aus, um einen Defekt während der Zellteilung hervorzurufen. Der Cytokinesedefekt ist eine direkte Konsequenz des gestörten Zellwandabbaus im Bereich der Septen und wird in *S. cerevisiae* und *S. pombe* auch durch die Deletion der Endo- β -1-3-Glukanase *ENG1* hervorgerufen (Baladron *et al.*, 2002; Martín-Cuadrado *et al.*, 2003; Martín-Cuadrado *et al.*, 2005; Alonso-Nunez, 2005). In *S. pombe* führt außerdem die Deletion des α -1-3-Glukanasegens *agn1* zu einem Zellseparationsdefekt (García *et al.*, 2005; Dekker *et al.*, 2004). Ein Grund hierfür könnte sein, dass das Primärseptum in *S. pombe* hauptsächlich aus Glukanen besteht, während in *S. cerevisiae* Chitin eine wichtige Rolle im Aufbau des Primärseptums spielt (Liu *et al.*, 1999; Humbel *et al.*, 2001; Cabib *et al.*, 2001; Roh *et al.*, 2002). Über die Rolle weiterer zellwandabbauender Enzyme in *U. maydis* ist nichts bekannt. Jedoch kodiert das Genom von *U. maydis* für 16 putative Glukanasegene (<http://pedant.helmholtz-muenchen.de>), sodass eine Beteiligung dieser Enzymklasse an der Cytokinese wahrscheinlich ist.

Cytokinesedefekte wurden in *U. maydis* bereits häufiger in Verbindung mit einer defekten Septenbildung beobachtet. So konnte gezeigt werden, dass der Verlust des Cdc42-spezifischen GTP-Austauschfaktors (guanine exchange factor) Don1 zu einer defekten Sekundärsepten-bildung führt und somit einen Cytokinesedefekt hervorruft (Weinzierl *et al.*, 2002; Mahlert *et al.*, 2006). Don1 bindet während der Zellteilung mit Hilfe einer FYVE-Domäne an Phosphatidylinositol-3-Phosphat (PtdIns-3-P)-reiche Vesikel und wird nach der Bildung des primären Septums von der Tochterzelle in die Teilungszone transportiert (Schink und Bölker, 2009). Dort aktiviert es die Rho-GTPase Cdc42, wodurch die Bildung des Sekundärseptums initiiert wird (Abb. 3.3).

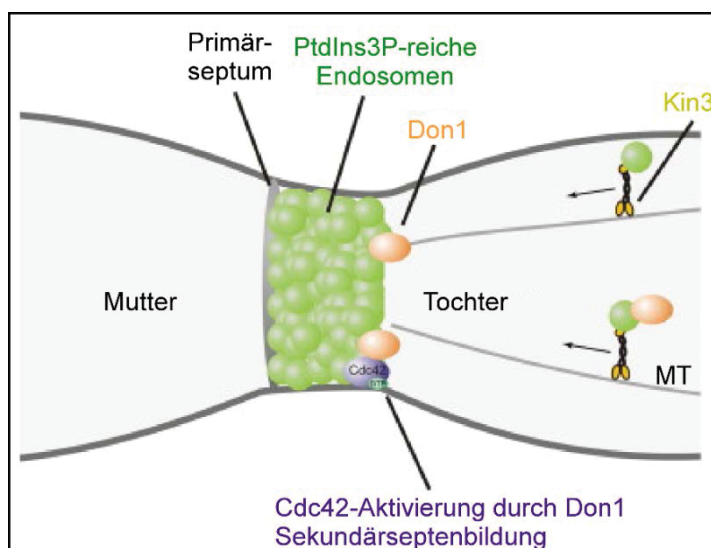


Abb. 3.3: Initiierung der Sekundärseptenbildung in *U. maydis*. Don1 bindet mit seiner FYVE-Domäne an PtdIns3P-reiche Endosomen mit denen es zur Teilungszone transportiert wird. Dort kommt es zur Akkumulation von Endosomen und Don1, wodurch die Rho-GTPase Cdc42 aktiviert und die Sekundärseptenbildung initiiert wird. Abbildung modifiziert nach (Nezis *et al.*, 2010).

Eine ähnliche Funktion wurde auch für die Ste20-ähnliche Kinase Don3 beschrieben (Böhmer *et al.*, 2008). Beide regulatorischen Wege werden benötigt, um einen kontraktilen Actomyosinring zu bilden, der für die Sekundärseptenbildung essentiell ist (Sandrock *et al.*, 2006; Böhmer *et al.*, 2008; Nezis *et al.*, 2010). Der Einfluss von Chitinasen in der Septenbildung wurde in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe von Calcofluor-White Färbungen fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Die Analyse zeigte jedoch, dass keines der untersuchten chitinolytischen Enzyme die Primär- oder Sekundärseptenbildung beeinflusst. Alle Mutanten waren in der Lage, während später Stadien der Zellteilung eine vollständige Trennung des Cytoplasmas zu etablieren. Dennoch konnte die physische Separation von Mutter- und Tochter-Zelle in *cts1Δcts2Δ*-Doppelmutanten nicht abgeschlossen werden, was darauf schließen lässt, dass beide Chitinasen an der Degradation von Chitinresten in der Teilungszone nach Einzug beider Septen beteiligt sind.

Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde die Lokalisation der Chitinasen während späten Stadien der Zellteilung näher untersucht. Die Co-Lokalisationsanalyse mit dem Septenmarker Calcofluor-White (Gull und Trinci, 1974) und dem Membranmarker Fm4-64 (Fischer-Parton *et al.*, 2000) zeigte, dass Cts1G in einem extrazellulären Kompartiment zwischen Mutter- und Tochter-Zelle lokalisiert. Durch Zugabe von heterolog exprimiertem Cts1 zur Flüssigkultur konnte der Cytokinesedefekt der *cts1Δcts2Δ*-Doppelmutante komplementiert werden, was die Annahme bekräftigte, dass Cts1 extrazellulär wirkt. Um zu überprüfen, ob Cts1 tatsächlich an der Zellwand bindet, könnte man eine fluoreszenzmarkierte Variante von Cts1 zur Kultur geben und die Bindung an die Zellwand fluoreszenzmikroskopisch untersuchen. Die Lokalisation von Cts2 konnte in dieser Arbeit auf Grund der Instabilität des Cts2G-Fusionsproteins nicht näher untersucht werden. Da jedoch gezeigt werden konnte, dass die beiden aktiven Chitinasen Cts1 und Cts2 während der Cytokinese redundant wirken, kann darauf geschlossen werden, dass beide Chitinasen in der Teilungszone lokalisieren. Der Grund für die Instabilität von Cts2G ist noch unklar. Jedoch konnte durch die Deletion von *cts1* im *cts2::egfp*-Stammhintergrund gezeigt werden, dass Cts2 durch die Abspaltung von Gfp nicht inaktiviert wird, da in diesem Stamm kein Cytokinesedefekt auftrat. Cts2 enthält ein Signalpeptid für die konventionelle Sekretion mittels ER und dem Golgi-Apparat. Möglicherweise kommt es während des Transports zu proteolytischer Prozessierung durch die Kex2-Protease, wie sie z.B. auch bei Killer-Toxinen beobachtet werden kann (Tao *et al.*, 1990). Proteolytische Spaltung konnte auch in pflanzlichen Chitinasen gezeigt werden. So wird z.B. die Chitinase PvChi4 aus der Gartenbohne (*Phaseolus vulgaris*) spezifisch während kompatibler Interaktion mit dem Ascomyceten *Fusarium solanii* proteolytisch prozessiert

(Lange *et al.*, 1996; Giri *et al.*, 1998). Durch die proteolytische Prozessierung kann z.B. die Substratbindespezifität von Chitinasen beeinflusst werden (Blaak und Schrempf, 1995).

Durch die Untersuchung der Cts1 Lokalisation während verschiedener Stadien der Cytokinese, konnte gezeigt werden, dass Cts1 nach der Bildung des primären Septums von der Tochterzelle zur Teilungszone rekrutiert wird. In früheren Arbeiten wurde gezeigt, dass Cts1 unkonventionell sekretiert wird (Kopeke *et al.*, 2011; Stock *et al.*, 2012). Die extrazelluläre Chitinaseaktivität hängt dabei jedoch lediglich in Filamenten vom Rrm4-vermittelten mRNA-Transport ab (Kopeke *et al.*, 2011). Dies deutet darauf hin, dass in Sporidien und Filamenten zwei alternative Sekretionsmechanismen existieren. Die beobachtete Translokation von der Tochterzelle zur Teilungszone ähnelt dem Mechanismus des Don1-Transportes während der Initiation der Sekundärseptenbildung (Abb. 3.3). Don1 wird dabei gekoppelt an Endosomen zur Teilungszone transportiert, wo es in einer Endosomen-reichen Region akkumuliert (Weinzierl *et al.*, 2002; Mahlert *et al.*, 2006; Schink und Bölker, 2009). Auch der Rrm4-abhängige mRNA-Transport in *U. maydis* Filamenten findet gekoppelt an Endosomen statt (Baumann *et al.*, 2002; Baumann *et al.*, 2014). Bisher sind die molekularen Mechanismen, die der zeitlich koordinierten Cts1 Translokation während der Cytokinese zu Grunde liegen, jedoch noch unklar. Es ist jedoch denkbar, dass die oben beschriebenen Transportwege auch für die Lokalisation der Chitinase Cts1 genutzt werden. Dabei könnten der Transport und die Sekretion von Cts1 in Sporidien wegen der geringen Größe der Zellen autonom, d.h. unabhängig von Rrm4, ablaufen. In Filamenten könnte die Sekretion von Cts1 entweder direkt von Rrm4-assoziierten Transportprozessen abhängen oder alternativ indirekt durch Rrm4-abhängige Faktoren beeinflusst werden. Interessant ist, dass die Lokalisation von Cts1 in Sporidien lediglich durch die Tochterzelle koordiniert wird. Dies spricht für eine Zellzyklus-abhängige Koordination und für Tochterzell-spezifische, regulatorische Mechanismen. Eine derartige Regulation ist in *S. cerevisiae* im Zusammenhang mit der Chitinase Cts1p bereits beobachtet worden (Colmann-Lerner *et al.*, 2001). ScCts1p wird während später Stadien der Cytokinese Tochterzell-spezifisch exprimiert. In *S. cerevisiae* wird die Tochterzell-spezifische Expression durch das sog. RAM-Netzwerk (*Regulation of Ace2p activity and polarized morphogenesis*) reguliert (Nelson *et al.*, 2003; Saputo *et al.*, 2012; Bogomolnaya *et al.*, 2006). Dabei steuert der Mob2p-Cbk1p Kinase Komplex die Aktivierung und Akkumulation des Transkriptionsfaktors Ace2p im Nukleus der Tochterzelle (Colman-Lerner *et al.*, 2001; Nelson *et al.*, 2003) während der späten M-Phase des Zellzyklus'. Ace2p wiederum aktiviert die Expression von *CTS1*, worauf die Chitinase Cts1p auf der Tochterseite der Teilungszone

lokalisiert (Kuranda und Robbins, 1991; Colman-Lerner *et al.*, 2001). Auch die Endo-Glukanase Eng1p wird Ace2p-abhängig in der Tochterzelle exprimiert und weist das gleiche Lokalisationsmuster wie Cts1p auf (Baladrón *et al.*, 2002). Das *U. maydis* Genom kodiert für mindestens zwei Serin/Threonin-Kinasen mit hoher Homologie zu Cbk1p, über deren Einfluss auf die Zellzyklus-abhängige, Tochterzell-spezifische Genexpression jedoch nichts bekannt ist. Es wäre jedoch denkbar, dass ein zum RAM-Netzwerk analoger Mechanismus auch in Brandpilzen existiert.

Obwohl die Funktion von Chitinasen während der Zellteilung in dieser Arbeit eindeutig nachgewiesen werden konnte, bleibt die physiologische Rolle weiterhin unklar. Unter Laborbedingungen hatte der Defekt keinen Einfluss auf die Teilungsrate exponentiell wachsender Flüssigkulturen. Unter natürlichen Bedingungen könnte die Trennung von Sporidien jedoch einen evolutionären Vorteil erbringen. Obwohl Teliosporen die Hauptverbreitungsform von *U. maydis* darstellen, können auch die haploiden Sporidien durch Umwelteinflüsse wie Regen oder Wind verbreitet werden (Banuett, 1995). Ein weiteres, bei biotrophen Pilzen seltenes Merkmal von *U. maydis* ist, dass sich Sporidien saprotroph ernähren und sich in diesem Stadium durch mitotische Teilung und Knospung vermehren können. Die physische Separation der Sporidien könnte zur Verbreitung beitragen und somit die Wahrscheinlichkeit erhöhen, auf geeignete Nährstoffbedingungen oder einen kompatiblen Kreuzungspartner zu treffen.

3.1.2 Lediglich Cts1 ist während des filamentösen Wachstums aktiv

Die Etablierung von unipolarem, filamentösem Wachstum setzt massive Remodellierung der Zellwand am apikalen Pol voraus (Bowman und Free, 2006). Der Chitingehalt der Zellwand von *U. maydis* beträgt ca. 14-16 %, was vermuten lässt, dass neben Chitin-Synthasen auch Chitinasen bei der Remodellierung eine Rolle spielen (Lanver *et al.*, 2014; Ruiz-Herrera *et al.*, 1996). Für die Chitin-Synthasen Chs5, Chs6, Chs7 und Mcs1 konnte bereits gezeigt werden, dass sie im Filament an der Hyphenspitze und an Septen am basalen Pol lokalisieren (Weber *et al.*, 2006). Auch für die Chitinase Cts1 wurde eine subapikale Lokalisation in Filamenten beschrieben, was auf eine Funktion während des polaren Wachstums schließen lässt (Koepke *et al.*, 2011). Die *cts1Δ*-Einzeldeletionsmutante zeigte jedoch keinen Defekt in der Etablierung unipolar wachsender Filamente.

In dieser Arbeit wurde die Rolle aller Chitinasen während des filamentösen Wachstums von *U. maydis* untersucht. Die Analyse der Kolonie- und Zellmorphologie aller Chitinase-Mutanten zeigte jedoch keinen Unterschied zum Ausgangsstamm. Dies verdeutlichte, dass

unipolares Wachstum auch in Abwesenheit chitinolytischer Enzyme etabliert und aufrechterhalten werden kann. Vor allem filamentös wachsende Pilze sind auf die Funktion von Chitinasen für ihr Wachstum angewiesen. In *Neurospora crassa* lokalisiert die Chitinase Chit-1 in der Zellwand vegetativer Hyphen und wird für ein effizientes Hyphenwachstum benötigt (Maddi *et al.*, 2009; Tzelepis *et al.*, 2012). Auch die Chitinase ChiA aus *A. nidulans* hat einen Einfluss auf das Koloniewachstum (Takaya *et al.*, 1998). Sedimentationsexperimente in Flüssigmedium zeigten, dass lediglich Cts1 an der bereits zuvor beschriebenen Aggregation von Filamenten in *U. maydis* beteiligt ist. Durch die Analyse der Chitinaseaktivitäten wurde des Weiteren beobachtet, dass während der filamentösen Phase lediglich Cts1 aktiv ist, was die Abhängigkeit der Aggregation von lediglich dieser Chitinase erklärt. Co-Lokalisationsstudien zeigten außerdem, dass Cts1 neben der Lokalisation im subapikalen Bereich auch punktförmig im ersten leeren Abschnitt und an Septen (vor allem im zweiten leeren Abschnitt) lokalisiert. In *A. nidulans* und *A. fumigatus* lokalisieren die Chitinasen ChiB bzw. ChiB1 an der Hyphenspitze, an Verzweigungsstellen und an den Septen, wo sie vor allem während autolytischen Prozessen eine Rolle spielen (Yamazaki *et al.*, 2008; Jaques *et al.*, 2003). Cts1 scheint während des filamentösen Wachstums von *U. maydis* eine ähnliche Rolle zu spielen. Durch die Sekretion in die leeren Abschnitte wird höchstwahrscheinlich überflüssiges Chitin abgebaut, was offensichtlich einen Einfluss auf das Aggregationsverhalten der leeren Abschnitte hat. Die biologische Rolle des Zellwandabbaus in den leeren Abschnitten der Filamente bleibt jedoch weiterhin unklar. Unter natürlichen Bedingungen wird das filamentöse Wachstum nach Fusion zweier, kompatibler Sporidien auf der Oberfläche der Wirtspflanze initiiert (Wösten *et al.*, 1996; Christensen, 1963; Snetselaar und Mims, 1992). Unter diesen Bedingungen könnten der Abbau und die Wiederverwertung des in Chitin enthaltenen Kohlen- und Stickstoffs einen Vorteil im vegetativen Wachstum erbringen. In stationären, axenischen Kulturen von *Penicillium chrysogenum* und *A. nidulans* konnte gezeigt werden, dass sowohl Chitinasen, als auch N-Acetylglukosaminidasen während autolytischen Prozessen eine Rolle spielen (Reyes *et al.*, 1989; Díez *et al.*, 2005; Sámi *et al.*, 2001; Yamazaki *et al.*, 2007; Shin *et al.*, 2009; McNeil *et al.*, 1998). Außerdem tragen sie im Mycelium durch die Degradation leerer Abschnitte zur Fragmentierung der Hyphen bei (White *et al.*, 2002; Sándor *et al.*, 1998). Eine derartige, autolytische Degradation von Zellwänden in leeren Abschnitten des Filaments und die Wiederverwertung der dadurch entstehenden Monosaccharide, könnte auch in *U. maydis* während der Besiedelung der Wirtspflanze unter natürlichen Bedingungen eine Rolle spielen. Der Zellwandabbau an Septen während des Längenwachstums auf der Pflanzenoberfläche könnte, durch Trennung des aktiv

wachsenden Filaments von den leeren Abschnitten, auch die Auswirkung von Umwelteinflüssen wie Wind und Regen auf die Besiedlung verringern.

Interessanterweise ist in Filamenten lediglich Cts1 aktiv, wohingegen die *cts2*-Expression im Filament herunter reguliert wird. Dies konnte in dieser Arbeit durch eine Analyse der Chitinase-Genexpression mittels semi-quantitative RT-PCR und einen Vergleich mit publizierten Transkriptom-Daten bestätigt werden (Abb. 6.9; Heimel *et al.*, 2010; Lanver *et al.*, 2014), wonach bei Induktion des b-Heterodimers bzw. der Appressorienbildung durch hydrophobe Oberflächen die *cts2*-Expression transkriptionell herunter reguliert wird. Es ist jedoch noch unklar, wie die transkriptionelle Regulation der Chitinasen in *U. maydis* erfolgt. Einige Chitinasegene, wie z.B. *ech42* und *chi33* aus *T. atroviride* und *T. harzianum* werden durch Chitin induziert und durch Kohlenstoff Katabolit-Repression sowie verschiedene Stickstoffquellen reguliert (Mach *et al.*, 1999; Seidl *et al.*, 2005; Carsolio *et al.*, 1994; St. Leger *et al.*, 1986; de las Mercedes *et al.*, 2001). Auch das Monomer N-Acetylglukosamin kann, abhängig von der N-Acetylglukosaminidase Nag1, zur Induktion von Chitinasen führen (Brunner *et al.*, 2003; López-Mondéjar *et al.*, 2009). Im Mais-pathogenen Ascomyceten *Cochliobolus carbonum* unterliegen viele zellwandabbauende Enzyme ebenfalls einer Glukose-Repression, welche durch das Gen *snf1* gesteuert wird (Tonukari *et al.*, 2000). Die Deletion des *snf1*-Gens führt in Abwesenheit von Glukose zum Verlust der Induktion wichtiger Zellwand-abbauender Enzyme, was zu vermindertem Wachstum und verminderter Virulenz führt. Eine solche Funktion des *snf1*-Homologs in *U. maydis* konnte jedoch nur teilweise bestätigt werden (Nadal *et al.*, 2010) und eine Beteiligung an der Regulation von Chitinasen ist unklar.

Über die Entwicklungs-spezifische Regulation von Chitinasen ist bislang sehr wenig bekannt. In *Botrytis cinerea* und *Rhizopus oligosporus* konnten Genexpressionsmuster nachgewiesen werden, die eine Rolle der jeweiligen Chitinasen (BcChiB und Chi3) während des Hyphenwachstums und der Sporulation vermuten lassen (Choquer *et al.*, 2007; Takaya *et al.*, 1998a; Richardson *et al.*, 2011). Über die Entwicklungs-spezifische, transkriptionelle Repression von Chitinasen, besonders während der Kolonisierung der Wirtspflanze, gibt es bisher keine Erkenntnisse. Die Chitinase Cts1 wird während des frühen, filamentösen Wachstums in Anwesenheit von Nitrat leicht induziert. Diese Induktion ist von der Stickstoffquelle abhängig, da eine Induktion des filamentösen Wachstums durch Ammonium-Minimalmedium (im Stammhintergrund AB31) nicht zum Anstieg der *cts1*-Transkriptmenge führt (Heimel *et al.*, 2010). Es wäre möglich, dass unter natürlichen Bedingungen auch Pflanzen-spezifische Signale zur Repression von *cts2* führen. Dafür spricht, dass die *cts2*-

Expression auf hydrophoben Oberflächen, wie sie auf der Pflanzenoberfläche herrschen, stark reprimiert wird (Lanver *et al.*, 2014). Von biologischer Relevanz könnte die *cts2*-Repression sein, falls Cts2 von der Pflanze als sog. „*microbe-associated molecular pattern*“ (MAMP) erkannt würde, was im äußersten Fall zur Resistenz von *Z. mays* gegenüber *U. maydis* führen könnte. Erst kürzlich wurde das RBPG1 (*responsiveness to botrytis polygalacturonase1*) Protein AtRLP42 in *Arabidopsis thaliana* identifiziert, welches als Rezeptor für *B. cinerea* und *A. niger* Endo-Polygalakturonasen fungiert (Zhang *et al.*, 2014). Endo-Polygalakturonasen zählen zu den Pektinasen und hydrolisieren die Homo-Galakturonan-Schicht von Pektin-Polysacchariden, wodurch sie zur Degradierung der pflanzlichen Zellwand beitragen. Die Erkennung von Polygalakturonasen führt in *A. thaliana* zur Bildung reaktiven Sauerstoffs und zum programmierten Zelltod, wodurch die Resistenz gegenüber *B. cinerea* erhöht wird. Analog könnte auch die Erkennung von Cts2 eine Immunantwort der Wirtspflanze auslösen. Um herauszufinden, ob die *cts2*-Expression aus diesem Grund während der pathogenen Entwicklung reprimiert wird, könnte man eine Kopie von *cts2* unter der Kontrolle eines konstitutiven Promotors oder des Pflanzen-spezifischen Promotors wie z.B. *P_{mig2-1}* (Basse *et al.*, 2002) in SG200 einbringen und die Virulenz des Stammes in Infektionsexperimenten testen.

3.1.3 Chitinasen werden für die sexuelle Vermehrung nicht benötigt

Chitin oder Chito-Oligomere können von pflanzlichen Rezeptoren erkannt werden und eine Immunantwort auslösen (Wan *et al.*, 2008; Kombrink *et al.*, 2011). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass chitinolytische Enzyme für die biotrophe Phase von *U. maydis* nicht benötigt werden. Daraus kann geschlossen werden, dass der aktive Abbau von CHOS der pilzlichen Zellwand durch Chitinasen und N-Acetylglukosaminidasen nicht zur Suppression des pflanzlichen Immunsystems beiträgt.

Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass Pilze über ein „mehrschichtiges“ System zur Unterdrückung der Immunantwort des Wirtes verfügen. Im Ascomyceten *Cladosporium fulvum* konnte z.B. das Chitin-bindende Protein Avr4 identifiziert werden, welches die pilzliche Zellwand vor Degradation durch pflanzliche Enzyme schützt (van den Burg *et al.*, 2006; van Esse *et al.*, 2007). Zusätzlich sekretiert *C. fulvum* das LysM (Lysin Motiv)-Protein Ecp6, welches mit pflanzlichen Chitinrezeptoren um CHOS der pilzlichen Zellwand konkurriert und somit die Chitin-induzierte Immunantwort der Pflanze supprimiert (de Jonge *et al.*, 2010; Sánchez-Vallet *et al.*, 2013). Auch *Mycosphaerella graminicola* sekretiert zwei Ecp6-ähnliche Proteine, Mg1LyM und Mg3LyM, die an Chitin der Zellwand binden und die

Pilzhypen somit vor exogenen Chitinasen schützen. Außerdem bindet Mg3LysM lösliche CHOS und kann somit die Chitin-induzierte Immunantwort der Wirtspflanze unterdrücken (Marshall *et al.*, 2011). Interessanterweise existiert auch in *U. maydis* ein Ecp6-Ortholog, welches zwei putative LysM-Domänen beinhaltet (Stolle, 2013; Bolton *et al.*, 2008). Dennoch scheint UmEcp6 (*um11464*) keine Rolle in der Unterdrückung der pflanzlichen Immunantwort zu spielen. *ecp6*-Deletionsmutanten zeigten unerwarteterweise sogar erhöhte Appressorienbildung und leicht erhöhte Virulenz (Stolle, 2013).

Eine weitere Strategie, der Immunantwort der Pflanze zu entkommen, ist aus dem Reis-pathogenen Ascomyceten *Magnaporthe oryzae* bekannt. Bei Kontakt mit der Wirtspflanze akkumuliert *M. oryzae* α -1-3-Glukan auf der Zellwand, das die Immunantwort durch Maskierung des darunter liegenden Chitins und β -1-3-Glukans unterdrückt (Fujikawa *et al.*, 2012). Die Funktion von α -1-3-Glukan in der Zellwand von *U. maydis* ist noch nicht vollständig geklärt. Jedoch scheint auch in der Interaktion zwischen *U. maydis* und *Z. mays* die Zusammensetzung der Zellwand eine Rolle zu spielen. So ist die Zellwandzusammensetzung in Abwesenheit der Myosin-Motordomänen-Chitinase Mcs1 leicht verändert, was zum apathogenen Phänotyp der Mutante beiträgt (Treitschke *et al.*, 2010).

Des Weiteren können phytopathogene Pilze einen Teil des in der Zellwand vorhandenen Chitins durch Chitin-Deacetylasen in Chitosan umwandeln, welches ein schlechteres Substrat für Chitinrezeptoren oder Chitinasen darstellt (Sánchez-Vallet *et al.*, 2014). Dadurch werden weniger CHOS freigesetzt, die als Elicitor der pflanzlichen Abwehrreaktion gelten. Das Genom von *U. maydis* kodiert für insgesamt sechs Chitin-Deacetylasen (<http://pedant.helmholtz-muenchen.de>), von denen zwei während der Appressorienbildung induziert werden (Lanver *et al.*, 2014). Eine partielle De-Acetylierung könnte dazu führen, dass *U. maydis* der Erkennung durch pflanzliche Chitinasen und Chitinrezeptoren entkommt und somit die biotrophe Entwicklung etablieren kann.

Neben der Vermeidung sensorischen Mechanismen der Wirtspflanze, ist *U. maydis* auch in der Lage, die pflanzliche Immunantwort durch Effektorproteine aktiv zu unterdrücken. So konnte z.B. der Effektor Pep1 identifiziert werden, der durch Inhibition der Mais-Peroxidase Pox12 den Chitosan-Induzierten, „oxidativen burst“ der Wirtspflanze und somit die basale Immunantwort unterdrückt (Doehleemann *et al.*, 2009; Hemetsberger *et al.*, 2012; Hemetsberger *et al.*, 2015). Während der Besiedelung der Wirtspflanze sekretiert *U. maydis* weitere, zum Teil Gewebe-spezifische Effektoren und manipuliert aktiv den Sekundärmetabolismus und den Hormonhaushalt, um eine erfolgreiche Infektion zu

gewährleisten (Rabe *et al.*, 2013; Djamei *et al.*, 2011; Schilling *et al.*, 2014). Kürzlich wurde außerdem das Effektorprotein Pit2 identifiziert, das Cystein-Proteasen der Wirtspflanze inhibiert und somit die kompatible Interaktion gewährleistet. *U. maydis* kodiert selbst für 31 potentiell sekretierte Proteasen. Möglicherweise werden durch einige von ihnen pflanzliche zellwandabbauende Enzyme, wie Chitinasen oder Glukanasen proteolytisch gespalten und somit inaktiviert, um eine Kolonisierung zu gewährleisten.

3.1.4 Chitinasen haben keinen Einfluss auf die Stresstoleranz und die Akquisition von Chitin als C-Quelle

Zuckerpolymeren, wie z.B. Cellulose, aber auch Chitin, werden von verschiedenen Organismen abgebaut und als Kohlenstoff- und zum Teil auch als Stickstoff-Quelle genutzt (Sivan und Chet, 1989; Gautam *et al.*, 2011; Vyas und Deshpande, 1989; Lingappa und Lockwood, 1961). In der vorliegenden Arbeit wurde getestet, ob Chitinasen einen Einfluss auf das Wachstum von *U. maydis* auf Medium mit Chitin als vorherrschender Kohlenstoffquelle haben. Dabei konnte gezeigt werden, dass weder das Wachstum auf CM, noch auf AM mit verschiedenen Chitinderivaten beeinflusst war. Dennoch wuchs *U. maydis* auf Chitin deutlich langsamer als auf Glukose. Durch Supplementation der Chitin-haltigen Medien mit Glukose konnte volles Wachstum wiederhergestellt werden, was zeigt, dass Chitin keine inhibitorische Wirkung auf das Wachstum von *U. maydis* hat, wie es z.B. bei einigen Chitosanderivaten der Fall ist (Hirano und Nagao, 1989). Daher kann geschlossen werden, dass Chitinasen zumindest unter den getesteten Bedingungen keine Rolle bei der Akquisition von Kohlenstoff aus polymerem Chitin spielen.

Des Weiteren wurde getestet, ob sich der Verlust der Chitinasen auf die Stresstoleranz auswirkt. Aus *C. neoformans* ist bekannt, dass der Verlust der Chitinasegene *chi2* und *chi21* zur erhöhten Stressanfälligkeit gegenüber SDS während des saprotrophen, Hefe-artigen Wachstums führt (Baker *et al.*, 2009). Außerdem konnte in *Trichoderma spec.* gezeigt werden, dass Zellwandstressoren, wie z.B. Calcofluor-White oder Kongorot, zu verstärkter Chitin-Polymerisation und dickeren Zellwänden führen (Roncero und Durán, 1985). Unter diesen Bedingungen werden Chitinasegene stärker exprimiert, was auf eine Beteiligung in der Stress-Antwort hindeutet (Gruber *et al.*, 2011). Ein ähnlicher Effekt wurde auch in *C. albicans* unter Hitzestress beobachtet. Hier führt eine längere Hitzeeinwirkung (42 °C) ebenfalls zu einer Verdickung der Zellwand, was auf erhöhte Chitinmengen zurückzuführen ist (Heilmann *et al.*, 2013). Interessanterweise sinkt infolgedessen die Chitinasesekretion in den Kulturüberstand, was mit einem Zellseparationsdefekt einhergeht. Ein Effekt von

Chitinasen auf die Stresstoleranz konnte in *U. maydis* Chitinasemutanten nicht beobachtet werden. Sowohl während des Hefe-artigen, als auch während des filamentösen Wachstums konnten keine Wachstumsunterschiede unter den sechs getesteten Stressbedingungen beobachtet werden. Dies spricht dafür, dass Chitinasen keinen zentralen Faktor in der Stressantwort von *U. maydis* darstellen.

3.1.5 Cts1 und Cts2 unterscheiden sich in ihrer Wirkungsweise

Chitinasen unterscheiden sich in ihren jeweiligen Mechanismen Chitin zu degradieren. Demnach können sie bezüglich der Art ihrer Substratbindung und Schnittstellenpräferenz in Endo- und Exo-Chitinasen unterteilt werden. Endochitinasen binden an zufälligen Stellen im Chitinstrang und fügen dort Strangbrüche ein, während Exochitinasen an den Enden der Chitinpolymere binden und (meist prozessiv) $(\text{GlcNAc})_2$ abspalten (Vaaje-Kolstad *et al.*, 2013). Beide Typen können meist auf Grund der Architektur ihrer Substratbindestellen und dem Hydrolyseprodukt bzw. dem Verhältnis von $(\text{GlcNAc})_3$ zu $(\text{GlcNAc})_2$ nach der Hydrolyse unterschieden werden (Horn *et al.*, 2006; Cottaz *et al.*, 2000; Sikorski *et al.*, 2006; Payne *et al.*, 2012).

U. maydis kodiert für drei Chitinasen. Für zwei von ihnen, Cts1 und Cts2, konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass sie während des saprotrophen Wachstums an der Cytokinese beteiligt sind. In Gel-Aktivitätstests mit polymerem Chitin konnte die Aktivität beider Chitinasen bestätigt werden. Die Chitinaseaktivität von *U. maydis* korreliert in dieser Phase mit den Transkriptionsmustern der Chitinasegene (s. Anhang Abb. 6.9). Daher besteht eine direkte Kausalität zwischen Chitinase-Genexpression, Aktivität und beobachtetem Phänotyp. Interessanterweise konnte in dieser Wachstumsphase mittels des fluorogenen Substrats MUC₃ lediglich Cts1-Aktivität beobachtet werden, was im Widerspruch zu den Ergebnissen aus den Tests mit polymerem Chitin steht. Eine mögliche Erklärung dafür könnte sein, dass Cts1 kurze CHOS als Substrat akzeptiert, während Cts2 lediglich polymeres Chitin verwerten kann. Daher wurden die Aktivitäten beider Enzyme zusätzlich mit den kurzkettigen Chito-Oligomeren $(\text{GlcNAc})_4$ und $(\text{GlcNAc})_6$, also unabhängig einer fluorogenen Abgangsgruppe bestimmt. Die Analyse ergab, dass beide Enzyme sowohl $(\text{GlcNAc})_4$, als auch $(\text{GlcNAc})_6$ als Substrat akzeptieren und als Hydrolyseprodukte $(\text{GlcNAc})_2$ und $(\text{GlcNAc})_3$ produzieren (Abb. 3.4). Die Diskrepanz zwischen dem Chitinase-Aktivitätstest mittels MUC₃ und $(\text{GlcNAc})_4$ kann zwei Gründe haben. Zum einen könnte die artifizielle, fluorogene Abgangsgruppe die Bindung von Cts2 an das Substrat verhindern oder die Synthese der Hydrolasereaktion blockieren. Ein ähnlicher Sachverhalt ist in der menschlichen

di-N-Acetyl-Chitobiase aus der Leber bekannt, ein GH18-Enzym, das Chitobiose spaltet, dessen Aktivität mit dem fluorogenen Substrat MUG jedoch ausbleibt (Stirling, 1973; Bearpark und Stirling, 1978; Aronson und Halloran, 2014). Es konnte gezeigt werden, dass die Aktivität dieses Enzyms zum einen von der Anomerkonfiguration und zum anderen von der Acetylierung der einzelnen Einheiten des Substrates abhängt. Die zweite Möglichkeit, warum die Aktivität von Cts2 mittels der fluorogenen Substrate MUC₃ oder MUC₂ nicht nachweisbar ist, ist eine unterschiedliche Bindestellen- oder Schnittstellen-Präferenz.

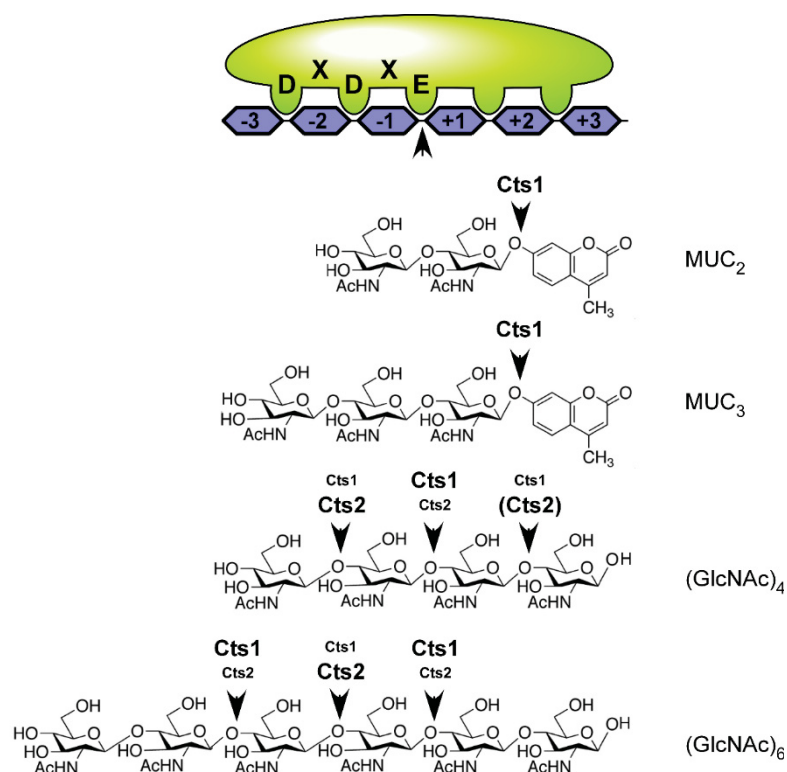


Abb. 3.4: Schnittstellenpräferenz der Chitinasen Cts1 und Cts2. Schematische Darstellung des aktiven Zentrums von GH18-Chitinasen und der ermittelten Schnittstellen von Cts1 und Cts2. Das Konsensusmotiv DXDXE bildet das katalytische Zentrum von GH18-Chitinasen. Das Glutamat ist die katalytische Aminosäure. Die GlcNAc-Reste vorher werden mit negativen Zahlen, die nachfolgenden Reste mit positiven Zahlen benannt. Die Hydrolyse erfolgt zwischen der -1 und der +1 Position. Lediglich Cts1 kann von den fluorogenen Substraten MUC2 und MUC3 das Fluorophor 4-Methylumbelliferon abspalten. Beide Chitinasen können die CHOS (GlcNAc)₄ und (GlcNAc)₆ spalten. Cts1 spaltet präferiert Dimere ab, während das (GlcNAc)₂ / (GlcNAc)₃-Verhältnis bei Cts2 deutlich geringer ist. Cts2 spaltet folglich eher in der Mitte von (GlcNAc)₆.

Demnach wäre es möglich, dass Cts1 (GlcNAc)₂ und (GlcNAc)₃ vom nicht-reduzierenden Ende des Substrats abspaltet, während Cts2 lediglich in der Mitte des Substrates wirkt bzw. ein acetyliertes GlcNAc-Monomer an der +1 Stelle des aktiven Zentrums benötigt (Abb. 3.4). Für diese Hypothese spricht das in dieser Arbeit gemessene (GlcNAc)₂ / (GlcNAc)₃-Verhältnis, welches für Cts1 ca. 8,2 und für Cts2 ca. 4,1 beträgt. Diese Verhältnisse stimmen mit denen überein, die für die bakteriellen Chitinasen ChiA und ChiC

(Exo- und Endo-Chitinase) aus *S. marcescens* während der Hydrolyse von β -Chitin ermittelt wurden (Horn *et al.*, 2006; Vaaje-Kolstad *et al.*, 2013). Ähnliche Unterschiede in der Schnittstellenpräferenz wurde auch im Vergleich von Endochitinasen aus Bohnen, *Streptomyces griseus*, sowie Lysozym aus Hühner-Ei und Exo-Chitinasen aus *Bacillus circulans* und *S. marcescens* beobachtet (Cottaz *et al.*, 2000).

Die Vermutung, dass es sich bei Cts1 um eine prozessiv wirkende Exo- und bei Cts2 um eine Endo-Chitinase handelt, wird durch die Proteinstrukturmodelle gestärkt. Demnach weist Cts1 eine Tunnel-förmige, tiefe Substratbindestelle auf, wie sie für Exo-Chitinasen typisch ist. Cts2 hingegen besitzt hingegen eine flache, offene Substratbindestelle, wie sie charakteristisch für Endo-Chitinasen ist. Außerdem wurden durch den Vergleich der Proteinstruktur von *S. marcescens* ChiA und dem Modell von Cts1 neun hochkonservierte, oberflächenexponierte, aromatische Aminosäuren identifiziert, deren Rolle während der prozessiven Chitindegredation in ChiA bereits experimentell bestätigt wurde (Horn *et al.*, 2006; Zakariassen *et al.*, 2009; Breyer und Matthews, 2001). Weiterhin enthält das katalytische Zentrum von Cts1 eine für Exo-Chitinasen typische Ansammlung aromatischer Aminosäuren, welche für prozessive Enzyme essentiell sind, um die dauerhafte Bindung an das Substrat zu gewährleisten (Anhang Abb. 6.6). Durch die Analyse der Hydrolyseprodukte des Abbaus von kristallinem Chitin und der fluorogenen Substrate MUC₃ und MUC₂ mittels UPLC-MS könnte eindeutig geklärt werden, ob sich die aktiven Chitinasen aus *U. maydis* in ihrer Prozessivität und ihrer Wirkungsweise als Exo- bzw. Endo-Chitinase unterscheiden.

Dennoch kann zu diesem Zeitpunkt bereits geschlussfolgert werden, dass mit den kommerziellen Substraten MUC₃ und MUC₂ zwei Substrate zur Verfügung stehen um spezifisch die Cts1-Aktivität in Wildtyp-Stämmen bestimmen zu können. Dies könnte zu einem späteren Zeitpunkt relevant werden, wenn z.B. die extrazelluläre Aktivität der unkonventionell sekretierten Chitinase Cts1 und der konventionell sekretierten Chitinase Cts2 verglichen werden sollen. Mit einer solchen Anwendung könnten in einem Mutantenscreen z.B. Kandidatengene identifiziert werden, welche spezifisch lediglich einen der beiden Sekretionsmechanismen beeinflussen.

Durch den Vergleich der Proteinstrukturen von Cts1 und SmChiA konnten neun aromatische, oberflächenexponierte Aminosäuren mit einer putativen Funktion bei der Chitinbindung identifiziert werden. Durch gezielte Mutation dieser Aminosäuren könnte die Chitinbindeaffinität von Cts1 gesenkt werden. Dadurch könnte die Cts1-Sekretionsleistung in den Kulturüberstand verbessert werden, was für die biotechnologische Nutzung der unkonventionellen Sekretion in *U. maydis* wertvoll wäre.

Des Weiteren steht nun mit dem AB33cts2Δ-Stamm eine wertvolle Mutante zur Untersuchung der unkonventionellen Sekretion von Cts1 zur Verfügung. Dieser Stamm eignet sich gut, da sich ein Defekt in der Cts1-Sekretion direkt phänotypisch als Cytokinesedefekt, wie er in der AB33cts1Δcts2Δ-Mutante auftritt, äußert. Dadurch kann dieser Stamm für makroskopische Hochdurchsatz-Analysen von Mutanten der unkonventionellen Sekretion verwendet werden.

3.1.6 Die Sekretionsmechanismen von Cts1 und Cts2 unterscheiden sich

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die Chitinasen Cts1 und Cts2 an der Remodellierung der Zellwand während der Zellteilung beteiligt sind. Beide Chitinasen haben zumindest teilweise redundante Funktionen, sodass lediglich in Doppel-Deletionsmutanten ein Cytokinesedefekt auftritt. Für die Chitinase Cts1 konnte außerdem gezeigt werden, dass sie während später Stadien der Cytokinese in der Teilungszone zwischen Mutter- und Tochter-Zelle lokalisiert, wo sie zum Abbau von Zellwandresten beiträgt und so die physische Separation gewährleistet. Für Cts2 konnte der genaue Wirkungsort wegen der Instabilität des Cts2G-Fusionsproteins nicht bestimmt werden.

Dennoch kann man auf Grund der funktionellen Redundanz davon ausgehen, dass sich der Wirkungsort beider Chitinasen überschneidet, was eine extrazelluläre Lokalisation von Cts2 wahrscheinlich macht und somit die Sekretion des Proteins voraussetzt. Eine putative Sekretion scheint auch deshalb wahrscheinlich, da das Protein eine N-terminale Signalsequenz für die konventionelle Sekretion besitzt. Bei der konventionellen Sekretion vermittelt die N-terminale, hydrophobe Signalsequenz zusammen mit dem Signalerkennungspartikel (SRP; *signal recognition particle*) die Assoziation der Translationsmaschinerie mit der ER-Membran (Walter *et al.*, 1981; Meyer und Dobberstein, 1980). Nach co-translationalem Import in das ER-Lumen kommt es zur Proteinfaltung (Chakravarthi *et al.*, 2006; Braakman *et al.*, 1992) und ggf. zur N-Glykosylierung, bei der ein charakteristisches Oligosaccharid an die Aminogruppe des Asparagins der Konsensussequenz N-x-S/T angehängt wird. Der Kern dieses in Eukaryoten konservierten Oligosaccharids besteht aus zwei β-1-4-verknüpften N-Acetylglukosamin-, einem β-1-4-verknüpften Mannose- und jeweils einem β-1-3- und β-1-6-verknüpften Mannose-Rest ((GlcNAc)₂-(Man)₃; Anhang Abb. 6.13; Imperiali und O'Connor; 1999; Bobrowicz *et al.*, 2004; Shakin-Eshleman *et al.*, 1996). Am Ende der Passage des ERs, werden die Proteine mittels COPII (*coat protein II*)-Vesikeln zum Golgi-Apparat transportiert, wo weitere Modifikationsprozesse ablaufen. Die vom Golgi-Apparat abgeschnürten Vesikel können nun mit Hilfe sog. SNARE (*soluble N*-

ethylmaleimide-sensitive factor attachment receptor)-Proteine mit der jeweiligen Zielmembran fusionieren und somit das Protein in den extrazellulären Raum entlassen (Söllner *et al.*, 1993; McNew *et al.*, 2000; Jahn *et al.*, 2003).

Im Gegensatz zu Cts2 wird Cts1 unkonventionell sekretiert und umgeht somit den klassischen ER/Golgi-abhängigen Sekretionsweg (Koepke *et al.*, 2011; Stock *et al.*, 2012; Sarkari *et al.*, 2014; Stock, 2014). In Filamenten von *U. maydis* konnte gezeigt werden, dass die Sekretion von Cts1 vom Rrm4-vermittelten, Mikrotubuli-assoziierten mRNA-Langstreckentransport abhängt (Koepke *et al.*, 2011). Durch *in vivo* UV-CLIP Experimente in Verbindung mit mRNA Lokalisation mittels FISH (Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung) konnte die *cts1*-mRNA als direktes Ziel von Rrm4 ermittelt werden (Koepke *et al.*, 2011; König *et al.*, 2009; Haag, 2013). Die *cts1*-mRNA lokalisiert demnach in Rrm4-assoziierten Partikeln, eine spezifische Lokalisation im subapikalen Bereich oder den Septen des Filaments konnte jedoch nicht beobachtet werden. Daher ist eine Abhängigkeit der Sekretion von lokaler Translation an der Hyphenspitze unwahrscheinlich. Neuere Erkenntnisse über den Transport und die Endosomen-gekoppelte, lokale Translation der Septin-mRNA *cdc3* deuten eher darauf hin, dass die *cts1*-mRNA während des Transports translatiert werden könnte und das fertige Protein am Zielort abgeladen oder möglicherweise direkt sekretiert wird (Baumann *et al.*, 2014; Baumann *et al.*, 2012).

Gegen einen direkten Einfluss von Rrm4 auf die Cts1-Lokalisation bzw. -Sekretion spricht jedoch, dass die Lokalisation von Cts1 in *rrm4Δ*-Filamenten unverändert ist. Außerdem konnte bereits früher gezeigt werden, dass in *rrm4Δ*-Mutanten aktives Cts1 intrazellulär akkumuliert, was gegen einen negativen Einfluss auf die Translation spricht (Koepke *et al.*, 2011). Auch die transkriptionelle Fusion der *ubi1*-3'UTR an den offenen Leserahmen von *cts1*, wodurch die Transporteffizienz erhöht wurde, hatte keinen Einfluss auf die Lokalisation oder Sekretion des Proteins (Stock, 2014). Des Weiteren deuten CLIP-Daten darauf hin, dass es sich bei der *cts1*-mRNA um ein sehr „schwaches“ Ziel (wenige Kreuzvernetzungsstellen) für den Rrm4-abhängigen Transport handelt. Im Gegensatz dazu wurden Ziel-mRNAs, wie z.B. *rho3* oder *cdc3* identifiziert, welche stark mit Rrm4 assoziiert erscheinen, was sich durch eine hohe Anzahl von CLIP-Tags auszeichnet (König *et al.*, 2009). Für Cdc3 konnte außerdem nachgewiesen werden, dass die finale Proteinlokalisierung von Rrm4 abhängt (Baumann *et al.*, 2014). Die Analyse der Cts1-Aktivität in verschiedenen Septin-Mutanten (inklusive *cdc3Δ*) ergab, dass die Sekretion von Cts1 auch von Septinen abhängt (pers. Mitteilung, S. Zander), was dafür spricht, dass Rrm4 lediglich indirekt an der Sekretion von Cts1 beteiligt ist.

Dennoch stellt sich die Frage, durch welchen Mechanismus die unkonventionelle Sekretion von Cts1 gesteuert wird. In Cts1 konnte sowohl bioinformatisch, als auch experimentell kein N-terminales Signalpeptid nachgewiesen werden (Stock *et al.*, 2012; Stock, 2014). Interessanterweise ist das Fehlen eines Sekretionssignals in homologen Proteinen der nahe verwandten Spezies *P. hubeiensis*, *S. reilianum* und *U. hordei* und sogar in der Chitinase Cts2p aus *S. cerevisiae* evolutionär konserviert. Obwohl für Cts2p lediglich eine Funktion während der Sporulation gezeigt wurde, konnte das Enzym in der Zellwand nachgewiesen werden, was für eine Sekretion spricht (Teparić *et al.*, 2007). Auch das Cts2p-Ortholog Cht4p aus *C. albicans* besitzt kein N-terminales Signalpeptid, wurde aber ebenfalls in Zellwänden nachgewiesen (Chaffin, 2008).

Dies spricht dafür, dass es sich bei der Cts1-Sekretion um einen konservierten Mechanismus handelt. Durch die genauere Untersuchung des Sekretionsmechanismus' und die Übertragung des Wissens auf verwandte Spezies könnte das Repertoire von Modellorganismen für die unkonventionelle Sekretion nicht-N-glykosylierter Proteine ausgeweitet werden.

Obwohl bereits experimentell gezeigt werden konnte, dass Cts1 unkonventionell sekretiert wird und damit die ER/Golgi-Passage umgeht (Koepke *et al.*, 2011; Stock *et al.*, 2012), kann über den genauen Mechanismus der unkonventionellen Sekretion derzeit lediglich spekuliert werden. Einige Mechanismen, die der unkonventionellen Sekretion zugrunde liegen können, wurden vor allem in tierischen Modellsystemen, aber auch in Pilzen untersucht (Nickel und Rabouille, 2009). Einer der bestuntersuchten Vertreter unkonventionell sekretierter Proteine ist der Fibroblasten-Wachstumsfaktor 2 (FGF2, *fibroblast growth factor 2*). FGF2 interagiert in seiner vollständig gereiften, phosphorylierten Form mit Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphat (PI-4,5-P₂) auf der inneren Seite der Plasmamembran, wodurch es zur Oligomerisierung kommt (Backhaus *et al.*, 2004; Nickel, 2010; Temmerman *et al.*, 2008). Dadurch wird die Internalisierung des Komplexes in die Membran ermöglicht (Torrado *et al.*, 2009). Durch die Interaktion von FGF2 mit proximalen Heparansulfaten in der Proteoglycanschicht der extrazellulären Matrix kommt es anschließend zur vollständigen Externalisierung von FGF2 (Nickel, 2010; Nickel, 2005; Torrado *et al.*, 2009). Weitere Beispiele von Proteinen, die Vesikel-unabhängig sekretiert werden, sind der a-Faktor aus *S. cerevisiae* bzw. der m-Faktor aus *S. pombe*. Beide Peptidhormone sind farnesyliert und werden mittels ABC (*ATP-binding cassette*)-Transporter (ScSte6p bzw. SpMam1) sekretiert (Michaelis, 1993; Berkower und Michaelis, 1991; Christensen *et al.*, 1997). Möglicherweise stellt der Export mittels ABC-Transporter einen konservierten Mechanismus für die Sekretion von Lipo-Peptiden bzw. -Proteinen dar (Rabouille *et al.*, 2012). Neben den genannten,

Vesikel-unabhängigen Sekretionsmechanismen sind auch einige Vesikel-abhängige Transportprozesse bekannt. Obwohl die meisten Proteine, die ein Signalpeptid enthalten über den klassischen ER/Golgi-abhängigen Weg sekretiert werden, sind einige Proteine, wie z.B. Hsp150 aus *S. cerevisiae* oder das Transmembranprotein CFTR aus der Hamsterniere, bekannt, die gezielt die Passage des Golgi-Apparates vermeiden (Grieve und Rabouille, 2011; Tveit *et al.*, 2009; Fatal *et al.*, 2004). Weitere Sekretionswege sind abhängig von differenzierteren Vesikeln wie z.B. sekretorischen Lysosomen oder Autophagosomen, Exosomen und multivesikulären Körpern (MVBs, *multivesicular bodies*; Nickel und Rabouille, 2009; Rabouille *et al.*, 2012; Duran *et al.*, 2010; Manjithaya *et al.*, 2010). Ein in dieser Hinsicht gut studiertes Beispiel ist das Acetyl-CoA bindende Protein Acb1 aus *S. cerevisiae* bzw. dessen Homolog AcbA aus *Dictyostelium discoideum* (Cabral *et al.*, 2010; Duran *et al.*, 2010). Es wurde gezeigt, dass Acb1 unter bestimmten Bedingungen, wie z.B. Nährstoffmangel, an sog. „Komponenten für die unkonventionelle Sekretion“ (CUPS) binden. Diese stellen eine bisher unbekannte Form von Vesikeln dar, welche sowohl das Golgi-typische Protein Grh1, als auch Komponenten des ER und von Autophagosomen enthalten (Bruns *et al.*, 2011; Cruz-Garcia *et al.*, 2014). Im weiteren Verlauf der Acb1-Sekretion wird Acb1 in spezialisierte Endosomen internalisiert, die sich später zu Exosomen differenzieren und ggf. in MVBs eingeschlossen werden. Durch die Fusion von MVBs mit der Plasmamembran werden Exosomen in den extrazellulären Raum freigesetzt. Dabei ist nicht nur die Bildung der CUPS, sondern auch die Fusion der MVBs und somit die Exosomensekretion von GRASP (*Golgi re-assembly and stacking protein*)-Proteinen abhängig (Giuliani *et al.*, 2011; Manjithaya *et al.*, 2010; Kinseth *et al.*, 2007; Duran *et al.*, 2010).

Ein weiteres Beispiel für MVB-vermittelte Externalisierung von Exosomen ist die Sekretion des Cytokins Interleukin-1 β (IL-1 β). In Makrophagen wird durch das Stress-induzierte Inflammosom die Caspase 1 aktiviert. Dadurch kommt es zur Prozessierung und Reifung des IL-1 β in seine aktive Form, die anschließend in MVBs eingeschlossen und mittels Exosomensekretion externalisiert wird (Feldmeyer *et al.*, 2007; Nickel und Rabouille, 2009). Interessanterweise konnte durch pharmakologische Inhibition und RNA-Interferenz-vermittelter Caspase 1 Hemmung gezeigt werden, dass nicht nur IL-1 β Caspase 1-abhängig sekretiert wird. Auch die Externalisierung weiterer, unkonventionell sekretierter Proteine, wie IL-1 α , der Makrophagenmigrations-Inhibitionsfaktor MIF, die Galektine 1 und 3, sowie FGF2 ist ebenfalls Caspase 1-abhängig (Keller *et al.*, 2008; Seelenmeyer *et al.*, 2008)). Daher kann geschlussfolgert werden, dass sowohl GRASP- als auch Caspase 1-Orthologe in *U. maydis*

möglicherweise als zentrale Regulatoren der unkonventionellen Sekretion fungieren könnten (Abb. 3.7). Das Genom von *U. maydis* kodiert lediglich für ein putatives GRASP-Ortholog, *grh1* (*um01076*). Außerdem enthält das Genom von *U. maydis* keine konventionellen Caspase-Gene, sondern kodiert lediglich für eine Metacaspase (*mca1*; *um01408*) mit Ähnlichkeit zu Mca1 (auch Yca1) aus *S. cerevisiae*. Metacaspasen werden häufig als Vorfahren der hochspezialisierten Caspasen angesehen und können in der Zelle oftmals unterschiedliche Funktionen ausüben (Hill *et al.*, 2014; Tsiatsiani *et al.*, 2011). Durch einen gezielten, revers-genetischen Kandidatengen-Ansatz könnte eine Rolle von Grh1 oder Mca1 während der unkonventionellen Sekretion von Cts1 in *U. maydis* untersucht werden.

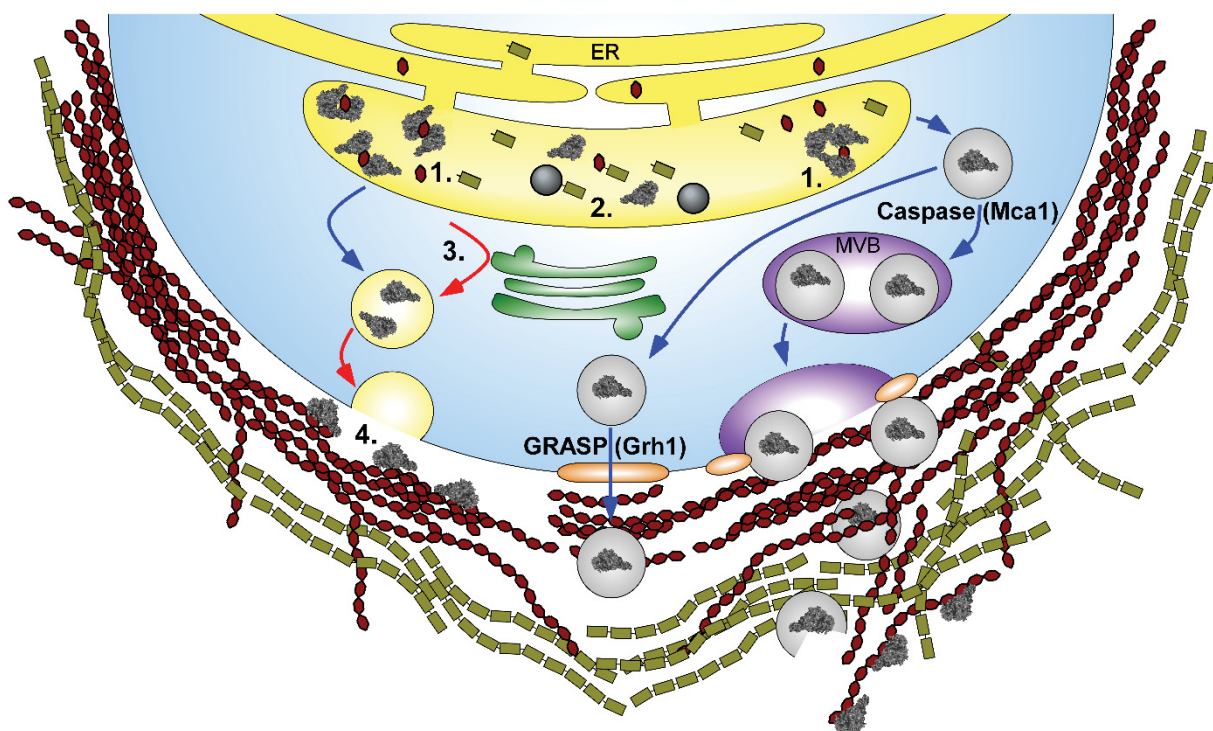


Abb. 3.7: Mögliche Mechanismen der unkonventionellen Sekretion von Cts1 in *U. maydis*. Schematische Darstellung potentieller Wege der unkonventionellen Sekretion von Cts1. Während der konventionellen Sekretion (rote Pfeile) werden Proteine co-translational in das ER transloziert, wo erste post-translationale Modifikationen, wie z.B. die initialen Schritte der N-Glykosylierung, stattfinden. Von dort aus werden sie in COPII-Vesikeln zum Golgi-Apparat transportiert, wo weitere Proteinmodifikationen, wie die späten Schritte der N-Glykosylierung und die O-Glykosylierung, ablaufen. Nach der Golgi-Passage werden sekretorische Vesikel zur Zellmembran transportiert, wo sie mit Hilfe von SNARE-Proteinen mit der Membran fusionieren und den Inhalt in den extrazellulären Raum entlassen. Die unkonventionelle Sekretion (blaue Pfeile) kann über mehrere Wege verlaufen. Zum einen können COPII-Vesikel die Golgi-Passage umgehen und somit Golgi-spezifische Modifikationen vermeiden. Außerdem können Proteine selbst-vermittelt oder über spezifische Transporter sekretiert werden (im Modell nicht dargestellt). Die dritte Möglichkeit ist die GRASP-vermittelte Sekretion von Exosomen oder MVBs, wodurch intakte, sekretorische Vesikel in den extrazellulären Raum gelangen. Die Bildung von MVBs ist in Säugetieren Caspase-abhängig. Diese Funktion könnte in *U. maydis* von der Metacaspase Mca1 übernommen werden. Die potenziellen Gründe für eine unkonventionelle Sekretion von Cts1 sind vielfältig. Zum einen könnte Cts1 durch eine hohe Affinität zu GlcNAc an Zuckern der N-Glykosylierungsmaschinerie binden, was zur Aggregation von Cts1 führen könnte (1). Andererseits könnte die Aktivität gegenüber GlcNAc-Dimeren auch zur De-Glykosylierung von Glykoproteinen führen (2), welche dadurch funktionslos oder sogar toxisch werden können.

Abb. 3.7 (fortgesetzt): Mögliche Mechanismen der unkonventionellen Sekretion von Cts1 in *U. maydis*. Des Weiteren enthält Cts1 eine putative Glykosylierungsstelle. Daher könnte die konventionelle Sekretion zu einer nicht physiologischen Glykosylierung von Cts1 in ER und Golgi-Apparat führen (3), wodurch das Protein inaktiviert werden könnte. Ein weiterer Grund, der für eine Sekretion mittels Exosomen spricht, lässt sich aufgrund der Zellarchitektur postulieren. Aufgrund vieler aromatischer Aminosäuren im aktiven Zentrum und im N-terminalen Bereich besitzt Cts1 höchstwahrscheinlich eine hohe Bindeaffinität gegenüber Chitin. Die konventionelle Sekretion könnte daher zu einer verfrühten Bindung führen, wodurch das Enzym seinen eigentlichen Wirkungsort nur schwer erreichen könnte. Durch Exosomen-vermittelte Sekretion könnte eine frühe Chitinbindung vermieden werden, wodurch auch distalere Bereiche der Zellwand erreicht würden.

Es gibt mehrere potentielle Gründe, warum die Chitinase Cts1 unkonventionell sekretiert werden muss (Abb. 3.7). Der wohl naheliegendste Grund, warum Cts1 den klassischen ER/Golgi-abhängigen Sekretionsweg umgeht besteht darin, dass Cts1 möglicherweise eine fehlerhafte N-Glykosylierung im ER-Lumen und dem Golgi-Apparat vermeiden muss. Cts1 besitzt laut NetNGlyc 1.0 eine putative N-Glykosylierungsstelle am Asparagin 140 in der Sequenz NLTH am Anfang der GH18-Domäne. Eine nicht-physiologische Glykosylierung des Enzyms könnte die Konformation der aktiven Domäne verändern und so zur Inaktivierung führen. Für FGF2 konnte ein ähnlicher Funktionsverlust bereits experimentell bestätigt werden. Die Umleitung von FGF2 durch den konventionellen Sekretionsapparat durch N-terminale Fusion eines Signalpeptids führt zu einer artifiziellen O-Glykosylierung, welche die Bindung an extrazelluläre Heparansulfate verhindert (Wegehingel *et al.*, 2008). Dadurch werden die Lagerung von FGF2 im extrazellulären Raum und seine Signalfunktion verhindert.

Ein weiterer Grund könnte in der Eigenschaft von Cts1 zu finden sein, kurzkettige GlcNAc-Oligomere zu binden. Dadurch könnte Cts1 mit dem Kern von Glykosylierungs-Oligosacchariden (Abb. 6.13) und Glykoproteinen interagieren, was zu einer Aggregatbildung im ER führen könnte. Interessanterweise konnte eine derartige Bindung für Galektine, eine Gruppe β -Galactosid-bindender Lectine, bereits gezeigt werden (Baum *et al.*, 1995; Delacour *et al.*, 2007; Camby *et al.*, 2006; Cho und Cummings, 1995a/b). Außerdem konnte gezeigt werden, dass Gal1 und Gal3 in Abhängigkeit der Caspase 1 unkonventionell sekretiert werden (Keller *et al.*, 2008). Die unkonventionelle Sekretion von Gal1 funktioniert auch für heterolog exprimiertes Protein in *S. cerevisiae*, was auf eine evolutionäre Konservierung des Sekretionsmechanismus schließen lässt (Cleves *et al.*, 1996). Die artifizielle, konventionelle Sekretion eines SP-Lipase (Uml2)-Cts1 Fusionsproteins führt zu einer Spaltung des Proteins während des Exports, wodurch fast ausschließlich Uml2 sekretiert wird. Der Großteil des intakten Vollängenproteins kann lediglich intrazellulär nachgewiesen werden (Stock, 2013). Möglicherweise wird die Passage des ERs während der konventionellen Sekretion von Cts1 durch Bindung an Glykosylierungs-Oligosaccharide oder Glykoproteine inhibiert.

Die Fähigkeit zur Bindung und Spaltung kurzkettiger CHOS könnte auch zur De-Glykosylierung von Glykoproteinen führen. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Cts1 gegenüber dem Chitobiase-Substrat MUC₂ aktiv ist. Dieses Substrat besteht aus lediglich zwei GlcNAc-Einheiten, welche β -glykosidisch an den Fluorophor 4-Methylumbelliferol gebunden sind. Eine sehr ähnliche Struktur ist auch im Kern von Glykosylierungszuckern vorhanden (Abb. 6.13). Unter natürlichen Bedingungen können Glykoproteine durch Endo-N-Acetyl- β -D-Glukosaminidasen (ENGasen) oder Peptid-N-Glykosidasen (PNGasen) de-glykosyliert werden (Tarentino *et al.*, 1985; Karamanos, 2013), was zur ER-assoziierten Protein-Degradation (ERAD) während ER-Stress beitragen kann (Tzelepis *et al.*, 2014). Dennoch wurden bereits Chitinasen und Chitobiasen mit ENGase- oder PNGase-Aktivität in mehreren Spezies identifiziert (Murata *et al.*, 2005; Larsen *et al.*, 2011; Frederiksen *et al.*, 2013; Aronson *et al.*, 1989). Das aktive Zentrum von Chitinasen und ENGasen enthält das identische Konsensusmotiv DXXDXDXE. Falls Cts1 ebenfalls ENGase- oder PNGase-Aktivität besitzt, könnte eine artifizielle, konventionelle Sekretion schwerwiegende Folgen auf die post-translationale Modifikation von Glykoproteinen haben und dadurch grundlegende Prozesse wie ER-Stress und ERAD beeinflussen.

Ein weiterer Grund für die unkonventionelle, Exosomen-vermittelte Sekretion von Cts1 könnte die extrazelluläre Lokalisation des Enzyms darstellen. Es konnte gezeigt werden, dass Cts1 auf seiner Oberfläche mindestens neun aromatische Aminosäuren besitzt, die höchstwahrscheinlich an der Chitinbindung beteiligt sind. Daher könnte die Affinität gegenüber Chitin sehr hoch sein, was extrazellulär zu einer verfrühten Bindung führen könnte. Durch die Sekretion mittels Exosomen bzw. MVBs könnte die Passage der Zellwand gewährleistet werden, wodurch Cts1 auch distale Chitinstränge erreichen würde.

Um die Gründe für die unkonventionelle Sekretion zu verstehen, sollte zunächst untersucht werden, ob die konventionelle Sekretion von Cts1 durch ein artifizielles N-terminales Signalpeptid zur Externalisierung von funktionellem Enzym führt. Dafür könnte der Stamm AB33cts2 Δ als Reporterstamm verwendet werden, da eine gestörte Cts1-Funktion in diesem Stamm zu dem beobachteten Cytokinesedefekt führen sollte. Außerdem könnte durch Co-Inkubation von heterolog exprimiertem Cts1 mit bekannten Glykoproteinen aus *U. maydis* getestet werden, ob Cts1 tatsächlich ENGase- oder PNGase-Aktivität besitzt. Durch die genauere Lokalisierung von nativem Cts1 und der Vergleich mit SP-Cts1 in der Zellwand von *U. maydis* mittels Immunogold-Markierung und Elektronenmikroskopie könnte außerdem untersucht werden, ob konventionelle Sekretion zu veränderter, extrazellulärer Lokalisation führen würde.

Durch das bessere Verständnis der unkonventionellen Sekretion von Cts1 könnten auch neue Erkenntnisse darüber gewonnen werden, inwiefern Rrm4 an der Sekretion beteiligt ist und welche weiteren Faktoren durch den Mikrotubuli-abhängigen mRNA-Transport beeinflusst werden. Möglicherweise trägt die Rrm4-vermittelte, lokale Translation an Endosomen zur Differenzierung von Vesikeln bei. Dadurch könnte eine Subpopulation von Vesikeln für den Export von cytoplasmatischen Proteinen ohne Signalpeptid geschaffen werden. Das Septin Cdc3 lokalisiert zusammen mit Rrm4 in bidirektional transportierten Vesikeln und es wird vermutet, dass die Proteinsynthese direkt an Endosomen stattfindet (Baumann *et al.*, 2014). Außerdem findet man Septin-Filamente und -Ringe an den gleichen Stellen in der Zelle, an denen auch Cts1 lokalisiert und neueste Beobachtungen zeigen, dass die Cts1-Sekretion in Septin-Deletionsmutanten verringert ist (pers. Mitteilung, S. Zander). Septine haben außerdem die Eigenschaft zur Hetero-Polymerisierung (Jansen *et al.*, 2014). Möglicherweise können Vesikel-assoziierte Septine mit membranständigen Septin-Filamenten oder -Ringen fusionieren, wodurch die Fusion beider Membranen eingeleitet wird und es zur unkonventionellen Sekretion kommt.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Lokalisations- und Aktivitäts-Analysen von Cts1 in Mutanten, mit einer gestörten Septenbildung während des Hefe-artigen und filamentösen Wachstums deuten darauf hin, dass in *U. maydis* zwei alternative Sekretionswege für Cts1 existieren (Abb. 3.8). In Deletionsmutanten von *don1* und *don3* kam es in Sporidien zu einer drastisch reduzierten Cts1-Aktivität (Abb. 2.17). Dagegen wiesen *drf1*-Deletionsmutanten, bei denen die Septenbildung während des Hefe-artigen Wachstums lediglich verlangsamt ist, normale Aktivität auf. Dies deutet darauf hin, dass die Bildung des sekundären Septums für die Sekretion von Cts1 in Sporidien essentiell ist. Möglicherweise kommt es während der Cytokinese, ähnlich wie bei Don1, Don3 und Cdc42, zum Transport von Cts1 mittels Pi-3-P-reicher Vesikel zur Teilungszone, was zur Akkumulation von Cts1 führt (Abb. 3.8 A, links). Durch die Bildung des sekundären Septums wird anschließend ein Kompartiment gebildet, das vollständig vom Cytoplasma der Mutter- und Tochter-Zelle getrennt ist (Abb. 3.8 A, mitte). Durch die lokale Wirkung von Cts1 und möglicherweise anderer zellwandabbauender Enzyme, wie z.B. Glukanasen, kommt es zur Auflösung der Teilungszone und zur Freisetzung ihres Inhaltes (Abb. 3.8 A, rechts), wodurch Cts1 in den Kulturüberstand gelangt. In Filamenten zeigt auch die *drf1*-Deletionsmutante eine verringerte Cts1-Aktivität, was darauf zurückzuführen sein könnte, dass in diesem Stamm die Septenbildung am basalen Pol von Filamenten, ebenso wie in *don1Δ*- und *don3Δ*-Mutanten, defekt ist. Auch *rrm4Δ*-Mutanten zeigten während des filamentösen Wachstums eine verringerte Cts1-Sekretion

(Koepke *et al.*, 2011). Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass *rrm4Δ*-Filamente zunächst bipolar auswachsen (Becht *et al.*, 2006). Dadurch wird zunächst kein basaler Pol etabliert und es kommt zu verzögerter Septenbildung.

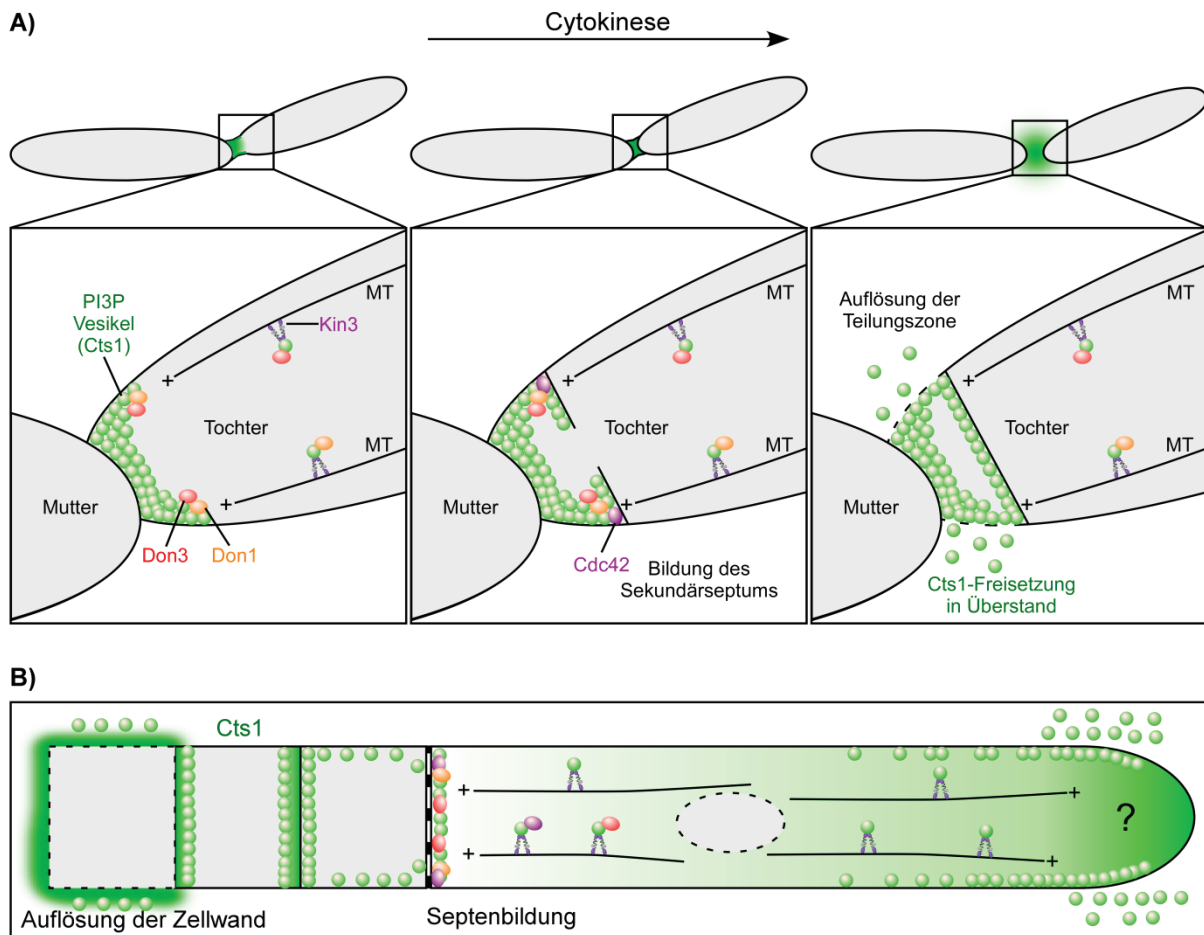


Abb. 3.8: Model der Sekretionsmechanismen von Cts1. Schematische Darstellung möglicher Mechanismen der Cts1-Sekretion. **(A)** Im Verlauf der Cytokinese kommt es in Sporidien zu einer Cts1-Akkumulation in der Teilungszone. Durch die Bildung des sekundären Septums wird ein extrazelluläres Kompartiment gebildet, welches Cts1 enthält. Durch die Wirkung der Chitinasen Cts1 und Cts2 (und wahrscheinlich weiterer Zellwandabbauender Enzyme) kommt es zur Auflösung der Teilungszone, wodurch Cts1 freigesetzt wird. **(B)** In Filamenten lokalisiert Cts1 in der sub-apikalen Zone und in spezifischen Mustern in den leeren Abschnitten des basalen Pols. Wahrscheinlich kommt es auch hier zum Abbau von Zellwandmaterial und zur Septierungsabhängigen Freisetzung von Cts1. Dennoch scheint in Filamenten ein zweiter, Septierungs-unabhängiger Sekretionsweg zu bestehen, der möglicherweise eine Hetero-Oligomerisierung von Septinen voraussetzt. Die Faktoren, die diesem Sekretionsweg zugrunde liegen sind jedoch noch unbekannt.

Interessanterweise kommt es in *don1*- und *don3*-Deletionsmutanten während des filamentösen Wachstums jedoch zu einem leichten Anstieg der Cts1 Aktivität gegenüber Sporidien (Abb. 2.17). Möglicherweise kommt es durch die Filamentinduktion zur Auflösung des Cytokinesedefekts, wodurch „gespeichertes“ Cts1 freigesetzt wird. Dafür spricht auch, dass Cts1 an jeder Mutter-Tochter-Grenze in den Cytokinese-defekten Zellaggregaten, die aus bis zu 30 Zellen bestehen können, akkumuliert. *don1D*- oder *don3D*-Filamente liegen dagegen häufig einzeln oder paarweise vor und eine typische Cts1-Aggregation ist nicht vorhanden,

was die Hypothese der Cts1-Freisetzung bekräftigt. Durch den Einsatz sog. Chemisch-genetischer Analysen (Shah *et al.*, 1997; Bishop *et al.*, 2001; Burkhard *et al.*, 2007) könnte diese Theorie überprüft werden. Die Funktionalität eines chemisch-genetischen Ansatzes zur Untersuchung der Cytokinese wurde in *U. maydis* bereits gezeigt und setzt den Einsatz einer leicht modifizierten Variante der Serin/Threonin-Kinase Don3 voraus (Don3-as; Böhmer *et al.*, 2008). Diese ist in der Lage an Inhibitoren, wie NA-PP1 zu binden, was zur reversiblen Inaktivierung führt. Nach Auswaschen des Inhibitors wird die Funktion der Kinase wieder hergestellt, wodurch der Cytokinese-Defekt aufgelöst wird, was zur Freisetzung von Cts1 führen müsste.

Möglicherweise existiert in Filamenten jedoch auch ein zweiter, septierungsunabhängiger Sekretionsweg (Abb. 3.8 B). Dafür spricht, dass in Filamenten verschiedener Septinmutanten ebenfalls reduzierte Cts1-Sekretion beobachtet wurde (pers. Mitteilung, S. Zander). Diese Mutanten weisen sowohl während des Hefe-artigen, als auch während des filamentösen Wachstums eine wildtypische Zellmorphologie und Septenbildung auf, sodass ein ein wie oben beschriebener Einfluss ausgeschlossen werden kann. Außerdem spricht die sub-apikale Lokalisation von Cts1G gegen eine ausschließlich basal-gerichtete Sekretion. Möglicherweise ist auch Rrm4, durch seinen Einfluss auf die Septin-Translation und -Lokalisation, indirekt an einem solchen Sekretionsweg beteiligt.

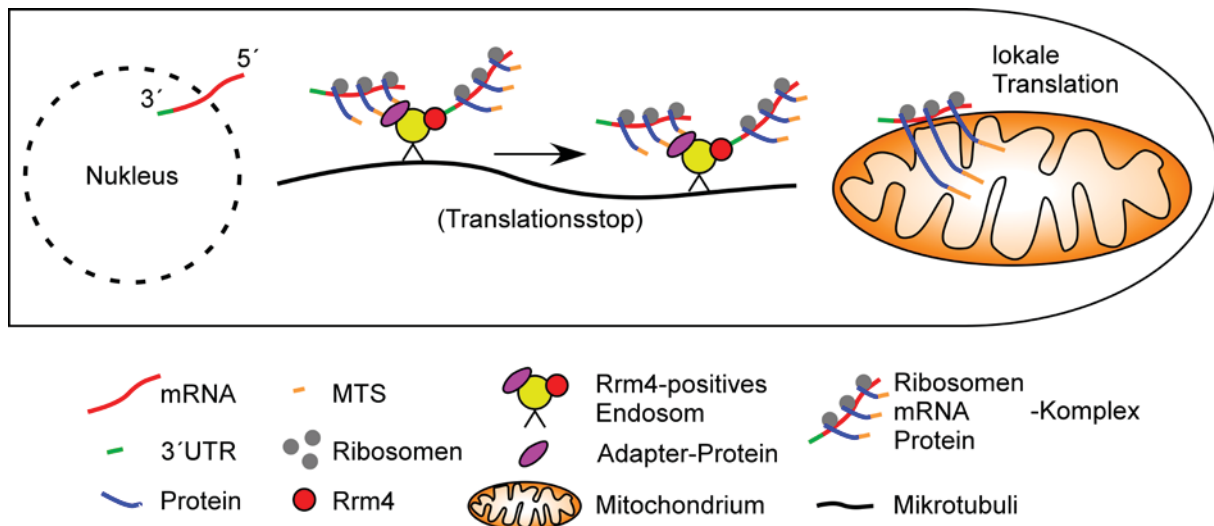
3.2 Der Einfluss von Rrm4 auf die Biogenese von Mitochondrien

In Vorarbeiten wurden durch *in vivo* UV-CLIP Experimente und differenzielle Proteomanalyse Ziele des Rrm4-abhängigen RNA-Transports identifiziert, die für mitochondrialen Proteine kodieren (zusammengefasst in Abb. 2.29; König *et al.*, 2009; Koepke, 2010; Haag, 2013). Die meisten dieser Proteine sind Atmungskettenproteine oder, wie im Falle der AAA-Protease Afg3, mit der inneren Mitochondrienmembran assoziiert (Arlt *et al.*, 1996; Ramelot *et al.*, 2014). Die meisten der identifizierten Ziele sind den Komplexen I (NADH-Dehydrogenase) und V (ATP-Synthase) zuzuordnen.

Obwohl gezeigt wurde, dass der Verlust von Rrm4 zu einer erhöhten Superoxid-Produktion führt (Koepke, 2010), ist der genaue Zusammenhang zwischen Rrm4-vermitteltem mRNA-Transport und Mitochondrienfunktion noch unklar. Im Falle des Septins Cdc3 ist Rrm4 notwendig, um die lokale Translation an Endosomen zu gewährleisten (Baumann *et al.*, 2014). Analog dazu könnte Rrm4 bei mitochondrialen Zielen für den Transport von mRNAs und Ribosomen zu Mitochondrien zuständig sein, wodurch die lokale Translation und evtl. der co-translationale Import gewährleistet werden könnte. In *S. cerevisiae* und Säugetieren

wurde bereits gezeigt, dass mRNAs mitochondrialer Proteine oftmals mit Mitochondrien assoziiert vorliegen (Sylvestre *et al.*, 2003; Kaltimbacher *et al.*, 2006). Dabei ist entweder die 3'UTR der mRNA oder die MTS des Zielproteins nötig und ausreichend um die jeweilige mRNA in die Nähe der Mitochondrien zu adressieren (Margeot *et al.*, 2002; Corral-Debrinski *et al.*, 2000). Vor allem mRNAs von Proteinen der Atmungskette liegen oft mit Mitochondrien assoziiert vor, was für die respiratorische Funktion essentiell ist (Matsumoto *et al.*, 2012; Margeot *et al.*, 2002). Neben Erkennungssequenzen der mRNA oder der Proteine, werden oft weitere Faktoren, wie z.B. RNA-bindende Proteine oder Bestandteile des Translokase-Komplexes der äußeren Mitochondrien-Membran (TOM), für die Verankerung der mRNPs an Mitochondrien benötigt (Gadir *et al.*, 2011). Außerdem konnten bereits vor über 30 Jahren Hinweise darauf geliefert werden, dass auch Ribosomen, ähnlich wie beim rauen ER, mit Mitochondrien assoziiert sind und dass mitochondriale Proteine aufgrund der beobachteten kurzen Zeitspanne zwischen Translationsstart und Import co-translational importiert werden müssen (Kellems und Butow, 1972; Price und Verner, 1993). Die lokale Translation mitochondrialer Proteine wurde kürzlich mit Hilfe Nährungs-spezifischer Ribosomenanalyse (*proximity-specific ribosome-profiling*) in *S. cerevisiae* bestätigt (Williams *et al.*, 2014). Ein ähnlicher Mechanismus ist auch in Filamenten von *U. maydis* denkbar, um die Proteinversorgung distaler Mitochondrien sicherzustellen (Abb. 3.8). Dabei würde die 3'UTR cytoplasmatischer mRNAs und/oder die MTS naszierender Zielproteine von Rrm4 und möglicherweise anderen Adapter-Proteinen erkannt und an Endosomen gekoppelt transportiert, um eine Verteilung im Filament sicherzustellen. In der Nähe von Mitochondrien könnte der mRNP dann von weiteren RNA-Bindenden Proteinen oder durch die Interaktion der MTS mit dem TOM-Komplex bzw. MTS-Rezeptoren „abgeladen“ werden. Anschließend würden die Proteine lokal translatiert und co-translational in die Mitochondrien-Matrix transloziert. Somit könnte eine schnelle und effiziente Versorgung aller Mitochondrien im ca. 100 µm langen Filament sichergestellt werden.

Abb. 3.8 (nächste Seite): Modell für den Transport mitochondrialer mRNAs und den co-translationalen Proteinimport. Die 3'UTR cytoplasmatische mRNAs wird von Rrm4 erkannt und an Endosomen gekoppelt. Der mRNP, welcher die gesamte Translationsmaschinerie enthält, wird dann entlang von Mikrotubuli transportiert. In der Nähe von Mitochondrien interagiert die mRNA mit Mitochondrien-assoziierten RNA-Bindeproteinen, wodurch der mRNP fixiert wird. Neu translatierte Proteine werden co-translational in die Mitochondrien transloziert. Alternativ könnte auch die MTS naszierender Proteine von Rrm4 oder weiteren Adapter-Proteinen an Endosomen fixiert werden. In der Nähe von Mitochondrien wird die MTS dann von Komponenten des TOM-Komplexes oder MTS-Rezeptoren erkannt, worauf die naszierenden Proteine gebunden und co-translational importiert werden.



3.2.1 Filamentöses Wachstum hängt von der Atmungskettenfunktion ab

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Inhibition der Atmungskette durch die Inhibitoren Rotenon, Antimycin-A und Myxothiazol zum Verlust des filamentösen Wachstums führt. Da der ATP-abhängige molekulare Transport von Rrm4-positiven Endosomen durch die Inhibition nicht gestört ist, kann geschlussfolgert werden, dass die sinkende ATP-Menge wahrscheinlich nicht der Grund für die gestörte Morphogenese ist.

Neben der ATP-Produktion haben Mitochondrien vielfältige Funktionen in der Zelle. Sie können Calcium-Ionen (Ca^{2+}), Cytochrom-C und Proteine aufnehmen oder ausschütten (Dumollard *et al.*, 2007; Duchen, 2000; Kroemer, 2003). Außerdem produzieren sie reaktiven Sauerstoff, die Reduktionsäquivalente NADH/H^+ und FADH_2 und intrazelluläre Metabolite (Turrens, 2003; MacDonald *et al.*, 2005; Brookes *et al.*, 2004; Pagliarini und Dixon, 2006). Des Weiteren spielen Mitochondrien eine wichtige Rolle bei der Bindung und dem Abbau schädlicher Proteinaggregate während der Zellteilung (Zhou *et al.*, 2014; Vevea *et al.*, 2014). Daher können Mitochondrien Ca^{2+} -Signalprozesse, das Redox-Potential sowie zelluläre Alterungsprozesse beeinflussen (Balaban *et al.*, 2005; Hajnóczky *et al.*, 2014).

Die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration sowie die Lokalisation von Ca^{2+} -Ionen kann die Polarität von Zellen beeinflussen. In Neuronen wird durch Ca^{2+} -Ionen ein molekularer Schalter, bestehend aus der Calmodulin-abhängigen Protein Kinase II (CaMKII) und Calcineurin (CaN), reguliert, der die Axon-Bewegung am Wachstumspol steuert (Sutherland *et al.*, 2014; Gomez *et al.*, 2001; Holliday *et al.*, 1991; Weihuang *et al.*, 2015). Auch in Pilzen ist ein derartiger, Ca^{2+} -abhängiger Regulationsmechanismus bekannt. Cytoplasmatische Ca^{2+} -Ionen werden durch die EF-Hand Domäne von Calmodulin gebunden und aktivieren unter anderem die Phosphatase Calcineurin. Dadurch wird eine Reihe von C2H2-Zinkfinger

Transkriptions-faktoren aktiviert, wodurch die Expression abhängiger Gene reguliert wird (Watanabe *et al.*, 1995; Cyert, 2001; Bodvard *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2015). Außerdem haben Ca^{2+} -Ionen Einfluss auf den Vesikel-Transport und die Sekretionsleistung filamentöser Pilze, wodurch die Polarität und der Thigmotropismus beeinflusst werden (Stephenson *et al.*, 2014; Brand *et al.*, 2008). Analog könnte ein gestörtes Ca^{2+} -Gleichgewicht durch eine mitochondriale Dysfunktion in *rrm4Δ*-Stämmen oder durch Inhibitoren zur Beeinträchtigung des polaren Wachstums von *U. maydis* führen. Dafür spricht auch, dass eine gestörte Ca^{2+} -Regulation zu erhöhter ROS-Produktion in Mitochondrien führt (Chatre und Ricchetti, 2014; Brookes *et al.*, 2004), wie sie auch in *rrm4Δ*-Filamenten beobachtet wurde (Koepke, 2010). Die erhöhte ROS-Produktion könnte anschließend Auswirkungen auf die Thio-Regulation von Protein-Thyrosin-Phosphatasen und Cystein-reichen Transkriptionsfaktoren haben oder die Proteinsynthese durch Oxidation von Thioredoxinen beeinflussen (Heller und Tudzynski, 2011; Scott und Eaton, 2008). Der pleiotrope Phänotyp von *rrm4Δ*-Mutanten spricht jedoch dafür, dass der Verlust des Rrm4-abhängigen mRNA-Transports multiple, zelluläre Prozesse beeinflusst. Eines der Ziele von Rrm4 ist z.B. die mRNA des kleinen G-Proteins Rho3 (König *et al.*, 2009). In *B. cinerea* wurde kürzlich gezeigt, dass Rho3 an der Lokalisation von Mitochondrien und ROS an der Hyphenspitze beteiligt ist (An *et al.*, 2015). Möglicherweise führt der Verlust von *rrm4* in *U. maydis* zu einer gestörten Funktion von Rho3, wodurch die Mitochondrienfunktion beeinträchtigt wird. Dies würde zu einem gestörten ROS- und Ca^{2+} -Gleichgewicht führen, wodurch wichtige Signalwege der Zelle beeinflusst würden.

3.2.2 Einfluss von Rrm4 auf den mitochondrialen Proteinimport

Um zu testen, ob die Effizienz des mitochondrialen Proteinimports in *rrm4Δ*-Filamenten gestört ist, wurde die Importdynamik von Nuo1G mittels FRAP-Analyse untersucht. Obwohl die Messungen eine klare Tendenz zeigten, wonach der Proteinimport in distale Mitochondrien in *rrm4Δ*-Filamenten deutlich ineffizienter ist, konnten keine akkuraten Daten ermittelt werden, da motile, ungebleichte Mitochondrien stochastisch in den Messbereich einwanderten. Mitochondrien sind in *U. maydis* meist stationär (Steinberg und Schuster, 2011). Dennoch haben sie die Fähigkeit entlang des Mikrotubuli-Cytoskeletts zu wandern, was besonders oft mit Fusions- oder Teilungs-Prozessen assoziiert ist (Fuchs *et al.*, 2002; Steinberg und Schuster, 2011). Da sowohl der Transport von Mitochondrien als auch von Rrm4-positiven mRNPs und Endosomen Mikrotubuli-abhängig ist, besteht experimentell nicht die Möglichkeit einen der Transportprozesse selektiv zu inhibieren und somit die

Mitochondrienbewegung zu unterbinden (Nangaku *et al.*, 1994; Morris und Hollenbeck, 1995; Becht *et al.*, 2006).

Um unabhängig von fluoreszierenden Markern festzustellen zu können, ob Ziel-mRNAs von Rrm4 lokal an Mitochondrien translatiert werden könnte man sich die Näherungs-spezifische Ribosomenanalyse zu Nutzen machen (Williams *et al.*, 2014; Jan *et al.*, 2014). Dabei co-exprimiert man ein Rrm4-Biotinligase Fusionsprotein und Ribosomen, welche einen Avi-Tag (15 Aminosäuren langes Biotin Akzeptor-Peptid) an der großen oder kleinen Untereinheit tragen (Abb. 3.9 A). In einem Vergleichsstamm werden markierte Ribosomen mit einem Fusionsprotein aus der Biotinligase und einem Protein der äußeren Mitochondrienmembran (z.B. TOM, *translocase of outer mitochondrial membrane*) untersucht. In Anwesenheit von Biotin werden nun Ribosomen, die sich in der Nähe von Rrm4 bzw. TOM befinden, biotinyliert und können anschließend mittels Streptavidin-Affinitätschromatographie aufgereinigt werden. Dabei werden mRNA-Bruchstücke, die von den Ribosomen maskiert werden co-präzipitiert und können anschließend sequenziert werden. Dadurch kann man Ziel-mRNAs identifizieren, welche entweder Rrm4- oder Mitochondrien-assoziiert translatiert werden. Falls Rrm4 an der lokalen Translation mitochondrialer mRNAs beteiligt ist, sollte es eine Überschneidung beider mRNA-Teilgruppen geben. Alternativ kann auch die Peroxidase „APEX“ und das Substrat Biotin-Phenol verwendet werden, was eine kürzere Inkubationszeit ermöglicht und damit falsch-positive Markierung minimiert (Hung *et al.*, 2014; Lam *et al.*, 2014).

Eine weitere Möglichkeit wäre, ein Rrm4-abhängiges Zielprotein N-terminal mit APEX zu markieren und während der Expression einen Translationsstop zu induzieren, damit APEX genügend Reifungszeit hat. Anschließend löst man den Translationsstop auf, wodurch das Zielprotein translatiert und in Mitochondrien transportiert wird. Falls Rrm4 in der Translationsmaschinerie vorhanden ist, sollte es zusammen mit Ribosomen, weiteren Bestandteilen des Rrm4-Partikels und mitochondrialen Zielen biotinyliert werden (Abb. 3.9 B).

APEX hat eine weitere Eigenschaft, die man sich in der Lokalisierung von Endosomen-assoziiert translaterter Proteine zu Nutze machen kann. Es übersteht rabiante Fixierungsmethoden der Elektronenmikroskopie (Hung *et al.*, 2014; Lam *et al.*, 2014). Dadurch können Präparate fixiert werden und die Lokalisation von Proteinen elektronenmikroskopisch untersucht werden. APEX verwendet hierbei das Substrat Diaminobenzidin (DAB), welches in Anwesenheit von H₂O₂ polymerisiert und elektronendichtes Osmiumoxid rekrutiert. Osmium erscheint während der Elektronenmikroskopie als

elektronendichtes, also dunkles Material. Dadurch könnte man zeigen, dass Rrm4-abhängig translatierte Proteine (z.B. Cdc3) in assoziierten Endosomen lokalisieren.

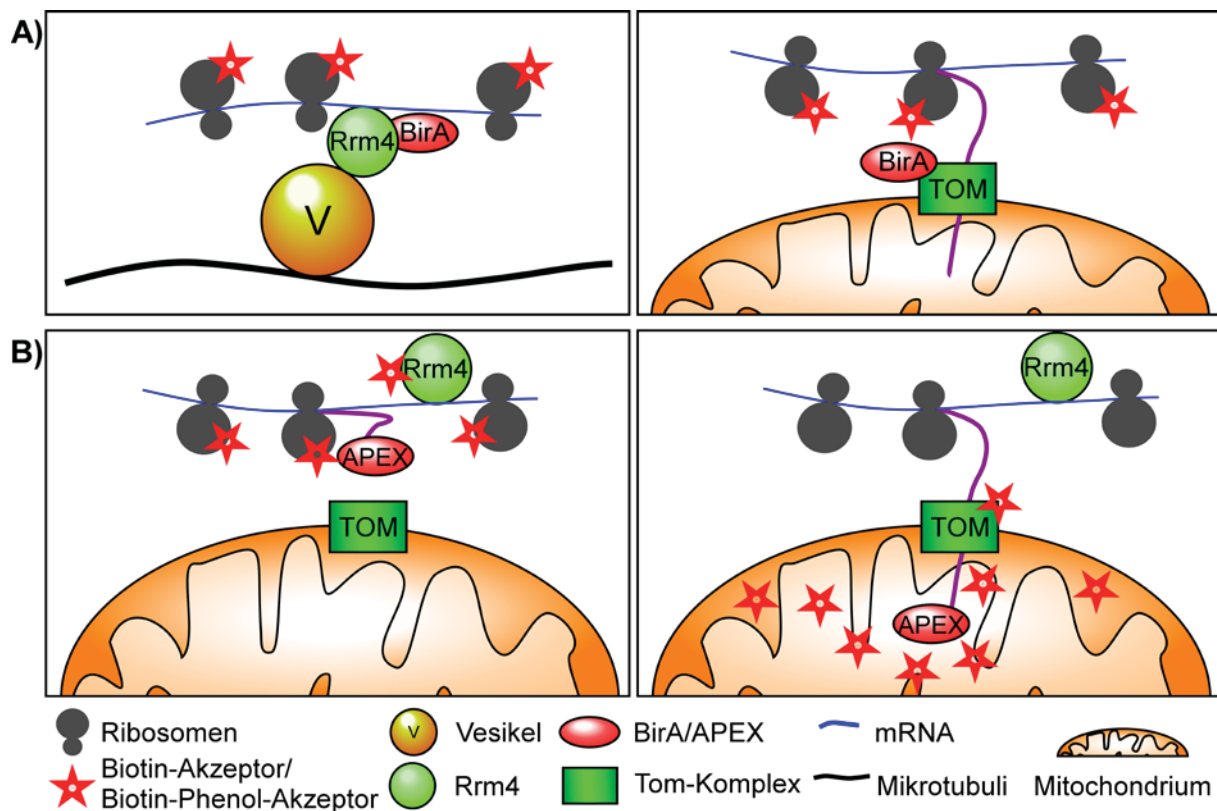


Abb. 3.9: Nahrungs-spezifische Biotinylierung zur Untersuchung lokaler Translation an Mitochondrien. (A) Schematische Darstellung der Nahrungs-spezifischen Ribosomenanalyse. In *U. maydis* Filamenten wird entweder ein Rrm4-BirA oder ein TOM-BirA Fusionsprotein mit Avi-markierten Ribosomen co-exprimiert. Bei räumlicher Annäherung von Rrm4 und Ribosomen oder während der lokalen Translation an Mitochondrien, werden die Ribosomen durch BirA biotinyliert und können mittels Streptavidin Affinitätschromatographie aufgereinigt werden. Durch die enge Assoziation von Ribosomen und Teilen der mRNA bleibt diese erhalten und kann anschließend sequenziert werden, um mRNA zu identifizieren, die Rrm4- oder Mitochondrien-assoziiert translatiert werden. (B) Alternativ zu BirA kann auch die Peroxidase APEX verwendet werden, die das Substrat Biotin-Phenol verwendet. Durch die N-terminale Fusion an Zielproteine könnte getestet werden, ob diese sowohl mit Rrm4, als auch mit Mitochondrien assoziiert vorliegen. Diese Methode eignet sich vor allem für Proteine, die co-translational importiert werden, da so eine falsch-positive Biotinylierung cytoplasmatischer Proteine vermieden werden kann.

3.2.3 Etablierung neuer Fluoreszenzmarker zur Untersuchung dynamischer Prozesse

Die in dieser Arbeit durchgeführten FRAP-Analysen zeigten, dass während der langen Dauer der Fluoreszenzrückkehr ungebleichte Mitochondrien in den Messbereich einwandern. Dadurch wird das Ergebnis verfälscht, sodass ein akkurater Vergleich von Wildtyp und *rrm4Δ*-Stämmen unmöglich ist. Zwar kann mit den oben beschriebenen, alternativen Methoden gezeigt werden, ob Rrm4 an der Translation mitochondrialer Proteine beteiligt ist, dennoch geben sie keine Auskunft über die Dynamik des mitochondrialen Proteinimports in verschiedenen Bereichen des Filaments. Deshalb wurden in dieser Arbeit alternative

Reporterproteine etabliert, welche die Untersuchung dynamischer Prozesse in *U. maydis* in Zukunft erleichtern sollen. Superfolder Gfp (sfGfp) ist eine schnell Gfp-faltende Variante, die innerhalb von fünf bis zehn Minuten reift und im Vergleich zu eGFP eine höhere pH- und Oxidations-Toleranz aufweist (Pédelacq *et al.*, 2006; Aronson *et al.*, 2011). Das Gen für sfGfp wurde in dieser Arbeit für die Expression in *U. maydis* optimiert und es konnte gezeigt werden, dass das Protein funktionell exprimiert wurde. Außerdem wurde es mittels N-terminaler MTS in Mitochondrien lokalisiert. Damit steht mit sfGfp ein weiteres, fluoreszierendes Markerprotein für *U. maydis* zur Verfügung. Dennoch müssen die Eigenschaften, die sfGfp in *U. maydis* besitzt noch näher charakterisiert werden. Dabei wäre zum einen interessant, ob sfGfp in *U. maydis* eine schnelle Faltung aufweist und zum anderen, ob es sich für den Einsatz in extremen Milieus, wie z.B. Vakuolen oder Endosomen, eignet. Falls sich die publizierte Faltungszeit von ca. fünf Minuten bestätigen würde (Pédelacq *et al.*, 2006), wäre sfGfp gut geeignet um schnelle dynamische Prozesse, wie z.B. Translation oder co-translationalen Transport zu untersuchen. Außerdem kann die schnelle Faltung von sfGfp genutzt werden, um das Alter von Proteinen mittels Lichtmikroskopie bestimmen zu können. Dazu wird das Zielprotein mit mCherry und sfGfp markiert. mCherry hat eine mittlere Reifungszeit von ungefähr 40 Minuten (Merzlyak *et al.*, 2007). Durch die unterschiedlichen Reifungszeiten der Fluorophore ergibt sich zu jedem Zeitpunkt (bis zur Vollständigen Reifung beider Fluorophore) ein unterschiedliches mCherry/sfGfp-Fluoreszenzverhältnis. In Bezug auf mitochondrialen Proteinimport kann sfGfp für weiterführende FRAP-Experimente genutzt werden. Möglicherweise lässt sich durch die kurze Reifungszeit die Dauer der Fluoreszenzrückkehr verringern, sodass die Mitochondrienmotilität die Messung weniger stark beeinflusst.

Neben sfGfp wurde mEos2, ein photokonvertierbares Fluorophor, für den Einsatz in *U. maydis* optimiert. Analog zu sfGfp konnte gezeigt werden, dass mEos2 funktionell exprimiert wird und die Photokonvertierbarkeit wurde mittels LASER- und HXP-Bestrahlung bestätigt. Die LASER-Konvertierung ermöglicht es kleine, subzelluläre Bereiche in Filamenten zu konvertieren (z.B. einzelne Organellen oder Endosomen), während eine großflächigere Bestrahlung mittels HXP-Lampe den Vorteil hat gesamte Bildausschnitte zu konvertieren. Die Helligkeitswerte der Ausgangsfluoreszenz von mEos2 weichen in *U. maydis* etwas von den beschriebenen Literaturwerten ab. In dieser Arbeit wurde für mEos2 eine etwa 0,8-fache eGfp-Fluoreszenz gemessen. Laut Literatur sollte mEos2 verglichen mit eGfp jedoch eine 1,4-fache Ausgangsfluoreszenz besitzen (McKinney *et al.*, 2009). Die niedrigere Ausgangsfluoreszenz kann zwei Gründe haben. Zum einen ist es möglich, dass

mEos2 im intrazellulären Milieu von *U. maydis* an Helligkeit verliert, oder die Belichtungszeiten müssen weiter optimiert werden. Möglicherweise kommt es durch die 488 nm Bestrahlung bereits zur partiellen Photokonversion, wodurch die Ausgangsfluoreszenz beeinflusst würde.

Durch die Verwendung von mEos2 können in Zukunft dynamische Prozesse in *U. maydis* besser untersucht werden. Vor allem der Einfluss von Hintergrundfluoreszenz kann durch die Möglichkeit zur Photokonversion minimiert werden. So könnte z.B. die Rrm4-abhängige Bewegung translationsaktiver Ribosomen an Endosomen visualisiert werden. Für die Untersuchung des mitochondrialen Proteinimports können Mitochondrien in der Nähe des Messbereichs photokonvertiert werden, sodass zwischen Proteinrückkehr und einwandernden Mitochondrien unterschieden werden kann. Dadurch wäre es im Gegensatz zur Verwendung von eGfp möglich, die Abhängigkeit der Dynamik des Proteinimports von Rrm4 subzellulär zu untersuchen und es wäre z.B. ein Vergleich Kern-naher und distaler Mitochondrien in *U. maydis* Filamenten möglich.

4. Material und Methoden

Hier beschriebene, standardisierte Methoden und/oder Medienzusammensetzungen, sowie Informationen zu den verwendeten Materialien sind zum Teil wörtlich oder leicht modifiziert aus den Methodensammlungen der AG Feldbrügge und der AG Kämper (KIT) übernommen.

4.1 Material und Bezugsquellen

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

Chemikalien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien waren p.a. Qualität und wurden von den Firmen Ambion, Amersham, Applichem GmbH, BioRad, Biozym Scientific GmbH, Carl Roth, Difco, Duchefa, Fluka, GE Healthcare, Gerbu, Invitrogen (Life Technologies), Merck, Riedel-de-Haën, Roche, Serva, Sigma-Aldrich, Thermo Fisher Scientific und VWR bezogen. Für weitere Einzelheiten siehe (Brachmann, 2001).

Puffer und Lösungen

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

Tab 4.1: In dieser Arbeit verwendete Enzyme

Enzym	Bezugsquelle
Alkalische Phosphatase	Roche
Lysing Enzyme aus <i>T. harzianum</i>	Sigma
Lysozym	Merck
Novozym 234 Novo Nordisc	Novo Nordisc
Phusion DNA-Polymerase	Finnzymes (NEB)
Restriktionsendonukleasen	New England Biolab
Ribonuklease A	Boehringer
Taq-DNA-Polymerase	Laborpräparation
T4-DNA-Ligase	Roche

Verwendete Kits

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Kits verwendet:

Tab 4.2: In dieser Arbeit verwendete Kits

Name	Hersteller	Verwendungszweck
Plasmid Midi Kit (100)	Qiagen	Plasmidpreparation aus <i>E. coli</i>
JETSORB Gel Extraction Kit	Genomed	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen
JETQUICK DNA Clean-Up Kit	Genomed	Aufreinigung von Plasmiden oder PCR-Produkten
PCR-DIG-labeling Kit	Roche	Herstellung Digoxigenin markierter DNA-Sonden
TOPO-TA cloning Kit	Life Technologies	Zwischenklonierung von DNA-Fragmenten
SureClean	Bioline	Aufreinigung von PCR-Produkten
RTS 100 Wheat Germ CECF Weg	5 Prime	<i>In vitro</i> Expression rekombinanter Proteine

Medien

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

LB-Medium

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

YT-Festmedium

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

dYT-Flüssigmedium

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

Medien für die Kultivierung von *U. maydis*

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

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

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

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

Nitrat-Minimalmedium (Scherer *et al.*, 2006)
62,5 ml Salz-Lösung (s.u.)

3,8 g KNO₃

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

Salz-Lösung (Holliday, 1974)

8 g KH₂PO₄

2 g Na₂SO₄

1 g MgSO₄ * 7 H₂O

Mit H₂O_{bid.} auf 1L aufgefüllt und autoklaviert.

Spurenelemente-Lösung (Holliday, 1974)

60 mg H₃BO₃

191 mg MnCl₂

400 mg ZnCl₂

47 mg NaMoO₄ * 2 H₂O

140 mg FeCl₃ * 6 H₂O

557 mg CuSO₄ * 5 H₂O

Mit H₂O_{bid.} auf 1L aufgefüllt und sterilfiltriert.

Vitamin-Lösung (Holliday, 1974)

100 mg Thiamin

20 mg Calciumpanthothenat

50 mg p-Aminobenzoesäure

20 mg Nikotinsäure

20 mg Cholinchlorid

40 mg myo-Inositol

50 mg Folsäure

Mit H₂O_{bid.} auf 1L aufgefüllt und sterilfiltriert.

NSY-Glycerin (Einfriermedium)

8 g Nutrient Broth

1 g Hefeextrakt

5 g Sukrose

800 ml 87% Glycerin

Mit H₂O_{bid.} auf 1L aufgefüllt und sterilfiltriert.

PD-Festmedium

39 g Kartoffeleextrakt-Glukose Agar

Mit H₂O_{bid.} auf 1L aufgefüllt und autoklaviert.

Regenerationsagarlight (Schulz *et al.*, 1990)

a) Top-Agar:

15 g (w/v) Agar

182,2 g (w/v) Sorbitol

10 g (w/v) Hefeextrakt

4 g (w/v) Bacto Pepton

4 g (w/v) Saccharose

Mit H₂O_{bid.} auf 1L aufgefüllt und autoklaviert.

b) Bottom-Agar

wie a), zusätzlich wurden Antibiotika zugegeben:

Für Hygromycin betrug die Endkonzentration

400 µg/ml, für Nourseothricin 300 µg/ml, für

Carboxin 4 µg/ml und für Geneticin (G418) 1000

µg/ml..

YEPSlight-Flüssigmedium (Tsukuda *et al.*, 1988)

10 g Hefeextrakt

4 g Bacto Pepton

4 g Saccharose

Mit H₂O_{bid.} auf 1L aufgefüllt und autoklaviert.

Antibiotika Konzentrationen für die Selektion von *E. coli*

Tab 4.3 Antibiotikakonzentrationen in Selektivmedien für *E. coli*

Antibiotikum	Endkonzentration
Ampicillin	100 µg/ml
Kanamycin	25 µg/ml
Chloramphenicol	34 µg/ml

Antibiotika Konzentrationen für die Selektion von *U. maydis*

Tab 4.4: Antibiotikakonzentrationen in Selektivmedien für *U. maydis*

Antibiotikum	CM-Festmedium	Regenerationsagar (Bottom)
Hygromycin (B)	200 µg/ml	400 µg/ml
Nourseothricin	150 µg/ml	300 µg/ml
Carboxin	2 µg/ml	4 µg/ml
Geneticin	500 µg/ml	1000 µg/ml

4.1.2 Stämme

E. coli Stämme

Für Standardklonierungen wurde der Stamm TOP10 (Invitrogen) verwendet, bei dem es sich um ein Derivat des *E.coli*-Stamms DH10B mit folgenden genetischen Markern handelt: *F-mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZAM15 ΔlacX74 nupG recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(StrR) endA1 λ-*.

Für die heterologe Proteinexpression in *E. coli* wurde der Stamm Rosetta pLysS (DE3; Novagen) verwendet, bei dem es sich um ein Derivat des *E. coli* Stammes BL21 handelt. Dieser Stamm ist für die heterologe Expression optimiert und exprimiert sechs für *E. coli* seltene tRNAs (für die Codons: AUA, AGG, AGA, CUA, CCC, and GGA). Genotyp: *F⁻ ompT hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) gal dcm (DE3) pLysSRARE (Cam^R)*.

Weiterhin wurde für die heterologe Proteinexpression der *E. coli* Stamm Rosetta-gami (DE3) pLysS (Novagen) verwendet, bei dem es sich um ein Derivat des *E. coli* Stammes Origami (K-12) handelt. Dieser Stamm enthält die *trcB/gor* Mutation, welche die Ausbildung von Sulfid-Brücken ermöglicht. Somit ist dieser Stamm für die heterologe Expression eukaryotischer Proteine optimiert. Genotyp: *Δ(ara-leu)7697 ΔlacX74 ΔphoA PvuII phoR araD139 ahpC galE galK rpsL (DE3) F'[lac⁺ lacI^f pro] gor522::Tn10 trxB pLysSRARE (Cam^R, Str^R, Tet^R)*

Die Nomenklatur von *E. coli*-Stämmen richtet sich nach (Demerec *et al.*, 1966).

Tab 4.5: Im Rahmen dieser Arbeit hergestellte *E. coli* Stämme

Stamm	Genotyp	Resistenz	Referenz
E. coli Rosetta Gami His-cts2	$\Delta(ara-leu)7697 \Delta lacX74 \Delta phoA PvuII$ $phoR araD139 ahpC galE galK rpsL$ (DE3) $F'[lac^+ lacI^q pro] gor522::Tn10$ $trxB$ pLysSRARE; pET15b-His:cts2	Amp ^R , Cam ^R , Kan ^R , Tet ^R , Strep ^R	diese Arbeit
E. coli Rosetta Gami His-cts3	$\Delta(ara-leu)7697 \Delta lacX74 \Delta phoA PvuII$ $phoR araD139 ahpC galE galK rpsL$ (DE3) $F'[lac^+ lacI^q pro] gor522::Tn10$ $trxB$ pLysSRARE; pET15b-His:cts3	Amp ^R , Cam ^R , Kan ^R , Tet ^R , Strep ^R	diese Arbeit
E. coli Rosetta Gami GST-cts2	$\Delta(ara-leu)7697 \Delta lacX74 \Delta phoA PvuII$ $phoR araD139 ahpC galE galK rpsL$ (DE3) $F'[lac^+ lacI^q pro] gor522::Tn10$ $trxB$ pLysSRARE; pGEX-gst:cts2	Amp ^R , Cam ^R , Kan ^R , Tet ^R , Strep ^R	diese Arbeit
E. coli Rosetta Gami GST-cts3	$\Delta(ara-leu)7697 \Delta lacX74 \Delta phoA PvuII$ $phoR araD139 ahpC galE galK rpsL$ (DE3) $F'[lac^+ lacI^q pro] gor522::Tn10$ $trxB$ pLysSRARE; pGEX-gst:cts3	Amp ^R , Cam ^R , Kan ^R , Tet ^R , Strep ^R	diese Arbeit
His-Cts2 (E. coli Rosetta pLys)	$F^- ompT hsdS_B(r_B^- m_B^-) gal dcm$ (DE3) pLysSRARE (Cam ^R); pET15b-His:cts2	Amp ^R , Cam ^R	diese Arbeit
His-Cts3 (E. coli Rosetta pLys)	$F^- ompT hsdS_B(r_B^- m_B^-) gal dcm$ (DE3) pLysSRARE (Cam ^R); pET15b-His:cts3	Amp ^R , Cam ^R	diese Arbeit
Gst-Cts2 (E. coli Rosetta pLys)	$F^- ompT hsdS_B(r_B^- m_B^-) gal dcm$ (DE3) pLysSRARE (Cam ^R); pGEX-gst:cts2	Amp ^R , Cam ^R	diese Arbeit
Gst-Cts3 (E. coli Rosetta pLys)	$F^- ompT hsdS_B(r_B^- m_B^-) gal dcm$ (DE3) pLysSRARE (Cam ^R); pGEX-gst:cts3	Amp ^R , Cam ^R	diese Arbeit

Maisvarietäten (*Zea mays* spec.)

Für Pflanzeninfektionsexperimente zur Bestimmung der Virulenz von *U. maydis* Stämmen wurde die Maisvarietät „Early Golden Bantam“ (Olds Seed Company, Madison, Wisconsin, USA) verwendet.

U. maydis Stämme

Tab. 4.6: In dieser Arbeit verwendete Ausgangsstämme

Stamm	Genotyp	Resistenz	Referenz
FB1	<i>a1,b1</i>	-	Banuett und Herskowitz, 1989
FB2	<i>a2,b2</i>	-	Banuett und Herskowitz, 1989
AB31	<i>a2,P_{crg1}:bE1,P_{crg1}:bW2</i>	Phleo ^R	Brachmann <i>et al.</i> , 2001
AB33	<i>a2,P_{nar}:bE1,P_{nar}:bW2</i>	Phleo ^R	Brachmann <i>et al.</i> , 2001
SG200	<i>a1:mfa2,bE1,bW2</i>	Phleo ^R	Kämper <i>et al.</i> , 2006
AB33rrm4Δ	<i>a2,P_{nar}:bE1,P_{nar}:bW2, rrm4Δ, hyg^R</i>	Phleo ^R ,Hyg ^R	Becht <i>et al.</i> , 2006
AB33cts1Δ	<i>a2,P_{nar}:bE1,P_{nar}:bW2, cts1Δ, hyg^R</i>	Phleo ^R ,Hyg ^R	Koepke <i>et al.</i> , 2011
AB33cts1:eGFP	<i>a2,P_{nar}:bE1,P_{nar}:bW2, cts1:eGFP, nat^R</i>	Phleo ^R ,Nat ^R	Koepke <i>et al.</i> , 2011
AB33nuo2:eGFP	<i>a2,P_{nar}:bE1,P_{nar}:bW2, nuo2:eGFP, nat^R</i>	Phleo ^R ,Nat ^R	Koepke, 2010
AB33nuo2:eGFP, rrm4Δ	<i>a2,P_{nar}:bE1,P_{nar}:bW2, nuo2:eGFP::nat^R,rrm4Δ, hyg^R</i>	Phleo ^R ,Hyg ^R ,Nat ^R	Koepke, 2010
SG200cts1Δ	<i>a1:mfa2,bE1,bW2, cts1Δ, hyg^R</i>	Phleo ^R ,Hyg ^R	Koepke <i>et al.</i> , 2011
AB31don1Δ	<i>a2,P_{crg1}:bE1,P_{crg1}:bW2, don1Δ, hyg^R</i>	Phleo ^R ,Hyg ^R	Weinzierl <i>et al.</i> , 2002
AB31don3Δ	<i>a2,P_{crg1}:bE1,P_{crg1}:bW2, don3Δ, hyg^R</i>	Phleo ^R ,Hyg ^R	Weinzierl <i>et al.</i> , 2002
AB31drf1Δ	<i>a2,P_{crg1}:bE1,P_{crg1}:bW2, drf1Δ, hyg^R</i>	Phleo ^R ,Hyg ^R	Freitag <i>et al.</i> , 2011

Tab. 4.6: Im Rahmen dieser Arbeit hergestellte *U. maydis* Stämme

Stammbezeichnung	Genotyp	Resistenz	Ausgangsstamm	integriertes Plasmid	Lokus
AB31rrm4Δ	<i>a2,P_{nar}:bE1,P_{nar}:bW2, rrm4Δ, hygR</i>	Hyg ^R , Phleo ^R	AB31	<i>prrm4Δ, hygR</i>	<i>rrm4</i>
SG200rrm4Δ	<i>a1:mfa2,bE1,bW2,rrm4Δ, hygR</i>	Hyg ^R , Phleo ^R	SG200	<i>prrm4Δ, hygR</i>	<i>rrm4</i>
AB33nuo1:eGFP	<i>a2,P_{nar}:bE1,P_{nar}:bW2, nuo1:eGFP, hygR</i>	Hyg ^R , Phleo ^R	AB33	<i>pnuo1:eGFP, hygR</i>	<i>nuo1</i>
AB33sod2:eGFP	<i>a2,P_{nar}:bE1,P_{nar}:bW2, sod2:eGFP, hygR</i>	Hyg ^R , Phleo ^R	AB33	<i>psod2:eGFP, hygR</i>	<i>sod2</i>
AB33sod2Δ	<i>a2,P_{nar}:bE1,P_{nar}:bW2, sod2Δ, hygR</i>	Hyg ^R , Phleo ^R	AB33	<i>psod2Δ, hygR</i>	<i>sod2</i>
AB33qcr10:eGFP	<i>a2,P_{nar}:bE1,P_{nar}:bW2, qcr10:eGFP, hygR</i>	Hyg ^R , Phleo ^R	AB33	<i>pqcr10:eGFP, hygR</i>	<i>qcr10</i>
AB33cts2Δ*	<i>a2,P_{nar}:bE1,P_{nar}:bW2, cts2Δ, hygR</i>	Hyg ^R , Phleo ^R	AB33	<i>pcts2Δ, hygR</i>	<i>cts2</i>
AB33cts3Δ*	<i>a2,P_{nar}:bE1,P_{nar}:bW2, cts3Δ, hygR</i>	Hyg ^R , Phleo ^R	AB33	<i>pcts3Δ, hygR</i>	<i>cts3</i>
SG200cts2Δ*	<i>a1:mfa2,bE1,bW2, cts2Δ, hygR</i>	Hyg ^R , Phleo ^R	SG200	<i>pcts2Δ, hygR</i>	<i>cts2</i>
SG200cts3Δ*	<i>a1:mfa2,bE1,bW2, cts3Δ, hygR</i>	Hyg ^R , Phleo ^R	SG200	<i>pcts3Δ, hygR</i>	<i>cts3</i>
AB33cts1Δ, cts2Δ*	<i>a2,P_{nar}:bE1,P_{nar}:bW2, cts1Δ, hygR, cts2Δ, natR</i>	Hyg ^R , Phleo ^R , Nat ^R	AB33cts1Δ	<i>pcts2Δ, natR</i>	<i>cts2</i>

AB33cts1Δ, cts3Δ*	<i>a2, P_{nar}:bE1, P_{nar}:bW2, cts1Δ, hygR, cts3Δ, g418R</i>	Hyg ^R , Phleo ^R , G418 ^R	AB33cts1Δ	pcts3Δ, g418R	cts3
SG200cts1Δ, cts2Δ*	<i>a1:mfa2, bE1, bW2, cts1Δ, hygR, cts2Δ, natR</i>	Hyg ^R , Phleo ^R , Nat ^R	SG200cts1Δ	pcts2Δ, natR	cts2
SG200cts1Δ, cts3Δ*	<i>a1:mfa2, bE1, bW2, cts1Δ, hygR, cts3Δ, g418R</i>	Hyg ^R , Phleo ^R , G418 ^R	SG200cts1Δ	pcts3Δ, g418R	cts3
AB33cts2Δ, cts3Δ**	<i>a2, P_{nar}:bE1, P_{nar}:bW2, cts2Δ, natR, cts3Δ, hygR</i>	Hyg ^R , Phleo ^R , Nat ^R	AB33cts3Δ	pcts2Δ, natR	cts2
SG200cts2Δ, cts3Δ*	<i>a1:mfa2, bE1, bW2, cts2Δ, natR, cts3Δ, hygR</i>	Hyg ^R , Phleo ^R , Nat ^R	SG200cts3Δ	pcts2Δ, natR	cts2
AB33cts1Δ, cts2Δ, cts3Δ**	<i>a2, P_{nar}:bE1, P_{nar}:bW2, cts1Δ, hygR, cts2Δ, natR, cts3Δ, g418R</i>	Hyg ^R , Phleo ^R , G418 ^R , Nat ^R	AB33cts1Δ, cts2Δ	pcts3Δ, g418R	cts3
SG200cts1Δ, cts2Δ, cts3Δ**	<i>a1:mfa2, bE1, bW2, cts1Δ, hygR, cts2Δ, natR, cts3Δ, g418R</i>	Hyg ^R , Phleo ^R , G418 ^R , Nat ^R	SG200cts1Δ, cts2Δ	pcts3Δ, g418R	cts3
AB33P _{otef} :MTS:eGFP	<i>a2, P_{nar}:bE1, P_{nar}:bW2, ipr [P_{otef}:mts_{mrbl}:eGFP], ips</i>	Cbx ^R , Phleo ^R	AB33	pP _{otef} :mts _{mrbl} :eGFP, cbxR	ip ⁵
AB33P _{crj1} :sfGFP	<i>a2, P_{nar}:bE1, P_{nar}:bW2, ipr [P_{crj1}:sfGFP], ips</i>	Cbx ^R , Phleo ^R	AB33	pP _{crj1} :sfGFP, cbxR	ip ⁵
AB33P _{crj1} :mEos2	<i>a2, P_{nar}:bE1, P_{nar}:bW2, ipr [P_{crj1}:mEos2], ips</i>	Cbx ^R , Phleo ^R	AB33	pP _{crj1} :mEos2, cbxR	ip ⁵
AB33P _{crj1} :mcherry	<i>a2, P_{nar}:bE1, P_{nar}:bW2, ipr [P_{crj1}:mcherry], ips</i>	Cbx ^R , Phleo ^R	AB33	pP _{crj1} :mcherry, cbxR	ip ⁵
AB33qcr10:eGFP, rrm4Δ	<i>a2, P_{nar}:bE1, P_{nar}:bW2, qcr10:eGFP, hygR, rrm4Δ, natR</i>	Hyg ^R , Phleo ^R , Nat ^R	AB33qcr10:eGFP	prrm4Δ, natR	rrm4
AB33P _{crj1} :MTS:sfGFP	<i>a2, P_{nar}:bE1, P_{nar}:bW2, ipr [P_{crj1}:mts_{mrbl}:sfGFP], ips</i>	Cbx ^R , Phleo ^R	AB33	pP _{crj1} :mts _{mrbl} :sfGFP, cbxR	ip ⁵
AB33P _{crj1} :MTS:mEos2	<i>a2, P_{nar}:bE1, P_{nar}:bW2, ipr [P_{crj1}:mts_{mrbl}:mEos2], ips</i>	Cbx ^R , Phleo ^R	AB33	pP _{crj1} :mts _{mrbl} :mEos2, cbxR	ip ⁵
AB33P _{otef} :ndi1	<i>a2, P_{nar}:bE1, P_{nar}:bW2, ipr [P_{otef}:ndi1], ips</i>	Cbx ^R , Phleo ^R	AB33	pP _{otef} :ndi1, cbx	ip ⁵
AB33rrm4Δ, P _{crj1} :MTS:sfGFP	<i>a2, P_{nar}:bE1, P_{nar}:bW2, rrm4Δ:hygR, ipr [P_{crj1}:mts_{mrbl}:sfGFP], ips</i>	Hyg ^R , Cbx ^R , Phleo ^R	AB33rrm4Δ	pP _{crj1} :mts _{mrbl} :sfGFP::cbxR	ip ⁵
AB33rrm4Δ, P _{crj1} :MTS:mEos2	<i>a2, P_{nar}:bE1, P_{nar}:bW2, rrm4Δ, hygR, ipr [P_{crj1}:mts_{mrbl}:mEos2], ips</i>	Hyg ^R , Cbx ^R , Phleo ^R	AB33rrm4Δ	pP _{crj1} :mts _{mrbl} :mEos2::cbxR	ip ⁵
AB33P _{otef} :MTS:sfGFP	<i>a2, P_{nar}:bE1, P_{nar}:bW2, ipr [P_{otef}:mts_{mrbl}:sfGFP], ips</i>	Cbx ^R , Phleo ^R	AB33	pP _{otef} :mts _{mrbl} :sfGFP	ip ⁵
AB33P _{otef} :MTS:mEos2	<i>a2, P_{nar}:bE1, P_{nar}:bW2, ipr [P_{otef}:mts_{mrbl}:mEos2], ips</i>	Cbx ^R , Phleo ^R	AB33	pP _{otef} :mts _{mrbl} :mEos2	ip ⁵
AB33rrm4Δ, P _{otef} :MTS:sfGFP	<i>a2, P_{nar}:bE1, P_{nar}:bW2, rrm4Δ, hygR, ipr [P_{otef}:mts_{mrbl}:sfGFP], ips</i>	Hyg ^R , Cbx ^R , Phleo ^R	AB33rrm4Δ	pP _{otef} :mts _{mrbl} :sfGFP	ip ⁵
AB33rrm4Δ, P _{otef} :MTS:mEos2	<i>a2, P_{nar}:bE1, P_{nar}:bW2, rrm4Δ:hygR, ipr [P_{otef}:mts_{mrbl}:mEos2], ips</i>	Hyg ^R , Cbx ^R , Phleo ^R	AB33rrm4Δ	pP _{otef} :mts _{mrbl} :mEos2	ip ⁵
AB33qcr10:eGFP, rrm4Δ	<i>a2, P_{nar}:bE1, P_{nar}:bW2, qcr10:eGFP, hygR, rrm4Δ, natR</i>	Hyg ^R , Nat ^R , Phleo ^R	AB33qcr10:eGFP	prrm4Δ, hygR	rrm4
AB33cts4Δ	<i>a2, P_{nar}:bE1, P_{nar}:bW2, cts4Δ, hygR</i>	Hyg ^R , Phleo ^R	AB33	pcts4Δ, hygR	cts4
AB33cts2:eGFP	<i>a2, P_{nar}:bE1, P_{nar}:bW2, cts2:eGFP, hygR</i>	Hyg ^R , Phleo ^R	AB33	pP _{cts2} :cts2:eGFP, hygR	cts2
SG200cts2:eGFP	<i>a1:mfa2, bE1, bW2, cts2:eGFP, hygR</i>	Hyg ^R , Phleo ^R	SG200	pP _{cts2} :cts2:eGFP, hygR	cts2
AB33cts3:eGFP	<i>a2, P_{nar}:bE1, P_{nar}:bW2, cts3:eGFP, hygR</i>	Hyg ^R , Phleo ^R	AB33	pP _{cts3} :cts3:eGFP, hygR	cts3
SG200cts3:eGFP	<i>a1:mfa2, bE1, bW2, cts3:eGFP, hygR</i>	Hyg ^R , Phleo ^R	SG200	pP _{cts3} :cts3:eGFP, hygR	cts3
AB33cts1Δ, cts2Δ, cts3Δ, cts4Δ	<i>a2, P_{nar}:bE1, P_{nar}:bW2, cts1Δ, hygR, cts2Δ, natR, cts3Δ, g418R, cts4Δ, cbxR</i>	Hyg ^R , Phleo ^R , G418 ^R , Nat ^R , G418 ^R	AB33cts1Δ, cts2Δ, cts3Δ	pcts4Δ, cbxR	cts4
SG200cts1Δ, cts2Δ, cts3Δ, cts4Δ	<i>a1:mfa2, bE1, bW2, cts1Δ, hygR, cts2Δ, natR, cts3Δ, g418R, cts4Δ, cbxR</i>	Hyg ^R , Phleo ^R , G418 ^R , Nat ^R , G418 ^R	SG200cts1Δ, cts2Δ, cts3Δ	pcts4Δ, cbxR	cts4
AB33cts1:eGfp, don1Δ	<i>a2, P_{nar}:bE1, P_{nar}:bW2, cts1:eGFP, nat^R, don1Δ, hygR</i>	Hyg ^R , Nat ^R , Phleo ^R	AB33cts1:eGfp	pdon1Δ, hygR	

* Diese Stämme wurden im Rahmen der Bachelorarbeit Hartmann, 2013 unter meiner Betreuung hergestellt.

** Diese Stämme wurden im Rahmen der Bachelorarbeit Öztürk, 2013 unter meiner Ko-Betreuung hergestellt.

4.1.3 Nukleinsäuren, Oligonukleotide und Plasmide

Zur Herstellung von CM-Medium (s. Kapitel 4.1.1) wurde Heringssperma-DNA (Sigma-Aldrich) verwendet. Alle PCR-Reaktionen wurden mit Desoxyribonukleotiden (dNTPs) von Jena Bioscience durchgeführt. Die Herstellung Digoxigenin-markierter Sonden für die Stammverifizierung mittels Southern-Blot Analyse erfolgte mit Hilfe von Digoxigenin-dUTPs (PCR-Dig labeling Kit; Roche). Als DNA Größenstandards für die Agarose Gelelektrophorese wurde Lambda-Phagen DNA (Sigma-Aldrich) oder der GeneRuler DNA Ladder Mix[®] (Fermentas) verwendet.

Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide, die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzt wurden, stammen von der Firma Metabion AG.

Tabelle 4.7: Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz (5'-3' Richtung)
Mitochondrielle Proteine: Deletionen, Reporterfusionen	
BsaI ins eGFP-Tnos 1	GTACAAGTAAGGAGACCGGTCTCGAGCGGCCGG
BsaI ins eGFP-Tnos 2	CGCGCCGGCCGCTCGAGACCGGTCTCCTTACTT
QCR10 3'UTR D1	GGTCTCCCGCTCTACACGCGTCCGAGGTG
QCR10 3'UTR U2	GGTCTCGGTAAAGCCTCCAGCTTGAATGTG
QCR10 DF D1	GGTCTCCGGCCAGCCTCCAGCTTGAATGTG
QCR10 DF D2	GGTCTCGCTGCAATATTACAACGTGCGAGTTCTGC
QCR10 DF D3	CATTCGTCGGTGACGGGTGAG
QCR10 P1	GGACATCCTGATCAAGCTC
QCR10 P2	CGCGATGTATTGGCGAGAG
QCR10 UF U2	GGTCTCGCCTGCAATATTTTAAACCGCATAACCGGC
QCR10 UF U3	GGTCTCCTGGCCGAGAAAGCGTTGTCGGCAGG
RL1109_SfiI(U)-sfGFP	GGCCTGAGTGGCCATGCGCAAGGGCGAGGAG
RL1110_nosT-rev_AflII	CGCAAGACCGGCAACAGG
RL1111_SfiI(U)-mEOS2	GGCCTGAGTGGCCACCATGTGCGCCATCAAGCCC
RL1112_SfiI(U)-mCherry	GGCCTGAGTGGCCCCATGGTGAGCAAGGGCGAGG
RL1113_mCherry-SfiI(c)	GGCCGCGTTGGCCCTTGTACAGCTCGTCCATGCCG
RL1117_SfiI-MTS_for	GGCCTGAGTGGCCATGATCGCACGCAACTTG
RL1118_MTS-SfiI_rev	GGCCACTCAGGCCGGCGTCGTATTGCGCCTTG
RL1119_EcoRI-MTS-for	GAATTCGATCCCATGATCGCACGCAACTTGTGC
RL1120_nosT-rev_EcoRI	CGATGAATTCTCATGTTTGAC
RL1128_MTS-rev_BsaI	GGTCTCGGGCGTCGTATTCGCCTTGACCG
RL1129_sfGFP-for_BsaI	GGTCTCGCGCCATGCGCAAGGGCGAGGAGC
RL1130_mEOS2-for_BsaI	GGTCTCGCGCCATGTCGGCCATCAAGCCC

RL503 msd1 U2	GGTCTCGCCTGCAATATTCGTGCCTCGATACTCGTTCCTCG
RL504 msd1 U3	GGTCTCCAGGCCCTTTGGGCAGAGATTATTGCTGCG
RL505 msd1 D1	GGTCTCCGGCCGTACGACACAGCTTCATCTCG
RL506 msd1 D2	GGTCTCGCTGCAATATTTCTGGGCCTAGATGCTTTGGG
RL507 msd1 P1	TGGTCCCTTCAAGCAGGC
RL508 msd1 P2	TCTGGGCAGCCTTGAAGC
RL509 msd1 U1	TCGGTACGACGTCTTGGC
RL510 msd1 D3	GATGACCGTATACGCCGC
RL629_nuo3 D2	GGTCTCGCTGCAATATTCTTCTGCCATCCAAAGC
Thsp70-rev-seq	CACACGACTCACATCTGCC
um03085 3'UTR D1	GGTCTCCCCTGCTTTGAGATAGAGGTGCG
um03085 3'UTR U2	GGTCTCGGTAAGTACGACACAGCTTCATCTC
um03085 DF D1	GGTCTCCGGCCGTACGACACAGCTTCATCTC
um03085 DF D2	GGTCTCGCTGCAATATTCAAAGCACACTCAAGC
um03085 DF D3	CAAGGCCATCACAGGTTCC
um03085 P1	CTCGCCACAGACTACTTC
um03085 P2	CGAGATGAAGCTGTGTGC
um03085 UF U1	GCGCATTTTCATCGAGCAG
um03085 UF U2	GGTCTCGCCTGCAATATTTGTGATCAAACGAGTG
um03085 UF U3	GGTCTCCTGGCCGAAACACGAGCCTTGGCGTC
um11731 3'UTR D1	GGTCTCCCCTGTCATGTCTGTGCTGAGCTTC
um11731 3'UTR U2	GGTCTCGGTAAACACCTCTACATGGCTTG
um11731 DF D1	GGTCTCCGGCCACACCTCTACATGGCTTG
um11731 DF D2	GGTCTCGCTGCAATATTTCTTTTCGACGAACG
um11731 DF D3	GTACCTGAAAGCGGAAGCG
um11731 P1	CTCCAGACCCTTCTTAGC
um11731 P2	CAAGCCACCGACGAATGG
um11731 UF U1	CCTGAACCGAATGTAGGAC
um11731 UF U2	GGTCTCGCCTGCAATATTGGACCATAACCGCGTCAG
um11731 UF U3	GGTCTCCTGGCCGATTCTTCATCGTCGTATGCG
um12001 3'UTR	GGTCTCGGTAAAGAGCCTCCCTGTTTGTATC
um12001 3'UTR D1	GGTCTCCCCTGGAACCACTTGTGACTTG
um12001 DF D1	GGTCTCCGGCCAGAGCCTCCCTGTTTGTATC
um12001 DF D2	GGTCTCGCTGCAATATTGCTGGTCTCGTCGATC
um12001 DF D3	CACAGAAGCCTGCGCAAG
um12001 P1	CTCGATCGGCTTTCCAAC
um12001 P2	GTATGGAGGCGTGTGCAG
um12001 UF U1	GCGCTTCGCCATTGCTCAAG
um12001 UF U2	GGTCTCGCCTGCAATATTCGTTCAACCAGAGCC
um12001 UF U3	GGTCTCCTGGCCGACGCAGTGTGATAACTCG
Chitinasen: Deletionen, Reporterfusionen, Southern Blot Sonden, in vitro Expression, E. Coli Expression	
RL479 cts3 U2	GTAACGCCAGGGTTTCCAGTCACGACGAATATTACATCAGCTATTCAAGTGTAC

	GC
RL480_cts3_U3	CCACTCGAGTGCGGCCGCAATTGTCACGCCATGGTTAACTCCTAATGTGTGCG
RL481_cts3_D1	CTGCTGCGCCGCGAAGCTGTGCGGCCGCATTAATAGGTCTGCGCACCTGTTTGG
RL482_cts3_D2	GCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCAATATTTCCACACCTTAGTGACGG
RL483_cts3_P1	GAAGCTTCTCCCACTCGG
RL484_cts3_P2	GTTGACGCTCTTGGTCGG
RL485_cts3_U1	TTCCATGCCACGCACACC
RL486_cts3_D3	CAAGCACAGACGGTTCGC
RL495_cts2_U2	GGTCTCGCCTGCAAATATTTGTAATTCGTGATGG
RL496_cts2_U3	GGTCTCCAGGCCCGCGGTGACCGAGAGGGG
RL497_cts2_D1	GGTCTCCGGCCATACGCTATCACACATCC
RL498_cts2_D2	GGTCTCGCTGCAAATATTTGGTGACTGTCAATACC
RL499_cts2_P1	GTCACGCACTCAGTGTGG
RL500_cts2_P2	GGCAGTTGGTTTCGCAGC
RL501_cts2_U1	TGTGTACACACTGGCGCG
RL502_cts2_D3	TAGCACCGATTGCGAGCG
RL955_cts2_probe-for	GCTGACACGAGAATCGTG
RL956_cts2_probe-rev	GCCAAGCGTACAGACCTAC
RL957_cts2_Probe-DF-for	CCATCTCAACCGCCTTTC
RL958_cts2_Probe-DF_rev	GGCAAACCTCACACGGAAG
RL959_cts3-Probe-UF-for	GATGCGAACCTCAGGCATC
RL960_cts3-Probe-UF-rev	CGTATGAGCACATGCTACG
RL961_cts3-Probe-DF-for	GTTGGTCTTGGCTCTCAC
RL962_cts3-Probe-DF-rev	CATCCACGCCTTGGACAC
RL1266_U1_cts4	TTTGGTGCCTCGACTCGC
RL1267_U2_cts4	GGTCTCGCCTGCAATATTCGCGACTCGACCTTTTAC
RL1268_U3_cts4	GGTCTCCAGGCCTGTTTGTGAAGCAGGTATG
RL1269_D1_cts4	GGTCTCCGGCCCCGACACAGCACTCGCCGTG
RL1270_D2_cts4	GGTCTCGCTGCAATATTCATGCGTCCGCTTCAAG
RL1271_D3_cts4	GCTACTGACCTTGTTGCC
RL1272_P1_cts4	TCGTTGGCGCTTTCTCTG
RL1273_P2_cts4	AGGGCAAGGAGTTGTGTC
RL1281_cts2-f-NdeI	CACATATGCGAGCCAACACACC
RL1282_cts2-r-BamHI	GTGGGATCCCTAGCTCAATCCGGCAGC
RL1283_cts3-f-NdeI	CACATATGAAGCTTCTCCCACTCGG
RL1284_cts3-r-BamHI	GTGGGATCCCTAGGAAGAGATAGCACCTGTC
RL1285_cts2-f-SP	CACATATGGTGCCTCACGAGCAGAGC
RL1286_cts3-f-SP	CACATATGGCGCTGAACAATGATGGATC
RL1287_cts3-r-BglII	GTGAGATCTCTAGGAAGAGATAGCACCTGTC
RL1291_U1-cts2	ACAACGCGCAGAAGTTTCG
RL1292_U2-cts2	GGTCTCGCCTGCAATATTGATGGTTTCCGTGTTTGG
RL1293_U3-cts2	GGTCTCCTGGCCATGCTCAATCCGGCAGCGTC
RL1294_D1-cts2	GGTCTCCGGCCACAGCATACGCTATCACAC
RL1295_D2-cts2	GGTCTCGCTGCAATATTCTGTGTTCTCAATGCCCCGC
RL1296_D3-cts2	CGCGATCTGCTTGAACATCC

RL1297_P1-cts2	ACAAGTTGGTCGTCGGTAAG
RL1298_P2-cts2	TTGAAAGGCGGTTGAGATGG
RL1299_U1-cts3	GCCTACAGCCGAGTTTGATC
RL1300_U2-cts3	GGTCTCGCCTGCAATATTCGTCAAGGCAGCCAAG
RL1301_U3-cts3	GGTCTCCTGGCCAGGGAAGAGATAGCACCTGTC
RL1302_D2-cts3	GGTCTCCGGCCGTCTGCGCACCTGTTGGTGTTG
RL1303_D2-cts3	GGTCTCGCTGCAATATTCCAACAGGATCCTACG
RL1304_D3-cts3	CACAAACTCATCCACTCCCG
RL1305_P1-cts3	TCAACGCTCGTCTCACAG
RL1306_P2-cts3	TAGCTAGCACGCATACAG
RL1314_cts3-seq-f	GGATTGGACAGCCTCGAC
RL1384_Cts1-Gfp_Bam_rev	GTGGGATCCTTACTTGTACAGCTCGTCCATGCCG
RL1784_NdeI-cts4	GGCATATGCTTTGGCCTCACCCAACC
RL1785_cts4-BsaI _r	GGTCTCGTTGCCGAGGAAGTTGGATCCG
RL1786_cts4-BsaI _f	GGTCTCGGCAACTACACAGGCAACAAC
RL1787_cts4-BamHI	GCGGATCCTCAATGCATGTTGCACATGCC
DD19_RT_Actin_for	CATGTACGCCGGTATCTCG
DD20_RT_Actin_rev	CTCGGGAGGAGCAACAATC
DD21_RT_cts1_for	GTCCGCACTTTGCACCTATG
DD22_RT_cts1_rev	ATCCAACCCGTCGTTCTC
DD23_RT_cts2_for	CCGCCTTACTGGAACATCAC
DD24_RT_cts2_rev	GAACTTCTGCGCGTTGTC
DD25_RT_cts3_for	GGCTTCCATACCACCTTCAC
DD26_RT_cts3_rev	TGTCCAATCCGCCAGTAG
DD27_RT_cts4_for	GCCAGCGTACAGATCAAGG
DD28_RT_cts4_rev	AGAAGCTGCGTCACTCTCC

Plasmide

Alle in dieser Arbeit verwendeten Ausgangsplasmide sind der Plasmidsammlung der AG Feldbrügge entnommen oder kommerziell erhältlich. Alle in dieser Arbeit hergestellten Plasmide sind der Plasmidsammlung der AG Feldbrügge zugeführt worden und sind damit für jedermann zugänglich und verfügbar.

Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Ausgangsplasmide:

pCRII-Topo (LifeTechnologies; Invitrogen)

Plasmid für die Zwischenklonierung von PCR-Produkten mittels Topoisomerase. Die Klonierungsstelle wird von EcoRI-Schnittstellen flankiert. Der P_{lac} -Promotor und das *lacZ*-Gen ermöglichen die Blau/Weiß-Selektion nach erfolgter Transformation. Resistenzen: Amp^R, Kan^R

pCR2.1 (LifeTechnologies; Invitrogen)

Plasmid für die Zwischenklonierung von PCR-Produkten mittels Topoisomerase. Die Klonierungsstelle wird von EcoRI-Schnittstellen flankiert. Der P_{lac} -Promotor und das *lacZ*-Gen ermöglichen die Blau/Weiß-Selektion nach erfolgter Transformation. Resistenzen: Amp^R, Kan^R

pIVEX 1.3 WG (pUMa2355, 5'Prime)

Plasmid für die *in vitro* Expression mittels T7-Polymerase vermittelter Transkription (z.B. mittels RTS 100 Wheat Germ CECF Kit). Enthält einen C-terminal gelegenen 6x-His-Tag und eine multiple cloning site. Die Klonierungskassette ist von Expressionsverstärkungssequenzen flankiert und steht unter der Kontrolle des T7-Promotors.

pIVEX 1.4 WG (pUMa2356, 5'Prime)

Plasmid für die *in vitro* Expression mittels T7-Polymerase vermittelter Transkription (z.B. mittels RTS 100 Wheat Germ CECF Kit). Enthält einen 6x-His-Tag, gefolgt von einer Faktor Xa Schnittstelle und der MCS (*multiple cloning site*). Die Klonierungskassette ist von Expressionsverstärkungssequenzen flankiert und steht unter der Kontrolle des T7-Promotors.

p123 (Aichinger, unveröffentlicht)

Dieses Plasmid enthält das *egfp*-Gen unter der Kontrolle des P_{otef} -Promotors und des T_{nos} -Terminators. Außerdem ist eine Carboxin-Resistenzkassette vorhanden, welche die homologe Integration in den *ip^s*-Lokus von *U. maydis* ermöglicht. Resistenzen: Amp^R, Cbx^R.

pMF1hs (pUMa194, Brachmann *et al.*, 2004)

Enthält die Hygromycin-Resistenzkassette mit dem konstitutiven P_{hsp70} -Promotor und dem T_{nos} -Terminator als 1884 bp langes SfiI/SfiI-Fragment. Resistenzen: Amp^R, Hyg^R.

pMF1n (pUMa262, Brachmann *et al.*, 2001)

Enthält die Nurseothricin-Resistenzkassette mit dem konstitutiven P_{gap1} -Promotor und dem T_{cyc1} -Terminator als 1437 bp langes SfiI/SfiI-Fragment. Resistenzen: Amp^R, Nat^R.

pMF1g (pUMa1057, Baumann *et al.*, 2012)

Enthält die Geneticin-Resistenzkassette mit dem konstitutiven P_{otef} -Promotor und dem T_{cyc1} -Terminator als 2073 bp langes SfiI/SfiI-Fragment. Resistenzen: Amp^R, G418^R.

pRS426 (pUMa1083, Sikorski und Hieter, 1989)

Plasmid für die Klonierung mittels Rekombination in *S. cerevisiae* basierend auf pBluescript.

pDest (pUMa1467, Terfrüchte *et al.*, 2013)

Dieses Plasmid ist ein pUC57 Derivat, welches als Zielvektor bei BsaI-basierten „Golden Gate“ Klonierungen dient. Es enthält eine Ampicillin-Resistenzkassette aus der die BsaI-Schnittstellen entfernt wurden. Außerdem trägt das Plasmid zwei BsaI-Schnittstellen, welche als Integrationspunkt für die gerichtete Klonierung dienen.

pStorI_1hs (pUMa1507, Terfrüchte *et al.*, 2013)

Donorplasmid bei BsaI-basierten „Golden Gate“ Klonierungen. Enthält die Hygromycin-Resistenzkassette mit dem konstitutiven P_{hsp70} -Promotor und dem T_{nos} -Terminator als 2424 bp langes BsaI/BsaI-Fragment. Resistenzen: Gent^R, Hyg^R.

pStorI_1n (pUMa1506, Terfrüchte *et al.*, 2013)

Donorplasmid bei BsaI-basierten „Golden Gate“ Klonierungen. Enthält die Nurseothricin-Resistenzkassette mit dem konstitutiven P_{gap1} -Promotor und dem T_{cyc1} -Terminator als 2424 bp langes BsaI/BsaI-Fragment. Resistenzen: Gent^R, Nat^R.

pStor_1c (pUMa1777, Terfrüchte *et al.*, 2013)

Donorplasmid bei BsaI-basierten „Golden Gate“ Klonierungen. Enthält die Carboxin-Resistenzkassette mit dem konstitutiven P_{ip} -Promotor und dem T_{ip} -Terminator als 1906 bp langes BsaI/BsaI-Fragment. Resistenzen: Gent^R, Cbx^R.

pMB2-2 (pUMa 1882, Basse *et al.*, 2004)

Dieses Plasmid enthält die Mitochondriale Zielsequenz des *mrbl*-Gens (um06182) als Fusion an das 3'-Ende des *egfp*-Gens unter der Kontrolle des P_{otef} -Promotors und des T_{nos} -Terminators. Außerdem ist eine Carboxin-Resistenzkassette vorhanden, welche die homologe Integration in den *ip^s*-Lokus von *U. maydis* ermöglicht. Resistenzen: Amp^R, Cbx^R.

prrm4-KO_Hyg (pUMa1391)

Plasmid für die Deletion des *rrm4*-Gens. Enthält eine 818 bp stromaufwärts des *rrm4*-Gens liegende Flanke und eine 1943 bp lange stromabwärts liegende Flanke. Zwischen den Flanken befindet sich die 2720 bp lange Hygromycin-Resistenzkassette aus pUMa261. Im Gegensatz zu pUMa495 sind 2 Punktmutationen in der stromabwärts liegenden Flanke entfernt. Amp^R, Hyg^R.

pET15b-Cts1 (pUMa1951)

Plasmid für die heterologe Proteinexpression von Cst1 als N-terminale Fusion mit einem Poly-Histidin Tag. Für die Herstellung wurde ein 1524 bp langes NdeI/BamHI-Fragment mittels PCR generiert (Primer: RL1085/1086) und in das 5698 bp lange Plasmidrückgrat (ebenfalls NdeI/BamHI-Fragment) aus pUMa410 kloniert. Resistenzen: Amp^R, Cam^R.

pCRII-mcherry (pUMa1039)

Zwischenklonierungsplamid für *mcherry*. Enthält den offenen Leserahmen von *mcherry* als 721 bp langes NcoI/NdeI-Fragment in pCRII-Topo (Invitrogen).

Im Rahmen dieser Arbeit hergestellte Plasmide:**pGEX-GST-cts2 (pUMa1291)**

Plasmid für die heterologe Proteinexpression von Cst2 als N-terminale Fusion mit GST (Glutathion-S-Transferase). Für die Herstellung wurde ein ~1,4 kbp langes NdeI/EcoRI-Fragment aus pUMa2127 in das ~4,9 kbp lange Plasmidrückgrat (ebenfalls NdeI/EcoRI-Fragment) aus pUMa2186 kloniert. Resistenzen: Amp^R.

pGEX-GST-cts3 (pUMa1292)

Plasmid für die heterologe Proteinexpression von Cst3 als N-terminale Fusion mit GST (Glutathion-S-Transferase). Für die Herstellung wurde ein 1,9 kbp langes NdeI/EcoRI-Fragment aus pUMa2128 in das 4,9 kbp lange Plasmidrückgrat (ebenfalls NdeI/EcoRI-Fragment) aus pUMa2186 kloniert. Resistenzen: Amp^R.

pUC57-apR-BsaI-Linker (pUMa1467)

Zielploid für BsaI-vermittelte Golden-Gate Klonierung. Zur Herstellung wurde ein mittels Oligonukleotiden (RL78/RL79) hergestellter „Linker“ in das 2691 bp lange Plasmidrückgrat (SacI/XbaI-Fragment) aus pUMa1389 kloniert. Resistenzen: Amp^R.

pStorII_5-16h (pUMa1599)

Zur Herstellung C-terminaler eGFP Fusionen und gleichzeitiger Integration von 3' UTRs (untranslatierten Regionen) zwischen dem *egfp*-Gen und des T_{nos}-Terminators. Für die Herstellung wurde zunächst das Ausgangsplasmid (pUMa1546) mit BsrGI/EcoRI sowie AscI/EcoRI geschnitten wodurch ein 743 bp langes Fragment entstand, welches das *egfp*-Gen enthält. Außerdem entstand ein 5415 bp langes Fragment, welches das Plasmidrückgrat und die Hygromycin-Resistenzkassette enthält. Zur Integration einer doppelten BsaI-Schnittstelle wurde eine, durch Hybridisierung von Oligonukleotiden hergestellte, Linker-Sequenz in das Plasmidrückgrat kloniert. Resistenzen: Gent^R, Hyg^R.

pqcr10-egfp-3'UTR (pUMa1600)

Zur endogenen Expression einer C-terminalen *egfp*-Fusion von *qcr10* (um11097) mit C-terminaler 3'UTR von *qcr10*. Zur Herstellung wurde ein 1076 bp langes Fragment, welches das *qcr10*-Gen und den stromaufwärts liegenden Bereich enthält, ein 1121 bp langes Fragment, welches den stromabwärts des *qcr10*-Gens gelegene Fragment enthält und ein 323 bp langes Fragment, welches die 3'UTR von *qcr10* enthält mittels PCR generiert. Diese wurden zusammen mit pUMa1599 und 1467 in einer Golden-Gate Reaktion hergestellt. Resistenzen: Amp^R, Hyg^R.

psod2-egfp-3'UTR (pUMa1601)

Zur endogenen Expression einer C-terminalen *egfp*-Fusion von *sod2* (um03085) mit C-terminaler 3'UTR von *sod2*. Zur Herstellung wurde ein 1093 bp langes Fragment, welches das *sod2*-Gen und den stromaufwärts liegenden Bereich enthält, ein 1001 bp langes Fragment, welches den stromabwärts des *sod2*-Gens gelegene Fragment enthält und ein 322 bp langes Fragment, welches die 3'UTR von *sod2* enthält mittels PCR generiert. Diese wurden zusammen mit pUMa1599 und 1467 in einer Golden-Gate Reaktion hergestellt. Resistenzen: Amp^R, Hyg^R.

pnuo1-egfp-3'UTR (pUMa1602)

Zur endogenen Expression einer C-terminalen *egfp*-Fusion von *nuo1* (um11731) mit C-terminaler 3'UTR von *nuo1*. Zur Herstellung wurde ein 1079 bp langes Fragment, welches das *nuo1*-Gen und den stromaufwärts liegenden Bereich enthält, ein 1077 bp langes Fragment, welches den stromabwärts des *nuo1*-Gens gelegene Fragment enthält und ein 397 bp langes Fragment, welches die 3'UTR von *nuo1* enthält mittels PCR generiert. Diese wurden zusammen mit pUMa1599 und 1467 in einer Golden-Gate Reaktion hergestellt. Resistenzen: Amp^R, Hyg^R.

pnuo3-egfp-3'UTR (pUMa1603)

Zur endogenen Expression einer C-terminalen *egfp*-Fusion von *nuo3* (um12001) mit C-terminaler 3'UTR von *nuo3*. Zur Herstellung wurde ein 1058 bp langes Fragment, welches das *nuo3*-Gen und den stromaufwärts liegenden Bereich enthält, ein 944 bp langes Fragment, welches den stromabwärts des *nuo3*-Gens gelegene Fragment enthält und ein 304 bp langes Fragment, welches die 3'UTR von *nuo3* enthält mittels PCR generiert. Diese wurden zusammen mit pUMa1599 und 1467 in einer Golden-Gate Reaktion hergestellt. Resistenzen: Amp^R, Hyg^R.

pP_{crg1}-MTS_{mrbl}-sfGFP (pUMa1604)

Für die Expression einer MTS-Superfolder-GFP (sfGFP) Variante unter der Kontrolle des P_{crg1}-Promotors als Integration in den *ip^s*-locus von *U. maydis*. Zur Herstellung wurde ein 777 bp langes Fragment (PCR-generiert und mit BsaI/AflIII geschnitten), welches das *sfgfp*-Gen enthält und ein 175 bp langes Fragment (PCR-generiert und mit SfiI/BsaI geschnitten), welches die mitochondrielle Zielsequenz des *mrbl*-Gens aus pMB2-2 (Basse *et al.*, 2004) enthält in das 6700 bp lange Plasmidrückgrat von pUMa1907 (SfiI/AflIII geschnitten) kloniert. Resistenzen: Amp^R, Cbx^R.

pP_{crg1}-MTS_{mrbl}-mEos2 (pUMa1605)

Für die Expression einer MTS-mEos2 Variante unter der Kontrolle des P_{crg1}-Promotors als Integration in den *ip^s*-locus von *U. maydis*. Zur Herstellung wurde ein 778 bp langes Fragment (PCR-generiert und mit BsaI/AflIII geschnitten), welches das *mEos2*-Gen enthält und ein 175 bp langes Fragment (PCR-generiert und mit SfiI/BsaI geschnitten), welches die mitochondrielle Zielsequenz des *mrbl*-Gens aus pMB2-2 (Basse *et al.*, 2004) enthält in das

6700 bp lange Plasmidrückgrat von pUMa1907 (SfiI/AflIII geschnitten) kloniert. Resistenzen: Amp^R, Cbx^R.

pP_{otef}-MTS_{mrb1}-sfGFP (pUMa1606)

Für die konstitutive, starke Expression einer MTS-Superfolder-GFP (sfGFP) Variante unter der Kontrolle des P_{otef}-Promotors als Integration in den *ip^s*-locus von *U. maydis*. Zur Herstellung wurde ein ~1,2 kbp langes EcoRI-Fragment aus pUMa2065, welches MTS-sfGFP enthält in das 5051 bp lange Plasmidrückgrat aus pUMa1882 (EcoRI-Fragment) kloniert. Resistenzen: Amp^R, Cbx^R.

pP_{otef}-MTS_{mrb1}-mEos2 (pUMa1607)

Für die konstitutive, starke Expression einer MTS-mEos2 Variante unter der Kontrolle des P_{otef}-Promotors als Integration in den *ip^s*-locus von *U. maydis*. Zur Herstellung wurde ein 1169 bp langes EcoRI-Fragment aus pUMa2066, welches MTS-mEos2 enthält in das 5051 bp lange Plasmidrückgrat aus pUMa1882 (EcoRI-Fragment) kloniert. Resistenzen: Amp^R, Cbx^R.

pcts2Δ_Hyg (pUMa1653)

Plasmid für die Deletion des *cts2*-Gens. Zur Herstellung wurde ein ~1,6 kbp langes Fragment, welches den stromaufwärts liegenden Bereich des *cts2*-Gens und enthält und ein ~1,5 kbp langes Fragment, welches den stromabwärts des *cts2*-Gens gelegene Fragment enthält mittels PCR generiert (RL495/496 und RL497/498). Diese wurden zusammen mit pUMa1507 und 1467 in einer Golden-Gate Reaktion hergestellt. Resistenzen: Amp^R, Hyg^R.

pcts3Δ_Hyg (pUMa1654) Recombinational Cloning

Plasmid für die Deletion des *cts3*-Gens. Zur Herstellung wurde ein ~1,5 kbp langes Fragment, welches den stromaufwärts liegenden Bereich des *cts3*-Gens und enthält und ein ~900 bp langes Fragment, welches den stromabwärts des *cts3*-Gens gelegene Fragment enthält mittels PCR generiert (RL479/480 und RL481/482). Diese wurden zusammen mit pUMa1083 und mit Hilfe von „Recombinational Cloning“ in *S. cerevisiae* erstellt. Resistenzen: Amp^R, Hyg^R.

prrm4-KO_Nat (pUMa1750)

Plasmid für die Deletion des *rrm4*-Gens. Enthält eine 818 bp stromaufwärts des *rrm4*-Gens liegende Flanke und eine 1943 bp lange stromabwärts liegende Flanke. Zwischen den Flanken befindet sich die 1437 bp lange Nourseothricin-Resistenzkassette aus pUMa855. Das Plasmidrückgrat stammt aus pUMa1391. Resistenzen: Amp^R, Kan^R, Nat^R.

prrm4-KO_G418 (pUMa1755)

Plasmid für die Deletion des *rrm4*-Gens. Enthält eine 818 bp stromaufwärts des *rrm4*-Gens liegende Flanke und eine 1943 bp lange stromabwärts liegende Flanke. Zwischen den Flanken befindet sich die 2073 bp lange G418-Resistenzkassette aus pUMa1057. Das Plasmidrückgrat stammt aus pUMa1391. Resistenzen: Amp^R, Kan^R, G418^R.

prrm4-KO_Hyg(kurz) (pUMa1756)

Plasmid für die Deletion des *rrm4*-Gens. Enthält eine 818 bp stromaufwärts des *rrm4*-Gens liegende Flanke und eine 1943 bp lange stromabwärts liegende Flanke. Zwischen den Flanken befindet sich die 1884 bp lange Hygromycin-Resistenzkassette aus pUMa194. Das Plasmidrückgrat stammt aus pUMa1391. Resistenzen: Amp^R, Kan^R, G418^R.

pMK-RQ_Ndi1 (pUMa1876)

Aufbewahrungsplasmid für eine für *U. maydis* dicodon-optimierte Variante des *ndi1*-Gens aus *S. cerevisiae*. Enthält das *ndi1*-Gen als 1545 bp langes NcoI/NotI-Fragment. BsaI-Schnittstellen wurden manuell aus dem Gen entfernt, um es für Golden-Gate Klonierungen kompatibel zu machen. Resistenzen: Amp^R.

p123-Um_nda1(pUMa1878)

Für die konstitutive, starke Expression des *nda1*-Gens (aus *S. cerevisiae*, codon optimiert für *U. maydis*) unter der Kontrolle des P_{otef}-Promotors als Integration in den *ip^s*-locus von *U. maydis*. Zur Herstellung wurde das *nda1*-Gen als 1545 bp langes NcoI/NotI-Fragment aus pUMa1876 in das 5568 bp lange Plasmidrückgrat (NcoI/NotI-Fragment) aus pUMa43 kloniert. Resistenzen: Amp^R, Cbx^R.

pcts2Δ-nat (pUMa1885)

Plasmid für die Deletion des *cts2*-Gens. Zur Herstellung wurde die Nourseothricin-Resistenzkassette aus pUMa865 als 1437 bp langes SfiI-Fragment in das 5557 bp lange Plasmidrückgrat (SfiI-Fragment) aus pUMa1653 kloniert. Resistenzen: Amp^R, Nat^R.

pcts3Δ-G418 (pUMa1886)

Plasmid für die Deletion des *cts3*-Gens. Zur Herstellung wurde die G418-Resistenzkassette aus pUMa1057 als 2028 bp langes NotI-Fragment in das 7773 bp lange Plasmidrückgrat (NotI-Fragment) aus pUMa1654 kloniert. Resistenzen: Amp^R, G418^R.

pSfiI(C)_16BoxB-Cterm (pUMa1894)

Plasmid für “Green-RNA” Anwendungen unter Berücksichtigung der 3'UTR. Enthält eine SfiI-C Schnittstelle gefolgt von 16 BoxB-Wiederholungen zur Integration offener Leserahmen. Außerdem enthält das Plasmid eine multiple Klonierungsstelle hinter den BoxB-Wiederholungen für die Integration einer 3'UTR. Zur Herstellung wurde ein 574 bp langes Fragment, welches die 16 BoxB Wiederholungen enthält mittels PCR generiert (Primer: RL919/920; Template: pUMa925). Das Plasmidrückgrat stammt aus dem Plasmid pUMa317, welches für die Klonierung mit BsrGI/SfiI in zwei Fragmente (3015 bp und 2888 bp) geschnitten wurde. Resistenzen: Amp^R, Hyg^R.

pMA-T-sgGFP (pUMa1903)

pMA-T Plasmid der Firma Geneart (Life Technologies), welches das Superfolder-GFP (*sfgfp*) Gen als 734 bp langes SfiI/AscI-Fragment als Di-Codon optimierte Variante für *U. maydis* enthält. Resistenzen: Amp^R.

pMA-T-mEos2 (pUMa1904)

pMA-T Plasmid der Firma Geneart (Life Technologies), welches das *mEos2*-Gen als Di-Codon optimierte Variante für *U. maydis* enthält. Resistenzen: Amp^R.

pSfiI(C)-sfgfp (pUMa1905)

Plasmid für die C-terminale Fusion von sfGFP mittels SfiI-Kassettensystems. Zur Herstellung wurde ein 734 bp langes SfiI/AscI-Fragment, welches das *sfgfp*-Gen enthält in das Plasmidrückgrat aus pUMa1546, bestehend aus einem 2996 bp und einem 2444 bp langem SfiI/AscI-Fragment, kloniert. Resistenzen: Gent^R, Hyg^R.

pSfiI(C)-mEos2 (pUMa1906)

Plasmid für die C-terminale Fusion von mEos2 mittels SfiI-Kassettensystems. Zur Herstellung wurde ein ~750 bp langes SfiI/AscI-Fragment, welches das *mEos2*-Gen enthält in das Plasmidrückgrat aus pUMa1546, bestehend aus einem 2996 bp und einem 2444 bp langem SfiI/AscI-Fragment, kloniert. Resistenzen: Gent^R, Hyg^R.

pP_{crgI}-sfGFP (pUMa1907)

Für die regulierbare Expression von Superfolder-GFP (sfGFP) unter der Kontrolle des P_{crgI} - Promotors als Integration in den *ip^s*-locus von *U. maydis*. Zur Herstellung wurde ein 778 bp langes SfiI/AflII-Fragment mittels PCR generiert (Primer: RL1109/1110, Template: pUMa1905), welches sfGFP enthält, in das 6700 bp lange Plasmidrückgrat aus pUMa955 (SfiI/AflII -Fragment) kloniert. Resistenzen: Amp^R, Cbx^R.

pP_{crgI}-mEos2 (pUMa1908)

Für die regulierbare Expression von mEos2 unter der Kontrolle des P_{crgI} -Promotors als Integration in den *ip^s*-locus von *U. maydis*. Zur Herstellung wurde ein 745 bp langes SfiI/AflII-Fragment mittels PCR generiert (Primer: RL1111/1112, Template: pUMa1906), welches mEos2 enthält, in das 6700 bp lange Plasmidrückgrat aus pUMa955 (SfiI/AflII - Fragment) kloniert. Resistenzen: Amp^R, Cbx^R.

pP_{crgI}-mcherry:sfgfp (pUMa1909)

Für die regulierbare Expression einer *mcherry:sfgfp*-Fusion als „fluoreszierender Timer“ unter der Kontrolle des P_{crgI} -Promotors als Integration in den *ip^s*-locus von *U. maydis*. Zur Herstellung wurde ein 723 bp langes SfiI-Fragment mittels PCR generiert (Primer: RL1112/1113, Template: pUMa1039), welches mCherry enthält und ein 781 bp langes AflII/SfiI-Fragment, welches sfGFP enthält, in das 6700 bp lange Plasmidrückgrat aus pUMa955 (SfiI/AflII -Fragment) kloniert. Resistenzen: Amp^R, Cbx^R.

pP_{crgI}-mcherry (pUMa1910)

Für die regulierbare Expression von mCherry unter der Kontrolle des P_{crgI} -Promotors als Integration in den *ip^s*-locus von *U. maydis*. Zur Herstellung wurde ein 768 bp langes

AflII/NcoI-Fragment mittels aus pUMa1557, welches mcherry enthält, in das 6704 bp lange Plasmidrückgrat aus pUMa955 (AflII/NcoI -Fragment) kloniert. Resistenzen: Amp^R, Cbx^R.

pcts4Δ-Hyg (pUMa2125)

Plasmid für die Deletion des *cts4*-Gens. Zur Herstellung wurde ein ~1,0 kbp langes Fragment, welches den stromaufwärts des *cts4*-Gens liegenden Bereich enthält und ein 930 bp langes Fragment, welches den stromabwärts des *cts4*-Gens gelegene Fragment enthält mittels PCR generiert (Primer: RL1267/1268 und RL1269/1270). Diese wurden zusammen mit pUMa1507 und 1467 in einer Golden-Gate Reaktion hergestellt. Resistenzen: Amp^R, Hyg^R.

pET15b-His-cts2 (pUMa2127)

Plasmid für die heterologe Proteinexpression von Cst2 als N-terminale Fusion mit einem Poly-Histidin Tag. Für die Herstellung wurde ein 1082 bp langes NdeI/BamHI-Fragment mittels PCR generiert (Primer: RL1285/1282) und in das 5686 bp lange Plasmidrückgrat (ebenfalls NdeI/BamHI-Fragment) aus pUMa410 kloniert. Resistenzen: Amp^R, Cam^R.

pET15b-His-cts3 (pUMa2128)

Plasmid für die heterologe Proteinexpression von Cst3 als N-terminale Fusion mit einem Poly-Histidin Tag. Für die Herstellung wurde ein 1583 bp langes NdeI/BglII-Fragment mittels PCR generiert (Primer: RL1286/1287) und in das 5686 bp lange Plasmidrückgrat (NdeI/BamHI-Fragment) aus pUMa410 kloniert. Resistenzen: Amp^R, Cam^R.

pcts2-egfp (pUMa2129)

Zur endogenen Expression einer C-terminalen *egfp*-Fusion von *cts2*. Zur Herstellung wurde ein 660 bp langes Fragment, welches einen Teil des *cts2*-Gens enthält und ein 912 bp langes Fragment, welches den stromabwärts des *cts2*-Gens gelegene Fragment enthält mittels PCR generiert (Primer RL1292/1293 und RL 1294/1295). Diese wurden zusammen mit pUMa1546 und 1467 in einer Golden-Gate Reaktion hergestellt. Resistenzen: Amp^R, Hyg^R.

pcts3-egfp (pUMa2130)

Zur endogenen Expression einer C-terminalen *egfp*-Fusion von *cts3*. Zur Herstellung wurde ein 996 bp langes Fragment, welches einen Teil des *cts3*-Gens enthält und ein 1026 bp langes Fragment, welches den stromabwärts des *cts3*-Gens gelegene Fragment enthält mittels PCR generiert (Primer RL1300/1301 und RL 1302/1303). Diese wurden zusammen mit pUMa1546 und 1467 in einer Golden-Gate Reaktion hergestellt. Resistenzen: Amp^R, Hyg^R.

Pcts4Δ-Cbx (pUMa2287)

Plasmid für die Deletion des *cts4*-Gens (um00695). Zur Herstellung wurde die Hygromycin-Resistenzkassette (SfiI/SfiI-Fragment) durch die Carboxin-Resistenzkassette aus pUMa 1777 (SfiI/SfiI-Fragment) ersetzt.

pIVEX1.4-Cts1 (pUMa2357)

Plasmid für die in vitro Expression von His-Cts1 mittels RTS100 Wheat Germ CECF Kits. Zur Herstellung wurde ein 1511 bp langes BamHI/NdeI-Fragment aus pUMa1951 in das 3245 bp lange Plasmidrückgrat (BamHI/NdeI-Fragment) von pUMa 2356 kloniert.

pIVEX1.4-Cts2 (pUMa2358)

Plasmid für die in vitro Expression von His-Cts2 mittels RTS100 Wheat Germ CECF Kits. Zur Herstellung wurde ein 1070 bp langes EcoRV/NdeI-Fragment aus pUMa2128 in das 345 bp lange Plasmidrückgrat (BamHI/NdeI-Fragment) von pUMa 2356 kloniert.

pIVEX1.4-Cts3 (pUMa2359)

Plasmid für die in vitro Expression von His-Cts3 mittels RTS100 Wheat Germ CECF Kits. Zur Herstellung wurde ein 1707 bp langes BamHI/NdeI-Fragment aus pUMa2127 in das 3247 bp lange Plasmidrückgrat (SmaI/NdeI-Fragment) von pUMa 2356 kloniert.

pIVEX1.4-Cmo1 (pUMa2358)

Plasmid für die in vitro Expression von His-Cmo1 mittels RTS100 Wheat Germ CECF Kits. Zur Herstellung wurde ein 1101 bp langes BamHI/NcoI-Fragment aus mittels PCR generiert (Primer: DD7/8) und in das 3251 bp lange Plasmidrückgrat (BamHI/NcoI -Fragment) von pUMa 2356 kloniert.

4.1.4 Sonstige Materialien

Filterpapier 3MM (Whatman), Glasperlen 150-212 Microns (Sigma), Amersham-Hybond-N Nylon Membran für den Transfer von DNA (GE-Healthcare; Southern Blot), Amersham-Hybond-P PVDF Membran für den Transfer von Proteinen (GE-Healthcare; Western Blot), Papierfilter (MN 615 ¼, Ø320 mm; Machery-Nagel), 1,5 ml- Reaktionsgefäße (Sarstedt) und 2 ml-Reaktionsgefäße (Sarstedt), 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäße (Star Lab), 96-well PCR-Platten (Star Lab), Standard Universal Pipettenspitzen (0,5-10 µl, 2-200 µl und 100-1000µl) (Sarstedt), Kapillarspitzen (Biozym), Petrischalen (Sarstedt), 15 ml und 50 ml PPN-Röhrchen (Greiner), 1,5 ml Polystyrol-Küvetten (Sarstedt), 0,22 µm Sterilfilter (VWR), 1 ml, 5 ml, 10

ml, 20 ml und 50 ml Einmalspritzen (A. Hartenstein), Einmal-Injektionskanülen (B. Braun), Thermalpapier (Hitachi), 96 Well-Platte schwarz mit durchsichtigem Boden (Greiner Bio One; VWR), Steritop sterilfilter 500 ml (Sarstedt), Schottflaschen 100, 250, 500, 1000 und 2000 ml (Schott), Objektträger (VWR), Kimtech fusselfreie Tücher (Kimberley-Clark), Amicon Größenausschlussfilter Ultracel 3k, Ultracel 30k (Millipore), PD10 Pufferaustauschsäulen (GE-Healthcare).

4.2 Mikrobiologische, genetische und Zellbiologische Methoden

4.2.1 Arbeiten mit *E. coli*

Kultivierungsbedingungen

E. coli-Stämme wurden als Schüttelkulturen oder auf Festmedien unter aeroben Bedingungen kultiviert. Schüttelkulturen wurden entweder in 3 ml dYT-Medium in Reagenzgläsern oder in 50-500 ml dYT-Medium in Schüttelkolben angeimpft und über Nacht auf Rotationsschüttlern oder Horizontalschüttlern bei 110 Upm bei 37°C inkubiert. Übernachtskulturen wurden stets von Festmedien inokuliert. Die Anzucht von Kolonien erfolgte über Nacht bei 37°C auf YT-Festmedium. Glycerinkulturen wurden bei -80°C gelagert und vor weiteren Arbeiten auf YT-Festmedium ausplattiert. Sowohl Flüssig- als auch Festmedien enthielten nach Bedarf oben genannte Antibiotikakonzentrationen.

Bestimmung der Zelldichte bei *E. coli*

Die Zelldichte von Flüssigkulturen wurde photometrisch mittels eines Novospec II Photometers (Pharmacia Biotech) bestimmt. Dazu wurde die optische Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 600 nm ermittelt. Im sicherzustellen, dass die Messung im Bereich der linearen Abhängigkeit stattfindet wurden die verwendeten Kulturproben so verdünnt, dass ihre OD₆₀₀ unter einem Wert von 0,6 lag. Als Referenzwert diente die OD₆₀₀ des jeweiligen Kulturmediums. Hierbei entspricht eine OD₆₀₀ = 1,0 etwa 10⁹ Zellen/ml.

Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen nach der RbCl-Methode

Das vorliegende Protokoll ist modifiziert nach Cohen *et al.* (1972). Zur Herstellung chemisch kompetenter Zellen wurden 100 ml dYT-Medium, dem jeweils 10 mM MgCl₂ und MgSO₄ zugesetzt war, mit 1 ml einer frischen Übernachtskultur des jeweiligen *E. coli* Stammes (meist Top10) angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ = 0,5 bei 37°C und 110 Upm inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (3000 Upm, 15 min, 4°C) pelletiert, in 33 ml eiskalter RF1-Lösung resuspendiert und 30-60 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation

(3000 Upm, 15 min, 4°C) wurden die sedimentierten Zellen in 5 ml eiskalter RF2-Lösung aufgenommen und 15 min auf Eis inkubiert. Die Zellsuspension wurde zu je 50 µl in 1,5 ml Reaktionsgefäßen aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

RF1-Lösung:

100 mM RbCl
50 mM MnCl₂ x 4 H₂O
30 mM K-Acetat
10 mM CaCl₂ x 2 H₂O
15% (v/v) Glycerin in H₂O_{bid.}
mit Essigsäure auf pH 5,8 einstellen und sterilfiltrieren.

RF2-Lösung:

10 mM MOPS
10 mM RbCl
75mM CaCl₂x2H₂O
15% (v/v) Glycerin in H₂O_{bid.}
mit NaOH auf pH 5,8 einstellen und sterilfiltrieren

Transformation chemisch kompetenter *E. coli* Zellen

Für die Transformation wurden die aliquotierten, chemisch kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut, mit 10 µl Plasmidlösung (1-5 ng Plasmid-DNA) bzw. Ligationsansatz versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock (42°C, 30 s) wurden die Zellen 2 min auf Eis abgekühlt, mit 150 µl dYT-Medium versetzt und 60 min bei 37°C geschüttelt (Vibrax, 1100 Upm). Während dieser Phase wird die phänotypische Expression der, durch die Transformation vermittelten, Antibiotikaresistenz gewährleistet. Der Transformationsansatz wurde auf YT-Festmedium, welches das entsprechende Antibiotikum enthält, ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

4.2.2 Arbeiten mit *U. maydis***Kultivierungsbedingungen**

U. maydis-Stämme wurden als Schüttelkulturen oder auf Festmedien unter aeroben Bedingungen kultiviert. Schüttelkulturen wurden entweder in 3-5 ml des jeweiligen Mediums in Reagenzgläsern oder in 50-500 ml in Schüttelkolben angeimpft und über Nacht auf Rotationsschüttlern oder Horizontalschüttlern bei 200 Upm bei 28°C inkubiert. Übernachtskulturen wurden stets von Kolonien auf Festmedien, welche nicht länger als einen Monat bei 4°C gelagert wurden, inokuliert. Die Anzucht von Kolonien erfolgte über Nacht bei 28°C auf CM-Festmedium. Glycerinkulturen, bestehend aus 50% einer dichten YEPS-Light Übernachtskultur und 50% NSY-Glycerin Medium, zur langfristigen Lagerung wurden bei -80°C gelagert und vor weiteren Arbeiten auf CM-Festmedium ausplattiert. Sowohl Flüssig- als auch Festmedien enthielten nach Bedarf oben genannte Antibiotikakonzentrationen.

Bestimmung der Zelldichte bei *U. maydis*

Die Zelldichte von Flüssigkulturen wurde photometrisch mittels eines Novospec II Photometers (Pharmacia Biotech) bestimmt. Dazu wurde die optische Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 600 nm ermittelt. Im sicherzustellen, dass die Messung im Bereich der linearen Abhängigkeit stattfindet wurden die verwendeten Kulturproben so verdünnt, dass ihre OD₆₀₀ unter einem Wert von 0,6 lag. Als Referenzwert diente die OD₆₀₀ des jeweiligen Kulturmediums. Hierbei entspricht eine OD₆₀₀ = 1,0 etwa $1-5 \times 10^7$ Zellen/ml.

Protoplastierung und Transformation von *U. maydis*

(Schulz *et al.*, 1990; Gillissen *et al.*, 1992)

Der zu protoplastierende Stamm wurde zunächst aus einer Glycerinkultur auf CM-Festmedium ausplattiert und über Nacht bei 28°C inkubiert. Danach wurde eine Vorkultur in 5 ml CM-Flüssigmedium angeimpft und über Nacht bei 28°C auf dem Rotationsschüttler inkubiert. Aus dieser Vorkultur wurde am nächsten Tag eine Hauptkultur in 50 ml CM-Flüssigmedium inokuliert, welche über Nacht bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6-1,0 (idealerweise 0,8) bei 28°C und 200 Upm inkubiert wurde. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (3500 Upm, 5 min) sedimentiert und der Überstand verworfen. Das Sediment wurde in 2 ml SCS-Puffer (+ 3,5 mg/ml Novozym 234) resuspendiert und für 3-10 min bei Raumtemperatur inkubiert bis ca. 80% der Zellen Stecknadelkopf-ähnliche Strukturen aufwiesen. Der enzymatische Abbau der Zellwand wurde dabei ständig mikroskopisch kontrolliert. Nun wurde 30 ml eiskalter SCS-Puffer hinzugegeben und die Zellen durch Zentrifugation (2400 Upm, 5 min, 4°C) sedimentiert. Die Zellen wurden daraufhin zweimal mit je 10 ml eiskaltem SCS-Puffer und einmal mit 10 ml eiskaltem STC-Puffer gewaschen (2400 Upm, 5 min, 4°C) und anschließend in 1 ml eiskaltem STC-Puffer resuspendiert. Die Zellsuspension wurde zu je 100 µl in 2 ml Reaktionsgefäßen aliquotiert, in Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Zur Transformation mittels homologer Integration wurden Protoplasten zunächst auf Eis aufgetaut und mit 1 µl Heparinlösung sowie bis zu 10 µl Plasmidlösung (1-5 µg linearisiertes Plasmid) versetzt. Nach 15-20 min Inkubation auf Eis wurde 500 µl STC/PEG-Lösung zugegeben und erneut 15 min auf Eis inkubiert. Der Transformationsansatz wurde anschließend vorsichtig auf frischem Regenerationsagar (bestehend aus einer Phase „Bottom Agar“, welche die doppelte Antibiotikakonzentration enthält und einer Phase „Top Agar“ (Reg-Light Medium) ohne Antibiotikum) ausplattiert. Nach 3-9 Tagen (abhängig vom

eingesetzten Selektionsmarker) Inkubation bei 28°C können die Kolonien auf antibiotikahaltigen CM-Festmedium Platten vereinzelt werden.

SCS

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

STC

10 mM Tris-HCl, pH 7,5
100 mM CaCl₂
1 M Sorbitol
In H₂O_{bid.}, sterilfiltriert

Heparin-Lösung

15 mg/ml Heparin
in H₂O_{bid.}, sterilfiltriert.

STC/PEG

15 ml STC
10 g PEG 4000

Test auf hefeartiges und filamentöses Wachstum auf Festmedien

Um das Wachstum von *U. maydis* Stämmen auf verschiedenen Medien mit definierten Kohlenstoffquellen zu testen, wurden die Zellen zunächst in CM-Medium bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 – 1,0 angezogen. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation sedimentiert (3500 Upm, 5 min, 22°C), zweimal in H₂O_{bid.} gewaschen und in H₂O_{bid.} aufgenommen, sodass die OD₆₀₀ der Zellsuspension 1,0 betrug. Daraus wurden 10⁻¹ – 10⁻⁵ Verdünnungen hergestellt von denen jeweils 4 µl auf das jeweilige Festmedium aufgetropft wurde. Nachdem die Tropfen angetrocknet waren, wurden die Platten geschlossen und bei 28°C inkubiert.

Für die Tests auf hefeartiges Wachstum wurden die Zellsuspensionen auf CM-Glukose und AM-Glukose getropft. Für Stresstests wurde dem jeweiligen Medium eine der folgenden Substanzen hinzugefügt: NaCl (1 M), Sorbitol (1 M), Calcofluor-White (150 µg/ml), Kongo-Rot (50 µg/ml), H₂O₂ (1,5 mM) und SDS (100 µg/ml). Für Wachstumstests auf verschiedenen Chitinvarianten als Kohlenstoffquelle wurde den jeweiligen Medien folgende Substanzen zugesetzt: Chitin aus Krabbenschalen (1%), kolloidales Chitin (1 %, nach der HCl-Methode hergestellt).

Für die Tests auf filamentöses Wachstum wurden NM-Platten verwendet, welche mit Aktivkohle versetzt waren. Für Stresstests wurden NM-Platten verwendet die mit oben genannten Stressinduktoren versetzt waren.

Induktion von *U. maydis* Stämmen in Flüssigkultur

Um das filamentöse Wachstum in den Stämmen AB31 und AB33 oder die Genexpression von P_{crg1}- oder P_{nar1}-regulierbaren Genen zu induzieren, wurden die jeweiligen Stämme zunächst unter reprimierenden Bedingungen angezogen (im Falle des P_{crg1}-Promotors mit Glukose als vorherrschende Kohlenstoffquelle, im Falle des P_{nar1}-Promotors mit Ammonium als vorherrschende Stickstoffquelle; meist CM-Glukose) und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 – 1,0 bei

28°C und 200 Upm inkubiert. Nach zweimaligem Waschen (3500 Upm, 5 min, 22°C) wurden die Zellen in induzierendem Flüssigmedium resuspendiert (im Falle des P_{crg1} -Promotors Arabinose als vorherrschende Kohlenstoffquelle; im Falle des P_{nar1} -Promotors Nitrat als einzige Stickstoffquelle). Die Kulturen wurden unter induzierenden Bedingungen für die erforderliche Zeit (1 – 9 h) bei 28°C und 200 Upm inkubiert.

Test auf Adhäsion (Fernández-Álvarez *et al.*, 2012)

Um den Effekt von Chitinasedelektionen auf die Zelladhäsion von *U. maydis* Stämmen zu testen wurden diese zunächst in YEPS-Light Medium bis zu einer OD₆₀₀ von 1,0 angezogen. Anschließend wurde je 5 µl der Kulturen auf Stärke-haltige Festmedien aufgetropft. Nachdem die Tropfen angetrocknet waren, wurden die Platten verschlossen und zwei Tage bei 28°C inkubiert.

Stärke Medium

0,25 % (w/v) lösliche Kartoffelstärke
 0,1 % (w/v) Ammonium Sulfat
 0,1 % (w/v) Saccharose
 25 mM Phosphat-Puffer
 pH 7

Untersuchung der Teilungsrate

Zur Untersuchung der Teilungsrate verschiedener *U. maydis* Stämme wurden Wachstumskurven angefertigt. Dazu wurden zunächst Vorkulturen der Stämme in CM-Medium hergestellt und über Nacht bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8 herangezogen. Anschließend wurde die Zelldichte in CM-Medium auf eine OD₆₀₀ von 0,05 eingestellt und die Kulturen bei 28°C und 200 Upm inkubiert. Die OD₆₀₀ wurde nun im Zeitraum von zwölf Stunden im Abstand von zwei Stunden gemessen.

Test auf Virulenz von *U. maydis* Stämmen

Die Virulenz von *U. maydis* Stämmen wurde in Spritzinfektionen ermittelt. Dazu wurden Maissamen der Varietät „Early Golden Bantam“ ausgesät und in einer GroBanks® TS-110 Phytokammer (CLF Plant Climatics, Wertingen, Deutschland) sieben Tage angezogen (16 std Lichtphase, ~ 600 µE, 100 % Leuchtstoffröhren, 100 % LED, 28°C; acht Stunden Dunkelphase, 0 % Leuchtstoffröhren, 0 % LED, 22°C). Für die Infektion wurde zunächst eine Vorkultur des zu infizierenden Stammes hergestellt und am nächsten Tag eine 50 ml

Hauptkultur angeimpft. Die Hauptkultur wurde bis zu einer OD_{600} von 1,0 wachsen gelassen. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation (3500 Upm, 5 min, 22°C) sedimentiert und zweimal mit $H_2O_{dest.}$ gewaschen. Für die Infektion wurden die Zellen in $H_2O_{dest.}$ aufgenommen, sodass die Zelldichte einer OD_{600} von 3,0 entsprach. Ca. 250 μ l dieser Zellsuspension wurden in das Innere des Blattwirtels injiziert, sodass ein Austreten der Flüssigkeit am apikalen Ende der Pflanze zu beobachten war. Die Bonitur erfolgte sieben Tage nach Infektion.

Test auf Keimung der Teliosporen

Zur Sporenbildung wurden infizierte Pflanzen für ca. vier Wochen herangezogen. Anschließend wurde infiziertes Pflanzenmaterial (Tumore) geerntet und zwei Tage bei 37°C getrocknet. Die getrockneten Pflanzenteile wurden mit 2 – 3 ml $H_2O_{dest.}$ in einem Mörser zerkleinert und 2 ml der Suspension in ein 15 ml Greiner Röhrchen überführt. Anschließend wurden 2 ml 3 % $CuSO_4$ (Endkonzentration 1,5 %) hinzugegeben und das Gemisch für 15 min bei RT inkubiert, abzentrifugiert (5000 Upm, 5 min, 22°C) und dreimal mit $H_2O_{dest.}$ gewaschen. Das Präzipitat wurde in 2 ml Wasser, welchem Ampicillin (100 μ g/ml) und Kanamycin (40 μ g/ml) zugesetzt war, aufgenommen und auf CM-Medium ausplattiert. Nach zweitägiger Inkubation sind Kolonien zu erkennen, wobei aus jeder Spore eine Kolonie entstand, welche die verschiedenen Meioseprodukte enthält.

4.3 Färbemethoden und Fluoreszenzmikroskopie

Mikroskopie und Bildverarbeitung

Mikroskopische Analysen wurden mit den zwei folgenden Mikroskopen der Firma Visitron Systems (München, Deutschland) durchgeführt:

Stativ:	Axio Imager M.1 (Zeiss, Oberkochen, Deutschland)
Kamera:	Spot-Pursuit CCD-Kamera (Diagnostic Instruments, Sterling Heights, MI, USA)
Objektive:	Plan Neofluar (40x, NA 1,3, Öl) Plan Neofluar (63x, NA 1,25, Öl) Plan Neofluar (100x, NA 1,3, Öl)
Lampe:	HPX Halogen Metaldampflampe (LEJ, Jena, Deutschland)
Stativ:	Axio Observer Z.1 (Zeiss, Oberkochen, Deutschland)
Kamera:	CoolSNAP HQ2 CCD-Kamera (Photometrics, Tucson, AZ, USA)
Objektive:	Plan Neofluar (40x, NA 1,3, Öl) Plan Apochromat (63x, NA 1,4, Öl) Plan Apochromat (100x, NA 1,4, Öl) α -Plan Apochromat (100X, NA 1,46, Öl)

Lampe: HBO 103 Quecksilber Lampe (LEJ, Jena, Deutschland)
CoolLED PrecisExcite (Visitron)

Für die Mikroskopie fluoreszenzmarkierter Proteine wurden folgende Filtersätze verwendet:

DAPI: HC387/11BP, BS409LP, HC 447/60BP
(AHF Analysentechnik, Tübingen, Deutschland)
GFP: ET470/40BP, ET495LP, ET525/50BP
RFP/mCherry: ET560/40BP, ET585LP, ET630/75BP
(Chroma, Bellow Falls, VT, USA)

Für FRAP- (*fluorescence recovery after photobleaching*) Experimente und die Fotokonversion von mEOS2 wurde LASER-basierte Epifluoreszenz-Mikroskopie angewandt. Ein LASER-Vereinigungssystem (VS-LMS4, Visitron Systems) gekoppelt mit dem VisiFRAP 2D-System (Visitron) vereinigte hierbei die Feststofflaser für DAPI (405 / 80 mW), GFP (488 nm / 50 mW) und RFP/mCherry (561 / 50 mW).

Die Mikroskopsteuerung sowie die Bearbeitung der Bilder bzw. Bildserien erfolgten mittels des Programms Metamorph (Version 7.7.0.0, Molecular Devices, Seattle, IL, USA). Die weitere Bearbeitung der Bilder, hinsichtlich Helligkeit, Kontrast und ggf. Farbintensität, erfolgte mit den Programmen IrfanView, ImageJ (frei erhältlich zum Herunterladen) und Canvas 12 (ACD Systems International Inc., Seattle, WA, USA).

Färbemethoden

Calcofluor-White: Calcofluor-White (CW) bindet nicht genau spezifiziert an Chitin in der Zellwand von Pilzen. Es eignet sich daher sehr gut zur Visualisierung der Zellwände und Septen (Monheit *et al.*, 1984; Mitchison und Nurse, 1985). Für die Färbung wurde 1 µl einer CW-Stammlösung (1 mg/ml) zu 1 ml Zellsuspension gegeben und diese anschließend direkt mikroskopiert. Die fluoreszenzmikroskopische Betrachtung erfolgte im DAPI-Kanal.

WGA-FITC: Weizenkeim-Agglutinin (WGA, *wheat germ agglutinin*) bindet selektiv an N-Acetylglukosamin- und N-Acetylneuraminsäure-Reste und oligomeres Chitin (Nagata und Burger, 1974; Wright, 1984). Zu Färbezwecken wird es häufig, wie auch in dieser Arbeit, als Konjugat

mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC) verwendet. Für die Visualisierung von Zellwänden und Septen wurde 1 µl einer WGA-FITC Stammlösung (1 mg/ml) zu 1 ml Zellsuspension gegeben und diese anschließend direkt mikroskopiert. Die fluoreszenzmikroskopische Betrachtung erfolgte im GFP-Kanal.

MitoTracker Red[®]: Mitochondrien wurde mit dem spezifischen Mitochondrienmarker MitoTracker Red[®] CM-H2X-Ros (Chloromethyl Dihydro-X-Rosamine, Invitrogen) angefärbt. Dieser Fluoreszenz-Farbstoff akkumuliert auf Grund des Membranpotentials aktiv in Mitochondrien (Poot *et al.*, 1996). In seiner reduzierten Form fluoresziert der Farbstoff nicht. Die Fluoreszenz wird innerhalb der Mitochondrien durch Oxidation aktiviert. Für die Färbung wurde 1 ml der Kultur mit 1 µl MitoTracker Red Stammlösung (1 mM) versetzt und 5 min bei 28°C auf dem Drehrad inkubiert. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert (3500 Upm, 5 min, RT) und zweimal mit neuem CM-Medium gewaschen. Die fluoreszenzmikroskopische Betrachtung erfolgte im RFP-Kanal.

MitoSOXTM: Der Fluoreszenzfarbstoff MitoSOXTM Red dient der Visualisierung von Superoxid in Mitochondrien. Wie auch MitoTracker Red[®] akkumuliert dieser Farbstoff aktiv in Mitochondrien. Die Fluoreszenz des Farbstoffes wird dort spezifisch von Superoxid aktiviert, sodass der Farbstoff zumindest bedingt für die Quantifizierung dieser reaktiven Sauerstoffspezies eingesetzt werden kann. Für die Färbung wurde 1 µl MitoSOXTM Stammlösung (5 mM) zu 1 ml Zellsuspension gegeben, welche anschließend 5 min bei 28°C auf dem Drehrad inkubiert wurde. Danach wurden die Zellen abzentrifugiert (3500 Upm, 5 min, RT) und zweimal mit neuem CM-Medium gewaschen. Die fluoreszenzmikroskopische Betrachtung erfolgte im RFP-Kanal.

4.4 Molekularbiologische Standardmethoden

4.4.1 Isolierung von Nukleinsäuren

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

Die Isolierung von Plasmid-DNA erfolgte durch sog. „kochende Lyse“. Hierfür wurden 2 ml einer *E. coli* Übernachtskultur (in dYT-Medium + Antibiotikum) durch Zentrifugation (13000 Upm, 1 min, RT) sedimentiert. Das Sediment wurde anschließend mit 300 µl STET-Puffer resuspendiert, mit 30 µl Lysozym-Lösung versetzt und 60 sek bei 95°C auf einem Eppendorf Thermoblock inkubiert. Nach 5 min Zentrifugation (13000 Upm, 10 min, RT) konnten die Zelltrümmer und die denaturierte, genomische DNA mit Hilfe eines sterilen Zahnstochers abgenommen werden. Die Plasmid-DNA wurde anschließend durch Zugabe von 30 µl Minilysat(III)-Lösung und 500 µl Isopropanol gefällt und durch Zentrifugation (13000 Upm, 15 min, RT) sedimentiert. Die sedimentierte Plasmid-DNA wurde mit 70 % Ethanol gewaschen, der Überstand abgesaugt und das trockene Sediment in 100 µl TE/RNaseA-Puffer (TE Puffer mit 50 µg/ml RNaseA) durch 5 minütige Inkubation bei 50°C gelöst. Mit dieser Methode gelang es routinemäßig, ca. 50-100 µg Plasmid-DNA zu isolieren. Bei Bedarf wurde die Plasmid-DNA anschließend mit Hilfe des „JetQuick DNA clean up Kit“ aufgereinigt um hochreine Plasmid-DNA zu erhalten.

STET-Puffer

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

Lysozym-Lösung

10 mg/ml Lysozym
in 1x TE-Puffer

Minilysat(III)-Lösung

3 M NaAC, pH 4,8
in H₂O_{bid}.

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

Für die Isolierung genomischer DNA (gDNA) wurde zunächst eine 3 ml Übernachtskultur des jeweiligen Stammes in YEPS_{Light}-Medium angefertigt. Am nächsten Morgen wurden 2 ml der dicht bewachsenen Kultur in ein 2 ml Reaktionsgefäß mit ca. 300 µg Glasperlen (150-200 µm Ø) überführt und durch Zentrifugation (13000 Upm, 2 min, RT) geerntet, der Überstand abgesaugt und das Zellsediment in 500 µl TE-Phenol/Chloroform und 400 µl Lysispuffer aufgenommen. Das Gemisch wurde anschließend 6-10 min bei 1200 Upm auf einem Vibrax-Schüttler inkubiert um die Zellen aufzuschließen. Die Trennung von wässriger und organischer Phase erfolgte durch Zentrifugation (13000 Upm, 15 min, RT). Von der wässrigen, oberen Phase wurden 400 µl in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, mit 1 ml 100 % Ethanol gemischt und Zentrifugiert (13000 Upm, 15 min, RT). Das Sediment wurde

mit 70 % Ethanol gewaschen und nach 5 min Trockenzeit in 50 µl TE/RNaseA Lösung aufgenommen. Zum Lösen der gDNA wurde das Gemisch 5 min bei 50°C auf einem Eppendorf-Thermomixer bei 800 Upm inkubiert. Zur Qualitätskontrolle wurde jeweils 1 µl der gDNA auf ein 0,8 % Agarosegel aufgetragen und analysiert.

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

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

TE-Phenol/Chloroform

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

4.4.2 Handhabung und *in vitro* Modifikation von Nukleinsäuren

Sämtliche hier beschriebene *in vitro* Methoden zur Handhabung von Nukleinsäuren wurden, falls nicht gesondert erwähnt, nach (Sambrook *et al.*, 1989a) durchgeführt.

Fällung von DNA

Die Aufreinigung und Konzentrierung von Nukleinsäuren aus wässriger Lösung erfolgte durch Fällung. Dazu wurden die Proben mit 1/10 Volumen Natrium-Acetat (3M, pH 5,3) und dem 2,5-fachen Volumen 100% Ethanol versetzt, gemischt und für 1 h bei -20°C inkubiert. Das Präzipitat wurde durch 10- bis 20-minütige Zentrifugation (13000 Upm, RT) sedimentiert und mit 70 % Ethanol gewaschen, um Salze zu entfernen. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt, der Niederschlag kurz getrocknet und im jeweiligen Volumen H₂O_{bid.} oder TE-Puffer gelöst.

Phenol/Chloroform-Extraktion von DNA

Proteine und andere Verunreinigungen wurden aus wässrigen DNA-Lösungen durch Extraktion mit Phenol entfernt. Die Probe wurde mit gleichem Volumen TE-Phenol kräftig gemischt. Die Phasentrennung erfolgte durch Zentrifugation (13.000 Upm, 5 min) und die obere wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. In einem zweiten Schritt wurde die Probe mit dem gleichen Volumen PC ausgeschüttelt (Sambrook *et al.*, 1989b). Die so gereinigten Nukleinsäuren wurden anschließend mit Ethanol präzipitiert (s.o.).

Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde fotometrisch bestimmt. Bei einer Wellenlänge von 260 nm und einer Schichtdicke von 1 cm entspricht ein Absorptionswert von 1 einer Konzentration von etwa 50 µg/ml doppelsträngiger DNA und 33 µg/ml einzelsträngiger DNA. Als Maß für die Reinheit der Desoxyribonukleinsäuren diente der Quotient aus den optischen Dichten bei den Wellenlängen 260 nm und 280 nm. Für reine DNA sollte er bei etwa 1,8 liegen. niedrigere Werte deuten Verunreinigungen mit Proteinen, höhere Werte Verunreinigungen mit Salzen oder Zuckern an. Die Messungen erfolgten an einem Nanodrop-2000 Spektralfotometer (Thermo Scientific).

Restriktion von DNA

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

0,5 µg	DNA
10 µg	Rinderserum-Albumin (falls empfohlen)
0,5 U	Restriktionsenzym
in 20 µl	Restriktionspuffer (1x)

Nach Inkubation für 1 h bei 37 °C (bzw. der für das jeweilige Enzym optimalen Temperatur) wurden dem Ansatz 2 µl nativer Auftragspuffer zugesetzt und die Reaktionsprodukte auf Agrosegele analysiert.

Dephosphorylieren linearer DNA-Fragmente

5'-terminale Phosphatgruppen können mit Hilfe von Alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm abgespalten werden. Da DNA-Stränge ohne 5'-terminale Phosphatgruppen nicht religieren können, kann so die Religation von linearisierter Plasmid-DNA verhindert werden. Ein typischer Reaktionsansatz enthielt:

1 µg	Plasmid-DNA
1 U	Alkalische Phosphatase
in 100 µl	Alkalische Phosphatase-Puffer (1x)

Der Ansatz wurde 30 min bei 37 °C, anschließend weitere 15 min bei 55 °C inkubiert. Zur Inaktivierung des Enzyms wurde eine Extraktion mit 100 µl PC durchgeführt. Die DNA wurde durch Zugabe von 10 µl Na-Acetat, pH 5,3 und 250 µl Ethanol gefällt, mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in TE-Puffer aufgenommen.

Auffüllen von 5' überhängenden DNA-Fragmentenden

Das Klenow-Fragment der *E. coli* DNA-Polymerase I ist in der Lage, 5' überhängende DNA-Fragmentenden in Anwesenheit von Desoxyribonukleotiden und Magnesiumionen aufzufüllen und so glatte Enden zu erzeugen. Die Reaktion kann in allen herkömmlichen Restriktionspuffern durchgeführt werden. Dieses Vorgehen ist die Methode der Wahl, um nichtkompatible Fragmentenden ligierbar zu machen.

Ein typischer Reaktionsansatz enthält:

1 µg	DNA-Fragmente in beliebigem Restriktionspuffer
50 µM	dNTPs
1 U	Klenow-Fragment der <i>E. coli</i> DNA-Polymerase I

Der Ansatz wurde 15 min bei RT inkubiert. Zur Inaktivierung des Enzyms folgte eine Inkubation bei 75 °C für 10 min. Derartig behandelte DNA-Fragmente können direkt in eine Ligation eingesetzt werden.

Ligation von DNA-Fragmenten

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

100 ng	linearisierter, dephosphorylierter Vektor
fünffach molarer Überschuss an linearem Fragment	
1 U	T4 DNA-Ligase
	in 10 µL Ligase-Puffer

Der Ansatz wurde entweder 2-4 h oder über Nacht bei 16 °C inkubiert.

Gateway-Klonierung

Bei der Gateway-Klonierung handelt es sich um eine Klonierungsmethode bei der Restriktion und Ligation auf Grund besonderer Eigenschaften des verwendeten Restriktionsenzym (hier BsaI, New England Biolabs) vereint werden können. Die BsaI-Erkennungssequenz und die Schnittstelle liegen hier räumlich voneinander getrennt vor, sodass die Erkennungssequenz während der Reaktion entfernt wird und variable Enden entstehen. Dies ermöglicht eine Klonierungsreaktion, bei welcher verschiedene Fragmente, sog. Aufbewahrungs-Plasmide

und Ziel-Plasmide kombiniert werden können um, ohne vorherige Restriktion, gezielt ein spezifisches Ligationsprodukt zu erzeugen welches die gewünschten Fragmente in der gewünschten Orientierung vereint. Ein typischer Klonierungsansatz war wie folgt zusammengesetzt:

75 ng	Aufbewahrungsplasmid (mehrere möglich)
75 ng	Zielpasmid
40 ng	Flanken (PCR-generiert und aufgereinigt)
0,75 µl	T4 DNA-Ligase
0,5 µl	BsaI-HF (NEB)
Auf 15 µl mit H ₂ O _{bid.} auffüllen	

Die Inkubation der Klonierungsreaktion erfolgte in einem PTC200 Thermocycler (MJ Research) unter folgenden Reaktionsbedingungen:

PCR-Programm: <Main>; <GOGATE>

37 °C	2 min	} 50 Zyklen
16 °C	5 min	
37 °C	5 min	
50 °C	5 min	
80 °C	5 min	
16 °C	∞	

Auftrennung und Nachweis von DNA-Fragmenten

In einem Agarosegel können Nukleinsäuren im elektrischen Feld entsprechend ihrer Größe aufgetrennt, identifiziert und isoliert werden (Sambrook *et al.*, 1989a). In der Regel wurden Gele mit 0,8% Agarose hergestellt. Hierfür wurde die entsprechende Menge an Agarose in TAE-Puffer aufgekocht, nach Abkühlung auf ca. 60°C mit Ethidiumbromid versetzt (Endkonzentration 0,5 µg/ml) und in einen Elektrophoreseschlitten gegossen. Nach Erstarren des Gels wurde die Gelkammer mit TAE-Puffer gefüllt. Die Proben wurden vor dem Auftragen im Verhältnis 6:1 mit nativem Auftragspuffer gemischt. Die Elektrophorese erfolgte bei konstanter Spannung (90-120 V). Die DNA-Banden konnten im UV-Durchlicht (254 nm) mit einer „eagle eye“-Apparatur (Stratagene) detektiert und auf Thermalpapier fotografisch dokumentiert werden.

Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

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

Sequenzierung von Plasmid-DNA

Für die Sequenzierung von Plasmid-DNA wurde der Sequenzier-Service der Ludwigs-Maximilian Universität München in Anspruch genommen. Vor der automatischen Sequenzierung wurde die DNA mittels JetQuick® DNA Reinigungskit aufgereinigt. Je Sequenzier-Reaktion wurden 100-300 ng Plasmid-DNA mit 2 pmol des Oligonukleotids gemischt. Die erhaltenen Sequenzrohdaten konnten zur weiteren Bearbeitung in Clone Manager 9 importiert werden.

4.4.3 Transfer und Nachweis von DNA auf Membranen

Transfer von DNA aus Agarosegelen auf Nylonmembranen (Southern-Blot) (modifiziert nach (Southern, 1975))

Der Transfer der aufgetrennten DNA-Fragmente aus einem Agarosegel auf eine Nylonmembran erfolgte durch Kapillar-Blot. Hierbei wird die Transfer-Lösung (20x SSC-Puffer) aus einem Pufferreservoir über Kapillarkräfte durch das Gel hindurch in einen auf dem Gel platzierten Stapel Papierhandtücher gesaugt. Die DNA-Fragmente werden durch den Pufferstrom aus dem Gel eluiert und binden an die darüber liegende Nylonmembran. Ein gleichmäßig verteiltes Gewicht auf dem Papierstapel garantiert eine dichte Verbindung zwischen den jeweiligen Lagen des Transfersystems. Vor dem Transfer wurde das Agarosegel 20 min in 0,25 M HCl inkubiert, um einen Teil der Purine abzuspalten, damit ein Transfer großer DNA-Fragmente erleichtert wird. Anschließend wurde das Gel für 20 min in DENAT und 20 min in RENAT inkubiert.

Aufbau des Blots von oben nach unten:

Gewicht (ca. 500 g)

Stapel Papierhandtücher

3 Lagen Whatman 3MM

Nylonmembran (Hybond N+ bzw. Hybond XL)

Agarosegel

Whatman 3MM-Brücke zum Pufferreservoir

Pufferreservoir

Der Kapillar-Blot erfolgte über Nacht. Anschließend wurde die Membran kurz getrocknet und die DNA durch UV-Bestrahlung mit einem UV-Stratalinker 1800 (Stratagene) fixiert.

20x SSC-Puffer

3 M NaCl

0,3 M Na-Citrat * 2 H₂O

in H₂O_{bid.}, pH-Wert mit HCl auf 7,0 eingestellt

DENAT-Lösung

1,5 M NaCl

0,4 M NaOH

in H₂O_{bid.}

RENAT-Lösung

1,5 M NaCl

282 mM Tris-HCl

218 mM Tris-Base

in H₂O_{bid.}

Spezifischer Nachweis immobilisierter Nukleinsäuren (DIG-Methode):

Für den Nachweis genomischer DNA-Fragmente für die Stammverifizierung wurden genspezifische Sonden verwendet, welche durch den Einbau von Digoxigenin-11-dUTP (DIG) markiert und detektiert werden können. Die Markierung erfolgte mittels „PCR DIG-labeling Kit“ (Roche) während einer PCR Reaktion. Eine typische Markerungsreaktion enthielt:

25 ng linearisierte Plasmid DNA

5 µl Phusion-HF Puffer

5 µl DIG-labeling Mix (Roche)

Je 20 pmol Oligonukleotide

0,5 µl Phusion DNA-Polymerase

Auf 50 µl H₂O_{bid.}

Die Markierungs-PCR wurde analog einer Standard PCR-Reaktion auf einem PTC200 Thermocycler (MJ Research) durchgeführt.

Die zuvor UV-bestrahlte Membran (s. Kapitel: Southern-Blot) wurde zunächst 39 min bei 65°C in Hybridisierungspuffer prähybridisiert. Währenddessen wurde die Sonde in 15 ml

Hybridisierungspuffer gelöst und zur Denaturierung 5 min bei 99°C inkubiert. Anschließend wurde der Prähybridisierungspuffer entfernt und die denaturierte Sonde zur Membran gegeben. Der Hybridisierungsansatz wurde in der Regel über Nacht, mindestens jedoch 6 std bei 65°C inkubiert. Nun wurde die Membran jeweils 15 min bei 65°C mit Southern-Waschpuffer I, Southern-Waschpuffer II und Southern-Waschpuffer III gewaschen. Alle nachfolgenden Schritte erfolgten bei Raumtemperatur. Nach 5 minütiger Inkubation mit DIG-Waschlösung wurde die Membran zunächst 30 min mit DIG2-Puffer blockiert und anschließend mit Antikörperlösung (Anti-Digoxigenin-AB Fab-Fragmente (Roche); 1:10000 in DIG2) für 60 min inkubiert. Die Membran wurde zweimal mit DIG-Waschlösung gewaschen und in DIG3-Puffer 5 min äquilibriert. Anschließend wurde die Membran 5 min mit Detektionslösung (CDP-Star (Roche); 1:100 in DIG3) inkubiert und die Chemilumineszenz mittels ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare) detektiert und digitalisiert.

20xSSPE

3 M NaCl
200 mM Na₂HPO₄
20 mM Na₂-EDTA
In H₂O_{bid.}, pH 7,4

Denhardt-Lösung

2% (v/v) BSA Fraktion V (Sigma A-9647)
2% (v/v) Ficoll
2% (v/v) PVP (Sigma PVP-360)
In H₂O_{bid.}

Southern-Hybridisierungspuffer

26 % (v/v) SSPE (20x)
5 % (v/v) Denhardt-Lösung
5 % (v/v) SDS (10%)
In H₂O_{bid.}

Southern-Waschpuffer I

2x SSPE
0,1 % SDS
in H₂O_{bid.}

Southern-Waschpuffer II

1x SSPE
0,1 % SDS

Southern Waschpuffer III

0,1x SSPE
0,1 % SDS
in H₂O_{bid.}

DIG1

100 mM Maleinsäure
150 mM NaCl
In H₂O_{bid.},
pH-Wert mit NaOH auf 7,5 einstellen

DIG-Waschpuffer

0,3 % Tween-20
In DIG1-Lösung

DIG2

1 % (w/v) Magermilchpulver
In DIG1-Lösung

DIG3

100 mM Tris-HCl
100 mM CaCl
In H₂O_{bid.}
pH-Wert mit NaOH auf 9,5 einstellen

4.4.4 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Mittel PCR ist es möglich, spezifische DNA-Fragmente gezielt zu amplifizieren. Hierzu werden spezifische Oligonukleotide eingesetzt, welche im 5'-Bereich der gewünschten Region (sog. „forward primer“) und im 3'-Bereich der gewünschten Region (sog. „reverse

primer“) hybridisieren. Die PCR-Reaktionen wurde mit einem Thermocycler PTC-200 (MJ Research) oder einem Labcycler (SensoQuest) durchgeführt. Die Reaktionsansätze waren wie folgt:

Standard PCR (nach Innes *et al.*, 1990):

10-100 ng	Matrizen-DNA
1 U	Taq-Polymerase
0,5 µl	25 mM dNTPs
je 0,5 µl	100 µM Primer
in 50 µl	1x Taq-Polymerase Puffer

Initiale Denaturierung	94°C	/ 5 min
Amplifikation (34 Zyklen):		
Denaturierung	94 °C	/ 30 sec
Hybridisierung	60 - 65 °C	/ 30 sec
Elongation	72 °C	/ 1 min pro 1000 Basenpaare
Endelongation	72°C	/ 10 min

Phusion®-Polymerase PCR:

Diese Variante wurde zur Amplifikation genomischer Fragmente von *U. maydis* oder zur Generierung von Fragmenten für die Klonierung eingesetzt. Da es sich bei der Phusion®-Polymerase um eine sog. „Hochgenauigkeitspolymerase“ handelt, zeichnet sie sich durch eine hohe Prozessivität und eine sehr niedrige Fehlerrate aus.

10-100 ng	Matrizen-DNA
1 U	Phusion®-Polymerase
0,5 µl	25 mM dNTPs
Je 0,5 µl	100 µM Primer
In 50 µl	1x Phusion®-HF Puffer

Initiale Denaturierung	98 °C	/ 30 sec
Amplifikation (30-34 Zyklen):		
Denaturierung	98°C	/ 10 sec
Hybridisierung	60 – 65 °C	/ 15 sec
Elongation	72 °C	/ 30 sec pro 1000 Basenpaare
Endelongation	72 °C	/ 8 min

4.5 Biochemische Methoden

4.5.1 Protein-expression und -präparation

Präparation von Proteinen aus *U. maydis*

Zur Präparation von Gesamtzellextrakten wurde zunächst eine Übernachtskultur in 5 ml CM-Medium hergestellt. Aus dieser wurde am nächsten Tag eine 50 ml Hauptkultur inokuliert welche über Nacht bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8 - 1 bei 28°C inkubiert wurde. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (5000 Upm, 5min, 4 °C) geerntet und in 1 ml kaltem Lysepuffer resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in Metallzylinder, welche mit flüssigem Stickstoff vorgekühlt waren, überführt, 2 vorgekühlte Metallkugeln hinzugegeben und weitere 5 min in flüssigem Stickstoff durchfrieren gelassen. Der Zellaufschluss erfolgte in einer Kugelmühle (MM 400, Retsch GmbH, Haan, Deutschland) für 5 min bei einer Schüttelfrequenz von 30 Hz. Anschließend wurde der Zellaufschluss bei 4 °C aufgetaut, in ein vorgekühltes (4 °C) 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und Zellreste durch Zentrifugation (10000 Upm, 15 min, 4 °C) sedimentiert. Der Überstand wurde abgenommen und in ein frisches, vorgekühltes 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt.

Proteinaufschlüsse für die Analyse (z.B. mittels SDS-PAGE oder Western-Blot) wurden standardmäßig unter denaturierenden Bedingungen hergestellt. Aufschlüsse für Aktivitätsmessungen (z.B. mittels Aktivitätsgel oder LC/MS-Analyse) wurden unter nativen Bedingungen hergestellt.

Protein-Lysepuffer (nativ)

50 ml	1x PBS-Puffer
2,5 mM	Benzamidin
1 mM	PMSF
1 mM	DTT
20 µl	Sigma P8340
1 Tablette	cOmplete EDTA-free (Roche)

Protein-Lysepuffer (denaturierend)

50 ml	1x PBS-Puffer
2,5 mM	Benzamidin
1 mM	PMSF
1 Tablette	cOmplete EDTA-free
8 M	Harnstoff

Heterologe Proteinexpression in *E. coli*

Zur Expression und Aufreinigung heterologer Proteine wurden *E. coli* Zellen der Stämme Rosetta (DE3) pLysS oder Rosetta Gami (DE3) pLysS mit dem jeweiligen Expressionsplasmid transformiert. Anschließend wurde zunächst eine Übernachtskultur hergestellt aus welcher am nächsten Morgen eine Expressionskultur inokuliert wurde (OD₆₀₀ = 0,1). Die Expressionskultur wurde bei 37°C solange inkubiert, bis eine OD₆₀₀ von 1,0

erreicht war. Zur Induktion der Proteinexpression wurde 1 mM IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid) zugesetzt und zu mehreren Zeitpunkten (0, 1, 3, 5 std, über Nacht) Proben für die Analyse mittels SDS-PAGE genommen.

Präparation von Proteinen aus *E. coli*

Zur Präparation und Aufreinigung heterolog exprimierter Proteine aus *E. coli* wurde eine 100 ml Expressionskultur hergestellt und mittels 1 mM IPTG induziert (s.o). Nach gewünschter Expressionszeit wurde die Kultur durch Zentrifugation (8500 Upm, 5 min, 4°C) geerntet und das Sediment in 10 ml eiskaltem *E. coli*-Lysepuffer resuspendiert und auf Eis aufbewahrt. Der Zellaufschluss erfolgte mittels Ultraschallbehandlung (Stufe 4, 30 s Impuls, 30 s Ruhephase, 3 Wiederholungen; Cell Disruptor B15, Branson; Mikrospritze konisch 5 mm, Heinemann). Nach dem Zellaufschluss wurden Zelltrümmer und unlösliche Proteine durch Zentrifugation (8500 Upm, 15 min, 4 °C) sedimentiert und der Überstand, welcher die lösliche Proteinfraction enthält, abgenommen und über Nickel-Affinitätschromatographie aufgereinigt.

***E. coli*-Lysepuffer**

50 mM	NaH ₂ PO ₄
300 mM	NaCl
10 mM	Imidazol
pH mit NaOH auf 8,0 einstellen	

***In vitro* Expression von Proteinen**

Für die Expression und Aufreinigung der *U. maydis* Chitinasen Cts1, Cts2 und Cts3 wurde das RTS 100 Wheat-Germ CECF Kit (5'Prime) verwendet. Den Anweisungen des Herstellers folgend wurde für die Reaktion 4-7 μ g aufgereinigte Plasmid-DNA eingesetzt. Die Expression erfolgte über Nacht (bis zu 24 h) bei 24°C auf einem Eppendorf Thermoblock.

Die Expression wurde mittels SDS-PAGE kontrolliert und die heterolog Exprimierten Proteine wurden über Nickel-Affinitätschromatographie aufgereinigt.

Proteinaufreinigung mittels Nickel-Affinitätschromatographie

Für die Aufreinigung heterolog exprimierter His-Tag markierter Proteine mittels Nickel-Affinitätschromatographie wurden die löslichen Proteinfractionen zunächst mit 1 - 2 ml Ni²⁺-NTA Agarose (Qiagen), welche vorher gemäß Herstellerangaben äquilibriert wurde, gemischt und mindestens 1 std bei 4 °C geschüttelt. Anschließend wurde das Gemisch auf eine Polypropylen-Säule (5 ml, Qiagen) gegeben und mehrfach (5-7x) mit 2 ml Waschpuffer

gewaschen. Die Elution erfolgte durch mehrfache (4-5x) Zugabe von 2 ml Elutionspuffer. Die Eluat-fractionen wurden gesammelt, mittels Größenausschlussfilter (Amicon Ultra-15, Millipore, 30 kDa) aufkonzentriert und mittels PD10 Entsalzungs-Säulen in KHMg-Puffer umgepuffert. In dieser Form sind die Proteine bei -20 °C mehrere Monate lagerfähig.

Waschpuffer

50 mM NaH_2PO_4
 300 mM NaCl
 20 mM Imidazol
 pH mit NaOH auf 8,0 einstellen

Elutionspuffer

50 mM NaH_2PO_4
 300 mM NaCl
 250 mM Imidazol
 pH mit NaOH auf 8,0 einstellen

4.5.2 Auftrennung und Nachweis von Proteinen**Konzentrationsbestimmung mittels Bradford-Test (nach Bradford, 1976)**

Für die Proteinbestimmung nach der Bradford Methode werden 10 µl der Proteinlösung mit Bradford-Färbelösung (Protein Assay Dye, BioRad; vor Gebrauch 1:5 mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid.}}$ verdünnen) in einer 96-Well Platte gemischt und für 5 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde in einem monochromatischen Fluoreszenzspektrometers (Infinite M200, Tecan) die Absorption bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen. Die Konzentrationsbestimmung erfolgt anhand eines Rinderserum-Albumin Standards (Standardreihe: 0 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml, 150 µg/ml und 200 µg/ml BSA). Um sicherzustellen, dass alle Proben im linearen Abhängigkeitsbereich gemessen werden, wurden Gesamtproteinpräparate vor der Messung standardmäßig 1:20 mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid.}}$ verdünnt.

Auftrennen von Proteinen mittels SDS-PAGE (nach Laemmli, 1970)

Proteinproben wurden für analytische Zwecke standardmäßig mittels denaturierender, diskontinuierlicher SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) anhand ihres Molekulargewichts aufgetrennt. Hierzu wurden in der Regel 10 % Trenngele mit einer Tiefe von 1 mm verwendet. Die Proben wurden mit 1/3 Volumen 3x Laemmli-Puffer (150 mM Tris-HCl pH 6,8, 30 % Glycerin, 15 % β -Mercaptoethanol, 6 % SDS, 0,003 % Bromphenolblau) gemischt und 5 min bei 99 °C auf einem Eppendorf Thermoblock inkubiert, um Proteinstrukturen zu denaturieren. Die Gelelektrophorese wurde in einer Mini-Protean II Apparatur (BioRad) bei einer Spannung von 150-180 V durchgeführt.

3x Probenpuffer (Laemmli)

15 mM Tris-HCl, pH 6,8
 30 % (v/v) Glycerin
 6 % (w/v) SDS
 0,003 % Bromphenolblau
 in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid.}}$

Sammelgel

125 mM Tris-HCl, pH 6,8
 5% Acrylamid
 0,1 % (w/v) SDS
 0,05 % (w/v) APS
 0,001 % (v/v) TEMED

		in H ₂ O _{bid} .
Trenngel		
375 mM	Tris-HCl, pH 8,8	
8 %-10 %	Acrylamid	
0,1 % (w/v)	SDS	
1,25 % (v/v)	Glycerin	
0,05 % (w/v)	APS	
0,001 % (v/v)	TEMED	
in H ₂ O _{bid} .		
SDS-Laufpuffer		
25 mM	Tris, pH 8,4	
192 mM	Glycin	
0,1 % (w/v)	SDS	
in H ₂ O _{bid}		

Transfer von Protein aus Polyacrylamidgelen auf PVDF-Membranen (Western-Blot)

Der Transfer von Proteinen aus SDS-Polyacrylamidgelen auf PVDF-Membranen (Hybond-P, Amersham; RPN303F, GE Healthcare) erfolgte mittels Elektro-Blot in einer halb-trocken Blot-Apparatur (L/SC-280, Sigma oder 846-015-200, Biometra) für 2 Stunden bei 1 mA pro cm² Gel. Dazu wurde die PVDF-Membran 1 min in 100 % Methanol aktiviert, mit H₂O_{dest} gewaschen und für 10 min in Anodenpuffer 2 äquilibriert. 2 Whatman-Papiere (3 mm) wurden in Anodenpuffer 1, 1 Whatman-Papier in Anodenpuffer 2 und 3 Whatman-Papiere in Kathodenpuffer getränkt.

Der Aufbau des Blots von Kathode zu Anode geschah folgendermaßen:

Kathode (-)

3 Lagen Whatman-Papier (in Kathodenpuffer getränkt)
 SDS-Polyacrylamidgel
 PVDF-Membran
 1 Lage Whatman-Papier (in Anodenpuffer 2 getränkt)
 2 Lagen Whatman-Papier (in Anodenpuffer 1 getränkt)

Anode (+)

Anodenpuffer 1

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

TBS

20 mM Tris-HCl, pH 7,6
 136 mM NaCl
 In H₂O_{bid}.

Anodenpuffer 2

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

TBST

0,05 % (v/v) Tween 20
 in TBS

Kathodenpuffer

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

Nachweis immobilisierter Proteine

Der Nachweis auf PVDF-Membranen immobilisierter Proteine erfolgte immunhistochemisch mittels indirekter Antikörpermarkierung. Dazu wurde die Membran zunächst 30 min bei RT in Blockierlösung auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde die Membran 3x 10 min in TBST-Puffer gewaschen und 1 std bei RT oder über Nacht bei 4°C mit der primären

Antikörperlösung (jeweilige Verdünnung in Blockierlösung) inkubiert. Der primäre Antikörper wurde durch dreimaliges Waschen mit TBST-Puffer (jeweils 10 min) entfernt und die Membran anschließend mit sekundärer Antikörperlösung (Konjugiert mit Meerrettich-Peroxidase; jeweilige Verdünnung in Blockierlösung) für 1 std bei RT oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Membran wurde 3 x 10 min mit TBST-Puffer g und 5 min in TBS-Puffer gewaschen und anschließend mit ECL-Lösung (GE Healthcare Life Sciences) versetzt (Verwendung gemäß Herstellerangaben). Die entstehende Chemilumineszenz wurde in einem ImageQuant LAS400 detektiert und digitalisiert.

Primäre Antikörper

- α -Gfp (Mischung der monoklonalen Antikörper 7.1 und 13.1, Maus IgG1; Roche)
- α -Tub1 (Anti- α -Tubulin, monoklonaler Antikörper, Klon DM 1A, Maus IgG1; Sigma)
- α -His (Anti-Poly-Histidin, monoklonarer Antikörper, Klon His-1, Maus IgG2a, Sigma)

Sekundärer Antikörper

- α -Maus (Anti-Mouse IgG HRP Konjugat aus der Ziege, Promega)

Coomassie-Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen

Um aufgetrennte Proteinbanden im Polyacrylamidgel sichtbar zu machen, wurden Gele standardmäßig mit Coomassie-Färbelösung angefärbt. Hierfür wurden die Gele in eine kleine Schale gegeben, mit ca. 100 ml Coomassie-Färbelösung versetzt, kurz in der Mikrowelle erwärmt (ca. 30 s) und 1 h bei RT schüttelnd inkubiert. Die Färbelösung wurde dekantiert (kann wiederverwendet werden) und das Gel mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ abgewaschen. Nun wurden ca. 100 ml Entfärbelösung und ein fusselfreies Tuch (fixiert den ausgewaschenen Farbstoff) hinzugegeben und das Gel über Nacht schüttelnd bei RT inkubiert.

Coomassie-Färbelösung

0,05 % Coomassie Brilliant Blue R250
 15 % Essigsäure
 15 % Methanol
 In 1 l $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid.}}$

Entfärbelösung

15 % Essigsäure
 15 % Methanol
 in 1 l $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid.}}$

Präparation von Mitochondrien und mitochondrieller Proteine

Für die Anreicherung von Mitochondrien aus *U. maydis* wurde zunächst eine 50 ml Vorkultur in CM-Medium hergestellt und über Nacht bei 28 °C inkubiert. Aus der Vorkultur wurde eine 1 l Hauptkultur angeimpft, welche wiederrum über Nacht bei 28°C und 200 Upm inkubiert wurde. Am nächsten Tag wurden die Zellen durch Zentrifugation (5470 g / 1 min / 4 °C) geerntet, zweimal mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ gewaschen und das Frischgewicht des Sediments ermittelt. Die Sedimentierten Zellen wurden nun in 100 ml 0,6 M Ammoniumsulfat-Lösung resuspendiert. Zur Zellsuspension wurde nun 16 mg lytische Enzyme aus *Trichoderma harzianum* (Sigma

Aldrich) pro 1 g Frischgewicht gegeben und 1 std bei 37 °C und 110 Upm in einem breiten Becherglas inkubiert. Der Verlauf der Protoplastierung wurde in 10 min Abständen mikroskopisch verfolgt. Die protoplastierten Zellen wurden durch Zentrifugation (5470 g / 1 min / 4 °C) geerntet und in 12,5 ml pro 1 g Frischgewicht Puffer 1 gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 40 ml Puffer 2 (versetzt mit 1 mM PMSF und 15 µl Protease Inhibitor Mix p8340 (Sigma Aldrich)) resuspendiert und in einen 50 ml Glashomogenisierer gegeben. Die Suspension wurde nun für 30 – 40 Stöße mit einem Teflon-Pistill homogenisiert. Die Suspension sollte nun eine leichte Gelbfärbung aufweisen. Das Homogenisat wurde nun mit Puffer 2 auf ein Gesamtvolumen von 130 ml verdünnt und Zellreste durch Zentrifugation (5470 g / 1 min / 4 °C) abgetrennt. Der Überstand wurde erneut Zentrifugiert (17200 g / 10 min / 4 °C), um die Mitochondrien zu sedimentieren. Der Niederschlag, welcher leicht bräunlich und sehr klein ist, wurde in 300 µl Puffer 2 aufgenommen und vorsichtig homogenisiert. Zum Lösen mitochondrieller Proteinkomplexe bzw. Superkomplexe aus Membranen wurde das Homogenisat im Verhältnis 1:2 (*m/m*; Protein/Digitonin) mit Digitonin versetzt und das Gemisch 30 min auf Eis inkubiert.

4.5.3 Nachweis von Enzymaktivitäten

Chitinase-Aktivitätsgel (Tropf-Gele)

Der qualitative Nachweis der Chitinase-Aktivität in *U. maydis* Zellextrakten erfolgte mittels Tropf-Aktivitätsgel. Dazu wurden zunächst Gesamtzellextrakte hergestellt (s.o.), ihr Proteingehalt mittels Bradford-Assay (s.o.) bestimmt und auf Eis bei 4 °C aufbewahrt. In der Zwischenzeit wurde das Aktivitätsgel vorbereitet. Für den Aktivitätstest wurde ein gängiges Chitinasesubstrat (Glykolchitin) in ein Polyacrylamidgel eingegossen. Die Zusammensetzung des Gels war wie folgt:

3 ml	Acrylamid-Lösung (30 %, Rotiphorese [®] , Carl Roth)
4,2 ml	Aktivitätspuffer (200 mM Na-Acetat, pH 5,3 in H ₂ O _{bid.})
0,8 ml	Glykolchitin (1 % w/v)
10 µl	TEMED
40 µl	APS (10 %)

Nachdem das Gel auspolymerisiert war, wurde die obere Glasplatte abgenommen und das Gel kurz getrocknet (5 min, RT), um Flüssigkeitstropfen auf der Oberfläche zu entfernen (alternative kann ein fusselfreies Tuch verwendet werden). Parallel wurde eine feuchte Kammer für die Inkubation vorbereitet. Dazu wurde einige feuchte Papiertücher in eine kleine Schale gelegt und der Boden einer Petrischale umgedreht darauf platziert. Nun wurde jeweils

5 µl der Zellextrakte (Proteinkonzentrationen wurden anhand der im Bradford-Assay ermittelten Konzentrationen angeglichen) auf das Gel aufgetropft (Proben nicht austrocknen lassen!). Das Gel wurde anschließend auf der Petrischale in der feuchten Kammer platziert, welche mit Aluminiumfolie verschlossen wurde. Die Reaktion erfolgte über Nacht bei 28 °C. Am nächsten Tag wurde das Gel 10 min bei RT in einer Calcofluor-White (CW) Lösung (0,5 M Tris-HCl, pH 8,0; 0,01 % (w/v) Calcofluor-White) geschüttelt. Dabei bindet CW an das im Gel eingebundene Chitin. Anschließend wurde das Gel 1 h und weiterhin über Nacht in H₂O_{bid.} gewaschen. Die Detektion und Digitalisierung erfolgte im UV-Durchlicht (254 nm) mit einer „eagle eye“-Apparatur (Stratagene). Chitinaseaktivität ist als dunkler Hof an der Auftropfstelle zu erkennen.

Fluorometrische Bestimmung der Chitinaseaktivität von *U. maydis* Kulturen

Die Aktivität von *U. maydis* Chinasen wurde mit Hilfe fluoreszierender Substrate getestet. Zum Nachweis der Aktivität der Glykosylhydrolase-18 Chinasen wurde das Substrat β-D-N,N',N''-Triacetylchitotrioside (SIGMA Aldrich) verwendet. Zum Nachweis der Aktivität der Glykosylhydrolase-20 Chitinase (Cts4) wurde das Substrat N-Acetyl-β-D-Glukosaminide (Sigma Aldrich) verwendet. Für die Messung wurden zunächst Vorkulturen und anschließend 50 ml Hauptkulturen der jeweiligen *U. maydis* Stämme angezogen und die Zelldichte auf eine OD₆₀₀ von 1,0 eingestellt. 30 µl dieser Zellsuspensionen wurde in eine Reaktionseinheit einer 96-Well Platte pipettiert. Anschließend wurde 70 µl Substratlösung (1: 10 Verdünnung in KHM-Puffer, Verwendung gemäß Herstellerangaben) hinzugegeben. Die Messung erfolgte entweder als Endpunktmessung oder als Kinetik über einen Zeitraum von 1 std. Für die Endpunktmessung wurde der Reaktionsansatz zunächst für 1 std bei 28 °c inkubiert und dann mit 200 µl 1M Na₂CO₃-Lösung versetzt um die Reaktion zu stoppen und den pH in einen basischen Bereich (optimal für die Substratfluoreszenz) zu bringen. Anschließend wurde die Fluoreszenz der Proben in einem monochromatischen Fluoreszenz-Spektrometers (Infinite 200, Tecan) gemessen. Für Messungen der Chitinaseaktivität filamentös wachsender Kulturen wurden 6 std induzierte Kulturen verwendet. Die Messungen erfolgten in technischen und experimentellen Triplikaten.

Bestimmung der Chitinaseaktivität und der Produkte mittels UHPLC/MS

Die Bestimmung der Enzymaktivitäten mittels Hochleistungsflüssigchromatographie und Massenspektrometrie wurde mit Gesamtzellextrakten und aufgereinigten Proteinen (in vitro

exprimiert) durchgeführt. Als Substrate dienten die definierten Chitin-Oligomere Diacetyl-Chitobiose (A2), Triacetyl-Chitotriose (A3), Tetraacetyl-Chitotetraose (A4), Pentaacetyl-Chitopentaose (A5) und Hexaacetyl-Chitohexaose (A6; Megazymes, Bray, Irland). Analysiert wurden jeweils die Produkte der Reaktion einzelner Enzyme oder Zellextrakte mit einem definierten oligomeren Substrat. Ein typischer Reaktionsansatz enthielt:

1 µl	Gesamtzellextrakt (5 µg Gesamtprotein)
2 µl	Substrat (5 mg/ml; A6, A5, A4, A3 oder A2)
5 µl	Na-Acetat-Puffer (200 mM NA-Acetat, pH 5,3)
2 µl	H ₂ O _{bid.}

10 µl Gesamtvolumen

Der Reaktionsansatz wurde gut gemischt und über Nacht bei 28 °C inkubiert. Anschließend wurden Proteine und andere hochmolekulare Substanzen (>3 kDa) mittels Zentrifugation (13000 rpm, 15 min, RT) durch eine Polyethersulfon Größenausschlusssäule (3 kDa, VWR) abgetrennt. 5 µl des Durchflusses, welcher die Produkte (und evtl. auch die Edukte) der Reaktion enthielt, wurden mittels Ultrahochleistungs-Flüssigchromatographie aufgetrennt und mittels Massenspektrometrie analysiert (Hamer *et al.*, 2015; pers. Mitteilung: Stefan Cord-Landwehr). Zur quantitativen Bestimmung des A2/A3-Verhältnisses im Reaktionsgemisch mittels ELSD (*evaporative light scattering detection*; Verdampfungs-Lichtstreuungs-Detektion) wurde die Menge der Chito-Oligomere mittels einer Standard-Kalibrierungsgeraden ermittelt. Dazu wurde die Lichtstreuung definierte Mengen (50-500 ng) der Chito-Oligomere ermittelt und Standardkurven berechnet. Die Kurven folgen der allgemeinen Gleichung: $f_{(x)} = ax^b$. Dabei steht $f_{(x)}$ für die Fläche des ESLD-Signal-Maximums, x für die Menge des jeweiligen Chito-Oligomers und a bzw. b für substrat- bzw. gerätespezifische Variablen (Mengerink *et al.*, 1991; Decroos *et al.*, 2005; Remoroza *et al.*, 2012). Die zur Analyse verwendete UPLC-ELSD-ESI-MSⁿ Methode wurde von (Remoroza *et al.*, 2012) abgewandelt. Es wurde ein Dionex Ultimate 3000RS UHPLC System (Thermo Scientific, Milford, USA) verwendet, welches an einen ELSD-Detektor (Modell: Sedex 90LT, Sedere, Alfortville Cedex, Frankreich) und einen ESI-MSⁿ-Detektor (amaZon speed, Bruker, Bremen, Deutschland). Die Auftrennung der Chito-Oligomere erfolgte mittels „Hydrophiler Interactions Chromatography“ (HILIC) unter Verwendung einer Acquity UPLC BEH (bridged ethyl hybride) Amid Säule (1.7 µm, 2.1 mm x 150 mm; Waters Corporation, Milford, MA, USA) in Kombination mit einer vorgeschalteten VanGuard Säule (1.7 µm, 2.1

mm x 5 mm; Waters Corporation, Milford, USA). Die Durchflussrate betrug 0.4 ml min^{-1} und die Temperatur wurde auf $35 \text{ }^{\circ}\text{C}$ eingestellt. Jeweils $1 \mu\text{l}$ der Proben wurde mittels eines „Autosamplers“ injiziert. Die Auftrennung der Proben erfolgte über mittels eines Gradienten der Substanzen A (80:20, Acetonitril (ACN):Wasser) und B (20:80, ACN:Wasser). Beide Eluenten enthielten weiterhin 10 mM Ammonium Format und $0,1 \text{ } \%$ (v/v) Forminsäure. Die Auftrennung erfolgte über einen Zeitraum von 15 min. anhand des folgenden Elutionsprofils: $0 - 2.5 \text{ min.}$, isokratisch $100\% \text{ A}$; $2.5 - 12.5 \text{ min.}$, linear von 0% bis $75\% \text{ (v/v) B}$; gefolgt von einer Säulen-Rekalibrierung: $12.5 - 13.5 \text{ min.}$, linear von 75% bis $0\% \text{ (v/v) B}$, $13.5 - 15 \text{ min.}$, isokratisch $100\% \text{ (v/v) A}$. Das Eluat wurde mittels eines „1:1 Trenners“ (Accurate, Dionex Corporation, Sunnyvale, CA, USA) aufgetrennt und zu gleichen Teilen an den ELSD-Detektor und den ESI-MSⁿ-Detektor weitergeleitet. Der Gasdruck des HPLC-ELSD Zerstäubers wurde auf $3,5 \text{ bar}$, die Gasflussrate auf $1,75 \text{ l * min}^{-1}$, die Verdampfungstemperatur auf $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$ und die Signalamplifikation auf 12 eingestellt. Die ESI-MS Detektion wurde unter positiver Spannung mit einer Kapillarspannung von 4 kV und einer Endplatten-Ausläuferspannung von 500 V durchgeführt. Der Druck des ESI-MS Zerstäubers wurde auf 15 psi eingestellt. Die Flussrate des Trockengases betrug 8 l * min^{-1} und die Trocknungstemperatur betrug $200 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Massenspektren wurden im Scanbereich $50-2000 \text{ (m/z)}$ unter Verwendung des „*enhanced resolution scan modes*“ mit einer Zielmasse von 500 (m/z) erhoben und mittels des Datenanalyseprogramms Data Analysis 4.1 (Bruker, Bremen, Deutschland) ausgewertet.

4.6 In silico Methoden

4.6.1 DNA- und Protein-Sequenzanalyse

Für die Analyse von DNA- und Proteinsequenzen wurden die folgenden Programme oder Internetangebote verwendet:

- CloneManager Version 9.0 (Sci Ed Central Software) wurde zur Bearbeitung von DNA-Sequenzen (Plasmid- und genomische DNA), zum Erstellen von Oligonukleotiden, zum Erstellen von Plasmidkarten zum Planen von Restriktionsverdaus und zum Vergleich von Proteinsequenzen (multipler Sequenzvergleich) verwendet.
- MUMDB (MIPS (*m*unich *i*nformation *c*enter for *p*rotein *s*equences) Ustilago maydis Database) wurde zum suchen spezifischer Gene oder Genfamilien und für die

Beschaffung von DNA- und Proteinsequenzen verwendet (<http://mips.helmholtz-muenchen.de/genre/proj/ustilago>)

- BLAST2 (*B*asic *L*ocal *A*lignment *S*earch *T*ool; Altschul *et al.*, 1990; Altschul *et al.*, 1997; Gish und States, 1993). Identifizierung ähnlicher Protein- oder DNA-Sequenzen sowie homologe Gene/Proteine (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).
- *U. maydis* Dicodon Optimierungs-Tool (Finkernagel und Vranes, pers. Mitteilung; <http://dicodon-optimization.appspot.com/>) zur Optimierung von DNA-Sequenzen zur Expression in *U. maydis*.
- ClustalW2 und Clustal-Ω (Larkin *et al.*, 2007) wurde zum automatisierten Sequenzvergleich multipler Proteinsequenzen und zur Identifizierung konservierter Bereiche/Motive verwendet (<http://www.clustal.org/>).
- PSORT2 (Nakai und Kanehisa, 1992) wurde zur Vorhersage subzellulärer Lokalisationen von Proteinen verwendet (<http://psort.hgc.jp/>).
- WoLF PSORT (Horton *et al.*, 2007) wurde zur Vorhersage subzellulärer Lokalisationen von Proteinen verwendet (<http://wolfsort.org/>).
- TargetP V1.1 (Emanuelsson *et al.*, 2000) wurde zur Identifizierung N-terminaler Signalpeptide und zur Vorhersage subzellulärer Lokalisationen von Proteinen verwendet (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>).
- SignalP V4.1 (Petersen *et al.*, 2011) wurde zur Identifizierung N-terminaler Signalpeptide und zur Vorhersage subzellulärer Lokalisationen von Proteinen verwendet (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>).
- SMART (*S*imple *M*odular *A*rchitecture *R*esearch *T*ool; Schultz *et al.*, 1998) wurde zur Identifizierung konservierter Proteindomänen und zur Identifizierung von Proteinen mit ähnlichen putativen Funktionen verwendet (<http://smart.embl-heidelberg.de/>).

4.6.2 Modellierung und Analyse dreidimensionaler Proteinstrukturen

Vorhersage putativer Protein-strukturen und –funktionen

Für die Strukturvorhersage, die Vorhersage putativer Proteinfunktionen sowie die Ermittlung strukturanaloger Proteine und deren Substratbindestellen wurde zunächst ein vorläufiges Proteinmodell im Strukturvorhersageprogramm I-Tasser (Zhang, 2008; Roy *et al.*, 2010) erstellt. I-Tasser vereint verschiedene Internetangebote für die Strukturmodellierung von Proteinen, wie verschiedene „Threading-Tools“, zur vorläufigen Ermittlung der 3D-Struktur,

„TM-Align“ um verschiedene 3D-Strukturen miteinander zu vergleichen und Strukturanaloga zu finden, sowie Optimierungsprogramme, wie z.B. REMO (Li und Zhang, 2009) zur Strukturverbesserung. Als Grundlage für die Modellierung dienten die jeweiligen Aminosäuresequenzen der Proteine, welche von MUMDB bezogen wurden. Für die weitere, manuelle Verbesserung der Modelle wurde sowohl das jeweils beste Modell als auch die jeweils nächsten Strukturanaloga als *.pdb Datei gespeichert. Außerdem wurden Strukturmodelle der Glykosylhydrolase (GH) -Domäne erstellt, welche auf Grund der hohen evolutionären Konservierung eine genauere Vorhersage der 3D-Struktur ermöglicht.

Manuelle Verbesserung der Strukturmodelle

Programme: 1) EMACS (Linux-basierter Text Editor)

2) Coot (Grafikbearbeitungsprogramm für makromolekulare Strukturen)

Für eine genauere Strukturvorhersage wurden zunächst die Modelle, welche durch I-Tasser ermittelt wurden mit den, durch Röntgenstrukturanalyse ermittelten, Elektronendichte-Karten der jeweils besten Strukturanalogen in COOT überlagert. Dies ermöglichte eine manuelle Verfeinerung der Aminosäure- bzw. Atom-positionen bis zu einer Auflösungsgrenze von einigen wenigen Ångström (Å) anhand von experimentell ermittelten Strukturen aus Proteindatenbanken (RCSB PDB; PDBe). Des Weiteren wurden die Modelle für die Glykosylhydrolase-Domänen auf gleiche Weise verfeinert. Für die Modellierung der GH18-Domänen wurden die Röntgenstrukturen der Chitinasen CrChi1 aus *Clonostachys rosea* (PDB-Eintrag: 3G6L; Yang *et al.*, 2010), als Vorlage für Cts1, OfCht1 aus *Ostrinia furnacalis* (PDB-Eintrag: 3W4R; Chen *et al.*, 2014), als Vorlage für Cts2 und HsAmc1 aus *Homo sapiens* (PDB-Eintrag: 2YBU; Sutherland *et al.*, 2011), als Vorlage für Cts3, verwendet. Für die Modellierung der N-Acetylglukosaminidase Cts4 wurde die Röntgenstruktur von OfHex1, der β -N-Acetyl-Hexosaminidase aus *Ostrinia furnacalis* (PDB-Eintrag: 3NSM, Liu *et al.*, 2011), verwendet. Bei den ausgewählten Strukturvorlagen handelte es sich um die Enzyme mit der größten prognostizierten Strukturähnlichkeit. Die Sequenzidentität der GH18-Domäne von Cts1 und der verwendeten Vorlage CrChi1 beträgt 47 % (Abb. 6.2). Die Identität von Cts2 und Cts3 zur jeweiligen Vorlage ist mit 19 % bzw. 26 % geringer, jedoch beträgt die Sequenzähnlichkeit 62 % (zwischen Cts2 und OfCht1) bzw. 59 % (zwischen Cts3 und

HsAmc1; Sequenzalignments zu Cts2 und Cts3 siehe Anhang Abb. 6.3 und 6.4) und ist damit ausreichend für die Modellierung.

Anschließend wurden die Atomkoordinaten der Modelle der GH-Domäne mittels EMACS in die PDB-Dateien der Strukturmodelle der Volllängenproteine übertragen. Dadurch wurde die Genauigkeit der Vorhersage der aktiven Domäne verbessert. Die so erhaltenen Modelle wurden erneut mit experimentell ermittelten Elektronendichte-Karten überlagert, welche von Strukturen stammten, welche mit verschiedenen Liganden Co-kristallisiert wurden. Somit konnte speziell die Struktur der Substratbindestelle erneut verbessert werden. Die Atomkoordinaten des jeweiligen Substrats wurden mittels EMACS aus den originalen PDB-Dateien extrahiert und als eigenständige Moleküle in die PDB-Dateien der Strukturmodelle integriert.

Visualisierung von Proteinstrukturen und Strukturmodellen

Für die Visualisierung von Proteinstrukturen und Strukturmodellen wurde das Programm PyMol (Schrödinger LLC) verwendet. Die Sekundärstruktur-Annotation erfolgte mittels PSIPRED (Jones, 1999) und wurde zusätzlich mit Sekundärstrukturen der nächsten Strukturanaloge des jeweiligen Proteins abgeglichen.

Ermittlung der Aminosäurekonservierung von Proteinen

Um konservierte Aminosäuren in Proteinen zu ermitteln wurde COFACTOR (Roy *et al.*, 2012; Roy und Zhang, 2012) verwendet. COFACTOR nutzt die gleichen Algorithmen wie I-Tasser und ermittelt zunächst die 100 besten Strukturanaloge (TM-Align; TM-score > 0,3) des Zielproteins. Anschließend wird zunächst ein multipler Sequenzvergleich erstellt und der Konservierungsgrad der Aminosäuren mittels Jensen-Shannon Divergenz (JSD; Capra und Singh, 2007) ermittelt. Der Grad der Konservierung kann Werte zwischen 0 (nicht konserviert) und 9 (stark konserviert) annehmen. Zur weiteren Analyse wurden Aminosäuren mit einem Wert ≥ 7 als hochkonserviert definiert.

5. Literaturverzeichnis

- Aachmann, F.L., Sorlie, M., Skjak-Braek, G., Eijsink, V.G.H., und Vaaje-Kolstad, G.** (2012). NMR structure of a lytic polysaccharide monooxygenase provides insight into copper binding, protein dynamics, and substrate interactions. *Proc Natl Acad Sci USA* **109**, 18779-18784.
- Aam, B.B., Heggset, E.B., Norberg, A.L., Sorlie, M., Varum, K.M., und Eijsink, V.G.H.** (2010). Production of Chitooligosaccharides and Their Potential Applications in Medicine. *Mar Drugs* **8**:1482-1517.
- Adams, D.J.** (2004). Fungal cell wall chitinases and Glukanases. *Microbiology* **150**, 2029-2035.
- Alcazar-Fuoli, L., Clavaud, C., Lamarre, C., Aïmaniunda, V., Seidl-Seiboth, V., Mellado, E., und Latgé, J.-P.** (2011). Functional analysis of the fungal/plant class chitinase family in *Aspergillus fumigatus*. *Fungal Genet Biol* **48**, 418-429.
- Alonso-Nunez, M.L.** (2005). Ace2p Controls the Expression of Genes Required for Cell Separation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Biol Cell* **16**, 2003-2017.
- 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.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Und Lipman, D. J.** (1997). Gapped Blast And Psi-Blast: A New Generation Of Protein Database Search Programs. *Nucleic Acids Res* **25**, 3389-3402.
- Alvarez, F.** (2014). The Effect of Chitin Size, Shape, Source and Purification Method on Immune Recognition. *Molecules* **19**, 4433-4451.
- Amselem, J., Cuomo, CA., van Kan, J.A.L., Viaud, M., Benito, E.P., et al.** (2011) Genomic Analysis of the Necrotrophic Fungal Pathogens *Sclerotinia sclerotiorum* and *Botrytis cinerea*. *PLoS Genetics* **7(8)**, e1002230.
- An, B., Li, B., Qin, G., und Tian, S.** (2015). Function of small GTPase Rho3 in regulating growth, conidiation and virulence of *Botrytis cinerea*. *Fungal Genet Biol* **75**, 46-55.
- Arlt, H., Tauer, R., Feldmann, H., Neupert, W., und Langer, T.** (1996). The YTA10-12 complex, an AAA protease with chaperone-like activity in the inner membrane of mitochondria. *Cell* **85**, 875-885.
- Arlt, H., Steglich, G., Perryman, R., Guiard, B., Neupert, W., und Langer, T.** (1998). The formation of respiratory chain complexes in mitochondria is under the proteolytic control of the m-AAA protease. *Embo J* **17**, 4837-4847.
- Aronson, D.E., Costantini, L.M., und Snapp, E.L.** (2011). Superfolder GFP Is Fluorescent in Oxidizing Environments When Targeted via the Sec Translocon. *Traffic* **12**, 543-548.
- Aronson, J.R.N.N., und Halloran, B.A.** (2014). Optimum Substrate Size and Specific Anomer Requirements for the Reducing-End Glykoside Hydrolase Di-N-Acetylchitobiase. *Bioscience, Biotechnol and Biochem* **70**, 1537-1541.

- Aronson, N.N., Jr., Backes, M., und Kurunda, M.J.** (1989). Rat liver chitobiase: purification, properties, and role in the lysosomal degradation of Asn-linked Glykoproteins. *Arch Biochem Biophys* **272**, 290-300.
- Backhaus, R., Zehe, C., Wegenhangel, S., Kehlenbach, A., Schwappach, B., und Nickel, W.** (2004). Unconventional protein secretion: membrane translocation of FGF-2 does not require protein unfolding. *J Cell Sci* **117**, 1727-1736.
- Bakkeren, G., Kämper, J., und Schirawski, J.** (2008). Sex in smut fungi: Structure, function and evolution of mating-type complexes. *Fungal Genet Biol* **45**, 15-21.
- Baker, L.G., Specht, C.A., und Lodge, J.K.** (2009). Chitinases Are Essential for Sexual Development but Not Vegetative Growth in *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryotic Cell* **8**, 1692-1705.
- Balaban, R.S., Nemoto, S., und Finkel, T.** (2005). Mitochondria, Oxidants, and Aging. *Cell* **120**, 483-495.
- Baladron, V., Ufano, S., Duenas, E., Martin-Cuadrado, A.B., del Rey, F., und Vazquez de Aldana, C.R.** (2002). Eng1p, an Endo-1,3- -Glukanase Localized at the Daughter Side of the Septum, Is Involved in Cell Separation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic Cell* **1**, 774-786.
- Banuett, F.** (1992). *Ustilago maydis*, the delightful blight. *Trends Genet* **8**, 174-180.
- Banuett, F.** (1995). Genetics of *Ustilago maydis*, a fungal pathogen that induces tumors in maize. *Annu Rev Genet* **29**, 179-208.
- Banuett, F., und Herskowitz, I.** (1989). Different *a* alleles of *Ustilago maydis* are necessary for maintenance of filamentous growth but not for meiosis. *Proc Natl Acad Sci USA* **86** (15), 5878-5882.
- Banuett, F., und Herskowitz, I.** (1994a). Identification of *fuz7*, a *Ustilago maydis* MEK/MAPKK homolog required for *a*-locus-dependent and -independent steps in the fungal life cycle. *Genes Dev* **8**, 1367-1378.
- Banuett, F., und Herskowitz, I.** (1994b). Morphological Transitions in the Life-Cycle of *Ustilago-Maydis* and Their Genetic-Control by the *a*-and-*B*-Loci. *Exp Mycol* **18**, 247-266.
- Banuett, F., und Herskowitz, I.** (1996). Discrete developmental stages during teliospore formation in the corn smut fungus, *Ustilago maydis*. *Dev* **122**, 2965-2976.
- Basse, C.W., Kolb, S., und Kahmann, R.** (2002). A maize-specifically expressed gene cluster in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol* **43**, 75-93.
- Baum, L.G., Pang, M., Perillo, N.L., Wu, T., Delegeane, A., Uittenbogaart, C.H., Fukuda, M., und Seilhamer, J.J.** (1995). Human thymic epithelial cells express an endogenous lectin, Galektin-1, which binds to core 2 O-glycans on thymocytes and T lymphoblastoid cells. *J Exp Med* **181**, 877-887.
- Baumann, S., König, J., Koepke, J., und Feldbrügge, M.** (2014). Endosomal transport of septin mRNA and protein indicates local translation on endosomes and is required for correct septin filamentation. *EMBO reports* **15**, 94-102.

- Baumann, S., Pohlmann, T., Jungbluth, M., Brachmann, A., und Feldbrügge, M.** (2012). Kinesin-3 and dynein mediate microtubule-dependent co-transport of mRNPs and endosomes. *J Cell Sci* **125**, 2740-2752.
- Bearpark, T.M., und Stirling, J.L.** (1978). A difference in the specificities of human liver N-acetyl-beta-hexosaminidases A and B detected by their activities towards Glykosaminoglycan oligosaccharides. *Biochem J* **173**, 997-1000.
- Becht, P., Vollmeister, E., und Feldbrügge, M.** (2006) Role for RNA-binding proteins implicated in pathogenic development of *Ustilago maydis*. *Eukaryotic cell* **4**: 121-133.
- Begerow, D., Stoll, M., und Bauer, R.** (2006). A phylogenetic hypothesis of Ustilaginomycotina based on multiple gene analyses and morphological data. *Mycologia* **98**, 906-916
- Bendtsen, J.D., Jensen, L.J., Blom, N., von Heine, G., und Brunak, S.** (2004) Feature based prediction of non-classical and leaderless protein secretion. *Protein Eng Des Sel* **17(4)**, 349-356
- Bendtsen, J.D., Kiemer, L., Fausboll, A., und Brunak, S.** (2005) Non-classical protein secretion in bacteria. *BMC Microbiology* **5**, 58.
- Berkower, C., und Michaelis, S.** (1991). Mutational analysis of the yeast a-factor transporter STE6, a member of the ATP binding cassette (ABC) protein superfamily. *EMBO J* **10**, 3777-3785.
- Bishop, A.C., Buzko, O. and Shokat, K.M.** (2001). Magic bullets for protein kinases. *Trends Cell Biol.* **11**, 167-172.
- Blaak, H., und Schrempf, H.** (1995). Binding and substrate specificities of a *Streptomyces olivaceoviridis* chitinase in comparison with its proteolytically processed form. *Eur J Biochem* **229**, 132-139.
- Bobrowicz, P., Davidson, R.C., Li, H., Potgieter, T.I., Nett, J.H., Hamilton, S.R., Stadheim, T.A., Miele, R.G., Bobrowicz, B., Mitchell, T., Rausch, S., Renfer, E., und Wildt, S.** (2004). Engineering of an artificial glykosylation pathway blocked in core oligosaccharide assembly in the yeast *Pichia pastoris*: production of complex humanized Glykoproteins with terminal galactose. *Glykobiology* **14**, 757-766.
- Bodvard, K., Jorhov, A., Blomberg, A., Molin, M., und Kall, M.** (2013). The yeast transcription factor Crz1 is activated by light in a Ca²⁺/calcineurin-dependent and PKA-independent manner. *PLoS One* **8(1)**, e53404
- Bogomolnaya, L.M., Pathak, R., Guo, J., und Polymenis, M.** (2006). Roles of the RAM signaling network in cell cycle progression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* **49**, 384-392.
- Böhmer, C., Böhmer, M., Bölker, M., und Sundrock, B.** (2008). Cdc42 and the Ste20-like kinase Don3 act independently in triggering cytokinesis in *Ustilago maydis*. *J Cell Sci* **121**, 143-148.
- Böhmer, C., Ripp, C., und Bölker, M.** (2009). The germinal centre kinase Don3 triggers the dynamic rearrangement of higher-order septin structures during cytokinesis in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol* **74**, 1484-1496.
- Bölker, M.** (2001). *Ustilago maydis* - a valuable model system for the study of fungal dimorphism and virulence. *Microbiol-Sgm* **147**, 1395-1401.
- Bölker, M., Urban, M., und Kahmann, R.** (1992). The a Mating Type Locus of *U. maydis* Specifies Cell Signaling Components. *Cell* **68**, 441-450.

- Bölker, M., Böhnert, H.U., Braun, K.H., Görl, J., und Kahmann, R.** (1995). Tagging pathogenicity genes in *Ustilago maydis* by restriction enzyme-mediated integration (REMI). *Mol Gen Genet* **248**(5), 547-552.
- Bolton, M.D., van Esse, H.P., Vossen, J.H., de Jonge, R., Stergiopoulos, I., Stulemeijer, I.J.E., van den Berg, G.C.M., Borrás-Hidalgo, O., Dekker, H.L., de Koster, C.G., de Wit, P.J.G.M., Joosten, M.H.A.J., und Thomma, B.P.H.J.** (2008). The novel *Cladosporium fulvum* lysin motif effector Ecp6 is a virulence factor with orthologues in other fungal species. *Mol Microbiol* **69**, 119-136.
- Bony, M., Thines-Semphoux, D., Barre, P., und Blondin, B.** (1997). Localization and cell surface anchoring of the *Saccharomyces cerevisiae* flocculation protein Flo1p. *J Bacteriol* **179**, 4929-4936
- Bonnet, C.** (1754). Recherches sur l'usage des feuilles dans les plantes : et sur quelques autres sujets relatifs à l'histoire de la vegetation. *Göttingen und Leiden; E. Luzac, fils.*
- Boraston, A.B., Bolam, D.N., Gilbert, H.J., und Davies, G.J.** (2004). Carbohydrate-binding modules: fine-tuning polysaccharide recognition. *Biochem J* **382**, 769-781.
- Bortone, K., Monzingo, A.F., Ernst, S., und Robertus, J.D.** (2002). The Structure of an Allosamidin Complex with the *Coccidioides immitis* Chitinase Defines a Role for a Second Acid Residue in Substrate-assisted Mechanism. *J Mol Biol* **320**, 293-302.
- Bowman, S.M., und Free, S.J.** (2006). The structure and synthesis of the fungal cell wall. *BioEssays* **28**, 799-808.
- Braakman, I., Helenius, J., und Helenius, A.** (1992). Manipulating disulfide bond formation and protein folding in the endoplasmic reticulum. *EMBO J* **11**, 1717-1722.
- 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* **272**(2), 216-226
- Brachmann, A., Weinzierl, G., Kamper, J., und Kahmann, R.** (2001). Identification of genes in the bW/bE regulatory cascade in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol* **42**, 1047-1063.
- Braconnot, H.** (1811). Sur la nature des champignons. *Ann Chim Phys* **79**, 265-304.
- Brand, A., Vacharaksa, A., Bendel, C., Norton, J., Haynes, P., Henry-Stanley, M., Wells, C., Ross, K., Gow, N.A.R., und Gale, C.A.** (2008). An Internal Polarity Landmark Is Important for Externally Induced Hyphal Behaviors in *Candida albicans*. *Eukaryotic Cell* **7**, 712-720.
- Brefort, T., Doeblemann, G., Mendoza-Mendoza, A., Reissmann, S., Djamei, A., und Kahmann, R.** (2009). *Ustilago maydis* as a Pathogen. *Annu Rev Phytopathol* **47**, 423-445
- Brefort, T., Tanaka, S., Neidig, N., Doeblemann, G., Vincon, V., und Kahmann, R.** (2014). Characterization of the largest effector gene cluster of *Ustilago maydis*. *PLoS Pathog* **10**(7), e1003866.
- Breyer, W.A., und Matthews, B.W.** (2001). A structural basis for processivity. *Protein Sci* **10**, 1699-1711.
- Brookes, P.S., Yoon, Y., Robotham, J.L., Anders, M.W., und Sheu, S.** (2004). Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. *Am J Physiol* **287**, 817-833.

- Bruce, S.A., Saville, B.J., und Emery, R.J.N. (2011). *Ustilago maydis* Produces Cytokinins and Absciscic Acid for Potential Regulation of Tumor Formation in Maize. *J Plant Growth Regul* **30**, 51-63.
- Brunner, K., Peterbauer, C.K., Mach, R.L., Kubicek, C.P., und Lorito, M. (2003). The NagI N-acetylglukosaminidase of *Trichoderma atroviride* is essential for chitinase induction by chitin and of major relevance to biocontrol. *Curr Genet* **43**, 289-295.
- Bruns, C., McCaffery, J.M., Curwin, A.J., Duran, J.M., und Malhotra, V. (2011). Biogenesis of a novel compartment for autophagosome-mediated unconventional protein secretion. *J Cell Biol* **195**, 979-992.
- Burkard, M.E., Randall, C.L., Larochele, S., Zhang, C., Shokat, K.M., Fisher, R.P. and Jallepalli, P.V. (2007). Chemical genetics reveals the requirement for Polo-like kinase 1 activity in positioning RhoA and triggering cytokinesis in human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 4383-4388.
- Cabib, E., Roh, D.H., Schmidt, M., Crotti, L.B., und Varma, A. (2001). The Yeast Cell Wall and Septum as Paradigms of Cell Growth and Morphogenesis. *J Biol Chem* **276**, 19679-19682.
- Cabral, M., Anjard, C., Malhotra, V., Loomis, W.F., und Kuspa, A. (2010). Unconventional Secretion of AcbA in *Dictyostelium discoideum* through a Vesicular Intermediate. *Eukaryotic Cell* **9**, 1009-1017.
- Camby, I., Le Mercier, M., Lefranc, F., und Kiss, R. (2006). Galektin-1: a small protein with major functions. *Glykobiology* **16**, 137R-157R.
- Capra, J.A., und Singh, M. (2007). Predicting functionally important residues from sequence conservation. *Bioinformatics* **23**, 1875-1882.
- Carsolio, C., Gutierrez, A., Jimenez, B., Van Montagu, M., und Herrera-Estrella, A. (1994). Characterization of ech-42, a *Trichoderma harzianum* endochitinase gene expressed during mycoparasitism. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**, 10903-10907.
- Carsolio, C., Benhamou, N., Haran, S., Cortes, C., Gutierrez, A., Chet, I., und Herrera-Estrella, A. (1999). Role of the *Trichoderma harzianum* endochitinase gene, ech42, in mycoparasitism. *Appl Environ Microbiol* **65**, 929-935.
- Chaffin, W.L. (2008). *Candida albicans* Cell Wall Proteins. *Microbiol Mol Biol Rev* **72**, 495-544.
- Chakravarthi, S., Jessop, C.E., und Bulleid, N.J. (2006). The role of glutathione in disulphide bond formation and endoplasmic-reticulum-generated oxidative stress. *EMBO reports* **7**, 271-275.
- Chatre, L., und Ricchetti, M. (2014). Are mitochondria the Achilles' heel of the Kingdom Fungi? *Curr Opin Microbiol* **20**, 49-54.
- Chen, L., Liu, T., Zhou, Y., Chen, Q., Shen, X., und Yang, Q. (2014). Structural characteristics of an insect group I chitinase, an enzyme indispensable to moulting. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* **70**, 932-942.
- Chen, J., Tang, B., Chen, H., Yao, Q., Huang, X., Chen, J., Zhang, D., und Zhang, W. (2010). Different Functions of the Insect Soluble and Membrane-Bound Trehalase Genes in Chitin Biosynthesis Revealed by RNA Interference. *PLoS ONE* **5**(4): e10133
- Cho, M.J., und Cummings, R.D. (1995a). Galektin-1, a Beta-Galactoside-Binding Lectin in Chinese-Hamster Ovary Cells .2. Localization and Biosynthesis. *J Biol Chem* **270**, 5207-5212.

- Cho, M.J., und Cummings, R.D.** (1995b). Galektin-1, a Beta-Galactoside-Binding Lectin in Chinese-Hamster Ovary Cells .1. Physical and Chemical Characterization. *J BiolChem* **270**, 5198-5206.
- Choquer, M., Becker, H.F., Vidal-Cros, A.** (2007). Identification of two group A chitinase genes in *Botrytis cinerea* which are differentially induced by exogenous chitin. *Mycologia* **111**, 615-625.
- Christensen, J.J.** (1963). Corn smut induced by *Ustilago maydis*. *Amer Phytopathol Soc Monogr* **2**.
- Christensen, P.U., Davey, J., und Nielsen, O.** (1997). The *Schizosaccharomyces pombe* mam1 gene encodes an ABC transporter mediating secretion of M-factor. *Mol Gen Genet* **255**, 226-236.
- Cleves, A.E., Cooper, D.N., Barondes, S.H., und Kelly, R.B.** (1996). A new pathway for protein export in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* **133**, 1017-1026.
- Colman-Lerner, A., Chin, T.E., und Brent, R.** (2001). Yeast Cbk1 and Mob2 activate daughter-specific genetic programs to induce asymmetric cell fates. *Cell* **107**, 739-750.
- Colussi, P.A., Specht, C.A., und Taron, C.H.** (2005). Characterization of a Nucleus-Encoded Chitinase from the Yeast *Kluyveromyces lactis*. *Appl Envir Microbiol* **71**, 2862-2869.
- Corral-Debrinski, M., Blugeon, C., und Jacq, C.** (2000). In yeast, the 3' untranslated region or the presequence of ATM1 is required for the exclusive localization of its mRNA to the vicinity of mitochondria. *Mol Cell Biol* **20**, 7881-7892.
- Cottaz, S., Brasme, B., und Driguez, H.** (2000). A fluorescence-quenched chitopentaose for the study of endo-chitinases and chitobiosidases. *Eur J Biochem* **267**, 5593-5600.
- Cruz-Garcia, D., Curwin, A.J., Popoff, J.F., Bruns, C., Duran, J.M., und Malhotra, V.** (2014). Remodeling of secretory compartments creates CUPS during nutrient starvation. *J Cell Biol* **207**, 695-703.
- Cyert, M.S.** (2001). Genetic analysis of calmodulin and its targets in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu Rev Genet* **35**, 647-672.
- Díez, B., Rodríguez-Sáiz, M., de La Fuente, J.L., Moreno, M.A., und Barredo, J.L.** (2005). The nagA gene of *Penicillium chrysogenum* encoding N-acetyl-glukosaminidase. *FEMS Microbiol Letters* **242**, 257-264.
- Damveld, R.A., Franken, A., Arentshorst, M., Punt, P.J., Klis, F.M., van den Hondel, C.A.M.J.J., und Ram, A.F.J.** (2008). A Novel Screening Method for Cell Wall Mutants in *Aspergillus niger* Identifies UDP-Galactopyranose Mutase as an Important Protein in Fungal Cell Wall Biosynthesis. *Genetics* **178**, 873-881.
- Dean, R., Van Kan, J. A., Pretorius, Z. A., Hammond-Kosack, K. E., Di Pietro, A., Spanu, P. D., Rudd, J. J., Dickman, M., Kahmann, R., Ellis, J., und Foster, G. D.** (2012) The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular plant pathology* **13**: 414-430.
- Decroos, K., Vincken, J.P., Heng, L., Bakker, R., Gruppen, H., und Verstraete, W.** (2005). Simultaneous quantification of differently glycosylated, acetylated, and 2,3-dihydro-2,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one-conjugated soyasaponins using reversed-phase high-performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection. *Journal of Chromatography* **1072**, 185-193.

- de Jonge, R., van Esse, H.P., Kombrink, A., Shinya, T., Desaki, Y., Bours, R., van der Krol, S., Shibuya, N., Joosten, M.H., und Thomma, B.P.** (2010). Conserved fungal LysM effector Ecp6 prevents chitin-triggered immunity in plants. *Science* **329**, 953-955.
- Del Alamo, M., Hogan, D.J., Pechmann, S., Albanese, V., Brown, P.O., und Frydman, J.** (2011). Defining the Specificity of Cotranslationally Acting Chaperones by Systematic Analysis of mRNAs Associated with Ribosome-Nascent Chain Complexes. *PLoS Biol* **9**(7), e1001100.
- de las Mercedes Dana, M., Limon, M.C., Mejias, R., Mach, R.L., Benitez, T., Pintor-Toro, J.A., und Kubicek, C.P.** (2001). Regulation of chitinase 33 (chit33) gene expression in *Trichoderma harzianum*. *Curr Genet* **38**, 335-342.
- Dekker, N.** (2004). Role of the α -Glukanase Agn1p in Fission-Yeast Cell Separation. *Mol Biol Cell* **15**, 3903-3914.
- Delacour, D., Greb, C., Koch, A., Salomonsson, E., Leffler, H., Le Bivic, A., und Jacob, R.** (2007). Apical Sorting by Galektin-3-Dependent Glykoprotein Clustering. *Traffic* **8**, 379-388.
- Djamei, A., und Kahmann, R.** (2012). *Ustilago maydis*: dissecting the molecular interface between pathogen and plant. *PLoS Pathog* **8**, e1002955.
- Djamei, A., Schipper, K., Rabe, F., Ghosh, A., Vincon, V., Kahnt, J., Osorio, S., Tohge, T., Fernie, A.R., Feussner, I., Feussner, K., Meinicke, P., Stierhof, Y.-D., Schwarz, H., Macek, B., Mann, M., und Kahmann, R.** (2011). Metabolic priming by a secreted fungal effector. *Nature* **478**, 395-398.
- Doebley, J.** (1992). Mapping the Genes that made Maize. *Trends Genet* **8**, 302-307.
- Doehlemann, G., van der Linde, K., Aßmann, D., Schwammbach, D., Hof, A., Mohanty, A., Jackson, D., und Kahmann, R.** (2009). Pep1, a Secreted Effector Protein of *Ustilago maydis*, Is Required for Successful Invasion of Plant Cells. *PLoS Pathogens* **5**, e1000290.
- Duchen, M.R.** (2000) Mitochondria and calcium: from cell signalling to cell death. *J Physiol* **529**, 57-68.
- Dumollard, R., Duchen, M., und Carroll, J.** (2007). The Role of Mitochondrial Function in the Oocyte and Embryo. *Curr Top Dev Biol* **77**, 21-49.
- Dünkler, A., Jorde, S., und Wendlund, J.** (2008). An *Ashbya gossypii* cts2 mutant deficient in a sporulation-specific chitinase can be complemented by *Candida albicans* CHT4. *Microbiol Res* **163**, 701-710.
- Dünkler, A., Walther, A., Specht, C.A., und Wendlund, J.** (2005). *Candida albicans* CHT3 encodes the functional homolog of the Cts1 chitinase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Fun Genet Biol* **42**, 935-947.
- Duran, J.M., Anjard, C., Stefan, C., Loomis, W.F., und Malhotra, V.** (2010). Unconventional secretion of Acb1 is mediated by autophagosomes. *J Cell Biol* **188**, 527-536.
- Eliyahu, E., Pnueli, L., Melamed, D., Scherrer, T., Gerber, A.P., Pines, O., Rapaport, D., Arava, Y.** (2010). Tom20 Mediates Localization of mRNAs to Mitochondria in a Translation-Dependent Manner. *Mol Cell Biol* **30**(1), 284-94.
- Emanuelsson, O., Nielsen, H., Brunak, S., und Von Heijne, G.** (2000). Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *J Mol Biol* **300**, 1005-1016.

- Fatal, N.** (2004). Active and specific recruitment of a soluble cargo protein for endoplasmic reticulum exit in the absence of functional COPII component Sec24p. *J Cell Sci* **117**, 1665-1673.
- Feldbrügge, M., Bölker, M., Steinberg, G., Kämper, J., und Kahmann, R.** (2004). Regulatory and structural networks orchestrating mating, dimorphism, cell shape, and pathogenesis in *Ustilago maydis*. In: Growth, Differentiation and sexuality. *U. Kües und R. Fischer (eds.) Springer Berlin Heidelberg*, pp. 375-391.
- Feldbrügge, M., Kellner, R., und Schipper, K.** (2013). The biotechnological use and potential of plant pathogenic smut fungi. *App Microbiol Biotech* **97**, 3253-3265.
- Feldmeyer, L., Keller, M., Niklaus, G., Hohl, D., Werner, S., und Beer, H.-D.** (2007). The Inflammasome Mediates UVB-Induced Activation and Secretion of Interleukin-1 β by Keratinocytes. *Curr Biol* **17**, 1140-1145.
- Ferguson, D.O., und Holloman, W.K.** (1996). Recombinational repair of gaps in DNA is asymmetric in *Ustilago maydis* and can be explained by a migrating D-loop model. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 5419-5424.
- Fernández-Álvarez, A., Marín-Menguiano, M., Lanver, D., Jiménez-Martín, A., Elías-Villalobos, A., Pérez-Pulido, A.J., Kahmann, R., und Ibeas, J.I.** (2012) Identification of O-mannosylated Virulence Factors in *Ustilago maydis*. *PLoS Pathog* **8(3)**, e1002563.
- Fischer-Parton, S., Parton, R.M., Hickey, P.C., Dijksterhuis, J., Atkinson, H.A., und Read, N.D.** (2000). Confocal microscopy of FM4-64 as a tool for analysing endocytosis and vesicle trafficking in living fungal hyphae. *J Microsc* **198**, 246-259.
- Frederiksen, R.F., Paspaliari, D.K., Larsen, T., Storgaard, B.G., Larsen, M.H., Ingmer, H., Palcic, M.M., und Leisner, J.J.** (2013). Bacterial chitinases and chitin-binding proteins as virulence factors. *Microbiology* **159**, 833-847.
- Freitag, J., Lanver, D., Böhmer, C., Schink, K.O., Bölker, M., und Sandroock, B.** (2011) Septation of Infectious Hyphae Is Critical for Appressoria Formation and Virulence in the Smut Fungus *Ustilago maydis*. *PLoS Pathog* **7(5)**, e1002044.
- Fuchs, F., Prokisch, H., Neupert, W., und Westermann, B.** (2002). Interaction of mitochondria with microtubules in the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *J Cell Sci* **115**, 1931-1937.
- Fuchs, U., Manns, I., und Steinberg, G.** (2005). Microtubules Are Dispensable for the Initial Pathogenic Development but Required for Long-Distance Hyphal Growth in the Corn Smut Fungus *Ustilago maydis*. *Mol Biol Cell* **16**, 2746-2758.
- Fuchs, R.L., McPherson, S.A., und Drahos, D.J.** (1986). Cloning of a *Serratia marcescens* Gene Encoding Chitinase. *Appl Environ Microbiol.* **51**:504-9.
- Fujikawa, T., Sakaguchi, A., Nishizawa, Y., Kouzai, Y., Minami, E., Yano, S., Koga, H., Meshi, T., und Nishimura, M.** (2012). Surface α -1,3-Glucan Facilitates Fungal Stealth Infection by Interfering with Innate Immunity in Plants. *PLoS Pathogens* **8**, e1002882.
- Fusetti, F., von Moeller, H., Houston, D., Rozeboom, H.J., Dijkstra, B.W., Boot, R.G., Aerts, J.M., und van Aalten, D.M.** (2002). Structure of human chitotriosidase. Implications for specific inhibitor design and function of mammalian chitinase-like lectins. *J Biol Chem* **277(28)**, 25537-25544

- Gadir, N., Haim-Vilmovsky, L., Kraut-Cohen, J., und Gerst, J.E.** (2011). Localization of mRNAs coding for mitochondrial proteins in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA* **17**(8), 1551–1565.
- Gao, L., Kelliher, T., Nguyen, L., und Walbot, V.** (2013). *Ustilago maydis* reprograms cell proliferation in maize anthers. *Plant J* **75**, 903-914.
- Garcia-Muse, T., Steinberg, G., und Perez-Martin, J.** (2003). Pheromone-Induced G2 Arrest in the Phytopathogenic Fungus *Ustilago maydis*. *Eukaryotic Cell* **2**, 494-500.
- Garcia, I., Jimenez, D., Martin, V., Duran, A., und Sanchez, Y.** (2005). The alpha-Glucanase Agn1p is required for cell separation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Biol Cell* **97**, 569-576.
- Garcia-Rodriguez, L.J., Gay, A.C., und Pon, L.A.** (2007). Puf3p, a Pumilio family RNA binding protein, localizes to mitochondria and regulates mitochondrial biogenesis and motility in budding yeast. *J Cell Biol* **176**(2):197-207.
- Gautam, S.P., Bundela, P.S., Pundey, A.K., Khan, J., Awasthi, M.K., und Sarsaiya, S.** (2011). Optimization for the Production of Cellulase Enzyme from Municipal Solid Waste Residue by Two Novel Cellulolytic Fungi. *Biotechn Res Intern* **2011**, 1-8.
- Gayther, S.A., Mangion, J., Russell, P., Seal, S., Barfoot, R., Ponder, B.A., Stratton, M.R., und Easton, D.** (1997). Variation of risks of breast and ovarian cancer associated with different germline mutations of the BRCA2 gene. *Nat Genet* **15**, 103-105.
- Giaever, G., Chu, A.M., Ni, L., Connelly, C., Riles, L., Veronneau, S., Dow, S., Lucau-Danila, A., Underson, K., Undre, B., Arkin, A.P., Astromoff, A., El-Bakkoury, M., Bangham, R., et al.** (2002). Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nature* **418**, 387-391.
- Gillissen, B., Bergemann, J., Sundmann, C., Schroeer, B., Bolker, M., und Kahmann, R.** (1992). A two-component regulatory system for self/non-self recognition in *Ustilago maydis*. *Cell* **68**, 647-657.
- Giri, A.P., Harsulkar, A.M., Patankar, A.G., Gupta, V.S., Sainani, M.N., Deshpunde, V.V., und Ranjekar, P.K.** (1998). Association of induction of protease and chitinase in chickpea roots with resistance to *Fusarium oxysporum f.sp. ciceri*. *Plant Pathol* **47**, 693-699.
- Gish, W., Und States, D. J.** (1993). Identification of protein coding regions by database similarity search. *Nature genetics* **3**, 266-272.
- Giuliani, F., Grieve, A., und Rabouille, C.** (2011). Unconventional secretion: a stress on GRASP. *Curr Opin Cell Biol* **23**, 498-504.
- Gold, S.E., Bakkeren, G., Davies, J.E., und Kronstad, J.W.** (1994). Three selectable Markers for transformation of *Ustilago maydis*. *Gene* **142**, 225-230.
- Gomez, T.M., Robles, E., Poo, M., und Spitzer, N.C.** (2001). Filopodial calcium transients promote substrate-dependent growth cone turning. *Science* **291**, 1983-1987.
- Gopaul, D.N., Guo, F., und Van Duyne, G.D.** (1998). Structure of the Holliday junction intermediate in Cre-loxP site-specific recombination. *EMBO J* **17**, 4175-4187.
- Gortari, M.C., und Hours, R.A.** (2013). Biotechnological processes for chitin recovery out of crustacean waste: A mini-review. *Elec J Biotechnol* **16**.

- Grieve, A.G., und Rabouille, C. (2011). Golgi Bypass: Skirting Around the Heart of Classical Secretion. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **3**, a005298-a005298.
- Gruber, S., und Seidl-Seiboth, V. (2011). Self versus non-self: fungal cell wall degradation in *Trichoderma*. *Microbiology* **158**, 26-34.
- Gruber, S., Kubicek, C.P., und Seidl-Seiboth, V. (2011). Differential Regulation of Orthologous Chitinase Genes in Mycoparasitic *Trichoderma* Species. *Appl Envir Microbiol* **77**, 7217-7226.
- Gull, K., und Trinci, A.P. (1974). Detection of areas of wall differentiation in fungi using fluorescent staining. *Arch Mikrobiol* **96**, 53-57.
- Haag, C. (2013) Transkriptomweite Einblicke in den Rrm4-vermittelten mRNA-Transport in *Ustilago maydis*. *Dissertation. Heinrich-Heine Universität Düsseldorf*.
- Hajnóczky, G., Booth, D., Csordás, G., Debattisti, V., Golenár, T., Naghdi, S., Niknejad, N., Paillard, M., Seifert, E.L., und Weaver, D. (2014). Reliance of ER-mitochondrial calcium signaling on mitochondrial EF-hand Ca²⁺ binding proteins: Miros, MICUs, LETM1 and solute carriers. *Curr Opin Cell Biol* **29**, 133-141.
- Hamer, S.N., Moerschbacher, B.M., Kolkenbrock, S. (2014). Enzymatic sequencing of partially acetylated chitosan oligomers. *Carbohydr. Res* **392**, 16–20.
- Hamid, R., Khan, M.A., Ahmad, M., Ahmad, M.M., Abdin, M.Z., Musarrat, J., und Javed, S. (2013) Chitinases: An Update. *J Pharm Bioallied Sci* **5** (1):21.29.
- Hamilton, J.J., Marlow, V.L., Owen, R.A., Costa, M.d.A.A., Guo, M., Buchanan, G., Chundra, G., Trost, M., Coulthurst, S.J., Palmer, T., Stanley-Wall, N.R., und Sargent, F. (2014). A holin and an endopeptidase are essential for chitinolytic protein secretion in *Serratia marcescens*. *J Cell Biol* **207**, 615-626.
- Hartl, F.U., und Neupert, W. (1990). Protein sorting to mitochondria: evolutionary conservations of folding and assembly. *Science* **247**, 930-938.
- Hartl, L., Zach, S., und Seidl-Seiboth, V. (2012). Fungal chitinases: diversity, mechanistic properties and biotechnological potential. *Appl Microbiol Biotechnol* **93**, 533-543.
- Hayafune, M., Berisio, R., Marchetti, R., Silipo, A., Kayama, M., Desaki, Y., Arima, S., Squeglia, F., Ruggiero, A., Tokuyasu, K., Molinaro, A., Kaku, H., und Shibuya, N. (2014). Chitin-induced activation of immune signaling by the rice receptor CEBiP relies on a unique sandwich-type dimerization. *Proc Natl Acad Sci USA* **111**, E404-413.
- Hawltischek, G., Schneider, H. Schmidt, B., Tropschug, M., Hartl, F.U., Neupert, W. (1988). Mitochondrial Protein Import: Identification of Processing Peptidase and of PEP, a Processing Enhancing Protein. *Cell* **53**, 795-806.
- Heilmann, C.J., Sorgo, A.G., Mohammadi, S., Sosinska, G.J., de Koster, C.G., Brul, S., de Koning, L.J., und Klis, F.M. (2013). Surface stress induces a conserved cell wall stress response in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* **12**, 254-264.
- Heimel, K., Scherer, M., Vranes, M., Wahl, R., Pothiratana, C., Schuler, D., Vincon, V., Finkernagel, F., Flor-Parra, I., und Kämper, J. (2010) The Transcription Factor Rbf1 Is the Master Regulator for *b*-Mating Type Controlled Pathogenic Development in *Ustilago maydis*. *PLoS Pathog* **6**(8), e1001035.

- Heller, J., und Tudzynski, P.** (2011). Reactive Oxygen Species in Phytopathogenic Fungi: Signaling, Development, and Disease. *Ann Rev Phytopathol* **49**, 369-390.
- Hemetsberger, C., Herrberger, C., Zechmann, B., Hillmer, M., und Doehlemann, G.** (2012). The *Ustilago maydis* Effector Pep1 Suppresses Plant Immunity by Inhibition of host Peroxidase Activity. *PLoS Pathog* **8**(5), e1002684.
- Hemetsberger, C., Mueller, A.N., Matei, A., Herrberger, C., Hensel, G., Kumlehn, J., Mishra, B., Sharma, R., Thines, M., Hückelhoven, R., und Doehlemann, G.** (2015). The fungal core effector Pep1 is conserved across smuts of dicots and monocots. *New Phytol* **206**(3), 1116-1126.
- Henrissat, B., und Davies, G.J.** (2000). Glykoside hydrolases and glykosyltransferases. Families, modules, and implications for genomics. *Plant Physiol* **124**, 1515-1519.
- Higuchi, Y., Ashwin, P., Roger, Y., und Steinberg, G.** (2014). Early endosome motility spatially organizes polysome distribution. *J Cell Biol* **204**, 343-357.
- Hill, S.M., Hao, X., Liu, B., und Nystrom, T.** (2014). Life-span extension by a metacaspase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* **344**, 1389-1392.
- Hill, T.W., Loprete, D.M., Momany, M., Ha, Y., Harsch, L.M., Livesay, J.A., Mirchundani, A., Murdock, J.J., Vaughan, M.J., und Watt, M.B.** (2006). Isolation of cell wall mutants in *Aspergillus nidulans* by screening for hypersensitivity to Calcofluor White. *Mycologia* **98**, 399-409.
- Hirano, S., und Nagao, N.** (1989). Effects of Chitosan, Pectic Acid, Lysozyme, and Chitinase on the Growth of Several Phytopathogens. *Agr Biol Chem Tokyo* **53**, 3065-3066.
- Hoffman, C. S., Und Winston, F.** (1987). A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *E. coli*. *Gene* **57**, 267-272.
- Holliday, J., Adams, R.J., Sejnowski, T.J., und Spitzer, N.C.** (1991). Calcium-Induced Release of Calcium Regulates Differentiation of Cultured Spinal Neurons. *Neuron* **7**, 787-796.
- Holliday, R.** (1964). The Induction of Mitotic Recombination by Mitomycin C in *Ustilago* and *Saccharomyces*. *Genetics* **50**, 323-335.
- Holliday, R.** (1967). Altered recombination frequencies in radiation sensitive strains of *Ustilago*. *Mutat Res* **4**, 275-288.
- Holliday, R.** (1974). Molecular aspects of genetic exchange and gene conversion. *Genetics* **78**, 273-287.
- Holliday, R.** (2004). Early studies on recombination and DNA repair in *Ustilago maydis*. *DNA Repair* **3**, 671-682.
- Horn, S.J., Sorbotten, A., Synstad, B., Sikorski, P., Sorlie, M., Varum, K.M., und Eijsink, V.G.H.** (2006). Endo/exo mechanism and processivity of family 18 chitinases produced by *Serratia marcescens*. *FEBS Journal* **273**, 491-503.
- Horton, P., Park, K. J., Obayashi, T., Fujita, N., Harada, H., Adams-Collier, C. J., Und Nakai, K.** (2007). WoLF PSORT: protein localization predictor. *Nucleic acids research* **35**, W585-587.

- Hult, E.L., Katouno, F., Uchiyama, T., Watanabe, T., und Sugiyama, J.** (2005). Molecular directionality in crystalline beta-chitin: hydrolysis by chitinases A and B from *Serratia marcescens* 2170. *Biochem J* **388**, 851-856.
- Humbel, B.M., Konomi, M., Takagi, T., Kamasawa, N., Ishijima, S.A., und Osumi, M.** (2001). In situ localization of beta-Glukans in the cell wall of *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* **18**, 433-444.
- Hung, V., Zou, P., Rhee, H.-W., Udeshi, Namrata D., Cracan, V., Svinkina, T., Carr, Steven A., Mootha, Vamsi K., und Ting, Alice Y.** (2014). Proteomic Mapping of the Human Mitochondrial Intermembrane Space in Live Cells via Ratiometric APEX Tagging. *Molecular Cell* **55**, 332-341.
- Imai, K., Noda, Y., Adachi, H., und Yoda, K.** (2005). A Novel Endoplasmic Reticulum Membrane Protein Rcr1 Regulates Chitin Deposition in the Cell Wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **280**, 8275-8284.
- Imperiali, B., und O'Connor, S.E.** (1999). Effect of N-linked glykosylation on Glykopeptide and Glykoprotein structure. *Curr Opin Chem Biol* **3**, 643-649.
- Innes, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J., Und White, T. J., eds.** (1990). PCR Protocols: a guide to methods and applications. (San Diego, USA, Academic Press).
- Jahn, R., Lang, T., und Sudhof, T.C.** (2003). Membrane fusion. *Cell* **112**, 519-533.
- Jan, C.H., Williams, C.C., und Weissman, J.S.** (2014). Principles of ER cotranslational translocation revealed by proximity-specific ribosome profiling. *Science* **346**, 1257521-1257521.
- Jankowski, S.** (2013). Charakterisierung der unkonventionell sekretierten Endochitinase Cts1 in *Ustilago maydis*. Masterarbeit. Herinrich-Heine Universität Düsseldorf.
- Jansen, R.-P., Niessing, D., Baumann, S., und Feldbrügge, M.** (2014). mRNA transport meets membrane traffic. *Trends in Genetics* **30**, 408-417.
- Jaques, A.K., Fukamizo, T., Hall, D., Barton, R.C., Escott, G.M., Parkinson, T., Hitchcock, C.A., und Adams, D.J.** (2003). Disruption of the gene encoding the ChiB1 chitinase of *Aspergillus fumigatus* and characterization of a recombinant gene product. *Microbiology* **149**, 2931-2939.
- Jones, D.T.** (1999). Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. *J Mol Biol.* **292**, 195-202.
- Kahmann, R., Und Kämper, J.** (2004). *Ustilago maydis*: how its biology relates to pathogenic development. *New Phytologist* **164**, 31-42.
- Kahmann, R., Steinberg, G., Basse, C., und Kämper, J.** (2000). *Ustilago maydis*, the causative agent of corn smut disease. In *Fungal Pathology*, J. W. Kronstad, ed. (Dodrecht, Kluwer Academic Publishers), pp. 347-371.
- Kaltimbacher, V., Bonnet, C., Lecoeuvre, G., Forster, V., Sahel, J.A., Corral-Debrinski, M.** (2006). mRNA localization to the mitochondrial surface allows the efficient translocation inside the organelle of a nuclear recoded ATP6 protein. *RNA* **12**, 1408-1417.
- Kämper, J., Kahmann, R., Bölker, M., Ma, L.J., Brefort, T., Saville, B.J., Banuett, F., Kronstad, J.W., Gold, S.E., Müller, O., et al.** (2006). Insights from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen *Ustilago maydis*. *Nature* **444**, 97-101.

- Kämper, J., Reichmann, M., Romeis, T., Bolker, M., und Kahmann, R.** (1995). Multiallelic recognition: nonself-dependent dimerization of the bE and bW homeodomain proteins in *Ustilago maydis*. *Cell* **81**, 73-83.
- Karamanos, Y.** (2013). Endo-N-Acetyl- β -D-Glukosaminidases and Peptide-N4-(N-acetyl- β -D-Glukosaminyl) Asparagine Amidases: More Than Just Tools. *Adv Biochem* **1**, 81.
- Karlsson, M., und Stenlid, J.** (2008) Comparative Evolutionary Histories of the Fungal Chitinase Gene Family Reveal Non-Random Size Expansions and Contractions due to Adaptive Natural Selection. *Evol Bioinform Online* **4**, 47-60.
- Karrer, P., und Hofmann** (1929) Polysaccharide XXXIX. Über den enzymatischen Abbau von Chitin und Chitosan I. *HCA* **12**, 616–637
- Kellems, R.E., und Butow, R.A.** (1972). Cytoplasmic-type 80 S ribosomes associated with yeast mitochondria. I. Evidence for ribosome binding sites on yeast mitochondria. *J Biol Chem* **247**, 8043-8050.
- Keller, M., Rüegg, A., Werner, S., und Beer, H.D.** (2008). Active Caspase-1 Is a Regulator of Unconventional Protein Secretion. *Cell* **132**, 818-831.
- Keon, J.P., White, G.A., und Hargreaves, J.A.** (1991). Isolation, characterization and sequence of a gene conferring resistance to the systemic fungicide carboxin from the maize smut pathogen, *Ustilago maydis*. *Curr Genet* **19**, 475-481.
- King, M.C., Marks, J.H., und Mundell, J.B.** (2003). Breast and ovarian cancer risks due to inherited mutations in BRCA1 and BRCA2. *Science* **302**, 643-646.
- Kinseth, M.A., Anjard, C., Fuller, D., Guizzunti, G., Loomis, W.F., und Malhotra, V.** (2007). The Golgi-Associated Protein GRASP Is Required for Unconventional Protein Secretion during Development. *Cell* **130**, 524-534.
- Kojic, M., Kostrub, C.F., Buchman, A.R., und Holloman, W.K.** (2002). BRCA2 homolog required for proficiency in DNA repair, recombination, and genome stability in *Ustilago maydis*. *Mol Cell* **10**, 683-691.
- Kojic, M., Sutherlund, J.H., Perez-Martin, J., und Holloman, W.K.** (2013). Initiation of Meiotic Recombination in *Ustilago maydis*. *Genetics* **195**, 1231-1240.
- Kombrink, A., Sánchez-Vallet, A., und Thomma, B.P.H.J.** (2011). The role of chitin detection in plant–pathogen interactions. *Microbes and Infection* **13**, 1168-1176.
- Koepke, J.** (2010) Die Rolle des RNA-bindenden Proteins Rrm4 während des polaren Wachstums von *Ustilago maydis*. *Dissertation. Philipps-Universität Marburg*.
- Koepke, J., Kaffarnik, F., Haag, C., Zarnack, K., Luscombe, N. M., König, J., Ule, J., Kellner, R., Begerow D., und Feldbrügge, M.** (2011) The RNA-binding protein Rrm4 is essential for efficient secretion of endochitinase Cts1. *Mol Cell Prot* **10**: M111 011213.
- König, J., Baumann, S., Koepke, J., Pohlmann, T., Zarnack, K., und Feldbrügge, M.** (2009). The fungal RNA-binding protein Rrm4 mediates long-distance transport of ubi1 and rho3 mRNAs. *EMBO J* **28**, 1855-1866.
- Korbel, D., Wurth, S., Käser, M., und Langer, T.** (2004). Membrane protein turnover by the m-AAA protease in mitochondria depends on the transmembrane domains of its subunits. *EMBO reports* **5**, 698-703.

- Kroemer, G. (2003). Mitochondrial control of apoptosis: an introduction. *Biochem Biophys Res Comm* **304**, 433-435.
- Kronstad, J.W., und Leong, S.A. (1989). Isolation of two alleles of the b locus of *Ustilago maydis*. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**, 978-982.
- Kuranda, M.J., und Robbins, P.W. (1991). Chitinase is required for cell separation during growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **266**, 19758-19767.
- Lam, S.S., Martell, J.D., Kamer, K.J., Deerinck, T.J., Ellisman, M.H., Mootha, V.K., und Ting, A.Y. (2014). Directed evolution of APEX2 for electron microscopy and proximity labeling. *Nature Methods* **12**, 51-54.
- Lange, J., Mohr, U., Wiemken, A., Boller, T., und Vogeli-Lange, R. (1996). Proteolytic processing of class IV chitinase in the compatible interaction of bean roots with *Fusarium solani*. *Plant Physiol* **111**, 1135-1144.
- Langner T. (2010) Functional Characterization of the Pst1 and Pst2 Effector Proteins in *Ustilago maydis*. *Diplomarbeit. KIT Karlsruhe*.
- Lanver, D., Berndt, P., Tollot, M., Naik, V., Vranes, M., Warmann, T., Münch, K., Rössel, N., und Kahmann, R. (2014). Plant Surface Cues Prime *Ustilago maydis* for Biotrophic Development. *PLoS Pathogens* **10**, e1004272.
- Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., Mcgettigan, P. A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, A., Lopez, R., *et al.* (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* **23**, 2947-2948.
- Larsen, T., Petersen, B.O., Storgaard, B.G., Duus, J.O., Palcic, M.M., und Leisner, J.J. (2011). Characterization of a novel *Salmonella Typhimurium* chitinase which hydrolyzes chitin, chitooligosaccharides and an N-acetyllactosamine conjugate. *Glykobiology* **21**, 426-436.
- Leake, J.R., und Read, D.J. (1990). Chitin as a Nitrogen-Source for Mycorrhizal Fungi. *Mycol Res* **94**, 993-995.
- Leger, R.J., Cooper, R.M., und Charnley, A.K. (1986). Cuticle-degrading Enzymes of Entomopathogenic Fungi: Regulation of Production of Chitinolytic Enzymes. *Microbiology* **132**:1509-1517
- Lehmle, C., Steinberg, G., Snetselaar, K.M., Schliwa, M., Kahmann, R., und Bolker, M. (1997). Identification of a motor protein required for filamentous growth in *Ustilago maydis*. *EMBO J* **16**, 3464-3473.
- Lenz, J.H., Schuchardt, I., Straube, A., und Steinberg, G. (2006). A dynein loading zone for retrograde endosome motility at microtubule plus-ends. *EMBO J* **25**, 2275-2286.
- Lesnik, C., und Arava, Y. (2014) Isolation of mRNAs associated with yeast mitochondria to study mechanisms of localized translation. *J Vis Exp* **85**, doi: 10.3791/51265.
- Letunic, I., Doerks, T., und Bork, P. (2014). SMART: recent updates, new developments and status in 2015. *Nucleic Acids Res* **43**, 257-260.
- Li, X., und Roseman, S. (2003). The chitinolytic cascade in *Vibrios* is regulated by chitin oligosaccharides and a two-component chitin catabolic sensor/kinase. *Proc Nat Acad Sci USA* **101**, 627-631.

- Li, Y., und Zhang, Y.** (2009). REMO: A new protocol to refine full atomic protein models from C-alpha traces by optimizing hydrogen-bonding networks. *Proteins* **76**, 665-676.
- Lingappa, Y., und Lockwood, J.L.** (1961). A chitin medium for isolation, growth and maintenance of actinomycetes. *Nature* **189**, 158-159.
- Liu, J.H., Wang, H.Y., McCollum, D., und Balasubramanian, M.K.** (1999). Drc1p/Cps1p, a 1,3-beta-Glucan synthase subunit, is essential for division septum assembly in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics* **153**, 1193-1203.
- Liu, L., Zhang, K., Sandoval, H., Yamamoto, S., Jaiswal, M., Sanz, E., Li, Z., Hui, J., Graham, B.H., Quintana, A., und Bellen, H.J.** (2015). Glial Lipid Droplets and ROS Induced by Mitochondrial Defects Promote Neurodegeneration. *Cell* **160**, 177-190.
- Liu, S., Hou, Y., Liu, W., Lu, C., Wang, W., und Sun, S.** (2015). Components of the calcium-calcineurin signaling pathway in fungal cells and their potential as antifungal targets. *Eukaryotic Cell* **14**, 324-334.
- Liu, T., Liu, Z., Song, C., Hu, Y., Han, Z., She, J., Fan, F., Wang, J., Jin, C., Chang, J., Zhou, J.M., und Chai, J.** (2012). Chitin-Induced Dimerization Activates a Plant Immune Receptor. *Science* **336**, 1160-1164.
- Liu, T., Zhang, H., Liu, F., Wu, Q., Shen, X., und Yang, Q.** (2011). Structural Determinants of an Insect -N-Acetyl-D-hexosaminidase Specialized as a Chitinolytic Enzyme. *J Biol Chem* **286**, 4049-4058.
- Lombard, V., Golaconda Ramulu, H., Drula, E., Coutinho, P.M., Henrissat, B.** (2014) The Carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acids Res* **42**, 490-495.
- López-Mondéjar, R., Catalano, V., Kubicek, C.P., und Seidl, V.** (2009). The β -N-acetylglucosaminidases NAG1 and NAG2 are essential for growth of *Trichoderma atroviride* on chitin. *FEBS Journal* **276**, 5137-5148.
- MacDonald, M.J.** (2005). Perspective: emerging evidence for signaling roles of mitochondrial anaplerotic products in insulin secretion. *AJP: Endocrinology and Metabolism* **288**, E1-E15.
- Mach, R.L., Peterbauer, C.K., Payer, K., Jaksits, S., Woo, S.L., Zeilinger, S., Kullnig, C.M., Lorito, M., und Kubicek, C.P.** (1999). Expression of two major chitinase genes of *Trichoderma atroviride* (*T. harzianum* P1) is triggered by different regulatory signals. *Appl Environ Microbiol* **65**, 1858-1863.
- Macknight, R., Bancroft, I., Page, T., Lister, C., Schmidt, R., Love, K., Westphal, L., Murphy, G., Sherson, S., Cobbett, C., und Dean, C.** (1997). FCA, a gene controlling flowering time in *Arabidopsis*, encodes a protein containing RNA-binding domains. *Cell* **89**, 737-745.
- Maddi, A., Bowman, S.M., und Free, S.J.** (2009). Trifluoromethanesulfonic acid-based proteomic analysis of cell wall and secreted proteins of the ascomycetous fungi *Neurospora crassa* and *Candida albicans*. *Fun Genet Biol* **46**, 768-781.
- Mahlert, M., Leveleki, L., Hlubek, A., Sundrock, B., und Bölker, M.** (2006). Rac1 and Cdc42 regulate hyphal growth and cytokinesis in the dimorphic fungus *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol* **59**, 567-578.

- Manjithaya, R., Anjard, C., Loomis, W.F., und Subramani, S.** (2010). Unconventional secretion of *Pichia pastoris* Acb1 is dependent on GRASP protein, peroxisomal functions, and autophagosome formation. *J Cell Biol* **188**, 537-546.
- Marcus, J.N., Watson, P., Page, D.L., Narod, S.A., Lenoir, G.M., Tonin, P., Linder-Stephenson, L., Salerno, G., Conway, T.A., und Lynch, H.T.** (1996). Hereditary breast cancer: pathobiology, prognosis, and BRCA1 and BRCA2 gene linkage. *Cancer* **77**, 697-709.
- Margeot, A., Blugeon, C., Sylvestre, J., Vialette, S., Jacq, C., und Corral-Debrinski, M.** (2002). In *Saccharomyces cerevisiae*, ATP2 mRNA sorting to the vicinity of mitochondria is essential for respiratory function. *Embo J* **21**, 6893-6904.
- Mark, B.L., Mahuran, D.J., Cherney, M.M., Zhao, D., Knapp, S., und James, M.N.** (2003). Crystal structure of human beta-hexosaminidase B: understanding the molecular basis of Sandhoff and Tay-Sachs disease. *J Mol Biol* **327**, 1093-1109.
- Marshall, R., Kombrink, A., Motteram, J., Loza-Reyes, E., Lucas, J., Hammond-Kosack, K.E., Thomma, B.P.H.J., und Rudd, J.J.** (2011). Analysis of Two in Planta Expressed LysM Effector Homologs from the Fungus *Mycosphaerella graminicola* Reveals Novel Functional Properties and Varying Contributions to Virulence on Wheat. *Plant Physiol* **156**, 756-769.
- Martin, J., Mahlke, K., Pfanner, N.** (1991). Role of an Energized Inner Membrane in Mitochondrial Protein Import. *J Biol Chem* **266**, 18051-18057.
- Martin-Cuadrado, A.B.** (2003). The endo-beta-1,3-Glucanase eng1p is required for dissolution of the primary septum during cell separation in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Cell Sci* **116**, 1689-1698.
- Martin-Cuadrado, A.B.** (2005). Role of Septins and the Exocyst Complex in the Function of Hydrolytic Enzymes Responsible for Fission Yeast Cell Separation. *Mol Biol Cell* **16**, 4867-4881.
- Martín-Cuadrado, A.B., del Dedo, J.E., de Medina-Redondo, M., Fontaine, T., del Rey, F., Latgé, J.P., und de Aldana, C.R.V.** (2008). The *Schizosaccharomyces pombe* endo-1,3- β -Glucanase Eng1 contains a novel carbohydrate binding module required for septum localization. *Mol Microbiol* **69**, 188-200.
- Martinez-Espinoza, A. D., Garcia-Pedrajas, M. D., Und Gold, S. E.** (2002). The Ustilaginales as plant pests and model systems. *Fungal Genet Biol* **35**, 1-20.
- Matsumoto, S., Uchiumi, T., Saito, T., Yagi, M., Takazaki, S., Kanki, T., und Kang, D.** (2012). Localization of mRNAs encoding human mitochondrial oxidative phosphorylation proteins. *Mitochondrion* **12**, 391-398.
- Mazloum, N., und Holloman, W.K.** (2009). Second-End Capture in DNA Double-Strand Break Repair Promoted by Brh2 Protein of *Ustilago maydis*. *Mol Cell* **33**, 160-170.
- McKinney, S.A., Murphy, C.S., Hazelwood, K.L., Davidson, M.W., und Looger, L.L.** (2009). A bright and photostable photoconvertible fluorescent protein. *Nature Methods* **6**, 131-133.
- McNeil, B., Berry, D.R., Harvey, L.M., Grant, A., und White, S.** (1998). Measurement of autolysis in submerged batch cultures of *Penicillium chrysogenum*. *Biotechnol Bioeng* **57**, 297-305.
- McNew, J.A., Parlati, F., Fukuda, R., Johnston, R.J., Paz, K., Paumet, F., Sollner, T.H., und Rothman, J.E.** (2000). Compartmental specificity of cellular membrane fusion encoded in SNARE proteins. *Nature* **407**, 153-159.

- Mendoza-Mendoza, A., Berndt, P., Djamei, A., Weise, C., Linne, U., Marahiel, M., Vranes, M., Kämper, J., und Kahmann, R. (2009). Physical-chemical plant-derived signals induce differentiation in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol* **71**, 895-911.
- Mengerink, Y., Deman, H.C.J., und Vanderwal, S. (1991). Use of an evaporative light-scattering detector in reversed-phase high-performance liquid-chromatography of oligomeric surfactants. *Journal of Chromatography* **552**, 593-604.
- Merzlyak, E.M., Goedhard, J., Shcherbo, D., Bulina, M.E., Shcheglov, A.S., Fradkov, A.F., Gaintzeva, A., Lukyanov, S., Gadella, T.W.J., und Chudakov, D.M. (2007). Bright monomeric red fluorescent protein with an extended fluorescence lifetime. *Nature Methods* **4**, 555-557.
- Meyer, D.I., und Dobberstein, B. (1980). Identification and Characterization of a Membrane Component Essential for the Translocation of Nascent Proteins across the Membrane of the Endoplasmic Reticulum. *J Cell Biol* **87**, 503-508.
- Michaelis, S. (1993). STE6, the yeast a-factor transporter. *Semin Cell Biol* **4**, 17-27.
- Molloy, C., Cannon, R.D., Sullivan, P.A., und Shepherd, M.G. (1994). Purification and characterization of two forms of N-acetylglucosaminidase from *Candida albicans* showing widely different outer chain glycosylation. *Microbiology* **140**, 1543-1553.
- Monreal, J., und Reese, E.T. (1969). The Chitinase of *Serratia marcescens*. *Can J Microbiol* **15**, 689-696.
- Morris, R.L., und Hollenbeck, P.J. (1995). Axonal transport of mitochondria along microtubules and F-actin in living vertebrate neurons. *J Cell Biol* **131**, 1315-1326.
- Murata, T., Amarume, S., Hattori, T., Tokuyama, S., Tokuyasu, K., Kawagishi, H., und Usui, T. (2005). Purification and characterization of a chitinase from *Amycolatopsis orientalis* with N-acetylglucosamine-repeating unit releasing activity. *Biochem Biophys Res Comm* **336**, 514-520.
- Mueller, A.N., Ziemann, S., Treitschke, S., Aßmann, D., und Doehlemann, G. (2013). Compatibility in the *Ustilago maydis*-Maize Interaction Requires Inhibition of Host Cysteine Proteases by the Fungal Effector Pit2. *PLoS Pathogens* **9**, e1003177.
- Nadal, M., Garcia-Pedrajas, M.D., und Gold, S.E. (2010). The snf1 Gene of *Ustilago maydis* Acts as a Dual Regulator of Cell Wall Degrading Enzymes. *Phytopathology* **100**, 1364-1372.
- Nangaku, M., Satoyoshitake, R., Okada, Y., Noda, Y., Takemura, R., Yamazaki, H., und Hirokawa, N. (1994). Kif1b, a Novel Microtubule Plus End-Directed Monomeric Motor Protein for Transport of Mitochondria. *Cell* **79**, 1209-1220.
- Nelson, B., Kurischko, C., Horecka, J., Mody, M., Nair, P., Pratt, L., Zougman, A., McBroom, L.D., Hughes, T.R., Boone, C., Luca, F.C. (2003). RAM: A Conserved Signaling Network That Regulates Ace2p Transcriptional Activity and Polarized Morphogenesis. *Mol Biol Cell* **14**, 3782-3803.
- Neuhaus, J.M., Sticher, L., Meins, F., Jr., und Boller, T. (1991). A short C-terminal sequence is necessary and sufficient for the targeting of chitinases to the plant vacuole. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**, 10362-10366.
- Neupert, W., und Schatz, G. (1981). How Proteins are transported into Mitochondria. *TIBS* **6**, 1-4

- Nezis, I.P., Sagona, A.P., Schink, K.O., und Stenmark, H.** (2010). Divide and ProsPer: The emerging role of PtdIns3P in cytokinesis. *Trends in Cell Biology* **20**, 642-649.
- Nickel, W.** (2005). Unconventional Secretory Routes: Direct Protein Export Across the Plasma Membrane of Mammalian Cells. *Traffic* **6**, 607-614.
- Nickel, W., und Rabouille, C.** (2009). Mechanisms of regulated unconventional secretion. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**, 148-55
- Nickel, W.** (2010). Pathways of unconventional protein secretion. *Curr Opin Biotechnol* **21**, 621-626.
- Nikolov, S., Petrov, M., Lymperakis, L., Friák, M., Sachs, C., Fabritius, H.-O., Raabe, D., und Neugebauer, J.** (2010). Revealing the Design Principles of High-Performance Biological Composites Using Ab initio and Multiscale Simulations: The Example of Lobster Cuticle. *Advanced Materials* **22**, 519-526.
- Onel, K., Koff, A., Bennett, R.L., Unrau, P., und Holloman, W.K.** (1996). The REC1 gene of *Ustilago maydis*, which encodes a 3'-->5' exonuklease, couples DNA repair and completion of DNA synthesis to a mitotic checkpoint. *Genetics* **143**, 165-174.
- Ostermann, J., Horwich, A.L., Neupert, W., und Hartl, F.U.** (1989). Protein folding in mitochondria requires complex formation with hsp60 and ATP hydrolysis. *Nature* **341**, 125-130.
- Pagliarini, D.J., und Dixon, J.E.** (2006). Mitochondrial modulation: reversible phosphorylation takes center stage? *Trends in Biochemical Sciences* **31**, 26-34.
- Patil, R.S., Ghormade, V.V., und Deshpunde, M.V.** (2000). Chitinolytic enzymes: an exploration. *Enzyme Microb Technol* **26**, 473-483.
- Payne, C.M., Baban, J., Horn, S.J., Backe, P.H., Arvai, A.S., Dalhus, B., Bjoras, M., Eijsink, V.G.H., Sorlie, M., Beckham, G.T., und Vaaje-Kolstad, G.** (2012). Hallmarks of Processivity in Glykoside Hydrolases from Crystallographic and Computational Studies of the *Serratia marcescens* Chitinases. *J Biol Chem* **287**, 36322-36330.
- Pédelacq, J.-D., Cabantous, S., Tran, T., Terwilliger, T.C., und Waldo, G.S.** (2006). Engineering and characterization of a superfolder green fluorescent protein. *Nature Biotechnology* **24**, 79-88.
- Peng, S.S., Chen, C.Y., Xu, N., und Shyu, A.B.** (1998). RNA stabilization by the AU-rich element binding protein, HuR, an ELAV protein. *EMBO J* **17**, 3461-3470.
- Perkins, D.D.** (1949). Biochemical Mutants in the Smut Fungus *Ustilago maydis*. *Genetics* **34**, 607-626.
- Perrakis, A., Tews, I., Dauter, Z., Oppenheim, A.B., Chet, I., Wilson, K.S., und Vorgias, C.E.** (1994). Crystal structure of a bacterial chitinase at 2.3 Å resolution. *Structure* **2**, 1169-1180.
- Peterbauer, C.K., Lorito, M., Hayes, C.K., Harman, G.E., und Kubicek, C.P.** (1996). Molecular cloning and expression of the nag1 gene (N-acetyl-beta-D-glukosaminidase-encoding gene) from *Trichoderma harzianum* P1. *Curr Genet* **30**, 325-331.
- Petersen, T.N., Brunak, S., von Heijne, G., und Nielsen, H.** (2011). SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature Methods* **8**, 785-786.

- Pfanner, N., Tropschug, M., und Neupert, W.** (1987). Mitochondrial Protein Import: Nucleoside Triphosphates Are Involved in Conferring Import-Competence to Precursors. *Cell* **49**, 815-823.
- Pócsi, I., Leiter, É., Kwon, N.J., Shin, K.S., Kwon, G.S., Pusztahelyi, T., Emri, T., Abuknesha, R.A., Price, R.G., und Yu, J.H.** (2009). Asexual sporulation signalling regulates autolysis of *Aspergillus nidulans* via modulating the chitinase ChiB production. *J Appl Microbiol* **107**, 514-523.
- Pohlmann, T.** (2013) Die Rolle von PAM2-Proteinen während des endosomalen mRNA-Transports in *Ustilago maydis*. *Dissertation. Heinrich-Heine Universität Düsseldorf*.
- Price, J., und Verner, K.** (1993). Puromycin Inhibits Protein Import into Mitochondria by Interfering with an Intramitochondrial Atp-Dependent Reaction. *Biochimica Et Biophysica Acta* **1150**, 89-97.
- Raabe, D., Sachs, C., und Romano, P.** (2005). The crustacean exoskeleton as an example of a structurally and mechanically graded biological nanocomposite material. *Acta Materialia* **53**, 4281-4292.
- Rabe, F., Ajami-Rashidi, Z., Doehlemann, G., Kahmann, R., und Djamei, A.** (2013). Degradation of the plant defence hormone salicylic acid by the biotrophic fungus *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol* **89**, 179-188.
- Rabouille, C., Malhotra, V., und Nickel, W.** (2012). Diversity in unconventional protein secretion. *J Cell Sci* **125**, 5251-5255.
- Ram, A.F.J., und Klis, F.M.** (2006). Identification of fungal cell wall mutants using susceptibility assays based on Calcofluor white and Congo red. *Nature Protocols* **1**, 2253-2256.
- Ramelot, T.A., Yang, Y., Sahu, I.D., Lee, H.-W., Xiao, R., Lorigan, G.A., Montelione, G.T., und Kennedy, M.A.** (2014). NMR structure and MD simulations of the AAA protease intermembrane space domain indicates peripheral membrane localization within the hexaoligomer. *FEBS Letters* **587**, 3522-3528.
- Reid, G.A., und Schatz, G.** (1982a). Import of Proteins into Mitochondria - Extra-Mitochondrial Pools and Post-Translational Import of Mitochondrial Protein Precursors In vivo. *J Biol Chem* **257**, 3062-3067.
- Reid, G.A., und Schatz, G.** (1982b). Import of Proteins into Mitochondria - Yeast-Cells Grown in the Presence of Carbonyl Cyanide Meta-Chlorophenylhydrazone Accumulate Massive Amounts of Some Mitochondrial Precursor Polypeptides. *J Biol Chem* **257**, 3056-3061.
- Reid, G.A., Yonetani, T., und Schatz, G.** (1982). Import of Proteins into Mitochondria - Import and Maturation of the Mitochondrial Intermembrane Space Enzymes Cytochrome-B2 and Cytochrome-C Peroxidase in Intact Yeast-Cells. *J Biol Chem* **257**, 3068-3074.
- Remoroza, C., Cord-Landwehr, S., Leijdekkers, A.G.M., Moerschbacher, B.M., Schols, H.A., und Gruppen, H.** (2012). Combined HILIC-ELSD/ESI-MSn enables the separation, identification and quantification of sugar beet Pektin derived oligomers. *Carbohydrate Polymers* **90**, 41-48.
- Richardson, P.M., Amselem, J., Cuomo, C.A., van Kan, J.A.L., Viaud, M., Benito, E.P., Couloux, A., Coutinho, P.M., de Vries, R.P., Dyer, P.S., Fillinger, S., Fournier, E., Gout, L., Hahn, M., Kohn, L., Lapalu, *et al.* (2011). Genomic Analysis of the Necrotrophic Fungal Pathogens *Sclerotinia sclerotiorum* and *Botrytis cinerea*. *PLoS Genetics* **7**, e1002230.**

- Rigden, D.J., Mello, L.V., und Galperin, M.Y.** (2004). The PA14 domain, a conserved all- β domain in bacterial toxins, enzymes, adhesins and signaling molecules. *Trends Biochem Sci* **29**, 335–339
- Robinow, S., und White, K.** (1991). Characterization and spatial distribution of the ELAV protein during *Drosophila melanogaster* development. *J Neurobiol* **22**, 443-461.
- Roh, D.H., Bowers, B., Schmidt, M., und Cabib, E.** (2002). The Septation Apparatus, an Autonomous System in Budding Yeast. *Mol Biol Cell* **13**, 2747-2759.
- Roncero, C., und Duran, A.** (1985). Effect of Calcofluor white and Congo red on fungal cell wall morphogenesis: in vivo activation of chitin polymerization. *J Bacteriol* **163**, 1180-1185.
- Roncero, C., Valdivieso, M.H., Ribas, J.C., und Duran, A.** (1988). Isolation and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* mutants resistant to Calcofluor white. *J Bacteriol* **170**, 1950-1954.
- Roy, A., Kucukural, A., Zhang, Y.** (2010). I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nature Protocols* **5**, 725-738
- Roy, A., Yang, J., und Zhang, Y.** (2012). COFACTOR: An accurate comparative algorithm for structure-based protein function annotation. *Nucleic Acids Research* **40**, 471-477
- Roy, A., und Zhang, Y.** (2012). COFACTOR: Recognizing protein-ligand binding sites by global structural alignment and local geometry refinement. *Structure* **20**, 987-997
- Ruiz-Herrera, J., Leon, C.G., Carabez-Trejo, A., und Reyes-Salinas, E.** (1996). Structure and chemical composition of the cell walls from the haploid yeast and mycelial forms of *Ustilago maydis*. *Fungal Genet Biol* **20**, 133-142.
- Saito, A., Fujii, T., Yoneyama, T., und Miyashita, K.** (1998). *glkA* is involved in Glukose repression of chitinase production in *Streptomyces lividans*. *J Bacteriol* **180**, 2911-2914.
- Saito, A., Ishizaka, M., Francisco, P.B., Jr., Fujii, T., und Miyashita, K.** (2000). Transcriptional co-regulation of five chitinase genes scattered on the *Streptomyces coelicolor* A3(2) chromosome. *Microbiology* **146**, 2937-2946.
- Sakakibara, S., Imai, T., Hamaguchi, K., Okabe, M., Aruga, J., Nakajima, K., Yasutomi, D., Nagata, T., Kurihara, Y., Uesugi, S., Miyata, T., Ogawa, M., Mikoshiba, K., und Okano, H.** (1996). Mouse-Musashi-1, a neural RNA-Binding protein highly enriched in the mammalian CNS stem cell. *Dev Biol* **176**, 230-242.
- Sámi, L., Pusztahelyi, T., Emri, T., Varecza, Z., Fekete, A., Grallert, A., Karanyi, Z., Kiss, L., und Pócsi, I.** (2001). Autolysis and aging of *Penicillium chrysogenum* cultures under carbon starvation: Chitinase production and antifungal effect of allosamidin. *J Gen Appl Microbiol* **47**, 201-211.
- Sambrook, J., Frisch, E. F., Und Maniatis, T.** (1989a). Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbour, New York, Cold Spring Harbour Laboratory Press).
- Sambrook, J., Frisch, E. F., Und Maniatis, T.** (1989b). Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbour, New York, Cold Spring Harbour Laboratory Press).
- Sánchez-Vallet, A., Mesters, J.R., und Thomma, B.P.H.J.** (2014). The battle for chitin recognition in plant-microbe interactions. *FEMS Microbiology Reviews*. **39**, 171,183

- Sánchez-Vallet, A., Saleem-Batcha, R., Kombrink, A., Hansen, G., Valkenburg, D.J., Thomma, B.P., und Mesters, J.R.** (2013). Fungal effector Ecp6 outcompetes host immune receptor for chitin binding through intrachain LysM dimerization. *Elife* **2**, e00790.
- Sándor, E., Pusztahelyi, T., Karaffa, L., Karányi, Z., Pócsi, I., Biró, S., Szentirmai, A., und Pócsi, I.** (1998). Allosamidin inhibits the fragmentation of *Acremonium chrysogenum* but does not influence the cephalosporin-C production of the fungus. *FEMS Microbiology Letters*, **164**: 231–236.
- Sandroock, B., Böhmer, C., und Bölker, M.** (2006). Dual function of the germinal centre kinase Don3 during mitosis and cytokinesis in *Ustilago maydis*. *Molecular Microbiology* **62**, 655–666.
- Santos, B., Martin-Cuadrado, A.B., Vazquez de Aldana, C.R., del Rey, F., und Perez, P.** (2005). Rho4 GTPase Is Involved in Secretion of Glukanases during Fission Yeast Cytokinesis. *Eukaryotic Cell* **4**, 1639–1645.
- Saputo, S., Chabrier-Rosello, Y., Luca, F.C., Kumar, A., und Krysan, D.J.** (2012). The RAM Network in Pathogenic Fungi. *Eukaryotic Cell* **11**, 708–717.
- Sarkari, P., Reindl, M., Stock, J., Müller, O., Kahmann, R., Feldbrügge, M., und Schipper, K.** (2014). Improved expression of single-chain antibodies in *Ustilago maydis*. *J Biotechnol* **191**, 165–175.
- Scherer, M., Heimel, K., Starke, V., und Kämper, J.** (2006). The Clp1 Protein Is Required for Clamp Formation and Pathogenic Development of *Ustilago maydis*. *The Plant Cell Online* **18**, 2388–2401.
- Schilling, L., Matei, A., Redkar, A., Walbot, V., und Doehlemann, G.** (2014). Virulence of the maize smut *Ustilago maydis* shaped by organ-specific effectors. *Mol Plant Pathol* **15**, 780–789.
- Schink, K.O., und Bölker, M.** (2008). Coordination of Cytokinesis and Cell Separation by Endosomal Targeting of a Cdc42-specific Guanine Nucleotide Exchange Factor in *Ustilago maydis*. *Mol Bio Cell* **20**, 1081–1088.
- Schirawski, J., Böhnert, H.U., Steinberg, G., Snetselaar, K., Adamikowa, L., und Kahmann, R.** (2005). Endoplasmic Reticulum Glucosidase II Is Required for Pathogenicity of *Ustilago maydis*. *The Plant Cell Online* **17**, 3532–3543.
- Schirawski, J., Heinze, B., Wagenknecht, M., und Kahmann, R.** (2005). Mating Type Loci of *Sporisorium reilianum*: Novel Pattern with Three a and Multiple b Specificities. *Eukaryotic Cell* **4**, 1317–1327.
- Schirawski, J., Mannhaupt, G., Münch, K., Brefort, T., Schipper, K., Doehlemann, G., Di Stasio, M., Rössel, N., Mendoza-Mendoza, A., Pester, D., Müller, O., Winterberg, B., Meyer, E., Ghareeb, H., Wollenberg, T., Münsterkötter, M., Wong, P., Walter, M., Stukenbrock, E., Güldener, U., und Kahmann, R.** (2010) Pathogenicity Determinants in Smut Fungi Revealed by Genome Comparison. *Science* **330**:1546–1548
- Schleyer, M., und Neupert, W.** (1985). Transport of Proteins into Mitochondria: Translocation Intermediates Spanning Contact sites between Outer and Inner Membranes. *Cell* **43**, 339–3350
- Schlumbaum, A., Mauch, F., Vogeli, U., und Boller, T.** (1986). Plant Chitinases Are Potent Inhibitors of Fungal Growth. *Nature* **324**, 365–367.

- Schuchardt, I.** (2005). Myosin-V, Kinesin-1, and Kinesin-3 Cooperate in Hyphal Growth of the Fungus *Ustilago maydis*. *Mol Biol Cell* **16**, 5191-5201.
- Schultz, J., Milpetz, F., Bork, P., und Ponting, C.P.** (1998). SMART, a simple modular architecture research tool: Identification of signaling domains. *Proc Natl Acad Sci USA* **60**, 295-306
- Schulz, B., Banuett, F., Dahl, M., Schlesinger, R., Schafer, W., Martin, T., Herskowitz, I., und Kahmann, R.** (1990). The b alleles of *Ustilago maydis*, whose combinations program pathogenic development, code for polypeptides containing a homeodomain-related motif. *Cell* **95**, 5857-5864.
- Schuster, M., Lipowsky, R., Assmann, M.A., Lenz, P., und Steinberg, G.** (2011a). Transient binding of dynein controls bidirectional long-range motility of early endosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* **108**, 3618-3623.
- Schuster, M., Kilaru, S., Ashwin, P., Lin, C., Severs, N.J., und Steinberg, G.** (2011b). Controlled and stochastic retention concentrates dynein at microtubule ends to keep endosomes on track. *EMBO J* **30**, 652-664.
- Scott, B., und Eaton, C.J.** (2008). Role of reactive oxygen species in fungal cellular differentiations. *Curr Opin Microbiol* **11**, 488-493.
- Seelenmeyer, C., Stegmayer, C., und Nickel, W.** (2008). Unconventional secretion of fibroblast growth factor 2 and Galektin-1 does not require shedding of plasma membrane-derived vesicles. *FEBS Letters* **582**, 1362-1368.
- Seidl, V.** (2008). Chitinases of filamentous fungi: a large group of diverse proteins with multiple physiological functions. *Fungal Biology Reviews* **22**, 36-42.
- Seidl, V., Huemer, B., Seiboth, B., und Kubicek, C.P.** (2005). A complete survey of *Trichoderma* chitinases reveals three distinct subgroups of family 18 chitinases. *FEBS J* **272**, 5923-5939.
- Shah, K., Liu, Y., Deirmengian, C. and Shokat, K.M.** (1997). Engineering unnatural nucleotide specificity for Rous sarcoma virus tyrosine kinase to uniquely label its direct substrates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 3565-3570.
- Shaner, N.C., Campbell, R.E., Steinbach, P.A., Giepmans, B.N.G., Palmer, A.E., und Tsien, R.Y.** (2004). Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nature Biotechnology* **22**, 1567-1572.
- Shin, K.S., Kwon, N.J., Kim, Y.H., Park, H.S., Kwon, G.S., und Yu, J.H.** (2009). Differential Roles of the ChiB Chitinase in Autolysis and Cell Death of *Aspergillus nidulans*. *Eukaryotic Cell* **8**, 738-746.
- Sikorski, P., Sorbotten, A., Horn, S.J., Eijssink, V.G.H., und Varum, K.M.** (2006). *Serratia marcescens* Chitinases with Tunnel-Shaped Substrate-Binding Grooves Show Endo Activity and Different Degrees of Processivity during Enzymatic Hydrolysis of Chitosan. *Biochemistry* **45** (31):9566-9574.
- Sivan, A., und Chet, I.** (1989). Degradation of Fungal Cell-Walls by Lytic Enzymes of *Trichoderma-Harzianum*. *J Gen Microbiol* **135**, 675-682.
- Skibbe, D.S., Doehlemann, G., Fernandes, J., und Walbot, V.** (2010). Maize tumors caused by *Ustilago maydis* require organ-specific genes in host and pathogen. *Science* **328**, 89-92.

- Snetselaar, K.M., und Mims, C.W.** (1994). Light and Electron-Microscopy of *Ustilago maydis* Hyphae in Maize. *Mycol Res* **98**, 347-355.
- 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.
- Sniegowski, J.A., Phail, M.E., und Wachter, R.M.** (2005). Maturation efficiency, trypsin sensitivity, and optical properties of Arg96, Glu222, and Gly67 variants of green fluorescent protein. *Biochem Biophys Res Comm* **332**, 657-663.
- Song, H.K., und Sung, S.W.** (1996) Refined Structure of the Chitinase from Barley Seeds at 2.0 Å Resolution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **52**:289-98
- Söllner, T., Whiteheart, S.W., Brunner, M., Erdjument-Bromage, H., Geromanos, S., Tempst, P., und Rothman, J.E.** (1993). SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature* **362**, 318-324.
- 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.
- Spellig, T., Bolker, M., Lottspeich, F., Frank, R.W., und Kahmann, R.** (1994). Pheromones trigger filamentous growth in *Ustilago maydis*. *EMBO J* **13**, 1620-1627.
- Shakin-Eshleman, S., Spitalnik, S.L., und Kasturi, L.** (1996). The Amino Acid at the X Position of an Asn-X-Ser Sequence Is an Important Determinant of N-Linked Core-glycosylation Efficiency. *J Biol Chem* **271**, 6363-6366.
- Steinberg, G., und Perez-Martin, J.** (2008). *Ustilago maydis*, a new fungal model system for cell biology. *Trends in Cell Biology* **18**, 61-67.
- Steinberg, G., und Schuster, M.** (2011). The dynamic fungal cell. *Fungal Biol Rev* **25**, 14-37.
- Stephenson, K.S., Gow, N.A.R., Davidson, F.A., und Gadd, G.M.** (2014). Regulation of vectorial supply of vesicles to the hyphal tip determines thigmotropism in *Neurospora crassa*. *Fungal Biol* **118**, 287-294.
- Stigliano, E., Sansebastiano, G.-P., und Neuhaus, J.-M.** (2014). Contribution of Chitinase A's C-Terminal Vacuolar Sorting Determinant to the Study of Soluble Protein Compartmentation. *International Journal of Molecular Sciences* **15**, 11030-11039.
- Stirling, J.L.** (1974). Human N-acetyl-beta-hexosaminidases: hydrolysis of N, N' diacetyl-chitobiose by a low molecular weight enzyme. *FEBS Lett* **39**, 171-175.
- Straube, A., Enard, W., Berner, A., Wedlich-Soldner, R., Kahmann, R., und Steinberg, G.** (2001). A split motor domain in a cytoplasmic dynein. *EMBO J* **20**, 5091-5100.
- Stratford, M.** (2008). Yeast Flocculation: A New Perspective. *Adv Microbial Phys* **33**, 1-71.
- Stock, J.,** (2013) Etablierung eines neuartigen Protein-Expressionssystems in *Ustilago maydis*. *Dissertation. Heinrich-Heine Universität Düsseldorf*.
- Stock, J., Sarkari, P., Kreibich, S., Brefort, T., Feldbrügge M., und Schipper, K.** (2012) Applying unconventional secretion of the endochitinase Cts1 to export heterologous proteins in *Ustilago maydis*. *J Biotechnol* **161**, 80-91.

- Stolle, N.,** (2013). Funktionelle Charakterisierung eines LysM-Proteins von *Ustilago maydis*. Dissertation. Philipps-Universität Marburg.
- Suissa, M., und Schatz, G.** (1982). Import of Proteins into Mitochondria - Translatable Messenger-RNAs for Imported Mitochondrial Proteins Are Present in Free as Well as Mitochondria-Bound Cytoplasmic Polysomes. *J Biol Chem* **257**, 3048-3055.
- Sutherland, D.J., Pujic, Z., und Goodhill, G.J.** (2014). Calcium signaling in axon guidance. *Trends in Neurosciences* **37**, 424-432.
- Sutherland, T.E., Andersen, O.A., Betou, M., Eggleston, I.M., Maizels, R.M., van Aalten, D., und Allen, J.E.** (2011). Analyzing airway inflammation with chemical biology: dissection of acidic mammalian chitinase function with a selective drug-like inhibitor. *Chem.Biol* **18**, 569
- Suzuki, K., Suzuki, M., Taiyoji, M., Nikaidou, N., und Watanabe, T.** (1998). Chitin binding protein (CBP21) in the culture supernatant of *Serratia marcescens* 2170. *Biosci Biotechnol Biochem* **62**, 128-135.
- Synowiecki, J., und Al-Khateeb, N.A.** (2003). Production, properties, and some new applications of chitin and its derivatives. *Crit Rev Food Sci Nutr* **42** (2):145-171.
- Sylvestre, J., Vialette, S., Corral Debrinski, M., und Jacq, C.** (2003). Long mRNAs coding for yeast mitochondrial proteins of prokaryotic origin preferentially localize to the vicinity of mitochondria. *Genome Biol* **4**, R44.
- Synstad, B., Gaseidnes, S., van Aalten, D.M.F., Vriend, G., Nielsen, J.E., und Eijsink, V.G.H.** (2004). Mutational and computational analysis of the role of conserved residues in the active site of a family 18 chitinase. *European Journal of Biochemistry* **271**, 253-262.
- Takaya, N., Yamazaki, D., Horiuchi, H., Ohta, A., und Takagi, M.** (1998a). Intracellular chitinase gene from *Rhizopus oligosporus*: molecular cloning and characterization. *Microbiol Uk* **144**, 2647-2654.
- Takaya, N., Yamazaki, D., Horiuchi, H., Ohta, A., und Takagi, M.** (1998b). Cloning and characterization of a chitinase-encoding gene (*chiA*) from *Aspergillus nidulans*, disruption of which decreases germination frequency and hyphal growth. *Biosci Biotechnol Biochem* **62**, 60-65.
- Tanaka, S., Brefort, T., Neidig, N., Djamei, A., Kahnt, J., Vermerris, W., Koenig, S., Feussner, K., Feussner, I., und Kahmann, R.** (2014). A secreted *Ustilago maydis* effector promotes virulence by targeting anthocyanin biosynthesis in maize. *Elife* **3**, e01355.
- Tao, J., Ginsberg, I., Banerjee, N., Held, W., Koltin, Y., und Bruenn, J.A.** (1990). *Ustilago maydis* KP6 killer toxin: structure, expression in *Saccharomyces cerevisiae*, and relationship to other cellular toxins. *Mol Cell Biol* **10**, 1373-1381.
- Tarentino, A.L., Gomez, C.M., und Plummer, T.H.** (1985). Deglycosylation of Asparagine-Linked Glycans by Peptide - N-Glykosidase-F. *Biochemistry US* **24**, 4665-4671.
- Temmerman, K., Ebert, A.D., Müller, H.-M., Sinning, I., Tews, I., und Nickel, W.** (2008). A Direct Role for Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate in Unconventional Secretion of Fibroblast Growth Factor 2. *Traffic* **9**, 1204-1217.
- Teparic, R., Stuparevic, I., und Mrsa, V.** (2007). Binding assay for incorporation of alkali-extractable proteins in the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Yeast* **24**, 259-266.

- Terfrüchte, M., Joehnk, B., Fajardo-Somera, R., Braus, G.H., Riquelme, M., Schipper, K., und Feldbrügge, M.** (2013). Establishing a versatile Golden Gate cloning system for genetic engineering in fungi. *Fun Genet Biol* **62**, 1-10.
- Terwisscha van Scheltinga, A.C., Hennig, M., und Dijkstra, B.W.** (1996). The 1.8 Å resolution structure of hevamine, a plant chitinase/lysozyme, and analysis of the conserved sequence and structure motifs of glykosyl hydrolase family 18. *J Mol Biol* **262**, 243-257.
- Terwisscha van Scheltinga, A.C., Kalk, K.H., Beintema, J.J., und Dijkstra, B.W.** (1994). Crystal structures of hevamine, a plant defence protein with chitinase and lysozyme activity, and its complex with an inhibitor. *Structure* **2**, 1181-1189.
- Tews, I., Perrakis, A., Oppenheim, A., Dauter, Z., Wilson, K.S., und Vorgias, C.E.** (1996). Bacterial chitobiase structure provides insight into catalytic mechanism and the basis of Tay-Sachs disease. *Nature Structural Biology* **3**, 638-648.
- Tharanathan, R.N., und Kittur, F.S.** (2003). Chitin – The undisputed biomolecule of great potential. *Crit Rev Food Sci Nutr* **43** (1):61-87.
- Tonukari, N.J., Craig, J.S., Walton, J.D.** (2000). The *Cochliobolus carbonum* SNF1 gene is required for cell wall-degrading enzyme expression and virulence on maize. *Plant Cell* **12**(2), 237-48
- Torrado, L.C., Temmerman, K., Muller, H.M., Mayer, M.P., Seelenmeyer, C., Backhaus, R., und Nickel, W.** (2009). An intrinsic quality-control mechanism ensures unconventional secretion of fibroblast growth factor 2 in a folded conformation. *J Cell Sci* **122**, 3322-3329.
- Treitschke, S., Doehlemann, G., Schuster, M., und Steinberg, G.** (2010). The Myosin Motor Domain of Fungal Chitin Synthase V Is Dispensable for Vesicle Motility but Required for Virulence of the Maize Pathogen *Ustilago maydis*. *The Plant Cell Online* **22**, 2476-2494.
- Tsiatsiani, L., Van Breusegem, F., Gallois, P., Zavialov, A., Lam, E., und Bozhkov, P.V.** (2011). Metacaspases. *Cell Death and Differentiation* **18**, 1279-1288.
- Tsien, R.Y.** (1998). The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem* **67**, 509-544.
- Turrens, J.F.** (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol* **552**, 335-344.
- Tveit, H., Akslen, L.K.A., Fagereng, G.L., Tranulis, M.A., und Prydz, K.** (2009). A Secretory Golgi Bypass Route to the Apical Surface Domain of Epithelial MDCK Cells. *Traffic* **10**, 1685-1695.
- Tzelepis, G., Hosomi, A., Hossain, T.J., Hirayama, H., Dubey, M., Jensen, D.F., Suzuki, T., und Karlsson, M.** (2014). Endo-β-N-acetylglucosamidases (ENGases) in the fungus *Trichoderma atroviride*: Possible involvement of the filamentous fungi-specific cytosolic ENGase in the ERAD process. *Biochem Biophys Res Comm* **449**, 256-261.
- Tzelepis, G.D., Melin, P., Jensen, D.F., Stenlid, J., und Karlsson, M.** (2012). Functional analysis of Glykoside hydrolase family 18 and 20 genes in *Neurospora crassa*. *Fun Genet Biol* **49**, 717-730.
- Uchiyama, T., Kaneko, R., Yamaguchi, J., Inoue, A., Yanagida, T., Nikaidou, N., Regue, M., und Watanabe, T.** (2003). Uptake of N,N'-Diacetylchitobiose [(GlcNAc)₂] via the Phosphotransferase System Is Essential for Chitinase Production by *Serratia marcescens* 2170. *J Bacteriology* **185**, 1776-1782.

- Uchiyama, T., Katouno, F., Nikaidou, N., Nonaka, T., Sugiyama, J., und Watanabe, T. (2001). Roles of the exposed aromatic residues in crystalline chitin hydrolysis by chitinase A from *Serratia marcescens* 2170. *J Biol Chem* **276**(44), 41343-9.
- Ulhoa, C.J., und Peberdy, J.F. (1991). Regulation of chitinase synthesis in *Trichoderma harzianum*. *J Gen Microbiol* **137**, 2163-2169.
- Vaaje-Kolstad, G., Horn, S.J., Sørle, M., und Eijsink, V.G.H. (2013). The chitinolytic machinery of *Serratia marcescens*- a model system for enzymatic degradation of recalcitrant polysaccharides. *FEBS Journal* **280**, 3028-3049.
- Vaaje-Kolstad, G., Horn, S.J., van Aalten, D.M.F., Synstad, B., und Eijsink, V.G.H. (2005). The Non-catalytic Chitin-binding Protein CBP21 from *Serratia marcescens* Is Essential for Chitin Degradation. *J Biol Chem* **280**, 28492-28497.
- Vaaje-Kolstad, G., Westereng, B., Horn, S.J., Liu, Z., Zhai, H., Sorlie, M., und Eijsink, V.G. (2010). An oxidative enzyme boosting the enzymatic conversion of recalcitrant polysaccharides. *Science* **330**, 219-222.
- Vaaje-Kolstad, G., Bøhle, L.A., Gåseidnes, S., Dalhus, B., Bjørås, M., Mathiesen, G., und Eijsink, V.G.H. (2012). Characterization of the Chitinolytic Machinery of *Enterococcus faecalis* V583 and High-Resolution Structure of Its Oxidative CBM33 Enzyme. *J Mol Biol* **416**, 239-254.
- van Aalten, D.M., Synstad, B., Brurberg, M.B., Hough, E., Riise, B.W., Eijsink, V.G., und Wierenga, R.K. (2001). Structure of a two-domain chitotriosidase from *Serratia marcescens* at 1.9-Å resolution. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 5842-5847.
- van den Burg, H.A., Harrison, S.J., Joosten, M.H., Vervoort, J., und de Wit, P.J. (2006). *Cladosporium fulvum* Avr4 protects fungal cell walls against hydrolysis by plant chitinases accumulating during infection. *Mol Plant Microbe Interact* **19**, 1420-1430.
- van Esse, H.P., Bolton, M.D., Stergiopoulos, I., de Wit, P.J.G.M., und Thomma, B.P.H.J. (2007). The chitin-binding *Cladosporium fulvum* effector protein Avr4 is a virulence factor. *Mol Plant Microbe Interact* **20**, 1092-1101.
- van Munster, J.M., Nitsche, B.M., Krijgheld, P., van Wijk, A., Dijkhuizen, L., Wosten, H.A., Ram, A.F., und van der Maarel, M.J.E.C. (2013). Chitinases CtcB and CfcI modify the cell wall in sporulating aerial mycelium of *Aspergillus niger*. *Microbiology* **159**, 1853-1867.
- Verner, K. (1993). Co-Translational Protein Import into Mitochondria - an Alternative View. *Trends in Biochemical Sciences* **18**, 366-371.
- Verstrepen, K.J., und Klis, F.M. (2006). Flocculation, adhesion and biofilm formation in Yeasts. *Mol Microbiology* **60** (1), 5-15.
- Verstrepen, K.J., Derdelinckx, G., Verachtert, H., and Delvaux, F.R. (2003) Yeast flocculation: what brewers should know. *Appl Microbiol Biotechnol* **61**, 197-205.
- Vevea, J.D., Swayne, T.C., Boldogh, I.R., und Pon, L.A. (2014). Inheritance of the fittest mitochondria in yeast. *Trends in Cell Biology* **24**, 53-60.
- Vollmeister, E., Haag, C., Zarnack, K., Baumann, S., König, J., Mannhaupt, G., und Feldbrügge, M. (2009). Tandem KH domains of Khd4 recognize AUACCC and are essential for regulation of morphology as well as pathogenicity in *Ustilago maydis*. *RNA* **15**(12), 2206-2218.

- Vollmeister, E., Schipper, K., Baumann, S., Haag, C., Pohlmann, T., Stock, J., und Feldbrügge, M. (2012) Fungal development of the plant pathogen *Ustilago maydis*. *FEMS Microbiology Reviews* **36**, 59-77.
- Vyas, P., und Deshpande, M.V. (1989). Chitinase Production by *Myrothecium verrucaria* and Its Significance for Fungal Mycelia Degradation. *J Gen Appl Microbiol* **35**, 343-350.
- Wan, J., Zang, X., Neece, D., Ramonell, K.M., Clough, S., Kim, S., Stacey, M.G., und Stacey, G. (2008). A LysM Receptor-Like Kinase Plays a Critical Role in Chitin Signaling and Fungal Resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **20**(2), 471-481.
- Wang, J., Holden, D.W., und Leong, S.A. (1988). Gene transfer system for the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**, 865-869.
- Walter, P., und Lingappa, V.R. (1986) Mechanism of Protein Translocation Across the Endoplasmic Reticulum Membrane. *Ann Rev Cell Biol* **2**, 499-516.
- Watanabe, Y., Perrino, B.A., Chang, B.H., und Soderling, T.R. (1995). Identification in the calcineurin A subunit of the domain that binds the regulatory B subunit. *J Biol Chem* **270**, 456-460.
- Watanabe, T., Ariga, Y., Sato, U., Toratani, T., Hashimoto, M., Nikaidou, N., Kezuka, Y., Nonaka, T., Sugiyama, J. (2003). Aromatic residues within the substrate-binding cleft of *Bacillus circulans* chitinase A1 are essential for hydrolysis of crystalline chitin. *Biochem J* **376**, 237-244.
- Weber, I., Abmann, D., Thines, E., Steinberg, G. (2006). Polar Localizing Class V Myosin Chitin Synthases Are Essential during Early Plant Infection in the Plant Pathogenic Fungus *Ustilago maydis*. *The Plant Cell Online* **18**, 225-242.
- 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.
- Wegehingel, S., Zehe, C., und Nickel, W. (2008). Rerouting of fibroblast growth factor 2 to the classical secretory pathway results in post-translational modifications that block binding to heparan sulfate proteoglycans. *FEBS Letters* **582**, 2387-2392.
- Weihuang, Y., Chang, S.-J., Harn, H.I.C., Huang, H.-T., Lin, H.-H., Shen, M.-R., Tang, M.-J., und Chiu, W.-T. (2015). Mechanosensitive Store-Operated Calcium Entry Regulates the Formation of Cell Polarity. *Journal Cell Phys* DOI: 10.1002/jcp.24936
- Weinzierl, G., Leveleki, L., Hassel, A., Kost, G., Wanner, G., und Bolker, M. (2002). Regulation of cell separation in the dimorphic fungus *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol* **45**, 219-231.
- White, S., McIntyre, M., Berry, D.R., und McNeil, B. (2002). The autolysis of industrial filamentous fungi. *Crit Rev Biotechnol* **22**, 1-14.
- Williams, C.C., Jan, C.H., und Weissman, J.S. (2014). Targeting and plasticity of mitochondrial proteins revealed by proximity-specific ribosome profiling. *Science* **346**, 748-751.
- Wittig, I., Braun, H.-P., und Schägger, H. (2006). Blue native PAGE. *Nature Protocols* **1**, 418-428.

- Wooster, R., Bignell, G., Lancaster, J., Swift, S., Seal, S., Mangion, J., Collins, N., Gregory, S., Gumbs, C., und Micklem, G. (1995). Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. *Nature* **378**, 789-792.
- Wösten, H.A., Bohlmann, R., Eckerskorn, C., Lottspeich, F., Bolker, M., und Kahmann, R. (1996). A novel class of small amphipathic peptides affect aerial hyphal growth and surface hydrophobicity in *Ustilago maydis*. *EMBO J* **15**, 4274-4281.
- Yang, J., Gan, Z., Tao, N., Mi, Q., Liang, L., Sun, Y., Guo, Y., Huang, X., Zou, C., Meng, Z., und Zhang, K.Q. (2010). Crystal structure and mutagenesis analysis of chitinase CrChi1 from the nematophagous fungus *Clonostachys rosea* in complex with the inhibitor caffeine. *Microbiology*. **156**, 3566-3574
- Yang, Y., Gu, X., Tan, R., Hu, W., Wang, X., Zhang, P., und Zhng, T. (2004) Fabrication and properties of a porous chitin/chitosan conduit for nerve regeneration. *Biotechnology Letters* **26**:1793-1797.
- Yang, J., Yan, R., Roy, A., Xu, D., Poisson, J., Zhang, Y. (2015). The I-TASSER Suite: Protein structure and function prediction. *Nature Methods* **12**, 7-8.
- Yamazaki, H., Tanaka, A., Kaneko, J.-i., Ohta, A., und Horiuchi, H. (2008). *Aspergillus nidulans* ChiA is a glykosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored chitinase specifically localized at polarized growth sites. *Fun Genet Biol* **45**, 963-972.
- Yamazaki, H., Yamazaki, D., Takaya, N., Takagi, M., Ohta, A., und Horiuchi, H. (2007). A chitinase gene, chiB, involved in the autolytic process of *Aspergillus nidulans*. *Current Genetics* **51**, 89-98.
- Zakariassen, H., Aam, B.B., Horn, S.J., Varum, K.M., Sorlie, M., und Eijsink, V.G.H. (2009). Aromatic Residues in the Catalytic Center of Chitinase A from *Serratia marcescens* Affect Processivity, Enzyme Activity, and Biomass Converting Efficiency. *J Biol Chem* **284**, 10610-10617.
- Zhang, L., Kars, I., Essenstam, B., Liebrund, T.W.H., Wagemakers, L., Elberse, J., Tagkalaki, P., Tjoitang, D., van den Ackerveken, G., und van Kan, J.A.L. (2014). Fungal Endopolygalakturonases Are Recognized as Microbe-Associated Molecular Patterns by the Arabidopsis Receptor-Like Protein RESPONSIVENESS TO BOTRYTIS POLYGALAKTURONASES1. *Plant Physiology* **164**, 352-364.
- Zhang, Y. (2008). I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics* **9**, 40.
- Zhou, C., Slaughter, Brian D., Unruh, Jay R., Guo, F., Yu, Z., Mickey, K., Narkar, A., Ross, Rhonda T., McClain, M., und Li, R. (2014). Organelle-Based Aggregation and Retention of Damaged Proteins in Asymmetrically Dividing Cells. *Cell* **159**, 530-542.

6. Anhang

Auf dem beiliegenden Datenträger befindet sich eine elektronische Version der vorliegenden Arbeit.

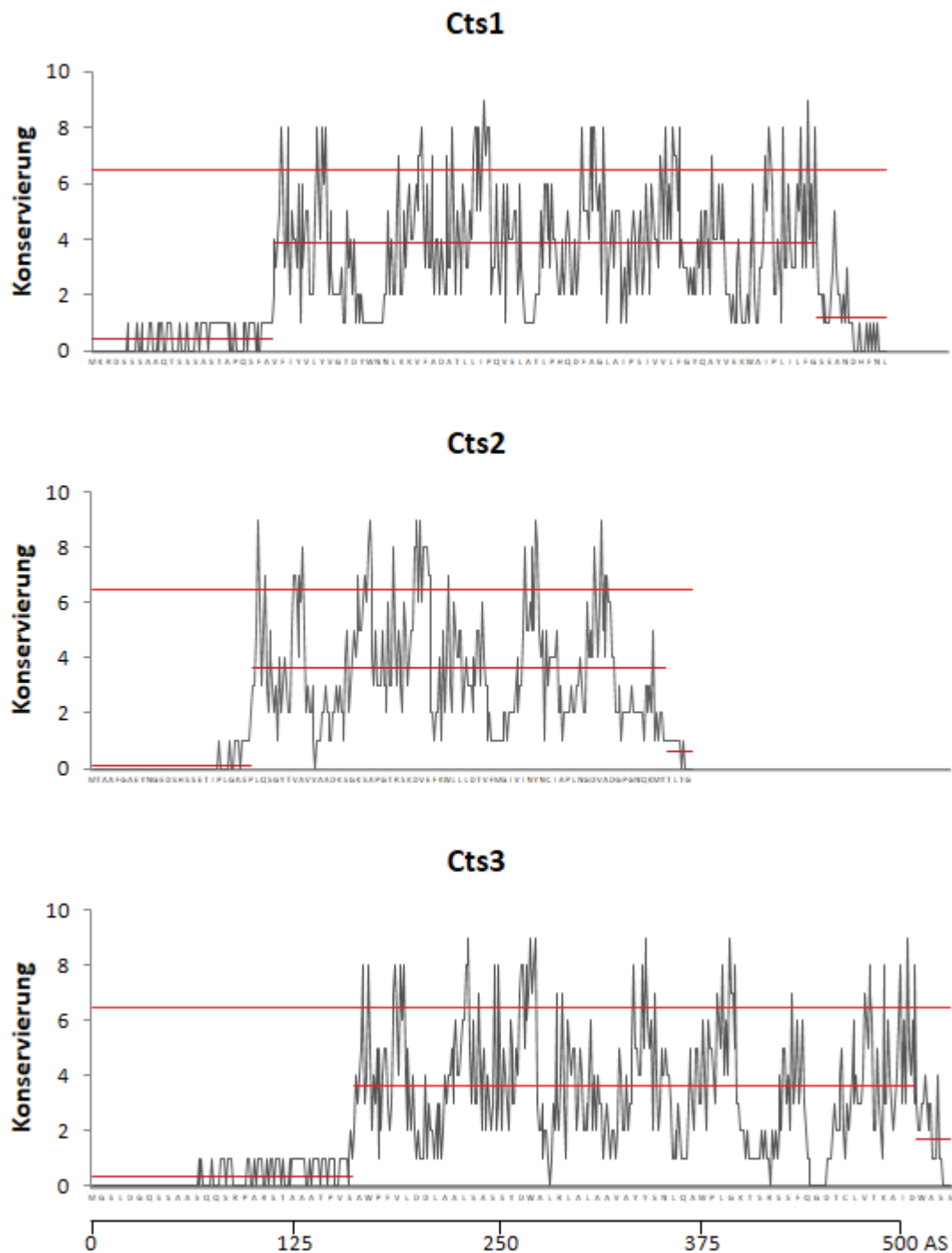


Abb. 6.1: Hochkonservierte Aminosäuren treten innerhalb der GH18-Domänen in kleinen Clustern auf. Co-Factor Analyse zur Identifizierung evolutionär hochkonservierter Aminosäuren. Alle *U. maydis* Chitinasen weisen schwach konservierte N- und C-Termini auf. Der mittlere Grad der Konservierung (rote Linien) steigt innerhalb der katalytischen Domäne (mittlere Linie) stark an. Hochkonservierte Aminosäuren (≥ 7 , obere Linie) treten in kleinen Clustern verstreut über die katalytische Domäne auf.

```

UmCts1GH18 1 PRVNLAYFTNWGIYGRKYSFDVPTCNLTHVLYAFADVNPDTGBCFLTDLWADEQIHYTGDSWNDTGNNLYGNFKQFLLI
SrCts1GH18 1 PRVNLAYFTNWGIYGRKYSFDVPTCNLTHVLYAFADVNPDTGBCILTDLWADEQLHYTGDSWNDAGNNLYGNFKQFLLI
UhCts1GH18 1 PRVNLAYFTNWGIYGRKYGFNDVPHCSLTHVLYAFADVNEETGDCFLTDLWADEQIHYAGDSWNDRGNNLYGNFKQFLLI
CrChiBGH18 1 --INAVYFTNWGIYGRNFQPADLQASKILHVLYSFMNLRVD-GTVYSGLTYADLEKHYSDDSWNDIGTNAYGCVKQLYKIL

UmCts1GH18 81 KKKNRALKMLSVGGWTFGPHFAPMAADAKKRAKFVSTAITILENDGLDGIDIDWEYPSDSTQAANFVLLKELRAGLTA
SrCts1GH18 81 KKKNRALKMLSVGGWTFGPHFAPMAADAKKRAKFVSSAITILENDGLDGIDIDWEYPANDAQAANFVLLKELRAGLTA
UhCts1GH18 81 KKKNRALKMLSIGGWTFGPHFAPMAADPKKRAKFVTTAIAILENDGLDGLDIDWEYPANAAQASNETLLKELRAGLTA
CrChiBGH18 78 KKANRSLKIMLSIGGWTFSTNFPAAASTEATRATAAKTAVEFMKDWGFDGIDIDWEYPASETDANNMVLLLQRFVQELDS

UmCts1GH18 161 HQAKKNETNPYLLSIAAPCGEDHYKVLQVAKMDQYLDFWNLMAYDFAGSWSALTGHQANLW----NIKGAPPSADDSINY
SrCts1GH18 161 HQKKKNDMVPYLLSIAAPCGEDHYKVLQVAKMDPYLDFWNLMAYDFAGSWSTVTGHQANLW----NIKGAPPSADDAVNY
UhCts1GH18 161 HAAKRRDMVPYLLSIAAPCG--EQMKILEVAKMDPYLDFWNLMAYDFAGSWSAVTGHQANLW----NIKGKVPSADNAVNF
CrChiBGH18 158 YSATYANGYHFQLSIAAPAGPSHYNVKLKQLGSVLDNINLMAYDYAGSWDSVSGHOTNLYPSTSNPSSTPESTKAAVDA

UmCts1GH18 237 YIGQGVVSHKLVLGIPLYGRGFENTDGPQQPYRGTGQGTWEAGNWDYKFLPVKGAKEMINTKIAASWSYDSAKREFISYD
SrCts1GH18 237 YICNGVVSHKLVLGIPLYGRGFENTDGPQQPYKGTGQGTWEAGNWDYKFLPVKGAKEMINTKIAASWSYDSKREFISYD
UhCts1GH18 236 YISNGVVSHKLVLGIPLYGRGFENTNGPQQPYNGTGQGTWEAGNWDYKFLPVKGAKEMINTKIGASWSYDSAKREFISYD
CrChiBGH18 238 YIAAGVPASKIILGMEITYGRAFVGTGDPGRPEYSTIGEGSWESGTWDYKVLPKAGATVITDSAAGATYSYDSSRTMISYD

UmCts1GH18 317 TPQNVLLKCKQYIRNKRLRGAMFWELSGD
SrCts1GH18 317 TPQNVLLKCAYIKQKRLRGAMFWELSGD
UhCts1GH18 316 TPENVLLKCONYIKQKRLRGAMFWELSGD
CrChiBGH18 318 TQDMVRTKVSIAKGLGIGSMFWERSAD

```

Abb. 6.2: Die Aminosäuresequenz der katalytischen Domäne von Cts1 ist hochkonserviert. Multiples Sequenzalignment der GH18-Domäne aus UmCts1 mit den Chitinasen SrCts1 und UhCts1, aus den nahen Verwandten *S. reilianum* und *U. hordei*, sowie CrChi1 (CrChiB) des nematophagen Pilzes *C. rosea*, die als Vorlage für die Modellierung verwendet wurde. Hochkonservierte Bereiche (> 70%) sind schwarz markiert. Die katalytische Triade Dx₁Dx₂E ist in rot markiert. Das Konsensusmotiv (Abb. 2.1) ist durch einen schwarzen Balken gekennzeichnet.

UmCts2GH18	1	PRFVLY-GDQDVASQSYGAPPYWNITGFNVFNLAFTVKF-GVADNAQKF
SrCts2GH18	1	PRFVLY-GDQDVAGQSYGAPPYWNITGFNVFNLAFTVKY-GVADNAAKF
UhCts2GH18	1	PRFVLY-GDEDVASQSYGAPPYSNITGFNVFNLAFTVKF-GVADNAAKW
OfCts2GH18	1	ARVVCYFSNWAIVYRPGVGR---YGLIEDIPVDMCTHIYSFTIGVTEDTQQV
UmCts2GH18	49	AA---KSDADKKWFKS---RYAGAGMKLMVSVFGATDTPQSMGKNATAL
SrCts2GH18	49	AA---KSDADKKWFKS---RYAGAGMKLMVSVFGATDTPQSLGKDPTAL
UhCts2GH18	49	AA---KSDSDKKWFKS---RYAGAGMKLMVSVFGATDTPQSMGKNPVQL
OfCts2GH18	48	LIIDPELDVDKNGFKNFTSLRSKHPCGVKFTVAVGGAEGGSKYSKMVAAK
UmCts2GH18	92	G-----RTIASFVKKNGLDGVDVDYEEMDLFAQGKS---SEWLIETLRS
SrCts2GH18	92	G-----KTIAAFVKRNGLDGVDVDYEEMDLFAQGKS---ANWLIALTTS
UhCts2GH18	92	G-----KTIAAFVKKHGLDGVDVDYEEMDLFAQGKS---ADWLIKLTLS
OfCts2GH18	98	STRMAFVRSVVDFLNKYNFDGLDLDEWEYPGAADRGGSFSDKDKFLYLIVQE
UmCts2GH18	133	LRNQL--PSEDYIITHA-PVAPWFNAQMY--PN-----
SrCts2GH18	133	LRAEL--PAF-YIITHA-PVAPWFNAQMY--PE-----
UhCts2GH18	133	LRQEL--PSEDYIITHA-PVMPWWSVAQY--PQ-----
OfCts2GH18	148	LRRAFIREGKGWEITAAVETLANFRLMEGYHVPELCQELDAIHVMSYDLRG
UmCts2GH18	161	---GYAYIHS-----QVGDLLIDWYN-----VQF
SrCts2GH18	160	---GYAKIHS-----AVGNLLIDWYN-----VQF
UhCts2GH18	161	---GYTRIHQ-----EVGDLLIDWYN-----LQA
OfCts2GH18	198	NWAGEADVHSPLYKRPHDQWAYEKLNVNDGLQLWEDKGCPTNKLVVGIPF
UmCts2GH18	181	YNQ-Q-----N--YNTCDQLIWNAA--DNFPETSLFEINKYAGVPLD
SrCts2GH18	180	YNQGS-----T--YDSCDNLINWAG--NDFPETSVEINKYAGVPLD
UhCts2GH18	181	YNQ-G-----DNCYTTCGLIWDSC--DYFPOTSLFEIHKSSGVPLE
OfCts2GH18	248	YGR-SFTLSSGNN--YNLGTIYNKEAGGDPAPYTNATGFWAYYEI-CT
UmCts2GH18	218	KLIVGKPAWQSDADDGFMKPSVLGGCL-----NIAVQNGW---KG--
SrCts2GH18	218	KIIVGKPAIESDADNGFVRPSVLGACL-----NIVGQNGW---KG--
UhCts2GH18	220	KLIVGKPAVESDAANGFMKPSVLGGCL-----NIGVQNGW---NA--
OfCts2GH18	294	EVDTADSKWTKKWDEHGKCEYAYKCTQWVGIEDPRSVEIKMNWIKEKGYL
UmCts2GH18	255	GAMFWEYYPH--
SrCts2GH18	255	GVMFWEYYPH--
UhCts2GH18	257	GAMFWQYPH--
OfCts2GH18	344	GAMFWAIDMD

Abb. 6.3: Sequenzalignment der GH18-Domäne von Cts2. Multiples Sequenzalignment der GH18-Domäne aus UmCts2 mit den homologen Chitinasen SrCts2 und UhCts2 aus den nahen Verwandten *S. reilianum* und *U. hordei*, sowie die strukturanaloge Chitinase OfCts2 aus dem Maiszünsler *Ostrinia furnacalis*, die als Vorlage für die Modellierung verwendet wurde. Hochkonservierte Bereiche (> 70%) sind schwarz markiert.

UmCts3GH18	1	KLMAGYWADWTASTLPATSIDFSKFDI-----VNYAFA-----IPTAEFDLWIPTDPSGNLLRGFVK
SrCts3GH18	1	KTMAAYWPDWTASTLPPTSIDFSKFDI-----INYAFA-----IPTADFSLSIPTDPSGGTLRRFVQ
UhCts3GH18	1	KIMAGYWADWTSSTFPVTSIDYTKFDN-----INYAFA-----IPTSNLDSL IPTDPSGNLLRRFVK
HsAmc1GH18	1	YQLTCYFTNW-AQYRPLGLG-RFMPDDINPCLCTHLIYAFAGMQNNEITTIEWN-DVTLYQAFNGLKN---
UmCts3GH18	58	AAKAGNAKPMLSLGGWG-GSTYFSPAVRTAASRATFISNIVKTYNQYGLDGIDLDWEYPGQACSGNLLDA
SrCts3GH18	58	ACKAGDTKAVLSLGGWG-GSTYFSPAVRTAASRATFIANIVRTYNTYGLDGIDLDWEYPGQTGAGNQDLDA
UhCts3GH18	58	ACKAGNTKALLSIGWG-GSTYFSPAVRTASARATLIGNITIKYYNTYSLDGIDLDWEYPGQVAGNHLDP
HsAmc1GH18	65	--KNSQLKTLILAIGWNFGTAPFTAMVSTPENRQTEITSVIKFLRQYEFQGLDFDWEYPGSRGS----PP
UmCts3GH18	127	SDTRNYQTFTELRAALPKGA-----LITGAVAHPTWMASSGQPVASVARAAAMDYIMIMNYDVWG
SrCts3GH18	127	SDTANFQTFELRAALPREA-----LITAAVGFTPWIGSSGAPVGSVARAAAGVLDYIMIMNYDVWG
UhCts3GH18	127	SDTANFQTFELQLRAALPQGA-----LITGAVSHTPWRASSGHPVASVARAAAMDYIMIMNYDVWG
HsAmc1GH18	129	QDKHLFTVLVQEMREAFEQBAKQINKPRLMVTAAVAAG---ISNIQSGYEIPQLSQYLDYIHVMITYDLHG
UmCts3GH18	189	S-SSNPGPNAPLANLCGNSTQPRANAAAGV----KAWSAAGMPRKILLGIPAYG--YINTSKKQTLRTR
SrCts3GH18	189	S-SSNPGPNAPLANLCGNSTQPGANAAAGV----RAWSAAGMPRKILLGIPAYG--YISQSSKQTLRTR
UhCts3GH18	189	S-SANPGPNAPLANLCGNSTQPOASAAAGV----KAWSAAGMPRKILLGIPAYG--YINTSSKKTILK--
HsAmc1GH18	196	SWEGYTGENSPLYKY---PTDTGSNAYLNVYVMNYWKDNGAPAEKLIVGFETYGHNFILSNPSNT----
UmCts3GH18	252	SRSRSSSSQRRAAKLTSSDGSTSSGQINFSTLVSQGALKLGADGLFDGAGGETKYWDDCSDTPYLS DASR
SrCts3GH18	252	SPA-----KRAVKLTSSDGSSNSGQINFSSLVSQGALKLGKDGLYDATGGFTKYWDDCSDTPYLS DGTR
UhCts3GH18	250	-----QKRAVQLTSMQASTSSGQISFSTLVNQGALKLGAEALYHGSGGWVKYWDDCSDTPFLSDGNK
HsAmc1GH18	259	GIGAPTSAGAPAGPYAKESGIWAYYEI--CTFLKNGA-----TQGWDAPEVPPYAYQGNV
UmCts3GH18	322	VITYDDTSSIFDKGAFASAAAGIAGTSMWSLDGD
SrCts3GH18	316	VVTYDDTSSIFDKGAFASAAAGIGGISMWSLDGD
UhCts3GH18	312	VVTYDDTSSIYDKGAFVKGARIGGVSMWSLDGD
HsAmc1GH18	312	WVGVDNIKSFEDIKAQWLKHNKFGGAMVWAIDLD

Abb. 6.4: Sequenzalignment der GH18-Domäne von Cts3. Multiples Sequenzalignment der GH18-Domäne aus UmCts3 mit den homologen Chitinasen SrCts3 und UhCts3 aus den nahen Verwandten *S. reilianum* und *U. hordei*, sowie die strukturanaloge Chitinase HsAmc1 aus *Homo sapiens*, die als Vorlage für die Modellierung verwendet wurde. Hochkonservierte Bereiche (> 70%) sind schwarz markiert.

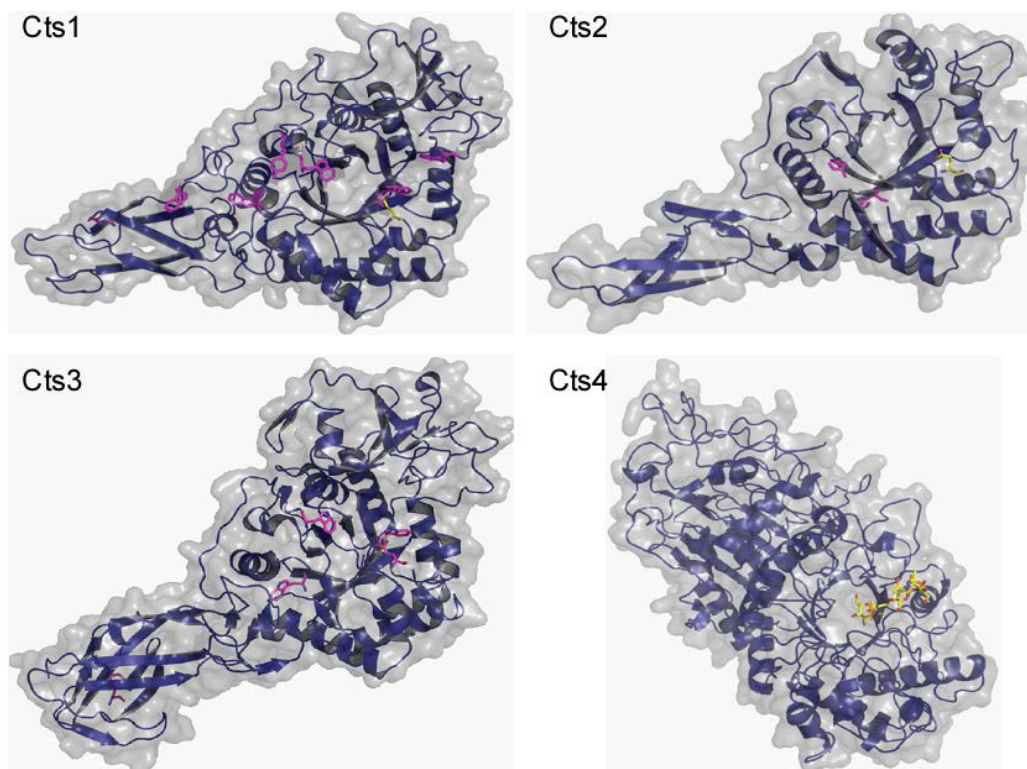


Abb. 6.5: Die dreidimensionale Proteinstruktur der chitinolytischen Enzyme aus *U. maydis* ist konserviert. Modelle der putativen Proteinstruktur chitinolytischer Enzyme aus *U. maydis*. Die Modelle wurden mittels I-Tasser erstellt und mittels Coot und EMAX anhand experimentell ermittelter Strukturvorlagen manuell nachbearbeitet. Die Visualisierung der Strukturen erfolgte mittels PyMol. Blau: Sekundärstrukturmodell in Cartoon Darstellung; Magenta: Konservierte, aromatische Aminosäuren;

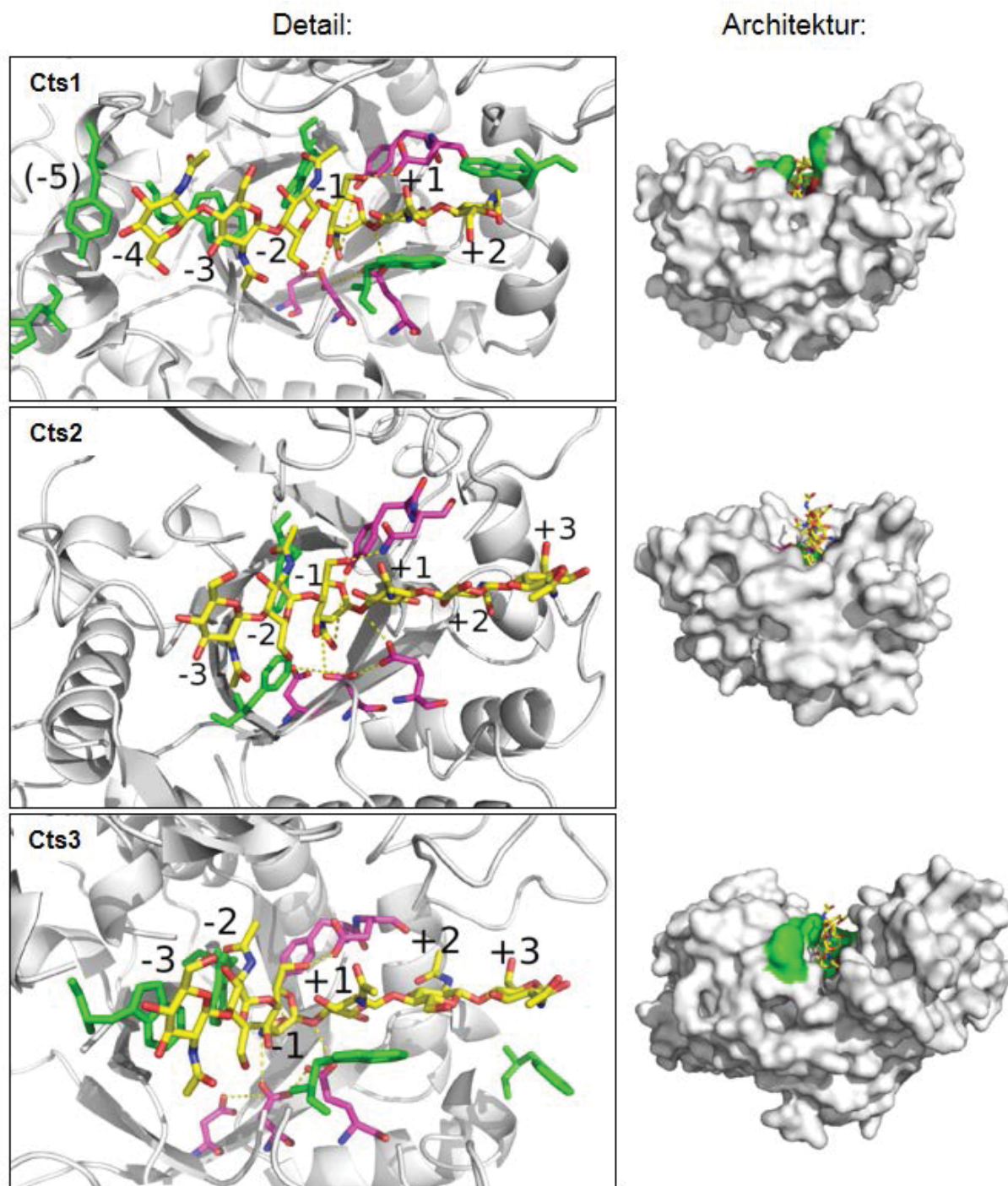


Abb. 6.6: Aromatische Aminosäuren in der Substratbindestelle von *U. maydis* Chitinasen. Strukturmodelle der Substratbindestellen von Cts1, Cts2 und Cts3. Links: Detaillierte Darstellung der Substratbindestelle und des aktiven Zentrums. Grün: Aromatische Aminosäuren; Gelb: Chitohexaose; Magenta: Katalytisch aktive Aminosäuren; Gestrichelte Linie: Mögliche Interaktionen während der Hydrolyse. In Cts1 und Cts3 sind die aromatischen Aminosäuren so angeordnet, dass eine starke Bindung des Substrats ermöglicht wird. Rechts: Vergrößerte Darstellung der Architektur der Substratbindestelle (aus Abb. 2.3). Cts1 und Cts3 besitzen tiefe, Tunnel-artige Bindestellen, während Cts2 eine flache, offene Bindestelle aufweist.

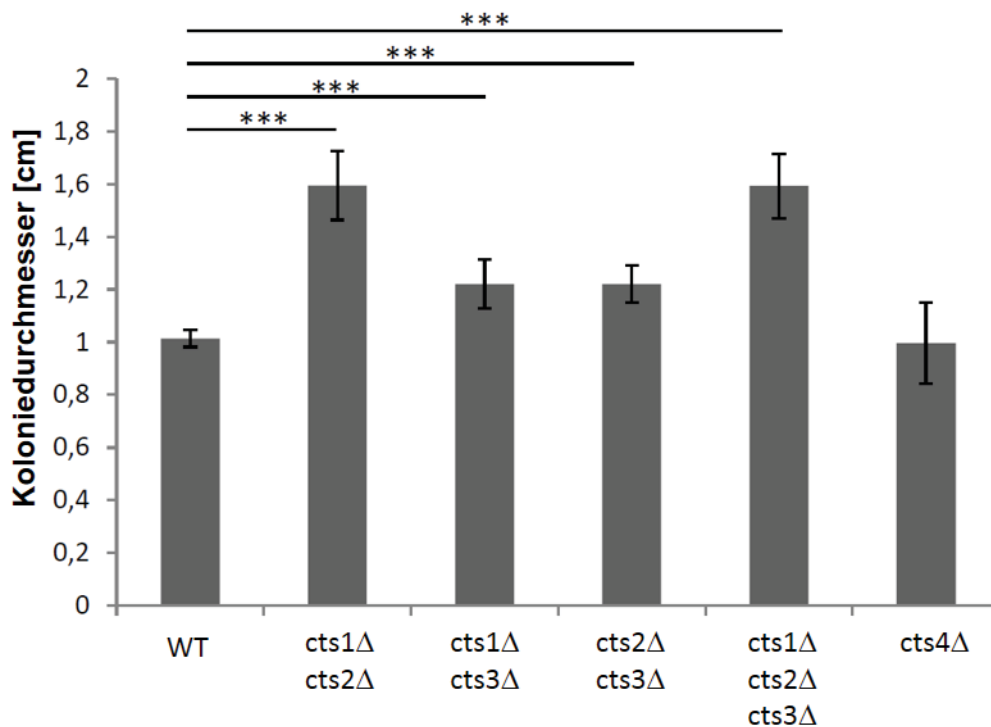
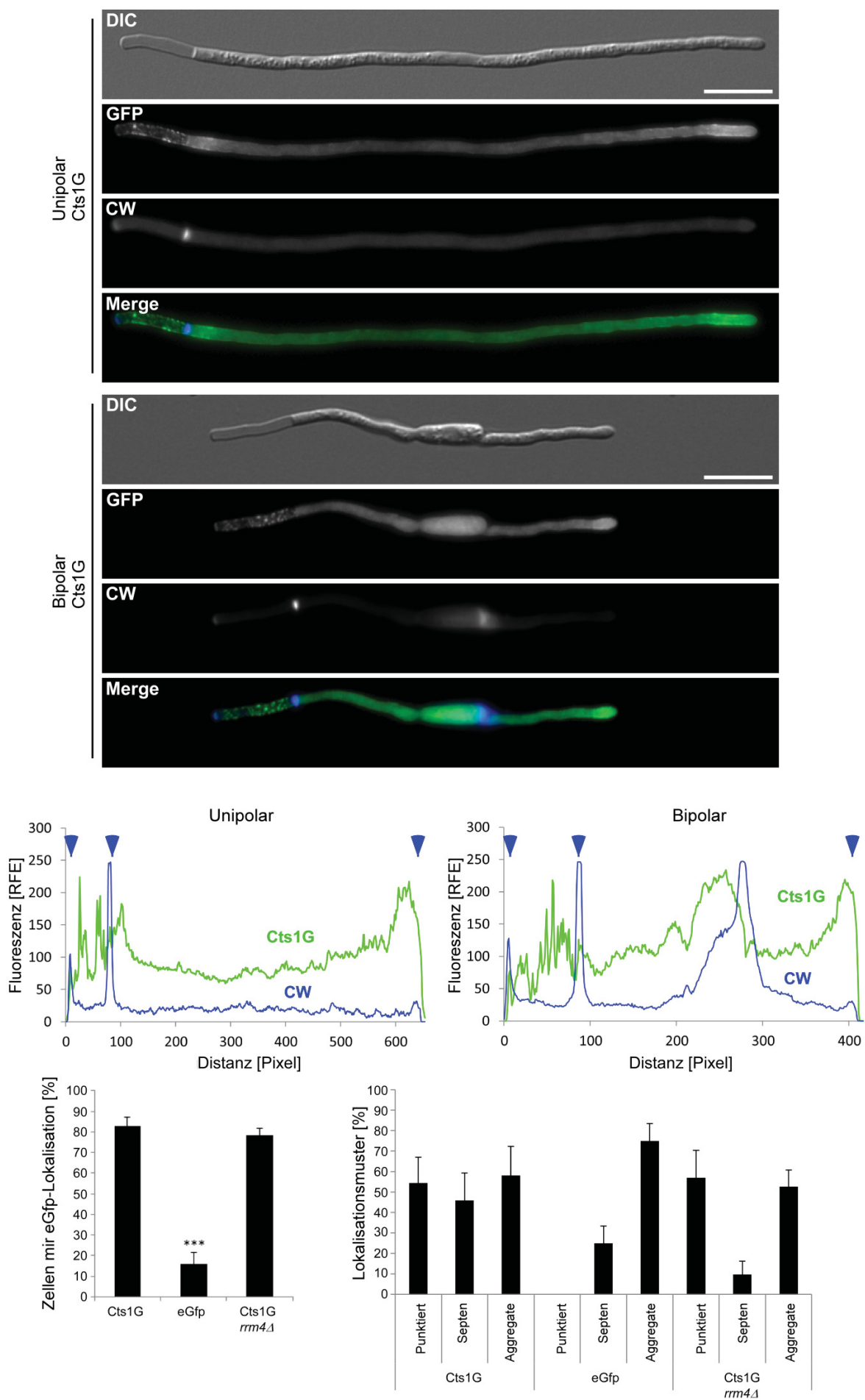


Abb. 6.7: Analyse des Koloniedurchmessers von Chitinase-Deletionsmutanten. Graphische Darstellung des Koloniedurchmessers verschiedener Chitinase-Deletionsmutanten auf CM-Vollmedium. Der Koloniedurchmesser von Stämmen, denen Cts1 oder Cts2 fehlt ist leicht erhöht. Mutanten, welchen sowohl Cts1 als auch Cts2 fehlen weisen einen deutlich größeren Durchmesser auf. Die Deletion von *cts4* hat keinen Einfluss auf den Durchmesser der Kolonien. Fehlerbalken: Standardabweichung aus sechs gemessenen Kolonien aus drei unabhängigen Experimenten. . ***, $p < 0,0005$ (T-Test).

Abb. 6.8 (nächste Seite): Die Lokalisation von Cts1G ist nicht Rrm4-abhängig. (A) Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Cts1G-Lokalisation. Cts1G lokalisiert in punktiertem Muster im ersten leeren Segment. Die Lokalisation ähnelt der aus AB33 (Abb. 2.16). Derartige Lokalisationsmuster sind im Kontrollstamm AB33egfp nicht zu erkennen. Blau: CW; grün: Cts1G. Größenstandard: 10 μm . (B) Linescan-Analyse der in (A) dargestellten Filamente zur Verdeutlichung der Cts1G-Lokalisation im Filament. Cts1G zeigt einen graduellen Konzentrationsanstieg zur Hyphenspitze. Multiple Signalmaxima zwischen dem ersten und zweiten Septum verdeutlichen das punktierte Lokalisationsmuster. Blau: CW; grün: Cts1G. Blaue Pfeilspitzen: Septen und Hyphenspitze. (C) Quantifizierung der Cts1G-Lokalisation. Graph aus Abb. 2.16 erweitert um AB33rrm4Δ. Die Häufigkeit der punktierten Cts1G-Lokalisation im ersten leeren Abschnitt ist mit AB33 vergleichbar. Fehlerbalken: Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten. ***, $p < 0,0005$ (T-Test).



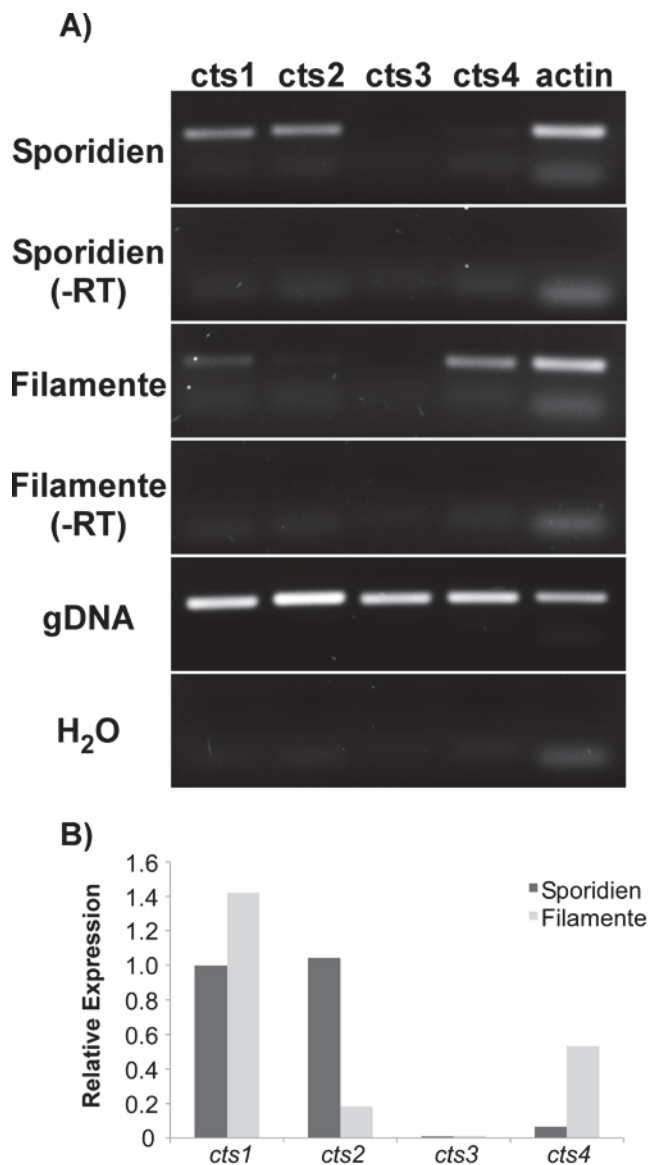


Abb. 6.9: Gen-Expressionsanalyse chitinolytischer Enzyme in *U. maydis*. **(A)** Semi-quantitative RT-PCR der Chitinase-Gene in Sporidien und Filamenten. *cts1* und *cts2* werden in AB33 Sporidien gleich stark exprimiert. In Filamenten wird *cts2* drastisch herunter reguliert. Sowohl in Sporidien als auch in Filamenten ist keine *cts3*-Expression detektierbar. *Cts4* wird in Sporidien auf einem basalen Niveau exprimiert und wird in Filamenten hoch reguliert. *actin* mRNA diente mit seiner konstitutiven Expression als endogene Kontrolle. Minus Reverse-Transkriptase Kontrollen (-RT) beider Stadien wurden verwendet, um mögliche Kontaminationen mit genomischer DNA (gDNA) auszuschließen. gDNA wurde als Template eingesetzt, um die Primer-Effizienz in der PCR-Reaktion zu überprüfen. H₂O diente als Negativ-Kontrolle für die PCR-Reaktion. **(B)** Microarray-Analyse der Transkriptions-Niveaus der Chitinase-Gene (aus Heimel *et al.*, 2010). Die Transkriptomanalyse zeigt ähnliche Expressionsmuster wie die semi-quantitative RT-PCR.

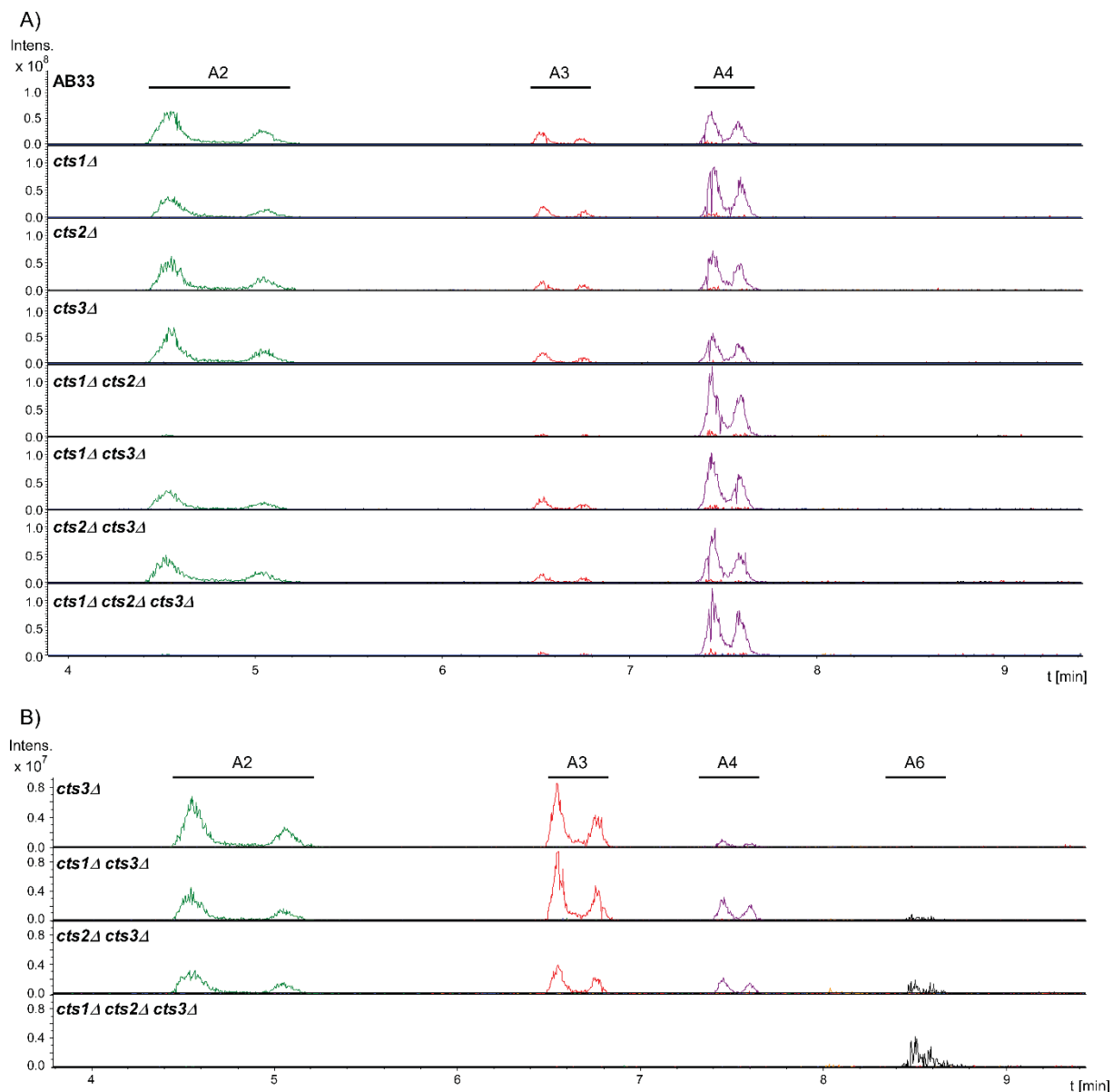


Abb. 6.10: Analyse der Hydrolyseprodukte verschiedener Chitinase-Deletionsmutanten. Extrahierte Ionen-Chromatogramme (EIC) der Hydrolyseprodukte aus der Inkubation von CHOS mit 5 μ g *U. maydis* Gesamtproteinextrakten. Die Reaktionsprodukte wurden mittels HILIC-ELSD-ESI-MSⁿ analysiert. (GlcNAc)₂ (A2; m/z 425,2; grün), (GlcNAc)₃ (A3; m/z 628,3; rot), (GlcNAc)₄ (A4; m/z 831,4; violett) und (GlcNAc)₆ (A6; m/z 619,3; schwarz). **(A)** Substrat: (GlcNAc)₄ (A4). **(B)** Substrat: (GlcNAc)₆ (A6); Ergänzend zu Abb. 2.28.

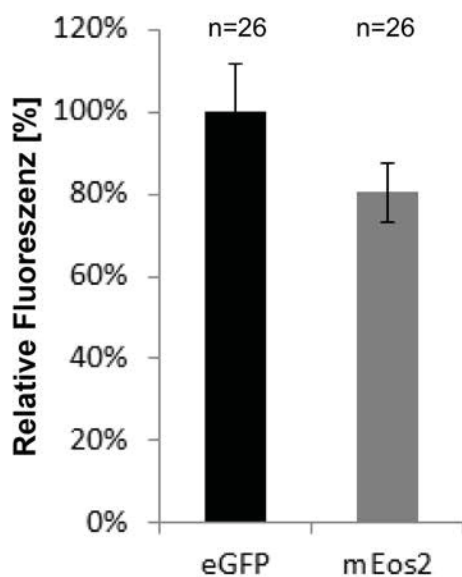
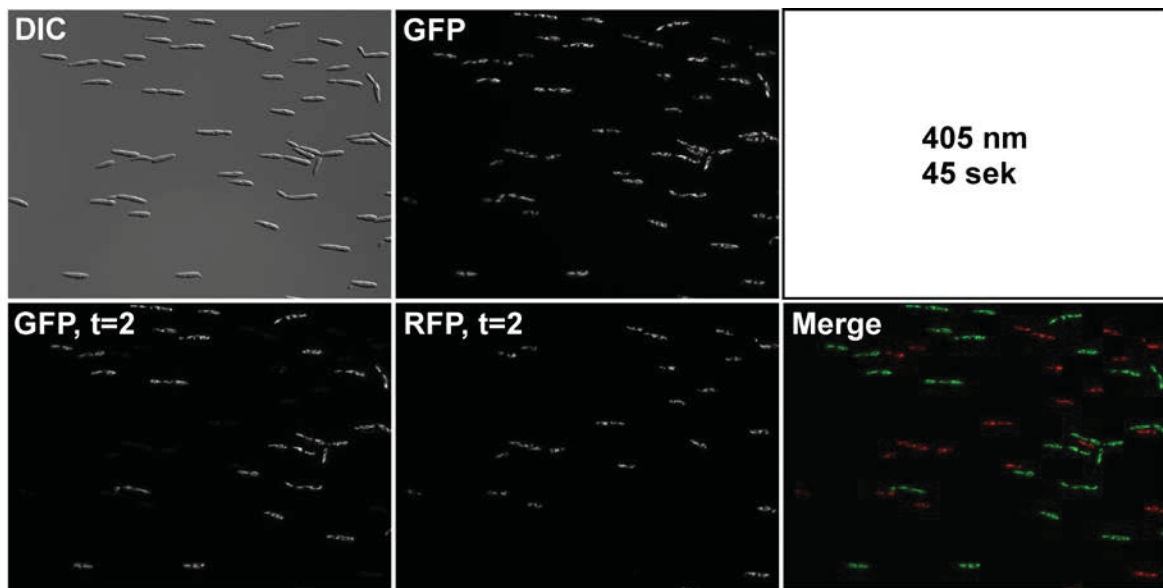


Abb. 6.13: Vergleich der Fluoreszenzintensität von eGfp und mEos2. Zur Bestimmung der Startintensität von mEos2 relativ zu eGfp, wurden Mischkulturen aus AB33Potef:eGfp und AB33Potef:mEos2 im Verhältniss 1:1 ($OD_{600} = 1,0$) hergestellt. Für die fluoreszenzmikroskopische Anlyse der Startintensität wurde zunächst ein Bild im Gfp-Kanal erstellt, welches für die Intensitätsmessung verwendet wurde. Zur Unterscheidung beider Stämme folgte anschließend eine Photokonversion durch 45 s. Belichtung bei 405 nm mit einer HXP-Lampe. Anschließend wurde sowohl ein Gfp- als auch ein Rfp-Bild aufgenommen. Zellen die eGfp exprimieren sind weiterhin im Gfp-Kanal zu erkennen, wohingegen Zellen, die mEos2 exprimieren lediglich im Rfp-Kanal zu sehen sind. Die Messung der Signalintensität erfolgte mittels Metamorph. Es wurde jeweils die Intensität von n=26 Zellen gemessen. Die relative Fluoreszenzintensität von mEos beträgt verglichen mit eGfp ca. 80 %.

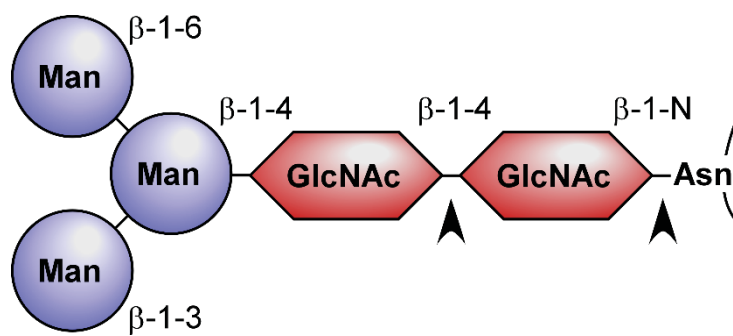


Abb. 6.14: Der Pentasaccharid-Kern N-glykosylierter Proteine. Der Kern aller N-verlinkten Glykoproteine besteht aus 3 Mannose- und 2 GlcNAc-Resten, welche β -glykosidisch an ein Asparagin der Konsensussequenz N-x-S/T gebunden sind. Pfeile markieren mögliche Schnittstellen von de-glykosylierenden Enzymen.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Menschen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen und mich auf meinem Weg begleitet haben.

An erster Stelle möchte ich mich bei Prof. Dr. Michael Feldbrügge bedanken. Michael, vielen Dank, dass du mir das Vertrauen entgegen gebracht hast und mich in dein hervorragendes Institut und deine sehr nette Arbeitsgruppe aufgenommen hast. Danke für die Betreuung, die Freiheiten, die du mir eingeräumt hast, aber auch für die richtungsweisende, helfende Hand, wenn sie gebraucht wurde.

Außerdem möchte ich mich herzlich bei Prof. Dr. Joachim Ernst für die bereitwillige Übernahme des Co-Referats und die kritischen und sehr hilfreichen Diskussionen im Rahmen des „Mikrobiologie Seminars“ bedanken.

Des Weiteren Danke ich Vera Göhre für die Betreuung im Rahmen der „RAB Attack“ Gruppe und die vielen Diskussionen, in denen du es sicher nicht immer leicht mit mir hattest. Ich danke allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe für die gute Atmosphäre und die schöne gemeinsame Zeit. Insbesondere möchte ich mich bei Dr. Kerstin Schipper bedanken, die mir stets mit Rat und Tat zur Seite stand und auch für die Zeit, die wir an der Kletterwand „abhängen“. Evelyn Vollmeister danke ich besonders für die schöne Anfangszeit, in der du mir den Einstieg sehr erleichtert hast.

Auch der gesamten Arbeitsgruppe „Molekulare Mykologie“ möchte ich für die jahrelange, schöne Nachbarschaft und Zusammenarbeit danken.

Allen Mitgliedern der iGRAD-Plant Graduiertenschule danke ich für die exzellenten Rahmenbedingungen für die Promotion und natürlich die schönen Retreats, die nicht nur interessant, sondern auch sehr lustig waren. Mein ganz besonderer Dank gilt hierbei Dr. Sigrun Wegener-Feldbrügge, die als Koordinatorin immer ein offenes Ohr für uns hatte und unser Leben im Programm sehr erleichtert hat. Außerdem möchte ich mich ganz besonders bei Prof. Jonathan Walton und seinem Team für die besondere Gastfreundschaft während meines Aufenthaltes in Michigan bedanken.

Last but not least, möchte ich mich bei allen meinen Freunden und ganz besonders meiner Familie bedanken. Vielen Dank, dass ihr immer zu mir gehalten habt und stets Verständnis für mich hattet. Besonderer Dank gilt dabei meinem Bruder Thomas und meiner wundervollen Freundin Sarah, die mich stets aufgemuntert, unterstützt und mir viel Kraft gegeben haben, um diese Arbeit fertigzustellen.

Danke!

Lebenslauf

Thorsten Langner

Diplom Biologe

Geburtsdatum: 26.01.1984

Geburtsort: 76135 Karlsruhe, Baden-Württemberg

Geschlecht: Männlich

Staatsangehörigkeit: Deutsch

Familienstand: Ledig, keine Kinder

Ausbildung

- | | |
|-----------------|---|
| 04/2011- | Promotion (Note: <i>magna cum laude</i>) |
| 06/2015 | Institut für Mikrobiologie, Heinrich-Heine Universität, Düsseldorf. |
| | |
| 11/2006- | Diplom (Note: 1,7): |
| 02/2010 | Karlsruher Institute für Technologie (KIT), Karlsruhe. |
| | |
| 04/2009- | Diplomarbeit (Note: 1,1) |
| 02/2010 | Institut für angewandte Biowissenschaften/ Karlsruher Institute für Technologie (KIT) |
| | Thema: Funktionelle Charakterisierung der Pst1- und Pst2-Effektorproteine in <i>U. maydis</i> . |
| | |
| 11/2008- | Mündliche Diplomsprüfungen (Notendurchschnitt: 1,5) |
| 03/2009 | Karlsruher Institute für Technologie (KIT), Karlsruhe. |
| | Molekularbiologie (1,7), Botanik (1,3), Mikrobiologie (1,3) |
| | |
| 10/2003- | Vordiplom (3,0) |
| 10/2006 | Karlsruher Institute für Technologie (KIT), Karlsruhe |

09/2000- Abitur (2,3)
06/2003 Elisabeth-Selbert-Gymnasium, Karlsruhe

Arbeitserfahrung

12/2009- Karlsruher Institute für Technologie (KIT), Karlsruhe
01/2010 Institut für angewandte Biowissenschaften, Genetik
Studentische Hilfskraft

06/2010- Karlsruher Institute für Technologie (KIT), Karlsruhe
11/2010 Institut für angewandte Biowissenschaften, Genetik
Wissenschaftliche Hilfskraft

11/2010- Praktikum: Novartis Pharma AG (Basel)
03/2011 Abteilung: "NBx - Microbial Expression of Biopharmaceuticals"

Stipendien

04/2011- Promotionsstipendium der Deutschen Forschungsgemeinschaft
09/2014 DFG/GRK1525 im Rahmen des Graduiertenprogramms „iGRAD-Plant“

Gremienarbeit

09/2012- Studentenvertreter des Graduiertenprogramms „iGRAD-Plant“
09/2013

Lehrtätigkeit

03/2009- Vorbereitung und Durchführung von Praktika in den Bereichen Genetik,
09/2010 Zellbiologie und Mikrobiologie

04/2011- Vorbereitung und Durchführung von Praktika und Seminaren in den
Heute Bereichen Mikrobiologie und Zellbiologie. Betreuung und Anleitung von
Laborpraktikanten sowie einer Bachelorarbeit.

Konferenzbeiträge

- 03/2012** **Keystone Symposia: Protein-RNA Interaction in Biology and Disease**
Santa Fe, New Mexiko
Poster: Microtubule-dependent mRNA-transport is crucial for pathogenic development of Ustilago maydis.
- 03/2013** **27th Fungal genetics conference**
Asilomar, Kalifornien
Poster: Microtubule-dependent mRNA-transport is crucial for pathogenic development of Ustilago maydis.
- 04/2011-
Heute** **Jährliche Vorträge und Poster im Rahmen der iGRAD-Plant Symposien**

Auslands-/Forschungs-Aufenthalte

- 06/2013-
12/2013** **Plant Research Laboratory, Michigan State University, East Lansing, USA. Betreuung: Jonathan D. Walton.**
- 07/ 2014** **Molekulare Phytopathologie und erneuerbare Ressourcen, Westfälische Wilhelms-Universität, Münster. Betreuung: Bruno M. Mörschbacher.**

Seminare/Workshops

- “Scientific Writing”**
- “Projektmanagement”**
- “Gentechnisches Arbeiten in gentechnischen Anlagen – Projektleiter”**
- „Gute wissenschaftliche Praxis für Promovierende“**
- „RNA-Seq in bio-medical research“**
- „Advanced microscopy: Studying protein-protein interaction via FRET“**
- „PC-based analysis and presentation of biological data“**

Methoden

- Organismen:** - Pilze (*Ustilago maydis*, *Aspergillus nidulans*, *Saccharomyces cerevisiae*)
 - Pflanzen (*Zea mays*, *Nicotiana tabacum*, *Arabidopsis thaliana*, *Arabis spec.*)
 - Bakterien (*Escherichia coli*)
- Zellkulturen:** - *Nicotiana tabacum* cv. Bright Yellow 2 (BY-2)
- Mikroskopie:** - Immunhistochemische Analyse von Pflanzenpräparaten
 - Fluoreszenzmikroskopie/ FRAP
 - Konfokalmikroskopie
 - 3D-Bildrekonstruktion
- Biochem./** - Herstellung von Überexpressions-, Deletions- und Reporterstämmen
- Genetische** - Heterologe Proteinexpression in Pilzen, Bakterien und Pflanzen
- Methoden:** - Proteinmarkierung und Nachweis
 - DNA und RNA Präparation
 - cDNA Synthese und Expressionsanalysen
- Bio-informatik:** - Invitrogen Vector NTI, Clone Manager 9, Sequencher, SignalP, TargetP, NCBI-Blast, ApE, PubMed, MUMDB, ClustalW, ScanProsite, WoLF-PSORT,
 Linux, PyMol, Coot
- Analyse:** - UHPLC-MS
- Strukturvorhersage:** - i-Tasser, Linux, Pymol, Coot, ClustalX

Weitere Qualifikationen

- Sprachen:** Deutsch (Muttersprache), Englisch (flüssig in Wort und Schrift), Französisch(Grundwissen)
- Computer:** MS Windows XP/ Vista/ 7; OS X; MS Office (Excel, Words, Power Point), Linux

Interessen

- Hobbies** **Sport:** Laufen, Klettern, Windsurfen, Wintersport.
Musik: Schlagzeug, Gitarre, Klavier.

Beitrag der Autoren zur Publikation:

Chitinases are essential for cell separation in *Ustilago maydis*. **Langner, T., Öztürk, M., Hartmann, S., Cord-Landwehr, S., Moerschbacher B.M., Walton, J.D. und Göhre, V.** (2015). *Eukaryotic Cell*. doi:10.1128/EC.00022-15.

Langner, T.:

Planung der Studie, Etablierung von Methoden, Durchführung des Großteils der Analysen, Auswertung und Darstellung der Ergebnisse, Schreiben des Manuskripts.

Öztürk, M. und Hartmann, S.:

Herstellung von Chitinase-Deletionsmutanten, Korrekturen des Manuskripts.

Cord-Landwehr, S. und Moerschbacher, B.M.:

Planung und Durchführung von HPLC-MS Messungen zur Aktivitätsbestimmung, Auswertung der A2/A3-Verhältnisse. Korrekturen des Manuskripts.

Walton, J.D.:

Betreuung und Überwachung der Arbeiten, die während eines Forschungsaufenthaltes an der Michigan State University durchgeführt wurden. Hauptsächlich beteiligt an der initialen Charakterisierung von Deletionsmutanten und heterologer Proteinexpression. Korrekturen des Manuskripts.

Göhre, V.:

Planung der Studie, Betreuung der Arbeiten an der Heinrich-Heine Universität. Schreiben des Manuskripts.

Flüssigkulturen filamentös wachsender *cts1Δ*-Zellen kommt es zu einer Aggregation der Zellen, was zu schnellerer Sedimentation führt (Abb. 1.9 A). Auch die biotrophe Entwicklung ist durch die Deletion von *cts1* nicht beeinflusst (Abb. 1.9 C).

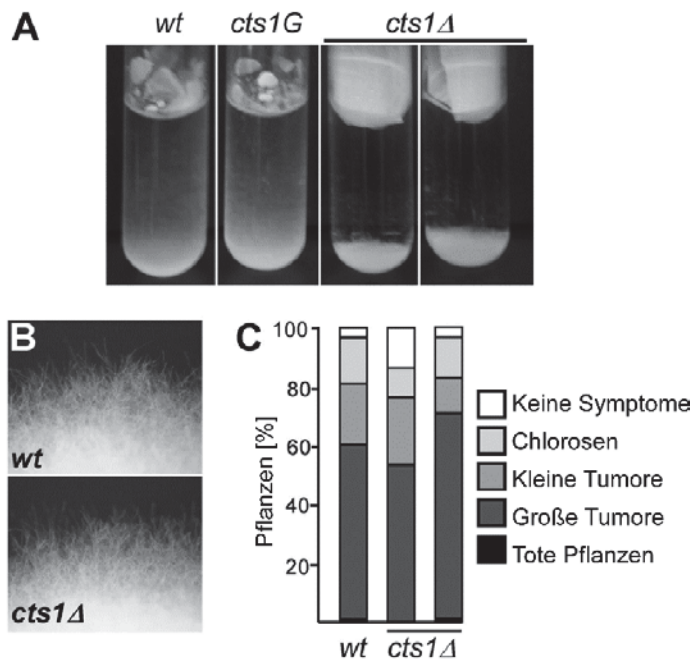


Abb. 1.9: Phänotypische Analyse der *cts1Δ*-Mutante. (A) *cts1Δ*-Filamente aggregieren in Flüssigkultur und weisen eine erhöhte Sedimentationsgeschwindigkeit auf. (B) Das filamentöse Wachstum auf Festmedium ist unverändert. (C) Die Deletion von *cts1* hat keinen Einfluss auf die Virulenz von *U. maydis*. Abbildung modifiziert aus (Koepeke *et al.*, 2011).

1.7 Der Einfluss des mRNA-Transports auf Mitochondrien

Neben *cts1* wurden mRNAs einiger mitochondrialer Proteine als direkte Ziele von Rrm4 identifiziert (König *et al.*, 2009; Koepeke *et al.*, 2011). Dies führte zu der Vermutung, dass der Langstreckentransport dieser mRNAs auch eine Rolle während der Verteilung mitochondrialer Proteine in Filamenten von *U. maydis* spielt. Mehrere Studien haben gezeigt, dass mitochondriale Proteine im Cytoplasma als Vorläufer synthetisiert werden, die anschließend, unter Beteiligung von Chaperonen, post-translational importiert werden (Abb. 1.10; Schatz, 1979; Neupert und Schatz, 1981; Reid und Schatz, 1982a; Reid und Schatz, 1982b; Reid *et al.*, 1982). Dazu binden sie an Rezeptoren der äußeren Mitochondrienmembran (Hennig *et al.*, 1983; Zwizinski *et al.*, 1984), wodurch die Translokation eingeleitet wird. Der Translokationsprozess hängt vom Membranpotential, der ATP-Verfügbarkeit und der Atmungskettenfunktion ab (Pfanner *et al.*, 1987; Martin *et al.*, 1991). In der Mitochondrienmatrix wird die N-terminale Importsequenz (MTS) durch eine Signalpeptid-Peptidase (MPP, *matrix processing peptidase*) entfernt, wodurch das reife Protein entsteht (Schleyer und Neupert, 1985; Hawlitschek *et al.*, 1988).

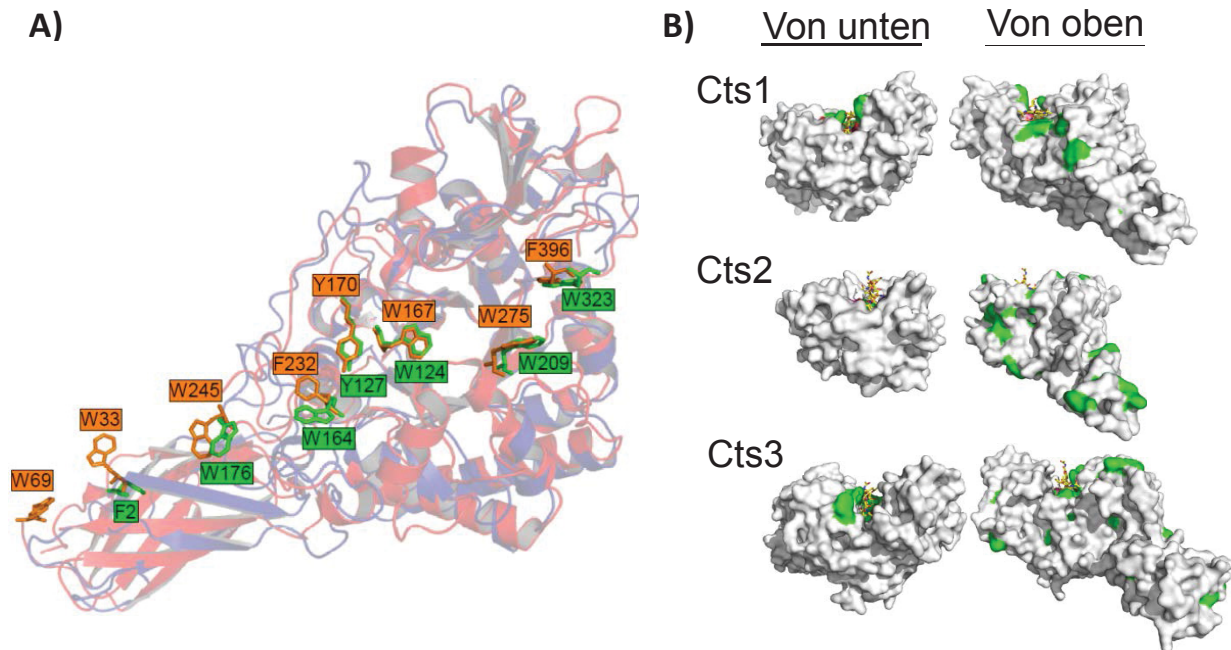


Abb. 2.3: Die oberflächenexponierten, aromatischen AS in Cts1 sind konserviert. (A) Überlagerung der Proteinstruktur von SmChiA (rot) mit der prognostizierten Struktur von Cts1 (blau). Aromatische AS aus SmChiA sind in orange, aus UmCts1 in grün gekennzeichnet. (B) Oberflächenprojektion von Cts1, Cts2 und Cts3 aus Sicht des C- (von unten) bzw. des N-Terminus (von oben). Darstellung als Komplex mit dem Substrat (GlcNAc)₆ (gelb). Aromatische AS auf der Oberfläche sind in grün dargestellt.

Um herauszufinden, ob die in Kapitel 2.1 identifizierten, evolutionär hochkonservierten AS (Abb. 6.1) strukturelle Funktionen haben und somit zur Substratbindung beitragen könnten, wurden sie in den dreidimensionalen Strukturmodellen visualisiert. Die Analyse ergab, dass sich alle hochkonservierten AS in unmittelbarer Nähe der Substratbindestelle befinden und somit höchswahrscheinlich direkt an der Bindung und Hydrolyse des Substrates beteiligt oder aber innerhalb der Bindestelle strukturell formgebend sind (Abb. 2.4).

sekundären Septums gestört ist (Abb. 2.9 B). Dies deutet darauf hin, dass der beobachtete Zellteilungsdefekt in *cts1Δcts2Δ*-Doppelmutanten durch nachfolgende Prozesse, wie z.B. dem Abbau von überflüssigem Zellwandmaterial zwischen Mutter- und Tochter-Zelle, hervorgerufen wird. Da beide Septen vorhanden sind, müsste ein solcher Abbau von Zellwandmaterial extrazellulär, durch sekretierte Chitinasen katalysiert werden. Daher müsste der beobachtete Zellseparationsdefekt in der *cts1Δcts2Δ*-Doppelmutante durch Gabe von exogenem Cts1 ausgeglichen werden können. Um diese Hypothese zu testen, wurde eine His₆-Cts1 (N-terminaler His-Tag) Variante in *Escherichia coli* exprimiert, über Nickel-Affinitätschromatographie aufgereinigt (Jankowski, 2013) und zu exponentiell wachsenden AB33 und AB33*cts1Δcts2Δ*-Kulturen gegeben. Als zusätzliche Kontrolle dienten jeweils unbehandelte Kulturen. Die mikroskopische Analyse der Zellmorphologien zeigte, dass der Zellteilungsdefekt durch dreistündige Inkubation mit 1,5 mg/ml exogenem Cts1 zumindest teilweise aufgehoben wurde (Abb. 2.14). In einigen Zellen führte die Behandlung mit exogener Chitinase His₆-Cts1 jedoch zu einer veränderten Zellmorphologie. Die Zellen erschienen bipolar elongiert und tendierten dazu Aggregate zu bilden (Abb. 2.10, rechte Spalte).

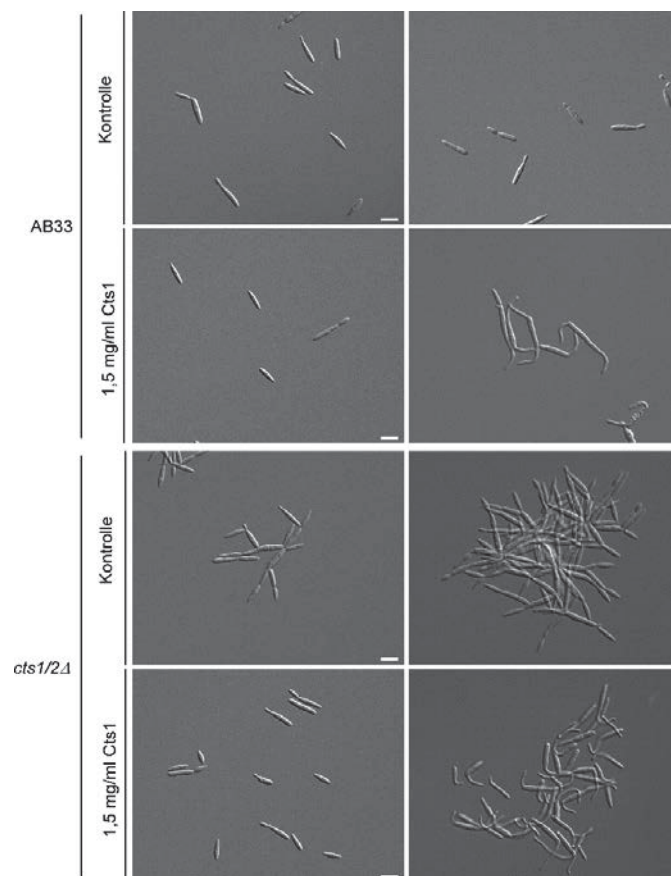


Abb. 2.10: Der Cytokinesedefekt in *cts1Δcts2Δ*-Mutanten kann durch exogenes Cts1 partiell aufgehoben werden. Mikroskopische Analyse der Zellmorphologie von AB33 und *cts1Δcts2Δ*-Kulturen. Unbehandelte *cts1Δcts2Δ*-Zellen zeigen die typische Aggregatbildung. Durch dreistündige Behandlung mit exogenem His₆-Cts1 kann dieser Phänotyp teilweise ausgeglichen werden. Größenstandard: 10 µm.

Jedoch zeigte keine der anderen Chitinase-Deletionsmutanten ein verändertes Sedimentationsverhalten gegenüber AB33 (Abb. 2.15 B), sodass geschlussfolgert werden kann, dass lediglich Cts1 die Aggregation der leeren Abschnitte beeinflusst. Die Analyse auf Festmedium ergab, dass auch hier keine der Chitinase-Deletionsmutanten einen Defekt im Hyphenwachstum hat (Abb. 2.15 A). Sowohl die Kolonimorphologien als auch die an den Rändern der Kolonien auswachsenden Filamente waren mit denen von AB33 vergleichbar.

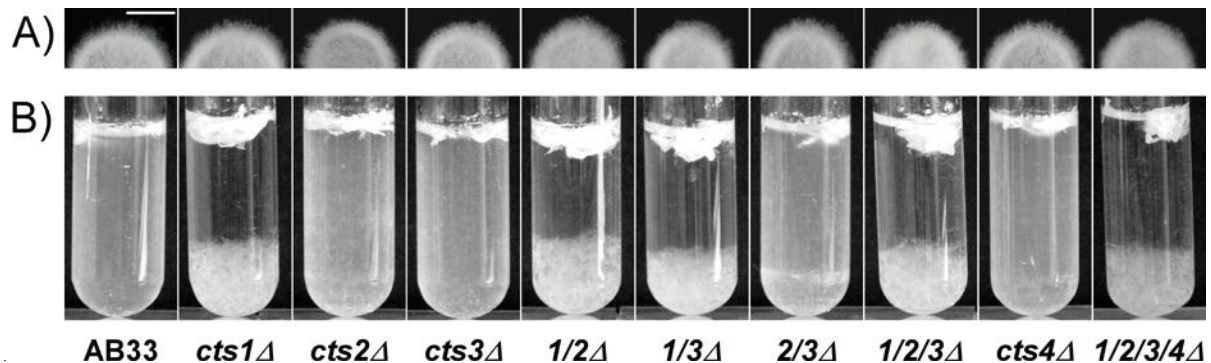


Abb. 2.15: Lediglich Cts1 hat eine Funktion während des filamentösen Wachstums. (A) Kolonimorphologie filamentös wachsender *U. maydis* Chitinase-Deletionsmutanten auf NM-Festmedium. Die Morphologie der entsprechenden Stämme ist mit der von AB33 vergleichbar. Größenstandard: 0,3 cm. (B) Sedimentationstest filamentös wachsender Chitinase-Deletionsmutanten. Lediglich die *cts1Δ*-Mutante zeigt verstärkte Aggregation an den leeren Abschnitten (Daten nicht gezeigt) und eine erhöhte Sedimentationsgeschwindigkeit in Flüssigkultur. Dieser Effekt wird durch die Deletion weiterer Chitinasen nicht beeinflusst. Die Kulturen wurden in NM-Flüssigmedium auf eine OD₆₀₀ von 0,5 eingestellt und in Reagenzgläser überführt und für 24 Stunden bei 28 °C und 200 Upm inkubiert. Die Sedimentation erfolgte 5 min stehend bei RT.

2.1.4.5 Die Chitinase Cts1 lokalisiert in Filamenten an der Zellwand leerer Abschnitte

Der beschriebene Effekt von Cts1 auf die Aggregation leerer Abschnitte lässt vermuten, dass Cts1 eine Funktion in der Degradierung oder Remodellierung von Zellwandmaterial am basalen Pol des Filaments hat. Eine Voraussetzung dafür ist, dass Cts1 am basalen Septum oder extrazellulär in den leeren Abschnitten lokalisiert, um dort an die Chitinfraktion der Zellwand zu binden. Bisher konnte Cts1G jedoch lediglich an der Hyphenspitze von AB33-Filamenten nachgewiesen werden (Koepke *et al.*, 2011).

Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde in den Stämmen AB33cts1:egfp und AB33egfp filamentöses Wachstum in NM induziert. Sechs Stunden nach Induktion wurde die Cts1G-Lokalisation in einer Co-Lokalisationsanalyse mit CW untersucht. Die fluoreszenzmikroskopische Analyse zeigte, dass Cts1G tatsächlich verschiedene Lokalisationsmuster während des filamentösen Wachstums aufweist (Abb. 2.16 A), welche durch eine Linescan-Analyse verdeutlicht werden konnten (Abb. 2.16 B).

2.2 Der Rrm4-abhängige Proteinimport in Mitochondrien

In Vorarbeiten wurden spezifische mRNAs mitochondrialer Proteine als Ziel-mRNAs des Rrm4-abhängigen RNA-Transports identifiziert (Abb. 2.29 A; König *et al.*, 2009; Haag, 2013). Viele dieser Ziel-mRNAs kodieren Proteine der mitochondrialen Atmungskette (Abb. 2.29 B). Außerdem wurde gezeigt, dass einige der mitochondrialen Proteine in Abhängigkeit von Rrm4 differenziell exprimiert werden und ihre Menge, vor allem in der Membran-assoziierten Fraktion, zwischen Wildtyp und *rrm4Δ*-Mutante stark variiert (Koepke, 2010). Des Weiteren konnte beobachtet werden, dass die Deletion von *rrm4* während des filamentösen Wachstums zu einer erhöhten Produktion von mitochondrialen, reaktiven Sauerstoff-Spezies (ROS, *reactive oxygen species*) führt (Abb. 2.29 C; Koepke, 2010).

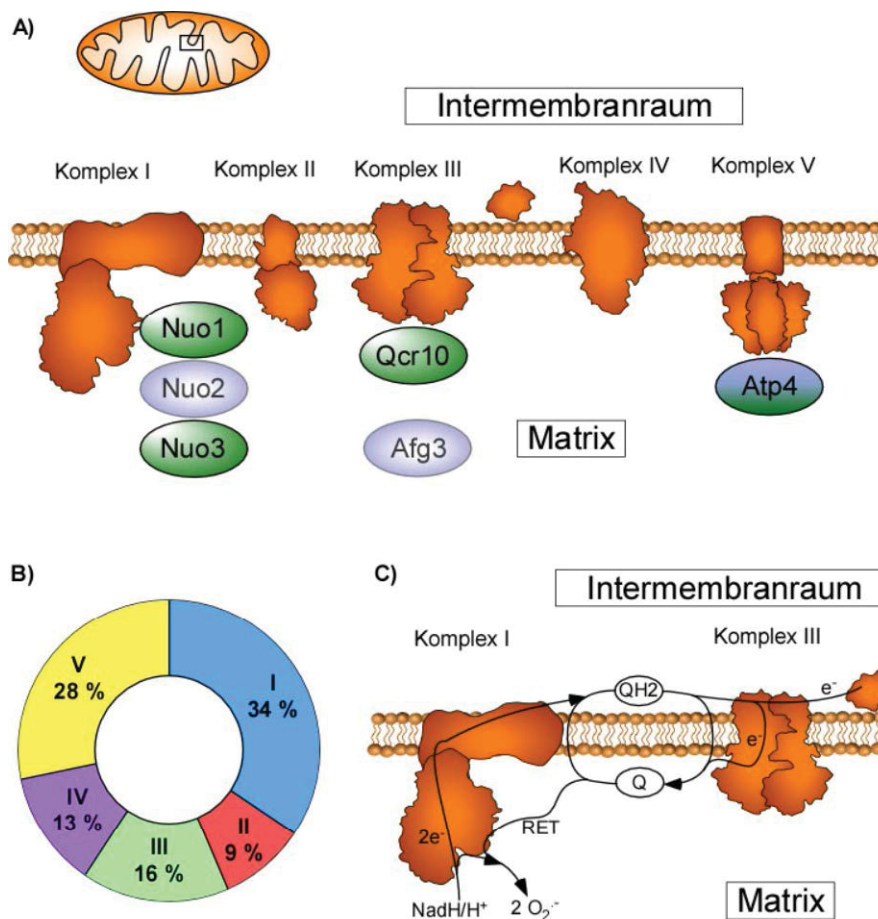


Abb. 2.29: mRNAs mitochondrialer Proteine sind Ziele des Rrm4-abhängigen Transports. (A) Ziele des Rrm4-abhängigen Transports in der Atmungskette, welche durch *in vivo* UV-Vernetzung (König *et al.*, 2009; Haag, 2013; grün, CLIP; *crosslinking immunoprecipitation*) und differenzielle Proteom-Analyse (Koepke, 2010; blau, DIGE; *2D fluorescence differential gel electrophoresis*) identifiziert wurden. Dargestellt sind die jeweils signifikantesten Ziele der Komplexe I, III und V. (B) Prozentuale Verteilung der Rrm4-Ziel-mRNAs aus der mitochondrialen Atmungskette auf die fünf Proteinkomplexe: 34 % Komplex I, 9 % Komplex II, 16 % Komplex III, 13 % Komplex IV, 28 % Komplex V. Daten extrahiert und zusammengefasst aus (König *et al.*, 2009; Haag, 2013; Koepke, 2010). (C) Komplex I-abhängiger Elektronentransport und Superoxidproduktion in der Atmungskette. Elektronen werden während des linearen Elektronentransports von $NadH/H^+$ über Komplex I auf den Ubichinon-Pool und weiter auf Komplex III übertragen. Unter Stress-Bedingungen kommt es zum reversen Elektronentransport (RET) zurück auf Komplex I, was durch die Übertragung von Elektronen auf molekularen Sauerstoff zur Bildung von Superoxid ($O_2^{\cdot -}$, SOX = ROS) führen kann.

dynamische Prozesse besser visualisieren und untersuchen zu können, wurden in der vorliegenden Arbeit zwei neue fluoreszierende Markerproteine für die Nutzung in *U. maydis* etabliert.

Das photokonvertierbare Protein mEos2 eignet sich aufgrund seiner Eigenschaften sehr gut zur Untersuchung dynamischer Prozesse. In seinem Grundzustand hat mEos2 sein Anregungsmaximum bei 506 nm und sein Emissionsmaximum bei 519 nm. Verglichen mit eGfp weist mEos2 außerdem eine 1,4-fach gesteigerte Helligkeit auf (McKinney *et al.*, 2009). Ein weiterer Vorteil von mEos2 gegenüber vielen anderen photokonvertierbaren Proteinen ist, dass das Helligkeitsverhältnis zwischen Grün- und Rot-Zustand sehr ausgewogen ist. Im Rot-Zustand hat mEos2 sein Anregungsmaximum bei 573 nm und sein Emissionsmaximum bei 584 nm. Die Fluoreszenz im roten Spektralbereich erreicht die etwa 0,8-fache Helligkeit von eGfp. Somit ist die Helligkeit von mEos2 im roten Zustand ca. doppelt so hoch wie die von mCherry (Shaner *et al.*, 2004; <http://nic.ucsf.edu/dokuwiki/doku.php?id=fluorescent-proteins>).

Die Nukleotidsequenz von *mEos2* wurde für die Expression in *U. maydis* zunächst Di-Codon-optimiert (Anhang: Abb. 6.11; <http://dicodon-optimization.appspot.com/>) und unter der Kontrolle der P_{otef} - und P_{crg1} -Promotoren in den *ip^s*-Locus integriert. Um zu testen, ob die so exprimierte mEos2-Variante funktionell ist, wurde die Expression des Proteins fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Die Analyse ergab, dass die di-codon-optimierte Variante von mEos2 in *U. maydis* funktionell exprimiert werden kann (Abb. 2.35). Außerdem konnte mEos2 mittels N-terminaler Mitochondrien-Import Sequenz (MTS; *mitochondrial targeting signal*) erfolgreich in die Mitochondrienmatrix transloziert werden. Die Fluoreszenz-Intensität von mEos2 erreichte in *U. maydis* jedoch lediglich die 0,8-fache Intensität von eGfp (Anhang: Abb. 6.13).

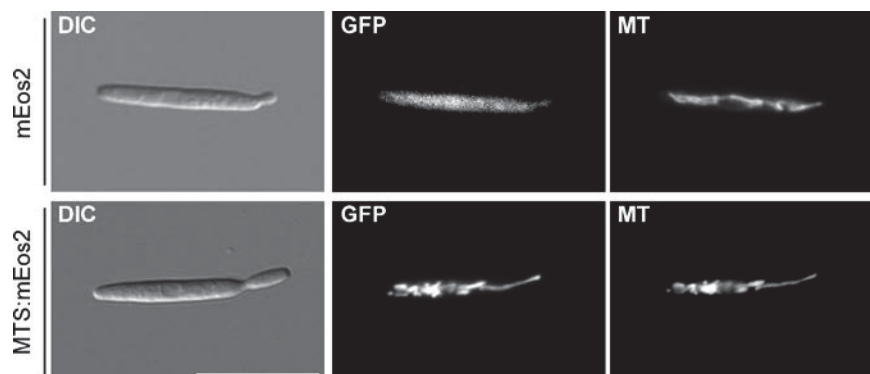


Abb. 2.35: mEos2 ist in *U. maydis* funktionell und kann mittels MTS in Mitochondrien transloziert werden. Fluoreszenzmikroskopische Co-Lokalisations-Analyse von mEos2 und Mito-Tracker™. Die mEos2 Expression wurde fünf Stunden nach Induktion des P_{crg1} -Promotors fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Freies mEos2 zeigt eine gleichmäßig verteilte, cytoplasmatische Fluoreszenz. MTS:mEos2 zeigt eine klare Co-Lokalisation mit dem Mitochondrien-Marker Mito-Tracker™ (MT). Kulturen wurden bis zu einer OD_{600} von 0,5 angezogen und in CM + 1 % Arabinose induziert. Größenmaßstab: 10 μ m.

Die Analyse zeigte, dass die Konversion von mEos2 mittels großflächiger Bestrahlung erfolgreich durchgeführt werden kann (Abb. 2.37 A). Die maximale Photokonversion war nach einer Bestrahlungszeit von 45 Sekunden erreicht (Daten nicht gezeigt). Die Reduktion des Gfp-Signals betrug $\sim 90\%$ (Abb. 2.37 B). Nach Photokonversion betrug die relative Intensität des Rfp-Signals (mEos2 im Rot-Zustand) etwa 60 % der Gfp-Ausgangsfluoreszenz, was den Literaturwerten entspricht (McKinney *et al.*, 2009).

Mit mEos2 steht daher nun ein weiterer genetisch kodierter Fluoreszenzmarker für die Untersuchung dynamischer Prozesse in *U. maydis* zur Verfügung.

Neben der Hintergrundfluoreszenz ist auch die Reifungszeit eines Fluorophors ausschlaggebend für die Untersuchung dynamischer Prozesse. Außerdem ist die Stabilität fluoreszierender Proteine stark von Temperatur, pH-Wert, Salzkonzentration sowie O₂-Verfügbarkeit abhängig (Pédélecq *et al.*, 2006; zusammengefasst in Tsien, 1998). Des Weiteren neigen einige Gfp-Varianten zur Bildung von Dimeren oder sogar Oligomeren, was zur Aggregation von Zielproteinen führen kann.

„Superfolder-Gfp“ (sfGfp) ist eine schnell faltende Gfp-Variante, die über eine hohe pH- und Salz-Toleranz verfügt (Pédélecq *et al.*, 2006). Für die Expression von sfGfp in *U. maydis*, wurde die Nukleotidsequenz zunächst di-codon-optimiert (Anang: Abb. 6.12) und unter der Kontrolle des induzierbaren P_{crg1} -Promotors in den ip^s -Locus integriert. Außerdem wurde ein Konstrukt für ein N-terminales MTS-Fusionsprotein integriert, um zu untersuchen, ob sich sfGfp in *U. maydis* funktionell in Mitochondrien translozieren lässt.

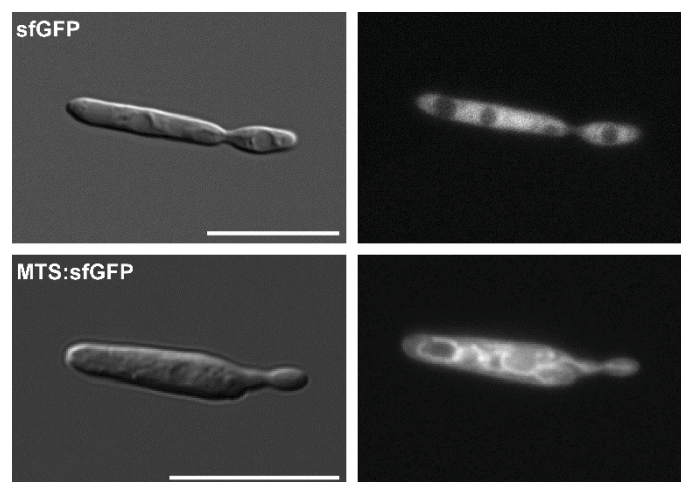


Abb. 2.38: sfGfp ist in *U. maydis* funktionell und kann mittels MTS in Mitochondrien transloziert werden. Fluoreszenzmikroskopische Analyse von sfGfp. Die Induktion der sfGfp-Expression mittels des P_{crg1} -Promotors erfolgte für fünf Stunden. Freies sfGfp zeigt eine gleichmäßig verteilte, cytoplasmatische Fluoreszenz. MTS:sfGfp zeigt eine deutliche Lokalisierung in Mitochondrien. Kulturen wurden bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 angezogen und in CM + 1 % Arabinose induziert. Die fluoreszenzmikroskopische Analyse erfolgte fünf Stunden nach Induktion. Größenmaßstab: 10 μ m.