

„Das AUACCC-bindende Protein Khd4 kontrolliert Morphogenese  
und Pathogenität in *Ustilago maydis*“



Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Biologie  
der Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt von

Evelyn Vollmeister  
aus Anklam

Marburg/Lahn  
Juni 2009

Vom Fachbereich Biologie  
der Philipps-Universität Marburg als Dissertation  
angenommen am: \_\_\_\_\_

Erstgutachter: Herr PD Dr. Michael Feldbrügge  
Zweitgutachter: Herr Prof. Dr. Hans-Ulrich Mösch

Tag der mündlichen Prüfung: \_\_\_\_\_

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von Januar 2006 bis Juli 2009 in Marburg am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie in der Abteilung für Organismische Interaktionen unter der Leitung von Frau Prof. Dr. Regine Kahmann und unter der Betreuung von Herrn PD Dr. Michael Feldbrügge durchgeführt.

## Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation mit dem Titel "Das AUACCC-bindende Protein Khd4 kontrolliert Morphogenese und Pathogenität in *Ustilago maydis*" selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

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

---

(Ort/Datum)

---

(Evelyn Vollmeister)

Teile dieser Arbeit sind zur Veröffentlichung eingereicht:

Vollmeister, E., Haag, C., Zarnack, K., Baumann, S., König, J., Mannhaupt, G. und Feldbrügge, M. (2009)

Tandem KH Domains of Khd4 Recognise AUACCC and are Essential for Regulation of Morphology as well as Pathogenicity in *Ustilago maydis*. *submitted*

## Zusammenfassung

Der phytopathogene Basidiomycet *Ustilago maydis* ist der Erreger des Maisbeulenbrandes. Für eine erfolgreiche Infektion der Wirtspflanze *Zea mays* ist die Bildung eines dikaryotischen Filaments erforderlich. Erst in diesem Stadium kann der Pilz die Pflanzenoberfläche penetrieren und die Tumorbildung induzieren. *U. maydis* stellt nicht nur ein Modellsystem für die Pilz/Wirt-Interaktion dar, sondern wurde in der Vergangenheit bspw. auch für Untersuchungen der DNA-Reparatur oder der RNA-Biologie genutzt. Erste Charakterisierungen des Einflusses RNA-bindender Proteine auf die Pathogenität deuteten dabei an, dass die posttranskriptionelle Regulation innerhalb des infektiösen Stadiums eine bedeutende Rolle spielt. Jedoch wurden bisher nur wenige RNA-bindende Proteine hinsichtlich ihrer regulatorischen Funktion in filamentösen Pilzen näher charakterisiert.

In dieser Arbeit wurde die Rolle des RNA-bindenden Proteins Khd4 von *U. maydis* detailliert untersucht. Die Deletion des Gens führt zu einem pleiotropen Phänotyp, der sich in einem Zytokinesedefekt haploider Sporidien, reduzierter Filamentbildung und stark verringerter Virulenz äußert. Um die Funktion von Khd4 hinsichtlich dessen Einfluss auf Morphologie und Pathogenität zu verstehen, wurde die RNA/Protein-Interaktion charakterisiert und mögliche Ziel-Transkripte identifiziert.

In dieser Dissertation konnte gezeigt werden, dass die Tandem-KH-Domänen 3 und 4 essentiell für die Funktion von Khd4 und für die RNA-Bindung *in vivo* sind. Mutationen wichtiger Aminosäuren innerhalb dieser Domänen äußerten sich in einem dem *khd4Δ*-ähnlichen Phänotyp und verhinderten die Bindung AUACCC-enhaltender RNA, welches mit Hilfe des Hefe-Drei-Hybrid-Systems ermittelt werden konnte. Die Anwesenheit des *cis*-aktiven Elements AUACCC war dabei sowohl notwendig als auch hinreichend. Um zu untersuchen, ob es sich bei diesem Motiv um ein regulatorisches RNA-Element in *U. maydis* handelt, wurden zwei unabhängige Analysen durchgeführt. Zum einen wurde über *Microarray*-Analysen ermittelt, dass das Motiv AUACCC in differentiell regulierten mRNAs angereichert war (29 von 72 regulierten mRNAs). Über bioinformatische Analysen wurde zum anderen eine signifikante Anreicherung des Motivs in den ersten 150 Nukleotiden der 3`untranslatierten Region (UTR) festgestellt. Die Untersuchung experimentell ermittelter 3`UTR-Längen bestätigte dabei diese Anreicherung. Weiterhin war die überwiegende Mehrheit der differentiell regulierten Transkripte im *khd4*-Deletionsstamm hochreguliert, was für eine destabilisierende Funktion von Khd4 sprach. Unterstützt wurde diese Hypothese durch die partielle Kolo-kalisation von Khd4 mit *processing bodies* (prozessierenden Körpern, *P-bodies*), welche in mRNA-Abbauprozessen von hoher Bedeutung sind. Die 29 AUACCC-enhaltenden, differentiell deregulierten Transkripte stellen außerdem direkte Ziel-Transkripte dar, welche einen Einfluss auf den Phänotyp des *khd4Δ*-Stammes besitzen könnten.

Folglich scheint die RNA-Bindung von Khd4 essentiell zu sein, um posttranskriptionell AUACCC-enhaltende mRNAs durch Rekrutierung von *P-bodies* zu degradieren. Mit Hilfe der Khd4-abhängigen Regulation wird dadurch möglicherweise die korrekte Entwicklung des haploiden und infektiösen Stadiums von *U. maydis* gewährleistet.

## Abkürzungen und Fachbegriffe

AS	Aminosäure(n)
Amp	Ampizillin
β-Gal	beta-Galaktosidase
BSA	<i>bovine serum albumin</i> (Rinder-Serumalbumin)
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
C-	carboxy-
cDNA/RNA	<i>complementary</i> DNA/RNA
DIC	<i>differential interference contrast</i> (differentieller Interferenz-Kontrast)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ds	doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EST	<i>expressed sequence tags</i>
GFP	grün fluoreszierendes Protein
eGFP	<i>enhanced</i> (verstärktes) GFP
Glc	Glukose
H <sub>2</sub> O <sub>bid</sub> /ddH <sub>2</sub> O	zweifach destilliertes Wasser
Hyg	Hygromyzin B
kb	Kilobasenpaar
KH-Domäne	<i>K homology domain</i> (K-Homologie-Domäne)
MIPS	<i>Munich Information Center for Protein Sequences</i>
mM	millimolar
mRfp	mono RFP
mRNA	<i>messenger</i> RNA (Boten-RNA)
MUMDB	MIPS <i>Ustilago maydis</i> DataBase
Nat	Nourseothrizin
N-	amino-
nt	Nukleotid(e)
OD	optische Dichte
ORF	<i>open reading frame</i> (offener Leserahmen)
p.a.	<i>pro analysi</i> , Klassifikation der Reinheitsstufe
<i>P-bodies</i>	<i>processing bodies</i> (prozessierende Körper)
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
PDB ID	<i>Protein Data Bank Identifier</i>
PEG	Polyethylenglykol
PUM	Pumilio
RBD	RNA-bindende Domäne
RFP	rot fluoreszierendes Protein
RNA	Ribonukleinsäure
RNP	Ribonukleoproteinkomplex
RRM	<i>RNA recognition motif</i> (RNA-Erkennungsmotiv)
RT	Raumtemperatur
SG	<i>stress granules</i> (Stresskörper)
ss	<i>single stranded</i> (einzelsträngig)
TAE	Tris-Acetat + Na <sub>2</sub> -EDTA
TBE	Tris-Borat + Na <sub>2</sub> -EDTA
TE	Tris-Cl + Na <sub>2</sub> -EDTA
U	<i>unit</i> , Enzymeinheit
u.a.	unter anderem
üN	über Nacht
ÜNK	Übernachtkultur
Upm	Umdrehungen pro Minute
UTR	untranslatierte Region
Wt	Wildtyp

# INHALTSVERZEICHNIS

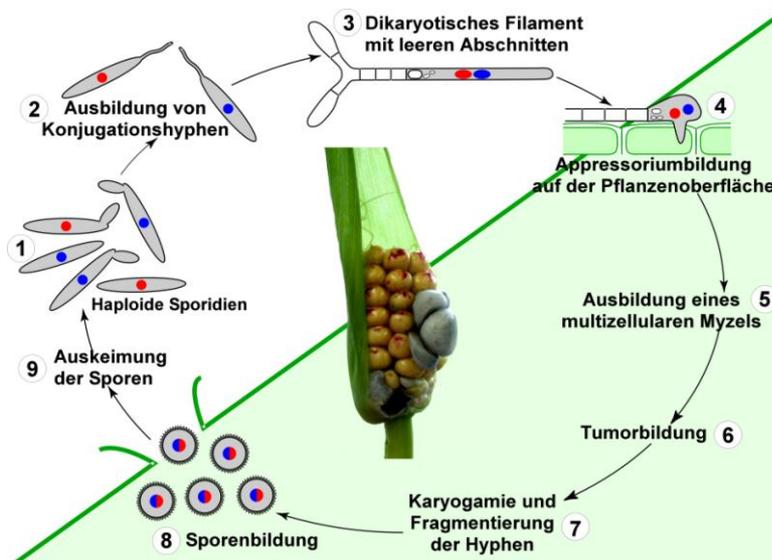
ZUSAMMENFASSUNG .....	I
ABKÜRZUNGEN UND FACHBEGRIFFE.....	II
INHALTSVERZEICHNIS.....	III
<b>1. EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1 DER PHYTOPATHOGENE PILZ <i>USTILAGO MAYDIS</i> ALS MODELLORGANISMUS .....	1
1.2 DIE mRNA-REIFUNG UND RIBONUKLEOPROTEINKOMPLEXE .....	3
1.3 <i>CIS</i> -AKTIVE RNA-ELEMENTE.....	4
1.4 DIE K-HOMOLOGIE-DOMÄNE ALS BINDER EINZELSTRÄNGIGER NUKLEINSÄUREN.....	5
1.5 FUNKTIONEN VON KH-DOMÄNEN-PROTEINEN .....	7
1.6 KHD4 AUS <i>U. MAYDIS</i> .....	9
1.7 ZIELSETZUNG DER ARBEIT .....	10
<b>2. ERGEBNISSE .....</b>	<b>11</b>
2.1 AMINOSÄURESEQUENZVERGLEICHE VON KHD4 MIT HOMOLOGEN PROTEINEN AUS VERSCHIEDENEN EUMYCOTA .....	11
2.2 UNTERSUCHUNG DER BIOLOGISCHEN FUNKTION DER TANDEM-KH-DOMÄNEN 3 UND 4 IN <i>U. MAYDIS</i> .....	13
2.2.1 Charakterisierung der Zellmorphologie von verschiedenen <i>khd4</i> -Stämmen .....	13
2.2.2 Charakterisierung der Filamentmorphologie von verschiedenen <i>khd4</i> -Stämmen .....	16
2.2.3 Filamentbildung und Pathogenität von verschiedenen <i>khd4</i> -Stämmen .....	18
2.3 WEITERFÜHRENDE SUBZELLULÄRE LOKALISATIONSSTUDIEN VON KHD4 UND KHD4-VARIANTEN .....	21
2.4 IDENTIFIZIERUNG EINER POTENTIELLEN BINDESEQUENZ UND ANALYSE VON BINDEEIGENSCHAFTEN VON KHD4.....	24
2.4.1 Identifizierung einer potentiellen Bindesequenz mit Hilfe des Hefe-Drei-Hybrid-Systems.....	24
2.4.2 Charakterisierung der RNA/Protein-Interaktion von AUACCC und Khd4 .....	28
2.5 IDENTIFIZIERUNG VON ZIEL-MRNAs MITTELS BIOINFORMATISCHER ANALYSEN UND EXPRESSIONSPROFILERSTELLUNG .....	30
2.5.1 Genomweite Suche nach potentiellen Ziel-mRNAs in <i>U. maydis</i> .....	30
2.5.2 Expressionsprofilanalyse zur Identifizierung direkter Ziel-mRNAs von Khd4.....	31
2.5.3 Positionsanalyse des Bindemotivs AUACCC von Khd4 in exprimierten Transkripten .....	35
<b>3. DISKUSSION .....</b>	<b>38</b>
3.1 DIE BINDESTELLE AUACCC IST SOWOHL NOTWENDIG ALS AUCH HINREICHEND FÜR DIE RNA/PROTEIN-INTERAKTION <i>IN VIVO</i> .....	38
3.2 AUACCC IST EIN REGULATORISCHES, <i>CIS</i> -AKTIVES RNA-ELEMENT IN <i>U. MAYDIS</i> .....	39
3.3 DIE TANDEM-KH-DOMÄNEN 3 UND 4 SIND ESSENTIELL .....	40
3.4 KHD4 IST AN DER DESTABILISIERUNG VON ZIEL-MRNAs INVOLVIERT .....	42
3.5 ALTERNATIVE FUNKTIONEN UND PROTEINMODIFIZIERUNGEN VON KHD4 .....	45

3.6 MODELLVORSTELLUNG FÜR DIE FUNKTION VON KHD4.....	47
3.7 AUSBLICK.....	49
<b>4. MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>50</b>
4.1 MATERIALIEN UND BEZUGSQUELLEN.....	50
4.1.1 Lösungen, Medien, Enzyme, Kits und Chemikalien .....	50
4.1.2 Nukleinsäuren.....	57
4.1.3 Plasmide, Plasmidkonstruktionen und Genbanken.....	58
4.1.4 Stämme.....	60
4.2 MOLEKULARBIOLOGISCHE STANDARDMETHODEN.....	61
4.2.1 Handhabung von Nukleinsäuren.....	61
4.2.2 Isolierung von Nukleinsäuren.....	62
4.2.3 PCR-Techniken.....	63
4.2.4 Transfer und Nachweis von DNA.....	63
4.2.5 Sequenzierung und Sequenzanalyse von DNA.....	64
4.2.6 Northern-Blot-Analyse.....	65
4.2.7 <i>Microarray</i> -Analyse .....	66
4.2.8 <i>Microarray</i> -Hybridisierung und Detektion .....	67
4.3 MIKROBIOLOGISCHE UND GENETISCHE METHODEN.....	68
4.3.1 <i>Escherichia coli</i> .....	68
4.3.2 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	69
4.3.3 <i>Ustilago maydis</i> .....	69
4.4 BIOCHEMISCHE METHODEN .....	70
4.5 ZELLBIOLOGISCHE METHODEN .....	70
4.5.1 Mikroskopie und Bildverarbeitung .....	70
4.5.2 Quantifizierungen .....	70
4.6 BIOINFORMATISCHE ANALYSEN .....	71
4.6.1 Aminosäuresequenzvergleiche .....	71
4.6.2 Transkriptomweite Identifizierung von Elementen und Positioneffektanalyse .....	71
<b>5. LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>72</b>
<b>6. ANHANG .....</b>	<b>85</b>

# 1. Einleitung

## 1.1 Der phytopathogene Pilz *Ustilago maydis* als Modellorganismus

Der Modellorganismus *Ustilago maydis* ist ein biotropher Basidiomycet, der auf seiner Wirtspflanze *Zea mays* tumorähnliche Brandgallen (im Folgenden als Tumore bezeichnet) an allen oberirdischen Pflanzenteilen induziert (Bölker, 2001; White und Doebley, 1998; Abb. 1.1). Beim Übergang von der saprophytischen, haploiden Hefephase in die parasitäre, dikaryotische Phase ist es notwendig, dass sich zwei kompatible, haploide Sporidien über ein Pheromon/Pheromonrezeptor-System erkennen. Kompatible Sporidien wachsen mittels Konjugationshyphen aufeinander zu und fusionieren an deren Spitzen (Spellig et al., 1994; Abb. 1.1). Das resultierende dikaryotische Filament wächst unipolar aus und zieht an dem basalen Pol leere Abschnitte durch Vakuolenbildung und Septierung ein. Am apikalen Pol penetriert es durch



**Abb. 1.1 Der Lebenszyklus von *Ustilago maydis*.** Die sich durch Knospung vermehrenden, haploiden Sporidien (1) erkennen sich und bilden Konjugationshyphen aus (2). Durch die Fusion an deren Spitzen entsteht ein dikaryotisches Filament (3), welches daraufhin in der Lage ist, die Pflanzenoberfläche durch Bildung eines Appressoriums zu penetrieren (4). Damit wird das pflanzenabhängige Entwicklungsstadium (grün unterlegt) erreicht. Massive Proliferation des Pilzmyzels (5) führt zur Bildung der Brandgallen an oberirdischen Pflanzenteilen (Bildmitte; 6). Nach der Karyogamie (7) werden Teliosporen gebildet (8), die den Brandgallen ein schwarzes, „verbranntes“ Aussehen verleihen („Maisbeulenbrand“). Durch die Auskeimung der Teliosporen (9) werden haploide Sporidien neu gebildet. Modifiziert nach Feldbrügge et al., 2004.

die Bildung eines Appressoriums die Pflanzenoberfläche. Anschließend proliferiert *U. maydis* innerhalb der Pflanze und bildet ein verzweigtes Myzel aus. Nach bereits wenigen Tagen sind erste Symptome wie z.B. Chlorose-Bildung erkennbar. Entsprechend erscheinen sechs Tage nach der Infektion Tumore, in denen sich nach der Karyogamie dickwandige Teliosporen entwickeln (Abb. 1.1). Die Freisetzung dieser erfolgt nach der Reifung mit anschließender Auskeimung neuer, haploider Sporidien (Bölker, 2001; Feldbrügge et al., 2004).

Die Grundlage für diesen Entwicklungsprozess bilden zwei Paarungstyploci, *a* und *b*, welche die Differenzierung kontrollieren. Der bialleliche *a*-Locus kodiert für ein Pheromon/Pheromonrezeptor-System, wobei ein Pheromonrezeptor jeweils nur das kompatible Pheromon des anderen *a*-Allels erkennt. Der Erkennung folgt die Aktivierung eines MAPK-

Signalweges (*mitogen-activated protein kinase*) und damit verknüpft die cAMP-abhängige Signalkaskade, die vermutlich über Umweltsignale angeschaltet wird (Andrews et al., 2000; Feldbrügge et al., 2004; Mayorga und Gold, 1998; Mayorga und Gold, 1999; Müller et al., 1999). Über verschiedene Hauptkomponenten wie bspw. das MAPK-Modul Kpp4/Fuz7/Kpp2 wird das Pheromonsignal an Prf1 (*pheromone response factor 1*) unter anderem durch Phosphorylierung verschiedener essentieller Aminosäuren vermittelt (Feldbrügge et al., 2006; Kaffarnik et al., 2003), was letztendlich zur Aktivierung der Gene des *a*- und *b*-Locus sowie weiterer Faktoren führt (Zarnack et al., 2008). Für die Ausbildung des polar wachsenden, dikaryotischen Filaments nach Verschmelzung zweier Konjugationshyphen ist der multiallelische *b*-Locus verantwortlich. Dieser kodiert für zwei Homeodomänen-Transkriptionsfaktoren, bE und bW, welche bei der Paarung kompatibler Partner einen heterodimeren und somit aktiven Komplex bilden (Kämper et al., 1995).

*U. maydis* stellt nicht nur einen Modellorganismus innerhalb pflanzenpathogener Prozesse dar (Doehlemann et al., 2008), sondern konnte in der Vergangenheit für die Untersuchung verschiedener zellulärer Prozesse, wie z.B. der homologen Rekombination, genutzt werden (Holliday, 1961; Holliday, 2004). In den letzten Jahren wurden u.a. die Erforschung der Morphogenese und Zellteilung oder der Einfluss RNA-bindender Proteine auf die Pathogenität untersucht (Banuett und Herskowitz, 2002; Becht, 2005; Böhmer et al., 2008; Garcia-Muse et al., 2004; Steinberg und Fuchs, 2004). Diese molekularbiologischen Analysen basieren auf der Möglichkeit der genetischen Manipulation des Pilzes über homologe Rekombination mit Hilfe von Genaustausch-Systemen (Brachmann et al., 2004; Kämper, 2004), N- und C-terminaler Fusionen mit fluoreszierenden Proteinen (Spellig et al., 1996; Steinberg et al., 2001; Weber et al., 2003), Aufreinigungsepitope (z.B. *TAP tag*, König et al., 2009), sowie induzierbarer oder konstitutiv aktiver Promotoren wie z.B. des *nar1*- oder *otef*-Promotors ( $P_{nar1}$ , Banks et al., 1993; Brachmann et al., 2001;  $P_{otef}$ , Spellig et al., 1996). Des Weiteren können verschiedene Stadien des Lebenszyklus unter Laborbedingungen imitiert werden. Dies reicht vom Wachstum in verschiedenen Flüssig- und Festmedien, über die Filamentinduktion bis hin zur Möglichkeit, Infektionsstudien mit Maiskeimlingen unter kontrollierten Gewächshausbedingungen innerhalb von ca. zwei Wochen durchzuführen.

Die Filamentbildung kann außerdem durch genetische Manipulation eingeleitet werden. Durch die Expression eines kompatiblen, aktiven bE/bW-Heterodimers in einer haploiden Sporidie wird das filamentöse Wachstum induziert, da die Paarung haploider Sporidien umgangen wird. Dabei kann eine haploide Sporidie einerseits durch Selbststimulation mittels Pheromon, nach Tropfen auf aktivkohlehaltigem Medium, die Expression des aktiven bE/bW-Heterodimers anschalten und ein b-abhängiges Filament induzieren (SG200, *a1mfa2bE1bW2*, Bölker et al.,

1995). Andererseits kann über die kontrollierte Aktivierung des *nar1*-Promotors durch Wechsel der Stickstoffquelle im Nährmedium ein aktives bE/bW-Heterodimer zur Filamentbildung führen (AB33, *a2P<sub>nar1</sub>:bW1bE2*; Brachmann et al., 2001).

Durch die Sequenzierung des Genoms von *U. maydis* mit folgender manueller Annotation konnten globale Analysetechniken etabliert werden wie z.B. die Erstellung von Expressionsprofilen, wie die *Microarray*-Analyse, oder Proteomprofilen, wie die 2D-Gelelektrophorese und DIGE (Broad Institut, [http://www.broad.mit.edu/annotation/fungi/Ustilago\\_maydis/](http://www.broad.mit.edu/annotation/fungi/Ustilago_maydis/); MUMDB, MIPS, <http://mips.gsf.de/genre/proj/Ustilago/>; *2D Fluorescence Difference Gel Electrophoresis*; Böhmer et al., 2007; Kämper et al., 2006; Koepke, 2005; Scherer et al., 2006; Zarnack et al., 2008). Durch die zur Verfügung stehenden etablierten Untersuchungsmethoden eignet sich *U. maydis* als hervorragender Modellorganismus.

## 1.2 Die mRNA-Reifung und Ribonukleoproteinkomplexe

Die eukaryotische Transkription ist ein streng kontrollierter Prozess, welcher für die Entwicklung einer reifen und korrekten *messenger*-RNA (mRNA) von entscheidender Bedeutung ist. Die Transkription findet im Zellkern statt, indem ein Komplex aus Transkriptionsfaktoren, DNA-abhängigen RNA-Polymerasen sowie RNA-bindenden Proteinen daran beteiligt ist, prä-mRNA zu synthetisieren. Dabei werden das 5' Ende der prä-mRNA mit einer 7-Methylguanin-Kappe versehen, Introns herausgespleißt und die Polyadenylierung am 3' Ende durchgeführt (Moore und Proudfoot, 2009). Diese kotranskriptionellen Prozesse unterliegen einer strengen Qualitätskontrolle. Erst nach Reifeprüfung kann eine mRNA den Zellkern über den Zellkernporenkomplex verlassen (D'Angelo und Hetzer, 2008; Rougemaille et al., 2008; Schmid und Jensen, 2008). Während dieser Prozessierungsschritte kontaktieren RNA-bindende Proteine die mRNA über sogenannte *cis*-aktive Elemente (Guerra et al., 2008; Martin und Ephrussi, 2009; siehe Kapitel 1.3). Dabei werden interaktive Ribonukleoproteinkomplexe gebildet (mRNPs), die über den weiteren Werdegang der mRNA entscheiden (Kuersten und Goodwin, 2005).

Im Zytoplasma wird durch die Interaktion der mRNA mit verschiedenen RNA-bindenden Proteinen die Translation dieser gesteuert (Moore und Proudfoot, 2009). Allgemein kann eine mRNA bspw. mit Hilfe des Signalerkennungspartikels zum endoplasmatischen Retikulum (*signal recognition particle*, SRP; Pool, 2005) oder mittels mitochondrieller Signalsequenz zu Mitochondrien transportiert werden (Garcia et al., 2007; Gonsalvez et al., 2005; Margeot et al., 2005). Abhängig von entwicklungspezifischen Stadien ändert sich die Komposition eines Ribonukleoproteinkomplexes, was zur Folge hat, dass charakteristische mRNAs in entsprechenden Entwicklungsstadien translatiert werden (Lee und Schedl, 2006; Wilhelm und

Smibert, 2005). Des Weiteren kann die mRNA durch umweltbedingte Stimuli einer Translationsinhibition unterliegen, welche sich in einer vorübergehenden Aufbewahrung der mRNA äußert (Abdelmohsen et al., 2008; Vergara und Thiele, 2008).

Für diese temporäre Aufbewahrung können granuläre, zytoplasmatische Strukturen entscheidend sein. Diese wurden teilweise erst in den letzten Jahren entdeckt und charakterisiert (Anderson und Kedersha, 2006; Bashkirov et al., 1997; Eulalio et al., 2007; van Dijk et al., 2002). Es handelt sich dabei zum einen um *stress granules* (Stresskörper) und zum anderen um *processing bodies* (prozessierende Körper, *P-bodies*; Anderson und Kedersha, 2006; Bashkirov et al., 1997; Eulalio et al., 2007; Kedersha und Anderson, 2002; Kedersha et al., 2005). Letztere sind hauptsächlich für den 5' in Richtung 3' mRNA-Abbau verantwortlich (Parker und Sheth, 2007). Für die Charakterisierung der *P-bodies* in niederen Eukaryoten, wie bspw. in *S. cerevisiae*, ist es erforderlich, diese durch induzierten Stress sichtbar zu machen, welches z.B. durch Glukosemangel oder Hitzestress hervorgerufen wird (Teixeira et al., 2005; Vollmeister, 2005).

Somit obliegt der Regulation von ko- und posttranskriptionellen Prozessen, wie bspw. dem Spleißen, dem Export, der Translationsregulation oder der mRNA-Stabilität, ein komplexes Wechselspiel aus RNA/Protein-Interaktionen.

### 1.3 *cis*-aktive RNA-Elemente

Für die Erkennung einer mRNA sind hauptsächlich *cis*-aktive Elemente erforderlich. Dabei kann die Primär- als auch die Sekundärstruktur von großer Bedeutung sein (Olivier et al., 2005; Van de Bor und Davis, 2004). Ohne die Bindung zu RNA-bindenden Proteinen wäre eine mRNA schutzlos vor dem Abbau durch mRNA-degradierende Enzyme (Kuersten und Goodwin, 2005). Experimentelle sowie bioinformatische Untersuchungen führen derzeit zu transkriptomweiten Identifizierungen von Bindemotiven und den dazugehörigen RNA-bindenden Proteinen (Galgano et al., 2008; Hogan et al., 2008; Noe et al., 2008). Es konnte beobachtet werden, dass Bindemotive in allen Regionen der mRNA vorkommen und dabei verschiedene Funktionen ausüben können. Ferner können mehrere RNA-bindende Proteine mit einer mRNA aufgrund diverser Bindemotive interagieren (Hogan et al., 2008).

Die Länge, Lage sowie Komposition der Elemente kann konserviert oder hochvariabel sein. So beinhalten mRNAs hoch konservierte Elemente, die von niederen zu höheren Eukaryoten gleiche Funktionen übernehmen können, wie bspw. die Spleißstellen oder das Polyadenylierungssignal. Das Erkennungsmotiv, um Introns zu entfernen, positioniert sich verteilt auf der prä-mRNA und wird für die Bindung des *Exon-Junction-Komplexes* benötigt (Aguilera, 2005; Wahl et al., 2009). Dabei enthält die 5`Spleißstelle GU und die 3`Spleißstelle AG, sie können jedoch Erweiterungen für alternatives Spleißen enthalten (Guerra et al., 2008; Ho et

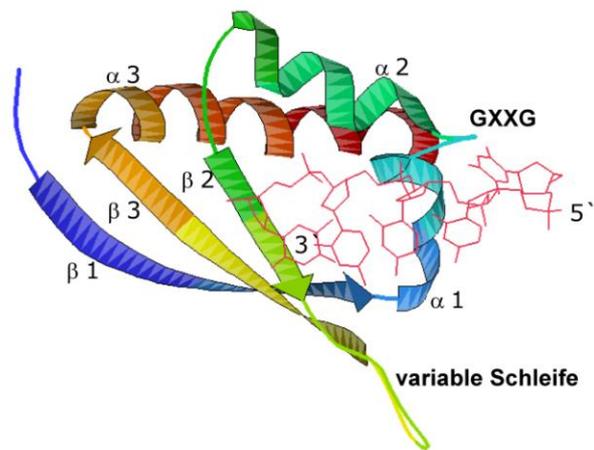
al., 2007; Wahl et al., 2009). Das Polyadenylierungssignal AAUAAA befindet sich in der 3`untranslatierten Region (UTR) und sorgt für die Anlagerung der Poly(A)-Polymerase, welche die Synthese des Poly(A)-Anhangs der mRNA übernimmt (Lutz, 2008; Mangus et al., 2003; Radford et al., 2008). Des Weiteren gibt es Bindemotiv-Familien, die in Sets von mRNAs zu finden sind und spezifische Funktionen ausüben. Diese Familien beinhalten AU-, GU-, poly(C)-, U- sowie CA-reiche Elemente (Brown et al., 2002; Hui et al., 2005; Hui et al., 2003; Kim und Gorospe, 2008; Vlasova und Bohjanen, 2008; Vlasova et al., 2008). Beispielsweise entscheiden AU- bzw. GU-reiche Elemente (AREs bzw. GREs), welche sich in der 3`UTR befinden, über die Lebensdauer einer mRNA (Barreau et al., 2005; Vasudevan und Steitz, 2007; Vlasova und Bohjanen, 2008). Auch in *U. maydis* konnten Transkripte mit CA-reichen Regionen mit dem RNA-bindenden Protein Rrm4 aufgereinigt werden. Inwieweit dieses mögliche Bindemotiv von Rrm4 für Transportprozesse von spezifischen Transkripten benötigt wird, ist zu diesem Zeitpunkt noch unklar (König et al., 2009).

#### 1.4 Die K-Homologie-Domäne als Binder einzelsträngiger Nukleinsäuren

Die Interaktion zwischen RNA und Protein wird durch RNA-bindende Domänen (RBD) vermittelt. Diese können einzeln oder zahlreich auftreten und kooperativ agieren oder redundant wirken (Lunde et al., 2007). Die Architektur der Domänenanordnung sowie der einzelnen RNA-bindenden Domänen können von Prokaryoten über Archäen bis hin zu höheren Eukaryoten hoch konserviert sein. Die am weitesten verbreiteten RBDs sind RRM (*RNA recognition motif*, RNA-Erkennungsmotiv), PUM (Pumilio), dsRBD (*double strand RBD*, doppelsträngige RNA-Bindedomäne) und KH-Domänen (*K homology domain*; Burd und Dreyfuss, 1994; Chen und Varani, 2005; Clery et al., 2008; Fierro-Monti und Mathews, 2000; Messias und Sattler, 2004; Valverde et al., 2008; Wickens et al., 2002). Die KH-Domäne wurde anfänglich in dem heterogenen nuklearen Ribonukleoprotein K identifiziert (hnRNP K; Siomi et al., 1993). Seither konnten KH-Domänen in zahlreichen Proteinen unterschiedlichster Funktionalität ermittelt und untersucht werden (11119 KH-Domänen in 6089 Proteinen vorkommend von Bakterien bis höheren Eukaryoten; SMART-nrdb, *non-redundant database*, <http://smart.embl-heidelberg.de/smart/>).

KH-Domänen besitzen eine Länge von ca. 70 Aminosäuren und weisen eine konservierte Sekundärstruktur auf. Die Anordnung ähnelt einem  $\alpha/\beta$ -Sandwich bestehend aus dem Kernmotiv  $\beta_1$ - $\alpha_1$ - $\alpha_2$ - $\beta_2$ . Eukaryotische und prokaryotische KH-Domänen unterscheiden sich jedoch in ihren Erweiterungen. Eukaryotische Typ I-KH-Domänen beinhalten eine C-terminale  $\beta_3$ - $\alpha_3$ -Erweiterung (Abb. 1.2), während prokaryotische Typ II-KH-Domänen eine N-terminale  $\alpha_0$ - $\beta_0$ -

Erweiterung tragen. Die Faltung beider Typen von KH-Domänen formiert eine  $\beta$ -Plattform, welche in Typ I durch antiparallele (Abb. 1.2), in Typ II durch gemischte  $\beta$ -Faltblatt-Anordnungen zustande kommt. Die Plattform ist in beiden KH-Domänen-Typen auf die  $\alpha$ -Helices gebettet (Grishin, 2001). Die Bindung einzelsträngiger Nukleinsäuren erfolgt über eine konservierte GXXG-Schleife, die nicht in jeder KH-Domäne konserviert ist (Brykailo et al., 2007), zwischen den Helices  $\alpha_1$  und  $\alpha_2$  sowie über eine variable Schleife, welche sich zwischen  $\beta_2$  und  $\beta_3$  (Typ I) bzw.  $\beta_0$  und  $\beta_1$  (Typ II) befindet (Abb. 1.2; Lewis et al., 2000). Das Zentrum der Bindestelle enthält hydrophobe Aminosäurereste, vorwiegend Isoleucin und Leucin (Banerjee et al., 2007; Fenn et al., 2007). Diese Aminosäurereste bilden im Gesamten einen hydrophoben Spalt, in den sich die einzelsträngige Nukleinsäure einlagert. Außerdem unterstützen Van-der-Waals-Kräfte und Wasserstoffbrückenbindungen diese Interaktion (Lewis et al., 2000; Messias und Sattler, 2004). Eine einzelne KH-Domäne bindet Nukleinsäuren, welche überwiegend drei Cytidine beinhaltet und mindestens vier Nukleotide lang ist (Du et al., 2007; Fenn et al., 2007; Valverde et al., 2008). In Folge von Proteinmodifikationen oder kooperierenden KH-Domänen kann die Länge gebundener Nukleinsäuren jedoch variieren (Diaz-Moreno et al., 2009; Messias et al., 2006; Valverde et al., 2008).



**Abb. 1. 2 Graphische Darstellung der dritten KH-Domäne von hnRNP K im Komplex mit einzelsträngiger DNA.** Es handelt sich um eine KH-Domäne vom Typ I mit antiparalleler  $\beta$ -Faltblatt-Anordnung (Braddock et al., 2002a; Grishin, 2001; <http://www.rcsb.org/pdb/static.do?p=explorer/viewers/king.jsp?structureId=1J5K>; PDB ID: 1J5K).

Auch die Anzahl von KH-Domänen ist variabel, wie bspw. das Hefeprotein Scp160p mit 14 KH-Domänen oder das menschliche Nova1 wie auch in hnRNP K mit jeweils drei KH-Domänen (Brykailo et al., 2007; Buckanovich et al., 1996; Musunuru und Darnell, 2004; Grishin, 2001; Wintersberger et al., 1995). Des Weiteren konnten bereits KH-Domänen-Proteinfamilien charakterisiert werden, die in unterschiedlichen Organismen vorkommen und eine entsprechende Komposition aus unterschiedlichen Domänen besitzen. Dazu zählen z.B. STAR-Proteine (*signal transduction and activation of RNA*) aus höheren Eukaryoten, wie die Proteine Sam68 oder QKI aus *Caenorhabditis elegans* (Lukong und Richard, 2003; Lukong und Richard, 2007), die zu einer einzelnen KH-Domäne noch weitere, flankierende N- sowie C-terminale KH-Domänensegmente (GSG-Domäne) sowie prolin- und tyrosinreiche Regionen aufweisen (Lukong und Richard, 2003). Proteine können weiterhin verschiedene RBD-Kompositionen besitzen. Ein Beispiel ist

das *zipcode-binding protein 1* (ZBP1) aus embryonalen Fibroblasten aus Huhn, welches zwei RRM sowie vier KH-Domänen besitzt (Farina et al., 2003; Ross et al., 1997). KH-Domänen können einander ersetzen, wie es bei Scp160p nachgewiesen werden konnte (Brykailo et al., 2007). Sie können einzeln fungieren oder aber als Tandem-Domäne kooperieren, wie es für ZBP1 oder für das humane FMRP gezeigt werden konnte (Farina et al., 2003; Valverde et al., 2007; Valverde et al., 2008). Außerdem können KH-Domänen unabhängig voneinander Nukleinsäuren binden, wie es bei FBP aus *Homo sapiens* gezeigt wurde (*FUSE-binding protein*; Braddock et al., 2002b).

Diese Vielfalt an KH-Domänen-Zusammensetzungen und die Kooperation mit anderen Domänen spiegelt in einer enormen Diversität die Ausübung verschiedenster zellulärer Funktionen wider. Diese Komplexität wird durch die Bindung einzelsträngiger Nukleinsäuren und den darin enthaltenen *cis*-aktiven Elementen verstärkt. Im Weiteren soll auf die Reichhaltigkeit dieser Komplexität eingegangen werden, wobei nur ein Auszug aus Funktionen von KH-Domänen-Proteinen aufgeführt wird.

## 1.5 Funktionen von KH-Domänen-Proteinen

Das bekannteste und best untersuchte Beispiel für KH-Domänen-Proteine ist hnRNP K. Es fungiert in vielen Prozessen der Genexpression, wobei es durch Interaktion mit verschiedenen Faktoren bspw. in der mRNA-Prozessierung und im mRNA-Export Funktionen übernimmt (Bomsztyk et al., 2004; Dreyfuss et al., 1993; Dreyfuss et al., 2002). hnRNP K enthält zum einen drei KH-Domänen, die mit ssDNA (*single stranded*, einzelsträngige DNA) bzw. mRNA interagieren (Braddock et al., 2002a; Ostrowski et al., 2002), und zum anderen drei prolinreiche Motive, welche Protein/Protein-Interaktion vermitteln können, z.B. mit Tyrosinkinasen der Src-Familie (Taylor und Shalloway, 1994; Van Seuning et al., 1995; Weng et al., 1994). Das Protein lokalisiert vorwiegend im Zellkern. Dort kann es unter anderem mit Transkriptionsfaktoren und Spleißfaktoren assoziiert sein (Bomsztyk et al., 1997; Bomsztyk et al., 2004; Mikula et al., 2006). Im Zytoplasma interagiert hnRNP K mit Proteinen, die u.a. in der Translationsinhibition von mRNAs involviert sind. Bspw. bindet hnRNP K im Komplex mit hnRNP E1 das Differenzierungskontrollelement (*differentiation controll element*, DICE) in der 3'UTR der *r15-LOX*-mRNA (*reticulocyte-15-lipoxygenase*), welches für ein Schlüsselenzym der Erythrozyten-Zelldifferenzierung kodiert. Der hnRNP K/E1-DICE-Komplex verhindert die 80S-Ribosomen-Assemblierung, wodurch die Translation der *r15-LOX*-mRNA reprimiert wird (Ostareck et al., 2001; Ostareck et al., 1997; Ostareck-Lederer und Ostareck, 2004). Durch inhibitorische Stimuli, wie z.B. Puromyzin, welches Polysomen destabilisiert, akkumuliert hnRNP K in Stresskörpern (Fukuda et al., 2009; siehe Kapitel 1.2). Diese Beobachtung lässt die Vermutung zu, dass hnRNP

K Ziel-mRNAs durch Bindung schützen kann, da hnRNP K nicht in *P-bodies*, welche in höheren Eukaryoten Orte des mRNA-Abbaus sind, akkumuliert (Fukuda et al., 2009).

Ein weiteres, gut untersuchtes Beispiel ist Khd1p aus *S. cerevisiae*, welches unter anderem für die aktinabhängige, asymmetrische Verteilung der *ASH1*-mRNA am Tochterzellpol gebraucht wird (Gonsalvez et al., 2005; Irie et al., 2002; Müller et al., 2007; Zarnack und Feldbrügge, 2007). Khd1p besitzt, wie hnRNP K, drei KH-Domänen, die innerhalb des offenen Leserahmens der *ASH1*-mRNA *cis*-aktive Elemente binden (Hasegawa et al., 2008). Die Translation während des Transports der *ASH1*-mRNA wird durch Khd1p so lange reprimiert, bis Khd1p die *ASH1*-mRNA am Tochterzellpol entlässt (Paquin et al., 2007). Insgesamt interagiert Khd1p jedoch mit 20% (1210 von 5881) aller mRNAs aus *S. cerevisiae* (Hasegawa et al., 2008). Darunter befinden sich zwölf spitzenlokalisierte mRNAs, die sowohl auf translationeller als auch auf mRNA-Stabilitätsebene von Khd1p reguliert werden, wie bspw. *SRL1*- bzw. *MTL1*-mRNA (Hasegawa et al., 2008; Shepard et al., 2003; Takizawa et al., 2000).

ZBP1 besitzt im Vergleich zu den oben erwähnten Proteinbeispielen neben vier KH-Domänen im N-terminalen Bereich zwei C-terminale RRM-Domänen. ZBP1, welches ein 54 Nukleotid (nt) langes, *cis*-aktives Element in der 3'UTR der  $\beta$ -*Aktin*-mRNA bindet, ist für deren Lokalisation verantwortlich, wodurch die Zellmotilität aufrechterhalten wird (Farina et al., 2003; Kislauskis et al., 1993). Die Minimalsequenz, die durch die Tandem-KH-Domänen 3 und 4 gebunden wird, ist ACACCC (Farina et al., 2003). Das nukleare *zipcode-binding protein 2* (ZBP2), ist ebenfalls für die  $\beta$ -*Aktin*-Bindung notwendig. Hier konnte gezeigt werden, dass die KH-Domänen 1 bis 4 für die Bindung der mRNA verantwortlich sind, wobei poly(C)-reiche Regionen gebunden werden. ZBP2 bindet die  $\beta$ -*Aktin*-mRNA kotranskriptionell. Der Export der  $\beta$ -*Aktin*-mRNA verlangt die Bindung von ZBP1 und ZBP2. Ohne Interaktion von ZBP2 mit der mRNA ist die Effizienz der ZBP1/mRNA-Interaktion verringert (Pan et al., 2007).

Diese Beispiele veranschaulichen die Komplexität der ko- und posttranskriptionellen Prozesse, die durch RNA/Protein- sowie Protein/Protein-Interaktionen vermittelt werden können. Ferner zeigt sich, dass Multifunktionalität bei RNA-bindenden Proteinen eine große Rolle spielt und diese in Eukaryoten konserviert ist. Weniger gut untersucht sind KH-Domänen-Proteine in filamentösen Pilzen. Hier gibt es RNA-bindende Proteine, die ebenfalls in höheren Eukaryoten konserviert sind. Ein Beispiel ist Khd5 aus *U. maydis*, welches mit seinen elf vorhergesagten KH-Domänen Homologien zu Scp160p aus *S. cerevisiae* sowie Vigilin aus bspw. *Xenopus laevis* aufweist (Becht et al., 2005; McKnight et al., 1992; Wintersberger et al., 1995). Scp160p besitzt Funktionen in der Chromosomen-Segregation sowie in der Lokalisation und mRNA-Abundanz von spezifischen mRNAs (Li et al., 2003; Weber et al., 1997; Wintersberger et al., 1995).

Hingegen sind die Funktionen pilzspezifischer KH-Domänen-Proteine, wie bspw. Khd4 aus *U. maydis* (Becht et al., 2005), noch weitgehend unbekannt.

## 1.6 Khd4 aus *U. maydis*

Das Multi-KH-Domänen-Protein Khd4 aus *U. maydis*, welches eine Größe von 1416 Aminosäuren besitzt, wurde durch einen revers-genetischen Ansatz ermittelt und charakterisiert (Becht, 2005; Becht et al., 2005; Haag, 2008; Vollmeister, 2005). Die Deletion von *khd4* führt zur Ausbildung eines pleiotropen Phänotyps. Dies äußert sich in einer gestörten Zellmorphologie, reduzierter Filamentbildung und hat Auswirkungen auf die Pathogenität (Becht et al., 2005; Haag, 2008). Hierbei wurden die ersten Charakterisierungen mit einem Deletionsstamm durchgeführt, der möglicherweise ein Restprotein von 668 Aminosäuren exprimiert (*khd4* $\Delta^{668-1416}$ ). Innerhalb dieses putativen Restproteins sind die KH-Domänen 1 bis 2a enthalten (siehe Kapitel 2.1). Die später hergestellte Gesamtdeletion von *khd4* führte jedoch zu den gleichen Defekten.

Im haploiden Stadium zeigen Zellen des *khd4*-Deletionsstammes eine abgerundete, zitronenähnliche Morphologie sowie eine bäumchenartige Struktur, welche durch einen Zytokinesedefekt hervorgerufen wird. Des Weiteren sind die Pheromonproduktion und die Konjugationshyphenbildung reduziert (Becht et al., 2005). Die Konjugationshyphen weisen zudem einen erhöhten Durchmesser auf (Haag, 2008). Zellwandfärbungen von haploiden Sporidien sowie induzierbaren Filamenten des *khd4*-Deletionsstammes zeigen einen Defekt in der Zellwandzusammensetzung (Haag, 2008; Vollmeister, 2005). Bestätigt werden konnte dies durch die enzymatische Degradation der Zellwand. Diese reagierte in *khd4* $\Delta$ -Zellen sensitiver gegenüber dem Zellwandabbau als Zellen des Wildtypstammes (Haag, 2008). Infektionen mit kompatiblen *khd4*-Deletionsstämmen zeigen nur ein Viertel der Wildtyp-ähnlichen Tumorraten an den oberirdischen Pflanzenteilen (Becht et al., 2005). Des Weiteren kann nur ein geringer Teil der ausgebildeten Filamente die Pflanze durch Appressoriumbildung penetrieren, *in planta* proliferieren und ein verzweigtes Myzel bilden (Haag, 2008).

Khd4 lokalisiert vorwiegend zytoplasmatisch und bildet nach Hitzeinduktion, welche in *S. cerevisiae* zur Bildung von *P-bodies* führt, partikuläre Akkumulationen (Vollmeister, 2005; siehe Kapitel 1.2). Mit Hilfe einer C-terminalen Fusion mit dem *TAP tag*-Epitop (Becht et al., 2006; König et al., 2009), welches für den Nachweis von gebundener RNA an Khd4 verwendet wurde, konnte mittels CLIP die zuvor nur bioinformatisch vorhergesagte RNA-Bindung bestätigt werden (*ultraviolet cross-linking and immunoprecipitation*; Ule et al., 2003; Vollmeister, 2005). Die zytoplasmatische Lokalisation von Khd4 sowie der pleiotrope Deletionsphänotyp führen zu der

Hypothese, dass das Multi-KH-Domänen-Protein Khd4 in posttranskriptionellen Regulationsmechanismen eine wichtige Funktion übernimmt.

## 1.7 Zielsetzung der Arbeit

Die zentralen Fragen dieser Dissertation beschäftigen sich mit der Aufklärung der putativen posttranskriptionellen Funktion des RNA-bindenden Proteins Khd4. Durch den pleiotropen Phänotyp, welcher die Deletion von *khd4* hervorruft, scheint Khd4 eine entscheidende Rolle in zellmorphologischen Prozessen und in der Pathogenität zu besitzen. Um diese Funktionen aufzuklären, sollten Mutationsanalysen des Multi-KH-Domänen-Proteins zeigen, welche Regionen bzw. Domänen essentiell für die Funktion von Khd4 sind. Weiterhin war es von entscheidender Bedeutung, die RNA/Protein-Interaktion detailliert zu untersuchen sowie mögliche RNA-Bindungspartner zu identifizieren, die auf eine Verbindung zu dem Phänotyp des Deletionsstammes hinweisen. Zu diesem Zweck sollte einerseits das Hefe-Drei-Hybrid-System verwendet und zum anderen ein transkriptomweites Expressionsprofil mittels *Microarray*-Analyse erstellt werden. Die Charakterisierung eines putativen Bindemotives könnte zum einen potentielle, *in vivo* gebundene Ziel-RNAs direkt ermitteln und zum anderen Auskunft über etwaige regulatorische Funktionen geben.

## 2. Ergebnisse

### 2.1 Aminosäuresequenzvergleiche von Khd4 mit homologen Proteinen aus verschiedenen Eumycota

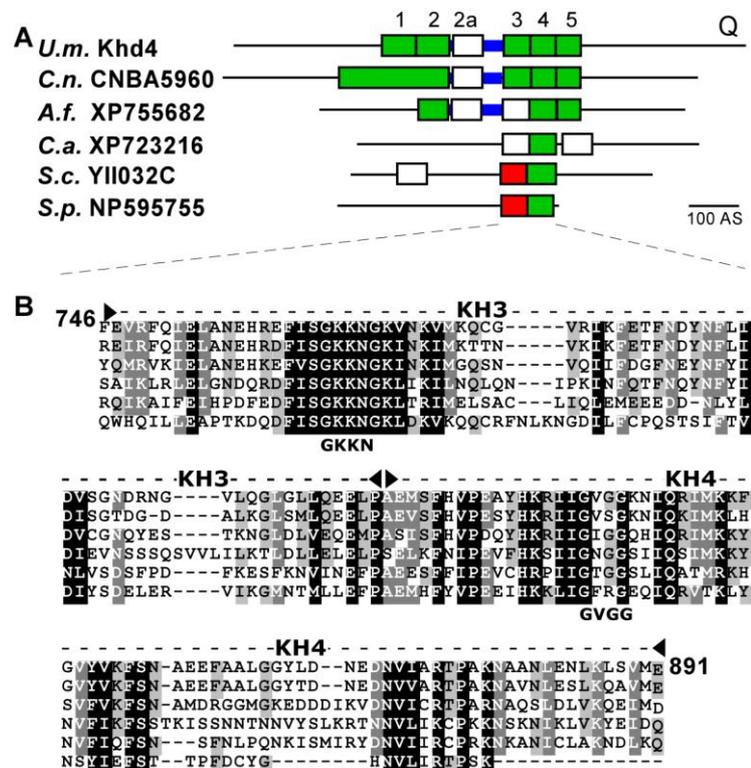
Khd4 wurde anhand der bekannten und weit verbreiteten KH-Domäne bioinformatisch identifiziert und charakterisiert (Becht et al., 2005; Becht, 2005; Siomi et al., 1993).

Um eine genauere Untersuchung der Aminosäuresequenz vorzunehmen, wurde die 1416 Aminosäuren lange Sequenz von Khd4 anhand der SMART-Datenbank analysiert (<http://smart.embl-heidelberg.de/>;

Letunic et al., 2004; Letunic et al., 2009). Khd4 besitzt nach der früheren Identifizierung fünf zentrale KH-Domänen. Neuere Analysen ermittelten eine potentielle sechste KH-Domäne, die sich in der Verbindungsregion zwischen der zweiten und dritten KH-Domäne von Aminosäure 603 bis 666 befindet (Abb. 2.1A, KH2a;  $8 \times 10^{-7}$ ). Diese mögliche KH-Domäne wurde mittels der schnipsel-Datenbank identifiziert (Schmidt et al., 2002). Weiterhin besitzt Khd4 eine C-terminale,

glutaminreiche Region, welche möglicherweise Protein/Protein-Interaktionen vermittelt.

Homologe Proteine von Khd4 finden sich in *Cryptococcus neoformans* und *Aspergillus fumigatus* (entsprechend CNBA5960 (e-Wert 0.0, Identität 61%) sowie XP755682 ( $5 \times 10^{-115}$ , 36%). Vergleich



**Abb. 2. 1 Khd4 sowie homologe Proteine aus verschiedenen Eumycota.** (A) Schematische Darstellung von Khd4 aus *U. maydis* und homologen Proteinen aus *C. neoformans*, *A. fumigatus*, *C. albicans*, *S. cerevisiae* und *S. pombe*. Offene Leserahmen sind maßstabsgetreu als Linien dargestellt, Kästchen zeigen die Positionen der KH-Domänen an. Grün, SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>; Letunic et al., 2004; Letunic et al., 2009), weiß, schnipsel (SCOP, *structural classification of proteins*; Schmidt et al., 2002), rot, anhand des Aminosäurevergleichs aus (B) visuell identifizierte KH-Domänen. Der blaue Balken kennzeichnet die hoch konservierte Verbindungsregion in Khd4 sowie CNBA5960 und XP755682 aus *C. neoformans* und *A. fumigatus* (Tab. 2.1). Q kennzeichnet die glutaminreiche Region (23 aufeinander folgende Qs) am C-Terminus von Khd4. (B) Aminosäuresequenzvergleich der dritten und vierten KH-Domäne von Khd4 mit homologen Proteinen höherer Pilze (Eumycota). Reihenfolge wie in (A). Zahlen kennzeichnen die Position der Aminosäuren aus Khd4. Die Pfeilspitzen mit gestrichelten Linien markieren Start und Ende der KH-Domänen drei und vier. Schwarz unterlegte Buchstaben, 100% identisch; grau unterlegte Buchstaben, 80% identisch; hellgrau unterlegte Buchstaben, 60% identisch. Der Aminosäuresequenzvergleich wurde mittels ClustalX durchgeführt und mittels Genedoc veranschaulicht (siehe Material und Methoden; Nicholas et al., 1997; Thompson et al., 1997).

man die KH-Domänenanordnung von Khd4 mit denen der Proteine CNBA5960 und XP755682, konnte KH-Domäne 1 aus Khd4 nicht in XP755682 aus *A. fumigatus* ermittelt werden (Abb. 2.1A; Tab. 2.1). Die zusätzliche, putative KH-Domäne 2a, welche sich in der hoch konservierten Verbindungsregion von Khd4 befindet, wurde ebenfalls mittels der schnipsel-Datenbank in den homologen Proteinen CNBA5960 sowie XP755682 identifiziert (Abb. 2.1A; Tab. 2.1). Die N- sowie C-terminalen Bereiche von Khd4 sind hingegen nur in *C. neoformans* konserviert (Tab. 2.1). Das entsprechende Protein XP723216 ( $1e^{-29}$ , 24%) aus dem humanpathogenen *Candida albicans* zeigt geringere Homologien zu Khd4. Es enthält drei KH-Domänen, wobei die ersten zwei mit KH3 und KH4 aus Khd4 vergleichbar sind (Abb. 2.1A; Tab. 2.1). Die dritte KH-Domäne aus XP723216 besitzt keine Homologie zur fünften KH-Domäne aus Khd4 (Tab. 2.1).

**Tab. 2. 1 Vergleich verschiedener Bereiche von Khd4 mit homologen Proteinen aus Eumycota**

<i>U. maydis</i> Khd4 <sup>1</sup>	<i>C. neoformans</i> CNBA5960		<i>A. fumigatus</i> XP755682		<i>C. albicans</i> XP723216		<i>S. cerevisiae</i> Yll032C		<i>S. pombe</i> NP595755	
	e- Wert	Identität [%]	e- Wert	Identität [%]	e- Wert	Identität [%]	e- Wert	Identität [%]	e- Wert	Identität [%]
<b>N-Terminus</b> 1 - 410 AS	0.005	55	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>KH1</b> 411 - 503 AS	0.017	54	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>KH2</b> 507 - 593 AS	$2e^{-12}$	43	0.066	27	-	-	-	-	-	-
<b>KH2a</b> 603 - 666 AS	$5e^{-21}$	67	$3e^{-07}$	42	-	-	-	-	-	-
<b>Verbindungsregion</b> 594 - 745 AS	$1e^{-56}$	64	$4e^{-18}$	34	-	-	-	-	-	-
<b>KH3</b> 746 - 815 AS	$7e^{-25}$	75	$4e^{-18}$	55	$1e^{-06}$	38	$1e^{-06}$	46	0.033	31
<b>KH4</b> 816 - 891 AS	$2e^{-31}$	84	$3e^{-18}$	56	$2e^{-06}$	38	$2e^{-07}$	44	$4e^{-06}$	43
<b>KH5</b> 899 - 967 AS	$1e^{-25}$	78	$3e^{-08}$	47	-	-	-	-	-	-
<b>C-Terminus</b> 968 - 1416 AS	$4e^{-20}$	36	-	-	-	-	-	-	-	-

<sup>1</sup> Die angegebenen Aminosäuren (AS) von Khd4 wurden über NCBI *protein blast* in den Organismen *C. neoformans*, *A. fumigatus*, *C. albicans*, *S. pombe* und *S. cerevisiae* auf Anwesenheit überprüft (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Die Ermittlung von homologen Proteinen aus der Bäckerhefe *S. cerevisiae* sowie aus der Spaltheife *Schizosaccharomyces pombe* ergab geringe Übereinstimmungen. Es konnten homologe Regionen zu Khd4 in den Proteinen Yll032C aus *S. cerevisiae* und NP595755 aus *S. pombe* identifiziert werden (Homologie gesamter Proteine entsprechend  $4e^{-15}$  [30%] und  $3e^{-22}$  [25%]). Die Homologie bezog sich auf die KH-Domänen 3 und 4, welche im Aminosäuresequenzvergleich in Abb. 2.1B dargestellt sind (Tab. 2.1). Innerhalb der dritten KH-Domäne war deutlich ein hoch konservierter

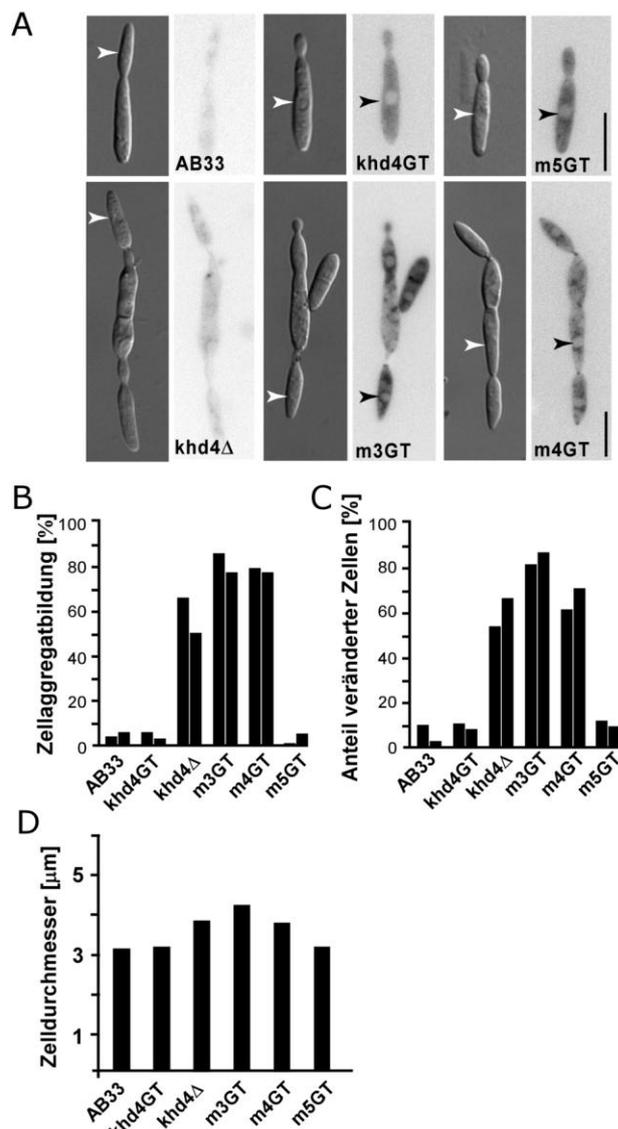
Bereich enthalten. Das gleiche galt für die vierte KH-Domäne. Diese zeigte unter anderem das typische GXXG-Motiv, welches für die RNA-Bindung essentiell ist (Abb. 2.1B; Grishin, 2001). Jedoch besaß einzig Khd4 im Gegensatz zu allen anderen homologen Proteinen am C-Terminus eine glutaminreiche Region.

Dies bedeutet, dass die Homologie der obigen Proteine auf die KH-Domänen begrenzt ist. Die Anordnung dieser ist jedoch nur mit der von Khd4 für die Proteine aus *C. neoformans* und *A. fumigatus* vergleichbar. Des Weiteren besitzt Khd4 eine putative, sechste KH-Domäne, die potentielle Funktionen wie RNA-Interaktion von Khd4 vermitteln könnte.

## **2.2 Untersuchung der biologischen Funktion der Tandem-KH-Domänen 3 und 4 in *U. maydis***

### **2.2.1 Charakterisierung der Zellmorphologie von verschiedenen *khd4*-Stämmen**

Die Analyse der zwei verschiedenen Deletionsstämmen von *khd4* (siehe Einleitung 1.6) deutete an, dass die KH-Domänen 3, 4 und 5 eine essentielle Bedeutung für die Funktion von Khd4 besitzen. Um herauszufinden, welche KH-Domäne von Bedeutung ist, wurden Mutationen in die GXXG-Schleifen dieser KH-Domänen eingefügt (GXXG mutiert zu AAAA; Haag, 2008), welche RNA-bindende Eigenschaften inhibieren sollten (Siomi et al., 1993). Die mutierten Khd4-Varianten wurden C-terminal mit eGfp fusioniert, um zum einen zu zeigen, ob die mutierten Khd4-Varianten exprimiert wurden und zum anderen, ob deren subzelluläre Lokalisation dadurch verändert wurde. Die entsprechenden Gene wurden in den Laborstamm AB33 eingebracht. AB33 enthält den *a2b2*-Genotyp des FB2-Wildtypstammes und trägt ein aktives b-Heterodimer unter der Kontrolle des Promotors  $P_{nar1}$ . Haploide Sporidien dieses Stammes können daher ohne kompatiblen Partner filamentös auswachsen, indem die Stickstoffquelle des Mediums gewechselt wird (siehe Einleitung 1.1). Die resultierenden Stämme werden wie folgt bezeichnet: AB33, AB33khd4GT exprimierte Khd4 mit C-terminal fusioniertem eGfp sowie *TAP tag*, AB33khd4<sup>m3</sup>GT, AB33khd4<sup>m4</sup>GT und AB33khd4<sup>m5</sup>GT exprimierten entsprechend mutierte, eGfp- und *TAP tag*-fusionierte Khd4-Varianten 3, 4 und 5 sowie als Kontrolle AB33khd4Δ (Haag, 2008).



**Abb. 2. 2 Funktionelle Charakterisierung der Khd4-Varianten während des vegetativen Wachstums.**

(A) DIC- (*differential interference contrast*) sowie inverse Gfp-Fluoreszenzaufnahmen der in den Bildern angegebenen Stämme AB33, AB33khd4GT (*khd4GT*), AB33khd4Δ (*khd4Δ*), AB33khd4<sup>m3</sup>GT (*m3GT*), AB33khd4<sup>m4</sup>GT (*m4GT*), AB33khd4<sup>m5</sup>GT (*m5GT*). Pfeilspitzen weisen auf die Kernregion hin (Größenmassstab = 10  $\mu\text{m}$ ). (B) Diagramm zur Quantifizierung von Zellen in einem Zellverband (> 2 Zellen). Angaben in Relation zur Gesamtzellzahl [Prozent]. Die unterschiedlichen Khd4-exprimierenden Stämme sind wie in (A) bezeichnet. Zwei unabhängige Messungen wurden durchgeführt. (C) Diagramm zur Quantifizierung von Zellen mit einer mutierten zitronenförmigen Zellform. Angaben in Relation zur Gesamtzellzahl [Prozent]. Die unterschiedlichen Khd4-exprimierenden Stämme sind wie in (A) bezeichnet. Zwei unabhängige Messungen wurden durchgeführt. (D) Messung des Zelldurchmessers der verschiedenen Khd4-Stämme (wie in (A) bezeichnet). Es wurden jeweils 30 haploide Sporidien an der breitesten Stelle gemessen. Bei den Stämmen AB33khd4Δ, AB33khd4<sup>m3</sup>GT und AB33khd4<sup>m4</sup>GT wurden die Zellen gemessen, welche an den Enden von Zellaggregaten vorkamen und somit nur einen weiteren Zellpartner aufwiesen.

Die Phänotypisierung der haploiden Sporidien zeigte, dass sich die Zellen des Stammes AB33khd4GT wie die Zellen des Wildtypstammes AB33 verhielten (Abb. 2.2A). Auch die Mutation in der fünften KH-Domäne führte zu keiner Veränderung des Phänotyps der Zellen des Stammes AB33khd4<sup>m5</sup>GT. Sie bildeten typische zigarrenförmige Zellen, die teilweise Tochterzellen im Knospungsstadium aufwiesen (Abb. 2.2A). Gegenätzlich ist gezeigt, dass AB33khd4<sup>m3</sup>GT und AB33khd4<sup>m4</sup>GT den gleichen pleiotropen Phänotyp aufwiesen, wie er für AB33khd4Δ sowie für *khd4*-Deletionsstämmen mit einem anderen genetischen Hintergrund bereits beschrieben werden konnte (Becht, 2005; Becht et al., 2005; Haag, 2008; Vollmeister, 2005; Abb. 2.2A). Der Deletionsphänotyp war charakterisiert durch bäumchenartige Zellaggregate. Abgesehen von diesem Zytokinesedefekt war die Zellform dieser Stämme zitronenförmig bis rund. Somit beeinflussten die Mutationen in den GXXG-Schleifen der KH-Domänen 3 und 4 die Funktion von Khd4, was zur Veränderung der Zellmorphologie führte. Hingegen hatte die Mutation in KH-Domäne 5 von Khd4 keinen Einfluss auf die Zellmorphologie.

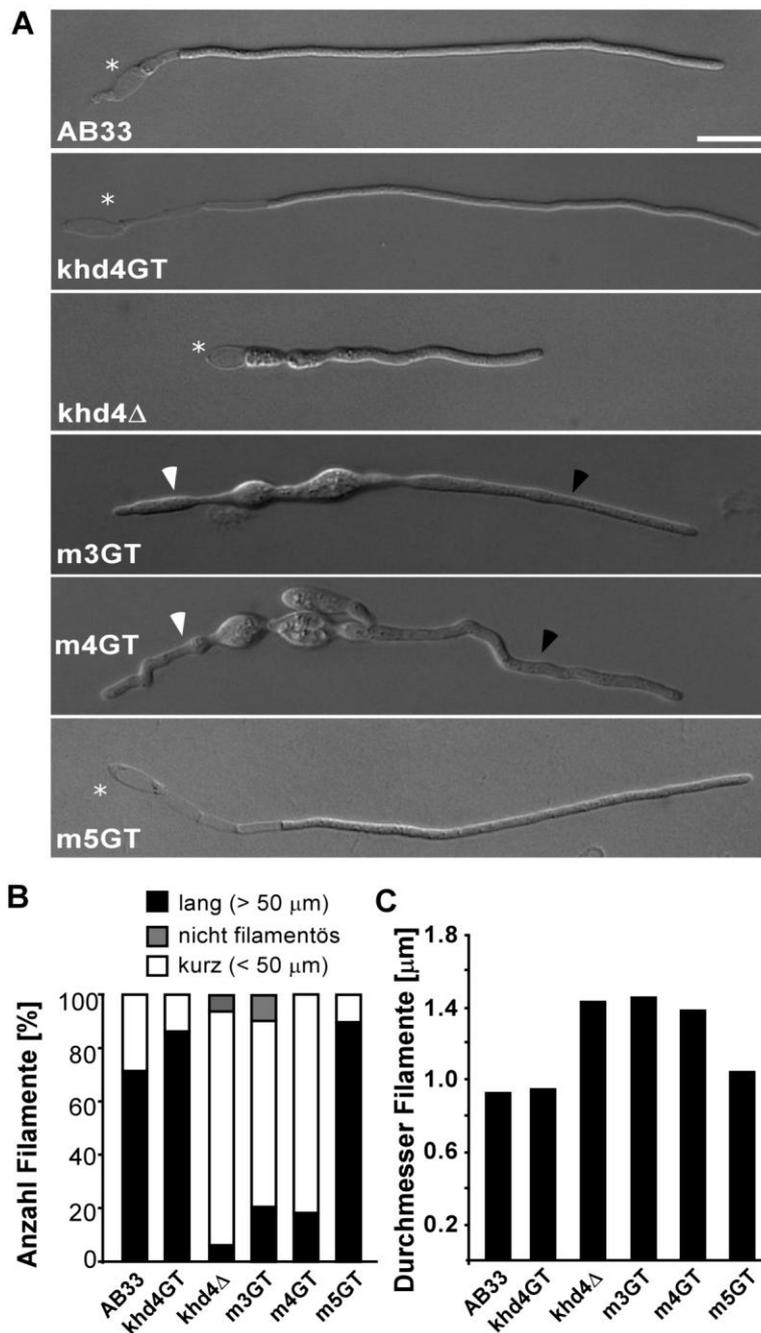
Die Quantifizierung der Zellverbände (mehr als zwei zusammenhängende Zellen) sowie der veränderten Zellform (abweichend von der zigarrenförmigen Zellform des Wildtypstammes), bestätigten die mikroskopische Untersuchung. Während

AB33, AB33khd4GT und AB33khd4<sup>m5</sup>GT eine Zellverbandrate von 2 bis 5% aufwiesen, lag diese bei AB33khd4Δ, AB33khd4<sup>m3</sup>GT und AB33khd4<sup>m4</sup>GT zwischen 59 und 83% (Abb. 2.2B). Der gleiche Effekt war bei der veränderten Zellform zu beobachten. AB33, AB33khd4GT und AB33khd4<sup>m5</sup>GT besaßen in 5 bis 10% der Fälle Zellen, die entweder zitronenförmig bis rund waren oder erkennbare andere Defekte aufwiesen. Im Gegensatz dazu zeigten AB33khd4Δ, AB33khd4<sup>m3</sup>GT und AB33khd4<sup>m4</sup>GT zwischen 57 und 81% Zellen mit einer veränderten Form (Abb. 2.2C). Aufgrund der Zitronenform waren die Zellen im Durchmesser größer, welches quantifiziert wurde. Dazu wurde der Durchmesser von jeweils 30 Zellen der verschiedenen Stämme gemessen (siehe Material und Methoden). Dabei konnte festgestellt werden, dass die breiteste Stelle einer Wildtyp-ähnlichen Zelle durchschnittlich 3 µm betrug (Abb. 2.2D). Auch die Zellen der Stämme AB33khd4GT und AB33khd4<sup>m5</sup>GT waren mit dem Wildtyp-ähnlichen Zelldurchmesser vergleichbar. Hingegen entwickelten die Stämme AB33khd4Δ, AB33khd4<sup>m3</sup>GT, AB33khd4<sup>m4</sup>GT eine leicht erhöhte durchschnittliche Zelldicke von 3,7 bis 4,1 µm (Abb. 2.2D). Diese Analyse unterstützte die mikroskopischen Daten, dass die Zellen des Stammes AB33khd4<sup>m5</sup>GT zu denen des Stammes AB33 vergleichbar waren, während die Zellen der Stämme AB33khd4<sup>m3</sup>GT und AB33khd4<sup>m4</sup>GT denen des *khd4*-Deletionsstammes glichen.

Um zu testen, ob die Mutationen in den KH-Domänen nicht zum Verlust der Proteinexpression und zu einer veränderten subzellulären Lokalisation führten, wurde die eGfp-Fluoreszenz der Khd4-Varianten überprüft. Der Wildtyp AB33 und der *khd4*-Deletionsstamm exprimierten kein eGfp und wiesen somit nur ein sehr schwaches Hintergrundsignal auf (Abb. 2.2A). Hingegen waren in den Stämmen AB33khd4GT und für AB33khd4<sup>m5</sup>GT deutliche eGfp-Signale zu beobachten, die auf vergleichbarem Niveau waren wie AB33khd4GT. Wie es bereits für Khd4 beschrieben werden konnte (Vollmeister, 2005), lokalisierte Khd4GT überwiegend im Zytoplasma, da die Kernregion in der Zellmitte ausgespart blieb (Abb. 2.2A). Die gleiche Lokalisation war für Khd4<sup>m5</sup>GT zu beobachten. Die Zellen der Stämme AB33khd4<sup>m3</sup>GT und AB33khd4<sup>m4</sup>GT zeigten ebenfalls ein deutliches eGfp-Signal. Dieses Signal war innerhalb eines Zellaggregates unterschiedlich stark ausgeprägt und überwiegend zytoplasmatisch. In einigen Zellen der Zellverbände wurden ebenfalls ausgesparte Kernregionen beobachtet (Abb. 2.2A). Der Phänotyp der Stämme, welche Khd4 mit den veränderten KH-Domänen 3 und 4 exprimierten, konnte damit auf die eingefügten Mutationen in der GXXG-Schleife zurückgeführt werden. Somit scheinen die RNA-bindenden Domänen essentiell für die Funktion von Khd4 in *U. maydis* zu sein.

## 2.2.2 Charakterisierung der Filamentmorphologie von verschiedenen *khd4*-Stämmen

Um zu überprüfen, inwieweit die Stämme AB33khd4<sup>m3</sup>GT, AB33khd4<sup>m4</sup>GT und AB33khd4<sup>m5</sup>GT in der Lage waren, filamentös zu wachsen, wurde die Filamentbildung sechs Stunden lang induziert, indem die Stickstoffquelle im Medium gewechselt wurde (siehe Kapitel 1.1). Als Kontrollen dienten AB33, AB33khd4GT sowie AB33khd4Δ. Die Längen der resultierenden Filamente wurden quantifiziert und in drei Kategorien eingeteilt (nicht filamentös, kurz [ $< 50 \mu\text{m}$ ], lang [ $> 50 \mu\text{m}$ ]) sowie der Durchmesser der Filamente bestimmt. Nach sechs Stunden bildeten sich im Wildtypstamm AB33 dünne Filamente aus, die eine durchschnittliche Länge von 80 bis 100  $\mu\text{m}$  erreichten (Becht, 2005; Becht et al., 2006; Abb. 2.3A). Der Stamm AB33khd4Δ bildete nach gleicher Induktionszeit unterschiedlich lange Filamente aus. Die Zellverbände waren in der Lage mehrfach Filamente auszubilden (Abb. 2.3A). Die Quantifizierung zeigte, dass mehr als 71% der AB33-Filamente eine Länge von über 50  $\mu\text{m}$  erreichten, während beim *khd4*-Deletionsstamm nur 6% der Filamente länger als 50  $\mu\text{m}$  wurden und 6% aller Zellen gar nicht filamentös auswuchsen (Abb. 2.3B). In dieser Analyse wurden für die Stämme AB33khd4GT und AB33khd4<sup>m5</sup>GT Filamentbildungen und -längen beobachtet, welche dem Ausgangsstamm AB33 glichen (zwischen 86 und 89% der Filamente wurden länger als 50  $\mu\text{m}$ ; Abb. 2.3A, B). Die Stämme AB33khd4<sup>m3</sup>GT und AB33khd4<sup>m4</sup>GT erreichten in nur 18 bzw. 21% der Fälle eine Filamentlänge von über 50  $\mu\text{m}$ . Beide Stämme zeigten somit auch nach Induktion des filamentösen Wachstums den Phänotyp des *khd4*-Deletionsstammes (Abb. 2.3A). Interessanterweise wuchsen unterschiedlich lange Filamente innerhalb eines Zellverbandes aus den außenstehenden Zellen aus. Demnach reagierten die Zellen innerhalb eines Zellverbandes nicht synchron auf den Stickstoffquellenwechsel und waren somit eigenständig innerhalb eines Zellverbandes. Des Weiteren wurden bei den Filamenten aller hier getesteter Stämme Septen gebildet und leere Abschnitte eingezogen (Abb. 2.3A; Daten nicht gezeigt).



**Abb. 2. 3 Charakterisierung der Filamentbildung verschiedener Khd4-Stämme.** (A) Mikroskopische DIC-Aufnahmen sechs Stunden induzierter Filamente verschiedener Khd4-Stämme. Stammnamen sind entsprechend in den DIC-Aufnahmen aufgeführt (Bezeichnung wie in Abb. 2.2). Weiße Pfeilspitzen markieren kurze, schwarze Pfeilspitzen lange Filamente, Sterne kennzeichnen Septen und leere Abschnitte. Größenmassstab = 10 μm (B) Quantifizierung der Filamentlängen. Ausgezählt wurden mindestens 29 Filamente eines Experiments. Ein Experiment ist exemplarisch gezeigt. Stammesbeschriftung wie in (A). (C) Quantifizierung des Filamentdurchmessers. Jedes Filament wurde an drei Stellen gemessen. Pro Stamm wurden 10 Filamente analysiert. Ein Experiment ist exemplarisch gezeigt. Stammesbeschriftung wie in (A).

Der Durchmesser der Filamente des Stammes AB33 waren durchschnittlich 0,9 μm lang (Abb. 2.3C). Vergleichbare Filamentdurchmesser wurden in den Stämmen AB33khd4GT und AB33khd4<sup>m5</sup>GT beobachtet (0,9 μm und 1 μm). Die Filamente des Stammes AB33khd4Δ wiesen hingegen eine erhöhte Breite auf, welche durchschnittlich 1,4 μm betrug. Entsprechend konnten Filamentdurchmesser von 1,5 μm und 1,4 μm in den Stämmen AB33khd4<sup>m3</sup>GT sowie AB33khd4<sup>m4</sup>GT gemessen werden (Abb. 2.3C). Damit konnte eine statistisch signifikante Erweiterung der Filamentdurchmesser um 44% in den Stämmen AB33khd4Δ, AB33khd4<sup>m3</sup>GT sowie AB33khd4<sup>m4</sup>GT im Vergleich zu

den Stämmen AB33, AB33khd4GT und AB33khd4<sup>m5</sup>GT quantifiziert werden. Folglich entsprach, wie bereits im haploiden Stadium von *U. maydis* beobachtet, auch das filamentöse Wachstum in AB33khd4<sup>m3</sup>GT und

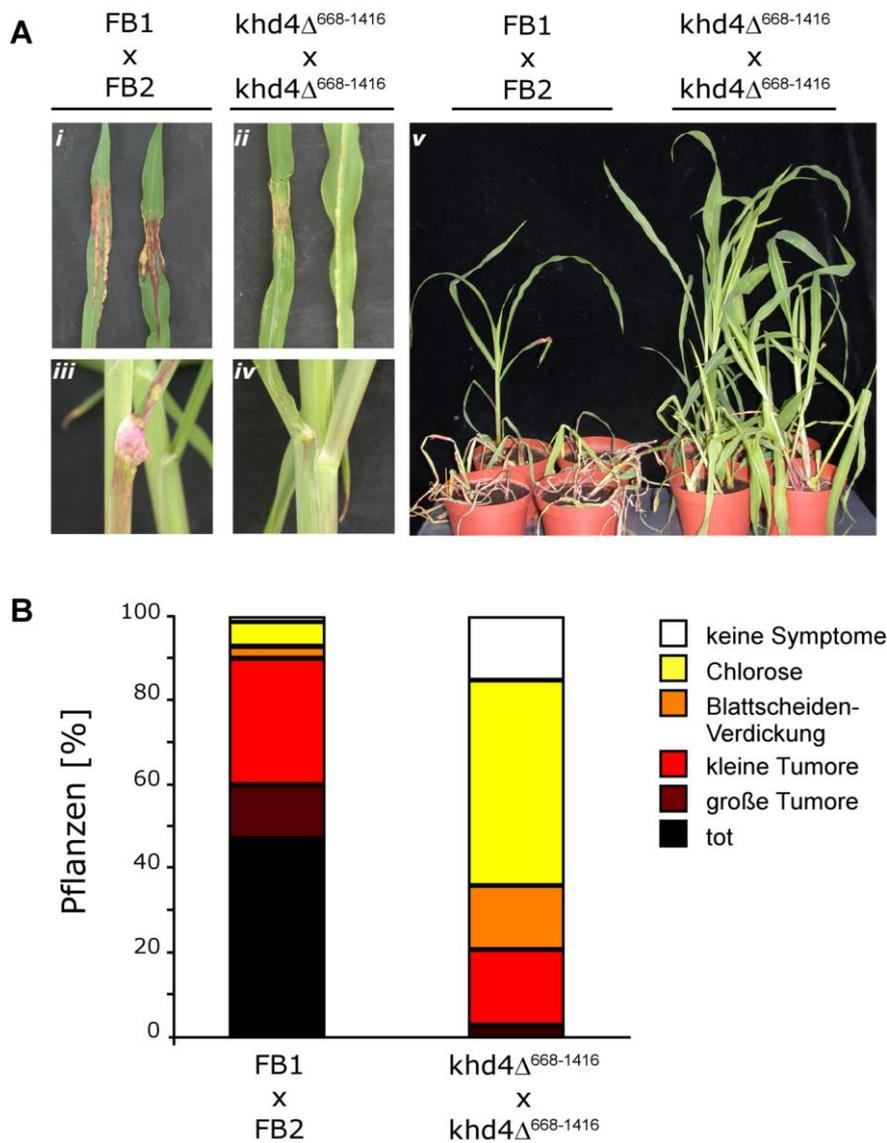
AB33khd4<sup>m4</sup>GT dem AB33khd4Δ-Phänotyp. Somit beeinflussten der Austausch der Aminosäuren GXXG in den KH-Domänen 3 und 4 sporidiales Wachstum und Filamentbildung in *U. maydis*.

### 2.2.3 Filamentbildung und Pathogenität von verschiedenen *khd4*-Stämmen

Einen wichtigen Bestandteil stellte die Untersuchung der Auswirkungen der einzelnen Mutationen in den RNA-bindenden KH-Domänen auf die Pathogenität dar. Dazu wurden vergleichende Pflanzeninfektionsexperimente mit genauer Symptomquantifizierung durchgeführt, um kleinere Unterschiede festzustellen zu können. Dafür wurden folgende Kategorien für die Bonitierung verwendet: (1) keine Symptome, (2) Chlorose-Bildung, (3) Blattscheiden-Verdickung, (4) kleine Tumore (< 5 mm), (5) große Tumore (> 5 mm), sowie (6) tote Pflanzen.

Wie bereits beschrieben, führt die Deletion von *khd4* zu einer reduzierten Tumorrates (16 - 27%; Becht et al., 2005). In dieser Arbeit wurden sieben Tage alte Maiskeimlinge mit einer Kreuzung aus kompatiblen Wildtyp- (FB1 und FB2) sowie entsprechenden *khd4*Δ<sup>668-1416</sup>-Stämmen infiziert (siehe Material und Methoden). Die Auswertung wurde 14 Tage nach der Infektion durchgeführt. Wildtypinfektionen der Stämme FB1 und FB2 zeigten eine Tumorrates von über 90% und bildeten typische Tumore an überirdischen Pflanzenteilen (Abb. 2.4A *i* und *iii*, Abb. 2.4B links). Im Vergleich zeigte die Infektion mit der Kreuzung kompatibler *khd4*Δ<sup>668-1416</sup>-Stämme eine Tumorrates von ca. 20%, wie es bereits in Becht et al., 2005) xx Klammer xx beschrieben wurde (Abb. 2.4B rechts). Der starke Kontrast zwischen beiden Infektionen ist deutlich in Abb. 2.4A zu beobachten (Abb. 2.4A *v*). Während in der Wildtyp-Infektion ca. 50% der Pflanzen bereits abgestorben waren, beobachtete man nach den *khd4*Δ<sup>668-1416</sup>-Stamm-Infektionen grüne, große Maispflanzen, die in weniger als 5% der Fälle große Tumore ausbildeten. Dennoch induzierte der Deletionsstamm verdickte Blattscheiden sowie Tumore auf Blättern (Abb. 2.4A *ii* und *iv*), welches mit der Beobachtung korrelierte, dass der Deletionsstamm in der Lage war, alle Stadien von der Appressoriumbildung über die Proliferation bis hin zur Tumorbildung zu durchlaufen (Haag, 2008).

Für die Analyse der veränderten Khd4-Varianten in Bezug auf die Pathogenität wurden diese in den solopathogenen Laborstamm SG200 integriert (SG200khd4<sup>m3</sup>GT, SG200khd4<sup>m4</sup>GT, SG200khd4<sup>m5</sup>GT), welcher ohne kompatiblen Partner in der Lage ist, innerhalb der Pflanze Tumore zu induzieren (Bölker et al., 1995; siehe Kapitel 1.1). Als Kontrollstamm dienten SG200khd4Δ sowie SG200R, welcher ein zweifaches, zytoplasmatisches *mrfp* (*mono red fluorescent protein*) unter dem konstitutiv aktiven *otef*-Promotor exprimiert (Fuchs et al., 2006) und sich wie der Wildtyp verhält.



**Abb. 2. 4 Qualitative und quantitative Pathogenitätsstudie von kompatiblen Wildtyp- und *khd4* $\Delta^{668-1416}$ -Stämmen.** (A) Qualitativer Nachweis von kleinen Tumoren auf Blättern (*i*, *ii*) sowie Blattscheiden-Verdickungen (*iii*, *iv*) aus Wildtyp- (FB1 und FB2, *i*, *iii*) sowie entsprechende *khd4* $\Delta^{668-1416}$ -Stamm-Infektionen (*ii*, *iv*). *v* zeigt vergleichend die Auswirkungen der Wildtyp- sowie *khd4* $\Delta^{668-1416}$ -Stamm-Infektionen. (B) Quantitative Symptomauswertung infizierter Maispflanzen. Prozentuale Anteile der einzelnen Symptomkategorien. Gezeigt ist die *khd4* $\Delta^{668-1416}$ -Stamm-Infektion mit einer Reduktion der Symptome im Vergleich zur Wildtypinfektion. Die Analyse erfolgte in zwei unabhängigen Experimenten, gezeigt ist das Ergebnis einer Durchführung.

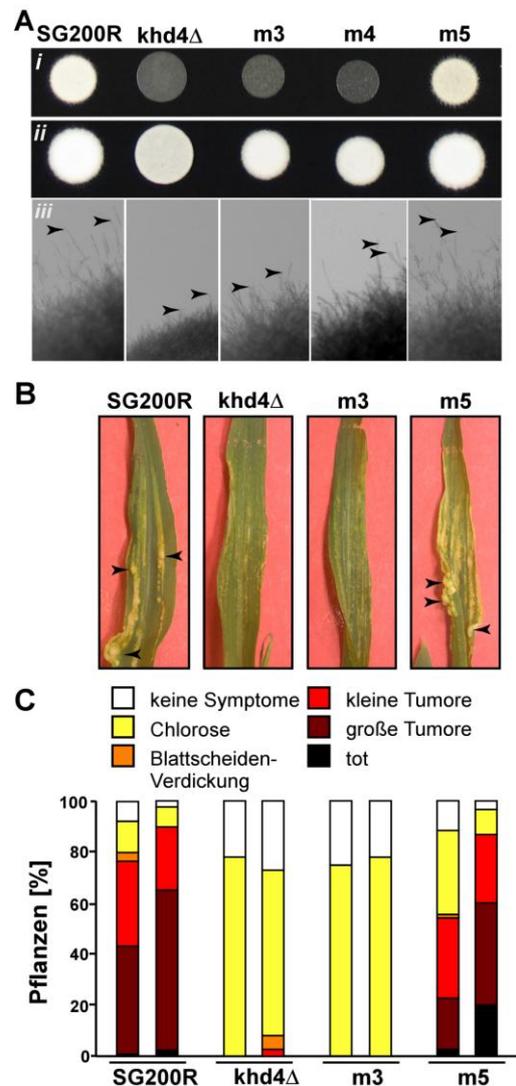
ein glattes Aussehen der Kolonie festgestellt, welches nicht-filamentöses Wachstum implizierte. Die Stämme SG200khd4 $^{m3}$ GT und SG200khd4 $^{m4}$ GT bildeten nach einem Tag wie der *khd4*-Deletionsstamm glatte Kolonien (Abb. 2.5A, *i*). Nach zwei Tagen Wachstum konnten auch bei den Stämmen SG200khd4 $\Delta$ , SG200khd4 $^{m3}$ GT und SG200khd4 $^{m4}$ GT weiße, fusselige Kolonien beobachtet werden (Abb. 2.5A, *ii*). Jedoch war hier die Filamentbildung, konsistent mit der Quantifizierung der Filamentlängen im AB33-Hintergrund, stark reduziert (Abb. 2.5A, *iii*).

Für die Pathogenitätsstudien wurden mit den Stämmen SG200R, SG200khd4 $\Delta$ , SG200khd4 $^{m3}$ GT und SG200khd4 $^{m5}$ GT sieben Tage alte Maiskeimlinge infiziert (siehe Material und Methoden).

Zu Beginn wurde überprüft, wie sich das filamentöse Wachstum der unterschiedlichen *Khd4*-exprimierenden Stämme auf aktivkohlehaltigem Nährmedium ausbildete. Dafür wurden die verschiedenen Stämme auf die entsprechende Nährstoffplatte getropft, wodurch das filamentöse Wachstum hervorgerufen wird. Der Wildtypstamm SG200R zeigte nach einem Tag Wachstum eine weiße, fusselige Kolonie, die ebenfalls für den Stamm SG200khd4 $^{m5}$ GT

beobachtet werden konnte (Abb. 2.5A, *i*). Dagegen wurde beim Deletionsstamm SG200khd4 $\Delta$  nach einem Tag Wachstum

Dabei diente SG200khd4<sup>m3</sup>GT als Repräsentant für SG200khd4<sup>m4</sup>GT, da diese beiden Stämme sich in den bisherigen Analysen identisch verhielten. Abb. 2.5B zeigt Maisblätter 7 Tage nach Infektion. Die mit SG200R und SG200khd4<sup>m5</sup>GT infizierten Pflanzen zeigten Tumore auf der Blattoberfläche (Abb. 2.5B). Dagegen war nach der SG200khd4Δ- und der SG200khd4<sup>m3</sup>GT-Infektion nur Chlorose-Bildung erkennbar. Die quantitative Auswertung der Replikate nach 14 Tagen dokumentierte die starke Symptombildung der SG200R- und SG200khd4<sup>m5</sup>GT-Infektionen in Kontrast zu den SG200khd4Δ- und SG200khd4<sup>m3</sup>GT-Infektionen (Abb. 2.5C). 55 bis 90% der infizierten Pflanzen zeigten starke Symptome wie Blattscheiden-Verdickung und Tumore auf oberirdischen Pflanzenteilen nach SG200R- und SG200khd4<sup>m5</sup>GT-Infektionen. Nach SG200khd4Δ- und SG200khd4<sup>m3</sup>GT-Infektionen zeigte die Mehrheit (75 – 80%) der infizierten Pflanzen nur geringe Symptombildung wie Chlorose-Bildung. Des Weiteren waren keine Unterschiede in der Symptomausprägung zwischen SG200khd4Δ und SG200khd4<sup>m3</sup>GT vorhanden (Abb. 2.5C). Demzufolge führte die Mutation in der KH-Domäne 3 nicht nur während des sporidialen Wachstums zum Funktionsverlust von Khd4, sondern auch wie die Deletion zu einem starken Virulenzverlust.

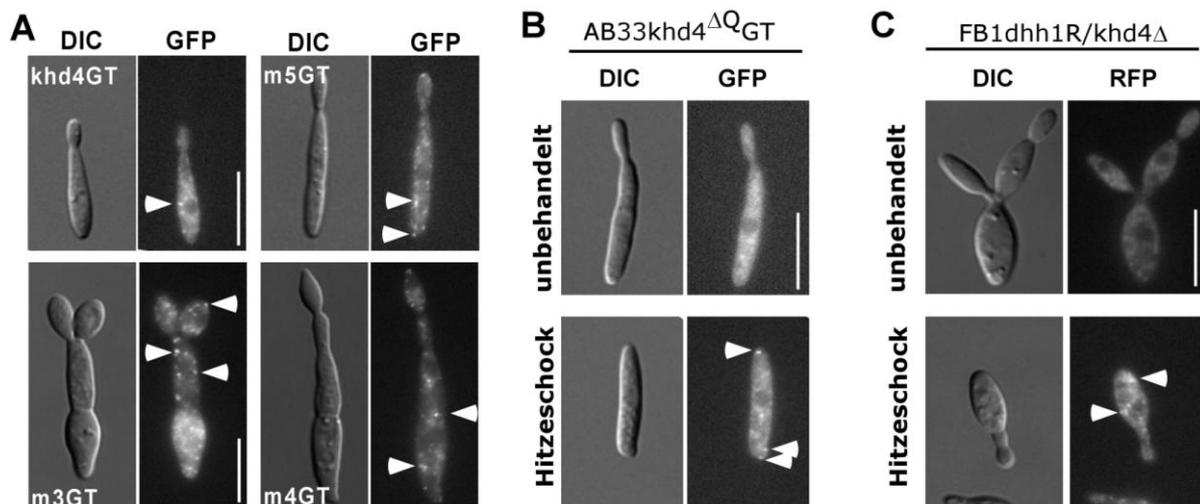


**Abb. 2. 5 Auswirkungen der verschiedenen Khd4-Varianten auf Filamentbildung und Pathogenität.** (A) Filamentbildung auf aktivkohlehaltigem Nährmedium. Übersichtsbild der Filamentbildung von den Stämmen SG200R, SG200khd4Δ (khd4Δ), SG200khd4<sup>m3</sup>GT (m3GT), SG200khd4<sup>m4</sup>GT (m4GT) und SG200khd4<sup>m5</sup>GT (m5GT) nach einem (*i*) und zwei Tagen Wachstum (*ii*). (*iii*) Vergrößerungsausschnitt der Filamente aus (*ii*) auf aktivkohlehaltigem Nährmedium. Zur Verbesserung der Abbildung invertiert. (B) Photographische Darstellung der Symptombildung nach 12tägiger Infektion verschiedener Khd4-exprimierender Stämme auf Blättern von Maispflanzen. Pfeilspitzen kennzeichnen Tumore. (C) Quantitative Symptomauswertung nach Pflanzeninfektionsexperimenten. Analyse und Darstellung wie in Abb. 2.4. Gezeigt sind zwei unabhängige Experimente pro Stamm.

### 2.3 Weiterführende subzelluläre Lokalisationsstudien von Khd4 und Khd4-Varianten

Um einen Einblick in den Mechanismus von Khd4 zu bekommen, wurde die zytoplasmatische Khd4-Partikelbildung, die nach fünfminütiger Hitzestressinduktion sichtbar gemacht werden kann, genauer untersucht (Vollmeister, 2005). Die Assemblierung dieser Partikel wurde in *S. cerevisiae* beschrieben und als *P-body*-Assemblierung bezeichnet (Teixeira et al., 2005; siehe Kapitel 1.2).

Als erstes wurde der Einfluss des Austauschs der Aminosäuren in den KH-Domänen 3, 4 und 5 überprüft. Dazu wurden die Stämme AB33khd4GT, AB33khd4<sup>m3</sup>GT, AB33khd4<sup>m4</sup>GT und AB33khd4<sup>m5</sup>GT einer 5 bis 10 minütigen Stressinduktion unterzogen (siehe Material und Methoden). Das Protein Khd4GT zeigte die bekannte zytoplasmatische Partikelbildung (Abb. 2.6A). Für die Proteine Khd4<sup>m3</sup>GT, Khd4<sup>m4</sup>GT und Khd4<sup>m5</sup>GT konnten vergleichbare Partikelbildungen beobachtet werden. Somit beeinflussten zwar die mutierten KH-Domänen 3 und 4 die Funktion von Khd4, führten jedoch weiterhin zur stressinduzierten Partikelbildung von Khd4<sup>m3</sup>GT und Khd4<sup>m4</sup>GT. Auch Khd4<sup>m5</sup>GT konnte in stressinduzierten Partikeln akkumulieren.



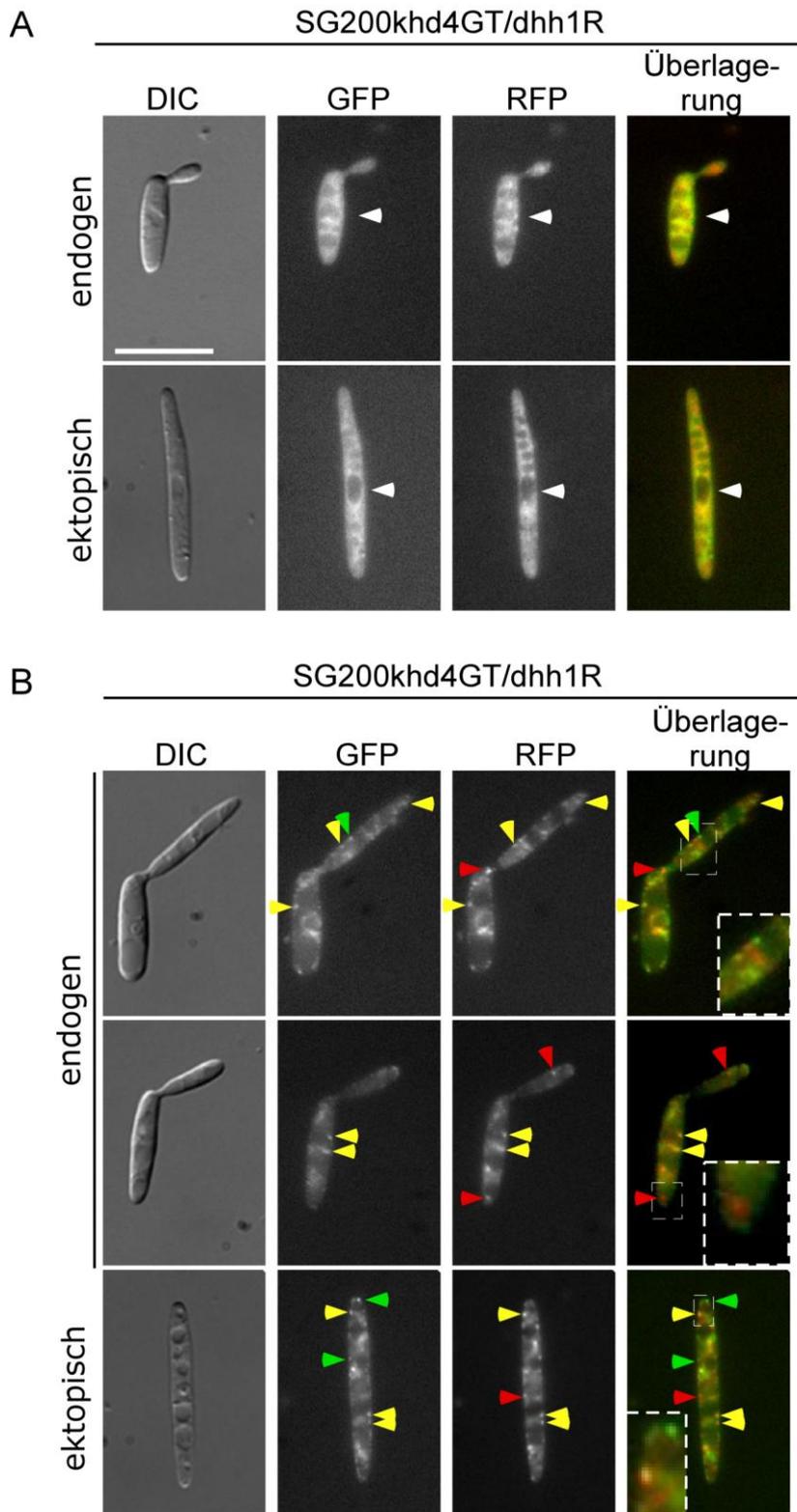
**Abb. 2. 6 Weiterführende subzelluläre Lokalisationsstudien von Khd4 und Khd4-Varianten.**

(A) Mikroskopische Aufnahmen zur Untersuchung der stressinduzierten Partikelbildung der verschiedenen Khd4-Varianten (siehe Material und Methoden). Stammnamen wie in Abb. 2.2A gekennzeichnet. Gezeigt sind Gfp-Fluoreszenzaufnahmen. Pfeilspitzen kennzeichnen Partikel der Khd4-Varianten. Größenmassstab = 10  $\mu$ m. (B) Mikroskopische Aufnahmen haploider Sporidien unbehauelter und hitzebehandelter Zellen des Stammes AB33khd4<sup>ΔQ</sup>GT (siehe Material und Methoden). Pfeilspitzen markieren in GFP-Aufnahmen stressinduzierte Partikelbildung. Größenmassstab = 10  $\mu$ m. (C) Mikroskopische Aufnahmen haploider Sporidien unbehauelter und hitzebehandelter Zellen des Stammes FB1dhh1R/khd4 $\Delta$ . Pfeilspitzen markieren Partikel bzw. *P-bodies* von Dhh1R nach Stressinduktion. Größenmassstab = 10  $\mu$ m.

Aus der Literatur ist bekannt, dass glutaminreiche Regionen in Proteinen, die mit *P-bodies* oder Stresskörpern assoziieren, bei Protein/Protein-Interaktionen eine Rolle spielen (Abaza und Gebauer, 2008; Gilks et al., 2004; Reijns et al., 2008). Um eine Funktion der glutaminreichen Region von Khd4 in dieser Hinsicht zu testen, wurde diese deletiert und das verbleibende *khd4*-Fragment C-terminal mit eGfp sowie *TAP tag* fusioniert (Khd4<sup>ΔQ</sup>GT; in Zusammenarbeit mit C. Haag). Als Kontrollstamm wurde der Stamm AB33khd4GT verwendet (Daten nicht gezeigt). Für die Überprüfung des resultierenden Stammes AB33khd4<sup>ΔQ</sup>GT wurde dieser sowie AB33khd4GT in Flüssigkultur angezogen und mikroskopiert. Wie AB33khd4GT zeigte AB33khd4<sup>ΔQ</sup>GT im haploiden Stadium eine dem Wildtyp ähnliche, zigarrenförmige Zellmorphologie (Abb. 2.6B). Damit beeinträchtigt die Deletion der glutaminreichen Region dieses Stammes nicht die Zellmorphologie. Um zu prüfen, ob die Deletion der glutaminreichen Region einen Einfluss auf die Partikelbildung hat, wurden die Kulturen nach der bereits oben beschriebenen stressinduzierenden Methode behandelt. Die mikroskopischen Aufnahmen zeigten eine eindeutige Partikelbildung von Khd4<sup>ΔQ</sup>GT (Abb. 2.6B). Damit ist die glutaminreiche Region nicht essentiell für die Assoziation von Khd4 mit *P-bodies* bzw. mit stressinduzierten Partikeln.

Um zu überprüfen, ob Khd4 einen Effekt auf die *P-body*-Assemblierung ausübt, wurde *khd4* in dem Stamm FB1dhh1R deletiert (FB1dhh1R/*khd4*Δ). Dhh1p ist ein Markerprotein von *P-bodies* in *S. cerevisiae* (Teixeira et al., 2005). Dieses zeigt, fusioniert mit mRfp (Dhh1R), nach Stressinduktion in *U. maydis* ebenfalls Partikel- bzw. *P-body*-Assemblierung (Vollmeister, 2005). Die mikroskopischen DIC-Aufnahmen zeigten, dass der typische *khd4*-Deletionsphänotyp ausgebildet wurde (Abb. 2.6C). Die mRfp-Fluoreszenz von Dhh1R bei unbehandelten Zellen zeigte weiterhin eine überwiegend zytoplasmatische Lokalisation, wie es bereits in vorangegangenen Arbeiten nachgewiesen werden konnte (Abb. 2.6C; Vollmeister, 2005). Nach Stressinduktion konnte Dhh1R weiterhin in *P-bodies* akkumulieren (Abb. 2.6C). Somit ist Khd4 nicht an der Assemblierung von *P-bodies* beteiligt.

Um zu testen, ob Khd4 eine Komponente der *P-bodies* darstellt, wurde im SG200-Hintergrund ein Stamm in Zusammenarbeit mit C. Haag hergestellt, der Khd4 C-terminal mit einem eGfp und dem *TAP tag* sowie Dhh1 C-terminal mit einem mRfp fusioniert exprimierte (SG200khd4GT/*dhh1R*). Im unbehandelten Zustand lokalisierten beide Proteine überwiegend zytoplasmatisch, wie es bereits für die Stämme, welche jeweils nur eines der Fusionsproteine exprimierten, gezeigt werden konnte (Vollmeister, 2005; Abb. 2.7A). Nach Induktion von Stress konnte bei beiden Proteinen die typische und bereits beschriebene Partikelbildung beobachtet werden (Abb. 2.7B). Die Überlagerung beider Fusionsproteine zeigte, dass Khd4GT in Dhh1R-markierten *P-bodies* akkumulierte (Abb. 2.7B). Damit unterstützt diese Kolo-kalisation eine posttranskriptionelle, möglicherweise mRNA-destabilisierende Funktion von Khd4. Weiterhin



**Abb. 2. 7 Khd4 kolokalisiert partiell mit *P-bodies*.** (A) Mikroskopische Aufnahmen unbehandelter Zellen des Stammes SG200khd4GT/dhh1R (endogen integriertes dhh1R; ektopisch integriertes dhh1R). Weiße Pfeilspitzen kennzeichnen die Kernregionen. (B) Mikroskopische Aufnahmen stressinduzierter Zellen des Stammes SG200khd4GT/dhh1R (wie in A). Gelbe Pfeilspitzen markieren einige der kolokalisierenden Partikel von Dhh1R und Khd4GT; grüne Pfeilspitzen kennzeichnen Khd4GT-Partikel; rote Pfeilspitzen markieren Dhh1R-Partikel. Weiß unterbrochene Rahmen zeigen Vergrößerungsausschnitte. Größenmassstab für (A) und (B) = 10  $\mu$ m.

zeigte die Überlagerung beider Fluoreszenzaufnahmen, dass einige Khd4- und Dhh1-Partikel in der Zelle nicht kolokalisierten (Abb. 2.7B). Hier bleibt offen, um welche Zusammensetzung es sich bei diesen Khd4-Partikeln handelt. Jedoch scheint Khd4 nicht jedes Dhh1-markierte *P-body* anzusteuern.

Zusammenfassend konnte hier gezeigt werden, dass Khd4 partiell mit *P-bodies* kolokalisierte, welche für den mRNA-Abbau in 5' nach 3' Richtung bekannt sind. Die glutaminreiche Region spielte zumindest bei der Partikelbildung keine essentielle Rolle, jedoch sind Kolokalisationsexperimente zwischen Khd4<sup>ΔQGT</sup> und Dhh1R notwendig, um zu klären, inwieweit Khd4<sup>ΔQGT</sup> in der Lage ist, in *P-bodies* zu assemblieren. Somit könnte Khd4 destabilisierend auf putative Ziel-mRNAs wirken.

## 2.4 Identifizierung einer potentiellen Bindesequenz und Analyse von Bindeeigenschaften von Khd4

### 2.4.1 Identifizierung einer potentiellen Bindesequenz mit Hilfe des Hefe-Drei-Hybrid-Systems

Mit Hilfe des reversen Hefe-Drei-Hybrid-Systems (König, 2003; Sengupta et al., 1999; König et al., 2007) wurde in Zusammenarbeit mit dem Fortgeschrittenenkurs der Molekulargenetik (WS 05/06) sowie innerhalb des Praktikums von Thomas Pohlmann und des Laborpraktikums von Sebastian Baumann ermittelt, welche Sequenzen von Khd4 *in vivo* gebunden werden. Das reverse Hefe-Drei-Hybrid-System besteht aus drei Teilen, einem DNA-bindenden Teil, einem RNA-Hybrid und einem Köder (Abb. 2.8A). Die DNA-Bindungsdomäne enthielt LexA als DNA-Binder, welcher *lexA*-Operatoren stromaufwärts von genomisch integrierten Reporter genen erkennen und binden konnte. Am C-Terminus von LexA war das RNA-bindende Protein MS2-CP (MS2 coat protein) fusioniert. Dieses erkannte eine definierte MS2-Bindesequenz, welche an eine auf genomischer DNA aus *U. maydis* basierte RNA-Bibliothek kloniert war (50 - 250 bp Insertgröße; König, 2003). Das Köderprotein bildete ein verkürztes Khd4-Derivat. Die glutaminreiche Region am C-Terminus wurde deletiert, um potentielle transkriptionsaktivierende Funktionen ausschließen zu können (Gerber et al., 1994; Triezenberg, 1995). Khd4 war weiterhin N-terminal mit einer Aktivierungsdomäne (A) und C-terminal mit einem eGfp fusioniert (Khd4AG). Das resultierende Gen *khd4AG* kodierte somit für ein 1675 AS langes Protein. Mittels eGfp-Fluoreszenz wurde die Expression von Khd4AG überprüft. Die Aktivierungsdomäne schaltete die Reporter genexpression (*HIS3*, *lacZ*) an, sobald eine Interaktion zwischen Khd4AG und einer Sequenz aus der RNA-Hybrid-Bibliothek stattfand. Das Reporter gen *HIS3* kodierte für einen Auxotrophie marker, das *lacZ*-Gen exprimierte die  $\beta$ -Galaktosidase. Zur Selektion gegen falschpositive oder selbstaktivierende Kandidaten wurde im *khd4*-tragenden Plasmid ein *ADE2*-Gen eingefügt, welches bei Verlust des *khd4AG*-tragenden Plasmids zur Rotfärbung der Hefekolonie führt (König et al., 2007). Das *LEU2*-Gen auf dem Köderprotein-kodierenden Plasmid und das *URA3*-Gen, welches im RNA-Hybrid-Plasmid integriert war, wurden als Auxotrophie marker zur Selektion verwendet.

Durchsucht wurden  $4 * 10^8$  Kolonien, welche auf entsprechenden Selektionsplatten wachsen konnten. 98 Kolonien wurden daraufhin auf ihre Fähigkeit überprüft,  $\beta$ -Galaktosidase zu exprimieren sowie weiße Kolonien zu bilden. Nach Aufreinigung sowie Retransformation der RNA-Hybrid-Plasmide konnten 73 Sequenzen analysiert werden. Die Sequenzierung dieser ergab 45 unabhängige genomische Loci aus *U. maydis* (Tab. 2.2). 20 dieser Sequenzen wurden mRNA-Sequenzen zugeordnet. Davon lagen 13 im offenen Leserahmen, fünf in der 3'UTR und zwei in

der 5'UTR. 25 Sequenzen befanden sich in intergenischen bzw. in Gegenstrangbereichen putativer mRNAs (entsprechend 4 und 21; Abb. 2.8B). Da 44% der Sequenzen mRNAs zugeordnet werden konnten und weder tRNA- noch rRNA-Sequenzen identifiziert wurden, deutet dies auf eine mögliche Rolle von Khd4 in mRNA-Regulationsprozessen, wie bspw. mRNA-Lokalisation, -Stabilität oder Translationskontrolle, hin.

**Tab. 2. 2 Khd4-interagierende Sequenzen aus dem Hefe-Drei-Hybrid-System**

um-Nummer	Annotation (nach MUMDB) <sup>1</sup>	AUACCC-Anzahl	AUACCC-Position <sup>2</sup>	Sequenz-bezeichnung	Chromosom	Nukleotid Position
<b>putativ kodierende Bereiche:</b>						
<i>um10914</i>	related to HOS3 - Trichostatin A-insensitive homodimeric histone deacetylase (HDAC)	2	5	S75	Chr16	342644 bis 342767
<i>um10886.2</i>	conserved hypothetical protein	1	5	S69	Chr12	151089 bis 151184
<i>um11712</i>	putative protein	1	O	S1	Chr06	110702 bis 110789
<i>um02326</i>	conserved hypothetical protein	1	O	S17	Chr05	869286 bis 869379
<i>um11195</i>	related to serine/threonine-specific protein kinase KIN1	1	O	S78	Chr20	121231 bis 121365
<i>um11704.2</i>	conserved hypothetical protein	1	O	S20	Chr05	874810 bis 874869
<i>um01830</i>	related to alpha-aminoadipate reductase	1	O	S3	Chr03	1123721 bis 1123827
<i>um03654</i>	related to poly(rC)-binding protein 3	1	O	S31	Chr10	49977 bis 50097
<i>um00305</i>	related to Splicing factor 3 subunit 1	1	O	S4	Chr01	831153 bis 843153
<i>um04895</i>	putative protein	1	O	S50	Chr15	26723 bis 26813
<i>um00742</i>	conserved hypothetical protein	1	O	S87	Chr01	2205312 bis 2205437
<i>um06509</i>	related to Phenylalanine ammonia-lyase	1	O	S90	Chr03	1622134 bis 1622185
<i>um01296</i>	related to RIX7 - AAA-type ATPase required for biogenesis and nuclear export of 60S ribosomal subunits	1	O	S53	Chr02	1491971 bis 1492018
<i>um04402</i>	related to MTO1 protein involved in mitochondrial tRNA modification	1	O	S12	Chr14	337478 bis 337567
<i>um11409</i>	probable 6-phosphofruktokinase	1	O	S19	Chr06	20386 bis 20527
<i>um03136</i>	putative protein	1	3	S79	Chr08	44687 bis 44828
<i>um05725</i>	probable OPI3 - methylene-fatty-acyl-phospholipid synthase	1	3	S65	Chr16	326875 bis 326952
<i>um04083*</i>	conserved hypothetical protein	1	3	S35	Chr11	652604 bis 652700
<i>um10656</i>	related to DNA primase 48K protein PRI1	1	3	S8	Chr08	643009 bis 643109
<i>um03706.2<sup>#</sup></i>	conserved hypothetical protein	1	3	S42	Chr10	199355 bis 199599
<b>nicht-kodierende Bereiche:</b>						
<b>Gegenstrangbereich:</b>						
<i>um10630</i>	putative protein	2	-	S86	Chr08	890421 bis 890583

<i>um02986</i>	conserved hypothetical protein	1	-	S10	Chr07	541031 bis 541137
<i>um15045</i>	Dyn1 - cytoplasmic dynein heavy chain 1	1	-	S11	Chr05	154373 bis 154542
<i>um01772</i>	related to Aldose 1-epimerase precursor	1	-	S16	Chr03	986047 bis 986123
<i>um00360</i>	hypothetical protein	1	-	S21	Chr01	997346 bis 997429
<i>um10429</i>	probable DNA-dependent RNA polymerase II RPB140 (RPB2)	1	-	S30	Chr12	572653 bis 572741
<i>um00464</i>	putative protein	1	-	S36	Chr01	1321213 bis 1321263
<i>um00064</i>	related to pepsin precursor (aspartate protease)	1	-	S40	Chr01	157765 bis 157827
<i>um05552</i>	conserved hypothetical protein	1	-	S56	Chr18	351226 bis 351311
<i>um01123</i>	related to IKI3 - Subunit of RNA polymerase II elongator histone acetyltransferase complex	1	-	S58	Chr02	951284 bis 951341
<i>um01518</i>	putative protein	1	-	S6	Chr03	260585 bis 260680
<i>um05794</i>	probable YCF1 - Vacuolar full-size ABC transporter, responsible for vacuolar sequestration of glutathione-S-conjugates	1	-	S60	Chr16	542456 bis 542631
<i>um11022</i>	related to SRY1 - 3-hydroxyaspartate dehydratase	1	-	S62	Chr20	211934 bis 212032
<i>um00945</i>	probable ARG6 - n-acetyl-gamma-glutamyl-phosphate reductase	1	-	S74	Chr02	380806 bis 380876
<i>um03347</i>	related to NUM1 - nuclear migration protein	1	-	S77	Chr08	682816 bis 682916
<i>um04818</i>	conserved hypothetical protein	1	-	S80	Chr17	356522 bis 356626
<i>um11195</i>	related to serine/threonine-specific protein kinase KIN1	1	-	S2	Chr20	120259 bis 120313
<i>um01234</i>	putative protein	1	-	S9	Chr02	1307594 bis 1307653
<i>um03862</i>	related to VPS27 - vacuolar protein sorting-associated protein	1	-	S94	Chr10	659962 bis 660038
<i>um01072</i>	conserved hypothetical protein	1	-	S73	Chr02	785422 bis 785500
<i>um01050</i>	Siderophore biosynthesis regulatory protein URBS1	1	-	S46	Chr02	723255 bis 723360

#### Intergenischer Bereich:

<i>um11921</i> to <i>um11922</i>	related to metallothionein related to Chitin deacetylase precursor	1	-	S97	Chr06	601529 bis 601600
<i>um00317</i> to <i>um00318</i>	hypothetical protein related to MRT4 - protein involved in mRNA turnover	1	-	S88	Chr01	871373 bis 871496
<i>um00533</i> to <i>um00534</i>	related to PPR1 - transcription factor regulating pyrimidine pathway conserved hypothetical protein	1	-	S93	Chr01	1548945 bis 1549016
G585P8071R H4.T0	<sup>3</sup> ; Excluded read	1	-	S32	-	-
Contig0.13	<sup>3</sup>	1	-	S14	-	-

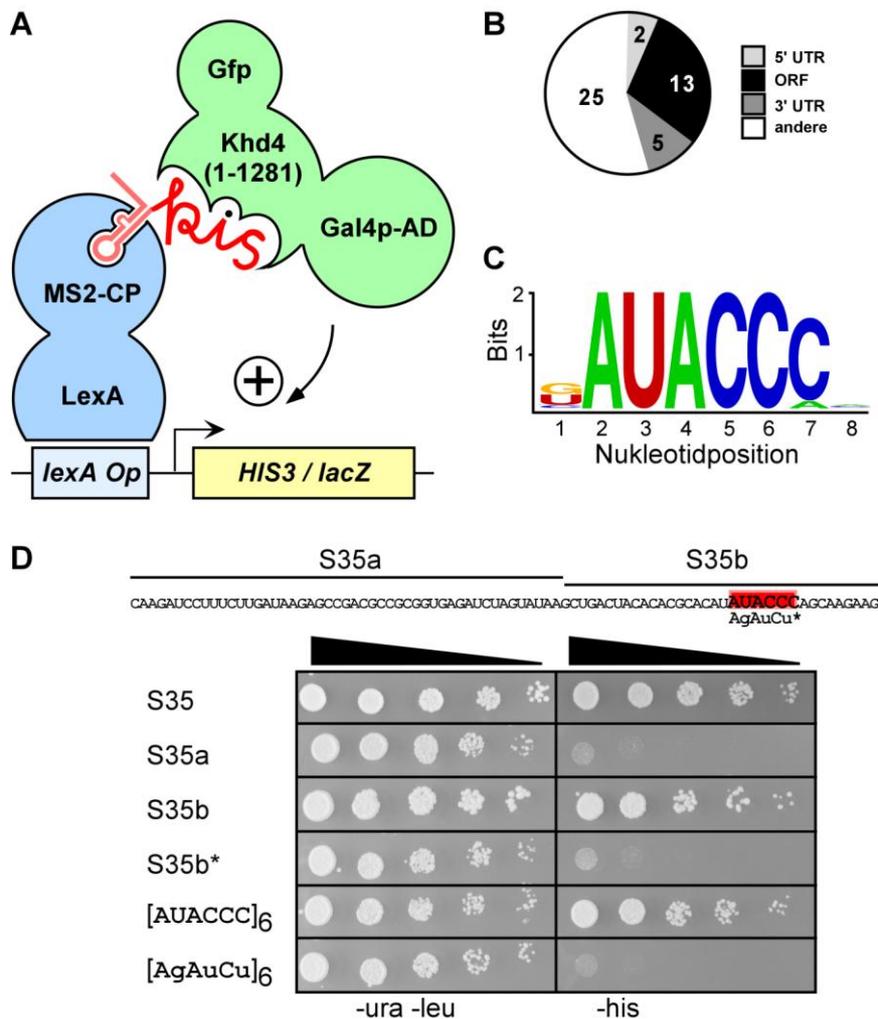
<sup>1</sup> MUMDB, <http://mips.gsf.de/genre/proj/Ustilago/>

\* Sequenz S35, Abb. 2.8D

# ebenfalls in der *Microarray*-Analyse identifiziert; Tab. 2.3

<sup>2</sup> 5, O, und 3 bedeutet 5' UTR, ORF und 3' UTR

<sup>3</sup> ermittelt durch BROAD Institut ([http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/ustilago\\_maydis/Home.html](http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/ustilago_maydis/Home.html))



**Abb. 2. 8 Das Bindemotiv AUACCC von Khd4 ist notwendig und hinreichend für die Interaktion mit Khd4 *in vivo*.** (A) Schematische Darstellung der Hefe-Drei-Hybrid-Systems. Erklärungen siehe Text. (B) Tortendiagramm zur Einteilung der 45 identifizierten Sequenzen mit Hilfe des Hefe-Drei-Hybrid-Systems. Zwei Sequenzen befinden sich in der 5'UTR, 13 im offenen Leserahmen (ORF), fünf in der 3'UTR sowie 25 in intergenischen bzw. in Gegenstrangbereichen (andere). (C) Schematische Darstellung des hoch konservierten Bindemotivs AUACCC aus den Resultaten des Hefe-Drei-Hybrid-Systems. Die absolute Höhe an jeder Stelle gibt den Grad der Konservierung an, die Höhe der einzelnen Buchstaben deren relative Häufigkeit an dieser Position (<http://weblogo.berkeley.edu/>; Crooks et al., 2004). (D) Qualitative Darstellung zum Nachweis, dass AUACCC notwendig für die Bindung an Khd4 ist. S35 aus den Hefe-Drei-Hybrid-Resultaten wurde für eine genauere Untersuchung zweigeteilt. Der vordere Sequenzbereich, als S35a bezeichnet, enthält kein Bindemotiv. Der hintere Bereich, als S35b bezeichnet, enthält AUACCC (rot hinterlegt). Für die Mutationsanalyse wurde das Bindemotiv zu AGAUCU verändert (S35b\*). Der untere Teil der Abbildung zeigt Ausschnitte aus Selektionsplatten, links ohne Uracil und Leucin als Kontrolle für das Vorhandensein beider Plasmide, rechts ohne Histidin zur Selektion auf Reportergenexpression und damit Wachstum resultierend aus der Interaktion zwischen Protein Khd4AG und der jeweiligen Sequenz. Die letzten zwei Reihen zeigen die Analyse des sechsfach wiederholten Bindemotivs ([AUACCC]<sub>6</sub>) sowie der mutierten Sequenz ([AGAUCU]<sub>6</sub>).

Den identifizierten Transkripten konnten teilweise verschiedene funktionelle Kategorien zugeordnet werden. Sechs der insgesamt 20 identifizierten Transkripte kodierten vielversprechend für Proteine des Stoffwechsels, des Zellzyklus und der DNA-Prozessierung sowie der Transkription. Diese Transkripte könnten potentielle Kandidaten darstellen. Jedoch konnten 70% der identifizierten Transkripte bisher keiner funktionellen Kategorie zugeordnet werden (FunCat, MUMDB; <http://mips.gsf.de/genre/proj/Ustilago/>; Wilson et al., 2000). Visuell konnte die Sequenz AUACCC ermittelt werden, welche mindestens einmal in jeder Sequenz enthalten war (Sebastian Baumann, Laborpraktikum). Mit Hilfe des Programms MEME (*Multiple Em for*

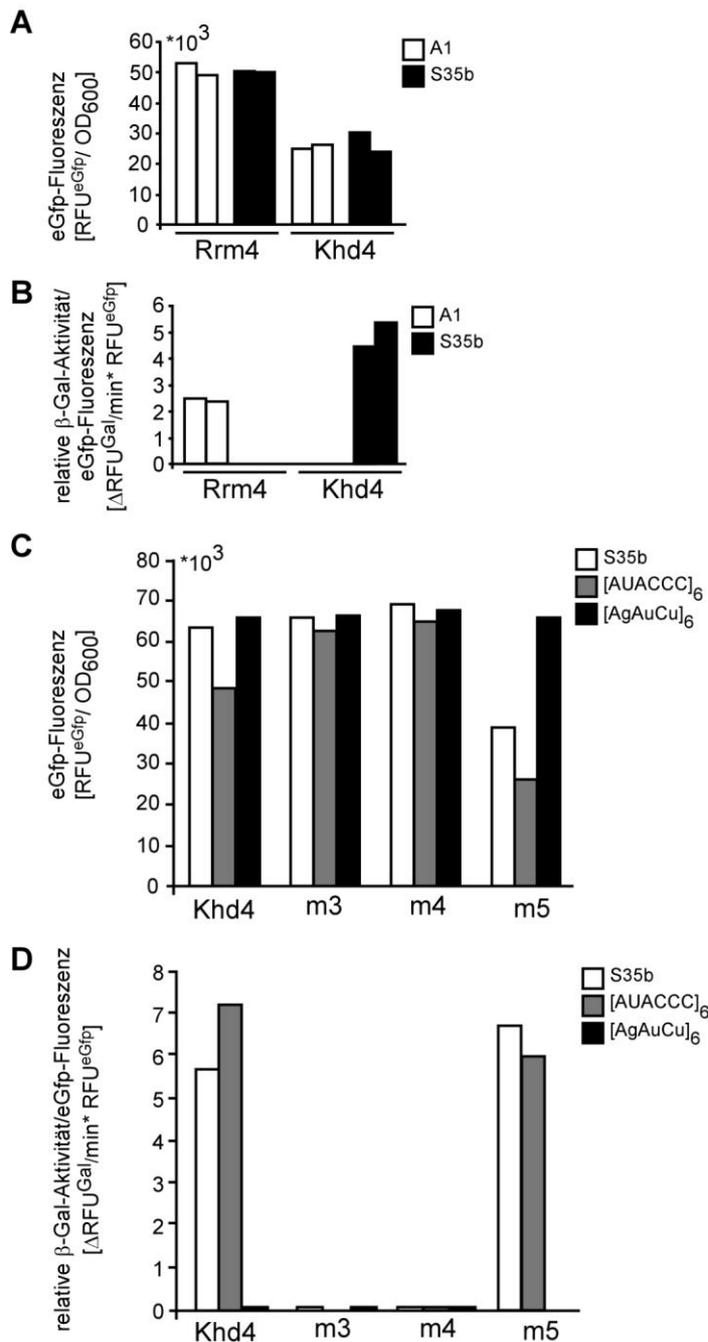
*Motif Elicitation*; <http://meme.sdsc.edu>; Bailey und Elkan, 1994; Bailey et al., 2006) wurde das Motiv AUACCC/A verifiziert (Abb. 2.8C; S. Baumann und M. Feldbrügge, pers. Mitteilung). Dieses Motiv könnte somit ein *cis*-aktives Element darstellen, welches von Khd4 *in vivo* gebunden wird.

Um zu überprüfen, ob dieses Motiv notwendig für die Bindung von Khd4 ist, wurde eine Sequenz aus den Ergebnissen ausgewählt, welche in der folgenden Arbeit als S35 bezeichnet wurde (Sequenz 35; Tab. 2.2). S35 befand sich in der 3'UTR des Gens *um04083*, welches für ein konserviertes, hypothetisches Protein mit einer Länge von 914 AS kodiert (siehe Tab. 2.2). Die 106 nt lange Sequenz wurde geteilt, so dass die ersten 56 nt (S35a) kein AUACCC enthielten, der zweite, 40 nt lange Teil jedoch das Bindemotiv trug (S35b; Abb 2.8D). Diese Sequenzen wurden in den RNA-Hybridvektor integriert und getestet. Khd4 interagierte mit S35 sowie mit S35b, welches durch Wachstum auf der Selektionsplatte gezeigt wurde. S35a wurde hingegen nicht gebunden. Somit erschien kein Wachstum auf der Selektionsplatte. Mutierte man AUACCC in S35b zu AGAUCU (S35b\*), wurde diese Sequenz nicht mehr von Khd4 gebunden. AUACCC ist folglich essentiell für die Bindung von Khd4 *in vivo*.

Es sollte weiterhin überprüft werden, ob AUACCC auch hinreichend für die Khd4-Bindung ist. Dafür wurden Oligonukleotide generiert (siehe Material und Methoden), die zum einen ein sechsfaches Bindemotiv ([AUACCC]<sub>6</sub>) und zum anderen als Kontrolle ein sechsfaches mutiertes Bindemotiv ([AGAUCU]<sub>6</sub>) enthielten. Eine Interaktion konnte zwischen Khd4 und [AUACCC]<sub>6</sub> beobachtet werden (Abb. 2.8D). Jedoch beobachtete man kein Wachstum und folglich keine Interaktion zwischen Khd4 und der mutierten Sequenz [AGAUCU]<sub>6</sub>. Somit war es mit Hilfe des Hefe-Drei-Hybrid-Systems möglich, erstens die Bindesequenz AUACCC von Khd4 *in vivo* zu ermitteln und zweitens zu zeigen, dass diese nicht nur notwendig, sondern auch hinreichend ist.

#### **2.4.2 Charakterisierung der RNA/Protein-Interaktion von AUACCC und Khd4**

Um zu ermitteln, welche KH-Domänen von Khd4 für die Bindung des Elementes AUACCC verantwortlich sind, wurden die KH-Domänen 3, 4 und 5 mutiert (Haag, 2008). Dabei wurden unter anderem die RNA-bindungsrelevanten Aminosäuren GXXG durch vier aufeinanderfolgende Alanine ausgetauscht (Haag, 2008; Valverde et al., 2008). Qualitative Untersuchungen deuteten dabei bereits auf eine Beteiligung der KH-Domänen 3 und 4 für die RNA-Bindung hin (Haag, 2008). Für die quantitative Bestätigung dieser Beobachtung wurde ein  $\beta$ -Galaktosidase-Test gewählt, der die Aktivität des exprimierten Reportergens *lacZ* überprüft. Dafür wurde das fluorogene Substrat 3-Carboxy-Umbelliferyl- $\beta$ -D-Galaktopyranosid (CUG) eingesetzt, welches nach Spaltung durch die  $\beta$ -Galaktosidase die fluoreszierende 7-Hydroxycoumarin-3-Carboxylsäure freisetzt.



**Abb. 2. 9 Relative Quantifizierung von RNA/Protein-Interaktionen von Khd4 und mutierten Khd4-Varianten in Bezug auf die AUACCC-enhaltenden Sequenzen.** (A) Proteinexpression von Rrm4AG (Rrm4) und Khd4AG (Khd4) in Stämmen, die verschiedene RNA-Hybride tragen (markiert in Legende). A1, eine mit Rrm4 interagierende Sequenz (König et al., 2007), S35b, eine der ermittelten mit Khd4 interagierenden Sequenzen. Zwei unabhängige Experimente sind gezeigt. Gemessen wurde die eGfp-Fluoreszenz im Verhältnis zur optischen Dichte bei 600 nm ( $OD_{600}$ ). (B) Relative  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität hervorgerufen durch Interaktion von Rrm4AG (Rrm4) und Khd4AG (Khd4) mit verschiedenen RNA-Hybriden. Die relativen  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten pro min pro eGfp-Fluoreszenz sind dargestellt. (C) Proteinexpression der Khd4-Varianten Khd4AG (Khd4), Khd4<sup>m3</sup>AG (m3), Khd4<sup>m4</sup>AG (m4) und Khd4<sup>m5</sup>AG (m5) in Stämmen, welche verschiedene RNA-Hybride tragen (markiert in Legende). Ein von zwei unabhängigen Experimenten ist exemplarisch aufgeführt. Gemessen wurde die eGfp-Fluoreszenz im Verhältnis zur  $OD_{600}$ . (D) Relative  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität hervorgerufen durch Interaktion von Khd4-Varianten aus (C) mit verschiedenen RNA-Hybriden (markiert in Legende). Die relative  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität pro min pro eGfp-Fluoreszenz ist dargestellt.

Vorab wurde ein Kontrollexperiment entworfen, welches die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität und damit die Interaktion von Khd4 und S35b mit der Positivkontrolle Rrm4/A1 verglich (König et al., 2007). Rrm4 bindet die Sequenz A1 mit einer hohen Affinität (Dissoziationskonstante  $K_D$  von 6 nM; König et al., 2007). Da die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität mit der Dissoziationskonstante korreliert (Hook et al., 2005), wurde hier quantitativ die resultierende Aktivität beider Proteine gemessen. Für die Analyse wurden Khd4AG und Rrm4AG verwendet (König et al., 2007). Um festzustellen, inwieweit die Fusionsproteine exprimiert werden, wurden die relativen Fluoreszenzeinheiten (*relative fluorescence units*; RFU) beider eGfp-Fusionsproteine in Relation zur optischen Dichte (OD bei 600 nm) gesetzt. Diese wurden in Kombination mit den zu testenden Sequenzen A1 und S35b untersucht. Khd4AG wies

im Vergleich zu Rrm4AG eine geringere eGfp-Fluoreszenz auf und war somit schwächer exprimiert als Rrm4AG (Abb. 2.9A).

Für die Analyse der relativen  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität wurde ca. 20 bis 50  $\mu$ g Gesamtproteinextrakt eingesetzt (siehe Material und Methoden). Die Steigung der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität pro Minute wurde ermittelt und in Relation zur eGfp-Fluoreszenz der Köderproteine Rrm4AG und Khd4AG gesetzt. Die Analyse zeigte, dass die Interaktion von Khd4AG und S35b eine stärkere Reporterexpression induzierte als bei Rrm4AG und A1 (Abb. 2.9B). Die Kontrollen, bei denen Rrm4AG mit S35b und Khd4AG mit A1 getestet wurden, zeigten keine  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität und somit keine Interaktion zwischen den jeweiligen RNA/Protein-Komponenten (Abb. 2.9B). Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Interaktion zwischen Khd4AG und S35b eine stärkere Reporterexpression hervorruft als bei der Interaktion zwischen Rrm4AG und A1.

Daraufhin wurden Khd4-Varianten mit den jeweils mutierten KH-Domänen 3, 4 und 5 (mit einer N-terminalen Aktivierungsdomäne und einer C-terminalen eGfp-Erweiterung: Khd4<sup>m3</sup>AG, Khd4<sup>m4</sup>AG und Khd4<sup>m5</sup>AG) auf ihre Bindung zu S35b, [AUACCC]<sub>6</sub> sowie [AGAUCU]<sub>6</sub> getestet. Das Experiment wurde wie bereits oben beschrieben durchgeführt. Die Khd4-Varianten mit entsprechenden Sequenzen wurden ungefähr gleich stark exprimiert wie Khd4AG mit Ausnahme der Kombinationen Khd4<sup>m5</sup>AG/S35b und Khd4<sup>m5</sup>AG/[AUACCC]<sub>6</sub>, welche weniger starke Expressionen zeigten (Abb. 2.9C). Setzte man die relative  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität der einzelnen Varianten in Relation zur eGfp-Fluoreszenz, wurde deutlich, dass die Proteine Khd4<sup>m3</sup>AG und Khd4<sup>m4</sup>AG im Gegensatz zu den Proteinen Khd4AG und Khd4<sup>m5</sup>AG keine der drei Sequenzen binden konnten. Hingegen interagierten Khd4AG als auch Khd4<sup>m5</sup>AG mit S35b und [AUACCC]<sub>6</sub> jedoch nicht mit [AGAUCU]<sub>6</sub> (Abb. 2.9D).

Somit ist es offensichtlich, dass die RNA-Bindung von Khd4AG an AUACCC über die KH-Domänen 3 und 4 vermittelt wird. Die KH-Domäne 5 hingegen scheint nicht essentiell für die Bindung an AUACCC zu sein. Dieses deutet darauf hin, dass die Aminosäuren GXXG für die Funktion der Tandem-KH-Domänen 3 und 4 essentiell sind und diese kooperativ arbeiten.

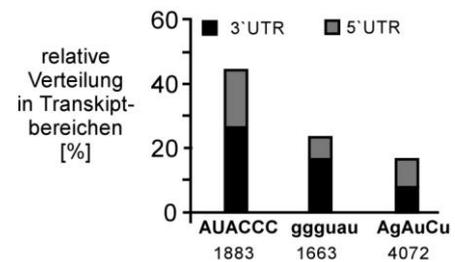
## **2.5 Identifizierung von Ziel-mRNAs mittels bioinformatischer Analysen und Expressionsprofilierung**

### **2.5.1 Genomweite Suche nach potentiellen Ziel-mRNAs in *U. maydis***

Mit Hilfe des Hefe-Drei-Hybrid-Systems unter Verwendung einer genomischen DNA-Bibliothek wurde das *in-situ*-aktive Element AUACCC ermittelt, welches in den identifizierten Sequenzen mindestens einmal vorhanden war. Unter diesen Sequenzen könnten sich putative Ziel-

Transkripte befinden. Da die Identifizierung von Sequenzen durch das Hefe-Drei-Hybrid-System nicht sättigend war, wurde eine bioinformatische Untersuchung in Zusammenarbeit mit G. Mannhaupt (MUMDB, MIPS München, <http://mips.gsf.de/genre/proj/Ustilago/>) durchgeführt. Dabei wurde analysiert, wie oft und in welchen Transkripten das Element AUACCC vorkommt und in welcher Region der mRNA dieses positioniert ist. Als Kontrollelemente dienten zwei Sequenzen, zum einen die Gegenstrangsequenz GGGUAAU und zum anderen die mutierte und in der vorherigen Analyse verwendete Sequenz AGAUCU. Die 5'- bzw. 3'-UTRs wurden jeweils als 300 nt stromaufwärts des Start- bzw. stromabwärts des Stoppkodons definiert.

In der bioinformatischen Analyse wurden 1883 Bindemotive in 1581 putativen Transkripten identifiziert (23%, ausgehend von 6785 Transkripten; MUMDB). Die Kontrollsequenzen ergaben eine Anzahl von 1663 für die Gegensequenz GGGUAAU und 4072 für AGAUCU. Für die Analyse, in welchen Bereichen eines Transkriptes die drei Elemente zu finden sind, wurde die Anzahl gefundener Motive in den Bereichen 5'UTR, ORF und 3'UTR in Relation zur Gesamtzahl identifizierter Motive in einem Diagramm aufgeführt (Abb. 2.10). Zu 45% befindet sich das Element AUACCC im Gegensatz zu den Kontrollsequenzen in der 5'- bzw. 3'UTR. Die Kontrollsequenzen liegen nur zu 17 bis 24% in den untranslatierten Bereichen.



**Abb. 2.10 Graphische Darstellung der Verteilung verschiedener Motive innerhalb der Transkripte.** Bioinformatische Identifizierungen des *cis*-aktiven Elements AUACCC und der zwei Kontrollelemente GGGUAAU sowie AGAUCU im Transkriptom von *U. maydis*. Definiert als 5'- bzw. 3'UTR wurden 300 nt stromaufwärts des Start- bzw. stromabwärts des Stoppkodons. Zahlen unterhalb der Elemente geben die Gesamtzahl der in Transkripten identifizierten Elemente an.

### 2.5.2 Expressionsprofilanalyse zur Identifizierung direkter Ziel-mRNAs von Khd4

Um zu überprüfen, ob potentielle Ziel-mRNAs auf Ebene der mRNA-Menge von Khd4 reguliert werden, sollte eine Expressionsprofilanalyse des Wildtypstamms FB2 und des Deletionsstamms FB2khd4Δ anhand einer *Microarray*-Analyse durchgeführt werden. Die *Microarrays* detektieren die Expression von ca. 90% aller vorhergesagten *U. maydis*-Gene (Scherer et al., 2006). Für die Analyse wurden der Stamm FB2 als Replikat sowie zwei unabhängige Stämme FB2khd4Δ in Minimalmedium angezogen (siehe Material und Methoden). Differentiell regulierte Gene wurden nach folgenden Kriterien identifiziert: (1) Eine mindestens zweifache Änderung der Expression unter Berücksichtigung eines Vertrauensintervalls von 90% sowie einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$ . (2) Die Differenz der Expression eines Gens im Wildtyp- und im FB2khd4Δ-Stamm hat einen Wert von über 50.

Die Expressionsprofilerstellung beider zu vergleichender Stämme ergab eine Anzahl von 72 differentiell regulierten mRNAs (Tab. 2.3). Dabei zeigten 15 eine verringerte Transkriptmenge in FB2khd4Δ, während die Mehrheit (57) eine erhöhte Expression aufwies. Um zu überprüfen, ob die kodierten Proteine der identifizierten Transkripte spezielle Funktionen besaßen, welche eine Korrelation zum Phänotyp des *khd4*-Deletionsstammes zuließen, wurden diese funktionellen Kategorien zugeordnet (FunCat MUMDB; <http://mips.gsf.de/projects/funcat/>; Wilson et al., 2000). Der überwiegende Teil der Gene, die für eine bekannte Funktion kodierten, wirkten innerhalb des Elektronentransports und der Energiekonservierung (*um00123*, *um00844* *sdh2*, *um01212*, *um03246*, *um05038* *acu2*, *um06433* *acu1*, *um10682* *cyb2*, *um11368*, *um11448*;  $p < 0,0002$ ) und/oder besaßen bindende Eigenschaften zu Ionen (Kalium-, Natrium-Bindung; *um06433* *acu1*, *um05083* *acu2*;  $p < 0,002$ ; Fe/S-Bindung; *um00844* *sdh2*, *um01212*, *um11448*;  $p < 0,005$ ; siehe *um*-Nummern in Tab. 2.3). Jedoch war der Hauptteil der identifizierten Transkripte ohne bekannte Funktion (64%). Damit regulierte Khd4 während des sporidialen Wachstums auf Expressionsebene eine geringe Anzahl an mRNAs (1,2%; 72 von 5883 mRNAs des *Microarrays*), die hauptsächlich für Proteine unbekannter Funktion kodierten.

**Tab. 2. 3 Differentiell regulierte Transkripte im Expressionsprofilvergleich von FB2 und FB2khd4Δ**

<i>um</i> - Nummer	Annotation (nach MUMDB) <sup>1</sup>	AUACCC- Anzahl	AUACCC- Position <sup>2</sup>	FB2 vs. FB2khd4Δ <sup>3</sup>	
				Faktorielle Änderung in Relation zu FB2khd4Δ <sup>5</sup>	Irrtums- wahrscheinlichkeit p
<b>Verminderte Expression in FB2khd4Δ:</b>					
<i>um03116</i>	conserved hypothetical protein	-	-	-5.35	9.2E-04
<i>um03115</i>	related to Sge1 - drug resistance protein	-	-	-5.27	2.0E-03
<i>um03246</i>	related to versicolorin b synthase	1	O	-4.35	2.0E-03
<i>um10636</i>	conserved hypothetical protein	-	-	-3.87	2.0E-03
<i>um00132</i>	hypothetical protein	1	O	-3.81	2.0E-03
<i>um03117.2</i>	conserved hypothetical protein	1	5	-3.59	2.1E-03
<i>um01936</i>	related to 4-coumarate-CoA ligase	-	-	-2.89	5.6E-03
<i>um04482</i>	conserved hypothetical protein	-	-	-2.52	6.3E-03
<i>um01902.2</i>	conserved hypothetical protein	-	-	-2.49	7.8E-03
<i>um05952</i>	putative protein	-	-	-2.12	1.0E-02
<i>um05514</i>	conserved hypothetical protein	1	O	-2.11	1.8E-02
<i>um12161</i>	related to lipase family	1	5	-2.08	2.2E-02
<i>um06253</i>	probable DUR3 - Urea permease	1	3	-2.07	1.7E-02
<i>um11129</i>	conserved hypothetical protein	-	-	-2.02	1.5E-02
<i>um00738</i>	conserved hypothetical protein	-	-	-2.00	1.9E-02
<b>Erhöhte Expression in FB2khd4Δ:</b>					
<i>um00723</i>	related to stress response protein rds1p	-	-	2.00	1.5E-02
<i>um03551</i>	related to Glucose oxidase	1	3*	2.03	1.4E-02
<i>um05781.2</i>	hypothetical protein	-	-	2.03	1.5E-02

<i>um06406</i>	related to Peripheral-type benzodiazepine receptor	-	-	2.03	1.4E-02
<i>um11368</i>	probable cytochrome b5	-	-	2.04	1.5E-02
<i>um02172</i>	related to methylglyoxal reductase (NADPH-dependent)	2	O, 3	2.06	1.6E-02
<i>um11922</i>	related to Chitin deacetylase precursor	-	-	2.08	1.5E-02
<i>um01080</i>	4-aminobutyrate aminotransferase	-	-	2.09	1.5E-02
<i>um10871</i>	conserved hypothetical protein	-	-	2.09	1.2E-02
<i>um00264</i>	related to ZAP1 - metalloregulatory protein involved in zinc-responsive transcriptional regulation	2	O	2.13	1.2E-02
<i>um00123</i>	related to L-lactate dehydrogenase (cytochrome b2)	-	-	2.17	1.0E-02
<i>um06335</i>	putative protein	-	-	2.18	2.6E-02
<i>um02227</i>	related to alpha-mannosidase	1	O	2.27	8.9E-03
<i>um04189</i>	related to Cytochrome P450	-	-	2.27	1.0E-02
<i>um05755.2</i>	conserved hypothetical protein	-	-	2.27	1.8E-02
<i>um00748</i>	<b>probable splicing factor 3B subunit 5</b>	2	3*	2.28	8.4E-03
<i>um06336</i>	conserved hypothetical protein	-	-	2.30	8.1E-03
<i>um03169</i>	probable CAR2 - ornithine aminotransferase	-	-	2.31	1.0E-02
<i>um05861</i>	related to FET5 - multicopy oxidase	-	-	2.33	8.9E-03
<i>um10682</i>	probable CYB2 - L-lactate dehydrogenase (cytochrome b2)	-	-	2.34	8.1E-03
<i>um10861</i>	related to Reticuline oxidase precursor	-	-	2.34	8.4E-03
<i>um12320</i>	conserved hypothetical Ustilago-specific protein	-	-	2.37	8.4E-03
<i>um03706.2</i>	<b>conserved hypothetical protein</b>	1	3*	2.43	6.9E-03
<i>um04923</i>	conserved hypothetical protein	-	-	2.47	6.7E-03
<i>um11448</i>	probable NADH-ubiquinone oxidoreductase 23 kDa subunit precursor	1	O	2.56	5.6E-03
<i>um01466</i>	related to acyl-CoA dehydrogenase, long-chain specific precursor	-	-	2.61	7.0E-03
<i>um01134</i>	related to HEM3 - porphobilinogen deaminase	1	O	2.65	5.0E-03
<i>um05422</i>	conserved hypothetical protein	2	O, 3*	2.65	2.1E-02
<i>um04248</i>	putative protein	1	5	2.80	8.0E-03
<i>um03850</i>	probable glutamate synthase (NADPH)	1	5	2.83	3.9E-03
<i>um03140</i>	conserved hypothetical protein	1	O	2.90	7.0E-03
<i>um01439</i>	related to FRE3 - Ferric reductase, reduces siderophore-bound iron prior to uptake	1	5	3.02	5.6E-03
<i>um03063</i>	related to TRM2 - tRNA(m5U54)methyltransferase	-	-	3.08	3.2E-03
<i>um01212</i>	probable flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase	1	O	3.09	3.6E-03
<i>um00844</i>	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein, mitochondrial precursor	-	-	3.12	2.9E-03
<i>um03997</i>	related to MET1 - siroheme synthase	1	O	3.20	2.9E-03
<i>um12098</i>	<b>putative protein</b>	1	3*	3.27	4.0E-03
<i>um05915</i>	conserved hypothetical protein	1	3	3.35	2.5E-03
<i>um10835</i>	related to Cytochrome b561	-	-	3.36	1.0E-02
<i>um02980</i>	probable dihydroxy-acid dehydratase	1	O	3.41	2.4E-03
<i>um04216</i>	related to translation elongation factor HBS1 protein	-	-	3.53	1.8E-02
<i>um05325</i>	conserved hypothetical protein	2	5, 3*	3.57	2.9E-03
<i>um02236</i>	putative protein	-	-	3.58	2.1E-03

<i>um10403</i>	conserved hypothetical Ustilago-specific protein	-	-	3.65	3.1E-03
<i>um06334</i>	related to beta 1,4-mannosyltransferase (egghead protein)	-	-	3.77	2.0E-03
<i>um05840</i>	putative protein	-	-	3.89	6.3E-03
<i>um00027</i>	putative protein	-	-	3.93	2.0E-03
<i>um00842</i>	probable aflatoxin efflux pump AFLT	-	-	4.12	2.1E-03
<i>um02774</i>	related to alternative oxidase precursor, mitochondrial	-	-	4.32	2.0E-03
<i>um01953</i>	conserved hypothetical protein	1	O	4.51	2.9E-03
<i>um11873</i>	hypothetical protein	-	-	4.88	1.1E-03
<i>um03923</i>	conserved hypothetical protein	1	3*	5.25	4.0E-03
<i>um00573</i>	conserved hypothetical protein	1	3*	5.30	2.0E-03
<i>um01351</i>	putative protein	-	-	6.08	8.5E-04
<i>um05038</i>	K, P-type ATPase (mediates high-affinity potassium or sodium uptake)	-	-	6.18	4.0E-03
<i>um04193.2</i>	probable ABP140 - actin filament-binding protein / conserved hypothetical protein	1	Intron <sup>4</sup>	11.60	2.9E-04
<i>um06433</i>	K, P-type ATPase	1	3	13.88	2.9E-04

<sup>1</sup>MUMDB, <http://mips.gsf.de/genre/proj/Ustilago/>; fett gedruckt weist auf die Gene hin, welche über Northern Blot verifiziert wurden (Abb. 2.11)

<sup>2</sup>5, O und 3 bedeuten 5' UTR, ORF und 3' UTR

\* bestätigt durch experimentell bestimmte EST-Daten (*expressed sequence tags*; MUMDB)

<sup>3</sup> Vergleich der Expressionsprofile von FB2 und FB2khd4Δ, angezogen in Minimalmedium (siehe Material und Methoden)

<sup>4</sup> Bestätigt durch experimentelle Analyse (siehe Material und Methoden)

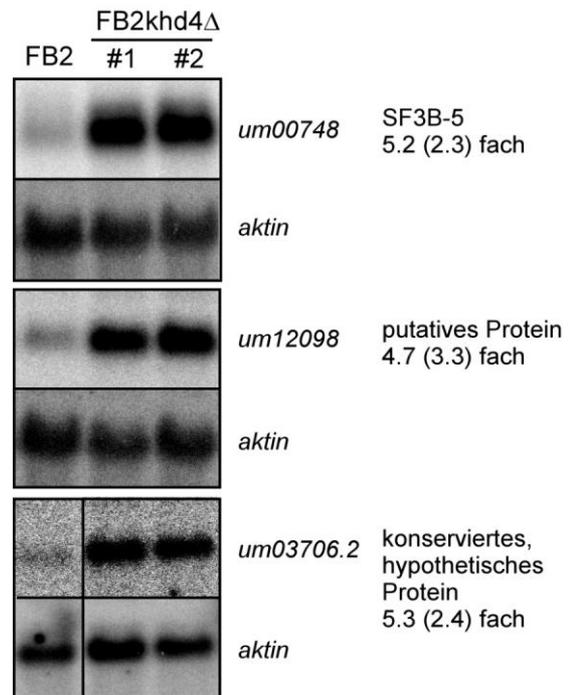
<sup>5</sup> Faktorielle Änderungen der Genexpression unter Berücksichtigung eines 90% - Vertrauensintervalls

Um die identifizierten Transkriptmengen zu verifizieren, wurden Northern-Blot-Analysen mit drei ausgewählten Transkripten durchgeführt. Dabei handelte es sich um *um00748*, welches für die kleine Untereinheit 5 des Spleißfaktors 3B kodiert, sowie um zwei hypothetische Proteine *um12098* und um *um03706.2* (Tab. 2.3). Letzteres konnte bereits in der Hefe-Drei-Hybrid-Analyse identifiziert werden. Die drei Gene zeigten in Bezug auf ihre Transkriptmenge eine Erhöhung im FB2khd4Δ-Stamm. Als Kontrolle diente die *act1*-mRNA (*um05715*). Die Präparation der RNA nach Wachstum der Kulturen in Vollmedium wurde unter Standardbedingungen durchgeführt (siehe Material und Methoden). Für *um03706.2* wurde eine mRNA-Aufreinigung durchgeführt, da die Transkriptmenge in Relation zur Gesamt-RNA zu gering war (siehe Material und Methoden). Für alle drei Transkripte konnte eine Erhöhung der mRNA-Menge in FB2khd4Δ bestätigt werden (Abb. 2.11).

Um zu untersuchen, wie viele der identifizierten mRNAs aufgrund der enthaltenen Bindestelle AUACCC ein direktes Ziel von Khd4 sein könnten, wurden diese bioinformatisch gefiltert. Dabei wurde ermittelt, dass 29 (40%) von 72 Transkripten ein Bindemotiv enthielten. Verglichen mit dem durchschnittlichen Wert von 27% (1270 mRNAs mit AUACCC und im Array transkribiert im Vergleich zu 4786 exprimierten Transkripten aus *U. maydis* [ $> 50$  durchschnittlicher Expressionswert]) sind AUACCC-tragende Transkripte unter den differentiell regulierten Genen angereichert (P-Wert mittels hypergeometrische Verteilung  $3,7e^{-03}$ ).

Weiterhin konnte festgestellt werden, dass 11 von 23 hochregulierten Transkripten (43%) ein AUACCC in der 3`UTR aufwiesen.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass Khd4 unter axenischen Bedingungen 72 (1,2%) Transkripte regulierte, die zu 40% das *cis*-aktive Element AUACCC trugen. Die Mehrheit der regulierten Transkripte war im FB2khd4 $\Delta$ -Hintergrund hochreguliert, wodurch eine Funktion von Khd4 in der Destabilisierung von mRNAs diskutiert werden kann. Eine Verbindung zwischen identifizierten Ziel-Transkripten und dem Phänotyp des *khd4*-Deletionsstammes konnte bisher jedoch nicht

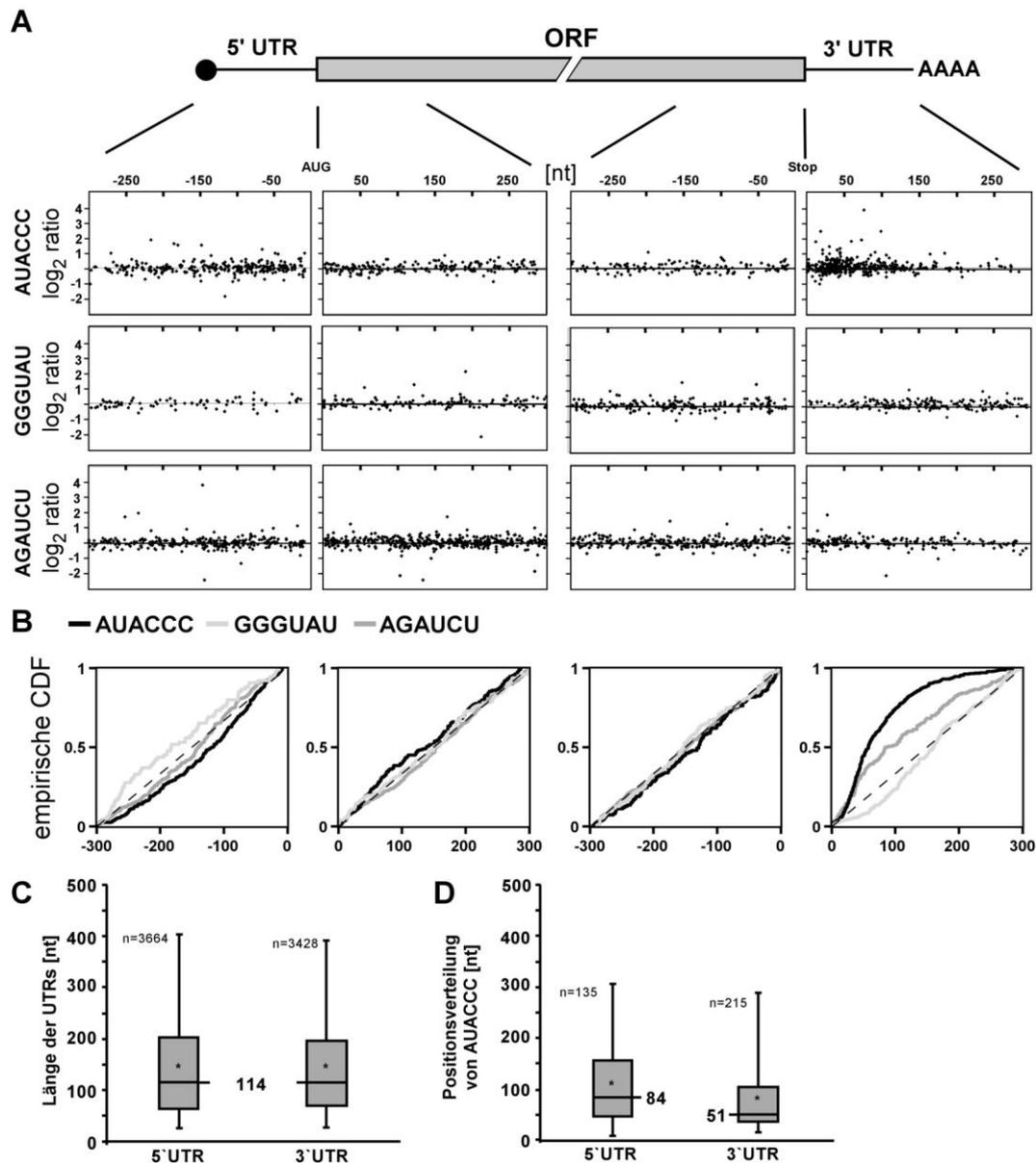


**Abb. 2. 11 Northern-Blot-Analyse für die Verifizierung der Microarrays.** Zweifache Durchführung der Analyse für FB2 in Replikaten (gezeigt ist ein Beispiel) und für 2 unabhängige FB2khd4 $\Delta$ -Stämme (#1, #2). Die getesteten Gene mit Annotation sind rechts aufgeführt, die *act1*-mRNA diente als Ladekontrolle. Für die Berechnung der faktoriellen Änderungen der Transkripte in der Northern-Blot-Analyse, wurden die jeweiligen Transkripte aller Experimente zuerst mit der *act1*-mRNA normalisiert. Die Zahlen zeigen die 100%ige faktorielle Änderung der jeweiligen Transkripte in der Northern-Blot-Analyse, die Zahlen in Klammern die 90%ige faktorielle Änderung der *Microarrays* an.

hergestellt werden.

### 2.5.3 Positionsanalyse des Bindemotivs AUACCC von Khd4 in exprimierten Transkripten

Da sich bereits in der bioinformatischen Analyse aus Kapitel 2.5.1 Anhaltspunkte auf eine Anreicherung des Bindemotivs AUACCC in den untranslatierten Bereichen der mRNA ergeben hatten, die auf eine regulatorische Funktion durch Khd4 hinweisen könnten, wurde eine detailliertere, bioinformatische Analyse durchgeführt. Dafür wurde ein Scatterplot angefertigt, bei dem die Positionen des Bindemotivs innerhalb der auf dem *Microarray* befindlichen Transkripte gegen die faktorielle Änderung der Transkripte aufgetragen wurden. Wie bereits in der vorangegangenen, bioinformatischen Analyse (siehe Kapitel 2.5.1) wurden 300 nt als Bereiche für die 5`- bzw. 3`UTR sowie für die ersten bzw. letzten 300 nt eines offenen Leserahmens definiert (Abb. 2.12A). Verwendet wurden in dieser Analyse nur diejenigen Transkripte, die in einem der beiden Expressionsprofile von FB2 und FB2khd4 $\Delta$  einen Expressionswert von über 50 aufwiesen und somit als exprimiert galten. Als Kontrollsequenzen zum Bindemotiv AUACCC wurden die Gegenstrangsequenz GGGUAU sowie die im Hefe-Drei-Hybrid-System verwendete mutierte Sequenz AGAUCU verwendet.



**Abb. 2. 12** Positionsanalyse des Bindemotivs AUACCC von Khd4 in exprimierten Transkripten. (A) Oberer Teil: Schematische Darstellung einer mRNA. Ein voller Kreis kennzeichnet die 5'-Kappe, ein Strich die 5'UTR; ein gestrichelter Kasten kennzeichnet die ORFs verschiedener Längen; ein Strich mit vier As kennzeichnet die 3'UTR mit Poly(A)-Anhang. Unterer Teil, Scatterplot: die x-Achse (oben vermerkt) bezeichnet jeweils 300 nt der mRNA-Bereiche, mit Strichen markiert, die y-Achse bezeichnet den  $\log_2$  der faktoriellen Änderung der Expression der Transkripte aus den *Microarrays* (bezogen auf die faktorielle Änderungen der Genexpression unter Berücksichtigung eines 90% - Vertrauensintervalls). Vergleichend dargestellt sind die Positionen des Bindemotivs AUACCC sowie der zwei Kontrollen der Gegenstrangsequenz GGGUAU und der mutierten Sequenz AGAUCU. (B) Wilcoxon-Diagramm zur Abbildung der empirischen kumulativen Verteilungsfunktion (CDF, *cumulative distribution function*) von AUACCC (schwarz), GGGUAU (hellgrau) und AGAUCU (dunkelgrau) innerhalb der vier Regionen der mRNA aus (A). (C) Whisker-Diagramm für die Verteilung von experimentell ermittelten 5' und 3'UTR-Längen. Ausgehend von 3664 und 3428 ESTs entsprechend für 5' bzw. 3'UTR wurden folgende Werte ermittelt: 25. Perzentil 62 bzw. 68 nt; 75. Perzentil 202 bzw. 196 nt. Die horizontale Linie kennzeichnet den Median. Der Stern gibt den Mittelwert an: 148 bzw. 147. Die vertikalen Linien geben nach oben bzw. unten jeweils das 95. bzw. 5. Perzentil an. (D) Whisker-Diagramm für die Verteilung von AUACCC in experimentell ermittelten 5' und 3'UTRs. 135 bzw. 215 Transkripte besaßen AUACCC innerhalb der ermittelten 5' bzw. 3'UTR-Länge. 25. Perzentil 46 bzw. 35 nt; 75. Perzentil 157 bzw. 105 nt. Die horizontale Linie kennzeichnet den Median. Der Stern gibt den Mittelwert an: 112 bzw. 83. Die vertikalen Linien geben nach oben bzw. unten jeweils das 95. bzw. 5. Perzentil an.

Die bioinformatische Analyse ergab, dass AUACCC in beiden Bereichen des ORFs gleichmäßig positioniert war (Abb. 2.12A,B). Dem gegenüber konnte eine signifikante Anreicherung von AUACCC in der 3`UTR beobachtet werden. Hierbei wird deutlich, dass innerhalb der ersten 150 nt die stärkste Anreicherung vorlag (Abb. 2.12B,C; P-Wert mittels Wilcoxon-Rank-Sum-Test  $2,2e^{-16}$ ). Interessanterweise konnten allen hochregulierten und ein AUACCC in der 3`UTR enthaltenden Transkripten das Motiv in den ersten 100 nt dieses Bereichs zugeordnet werden. Eine geringere Anreicherung des Elements AUACCC befand sich in der 5`UTR ( $3,7e^{-03}$ ). Die Kontrollsequenzen waren überwiegend gleichmäßig in den entsprechenden mRNA-Regionen verteilt, mit Ausnahme von AGAUCU in der 3`UTR (Abb. 2.12B,C;  $2,4e^{-06}$ ).

Übereinstimmend mit der Anreicherung des Motivs AUACCC in der 3`UTR konnte über experimentell bestimmte UTR-Längen der Median von 114 Nukleotiden sowohl für die 5`UTR als auch für die 3`UTR ermittelt werden (ausgehend von 3664 und 3428 *expressed sequence tags*, ESTs, für entsprechend 5` und 3`UTR; Abb 2.12C). Um zu überprüfen, ob die Motivpositionen von AUACCC innerhalb dieser beiden Regionen in den entsprechenden Transkripten vorkommen, wurden die maximalen UTR-Längen mit den Motivpositionen abgeglichen. Dabei konnten 135 und 215 Transkripte identifiziert werden (entsprechend für AUACCC in der 5` und 3`UTR), in denen die Motivpositionen faktisch innerhalb der entsprechenden UTR-Längen positioniert waren. Die Analyse mittels des Whisker-Diagrammes ergab, dass die häufigsten Positionen von AUACCC innerhalb der 5`UTR um 84 Nukleotide lag (Abb. 2.12D). Im Gegensatz dazu konnte für die Verteilung von AUACCC in der 3`UTR ein Median von 51 Nukleotiden ermittelt werden (Abb. 2.12D). Demzufolge bestätigte diese Analyse die vorherige Hypothese der notwendigen Anwesenheit des Elements AUACCC in der 3`UTR von Transkripten auf experimentell bestimmten UTR-Längen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass AUACCC, welches von Khd4 *in vivo* gebunden wird, ein reguliertes Element darstellt, weil es zum einen in den differentiell regulierten Transkripten angereichert ist und zum anderen in der 3`UTR akkumuliert.

### 3. Diskussion

Für die Entwicklung und Morphogenese eines Organismus sind RNA-bindende Proteine essentiell, da durch Bindung von *cis*-aktiven Elementen in mRNAs zahlreiche zelluläre Funktionen vermittelt werden. Solche ko- und posttranskriptionellen Prozesse werden durch RNA/Protein-, Protein/Protein-Interaktionen, Modifizierungen von RNA-bindenden Proteinen sowie durch umwelt- oder entwicklungspezifische Faktoren beeinflusst (Abdelmohsen et al., 2008; Keene, 2007; Lee und Schedl, 2006). Die Bindung von RNA findet über spezifische RNA-bindende Domänen statt, wie bspw. die KH-Domänen (Siomi et al., 1993; Valverde et al., 2008). In *U. maydis* konnte das Multi-KH-Domänen-Protein Khd4 identifiziert werden, dessen Verlust zu einem pleiotropen Phänotyp im sporidialen und infektiösen Stadium des Pilzes führte (Becht et al., 2005). Zusätzlich ließ die überwiegend zytoplasmatische Lokalisation die Schlussfolgerung zu, dass Khd4 nicht in nukleären, sondern in zytoplasmatischen posttranskriptionellen Prozessen involviert ist, um darüber zellmorphologische Entwicklungsstadien zu regulieren. Eine Vorhersage potentieller Funktionen von Multi-KH-Domänen-Proteinen ist jedoch nicht möglich. In dieser Arbeit wurde die RNA-Interaktion von Khd4 detailliert untersucht und mögliche Ziel-Transkripte identifiziert, um die regulatorische Beteiligung von Khd4 an zellmorphologischen und infektiösen Entwicklungsstadien von *U. maydis* aufzuklären.

#### 3.1 Die Bindestelle AUACCC ist sowohl notwendig als auch hinreichend für die RNA/Protein-Interaktion *in vivo*

Für die Identifizierung gebundener RNA wurde in dieser Arbeit das reverse Hefe-Drei-Hybrid-System mit einer genomischen Bibliothek zum ersten Mal erfolgreich in *U. maydis* angewendet (König et al., 2007; Seay et al., 2006; Sengupta et al., 1999; SenGupta et al., 1996; Stumpf et al., 2008). Dabei wurde die Sequenz AUACCC als Bindestelle von Khd4 ermittelt, da diese mindestens einmal in jeder der 45 identifizierten RNA-Hybridsequenz vorkam und sowohl notwendig als auch hinreichend für die RNA/Protein-Interaktion war. Innerhalb der RNA-Hybridsequenzen konnten weder eine Sekundärstruktur (S. Baumann und M. Feldbrügge, pers. Mitteilung) noch tRNA- oder rRNA-Sequenzen erfasst werden. Hingegen befanden sich unter den identifizierten RNA-Hybrid-Sequenzen bis zu 44% mRNA-Sequenzen. Dies lässt auf eine mögliche Beteiligung von Khd4 an mRNA-metabolischen Prozessen schließen.

Die Bindestärke, mit der Khd4 AUACCC bindet, konnte durch einen Vergleich der relativen  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität von RNA/Rrm4- bzw. RNA/Khd4-Interaktionen charakterisiert werden, da diese direkt mit der Dissoziationskonstante korreliert (Hook et al., 2005). Die Beobachtung, dass die relative  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität der Khd4-Interaktion im Vergleich zur

Rrm4-Interaktion höher war und Rrm4 sein Element bereits mit einer hohen Affinität bindet (König et al., 2007), deutet auch für Khd4 auf eine hoch affine Bindung von Khd4 an AUACCC-enhaltenden RNAs hin.

Die Charakterisierung von RNA/Protein-Interaktionen wurde mit dem Hefe-Drei-Hybrid-System auch für Pumilio-Proteine angewendet (Stumpf et al., 2008). Die Bindung von KH-Domänen-Proteinen an einzelsträngige Nukleinsäuren konnte durch NMR-Spektroskopie und über Röntgenstrahl-Strukturanalyse gut untersucht werden (Valverde et al., 2008). Strukturanalysen der Proteine Nova2, hnRNP K und des poly(C)-bindenden Proteins PCBP zeigen entsprechend Interaktionen mit dem Tetranukleotid UCAC, welches sich in der Schleife der Sekundärstruktur befindet, TCCC sowie ACCC oder CCCT/U (Backe et al., 2005; Braddock et al., 2002b; Du et al., 2007; Lewis et al., 2000). Für das Protein FBP wurden die Elemente dTTT und ATTC identifiziert (Braddock et al., 2002b). Das RNA-Element ACACCC wird durch ZBP1 gebunden (Farina et al., 2003; Ross et al., 1997). Interessanterweise bindet das Protein Yll032C aus *S. cerevisiae* mRNAs mit dem *cis*-aktiven Element A/UAUACCC/U, welches nahezu identisch mit dem AUACCC von Khd4 ist (siehe unten; Hogan et al., 2008). Somit binden KH-Domänen-Proteine überwiegend C-reiche Sequenzen, die mit nur vier bis sechs Nukleotiden relativ kurz und hoch konserviert sind (Valverde et al., 2008).

### **3.2 AUACCC ist ein regulatorisches, *cis*-aktives RNA-Element in *U. maydis***

Die Identifizierung gebundener Sequenzen durch das Hefe-Drei-Hybrid-System wurde nicht sättigend durchgeführt. Jedoch konnten mit Hilfe des hoch konservierten, sechs Nukleotid langen Motivs alle putativen Ziel-mRNAs von Khd4 bioinformatisch ermittelt werden. Bei der Analyse der Positionen des Elements AUACCC in diesen Transkripten wurde eine statistisch signifikante Anreicherung in den ersten 150 Nukleotiden der 3'UTR ermittelt. Zusätzlich zeigten Korrelationsanalysen basierend auf der bioinformatischen Untersuchung und den *Microarrays*, dass allen differentiell regulierten Transkripten mit einem Motiv in der 3'UTR eine Position in der Anreicherungsregion zugeordnet werden kann. 92% dieser Transkripte wiesen außerdem eine erhöhte Transkriptmenge im *khd4*-Deletionsstamm auf (siehe unten). Die Anreicherung korreliert ebenfalls mit der durchschnittlichen Länge von 3'UTRs, die auf experimentellen Untersuchungen basierten, sowie mit der Tatsache, dass untranslatierte Regionen bekannt sind regulatorisch zu wirken (Hesketh, 2004; Kuersten und Goodwin, 2003; Merritt et al., 2008).

Die Charakterisierung der transkriptomweiten Positionierung von AUACCC ist durch die Verknüpfung mit der *Microarray*-Analyse bisher einmalig. Zwar wurden bereits bioinformatisch Motivpositionen analysiert (Galvano et al., 2008; Hogan et al., 2008), jedoch konnte eine

Verbindung zu möglichen regulatorischen Funktionen eines Motivs auf diese Weise nicht hergestellt werden.

Mit Hilfe von experimentellen Untersuchungen, wie z.B. die Bestimmung der Halbwertszeiten von Transkripten, konnten *cis*-aktive Elemente wie AREs (AU-reiche Elemente), die hauptsächlich für die Destabilisierung von Transkripten verantwortlich sind und generell in der 3'UTR vorkommen, untersucht werden (Bolognani und Perrone-Bizzozero, 2008; Mignone et al., 2002; Nechama et al., 2008). Nur wenige Beispiele sind bekannt, in denen destabilisierende Elemente bspw. im offenen Leserahmen positioniert sind (Grosset et al., 2000). Hingegen bewirken *cis*-aktive Elemente in der 5'UTR überwiegend translationelle Regulation (Muralidharan et al., 2007). Somit scheint AUACCC in *U. maydis* ein regulatorisches, *cis*-aktives Element darzustellen, welches durch Anwesenheit in der 3'UTR u.a. für die Destabilisierung von Transkripten sorgen könnte (siehe unten).

### 3.3 Die Tandem-KH-Domänen 3 und 4 sind essentiell

Die anfänglichen Analysen nach Verlust des RNA-bindenden Proteins Khd4 führten in *U. maydis* zu einem aberranten Phänotyp, der sich unter anderem in einem gestörten, sporidialen Wachstum, in reduzierter Filamentbildung und in stark reduzierter Virulenz äußerte (Becht et al., 2005; Vollmeister, 2005). Um aufzuklären, ob die RNA-bindenden Domänen von Khd4 für die Funktion des Proteins von Bedeutung sind, wurden KH3 bis KH5 mutiert, da diese im Aminosäuresequenzvergleich von homologen Proteinen der pathogenen Pilze *C. neoformans* und *A. fumigatus* den höchsten Konservierungsgrad aufwiesen. Die in diese KH-Domänen eingeführten Mutationen wurden hinsichtlich einer möglichen Inhibierung der RNA-Interaktion gewählt (GXXG zu AAAA; Banerjee et al., 2007; Haag, 2008; Valverde et al., 2008; Vanrobays et al., 2008). Letztendlich konnte bestätigt werden, dass die RNA-bindenden Domänen KH3 und KH4 eine essentielle Rolle in der Ausübung der Funktion von Khd4 innehaben. Diese hatten nach Mutation den vollen Funktionsverlust des Proteins zur Folge, während die mutierte KH-Domäne 5 zu keiner hier untersuchten Funktionsstörung führte. Somit scheinen nicht alle RNA-bindenden Domänen eine wichtige Funktion auszuüben, welches auch aus Untersuchungen anderer KH-Domänen-Proteine hervorgeht.

Mutationen in KH-Domänen-Proteinen führen in den verschiedensten Organismen zu schwerwiegenden Krankheiten bzw. Veränderungen eines Organismus. Ein Beispiel stellt das *fragile X mental retardation syndrome* Protein FMRP dar, welches bei Funktionsverlust zu kognitiver Defizienz im Menschen führen kann. Dies äußert sich in geringem Ausmaß in Lernschwierigkeiten bis hin zu stark ausgeprägten Sprachstörungen oder

Aufmerksamkeitsdefiziten. Den genetischen Hintergrund dieser Krankheit bildet die Abwesenheit bzw. die Mutation des *fmr1*-Gens, welches für FMRP kodiert und nur eine einzelne Punktmutation aufweisen kann (Bassell und Warren, 2008; Feng et al., 1997). Der resultierende I304N-Austausch in der zweiten KH-Domäne des translationsregulierenden Proteins ermöglicht zwar weiterhin die Bindung von poly(A)-mRNA, die Assemblierung höhergeordneter mRNA-Ribonukleoprotein-Komplexe und die daraus resultierende Translationsregulation sind jedoch reduziert (Feng et al., 1997; Wang et al., 2008; Zalfa et al., 2006). Der Austausch des ersten Glyzins der GXXG-Schleife des Hefeproteins Dim2p (YOR145C, PNO1; G207A) führt hingegen nicht wie die Deletion von *DIM2* zur Letalität, sondern hat stattdessen nur partielle Funktionsverluste zur Folge (Vanrobays et al., 2008). Mutanten des bakteriellen KH-Domänen-Proteins NusA zeigen nach Austausch der jeweils ersten Glyzine der GXXG-Schleifen durch Aspartat in den zwei KH-Domänen Unterschiede in der Funktionalität. Während die Mutation in der ersten KH-Domäne starke Funktionsverluste herbeiführt, werden nach Mutation der zweiten KH-Domäne nur geringe Funktionsbeeinträchtigungen festgestellt (Zhou et al., 2002).

Warum es Unterschiede in der Funktionalität von KH-Domänen gibt, könnte zum einen Ursache von konservierten und divergenten KH-Domänen sein und zum anderen durch die Lage bzw. die Anordnung von KH-Domänen verursacht werden. Innerhalb eukaryotischer Typ I-KH-Domänen bestehen Unterschiede in der Zusammensetzung der essentiellen GXXG-Schleife. Neben den konservierten GXXG-Schleife-beinhaltenen existieren divergente KH-Domänen, die durch Abweichungen oder Unterbrechungen gekennzeichnet sind (Brykailo et al., 2007). Khd4 besitzt von den fünf KH-Domänen nur eine konservierte. Diese vierte KH-Domäne ist essentiell. Die KH-Domänen 3 und 5 zeigen indes ein unterschiedliches Verhalten. Während die dritte KH-Domäne essentiell ist, scheint die fünfte KH-Domäne auf die hier untersuchte RNA-Bindung und auf den Phänotyp keinen erkennbaren Einfluss zu haben. Hier stellt sich die Frage, ob die fünfte oder die zwei N-terminalen KH-Domänen die Funktion der dritten KH-Domäne übernehmen würden, indem die Positionen dieser bspw. ausgetauscht würden und dadurch ebenfalls von funktioneller Relevanz für Khd4 sind. Andererseits könnte bspw. die KH-Domäne 5 für eine entwicklungspezifische Selektion von AUACCC-enthaltenden mRNAs *in vivo* verantwortlich sein, welches auf Proteinmodifizierungen oder Protein/Protein-Interaktionen beruhen könnte (siehe unten).

Untersuchungen von Scp160p bspw. zeigten, dass es neben sieben konservierten (KH2, KH8-12, KH14) weitere sieben divergente KH-Domänen enthält (KH1, KH3-7, KH13; Brykailo et al., 2007; Currie und Brown, 1999). Brykailo und Mitarbeiter bestätigten dabei, dass divergente KH-Domänen die Funktion von konservierten KH-Domänen durch Positionsaustausch partiell übernehmen sowie essentiell für die Funktion des Proteins sein können (Brykailo et al., 2007).

Die Proteinvarianten von Khd4, welche die Mutationen in den KH-Domänen 3 und 4 beinhalteten, interagierten nicht mit entsprechenden AUACCC-enhaltenden Sequenzen, welches sich in einer fehlenden  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität äußerte. Dies deutet daraufhin, dass die Tandem-KH-Domänen 3 und 4 das *cis*-aktive Element AUACCC wahrscheinlich kooperativ binden. Auch in anderen Organismen konnte beobachtet werden, dass Tandem-KH-Domänen Hexanukleotidsequenzen binden, wie es in ZBP1 aus Huhn gezeigt werden konnte. Die Tandem-KH-Domänen 3 und 4 von ZBP1 binden das *cis*-aktive Element ACACCC, welches sich zweifach in der vorhergesagten Schleife der Sekundärstruktur der  $\beta$ -Aktin-mRNA befindet (Farina et al., 2003). Das Hefeprotein Yll032C enthält laut Literatur nur eine einzelne KH-Domäne, welche zur vierten KH-Domäne aus Khd4 hohe Identität aufweist, und bindet mRNAs, die das Element A/UAUACCC/U angereichert haben (siehe unten; Hogan et al., 2008; Zhang et al., 1999). Der in dieser Arbeit durchgeführte Aminosäuresequenzvergleich der KH-Domäne 3 von Khd4 zeigte jedoch, dass die essentiellen Aminosäuren der KH-Domäne 3 aus Khd4 in Yll032C ebenfalls konserviert sind (Abb. 2.1B). Daher kann an dieser Stelle spekuliert werden, dass Yll032C das *cis*-aktive Element über die Tandem-KH-Domänen 3 und 4 bindet. Damit scheinen Tandem-KH-Domänen das *cis*-aktive Element mit dem Konsensus A(U/C)ACCC nicht nur in Pilzen, sondern auch in höheren Eukaryoten zu binden. Dies weist auf einen konservierten RNA-Bindungsmechanismus von Tandem-KH-Domänen in Eukaryoten hin.

### 3.4 Khd4 ist an der Destabilisierung von Ziel-mRNAs involviert

Mit Hilfe zweier unabhängiger Ansätze sollte die Frage geklärt werden, inwieweit Khd4 posttranskriptionell agiert. Die *Microarray*-Analyse gestattete es (Kämper et al., 2006; Scherer et al., 2006; Zarnack et al., 2008), differentiell regulierte mRNAs einzig beruhend auf mRNA-Mengen zu ermitteln. Obwohl für diese Analyse zwei unabhängige *khd4*-Deletionsstämme verwendet wurden, lag der Pearson-Korrelationskoeffizient nur gering unter dem Wert, welcher eine hohe Reproduzierbarkeit impliziert (Zakharkin et al., 2005; siehe Material und Methoden). Es wurden 72 Khd4-abhängige Ziel-mRNAs identifiziert, von denen 72% eine Erhöhung der Transkriptmenge im *khd4*-Deletionsstamm aufwiesen und somit eine destabilisierende Funktion von Khd4 implizieren. Die differentiell regulierten mRNAs könnten weiterhin in primäre und sekundäre Ziele unterteilt werden, da 40% das *cis*-aktive Element AUACCC beinhalteten und damit in *U. maydis* potentiell gebunden werden. Die funktionelle Analyse der 72 identifizierten mRNAs ergab eine Anreicherung in den funktionellen Kategorien Ionenbindung sowie Elektronentransport und Energiekonservierung. Abgesehen von einer verlangsamten Verdopplungszeit des *khd4*-Deletionsstammes (Becht et al., 2005), welches auf einen möglichen

Defekt in der Energiebereitstellung zurückzuführen sein könnte, konnte eine direkte Korrelation zwischen dem bestehenden Phänotyp und den regulierten mRNAs bislang nicht hergestellt werden. Weiterhin wurde die Transkriptanalyse dadurch erschwert, dass der überwiegenden Mehrheit der identifizierten Transkripte (64%) gegenwärtig noch keine Funktion zugeordnet werden kann.

Das Protein Yll032C, welches zytoplasmatisch lokalisiert und mit Ribosomen koimmunopräzipitiert wurde (Fleischer et al., 2006; Huh et al., 2003; Übersax et al., 2003), bindet ebenfalls nur eine geringe Anzahl an Transkripten (54), die nach funktioneller Kategorisierung keine Übereinstimmung mit funktionellen Kategorien von Khd4-regulierten Transkripten aufweisen (Hogan et al., 2008). Inwieweit Yll032C diese Transkripte reguliert, konnte mit Hilfe dieser Analyse jedoch nicht ermittelt werden. Folglich werden zwar über die ähnlichen KH-Domänen 3 und 4 der Proteine Yll032C und Khd4 das nahezu identische, *cis*-aktive Element (A)AUACCC/A gebunden, jedoch unterscheiden sich beide Proteine sowohl in der kodierten Proteinfunktion ihrer Ziel-Transkripte als auch in ihren Deletionsphänotypen voneinander (Die Deletion von *yll032c* in *S. cerevisiae* führt zu einem Postsporulations/-keimungs-Wachstumsdefekt, es wird aber als nicht-essentielles Gen beschrieben.; Deutschbauer et al., 2002; Die Keimung von Sporen im *khd4*-Deletionsstamm wurde bisher nicht überprüft.).

Die partielle Kolo-kalisation von Khd4 mit Dhh1-enthaltenden *P-bodies* und die überwiegend erhöhten mRNA-Mengen in dem *khd4*-Deletionsstamm bekräftigen die Vermutung, dass Khd4 Ziel-Transkripte destabilisiert. Dynamische *P-bodies* sind Orte des in 5' Richtung 3' mRNA-Abbaus (Anderson und Kedersha, 2006; Eulalio et al., 2007; Kedersha et al., 2005; Parker und Sheth, 2007; Parker und Song, 2004; Wilusz und Wilusz, 2004). Die Hauptkomponenten von *P-bodies* sind u.a. die 5' - 3' Exoribonuklease Xrn1, die *decapping*- (Entkappungs-) Enzyme Dcp1 und Dcp2 sowie die DExD/H-Box-RNA-Helikase Dhh1 (Eulalio et al., 2007; Teixeira et al., 2005). Die entscheidende Komponente für die Assemblierung der *P-bodies* ist jedoch die mRNA, ohne die *P-bodies* nicht assemblieren können (Cougot et al., 2004; Eulalio et al., 2007; Teixeira et al., 2005).

Obwohl die mutierten Khd4-Varianten 3 und 4 zu einem Deletionsphänotyp und zur Inhibierung der Bindung von AUACCC-enthaltenden RNAs in *S. cerevisiae* führten, bildeten sie stressinduzierte Partikel. Vorausgesetzt, dass die RNA-Bindung nach Mutation der Tandem-KH-Domänen 3 und 4 auch in *U. maydis* inhibiert wird, sollten die resultierenden Khd4-Varianten zumindest nicht mehr aufgrund der fehlenden RNA-Bindung in *P-bodies* akkumulieren können. Jedoch muss die Partikelbildung genauer untersucht werden, um Aussagen darüber zu treffen, ob die mutierten Khd4-Varianten noch in der Lage sind, in *P-bodies* zu akkumulieren oder um welche Art stressinduzierbarer Körper es sich bei den *P-body*-unabhängigen Partikeln handelt.

Eine Art der Partikel könnten Stresskörper darstellen. Diese fungieren hauptsächlich als Orte der mRNA-Selektion. Sie entscheiden, ob eine mRNA entlassen und deren Translation reinitiiert, zu Orten des mRNA-Abbaus exportiert oder aufbewahrt wird (Anderson und Kedersha, 2006; Anderson und Kedersha, 2008; Kedersha und Anderson, 2002). Dabei wird in Stresskörpern zwischen *housekeeping*- (Haushalts-) mRNAs und solchen unterscheiden, die in Stresssituationen von großem Nutzen sind, wie bspw. chaperon- oder hitzeschockproteinkodierende mRNAs (Anderson und Kedersha, 2006; Kedersha und Anderson, 2002). Die Hauptkomponenten der Stresskörper sind der 48S-Präinitiationskomplex, wobei nur die kleinen ribosomalen Untereinheiten integriert sind, einige frühe Translationsinitiationsfaktoren und das Poly(A)-bindende Protein Pab1 (Anderson und Kedersha, 2006; Anderson und Kedersha, 2008).

*P-bodies* und Stresskörper können miteinander interagieren (Kedersha et al., 2005). Es findet ein dynamischer Austausch von Proteinen und mRNAs statt (Bregues et al., 2005). Proteinkomponenten, welche in beiden Partikeln akkumulieren können, sind u.a. die RNA-bindenden TIA-Proteine (TIA-1/R) und der eukaryotische Initiationsfaktor eIF4E (Anderson und Kedersha, 2006; Anderson und Kedersha, 2008; Kedersha und Anderson, 2002; Kedersha et al., 2005). Da Stresskörper ebenfalls in niederen Eukaryoten entdeckt wurden (Bregues und Parker, 2007; Hoyle et al., 2007), ist es auch für *U. maydis* nicht auszuschließen, dass Stresskörper vorhanden sind. Zwar konnten nur wenige Proteinkomponenten, die zwischen *P-bodies* und Stresskörpern shuttle (pendeln), in *U. maydis* bioinformatisch identifiziert werden (abgesehen von essentiellen Komponenten wie eIF4e wurden u.a. bioinformatisch ermittelt: RAP55/Scd6 [*um11794*] und TIA-1/R [*um01182*]; Feldbrügge et al., 2008), jedoch könnte die partielle Kollokalisierung auf eine Lokalisation von Khd4 auch in potentiellen Stresskörpern hinweisen.

In anderen Organismen konnten diesbezüglich Beobachtungen getroffen werden, welche z.B. für ZBP1 zeigen, dass die Tandem-KH-Domänen 3 und 4 eine Beteiligung in Stresskörpern ausüben und des Weiteren mit dem Aktinzytoskelett assoziiert sind (Farina et al., 2003; Stöhr et al., 2006). ZBP1 vermittelt nicht nur direkte Lokalisation von mRNAs, sondern auch Translationsregulation sowie mRNA-Stabilität. Unter Stress vermittelt ZBP1 mRNA-Stabilisierung in den Stresskörpern durch Bindung des Sequenzelementes ACACCC (Stöhr et al., 2006). Jedoch werden alle mRNAs, ob aktiv translatiert oder nicht, nach Stressinduktion in Stresskörpern detektiert, wodurch die Vermutung nahe liegt, dass mRNAs unabhängig ihres *cis*-aktiven Elements zu Stresskörpern rekrutiert werden. Lediglich die Assoziation mit dem ZBP1 in Stresskörpern verhindert den schnellen Abbau der gebundenen mRNA nach Aufbewahrung (Stöhr et al., 2006).

Glutaminreiche Regionen sind in Proteinen mit diversen Funktionen in der Genexpression vertreten. Unter anderem werden sie für Protein/Protein-Interaktionen gebraucht oder als multimerisierende Module genutzt (Emili et al., 1994; Pascal und Tjian, 1991; Ström et al., 1996).

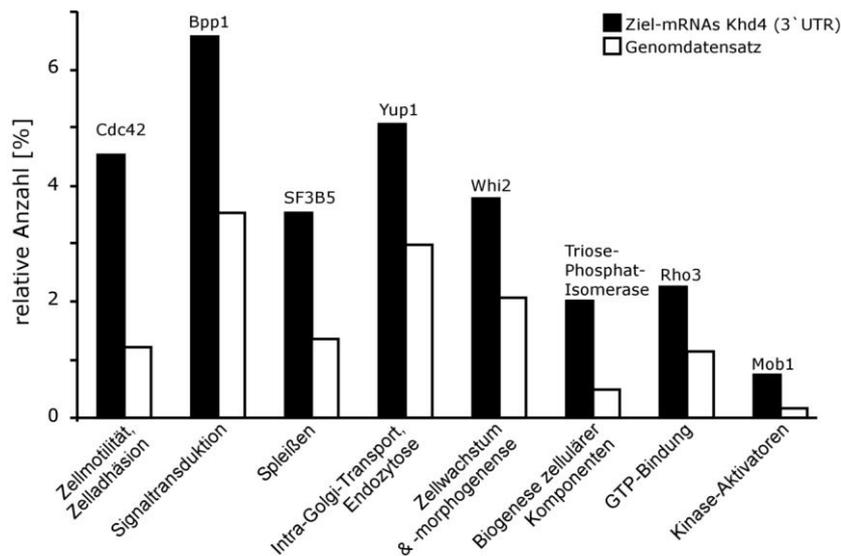
Aus der Literatur ist ebenfalls bekannt, dass glutaminreiche Regionen eine Rolle in der Assemblierung bzw. in der Protein/Protein-Interaktion von subzellulären Granula, wie z.B. den Stresskörpern oder den *P-bodies*, spielen (Abaza und Gebauer, 2008; Gilks et al., 2004; Reijns et al., 2008). Die glutaminreiche Region im C-Terminus von Khd4 konnte in dieser Analyse keine Hinweise auf Funktionen in der stressinduzierten Partikelakkumulation liefern, obgleich die Anzahl an Glutaminen innerhalb dieser Region (n 23) der Menge an Glutaminen von *P-body*-Markerproteinen in *S. cerevisiae* entspricht (Reijns et al., 2008). Die partielle Kolo-kalisation von Khd4 und Dhh1 lässt aber die Frage offen, ob durch die Deletion der glutaminreichen Region von Khd4 die partielle Kolo-kalisation von Khd4<sup>ΔQ</sup> mit Dhh1 in *P-bodies* inhibiert wird. Andererseits besitzt Dhh1p aus *S. cerevisiae* eine glutaminreiche Region (n 25), die in Dhh1 aus *U. maydis* nicht konserviert ist (Daten nicht gezeigt; Reijns et al., 2008). Allerdings wird auch in Reijns et al., 2008xx diskutiert, inwieweit glutaminreiche Regionen eine essentielle Rolle in der Assemblierung von *P-bodies* spielen (Reijns et al., 2008). Diese sind wahrscheinlich nur in *Saccharomyces*-Spezies konserviert und nicht essentiell, führen jedoch zu einer höheren Effizienz in der Assemblierung in *P-bodies* (Reijns et al., 2008). In höheren Eukaryoten sind die glutaminreichen Regionen entscheidend für die Assemblierung in Stresskörpern (Gilks et al., 2004). Die Proteine TIA-1/R besitzen eine C-terminale glutaminreiche Prionaggregationsdomäne (*prion-related domain*, PRD), die für eine spontane Assemblierung in Stresskörpern essentiell sind (Gilks et al., 2004).

Die detaillierte Charakterisierung dieser stressinduzierten Partikel ist bedeutend, um die genaue Funktion von Khd4 mit bzw. ohne Beteiligung der RNA-Bindung zu ermitteln. Inwieweit die glutaminreiche Region eine Rolle spielt, bleibt hier offen. Jedoch weisen die ersten Lokalisationsstudien mit *P-bodies* sowie die überwiegende Mehrheit destabilisierter Transkripte und zusätzlich die Anreicherung des *cis*-aktiven Elementes AUACCC in der 3'UTR sehr deutlich daraufhin, dass Khd4 u.a. in mRNA-Abbauprozessen funktionell aktiv ist.

### **3.5 Alternative Funktionen und Proteinmodifizierungen von Khd4**

Auf Grund der Tatsache, dass nur wenige Transkriptmengen über Khd4 reguliert werden, obwohl theoretisch ca. 350 Transkripte das *cis*-aktive Element AUACCC in der 3'UTR (bzw. 1581 mRNAs mit AUACCC) enthalten, scheint Khd4 zum einen nicht hauptsächlich über den mRNA-Abbau Transkripte zu regulieren und zum anderen durch weitere Faktoren beeinflusst zu werden. Letzteres könnte bspw. über Protein/Protein-Interaktion vermittelt und durch Modifizierungen von Khd4 hervorgerufen werden.

Ermittelt man die kodierten Proteinfunktionen aller putativen Ziel-Transkripte von Khd4, die ein AUACCC in der 3'UTR enthalten, reichern sich teilweise überlappende, funktionelle Kategorien an, die mit dem Phänotyp des Deletionsstammes korrelieren würden (Abb. 3.1; P-Wert < 0,05). Dabei könnten einige Proteine für den Deletionsphänotyp von *khd4* verantwortlich sein, wie bspw. Cdc42, Spa2 (hier unter „unbekannte Funktion“ eingestuft), Yup1 oder Whi2 (Carbo und Perez-Martin, 2008; Fuchs et al., 2006; Mahlert et al., 2006; Wedlich-Söldner et al., 2000). Z.B. führt die Deletion von *cdc42* zu einem Zytokinese-Defekt, welcher sich in der Bildung von



**Abb. 3. 1** Balkendiagramm für die Verteilung von Proteinfunktionen putativer Ziel-mRNAs von Khd4. Verwendet wurden 369 mRNAs, welche das *cis*-aktive Element in der 3'UTR beinhalten und unter den durchgeführten Bedingungen einen durchschnittlichen Expressionswert von über 50 besaßen. Die Analyse wurde im Vergleich zu den bekannten Funktionen aller putativen Proteine von *U. maydis* mittels FunCat durchgeführt (MUMDB; <http://mips.gsf.de/genre/proj/Ustilago/>; Wilson et al., 2000; P-Wert < 0.04)

Zellaggregaten äußert, und zum Virulenzverlust (Mahlert et al., 2006). Nach Überexpression bzw. Deletion von *spa2* ändert sich die Zellgröße und -form vergleichbar mit dem Phänotyp des *khd4*-Deletionsstammes, jedoch ergibt sich kein Patho-

genitätsverlust (Carbo und Perez-Martin, 2008). Die entsprechenden Transkripte könnten bspw. über die Translationsregulation be-

einflusst werden. Hingegen wäre eine Beteiligung weiterer Proteine, die mit Khd4 interagieren, um so Spezifität in der Bindung von Transkripten auszuüben, durchaus plausibel.

Eine weitere Möglichkeit, mit der die Interaktionen zwischen RNA und Protein und infolgedessen Funktionen beeinflusst werden können, besteht in der Proteinmodifizierung von RNA-bindenden Proteinen, die u.a. auf Methylierung oder Phosphorylierung beruhen könnte. Cote und Mitarbeiter entdecken, dass ohne die Methylierung eines Argininrestes in der Nähe der prolinreichen Region P3 in Sam68 die zuvor nukleäre Lokalisation folgend im Zytoplasma vorliegt (Cote et al., 2003; McLaren et al., 2004). Weiterhin konnten sie zeigen, dass durch Methylierung der Export ungespleißter *HIV1*-RNA (*human immunodeficiency virus RNA*) aus dem Zellkern in das Zytoplasma verhindert wird (Cote et al., 2003). In *S. cerevisiae* konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die Phosphorylierung eines Serins (S358) durch die in Hefe exprimierte Kaseinkinase Yck1p (*yeast casein kinase*) an der Plasmamembran dazu führt, dass Khd1p, welches

im Komplex mit der *ASH1*-mRNA zum Tochterzellpol transportiert wird, die *ASH1*-mRNA dort entlässt (Irie et al., 2002; Paquin et al., 2007).

Das K-Homologie-Spleißregulatorprotein KSRP enthält vier KH-Domänen, wobei KH3 und KH4 kooperativ für die Bindung AU-reicher (ARE), *cis*-aktiver Elemente verantwortlich sind (Garcia-Mayoral et al., 2007; Gherzi et al., 2004). KSRP destabilisiert die gebundenen ARE-mRNAs durch die Rekrutierung des Exosoms (Gherzi et al., 2004). Um die destabilisierende Funktion von KSRP aufzuheben, wird ein konservierter Serinrest (S193), der sich in der ersten KH-Domäne befindet, durch die AKT-Kinase phosphoryliert (Gherzi et al., 2006). Dabei wird die erste KH-Domäne umstrukturiert, so dass ein 14-3-3 Protein daran binden kann und die Rekrutierung des Exosoms aufgehoben wird (Diaz-Moreno et al., 2009; Gherzi et al., 2006).

Eine mögliche posttranslationelle Modifizierung von Khd4 in Bezug auf die Bindungseigenschaften zu *cis*-aktiven Elementen enthaltenden Ziel-mRNAs ist somit denkbar. Bioinformatische, posttranslationelle Modifizierungsprognosen zeigen eine Reihe putativer Phosphorylierungsstellen für Khd4 auf, die über verschiedene Kinasen vermittelt werden könnten. Insgesamt werden 74 Serin-, 16 Threonin- und 9 Thyrosinreste als potentielle Phosphorylierungsstellen vorhergesagt (NetPhos 2.0 Server; <http://www.cbs.dtu.dk/services/>; Blom et al., 1999; Blom et al., 2004). Hingegen wird kinasespezifisch nur ein Threoninrest an Position 1341 prognostiziert, welches über ESS-Filterung ermittelt wurde (*evolutionary stable sites*; evolutionär stabile Stelle gefiltert durch Sequenzähnlichkeiten und Taxonomie; NetPhosK; <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhosK/>; Blom et al., 2004). Diese Hypothese könnte z.B. durch Western-Analysen mit Phosphorylierungsantikörpern untersucht werden, wobei auch hier entwicklungspezifische Stadien des Pilzes berücksichtigt werden müssen.

### 3.6 Modellvorstellung für die Funktion von Khd4

Khd4 eröffnet eine neue Klasse pilzspezifischer Multi-KH-Domänen-Proteine. Bisher gibt es keine Untersuchungen an homologen Proteinen in anderen filamentösen Pilzen, mit Ausnahme des homologen Proteins NCU05266 aus *Neurospora crassa* (Colot et al., 2006). Deletionsanalysen des Gens scheinen jedoch keine Auswirkungen auf den Phänotyp von *N. crassa* zu haben ([http://www.dartmouth.edu/~neurosporagenome/knockouts\\_completed.html](http://www.dartmouth.edu/~neurosporagenome/knockouts_completed.html)). Damit ist Khd4 aus *U. maydis* das erste untersuchte Beispiel für Multi-KH-Domänen-Proteine in filamentösen Pilzen.

Die Suche nach einer Verbindung zwischen der Funktion des Proteins Khd4 und dem Phänotyp des Deletionsstammes konnte bis zu diesem Zeitpunkt noch nicht aufgeklärt werden. Dass die Bindung von RNA an das Protein jedoch einen entscheidenden Einfluss darstellt, konnte über

die Mutationsanalysen im Hefe-Drei-Hybrid-System und in zellbiologischen Untersuchungen in *U. maydis* bereits gezeigt werden. Die diskutierte, destabilisierende Funktion von Khd4 muss nicht zwangsläufig die Hauptfunktion des Proteins darstellen. Aus der Literatur sind Proteine bekannt, die zum einen mehrere KH-Domänen beinhalten und daher zu den Multi-KH-Domänen-Proteinen zählen, und zum anderen verschiedenste Funktionen im RNA-Metabolismus ausgehend von spezifischen RNA-Interaktionen, über RNA-Export bis hin zur Translationsregulation und mRNA-Stabilität ausüben können (Kruse et al., 1996; Kruse et al., 1998; Kruse et al., 2000; Mendelsohn et al., 2003). Scp160p mit seinen 14 KH-Domänen fungiert bspw. im Chromatin-*Silencing* (-Stilllegung) des Kreuzungstyplocus und der Telomere, in der Chromosomensegregation und in mRNA-metabolischen Prozessen, wie dem RNA-Export aus dem Zellkern oder die intrazelluläre RNA-Lokalisation (Guo et al., 2003; Lang und Fridovich-Keil, 2000; Li et al., 2003; Marsellach et al., 2006; Weber et al., 1997; Wintersberger et al., 1995). Außerdem ist Scp160p mit löslichen und membranständigen Polyribosomen assoziiert, welches über die zwei letzten KH-Domänen vermittelt wird (Baum et al., 2004; Frey et al., 2001; Lang und Fridovich-Keil, 2000; Lang et al., 2001; Li et al., 2004). Scp160p ist in der Lage mehrere tausend mRNAs zu binden, wie es für das poly(A)-bindende Protein Pab1p ebenfalls gezeigt werden konnte (Hogan et al., 2008). Vigilin aus Vertebraten ist das nächste homologe Protein zu Scp160p. Es enthält 15 KH-Domänen und ist in Prozessen wie dem Cholesterol-Metabolismus, RNA-metabolischen Prozessen, dem Sterol-Transport, dem tRNA-Export aus dem Kern und der negativen Regulation bei mRNA-Spaltungsprozessen involviert (Cunningham et al., 2000; Gibson et al., 1993; Kruse et al., 2000; McKnight et al., 1992; Musco et al., 1996).

Khd4 scheint einerseits die Destabilisierung von Ziel-Transkripten zu vermitteln, wobei die Bindung zum *cis*-aktiven Element in der 3'UTR dieser Transkripte ausschlaggebend zu sein scheint. Diese mRNAs werden stetig transkribiert, obwohl sie zu bestimmten Zeitpunkten der Entwicklung nicht gebraucht werden. Daher könnte Khd4 diese Transkripte destabilisieren, indem es *P-body*-Komponenten rekrutiert. Erst nach Änderung entwicklungs- oder umweltspezifischer Bedingungen könnte die Bindung von Khd4 an AUACCC-enhaltende Transkripte durch Bindung anderer Proteinkomponenten oder durch Modifizierung von Khd4 inhibiert werden, so dass diese Transkripte translatiert werden können. Andererseits besteht die Möglichkeit, dass Khd4 bspw. parallel zur Destabilisierung oder zellzyklusabhängig (bei Anwesenheit bestimmter Regulatoren) für die Translation von Transkripten sorgt, um die Entwicklung von *U. maydis* zu gewährleisten. Dabei könnte es sich um die Translation der *clp1*-mRNA handeln, welches erst b-abhängig induziert wird (Scherer et al., 2006). Khd4 könnte dabei durch Bindung des Transkripts die Translationseffizienz steigern.

### 3.7 Ausblick

Um für Khd4 eine destabilisierende Funktion gegenüber AUACCC-enhaltenden Transkripten nachzuweisen, erfordert dies die Bestimmung der Halbwertszeiten, welches über Transkriptionsstopp bspw. mit Hilfe des RNA-Polymerase-Inhibitors Thiolutin eingeleitet werden kann. In diesem Zusammenhang wäre eine genetische Manipulation einer AUACCC-enhaltenden mRNA möglich, um die regulatorische Funktion des Elements in der 3`UTR zu verifizieren. Northern-Analysen würden Auskunft geben, ob Khd4 für die Destabilisierung AUACCC-enhaltender Transkripte verantwortlich ist und ob AUACCC ein regulatorisches Element in *U. maydis* darstellt. Der zweite Aspekt würde sich der Analyse der stressinduzierten Partikel widmen. Um die Komponenten der möglicherweise unterschiedlichen granulären Körper zu identifizieren, bietet sich die Zweischnitt-Aufreinigung durch das *TAP tag* Epitop an, welches derzeit durchgeführt wird (C. Haag und M. Feldbrügge, pers. Mitteilung). Des Weiteren könnten direkt gebundene mRNAs identifiziert werden, welche nach UV-Bestrahlung der Zellen an Khd4 kovalent kreuzvernetzt werden (CLIP, *ultraviolet crosslinking and immunoprecipitation*; Becht et al., 2006; König et al., 2009). Dabei könnte das *high throughput sequencing* (Hochdurchsatz-Sequenzierung; HITS-CLIP) verwendet werden (Licatalosi et al., 2008). Somit würde einerseits der direkte Beweis der Bindung von Khd4 an das *cis*-aktive Element in *U. maydis* erbracht und andererseits auch translationsregulierte Transkripte ermittelt werden, die durch *Microarray*-Analysen nicht identifiziert werden können. Der wichtigste Punkt stellt jedoch die Verknüpfung des *khd4*-Deletionsphänotyps mit der Proteinfunktion gebundener Ziel-Transkripte von Khd4 dar. Zum einen könnten Überexpressionsstudien von Ziel-Transkripten einen möglichen Zusammenhang aufzeigen, zum anderen könnten Lokalisationsstudien die Funktionen der unbekannt Proteine aufdecken.

Für die Zukunft wäre es von Interesse, den Transport der mRNAs, die von Khd4 gebunden werden und möglicherweise zwischen Stresskörper und *P-bodies* shuttle, zu verfolgen, wobei die Methode der „*Green RNA*“ verwendet werden könnte (Daigle und Ellenberg, 2007; König et al., 2009). Weiterhin könnte man mittels „*single molecule*“-Analysen detaillierter untersuchen, wie der dynamische Austausch zwischen Stresskörpern und *P-bodies* in filamentösen Pilzen verläuft und welche Proteine daran beteiligt sind, da einige bekannte Komponenten in *U. maydis* nicht vorhanden sind. Erste Studien zeigen bereits, dass Khd4 sich in der Zelle bewegt, wodurch ein Transport von mRNA nicht auszuschließen ist. Kolokalisationsstudien mit Rrm4, welches mikrotubuliabhängig in der Zelle bidirektional fährt, könnten Aufschluss über den Transportprozess von Khd4 liefern.

## 4. Material und Methoden

### 4.1 Materialien und Bezugsquellen

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

##### *Lösungen:*

Ampizillin-Lösung	10 mg/ml Ampizillin in H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub> sterilfiltriert
DIG1	0,1 M Maleinsäure 0,15 M NaCl in H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub> pH7,5
DIG2	10% (v/v) Blockierungslösung in DIG1
DIG3	0,1 M Maleinsäure 0,1 M NaCl 0,05 M MgCl <sub>2</sub> in H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub> , pH 9,5
DIG-Waschpuffer	0,3% (v/v) Tween-20 in DIG1
DNA-Auftragspuffer (6x)	50% Saccharose (w/v) 0,25% Bromphenolblau (w/v) 10 mM Tris-HCl (pH 7,9) 1 mM Na <sub>2</sub> -EDTA in H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub>
Heparin-Lösung	15 mg/ml Heparin in H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub> , sterilfiltriert
Hygromyzin B-Lösung	10 mg/ml Hygromyzin B
Lachssperma-DNA	10 mg/ml Deoxyribonuklein Säure (von Salmon Testis; Sigma D-1626) in TE-Puffer
Ligase-Puffer (10x)	50 mM MgCl <sub>2</sub> 660 mM Tris-Cl, pH 7,5 10 mM DTT 10 mM ATP in H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub>
Ligationspuffer (10x)	100 mM Tris-HCl, pH 7,5 100 mM MgCl <sub>2</sub> 100 mM DTT 6 mM ATP in H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub> sterilfiltriert
Lysozym-Lösung	10 mg/ml Lysozym 10 mM Tris-Cl, pH 8,0 in H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub>
Lysis-Puffer	2% TritonX100 1% SDS 100 mM NaCl 10 mM Tris-HCl pH 8

	1 mM EDTA in H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub>
Methylenblau-Lösung	300 mM NaAc 0,02% (w/v) Methylenblau
Minilysat III-Lösung	3 M Na-Acetat pH 4,8 in H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub>
MOPS-Puffer	200 mM MOPS 80 mM NaAc 10 mM Na <sub>2</sub> -EDTA*2H <sub>2</sub> O in H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub> , pH 7,0
Northern-Hybridisierungspuffer	5% (v/v) 1 M Na-Phosphatpuffer pH 7,0 (f.c. 50 mM) 5% (v/v) 1 M PIPES (f.c. 50 mM) 2% (v/v) 5 M NaCl (f.c. 100 mM) 25% (v/v) 20% SDS (f.c. 5%) 0,2% (v/v) 0,5 M EDTA pH 8,0 (f.c. 1 mM) in H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub>
Northern-Strippingbuffer	0,5% (v/v) 20x SSC (f.c. 0,1) 0,5% (v/v) 20% SDS (f.c. 0,1%) in H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub>
Northern-Waschpuffer	5% (v/v) 20x SSC (f.c. 1x) 25% (v/v) 20% SDS (f.c. 5%) in H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub>
Novozym-Lösung	1,25% (w/v) Novozym 234 (InterSpex Products, Inc.) in SCS-Puffer lösen
PBS	7,9 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O 14,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 137 mM NaCl 0,5 mM MgCl <sub>2</sub> 2,7 mM KCl in H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub>
PCR-Puffer (10x)	500 mM KCl 15 mM MgCl <sub>2</sub> 100 mM Tris-HCl, pH 8,3 in H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub>
Phenol/Chloroform	50% Phenol 50% Chloroform in TE-Puffer
RB Puffer	0,1M Natriumphosphat, pH7,3 1mM MgCl <sub>2</sub>
RB+M Puffer	10ml RB Puffer 0,035g Mercaptoethanol
RF1-Lösung	100 mM RbCl 50 mM MnCl <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O 30 mM K-Acetat 10 mM CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O 15% (v/v) Glycerin in H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub> mit Essigsäure auf pH 5,8 einstellen und sterilfiltrieren
RF2-Lösung	10 mM MOPS

	10 mM RbCl 75 mM CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O 15% (v/v) Glyzerin in H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub> mit NaOH auf pH 5,8 einstellen und sterilfiltrieren
RNA-Auftragspuffer	1x MOPS 50% Glyzerin 5% Bromphenolblau 5% Xylencyanolblau
RNase A-Lösung	10 mg/ml RNase A 15 mM NaCl 10 mM Tris-Cl, pH 8,0 SCS 20 mM Na-Citrat, pH 5,8 1 M Sorbitol in H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub> sterilfiltriert
Southern-Hybridisierungspuffer	500 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,0 7% (w/v) SDS in H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub>
Southern-Waschpuffer	100 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,0 1% (w/v) SDS in H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub>
SSC (20x)	400 mM Na-Citrat, pH 7,0 3 M NaCl in H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub>
STC	20 mM Na-Citrat, pH 5,8 1 M Sorbitol in H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub> sterilfiltriert
STC/PEG	15 ml STC 10 g PEG4000
STET	10 mM Tris-Cl, pH 8,0 100 mM NaCl 1 mM Na <sub>2</sub> -EDTA 5% (v/v) Triton X-100 in H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub>
TAE (50x)	2 M Tris-Acetat 100 mM Na <sub>2</sub> -EDTA in H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub>
TBE (5x)	500 mM Tris-Borat, pH 7,9 10 mM Na <sub>2</sub> -EDTA in H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub>
TBS	20 mM Tris-HCl, pH 7,6 136 mM NaCl
TBST	20 mM Tris-HCl, pH 7,6 136 mM NaCl 0,5% (v/v) Tween 20
TE (10x)	100 mM Tris-HCl, pH 7,9 10 mM Na <sub>2</sub> -EDTA in H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub>
Usti-Lysis-TT-Puffer	100 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>

	100 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> * H <sub>2</sub> O
	0,1% Nonidet P-40
	150 mM NaCl
	2 mM EDTA
	50 mM NaF
	0,1 mM Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>
	0,1 M Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>
W-Solution (10ml)	275µl Component A (Molecular Probes F-2905) 9,73ml RB+M Puffer
X-Gal-Lösung	X-Gal (2%) in Dimethylformamid

### **Medien für *Escherichia coli*:**

YT-Medium (Sambrook et al., 1989)	8 g Trypton 5 g Yeast Extract 5 g NaCl mit H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub> auf 1 l aufgefüllt
dYT-Medium (Sambrook et al., 1989)	16 g Trypton 10 g Yeast Extract 5 g NaCl mit H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub> auf 1 l aufgefüllt

Wenn nicht gesondert vermerkt, wurden alle Medien 5 min bei 121°C autoklaviert. Zur Herstellung von Platten aus den angeführten Medien wurde 1,5% Bacto-Agar zugesetzt.

### **Medien für *Saccharomyces cerevisiae*:**

SC- (*Synthetic Complete*) und YP-Hefemedien wurden aus einem Dreikomponentensystem erzeugt.  
 Komponente 1: 200 ml 2x SC- Nährlösung ohne die gewünschten Aminosäuren bzw. 2x YP-Nährlösung.  
 Komponente 2: 50 ml des gewünschten Zuckers (hier nur 20% Glucose).  
 Komponente 3: 250 ml H<sub>2</sub>O für Flüssigmedien oder 10 g Agar in 250 ml H<sub>2</sub>O, welches vor dem Mischen aufgeköcht wurde, für Festmedien.

2x SC-Nährlösung ohne gewünschte Aminosäuren:	SC-Pulver ohne gewünschte Aminosäuren	5g
	Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acids	16,75 g

Mit H<sub>2</sub>O auf 1 l aufgefüllt, 30 min gerührt, zu je 200 ml abgefüllt und anschließend autoklaviert.

SC-Pulver ohne gewünschten Aminosäuren:	SC-Grundmischung	36,7 g
	Histidin	2 g
	Leucin	4 g
	Uracil	2 g
	Tryptophan	2 g
	Adenin	0,25 g

Die Aminosäuren aus der Liste, die nicht anwesend sein sollten, wurden weggelassen. Anschließend wurde über Nacht gemischt.

SC-Grundmischung:

Alanin	20 g	Asparaginsäure	20 g
Arginin	20 g	Cystein	20 g
Asparagin	20 g	Glutamin	20 g

Glutaminsäure	20 g	Serin	20 g
Glycin	20 g	Threonin	20 g
Inositol	20 g	Tyrosin	20 g
Isoleucin	20 g	Valin	20 g
Lysin	20 g	p-Aminobenzoe Säure	2 g
Methionin	20 g		
Phenylalanin	20 g		
Prolin	20 g		

Die aufgeführten Komponenten wurden über Nacht gemischt.

20% Glukoselösung (10x)	50 g auf 250 ml H <sub>2</sub> O 5 Aliquots von 50 ml sterilfiltrieren
YP-Komplettmedium (2x Stammlösung)	50 g Bacto Peptone 25 g Bacto Yeast Extract mit H <sub>2</sub> O auf 1 l aufgefüllt  5 Aliquots von 200 ml und Autoklavieren

### ***Medien für Ustilago maydis:***

CM-Medium (Holliday, 1974) (Banuett und Herskowitz, 1989)	1,5 g NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 2,5 g Casamino Acids 0,5 g DNA 1 g Yeast Extract 10 ml Vitamin-Lösung (s. u.) 62,5 ml Salz-Lösung (s. u.) 0,5 ml Spurenelement-Lösung (s. u.)  mit H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub> auf 980 ml auffüllen  nach dem Autoklavieren 20 ml 50% (w/v) Glukose zufügen und mit NaOH auf pH 7,0 einstellen
MM-Glutamin-Glukose	30 mM L-Glutamin 2% (v/v) 50% Glucose (f.c. 1%) 6,25% (v/v) Salzlösung nach Holliday in H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub> , pH 7,0, sterilfiltrieren (nicht autoklavieren)
NM-Medium	0,3% (w/v) KNO <sub>3</sub> 6,25% (v/v) Salzlösung nach Holliday  Mit Seradest-Wasser ansetzen, mit 5 M KOH pH 7,0 einstellen. nach dem Autoklavieren bzw. vor Verwendung: 2% (v/v) 50% Glukoselösung (1% f.c.)
NSY-Glyzerin (Einfriermedium)	8 g Nutrient Broth 1 g Yeast Extract 5 g Saccharose 800 ml 87% Glyzerin mit H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub> auf 1 l aufgefüllt
PD-Medium	24g Potato Dextrose Broth 20 g Bacto Agar (für Platten) mit H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub> auf 1 l aufgefüllt und autoklaviert
PD-Medium mit Aktivkohle	24 g Potato Dextrose Broth 20 g Bacto Agar (für Platten) 10 g Aktivkohle mit H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub> auf 1 l aufgefüllt und autoklaviert

Salz-Lösung (Holliday, 1974)	8 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 2 g Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 1 g MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O mit H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub> auf 1 l aufgefüllt und sterilfiltriert
Spurenelement-Lösung (Holliday, 1974)	60 mg H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> 191 mg MnCl <sub>2</sub> 400 mg ZnCl <sub>2</sub> 47 mg NaMoO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O 140 mg FeCl <sub>3</sub> x 6 H <sub>2</sub> O 557 mg CuSO <sub>4</sub> x 5 H <sub>2</sub> O mit H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub> auf 1 l aufgefüllt und sterilfiltriert
Vitamin-Lösung (Holliday, 1974)	100 mg Thiamin 20 mg Calciumpantothenat 50 mg p-Aminobenzoesäure 20 mg Nikotinsäure 20 mg Cholinchlorid 40 mg myo-Inositol 50 mg Folsäure mit H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub> auf 1 l aufgefüllt und sterilfiltriert
YEPS <sub>Light</sub> (Tsukuda et al., 1988)	10 g Yeast Extrakt 10 g Pepton 10 g Saccharose mit H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub> auf 1 l aufgefüllt
YEPS-Regenerationsagar (Schulz et al., 1990)	a) Top-Agar: 1,5% (w/v) Bacto-Agar 1 M Sorbitol in YEPS <sub>Light</sub> -Medium (s. u.)  b) Bottom-Agar: wie a), zusätzlich 400 g/ml Hygromyzin

Die Medien wurden für 5 min bei 121°C autoklaviert. Zur Herstellung von Platten wurden vor dem Autoklavieren 2% Bacto-Agar zugesetzt.

### ***Enzyme:***

**Tab. 4. 1 In dieser Arbeit verwendete Enzyme**

<b>Name</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Alkalische Phosphatase	Roche
DNaseI	Roche
Herkulase	Stratagene
Lysozym (aus Hühnerei)	Merck
Novozym 234	Novo Nordisc
Phusion	Finnzymes
PNK	New England Biolabs
Quick-Ligase	BioLabs, Inc.
Restriktionsenzyme	New England Biolabs
RNase A	Boehringer
RNasin	Invitrogen
Taq DNA-Polymerase	A. Brachmann und G. Weinzierl, pers. Mitteilung
Reverse Transkriptase	Gibco
T4-DNA Ligase	Roche

### ***Kits:***

Plasmid Midi Kit (100) (Qiagen)

zur Präparation hochreiner Plasmid-DNA

JETsorb® Kit (Qiagen)	zur Eluierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen
TOPO-TA® Cloning Kit (Invitrogen)	zur Klonierung von PCR-Fragmenten
JETquick® General DNA Clean-Up Kit (Genomed)	zur Aufreinigung von Plasmiden vor der Sequenzierung
ABI PRISM® BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)	zur Herstellung der Sequenzierungsreaktionen
PCR-DIG-labeling Kit (Roche)	zur Dioxigenin-Markierung von PCR-Produkten
FluoReporter® lacZ/Galactosidase Quantification Kit (Molecular Probes)	zur quantitativen Bestimmung von Galaktosidase-Aktivität
Oligotex® mRNA Aufreinigungs Kit (Qiagen)	zur Aufreinigung von poly(A)-mRNAs
RNeasy Kit (Qiagen)	zur Präparation hochreiner Gesamt-RNA
JETquick® Plasmid Miniprep Kit (Genomed)	zur Präparation hochreiner Plasmid-DNA
JETquick® General DNA Clean-Up Kit (Genomed)	zur Aufreinigung von Plasmiden vor der Sequenzierung
BioArray-HighYield-RNA Transcript Labelling Kit (Enzo)	zum Labeln/Markieren und reverser Transkription von cRNA
SuperScript® III First-Strand Synthesis SuperMix (Invitrogen)	zur Synthese von cDNA

### **Chemikalien:**

**Tab. 4. 2 In dieser Arbeit verwendete Chemikalien**

<b>Name</b>	<b>Bezugsquelle</b>		
Agarose	Sigma	Formaldehyd, 37%	Roth
Agarose, <i>low melting temperatur</i>	Sigma	Formamid	Merck
p-Aminobenzoe Säure	Sigma	Glukose	Roth
Ammoniumnitrat	Roth	Glycerol	Roth
Ammoniumsulfat	Roth	Glyoxal	Roth
Ampizillin	Roth	Heparin	Sigma
Arabinose	Roth	Hygromyzin B	Duchefa-Roche
BactoAgar	Difco	8-Hydroxycholin	Merck
Borsäure	Roth	Myo-Inositol	Difco
Bromphenolblau	Sigma	Isopropanol	Merck
Calciumchlorid	Sigma	Kaliumacetat	Roth
Calciumpantothenat	Sigma	Kaliumchlorid	Roth
Casaminoacids	Difco	Kaliumhydrogen Phosphat	Merck
Chloroform	Roth	Kaliumnitrat	Roth
Cholinchlorid	Sigma	Kupfer[II]sulfat	Roth
Cytidin	Sigma	Magnesiumchlorid	Sigma
Desoxyribonukleotid Triphosphate dCTP, dGTP, dTTP, dATP	Pharmacia, Roth	Magnesiumsulfat	Merck
DAPI	Sigma	Maleinsäure	Roth
Dinatriumhydrogen Phosphat	Merck	Manganchlorid	Merck
DMSO	Roth	Methylenblau	Merck
DNA	Sigma	MOPS	Roth
DTT	Gerbu	Natriumacetat	Sigma
Eisen[III]chlorid	Merck	Natriumchlorid	Roth
Essigsäure	Roth	Tri-Natriumcitrat	Merck
Ethanol	Roth	Natriumdihydrogenphosphat	Roth
Ethidiumbromid	Roth	Natrium-EDTA	Serva
Folsäure	Sigma	Natriumhydroxid	Riedel-de-Haen
		Natriummolybdat	Merck
		Natriumsulfat	Roth
		Nikotinsäure	Sigma
		<i>Nutrient Broth</i>	Difco

PEG 400	Roth	Tris-Acetat	Sigma
Pepton	Difco	Tris-Borat Roth	Roth
Phenol	Roth	Trizma-HCl	Sigma
PIPES	Roth	Triton X-100	Roth
<i>Potato Dextrose Broth</i>	Difco	Trypton	Difco
Rubidiumchlorid	Roth	Tween-20	Roth
SDS	Roth	Xylencyanol FF	Roth
Sorbitol	Sigma	X-Gal	Gerbu
Saccharose	Merck	Yeast Extract	Difco
Thiamin	Serva	Zinkchlorid	Roth

### Sonstige Materialien:

Filterpapier 3 mm (Whatman)	15 ml und 50 ml PPN-Röhrchen (Sarstedt)
Glasperlen 150-212 microns (Sigma)	Röntgenfilme CEA RP (CEA)
Hybond N+-Nylonmembran (Amersham Pharmacia Biotech)	Sterilfilter 0,20 mm (Sartorius)
Petrischalen (Greiner)	Thermalpapier (Hitachi)

### 4.1.2 Nukleinsäuren

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von den Firmen Sigma ARC Scientific und Metabion synthetisiert.

**Tab. 4.3 In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide**

Verwendung für	Bezeichnung	Sequenz (von 5' - in 3'-Orientierung)
<i>um12098</i>	SL642 SL643	CTCTGCACACTGCCTACC GCGGGCGATCACAGTATG
<i>um03706.2</i>	SL541 SL542	ATGCGGTGATGGAGGAGG ACACGCTAGGCACAGGAG
<i>um00748</i> (SF3B5)	SL640 SL641	GCCGCAGACACATGAAGG TGTCGAGCGGGTATCGAG
<i>um05715</i> ( <i>aktin</i> )	SL547 SL548	CGGCTGCAACCCAAGAAG GCCGAGTTCGTAGCTGAG
[AUACCC] <sub>6</sub>	SL704 SL705	CGATACCCATACCCATACCCATACCCATACCCATACCC CGCGGGGTATGGGTATGGGTATGGGTATGGGTATGGGTAT
[AGAUCU] <sub>6</sub>	SL706 SL707	CGTCAGATCTAGATCTAGATCTAGATCTAGATCTAGATCT CGCGAGATCTAGATCTAGATCTAGATCTAGATCTAGATCTGA
<i>um04193.2</i>	SL644 MF898 MF899	AGACGTGGCGCAAGTTGAGCG CAGTGAATTGTAATACGACTCAC GTAATACGACTCACTATAGGGAGGCGG
Sequenzierung	MF502	ACGACGTTGTAAAACGACGGCCAG
Sequenzierung	MF503	TTCACACAGGAAACAGCTATGACC
Sequenzierung	To2R	GACGTTGTAAAACGACGGCCAGTG
Sequenzierung	To2F	AACAGCTATGACCATGATTACGCC
Sequenzierung	MF162	CAGCCTCAGTAGCATGCCCAAACC
Sequenzierung	MF592	GTGTGAATGAGCGCAGGC
Sequenzierung	MF166	CGTGGCGTTGCTAGCGTTACTGGC
Sequenzierung	MF586	TTGATCTCGACGGCTGGC
Sequenzierung	MF812	AGCTGTACAAGGAGAAGCGTCGATGG
Sequenzierung	MF369	TGTGGCCGTTTACGTCGC
Sequenzierung	MF972	TACTCTCCACGCTCCTCC
Sequenzierung	MF72	TCGCCGACCACTACCAGCAGAACA
Sequenzierung	MF725	CATGGTACGCTGTGGTGC
Sequenzierung	SL133	GGTCAAGACCAATGCGGAGCA
Sequenzierung	SL134	GCAAGACCTGCCTGAAACCGAA
Sequenzierung	SL460	GAGCGTCAGCGTTAGCTC
Sequenzierung	SL658	CGATCGCAACGGAGTTTTAC

Sequenzierung	SL109	GTATCCCGCTACCAACC
Sequenzierung	SL174	GCACGCAGCTATCGCAAG
Sequenzierung	SL176	CTTGCGATAGCTGCGTGC
<i>um10655 (dhh1)</i>	SL173	GATGACGAGGAAGACGGG
	SL110	GGTGGCCGCGTTGGCCTGCGCAGGTACACCACCGTG
	SL111	GGTGGCCTGAGTGGCCGTGATTCCGCCAGGTCAG
	SL112	GCAACACCCGTGCCTATC
	SL114	GGCCGGTGTAGTAATGGG
<i>um03837 (khd4)</i>	MF590	TCGCATCGTCTTGACGCC
	MF965	AAAGCGCTCCGCTGTACC

### 4.1.3 Plasmide, Plasmidkonstruktionen und Genbanken

**Tab. 4. 4 In dieser Arbeit verwendete und hergestellte Plasmide sowie verwendete Genbanken**

Plasmidnummer	Bezeichnung	Resistenz	Anmerkungen
<b>Verwendete Plasmide</b>			
pCR2.1 TOPO			Invitrogen
pCR II TOPO			Invitrogen
pACT1IA	pP <sub>adh</sub> :AD (Aktivierungsdomäne)		König et al., 2007
pIIIMS2-1	<i>S. cerevisiae</i> / <i>E. coli</i> Transfer-Vektor, enthält RNA-Hybrid mit 2 MS-Bindestellen		SenGupta et al., 1996
pUMa194	pBS-hhn		Kämper, 2004
pUMa206	pNEBUC		Weinzierl, 2001
pUMa207	pNEBUH		Weinzierl, 2001
pUMa261	pTC-Hyg(+), pMF1h		Brachmann et al., 2004
pUMa270	pNEBUP		Weinzierl, 2001
pUMa419	pNEBUN		Weinzierl, 2001
pUMa427	pRrm4AG-ACT1IA		Drei-Hybrid-Plasmid, König et al., 2007
pUMa494	pIII MS2-5		Drei-Hybrid-Plasmid, J. Schwarz, pers. Mitteilung
pUMa550	pA1-IIIMS2-4		Drei-Hybrid-Plasmid, König et al., 2007
pUMa697	pkhd4Δ		Vollmeister, 2005
pUMa737	peGfp-TapTag-nos-SfiC-nat-pBS		Becht et al., 2006
pUMa738	pmRfp-nos-SfiC-nat-pBS		C-terminale Rfp-Fusion; M. Feldbrügge, pers. Mitteilung
pUMa756	pKhd4 <sup>1-1281</sup> G-ACT1IA		Drei-Hybrid-Plasmid, J. Schwarz, pers. Mitteilung
pUMa785	pS35b-IIIMS2-1		Drei-Hybrid-Plasmid; S. Baumann, pers. Mitteilung
pUMa786	pS35a-IIIMS2-1		Drei-Hybrid-Plasmid; S. Baumann, pers. Mitteilung
pUMa820	pS35b*-IIIMS2-1		Drei-Hybrid-Plasmid; S. Baumann, pers. Mitteilung
pUMa1085	p5'SwaI khd4 3'SfiI		C. Haag, pers. Mitteilung
pUMa1086	p5'SfiI RB khd4 3'SwaI		C. Haag, pers. Mitteilung
pUMa1099	pkhd4 <sup>ΔQ</sup> GT (alt)		C. Haag, pers. Mitteilung
pUMa1115	pKhd4 <sup>1-1281</sup> Gmkh3-ACT1IA		Drei-Hybrid-Plasmid, Haag, 2008
pUMa1142	pkhd4Δ-long borders		Haag, 2008
pUMa1155	pkhd4 <sup>ms3</sup> GT (alt)		C. Haag, pers. Mitteilung
pUMa1176	pKhd4 <sup>1-1281</sup> Gmkh5-ACT1IA		Drei-Hybrid-Plasmid, Haag, 2008
pUMa1178	pKhd4 <sup>1-1281</sup> Gmkh4-ACT1IA		Drei-Hybrid-Plasmid, Haag, 2008
pUMa1218	pS35-IIIMS2-1		Drei-Hybrid-Plasmid, S. Baumann, pers. Mitteilung
<b>Hergestellte Plasmide:</b>			
pUMa774	pSfiI-dhh1	Amp	Klonierung
pUMa775	pdhh1R	Amp, Nat	C-terminale Rfp-Fusion
pUMa782	pdhh1-SfiI	Amp	Klonierung
pUMa1017	pum05715	Amp	Northern-Sonde
pUMa1021	pum03706.2	Amp	Northern-Sonde
pUMa1104	pum00748	Amp	Northern-Sonde
pUMa1105	pum12098 w 5'/3'UTR	Amp	Northern-Sonde
pUMa1106	pum04193.2 zur mRNA Bestimmung	Amp	Intronbestätigung
pUMa1110	peGfp-TapTag-nos-SfiC-hygR-pBS	Amp, HygR	pMF5-3h, C-terminale Gfp-Ctt-Fusion
pUMa1160	p[AUACCC] <sub>6</sub> -IIIMS2-1	Amp, UR-43	Drei-Hybrid-Plasmid
pUMa1161	p[AGAUCU] <sub>6</sub> -IIIMS2-1	Amp, UR-43	Drei-Hybrid-Plasmid
pUMa1189	pkhd4 <sup>ΔQ</sup> GT (neu)	Amp, Hyg	C-terminale Gfp-Ctt-Fusion
pUMa1190	pkhd4GT	Amp, Hyg	C-terminale Gfp-Ctt-Fusion
pUMa1191	pkhd4mkh3GT (neu)	Amp, Hyg	C-terminale Gfp-Ctt-Fusion
pUMa1206	pkhd4mkh5GT	Amp, Hyg	C-terminale Gfp-Ctt-Fusion
pUMa1207	pkhd4mkh4GT	Amp, Hyg	C-terminale Gfp-Ctt-Fusion
<b>Verwendete Genbanken</b>			
RNA-Hybrid-Bibliothek			König, 2003

### **Plasmide zur Herstellung von Sonden für Northernanalysen:**

#### *pUMa1017*

Plasmid zur Verifizierung von der Transkriptmenge der Kontroll-mRNA *um05715 (act1)*. Die Herstellung erfolgte durch die Amplifizierung auf genomischer DNA des Stammes 521 mit den in Tabelle 4.3 aufgeführten Oligonukleotiden SL547 und SL548. Das Amplifikat (1136 bp) wurde in pCR2.1 oder pCRII TOPO integriert.

#### *pUMa1021*

Plasmid zur Verifizierung von der Transkriptmenge der *um03706.2*-mRNA. Die Herstellung erfolgte durch die Amplifizierung auf genomischer DNA des Stammes 521 mit den in Tabelle 4.3 aufgeführten Oligonukleotiden SL541 und SL542. Das Amplifikat (561 bp) wurde in pCR2.1 oder pCRII TOPO integriert.

#### *pUMa1104*

Plasmid zur Verifizierung von der Transkriptmenge der *um00748*-mRNA. Die Herstellung erfolgte durch die Amplifizierung auf genomischer DNA des Stammes 521 mit den in Tabelle 4.3 aufgeführten Oligonukleotiden SL640 und SL641. Das Amplifikat (552 bp) wurde in pCR2.1 oder pCRII TOPO integriert.

#### *pUMa1105*

Plasmid zur Verifizierung von der Transkriptmenge der *um12098*-mRNA. Die Herstellung erfolgte durch die Amplifizierung auf genomischer DNA des Stammes 521 mit den in Tabelle 4.3 aufgeführten Oligonukleotiden SL642 und SL643. Das Amplifikat (457 bp) wurde in pCR2.1 oder pCRII TOPO integriert. Das Amplifikat enthält

Die oben aufgeführten Plasmide wurden auf Richtigkeit durch Restriktionsanalysen sowie durch Sequenzierung mit dem Oligonukleotid MF503 kontrolliert.

### **Herstellungen von Plasmiden für das Hefe-Drei-Hybrid-Plasmide:**

#### *pUMa1160*

Das Plasmid enthält die RNA-Sequenz [AUACCC]<sub>6</sub> zur Verifizierung, dass AUACCC hinreichend ist. Das Plasmid entstand durch das Annealing von den Oligonukleotiden SL704 und SL705 unter Verwendung eines 5'-ClaI - sowie 3'-AscI-Überhangs. Die Integration erfolgte in den Vektor pUMa494, der mit ClaI und AscI geschnitten wurde.

#### *pUMa1161*

Plasmid enthält die RNA-Sequenz [AGAUCU]<sub>6</sub> zur Verifizierung, dass AGAUCU nicht hinreichend für die RNA/Protein-Interaktion ist. Das Plasmid entstand durch das Annealing von den Oligonukleotiden SL706 und SL707 unter Verwendung eines 5'-ClaI - sowie 3'-AscI-Überhangs. Die Integration erfolgte in den Vektor pUMa494, der mit ClaI und AscI geschnitten wurde.

Die hergestellten Plasmide wurden durch Restriktionsanalysen und zusätzlichen Sequenzierungen überprüft.

### **Plasmide für Genfusionen und Intronbestätigung in *U. maydis*:**

#### *pUMa775*

Plasmid zur Herstellung einer C-terminalen Rfp-Fusion für *um10655 (dbb1)*. Ligation erfolgte aus folgenden Fragmenten: pUMa782/MscI, SfiI (359 bp und 4991 bp), pUMa738/SfiI (2406 bp) und pUMa774/MscI, SfiI (2196 bp). pUMa782 und pUMa774 entstanden durch Amplifizierung mit den Oligonukleotiden SL173 und SL110 (2620 bp) sowie SL111 und SL112 (995 bp) auf genomischer DNA des Stammes 521 mit Integration in pCR2.1 oder pCRII TOPO.

#### *pUMa1106*

Plasmid zur Intronbestätigung des Gens *um04193.2* (vorher *um11123* und *um11124*). Die Herstellung erfolgte durch zwei PCR-Reaktionen: (1) auf cDNA (K. Zarnack, pers. Mitteilung) mit den in Tabelle 4.3 aufgeführten Oligonukleotiden MF898 und SL644 und (2) auf das erste PCR-Produkt mit den in Tabelle 4.3 aufgeführten Oligonukleotiden MF899 und SL644. Durch Sequenzierung und Sequenzvergleiche konnte das Intron in *um04193.2* bestätigt werden.

#### *pUMa1110*

Das Plasmid enthält flankiert von 2 SfiI-Schnittstellen ein *egfp* und *ctt* für die C-terminale Fusion von Genen. Außerdem enthält dieses Plasmid die Hyg-Resistenzkassette zur Selektion. Das Plasmid entstand aus einer Zweifragment-Ligation mit Fragmenten folgender Herkunft: pUMa261/NotI (2675 bp) und pUMa737/NotI (4485

bp).

#### *pUMa1189*

Das Plasmid enthält *kbd4* (1 – 3839 bp), welches die glutaminreiche Region deletiert hat. Zusätzlich ist am 3'Ende ein *egfp* und *ctt* fusioniert. Das Plasmid entstand aus einer Dreifragment-Ligation mit Fragmenten folgender Herkunft: pUMa1099/KpnI, NcoI (3480 bp), pUMa1099/AscI, KpnI (8319 bp) sowie pUMa1110/AscI, NcoI, XmaI (1269 bp).

#### *pUMa1190*

Das Plasmid enthält *kbd4* mit einer 3'Endfusion von *gfp* und *ctt*. Das Plasmid entstand durch eine Dreifragment-Ligation mit Fragmenten folgender Herkunft: pUMa1086/SfiI, DraIII (1886 bp), pUMa1085/SfiI, DraIII (7333 bp) sowie pUMa1110/SfiI (4272 bp).

#### *pUMa1191*

Das Plasmid enthält *kbd4* mit einer Mutation in der 3. KH-Domäne (GXXG → AAAA, Haag, 2008). Zusätzlich ist am 3'Ende ein *egfp* und ein *ctt* fusioniert. Das Plasmid entstand aus einer Zweifragment-Ligation mit Fragmenten folgender Herkunft: pUMa1110/SfiI (4272 bp) und pUMa1155/SfiI (9219 bp).

#### *pUMa1206*

Das Plasmid enthält *kbd4* mit einer Mutation in der 5. KH-Domäne (GXXG → AAAA; Haag, 2008). Zusätzlich ist am 3'Ende ein *egfp* und ein *ctt* fusioniert. Das Plasmid entstand aus einer Dreifragment-Ligation mit Fragmenten folgender Herkunft: pUMa1191/NdeI, XmaI (7916 bp), pUMa1191/BsiWI, NdeI (3586 bp) sowie pUMa1176/BsiWI, XmaI (1989 bp).

#### *pUMa1207*

Das Plasmid enthält *kbd4* mit einer Mutation in der 4. KH-Domäne (GXXG → AAAA, Haag, 2008). Zusätzlich ist am 3'Ende ein *egfp* und ein *ctt* fusioniert. Das Plasmid entstand aus einer Dreifragment-Ligation mit Fragmenten folgender Herkunft: pUMa1191/NdeI, XmaI (7916 bp), pUMa1191/BsiWI, NdeI (3586 bp) sowie pUMa1178/BsiWI, XmaI (1989 bp).

Die hergestellten Plasmide wurden über Restriktionsanalysen und zusätzlichen Sequenzierungen überprüft.

### 4.1.4 Stämme

**Tab. 4. 5 In dieser Arbeit verwendete Stämme**

Stammbezeichnung	Genotyp	UMA-Nummer	Resistenz	Referenz
521	<i>a1 b1</i>			Banuett und Herskowitz, 1989
AB33	<i>a2 b2 Pnar1:bW2 bE1</i>	133	Phleo	Brachmann, 2001
FB1	<i>a1 b1</i>	51		Banuett und Herskowitz, 1989
FB2	<i>a2 b2</i>	52		Banuett und Herskowitz, 1989
SG200	<i>a1 mfa2 bW2 bE1</i>	67	Phleo	Bölker et al., 1995
FB2khd4Δ	<i>a2 b2 kbd4Δ</i>	331	Hyg	Vollmeister, 2005
FB1dhh1R	<i>a1 b1 dhh1::mrjfp</i>	383	Nat	Vollmeister, 2005
FB1khd4Δ <sup>668-1416</sup>	<i>a1 b1 kbd4Δ<sup>668-1416</sup></i>	163	Hyg	Becht et al., 2005
FB2khd4Δ <sup>668-1416</sup>	<i>a2 b2 kbd4Δ<sup>668-1416</sup></i>	160	Hyg	Becht et al., 2005
AB33khd4GT	<i>a2 b2 Pnar1:bW2 bE1 kbd4::egfp::ctt</i>	478	Phleo, Hyg	Haag, 2008
AB33khd4Δ	<i>a2 b2 Pnar1:bW2 bE1 kbd4Δ</i>	482	Phleo, Hyg	Haag, 2008
SG200R	<i>a1 mfa2 bW2 bE1Potef 2x mrjfp ip</i>	586	Phleo, Cbx	Fuchs et al., 2006
SG200khd4Δ	<i>a1 mfa2 bW2 bE1 kbd4Δ</i>	506	Phleo, Hyg	C. Haag, pers. Mitteilung

**Tab. 4. 6 In dieser Arbeit hergestellte Stämme**

Stammbezeichnung	Genotyp	UMA-Nr.	transformiertes Plasmid	Locus	Ausgangsstamm	Resistenz	Referenz
FB1 dhh1R/khd4Δ	<i>a1 b1 dhh1::mrjfp kbd4Δ</i>	510	pUMa1142	<i>kbd4</i>	UMa383	Nat, Hyg	
AB33khd4m3GT	<i>a2 b2 Pnar:bW2 bE1 kbd4mkh3::egfp::ctt (GXXG--&gt;AAAA)</i>	548	pUMa1191	<i>kbd4</i>	AB33	Phleo, Hyg	
AB33khd4m4GT	<i>a2 b2 Pnar:bW2 bE1</i>	549	pUMa1207	<i>kbd4</i>	AB33	Phleo, Hyg	

AB33khd4m5GT	<i>kbd4mkb4:egfp::ctt</i> (GXXG-->AAAA) <i>a2 b2 Pnar:bW2 bE1</i>	550	pUMa1206	<i>kbd4</i>	AB33	Phleo, Hyg	
AB33khd4 <sup>Q</sup> GT	<i>kbd4mkb5:egfp::ctt</i> (GXXG-->AAAA) <i>a2 b2 Pnar:bW2 bE1 kbd4nt1-3839<sup>A</sup></i>	584	pUMa1189	<i>kbd4</i>	AB33	Phleo, Hyg	
SG200khd4m3GT	<i>a1 mfa2 bW2 bE1 kbd4mkb3:egfp::ctt</i> (GXXG-->AAAA)	545	pUMa1191	<i>kbd4</i>	SG200	Phleo, Hyg	
SG200khd4m4GT	<i>a1 mfa2 bW2 bE1 kbd4mkb4:egfp::ctt</i> (GXXG-->AAAA)	546	pUMa1207	<i>kbd4</i>	SG200	Phleo, Hyg	
SG200khd4m5GT	<i>a1 mfa2 bW2 bE1 kbd4mkb5:egfp::ctt</i> (GXXG-->AAAA)	547	pUMa1206	<i>kbd4</i>	SG200	Phleo, Hyg	
SG200khd4GT	<i>a1 mfa2 bW2 bE1 kbd4:egfp::ctt</i>	562	pUMa1191	<i>kbd4</i>	SG200	Phleo, Hyg	
SG200khd4GT/ dhh1R	<i>a1 mfa2 bW2 bE1 dbb1:mrfp kbd4:egfp::ctt</i>	582	pUMa775	<i>dbb1</i>	UMa562	Phleo, Hyg, Nat	in Zusammen- arbeit mit C. Haag

## 4.2 Molekularbiologische Standardmethoden

### 4.2.1 Handhabung von Nucleinsäuren

#### **Die Bestimmung der Konzentration von Nucleinsäuren:**

Die Konzentration von Nucleinsäuren wurde photometrisch bestimmt. Bei einer Schichtdicke von 1 cm entspricht  $OD_{260} = 1$  einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA, 33 µg/ml einzelsträngiger DNA, bzw. 40 µg/ml RNA. Als Maß für die Reinheit der Desoxyribonucleinsäuren diente der Quotient aus A260 zu A280. Für reine DNA und RNA sollte er bei etwa 1,8 liegen. Niedrigere Werte weisen auf Verunreinigungen mit Proteinen hin, höhere Werte auf Verunreinigungen mit Salzen oder Zuckern. Die Messungen erfolgten in einem BioSpec UV-Spektralphotometer (Amersham) bzw. NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop-Technologies).

#### **Restriktionsspaltungen:**

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

- 0,5 µg DNA
- 10 µg BSA, optional
- 0,5 U Restriktionsenzym
- 2 µl Reaktionspuffer (10fach)
- ad 20 µl H<sub>2</sub>O<sub>bid</sub>.

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

#### **Dephosphorylierung von 5'- und 3'-Enden von DNA-Molekülen:**

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

- 20 µl Restriktionsansatz
- 5 µl Reaktionspuffer (10fach)
- 3 U Alkalische Phosphatase
- ad 50 µl H<sub>2</sub>O<sub>bid</sub>.

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

### ***DNA-Fällung:***

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

### ***Auftrennung von Nukleinsäuren im Agarosegel:***

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten wurden neutrale Gele aus Agarose verwendet. Sie erlaubten eine Trennung von Fragmenten mit einer Länge von 70 bp bis zu einer Größe von 50 kb Länge, wobei die Auflösung je nach Agarose-Konzentration etwa 0,5% der Fragmentgröße betragen kann. Als Laufpuffer und als Lösungsmittel für die Agarose wurde 1x TAE oder 0,5x TBE verwendet. Die DNA-Lösung wurde vor dem Auftragen mit 0,2 Volumen Auftragspuffer versetzt. Die Gelelektrophorese wurde bei analytischen TBE-Gele mit bis zu 130 V und bei präparativen TAE-Gele mit nicht mehr als 80 V durchgeführt. Die Färbung der DNA mit Ethidiumbromid erfolgte während der Elektrophorese durch den im Gel zugesetzten Farbstoff. Manche Anwendungen machten eine Zugabe von 10 µl Ethidiumbromid-Lösung (Roth) zum Laufpuffer nötig. Die DNA-Banden wurden auf dem UV-Tisch durch Fluoreszenz des interkalierten Ethidiumbromids sichtbar. Als Marker wurde mit *Pst*I oder *Bst*EII restringierte DNA oder die 1 kb- bzw. 2log-Leiter (New England Biolabs) verwendet.

### ***Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen:***

Die entsprechende Bande wurde auf dem UV-Tisch mit dem Skalpell markiert. Es war darauf zu achten, dass eine niedrige Strahlungsintensität eingestellt war und die Dauer der Bestrahlung der DNA möglichst kurz gehalten wurde. Die Bande wurde dann in einem möglichst geringen Agarose-Volumen ausgeschnitten und in eine von unten gekürzte 20-200µl-Pipettenspitze mit Filtereinsatz (STARLab) überführt. Dann wurde die Spitze in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß gesetzt und 5 min bei 8000 Upm zentrifugiert, um dann eingesetzt zu werden. Alternativ wurde das JETsorb-Kit (Genomed) zur Extraktion von PCR-Fragmenten aus Agarosegelen verwendet und nach Herstellerangaben durchgeführt.

### ***Ligation von DNA-Fragmenten:***

Einfache Ligationsansätze wurden mit der Quick-DNA-Ligase nach dem vom Hersteller empfohlenen Protokoll durchgeführt. Dabei wurden Vektor und Fragment (nach Möglichkeit in ungefähr fünffachem molaren Überschuß) mit einem Gesamtvolumen von 10 µl zu einer gleichen Menge Ligationspuffer gegeben, mit 1 µl des Enzyms vermischt und 5 - 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluß konnte der Ansatz direkt in kompetente *E. coli*-Zellen (siehe "RbCl-Transformation") transformiert werden. Bei anspruchsvolleren Ligationen, z. B. durch den Einsatz von zwei oder mehr Fragmenten, erfolgte die kovalente Verknüpfung mit Hilfe der T4-DNA Ligase. Auch hier wurden die zu klonierenden Fragmente in der Regel in fünffach molarem Überschuss gegenüber der linearisierten und gegebenenfalls dephosphorylierten Vektor-DNA eingesetzt. Ein typischer Reaktionsansatz enthielt:

100 ng Vektor-DNA  
lineare Insertionsfragmente (in 5fach molaren Überschuß)  
1 U T4-DNA Ligase  
2 µl Ligase-Puffer (10fach)  
ad 20 µl H<sub>2</sub>O<sub>bid</sub>.

## **4.2.2 Isolierung von Nukleinsäuren**

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

Die Isolierung erfolgte durch "Lyse durch Kochen" nach Sambrook et al., 1989xx. 1,5 ml einer *E. coli*-Übernachtskultur wurden pelletiert (13.000 Upm, 30 sec, RT). Das Zellpellet wurde in 300 µl STET resuspendiert, nach Zugabe von 20 µl Lysozym-Lösung kräftig geschüttelt und anschließend 40 sec bei 95 °C in einem Eppendorf-Heizblock inkubiert. Die lysierten Zellenreste und die denaturierte genomische DNA wurden 15 min bei 13.000 Upm abzentrifugiert und danach mit einem sterilen Zahnstocher aus der wässrigen Lösung entfernt. Die Reinigung der Plasmid-DNA erfolgte durch Fällung mit 40 µl 3 M Na-Acetat, pH 5,3 und 400 µl Isopropanol bei RT für 5 min und anschließender Zentrifugation für 5 min bei 13.000 Upm. Das Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen und nach Trocknen in 200 µl TE-Puffer mit 20 µg/ml RNase A aufgenommen. Mit dieser Methode gelang es routinemässig, aus 1,5 ml Übernachtskultur etwa 50 µg Plasmid-DNA zu isolieren.

### ***DNA-Isolierung aus *U. maydis*:***

Diese Methode ist modifiziert nach Hoffman und Winston, 1987 xx. Dabei wurden 1,5 ml einer Übernachtskultur in YEPS<sub>light</sub>-Flüssigmedium zusammen mit 0,3 g Glasperlen in einem 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß pelletiert (13.000 Upm, 30 sec, RT), der Überstand abgegossen und das Pellet in 400 µl *Ustilago*-Lysispuffer und 400 µl TE-Phenol/Chloroform aufgenommen. Die Proben wurden für 10 min auf einem Vibrax-VXR Schüttler (IKA) geschüttelt. Nach Phasentrennung (13.000 Upm, 5 min, RT) wurden 400 µl des Überstands in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und mit 1 ml Ethanol gefällt. Nach Zentrifugation (13.000 Upm, 30 sec, RT) wurde das Pellet in 50 µl TE mit 20 µg/ml RNase A aufgenommen, bei 50 °C resuspendiert und bei -20 °C aufbewahrt.

### ***RNA-Isolierung nach der Trizol<sup>®</sup>-Methode:***

Diese Methode orientiert sich am Protokoll der Firma Invitrogen und wurde zur Präparation von Gesamt-RNA aus *U. maydis*-Flüssigkulturen verwendet: 2 ml Zellkultur (OD<sub>600</sub> = 0,5) wurden pelletiert (3.500 Upm, 5 min, RT), der Überstand verworfen und das Pellet in flüssigem Stickstoff schockgefroren (ggf. Aufbewahrung bei -80 °C). Auf das tiefgefrorene Zellpellet wurde 1 ml Trizol pipettiert, dieser Ansatz kurz gevortext und nach Zugabe von ca. 0,3 g Glasperlen (150212 microns; Sigma) für 5 min auf einer Retsch-Kugelmühle bei 30 Hz aufgeschlossen. Nach Inkubation bei RT für 5 min wurden 200 µl Chloroform zugegeben. Die Ansätze wurden anschließend kurz gevortext und 2-3 min bei RT inkubiert. Nach Zentrifugation (13.000 Upm, 4 °C, 15 min) wurde die wässrige Phase abgenommen, in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und nach Zugabe von 500 µl Isopropanol 10 min bei RT gefällt. Nach einer erneuten Zentrifugation (13.000 Upm, 4 °C, 10 min) wurde die pelletierte RNA mit 75% Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (13.000 Upm, 4 °C, 5 min). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet für 5 min bei RT getrocknet, anschließend in 50 µl Nuklease-freiem H<sub>2</sub>O (Ambion) aufgenommen und für 10 min bei 55 °C resuspendiert. Eine Quantitäts- und Qualitätskontrolle erfolgte durch photometrische Messung am NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer sowie durch Analyse auf einem Agilent 2100-BioanalyserR (siehe Angaben des Herstellers).

## **4.2.3 PCR-Techniken**

### ***Standard-PCR-Ansätze:***

Die Methode ist modifiziert nach Innis et al., 1990 xx. Ein typischer PCR-Ansatz enthielt etwa 10 ng Matrizen-DNA, zwei sequenzspezifische Oligonukleotide (f.c. 1 µM) und 125 µM (f.c.) dNTPs (d.h. je 200 µM dATP, dCTP, dGTP und dTTP) in PCR-Puffer. Standardmäßig wurden die Reaktionen in einem Volumen von 50 µl durchgeführt, zur Vermeidung von Kontaminationen wurden Pipettenspitzen mit Filtereinsatz benutzt. Bei einer Amplifikatlänge von unter 1 kb sah ein typisches Protokoll folgendermaßen aus:

- Denaturierung bei 94 °C für 2 min,
- Zugabe von 1-2 U Taq DNA-Polymerase (*Hot Start*),
- Denaturierung bei 94 °C für 1 min,
- 30 Zyklen mit jeweils 30 sec Denaturierung bei 94 °C, 30 sec Anlagerung bei 65 °C und 1 min Elongation bei 72 °C,
- mit einer abschließenden Elongationsphase von 10 min bei 72 °C.

Bei der Herstellung längerer Amplifikate wurde die Elongationszeit entsprechend angepasst. Die Reaktionen erfolgten im Thermocycler (PTC 100 oder PTC 200, MJ Research).

## **4.2.4 Transfer und Nachweis von DNA**

### ***Transfer von DNA (Southernblot-Analyse):***

Diese Methode ist modifiziert nach Southern, 1975 xx. Der Transfer der aufgetrennten DNA-Fragmente aus einem Agarosegel auf eine Nylonmembran erfolgte durch einen Kapillar-Blot. Hierbei wird die Transfer-Lösung (20x SSC) aus einem Pufferreservoir über Kapillarkräfte durch das Gel hindurch in einen auf dem Gel platzierten Stapel Papierhandtücher gesaugt. Die DNA-Fragmente werden durch den Pufferstrom aus dem Gel eluiert und binden an die darüberliegende Nylonmembran (Hybond-N+, Amersham Pharmacia Biotech). Vor dem Transfer wurde das Agarosegel für jeweils 20 min in 0,25 M HCl, DENAT- und RENAT-Lösung inkubiert, um u.a. einen Teil der Purine abzuspalten und damit den Transfer großer DNA-Fragmente zu erleichtern. Der Kapillar-Blot erfolgte in der Regel über Nacht, mindestens jedoch für 4 h. Anschließend wurde die Membran 15 min getrocknet und die DNA durch UV-Bestrahlung (1200 mJ \* cm<sup>-2</sup>) in einem StratalinkerR (Stratagene) fixiert.

### ***Der spezifische Nachweis immobilisierter DNA:***

Genspezifische Sonden wurden durch den Einbau von Digoxigenin-11-dUTP (DIG) während einer PCR markiert. Ein PCR-Ansatz enthielt 10 - 100 pg Plasmid-DNA oder 100 ng genomische DNA, 5 µl PCR-Puffer, 5 µl PCR-DIG-Labeling-Mix (Roche, siehe Herstellerangaben), jeweils 20 pmol der beiden Oligonukleotide und 0,5 µl *Taq*-DNA-Polymerase (mit H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub> auf 50 µl aufgefüllt). Die Reaktion erfolgte in einem Thermocycler PTC200 (MJ Research) analog einem Standard-PCR-Ansatz. Die Hybond-N+-Membranen (Amersham Pharmacia Biotech) wurden zur Absättigung der unspezifischen Bindungsstellen mit Southern-Hybridisierungspuffer für 20 min bei 62 °C präinkubiert. Nach Wechsel der Hybridisierungslösung wurde die für 5 min bei 95 °C denaturierte Sonde zugegeben und über Nacht bei 65 °C hybridisiert. Im Anschluß wurden die Filter für je 15 min bei 65 °C mit 2x SSPE + 0,1% SDS, 1x SSPE + 0,1% SDS und 0,1x SSPE + 0,1% SDS gewaschen.

Für die Detektion wurde die Membran bei Raumtemperatur unter langsamem Schwenken in folgenden Lösungen inkubiert: 5 min DIG-Waschpuffer, 30 min DIG2-Lösung, 30 min DIG2- Antikörper-Lösung (1:20.000 Anti-Digoxigenin-AB Fab-Fragmente (Roche) in DIG2-Lösung) und zweimal 20 min in DIG-Waschpuffer. Danach wurde die Membran für 5 min in DIG3-Lösung äquilibriert und anschließend für 5 min in Chemilumineszenz-Lösung (1:100 CDP-Star (Roche) in DIG3-Lösung) inkubiert. Die Membran wurde luftblasenfrei in einen Plastikbeutel eingeschweißt und gemeinsam mit einem Film in einer lichtdichten Kassette verschlossen. Nach einer Expositionszeit von durchschnittlich 10 min wurde der Film entwickelt.

### **4.2.5 Sequenzierung und Sequenzanalyse von DNA**

Die DNA-Sequenzierung wurde von der Zentralabteilung DNA am Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung (MPIZ) in Köln oder am hiesigen MPI durchgeführt. Verwendet wurden am MPIZ Sequenzierautomaten AbiPrism 377, 3100 und 3730 (Applied Biosystems) sowie in beiden Instituten das Sequenzier-Kit Big-Dye-Terminator v3.1 (Applied Biosystems). Die erhaltenen Daten wurden mit den Programmen SEQUENCHER 4.1 (Genecodes) oder CLONEMANAGER (Version 7, 8 und 9; Sci Ed Central) ausgewertet.

#### ***SEQUENCHER 4.1***

(Genecodes) zur Bearbeitung von Sequenz-Rohdaten und zum Vergleich von DNA-Sequenzen.

#### ***CLONEMANAGER***

(Version 7, 8 und 9; Sci Ed Central) zur Erstellung und Bearbeitung von Plasmid- und genomischen Sequenzen, zum Erstellen von Oligonukleotiden und Zeichnen von genetischen Karten.

#### ***BLAST2***

(Altschul et al., 1990; Altschul et al., 1997; Gish und States, 1993) zur Identifikation ähnlicher Proteine oder DNA-Sequenzen in den öffentlichen Datenbanken.

#### ***MEME***

(Bailey und Elkan, 1994 xx; <http://meme.sdsc.edu/meme/intro.html>) zur Identifikation wiederkehrender Sequenzmotive.

Die durch MEME ermittelte positionsspezifische Matrix (*Position-specific scoring matrix*) des AUACCC-Elements lautet:

```
ALPHABET= ARNDCQEGHILKMFPTWYVBZX
log-odds matrix: alength= 23 w= 6

  10.819  -12.654  -12.749
 -12.856   -9.569  -12.338
 -12.267   -9.945  -12.180
 -11.442  -12.269  -11.522
 -11.645  -13.037  -12.670
  -9.574  -11.050  -14.219
 -13.008  -10.151  -12.807
 -12.295   -9.277  -10.600
 -12.072  -10.472  -11.848
 -10.417  -12.018  -12.380
 -12.498  -12.494  -10.534
 -11.872  -11.442  -11.138
 -12.640  -12.983   -9.200
  11.993  -13.821  -12.957
 -10.016  -11.219  -12.238
  -9.455   10.819  -12.654
 -12.749  -12.856   -9.569
```

-12.338	-12.267	- 9.945
-12.180	-11.442	-12.269
-11.522	-11.645	-13.037
-12.670	- 9.574	-11.050
-14.219	-13.008	-10.151
-12.807	-12.295	- 9.277
-11.098	-15.452	-14.720
-15.462	17.201	-15.555
-16.216	-13.746	-14.786
-11.291	-11.875	-14.917
-11.974	-13.299	-15.275
-12.768	-12.396	-15.446
-14.582	-10.974	-15.123
-15.957	-12.230	-11.098
-15.452	-14.720	-15.462
17.201	-15.555	-16.216
-13.746	-14.786	-11.291
-11.875	-14.917	-11.974
-13.299	-15.275	-12.768
-12.396	-15.446	-14.582
-10.974	-15.123	-15.957
-12.230	3.437	-12.164
-11.663	-12.230	16.150
-12.137	-12.550	-10.133
-11.554	- 8.695	- 9.321
-11.442	- 9.289	-10.626
-12.044	- 9.358	- 9.493
-12.571	-11.625	- 8.188
-11.971	-12.388	- 8.503

## **WEBLOGO**

(Version 2.8.2) zur graphischen Abbildung eines Sequenzvergleichs.

## **4.2.6 Northern-Blot-Analyse**

### ***Wachstumsbedingungen***

Die Stämme FB2 und FB2khd4Δ wurden in CM-Flüssigmedium bis zu einer OD<sub>600</sub> ~ 1 angezogen und auf OD<sub>600</sub> ~ 0,3 verdünnt. Nach Wachstum bis OD<sub>600</sub> ~ 0,6 wurden diese bei 13000 Upm 2 min zentrifugiert und das Pellet Schock gefroren in flüssigem Stickstoff.

### ***Gesamt-RNA / mRNA-Aufreinigung und Auftrennung:***

Für *Northern-Blot*-Analysen wurde Gesamt-RNA stets nach der Trizol-Methode isoliert (siehe Kapitel 4.2.2). Die mRNA-Aufreinigung für *um03706.2* wurde mit dem Oligotex® mRNA Aufreinigungs Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben durchgeführt. Für den Nachweis der entsprechenden mRNAs wurden 15 µg pro Spur eingesetzt. Im Falle der mRNA-Aufreinigung für *um03706.2* wurden 1,5 µg pro Spur eingesetzt und auf einem 1%igen MOPS-Agarosegel aufgetrennt.

### ***RNA-Fällung***

Zur Aufkonzentration wurden RNA-Präparationen gepoolt, mit 1/10 Volumen 3M Natriumacetat (pH 5,3) sowie 2,5 Volumen 100%igem Ethanol versetzt, gemischt und über Nacht bei -20 °C gefällt. Nach Zentrifugation (22000 Upm, 15 min, 4 °C) wurde das Pellet mit 1 ml 75%igem Ethanol gewaschen und wieder zentrifugiert (13000 Upm, 15 min, 4 °C). Der Trocknung des Pellets folgte die Aufnahme in 11,5 µl nukleasefreiem Wasser und die Inkubation bei 50 °C für 10 min (1200 Upm).

### ***Northern Blot:***

Der Transfer der Nukleinsäuren auf eine Nylonmembran (Hybond-XL, Amersham Pharmacia Biotech) erfolgte durch Kapillar-Blot in 20x SSC länger als 3 h. Vor dem Transfer wurden die MOPS-RNA-Gele für 15 min in 20x SSC äquilibriert. Anschließend wurde die Membran getrocknet. Ein Nachweis der transferierten 18S- und 28S-rRNA-Banden auf der Membran wurde mittels Färbung mit Methylenblau (200 mg/l in 300 mM Na-Acetat) durchgeführt. Dazu wurde die Membran in der Färbelösung 5 min inkubiert, anschließend mit H<sub>2</sub>O gewaschen, getrocknet und das Bandenmuster photographisch dokumentiert.

### ***Spezifischer Nachweis immobilisierter RNA:***

Die Hybond-N+-Membranen (Amersham Pharmacia Biotech) wurden zur Absättigung der unspezifischen Bindungsstellen mit Hybridisierungspuffer für 20 min bei 60 °C präinkubiert. Nach Wechsel der Hybridisierungslösung wurde die bei 95 °C für 5 min denaturierte radioaktive Hybridisierungsprobe zugegeben (Endkonzentration etwa 10<sup>6</sup> cpm/ml). Spezifische Hybridisierung erfolgte bei 60 °C über Nacht. Die Filter wurden zweimal je 15 min bei 60 °C mit Waschpuffer gewaschen. Schließlich wurden die Filter in Plastikfolie eingeschweißt und in Kassetten für den Phosphorimager STORM840 (Molecular Dynamics) exponiert. Nach 12 bis 24 Stunden wurden die strahlungssensitiven *Screens* der Kassetten im Phosphorimager eingelesen und mit dem Computerprogramm IMAGEQUANT (Molecular Dynamics) bearbeitet.

### ***Herstellung von Hybridisierungssonden für Northern-Analysen:***

Doppelsträngige Hybridisierungssonden wurden durch Amplifizierung hergestellt. Folgende Oligonukleotidkombinationen wurden verwendet: SL640 und SL641 für *um00748* (552 bp), SL642 und SL643 für *um12098* (457 bp), SL541 und SL542 für *um03706.2* (561 bp) sowie SL547 und SL548 für die Kontroll-mRNA aktin (*um05715*; 1136 bp).

Die radioaktive Markierung der Hybridisierungssonden wurde wie folgt durchgeführt: 150 ng PCR-Produkt wurden in 33 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen und 5 min bei 100 °C denaturiert. Es folgte die Zugabe von 5 µl 10x Labeling Puffer (siehe Herstellerangaben, NEB-Puffer 2 und 33 µM dNTPs) und 6 µl dCTP-freie dNTPs. Nach der Zugabe von 1 µl Klenow-Enzym (NEB) und 5 µl <sup>32</sup>P dCTP (50 µCi), folgender kurzer Zentrifugation wurden die Sonden für 1½ bis 2 Stunden bei 37 °C inkubiert. Mittels S300-Säulchen (GE Healthcare) wurden die überschüssigen freien dNTPs verworfen (2 min bei 2800 Upm zentrifugieren). Nach Denaturierung 10 min bei 95 °C konnten die Hybridisierungssonden eingesetzt werden.

## **4.2.7 Microarray-Analyse**

### ***Wachstumsbedingungen:***

Alle Stämme, von denen *Microarray*-Analysen durchgeführt wurden, wurden dafür in Arrayminimalmedium angezogen. Die Zellen wurden stets bei OD<sub>600</sub> = 0,3 - 0,4 geerntet. Für die Zellernte wurden 2 ml Kultur in Eppendorfreaktionsgefäßen zentrifugiert (13.000 Upm, 1 min, RT), der Überstand entfernt und das verbleibende Pellet in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Pellets bei -80 °C gelagert.

### ***RNA-Isolierung:***

Für *Microarray*-Analysen wurde Gesamt-RNA stets nach der Trizol-Methode isoliert (siehe Kapitel 4.2.2).

### ***RNA-Aufreinigung nach RNeasy MinElute Cleanup-Protokoll (Qiagen):***

100 µl gelöste RNA wurden mit 350 µl Puffer RLT und 250 µl 100%igem EtOH gemischt. Dieser Ansatz wurde auf eine RNeasy-Säule pipettiert und für 15 sec bei 10.000 Upm, RT zentrifugiert. Nach Zugabe von 500 µl Puffer RPE wurde die Säule erneut für 15 sec bei 10.000 Upm, RT zentrifugiert. Nach Zugabe von 500 µl 80% EtOH wurde die Säule für 2 min bei 10.000 Upm, RT zentrifugiert. Anschließend wurde die Säule mit geöffnetem Deckel für 2 min bei 10.000 Upm, RT zentrifugiert, um das Säulenmaterial zu trocknen. Zur Elution der RNA wurden 14 µl Nuklease-freies Wasser (Ambion) auf die Matrix pipettiert und die Säule für 1 min bei 10.000 Upm zentrifugiert. Die Methode orientiert sich am Protokoll der Firma Qiagen. Die Zusammensetzung der verwendeten Puffer geht aus dem Protokoll hervor.

### ***Synthese und Aufreinigung von cDNA und cRNA:***

Alle nachfolgenden Amplifikationsschritte sind im "GeneChipR Expression Analysis Technical Manual" der Firma Affymetrix beschrieben.

### ***Ein-Schritt-Amplifikation:***

Für die Synthese eines cDNA-Erststranges wurden 5 µg gereinigte RNA (nach photometrischer Konzentrationsbestimmung) und 100 pmol T7(dT)-Primer in einem Volumen von 20 µl für 10 min bei 70 °C inkubiert. Nach Abzentrifugieren wurde der Ansatz auf Eis gestellt, mit 4 µl 5x Erststrang-Puffer, 2 µl 0,1 M DTT und 1 µl 10 mM dNTP-Mix versetzt und für 2 min bei 50 °C inkubiert. Nach Zugabe von 2 µl SuperScript II RT (Gibco) wurde die Mischung für 1 h bei 50 °C inkubiert. Für die Zweitstrang-Synthese wurde der oben beschriebene Ansatz mit 91 µl H<sub>2</sub>O, 30 µl 5x Zweitstrang-Puffer, 3 µl 10 mM dNTP-Mix, 1 µl *E. coli*-DNA-Ligase (10 U/µl), 4 µl *E. coli*-DNA-Polymerase I (10 U/µl) und 1 µl *E. coli*-RNase H (2 U/µl) versetzt und für 2 h bei 16 °C inkubiert.

Anschließend wurden 2 µl T4-DNA-Polymerase (5 U/µl) zugegeben, der Ansatz für weitere 5 min bei 16 °C inkubiert und die Reaktion mit 10 µl 0,5 M EDTA gestoppt. Diese Methode orientiert sich an den Protokollen der Firmen Affymetrix und Invitrogen. Die Zusammensetzung der verwendeten Puffer geht aus dem jeweiligen Protokoll hervor.

#### ***cDNA-Aufreinigung:***

600 µl cDNA-Bindepuffer wurden zu 162 µl cDNA gegeben, der Ansatz kurz gevortext und auf eine cDNA-Reinigungssäule gegeben. Nach Zentrifugation für 1 min bei 10.000 Upm (RT) wurde die Säule mit 750 µl cDNA-Waschpuffer gewaschen und erneut für 1 min bei 10.000 Upm (RT) zentrifugiert. Nach Verwerfen des Eluates wurde die Säule für 5 min bei 13.000 Upm (RT) zentrifugiert. Die Elution der cDNA erfolgte mit 14 µl cDNA-Elutionspuffer und einminütige Zentrifugation bei 13.000 Upm (RT). Eine Qualitätskontrolle der cDNA erfolgte auf einem Agilent 2100-BioanalyserR. Diese Methode orientiert sich am Protokoll der Firma Qiagen. Die Zusammensetzung der verwendeten Puffer geht aus dem Protokoll hervor.

#### ***cRNA-Synthese/in vitro-Transkription:***

Die *in vitro*-Transkription erfolgte mit dem BioArray-HighYield-RNA Transcript Labelling Kit (Enzo). Dabei wurde 5 µl cDNA mit 4 µl 10x HY-Puffer, 4 µl 10x Biotin-markierten Ribonukleotiden, 4 µl 10x DTT, 4 µl 10x RNase-Inhibitoren und 2 µl 20x T7-RNA-Polymerase in einem Gesamtvolumen von 40 µl versetzt. Die Komponenten wurden kurz gevortext, abzentrifugiert und anschließend bei 37 °C für 16 h inkubiert. Nach jeweils 30 min wurde der Ansatz bei 750 Upm für 30 sec geschüttelt. Diese Methode orientiert sich am Protokoll der Firma Enzo. Die Zusammensetzung der verwendeten Puffer geht aus dem Protokoll hervor.

#### ***cRNA-Aufreinigung:***

60 µl H<sub>2</sub>O wurden zu der *in vitro*-Transkriptionsreaktion pipettiert und für 3 sec gevortext. Der Ansatz wurde mit 350 µl IVT-cRNA-Bindepuffer versetzt und erneut für 3 sec gevortext. Anschließend wurden 250 µl 100%igem EtOH zugegeben und die Lösung durch Pipettieren gemischt. Dieser Ansatz wurde auf IVT-cRNA-Säulen aufgetragen und für 15 sec bei 10.000 Upm, RT zentrifugiert. Nach Zugabe von 500 µl IVT-cRNA-Waschpuffer wurden die Säulen erneut für 15 sec bei 10.000 Upm, RT zentrifugiert. Es wurden dann 500 µl 80 % EtOH zugegeben und die Säule erneut für 15 sec bei 10.000 Upm, RT zentrifugiert. Nach Verwerfen des Eluates wurde die Säule für 5 min bei 13.000 Upm, RT zentrifugiert. Zur Elution der cRNA wurden 11 µl H<sub>2</sub>O auf die Matrix pipettiert, die Säule für 1 min bei RT inkubiert, für 1 min bei 13.000 Upm, RT zentrifugiert, erneut mit 10 µl H<sub>2</sub>O versetzt, erneut für 1 min bei RT inkubiert und für 1 min bei 13.000 Upm, RT zentrifugiert. Eine Qualitätskontrolle der cRNA erfolgte auf einem Agilent 2100-BioanalyserR und durch photometrische Messung. Diese Methode orientiert sich am Protokoll der Firma Qiagen. Die Zusammensetzung der verwendeten Puffer geht aus dem Protokoll hervor.

#### ***cRNA-Fragmentierung:***

Für die cRNA-Fragmentierungsreaktion wurden 20 µg cRNA mit 8 µl Mg<sup>2+</sup>-haltigem 5x Fragmentations-Puffer und Nuklease-freiem H<sub>2</sub>O (Ambion) in einem Gesamtvolumen von 40 µl gemischt. Dieser Ansatz wurde 35 min bei 94 °C inkubiert und anschließend auf Eis gehalten. Eine Qualitätskontrolle der fragmentierten cRNA erfolgte auf einem Agilent 2100-BioanalyserR. Diese Methode orientiert sich am Protokoll der Firma Affymetrix. Die Zusammensetzung der verwendeten Puffer geht aus dem Protokoll hervor.

### **4.2.8 Microarray-Hybridisierung und Detektion**

#### ***Array-Hybridisierung:***

30 µl der fragmentierten cRNA wurden mit 5 µl des Kontroll-Oligo B2, 15 µl 20x Hybridisierungskontrollen, 3 µl Heringssperma-DNA (10 mg/ml), 3 µl BSA (50 mg/ml), 150 µl 2x Hybridisierungspuffer und Nuklease-freiem H<sub>2</sub>O (Ambion) in einem Gesamtvolumen von 300 µl gemischt (*Standard Array*). Dieser Cocktail wurde für 5 min bei 99 °C erhitzt, dann für 5 min bei 45 °C inkubiert und 5 min bei 13.000 Upm, RT abzentrifugiert. 200 µl davon wurden in den *Microchip* pipettiert, der zuvor mit 200 µl 1x Hybridisierungspuffer bei 45 °C für 10 min äquilibriert worden war. Nach Verschließen der *Chip*-Septen mit Klebepunkten wurde der *Chip* bei 45 °C und 60 Upm für 16 - 18 h hybridisiert. Diese Methode orientiert sich am Protokoll der Firma Affymetrix. Die Zusammensetzung der verwendeten Puffer geht aus dem Protokoll hervor.

#### ***Array-Detektionsreaktionen:***

Nach der Hybridisierung wurde der *Chip* entleert und mit 300 µl Waschpuffer A befüllt. Die Nachweisreaktionen wurden mit einem *S.APE*-Mix, bestehend aus 300 µl 2x MES-Puffer, 24 µl BSA (50 mg/ml), 6 µl Streptavidin-Phycoerythrin (1 mg/ml) und Nuklease-freiem H<sub>2</sub>O (Ambion) in einem Gesamtvolumen von 600 µl, sowie einer Antikörper-Mischung, bestehend aus 300 µl 2x MES-Puffer, 24 µl BSA (50 mg/ml), 6 µl Ziegen-IgG (10 mg/ml), 3,6 µl biotinylierter Antikörper (0,5 mg/ml) und Nuklease-freiem H<sub>2</sub>O (Ambion) in einem Gesamtvolumen von 600 µl durchgeführt. Es wurde das Programm EuGE-WS2v4 für sämtliche Wasch- und Detektionsschritte verwendet. Diese Methode orientiert sich am Protokoll der Firma Affymetrix. Die Zusammensetzung der verwendeten Puffer geht aus dem jeweiligen Protokoll hervor.

### ***Datenanalyse:***

Nach Abschluss der Wasch- und Markierungsschritte wurden die Arrays mit Hilfe eines GeneArray-Scanners (Agilent/Affymetrix) bzw. eines Affymetrix GeneChip-Scanners (Affymetrix) eingelesen. Das resultierende Bild wurde zunächst durch Verwendung des Programms AFFYMETRIX MICROARRAY SUITE 5.0 (Affymetrix) ausgewertet, normalisiert und die Expressionswerte kalkuliert. Eine Auswertung der Transkriptom-Vergleiche wurde mit Hilfe des Programms dChip 2004 (Li und Hung Wong, 2001) durchgeführt. Bei der vergleichenden Analyse der experimentellen *Arrays* mit den Kontrollarrays wurden Gene herausgefiltert, die mindestens zweifach induziert oder reprimiert waren. Bei der Berechnung der faktoriellen Änderung der Genexpression wurde ein Vertrauensintervall von 90% (*lower confidence bound of fold change*<sup>2</sup>) vorgegeben (Li und Hung Wong, 2001). Der Pearson-Korrelationskoeffizient (Microsoft Office, Excel) der FB2-Replikate belief sich bei 0,9891, die zweier unabhängiger FB2khd4Δ-Stämme bei 0,9838. Über 0,985 impliziert eine hohe Reproduzierbarkeit (Zakharkin et al., 2005).

Die Datenanalyse wurde Stand 2006-2007 durchgeführt. Etwaige Abweichungen von Genannotation und Bezeichnungen, der in dieser Arbeit verwendeten Ustilago-Gene, ist zu berücksichtigen (<http://mips.gsf.de/genre/proj/Ustilago/>).

## **4.3 Mikrobiologische und genetische Methoden**

### **4.3.1 *Escherichia coli***

#### ***Kultivierung von E. coli:***

Für die Kultivierung von *E. coli* wurden dYT- und LB-Flüssigmedien und YT-Festmedium verwendet (Ausubel et al., 1987; Sambrook et al., 1989). Medienzusätze wurden, soweit nicht anders vermerkt, in folgenden Konzentrationen eingesetzt: Ampizillin (100 µg/ml), Chloramphenicol (34 µg/ml), Kanamycin (40 µg/ml), Tetrazyklin (25 µg/ml) und X-Gal (40 µg/ml). *E. coli*-Stämme wurden entweder als Schüttelkulturen bei 200 U<sub>pm</sub> oder auf Festmedien unter aeroben Bedingungen bei 37°C kultiviert. Übernachtskulturen wurden von YT-Amp-Festmedien angeimpft.

#### ***Bestimmung der Zelldichte von E. coli:***

Die Zelldichte von Flüssigkulturen wurde photometrisch in einem Novospec II-Photometer (Pharmacia Biotech) bei 600 nm bestimmt. Um eine lineare Abhängigkeit sicherzustellen, wurden für die Messung der OD<sub>600</sub> die Kulturen durch entsprechende Verdünnung auf einen Wert unterhalb von 0,8 verdünnt. Als Nullwert wurde die OD<sub>600</sub> des jeweiligen Kulturmediums verwendet. OD<sub>600</sub> = 1,0 entspricht etwa 10<sup>9</sup> Zellen/ml.

#### ***RbCl-Transformation von E. coli:***

Dieses Protokoll ist modifiziert nach Cohen et al., 1972 xx klammern xx. Zur Herstellung transformationskompetenter Bakterienzellen wurden 100 ml LB-Medium, dem 10 mM MgCl<sub>2</sub> und 10 mM MgSO<sub>4</sub> zugesetzt waren, mit 1 ml einer frischen DH5α-Übernachtskultur angeimpft und bis zu einer OD<sub>600</sub> ≈ 0,5 bei 37 °C und 200 U<sub>pm</sub> inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation für 15 min bei 3.000 U<sub>pm</sub> und 4°C (Heraeus Varifuge 3.0R) pelletiert und in 33 ml eiskalter RF1-Lösung resuspendiert. Nach 30 bis 60 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen erneut abzentrifugiert (15 min, 3.000 U<sub>pm</sub>, 4 °C, Heraeus Varifuge 3.0R), der Überstand abgenommen, die Zellen in 5 ml eiskalter RF2-Lösung resuspendiert und 15 min inkubiert. Die Zellsuspension wurde zu je 100 µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Zur Transformation wurden die Zellen auf Eis aufgetaut, jeweils 50 µl mit bis zu 10 µl Plasmidlösung (1-5 ng DNA) bzw. Ligationsansatz versetzt und 45 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock von 1 min bei 42 °C wurde der Transformationsansatz zur Expression der durch das eingebrachte Plasmid vermittelten Antibiotikaresistenz mit 500 µl dYT-Medium versetzt und 30 min bei 37 °C horizontal mit 200 U<sub>pm</sub> geschüttelt. Anschließend wurde die Suspension auf YT-Platten mit 100 µg/ml Ampizillin ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Auf diese

Weise konnte eine Transformationsrate von  $10^6$  Transformanten pro 1  $\mu\text{g}$  eingesetzter Plasmid-DNA erreicht werden.

### 4.3.2 *Saccharomyces cerevisiae*

#### ***Kultivierung:***

Hefekulturen wurden entweder als Schüttelkulturen bei 200 Upm oder auf Festmedium unter aeroben Bedingungen bei 28 °C in den entsprechenden Medien kultiviert. Übernachtskulturen wurden von Kulturen auf Festmedium angeimpft, die für max. zwei Monate bei 4 °C gelagert waren.

#### ***Bestimmung der Zelldichte von Hefe:***

Die Zelldichte von Flüssigkulturen wurde photometrisch in einem Novospec II Photometer (Pharmacia Biotech) bei 600 nm bestimmt. Um eine lineare Abhängigkeit sicherzustellen, wurden für die Messung der  $OD_{600}$  die Kulturen durch entsprechende Verdünnung auf einen Wert unterhalb von 0,8 verdünnt. Als Nullwert wurde die  $OD_{600}$  des jeweiligen Kulturmediums verwendet.  $OD_{600} = 1,0$  entspricht etwa  $2 \cdot 10^7$  Zellen/ml.

#### ***Transformation:***

1,5 ml einer Hefeübernachtskultur ( $OD_{600}$  ca. 0,8) wurden für 3 min bei Raumtemperatur (RT) bei 3500 Upm zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1ml LiT pro Trafo resuspendiert, erneut bei 3500 Upm zentrifugiert und dann in 100 $\mu\text{l}$  LiT aufgenommen. 5  $\mu\text{l}$  Lachssperma-DNA (10 mg/ml), welche zuvor 5 min bei 95 °C denaturiert und dann auf Eis renaturiert wurde, 5 $\mu\text{l}$  Plasmid-DNA und 500  $\mu\text{l}$  PEG in LiT wurden addiert, gemischt und 15 min bei RT auf dem Laufrad inkubiert. Nach Zugabe von 50  $\mu\text{l}$  DMSO wurden die Zellen 15min bei 42 °C inkubiert und anschließend bei 8000 Upm für 30 sec zentrifugiert. Das Pellet wurde in 250  $\mu\text{l}$  H<sub>2</sub>O aufgenommen und auf die entsprechenden Nährböden ausplattiert.

### 4.3.3 *Ustilago maydis*

#### ***Kultivierung von U. maydis:***

*U. maydis*-Stämme wurden entweder als Schüttelkulturen bei 200 Upm oder auf Festmedien unter aeroben Bedingungen bei 28 °C kultiviert, sofern nicht anders vermerkt. Übernachtskulturen wurden von Kulturen auf Festmedien, die weniger als einen Monat bei 4 °C gelagert wurden, angeimpft. Die bei -80 °C gelagerten Glycerinkulturen wurden vor weiteren Arbeiten immer zuerst auf Festmedien ausgestrichen.

#### ***Bestimmung der Zelldichte bei U. maydis:***

Die Zelldichte von Flüssigkulturen wurde photometrisch in einem Novospec II Photometer (Pharmacia Biotech) bei 600 nm bestimmt. Um eine lineare Abhängigkeit sicherzustellen, wurden für die Messung der  $OD_{600}$  die Kulturen durch entsprechende Verdünnung auf einen Wert unterhalb von 0,8 verdünnt. Als Nullwert wurde die  $OD_{600}$  des jeweiligen Kulturmediums verwendet. Eine  $OD_{600}$  von 1,0 entspricht etwa  $1 - 5 \times 10^7$  Zellen/ml.

#### ***Transformation von U. maydis:***

Dieses Protokoll ist modifiziert nach Schulz et al., 1990 xx) und Gillissen et al., 1992 xx). Von einer auf Platte wachsenden Kultur wurde eine 4 ml YEPS-Flüssigkultur angesetzt und für 8-10 h bei 28 °C geschüttelt. Diese Vorkultur wurde anschließend 1:300 in 50 ml frischem YEPS<sub>Light</sub>-Medium verdünnt und bei 28 °C bis zu einer Zelldichte von  $1-2 \times 10^7$  Zellen/ml (bis maximal  $OD_{600} = 1,0$ ) geschüttelt. Nach Erreichen des optimalen Zelltiters wurden die Zellen durch Zentrifugation (3.200 Upm, 10 min, 4 °C) geerntet, einmal mit 25 ml SCS gewaschen und in 2 ml SCS mit 2,5 bis 5 mg/ml Novozym resuspendiert. Die in diesem Puffer bei Raumtemperatur ablaufende Protoplastierung kann mikroskopisch verfolgt werden, da die zigarrenförmigen Zellen nach Lyse der Zellwand eine kugelige Form einnehmen. Waren etwa 1/3 der Zellen abgerundet (5 - 15 min), wurden 10 ml eiskaltes SCS zugegeben und die Protoplasten durch 10-minütige Zentrifugation bei 2.300 Upm (4 °C) pelletiert. Um das Novozym vollständig zu entfernen, wurde dieser Waschgang zweimal wiederholt. Anschließend wurde mit eiskaltem 10 ml STC gewaschen und das Pellet danach in einem Volumen von 0,5 ml eiskaltem STC aufgenommen. Die so behandelten Protoplasten können 3 - 4 h auf Eis oder aliquotiert bei -80 °C mehrere Monate aufbewahrt werden. Zur integrativen Transformation wurden 50  $\mu\text{l}$  Protoplasten mit 1 - 5  $\mu\text{l}$  linearisierter Plasmid-DNA (ca. 5  $\mu\text{g}$ ) und 1  $\mu\text{l}$  Heparin-Lösung für 10 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 0,5 ml STC/PEG folgte eine weitere Inkubation von 15 min auf Eis. Anschließend wurde der gesamte Transformationsansatz auf einer kurz zuvor mit Top-Agar

überschichteten Regenerationsagarplatte ausgestrichen. Nach 2 bis 5 Tagen Inkubation bei 28 °C wurden die gewachsenen Kolonien mit einer Glaspipette auf antibiotikahaltigen CM- bzw. PD-Platten vereinzelt.

### ***Test auf filamentöses Wachstum:***

*U. maydis* Stämme wurden in CM-Flüssigmedium über Nacht bis zu einer  $OD_{600} = 1$  angezogen. Die Zellen wurden geerntet (Zentrifugation bei 3500 Upm für 5 min bei RT in einer Heraeus Biofuge), zweimal in  $H_2O_{bid.}$  gewaschen und anschließend so in  $H_2O_{bid.}$  aufgenommen, dass in etwa eine Zelldichte von  $OD_{600} = 3$  erreicht wurde. Von diesen Ansätzen wurden 3 - 5  $\mu$ l auf eine CM-CC-Platte getropft und wenn nicht anders beschrieben für 24 - 48 h unter Luftabschluss bei 22 °C inkubiert.

### ***Filamentinduktion durch Stickstoffquellenwechsel:***

AB33-Stämmen wurden in CM-Flüssigmedium über Nacht bis zu einer  $OD_{600} = 1$  angezogen. Die Zellen wurden auf eine  $OD_{600} = 0,3$  verdünnt, wachsen gelassen und bei  $OD_{600} = 0,5$  zentrifugiert (RT, 5 min, 2400 Upm), mit  $H_2O_{bid.}$  gewaschen und erneut zentrifugiert. Das Pellet wurde in NM-Glucose aufgenommen und für die entsprechende Zeit filamentös auswachsen gelassen (ca. 6h bei 28 °C).

### ***Pflanzeninfektionsanalysen zur Pathogenitätsbestimmung:***

Als Pathogenitätstest wurde eine Spritzinfektion verwendet, bei der eine Pilzsuspension in das Innere des Blattwirtels 7 Tage alter Maispflanzen injiziert wurde. Die entsprechenden Stämme wurden in  $YEPS_{Light}$ -Flüssigmedium bis zu einer  $OD_{600} = 0,8$  angezogen, durch Zentrifugation (3000 Upm, 5 min, RT) pelletiert und in  $H_2O_{bid.}$  aufgenommen ( $OD_{600} = 3,0$ ). Die kompatiblen Stämme (FB1 x FB2) wurden vor der Infektion 1:1 gemischt. SG200-Stämme wurden direkt injiziert. Die Bonitur erfolgte 7 und 14 Tage nach Infektion nach den im Text angegebenen Symptomklassifizierungen.

### ***Partikelinduktion:***

Kulturen von Zellen wurden in CM-Flüssigmedium bis zu einer  $OD_{600} \sim 1$  angezogen, auf  $OD_{600} \sim 0,2$  verdünnt und bis  $OD_{600} \sim 0,4$  wachsen gelassen. 200  $\mu$ l einer Kultur wurden für 5 - 10 min bei 40 °C schüttelnd inkubiert (800 Upm) und dann mikroskopiert (siehe Kapitel 4.5.1).

## **4.4 Biochemische Methoden**

### ***Quantitativer $\beta$ -Galaktosidase-Test in *S. cerevisiae*:***

Dieser Test wurde, wie bereits beschrieben, durchgeführt (König et al., 2007). Zwei unabhängige Experimente wurden durchgeführt und zwei bzw. ein exemplarisches Experiment sind gezeigt.

## **4.5 Zellbiologische Methoden**

### **4.5.1 Mikroskopie und Bildverarbeitung**

Für die Beobachtung von *U. maydis*-Zellen *in vivo* wurden 2  $\mu$ l einer logarithmisch wachsenden Kultur auf einem Objektträger mit dem gleichen Volumen vorgewärmter 2%iger Low-Melt-Agarose vermischt und mit einem Zeiss Axiophot Mikroskop betrachtet. Für DIC-Mikroskopie und Fluoreszenz-Mikroskopie wurde ein 63faches bzw. 100faches Plan-Apochromat Objektiv (Zeiss) verwendet. Für die Fluoreszenz-Mikroskopie wurden Filter mit folgendem Anregungs- und Emissionsspektrum eingesetzt: Rfp, 565nm und 620nm; Gfp; 450-490nm und 515-565nm. Bilder wurden mit einer gekühlten CCD-Kamera (CoolSNAP-HQ, Photometrics) aufgenommen. Die CoolSnap-HQ wurde mit dem Programm MetaMorph (Universal Imaging) gesteuert. Nachbearbeitung der Aufnahmen (Bildausschnitt, Kontrastverstärkung, Einfärbung, Maßstabskalierung) erfolgte mit MetaMorph und Photoshop CS2 (Adobe). Die Zusammenstellung und Bearbeitung der Abbildungen wurden mit Photoshop CS2 sowie Canvas 8 durchgeführt.

### **4.5.2 Quantifizierungen**

Längen- bzw. Breitenmessungen wurden mit Hilfe von MetaMorph (Universal Imaging) durchgeführt.

Berechnungen und statistische Auswertungen erfolgten mit Excel (Microsoft). Bei den Stämmen AB33khd4 $\Delta$ , AB33khd4<sup>m3</sup>GT und AB33khd4<sup>m4</sup>GT wurden für die Zelldurchmesseranalyse die Zellen analysiert, welche an den Enden von Zellaggregaten vorkamen und somit nur einen weiteren Zellpartner aufwiesen. Für die Analyse der Zelldurchmesser wurden 30 Zellen pro Stamm, für die Zellaggregat bzw. Zellform mindestens 80 Zellen pro Stamm und für die Filamentlängen und -durchmesser mindestens 29 und 10 (an drei Stellen pro Filament gemessen) Filamente pro Stamm verwendet. Mit Ausnahme der Zelldurchmessermessung wurden die Analysen in zwei unabhängigen Messungen durchgeführt xx.

## 4.6 Bioinformatische Analysen

### 4.6.1 Aminosäuresequenzvergleiche

Für die Analyse der Homologie zwischen Proteinen und deren KH-Domänen aus verschiedenen Eumycota wurde Khd4 bzw. die einzelnen KH-Domänen oder Regionen (Positionen jeweils in Tabelle 2.1 angegeben) als Matrize verwendet ([http://mips.gsf.de/genre/proj/ustilago/Search/sequence\\_view\\_um.cgi.jsp?entry=um03837](http://mips.gsf.de/genre/proj/ustilago/Search/sequence_view_um.cgi.jsp?entry=um03837); MUMDB). Zur Identifizierung homologer Proteine sowie deren E-Wert und Identität (%) wurde NCBI Blast verwendet ([http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&BLAST\\_PROGRAMS=blastp&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&SHOW\\_DEFAULTS=on&LINK\\_LOC=blasthome](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&BLAST_PROGRAMS=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&SHOW_DEFAULTS=on&LINK_LOC=blasthome); blastp gegen *Reference Proteins; Altschul et al., 1990*). Für die Identifizierung der KH-Domänen wurde SMART verwendet

#### ***Canvas 8***

Canvas 8 diente der Bearbeitung und Erstellung des Bildmaterials.

#### ***ClustalX***

ClustalX wurde zum Vergleich und Ausrichten mehrerer Protein- bzw. Nukleotidsequenzen verwendet (Thompson et al., 1997).

#### ***GeneDoc***

Das Programm GeneDoc wurde zur Bearbeitung und Annotation von ClustalX-Ergebnissen verwendet (<http://www.psc.edu/biomed/genedoc/>; Nicholas et al., 1997).

#### ***SMART***

Das *simple architecture research tool* wurde zur Identifikation konservierter Domänen bzw. zur Identifikation von Proteinen mit ähnlicher Domänenstruktur oder -organisation verwendet (<http://smart.embl.de/>; Letunic et al., 2004; Letunic et al., 2009; Schultz et al., 1998).

### 4.6.2 Transkriptomweite Identifizierung von Elementen und Positioneffektanalyse

Um Positionen der Elemente AUACCC, GGGUAAU und AGAUCU in Transkripten (6785, MUMDB, <http://mips.gsf.de/genre/proj/Ustilago/>) zu identifizieren, wurden die 5'UTR und die 3'UTR mit 300 Nukleotiden stromaufwärts der Startkodons und stromabwärts der Stopkodons definiert. Für die Positioneffektanalyse wurden die Positionen der Elemente innerhalb der Transkripte mit dem log<sub>2</sub> der faktoriellen Änderung der Expression unter Berücksichtigung eines 90% Vertrauensintervalls miteinander korreliert. Es wurden nur Transkripte verwendet, welche einen durchschnittlichen Expressionswert von über 50 entweder im Wildtypstamm FB2 oder im *khd4*-Deletionsstamm aufwiesen. Bei kurzen ORFs (<600 nt) wurden überlappende Motivpositionen entweder für die ersten oder letzten 300 nt beobachtet. In diesem Falle wurden die Motivpositionen den ersten 300 nt eines ORFs zugeteilt.

In Zusammenarbeit mit K. Zarnack wurden die empirische kumulative Verteilungsfunktion (CDF, *cumulative distribution function*) und der Wilcoxon-Rank-Sum-Test mit R 2.7.1 durchgeführt (Hornik, 2009, <http://www.r-project.org/>; ecdplotD by D. Sarkar). P-Werte wurden gegen die gleichförmige Verteilung unter Berücksichtigung eines signifikanten Schwellenwertes von <0,01 kalkuliert.

Für die Erstellung der Whisker-Diagramme wurde Microsoft Excel verwendet. Für die Analyse der UTR-Längen wurden 3664 und 3428 *expressed sequence tags* entsprechend für die 5' und 3'UTR verwendet (G. Mannhaupt, MUMDB). Für die Verteilung realer Positionen des RNA-Elementes AUACCC innerhalb der experimentell bestimmten UTR-Längen wurden 135 und 215 5' bzw. 3'UTRs ermittelt.

## 5. Literaturverzeichnis

- Abaza, I. und Gebauer, F. (2008) Functional domains of Drosophila UNR in translational control. *Rna*, **14**, 482-490.
- Abdelmohsen, K., Kuwano, Y., Kim, H.H. und Gorospe, M. (2008) Posttranscriptional gene regulation by RNA-binding proteins during oxidative stress: implications for cellular senescence. *Biol Chem*, **389**, 243-255.
- Aguilera, A. (2005) Cotranscriptional mRNP assembly: from the DNA to the nuclear pore. *Curr Opin Cell Biol*, **17**, 242-250.
- 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.
- Anderson, P. und Kedersha, N. (2006) RNA granules. *J Cell Biol*, **172**, 803-808.
- Anderson, P. und Kedersha, N. (2008) Stress granules: the Tao of RNA triage. *Trends Biochem Sci*, **33**, 141-150.
- Andrews, D.L., Egan, J.D., Mayorga, M.E. und Gold, S.E. (2000) The *Ustilago maydis* *ubc4* and *ubc5* genes encode members of a MAP kinase cascade required for filamentous growth. *Mol Plant Microbe Interact*, **13**, 781-786.
- Ausubel, S.F., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. und Struhl, K. (1987) *Current Protocols on Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Inc., USA.
- Backe, P.H., Messias, A.C., Ravelli, R.B., Sattler, M. und Cusack, S. (2005) X-ray crystallographic and NMR studies of the third KH domain of hnRNP K in complex with single-stranded nucleic acids. *Structure*, **13**, 1055-1067.
- Bailey, T.L. und Elkan, C. (1994) Fitting a mixture model by expectation maximization to discover motifs in biopolymers. *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol*, **2**, 28-36.
- Bailey, T.L., Williams, N., Misleh, C. und Li, W.W. (2006) MEME: discovering and analyzing DNA and protein sequence motifs. *Nucleic Acids Res*, **34**, W369-373.
- Banerjee, P., Nayar, S., Hebbar, S., Fox, C.F., Jacobs, M.C., Park, J.H., Fernandes, J.J. und Dockendorff, T.C. (2007) Substitution of critical isoleucines in the KH domains of Drosophila fragile X protein results in partial loss-of-function phenotypes. *Genetics*, **175**, 1241-1250.
- Banks, G.R., Shelton, P.A., Kanuga, N., Holden, D.W. und Spanos, A. (1993) The *Ustilago maydis* *nar1* gene encoding nitrate reductase activity: sequence and transcriptional regulation. *Gene*, **131**, 69-78.
- Banuett, F. und Herskowitz, I. (1989) Different *a* alleles of *Ustilago maydis* are necessary for maintenance of filamentous growth but not for meiosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, **86**, 5878-5882.
- Banuett, F. und Herskowitz, I. (2002) Bud morphogenesis and the actin and microtubule cytoskeletons during budding in the corn smut fungus *Ustilago maydis*. *Fungal Genet Biol*, **37**, 149-170.
- Barreau, C., Paillard, L. und Osborne, H.B. (2005) AU-rich elements and associated factors: are there unifying principles? *Nucleic Acids Res*, **33**, 7138-7150.
- Bashkurov, V.I., Scherthan, H., Solinger, J.A., Buerstedde, J.M. und Heyer, W.D. (1997) A mouse cytoplasmic exoribonuclease (mXRN1p) with preference for G4 tetraplex substrates. *J Cell Biol*, **136**, 761-773.
- Bassell, G.J. und Warren, S.T. (2008) Fragile X syndrome: loss of local mRNA regulation alters synaptic development and function. *Neuron*, **60**, 201-214.
- Baum, S., Bittins, M., Frey, S. und Seedorf, M. (2004) Asc1p, a WD40-domain containing adaptor protein, is required for the interaction of the RNA-binding protein Scp160p with polysomes. *Biochem J*, **380**, 823-830.

- Becht, P. (2005) Die Rolle von RNA-bindenden Proteinen bei der pathogenen Entwicklung von *Ustilago maydis*. *MPI for Terrestrial Microbiology*. Philipps-University, Marburg.
- Becht, P., König, J. und Feldbrügge, M. (2006) The RNA-binding protein Rrm4 is essential for polarity in *Ustilago maydis* and shuttles along microtubules. *J Cell Sci*, **119**, 4964-4973.
- Becht, P., Vollmeister, E. und Feldbrügge, M. (2005) Role for RNA-binding proteins implicated in pathogenic development of *Ustilago maydis*. *Eukaryot Cell*, **4**, 121-133.
- Blom, N., Gammeltoft, S. und Brunak, S. (1999) Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *J Mol Biol*, **294**, 1351-1362.
- Blom, N., Sicheritz-Ponten, T., Gupta, R., Gammeltoft, S. und Brunak, S. (2004) Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence. *Proteomics*, **4**, 1633-1649.
- Böhmer, C., Böhmer, M., Bölker, M. und Sandrock, B. (2008) Cdc42 and the Ste20-like kinase Don3 act independently in triggering cytokinesis in *Ustilago maydis*. *J Cell Sci*, **121**, 143-148.
- Böhmer, M., Colby, T., Böhmer, C., Bräutigam, A., Schmidt, J. und Bölker, M. (2007) Proteomic analysis of dimorphic transition in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Proteomics*, **7**, 675-685.
- Bölker, M. (2001) *Ustilago maydis* - a valuable model system for the study of fungal dimorphism and virulence. *Microbiology*, **147**, 1395-1401.
- Bölker, M., Genin, S., Lehmler, C. und Kahmann, R. (1995) Genetic regulation of mating, and dimorphism in *Ustilago maydis*. *Can J Bot*, **73**, 320-325.
- Bolognani, F. und Perrone-Bizzozero, N.I. (2008) RNA-protein interactions and control of mRNA stability in neurons. *J Neurosci Res*, **86**, 481-489.
- Bomsztyk, K., Denisenko, O. und Ostrowski, J. (2004) hnRNP K: one protein multiple processes. *Bioessays*, **26**, 629-638.
- Bomsztyk, K., Van Seuning, I., Suzuki, H., Denisenko, O. und Ostrowski, J. (1997) Diverse molecular interactions of the hnRNP K protein. *FEBS Lett*, **403**, 113-115.
- Brachmann, A. (2001) Die frühe Infektionsphase von *Ustilago maydis*: Genregulation durch das bW/bE-Heterodimer. *Fakultät für Biologie*. Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- Brachmann, A., König, J., Julius, C. und Feldbrügge, M. (2004) A reverse genetic approach for generating gene replacement mutants in *Ustilago maydis*. *Mol Genet Genomics*, **272**, 216-226.
- Brachmann, A., Weinzierl, G., Kämper, J. und Kahmann, R. (2001) Identification of genes in the bW/bE regulatory cascade in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol*, **42**, 1047-1063.
- Braddock, D.T., Baber, J.L., Levens, D. und Clore, G.M. (2002a) Molecular basis of sequence-specific single-stranded DNA recognition by KH domains: solution structure of a complex between hnRNP K KH3 and single-stranded DNA. *Embo J*, **21**, 3476-3485.
- Braddock, D.T., Louis, J.M., Baber, J.L., Levens, D. und Clore, G.M. (2002b) Structure and dynamics of KH domains from FBP bound to single-stranded DNA. *Nature*, **415**, 1051-1056.
- Bregues, M. und Parker, R. (2007) Accumulation of polyadenylated mRNA, Pab1p, eIF4E, and eIF4G with P-bodies in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell*, **18**, 2592-2602.
- Bregues, M., Teixeira, D. und Parker, R. (2005) Movement of eukaryotic mRNAs between polysomes and cytoplasmic processing bodies. *Science*, **310**, 486-489.
- Brown, J.W., Simpson, C.G., Thow, G., Clark, G.P., Jennings, S.N., Medina-Escobar, N., Haupt, S., Chapman, S.C. und Oparka, K.J. (2002) Splicing signals and factors in plant intron removal. *Biochem Soc Trans*, **30**, 146-149.

- Brykailo, M.A., Corbett, A.H. und Fridovich-Keil, J.L. (2007) Functional overlap between conserved and diverged KH domains in *Saccharomyces cerevisiae* SCP160. *Nucleic Acids Res*, **35**, 1108-1118.
- Buckanovich, R.J., Yang, Y.Y. und Darnell, R.B. (1996) The onconeural antigen Nova-1 is a neuron-specific RNA-binding protein, the activity of which is inhibited by paraneoplastic antibodies. *J Neurosci*, **16**, 1114-1122.
- Burd, C.G. und Dreyfuss, G. (1994) Conserved structures and diversity of functions of RNA-binding proteins. *Science*, **265**, 615-621.
- Carbo, N. und Perez-Martin, J. (2008) Spa2 is required for morphogenesis but it is dispensable for pathogenicity in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Fungal Genet Biol*, **45**, 1315-1327.
- Chen, Y. und Varani, G. (2005) Protein families and RNA recognition. *Febs J*, **272**, 2088-2097.
- Clery, A., Blatter, M. und Allain, F.H. (2008) RNA recognition motifs: boring? Not quite. *Curr Opin Struct Biol*, **18**, 290-298.
- Cohen, S.N., Chang, A.C. und Hsu, L. (1972) Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **69**, 2110-2114.
- Colot, H.V., Park, G., Turner, G.E., Ringelberg, C., Crew, C.M., Litvinkova, L., Weiss, R.L., Borkovich, K.A. und Dunlap, J.C. (2006) A high-throughput gene knockout procedure for *Neurospora* reveals functions for multiple transcription factors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 10352-10357.
- Cote, J., Boisvert, F.M., Boulanger, M.C., Bedford, M.T. und Richard, S. (2003) Sam68 RNA binding protein is an in vivo substrate for protein arginine N-methyltransferase 1. *Mol Biol Cell*, **14**, 274-287.
- Cougot, N., Babajko, S. und Seraphin, B. (2004) Cytoplasmic foci are sites of mRNA decay in human cells. *J Cell Biol*, **165**, 31-40.
- Crooks, G.E., Hon, G., Chandonia, J.M. und Brenner, S.E. (2004) WebLogo: a sequence logo generator. *Genome Res*, **14**, 1188-1190.
- Cunningham, K.S., Dodson, R.E., Nagel, M.A., Shapiro, D.J. und Schoenberg, D.R. (2000) Vigilin binding selectively inhibits cleavage of the vitellogenin mRNA 3'-untranslated region by the mRNA endonuclease polysomal ribonuclease 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 12498-12502.
- Currie, J.R. und Brown, W.T. (1999) KH domain-containing proteins of yeast: absence of a fragile X gene homologue. *Am J Med Genet*, **84**, 272-276.
- Daigle, N. und Ellenberg, J. (2007) LambdaN-GFP: an RNA reporter system for live-cell imaging. *Nat. Methods*, **4**, 633-636.
- D'Angelo, M.A. und Hetzer, M.W. (2008) Structure, dynamics and function of nuclear pore complexes. *Trends Cell Biol*, **18**, 456-466.
- Deutschbauer, A.M., Williams, R.M., Chu, A.M. und Davis, R.W. (2002) Parallel phenotypic analysis of sporulation and postgermination growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 15530-15535.
- Diaz-Moreno, I., Hollingworth, D., Frenkiel, T.A., Kelly, G., Martin, S., Howell, S., Garcia-Mayoral, M., Gherzi, R., Briata, P. und Ramos, A. (2009) Phosphorylation-mediated unfolding of a KH domain regulates KSRP localization via 14-3-3 binding. *Nat Struct Mol Biol*, **16**, 238-246.
- Doehlemann, G., Wahl, R., Vranes, M., de Vries, R.P., Kämper, J. und Kahmann, R. (2008) Establishment of compatibility in the *Ustilago maydis*/maize pathosystem. *J Plant Physiol*, **165**, 29-40.
- Dreyfuss, G., Kim, V.N. und Kataoka, N. (2002) Messenger-RNA-binding proteins and the messages they carry. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **3**, 195-205.
- Dreyfuss, G., Matunis, M.J., Pinol-Roma, S. und Burd, C.G. (1993) hnRNP proteins and the biogenesis of mRNA. *Annu Rev Biochem*, **62**, 289-321.

- Du, Z., Lee, J.K., Fenn, S., Tjhen, R., Stroud, R.M. und James, T.L. (2007) X-ray crystallographic and NMR studies of protein-protein and protein-nucleic acid interactions involving the KH domains from human poly(C)-binding protein-2. *Rna*, **13**, 1043-1051.
- Emili, A., Greenblatt, J. und Ingles, C.J. (1994) Species-specific interaction of the glutamine-rich activation domains of Sp1 with the TATA box-binding protein. *Mol Cell Biol*, **14**, 1582-1593.
- Eulalio, A., Behm-Ansmant, I. und Izaurralde, E. (2007) P bodies: at the crossroads of post-transcriptional pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **8**, 9-22.
- Farina, K.L., Hüttelmaier, S., Musunuru, K., Darnell, R. und Singer, R.H. (2003) Two ZBP1 KH domains facilitate beta-actin mRNA localization, granule formation, and cytoskeletal attachment. *J Cell Biol*, **160**, 77-87.
- Feldbrügge, M., Bölker, M., Steinberg, G., Kämper, J. und Kahmann, R. (2006) Regulatory and structural networks orchestrating mating, dimorphism, cell shape, and pathogenesis in *Ustilago maydis*. In Kües, U. und Fischer, R. (eds.), *The Mycota I*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp. 375-391.
- Feldbrügge, M., Kämper, J., Steinberg, G. und Kahmann, R. (2004) Regulation of mating and pathogenic development in *Ustilago maydis*. *Curr Opin Microbiol*, **7**, 666-672.
- Feldbrügge, M., Zarnack, K., Vollmeister, E., Baumann, S., Koepke, J., König, J., Münsterkötter, M. und Mannhaupt, G. (2008) The posttranscriptional machinery of *Ustilago maydis*. *Fungal Genet Biol*, **45 Suppl 1**, S40-46.
- Feng, Y., Absher, D., Eberhart, D.E., Brown, V., Malter, H.E. und Warren, S.T. (1997) FMRP associates with polyribosomes as an mRNP, and the I304N mutation of severe fragile X syndrome abolishes this association. *Mol Cell*, **1**, 109-118.
- Fenn, S., Du, Z., Lee, J.K., Tjhen, R., Stroud, R.M. und James, T.L. (2007) Crystal structure of the third KH domain of human poly(C)-binding protein-2 in complex with a C-rich strand of human telomeric DNA at 1.6 Å resolution. *Nucleic Acids Res*, **35**, 2651-2660.
- Fierro-Monti, I. und Mathews, M.B. (2000) Proteins binding to duplexed RNA: one motif, multiple functions. *Trends Biochem Sci*, **25**, 241-246.
- Fleischer, T.C., Weaver, C.M., McAfee, K.J., Jennings, J.L. und Link, A.J. (2006) Systematic identification and functional screens of uncharacterized proteins associated with eukaryotic ribosomal complexes. *Genes Dev*, **20**, 1294-1307.
- Frey, S., Pool, M. und Seedorf, M. (2001) Scp160p, an RNA-binding, polysome-associated protein, localizes to the endoplasmic reticulum of *Saccharomyces cerevisiae* in a microtubule-dependent manner. *J Biol Chem*, **276**, 15905-15912.
- Fuchs, U., Hause, G., Schuchardt, I. und Steinberg, G. (2006) Endocytosis is essential for pathogenic development in the corn smut fungus *Ustilago maydis*. *Plant Cell*, **18**, 2066-2081.
- Fukuda, T., Naiki, T., Saito, M. und Irie, K. (2009) hnRNP K interacts with RNA binding motif protein 42 and functions in the maintenance of cellular ATP level during stress conditions. *Genes Cells*, **14**, 113-128.
- Galgano, A., Forrer, M., Jaskiewicz, L., Kanitz, A., Zavolan, M. und Gerber, A.P. (2008) Comparative analysis of mRNA targets for human PUF-family proteins suggests extensive interaction with the miRNA regulatory system. *PLoS ONE*, **3**, e3164.
- Garcia, M., Darzacq, X., Delaveau, T., Jourden, L., Singer, R.H. und Jacq, C. (2007) Mitochondria-associated yeast mRNAs and the biogenesis of molecular complexes. *Mol Biol Cell*, **18**, 362-368.
- Garcia-Mayoral, M.F., Hollingworth, D., Masino, L., Diaz-Moreno, I., Kelly, G., Gherzi, R., Chou, C.F., Chen, C.Y. und Ramos, A. (2007) The structure of the C-terminal KH domains of KSRP reveals a noncanonical motif important for mRNA degradation. *Structure*, **15**, 485-498.
- Garcia-Muse, T., Steinberg, G. und Perez-Martin, J. (2004) Characterization of B-type cyclins in the smut fungus *Ustilago maydis*: roles in morphogenesis and pathogenicity. *J Cell Sci*, **117**, 487-506.

- Gerber, H.P., Seipel, K., Georgiev, O., Hofferer, M., Hug, M., Rusconi, S. und Schaffner, W. (1994) Transcriptional activation modulated by homopolymeric glutamine and proline stretches. *Science*, **263**, 808-811.
- Gherzi, R., Lee, K.Y., Briata, P., Wegmüller, D., Moroni, C., Karin, M. und Chen, C.Y. (2004) A KH domain RNA binding protein, KSRP, promotes ARE-directed mRNA turnover by recruiting the degradation machinery. *Mol Cell*, **14**, 571-583.
- Gherzi, R., Trabucchi, M., Ponassi, M., Ruggiero, T., Corte, G., Moroni, C., Chen, C.Y., Khabar, K.S., Andersen, J.S. und Briata, P. (2006) The RNA-binding protein KSRP promotes decay of beta-catenin mRNA and is inactivated by PI3K-AKT signaling. *PLoS Biol*, **5**, e5.
- Gibson, T.J., Thompson, J.D. und Heringa, J. (1993) The KH domain occurs in a diverse set of RNA-binding proteins that include the antiterminator NusA and is probably involved in binding to nucleic acid. *FEBS Lett*, **324**, 361-366.
- Gilks, N., Kedersha, N., Ayodele, M., Shen, L., Stoecklin, G., Dember, L.M. und Anderson, P. (2004) Stress granule assembly is mediated by prion-like aggregation of TIA-1. *Mol Biol Cell*, **15**, 5383-5398.
- Gillissen, B., Bergemann, J., Sandmann, C., Schröer, B., Böcker, M. und Kahmann, R. (1992) A two-component regulatory system for self/non-self recognition in *Ustilago maydis*. *Cell*, **68**, 647-657.
- Gish, W. und States, D.J. (1993) Identification of protein coding regions by database similarity search. *Nat Genet*, **3**, 266-272.
- Gonsalvez, G.B., Urbinati, C.R. und Long, R.M. (2005) RNA localization in yeast: moving towards a mechanism. *Biol Cell*, **97**, 75-86.
- Grishin, N.V. (2001) KH domain: one motif, two folds. *Nucleic Acids Res*, **29**, 638-643.
- Grosset, C., Chen, C.Y., Xu, N., Sonenberg, N., Jacquemin-Sablon, H. und Shyu, A.B. (2000) A mechanism for translationally coupled mRNA turnover: interaction between the poly(A) tail and a c-fos RNA coding determinant via a protein complex. *Cell*, **103**, 29-40.
- Guerra, M., Dobbertin, A. und Legay, C. (2008) Identification of cis-acting elements involved in acetylcholinesterase RNA alternative splicing. *Mol Cell Neurosci*, **38**, 1-14.
- Guo, M., Aston, C., Burchett, S.A., Dyke, C., Fields, S., Rajarao, S.J., Uetz, P., Wang, Y., Young, K. und Dohlman, H.G. (2003) The yeast G protein alpha subunit Gpa1 transmits a signal through an RNA binding effector protein Scp160. *Mol Cell*, **12**, 517-524.
- Haag, C. (2008) Die funktionelle Charakterisierung des RNA-bindenden Proteins Khd4 in *Ustilago maydis*. *MPI for Terrestrial Microbiology*. Philipps-Universität, Marburg.
- Hasegawa, Y., Irie, K. und Gerber, A.P. (2008) Distinct roles for Khd1p in the localization and expression of bud-localized mRNAs in yeast. *Rna*, **14**, 2333-2347.
- Hesketh, J. (2004) 3'-Untranslated regions are important in mRNA localization and translation: lessons from selenium and metallothionein. *Biochem Soc Trans*, **32**, 990-993.
- Ho, E.C., Cahill, M.J. und Saville, B.J. (2007) Gene discovery and transcript analyses in the corn smut pathogen *Ustilago maydis*: expressed sequence tag and genome sequence comparison. *BMC Genomics*, **8**, 334.
- 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.
- Hogan, D.J., Riordan, D.P., Gerber, A.P., Herschlag, D. und Brown, P.O. (2008) Diverse RNA-binding proteins interact with functionally related sets of RNAs, suggesting an extensive regulatory system. *PLoS Biol*, **6**, e255.
- Holliday, R. (1961) Induced mitotic crossing-over in *Ustilago maydis*. *Genet Res Camb*, **2**, 231-248.
- Holliday, R. (1974) *Ustilago maydis*. In King, R.C. (ed.), *Handbook of Genetics*. Plenum Press, New York, USA, Vol. 1, pp. 575-595.

- Holliday, R. (2004) Early studies on recombination and DNA repair in *Ustilago maydis*. *DNA Repair (Amst)*, **3**, 671-682.
- Hook, B., Bernstein, D., Zhang, B. und Wickens, M. (2005) RNA-protein interactions in the yeast three-hybrid system: affinity, sensitivity, and enhanced library screening. *Rna*, **11**, 227-233.
- Hornik, K. (2009) The R FAQ. [WWW document]: URL <http://CRAN.R-project.org/doc/FAQ/R-FAQ.html>.
- Hoyle, N.P., Castelli, L.M., Campbell, S.G., Holmes, L.E. und Ashe, M.P. (2007) Stress-dependent relocalization of translationally primed mRNPs to cytoplasmic granules that are kinetically and spatially distinct from P-bodies. *J Cell Biol*, **179**, 65-74.
- Huh, W.K., Falvo, J.V., Gerke, L.C., Carroll, A.S., Howson, R.W., Weissman, J.S. und O'Shea, E.K. (2003) Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature*, **425**, 686-691.
- Hui, J., Hung, L.H., Heiner, M., Schreiner, S., Neumüller, N., Reither, G., Haas, S.A. und Bindereif, A. (2005) Intronic CA-repeat and CA-rich elements: a new class of regulators of mammalian alternative splicing. *Embo J*, **24**, 1988-1998.
- Hui, J., Stangl, K., Lane, W.S. und Bindereif, A. (2003) HnRNP L stimulates splicing of the eNOS gene by binding to variable-length CA repeats. *Nat Struct Biol*, **10**, 33-37.
- Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. und White, T.J. (eds.). (1990) *PCR Protocols: a guide to methods and applications*. Academic Press, San Diego, USA.
- Irie, K., Tadauchi, T., Takizawa, P.A., Vale, R.D., Matsumoto, K. und Herskowitz, I. (2002) The Khd1 protein, which has three KH RNA-binding motifs, is required for proper localization of *ASH1* mRNA in yeast. *Embo J*, **21**, 1158-1167.
- Kaffarnik, F., Müller, P., Leibundgut, M., Kahmann, R. und Feldbrügge, M. (2003) PKA and MAPK phosphorylation of Prf1 allows promoter discrimination in *Ustilago maydis*. *EMBO J*, **22**, 5817-5826.
- Kämper, J. (2004) A PCR-based system for highly efficient generation of gene replacement mutants in *Ustilago maydis*. *Mol Genet Genomics*, **271**, 103-110.
- Kämper, J., Kahmann, R., Bölker, M., Ma, L.J., Brefort, T., Saville, B.J., Banuett, F., Kronstad, J.W., Gold, S.E., Müller, O., Perlin, M.H., Wösten, H.A., de Vries, R., Ruiz-Herrera, J., Reynaga-Pena, C.G., Snetselaar, K., McCann, M., Perez-Martín, J., Feldbrügge, M., Basse, C.W., Steinberg, G., Ibeas, J.I., Holloman, W., Guzman, P., Farman, M., Stajich, J.E., Sentandreu, R., Gonzalez-Prieto, J.M., Kennell, J.C., Molina, L., Schirawski, J., Mendoza-Mendoza, A., Greilinger, D., Münch, K., Rössel, N., Scherer, M., Vranes, M., Ladendorf, O., Vincon, V., Fuchs, U., Sandrock, B., Meng, S., Ho, E.C., Cahill, M.J., Boyce, K.J., Klose, J., Klosterman, S.J., Deelstra, H.J., Ortiz-Castellanos, L., Li, W., Sanchez-Alonso, P., Schreier, P.H., Hauser-Hahn, I., Vaupel, M., Koopmann, E., Friedrich, G., Voss, H., Schlüter, T., Margolis, J., Platt, D., Swimmer, C., Gnirke, A., Chen, F., Vysotskaia, V., Mannhaupt, G., Güldener, U., Münsterkötter, M., Haase, D., Oesterheld, M., Mewes, H.W., Mauceli, E.W., DeCaprio, D., Wade, C.M., Butler, J., Young, S., Jaffe, D.B., Calvo, S., Nusbaum, C., Galagan, J. und Birren, B.W. (2006) Insights from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen *Ustilago maydis*. *Nature*, **444**, 97-101.
- Kämper, J., Reichmann, M., Romeis, T., Bölker, M. und Kahmann, R. (1995) Multiallelic recognition: nonself-dependent dimerization of the bE and bW homeodomain proteins in *Ustilago maydis*. *Cell*, **81**, 73-83.
- Kedersha, N. und Anderson, P. (2002) Stress granules: sites of mRNA triage that regulate mRNA stability and translatability. *Biochem Soc Trans*, **30**, 963-969.
- Kedersha, N., Stoecklin, G., Ayodele, M., Yacono, P., Lykke-Andersen, J., Fitzler, M.J., Scheuner, D., Kaufman, R.J., Golan, D.E. und Anderson, P. (2005) Stress granules and processing bodies are dynamically linked sites of mRNP remodeling. *J Cell Biol*, **169**, 871-884.
- Keene, J.D. (2007) RNA regulons: coordination of post-transcriptional events. *Nat Rev Genet*, **8**, 533-543.
- Kim, H.H. und Gorospe, M. (2008) GU-rich RNA: expanding CUGBP1 function, broadening mRNA turnover. *Mol Cell*, **29**, 151-152.

- Kislauskis, E.H., Li, Z., Singer, R.H. und Taneja, K.L. (1993) Isoform-specific 3'-untranslated sequences sort alpha-cardiac and beta-cytoplasmic actin messenger RNAs to different cytoplasmic compartments. *J Cell Biol*, **123**, 165-172.
- Koepke, J. (2005) Proteomvergleich zur Charakterisierung des RNA-bindenden Proteins Rrm4 in *Ustilago maydis*. *MPI for Terrestrial Microbiology*. Philipps-University, Marburg.
- König, J. (2003) Verwendung des Drei-Hybrid-Systems zur Identifizierung eines RNA-Interaktionspartners von Rrm4 aus *Ustilago maydis*. *MPI for Terrestrial Microbiology, Marburg*. Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- 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 *rbo3* mRNAs. *Embo J*.
- König, J., Julius, C., Baumann, S., Homann, M., Göringer, H.U. und Feldbrügge, M. (2007) Combining SELEX and the yeast three-hybrid system for in vivo selection and classification of RNA aptamers. *Rna*, **13**, 614-622.
- Kruse, C., Grünweller, A., Notbohm, H., Kugler, S., Purschke, W.G. und Müller, P.K. (1996) Evidence for a novel cytoplasmic tRNA-protein complex containing the KH-multidomain protein vigilin. *Biochem J*, **320 Pt 1**, 247-252.
- Kruse, C., Grünweller, A., Willkomm, D.K., Pfeiffer, T., Hartmann, R.K. und Müller, P.K. (1998) tRNA is entrapped in similar, but distinct, nuclear and cytoplasmic ribonucleoprotein complexes, both of which contain vigilin and elongation factor 1 alpha. *Biochem J*, **329 Pt 3**, 615-621.
- Kruse, C., Willkomm, D.K., Grünweller, A., Vollbrandt, T., Sommer, S., Busch, S., Pfeiffer, T., Brinkmann, J., Hartmann, R.K. und Müller, P.K. (2000) Export and transport of tRNA are coupled to a multi-protein complex. *Biochem J*, **346 Pt 1**, 107-115.
- Kuersten, S. und Goodwin, E.B. (2003) The power of the 3' UTR: translational control and development. *Nat Rev Genet*, **4**, 626-637.
- Kuersten, S. und Goodwin, E.B. (2005) Linking nuclear mRNP assembly and cytoplasmic destiny. *Biol Cell*, **97**, 469-478.
- Lang, B.D. und Fridovich-Keil, J.L. (2000) Scp160p, a multiple KH-domain protein, is a component of mRNP complexes in yeast. *Nucleic Acids Res*, **28**, 1576-1584.
- Lang, B.D., Li, A., Black-Brewster, H.D. und Fridovich-Keil, J.L. (2001) The brefeldin A resistance protein Bfr1p is a component of polyribosome-associated mRNP complexes in yeast. *Nucleic Acids Res*, **29**, 2567-2574.
- Lee, M.H. und Schedl, T. (2006) RNA-binding proteins. *WormBook*, 1-13.
- Letunic, I., Copley, R.R., Schmidt, S., Ciccarelli, F.D., Doerks, T., Schultz, J., Ponting, C.P. und Bork, P. (2004) SMART 4.0: towards genomic data integration. *Nucleic Acids Res*, **32 Database issue**, D142-144.
- Letunic, I., Doerks, T. und Bork, P. (2009) SMART 6: recent updates and new developments. *Nucleic Acids Res*, **37**, D229-232.
- Lewis, H.A., Musunuru, K., Jensen, K.B., Edo, C., Chen, H., Darnell, R.B. und Burley, S.K. (2000) Sequence-specific RNA binding by a Nova KH domain: implications for paraneoplastic disease and the fragile X syndrome. *Cell*, **100**, 323-332.
- Li, A.M., Vargas, C.A., Brykailo, M.A., Openo, K.K., Corbett, A.H. und Fridovich-Keil, J.L. (2004) Both KH and non-KH domain sequences are required for polyribosome association of Scp160p in yeast. *Nucleic Acids Res*, **32**, 4768-4775.
- Li, A.M., Watson, A. und Fridovich-Keil, J.L. (2003) Scp160p associates with specific mRNAs in yeast. *Nucleic Acids Res*, **31**, 1830-1837.
- Li, C. und Hung Wong, W. (2001) Model-based analysis of oligonucleotide arrays: model validation, design issues and standard error application. *Genome Biol*, **2**, RESEARCH0032.

- Licatalosi, D.D., Mele, A., Fak, J.J., Ule, J., Kayikci, M., Chi, S.W., Clark, T.A., Schweitzer, A.C., Blume, J.E., Wang, X., Darnell, J.C. und Darnell, R.B. (2008) HITS-CLIP yields genome-wide insights into brain alternative RNA processing. *Nature*, **456**, 464-469.
- Lukong, K.E. und Richard, S. (2003) Sam68, the KH domain-containing superSTAR. *Biochim Biophys Acta*, **1653**, 73-86.
- Lukong, K.E. und Richard, S. (2007) Targeting the RNA-binding protein Sam68 as a treatment for cancer? *Future Oncol*, **3**, 539-544.
- Lunde, B.M., Moore, C. und Varani, G. (2007) RNA-binding proteins: modular design for efficient function. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **8**, 479-490.
- Lutz, C.S. (2008) Alternative polyadenylation: a twist on mRNA 3' end formation. *ACS Chem Biol*, **3**, 609-617.
- Mahlert, M., Leveleki, L., Hlubek, A., Sandrock, B. und Bölker, M. (2006) Rac1 and Cdc42 regulate hyphal growth and cytokinesis in the dimorphic fungus *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol*, **59**, 567-578.
- Mangus, D.A., Evans, M.C. und Jacobson, A. (2003) Poly(A)-binding proteins: multifunctional scaffolds for the post-transcriptional control of gene expression. *Genome Biol*, **4**, 223.
- Margeot, A., Garcia, M., Wang, W., Tetaud, E., di Rago, J.P. und Jacq, C. (2005) Why are many mRNAs translated to the vicinity of mitochondria: a role in protein complex assembly? *Gene*, **354**, 64-71.
- Marsellach, F.X., Huertas, D. und Azorin, F. (2006) The multi-KH domain protein of *Saccharomyces cerevisiae* Scp160p contributes to the regulation of telomeric silencing. *J Biol Chem*, **281**, 18227-18235.
- Martin, K.C. und Ephrussi, A. (2009) mRNA localization: gene expression in the spatial dimension. *Cell*, **136**, 719-730.
- Mayorga, M.E. und Gold, S.E. (1998) Characterization and molecular genetic complementation of mutants affecting dimorphism in the fungus *Ustilago maydis*. *Fungal Genet Biol*, **24**, 364-376.
- Mayorga, M.E. und Gold, S.E. (1999) A MAP kinase encoded by the *ubc3* gene of *Ustilago maydis* is required for filamentous growth and full virulence. *Mol. Microbiol.*, **34**, 485-497.
- McKnight, G.L., Reasoner, J., Gilbert, T., Sundquist, K.O., Hokland, B., McKernan, P.A., Champagne, J., Johnson, C.J., Bailey, M.C., Holly, R., O'Hara, P.J. und Oram, J.F. (1992) Cloning and expression of a cellular high density lipoprotein-binding protein that is up-regulated by cholesterol loading of cells. *J Biol Chem*, **267**, 12131-12141.
- McLaren, M., Asai, K. und Cochrane, A. (2004) A novel function for Sam68: enhancement of HIV-1 RNA 3' end processing. *Rna*, **10**, 1119-1129.
- Mendelsohn, B.A., Li, A.M., Vargas, C.A., Riehm, K., Watson, A. und Fridovich-Keil, J.L. (2003) Genetic and biochemical interactions between SCP160 and EAP1 in yeast. *Nucleic Acids Res*, **31**, 5838-5847.
- Merritt, C., Rasoloson, D., Ko, D. und Seydoux, G. (2008) 3' UTRs are the primary regulators of gene expression in the *C. elegans* germline. *Curr Biol*, **18**, 1476-1482.
- Messias, A.C., Harnisch, C., Ostareck-Lederer, A., Sattler, M. und Ostareck, D.H. (2006) The DICE-binding activity of KH domain 3 of hnRNP K is affected by c-Src-mediated tyrosine phosphorylation. *J Mol Biol*, **361**, 470-481.
- Messias, A.C. und Sattler, M. (2004) Structural basis of single-stranded RNA recognition. *Acc Chem Res*, **37**, 279-287.
- Mignone, F., Gissi, C., Liuni, S. und Pesole, G. (2002) Untranslated regions of mRNAs. *Genome Biol*, **3**, REVIEWS0004.
- Mikula, M., Dzwonek, A., Karczmarski, J., Rubel, T., Dadlez, M., Wyrwicz, L.S., Bomsztyk, K. und Ostrowski, J. (2006) Landscape of the hnRNP K protein-protein interactome. *Proteomics*, **6**, 2395-2406.

- Moore, M.J. und Proudfoot, N.J. (2009) Pre-mRNA processing reaches back to transcription and ahead to translation. *Cell*, **136**, 688-700.
- Müller, M., Heuck, A. und Niessing, D. (2007) Directional mRNA transport in eukaryotes: lessons from yeast. *Cell Mol Life Sci*, **64**, 171-180.
- Müller, P., Aichinger, C., Feldbrügge, M. und Kahmann, R. (1999) The MAP kinase kpp2 regulates mating and pathogenic development in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol*, **34**, 1007-1017.
- Muralidharan, B., Bakthavachalu, B., Pathak, A. und Seshadri, V. (2007) A minimal element in 5'UTR of insulin mRNA mediates its translational regulation by glucose. *FEBS Lett*, **581**, 4103-4108.
- Musco, G., Stier, G., Joseph, C., Castiglione Morelli, M.A., Nilges, M., Gibson, T.J. und Pastore, A. (1996) Three-dimensional structure and stability of the KH domain: molecular insights into the fragile X syndrome. *Cell*, **85**, 237-245.
- Musunuru, K. und Darnell, R.B. (2004) Determination and augmentation of RNA sequence specificity of the Nova K-homology domains. *Nucleic Acids Res*, **32**, 4852-4861.
- Nechama, M., Ben-Dov, I.Z., Briata, P., Gherzi, R. und Naveh-Many, T. (2008) The mRNA decay promoting factor K-homology splicing regulator protein post-transcriptionally determines parathyroid hormone mRNA levels. *Faseb J*, **22**, 3458-3468.
- Nicholas, K.B., Nicholas, H.B., Jr. und Deerfield, D.W., II. (1997) GeneDoc: Analysis and Visualization of Genetic Variation. *EMBNEWNEWS*, **4**.
- Noe, G., De Gaudenzi, J.G. und Frasch, A.C. (2008) Functionally related transcripts have common RNA motifs for specific RNA-binding proteins in trypanosomes. *BMC Mol Biol*, **9**, 107.
- Olivier, C., Poirier, G., Gendron, P., Boisgontier, A., Major, F. und Chartrand, P. (2005) Identification of a conserved RNA motif essential for She2p recognition and mRNA localization to the yeast bud. *Mol Cell Biol*, **25**, 4752-4766.
- Ostareck, D.H., Ostareck-Lederer, A., Shatsky, I.N. und Hentze, M.W. (2001) Lipoxigenase mRNA silencing in erythroid differentiation: The 3'UTR regulatory complex controls 60S ribosomal subunit joining. *Cell*, **104**, 281-290.
- Ostareck, D.H., Ostareck-Lederer, A., Wilm, M., Thiele, B.J., Mann, M. und Hentze, M.W. (1997) mRNA silencing in erythroid differentiation: hnRNP K and hnRNP E1 regulate 15-lipoxygenase translation from the 3' end. *Cell*, **89**, 597-606.
- Ostareck-Lederer, A. und Ostareck, D.H. (2004) Control of mRNA translation and stability in haematopoietic cells: the function of hnRNPs K and E1/E2. *Biol Cell*, **96**, 407-411.
- Ostrowski, J., Wyrwicz, L., Rychlewski, L. und Bomsztyk, K. (2002) Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K protein associates with multiple mitochondrial transcripts within the organelle. *J Biol Chem*, **277**, 6303-6310.
- Pan, F., Hüttelmaier, S., Singer, R.H. und Gu, W. (2007) ZBP2 facilitates binding of ZBP1 to beta-actin mRNA during transcription. *Mol Cell Biol*, **27**, 8340-8351.
- Paquin, N., Menade, M., Poirier, G., Donato, D., Drouet, E. und Chartrand, P. (2007) Local activation of yeast ASH1 mRNA translation through phosphorylation of Khd1p by the casein kinase Yck1p. *Mol Cell*, **26**, 795-809.
- Parker, R. und Sheth, U. (2007) P bodies and the control of mRNA translation and degradation. *Mol Cell*, **25**, 635-646.
- Parker, R. und Song, H. (2004) The enzymes and control of eukaryotic mRNA turnover. *Nat Struct Mol Biol*, **11**, 121-127.
- Pascal, E. und Tjian, R. (1991) Different activation domains of Sp1 govern formation of multimers and mediate transcriptional synergism. *Genes Dev*, **5**, 1646-1656.

- Pool, M.R. (2005) Signal recognition particles in chloroplasts, bacteria, yeast and mammals (review). *Mol Membr Biol*, **22**, 3-15.
- Radford, H.E., Meijer, H.A. und de Moor, C.H. (2008) Translational control by cytoplasmic polyadenylation in *Xenopus* oocytes. *Biochim Biophys Acta*, **1779**, 217-229.
- Reijns, M.A., Alexander, R.D., Spiller, M.P. und Beggs, J.D. (2008) A role for Q/N-rich aggregation-prone regions in P-body localization. *J Cell Sci*, **121**, 2463-2472.
- Ross, A.F., Oleynikov, Y., Kislauskis, E.H., Taneja, K.L. und Singer, R.H. (1997) Characterization of a beta-actin mRNA zipcode-binding protein. *Mol Cell Biol*, **17**, 2158-2165.
- Rougemaille, M., Villa, T., Gudipati, R.K. und Libri, D. (2008) mRNA journey to the cytoplasm: attire required. *Biol Cell*, **100**, 327-342.
- Sambrook, J., Frisch, E.F. und Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York.
- Scherer, M., Heimel, K., Starke, V. und Kämper, J. (2006) The Clp1 protein is required for clamp formation and pathogenic development of *Ustilago maydis*. *Plant Cell*, **18**, 2388-2401.
- Schmid, M. und Jensen, T.H. (2008) Quality control of mRNP in the nucleus. *Chromosoma*, **117**, 419-429.
- Schmidt, S., Bork, P. und Dandekar, T. (2002) A versatile structural domain analysis server using profile weight matrices. *J Chem Inf Comput Sci*, **42**, 405-407.
- Schultz, J., Milpetz, F., Bork, P. und Ponting, C.P. (1998) SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 5857-5864.
- Schulz, B., Banuett, F., Dahl, M., Schlesinger, R., Schäfer, W., Martin, T., Herskowitz, I. und Kahmann, R. (1990) The *b* alleles of *U. maydis*, whose combinations program pathogenic development, code for polypeptides containing a homeodomain-related motif. *Cell*, **60**, 295-306.
- Seay, D., Hook, B., Evans, K. und Wickens, M. (2006) A three-hybrid screen identifies mRNAs controlled by a regulatory protein. *Rna*, **12**, 1594-1600.
- Sengupta, D.J., Wickens, M. und Fields, S. (1999) Identification of RNAs that bind to a specific protein using the yeast three-hybrid system. *Rna*, **5**, 596-601.
- SenGupta, D.J., Zhang, B., Kraemer, B., Pochart, P., Fields, S. und Wickens, M. (1996) A three-hybrid system to detect RNA-protein interactions in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 8496-8501.
- Shepard, K.A., Gerber, A.P., Jambhekar, A., Takizawa, P.A., Brown, P.O., Herschlag, D., DeRisi, J.L. und Vale, R.D. (2003) Widespread cytoplasmic mRNA transport in yeast: identification of 22 bud-localized transcripts using DNA microarray analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 11429-11434.
- Siomi, H., Matunis, M.J., Michael, W.M. und Dreyfuss, G. (1993) The pre-mRNA binding K protein contains a novel evolutionarily conserved motif. *Nucleic Acids Res*, **21**, 1193-1198.
- Southern, E.M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol*, **98**, 503-517.
- Spellig, T., Bölker, M., Lottspeich, F., Frank, R.W. und Kahmann, R. (1994) Pheromones trigger filamentous growth in *Ustilago maydis*. *EMBO J*, **13**, 1620-1627.
- Spellig, T., Bottin, A. und Kahmann, R. (1996) Green fluorescent protein (GFP) as a new vital marker in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Mol Gen Genet*, **252**, 503-509.
- Steinberg, G. und Fuchs, U. (2004) The role of microtubules in cellular organization and endocytosis in the plant pathogen *Ustilago maydis*. *J Microsc*, **214**, 114-123.
- Steinberg, G., Wedlich-Söldner, R., Brill, M. und Schulz, I. (2001) Microtubules in the fungal pathogen *Ustilago maydis* are highly dynamic and determine cell polarity. *J Cell Sci*, **114**, 609-622.

- Stöhr, N., Lederer, M., Reinke, C., Meyer, S., Hatzfeld, M., Singer, R.H. und Hüttelmaier, S. (2006) ZBP1 regulates mRNA stability during cellular stress. *J Cell Biol*, **175**, 527-534.
- Ström, A.C., Forsberg, M., Lillhager, P. und Westin, G. (1996) The transcription factors Sp1 and Oct-1 interact physically to regulate human U2 snRNA gene expression. *Nucleic Acids Res*, **24**, 1981-1986.
- Stumpf, C.R., Kimble, J. und Wickens, M. (2008) A *Caenorhabditis elegans* PUF protein family with distinct RNA binding specificity. *Rna*, **14**, 1550-1557.
- Takizawa, P.A., DeRisi, J.L., Wilhelm, J.E. und Vale, R.D. (2000) Plasma membrane compartmentalization in yeast by messenger RNA transport and a septin diffusion barrier. *Science*, **290**, 341-344.
- Taylor, S.J. und Shalloway, D. (1994) An RNA-binding protein associated with Src through its SH2 and SH3 domains in mitosis. *Nature*, **368**, 867-871.
- Teixeira, D., Sheth, U., Valencia-Sanchez, M.A., Brengues, M. und Parker, R. (2005) Processing bodies require RNA for assembly and contain nontranslating mRNAs. *Rna*, **11**, 371-382.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. und Higgins, D.G. (1997) The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res*, **25**, 4876-4882.
- Triezenberg, S.J. (1995) Structure and function of transcriptional activation domains. *Curr Opin Genet Dev*, **5**, 190-196.
- Tsukuda, T., Carleton, S., Fotheringham, S. und Holloman, W.K. (1988) Isolation and characterization of an autonomously replicating sequence from *Ustilago maydis*. *Mol Cell Biol*, **8**, 3703-3709.
- Übersax, J.A., Woodbury, E.L., Quang, P.N., Paraz, M., Blethrow, J.D., Shah, K., Shokat, K.M. und Morgan, D.O. (2003) Targets of the cyclin-dependent kinase Cdk1. *Nature*, **425**, 859-864.
- Ule, J., Jensen, K.B., Ruggiu, M., Mele, A., Ule, A. und Darnell, R.B. (2003) CLIP identifies Nova-regulated RNA networks in the brain. *Science*, **302**, 1212-1215.
- Valverde, R., Edwards, L. und Regan, L. (2008) Structure and function of KH domains. *Febs J*, **275**, 2712-2726.
- Valverde, R., Pozdnyakova, I., Kajander, T., Venkatraman, J. und Regan, L. (2007) Fragile X mental retardation syndrome: structure of the KH1-KH2 domains of fragile X mental retardation protein. *Structure*, **15**, 1090-1098.
- Van de Bor, V. und Davis, I. (2004) mRNA localisation gets more complex. *Curr Opin Cell Biol*, **16**, 300-307.
- van Dijk, E., Cougot, N., Meyer, S., Babajko, S., Wahle, E. und Seraphin, B. (2002) Human Dcp2: a catalytically active mRNA decapping enzyme located in specific cytoplasmic structures. *Embo J*, **21**, 6915-6924.
- Van Seuning, I., Ostrowski, J., Bustelo, X.R., Sleath, P.R. und Bomsztyk, K. (1995) The K protein domain that recruits the interleukin 1-responsive K protein kinase lies adjacent to a cluster of c-Src and Vav SH3-binding sites. Implications that K protein acts as a docking platform. *J Biol Chem*, **270**, 26976-26985.
- Vanrobays, E., Leplus, A., Osheim, Y.N., Beyer, A.L., Wacheul, L. und Lafontaine, D.L. (2008) TOR regulates the subcellular distribution of DIM2, a KH domain protein required for cotranscriptional ribosome assembly and pre-40S ribosome export. *Rna*, **14**, 2061-2073.
- Vasudevan, S. und Steitz, J.A. (2007) AU-rich-element-mediated upregulation of translation by FXR1 and Argonaute 2. *Cell*, **128**, 1105-1118.
- Vergara, S.V. und Thiele, D.J. (2008) Post-transcriptional regulation of gene expression in response to iron deficiency: co-ordinated metabolic reprogramming by yeast mRNA-binding proteins. *Biochem Soc Trans*, **36**, 1088-1090.
- Vlasova, I.A. und Bohjanen, P.R. (2008) Posttranscriptional regulation of gene networks by GU-rich elements and CELF proteins. *RNA Biol*, **5**, 201-207.

- Vlasova, I.A., Tahoe, N.M., Fan, D., Larsson, O., Rattenbacher, B., Sternjohn, J.R., Vasdewani, J., Karypis, G., Reilly, C.S., Bitterman, P.B. und Bohjanen, P.R. (2008) Conserved GU-rich elements mediate mRNA decay by binding to CUG-binding protein 1. *Mol Cell*, **29**, 263-270.
- Vollmeister, E. (2005) Funktionelle und zellbiologische Untersuchungen an dem RNA-bindenden Protein Khd4 aus *Ustilago maydis*. *MPI for Terrestrial Microbiology*. Philipps-Universität, Marburg.
- Wahl, M.C., Will, C.L. und Lührmann, R. (2009) The spliceosome: design principles of a dynamic RNP machine. *Cell*, **136**, 701-718.
- Wang, H., Dichtenberg, J.B., Ku, L., Li, W., Bassell, G.J. und Feng, Y. (2008) Dynamic association of the fragile X mental retardation protein as a messenger ribonucleoprotein between microtubules and polyribosomes. *Mol Biol Cell*, **19**, 105-114.
- Weber, I., Gruber, C. und Steinberg, G. (2003) A class-V myosin required for mating, hyphal growth, and pathogenicity in the dimorphic plant pathogen *Ustilago maydis*. *Plant Cell*, **15**, 2826-2842.
- Weber, V., Wernitznig, A., Hager, G., Harata, M., Frank, P. und Wintersberger, U. (1997) Purification and nucleic-acid-binding properties of a *Saccharomyces cerevisiae* protein involved in the control of ploidy. *Eur J Biochem*, **249**, 309-317.
- Wedlich-Söldner, R., Bölker, M., Kahmann, R. und Steinberg, G. (2000) A putative endosomal t-SNARE links exo- and endocytosis in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *EMBO J*, **19**, 1974-1986.
- Weinzierl, G. (2001) Isolierung und Charakterisierung von Komponenten der b-vermittelten Regulationskaskade in *Ustilago maydis*. *Fachbereich Biologie*. Philipps-Universität Marburg, Marburg.
- Weng, Z., Thomas, S.M., Rickles, R.J., Taylor, J.A., Brauer, A.W., Seidel-Dugan, C., Michael, W.M., Dreyfuss, G. und Brugge, J.S. (1994) Identification of Src, Fyn, and Lyn SH3-binding proteins: implications for a function of SH3 domains. *Mol Cell Biol*, **14**, 4509-4521.
- White, S. und Doebley, J. (1998) Of genes and genomes and the origin of maize. *Trends Genet*, **14**, 327-332.
- Wickens, M., Bernstein, D.S., Kimble, J. und Parker, R. (2002) A PUF family portrait: 3'UTR regulation as a way of life. *Trends Genet*, **18**, 150-157.
- Wilhelm, J.E. und Smibert, C.A. (2005) Mechanisms of translational regulation in *Drosophila*. *Biol Cell*, **97**, 235-252.
- Wilson, C.A., Kreychman, J. und Gerstein, M. (2000) Assessing annotation transfer for genomics: quantifying the relations between protein sequence, structure and function through traditional and probabilistic scores. *J Mol Biol*, **297**, 233-249.
- Wilusz, C.J. und Wilusz, J. (2004) Bringing the role of mRNA decay in the control of gene expression into focus. *Trends Genet*, **20**, 491-497.
- Wintersberger, U., Kühne, C. und Karwan, A. (1995) Scp160p, a new yeast protein associated with the nuclear membrane and the endoplasmic reticulum, is necessary for maintenance of exact ploidy. *Yeast*, **11**, 929-944.
- Zakharkin, S.O., Kim, K., Mehta, T., Chen, L., Barnes, S., Scheirer, K.E., Parrish, R.S., Allison, D.B. und Page, G.P. (2005) Sources of variation in Affymetrix microarray experiments. *BMC Bioinformatics*, **6**, 214.
- Zalfa, F., Achsel, T. und Bagni, C. (2006) mRNPs, polysomes or granules: FMRP in neuronal protein synthesis. *Curr Opin Neurobiol*, **16**, 265-269.
- Zarnack, K., Eichhorn, H., Kahmann, R. und Feldbrügge, M. (2008) Pheromone-regulated target genes respond differentially to MAPK phosphorylation of transcription factor Prf1. *Mol Microbiol*, **69**, 1041-1053.
- Zarnack, K. und Feldbrügge, M. (2007) mRNA trafficking in fungi. *Mol Genet Genomics*, **278**, 347-359.
- Zhang, N., Ismail, T., Wu, J., Woodwark, K.C., Gardner, D.C., Walmsley, R.M. und Oliver, S.G. (1999) Disruption of six novel ORFs on the left arm of chromosome XII reveals one gene essential for vegetative growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **15**, 1287-1296.

Zhou, Y., Mah, T.F., Greenblatt, J. und Friedman, D.I. (2002) Evidence that the KH RNA-binding domains influence the action of the *E. coli* NusA protein. *J Mol Biol*, **318**, 1175-1188.

## 6. Anhang

### Übersicht der Daten auf der beiliegenden CD:

#### Ordner 1 – Microarray-Rohdaten

→ Die vollständigen Datensätze sind im dChip-Format angegeben. Die jeweiligen Replikate sind durch die Erweiterung 1 und 2 gekennzeichnet

#### Ordner 2 – Tabellen der gefilterten Datensätze (Excel)

→ EXC1: dChip-Filterungstabelle (Mittels Sternchen werden die gefilterten Sondenreihen angezeigt)

→ EXC2: Endauswertungstabelle (Kriterien siehe Kapitel 2.5.2)

## Danksagung

Mein Dank gilt in erster Linie Michael Feldbrügge für die Unterstützung meines Projektes, der regen Diskussionen und der guten Betreuung. Weiterhin möchte ich mich besonders bei der gesamten STaR-Lab Arbeitsgruppe Feldmanbashi bedanken, die sich für keinen Scherz zu fein war, wir eine Menge Spaß hatten während etwaiger Betriebsausflüge, Weihnachtsgrillsessions bei -20°C und eingefrorenen Händen und Füßen, der legendären Klatsch-und-Tratsch Ecke unseres Seminars und natürlich bei der Unterstützung während der regelmäßigen Höhen und Tiefen. Carl, Kathi, Petra, Sarah, Thomas und Sebastian danke ich für die Mitarbeit an dem Khd4-Projekt. Janine, Marc und Philip gilt mein Dank für die schönen Stunden in unserer Box.

All meinen Freunden möchte ich meinen Dank aussprechen für das Auffangen meiner Launen, für die Abwechslung zum Arbeitsalltag und für das Überhören von: „ich meld mich, sobald ich wieder etwas Zeit habe“. Denen sei gesagt, ich habe jetzt wieder Zeit! Weiterhin möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, die einen großen Beitrag zur Unterstützung meiner Arbeit geleistet hat. Ronny danke ich für das unschätzbare Vertrauen in mich und mein Handeln.

Frau Prof. Regine Kahmann möchte ich für die Möglichkeit danken, dass diese Arbeit in ihrer Abteilung durchgeführt werden konnte.

Zum Schluss gilt mein Dank für die freundliche Bereitschaft der Teilnahme an meiner Prüfungskommission den beiden Gutachtern Herrn PD Michael Feldbrügge und Herrn Prof. Hans-Ulrich Mösch sowie Herrn Prof. Uwe Maier und Juniorprofessor Dr. Martin Thanbichler.

## Lebenslauf

**Persönliche Angaben:** Evelyn Vollmeister  
geb. am 02.06.1981 in Anklam

### Ausbildung:

1992 - 2000 Gymnasium: "Neues Friedländer Gymnasium" (Allgemeine Hochschulreife), Friedland

2000 - 2005 Studium der Biologie an der Philipps-Universität Marburg

2004 - 2005 Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie, Marburg, in der Abteilung für Organismische Interaktionen unter Betreuung von Frau Prof. Dr. Regine Kahmann

Titel: "Funktionelle und zellbiologische Untersuchungen an dem RNA-bindenden Protein Khd4 aus *Ustilago maydis*"

2006 - 2009 Doktorarbeit am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie, Marburg, in der Abteilung für Organismische Interaktionen unter der Betreuung von Herrn PD Dr. Michael Feldbrügge

Titel: "Das AUACCC-bindende Protein Khd4 kontrolliert Morphogenese und Pathogenität in *Ustilago maydis* "