Die selektive Aktivierung der kleinen GTPasen Cdc42 und Rac1 durch Guaninnukleotid-Austauschfaktoren bestimmt deren Signalspezifität in *Ustilago maydis*

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

dem
Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von
Andrea Hlubek
aus Frankfurt/Main

Marburg / Lahn 2008

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden unter der Betreuung von Herrn Prof. Dr. Michael Bölker von April 2004 bis März 2008 an der Philipps-Universität Marburg durchgeführt.

vom Fachbereich Biologie

der Philipps-Universität Marburg als Dissertation

angenommen am: 29.04.2008

Erstgutachter: Herr Prof. Dr. Michael Bölker

Zweitgutachter: Herr Prof. Dr. Hans-Ulrich Mösch

Tag der mündlichen Prüfung am: 09.05.2008

Teile dieser Arbeit wurden in folgenden Artikeln veröffentlicht:

Mahlert, M., Leveleki, L., Hlubek, A., Sandrock, B. and Bölker, M. (2006) Rac1 and Cdc42 regulate hyphal growth and cytokinesis in the dimorphic fungus Ustilago maydis. *Mol Microbiol*, **59**, 567-578.

Hlubek, A., Schink, K., Mahlert, M., Sandrock, B. and Bölker, M. (2008) Selective activation by the guanine nucleotide exchange factor Don1 is a main determinant of Cdc42 signaling specificity in Ustilago maydis. *Mol Microbiol* (in press)

Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation mit dem Titel “Die selektive Aktivierung der kleinen GTPasen Cdc42 und Rac1 durch Guaninnukleotid-Austauschfaktoren bestimmt deren Signalspezifität in *Ustilago maydis*“ selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe. Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

_____ _____

(Ort, Datum) Andrea Hlubek

Für Julia und meine Eltern

Zusammenfassung der Arbeit

Rho-GTPasen fungieren als zentrale Schalter in komplexen Signalnetzwerken eukaryotischer Zellen. Sie sind an vielfältigen Prozessen beteiligt, wie der Regulation der Genexpression und Zellproliferation, der Organisation des Vesikelverkehrs und des Zytoskeletts. Diese Arbeit beschäftigt sich mit dem Problem der Spezifitätsdetermination der Rho-GTPasen. Es existieren weitaus mehr Aktivatoren und Effektoren, als GTPasen selbst. Hinzu kommt, dass einige Effektoren von mehr als einer GTPase aktiviert werden. Dennoch muss sichergestellt werden, dass ein spezifischer Stimulus auch immer nur die zugehörige Zellantwort induziert.

Trotz sehr hoher Sequenzähnlichkeit der GTPasen Cdc42 und Rac1 führen die Deletionen der entsprechenden Gene zu deutlich differenzierbaren Phänotypen in *U. maydis*. Durch Komplementationsstudien chimärer Konstrukten, bestehend aus verschiedenen Anteilen aus Cdc42- und Rac1-Sequenz, konnte gezeigt werden, dass die Region zwischen Aminosäure 41 und 56 notwendig und ausreichend für die Spezifitätsbestimmung der GTPasen ist.

Der Austausch einer einzigen Aminosäure innerhalb dieser Region führte zu einer GTPase, $Rac1^{W56F}$, die *in vivo* sowohl Funktionen von Cdc42 als auch von Rac1 erfüllt. Über *in vitro* GEF-Assays konnte gezeigt werden, dass der Aminosäureaustausch an dieser Position zur Erkennung von $Rac1^{W56F}$ durch den Cdc42-spezifischen GEF Don1 führt. Somit ist die Aktivierung von $Rac1^{W56F}$ durch Don1 der kritische Faktor, der es dieser GTPase erlaubt, Cdc42 zu ersetzen.

Die beiden Rho-GEFs Its1 und Cdc24 wurden sowohl mittels GEF-Assays auf ihre Spezifität gegenüber den GTPasen analysiert als auch genetisch auf ihre zellulären Funktionen hin untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass Its1 ein Cdc42-spezifischer GEF, und Cdc24 ein Rac1-spezifischer GEF ist. Interessanterweise führt der Aminosäureaustausch an Position 56 der GTPasen ebenfalls zu einer veränderten Aktivierbarkeit durch die beiden GEFs Its1 und Cdc24.

Die Analyse einer konditionalen *its1*-Mutante zeigte, dass dieser GEF in *U. maydis* essentiell ist. Sowohl die Zellwandmorphologie als auch Endozytose und Vesikelfusion sind in dieser Mutante gestört. Über quantitative „real time“-PCR konnte gezeigt werden, dass über Nutzung alternativer Polyadenylierungsstellen verschiedene Isoformen von Its1 gebildet werden, von denen nur die längere die katalytische GEF-Domäne besitzt.

Über die Erstellung einer konditionalen *cdc24*-Mutante konnte gezeigt werden, dass Cdc24 ebenfalls ein essentieller GEF ist und die Cdc24-Überexpression über Aktivierung von Rac1 zur Bildung langer Filamente führt.

Außerdem wurde in dieser Arbeit mit dem Rho-GDI Rdi1 ein weiterer Regulator der GTPasen untersucht. Interessanterweise interferiert eine *rdi1*-Deletion mit der Filamentbildung durch Ras1-, Rac1- und Cdc24-Überexpression, jedoch nicht mit der *b*-induzierten Filamentbildung, obwohl diese Rac1-abhängig ist. Dies spricht dafür, dass hier verschiedene regulatorische Mechanismen zugrunde liegen.

Abkürzungen und Fachbegriffe

Abb.	Abbildung	**MM**	Minimalmedium
Amp	Ampicillin	**N-terminus**	Amino-Terminus
ATP	Adenosin-Triphosphat	**OD_{600}**	Optische Dichte bei 600 nm
bp	Basenpaar	**ORF**	*„open reading frame“*
BSA	*„bovine serum albumin“*	**PAK**	p21 aktivierte Kinase
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat	**PCR**	*„polymerase chain reaction“*
Cbx	Carboxin	**PD**	*„potato dextrose“*
CMAC	7-amino-4-chloromethylcumarin (CellTracker™ blue)	**PEG**	Polyethylenglycol
CRIB	Cdc42/Rac1 interactive binding domain	**PKA**	Proteinkinase A
C-Terminus	Carboxy-Terminus	**q RT PCR**	Quantitative “*real time”* PCR
CTP	Cytosin-Triphosphat	**RNA**	Ribonukleinsäure
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid	**RNAse**	Ribonuklease
DNA	Desoxyribonukleinsäure	**rpm**	„*rotations per minute“*
dNTP	Desoxyribonukleosid-Triphosphat	**RT**	Raumtemperatur
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure	**SDS**	*„sodium dodecyl sulfate“*
FM4-64	N-(3-triethylammoniumpropyl)-4-(p-diethylaminophenylhexatrienyl)pyridiniumdibromid	**Tab.**	Tabelle
GAP	GTPase aktivierendes Protein	**TEMED**	N,N,N’,N’-Tetramethylendiamin
GDP	Guanosin-Diphosphat	**T_m**	mittlere Schmelztemperatur
GDI	Guanin nukleotid dissoziations Inhibitor	**Tris**	Trishydroxylmethylaminomethan
GEF	Guanin Nukleotid Austausch Faktor	**TTP**	Thymidin-Triphosphat
GTP	Guanosin-Triphosphat	**ÜNK**	Übernachtkultur
H_2O bidest.	zweifach destilliertes Wasser	**UV**	ultraviolettes Licht
Hyg	Hygromycin	**WT**	Wildtyp
kb	Kilobase	**YEP**	*„yeast extract + peptone“*
kD	Kilodalton	**YNB**	*„yeast nitrogen base“*
mant-GDP	N-methylanthranoyl-GDP	**X-Gal**	5-Bromo-4-chloro-l-indol-β-D-galactosid
MCS	Multiple Cloning Site	**z.B.**	Zum Beispiel

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung der Arbeit **I**

Abkürzungen und Fachbegriffe **III**

Inhaltsverzeichnis **IV**

1. Einleitung **1**

1.1 Rho-GTPasen **1**
1.1.1 Überblick 1
1.1.2 Regulation kleiner G-Proteine 2
1.1.3 Prenylierung der GTPasen und Regulation durch GDIs 4
1.1.4 Die Anzahl der Aktivatoren und der Effektoren übertrifft die der GTPasen 6

1.2 Guaninnukleotid-Austauschfaktoren **8**
1.2.1 Überblick 8
1.2.2 Der GEF Cdc24 12
1.2.3 Intersectin 15

1.3 *Ustilago maydis* **17**
1.3.1 Lebenszyklus 18
1.3.2 Zytokinese und Zellpolarität 20

1.4 Zielsetzung **24**

2. Ergebnisse **25**

2.1 Identifizierung der Spezifitätsdomäne von Cdc42 und Rac1 **25**
2.1.1 Die Aminosäureregion von 41 bis 56 ist notwendig und hinreichend zur Bestimmung der Spezifität von Rac1 und Cdc42 in *U. maydis* 27
2.1.2 Komplementation einer *cdc42*-Deletionsmutante in *S. cerevisiae* 28
2.1.3 Weitere Eingrenzung der Spezifitätsdomäne in *S. cerevisiae* 31
2.1.4 Weitere Eingrenzung der Spezifitätsdomäne in *U. maydis* 32

2.2 Die Aminosäure an Position 56 ist kritisch für eine spezifische GEF–GTPase Interaktion **34**
2.2.1 Der Einfluss der Aminosäure an Position 56 auf die Signalspezifität von *Um*Rac1^{W56F} und *Um*Cdc42^{F56W} in *S. cerevisiae* 34
2.2.2 Der Einfluss der Aminosäure an Position 56 auf die Signalspezifität der GTPasen in *U. maydis* 35
2.2.3 Aktivierbarkeit der GTPasen durch den GEF Don1 36
2.2.4 Komplementation der *cdc42/rac1* Doppelmutante durch Rac1^{W56F} 38

2.3 Identifizierung weiterer Cdc24- und Rac1-spezifischer GEFs **40**

2.4 Der GEF Cdc24 **42**
2.4.1 Cdc24 ist ein Rac1-spezifischer GEF 42
2.4.2 Der GEF Cdc24 ist essentiell 44
2.4.3 Die konditionale *cdc24*/*rac1*-Doppelmutante 45

2.5 Der GEF Its1 **47**
2.5.1 Its1 ist ein Cdc42-spezifischer GEF 47
2.5.2 Die DH-Domäne von Its1 komplementiert die *don1*-Deletionsmutante 48
2.5.3 Die konditionale *its1*-Mutante 50
2.5.4 Its1 als Regulator von Endozytose und Vakuolenfusion 53
2.5.5 *U. maydis* exprimiert verschiedene Isoformen von Its1 durch Nutzung alternativer Polyadenylierungsstellen 56

2.6 Rdi1 und polares Wachstum **60**
2.6.1 Einfluss von Rdi1 auf die durch Rac1- und Cdc24-induzierte Filamentbildung 60
2.6.2 Einfluss von Rdi1 auf die Bildung des Ras1-abhängigen Filaments 61
2.6.3 Die Rolle von Rdi1 bei der *b*-induzierten Filamentbildung 62

3. Diskussion **64**

3.1 Bestimmung der Signalspezifität von Cdc42 und Rac1 **65**
Eingrenzung einer Spezifitätsdomäne der GTPasen Cdc42 und Rac1 66
$Rac1^{W56F}$ vereint Funktionen von Rac1 und Cdc42 69
Modell zur Bestimmung der Signalspezifität 70

3.2 Intersectin reguliert vielfältige Prozesse durch seine Eigenschaft als gerüstbildendes Protein **75**
Intersectin ist ein gerüstbildendes Protein mit Cdc42-spezifischer GEF-Aktivität 75
Bildung verschiedener Isoformen über alternative Polyadenylierungsstellen 78

3.3 Funktionen von Cdc24 und Regulation der Polarität **82**
Cdc24 ist ein essentieller GEF, der Filamentbildung über Rac1 induziert 82
Aufbau und Erhalt der Polarität beim filamentösen Wachstum 85

4. Material **90**
Stämme 90
Medien 91
Chemikalien 94
Puffer und Lösungen 96
verwendete Kits 99
Enzyme und Proteine 99
Sonstige Materialien 100
Plasmide 100
Oligonukleotid-Primer 103

5. Methoden **108**

5.1 Anzucht von Mikroorganismen **108**
Anzucht von *E. coli* 108
Anzucht von *U. maydis* 108

Anzucht von *S. cerevisiae* 109

5.2 DNA-Präparationen **109**
Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* - analytischer Maßstab 109
Präparation genomischer DNA aus *U. maydis* für PCR 110
Präparation genomischer DNA aus *U. maydis* für Southern Blot 111

5.3 Amplifikation und Klonierung von DNA **111**
Amplifikation von DNA über Polymerase-Kettenreaktion 111
Restriktions-Analyse von DNA 113
Dephosphorylierung von DNA 113
Ligation von DNA-Fragmenten 114

5.4 Analyse von DNA **114**
Bestimmung der DNA-Konzentration 114
Trennung von DNA-Fragmenten mittels Agarosegelelektrophorese 114
DNA-Sequenzierung 115
Transfer und Detektion von DNA auf Membranen 116

5.6 Analyse von RNA **117**
Präparation von RNA aus *U. maydis* 117
Auftrennung von RNA durch Agarosegelelektrophorese 118
Transfer und Detektion von RNA auf Membranen 119
Quantitative „real time"-PCR 120

5.7 Biochemische Methoden **122**
Proteinexpression 122
Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen 122
GEF-Assays 122

5.8 Transformationen **123**
Herstellung elektrokompetenter *E. coli*-Zellen 123
Elektro-Transformation von elektrokompetenten *E. coli*-Zellen 123
Herstellung chemokompetenter *E. coli*-Zellen 124
Transformation chemokompetenter *E. coli*-Zellen 124
Protoplastierung von *U. maydis* 124
Transformation von *U. maydis*-Protoplasten 125
Integration von Vektoren in den genomischen *ip*-Locus 125
Transformation von *S. cerevisiae* 126

5.9 Untersuchung von *U. maydis* **127**
Mikroskopie 127
Färbungen 128

6. Literaturverzeichnis **130**

1. Einleitung

1.1 Rho-GTPasen

1.1.1 Überblick

Die Superfamilie der kleinen GTP-bindenden Proteine (G-Proteine) enthält über 100 Mitglieder, die aufgrund struktureller und funktioneller Unterschiede in fünf verschiedene Familien eingeteilt werden können (Bourne et al., 1990). Die Ras-Familie reguliert die Genexpression, die Funktionen der Proteine der Rho-Familie liegen vorwiegend in der Aktinorganisation. Die Mitglieder der Rab- und Sar1/Arf-Familien regulieren den Vesikeltransport und GTPasen der Ran-Familie haben Aufgaben im nukleozytoplasmatischen Transport (Takai et al., 2001). Zu der Familie der Rho-GTPasen gehören unter anderem die GTPasen Rho, Cdc42 und Rac, die an verschiedenen biologischen Prozessen der Zelle beteiligt sind. Sie steuern neben der Reorganisation des Aktinzytoskeletts und der Regulation der Genexpression auch Prozesse des Zellwachstums und der Differenzierung (Hall, 1998; Hall and Nobes, 2000).
Rho GTPasen fungieren als molekulare Schalter in komplexen Signalkaskaden. Abhängig von der Bindung von GTP oder GDP ändern sie ihre Konformation und wechseln so zwischen ihrer aktiven und ihrer inaktiven Form. Die GTP-gebundene Form ist die aktive Konformation, in der die GTPase an Effektoren bindet und nachgeschaltete Prozesse aktiviert. Die Aktivität der GTPasen muss streng reguliert werden, deregulierte Aktivität sowohl von Ras- als auch von Rho-Proteinen kann zu malignen Transformationen führen (Hall and Nobes, 2000). Oft wird auch eine erhöhte Expression oder Aktivität von Rho-GTPasen in Tumorzellen gefunden (Abraham et al., 2001).

Cdc42 ist die am besten charakterisierte GTPase der Rho-Familie, die essentielle Funktion dieses Proteins wurde erstmals in *S. cerevisiae* beschrieben. Temperatursensitive Mutanten zeigen unter restriktiven Bedingungen eine asymmetrische Verteilung des Zytoskeletts und Knospungsdefekte. Sie arretieren als große, knospenlose Zellen mit mehreren Kernen (Adams et al., 1990). In Pilzen und auch höheren Eukaryoten wurden Proteine gefunden, die eine sehr hohe Sequenzähnlichkeit, teilweise bis zu 95 %, aufweisen (Chen et al., 1993; Gong et al.,

1997). Viele dieser Cdc42 Proteine sind so stark konserviert, dass sie die temperatursensitive *cdc42*-Mutante in *S. cerevisiae* komplementieren können (Munemitsu et al., 1990; Shinjo et al., 1990). Cdc42 ist an der Regulation einer Vielzahl zellulärer Prozesse beteiligt, unter anderem an der Regulation des Aktinzytoskeletts über WASP und den Arp2/3-Komplex, und an der Signalweiterleitung von externen und internen Stimuli in den Zellkern (Eden et al., 2002; Wear et al., 2000).

Rac1 ist ein weiteres Mitglied der Familie der Rho-GTPasen und weist eine hohe Sequenzähnlichkeit zu Cdc42 auf. Es wurde erstmals als zelluläres Substrat eines bakteriellen Toxins der C3-Exotransferase von *Clostridium botulinum* beschrieben (Didsbury et al., 1989). Aufgrund dessen und aufgrund seiner Verwandtschaft zu Ras-Proteinen wurde es Rac (ras related C3 botulinum toxin substrate) genannt. Erst später stellte sich heraus, dass Rho-Proteine die tatsächlichen Substrate des C3 Toxins sind und Rac1 ein eher schlechtes Substrat darstellt (Menard et al., 1992). Die zellulären Funktionen von Rac1 ähneln denen von Cdc42. Rac1 reguliert ebenfalls die Aktinpolymerisation über den Arp2/3-Komplex, allerdings nicht wie Cdc42 über WASP, sondern über WAVE Proteine (Miki et al., 2000; Yamazaki et al., 2007). So induziert aktives Rac1 Lamellipodien und „membrane ruffles“ in Fibroblasten, während aktives Cdc42 Filopodienbildung induziert (Ridley et al., 1992).

1.1.2 Regulation kleiner G-Proteine

Abhängig von der Bindung von GTP oder GDP ändern die GTPasen ihre Konformation und wechseln so zwischen ihrer aktiven und ihrer inaktiven Form. Zwei konservierte Regionen sind hoch flexibel und besonders stark an dieser Konformationsänderung beteiligt, weshalb sie auch Switch I- und Switch II-Region genannt werden (Feltham et al., 1997; Vetter and Wittinghofer, 2001). Die Switch I-Domäne deckt sich auch mit der so genannten „Effektordomäne“ (Position 26 bis 50), über die die GTPasen viele Effektoren und Regulatoren binden (Abdul-Manan et al., 1999; Mott et al., 1999). Die Switch-Regionen verschiedener GTPasen der Ras-Superfamilie sind sich im GTP-gebundenen Zustand deutlich ähnlicher sind als in der GDP-gebundenen Form (Abb. 1). Dies legt nahe, dass die Mechanismen, über welche die GTPasen mit ihren Partnern interagieren, stark konserviert sind (Vetter and Wittinghofer, 2001).

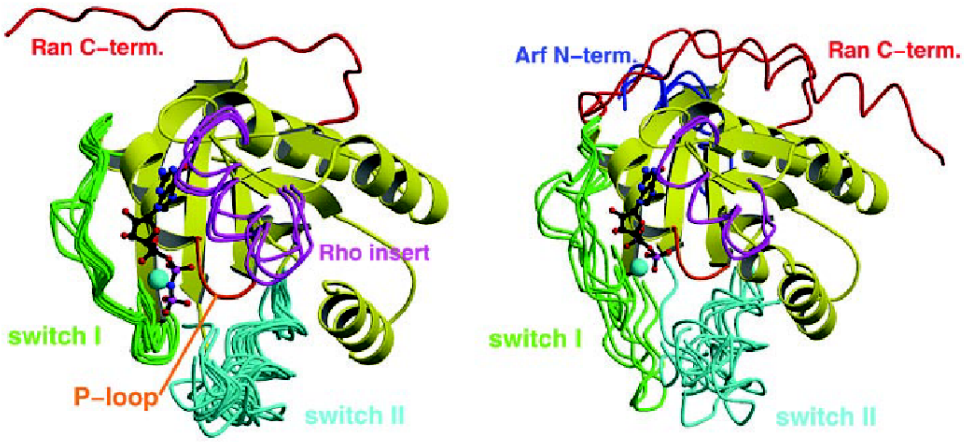


Abbildung 1: Durch GTP-Bindung der GTPase nehmen die SwitchI-Regionen eine definierte Struktur ein. Die Strukturen mehrerer GTPasen der Ras-Superfamilie sind übereinander gelegt. In der GDP-gebundenen Form (links) sind die beiden Switch-Regionen sehr divergent. Durch die GTP-Bindung (rechts) nehmen sie eine konservierte Konformation ein (Vetter and Wittinghofer, 2001).

Um die Dynamik ihrer Funktionen sicherzustellen, muss sowohl eine strikte räumliche als auch eine zeitliche Regulation der GTPasen gewährleistet sein. Drei verschiedene Klassen von Proteinen regulieren die Aktivität der GTPasen. Guanin-Nukleotid-Austauschfaktoren, kurz GEFs (guanine nucleotide exchange factors), überführen die GTPase in ihren aktiven, GTP-gebundenen Zustand. GTPase-aktivierende Proteine, kurz GAPs (GTPase activating proteins), erhöhen die intrinsische GTPase-Aktivität des G-Proteins und führen so zu dessen Inaktivierung. Ebenfalls negative Regulatoren sind die Guanin-Nukleotid-Dissoziationsinhibitoren (GDI), die nicht nur die Aktivität der GTPasen, sondern auch die Lokalisierung dieser Proteine regulieren (Abb. 2).

In höheren Eukaryoten und Hefe zeigen die Mitglieder der Ras- und Rho-Unterfamilien regulatorische Wechselwirkungen. Hauptsächlich Studien in Swiss 3T3 Fibroblasten haben zu der Ansicht beigetragen, dass Ras-Signalkaskaden die Aktivierung von Rho-Proteinen bewirken und auch die Rho-Proteine untereinander in regulatorischen Kaskaden gekoppelt sind (Chant and Stowers, 1995; Nobes and Hall, 1995; Ridley et al., 1992).

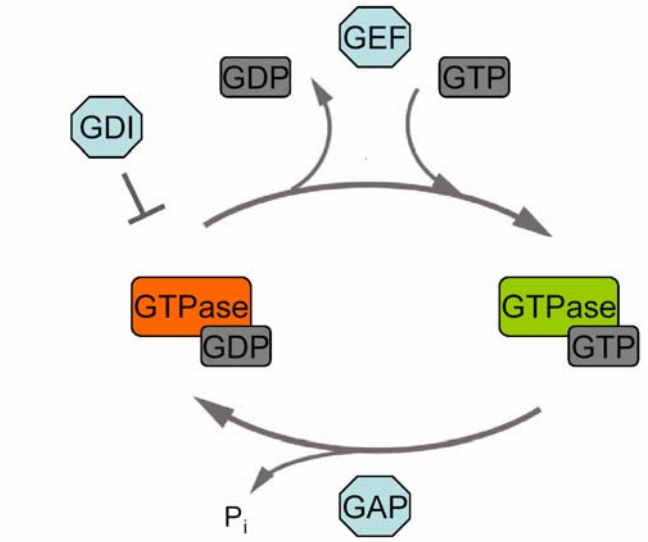


Abbildung 2: Regulation kleiner Rho-GTPasen. GTPasen der Rho-Familie existieren entweder in einer GTP-gebundenen, aktiven Form, oder liegen GDP-gebunden und somit inaktiv vor. Der Wechsel zwischen diesen Formen wird durch GAPs, GEFs und GDIs reguliert.

1.1.3 Prenylierung der GTPasen und Regulation durch GDIs

Die Prenylierung ist eine Lipidmodifikation, die bei einer Vielzahl verschiedener membranassoziierter Proteine gefunden wird, zum Beispiel bei pilzlichen Paarungsfaktoren, heterotrimeren G-Proteinen und auch bei Ras- und Rho-GTPasen (Zhang and Casey, 1996). Diese Modifikation besteht in einer kovalenten Verknüpfung von einer Farnesyl- (15 C-Atome) oder Geranylgeranyleinheit (20 C-Atome) an ein konserviertes Cystein am C-Terminus des Proteins. Alle prenylierten Proteine besitzen an ihrem C-Terminus ein konserviertes Motiv, die so genannte CAAX-Box, wobei C für Cystein und A für eine aliphatische Aminosäure steht (Chuang et al., 1995; Clarke, 1992). Die C-terminale Aminosäure dieses Motivs bestimmt die Art der Modifikation. Befindet sich an Stelle des X ein Serin, Glutamat oder Methionin, so erfolgt eine Farnesylierung. Steht an der Stelle des X ein Leucin, wird das entsprechende Protein geranylgeranyliert (Casey et al., 1991; Hartman et al., 2005; Yokoyama et al., 1991). Die posttranslationale Prozessierung erfolgt in drei Stufen. Zuerst kommt es zur Proteinprenylierung durch Farnesyltransferasen beziehungsweise Geranylgeranyltransferasen, dann werden die drei C-terminalen Aminosäuren AAX abgespalten und schließlich erfolgt eine Methylierung am nun endständigen, prenylierten Cystein. Diese C-terminalen Modifikationen sind essentiell für die Membranlokalisierung der Proteine, jedoch brauchen manche GTPasen ein zweites Signal für die korrekte Membranlokalisierung, so zum Beispiel Ras. Hierbei handelt

es sich entweder um eine zweite Lipidmodifikation, eine Palmitoylierung, oder einen polybasischen Bereich, der sich N-terminal vom CAAX-Motiv befindet (Perez-Sala, 2007; Resh, 2004; Silvius, 2002).

Inaktive Rho GTPasen können in der GDP-gebundenen Form durch GDIs aus der Zytoplasmamembran herausgelöst und im Zytoplasma gehalten werden. Nach erneuter Aktivierung können sie wieder an Membranen relokalisieren (Boivin and Beliveau, 1995). Diese reversible Membranlokalisierung ist anscheinend ein essentieller Bestandteil ihrer Funktionsweise und wird durch Guaninnukleotid Dissoziations Inhibitoren (GDIs) vermittelt (Adamson et al., 1992a; Adamson et al., 1992b; Kranenburg et al., 1997; Michaelson et al., 2001b).

GDIs sind zum einen negative Regulatoren der GTPasen, da sie die GTPase in ihrer inaktiven, GDP-gebundenen Form blockieren, andererseits sind sie essentiell für die Relokalisierung zwischen Zytoplasma und Plasmamembran und ermöglichen damit die korrekte räumliche und zeitliche Regulation der GTPasen (Michaelson et al., 2001a; Richman et al., 2004). Sie besitzen zwei wichtige Domänen, über die sie mit den Mitgliedern der Rho-GTPasen interagieren (Abb. 3).

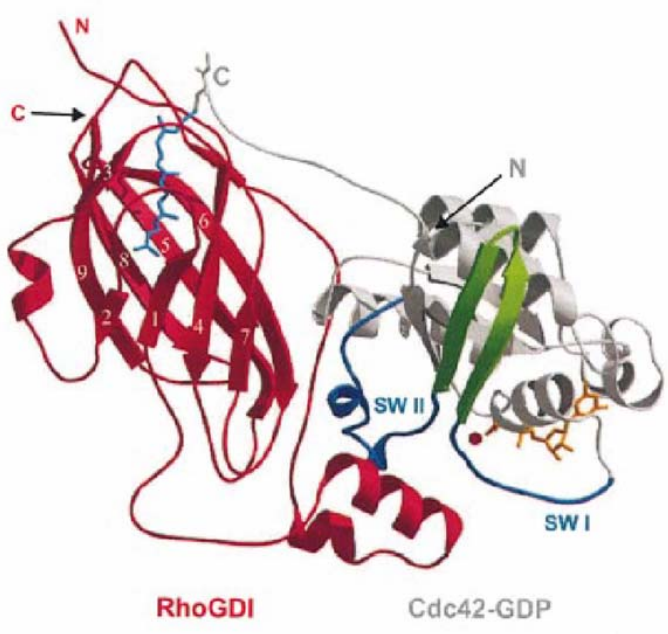


Abbildung 3: Komplex von Rho-GDI mit der GTPase Cdc42. Cdc42 ist grau dargestellt, die beiden Switch-Regionen (SWI und SWII) in dunkelblau. Der C-Terminus der GTPase ist geranylgeranyliert (hellblau) und wird von der hydrophoben Tasche von Rho-GDI (rot) gebunden. Zwei α-Helices bilden den regulatorischen Arm, der mit den beiden Switch-Regionen der GTPase Kontakt hat (aus Hanzal-Bayer et al., 2002).

Zum einen besitzen die GDIs eine hydrophobe Bindetasche, die den Prenylrest am C-Terminus der GTPasen bindet, was zum Herauslösen der Proteine aus der Membran führt (Dransart *et al.*, 2005). Zum anderen findet man einen N-terminalen Bereich, der aus einem Helix-Loop-Helix-Motiv besteht, welches einen „regulatorischen Arm" darstellt. Dieser bindet an die Switch-Regionen der GTPase und blockiert sie in ihrer GDP-gebundenen Konformation (Hoffman et al., 2000).

1.1.4 Die Anzahl der Aktivatoren und der Effektoren übertrifft die der GTPasen

Die Aktivierung der Rho GTPasen erfolgt über eine Vielzahl unterschiedlicher GEFs, die Mitglieder einer großen, sehr diversen Proteinfamilie sind. Im Menschen sind momentan ca. 70 verschiedene GEFs beschrieben, dem gegenüber stehen nur ungefähr 20 verschiedene GTPasen (Garcia-Mata and Burridge, 2007). Aktivierte GTPasen interagieren wiederum mit einer großen Anzahl Effektoren, die ein weites Spektrum verschiedener Zellantworten, wie Endozytose, zelluläre Signalweiterleitung und Aktinreorganisation regulieren. Die Interaktion der Rho-GTPasen mit Effektoren erfolgt häufig über die Bindung an eine CRIB-Domäne (Cdc42/Rac interactive binding) die viele, aber nicht alle Effektormoleküle besitzen (Burbelo et al., 1995). Zu den Effektoren von Cdc42 mit CRIB-Domäne (Pirone et al., 2001) gehören zum Beispiel Ste20 und Cla4, die Mitglieder der PAK-Familie sind (Bokoch, 2003). Interessanterweise werden einige der Effektoren sowohl durch Cdc42 und Rac1 aktiviert, andere dagegen spezifisch von nur einer GTPase (Manser et al., 1994; Symons, 1996).

So entsteht das Bild eines komplexes Signalkaskadennetzwerks in dem die GTPasen eine zentrale Rolle einnehmen, wodurch das Modell paralleler Signalkaskaden ersetzt wird. Es sind weitaus mehr GEFs und Effektoren als GTPasen selbst beschrieben (Rossman et al., 2005). Dadurch treffen Signale konvergent von einer Vielzahl verschiedener Aktivatoren ein und müssen spezifisch auf divergente Weise an eine große Zahl Effektoren verteilt werden, um eine korrekte Zellantwort hervorzurufen.

Strukturanalysen von GTPase/Effektor Komplexen führten zur Identifizierung einer Region der GTPasen, die an der Interaktion mit Effektoren beteiligt ist (Abdul-Manan et al., 1999; Mott et al., 1999). Der Austausch dieser Region zwischen Cdc42 und Rac1 beeinflusst *in vitro* deren Eigenschaft, an Effektoren zu binden (Elliot-Smith et al., 2005; Li et al.,

1999; Owen et al., 2000). Daraus lässt sich folgern, dass die Interaktion mit Effektoren ein spezifitätsbestimmender Schritt innerhalb der Cdc42/Rac1-Signalkaskaden ist.

Die Existenz vieler verschiedener Cdc42- und Rac1-spezifischer GEFs lässt allerdings auch vermuten, dass auch eine selektive Aktivierung der GTPasen durch die GEFs zur Spezifität der Signalkaskademodule beiträgt (Zhou et al., 1998). In verschiedenen Studien wurden bereits strukturelle Elemente gefunden, die die Spezifität der GEF-GTPase Interaktion bestimmen (Karnoub *et al.*, 2001; Snyder *et al.*, 2002).

Es ist wenig darüber bekannt, wie sichergestellt wird, dass durch einen eintreffenden Stimulus ausschließlich die zugehörige Antwort induziert wird. Es muss daher ein Mechanismus zur Sicherstellung des korrekten Signalflusses durch dieses komplexe Multikomponentennetzwerk existieren. Nur so können die GTPasen der Rho-Familie als zentrale Komponenten gemeinsam von verschiedenen Signalkaskaden genutzt werden.

1.2 Guaninnukleotid-Austauschfaktoren

1.2.1 Überblick

Die bisher bekannten GEFs für Rho-Proteine werden aufgrund ihrer strukturellen Unterschiede in zwei Klassen eingeteilt. Zu einer Klasse zählen GEFs mit einer DH-Domäne (Dbl-homology), die ca. 180 Aminosäuren umfasst und den Nukleotidaustausch an der GTPase katalysiert (Chan et al., 1996; Horii et al., 1994). Eine zweite Unterfamilie wurde erst kürzlich beschrieben, ihre Mitglieder werden CZH (CDM Zizimin homology) Proteine genannt. Die Gruppe der CZH-Proteine teilt sich in Zizimin Proteine, die Cdc42 aktivieren, und CDM (Ced-5, Dock180 and Myoblast city) Proteine, die Rac aktivieren (Meller et al., 2005). Proteine dieser Familie besitzen keine DH-Domäne, die katalytische GEF-Domäne ist hier die so genannte DHR- (Dock homology related) oder CZH-Domäne (Cote et al., 2005; Cote and Vuori, 2007).

Zu den klassischen Vertretern der Dbl-Familie gehören Cdc24 aus *S. cerevisiae*, und Dbl (diffuse B cell lymphoma). Dbl wurde ursprünglich als transformierender Faktor aus humanen Zellen isoliert (Ron et al., 1988) und ist namensgebend für diese Proteinklasse. Verschiedene biochemische Arbeiten bestätigen, dass diese beiden Proteine Cdc42-spezifische GEFs sind (Hart et al., 1991; Van Aelst and D'Souza-Schorey, 1997; Zheng et al., 1994).

Einige GEFs sind spezifisch für eine GTPase, so aktiviert zum Beispiel Cdc24 ausschließlich Cdc42, der GEF-H1 hingegen ausschließlich RhoA (Birkenfeld et al., 2007), während andere GEFs verschiedene GTPasen erkennen. Trio besitzt zwei verschiedene RhoGEF-Domänen, eine aktiviert sowohl RhoG als auch Rac, während die zweite GEF Domäne nur RhoA aktiviert (Bellanger et al., 2000). So ist dieser GEF eine Verknüpfungsstelle für verschiedene Rho-GTPase Signalwege.

Einige Mitglieder der Dbl-Familie besitzen zusätzlich zu der DH-Domäne, die den Nukleotidaustausch an Rho-GTPasen katalysiert, auch eine Ras-GEF-Domäne. So können zum Beispiel die beiden Ras GEFs Sos1 und RasGRF die Signalkaskaden von Ras- und Rho-GTPasen vernetzen (Chardin et al., 1993; Fan et al., 1998; Innocenti et al., 2002; Shou et al., 1992).

Zusammenfassend wird deutlich, dass GEFs Interaktionsstellen multipler Signalwege sind. Es bleibt eine interessante Frage, welche Mechanismen zusammenspielen, um die Signalspezifität sicherzustellen.

Domänenstruktur der Dbl-Familie

Die DH-Domäne ist das charakteristische Merkmal aller GEFs dieser Familie und besteht aus drei strukturell konservierten Regionen, die durch variable Bereiche voneinander getrennt sind. Sie ist an der Erkennung/Bindung der GTPasen beteiligt, vor allem aber stellt sie die eigentliche katalytische Einheit dar, die den GDP/GTP-Austausch am Rho-Protein katalysiert. (Cerione and Zheng, 1996; Rossman et al., 2003).
Die Mitglieder der Dbl-Familie der GEFs besitzen in der Regel noch eine zweite Domäne, die C-terminal direkt an die DH-Domäne anschließt. Die so genannte Pleckstrin Homology (PH) Domäne umfasst ca. 100 Aminosäuren und wurde zuerst in Pleckstrin beschrieben, einem Substrat der Proteinkinase C (Abrams et al., 1995). Über die PH-Domäne erfolgen Protein/Protein- und Protein/Lipid-Interaktionen, damit dient sie unter anderem zur Membranassoziation der GEFs (Ron et al., 1988; Whitehead et al., 1996).
Abgesehen von der DH/PH-Tandemdomäne weisen die GEFs untereinander keine Ähnlichkeit auf. Viele GEFs sind sehr große Proteine mit weiteren, konservierten Domänen, wie zum Beispiel SH3-, WH2- und EH-Domänen. Es gibt viele GEFs, denen aufgrund ihrer Multidomänenstruktur eine Gerüst bildende Funktion zugeschrieben wird. Solch ein GEF ist TUBA, welcher über seine multiplen Domänen sowohl die GTPase Cdc42 bindet und aktiviert als auch die GTPase Dynamin und eine Vielzahl aktinregulierender Proteine. Somit werden über TUBA die GTPase Cdc42 und die zugehörigen Effektoren in enger räumlicher Nähe gekoppelt (Salazar et al., 2003).

Mechanismus des Nukleotidaustausches

Beim GDP/GTP-Nukleotidaustausch erfolgen die GDP-Dissoziation und die GTP-Bindung sequentiell. Durch die Bindung von GEF und GTPase kommt es zu einer Konformationsänderung der GTPase, woraus eine reduzierte Bindungsaffinität zum GDP resultiert. Die koordinative Bindung des Mg^{2+}-Ions wird gestört und die strukturellen Änderungen der Nukleotidbindetasche führen zu einer Dissoziation des GDPs. Nach dem Herauslösen des GDP-Moleküls stabilisiert der GEF den nukleotidfreien Zustand der GTPase. Aufgrund der im Zytoplasma vorliegenden, ca. 10fach höheren GTP-Konzentration im Vergleich zu GDP, kommt es bevorzugt zur Bindung von GTP (Cherfils and Chardin, 1999).

Die Kristallstruktur der DH-PH-Domäne von Dbs (Dbl's big sister) mit Cdc42 zeigt, dass die DH-Domäne des GEFs engen Kontakt mit den Switch-Regionen der GTPase hat (Abb. 4)(Zhang et al., 2000).

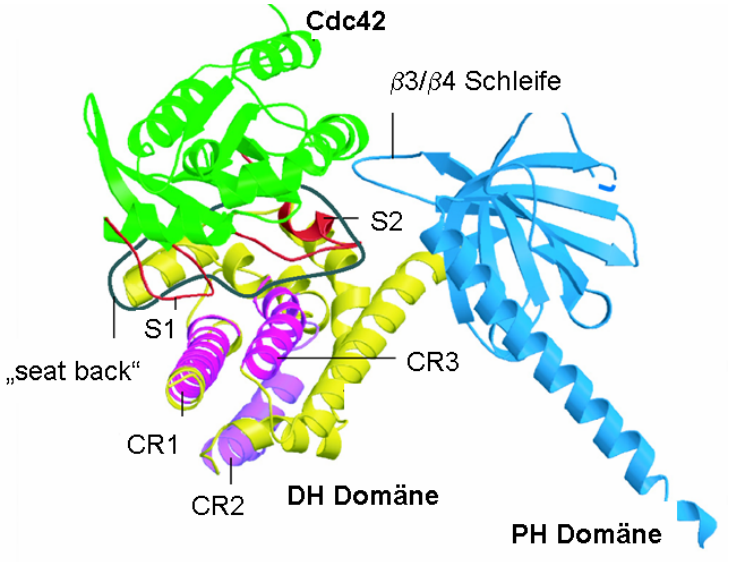


Abbildung 4: Interaktion der DH-PH-Domäne von Dbs mit Cdc42. Die DH-Domäne (gelb) und die PH-Domäne (blau) interagieren mit den beiden Switch-Regionen von Cdc42 (S1 und S2, rot). Haupt-Interaktionspunkte auf Seiten des GEFs sind die konservierten Regionen CR1, CR2 und CR3, die „seat back" Schleife und die β3/β4 Schleife (Rossman et al., 2005).

Interaktionen erfolgen insbesondere zwischen den beiden Switch-Regionen der GTPase (S1 und S2) und verschiedenen Bereichen der DH-PH-Tandemdomäne. Die konservierten Regionen CR1, CR2 und CR3, die „seat back" Schleife der DH-Domäne und die β3/β4 Schleife der PH-Domäne sind die hauptsächlichen Interaktionspunkte.

Regulation der GEFs

Viele GEFs liegen in einer basalen, inhibierten Form vor und werden erst nach Stimulierung aktiv. Es gibt Beispiele für verschiedene Mechanismen der Inhibierung (Abb. 5). So existiert für Vav und Sos eine intramolekulare Bindung zwischen DH- und PH-Domäne (Han et al., 1998; Nimnual et al., 1998). In Vav und Dbl existiert eine zusätzliche inhibitorische Domäne, die intramolekular an die DH-Domäne bindet (Aghazadeh et al., 2000). Für Tiam1 hingegen wurden zusätzliche regulatorische Proteine beschrieben, die die GEFs in ihrer inaktiven Form halten (Otsuki et al., 2001).

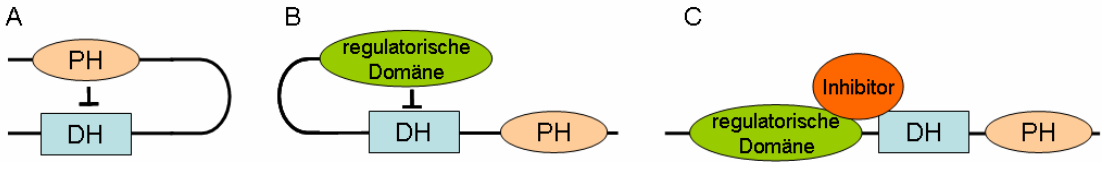


Abbildung 5: GEFs werden über verschiedene Mechanismen in einer inaktiven Form gehalten. A) Die PH-Domäne bindet intramolekular an die DH-Domäne. **B)** Die GEFs besitzen eine zusätzliche inhibitorische Domäne, die die DH-Domäne blockiert. **C)** Zusätzliche inhibitorische Proteine halten den GEF inaktiv (Zheng, 2001).

Die Aktivierung von GEFs kann über verschiedene Mechanismen erfolgen. So wurde in einigen Systemen beobachtet, dass GEFs auf extrazelluläre Stimuli hin durch Proteinkinasen phosphoryliert werden. So wird nach Aktivierung von Zytokin-Rezeptoren der GEF Vav durch Tyrosin-Kinasen phosphoryliert. Dadurch wird die Bindung der N-terminalen, inhibitorischen Domäne an die DH-Domäne aufgehoben und der GEF kann RhoA aktivieren (Mahajan and Earp, 2003). Phosphoinositol-Kinasen haben ebenfalls einen Effekt auf die GEF-Aktivität. Für das Produkt von Phosphoinositol-3-Kinasen (PI3K), Phosphoinositol(3,4,5)trisphosphat (PtIns(3,4,5)P_3) wurde gezeigt, dass es die Aktivität der GEFs Sos und Vav erhöht (Han et al., 1998). So tragen zwei Signale, nämlich die Aktivierung des GEFs über eine Rezeptortyrosinkinase und die Bindung an PtIns(3,4,5)P_3, kooperativ zur maximalen Aktivierung von Rho-GEFs bei. Dies ist ein Beispiel dafür, dass viele verschiedene einkommende Signale kooperativ Einfluss auf die Aktivität der Signalkaskaden nehmen.

Relevanz der korrekten GEF-Funktion

Die korrekte Signalweiterleitung in komplexen GTPase-Netzwerken ist anfällig für Störungen. So kann eine fehlregulierte Rho-GTPase-Aktivität oder die veränderte Expression von GAPs, GEFs oder GDIs verschiedene humane Erkrankungen auslösen (Barber and Welch, 2006; Chrissobolis and Sobey, 2006). Eine veränderte Aktivität von GEFs wird oft in Tumorgewebe gefunden und wurde als Ursache für verschiedene Entwicklungsstörungen identifiziert. Des Weiteren sind GEFs ein Angriffspunkt für Bakterien oder Viren, um in die Wirtszelle einzudringen oder deren Expressionsprofil umzustellen (Erickson and Cerione, 2004; Zhang et al., 1999).

Durch die deregulierte Aktivierung der GTPasen sind die GEFs direkt an der Onkogenese beteiligt, indem sie die Zytoskelettreorganisation und die Genexpression beeinflussen (Minden et al., 1995). Beispielsweise können der GEF Dbl und die Rho-GTPasen Cdc42 und Rac1 JNK und p38-Kinase aktivieren. Des weiteren wurde für RhoA, Rac1 und Cdc42 gezeigt, dass sie den Serum Response Factor (SRF) aktivieren, der die Transkription vom *fos*-protooncogen Promotor induziert (Hill et al., 1995). Ein bekanntes Beispiel für einen onkogenen GEF ist eine N-terminal veränderte Form des humanen GEF-H1, welche als Onkogen in einer Leukämie-Zellinie identifiziert wurde (Brecht et al., 2005).
Die wichtige Rolle regulierter GEF-Aktivität in verschiedenen Entwicklungsprozessen wird durch ein anderes Beispiel deutlich. Der offene Leserahmen der für den GEF FGD1 kodiert, ist in einer Chromosomentranslokation unterbrochen. Dies führt zu der Entstehung des Aarskog-Scott-Syndroms (Faciogenitale Dysplasie), welches durch multiple Entwicklungsstörungen gekennzeichnet ist (Matsuura, 2006; Pasteris et al., 1997; Pasteris et al., 1994; Zheng et al., 1996).
Diese Beispiele machen deutlich, wie wichtig eine regulierte Signalweiterleitung ist. Rho-GEFs sind aufgrund ihrer zentralen Rolle in vielen regulatorischen Prozessen ein wichtiger Bereich der medizinischen Forschung (Erickson and Cerione, 2004; Zhang et al., 1999).

1.2.2 Der GEF Cdc24

Ursprünglich wurde Cdc24 über die Identifizierung temperatursensitiver Zellzyklusmutanten in *S. cerevisiae* gefunden (Hartwell et al., 1974). Biochemische Arbeiten haben gezeigt, dass Cdc24 an Cdc42 bindet und spezifisch den Nukleotidaustausch an Cdc42 katalysiert. Das Cdc24/Cdc42-Signalmodul ist in *S. cerevisiae* sowohl an der Bestimmung der Knospungsstelle als auch an der Signalweiterleitung des Pheromonstimulus beteiligt (Elion, 2000; Zheng et al., 1995; Zheng et al., 1994).
Das Cdc24-Homolog in *S. pombe* (Scd1) interagiert ebenfalls spezifisch mit Cdc42 (Chang et al., 1994). Des Weiteren stellt Scd1 auch einen Ras1-Effektor dar. Somit ergibt sich hier ein möglicher Punkt der Verknüpfung von Ras- und Rho-Signalkaskaden.

Domänenstruktur

Cdc24 ist ein GEF der Dbl-Familie der Gunainnukleotid-Austauschfaktoren und besitzt das für diese Familie charakteristische Tandem-Motiv aus DH- und PH-Domäne. In *S. cerevisiae* entspricht das den Aminosäuren 283-452 (DH) und 472-681 (PH) (Gulli and Peter, 2001a). Des Weiteren existiert eine Calponin-Homologie (CH)-Domäne, von der angenommen wird, dass sie an der Aktinbindung beteiligt ist (Stradal et al., 1998). Außerdem wurde eine PB1-Domäne beschrieben, die als konservierte Protein-Interaktionsdomäne definiert ist (Sumimoto et al., 2007).
Cdc24 liegt in einer autoinhibierten Form vor, in der die DH-Domäne durch intramolekulare Bindung an andere Domänen blockiert ist. Binden Aktivatoren wie zum Beispiel Rsr1p/Bud1p oder Far1p an die CH-Domäne, führt das zur Freisetzung der DH-Domäne (Shimada et al., 2004).
In *U. maydis* wird Cdc24 durch das Gen mit der Datenbanknummer Um02422 kodiert und weist eine hohe Sequenzidentität zu Cdc24 in *S. cerevisiae* und zu Scd1 in *S. pombe* auf. Die Domänenstruktur, bestehend aus der DH-PH-Tandem Domäne, der CH- und der PB1-Domäne, ist identisch mit *Sc*Cdc24. Da *U. maydis* neben der GTPase Cdc42 auch noch Rac1 besitzt, ergibt sich die Frage, welche Spezifität der GEF Cdc24 in *U. maydis* hat und in welcher Weise er an der Signalweiterleitung beteiligt ist.

Cdc24 und polares Wachstum in *S. cerevisiae*

S. cerevisiae besitzt mit Cdc24p nur einen bekannten Cdc42p-spezifischen GEF (Bi et al., 2000). Da eine Deletion von Cdc42p letal ist, erklärt sich so auch die essentielle Funktion von Cdc24p.
Während aller Stadien des Lebenszyklus von *S. cerevisiae* werden die Aktivität von Cdc24p und die dadurch regulierten polaren Prozesse benötigt. Während der vegetativen Phase erfolgt streng reguliert polare Knospenbildung (Pruyne and Bretscher, 2000). Ein weiterer polarer Wachstumsprozess ist die Bildung des so genannten „Shmoos“, einer Paarungsprojektion, die die Zelle als Antwort auf einen Pheromongradienten eines passenden Paarungspartners hin ausbildet (Arkowitz, 1999). Unter Stickstoffmangelbedingungen kann ein weiterer asymmetrischer Wachstumsvorgang beobachtet werden, bei dem die Zellen elongiert wachsen,

was als pseudohyphen-förmiges Wachstum bezeichnet wird (Mösch et al., 2001; Wu and Jiang, 2005). All diese Prozesse erfordern eine Polarisierung des Aktinzytoskeletts, wobei die GTPase Cdc42p und der GEF Cdc24p eine zentrale Rolle spielen (Etienne-Manneville, 2004). So ist das Cdc24p-Cdc42p Signalmodul an vollständig unterschiedlichen Prozessen beteiligt. Es ist wenig darüber bekannt, wie selektiv nur einzelne dieser zellulären Reaktionen induziert werden.

Besonders gut studiert ist die Cdc24p-Regulation und -Funktion während der Knospung und während der Bildung der Paarungsprojektion (Barale et al., 2004; Shimada et al., 2000b). Während der G1-Phase lokalisiert Cdc24p im Kern und wird dort durch die Bindung an Far1p gehalten. Bei der Knospenbildung wird Far1p phosphoryliert und ubiquitinabhängig abgebaut (Shimada et al., 2000a). So wird Cdc24p ins Zytoplasma entlassen und durch das Signalmodul Rsr1p/Bud1p an die zukünftige Knospungsstelle rekrutiert (Abb. 6) (Park et al., 1999).

Die Bildung der Paarungsprojektionen (Shmoos) erfordert die polare Ausrichtung des Aktinzytoskeletts unter Regulation des Cdc24p-Cdc42p Signalmoduls. Die Zellen reagieren auf den Pheromongradienten über spezifische Transmembranrezeptoren, die an heterotrimere G-Proteine gekoppelt sind. Nach Aktivierung durch das Pheromonsignal dissoziieren diese in Gα- und Gβγ-Untereinheiten. Die Polarisierungsmaschinerie wird an die Stelle der höchsten Rezeptoraktivität geleitet, indem das Gβγ-Heterodimer über das Adaptermolekül Far1p den GEF Cdc24p rekrutiert (Butty et al., 1998). Für diesen Prozess der Polarisierung wird Cdc24p durch das Exportin Msn5p als Cdc24p/Far1p-Komplex aus dem Kern heraustransportiert (Blondel et al., 1999).

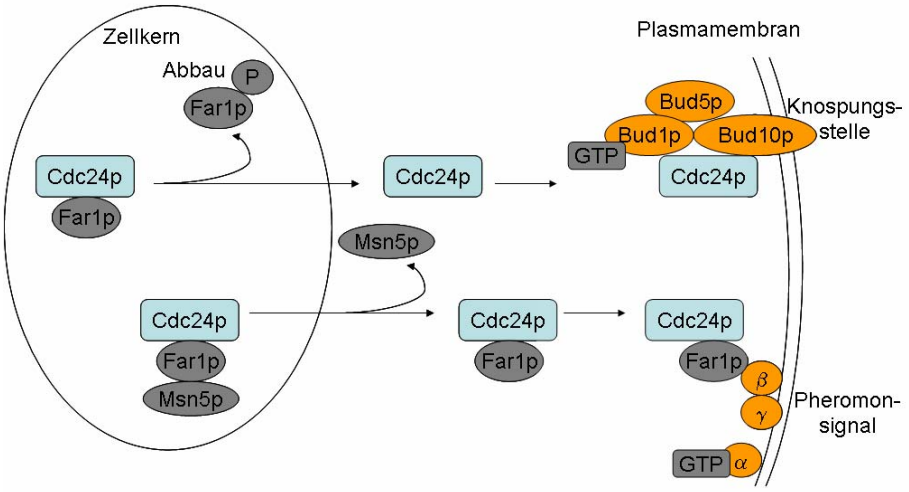


Abbildung 6: Signalabhängige, subzelluläre Lokalisierung von Cdc24p. Zur Knospenbildung phosphorylieren Cyklinabhängige Kinasen Far1p, welches daraufhin Cdc24p aus dem Kern entlässt. Cdc24p wird dann an die bereits markierte Knospungsstelle rekrutiert, an der es dann über Cdc42p polare Wachstumsprozesse steuert. Als Antwort auf ein Pheromonsignal wird Cdc24p mitsamt Far1p durch das Exportprotein Msn5p aus dem Kern geleitet und dann an die Stelle des aktivierten trimeren G-Proteins gebunden (Gulli and Peter, 2001b).

Ist Cdc24p an die Stelle des polaren Wachstums rekrutiert und aktiviert, erfolgt eine Stabilisierung durch das „Scaffold“ Protein Bem1p, welches über eine positive Rückkopplungsschleife zur Signalverstärkung führt (Bose et al., 2001; Butty et al., 2002). Die Inaktivierung dieses Komplexes erfolgt über Cla4p, welches Cdc24p hyperphosphoryliert und so inaktiviert. So wird über eine negative Rückkopplungsschleife das polare Signal wieder abgeschwächt (Bose et al., 2001).

Das GEF-GTPase Signalmodul unterliegt somit komplexen Regulationsmechanismen, die auch auf GTPase-Signalkaskaden höherer Organismen zutreffen: Rekrutierung an spezifische Membranbereiche auf einen extrazellulären Stimulus hin, Stabilisierung innerhalb großer Proteinkomplexe, Signalamplifikation und -abschwächung durch positive und negative Rückkopplungsschleifen.

Mit zunehmender Komplexität des Organismus steigt auch die Zahl der GTPasen, Aktivatoren und Effektoren. In Hefe ist viel über die Regulation von Cdc24 und der beteiligten Signalkaskaden bekannt. Doch schon in *U. maydis* ergibt sich mit der Existenz von Rac1 ein weiterer Grad an Verflechtung innerhalb des Signalnetzwerks.

1.2.3 Intersectin

Intersectin wurde ebenfalls als Cdc42-spezifischer GEF beschrieben. Er bindet über verschiedene Domänen eine Vielzahl an Proteinen, die an Clathrin-vermittelter Endozytose, an der Reorganisation des Aktinzytoskeletts und zellulärer Signalweiterleitung beteiligt sind (Hussain et al., 2001; Hussain et al., 1999; Tong et al., 2000a). Von einigen Forschergruppen wurde Intersectin aufgrund der Lokalisierung des kodierenden Gens in der Down-Syndrom-Region des humanen Chromosoms 21 beschrieben (Guipponi et al., 1998). Durch die Funktionen bei endozytotischen Prozessen ist Intersectin vermutlich an den pathologischen Symptomen des Down Syndroms und der Alzheimer Erkrankungen beteiligt (Cataldo et al., 2000).

Für das humane Intersectin wurden verschiedene Isoformen beschrieben, die durch differentielles Spleißen gebildet werden. Die zwei Hauptformen werden ITSN-S (short) und ITSN-L (long) genannt, wobei die lange Isoform gehirnspezifisch exprimiert wird und im Gegensatz zu der kurzen Isoform die für Dbl-GEFs charakteristische DH-PH-Tandemdomäne besitzt (Hussain et al., 1999).

Die Intersectin-Proteine verschiedener Organismen, z.B ITSN aus *H. sapiens*, Pan1p aus *S. cerevisiae* und Dap-160 aus *D. melanogaster* zeigen eine identische Domänenorganisation und einen hohen Grad an Aminosäureidentität (O'Bryan et al., 2001).

N-Terminal befinden sich zwei Eps15 (EH)-Domänen, die charakteristisch sind für Proteine, die an „Clathrin Coated Pits" lokalisieren und an der Endozytose beteiligt sind. Anschließend findet man eine „coiled-coil"-Region, über die Protein-Protein Interaktionen über Homo- oder Heterodimerisierung stattfinden. Darauf folgen mehrere Src-homology (SH3) Domänen, die klassische Protein-Protein Interaktionsdomänen sind (Engqvist-Goldstein and Drubin, 2003). ITSN besitzt weiter C-terminal das für GEFs der Dbl-Familie charakteristische Tandemmotiv aus Dbl-Homologie (DH)-Domäne und Pleckstrin-Homologie (PH)-Domäne (Hurley and Misra, 2000). Eine C2-Domäne findet sich am C-Terminus, für sie wurde eine Ca^{2+}-abhängige Phospholipidbindung und eine Beteiligung an der Endozytose in neuronalen Zellen beschrieben (Kohout et al., 2002).

In höheren Eukaryoten existieren verschiedene Isoformen. Die lange Form besitzt den Kompletten C-Terminus mit der GEF-Domäne, die der kurzen Version fehlt (Abb. 7). Das Homolog von *S. cerevisiae*, Pan1p, entspricht der kurzen Isoform. Pan1p besitzt keine DH-PH Tandemdomäne, stattdessen aber eine Folge saurer Aminosäuren, die direkt mit Arp2/3 interagieren und darüber an der Aktinreorganisation beteiligt sind (Huang and Cai, 2007).

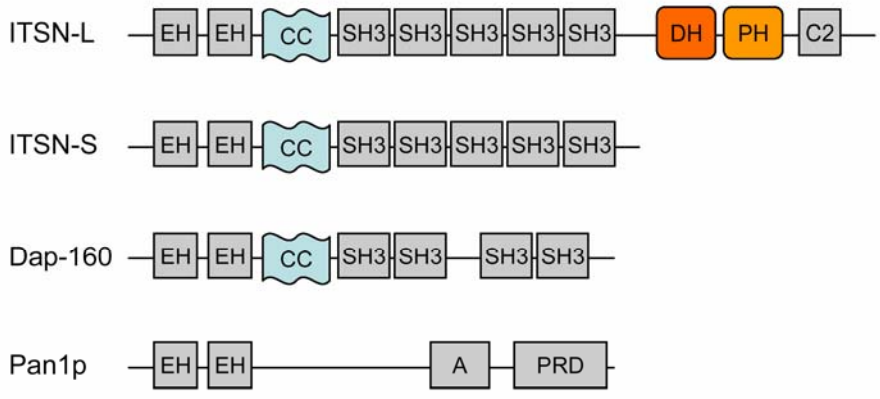


Abbildung 7: Domänenstruktur verschiedener Intersectin Homologe. In *H. sapiens* findet sich eine lange Isoform (ITSN-L) mit DH-PH-Domäne, und eine kurze Isoform (ITSN-S) ohne DH-PH-Domäne. Die homologen Proteine in *D. melanogaster* (DAP-160) und *S. cerevisiae* (Pan1p) besitzen beide keine Rho-GEF Domäne. A = „acidic stretch", PRD = „prolin rich domain".

1.3 *Ustilago maydis*

Der phytopathogene Pilz *Ustilago maydis* gehört zu den Basidiomyceten. Er verfügt über ein enges Wirtsspektrum, das lediglich Mais und Teosinte umfasst (Kahmann, 2000). Er kann alle überirdischen Teile der Pflanze befallen und die Bildung von Pflanzentumoren bzw. Gallen induzieren (Abb. 8). Innerhalb der infizierten Gewebe erfolgt die Sporenentwicklung des Pilzes unter für ihn optimalen Bedingungen. *U. maydis* ist ein dimorpher Pilz, er kann sowohl in einer apathogenen haploiden als auch in einer pathogenen diploiden Form existieren. Haploide Zellen sind im Labor leicht kultivierbar und wachsen hefeartig, indem sie sich durch Knospung teilen. Für die Entwicklung und Aufrechterhaltung der filamentösen, diploiden Form ist der Pilz jedoch auf die Wirtspflanze angewiesen. Die pathogene Entwicklung vieler Pilze, sowohl human- als auch pflanzenpathogener Spezies, geht oft mit einer morphologischen Transition zwischen hefeartiger und filamentöser Form einher, was dem Pilz die Penetration des Wirtsgewebes ermöglicht (Gow et al., 2002).

Abbildung 8: Symptome der Infektion von *Zea mays* durch *Ustilago maydis*. Gezeigt sind die durch *U. maydis* induzierten Gallen am Stängel und am Kolben der Pflanze.

Das Genom von *U. maydis* ist komplett sequenziert und öffentlich zugänglich http://www.broad.mit.edu/annotation/fungi/fgi/candidates.html. Im Vergleich mit anderen pflanzenpathogenen Pilzen ist das Genom von *U. maydis* recht klein und die Gene besitzen nur wenige Introns (Kamper et al., 2006).
Bereits R. Holliday hat *U. maydis* als Modellsystem für seine Rekombinationsstudien genutzt, und heute existieren viele molekularbiologische Methoden zur genetischen Manipulation (Fotheringham and Holloman, 1989; Fotheringham and Holloman, 1990; Holliday, 1965; Holliday, 1975; Kojic and Holloman, 2000). Diese Tatsache in Verbindung mit der leichten Kultivierbarkeit machen *U. maydis* zu einem interessanten genetischen Modellsystem.
Der dimorphe Lebenszyklus, bei dem es während der sexuellen Phase zu einem dramatischen Umschalten von hefeartigem Wachstum durch Knospung hin zu filamentösem Spitzenwachstum kommt, ermöglicht die Untersuchung grundlegender Probleme der Morphogenese und Zellpolarität (Klosterman et al., 2007).

1.3.1 Lebenszyklus

Haploide Sporidien von *U. maydis* zeigen eine zigarrenförmige Morphologie und vermehren sich durch Knospung. Zellen mit kompatiblem Kreuzungstyp erkennen einander über ein Pheromon-Rezeptorsystem. Sie bilden Konjugationshyphen aus, die entlang eines Pheromongradienten aufeinander zuwachsen, fusionieren und ein dikaryotisches Filament ausbilden (Abb. 9) (Snetselaar et al., 1996). Für die folgende sexuelle Entwicklung ist der Pilz auf die Wirtspflanze angewiesen. Das dikaryotische Filament penetriert die Pflanze über appressorienähnliche Strukturen und wächst zwischen den Pflanzenzellen, aber auch durch sie hindurch, ohne eine signifikante Pflanzenabwehr zu induzieren. Hauptsächlich in den Fruchtständen stimuliert *U. maydis* massives Pflanzenzellwachstum und die Bildung von Gallen. Innerhalb dieser Gallen erfolgt die Karyogamie und die massive Bildung von schwarzen, diploiden Teliosporen, die nach Aufbruch der Galle durch Wind und Wetter verbreitet werden (Banuett and Herskowitz, 1996). Die Teliosporen stellen eine Dauerform des Pilzes dar, die unter geeigneten Bedingungen auskeimt und nach Durchlaufen der Meiose zur Bildung der haploiden, saprophytischen Form führt (Christensen, 1963).

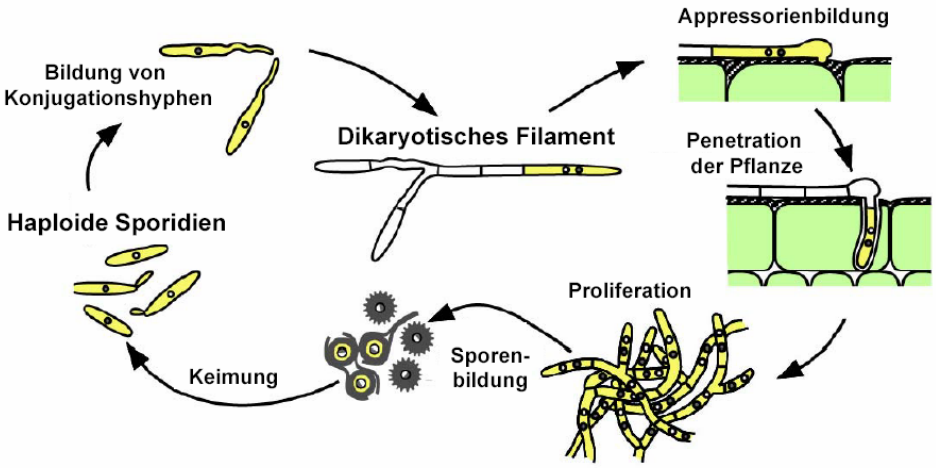


Abbildung 9: Lebenszyklus von *U. maydis*. Kompatible, haploide Sporidien fusionieren zu einem dikaryotischen Filament. Diese pathogene Form penetriert die Maispflanze und induziert die Bildung von Gallen. Innerhalb dieser erfolgt Proliferation und Sporenbildung. Die Sporen keimen dann wieder zu haploiden Sporidien aus (nach Kämper et al., 2006).

Der Übergang zur sexuellen Phase des Lebenszyklus und dem damit verbundenen polaren Wachstum steht unter der Kontrolle eines tetrapolaren Kreuzungssystems. Für eine erfolgreiche Fusion und anschließende Pathogenitätsentwicklung müssen sich die Partner in den Kreuzungstyploci *a* und *b* unterscheiden (Banuett and Herskowitz, 1989). Der *a*-Locus ist biallelisch (*a1* und *a2*) und kodiert sowohl für einen Vorläufer eines Pheromons als auch für einen Pheromonrezeptor, der das Pheromon des anderen Paarungstyps erkennt. Unterscheiden sich zwei Zellen im *a*-Locus, wird mit Hilfe dieses Pheromon/Rezeptor Systems die Bildung von Konjugationshyphen induziert, welche entlang des Pheromongradienten aufeinander zuwachsen und miteinander fusionieren (Snetselaar et al., 1996; Spellig et al., 1994).

Für die Ausbildung eines stabilen Dikaryons und die Pathogenität müssen sich die Zellen außerdem in ihrem multiallelischen *b*-Locus unterscheiden; dies stellt die Selbst/Nicht-Selbst-Erkennung der beiden Kerne sicher. Der *b*-Locus besteht aus zwei divergent transkribierten Genen, dem *bE* (East) und *bW* (West) Gen (Gillissen et al., 1992). Die beiden Genprodukte bilden Heterodimere aus, wenn sie von unterschiedlichen Allelen stammen (Kämper et al., 1995). Dieses bE/bW-Heterodimer wirkt als Transkriptionsfaktor, der direkt oder indirekt für die Expression aller Gene für das biotrophe Wachstum verantwortlich ist. Somit stellt der *b*-Locus einen „master control locus“ dar, der essentiell für das filamentöse Wachstum und die Tumorinduktion ist.

1.3.2 Zytokinese und Zellpolarität

Zellpolarität ist ein wichtiger Aspekt vieler Differenzierungs-, Entwicklungs- und Proliferationsprozesse in ein- und mehrzelligen Organismen (Drubin and Nelson, 1996). Der prinzipielle Mechanismus der Markierung einer Stelle der polaren Entwicklung hin zur gerichteten Reorganisation des Zytoskeletts ist unabhängig vom Organismus oder dem Zelltyp. Über das dynamische Verhalten von Mikrotubuli und die Beteiligung von Motorproteinen an der Ausbildung der Zellpolarität existieren bereits verschiedene Studien in *U. maydis* (Lehmler et al., 1997; Steinberg et al., 2001).

In unserer Arbeitsgruppe konnte bereits gezeigt werden, dass die kleinen Rho-GTPasen Cdc42 und Rac1 an der Regulation der Zytokinese und der Zellpolarität in *U. maydis* beteiligt sind. Dabei hat Rac1 hauptsächlich Funktionen bei der Knospen- und Filamentbildung, Cdc42 ist an der Bildung des sekundären Septums beteiligt, welches für die korrekte Zytokinese benötigt wird (Mahlert et al., 2006). Rac1 und Cdc42 zeigen auf Aminosäureebene 67% Sequenzähnlichkeit und haben teilweise redundante Funktionen (Mahlert et al., 2006).

Die Rolle von Cdc42 bei der Zytokinese von *U. maydis* wurde durch die Identifizierung der *don1*-Mutante deutlich. Don1 ist ein spezifischer Cdc42-Aktivator (Weinzierl et al., 2002). Die Zytokinese in *U. maydis* ist ein zweistufiger Prozess: Im ersten Schritt wird ein primäres Septum an der Grenze zwischen Mutter- und Tochterzelle gebildet. Daraufhin kommt es an der Tochterseite dieses ersten Septums zu einer Akkumulation membranöser Vesikel. Diese werden durch ein zweites Septum, welches auf der Tochterseite eingezogen wird, zwischen Mutter- und Tochterzelle eingeschlossen. Zwischen den beiden Septen entsteht so eine Fragmentierungszone, an der die Trennung der beiden Zellen erfolgt (Weinzierl et al., 2002). Deletionsmutanten von Cdc42 und Don1 zeigen beide einen Zelltrennungsdefekt, der sich dadurch äußert, dass nach Ausbildung der Tochterzelle nur ein einzelnes Septum eingezogen wird. Dadurch löst sich die Tochterzelle nicht mehr von der Mutterzelle, was zur Ausbildung bäumchenförmiger Zellstrukturen führt (Abb. 10). Die Mutanten zeigen eine abnormale Koloniemorphologie und bilden auf Festmedium kringelförmige Kolonien. Daher rührt der Name der *don1*-Mutanten, don steht für „donut“.

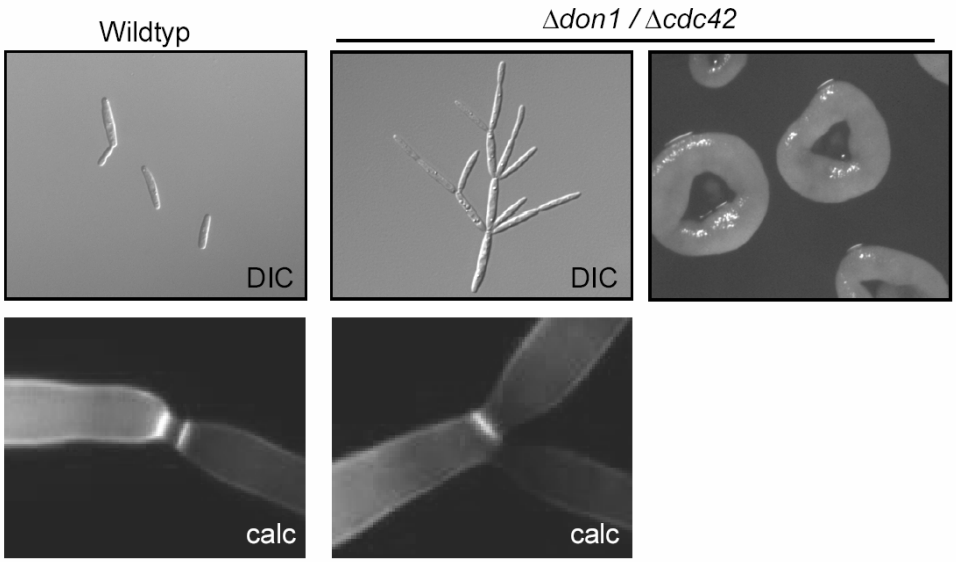


Abbildung 10: *don1*-Mutanten in *U. maydis*. Die *don1*-Deletion führt zu einem Defekt in der Bildung des sekundären Septums (untere Reihe, Calcofluorfärbung) und dadurch auch in der Zelltrennung. Dies führt zur Ausbildung bäumchenförmiger Zellansammlungen in Flüssigkultur und zu einer „donut“ förmigen Koloniemorphologie (verändert nach (Weinzierl et al., 2002)).

Die Rolle von Rac1 bei der Regulation der Polarität wird deutlich durch die Deletion des Gens, die zur Bildung abgerundeter Zellen mit Polaritätsdefekten führt. Die Zellen bilden keine Knospen an einem der Zellpole, sondern teilen sich durch Spaltung nach dem Einzug eines zentralen Septums. Eine Deletionsmutante des Rac1-Effektors Cla4 zeigt einen ähnlichen Phänotyp (Leveleki et al., 2004). Eine Überexpression von Rac1 induziert die Ausbildung von Filamenten, während die *rac1*-Deletion mit der Ausbildung des *b*-abhängigen, dikaryotischen Filaments interferiert (Abb. 11) (Mahlert et al., 2006).

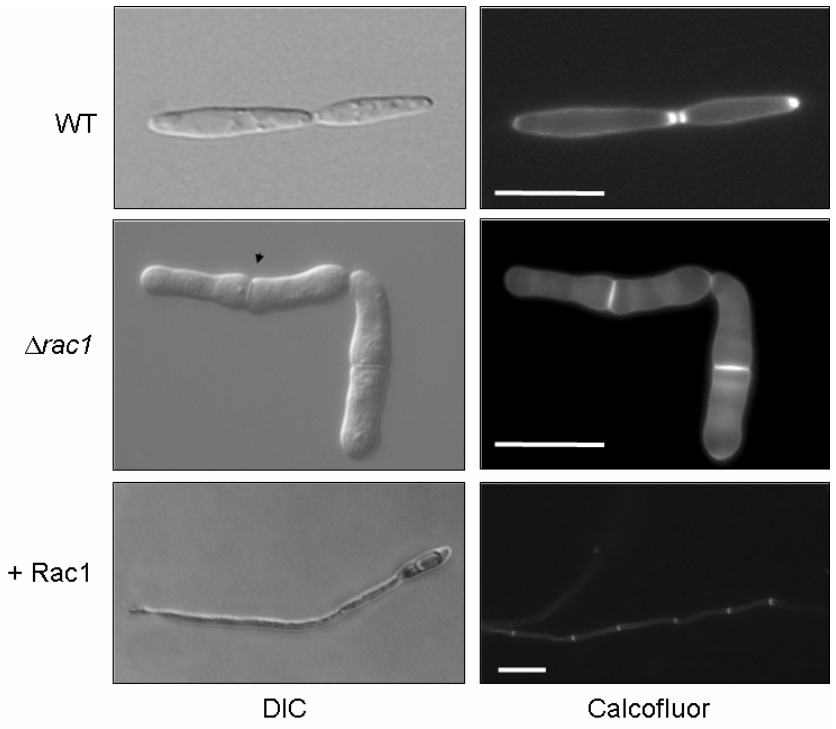


Abbildung 11: Die kleine GTPase Rac1 in *U. maydis*. Wildtyp Zellen bilden regelmäßige Doppelsepten aus, an denen dann die Zelltrennung erfolgt. Eine *rac1*-Mutante teilt sich nicht mehr durch Knospung, sondern durch Spaltung an einem in der Zellmitte eingezogenen Septum. Die Überexpression von Rac1 führt zur Bildung langer, septierter Filamente.

Mit Rac1 und Cdc42 wurden somit in *U. maydis* zwei hoch homologe kleine GTPasen der Rho-Familie identifiziert, die Bestandteile wichtiger zellulärer Signalkaskaden zur Regulation der Zytokinese und der Zellpolarität sind. Sowohl die Deletionsmutante von *rac1* als auch die von *cdc42* sind lebensfähig, eine Doppeldeletion jedoch nicht. Somit haben diese beiden GTPasen mindestens eine gemeinsame essentielle Aufgabe, aufgrund ihrer verschiedenen Deletions- und Überexpressionsphänotypen aber auch unterschiedliche zelluläre Funktionen (Mahlert et al., 2006).

Neben *U. maydis* sind mittlerweile in mehreren Organismen lebensfähige *cdc42*-Mutanten beschrieben, allerdings ist in diesen Beispielen immer ein Rac1-Protein in der Zelle vorhanden, welches möglicherweise einige Funktionen von Cdc42 übernehmen kann (Scheffer et al., 2005; Ye and Szaniszlo, 2000). Dies führt zur Hypothese, dass die essentiellen Funktionen von *Sc*Cdc42 in *U. maydis* auf Rac1 und Cdc42 aufgeteilt sind (Mahlert et al., 2006).

Für *U. maydis* konnte über Epistasisanalysen gezeigt werden, dass der GEF Don1 ein Aktivator von Cdc42 ist und dass Cla4 vermutlich einen Effektor von Rac1 darstellt (Mahlert et al., 2006). Die Cdc42-Signalkaskade ist an der Zytokinese beteiligt, während die Rac1-Kaskade polares Wachstum reguliert (Abb. 12). In *S. cerevisiae* erfolgt die Regulation von Zytokinese und Polarität gemeinsam über Cdc42 und die Aktivierung von Ste20 und Cla4 (Hofmann et al., 2004).

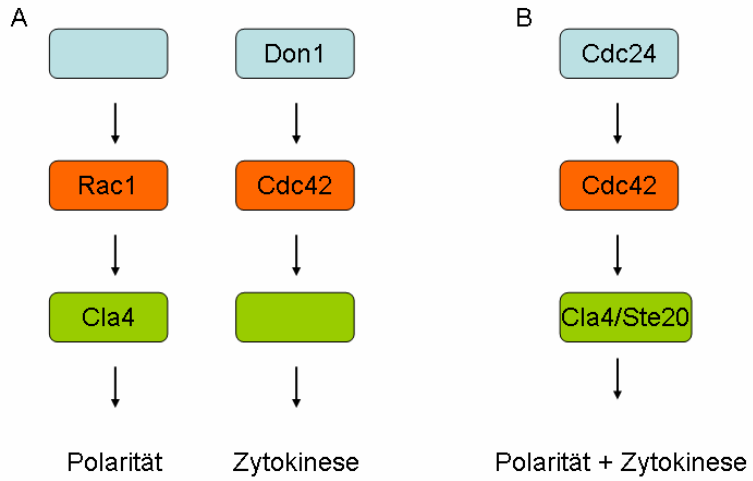


Abbildung 12: GTPase-Signalkaskaden in *U. maydis* und *S. cerevisiae*. A) Die Don1/Cdc42-Kaskade ist für die Bildung des sekundären Septums verantwortlich, Don1 ist dabei der GEF für Cdc42. Die Kaskade über Rac1 und Cla4 reguliert das polare Wachstum. **B)** *S. cerevisiae* verfügt über die kleine GTPase Cdc42, jedoch nicht Rac1. Cla4p wird hier über eine Signalkaskade aus Cdc24p und Cdc42p aktiviert.

Sowohl die dramatischen morphologischen Veränderungen während des Lebenszyklus (Klosterman et al., 2007) als auch die morphologisch klar zu unterscheidenden Effekte von Cdc42 und Rac1 machen *U. maydis* zu einem sehr geeigneten Modellorganismus, um die Rolle von kleinen GTPasen bei der Regulation der Zytokinese und Polarität zu studieren.

1.4 Zielsetzung

Rho-GTPasen sind an vielen zellulären Prozessen wie der Regulation des Membranverkehrs, der Transkriptionsaktivation und der Kontrolle des Zellwachstums beteiligt. Die Signalkaskaden, die diese biologischen Prozesse regulieren, sind komplex und verwoben. Es existieren weitaus mehr Aktivatoren und Effektoren, als GTPasen selbst. Bisher ist nur wenig darüber bekannt, wie sichergestellt wird, dass durch einen eintreffenden Stimulus ausschließlich die zugehörige Antwort induziert wird. Die Bestimmung der Spezifität könnte einerseits auf der Ebene der Interaktion von GTPasen mit Effektoren erfolgen. Andererseits ist es auch möglich, dass die Aktivierung durch einen bestimmten GEF dazu führt, dass die GTPase spezifisch den zugehörigen Effektor erkennt (Elliot-Smith et al., 2005; Karnoub et al., 2001; Snyder et al., 2002).

Da in *U. maydis* Deletionen der nicht essentiellen Gene *cdc42* und *rac1* zu klar unterscheidbaren Phänotypen führen (Mahlert et al., 2006), sollte dieses einfache Modellsystem genutzt werden, um die Signalspezifität von Cdc42 und Rac1 zu analysieren. Dazu sollten verschiedene chimäre Cdc42/Rac1-Proteine sowohl im Wildtyp als auch in den Deletionsstämmen exprimiert werden. Über die entsprechenden phänotypischen Auswirkungen der unterschiedlichen Konstrukte sollte eine spezifitätsbestimmende Region der GTPasen gefunden werden. Komplementationsstudien der chimären Proteine in *S. cerevisiae* sollten zeigen, ob es sich bei der Spezifitätsbestimmung um universelle Mechanismen handelt.

Um den Einfluss der GEFs auf die Signalspezifität zu bestimmen, sollten weiterhin konditionale Mutanten der beiden GEFs Cdc24 und Intersectin erstellt und analysiert werden. Da für Intersectin im humanen System durch alternative Spleißvorgänge unterschiedliche Isoformen beschrieben sind (Gardiner et al., 2004; Tsyba et al., 2004), sollte mittels quantitativer „real time"-PCR untersucht werden, ob dies auch in *U. maydis* der Fall ist.

Zur Charakterisierung eines weiteren Regulators der Rho-GTPasen sollte auch der Effekt einer GDI-Deletion sowohl auf die durch Rac1- als auch auf die durch *b*-Induktion gesteuerte Filamentbildung untersucht werden.

2. Ergebnisse

2.1 Identifizierung der Spezifitätsdomäne von Cdc42 und Rac1

Cdc42 und Rac1 zeigen auf Aminosäureebene einen hohen Grad an Sequenzähnlichkeit (Abb. 13), jedoch ist der Phänotyp von Deletionsmutanten in *U. maydis* Zellen völlig verschieden. Bei Überexpression des Rac1-Proteins kommt es zur Ausbildung von Filamenten, während die Überexpression von Cdc42 keinen morphologischen Effekt hat.

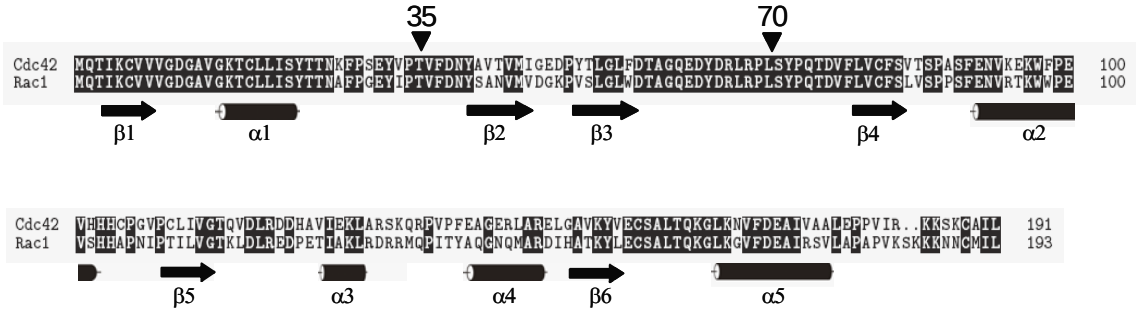


Abbildung 13: Sequenzvergleich von Cdc42 und Rac1 aus *U. maydis*. Die beiden Proteine haben einen sehr ähnlichen Aufbau und zeigen auf Aminosäureebene eine Sequenzidentität von 66,8 %. Die Pfeile zeigen die Fragmentgrenzen der Module, aus denen die chimären Proteine $C_{35}R$, $C_{70}R$, $R_{35}C$ und $R_{70}C$ aufgebaut sind. Innerhalb dieses Bereichs (Faltblätter β2 und β3) unterscheiden sich die beiden GTPasen stärker.

In meiner Diplomarbeit habe ich bereits verschiedene chimäre Proteine aus Cdc42 und Rac1 auf ihre Fähigkeit getestet, *cdc42*- bzw. *rac1*-Deletionsmutanten in *U. maydis* zu komplementieren. Dabei wurden Bereiche vom N-Terminus oder vom C-Terminus gegen Sequenzen des jeweils anderen Proteins ausgetauscht. Die dadurch erhaltenen Konstrukte $C_{35}R$, $C_{70}R$, $R_{35}C$ und $R_{70}C$ wurden unter Kontrolle des Arabinose-induzierbaren *crg*-Promotors exprimiert (Abb.14). Die Transformanden wurden daraufhin untersucht, ob die Expression der chimären Proteine zur Komplementation des Zelltrennungsdefektes der Δ*cdc42*-Mutante, bzw. zur Induktion des Rac1-spezifischen, filamentösen Wachstums führt. Über diese phänotypische Analyse konnte gezeigt werden, dass für die Spezifität der beiden GTPasen der Bereich zwischen Aminosäure 35 und 70 notwendig ist (Hlubek, Diplomarbeit).

Diese Domäne liegt genau in dem Bereich zwischen den beiden Regionen Switch I und Switch II und umfasst die antiparallelen Faltblätter β2 und β3 (Abb. 14). Diese Region deckt sich interessanterweise mit der so genannten Effektordomäne, die sowohl durch die Analyse verschiedener Chimären aus den GTPasen Cdc42 und TC10 als auch in Kristallstrukturanalysen identifiziert wurde (Gu et al., 2004; Maesaki et al., 1999).

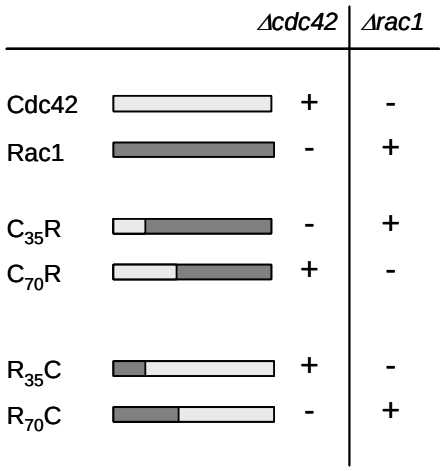


Abbildung 14: Komplementation von Δ*rac1*- und Δ*cdc42*-Mutanten durch Expression chimärer GTPasen in *U. maydis*. Gezeigt sind die chimären Konstrukte, die die Region zwischen Aminosäure 35 und 70 der kleinen GTPasen eingrenzen. + und - bedeuten Komplementation, bzw. keine Komplementation des jeweiligen Deletionsphänotyps.

In dieser Arbeit sollte nun überprüft werden, ob der Bereich zwischen Aminosäure 35 und 70 nicht nur notwendig, sondern auch ausreichend für die Bestimmung der Spezifität ist. Darüber hinaus sollte eine detailliertere Analyse weiterer chimärer Cdc42/Rac1 Kombinationen erfolgen.

2.1.1 Die Aminosäureregion von 41 bis 56 ist notwendig und hinreichend zur Bestimmung der Spezifität von Rac1 und Cdc42 in *U. maydis*

Um zu untersuchen, ob der Bereich von Aminosäure 35 bis 70 nicht nur notwendig, sondern auch ausreichend für die Spezifitätsbestimmung ist, sollten Domänenaustauschproteine analysiert werden. Es wurden chimäre Proteine hergestellt, bei denen diese Region zwischen den GTPasen ausgetauscht wurde. Innerhalb dieses Bereiches unterscheiden sich Rac1 und Cdc42 lediglich an 10 Aminosäuren zwischen Position 41 und 56. Daher wurden die beiden daraus resultierenden Konstrukte $CR_{41\text{-}56}C$ (Cdc42, bei dem Aminosäure 41–56 gegen die Rac1 Sequenz ausgetauscht wurde) und $RC_{41\text{-}56}R$ (Rac1, bei dem diese Region durch die entsprechende Cdc42 Sequenz ersetzt wurde) genannt. Diese Konstrukte wurden sowohl im Wildtyp als auch in *cdc42*- und *rac1*- Deletionsmutanten unter der Kontrolle des *crg*-Promotors exprimiert (Abb. 15).

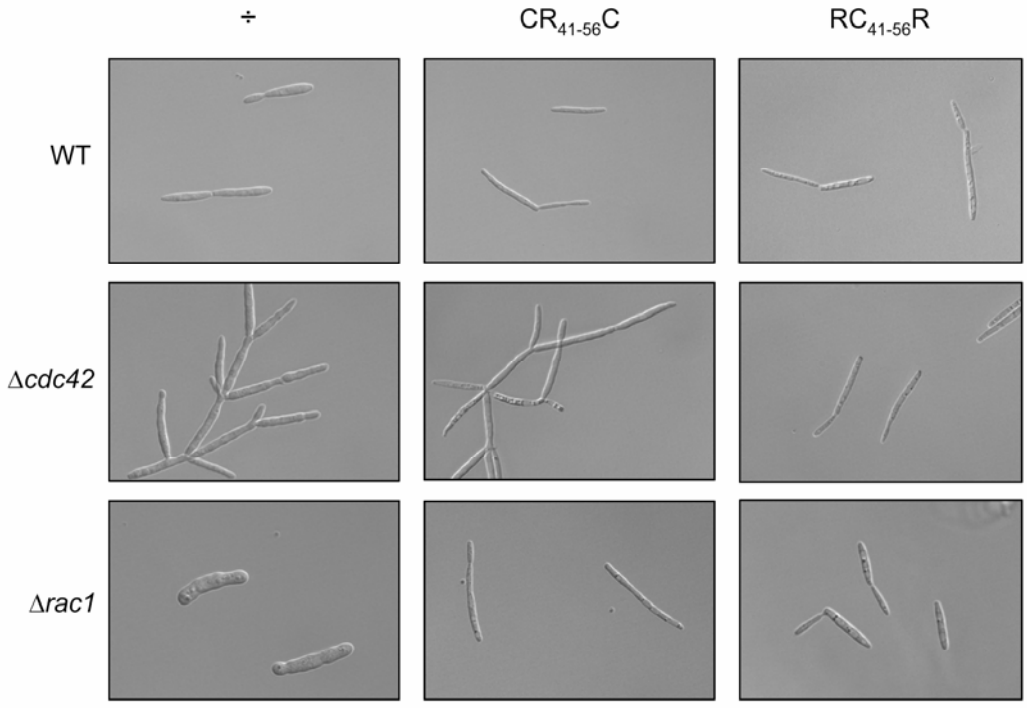


Abbildung 15: Komplementation der Δ*rac1*- und Δ*cdc42*-Mutanten durch „domain swap" Konstrukte in *U. maydis*. Phänotypen von Wildtyp Zellen, Δ*rac1*- und Δ*cdc42*-Mutanten, die die chimären GTPasen $RC_{41\text{-}56}R$ und $CR_{41\text{-}56}C$ exprimieren.

Die Überexpression der beiden Konstrukte in Wildtypzellen zeigte keine auffälligen morphologischen Auswirkungen. Interessanterweise war auch für keines der Konstrukte Filamentbildung zu beobachten, wie sie für die Rac1-Überexpression charakteristisch ist (Mahlert et al., 2006).

Der Zelltrennungsdefekt der Δ*cdc42*-Mutante wurde durch die Expression der chimären GTPase $RC_{41\text{-}56}R$ vollständig komplementiert, unter induzierenden Bedingungen fanden sich nur noch Einzelzellen oder Zellen mit einer einzelnen Knospe. Bei Expression des Konstruktes $CR_{41\text{-}56}C$ kam es lediglich zu einer teilweisen Trennung der bäumchenartigen Strukturen, nur gelegentlich fanden sich auch einzelne Zellen. Die Zellaggregate waren deutlich kleiner als in der Δ*cdc42*-Mutante, es erfolgte aber keine vollständige Komplementation. Der morphologische Phänotyp der Δ*rac1*-Mutante wurde sowohl durch Expression von $RC_{41\text{-}56}R$ als auch durch $CR_{41\text{-}56}C$ komplementiert. Die Zellen, in denen das Konstrukt $CR_{41\text{-}56}C$ exprimiert wurde, waren leicht elongiert, jedoch war auch hier keine Filamentbildung zu beobachten.

Für die Funktion von Cdc42 bei der Bildung des zweiten Septums und der Zellteilung ist also die Region 41 bis 56 ausreichend (vgl. Abb. 15, $RC_{41\text{-}56}R$ in Δ*cdc42*). Umgekehrt sind diese 10 Aminosäuren von Rac1 im Cdc42 Kontext ausreichend, um die morphologischen Veränderungen einer *rac1*-Deletionsmutante zu komplementieren (vgl. Abb. 15, $CR_{41\text{-}56}C$ in Δ*rac1*).

2.1.2 Komplementation einer *cdc42*-Deletionsmutante in *S. cerevisiae*

Die Funktionen von Cdc42 wurden erstmals in *S. cerevisiae* beschrieben. In Hefe ist Cdc42 essentiell, und es existiert kein Rac1-Homolog (Johnson and Pringle, 1990). Eine temperatursensitive *cdc42*-Mutante zeigt unter restriktiven Bedingungen Defekte im Zytoskelett und der Knospenbildung. Die Zellen arretieren als große, knospenlose Zellen mit mehreren Kernen (Adams et al., 1990). Es wurde beschrieben, dass die temperatursensitive *cdc42-1* Mutante durch Expression von Cdc42-Proteinen anderer Organismen komplementiert werden kann (Munemitsu et al., 1990; Shinjo et al., 1990). Björn Sandrock

konnte für die GTPasen von *U. maydis* zeigen, dass nur die Expression von Cdc42, nicht aber die von Rac1 zur Komplementation der *cdc42-1* Mutante führt (Hlubek, 2008).

Anhand der Analyse der Domänenaustauschproteine $CR_{41\text{-}56}C$ und $RC_{41\text{-}56}R$ konnte gezeigt werden, dass die Region zwischen Aminosäure 41 und 56 von *Um*Cdc42 notwendig und auch ausreichend für die Cdc42 Funktion einer ansonsten aus Rac1 Sequenz bestehender GTPase ist. Bei restriktiver Temperatur (37 °C) war das Konstrukt $RC_{41\text{-}56}R$ in der Lage, den Wachstumsdefekt der temperatursensitiven *cdc42-1* Mutante zu komplementieren. Dies geschah nicht bei der Expression des Konstruktes $CR_{41\text{-}56}C$ (Abb. 17).

Die Beobachtung, dass das Konstrukt $CR_{41\text{-}56}C$ nicht den letalen Phänotyp der *cdc42-1* Mutante rettet, könnte auch auf eine reduzierte Stabilität des chimären Proteins bei erhöhter Temperatur zurückzuführen sein. Um dies auszuschließen, wurden die chimären Konstrukte auch bei physiologischer Temperatur auf Komplementation einer *cdc42*-Deletionsmutante in *S. cerevisiae* getestet. Zu diesem Zweck wurde ein Hefestamm genutzt, der am genomischen Lokus eine *cdc42*-Deletion trägt, jedoch gleichzeitig Cdc42 von einem autonom replizierenden *URA3* Plasmid exprimiert (Mösch et al., 2001). *URA3* kodiert für eine Orotidin-5'-monophosphat-Decarboxylase. In Gegenwart dieses Enzyms gelangt 5-FOA in den Pyrimidinstoffwechsel der Hefezellen, wo es zu einer toxischen Verbindung umgewandelt wird. Der Verlust dieses Plasmides und Wachstum auf 5-FOA haltigen Platten ist nur möglich, wenn die genomische *cdc42*-Deletion einer chimären GTPase mit Cdc42-Funktion ersetzt wurde (Abb.16).

Abbildung 16: 5-FOA Gegenselektionssystem. Das genomische *cdc42*-Allel ist deletiert, Cdc42 wird von dem Plasmid pTF27 *CDC42* exprimiert. Da pTF27 *CDC42* auch das *URA3* Gen trägt, kann nach Transformation mit den zu testenden chimären Konstrukten auf 5-FOA haltigen Platten gegen dieses *cdc42* codierende Plasmid selektiert werden. So entstehen *cdc42*-Deletionsmutanten, die nur lebensfähig sind, wenn das chimäre Konstrukt Cdc42-Funktionen übernimmt.

Dieses System wurde genutzt, um die chimären Proteine aus *U. maydis* bei physiologischen Temperaturen auf ihre Fähigkeit zu testen, eine *cdc42*-Deletionsmutante in *S. cerevisiae* zu komplementieren. Transformanden, die die GTPasen Cdc42 und Rac1, bzw. die Domänenaustauschproteine $RC_{41-56}R$ und $CR_{41-56}C$ exprimieren, wurden in Abwesenheit von 5-FOA angezogen. Serielle Verdünnungsreihen der entsprechenden Kulturen wurden dann auf 5-FOA-haltige Agarplatten getropft.

Die Ergebnisse dieses Tests und die des Komplementationstests der *cdc42-1* Mutante waren identisch (Abb. 17). *Um*Cdc42 komplementierte sowohl das temperatursensitive *cdc42-1* Allel als auch die Deletionsmutante von *cdc42* in *S. cerevisiae*, während *Um*Rac1 dazu nicht in der Lage war. In beiden Versuchen komplementierte das Konstrukt $RC_{41-56}R$ den Δ*cdc42*-Defekt in *S. cerevisiae*, jedoch nicht das komplementäre Konstrukt $CR_{41-56}C$. Somit konnte das Konstrukt $CR_{41-56}C$ auch bei normalen Wachstumstemperaturen nicht Cdc42 in *S. cerevisiae* ersetzen.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass die Region von Aminosäure 41 bis 56 sowohl notwendig als auch ausreichend für die essentielle Funktion von Cdc42 in *S. cerevisiae* ist.

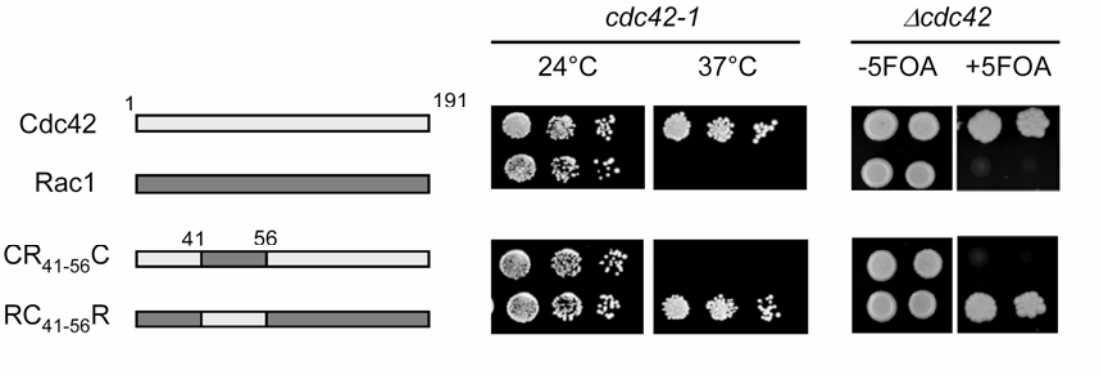


Abbildung 17: Komplementation von *cdc42*-Mutanten in *S. cerevisiae*. *Um*Cdc42 und *Um*Rac1 als auch die Konstrukte $RC_{41-56}R$ und $CR_{41-56}C$ unterscheiden sich in ihrer Fähigkeit, *cdc42*-Mutanten in *S. cerevisiae* zu komplementieren. Dies wurde sowohl in einem Hefestamm getestet, der das temperatursensitive Allel *cdc42-1* trägt als auch in einem Stamm, in dem über das 5-FOA Gegenselektionssystem eine echte *cdc42*-Deletion hergestellt werden kann.

2.1.3 Weitere Eingrenzung der Spezifitätsdomäne in *S. cerevisiae*

Der Bereich zwischen Aminosäure 41 und 56 wurde noch weiter auf seinen Einfluss auf die Spezifität der GTPasen hin untersucht. Diese Analysen wurden sowohl in der temperatursensitiven *cdc42-1* Mutante als auch im 5-FOA-System durchgeführt.
Zur weiteren Feinkartierung wurde die Region von Aminosäure 41 bis 56 in zwei kleinere Bereiche aufgeteilt. Zum Einen von Aminosäure 41 bis 45 (3 unterschiedliche Aminosäuren zwischen Cdc42 und Rac1) und zum Anderen von Aminosäure 45 bis 56 (7 unterschiedliche Aminosäuren zwischen Cdc42 und Rac1). Es wurden chimäre Konstrukte von Cdc42 und Rac1 erstellt, bei denen entweder die Region 41 bis 45, oder die Region 45 bis 56 gegen die Sequenz des jeweils anderen Proteins ausgetauscht wurde (Abb. 18).

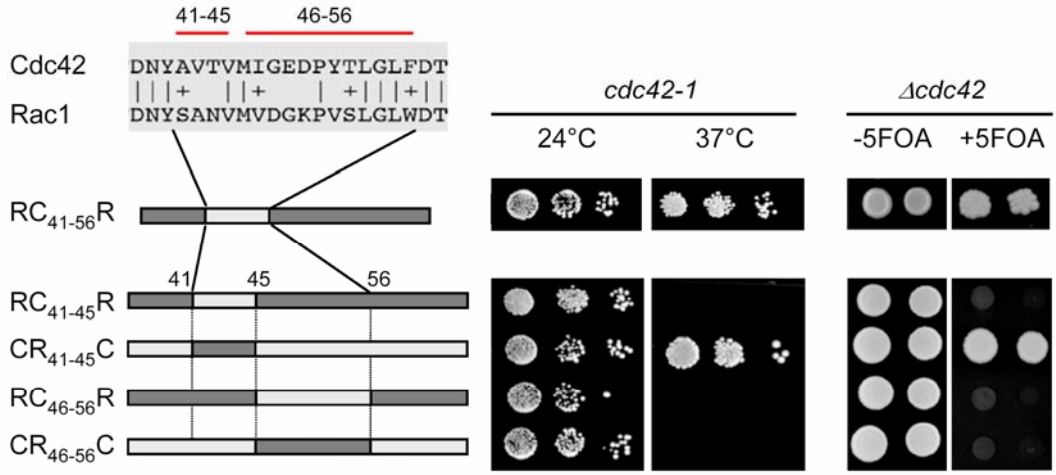


Abbildung 18: Komplementation von *cdc42*-Mutanten in *S. cerevisiae* durch chimäre GTPasen, die eine weitere Feinkartierung der Region zwischen Aminosäure 41 und 56 erlauben. Auch die Konstrukte der Feinkartierung sind sowohl in einem Hefestamm getestet, der das temperatursensitive Allel *cdc42-1* trägt als auch in einem Stamm, in dem über das 5-FOA Gegenselektionssystem eine echte *cdc42*-Deletion hergestellt werden kann.

Auch hier entsprachen sich die Ergebnisse beider Testsysteme. Lediglich das Konstrukt $CR_{41-45}C$ war noch in der Lage, die Funktion von Cdc42 in Hefe zu übernehmen. Die Region zwischen Aminosäure 41 und 45 scheint somit nicht notwendig für die Spezifitätsbestimmung zu sein. Die Expression der drei anderen Konstrukte $RC_{41-45}R$, $CR_{41-45}C$ und $CR_{46-56}C$ führte nicht zur Komplementation der *cdc42*-Mutanten in *S. cerevisiae*. Somit ist die Region zwischen Aminosäure 45 und 56 für die Cdc42-Funktion unbedingt notwendig ($RC_{41-45}R$ und $CR_{46-56}C$ komplementierten nicht). Ohne weitere

Cdc42-Regionen im Rac1-Kontext ist dieser Bereich aber auch nicht ausreichend, um den Δ*cdc42* Defekt in *S. cerevisiae* zu komplementieren ($RC_{46-56}R$).
Dies bedeutet, dass in *S. cerevisiae* die Region zwischen Aminosäure 41 und 56 ausreichend für die Bestimmung der Cdc42-Spezifität ist, aber nicht noch weiter eingegrenzt werden kann.

2.1.4 Weitere Eingrenzung der Spezifitätsdomäne in *U. maydis*

Die Feinkartierung der spezifitätsbestimmenden Domäne von *Um*Cdc42 in *S. cerevisiae* gab einen ersten Hinweis darauf, welche Regionen von *Um*Cdc42 für dessen Funktionalität notwendig sind. Daraufhin wurden diese Konstrukte auf Komplementation des Zellteilungsdefekts der *cdc42*-Deletionsmutante in *U. maydis* getestet (Abb. 19).

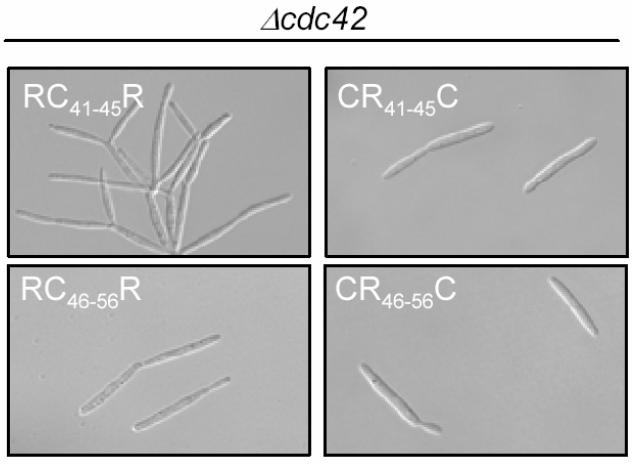


Abbildung 19: Komplementierung der *U. maydis cdc42*-Deletionsmutante. Expression der chimären GTPasen $RC_{41-45}R$, $RC_{46-56}R$, $CR_{41-45}C$ und $CR_{46-56}C$. Übernimmt das jeweilige Konstrukt Cdc42-Funktion, kommt es zu einer Komplementation des Zelltrennungsdefektes der Deletionsmutante.

Im Gegensatz zu den Experimenten in *S. cerevisiae* waren bei der Analyse in *U. maydis* drei der getesteten Konstrukte in der Lage, den Zelltrennungsdefekt einer *cdc42*-Deletionsmutante zu komplementieren. Lediglich die Expression des Konstruktes $RC_{41-45}R$ führte nicht zu einer Komplementation der Δ*cdc42*-Mutante in *U. maydis*. In Abb. 20 ist zusammengefasst, wie sich die Ergebnisse der Feinkartierung in *U. maydis* und *S. cerevisiae* unterscheiden.

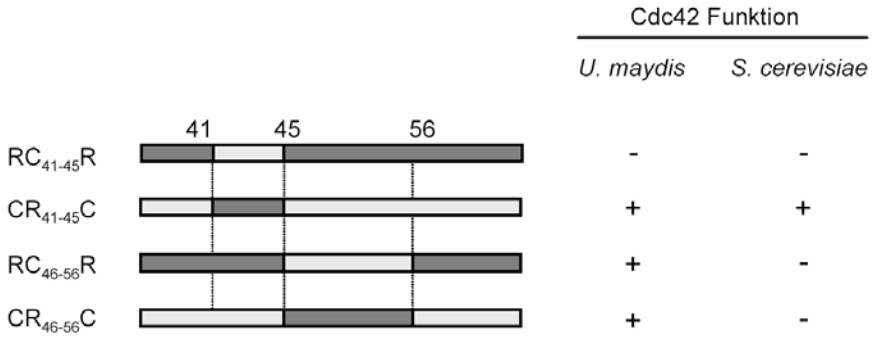


Abbildung 20: In *U. maydis* und *S. cerevisiae* werden unterschiedliche Bereiche für die Bestimmung der Cdc42-Spezifität benötigt. Dargestellt sind die chimären GTPasen $RC_{41-45}R$, $RC_{46-56}R$, $CR_{41-45}C$ und $CR_{46-56}C$. +, bzw. – steht für ihre Fähigkeit, die *cdc42*-Mutanten in *S. cerevisiae* und *U. maydis* zu komplementieren.

Zwischen *U. maydis* und *S. cerevisiae* scheinen sich die Mechanismen zur Spezifitätsbestimmung von Cdc42 zu unterscheiden. In *U. maydis* und *S. cerevisiae* ist der Bereich zwischen Aminosäure 41 und 45 weder ausreichend, noch notwendig, um Cdc42-Funktionalität zu vermitteln. Interessanterweise war in *U. maydis,* jedoch nicht in *S. cerevisiae,* der Bereich von Aminosäure 46 bis 56 ausreichend, um Cdc42-Funktion auf das chimäre Protein zu übertragen. Allerdings konnte in *U. maydis* dieser Bereich auch gegen Rac1-Sequenz ersetzt werden, ohne die Cdc42-Funktion des Proteins zu beeinträchtigen (vgl. $CR_{46-56}C$).

2.2 Die Aminosäure an Position 56 ist kritisch für eine spezifische GEF–GTPase Interaktion

In der spezifitätsbestimmenden Region von Aminosäure 46 bis 56 ist eine Aminosäure enthalten, die bereits in früheren Studien als kritisch für die spezifische Erkennung der GTPasen durch Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (GEFs) beschrieben wurde (Gao et al., 2001; Karnoub et al., 2001). Alle bekannten Cdc42-Proteine tragen an Position 56 ein Phenylalanin (F), während sich in allen bekannten Rac1-Proteinen hier ein Tryptophan (W) befindet. Dies gilt auch für *U. maydis*.
Um zu überprüfen, wie sich ein Austausch dieser Aminosäuren auf die Spezifität auswirkt, wurden die Effekte der entsprechenden Proteinvarianten von *Um*Cdc42 und *Um*Rac1 sowohl in *S. cerevisiae* als auch in *U. maydis* analysiert.

2.2.1 Der Einfluss der Aminosäure an Position 56 auf die Signalspezifität von *Um*Rac1^{W56F} und *Um*Cdc42^{F56W} in *S. cerevisiae*

Für einen Austausch der Aminosäure an Position 56 wurden mittels PCR-Mutagenese die beiden Allele *cdc42*^{F56W} and *rac1*^{W56F} erzeugt. Die beiden entsprechenden GTPasen wurden zuerst auf ihre Fähigkeit getestet, die Letalität der *cdc42-1* Mutante unter erhöhter Temperatur und einer echten *cdc42*-Deletionsmutante im 5FOA-System zu komplementieren (Abb. 21).

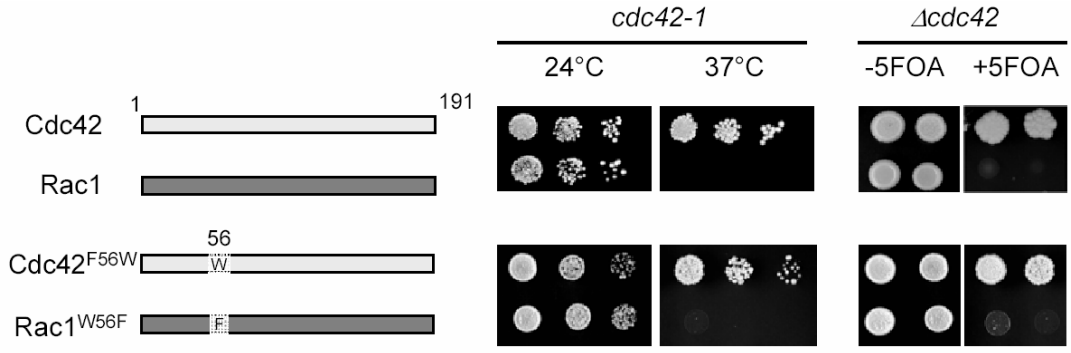


Abbildung 21: Effekt der Aminosäure an Position 56 auf die Komplementationseigenschaften von *Um*Cdc42 und *Um*Rac1 in *S. cerevisiae*. Die GTPasen Cdc42^{F56W} und Rac1^{W56F} sind sowohl in einem Hefestamm getestet, der das temperatursensitive Allel *cdc42-1* trägt als auch in einem Stamm, in dem über das 5-FOA Gegenselektionssystem eine echte *cdc42*-Deletion hergestellt werden kann.

Interessanterweise hatte der Austausch dieser einzelnen Aminosäure keinerlei Effekt auf die Funktionen der GTPasen in *S. cerevisiae*. $Cdc42^{F56W}$ konnte immer noch die *cdc42*-Mutanten komplementieren, während dies bei der Expression von $Rac1^{W56F}$ nicht zu beobachten war.

2.2.2 Der Einfluss der Aminosäure an Position 56 auf die Signalspezifität der GTPasen in *U. maydis*

Um die Proteine $Rac1^{W56F}$ und $Cdc42^{F56W}$ auf die Komplementation des Zellseparationsdefekts des *cdc42*-Deletionsstamms und des Polaritätsdefekts und des *rac1*-Deletionsstamms zu testen, wurden sie unter der Kontrolle des regulierbaren *crg*-Promotors exprimiert.

Überaschenderweise waren sowohl $Rac1^{W56F}$ als auch $Cdc42^{F56W}$ in der Lage, den Zellteilungsdefekt des *cdc42*-Deletionsstamms zu komplementieren. Auch bei der Expression dieser Konstrukte in *rac1*-Mutanten kam es zu einer vollständigen Komplementation des Δ*rac1*-abhängigen Polaritätsdefektes (Abb. 22).

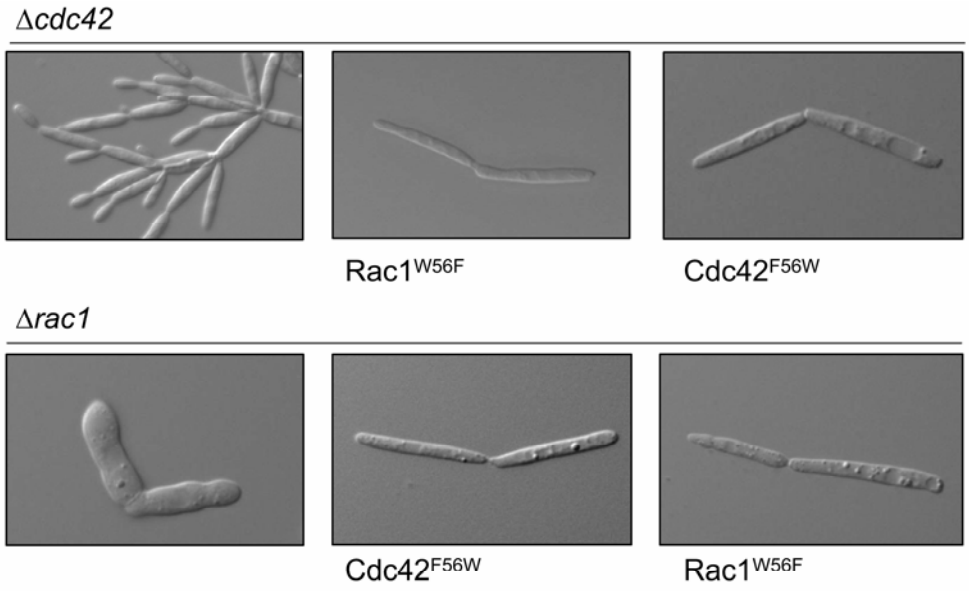


Abbildung 22: Komplementationseigenschaften der GTPasen $Cdc42^{F56W}$ und $Rac1^{W56F}$. Die GTPasen $Cdc42^{F56W}$ und $Rac1^{W56F}$ sind sowohl in Δ*cdc42*- als auch in Δ*rac1*-Mutanten exprimiert. Beide GTPasen komplementieren den Phänotyp der *cdc42*- und der *rac1*-Deletion.

Somit wurden Rac1-spezifische Funktionen auf Cdc42 übertragen und umgekehrt. Allerdings fiel auf, dass weder bei Expression von Rac1^{W56F} noch von Cdc42^{F56W} die für die Rac1-Überexpression typische Filamentbildung zu beobachten war.

2.2.3 Aktivierbarkeit der GTPasen durch den GEF Don1

Die Expression von Rac1^{W56F} führt zur Komplementation des Zytokinesedefekts von *cdc42*-Mutanten. In früheren *in vitro* Studien konnte gezeigt werden, dass der Austausch der Aminosäure an Position 56 dazu führt, dass die Spezifität der GTPase gegenüber den GEFs verändert wird (Gao et al., 2001; Karnoub et al., 2001). Dies legt die Vermutung nahe, dass Rac1^{W56F} durch einen GEF, dessen Aktivität für die Zellteilung in *U. maydis* benötigt wird, aktiviert werden kann. Um zu testen, ob die Komplementationsergebnisse der beiden Proteine Rac1^{W56F} und Cdc42^{F56W} durch eine veränderte Spezifität gegenüber ihren GEFs zu erklären sind, wurde die Aktivität des GEFs Don1 gegenüber den GTPasen Rac1, Cdc42, Rac1^{W56F} und Cdc42^{F56W} *in vitro* getestet. Für Don1 konnte bereits genetisch gezeigt werden, dass dieser GEF über die Aktivierung von Cdc42 an der Regulation der Zellteilung beteiligt ist (Mahlert *et al.*, 2006; Weinzierl *et al.*, 2002).
Dazu wurden die GTPasen und die katalytische DH-Domäne von Don1 von K. Schink in unserer Arbeitsgruppe als GST-Fusionen aus *E. coli* aufgereinigt. Die zu testende GTPase wurde in Gegenwart des GEFs Don1 mit dem fluoreszierenden Nukleotidderivat mantGDP (N-methylanthranoyl-GDP) inkubiert. Die Fluoreszenz von mantGDP wird durch Bindung an die GTPase stark erhöht (Leonard et al., 1994). Ist ein GEF in der Lage den Nukleotidaustausch an der GTPase zu katalysieren, kommt es zu einem Austausch von GDP zu mantGDP, der fluorimetrisch nachgewiesen werden kann. (Abb. 23).

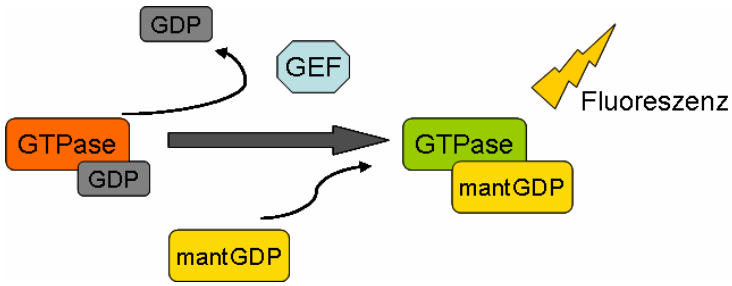


Abbildung 23: *in vitro* GEF-Assays. Ist der GEF aktiv gegenüber der untersuchten GTPase, wird der Austausch von GDP zu mantGDP katalysiert. Dieser Prozess kann über die Zunahme der Fluoreszenz verfolgt werden.

In Zusammenarbeit mit K. Schink konnten wir zeigen, dass Don1 *in vitro* sehr effizient den Nukleotidaustausch an Cdc42 katalysiert, jedoch keinerlei GEF-Aktivität gegenüber Rac1 zeigt (Hlubek, 2008). Dies bestätigt die früheren Beobachtungen, dass Don1 ein Cdc42-spezifischer GEF ist (Abb. 24) (Mahlert *et al.*, 2006).

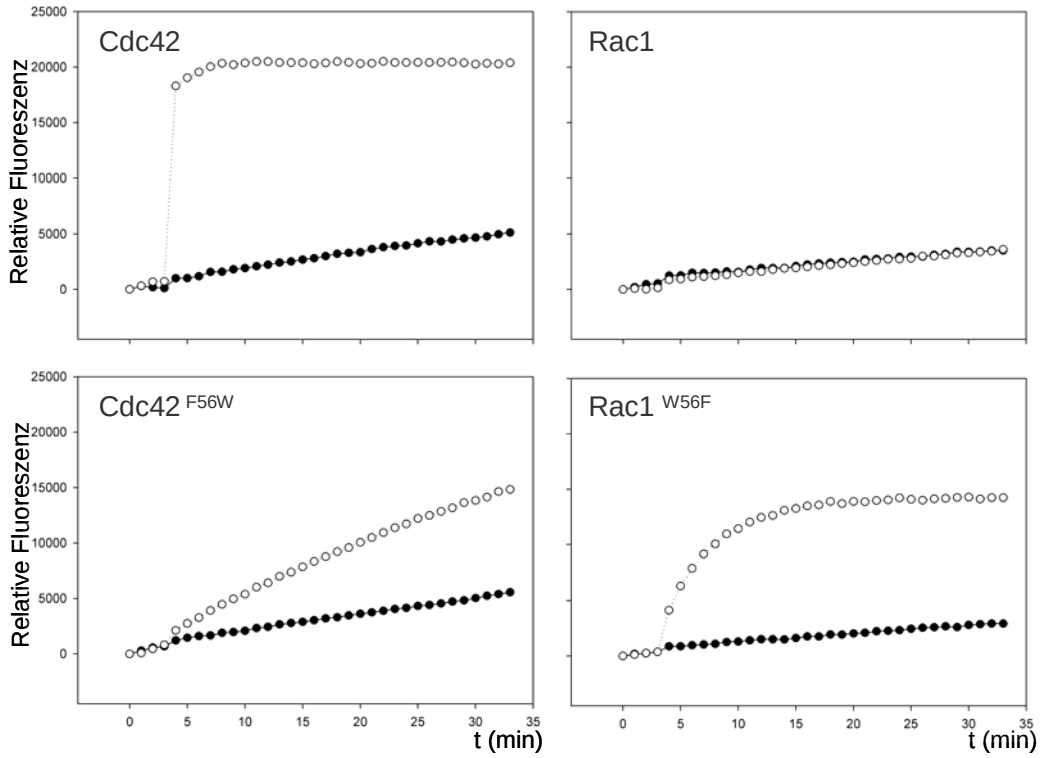


Abbildung 24: Don1 GEF-Assay. Die DH-Domäne wurde mit den verschiedenen GTPasen in Gegenwart von mantGDP inkubiert. Über die Zunahme der Fluoreszenz kann auf die spezifische Aktivität von Don1-DH gegenüber der jeweiligen GTPase geschlossen werden. Gezeigt sind die Ergebnisse der GTPasen Cdc42, Rac1, Cdc42^{F56W} und Rac1^{W56F}. • stellt die Resultate der Kontrollreaktion dar, die ohne die Zugabe des GEFs erfolgte. Die Ergebnisse nach Zugabe des GEFs sind durch o gezeigt.

Don1 konnte den Nukleotidaustausch an Cdc42^{F56W} katalysieren, wenn auch etwas schwächer als an Cdc42. Interessanterweise konnte Rac1^{W56F} deutlich von Don1 aktiviert werden, während dies für Rac1 nicht der Fall war.

Diese Daten sind in guter Übereinstimmung mit den Beobachtungen der *in vivo* Experimente, in denen gezeigt wurde, dass beide mutierten GTPasen den Zellteilungsdefekt der *cdc42*-Deletionsmutante komplementieren können. Interessanterweise ist ein einzelner Aminosäureaustausch ausreichend, um die GTPase Rac1 *in vitro* durch den GEF Don1 aktivierbar zu machen. Gleichzeitig führt dieser Austausch dazu, dass Rac1^{W56F} *in vivo* die Funktion von Cdc42 während der Zelltrennung übernehmen kann.

2.2.4 Komplementation der *cdc42/rac1* Doppelmutante durch Rac1^{W56F}

Die GTPase Rac1^{W56F} kann sowohl den Zellteilungsdefekt einer *cdc42*-Deletionsmutante als auch den morphologischen Defekt einer *rac1*-Deletionsmutante komplementieren. Eine Doppeldeletion von Cdc42 und Rac1 ist in *U. maydis* letal, die beiden GTPasen haben somit zumindest eine redundante, essentielle Funktion, die jedoch bisher noch nicht genau definiert ist (Mahlert et al., 2006). Um zu testen, ob die GTPase Rac1^{W56F}, die ja sowohl Rac1- als auch Cdc42-spezifische Funktionen übernimmt, auch die gemeinsamen essentiellen Funktionen komplementieren kann, wurde eine Doppeldeletion von Cdc42 und Rac1 in Gegenwart einer Rac1^{W56F} Expression erstellt. Dazu wurde in einer Δ*cdc42*-Mutante die GTPase Rac1^{W56F} unter der Kontrolle des regulierbaren *crg*-Promotors exprimiert. Unter induzierenden Bedingungen erfolgte dann die Deletion von *rac1*.
Der so erhaltene Stamm konnte nur unter induzierenden Bedingungen wachsen. In Abwesenheit von Rac1^{W56F} war er nicht lebensfähig (Abb. 25).

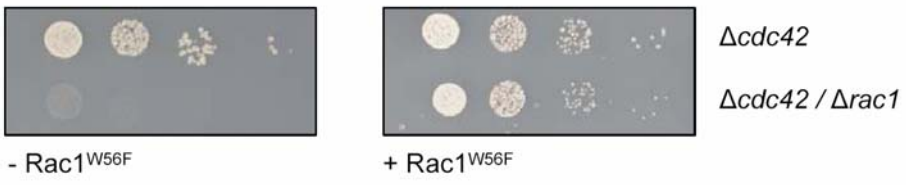


Abbildung 25: Komplementation der Δ*cdc42*/Δ*rac1*-Doppelmutante durch Rac1^{W56F}. In eine *cdc42*-Deletionsmutante wurde Rac1^{W56F} unter der Kontrolle eines induzierbaren Promotors eingebracht. Unter induzierenden Bedingungen wurde *rac1* deletiert. Die Gegenwart von Rac1^{W56F} ermöglicht die Lebensfähigkeit einer Δ*cdc42*/Δ*rac1* Doppelmutante.

Bei Expression von Rac1^{W56F} zeigten die Zellen dieses Stammes Wildtypmorphologie (Abb. 26). Weder Zelltrennung noch polare Knospenbildung waren gestört. Die Calcofluorfärbung zeigt, dass ein reguläres Doppelseptum gebildet wird. Die Überexpression von Rac1^{W56F} ist anscheinend ausreichend, um sowohl die Δ*cdc42*- als auch die Δ*rac1*-Defekte zu komplementieren. Somit konnte ein Stamm erstellt werden, in dem, ähnlich wie in *S. cerevisiae*, eine einzige GTPase ausreichend ist, um alle essentiellen Funktionen der GTPasen Cdc42 und Rac1 auszuüben.

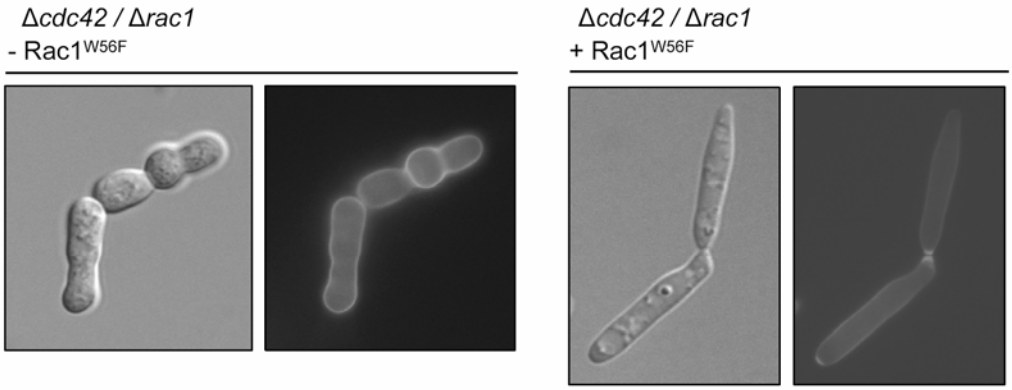


Abbildung 26: Rac1^{W56F} komplementiert alle morphologischen Defekte der Δ*cdc42*/Δ*rac1*-Doppelmutante. Durch Expression von Rac1^{W56F} wird die Lebensfähigkeit einer Δ*cdc42*/Δ*rac1*-Doppelmutante ermöglicht. Die Morphologie entspricht der Wildtyp-Morphologie, die Calcofluorfärbung zeigt sogar die Bildung regulärer Doppelsepten. Rac1^{W56F} komplementiert sowohl die phänotypischen Effekte der *cdc42*- als auch der *rac1*- Deletion. Filamente werden nicht induziert.

2.3 Identifizierung weiterer Cdc24- und Rac1-spezifischer GEFs

Sowohl die *in vitro*- als auch *in vivo*-Daten der bisherigen Versuche sprechen dafür, dass die spezifische Aktivierbarkeit der GTPasen durch den GEF Don1 auch die Signalspezifität unterhalb der GTPasen mitbestimmt. So konnte *in vitro* gezeigt werden, dass Don1 $Rac1^{W56F}$ aktiviert. Dies führt dazu, dass $Rac1^{W56F}$, vermutlich über Cdc42-spezifische Effektoren, den Zytokinesedefekt einer Δ*cdc42*-Mutante komplementieren kann. Um diesen interessanten Aspekt genauer zu untersuchen, wurde analysiert, ob diese Beobachtungen auch für andere GEFs gelten.

Um noch weitere GEFs sowohl auf ihre Spezifität als auch auf ihre Funktion zu untersuchen, wurde zuerst eine Homologiesuche nach möglichen GEFs der Dbl-Familie im Genom von *U. maydis* durchgeführt. Es konnten 12 Gene gefunden werden, die für mögliche Rho/Rac/Cdc42-GEFs kodieren, darunter auch das Gen, welches für den bereits beschriebenen GEF Don1 kodiert. Vier dieser Gene kodieren für Proteine mit sehr hoher Sequenzähnlichkeit zu beschriebenen GEFs mit bekannter Cdc42- oder Rac1-Spezifität (Tabelle 1). Dies gibt einen ersten Hinweis auf die mögliche Spezifität der entsprechenden Proteine in *U. maydis*.

Tabelle 1: Homologe Proteine aus *U. maydis* zu bereits beschriebenen GEFs aus *H. sapiens* und *S. cerevisiae*. Mittels Homologiesuche konnten verschiedene Gene von *U. maydis* identifiziert werden, deren Genprodukte hohe Homologien zu bekannten GEFs aufweisen. Gezeigt ist eine Auswahl dieser Proteine mit der zugehörigen Nummer des Genbankeintrages. Hinter den beschriebenen Proteinen ist in Klammern der Grad der Sequenzähnlichkeit angegeben.

U. maydis	(NUMDB Eintrag)	*H. sapiens* (E-value)	*S. cerevisiae* (E-value)
Don1	(Um10152)	FGD6 ($7e^{-23}$)	
Hot1	(Um04477)	TUBA ($3e^{-25}$)	
Cdc24	(Um02422)	pREX1 ($7e^{-25}$)	Cdc24 (e^{-60})
Its1	(Um06013)	Intersectin2 ($6e^{-27}$)	Pan1 (e^{-29})

So findet sich im Genom von *U. maydis* das Gen *um04477*, das für den GEF Hot1, ein TUBA-Homolog, kodiert. Das humane Protein TUBA wurde als Cdc42-spezifischer GEF beschrieben, der sowohl an der Zytoskelettreorganisation als auch an der Regulation des Vesikelverkehrs beteiligt ist (Kovacs et al., 2006). Der GEF Hot1 wird momentan im Rahmen einer Diplomarbeit in unserer Arbeitsgruppe charakterisiert.
Des Weiteren wurden über die Homologiesuche das Gen *um06013* gefunden, welches zwei Introns enthält und für ein Protein kodiert, welches große Ähnlichkeit zu dem humanen GEF ITSN und zu Pan1p aus *S. cerevisiae* aufweist. Aufgrund dessen wurde es *its1* (Intersectin1) genannt. In Säugetieren existieren unterschiedliche Isoformen, die durch differentielles Spleißen entstehen. Die lange Form (ITSN-L) besitzt am C-Terminus das charakteristische DH-PH Tandemmotiv, welches Cdc42-spezifisch ist und der kurzen Isoform (ITSN-S) fehlt (Hussain et al., 1999). Die Intersectinvarianten in *S. cerevisiae* und *D. melanogaster* besitzen kein DH-PH Tandemmotiv (Huang and Cai, 2007; O'Bryan et al., 2001).
Ein weiteres Gen, welches über die Homologiesuche nach möglichen GEFs der Dbl-Familie gefunden wurde, ist *um02422*. Das entsprechende Protein Cdc24 weist sehr hohe Sequenzähnlichkeit zu Cdc24p aus *S. cerevisae* auf. Cdc24 wurde sowohl in *S. cerevisiae* als auch in *S. pombe* als Cdc42-spezifischer GEF beschrieben, der an polaren Wachstumsprozessen beteiligt ist (Chang et al., 1994; Elion, 2000; Zheng et al., 1995; Zheng et al., 1994). In *H. sapiens* hat das Protein pREX (PtdIns-dependent Rac exchanger) sehr hohe Sequenzähnlichkeit zu Cdc24 in *U. maydis*. Interessanterweise ist pREX als Rac1-spezifischer GEF beschrieben (Welch et al., 2002).

Um die Spezifität der GEFs Cdc24 und Its1 in *U. maydis* und deren Rolle bei der Regulation der GTPase Signalkaskaden genauer zu untersuchen, wurden sowohl konditionale Mutanten erstellt als auch *in vitro* GEF-Assays mit den entsprechenden DH-Domänen durchgeführt.

2.4 Der GEF Cdc24

2.4.1 Cdc24 ist ein Rac1-spezifischer GEF

Um zu untersuchen, welche der GTPasen von Cdc24 aktiviert werden, wurde das Gen im Wildtyp, in der *cdc42*- und der *rac1*-Mutante unter der Kontrolle des *crg*-Promotors exprimiert. Unter induzierenden Bedingungen kann so der Effekt der Überexpression von Cdc24 untersucht und dadurch auf spezifische Funktionen von Cdc24 rückgeschlossen werden.

In Wildtypzellen führte die Überexpression von Cdc24 zur Filamentbildung. Diese Filamente ähneln morphologisch denen einer Rac1-Überexpression (Abb. 27). Diese Cdc24-induzierte Filamentbildung wurde auch in Zellen beobachtet, in denen *cdc42* deletiert ist. Allerdings wurden nach Cdc24-Überexpression in einer *rac1*-Deletionsmutante keine Filamente gebildet.

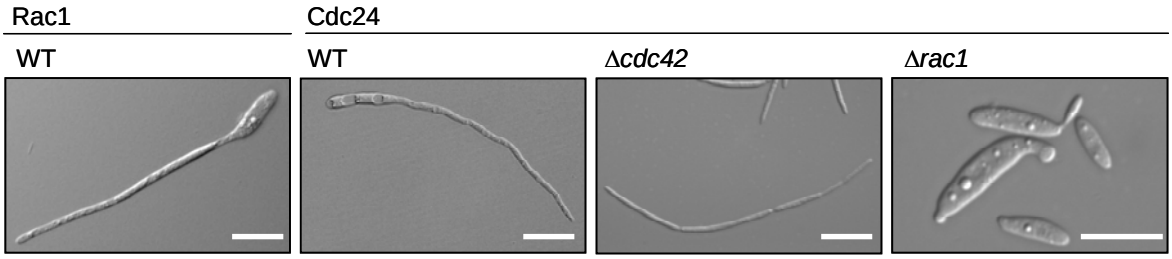


Abbildung 27: Überexpression von *cdc24*. Das Gen ist unter der Kontrolle des regulierbaren *crg*-Promotors ektopisch in verschiedenen Stämmen integriert. Nach Induktion ist im Wildtyp die Bildung eines Filaments zu beobachten, das sehr dem Rac1-induzierten Filament ähnelt. Eine *cdc42*-Deletion interferiert nicht mit der Filamentbildung, jedoch werden in einer *rac1*-Deletion keine Filamente mehr gebildet.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde vermutet, dass Cdc24 Rac1 aktiviert. Diese Vermutung wurde unterstützt durch *in vitro* „GEF-Assays“ mit dem GEF Cdc24 und den GTPasen Rac1 und Cdc42 (Kay Schink, Sonja Frieser). Dabei zeigte sich deutlich, dass Cdc24 ein starker Aktivator des Nukleotidaustausches an Rac1 ist. Cdc24 kann auch Cdc42 aktivieren, wenn auch nur in einem geringeren Ausmaß (Abb. 28). Da sowohl Cdc24 essentiell ist als auch Rac1 und Cdc42 mindestens eine gemeinsame, essentielle Funktion haben, wäre es möglich, dass Cdc24 beide GTPasen in diesem Prozess aktiviert.

Auch die bereits beschriebenen GTPasen mit den einzelnen Aminosäureaustauschen Rac1^{W56F} und Cdc42^{F56W} wurden auf ihre Aktivierbarkeit durch Cdc24 getestet. Auch mit dem GEF Cdc24 wurde ein Wechsel der Spezifität beobachtet. Während Rac1^{W56F} so gut wie gar nicht mehr aktiviert werden konnte, katalysierte Cdc24 signifikant den Nukleotidaustausch an Cdc42^{F56W}. Also scheint auch bezüglich des GEFs Cdc24 die Aminosäure an Position 56 der GTPasen ein kritischer Faktor für die spezifische Aktivierung und damit auch der Signalspezifität zu sein.

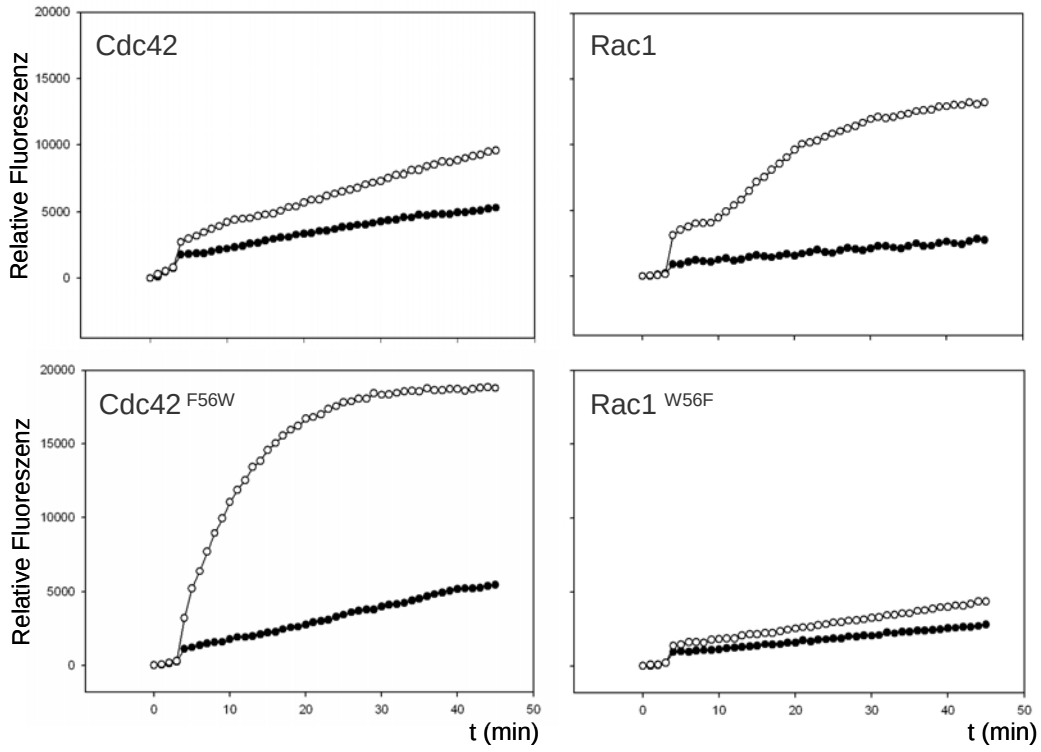


Abbildung 28: Cdc24 GEF-Assay. Die DH-Domäne von Cdc24 wurde mit den verschiedenen GTPasen in Gegenwart von mantGDP inkubiert. Über die Zunahme der Fluoreszenz kann auf die spezifische Aktivität von Cdc24-DH gegenüber der jeweiligen GTPase geschlossen werden. Gezeigt sind die Ergebnisse der GTPasen Cdc42, Rac1, Cdc42^{F56W} und Rac1^{W56F}. • stellt die Resultate der Kontrollreaktion dar, die ohne die Zugabe des GEFs erfolgte. Die Ergebnisse nach Zugabe des GEFs sind durch o gezeigt.

2.4.2 Der GEF Cdc24 ist essentiell

Um eine *cdc24*-Deletionsmutante zu erstellen wurden mittels PCR je 1000bp ober- und unterhalb des *cdc24* Gens amplifiziert und an eine Resistenzkassette ligiert. Über homologe Rekombination zwischen den flankierenden Sequenzen sollte das *cdc24*-Gen gegen die Resistenzkassette ausgetauscht werden. Trotz mehrerer unabhängiger Versuche konnten auf Selektionsmedium keine positiven Transformanden erhalten werden. Dies weist darauf hin, dass Cdc24 ein essentielles Protein und die *cdc24*-Deletion letal ist.
Aus diesem Grund wurde eine konditionale *cdc24*-Mutante erstellt, bei der das *cdc24*-Gen unter der Kontrolle eines regulierbaren Promotors steht. Über homologe Rekombination wurde der *crg*-Promotor direkt vor das zu regulierende Gen *cdc24* integriert.
Interessanterweise konnten die erhaltenen Transformanden unter reprimierten Bedingungen auf Festmedium wachsen. Wurde die Expression jedoch längere Zeit in Flüssigmedium reprimiert, so arretieren die Zellen im Wachstum, rundeten sich ab und bildeten kleine Zellansammlungen (Abb. 29). Die Zellen starben nach mehrfacher Passage in reprimierendem Medium unter Ausbildung einer Zellmorphologie, die interessanterweise der einer *cdc42/rac1* Doppelmutante ähnelt. Die Färbung mit Calcofluor zeigt eine aberrante Chitinablagerung um den Äquator der Zelle. Dies deutet sowohl auf eine Störung in der Zelltrennung als auch auf einen Polaritätsdefekt hin.

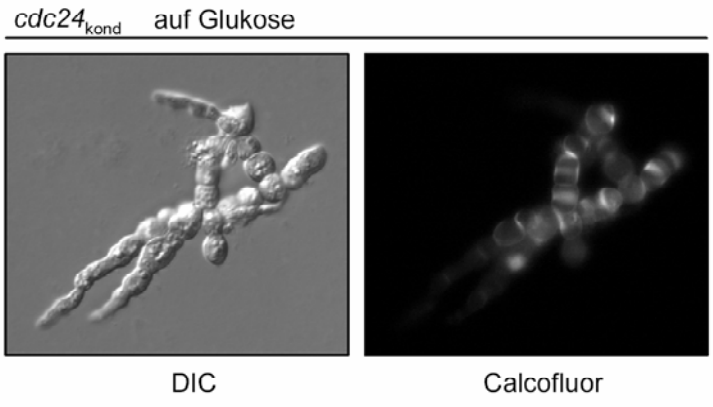


Abbildung 29: Die konditionalen *cdc24*-Mutante. In Flüssigmedium ist die Repression von *cdc24* letal, die Zellen runden sich ab und sterben. Die Calcofluorfärbung zeigt eine aberrante Chitinablagerung.

Die Ähnlichkeit dieser Mutante mit einer *cdc42/rac1* Doppelmutante legt die Vermutung nahe, dass Cdc24 in einem essentiellen Signalweg als Aktivator für Rac1 und Cdc42 fungiert. Cdc42 scheint ein essentielles Protein zu sein; allerdings sind entweder sehr geringe Mengen von Cdc24 für das Wachstum ausreichend, oder das Protein ist sehr stabil, da der letale Effekt erst nach längerer Kultur auftritt.

2.4.3 Die konditionale *cdc24*/*rac1*-Doppelmutante

Um das Zusammenspiel der GTPase Rac1 mit dem GEF Cdc24 genauer zu untersuchen wurde eine konditionale Doppelmutante erstellt. Dazu wurde eine konditionale *rac1*-Mutante, bei der das *rac1*-Gen unter Kontrolle des *crg*-Promotors steht, als Ausgangsstamm genommen. In diesem Hintergrund wurde *cdc24* an seinem natürlichen Lokus unter die Kontrolle des durch verschiedene Stickstoffquellen regulierbaren *nar*-Promotors gebracht.
Nach Transformation des konditionalen *rac1*-Stammes und Selektion auf Carboxin wurden Transformanden erhalten, die das *cdc24*-Gen unter Kontrolle des *nar*-Promotors am natürlichen Lokus besitzen. In Gegenwart von Ammonium ist dieser Promotor und somit die Cdc24 Expression reprimiert, wohingegen die Anwesenheit von Nitrat die Expression von Cdc24 vom *nar*-Promotor ermöglicht. Somit konnten beide Gene unabhängig voneinander induziert und reprimiert werden.
Bei paralleler Überexpression von Cdc24 und Rac1 erfolgte ein stark filamentöses Wachstum. An den Spitzen der Filamente deutete eine besonders intensive Calcofluorfärbung auf stark polarisiertes Wachstum hin. Wie erwartet, war die Repression von *cdc24* bei gleichzeitiger Abwesenheit von Rac1 letal, die Zellen arretierten mit einem Phänotyp, wie er auch von der konditionalen *cdc24*-Mutante unter reprimierten Bedingungen gezeigt wurde (Abb. 30).

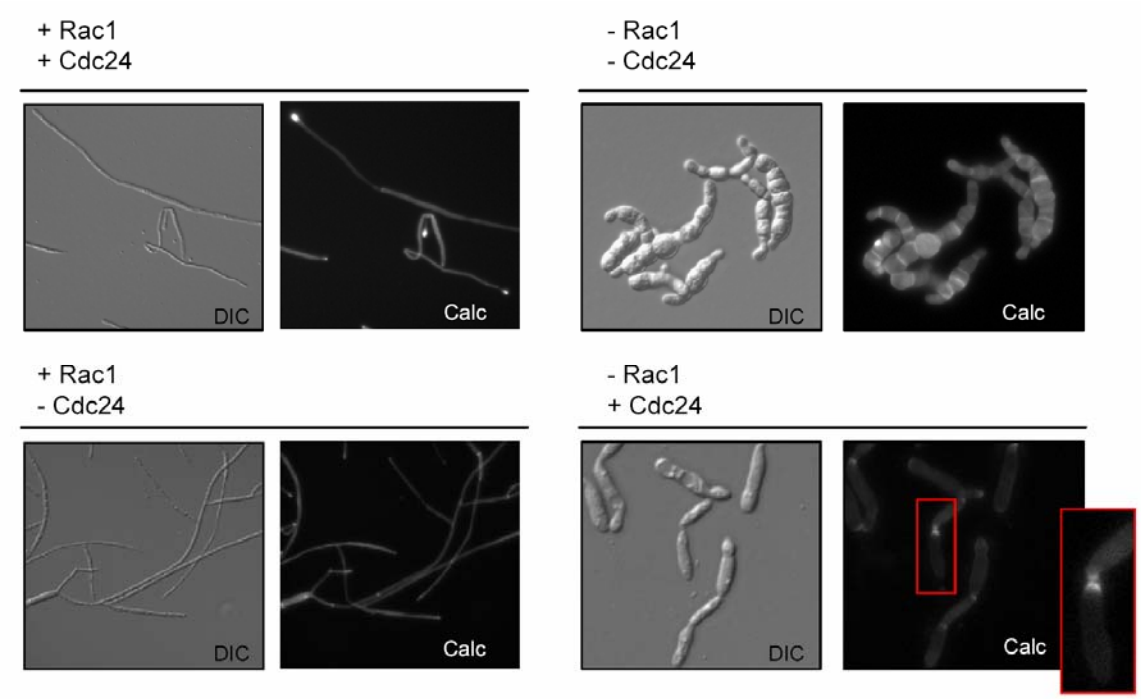


Abbildung 30: Die konditionale *cdc24/ rac1* Doppelmutante. In diesem Stamm kann *cdc24* vom *nar*-Promotor, und *rac1* vom *crg*-Promotor exprimiert werden. Sowohl die Überexpression beider Proteine als auch die Überexpression von Rac1 bei gleichzeitiger Cdc24-Repression führt zur Bildung langer Filamente. Die gleichzeitige Repression der Rac1- und der Cdc24-Expression resultiert in einem letalen Phänotyp, der dem Phänotyp der alleinigen Cdc24 Repression ähnelt. Eine Überexpression von Cdc24 führt zur Komplementation des Phänotyps einer Rac1-Depletion, die Calcofluorfärbung zeigt die Bildung von Doppelsepten.

Interessanterweise rettete jedoch die parallele Überexpression von Rac1 die Letalität der *cdc24*-Mutante, es kam sogar zur Ausbildung der für die Rac1-Überexpression charakteristischen Filamente. Umgekehrt konnte auch die Überexpression von Cdc24 den Phänotyp einer Rac1 Repression partiell komplementieren. Die Zellmorphologie ähnelte eher der des Wildtyps, teilweise konnte man auch mittels Calcofluorfärbung Doppelsepten nachweisen. Wie auch bei der Überexpression von Cdc24 in einer *rac1*-Deletionsmutante, wurden jedoch keine Filamente induziert (vergleiche Abb. 27).

Interessanterweise erfolgte das durch Rac1-Überexpression induzierte filamentöse Wachstum auch bei *cdc24*-Repression. Vermutlich sind bei erhöhtem Rac1-Level sehr geringe Mengen von Cdc24 ausreichend, um Filamente zu induzieren. Weiterhin überraschend war, dass bei Abwesenheit von Rac1 und paralleler Überexpression von Cdc24 Doppelsepten nachzuweisen waren. Möglicherweise wird durch große Mengen an Cdc24 auch Cdc42 rekrutiert und kann so Rac1 ersetzten.

2.5 Der GEF Its1

Über die genomweite Homologiesuche nach potentiellen GEFs in *U. maydis* konnte neben *don1* und *cdc24* auch *its1* identifiziert werden. In Säugetieren ist die DH-Domäne von Intersectin als Cdc42-spezifisch beschrieben. Wie auch in Säugetieren kodiert in *U. maydis* das letzte Intron für eine DH-PH Domäne, die in Intersectinvarianten von *S. cerevisiae* und *D. melanogaster* nicht existiert (Huang and Cai, 2007; O'Bryan et al., 2001).
Um die Rolle des GEFs Its1 innerhalb des komplexen Signalkaskadenetzwerks in *U. maydis* zu untersuchen, sollte die Spezifität der Its1-DH Domäne bestimmt werden.

2.5.1 Its1 ist ein Cdc42-spezifischer GEF

Um die Spezifität der DH-Domäne von Intersectin gegenüber den GTPasen Rac1 und Cdc42 in *U. maydis* zu untersuchen, wurden *in vitro* GEF-Assays mit der DH-Domäne von Its1 durchgeführt. Da für die GTPasen mit dem einzelnen Aminosäureaustausch an Position 56 eine veränderte Aktivierbarkeit durch Don1 gezeigt werden konnte, wurde ebenfalls die Spezifität der Its1-DH Domäne gegenüber $Rac1^{W56F}$ und $Cdc42^{F56W}$ untersucht.
Cdc42 konnte von Intersectin aktiviert werden, im Falle von Rac1 war kein Nukleotidaustausch messbar (Abb. 31). Durch den Austausch der einzelnen Aminosäure an Position 56 erfolgte für Cdc42 eine drastische Reduzierung der Aktivierbarkeit, während $Rac1^{W56F}$ nun durch Intersectin aktiviert wurde.
Somit konnte gezeigt werden, dass die Its1 DH-Domäne auch in *U. maydis* strikt Cdc42-spezifisch ist. Durch Austausch der Aminosäure an Position 56 reduzierte sich die Aktivierbarkeit von Cdc42, jedoch konnte $Rac1^{W56F}$ durch Its1-DH aktiviert werden. Diese Veränderungen der Aktivierbarkeit durch Its1 sind vergleichbar mit denen durch Don1.

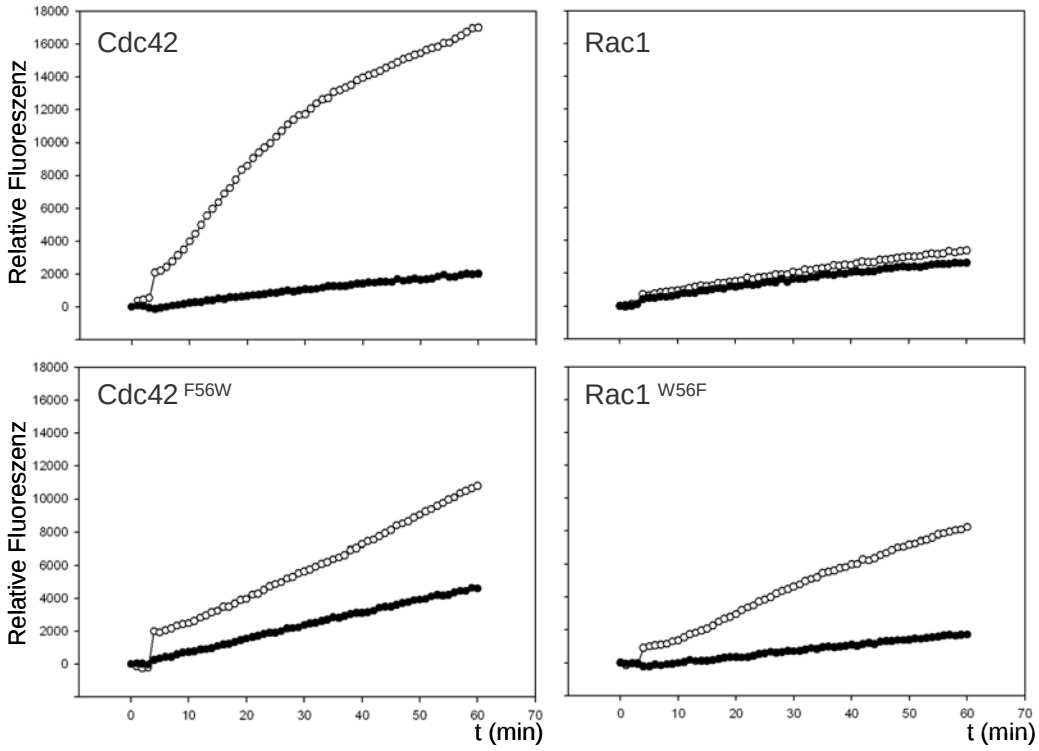


Abbildung 31: Its1 GEF-Assay. Die DH-Domäne wurde mit den verschiedenen GTPasen in Gegenwart von mant-GDP inkubiert. Über die Zunahme der Fluoreszenz kann auf die spezifische Aktivität von Intersectin-DH gegenüber der jeweiligen GTPase geschlossen werden. Gezeigt sind die Ergebnisse der GTPasen Cdc42, Rac1, Cdc42^{F56W} und Rac1^{W56F}. • stellt die Resultate der Kontrollreaktion dar, die ohne die Zugabe des GEFs erfolgten. Die Ergebnisse nach Zugabe des GEFs sind durch o gezeigt.

2.5.2 Die DH-Domäne von Its1 komplementiert die *don1*-Deletionsmutante

Vergleicht man die gemessene Aktivität der Its1 DH-Domäne mit der Aktivität der Don1 DH-Domäne gegenüber den GTPasen, so erkennt man, dass die Spezifität dieser beiden GEFs identisch ist. Beide aktivierten Cdc42, jedoch nicht Rac1. Beim Test der GTPasen mit den einzelnen Aminosäureaustauschen reduzierte sich die Aktivierbarkeit von Cdc42, während Rac1 zu geringem Ausmaß von Intersectin und Don1 aktivierbar wurde. Dadurch ergab sich die Frage, ob Intersectin in der Lage ist, den Zelltrennungsdefekt von *don1*-Mutanten zu komplementieren.

Interessanterweise komplementierten sowohl die Don1 DH-PH-Domäne als auch die DH–Domäne von Intersectin den morphologischen Phänotyp der *don1*-Mutante. Die Färbung mit Calcofluor zeigte die Bildung von Doppelsepten (Abb. 32). Umgekehrt allerdings erfolgte keine Komplementation der konditionalen *its1*-Mutante durch Expression von Don1-DH (nicht gezeigt).

Die DH-Domäne von Its1 führte somit an Stelle von Don1 zur Aktivierung von Cdc42 bei der Bildung des zweiten Septums. Allerdings muss bei der Bewertung dieses Ergebnisses beachtet werden, dass es sich hierbei um Überexpressionsanalysen handelt.

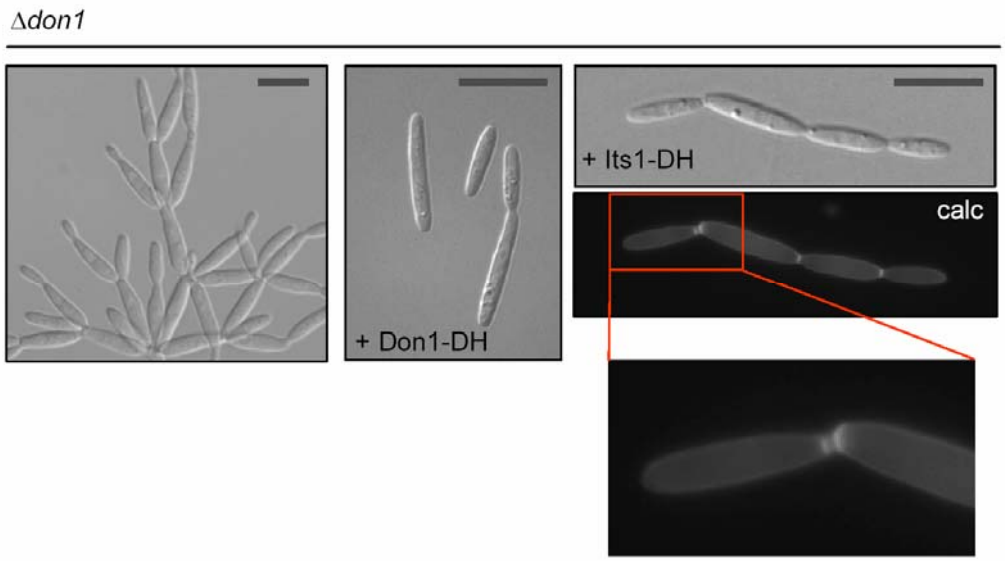


Abbildung 32: Komplementation von Δ*don1* durch die Its1 DH-Domäne. Die DH-Domäne von Its1 und die DH-PH-Domäne von Don1 wurden konstitutiv vom *etef*-Promotor exprimiert. Dies führte zur Komplementation des Zelltrennungsdefektes der *don1*-Mutante. Die Calcofluorfärbung zeigt, dass die Komplementation des Zelltrennungsdefektes der *don1*-Mutante durch die Expression von Its1-DH über die Bildung regulärer Doppelsepten erfolgt.

2.5.3 Die konditionale *its1*-Mutante

Es gibt verschiedene Hinweise, dass Intersectin an der Regulation verschiedener GTPase-Signalkaskaden beteiligt ist (Wang et al., 2005). So aktiviert Intersectin die Rho-GTPasen direkt über die DH-Domäne (Pucharcos et al., 2000; Sengar et al., 1999), interagiert aber beispielsweise auch über die SH3-Domänen mit Sos, einen GEF für Ras-GTPasen (Tong et al., 2000b). Außerdem besitzt Intersectin weitere Domänen, über die es mit einer Vielzahl weiterer regulatorischer Proteine interagiert (O'Bryan et al., 2001). Somit hat möglicherweise auch Its1 in *U. maydis* noch weitere Funktionen neben der Aktivierung von Cdc42 durch die DH-Domäne.

Um die zellulären Funktionen des Multidomänen-Proteins Its1 in *U. maydis* zu untersuchen, wurde eine konditionale *its1*-Mutante erstellt, indem der natürliche Promotor von *its1* mittels homologer Rekombination gegen den regulierbaren *crg*-Promotor ausgetauscht wurde. Unter reprimierenden Bedingungen können so die Effekte einer Depletion von Its1 und unter induzierenden Bedingungen die Effekte einer Its1-Überexpression studiert werden.

Sowohl in Wildtyp Zellen als auch in einer Δ*rac1*-Mutante konnten Transformanden erzeugt werden. Auf arabinosehaltigem Festmedium wuchsen diese Transformanden normal, unter reprimierenden Bedingungen allerdings starben sie (nicht gezeigt).

In Flüssigmedium war die Zellmorphologie unter induzierenden Bedingungen völlig unauffällig, unter reprimierenden Bedingungen rundeten sich die Zellen ab, erschienen verdickt und hatten einen Zellteilungsdefekt. Nach längerer Repression der Intersectin Expression starben die Zellen unter Ausbildung einer „erdnussförmigen“ Zellmorphologie (Abb. 33). Calcofluor Färbungen zeigten, dass es bei dieser Mutante unter reprimierenden Bedingungen zu einer abnormalen Chitindeposition kam. Es wurden keine Doppelsepten mehr gebildet, stattdessen waren zentrale Septen und leistenartige Verstärkungen der Zellwand am Äquator der Zellen nachweisbar.

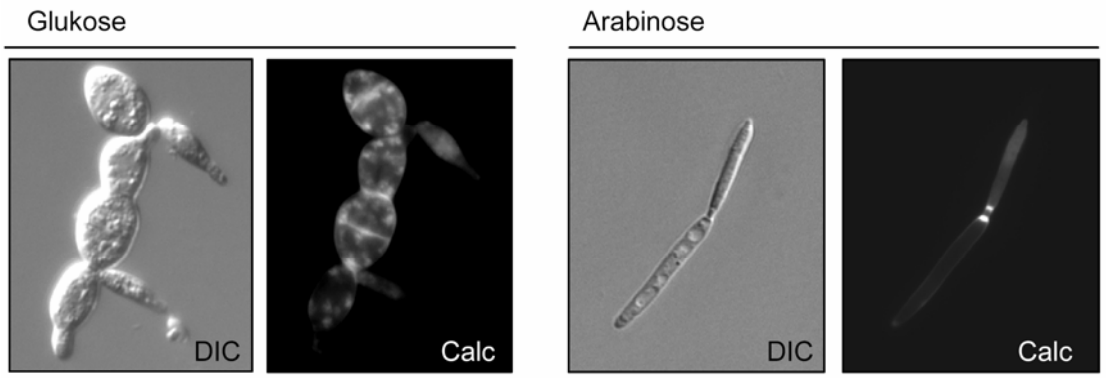


Abbildung 33: *its1*-Mutanten zeigen eine abnormale Chitindeposition. Die Repression von *its1* ist letal. Die Zellen arretieren als erdnussförmige Zellaggregate; die Calcofluorfärbung zeigt eine abnormale Ablagerung von Zellwandmaterial. Eine Überexpresion von Its1 hat keinen morphologischen Effekt; die Calcofluorfärbung zeigt die Bildung eines regulären Doppelseptums.

Über eine Färbung mit Syto11 kann die Kernverteilung nachgewiesen werden. Unter induzierenden Bedingungen war auch diese nicht verändert, jedoch zeigte die Mutante unter reprimierten Bedingungen in vielen Fällen zwei Kerne pro Zelle (Abb. 34). Dies könnte darauf hindeuten, dass in dieser Mutante die Mitose noch erfolgt, die anschließende Zytokinese jedoch beeinträchtigt ist. Allerdings ist nicht auszuschließen, dass diese im DIC Bild als eine Zelle erscheinenden Zellformen nicht noch ein durchgezogenes, zentrales Septum besitzen und somit zwei Zellen mit je einem Kern entsprechen.

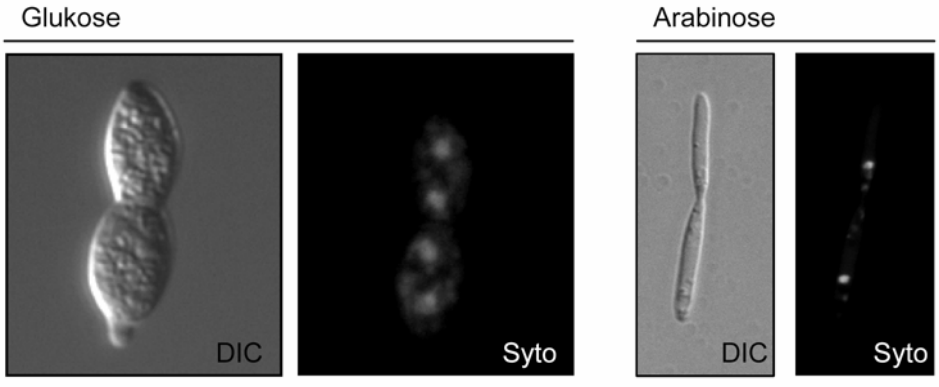


Abbildung 34: *its1*-Mutanten weisen einen Defekt in der Zytokinese auf. Die Färbung mit Syto11 zeigt bei Repression von *its1* zwei Kerne pro verdickter Zelle. Unter induzierten Bedingungen ist die Kernverteilung normal.

Da Syto11 oft auch Mitochondrien anfärbt und aufgrund gleicher Emmisionsspektren keine Doppelfärbung mit DAPI und Calcofluor möglich ist, wurde diese Mutante mit den Farbstoffen WGA und DAPI gefärbt. WGA färbt die Zellwand, während DAPI Kerne anfärbt. Da die Intersectinmutante eine Verdickung der Zellwände aufwies, konnte leider keine sehr gleichmäßige WGA Färbung erzielt werden. Dennoch wurde an einigen Stellen deutlich, dass die Zellen kein zentrales Septum und trotzdem zwei Kerne besaßen (Abb. 35).

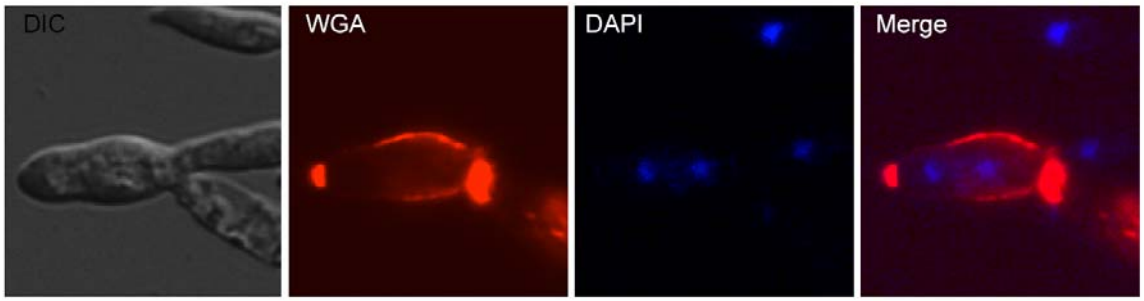


Abbildung 35: Doppelfärbung der konditionalen Its1-Mutante mit WGA und DAPI. DAPI färbt die Kerne (blau), WGA färbt die Zellwand (rot). Im Merge ist zu erkennen, dass bei Repression von Intersectin in einigen der verdickten Zellen zwei Kerne vorliegen, die nicht durch ein Septum voneinander getrennt sind.

2.5.4 Its1 als Regulator von Endozytose und Vakuolenfusion

In Säugetieren interagiert Intersectin über multiple Protein-Binde-Domänen mit verschiedenen Proteinen, die an der Regulation der Endozytose oder der Aktinzytoskelettreorganisation beteiligt sind. Dadurch wird Intersectin zu einem wichtigen Protein, das die Prozesse der Aktinpolymerisierung und der Endozytose verknüpft (Lanzetti, 2007; Qualmann and Kessels, 2002; Schafer, 2002).

Deswegen wurde nun die Endozytose der konditionale *its1*-Mutante in *U. maydis* untersucht. FM4-64 ist ein lipophiler Farbstoff, mit dem in einem „pulse chase" Experiment endozytotische Prozesse von der Membraneinstülpung, über die Vesikelabschnürung bis zum Transport früher Endosomen hin zur Vakuole, verfolgt werden können (Vida and Emr, 1995). In Wildtypzellen wird nach einem Zeitraum von ca. 45 Minuten schließlich die gesamte Vakuolenmembran angefärbt. Parallel wurde das Lumen der Vakuolen mit CMAC angefärbt. Dieser auf Cumarin basierende Farbstoff fluoresziert in saurem Milieu und macht daher selektiv die Vakuole sichtbar (Stefan and Blumer, 1999; Stewart and Deacon, 1995). Bei Wildtypzellen erkannte man die intakten Lumina der Vakuolen (grün), klar umgeben von der gefärbten Vakuolenmembran (rot) (Abb. 36).

Die Repression der *its1*-Expression führte zu einem starken Defekt der endozytotischen Prozesse und zu einem Defekt in der Vakuolenmorphologie. Große, intakte Vakuolen waren gar nicht mehr detektierbar. In einigen Zellen konnte man mit CMAC fragmentierte Vakuolen nachweisen, allerdings ließen sich die Membranen nicht mehr mit FM4-64 anfärben. Andere Zellen ließen sich umgekehrt nicht mit CMAC anfärben, dies spricht für die Abwesenheit von Vakuolen mit erniedrigtem pH-Wert. Diese Zellen waren mit FM4-64 anfärbbar, allerdings erfolgte kein Membrantransport von der Zytoplasmamembran zur Vakuolenmembran.

Bei der Überexpression von Its1 konnten mit CMAC intakte Vakuolen angefärbt werden, die leicht vergrößert waren. Die endozytotischen Prozesse scheinen weitestgehend unbeeinträchtigt zu sein, die FM4-64 Färbung zeigte eine intakte Vakuolenmembran.

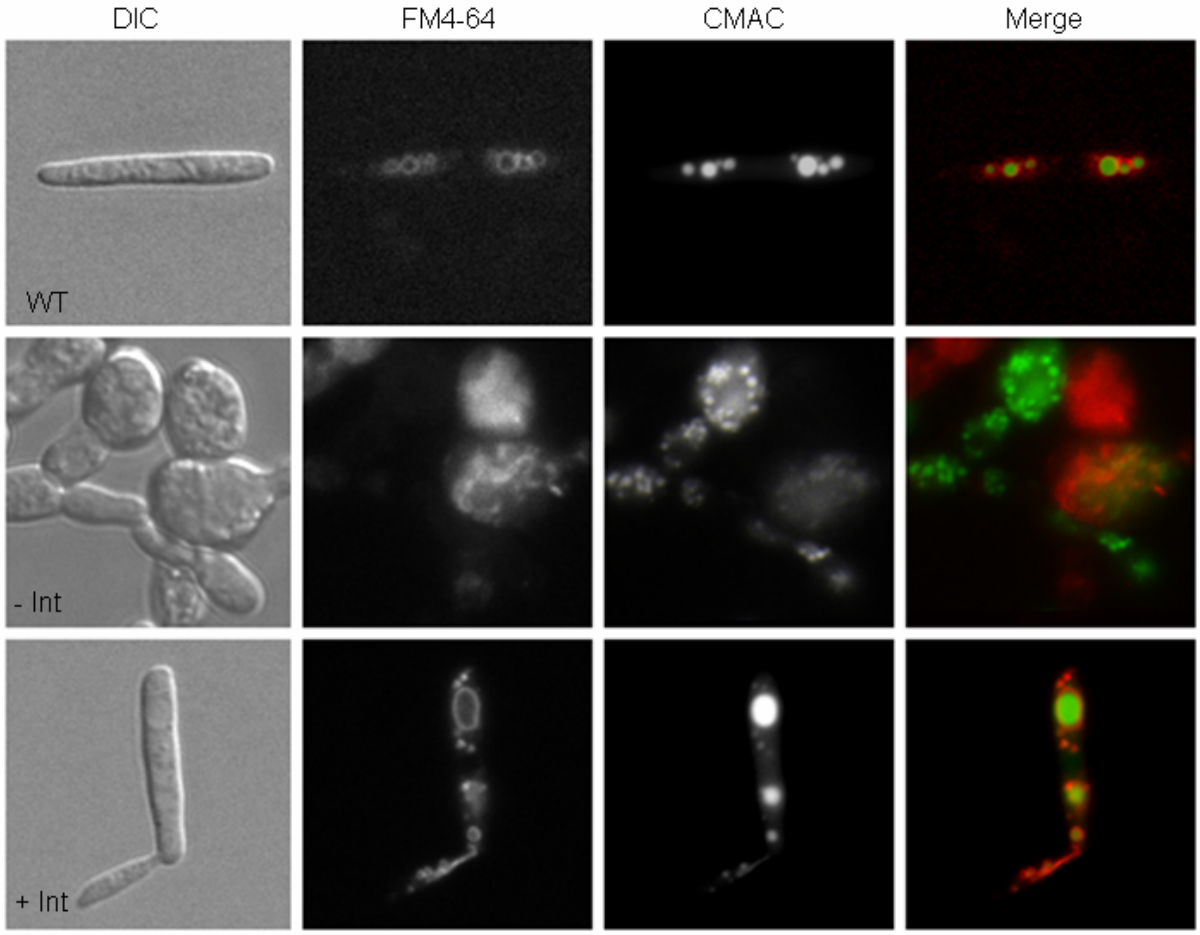


Abbildung 36: Einfluss von Its1 auf die Endozytose und die Vakuolenfusion. Wildtypzellen und die konditionale Its1-Mutante unter induzierten und unter reprimierten Bedingungen wurden mit CellTracker blue (CMAC) und FM4-64 gefärbt. Nach 60 Minuten ist in Wildtypzellen die Vakuolenmembran von FM4-64 gefärbt und umgibt das mit CMAC angefärbte Lumen der Vakuole. Unter reprimierenden Bedingungen zeigt die Its1-Mutante einen starken Endozytose- und Vakuolendefekt. Einige Zellen besitzen stark fragmentierte Vakuolen, lassen sich aber nicht mehr mit FM4-64 anfärben. In anderen Zellen lassen sich mit CMAC keine Vakuolen nachweisen, hier zeigt die FM4-64 Färbung eine frühe Blockade der endozytotischen Prozesse. Überexpression von Its1 führt zur Bildung intakter, aber etwas vergrößerter Vakuolen. Zusätzlich lassen sich kleinere endozytotische Vesikel mit FM4-64 anfärben, deren Lumen aber nicht durch CMAC anfärbbar ist.

Für Δ*rac1*-Mutanten wurde bereits beschrieben, dass sich neben den großen Vakuolen auch viele kleinere, mit CMAC anfärbbare Vesikel finden (Mahlert, Dissertation). Sowohl die Vakuolenmorphologie als auch die Fusion endozytotischer Vesikel mit der Vakuole sind in dieser Mutante gestört. Um zu untersuchen, ob Rac1 und Its1 in einem gemeinsamen Signalweg die Endozytose regulieren, wurde in einem *rac1*-Deletionshintergrund eine konditionale *its1*-Mutante erstellt.

Im Hintergrund einer *rac1*-Deletion zeigte die Repression von *its1* einen ähnlichen Phänotyp wie im Wildtyphintergrund. In den Zellen waren Strukturen entweder nur mit CMAC oder nur mit FM4-64 anfärbbar (Abb. 37). Interessanterweise führte die *its1*-Überexpression zur Komplementation der endozytotischen Defekte der Δ*rac1*-Mutante. Es konnte die Bildung normaler Vakuolen gezeigt werden, die sowohl mit CMAC als auch mit FM4-64 gefärbt werden konnten, was für eine Komplementation des Vakuolenfusiondefektes dieser Mutante spricht.

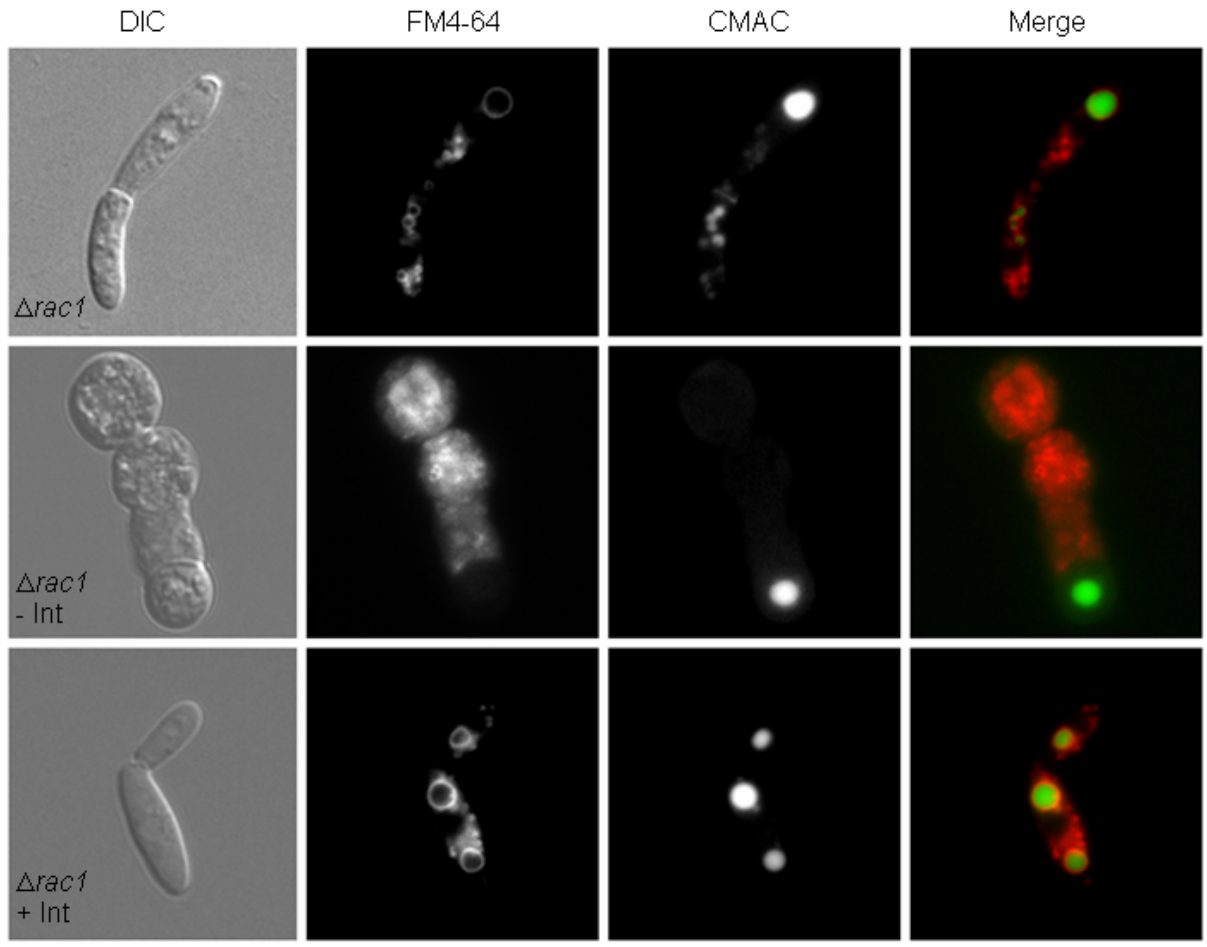


Abbildung 37: Überexpression von Its1 komplementiert den Defekt der Vakuolenfusion einer Δ*rac1*-Mutante. Eine konditionale Its1-Mutante in einem *rac1*-Deletionshintergrund wurde unter induzierenden und unter reprimierenden Bedingungen mit CellTracker blue (CMAC) und FM4-64 gefärbt. Rac1-Deletionsmutanten haben teilweise intakte Vakuolen, allerdings finden sich auch immer fragmentierte Vakuolen, die sich sowohl mit FM4-64 als auch mit CMAC anfärben lassen. Durch Überexpression von Its1 können diese endozytotischen Vesikel mit der Vakuole fusionieren. Wie auch bei der Überexpression von Its1 in Wildtyp Zellen, finden sich hier FM4-64, aber nicht CMAC anfärbbare Strukturen.

Somit hatte die Überexpression von Its1 keinen Effekt auf die endozytotischen Prozesse. Die Repression führte allerdings zu einem starken Endozytosedefekt und stark fragmentierten Vakuolen. Interessanterweise wurde der Vakuolendefekt einer *rac1*-Deletionsmutante durch die Überexpression von Its1 komplementiert. Da Rac1 und Cdc42 bei der Regulation der Endozytose teilweise redundante Funktionen haben (Mahlert, Dissertation), könnte es sein, dass es durch eine erhöhte Its1-Konzentration lokal zu einer starken Aktivierung von Cdc42 kommt, welches dann die Rac1-Funktionen bei der Endozytose vollständig übernimmt.

2.5.5 *U. maydis* exprimiert verschiedene Isoformen von Its1 durch Nutzung alternativer Polyadenylierungsstellen

Für verschiedene höhere Organismen ist bekannt, dass unterschiedliche Isoformen von Intersectin existieren, die durch alternative Spleißvorgänge gebildet werden. Da dieses Protein zwischen verschiedenen Organismen hoch konserviert ist, und auch die Domänenorganisation zwischen Its1 und den humanen Varianten identisch ist, sollte untersucht werden, ob auch bei *U. maydis* verschiedene Transkripte des *its1*-Gens zu identifizieren sind.

Es ist besonders auffällig, dass die Introns so organisiert sind, dass in beiden Fällen durch Erhalt des Introns die Translation direkt in ein Stop Codon laufen würde. Dies würde dazu führen, dass die Transkription entweder exakt nach der ersten, bzw. der zweiten SH3 Domäne stoppen würde. Im zweiten Intron konnte über ESTs eine alternative Polyadenylierungsstelle identifiziert werden (Abb.38).

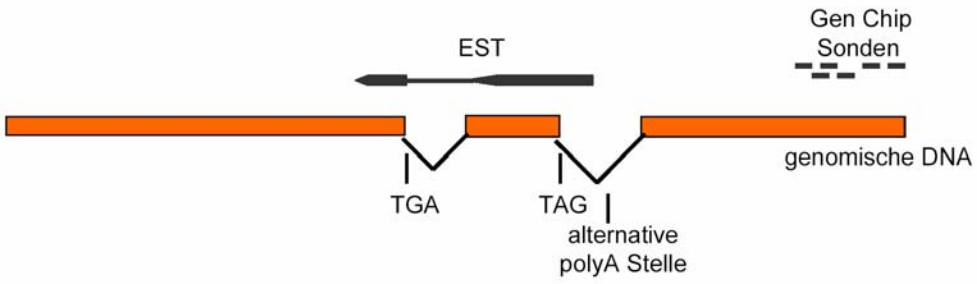


Abbildung 38: Das *its1*-Gen in *U. maydis*. ESTs bestätigen die Existenz des ersten Introns, aber auch die Existenz einer mRNA mit Sequenzen des zweiten Introns. Sonden für Microarrays liegen nur am C-Terminus der langen Variante.

Wird diese alternative Polyadenylierungsstelle genutzt, kommt es zu einer verkürzten mRNA, deren Produkten das DH-PH-Tandem fehlt. Solch verkürzte Transkripte entsprächen der humanen ITSN-S Isoform, bzw. dem Hefehomolog Pan1 oder dem Homolog in *D. melanogaster*, welche keine DH-Domäne besitzen (vgl. Abb. 7).
Im 3' Bereich des Gens finden sich keine ESTs, die die Existenz einer vollständig gespleißten mRNA und somit einer langen Intersectinform mitsamt DH-PH-Tandemdomäne bestätigen würden.

Um die Existenz verschiedener mRNA Spezies nachzuweisen, wurde zuerst ein Northern Blot durchgeführt. Die zu detektierenden, erwarteten mRNA Größen entsprechen den rRNA Größen, weswegen zuerst eine polyA mRNA Aufreinigung durchgeführt wurde. Leider war es nicht möglich, *its1*-Transkripte mit entsprechenden Sonden im Northern Blot nachzuweisen. Dies liegt möglicherweise an der geringen Expressionsstärke die für die lange Isoform bereits durch „micro array"-Daten bestätigt wurde (Mahlert, Bauer, persönl. Mitteilung).
Aus diesem Grund wurde zum Nachweis der Existenz verschiedener mRNA-Spezies eine „quantitative real time"-PCR durchgeführt. Dies erlaubt auch Aussagen über die relativen Mengenverhältnisse der einzelnen Isoformen zu treffen.
Mithilfe des Computerprogramms „Primer Express" wurden geeignete Primer ermittelt. Dabei detektiert das Primerpaar P3 die längste mRNA Form, die durch vollständiges Spleißen entsteht und für das vollängen Protein Its1-L (long) kodiert. Das Primerpaar P2 weist die zweite Exon-Intron Grenze und somit eine mRNA nach, die für die Form Its1-S (short) mit zwei SH3 Domänen kodiert (Abb. 39). Entsprechend detektiert das Primerpaar P1 das Vorhandensein der ersten Exon-Intron Grenze und somit einer mRNA, die zur Bildung der verkürzten Intersectin Form mit nur einer SH3-Domäne führt. Als Kontrolle der Verdünnungsreihen wurde ein bereits für *U. maydis* getestetes Primerpaar genutzt, welches die konstitutiv exprimierte mRNA einer Untereinheit des Translationsinitiationsfaktors eIF-2B detektiert (Kämper, pers Mitteilung). Ein letztes Primerpaar, das ausschließlich nicht transkribierte Bereiche amplifiziert, diente zur Detektion von DNA Kontaminationen und somit als Negativkontrolle.

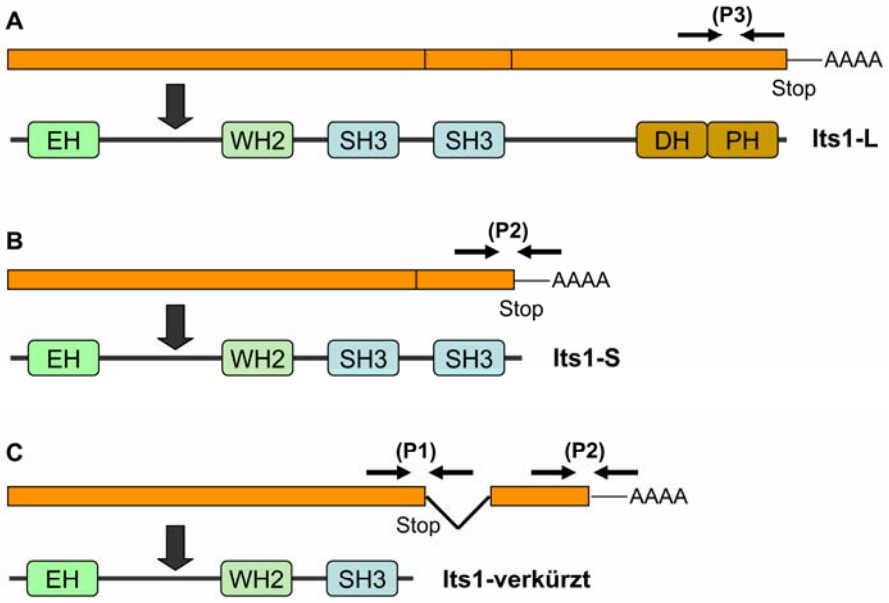


Abbildung 39: Schematische Darstellung der unterschiedlichen Intersectin Isoformen und der für die „quantitative real time"-PCR verwendeten Primerkombinationen. A) Die mRNA ist vollständig gespleißt, die lange Isoform wird gebildet. Die vollständig gespleißte mRNA kann mit Primerkombination 3 nachgewiesen werden. **B)** Wird nur das erste Intron herausgespleißt, entsteht eine mRNA, von der die kurze Isoform translatiert wird. Diese mRNA gibt für die Primerkombination 2 ein Signal. **C)** Wird keines der Introns herausgespleißt, so kommt es im ersten Intron zum Translationsstop und eine verkürzte Its1 Form wird gebildet. Die entsprechende mRNA ist mit Primerkombination 1 und 2 nachweisbar.

Der Vorteil einer quantitativen real time PCR ist, dass auch sehr geringe Transkriptmengen nachgewiesen werden können, und außerdem die Messung während der exponentiellen Phase der PCR erfolgt. Dies führt zu einer wesentlich größeren Genauigkeit, als sie durch so genannte „Endpunkt-Methoden" erreicht werden kann. Über eine Verdünnungsreihe von genomischer DNA definierter Konzentration wurde für jedes Primerpaar und für jede Verdünnungsstufe der so genannte Ct-Wert (Threshold-cycle = „Schwellenwertzyklus") bestimmt. Dieser beschreibt denjenigen PCR Zyklus, an dem die Fluoreszenz erstmalig signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt. Trägt man die so erhaltenen Ct-Werte gegen den Logarithmus der Ausgangskonzentration auf, erhält man eine Standartkurve. Durch Interpolation des erhaltenen Ct-Werts einer Probe mit unbekannter Konzentration in diese Ausgleichskurve kann die Ausgangskonzentration der amplifizierten Sequenz bestimmt werden. Zur relativen Quantifizierung der zu testenden Probe nach der Methode von Pfaffl (Pfaffl, 2001), kann aus der Steigung der Kurve die Effizienz der PCR-Reaktion berechnet werden und über verschiedene mathematische Modelle die relative

Ausgangskonzentration der amplifizierten Sequenz in der Probe bestimmt werden (Pfaffl, 2001; Tichopad et al., 2003).
Mittels dieser Methode konnte gezeigt werden, dass in *U. maydis* tatsächlich verschiedene Isoformen von Its1 existieren. Für die mRNA Spezies der verkürzten Isoform wurde die geringste Konzentration nachgewiesen. Die mRNA Spezies für Its1-L war ca. 10-fach häufiger vorhanden, während die mRNA Spezies für Its1-S ca. 40-mal häufiger als die verkürzte Form nachweisbar war.

So konnte die Existenz aller drei mRNA Formen nachgewiesen werden. Durch Nutzung einer alternativen Polyadenylierungsstelle innerhalb des zweiten Introns wird eine verkürzte mRNA gebildet. Abhängig davon, ob das erste Intron herausgespleißt wird, wird entweder eine verkürzte Its1 Form oder Its1-S gebildet. Dabei ist der Anteil der mRNA für die verkürzte Form zu vernachlässigen, es ist nicht auszuschließen, dass es sich hierbei um geringe Anteile noch nicht gespleißter prä-mRNA handelt. In haploiden Zellen war die mRNA für Its1-S 4 mal häufiger nachzuweisen als die mRNA für Its1-L.

2.6 Rdi1 und polares Wachstum

Bereits während meiner Diplomarbeit konnte ich über einen Genomvergleich ein potentielles RhoGDI-Homolog in *U. maydis* identifizieren. Die Deletion des entsprechenden Gens *rdi1* wies jedoch augenscheinlich keinen auffälligen Phänotyp auf. Weder Zellmorphologie, noch Septenbildung oder Kernverteilung sind verändert. Auch lässt sich kein Defekt in der Kreuzung mit kompatiblen Partnern oder bei der Pflanzeninfektion und der Tumorinduktion feststellen. Durch Überexpression von Rdi1 unter der Kontrolle des *crg*-Promotors kam es zu einem Δ*rac1*-ähnliche Abrunden der Zellen. Sie bilden zentrale Mittelsepten statt Knospen mit Doppelsepten. Längere Überexpression ist letal, die Zellen arretieren als Hantel- förmige Strukturen. Dies deutet darauf hin, dass Rdi1 als negativer Regulator von Cdc42 und Rac1 fungiert. Jedoch war die Funktion von Rdi1 unter natürlichen Bedingungen immer noch unklar, da eine Deletion keinerlei Effekte zu haben scheint.
Um den Einfluss von Rdi1 auf die spezifischen Effekte der GTPase-Signalkaskaden genauer zu untersuchen, sollte der Effekt einer *rdi1*-Deletion auf das polare Wachstum von *U. maydis* analysiert werden.

2.6.1 Einfluss von Rdi1 auf die durch Rac1- und Cdc24-induzierte Filamentbildung

Um eine mögliche Beteiligung von Rdi1 an der Polaritätsentwicklung zu untersuchen, wurden die Effekte einer *rdi1*-Deletion in einem *cdc24*- und *rac1*-Überexpressionsstamm untersucht. Dazu wurde in den konditionalen *rac1*- und *cdc24*-Mutanten der Leserahmen von *rdi1* deletiert. So konnten die Effekte der Überexpression von Rac1 und Cdc24 auf die Polarität in Abwesenheit des negativen Regulators Rdi1 untersucht werden.
Sowohl bei der Überexpression von Rac1 als auch bei der Überexpression von Cdc24 kam es zur Ausbildung langer Filamente. Wurde in diesen Stämmen jedoch *rdi1* deletiert, konnte keine Filamentbildung mehr beobachtet werden (Abb. 40). Die Überexpression von Rac1 hatte keinerlei morphologische Effekte, die Zellen sahen aus wie Wildtypzellen. Die Überexpression von Cdc24 im Δ*rdi*-Hintergrund bewirkte allerdings eine veränderte Zellmorphologie. Die Zellen waren leicht verdickt, es waren Ansätze von Filamenten zu beobachten, die jedoch nicht weiter auswuchsen.

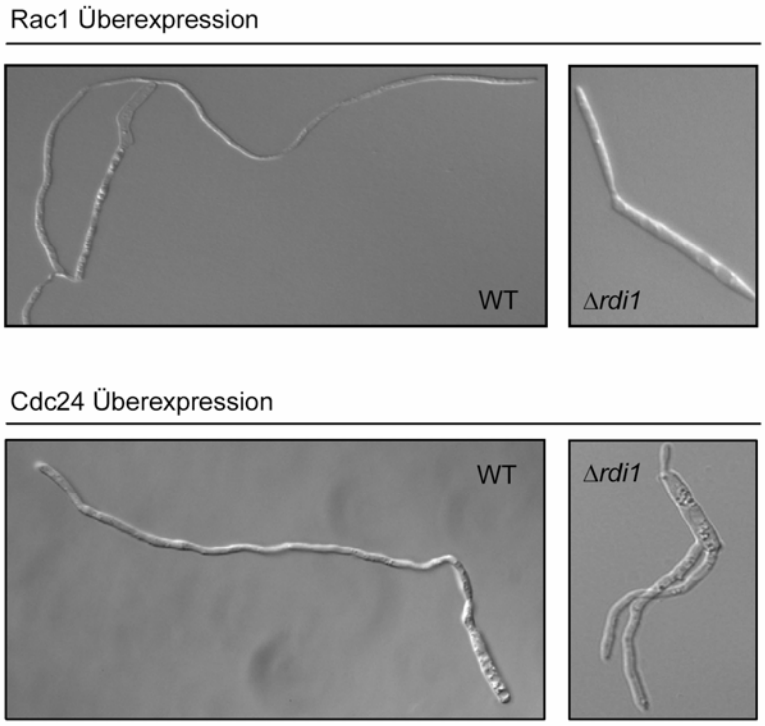


Abbildung 40: Überexpression von Cdc24 und Rac1 in einer *rdi1*-Deletionsmutante. Überexpression von Rac1 und Cdc24 führt zur Bildung langer Filamente. Wird in diesen Stämmen Rdi1 deletiert, führt das zu einer Blockade der Filamentbildung. Die Überexpression von *cdc24* in Abwesenheit von Rdi1 resultiert in einer abnormalen Zellmorphologie.

Somit scheint Rdi1 einen Einfluss auf die Rac1-abhängige Filamentbildung zu haben. Nur in Gegenwart des Guaninnukleotid-Dissoziations-Inhibitors Rdi1 konnte Filamentbildung durch Rac1-, bzw. Cdc24-Überexpression beobachtet werden.

2.6.2 Einfluss von Rdi1 auf die Bildung des Ras1-abhängigen Filaments

In *U. maydis* führt die Überexpression von Ras1, ebenso wie die von Rac1, zur Filamentbildung (Mahlert et al., 2006). Für verschiedene pilzliche Organismen ist bekannt, dass Ras-Proteine häufig in Signalwegen einzuordnen sind, die zur Aktivierung von Cdc42 oder Rac1 führen. Des Weiteren sind enge Beziehungen zwischen den Effekten der Ras-Proteine und der Proteine der Rho/Rac-Familie beschrieben (Boyce et al., 2005; Chen and Dickman, 2004; Vallim et al., 2005).

Um den Effekt einer *rdi1*-Deletion und darüber genauer die Zusammenhänge der Interaktion zwischen den GTPasen Ras1 und Rac1 zu untersuchen, wurde in einer Ras1-Überexpressionsmutante *rdi1* deletiert. Die Ras1-induzierte Filamentbildung wurde ebenfalls durch die Deletion von *rdi1* blockiert. Die Zellen zeigten einen leicht verdickten Habitus; an den Zellpolen bildeten sich kürzere Zellfortsätze, die jedoch nie die Länge eines Filaments erreichten (Abb. 41). Anscheinend ist für die Ras1-abhängige Filamentbildung ebenfalls die Anwesenheit von Rdi1 notwendig.

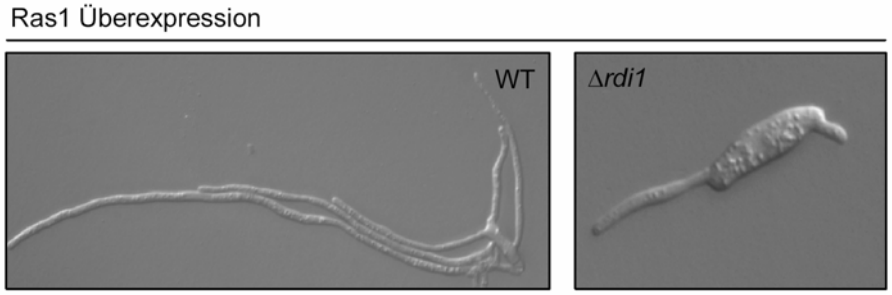


Abbildung 41: Effekte von Rdi1 auf die Ras1-induzierte Filamentbildung. Die Überexpression von Ras1 führt zur Ausbildung langer Filamente, die dem Rac1- oder dem *b*-iduzierten Filament ähneln. Deletiert man in diesem Stamm *rdi1*, so kommt es nicht mehr zur Filamentbildung durch Überexpression von Ras1.

2.6.3 Die Rolle von Rdi1 bei der *b*-induzierten Filamentbildung

Das Rac1-induzierte Filament ähnelt sehr dem dikaryotischen, *b*-induzierten Filament. Diese durch *b*-induzierte Filamentbildung ist Rac1-abhängig und erfolgt nicht in einer Δ*rac1*-Mutante (Mahlert et al., 2006). Um zu untersuchen, ob Rdi1 eine regulatorische Rolle bei der *b*-abhängigen Filamentinduktion hat, wurde eine *rdi1*-Deletionsmutante im Stamm AB31 erstellt. Der Stamm AB31 trägt ein aktives bW2/bE1-Heterodimer unter Kontrolle des *crg*-Promotors (Brachmann et al., 2001). Unter induzierenden Bedingungen wächst dieser Stamm filamentös, da der dikaryotische Zustand künstlich simuliert wird. Auch in diesem Stamm wurde *rdi1* deletiert.

Interessanterweise interferierte die Deletion von *rdi1* nicht mit der *b*-induzierten Filamentbildung (Abb. 42). Dies war überraschend, da die Bildung des *b*-Filaments Rac1-abhängig ist, die *rdi1*-Deletion aber die Filamentbildung durch Rac1-Überexpression verhinderte.

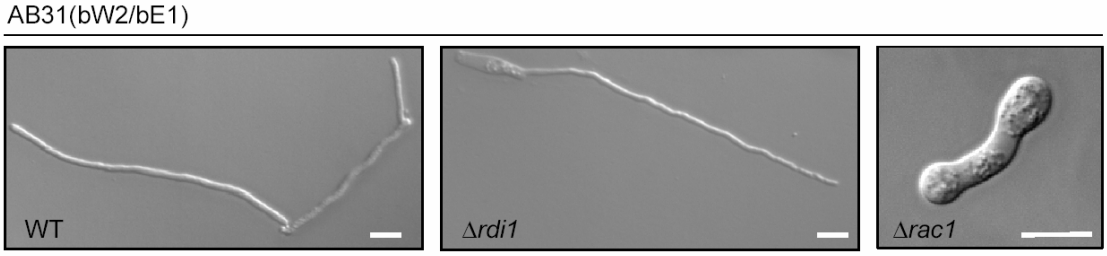


Abbildung 42: Einfluss von Rdi1 auf das *b*-abhängige Filament. Durch Expression eines aktiven *b*-Heterodimers wird der dikaryotische Zustand simuliert und es kommt zur Ausbildung eines Filaments. Dieser Vorgang ist Rac1 abhängig, eine *rac1*-Deletionsmutante kann kein *b*-Filament bilden. Die Deletion von *rdi1* hat allerdings keinen negativen Effekt auf das *b*-induzierte Filament.

Interessanterweise scheint die *rdi1*-Deletion keinen Effekt auf das *b*-induzierte Filament zu haben, obwohl das *b*-Filament Rac1-abhängig ist und die *rdi1*-Deletion die Filamentbildung durch Rac1-Überexpression verhindert.

3. Diskussion

Die kleinen GTPasen Cdc42 und Rac1 sind zentrale Schalter innerhalb komplex vernetzter Signalkaskaden. In dieser Arbeit wurde mit Hilfe verschiedener chimärer Konstrukte aus Rac1 und Cdc42 untersucht, welche Bereiche der GTPasen verantwortlich für die spezifische Aktivierung nachgeschalteter Signalweiterleitung und damit auch für ihre unterschiedlichen zellulären Funktionen sind.

Die Arbeiten zeigten, dass ein Bereich von 15 Aminosäuren und dabei besonders die Position 56 für die spezifische Erkennung der GTPasen durch die GEFs wichtig ist. Aufgrund der *in vivo* und *in vitro* Daten konnte gezeigt werden, dass nicht so sehr die Interaktion der GTPasen mit Effektoren, sondern die Aktivierung durch einen spezifischen GEF die zelluläre Antwort bestimmt.

Daraufhin wurden auch die GEFs Cdc24 und Intersectin sowohl hinsichtlich ihrer Spezifität gegenüber den GTPasen als auch auf ihre zellulären Funktionen hin untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass in *U. maydis* sowohl Cdc24 als auch Intersectin essentielle Proteine sind, wobei bei Intersectin vermutlich nicht die GEF-Aktivität die essentielle Funktion ausmacht. Während Cdc24 ein Rac1-spezifischer GEF ist, konnte für die katalytische Domäne von Intersectin Cdc42-Spezifität gezeigt werden. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass Intersectin zwei verschiedene Polyadenylierungsstellen besitzt, die zur Bildung einer langen und einer kurzen Isoform führen, von denen nur die lange Form die GEF-Domäne enthält.

Zusammenfassend tragen die erhaltenen Ergebnisse entscheidend zum Verständnis der Spezifitätsbestimmung der GTPase-Signalwege in *U. maydis* bei. Es lässt sich ein Modell entwickeln, wie in verschiedenen Signalkaskaden teilweise identische Komponenten genutzt werden und dennoch eine spezifische Zellantwort garantiert ist.

3.1 Bestimmung der Signalspezifität von Cdc42 und Rac1

In *U. maydis* induziert die Überexpression von Rac1 die Bildung von langen Filamenten, während die Überexpression von Cdc42 zu keinem morphologischen Effekt führt. Ebenso unterscheiden sich die Deletionsphänotypen vollständig voneinander (Mahlert et al., 2006). Daraus ergibt sich die Frage, wie die Spezifität dieser ähnlichen Proteine gewährleistet wird, um solch unterschiedliche Zellantworten induzieren zu können.

In vielen Organismen ist die Zahl an beschriebenen Effektoren wesentlich größer, als die Zahl der Rho-GTPasen selbst. Einzelne GTPasen interagieren also mit mehreren Effektoren, umgekehrt werden einige Effektoren aber auch von mehr als einer GTPase aktiviert (Bishop and Hall, 2000; Bustelo *et al.*, 2007; Van Aelst and D'Souza-Schorey, 1997). Die Experimente dieser Arbeit waren darauf ausgerichtet, die strukturellen Elemente zu bestimmen, die die Signalspezifität der GTPasen determinieren. Bisher wurde vermutet, dass der spezifischen Interaktion der GTPasen mit Effektoren dabei eine wichtige Rolle zukommt. So wurden die CRIB-Domäne auf Seite der Effektoren, und die so genannte Effektor-Domäne auf Seite der GTPasen als wichtige Interaktionspunkte beschrieben (Abdul-Manan et al., 1999; Mott et al., 1999). Strukturuntersuchungen zeigen, dass die Interaktion zwischen Cdc42 und dem Effektor WASP über die Switch I-Region von Cdc42 erfolgt, die die Aminosäuren von Position 30 bis 40 umfasst (Wittinghofer and Nassar, 1996).

Es ist jedoch unwahrscheinlich, dass die Diskriminierung zwischen Cdc42 und Rac1 über die Switch I-Region erfolgt, da diese zwischen diesen beiden GTPasen nahezu identisch ist. Auch in *S. cerevisiae* haben die Rho-Proteine verschiedene Funktionen im Knospungsprozess, obwohl die Sequenzen der Switch I-Region teilweise vollständig identisch sind (Kozminski et al., 2000). Tatsächlich führten einzelne Punktmutationen innerhalb dieser Region zur generellen Störung aller GTPase-Effektor Interaktionen (Owen et al., 2000). Somit wurde vermutet, dass weitere Interaktionsstellen zwischen GTPase und Effektor existieren, über welche die Spezifität der Interaktion gewährleistet wird.

Eingrenzung einer Spezifitätsdomäne der GTPasen Cdc42 und Rac1

In dieser Arbeit konnte über die Analyse chimärer GTPasen aus *Um*Cdc42 und *Um*Rac1 gezeigt werden, dass der Bereich zwischen Aminosäure 41 und 56 die unterschiedlichen zellulären Effekte der GTPasen bestimmt. Sowohl für die Komplementation von *cdc42*- und *rac1*-Mutanten in *U. maydis*, als auch für die Komplementation von *cdc42*-Deletionsmutanten in *S. cerevisiae* konnte mittels Domänenaustausch-Konstrukten gezeigt werden, dass dieser Bereich notwendig und ausreichend für die Spezifitätsbestimmung der GTPasen ist.
Interessanterweise sind diese Resultate vergleichbar mit Ergebnissen von „gain of function" Analysen, die zeigen, dass der Austausch von 7 Aminosäuren in Rac1 die Bindung des Cdc42-spezifischen Effektor ACK bewirkt. Von diesen 7 Aminosäuren liegen 6 innerhalb des in dieser Arbeit als spezifitätsbestimmend gefundenen Bereichs (Elliot-Smith et al., 2005).
Eine Reihe weiterer Studien zeigt vergleichbare Ergebnisse für andere Rho-GTPasen. So konnte bei der Analyse chimärer GTPasen bestehend aus Sequenzen von Cdc42 und TC10 eine Region zwischen Switch I und Switch II als spezifitätsbestimmend für die Bindung an den Effektor ACK identifiziert werden (Gu et al., 2004). Diese Region deckt sich genau mit der in dieser Arbeit gefundenen Region 41-56. Entsprechende Ergebnisse wurden auch bei der Analyse von chimären GTPasen aus RhoA- und Cdc42-Sequenzen in Säugerzellen beschrieben (Li et al., 1999).
Dass die Region zwischen Aminosäure 41 und 56 auch für GTPasen anderer Organismen als spezifitätsbestimender Bereich identifiziert wurde, weist auf einen konservierten Mechanismus hin.

Um den Bereich zwischen Aminosäure 41 und 56 noch genauer zu analysieren, wurden in dieser Arbeit noch weitere chimären Konstrukte erstellt, bei denen dieser Bereich noch weiter eingegrenzt wurde. Diese Konstrukte wurden sowohl in *U. maydis* auf die Komplementation des Zelltrennungsdefektes der Δ*cdc42*-Mutante als auch in *S. cerevisiae* auf die Komplementation des letalen Effektes einer *cdc42*-Deletionsmutante getestet. Die erhaltenen Ergebnisse sind schematisch in Abbildung 43 zusammengefasst.
Zur besseren Übersicht sind die Konstrukte nach abnehmendem Anteil an Cdc42-Sequenz angeordnet. Im oberen Teil weisen alle Konstrukte ein Phenylalanin an Position 56 auf.

Interessanterweise kann man in *U. maydis* die Cdc42 Sequenz bis auf dieses Phenylalanin reduzieren. Dadurch erhält man die GTPase Rac1^{W56F}, welche mit dem einzelnen Aminosäureaustausch an Position 56 den Zelltrennungsdefekt der Δ*cdc42*-Mutante komplementiert. Die Konstrukte im unteren Teil besitzen alle ein Tryptophan an Position 56, welches es auch in Rac1 vorkommt. Nur wenn die Konstrukte mindestens im Bereich zwischen Aminosäure 41 und 45 und zusätzlichen N- und C-terminalen Bereichen aus Cdc42 Sequenz bestehen, hat dies keinen negativen Einfluss auf die Cdc42-Funktion in *U. maydis*.

Die Komplementationsmuster der beiden Konstrukte $RC_{46-56}R$ und $CR_{46-56}C$ unterscheiden sich zwischen *U. maydis* und *S. cerevisiae*. In Hefe ist die Aminosäuresequenz von Position 46 bis 56 notwendig, jedoch im Rac1-Kontext nicht ausreichend, um die *cdc42*-Deletion zu komplementieren. Die Komplementationsergebnisse der GTPasen Cdc42^{F56W} und Rac1^{W56F} unterscheiden sich ebenfalls. Während in *U. maydis* sowohl Rac1^{W56F} als auch Cdc42^{F56W} die *cdc42*-Deletionsmutante komplementieren, hat dieser einzelne Aminosäureaustausch keinen Effekt auf die Komplementationseigenschaften der *cdc42*-Mutante in *S. cerevisiae*. Diese Unterschiede sind ein Hinweis darauf, dass die Spezifititätsdetermination in *U. maydis* und *S. cerevisiae* auf unterschiedliche Weisen erfolgt.

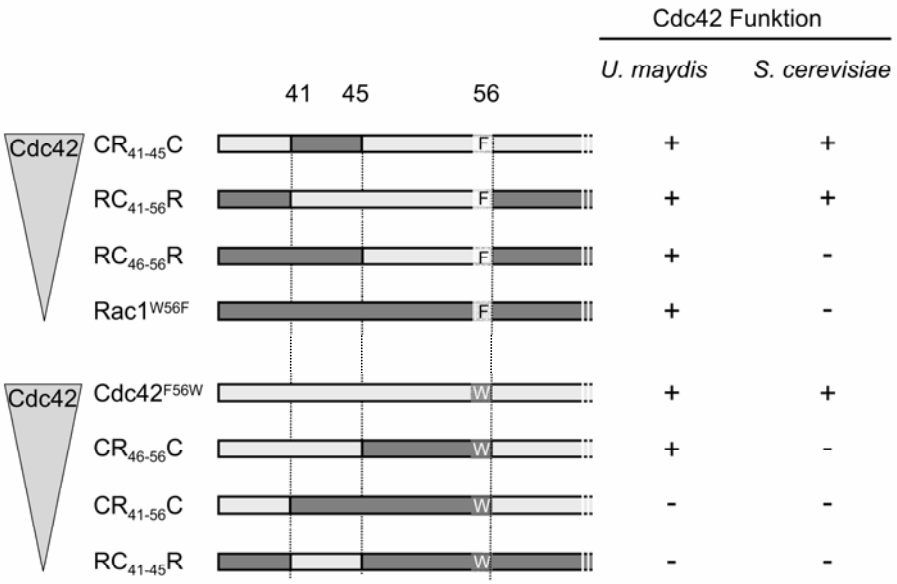


Abbildung 43: Die chimären Konstrukte zur Feinkartierung zeigen Unterschiede in der Komplementation der *cdc42*-Deletionen in *U. maydis* und *S. cerevisiae*. Die Ergebnisse der Komplementationsanalysen der chimären GTPasen sind zusammengefasst. Im ersten Block sind alle chimären Proteine mit einem Phenylalanin, im zweiten Block alle mit einem Tryptophan an Position 56 dargestellt. Die Anteile der Cdc42 Sequenz nehmen jeweils von oben nach unten ab. +, bzw. – steht für ihre Fähigkeit, die *cdc42*-Mutanten in *S. cerevisiae* und *U. maydis* zu komplementieren.

Eine Ursache für diese voneinander abweichenden Komplementationsergebnisse ist, dass die chimären GTPasen in *S. cerevisiae* auf die essentielle Funktion von Cdc42 getestet wurden, während sie in *U. maydis* auf Komplementation des Zelltrennungsdefektes der *cdc42*-Deletionsmutante geprüft wurden.
Außerdem besitzt *S. cerevisiae* kein Rac1 Homolog, weswegen auch die Mechanismen der spezifischen Interaktionen mit Aktivatoren und Effektoren nicht vergleichbar sind mit denen von Organismen, die mehrere GTPasen und entsprechende Signalkaskaden koordinieren müssen. Da Cdc24 in *S. cerevisiae* den einzigen Cdc42-spezifischen GEF darstellt, ist eine Spezifitätsbestimmung über GEF-GTPase Interaktion weder möglich noch nötig (Zhao et al., 1995). Haben sich im Laufe der Evolution aus einer GTPase bei *S. cerevisiae* zwei GTPasen in *U. maydis* entwickelt, die sich die essentiellen Funktionen und Effektoren teilen?
Diese Hypothese scheint möglich, da mit einer zunehmenden evolutionären Entwicklung auch ein Anstieg der Anzahl an Rho-GTPasen zu verzeichnen ist. Neuere Studien zeigen allerdings, dass die GTPase Rac1 die Wurzel des GTPasen-Stammbaums darstellt und später in der Evolution erst Rho und dann Cdc42 entstanden sind (Boureux et al., 2007). Somit handelt es sich vermutlich eher um den Verlust von Rac1 bei *S. cerevisiae.*

In *U. maydis* komplementieren beide GTPasen $Rac1^{W56F}$ und $Cdc42^{F56W}$ sowohl den Phänotyp der *rac1*- als auch den der *cdc42*-Deletionsmutante. Da in anderen Studien die Aminosäure an Position 56 als wichtige Determinante für spezifische GEF-GTPase Interaktionen beschrieben wurde (Gao *et al.*, 2001; Karnoub *et al.*, 2001), könnte auch in *U. maydis* die Aktivierbarkeit dieser GTPasen durch GEFs verändert sein.
Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass es verschiedene Mechanismen zur Bestimmung der Signalspezifität von GTPasen gibt. So ist bei dem Vergleich anderer GTPasen ebenfalls der in dieser Arbeit definierte Bereich von 41-56 als spezifitätsbestimmend gefunden worden (Gu et al., 2004; Li et al., 1999). Des Weiteren wurde in biochemischen Arbeiten an GTPasen von Säugertieren der Einfluss der Aminosäure an Position 56 auf die spezifischen Erkennung durch GEFs deutlich (Gao *et al.*, 2001; Karnoub *et al.*, 2001).

Rac1^{W56F} vereint Funktionen von Rac1 und Cdc42

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sowohl die Expression von Cdc42^{F56W} als auch die von Rac1^{W56F} zur Komplementation des Zelltrennungsdefektes der Δ*cdc42*-Mutante führte. Anscheinend kann Rac1 durch den Austausch dieser einen Aminosäure Cdc42-spezifische Funktionen übernehmen.

In anderen Studien wurde die Aminosäure an Position 56 der Rho-GTPasen als kritische Interaktionsstelle zwischen GTPase und GEF beschrieben. *In vitro* Studien humaner GTPasen haben gezeigt, dass Rac1^{W56F} durch den Cdc42-spezifischen GEF Intersectin (Karnoub *et al.*, 2001) und Cdc42^{F56W} durch den Rac1-spezifischen GEF TrioN aktiviert wird (Gao *et al.*, 2001). Deswegen wurde in dieser Arbeit über *in vitro* GEF- Assays getestet, ob dieser Aminosäureaustausch auch *U. maydis* zu einer veränderten Erkennung durch GEFs führt.

Für den GEF Don1 konnte in unserer Arbeitsgruppe bereits gezeigt werden, dass er an der Zelltrennung beteiligt, und vermutlich Cdc42-spezifisch ist (Mahlert *et al.*, 2006; Weinzierl *et al.*, 2002). Tatsächlich zeigten die GEF-Assays, dass Don1 spezifisch den Nukleotidaustausch an Cdc42 katalysiert, jedoch keine Aktivität gegenüber Rac1 hat. Interessanterweise konnte jedoch Don1 sowohl mit Rac1^{W56F} als auch mit Cdc42^{F56W} den Nukleotidaustausch katalysieren. Dies deckt sich mit den *in vivo* Beobachtungen dieser Arbeit, dass beide GTPasen mit dem Aminosäureaustausch an Position 56 den Zelltrennungsdefekt der Δ*cdc42*-Mutante komplementieren können. Die Komplementation des Zelltrennungsdefektes durch Rac1^{W56F} könnte somit durch die Aktivierbarkeit von Rac1^{W56F} durch Don1 begründet sein.

Die Expression der beiden GTPasen Rac1^{W56F} und Cdc42^{F56W} in der Δ*rac1*-Mutante führte ebenfalls in beiden Fällen zu einer Komplementation des Deletionsphänotyps. Beide GTPasen sind also in der Lage, auch die Rac1-spezifischen Funktionen zu übernehmen. *In vitro* GEF-Assays für den GEF Cdc24 zeigten, dass dieser Rac1 spezifisch aktiviert, und gegenüber Cdc42 nur eine deutlich geringere Aktivität aufweist. Durch den Austausch der Aminosäure an Position 56 kann Cdc42^{W56F} jedoch in einem starken Ausmaß von dem Rac1-spezifischen GEF Cdc24 aktiviert werden. Dies erklärt die Komplementation der Δ*rac1*-Mutante durch Expression von Cdc42^{W56F}. Obwohl die DH-Domäne von Cdc24 nur eine schwache Aktivierung von Rac1^{W56F} bewirkt, kann Rac1^{W56F} den Phänotyp einer *rac1*-

Deletionsmutante komplementieren. Möglicherweise ist diese geringe Aktivierbarkeit ausreichend, da es sich bei den *in vivo* Studien um Überexpressionsstudien handelt. Alternativ muss man entweder weitere, noch nicht charakterisierte GEFs zur Aktivierung der Rac1-Signalkaskade, oder aber zusätzliche spezifitätsbestimmende GEF-GTPase Interaktionen außerhalb der getesteten DH-Domäne annehmen.
Tatsächlich sind bei der GEF-GTPase Interaktion vermutlich auch noch weitere Interaktionsstellen von Bedeutung, da für den GEF Tiam gezeigt wurde, dass er zwischen Rho und Rac diskriminieren kann, obwohl beide an Position 56 ein Tryptophan besitzen (Snyder et al., 2002). Weitere strukturelle Studien zeigen, dass ausgedehnte Kontakte zwischen GEFs und der Switch II-Region (Aminosäure 57-75 von Cdc42) die selektive Bindung bewirken (Rossman et al., 2005). So interagiert die PH-Domäne von Dbs mit der Switch II-Region und His 103 von Cdc42 (Rossman et al., 2002).
Zusammenfassend kann man aufgrund der Daten dieser Arbeit und den *in vitro* Studien von Gao und Karnoub davon ausgehen, dass die Aminosäure an Position 56 einen wichtigen Einfluss auf die Aktivierbarkeit durch GEFs hat. Dennoch kann man zusätzliche Effekte weiterer Interaktionen nicht komplett ausschließen.

Modell zur Bestimmung der Signalspezifität

Die in *vivo* Experimente dieser Arbeit zeigen, dass $Rac1^{W56F}$ den Zelltrennungsdefekt einer Δ*cdc42*-Mutante komplementieren kann. Des Weiteren zeigen die GEF-Assays, dass dieser einzelne Aminosäureaustausch zu einer veränderten GEF-Interaktion führt. Geht man von dem Modell einer Signalkaskade aus, in der die GTPase in einem ersten Schritt von einem GEF aktiviert wird, um dann in einem weiteren Schritt einen Effektor zu aktivieren, müsste $Rac1^{W56F}$ zur Komplementation der Δ*cdc42*-Mutante nicht nur von Don1 aktiviert werden, sondern auch die entsprechenden Cdc42-spezifischen Effektoren aktivieren können.
Dies ist jedoch nur schwer vereinbar mit anderen Studien, die darauf hinweisen, dass der Austausch an Position 56 nicht die Effektor Interaktion von Rac1 beeinflusst (Karnoub *et al.*, 2001). Ebenso wurde beschrieben, dass ein Aminosäureaustausch an dieser Position

auch keinen Einfluss auf die Bindung von Cdc42 an den Effektor ACK2 hat (Gu et al., 2004).

Wie lässt sich also die veränderte Signalspezifität erklären? Die Beobachtung, dass der Austausch der Aminosäure an Position 56 nicht zu einer veränderten Effektoraktivierung führt, wurde mit konstitutiv aktiven GTPasen gemacht, wie zum Beispiel mit $Rac1^{Q61L/W56F}$ (Karnoub *et al.*, 2001). Dieses Protein liegt immer in der GTP-gebundenen, aktiven Form vor und wird daher nicht durch den entsprechenden GEF erkannt. Deshalb war es auch nur möglich, den Effekt von direkten Interaktionen mit Effektoren zu beobachten. Auch in *U. maydis* wurde bereits die Wirkung konstitutiv aktiver Varianten der GTPasen getestet. So komplementiert $Cdc42^{Q61L}$ die Δ*don1*-Mutante, während $Rac1^{Q61L}$ dazu nicht in der Lage ist (Mahlert *et al.*, 2006). Dies bestätigt, dass aktives Rac1 anscheinend nicht in der Lage ist, mit Cdc42-spezifischen Effektoren zu interagieren, während die Überexpression von aktivem Cdc42 selbst in Abwesenheit des entsprechenden GEFs Don1 die entsprechenden Effektoren für die Zellteilung aktiviert.

In dieser Arbeit wurden nun GTPasen getestet, die zwar den WF-Austausch besitzen, jedoch im Gegensatz zu den oben genannten Studien noch zwischen GTP- und GDP-gebundener Form hin- und herwechseln können. Dieser neue Ansatz in *U. maydis* ergab, dass die Interaktion von $Rac1^{W56F}$ mit dem Cdc42-spezifischen GEF Don1 anscheinend der kritische Faktor ist, der es dieser GTPase erlaubt, anstelle von Cdc42 entsprechende Effektoren zu aktivieren und so Cdc42 zu ersetzen.

Somit beeinflusst der GEF die spezifische Effektoraktivierung. Doch dies steht in einem gewissen Widerspruch zu der Annahme, dass der GEF mit der GTPase interagiert, die aktivierte GTPase nach dem Nukleotidaustausch abdissoziiert und danach erst über spezifische GTPase-Effektor Interaktionen den richtigen Signalweg aktiviert (Abb. 44 A)) (Bishop and Hall, 2000; Schmidt and Hall, 2002). Die Beobachtungen sprechen eher dafür, dass die beteiligten Proteine auf eine Weise miteinander interagieren, die es dem GEF ermöglicht, Einfluss auf die Aktivierung des Effektors auszuüben. Interessanterweise konnte tatsächlich gezeigt werden, dass in Säugerzellen der GEF Dbl mit der GTPase Cdc42 und dem Effektor PAK1 einen stabilen ternären Komplex bilden kann (Abb. 44B) (Wang *et al.*, 2004), was diese Hypothese erhärtet.

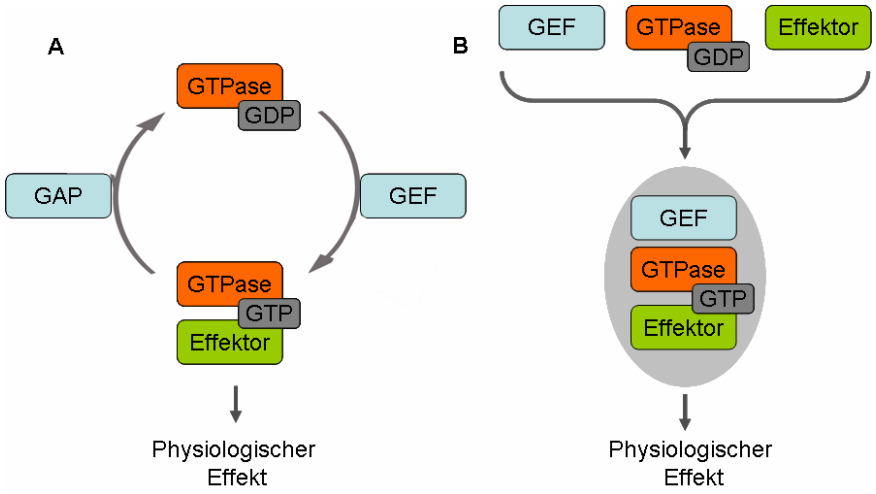


Abbildung 44: Modell zur Bestimmung der Signalspezifität über den GEF. A) Der GEF aktiviert die GTPase, welche dann abdissoziiert und erst in einem weiteren Schritt den Effektor erkennt. So kann der GEF keinen Einfluss auf die spezifische Effektor-Erkennung haben. **B)** GEF, GTPase und Effektor liegen gemeinsam in einem ternären Komplex vor. Innerhalb dieses Komplexes erfolgt sowohl die Aktivierung der GTPase durch den GEF als auch die Effektor-Aktivierung. Dadurch kann der GEF die spezifische Effektor-Erkennung beeinflussen.

Die Existenz eines solchen ternären Komplexes kann verschiedene biologische Funktionen haben. Zum einen kann so lokal die Signalamplifikation und damit die Effizienz eines einmal aktivierten Signalkaskademoduls erhöht werden. So ist beispielsweise für das Modul aus Dbl, Cdc42 und PAK1 eine positive Rückkopplung von PAK1 auf den GEF Dbl beschrieben (Wang et al., 2004). Eine weitere wichtige Funktion eines solchen Komplexes ist die Verhinderung ungewollter Kreuzreaktionen paralleler Signalkaskaden. Dieser Punkt bekommt besondere Wichtigkeit, wenn man bedenkt, dass in vielen Organismen die Zahl der GEFs und auch der Effektoren wesentlich größer ist als die der GTPasen (Karnoub et al., 2004). Es ist wenig darüber bekannt, wie die Spezifität der Effektor Aktivierung erreicht wird (Etienne-Manneville, 2004). Der modulare Aufbau eines ternären Komplexes garantiert, dass ein bestimmter Stimulus in der Zelle dazu führt, dass eine GTPase die richtigen Effektoren rekrutiert, aktiviert und die zugehörige Zellantwort induziert.

Dies könnte ein effektiver Mechanismus zur Sicherstellung der Signalspezifität sein, der auch in *U. maydis* genutzt wird: Cla4 ist ein Effektor, der innerhalb der Rac1-Signalkaskade den Knospungsprozess reguliert. Zwei-Hybrid-Analysen haben gezeigt, dass sowohl Rac1 als auch Cdc42 mit Cla4 interagieren kann (Abb. 45) (Sandrock, persönl. Mitteilung). Trotzdem kann die Überexpression von Cdc42 nicht den morphologischen Defekt einer *rac1*-Mutante komplementieren.

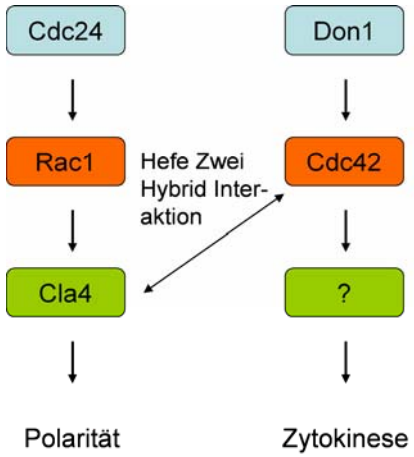


Abbildung 45: Rho-GTPase Signalkaskaden in *U. maydis*. Die GTPasen Cdc42 und Rac1 können beide mit Cla4 interagieren, dennoch kann Cdc42 nicht den morphologischen Defekt einer *rac1*-Mutante komplementieren. Es muss Mechanismen geben, die Kreuzreaktionen zwischen den einzelnen Kaskaden verhindern.

Doch was hält einen solchen ternären Komplex zusammen, und wie wird der korrekte Aufbau sichergestellt? In *S. cerevisiae* sind schon seit längerer Zeit verschiedene gerüstbildende Proteine bekannt, die Komponenten von MAPK Signalkaskaden zusammenhalten. Ste5p war das erste beschriebene MAPK Scaffold-Protein, welches die Komponenten der Paarungs- MAPKinase Kaskade miteinander koppelt (Elion, 2001). Teilweise werden sogar über mehrere Scaffolding-Proteine noch größere Signalkomplexe miteinander gekoppelt. So sind beispielsweise für das humane Multidomänenprotein Sinophilin mehr als 30 potentielle Interaktionspartner beschrieben, unter anderem Regulatoren des Zytoskeletts, Zelladhesionsmoleküle, GEFs und andere Regulatoren von G-Protein-Signalkaskaden (Sarrouilhe et al., 2006).

In allen diesen Beispielen handelt es sich um zusätzliche Hilfsproteine, die allein über ihre gerüstbildende Funktion MAPK-Kaskaden und GTPase-Signalkaskaden zusammenhalten. Daneben gibt auch weitere Beispiele, in denen der GEF selbst eine gerüstbildende Funktion ausübt (Marinissen and Gutkind, 2005). Beispielsweise bindet der GEF PIX sowohl Rac als auch dessen Effektor PAK und bildet so einen Komplex, in dem der Effektor in direkter Nähe an die GTP gebundene GTPase gekoppelt ist (Daniels et al., 1999). Somit ist der GEF nicht nur an der Aktivierung der GTPase, sondern auch an der Auswahl des Effektors beteiligt (Buchsbaum et al., 2003). Darüber lassen sich auch frühere Beobachtungen in COS-7 Zellen erklären, dass die gleiche GTPase, in Abhängigkeit von dem sie aktivierenden GEF, entweder PAK1 oder JKN aktivieren kann (Zhou et al., 1998).

Auch in *U. maydis* könnten Don1 und Cdc42 Teil eines solchen ternären Komplexes sein, der den putativen Effektor enthält und somit die spezifische Zellantwort vorbestimmt. Dabei könnte der GEF über ein „scaffold“ Protein an den Effektor gekoppelt sein, oder selbst gerüstbildende Funktion haben und den Effektor binden. Die GTPasen selbst haben anscheinend wenig Einfluss auf die Signalspezifität. Sie sind zwischen den einzelnen Signalkaskaden austauschbar, solange sie durch den jeweiligen GEF aktivierbar sind (Abb. 46).

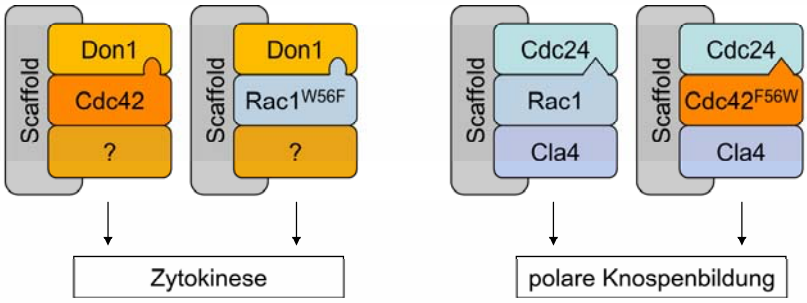


Abbildung 46. Modell zur Bestimmung der Signalspezifität über Proteinkomplexe. Entweder der GEF selbst hat gerüstbildende Eigenschaften, oder aber man muss zusätzliche „scaffold“-Proteine postulieren, über die GEF, GTPase und Effektor gekoppelt werden. Der GEF liegt mit dem zugehörigen Effektor in einem Komplex vor und bestimmt dadurch die spezifische Zellantwort mit. Die Aktivierbarkeit der GTPasen durch den GEF ist ausreichend, damit sie sich funktionell ersetzten und den durch den GEF vorbestimmten Effektor aktivieren können.

Sobald also Cdc42^{F56W} von Cdc24 aktiviert wird, kann es in einem Signalkomplex fungieren, der über den Effektor Cla4 an der Regulation der Zellpolarität beteiligt ist. Umgekehrt ist Don1 über spezifische Effektoren an der Regulation der Zelltrennung beteiligt. Sowohl Cdc42 als auch Rac1^{W56F} können von Don1 aktiviert werden und so in dem entsprechenden Komplex fungieren.

Zusammenfassend ist also der GEF nicht nur dafür verantwortlich, welche einkommenden Signale in die Kaskade eingespeist werden, sondern bestimmt auch noch die Auswahl der richtigen Effektoren.

3.2 Intersectin reguliert vielfältige Prozesse durch seine Eigenschaft als gerüstbildendes Protein

In dieser Arbeit konnte sowohl über die Charakterisierung verschiedener chimärer GTPasen und GTPasen mit veränderter Effektor-Interaktion als auch über GEF Assays gezeigt werden, dass die GEFs wichtige Regulatoren sind, die über ihre „scaffold"-Funktion oder über Interaktion mit gerüstbildenden Proteinen die Komponenten der Signalkaskaden koppeln und dadurch eine spezifische Zellantwort sicherstellen.
Im Genom von *U. maydis* konnten verschiedene für GEFs kodierende Gene gefunden werden. Vor dem Hintergrund der bisherigen Ergebnisse ist Intersectin besonders interessant, da dieser GEF sehr groß ist und multiple Domänen besitzt, und somit auch gerüstbildende Funktionen haben könnte.

Intersectin ist ein gerüstbildendes Protein mit Cdc42-spezifischer GEF-Aktivität

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die DH-Domäne von Intersectin den Nukleotidaustausch an Cdc42 stimuliert, allerdings keine Aktivität gegenüber Rac1 zeigt. Dies deckt sich mit der Beobachtung, dass beispielsweise die DH-Domäne von humanem Intersectin in Nagerfibroblasten spezifisch Cdc42 aktiviert (Hussain et al., 2001).
Parallel konnte gezeigt werden, dass Intersectin essentiell ist, und dass die Repression der *its1*-Expression zu einer Beeinträchtigung vieler zellulärer Prozesse führt. So konnten eine veränderte Zellwandstruktur und vor allem Endozytose- und Vakuolendefekte beobachtet werden. Diese morphologischen Phänotypen sind vergleichbar mit denen von *pan1*-Mutanten von *S. cerevisiae* und *C. albicans* (Martin et al., 2007).

Vermutlich hat die DH-Domäne keine essentielle Funktion, da der *in vitro* GEF-Assay eine reine Cdc42-Spezifität zeigt. Da in *U. maydis* eine *cdc42*-Deletion nicht letal ist, sollte auch ein Verlust der Aktivierung dieser GTPase keinen letalen Effekt haben. Hinzu kommt, dass homologen Proteinen verschiedener anderer Organismen, wie zum Beispiel *S. cerevisiae* und *D. melanogaster,* die C-Terminale DH-Domäne komplett fehlt (Huang and Cai, 2007; O'Bryan et al., 2001).

Es gibt verschiedene Hinweise, dass Intersectin über weitere Domänen mehrere GTPase-Signalkaskaden reguliert (Wang et al., 2005). So hemmt Intersectin die Aktivität eines GAPs für Rac1 und Cdc42 und aktiviert darüber weitere GTPase-Signalkaskaden (Jenna et al., 2002). Des Weiteren interagiert Intersectin über die SH3-Domänen mit Sos, einem GEF für Ras-GTPasen (Tong et al., 2000b). Da Sos sowohl eine Ras-GEF-Domäne als auch eine Rac-GEF-Domäne besitzt, stimuliert Intersectin auf vielfältige Weise verschiedene Signalkaskaden (Abb. 47) (Nimnual et al., 1998).

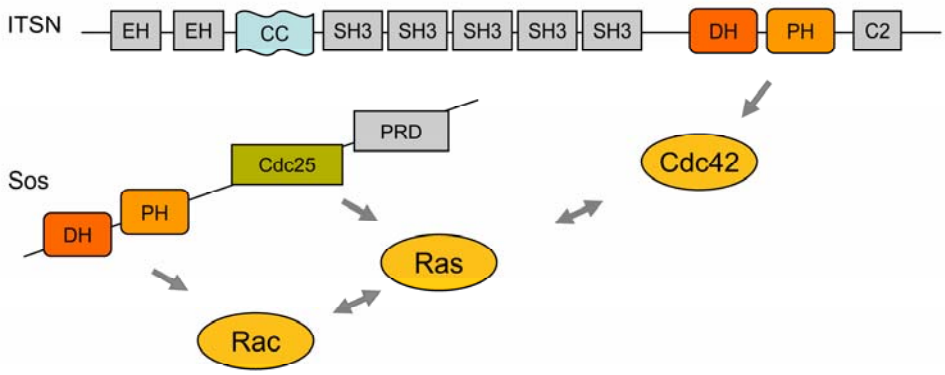


Abbildung 47: Intersectin reguliert über die Bindung von Sos mehrere GTPase Signalkaskaden. Die GEF-Domäne von Intersectin aktiviert Cdc42. Über die SH3-Domänen wird der GEF Sos gebunden, der sowohl eine Ras- als auch Rac-GEF Domäne besitzt. Nach O'Bryan et al., 2001.

In *U. maydis* finden sich allerdings keine Sos-Homologe, die sowohl Ras-GEF Domänen als auch Rho-GEF Domänen besitzen, und die zum Aufbau eines vergleichbaren Netzwerks in *U. maydis* beitragen könnten. Allerdings findet man in der Genomdatenbank fünf Gene, die für putative Ras-GEFs kodieren. Eines dieser Gene kodiert für das Protein Bem2, welches sowohl eine Ras-GEF Domäne als auch eine Rho-GAP Domäne besitzt. Über Interaktionen mit diesem Protein werden Ras- und Rho-GTPase Signalkaskaden in *U. maydis* miteinander verknüpft. Die beiden Ras-GEFs Sql2 und Cdc25 besitzen beide eine SH3 Domäne, über die weitere Protein-Protein Interaktionen erfolgen können.

Die essentielle Funktion von Intersectin liegt vermutlich in der Regulation der Endozytose oder in der Zytoskelettorganisation. Sowohl die *its1*-Mutante in *U. maydis* als auch eine *pan1*-Mutante in *S. cerevisiae* zeigen Defekte in der Aufnahme des Farbstoffs FM4-64 und bei der Vesikelfusion (Wendland et al., 1996). Intersectin besitzt EH-Domänen, eine

„coiled-coil"-Region und SH3-Domänen, für die Interaktionen mit an der Endozytose beteiligten Proteinen beschrieben wurden (Fernandez-Chacon et al., 2000; Sengar et al., 1999; Yamabhai et al., 1998).
In *S. cerevisiae* wurde für Pan1p gezeigt, dass es über seine gerüstbildende Funktion Aktinpolymerisierung an Stellen der Endozytose induziert (Kaksonen et al., 2003; Lanzetti, 2007; Qualmann and Kessels, 2002; Schafer, 2002). Die Färbung mit Rhodamin-Phalloidin zeigt Defekte in der Organisation von Aktinfilamenten (Wendland et al., 1996). In *U. maydis* kann man ein gestörtes Aktinzytoskelett der *its1*-Mutante lediglich aufgrund der abgerundeten Zellmorphologie vermuten. Leider funktioniert die Färbung von Aktin mit Rhodamin-Phalloidin hier nicht, was vermutlich auf Sequenzunterschiede innerhalb der Erkennungssequenz zurückzuführen ist (Verena Welteke, Diplomarbeit).

Zusammengenommen wird aus den Beobachtungen deutlich, dass Intersectin an vielen wichtigen Prozessen der Zelle beteiligt ist. Jedoch ist nicht klar, welche dieser Funktionen den essentiellen Funktionen von Intersectin entsprechen. Interessanterweise wurde gezeigt, dass die Ko-Expression einzelner Domänen von Pan1p nicht den gleichen Effekt wie die Expression des Vollängenproteins Pan1p hat (Miliaras et al., 2004). In dieser Studie wurden die einzelnen Domänen von Pan1p in Wildtypzellen überexprimiert um deren dominante Konsequenzen zu studieren. Die stärksten Phänotypen mit blockierter Endozytose und aggregiertem Aktin waren nur bei Überexpression des gesamten Proteins zu beobachten. Parallele Überexpression nicht überlappender N- und C-terminaler Hälften induzierte nicht den gleichen Effekt. Somit liegt die essentielle Funktion von Intersectin vermutlich nicht an einzelnen Domänen oder einzelnen Funktionen, sondern an der Tatsache, dass Intersectin als Gerüst-Protein verschiedene wichtige Prozesse in höheren Proteinstrukturen miteinander verknüpft.
Um in *U. maydis* die Funktionen der einzelnen Domänen zu untersuchen, könnte man partielle Deletionen einzelner Domänen erstellen, oder die entsprechenden Domänen überexprimieren um deren dominant negativen Effekt zu untersuchen.

Bildung verschiedener Isoformen über alternative Polyadenylierungsstellen

In Säugetieren werden zwei unterschiedlich lange Isoformen des Intersectin-Homologs ITSN durch alternatives Spleißen gebildet. Dabei enthält nur die längere Form die C-terminale GEF-Domäne. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass auch in *U. maydis* unterschiedliche mRNAs von dem *its1*-Gen gebildet werden.

Alternative Transkriptionsinitiation, alternatives Spleißen und alternative Polyadenylierung sind wichtige Mechanismen, um die Proteindiversität zu vergrößern. Von einem einzigen Transkript können so gewebe-, geschlechts- oder entwicklungsspezifisch verschiedene Isoformen mit unterschiedlichen oder sogar antagonistischen Funktionen entstehen (Stamm et al., 2005). Die Bedeutung des alternativen Spleißens zeigt sich über die gesamte Evolution hinweg. In vielen, auch entfernt verwandten Spezies, wie beispielsweise in *H. sapiens*, *D. melanogaster* und *C. elegans*, kommt dieser Mechanismus in starkem Ausmaß vor (Brett et al., 2002). Microarray Daten zeigen, dass 74% aller menschlichen Gene alternativ gespleißt werden (Johnson et al., 2003). In pilzlichen Organismen hingegen ist alternatives Spleißen ein eher selten genutzter Mechanismus. In *C. neoformans* werden ca. 4,2 % aller Gene alternativ gespleißt, in *M. grisea* sind es ca. 1,6 %. Für *U. maydis* wurde erst kürzlich vermutet, dass mindestens 3,6 % der Gene alternativ gespleißten werden (Ho et al., 2007). Es stellt sich die Frage, inwieweit alternative Spleißvorgänge an der Regulation der Signalspezifität von Intersectin in *U. maydis* beteiligt sind.

Das *its1*-Gen in *U. maydis* besteht aus drei Exons und zwei Introns. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch unterschiedliche Nutzung von zwei Polyadenylierungsstellen verschiedene Transkripte entstehen, von denen die zwei Haupt-Isoformen von Intersectin gebildet werden. Diese entsprechen in ihrer Domänenstruktur den zwei Hauptformen des Menschen, von denen eine die C-terminale DH-PH-Tandemdomäne besitzt, die der kurzen Form fehlt (Hussain et al., 1999; Pucharcos et al., 1999).

Exons fallen in drei Kategorien: 5'-terminale Exons, interne Exons und 3'-terminale Exons. Durch Exon „skipping" werden interne Exons übersprungen, dies ist der häufigste Fall von alternativem Spleißen in Eukaryoten. Dabei wird immer das gleiche Exon als 3'-terminales Exon genutzt, deswegen ist auch der C-Terminus des Proteins immer identisch (Abb. 48 A)). Daneben gibt es auch noch die Möglichkeit, durch Nutzung alternativer Polyadenylierungsstellen Proteine mit alternativen 3' Exons zu bilden. Es wurden drei

verschiedene Muster von alternativer Polyadenylierung beschrieben: Tandem-Polyadenylierungsstellen, übersprungene Exons und „kombinierte“ Exons (Edwalds-Gilbert et al., 1997). Tandem-Polyadenylierungsstellen entsprechen multiplen, alternativen Polyadenylierungsstellen im 3’ terminalen Exon. Dies kommt in Pilzen sehr häufig vor. Auch in *U. maydis* zeigen verschiedene ESTs, dass für viele Gene mehrere Polyadenylierungsstellen in Tandem genutzt werden.

In manchen Genen existiert eine Polyadenylierungsstelle vor dem letzten Exon, wodurch das Transkript nach dem internen Exon endet. Wird diese Polyadenylierungsstelle jedoch nicht genutzt, kann das mittlere Exon durch Spleißen vollständig übersprungen werden. Auch in diesem Fall entstehen Proteine mit unterschiedlichen C-Termini (Abb.48 B)).

Ein drittes Muster der alternativen Polyadenylierung erfolgt über „kombinierte“ Exons, die sowohl interne als auch 3’ Exons sein können (Abb.48 C)).

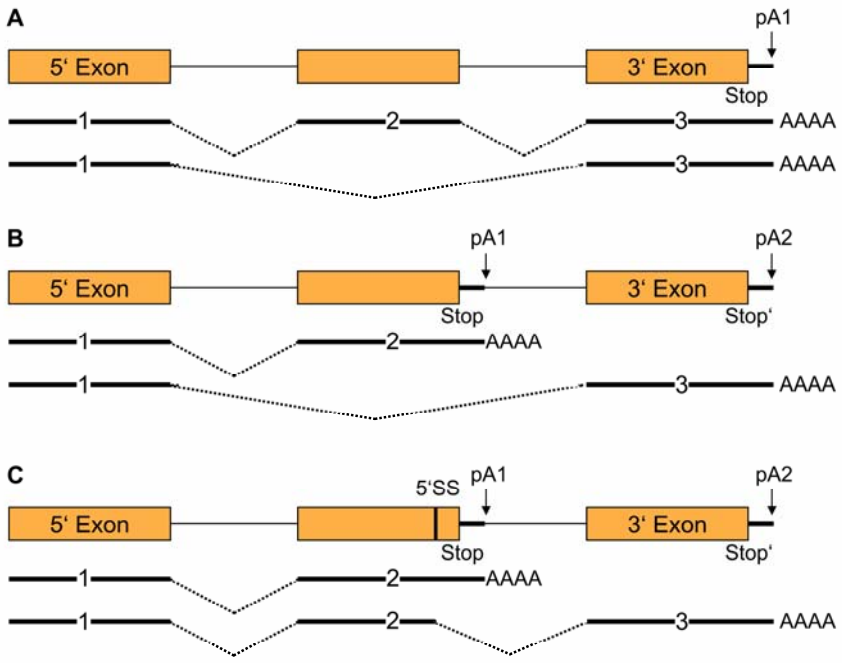


Abbildung 48: Alternative Polyadenylierung. A) Exon „skipping“ führt zu unterschiedlich langen Proteinen, die jedoch immer identische 3’ Termini haben. **B)** Durch Intron „retention“ und Existenz einer alternativen Polyadenylierungsstelle im internen Exon können Transkripte mit unterschiedlichen C-Termini generiert werden. **C)** Durch alternative Nutzung einer Polyadenylierungsstelle im internen Exon kann dieses „kombinierte“ Exon sowohl internes als auch 3’ Exon sein. Nach (Edwalds-Gilbert et al., 1997).
pA = Polyadenylierungsstelle, 5’SS = 5’-Spleißstelle

Diese Form der alternativen Polyadenylierung findet sich auch im Fall von *its1* in *U. maydis*. Auch hier folgt in einem „kombinierten“ Exon auf eine potentielle 5’-Spleißstelle ein Stop Codon und kurz darauf eine mögliche Polyadenylierungsstelle. Wird diese Polyadenylierungsstelle genutzt, verhält sich dieses Exon wie ein 3’ Exon und es kommt zur Bildung einer kürzeren mRNA, die zur Bildung der verkürzten Its1-Isoform führt. Wird die alternative Polyadenylierungsstelle pA1 im internen Exon nicht genutzt, erfolgt die Transkription bis zur Polyadenylierungsstelle pA2. Das 3’ Exon wird dann an die 5’ Spleißstelle des internen Exons gespleißt. Auf diese Weise entsteht in *U. maydis* die lange Its1 Isoform.

Verschiedene auf 3’ESTs basierende Studien zeigen, dass alternative Polyadenylierung in höheren Organismen ein weit verbreiteter Mechanismus zur Erzeugung von Diversität der reifen mRNA-Transkripte und somit der Proteindiversität darstellt. Für 29% aller humanen Gene konnte alternative Polyadenylierung nachgewiesen werden (Edwalds-Gilbert et al., 1997; Iseli et al., 2002; Pesole et al., 2000).

In pilzlichen Systemen ist noch wenig über alternative Polyadenylierung bekannt. Allerdings ist beispielsweise in *S. cerevisiae* für verschiedene Gene die Nutzung alternativer Polyadenylierungsstellen als Antwort auf verschiedene Kohlenstoffquellen beschrieben (Sparks and Dieckmann, 1998).

Auch in Pflanzen existieren Mechanismen der unterschiedlichen Prozessierung einer prä-mRNA (Reddy, 2007). In *A. thaliana* sind verschiedene Beispiele für die Nutzung alternativer Polyadenylierungsstellen bekannt. So wurde für mehrere unter Stress induzierte Gene die Nutzung verschiedener Polyadenylierungsstellen beschrieben (Magnotta and Gogarten, 2002). Auch die Blütenentwicklung von *A. thaliana* ist abhängig von der Wahl alternativer Polyadenylierungsstellen (Quesada et al., 2005). Dieser Mechanismus hat so große Bedeutung erlangt, dass sogar für die genetische Manipulation von Nutzpflanzen Algorithmen entwickelt werden, über die Polyadenylierungsstellen in Pflanzengenomen vorherzusagen sind. Dadurch kann bei der Erstellung von Transgenen die ungewollte Einführung von Polyadenylierungsstellen vermieden werden (Ji et al., 2007).

In dieser Arbeit konnte über „real time“-PCR-Analysen gezeigt werden, dass in haploiden Sporidien von *U. maydis* beide Intersectinformen vorkommen. Dies ist das erste Beispiel dafür, dass durch alternative Polyadenylierung verschiedene funktionelle Proteine in *U. maydis* gebildet werden. Es wäre interessant zu untersuchen, ob die Mengenverhältnisse der gebildeten Isoformen von unterschiedlichen Lebensstadien des Pilzes abhängig sind. Es wäre auch denkbar, dass die lange Form mit Rho-GEF Aktivität am polaren Wachstum der Konjugationshyphen und des dikaryotischen Filaments beteiligt ist. Ebenso wäre es denkbar, dass die GEF-Aktivität von Its1 für verschiedene Entwicklungsprozesse innerhalb der Pflanze benötigt wird.

Um dies zu untersuchen, sollte man mRNA-Proben aus unterschiedlichen Stadien des Lebenszyklus mittels „real time“-PCR untersuchen.

Durch die gute genetische Handhabbarkeit von *U. maydis* bietet sich in diesem System die einfache Möglichkeit, durch genetische Manipulationen Mutanten zu erzeugen, die entweder nur die kurze Form von Its1 (ohne GEF-Domäne), oder nur die lange Form von Its1 (mit GEF-Domäne) bilden können. Damit kann eindeutig bestimmt werden, welche Funktionen die GEF-Domäne von Its1 erfüllt.

3.3 Funktionen von Cdc24 und Regulation der Polarität

Der generelle Mechanismus des Aufbaus und der Regulation von Zellpolarität ist zwischen allen Eukaryoten hoch konserviert. Eine zentrale Rolle in der Regulation wird von den kleinen Rho-GTPasen eingenommen. Besonders Cdc42, welches ursprünglich aufgrund seiner Funktion bei Zellpolarisierung während des Knospungsvorganges in Hefe identifiziert wurde (Adams et al., 1990), spielt in allen Eukaryoten eine zentrale Rolle bei der Polaritätsentwicklung (Etienne-Manneville, 2004; Hall, 1998; Johnson, 1999).
Für die Etablierung von Polarität sind verschiedene Prozesse, an denen Rho-GTPasen beteiligt sind, essentiell. Dazu gehört, wie bereits diskutiert, die Reorganisation des Aktinzytoskeletts und die Kontrolle von Vesikelverkehr und Zellwandmorphogenese. Für polares Wachstum ist allerdings auch wichtig, dass der Ort des polaren Wachstums korrekt markiert wird. Auch über diesen Prozess sind Rho-GTPase-Module an polaren Wachstumsprozessen beteiligt (Harris and Momany, 2004).

Cdc24 ist ein essentieller GEF, der Filamentbildung über Rac1 induziert

In *U. maydis* wurde bereits gezeigt, dass Rac1 essentiell für polares Wachstum ist. Die Anwesenheit von Rac1 ist notwendig für die Ausbildung des *b*-Filaments (Mahlert et al., 2006). Daraus könnte man schließen, dass *b*-Induktion zu verstärkter Rac1-Expression führt, was jedoch über die Ergebnisse von Microarray-Daten ausgeschlossen werden kann (Kämper, persönl. Mitteilung). Eine andere Hypothese wäre, dass durch Expression des *b*-Heterodimers ein Aktivator von Rac1 exprimiert und darüber die Rac1-Aktivität stimuliert wird, oder dass zusätzliche Faktoren Rac1 an die Stellen des polaren Wachstums rekrutieren. Beide Funktionen könnten von einem Rac1-spezifischen GEF erfüllt werden.
Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen vermuten, die Aktivierung von Rac1 in *U. maydis* von Cdc24 übernommen wird. So konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von Cdc24 zur Filamentbildung führt, allerdings nur in Anwesenheit des Rac1-Proteins. Des Weiteren zeigen die GEF-Assays, dass die DH-Domäne von Cdc24 den Nukleotidaustausch an Rac1 katalysiert. Somit ist in *U. maydis* Cdc24 ein Rac1-spezifischer GEF, der einen idealen Kandidat darstellt, um Rac1 an die Stelle des polaren Wachstums zu rekrutieren und dort zu aktivieren. Tatsächlich konnte in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass durch *b*-

Induktion Cdc24GFP an der Spitze des Filaments lokalisiert (Sonja Frieser, persönl. Mitteilung). Über Microarray-Analysen konnte jedoch keine Erhöhung der Cdc24-Expression nach *b*-Induktion nachgewiesen werden (Kämper, persönl. Mitteilung). Somit müsste eine *b*-abhängige Aktivierung von Cdc24 angenommen werden, oder es müssten weitere Faktoren postuliert werden, über die Cdc24 *b*-abhängig an der Spitze lokalisiert wird.

In anderen pilzlichen Organismen wurde das so genannte Polarisom als apikales Gerüst für GEF und GTPase beschrieben (Sheu et al., 1998). Darüber werden Rho-GTPase Signalkaskaden am Ort des polaren Wachstums gehalten und an die Aktinreorganisation gekoppelt (Evangelista et al., 1997; Kohno et al., 1996). Auch in *U. maydis* wird die Existenz eines solchen „Polarisoms" vermutet, welches durch *b*-Induktion assembliert und das Signalmodul aus dem GEF Cdc24 und der GTPase Rac1 an der Spitze des Filaments lokalisiert und/oder aktiviert. Bestandteil eines solchen Polarisoms in *U. maydis* könnte die cyclinabhängige Kinase Cdk5 sein. Es wurde gezeigt, dass Cdk5 zur Lokalisierung von Cdc24 an der Sitze des Filaments führt und darüber die Aktivität von Rac1 beim polaren Wachstum reguliert (Castillo-Lluva et al., 2007).

In *S. cerevisiae* werden Cdc24 und Cdc42 über das Polarisom an die Stellen des polaren Wachstums rekrutiert (Pruyne and Bretscher, 2000). Auch in vielen anderen Organismen erfolgt die Regulation des polaren Wachstums über das stark konservierte Signalmodul aus Cdc24 und Cdc42. Jedoch ist in Organismen, wie *P. marneffei*, *W. dermatitidis* und *M. grisea,* die ein Rac1-Homolog besitzen, Rac1 und nicht Cdc42 an der Regulation des filamentösen Wachstums beteiligt (Boyce et al., 2003; Hurtado et al., 2000). Die Phänotypen der *rac1*-Mutanten verschiedener Organismen und die Abwesenheit von Rac in monomorphen Hefen sprechen dafür, dass die Hauptrolle von Rac im Hyphenwachstum liegt.

Es wäre allerdings möglich, dass in *U. maydis* Cdc24 neben der Aktivierung von Rac1 im polaren Wachstum auch weitere Funktionen hat. Über die GEF-Assays konnte gezeigt werden, dass Cdc24 auch zu einem geringen Ausmaß Cdc42 aktivieren kann. Dies deckt sich mit den Beobachtungen, dass eine *cdc24*-Deletion letal ist und morphologisch der *cdc42/rac1*-Doppelmutante ähnelt.

Interessant sind die Phänotypen der konditionalen Doppelmutante, bei der *rac1* und *cdc24* unabhängig voneinander induziert werden können. Die Repression beider Gene hat eine letale Wirkung, während die parallele Induktion beider Gene zu filamentösem Wachstum

führt. Allerdings interferiert die Repression von *cdc24* nicht mit der Rac1-induzierten Filamentbildung. Entweder sind sehr geringe Mengen von Cdc24 ausreichend, um Rac1 korrekt zu lokalisieren, oder man muss andere Mechanismen postulieren (siehe unten). Umgekehrt führt die Überexpression von *cdc24* nicht zur Filamentinduktion, wenn gleichzeitig *rac1* reprimiert wird. Dies ist ein weiterer Hinweis, dass Cdc24 ein Rac1-spezifischer GEF ist. Interessanterweise kommt es allerdings bei Induktion von Cdc24 bei paralleler *rac1*-Repression teilweise zur Bildung von Doppelsepten. Dies könnte dadurch zu erklären sein, dass Cdc24 auch in geringem Ausmaß Cdc42 aktivieren kann, welches dann aufgrund von partiell redundanten Funktionen Rac1 ersetzen kann. Alternativ könnte das bereits beschriebene Modell greifen, dass der GEF die zelluläre Antwort bestimmt, und daher Rac1 in dieser Signalkaskade teilweise durch Cdc42 ersetzt werden kann.

Zusammenfassend lässt sich somit festhalten, dass Cdc24 ein Rac1-spezifischer GEF ist, der in einer Signalkaskade oberhalb von Rac1 liegt und der in Abwesenheit von Rac1 somit keine Filamente mehr induzieren kann. Da eine Repression von *cdc24* jedoch zu einem letalen Phänotyp führt, der vergleichbar mit der *cdc42*/*rac1*-Doppelmutante ist und im GEF-Assay eine geringe Cdc42-Aktivierung nachgewiesen werden kann, ist es wahrscheinlich, dass er auch einige der Cdc42-Funktionen reguliert (Abb. 49). So würde die essentielle Funktion von Cdc24 in der Aktivierung beider GTPasen liegen, während die durch Überexpression induzierte Filamentbildung über die Aktivierung von Rac1 erfolgt.

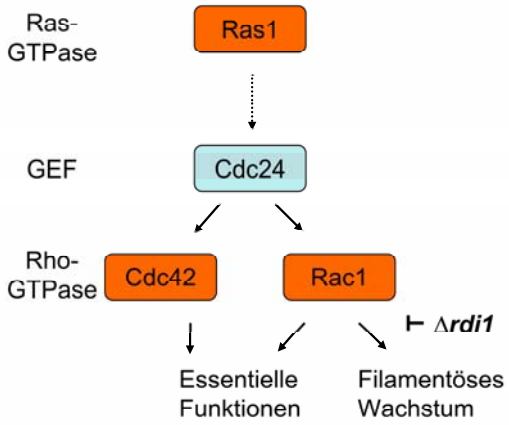


Abbildung 49: Funktionen von Cdc24 in *U. maydis*. Die Letalität der *cdc24*-Deletion beruht vermutlich darauf, dass Cdc24 beide GTPasen aktiviert und deren essentielle Funktionen reguliert. Die Filamentbildung durch Cdc24 Überexpression erfolgt über Rac1 und ist, wie auch die Rac1-induzierte Filamentbildung, von Rdi1 abhängig.

Aufbau und Erhalt der Polarität beim filamentösen Wachstum

In unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von Cdc24 (diese Arbeit), von Rac1 und Ras1 (Mahlert, Diss.) zur Ausbildung langer Filamente führt, die den Filamenten durch *b*-Induktion ähneln. Interessanterweise konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass in Abwesenheit des Rho-GDIs Rdi1 eine Filamentinduktion durch Rac1-Überexpression nicht mehr möglich ist. Das *b*-induzierte Filament dagegen ist zwar ebenfalls abhängig von Rac1, wird aber nicht durch eine *rdi1*-Deletion blockiert.
Die Zellpolarisierung durch Rac1-Überexpression erfolgt demnach vermutlich über einen anderen Mechanismus, als die Entwicklung des *b*-Filaments. Bei Überexpression von Rac1 reicht die basale Aktivität eines GEFs, wahrscheinlich Cdc24, aus, um ausreichend Rac1 an der Spitze des polaren Wachstums zu aktivieren.
Für *S. cerevisiae* sind bereits ähnliche Mechanismen der spontanen Entwicklung der Polarität beschrieben, für die weder ein kortikale Markierung, noch ein Pheromonstimulus notwendig sind (Wedlich-Söldner et al., 2003; Wedlich-Söldner and Li, 2003). Eine spontane Polarisierung erfolgt, wenn bei einer zufälligen, lokalen Erhöhung von aktivem Cdc42 eine positive Rückkopplungsschleife induziert wird, über die noch mehr Signalkomponenten rekrutiert werden und das ursprüngliche Signal weiter verstärken. In *S. cerevisiae* erfolgt diese positive Rückkopplung über das Adapter Protein Bem1. Durch Cdc24p aktiviertes Cdc42p rekrutiert Bem1p, was zu einer Stabilisierung von Cdc24p führt. Über diesen selbstverstärkenden Mechanismus wird polares Wachstum gesteuert (Butty et al., 2002). Beim polaren Wachstum über lange Entfernungen muss man noch einen weiteren Faktor postulieren, der verhindert, dass sich beim Wachstum des Filaments das Polaritätssignal über die Flanken verteilt. In *S. cerevisiae* könnte Rho-GDI ein solcher Faktor sein, der inaktives Cdc42 aus der Plasmamembran extrahiert und somit ein „recycling“ der GTPase an die Spitze ermöglicht, so dass das Polaritätssignal immer auf die Spitze des Filaments begrenzt bleibt (Koch et al., 1997).
Ein solcher Mechanismus wurde auch für das polare Wachstum von Pollenschläuchen in *N. tabacum* beschrieben. Das gerichtete, polare Wachstum erfolgt dort über die Rho-GTPase Rac5. Wird die Interaktion von Rac5 mit RhoGDI2 gestört, lokalisiert Rac5 nicht mehr an der Spitze des Pollenschlauchs, sondern zeigt eine gleichmäßige Verteilung über die Flanken. Dies führt zur Blockade des polaren Wachstums (Klahre et al., 2006). In

N. tabacum ist für die Aufrechterhaltung der Polarität über Rac5 auch noch die Funktion eines GAPs notwendig. RhoGAP1 lokalisiert nahe der Zone des polaren Wachstums, allerdings im subapicalen Bereich. Diese Lokalisierung verhindert, dass sich aktives Rac5 beim Wachstum auf die Flanken verteilt (Klahre and Kost, 2006). Somit stellen RhoGDI2 und RhoGAP1 ein effektives System dar, um Rac5-Aktivität beim polaren Wachstum der Pollenschläuche an der Spitze zu konzentrieren.

In *U. maydis* übt Rdi1 vermutlich eine vergleichbare Funktion während des kontinuierlichen Streckenwachstums des Filaments aus: In Abwesenheit von Rdi1 kann das inaktive Rac1 nicht mehr aus Membranen der Hyphenflanke herausgelöst und an den Ort des polaren Wachstums relokalisiert werden (Abb. 50). Dies könnte erklären, warum die Überexpression von Rac1 in der *rdi1*-Deletionsmutante nicht zur Filamentbildung führt.

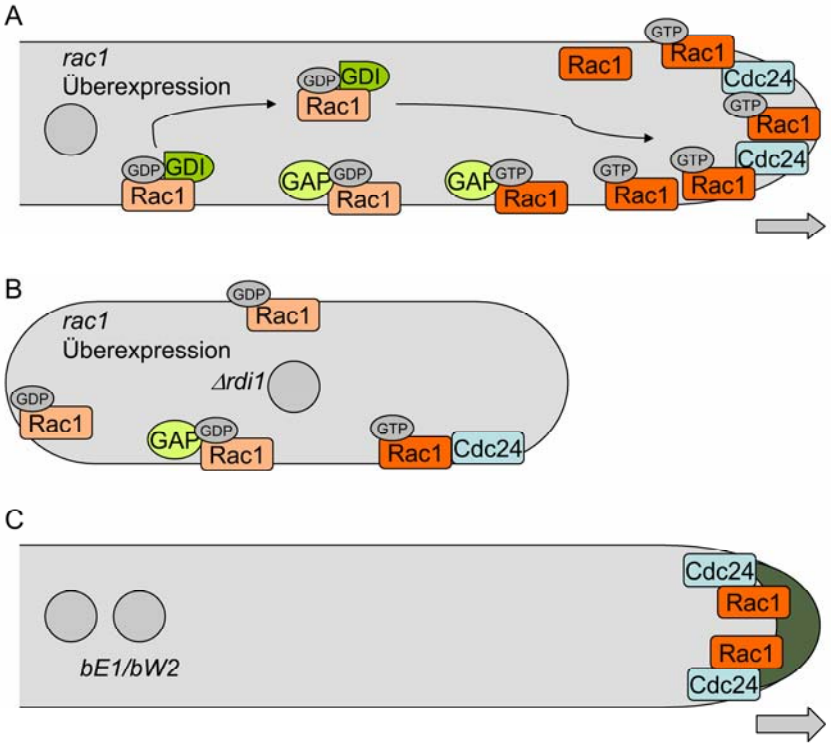


Abbildung 50: Modell der molekularen Kontrolle des polarisierten Spitzenwachstums in *U. maydis*.
A) Spontane Polarisierung durch Rac1-Überexpression. Über eine positive Rückkopplungsschleife bewirkt Rac1 polarisiertes Wachstum. Rac1 ist nicht am Apex stabilisiert, und muss an den Flanken der Hyphe über GAPs inaktiviert und von GDIs aus der Membran herausgelöst werden, um an die Spitze zu relokalisieren. **B)** In Abwesenheit von Rdi1 wird Rac1 nicht mehr effektiv aus der Membran herausgelöst, und kann selbst bei Überexpression kein gerichtetes, polares Wachstum induzieren. **C)** Polares Wachstum im dikaryotischen Filament. Durch *b*-Induktion wird am Ort des polaren Wachstums ein „Polarisom" aufgebaut, welches GEF und GTPase an dieser Stelle stabilisiert.

Interessanterweise hat eine *rdi1*-Deletion keinen Effekt auf das durch *b*-Induktion gebildete Filament, obwohl Rac1 essentiell für *b*-induziertes, filamentöses Wachstum ist. Hier muss ein anderer Mechanismus zur Aufrechterhaltung der Polarität postuliert werden, der zwar auf Rac1, aber nicht auf Rdi1-abhängige Akkumulation beruht. Durch die *b*-Induktion könnten weitere Faktoren an der Stelle des polaren Wachstums stabilisiert werden, die diesen Ort markieren und in Form eines Proteinkomplexes oder Gerüstes zur Bindung der Rac1-Signalkaskade führen (Abb. 50 C)). Solch ein Proteinkomplex könnte dem aus anderen Pilzen bekannten Polarisom entsprechen. Dieses Polarisom hält GEF und GTPase am Ort des polaren Wachstums, wo sie über verschiedene Effektoren die Veränderungen von Aktinzytoskelett und Zytoplasmamembran steuern (Evangelista et al., 1997; Kohno et al., 1996).
Es bleibt noch zu untersuchen, ob auch in *U. maydis* Rho-spezifische GAPs an dieser Umverteilung des Rac1-Signalmoduls beteiligt sind. Man könnte dies allerdings vermuten, da die Expression einer konstitutiv aktiven Variante von Rac1 zu isotropem Zellwachstum führt. Somit ist für die Aufrechterhaltung des durch Rac1-induzierten polaren Wachstums sowohl ein Wechsel zwischen aktiver, GTP gebundener und inaktiver, GDP gebundener Form von Rac1 als auch ein Wechsel zwischen membrangebundener und zytosolischer Form der GTPase notwendig.

Auch die Überexpression von Ras1 und Cdc24 führt zur Bildung langer Filamente. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Ras1 und Cdc24 an dem zufälligen Aufbau einer polaren Wachstumsstelle durch den beschriebenen selbstverstärkenden Mechanismus beteiligt sind. In einer *rdi1*-Deletionsmutante ist die Filamentbildung durch Überexpression von sowohl Cdc24, als auch Ras1 blockiert.
Cdc24 als Rac1-spezifischer GEF führt bei Überexpression zwar zu erhöhter Rac1-Aktivierung, allerdings ist bei Abwesenheit von Rdi1 keine Umverteilung und somit Stabilisierung des Signalmoduls an einer polaren Wachstumsstelle möglich. Dies wird deutlich durch den entsprechenden Phänotyp repräsentiert. Die Zellen bilden sehr kurze Filamente aus, die dann aber nicht weiter in die Länge wachsen, sondern stattdessen verdickt wirken (vgl. Abb. 40). Dies ließe sich tatsächlich dadurch erklären, dass sich das aktive Signalmodul beim Wachstum des Filaments über die Flanken verteilt hat, und nicht wieder an die Spitze rekrutiert werden kann.
Auch der morphologische Phänotyp der Ras1-Überexpression in Abwesenheit von Rdi1 zeigt, dass die Filamentbildung bis zu einem bestimmten Grad erfolgt, dann abbricht und

das Filament verdickt ist (vgl. Abb. 41). Die Blockade der Ras1-abhängigen Filamentbildung durch die *rdi1*-Deletion lässt vermuten, dass in *U. maydis* Ras1 über Rac1 signalisiert. In verschiedenen anderen Organismen ist bereits beschrieben, dass Ras1 direkt oder indirekt Rac1 aktiviert (Chen and Dickman, 2004; Vallim et al., 2005). In *U. maydis* wurde bereits gezeigt, dass Ras1 die Regulation der Vakuolenmorphologie tatsächlich über die Aktivierung von Rac1 steuert (Mahlert, Diss.). Möglicherweise erfolgt also die spontane Polarisierung nach Überexpression von Ras1 durch die direkte oder indirekte Aktivierung des Rac1-GEFs Cdc24.

Somit kann in *U. maydis* die Filamentbildung entweder über *b*-Induktion erfolgen, wobei eine Stabilisierung der entsprechenden Signalmodule an der Filamentspitze erfolgt, oder aber spontan über Überexpression von Ras1, Cdc24 oder Rac1. Im letzten Fall ist allerdings die Rdi1-Funktion erforderlich, wodurch die Signalmodule während des Streckenwachstums immer wieder an die Filamentspitze zurücktransportiert werden (Abb. 51).

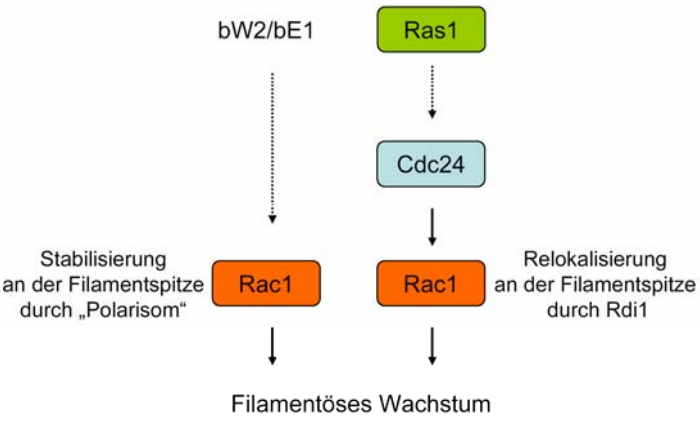


Abbildung 51: Spontane Polarisierung im Gegensatz zum *b*-induzierten Filament. Durch *b*-induziertes polares Wachstum ist abhängig von Rac1, allerdings erfolgt die Filamentbildung nicht über erhöhte Rac1 Expression. Stattdessen muss eine lokale Stabilisierung von aktivem Rac1 am Ort des polaren Wachstums postuliert werden. Alternativ kann Filamentbildung auch durch Überexpression von Ras1, Cdc24 oder Rac1 induziert werden. Dies ist allerdings abhängig von der Anwesenheit von Rdi1. Man kann postulieren, dass Rdi1 kontinuierlich aktives Rac1 an die Spitze des Filaments relokalisiert und so dessen Verteilung über die Filamentflanken verhindert.

Der Erhalt der Polarität in Hyphen und Filamenten birgt besondere Anforderungen. So müssen die Polaritätsmarker und auch die involvierten GTPase Signalmodule beim Wachstum der Hyphe immer neu an der Spitze etabliert, oder aber durch zusätzliche Faktoren stabilisiert werden.
Bei spontaner Polarisierung müssen Faktoren wie GDIs oder GEFs den Erhalt der hohen GTPase-Konzentration an der Spitze gewährleisten. Inwieweit in *U. maydis* GAPs an der spontanen Polarisierung beteiligt sind, bleibt noch zu untersuchen. Ein direkter Nachweis wäre, entsprechende Deletionsmutanten auf Filamentbildung durch Rac1-Überexpression zu testen. Im Falle des *b*-induzierten Filaments stellen andere Faktoren, möglicherweise ein Polarisom-ähnlicher Komplex, die Stabilisierung des Polaritätsmoduls an der Filamentspitze sicher.

Sowohl diese Studien zur molekularen Kontrolle des polarisierten Spitzenwachstums als auch die Komplementationsstudien mit chimären GTPasen und die Charakterisierung der GEFs Its1 und Cdc24, leisten einen Beitrag zum besseren Verständnis der komplexen Mechanismen der Signaltransduktion durch Rho-GTPasen. Da viele GTPasen, Effektoren und teilweise auch GEFs von Hefe bis zum Menschen stark konserviert sind, könnten die Ergebnisse möglicherweise auf höhere Organismen übertragen werden. Es existieren viele wichtige grundlegende Studien in Fibroblasten, Drosophila und *S. cerevisiae* zu diesen Themen. *U. maydis* bietet sich hierfür jedoch ebenfalls als geeigneter Modellorganismus an, da er genetisch leichter zugänglich ist als Fibroblasten, einfacher aufgebaut ist als *D. melanogaster* und dennoch eine größere Zahl an Rho-GTPasen aufweist als *S. cerevisiae.*

4. Material

Stämme

U. maydis-Stämme

Tabelle 2: Verwendete *U. maydis*-Stämme.

Stamm	Genotyp	Kernphase	Referenz
FB1	*a1 b1*	haploid	(Banuett and Herskowitz, 1989)
Bub8	*a2 b4*	haploid	Laborsammlung
Bub8Δ*cdc42*	*a2 b4*	haploid	Laborsammlung (M. Mahlert)
Bub8Δ*rac1*	*a2 b4*	haploid	Laborsammlung (M. Mahlert)
AB31	*a2 pcrg::bW2/bE1*	haploid	(Brachmann et al., 2001)
Bub8Δ*rdi1*	*a2 b4*	haploid	Laborsammlung (A. Hlubek)

E. coli-Stämme

Für sämtliche Klonierungen wurde der Stamm DH5α (Hanahan, 1983) verwendet. Hierbei handelt es sich um ein Derivat des Stammes K12 mit folgenden genetischen Markern: F^-, *endA1*, *hsdR17*(r_K^-, m_K^+), *supE44, thi-1, gyrA96* (Nal^r), *relA1, recA1, Δ(argF-lacIZYA)U169 (Φ80dlacZΔM15)*.

S. cerevisiae-Stämme

Tabelle 3: Verwendete *S. cerevisiae*-Stämme.

Stamm	Genotyp
W303	MATα; ura3-52; trp1D2; leu2-3-112 ; his3-11 ; ade2-1 ; can1-100
Z718	MATα; cdc42-1 t.s.; ura3; his4; leu2; trp1

Medien

Medien zur Kultivierung von *U. maydis*

Bezeichnung	**Lösung in H_2O dest.**
NSY-Glycerin-Medium	8 g/l Nutrient Broth 5 g/l Saccharose 1 g/l Hefe-Extrakt 69,6 % (v/v) Glycerin
PD- Agar	24 g/l Potato Dextrose Broth 2,0 % (w/v) Agar
PD-Charcoal-Agar	24 g/l Potato Dextrose Broth 10 g/l Charcoal 2,0 % (w/v) Agar
Regenerations-Agar	10 g/l Hefe-Extrakt 20 g/l Pepton 2,0 % (w/v) Saccharose bzw. Glukose bzw. Arabinose 182,2 g/l Sorbitol 1,5 % (w/v) Agar
YEPA-Agar	10 g/l Hefe-Extrakt 20 g/l Pepton 2,0 % (w/v) Agar 2,0 % (w/v) Arabinose
YEPD-Agar	wie YEPA-Agar jedoch statt Arabinose 2,0 % (w/v) Glukose
YEPS-Medium	10 g/l Hefe-Extrakt 20 g/l Pepton 2,0 % (w/v) Saccharose
Wasseragar	2,0 % (w/v) Agar
YNB-A-Medium	1,7 g/l Yeast Nitrogen Base 0,2 % (w/v) Ammoniumsulfat 4,0 % (v/v) Arabinose-Stammlösung (50,0 % (w/v))

YNB-G-Medium	1,7 g/l Yeast Nitrogen Base 0,2 % (w/v) Ammoniumsulfat 4,0 % (v/v) Glukose-Stammlösung (50,0 % (w/v))
YNB-Regenerations-Agar	1,7 g/l Yeast Nitrogen Base 0,2 % (w/v) Ammoniumsulfat 2,0 % (w/v) Glukose bzw. Arabinose 182,2 g/l Sorbitol 1,5 % (w/v) Agar

Medien zur Kultivierung von *E. coli*

Bezeichnung	**Lösung in H_2O dest.**
dYT-Medium	16 g/l Trypton 10 g/l Hefe-Extrakt 5 g/l NaCl
dYT-Agar	wie dYT-Medium 1,3 % (w/v) Agar
dYT-Glycerin-Medium	wie dYT-Medium 69,6 % (v/v) Glycerin

Medien zur Kultivierung von *S. cerevisiae*

5-FOA Platten	Hefe Minimalmedium, jedoch pH nicht eingestellt, 2X konzentriert 1g/l 5-FOA 0,15g/l Uracil 10 Minuten autoklavieren Zum Giessen der Platten 1:1 mit 2X Agar mischen

Hefe- Minimalmedium

6,7 g/l YNB
1,56 g/l Aminosäure-Mix:
- 2g Alanin
- 2g Arginin
- 2g Asparagin
- 2g Asparaginsäure
- 2g Cystein
- 2g Glutamin
- 2g Glutaminsäure
- 2g Glycin
- 2g Inositol
- 2g Isoleucin
- 2g Lysin
- 0,2g para- Aminobenzoesäure
- 2g Phenylalanin
- 2g Prolin
- 2g Serin
- 2g Threonin
- 2g Tyrosin
- 2g Uracil
- 2g Valin

20 g/l Glucose
bei 50°C lösen, pH auf 5,6 einstellen
20 g/l Agar
10 Minuten autoklavieren
nach Bedarf Methionin (200 mg/l), Adenin (200mg/l),
Leucin (1g/l), Histidin (200 mg/l) sterilfiltriert zufügen

Chemikalien

Tabelle 4: Verwendete Chemikalien.

Name	Bezugsquelle
α-^{32}P-dATP	Hartmann Analytic (Braunschweig)
Acrylamid	Roth (Karlsruhe)
Adenin	Sigma (Deisenhofen)
Agar-Agar	Roth (Karlsruhe)
Agarose	Biozym (Hessisch Oldendorf)
Alanin	Serva (Heidelberg)
Ammoniumnitrat	Roth (Karlsruhe)
Ammoniumsulfat	Roth (Karlsruhe)
Ampicillin	Roth (Karlsruhe)
APS	Roth (Karlsruhe)
Arabinose	Merck (Darmstadt)
Arginin	Sigma (Deisenhofen)
Asparagin	Sigma (Deisenhofen)
Asparaginsäure	Serva (Heidelberg)
Bacto-Agar	Difco (Detroit)
Bromphenolblau	Roth (Karlsruhe)
Calciumchlorid	Merck (Darmstadt)
Carboxin	Riedel-de Haen (Seelze)
Casaminoacids	Difco (Detroit)
Chloroform	Roth (Karlsruhe)
Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs)	Roth (Karlsruhe)
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Roth (Karlsruhe)
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck (Darmstadt)
EDTA	Merck (Darmstadt)
Essigsäure	Roth (Karlsruhe)
Ethanol (vergällt)	Schmidt-GmbH (Dillenburg)
Ethanol (unvergällt)	Roth (Karlsruhe)
Ethidiumbromid	Roth (Karlsruhe)
FM4-64 – Farbstoff	Molecular Probes (Leiden, NL)
Glukose	Roth (Karlsruhe)
Glycerin	Roth (Karlsruhe)
Glycin	Roth (Karlsruhe)
L-Glutamin	Sigma (Deisenhofen)
H_2O, für molekularbiologische Zwecke	Braun (Melsungen)
Hefeextrakt	GibcoBRL Life Technologies (Eggenstein)
Heringssperma DNA	Sigma (Deisenhofen)
Histidin	Merck (Darmstadt)
Isoleucin	Merck (Darmstadt)
HygromycinB	Duchefa (Haarlem, NL)
IPTG	Peqlab Biotechnologie GmbH (Erlangen)

Isopropanol	Roth (Karlsruhe)
Kaliumacetat	Merck (Darmstadt)
Kaliumchlorid	Merck (Darmstadt)
Kaliumnitrat	Roth (Karlsruhe)
Kupfersulfat	Roth (Karlsruhe)
L-Histidin	Roth (Karlsruhe)
L-Leucin	Merck (Darmstadt)
Lysin	Merck (Darmstadt)
Magnesiumchlorid	Merck (Darmstadt)
Methanol	Roth (Karlsruhe)
Methionin	Merck (Darmstadt)
Natriumacetat	Merck (Darmstadt)
Natriumchlorid	Roth (Karlsruhe)
Natriumcitrat	Roth (Karlsruhe)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth (Karlsruhe)
Natriumdihydrogenphosphat	Roth (Karlsruhe)
Natriumhydroxid	Roth (Karlsruhe)
Orange G	Sigma (Deisenhofen)
p - Aminobenzoesäure	Sigma (Deisenhofen)
Paraffinöl	Merck (Darmstadt)
Pepton	Difco (Detroit, US)
Phenol	Roth (Karlsruhe)
Phenylalanin	Merck (Darmstadt)
Polyethylenglycol (PEG 4000)	Merck (Darmstadt)
Potato-Dextrose	Difco (Detroit, US)
Prolin	Serva (Heidelberg)
Proteinase K	Sigma (Deisenhofen)
Saccharose	Roth (Karlsruhe)
Salzsäure	Roth (Karlsruhe)
Sequagel^{TM} XR	Biozym (Hessisch Oldendorf)
Serin	Roth (Karlsruhe)
Sorbitol	Sigma (Deisenhofen)
Threonin	Sigma (Deisenhofen)
TEMED	Roth (Karlsruhe)
Tris	Roth (Karlsruhe)
TRIZOL	Invitrogen (Karlsruhe)
TritonX-100	Sigma (Deisenhofen)
Trypton	GibcoBRL Life Technologies (Eggenstein)
Tryptophan	Merck (Darmstadt)
Tyrosin	Sigma (Deisenhofen)
Uracil	Sigma (Deisenhofen)
Valin	Merck (Darmstadt)
X-Gal	Roth (Karlsruhe)

Puffer und Lösungen

Falls nicht anders angegeben, sind alle Puffer und Lösungen mit H_2O bidest. angesetzt.

AE-Puffer (RNA-Präparation)	50 mM Na-Acetat, pH 5,3 10 mM Na_2-EDTA
Ampicillin-Lösung	10 mg/ml Ampicillin
Carboxin-Lösung	2 mg/ml Carboxin in Methanol
DNA-Auftragspuffer (10x)	0,1 % (w/v) Bromphenolblau 0,2 % (w/v) Xylencyanol FF 0,2 % (w/v) Orange G 50 % (w/v) Saccharose 1 mM Na_2-EDTA
dNTP-Lösung	10 mM dATP 10 mM dCTP 10 mM dGTP 10 mM dTTP
Elutionspuffer (GST-Aufreinigung)	50 mM tris-HCl, pH 8,0 150 mM NaCl 5 mM $MgCl_2$ Frisch zugeben: 5 mM DTT 15 mM red. Gluthation
Lysis-Puffer (DNA-Präparation aus *U. maydis)*	2,0 % (w/v) Triton X-100 1 % (w/v) SDS 100 mM NaCl 10 mM Tris-HCl, pH 8,0 1 mM Na_2-EDTA
Lysis Puffer (Protein Aufreinigung)	50 mM Tris-HCl, pH 7,6 50 mM NaCl 5 mM $MgCl_2$ 1 mM DTT 1mM PMSF

Lysozym-Lösung	10 mg/ml Lysozym 10 mM Tris/HCl, pH 8,0
MOPS-Puffer (10 x)	200 mM MOPS, pH 7,0 80 mM Na-Acetat 10 mM Na_2-EDTA
Northern-Hybridisierungspuffer	50 mM PIPES, pH 6,5 100 mM NaCl 50 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,0 1 mM EDTA 5 % (w/v) SDS
Northern-Waschpuffer	1 x SSC 5 % SDS
Northern-Strip-Puffer	0,1 x SSC 0,1 % SDS
PCR-Puffer (*Taq* DNA-Polymerase)	10 mM Tris/HCl, pH 8,3 50 mM KCl 1,5 mM $MgCl_2$
Phenol/AE	50 % (v/v) Phenol 50 % (v/v) AE-Puffer
Phenol/Chloroform	50 % (v/v) Phenol 50 % (v/v) Chloroform
RNA-Auftragspuffer	50 % (w/v) Saccharose 0,25 % (w/v) Bromphenolblau 0,25 % (w/v) Xylencyanol FF in MOPS-Puffer
SCS-Puffer (Protoplastierung)	20 mM Natriumcitrat-Puffer pH 5,8 1 M Sorbitol
SCS-Novozym-Lösung (Protoplastierung) (sterilfiltriert, frisch angesetzt)	0,5 % (w/v) Novozym 234 in SCS-Lösung

STET-Puffer	50 mM EDTA 50 mM Tris/HCl, pH8 8 % (w/v) Saccharose 5 % (v/v) Triton X 100 2 M Essigsäure
Southern-Denaturierungslösung	0,25 M HCl
Southern-Transferlösung	0,4 M NaOH
Southern-Hybridisierungspuffer	7 % (w/v) SDS 500 mM Natriumphosphat-Puffer pH 7,0
Southern-Waschpuffer	1 % (w/v) SDS 100 mM Natriumphosphat-Puffer pH 7,0
SSC (20 x)	300 mM Na-Citrat, pH 7,0 3 M NaCl
STC-Puffer (Protoplastierung)	1 M Sorbitol 10 mM Tris/HCl, pH 7,5 100 mM $CaCl_2$
STC/PEG (Transformation *U. maydis*)	60 % (v/v) STC-Puffer 40 % (w/v) Polyethylenglykol
TAE-Puffer	40 mM Tris/HCl, pH 8,3 20 mM Na-Acetat 2 mM Na_2-EDTA
TE-Puffer	10 mM Tris/HCl-Puffer pH 8,0 1 mM Na_2-EDTA
TE mit RNAseA	50 µg/ml RNAseA in TE-Puffer
X-Gal-Lösung	2,0 % (w/v) X-Gal in N, N-Dimethylformamid

verwendete Kits

Tabelle 5: Verwendete Kits.

Name	Bezugsquelle
BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems (Darmstadt)
JETSORB'g'Kit	Genomed (Bad Oeynhausen)
Maxi-Kit Jetstar 2.0	Genomed (Bad Oeynhausen)
Megaprime Labeling Kit	Amersham (Braunschweig)
peqGOLD Plasmid Mini Prep Kit I	peqLAB (Erlangen)
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen (Hilden)
Topo TA Cloning Kit	Invitrogen (Karlsruhe)
Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System	Promega (Mannheim)
PolyATtract mRNA Isolation Systems	Promega (Mannheim)
Qiagen RNeasy Mini Kit	Qiagen (Hilden)
SYBR GREEN PCR Master Mix	ABI
cDNA Archive Kit	ABI

Enzyme und Proteine

Tabelle 6: Verwendete Enzyme und Proteine.

Name	Bezugsquelle
Calf Intestine Alkaline Phosphatase (CIAP)	Amersham (Braunschweig)
Lysozym	Boehringer Mannheim (Mannheim)
Novozym 234	Novo Nordisc (Koppenhagen, DN)
Pfx DNA-Polymerase	Promega (Mannheim)
Restriktionsendonukleasen	Amersham (Braunschweig); New England Biolabs GmbH (Schwalbach)
RNAse A	Serva (Heidelberg)
T4-DNA-Ligase	Boehringer Mannheim (Mannheim)
Taq-Polymerase	GibcoBRL Life Technologies (Eggenstein)
SuperScript reverse Transkriptase	Invitrogen (Karlsruhe)

Sonstige Materialien

Tabelle 7: Sonstige Materialien.

Material	Bezugsquelle
BIODYNE B - Membran (0,45 µm)	Pall (Dreieich)
Blottingpapier	Macherey-Nagel (Düren)
Falcon-Röhrchen (15ml und 50 ml)	Greiner (Frickenhausen)
Faltenfilter	Schleicher und Schuell (Dassel)
Glasperlen	Sigma (Deisenhofen)
Kunststoff-Küvetten	Sarstedt (Nümbrecht)
MobiSpin Columns	MoBiTec (Göttingen)
Petrischalen	Greiner (Frickenhausen)
Pipettenspitzen	Greiner (Frickenhausen)
Röntgenfilm CEA RP New medical X-Ray Film	CEA AB (Strängnäs, Schweden)
Schikanekolben	Ochs (Bovenden)
sterile Spritzen und Kanülen	Braun (Melsungen)
Sterilfilter	Sarstedt (Nümbrecht)
Storage Phosphor Screen	Amersham (Freiburg)

Plasmide

Tabelle 8: In dieser Arbeit verwendete Plasmide.

Name	Resistenz	Herkunft	Verwendung
P123-Nterminal-GFP	Amp, Cbx	Laborsammlung	Expression der Int-DH Domäne in Δ*don1*
pCR2.1-Topo	Amp	Invitrogen (Topo TA Cloning Kit)	Klonierung und Sequenzierung von PCR-Produkten
pMF2-2C	Amp, Cbx	Laborsammlung (Brachmann et al., 2004)	Gewinnung der Cbx-Kassette und des *nar*-Promotors als SfiI-Fragment zur Konstruktion der konditionalen *cdc24*-Mutante

pMF2-1P	Amp, Phleo	Laborsammlung (Brachmann et al., 2004)	Gewinnung der Phleo-Kassette und des *crg*-Promotors als SfiI-Fragment zur Konstruktion der konditionalen *int*-Mutante und der konditionalen *cdc24*-Mutante
pRU11ΔNotI	Amp, Cbx	Laborsammlung	Expressionsvektor für *U. maydis*
pGBT9-3H/B	Amp	Laborsammlung (Tirode et al., 1997)	Expressionsvektor für *S. cerevisiae*
pUC18	Amp	MBI Fermentas	Klonierungsvektor
pGST parallel-1	Amp	Laborsammlung (Sheffield et al., 1999)	Int-DH Expression und GST Aufreinigung
pRac1ΔNAT	Amp, NAT	Laborsammlung	Deletion von *rac1*
pUC18(rdi1-up-hyg-down)	Amp, Hyg	Laborsammlung/ Diplomarbeit Hlubek	Deletion von *rdi1*

Tabelle 9: In dieser Arbeit konstruierte Plasmide.

Name	Resistenz	Anmerkungen
pIntcondPhleo	Amp, Phleo	Verwendet zur Herstellung der konditionalen *int*-Mutante. pUC18 enthält die upstream-Sequenz von *int* gefolgt von der Phleo-Kassette, dem *crg*-Promotor und dem *int*-ORF. Die upstream-Sequenz von *int* wurde mittels PCR unter Verwendung der Primer MC630 und MC631 amplifiziert. Das Fragment, das den ORF enthält, wurde unter Verwendung der Primer MC632 und MC633 amplifiziert. Das mit *Eco*RI und *Nar*I ausgeschnittene Fragment wurde in *U. maydis* eingebracht.
pCdc24condPhleo	Amp, Phleo	Verwendet zur Herstellung der konditionalen *cdc24*-Mutante. pUC18 enthält die upstream-Sequenz von *cdc24* gefolgt von der Phleo-Kassette, dem *crg*-Promotor und dem *cdc24*-ORF. Die upstream-Sequenz von *int* wurde mittels PCR unter Verwendung der Primer MC626 und MC627 amplifiziert. Das Fragment, das den ORF enthält, wurde unter Verwendung der Primer MC628 und MC629 amplifiziert. Der Vektor wurde mit *Hind*III und *Nde*I geschnitten und in *U. maydis* eingebracht.

pCdc24condCbx	Amp, Cbx	Verwendet zur Herstellung der konditionalen *cdc24*-Mutante. pUC18 enthält die upstream-Sequenz von *cdc24* gefolgt von der Cbx-Kassette, dem *nar*-Promotor und dem *cdc24*-ORF. Die upstream-Sequenz von *int* wurde mittels PCR unter Verwendung der Primer MC626 und MC627 amplifiziert. Das Fragment, das den ORF enthält, wurde unter Verwendung der Primer MC628 und MC629 amplifiziert. Der Vektor wurde mit *Hind*III und *Nde*I geschnitten und das so erhaltene Fragment in *U. maydis* eingebracht.
pGST parallel-1-IntDH	Amp	GST Fusion der Intersectin DH Domäne. Das entsprechende Fragment wurde mit MD660 und MD662 amplifiziert und über *Eco*RI und *Not*I in den Vektor eingebracht.
p123IntDH	Amp, Cbx	Kodiert für die DH Domäne von *int*, der in die NcoI-und *Not*I-Schnittstelle von p123 einkloniert wurde. Verwendet zur konstitutiven Expression der DH-Domäne vom *etef* Promotor
pRU11ΔNotI-"Chimäre Proteine"	Amp, Cbx	Über die *Nde*I-und *Not*I-Schnittstelle von pRU11ΔNotI wurden verschiedene Allele einkloniert; zur Expression chimärer GTPasen vom regulierbaren *crg*-Promotor in *U. maydis.* Vor dem Einbringen mit *Ssp*I linearisiert.
pRU11ΔNotI- Rac1^{W56F}	Amp, Cbx	Über die *Nde*I-und *Not*I-Schnittstelle von pRU11ΔNotI wurde *rac1*^{W56F} einkloniert; zur Expression vom regulierbaren *crg* Promotor in *U. maydis.* Vor dem Einbringen mit SspI linearisiert.
pRU11ΔNotI- Cdc42^{F56W}	Amp, Cbx	Über die *Nde*I-und *Not*I-Schnittstelle von pRU11ΔNotI wurde *cdc42*^{F56W} einkloniert; zur Expression vom regulierbaren *crg* Promotor in *U. maydis.* Vor dem Einbringen mit SspI linearisiert.
pGBT9-3H/B - Rac1^{W56F}	Amp	Über die *Nde*I-und *Not*I-Schnittstelle von pbridge wurde *rac1*^{W56F} einkloniert; zur Expression vom regulierbaren MET25 Promotor in *S. cerevisiae.*
pGBT9-3H/B - Cdc42^{F56W}	Amp	Über die *Nde*I-und *Not*I-Schnittstelle von pbridge wurde *rac1*^{W56F} einkloniert; zur Expression vom regulierbaren MET25 Promotor in *S. cerevisiae.*

Oligonukleotid-Primer

Primer-Nummer	Funktion	Sequenz
MB123	Gewinnung des *cdc42* ORF,NotI Schnittstelle am 3´Ende	GTGCGGCCGCTCAGAGAATGGCGCAC
MB479	Gewinnung des *cdc42* ORF oder des Rac1 ORF, 5´NdeI	GGCCATATGCAGACCATCAAGTG
MB508	Gewinnung des *rac1* ORF, NotI Schnittstelle am 3´Ende	TGTTCGGCGGCCGCTCTTAAAGAATCAAACA
MB508neu	Gewinnung des *rac1* ORF, NotI Schnittstelle am 3´Ende	TGTTCGGCGGCCGCTCTTATAGAATCAAACA
MB332	Amplifikation der *gdi* down-Flanke für *gdi* Deletion	GCGGCCGCTTTAGTGTGGGGTCAAGA
MB333	Amplifikation der *gdi* up- Flanke für *gdi* Deletion	GCATGCCGAATGCCTTTGGACTAT
MB334	Amplifikation der *gdi* up- Flanke für *gdi* Deletion	CGGCCGCGCGACATGATGACGAAGG
MB335	Amplifikation der *gdi* down-Flanke für *gdi* Deletion	GGTACCGGCCATCCATGTCTAGTG
MB378	PCR Kontrolle der *gdi* Deletion	CAGAACTCGCTGGTAGTTACC
MB658	Amplifikation der Module für die chimären Proteine aus Cdc42	TCGGAGTATGTTCCCACGGTGTTTGACAACTA
MB659	Amplifikation der Module für die chimären Proteine aus Cdc42	TAGTTGTCAAACACCGTGGGAACATACTCCGA
MB660	Amplifikation der Module für die chimären Proteine aus Cdc42	GCGACCGACTGCGACCCTTAAGTTACCCGCAGACGGATG
MB661	Amplifikation der Module für die chimären Proteine aus Cdc42	CATCCGTCTGCGGGTAACTTAAGGGTCGCAGTCGGTCGC
MB662	Amplifikation der Module für die chimären Proteine aus Cdc42	GTGGGAACCCAGGTAGATCTGCGCGACGACCAC
MB663	Amplifikation der Module für die chimären Proteine aus Cdc42	GTGGTCGTCGCGCAGATCTACCTGGGTTCCCAC
MB664	Amplifikation der Module für die chimären Proteine aus Cdc42	CAAGTACGTCGAGTGCAGTGCACTGACGCAAAAGGG

MB665	Amplifikation der Module für die chimären Proteine aus Cdc42	CCCTTTTGCGTCAGTGCACTGCACTCGACGTACTTG
MB666	Amplifikation der Module für die chimären Proteine aus Rac1	GAATACATCCCCACGGTGTTTGACAACTA
MB667	Amplifikation der Module für die chimären Proteine aus Rac1	TAGTTGTCAAACACCGTGGGGATGTATTC
MB668	Amplifikation der Module für die chimären Proteine aus Rac1	ACGACCGGTTAAGACCCTTAAGTTACCCGCAAACCGACG
MB669	Amplifikation der Module für die chimären Proteine aus Rac1	CGTCGGTTTGCGGGTAACTTAAGGGTCTTAACCGGTCGT
MB670	Amplifikation der Module für die chimären Proteine aus Rac1	GTGGGAACCAAGTTAGATCTGCGCGAGGA
MB671	Amplifikation der Module für die chimären Proteine aus Rac1	TCCTCGCGCAGATCTAACTTGGTTCCCAC
MB672	Amplifikation der Module für die chimären Proteine aus Rac1	AAGTATTTGGAGTGCAGTGCACTGACCCAGAAGGGATT
MB673	Amplifikation der Module für die chimären Proteine aus Rac1	AATCCCTTCTGGGTCAGTGCACTGCACTCCAAATACTT
MB724	PCR Kontrolle der *gdi* Deletion	AAGCGACGCGGTTGGTA
MB725	PCR Kontrolle der *gdi* Deletion	ACCGGCAAATCACCATGGCC
MB748	Sondenherstellung für Southernblot der gdi- Deletion; anti *gdi*	GCATGATGAGTTTGCTTACC
MB749	Sondenherstellung für Southernblot der gdi- Deletion; anti *gdi*	CGAGAAAAAGTCGTCCGCTG
MB759	Gewinnung des *gdi* ORF mit einer KpnI Schnittstelle am 5´Ende	GGTACCATGTCGCATGCACAGGATCC
MB760	Gewinnung des *gdi* ORF mit einer KpnI Schnittstelle am 3´Ende	GGTACCGCCACTACAAAGGGCATGGTGA
MB761	Gewinnung des *gdi* ORF mit einer NotI Schnittstelle am 3´Ende	GCGGCCGCTCACACTACAAAGGGCATGG
MB765	PCR Kontrolle der *gdi* Deletion	AGCATCACCGGCTGTGCTTC

MB766	PCR Kontrolle der richtigen Integration in den ip- Locus	GAGCAGTTCATGATGGTAAG
MB767	PCR Kontrolle der richtigen Integration in den ip- Locus	TTCGAGCTGGTTGCCTGC
MB768	PCR Kontrolle der richtigen Integration in den ip- Locus	CTATGCGGCATCAGAGCAG
MB769	PCR Kontrolle der richtigen Integration in den ip- Locus	GAGCAGTTCATGATGGTGTG
MC25	Einfügen des WF Austausches in rac1/ fwd	TCTCTCGGTCTCTTCGATACTGCGGGT
MC26	Einfügen des WF Austausches in rac1/rev	ACCCGCAGTATCGAAGAGACCGAGAGA
MC27	Einfügen des FW Austausches in Cdc42/ fwd	ACACTCGGATTGTGGGATACCGCCGGT
MC28	Einfügen des FW Austausches in Cdc42/rev	ACCGGCGGTATCCCACAATCCGAGTGT
MC 523	Amplifikation der cdc24 up-Flanke mit PstI Schnittstelle (konditionale Mutante)	CGCTGCAGTCGCTGCTGCCTCTCCGT
MC524	Amplifikation der cdc24 up-Flanke mit SfiI Schnittstelle (konditionale Mutante)	GCGGCCATCTAGGCCCGGACCTGAACGCAAGCG
MC525	Amplifikation der ersten 1000 bp von cdc24 mit SfiI site (konditionale Mutante)	GCGGCCTGAGTGGCCATGGCTGCTTCCACATCG
MC526	Amplifikation der ersten 1000 bp von cdc24 mit KpnI site (konditionale Mutante)	GCGGTACCAACGTTTTCTTCGACA
MC527	Amplifikation der Intersectin up-Flanke mit PstI Schnittstelle(konditionale Mutante)	CGCTGCAGTGAGCTACAGGCAGAA
MC528	Amplifikation der intersectin up-Flanke, SfiI Schnittstelle (konditionale Mutante)	GCGGCCATCTAGGCCGTTGTTGTACATGCCC
MC529	Amplifikation der ersten 1000 bp von intersectin mit SfiI site(konditionale Mutante)	GCGGCCTGAGTGGCCATGCAAGGACACGGCT

MC530	Amplifikation der ersten 1000 bp von intersectin mit BamHI site (konditionale Mutante)	GCGGATCCTGCTGTGACGCACGTT
MC608	Phleo 5' out Kontrollprimer	AGGATGGCAGAGGCATCAGCAGCT
MC609	Phleo 5' out Kontrollprimer	TCCAGAACGATGCAGTCTGGAGGC
MC610	Kontrolle kond cdc24 Mutante/ up Integration	GCACGCATCCCACTCAGCGACTAA
MC611	Kontrolle kond cdc24 Mutante/ Gen	TCCAACGCCAGATTGTAGTTGGCG
MC612	Kontrolle kond int Mutante/ up Integration	TACGCCATCGCACCCGTAGCTAGT
MC613	Kontrolle kond int Mutante/ Gen	CGTCTTTCTTCGGGGCGACG
MC883	pMF2-2c Kontrolle 5'out	CACTTCTTCCGCGATCTTCC
MC884	pMF2-2c Kontrolle 3'out	CAGCATCTTAGCTTGCTTCC
MC937	Int 3' RACE antisense dt adaptor	GACTCGAGTCGACATCGATTTTTTTTTTTTTTTT
MC938	Int 3' RACE antisense sequenz spez adaptor	GACTCGAGTCGACATCGA
MD660	Amplifikation intersectin-DH (NcoI in p123)	GCGGAATTCGCCATGGCGGGTGCTCCATCGTGGTCGAGCCTG
MD661	Amplifikation intersectin-DH (NotI in p123)	GCGGCGGCCGCCTAAGTGTTTGAAGCGTTGGCG
MD662	Amplifikation intersectin-DH (NotI in p123)	GCGGCGGCCGCTCCTAACGTACTTGATCTCCCAGCCACAG
MD695	qRT primer Exon2-Exon3 rev	CGTCGCTGTCTTCGTTCGT
MD696	qRT primer Exon2-Exon3 fwd	CCGCCACGTATTTGGAGCT
MD697	qRT primer Exon2-Intron2 rev	AATCCTTCCAACGAGCGGA
MD698	qRT primer Exon2-Intron2 fwd	TGGCGGTCCAAAGATCCTC
MD699	qRT primer Exon1-Intron1 rev	GGCGGAAGAGGTCAGCAAG

MD700	qRT primer Exon1-Intron1 fwd	CGTCGAGCCGATTGATAAGC
MD701	qRT primer Intron tuba Kontrolle fwd	TTCCGAGTGCGGCGAG
MD702	qRT primer Intron tuba Kontrolle rev	CGCGAGACTGCCATTCTCTC
rt-eIF-2B-F	qRT primer , pos Kontrolle, rt-eIF-2B-F	ATCCCGAACAGCCCAAAC
rt-eIF-2B-R	qRT primer , pos Kontrolle, rt-eIF-2B-R	ATCGTCAACCGCAACCAC
	Sequenzierprimer Hyg 5'out IRD800	GACTCACATCTGCCGCCA
	Sequenzierprimer Hyg 3' out IRD800	CGCTGCTGCGCCGCGAAGC
	Sequenzierprimer Met25 – NdeI IRD800	CGTGTAATACAGGGTCGTC
	Sequenzierprimer Met25 – NotI IRD800	GGCAATTCCTTACCTTCC
M13fwd	IRD800 Sequenzierprimer	GTAAAACGACGGCCAGT
M13rev spezial	IRD800 Sequenzierprimer	CAGGAAACAGCTATGACC

5. Methoden

5.1 Anzucht von Mikroorganismen

Anzucht von *E. coli*

Flüssigkulturen von *E. coli* wurden in autoklaviertem dYT-Medium unter aeroben Bedingungen angezogen. Dem Medium wurde, wenn nötig, Ampicillin mit einer Endkonzentration von 100 µg/ml zugesetzt.
Zur Kultivierung auf Festmedium wurde dYT-Agar verwendet, wenn nötig mit oben genannter Konzentration an Ampicillin. Zum Nachweis von β-Galaktosidase-Aktivität im Blau-Weiß-Test wurde X-Gal mit einer Endkonzentration von 0,02 % (w/v) zugegeben.
Bei der Anzuchttemperatur wurde für Über-Nacht-Kulturen (ÜNKs) 37°C gewählt.
Zum Anlegen von Dauerkulturen wurden ÜNKs mit dYT-Glycerin-Medium im Verhältnis 1:1 gemischt und bei -80°C eingefroren.

Anzucht von *U. maydis*

Flüssigkulturen von *U. maydis* wurden meist auf YEPS-Medium angezogen, wobei auf gute Durchlüftung des Medium geachtet wurde, um aerobe Bedingungen zu gewährleisten. Wenn nötig, wurde Hygromycin (200 µg/ml Endkonzentration), Carboxin (2 µg/ml Endkonzentration) oder Nourseothricin (150 µg/ml Endkonzentration) zugesetzt. Die Zugabe der sterilfiltrierten Antibiotika (ABs) erfolgte nach dem Autoklavieren. Die Induktion des *crg*-Promotors erfolgte auf YNB-A-Medium, die Induktion des *nar*-Promotors auf YNB Medium mit 0,2% Kaliumnitrat. Die Anzucht der Kulturen erfolgte über Nacht oder bis zu mehreren Tagen bei 28°C.
Die Kultivierung auf Festmedium geschah auf YNB-G-Agar, YNB-A-Agar, PD-Agar, YNB-Regenerationsagar oder Regenerationsagar, falls erforderlich mit oben genannten AB-Konzentrationen.
Für Dauerkulturen wurden ÜNKs mit NSY-Glycerin-Medium im Verhältnis 1:1 gemischt und bei -80°C gelagert.

Anzucht von *S. cerevisiae*

Flüssigkulturen wurden in YEPG – Medium bei 24 °C aerob oder anaerob angezogen.
Als Festmedium wurde Hefe – Minimalmedium gewählt, wobei alle Aminosäuren, außer die für die entsprechende Selektion genutzten, zugesetzt wurden.
Die Inkubation erfolgte bei 24°C, bzw. bei 37°C bei den Versuchen mit der temperatursensitiven Mutante von Cdc42.

5.2 DNA-Präparationen

Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* - analytischer Maßstab

Die Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde nach der Methode der Alkalischen Lyse (Birnboim and Doly, 1979) oder alternativ der Kochenden Lyse durchgeführt. In einigen Fällen wurde auch das peqGOLD Plasmid Mini Prep Kit I nach Herstellerangaben verwendet.

Alkalische Lyse
Es wurden 1,5 ml ÜNK in einem Reaktionsgefäß abzentrifugiert (1 min, 13000 rpm, RT, Tischzentrifuge) und das Pellet nach Entfernen des Überstandes in 100 µl SolA resuspendiert. Nachfolgend wurden in 5-Minuten-Abständen nacheinander 200 µl SolB und 150 µl SolC dazugemischt. Die Inkubation erfolgte auf Eis. Nach Zentrifugation (10 min, 14000 rpm, RT, Tischzentrifuge) wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 400 µl Chloroform versetzt und erneut zentrifugiert (15 min, 14000 rpm, 4°C, Tischzentrifuge). Die obere Phase wurde in ein neues Cup überführt und mit 400 µl Isopropanol versetzt. Es erfolgte eine Zentrifugation bei 14000 rpm, 20 min, 4°C in der Tischzentrifuge. Das Pellet wurde anschließend mit 400 µl 70 %igem Ethanol gewaschen und der verbliebene Alkohol restlos entfernt. Die sedimentierte DNA wurde in 30 µl Wasser aufgenommen, für 10 min bei RT auf dem Eppendorf-Schüttler gelöst und bei -20°C gelagert.

Kochende Lyse

Es wurden 1,5 ml ÜNK in einem Reaktionsgefäß abzentrifugiert (1 min, 13000 rpm, RT, Tischzentrifuge) und der Niederschlag nach Entfernen des Überstandes in 350 µl Stet-Puffer und 25 µl Lysozym 5 min schüttelnd inkubiert. Zur Denaturierung der Proteine wurden die Proben 40 sec bei 95°C in einem Eppendorf Heizblock inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation (10 min, 14000 rpm, RT, Tischzentrifuge) wurde das Pellet mit Hilfe eines Zahnstochers entfernt. Zur Fällung der Plasmid-DNA wurden 40 µl 3 M Natriumacetat-Lösung und 400 µl Isopropanol zugegeben, gemischt und zentrifugiert (10 min, 14000 rpm, RT, Tischzentrifuge). Das Pellet wurde in 70 % Ethanol gewaschen, 5 min getrocknet, in 30 µl TE mit 0,1 mg/ml RNAseA aufgenommen und 30 min bei RT im Eppendorf-Schüttler gelöst.

Präparation genomischer DNA aus *U. maydis* für PCR

Eine Kultur von *U. maydis* wurde bis zu einer OD_{600} von 0,3 - 0,4 auf YEPS angezogen und 2 ml davon wurden in einem Reaktionsgefäß abzentrifugiert (13000 rpm, 1 min, RT, Tischzentrifuge). Das Sediment wurde in 500 µl Lysis-Puffer resuspendiert und anschließend mit 0,3 g Glasperlen (425-600 Micron) und 500 µl Phenol/Chloroform versetzt. Der Ansatz wurde auf dem Vortexer geschüttelt (10 min, RT) und nachfolgend zentrifugiert (13000 rpm, 10 min, RT, Tischzentrifuge). 450 µl des Überstandes wurden mit 315 µl Isopropanol gemischt und erneut zentrifugiert (14000 rpm, 10 min, RT, Tischzentrifuge). Das Pellet wurde mit 500 µl 70 %igem Ethanol gewaschen und an der Luft getrocknet. Dann wurde das Sediment in 50 µl TE mit RNAseA aufgenommen, 30 min bei RT im Eppendorf-Schüttler gelöst und bei -20°C gelagert.

Präparation genomischer DNA aus *U. maydis* für Southern Blot

15 ml einer Übernachtkultur von *U. maydis* wurden in einem 15 ml Falcon-Röhrchen abzentrifugiert (4300 rpm, 15 min, 4°C, Heraeus-Zentrifuge). Das Medium wurde verworfen und die Zellen in 1 ml Wasser resuspendiert. Es erfolgte eine Zentrifugation (4300 rpm, 10 min, 4°C). Das Pellet wurde mit 200 µl Lysis-Puffer und 0,3g Glasperlen (425-600 Micron) versetzt. Nach Zugabe von 200 µl Phenol/Chloroform wurde 3,5 min gevortext. Anschließend wurden 200 µl TE-Puffer zugesetzt. Das Gemisch wurde abzentrifugiert (4000 rpm, 15 min, 4°C). Der Überstand wurde in ein Eppendorf-Cup gegeben. Es wurde 1 ml 96 % Ethanol zugegeben, gemischt und abzentrifugiert (4000 rpm, 2 min, 4°C, Tischzentrifuge). Das Pellet wurde 10 min getrocknet und in 400 µl TE mit 0,1 mg/ml RNAseA gelöst. Die Lösung wurde 30 min bei 37°C inkubiert. Zur Extraktion wurden 400 µl Phenol/Chloroform zugegeben und nach Vortexen abzentrifugiert (13000 rpm, 15 min, RT, Tischzentrifuge). Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Cup überführt und mit 11 µl 3 M Ammoniumacetat versetzt. Anschließend wurde 1 ml Ethanol zugegeben und gemischt. Nach Zentrifugation (14000 rpm, 2 min, 4°C) wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit 1 ml 70 % Ethanol gewaschen. Schließlich wurde es nach 10 minütiger Trocknung bei RT in 50 µl TE resuspendiert.

5.3 Amplifikation und Klonierung von DNA

Amplifikation von DNA über Polymerase-Kettenreaktion

Zur Amplifikation von DNA-Fragmenten wurde die Methode der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) verwendet (Innis and Gelfand, 1990). Mit Hilfe der PCR-Amplifikation können definierte DNA-Sequenzen aus einem komplexen DNA-Gemisch selektiv angereichert werden. Man benötigt hierzu zwei Primer, von denen der eine zum 3'-Bereich der gewünschten Sequenz und der andere zum Gegenstrang des 5'-Bereiches komplementär ist. Die Reaktionen wurden in einem Trio-Thermoblock (Biometra) oder einem Personal Cycler (Biometra) durchgeführt. Es wurde wahlweise die Taq-Polymerase oder die Pfx-Polymerase mit Korrekturlese-Funktion verwendet.

Reaktions-Ansatz (Taq-Polymerase)

10 % (v/v) Taq-Puffer (10x)

1,5 mM $MgCl_2$

0,2 mM dNTPs

je 0,5 µM Primer 1 und Primer 2

0,5 U Taq-Polymerase

10-100 ng DNA-Matrize

PCR-Programm:

	10 min,	94°C	anfänglicher Denaturierungs-Schritt
30-35x	1 min,	94°C	Denaturierung
	1 min,	40-70°C	Anlagerung der Primer, Temperatur abhängig vom Primer
	1 min je 1 kb,	72°C	Elongation
	10 min,	72°C	finale Polymerisation

Reaktions-Ansatz (Pfx-Polymerase)

10 % (v/v) Pfx-Amplifikationpuffer (10x)

1 mM $MgSO_4$

0,3 mM dNTPs

je 0,3 µM Primer 1 und Primer 2

0,5 U Pfx-Polymerase

0,01-100 ng DNA-Matrize

PCR-Programm:

	2 min,	94°C	anfänglicher Denaturierungs-Schritt
30-35 x	15 sec,	94°C	Denaturierung, Temperatur abhängig vom Primer
	1 min je 1 kb,	68°C	Elongation
	10 min,	68°C	finale Polymerisation

Die Wahl der Hybridisierungstemperatur war abhängig von der Schmelztemperatur der Primer. Diese ist definiert als die Temperatur, bei der die Hälfte der Primer mit DNA gepaart, die andere Hälfte aber ungebunden vorliegt. Die Hybridisierungstemperatur wurde jeweils 5°C niedriger als die Schmelztemperatur des Primers mit der niedrigeren Schmelztemperatur gewählt. Die Reaktionsprodukte wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert.

Restriktions-Analyse von DNA

Zum Schneiden von DNA wurden Restriktions-Endonukleasen und die dazugehörigen Puffersysteme der Firmen New England Biolabs, Fermentas und Amersham Pharmacia nach Herstellerangaben verwendet. Zusätzlich wurden die Reaktionen mit einer Endkonzentration von 50 µg/µl RNaseA versetzt.
Bei Verwendung zweier Enzyme wurde der Puffer gewählt, bei dem beide Enzyme die höchste Aktivität hatten, ohne jedoch Star-Aktivitäten aufzuweisen. War dies nicht möglich oder weniger optimal, so wurde die DNA zunächst mit dem einem Enzym geschnitten und dann mit 1 Volumen Isopropanol gefällt (10 min, 4°C, 14000 rpm, Tischzentrifuge). Nach dem Waschen mit 70 % Ethanol, erneutem Zentrifugieren und anschließendem Trocknen wurde das Pellet in wenigen µl H_2O (Braun) gelöst und die DNA mit dem zweiten Enzym geschnitten.

Dephosphorylierung von DNA

Zur Verhinderung einer Religation von linearisierten Plasmiden in einer späteren Ligation wurden die 5'- Enden durch alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (CIAP) dephosphoryliert. Dazu wurden 44 µl DNA-Lösung mit 5 µl 10 x CIAP-Puffer und 1 µl CIAP versetzt und für 1 h bei 37°C inkubiert. Zur vollständigen Inaktivierung des Enzyms wurden der Reaktion 150 µl H_2O und 200 µl Phenol/Chloroform beigefügt. Nach gründlichem Durchmischen der Phasen wurde für 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die enthaltene DNA mit 2 Volumen 96 %igem Ethanol gefällt. Nach dem Waschen des Pellets mit 70 % Ethanol und vollständigem Trocknen wurde die DNA in 10 µl H_2O gelöst.

Alternativ wurde die DNA mit alkalischer Phosphatase aus Shrimps (SAP) dephosphoryliert. Hier wurden 44 µl DNA-Lösung mit 5 µl SAP-Puffer und 1 µl SAP 1 h bei 37°C inkubiert. Die Inaktivierung erfolgte hier durch Inkubation für 15 min bei 65°C. Eine anschließende Fällung war hier nicht nötig.

Ligation von DNA-Fragmenten

Die kovalente Verknüpfung zweier oder auch mehrerer DNA-Fragmente ist mit T4-DNA-Ligase möglich. Für die Ligation von Fragmenten in ein geöffnetes Plasmid wurden 100 ng dephoshorylierte Plasmid-DNA mit 1 µl 10 x Ligase-Puffer, 0,5 U T4-DNA-Ligase und bis zu 7,5 µl Lösung des oder der zu klonierenden Fragmente vermengt (10 µl Endvolumen). Nach einer Inkubation von 2-3 h bei RT oder ÜN bei 14°C wurde 1 µl des Ansatzes in elektroko- oder chemokompetente *E. coli*-Zellen transformiert.

5.4 Analyse von DNA

Bestimmung der DNA-Konzentration

Zur Ermittlung der DNA-Konzentration in wässrigen Lösungen wurden verschiedene Verdünnungen auf ein Ethidiumbromid-haltiges Agarose-Gel aufgetragen. Als Mengen-Referenz diente λ-DNA (10, 30, 60 ng). Nach kurzer Gelelektrophorese konnte die Konzentration anhand der Banden-Intensität im Vergleich zur λ-DNA ermittelt werden.

Trennung von DNA-Fragmenten mittels Agarosegelelektrophorese

Zur Auftrennung verschiedener DNA-Fragmente durch Agarose-Gelelektrophorese wurde eine horizontale Elekrophorese-Apparatur verwendet. Eine Suspension von 0,8 bis 2 % Agarose in TAE-Puffer wurde bis zum vollständigen Lösen der Agarose aufgekocht und auf ca. 60°C erkalten lassen. Anschließend wurde die Lösung mit Ethidiumbromid versetzt (Endkonzentration 1-5 µg/ml) und in einen Gelschlitten mit eingestecktem Gelkamm

gegossen. Nach dem Erstarren wurde der Gelkamm gezogen und der Schlitten in die mit TAE-Puffer gefüllte Elektrophorese-Apparatur gelegt.
Die Proben wurden mit DNA-Auftragspuffer versetzt und in die Taschen gegeben. Als Größen-Standard diente mit *Pst*I vollständig geschnittene λ-DNA (s. Material). Die Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 25 – 100 V. Da sich das Ethidiumbromid in die DNA einlagert, konnte diese anschließend unter UV-Licht sichtbar gemacht und photographiert werden.
Nach der Gelelektrophorese konnten einzelne Banden aus den Agarose-Gelen ausgeschnitten und die DNA daraus isoliert werden. Hierzu wurde der QIAquick Gel Extraction Kit nach Herstellerangaben verwendet.

DNA-Sequenzierung

Zur Bestimmung einer DNA-Sequenz wurde die Kettenabbruch-Methode durch Didesoxyribonukleotide nach Sanger (Sanger et al., 1977) gewählt. Die zu sequenzierende Plasmid-DNA dient hierbei während einer Polymerase-Kettenreaktion als Matrize. Die Didesoxyribonucleotide, die zum Kettenabbruch führen, sind mit verschiedenen Fluoreszenzträgern markiert. Es wurden 5 pmol Primer und ca. 400 ng gelöste DNA je Reaktion eingesetzt. Diese Komponenten wurden in einem Gesamtvolumen von 20 µl mit 2 µl BigDye Terminator v3.1 Cycle Mix und 3 µl Reaction Buffer versetzt und einer PCR mit folgenden Parametern unterworfen:

	1 min,	99°C	anfänglicher Denaturierungs-Schritt
25x	10 sec,	96°C	Denaturierung
	30 sec,	50°C	Anlagerung der Primer
	4 min,	60°C	Elongation

Anschließend wurde das Reaktionsgemisch durch Zugabe von 10 µl 125 mM EDTA, 9 µl 3 M Natriumacetat, 80 µl Wasser und 400 µl Ethanol (96 %) gefällt. Nach 15 Minuten Inkubation bei RT erfolgte eine Zentrifugation für 20 Minuten bei 13000 rpm in einer Tischzentrifuge. Anschließend wurde zweimal mit Ethanol (70 %) gewaschen und jeweils für fünf Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert. Das getrocknete Pellet wurde in 20 µl Formamid-Mix resuspendiert und zur Sequenzierung abgegeben.

Transfer und Detektion von DNA auf Membranen

Zur Detektion von DNA-Restriktionsfragmenten bestimmter Größen wurde die Southern-Blotting Methode durchgeführt (Southern, 1975). Die nach der gelelektrophoretischen Auftrennung auf eine Nylon-Membran übertragenen DNA-Fragmente können hierbei durch anschließende Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten Sonde detektiert werden.

Transfer von DNA (Southern Blotting)

Nach der elektrophoretischen Auftrennung eines Restriktionsansatzes von genomischer oder auch Plasmid-DNA auf einem 0,8 %igem Agarose-Gel wurde dieses zur Dokumentation unter UV-Licht photographiert. Nacheinander wurde es dann für 15 min zur Depurinierung in 0,25 M HCl und für 15 min zur Denaturierung in 0,4 M NaOH bei leichtem Schwenken inkubiert.

Für den Transfer auf eine Biodyne B – Nylonmembran wurde die aufwärts gerichtete Methode gewählt. Hierzu wurde eine Schale mit 0,4 M NaOH gefüllt. Über die Schale wurde ein Deckel quer gelegt. Über diesen Deckel wurde ein mit 0,4 M NaOH getränkter Streifen Whatman-Papier so gelegt, dass beide Enden in die NaOH-Lösung hingen. Dieser wurde mit drei Lagen NaOH getränktem Whatman-Papier überschichtet. Anschließend folgte das Gel, so orientiert, dass seine Taschenöffnungen unten lagen. Auf dieses wurde die Nylonmembran, gefolgt von drei Schichten Whatman-Papier und einem dicken Stapel saugfähigem Laborpapier, gelegt. Zwischen das Gel und die Membran wurde zur seitlichen Abdichtung an den Rändern etwa 5 mm weit wasserdichter Parafilm eingeführt. Auf diese Konstruktion wurde zur Beschwerung ein Gewicht von etwa 400 g gelegt. Das Blotten erfolgte über Nacht: Die NaOH-Lösung wurde dabei von dem Papier durch das Gel und die Membran nach oben gesaugt. Hierdurch wurde die DNA auf die Membran überführt.

Anschließend wurde die Membran getrocknet und die DNA durch UV-Bestrahlung (UV-Stratalinker) auf der Membran fixiert.

Herstellung radioaktiver DNA-Sonden

Zur radioaktiven Markierung von DNA-Fragmenten wurde der Megaprime Labeling Kit verwendet. Das ausgewählte DNA-Restriktions-Fragment (ca. 25 ng) wurde mit 5 µl des im Kit vorhandenen Primers versetzt und mit H_2O auf 33 µl aufgefüllt. Der Ansatz wurde 5 min bei 95°C denaturiert. Nachfolgend wurden 10 µl Labeling-Puffer und 5 µl radioaktives [^{32}P]αdCTP beigefügt. Durch Zugabe von 2 µl Klenow-Enzymwurde die

Reaktion gestartet und der Ansatz für 30 min bei 37°C inkubiert. Durch den Einbau des [^{32}P]αdCTPs in die neu synthetisierten DNA-Stränge wurden diese radioaktiv markiert.
Zur Entfernung der nicht eingebauten Nukleotide wurde der Ansatz über eine MobiSpin S-200 Sephacryl-Säule nach Herstellerangaben aufgereinigt. Die Sonde wurde bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

Hybridisierung

Die auf der Nylon-Membran fixierte DNA wurde nach der Methode von Church und Gilbert (Church and Gilbert, 1984) mit der radioaktiven Sonde hybridisiert. Zunächst wurde die Membran für 20 min bei 60°C mit Southern-Hybridisierungspuffer vorinkubiert. Die für 5 min bei 95°C denaturierte Sonde wurde zugegeben und der Ansatz über Nacht bei 65°C im Hybridisierungsofen drehend inkubiert.
Die Hybridisierungs-Lösung wurde entfernt und die Membran zweimal mit 20 ml Southern-Waschpuffer für jeweils 20 min bei 65°C gewaschen. Nach dem Einschlagen der Membran in Klarsichtfolie wurde ein Storage Phosphor-Screen (Amersham) über Nacht mit der strahlenden Membran belichtet. Dieser wurde dann mit einem STORM 860 Phosphoimager (Molecular Dynamics) analysiert und die erhaltenen Signale mit der Software STORM Image Quant analysiert.

5.6 Analyse von RNA

Präparation von RNA aus *U. maydis*

Zur Präparation von RNA wurden ausschließlich autoklavierte Gefäße und Materialien verwendet, alle wässrigen Lösungen waren durch Zugabe von 1/1000 Vol DEPC von RNAsen befreit worden.
Zur Präparation wurden 15 ml Kultur mit einer OD_{600} von ca. 0,5 abzentrifugiert (10 min, 4000 rpm, 4°C, Laborzentrifuge). Nach Entfernung des Mediums wurde das Pellet in 400 ml AE-Puffer resuspendiert und in ein Eppendorf-Cup überführt. Es wurden 40 µl 10 % SDS zugegeben, gevortext und direkt anschließend 400 µl 65°C warmes mit AE-Puffer gesättigtes Phenol zugegeben, gevortext und 10 min schüttelnd bei 65°C in einem Eppendorfheizblock inkubiert. Es folgte eine Inkubation für 5 min bei –80°C und eine

anschließende Zentrifugation (2 min, 13000 rpm, 4°C, Laborzentrifuge). Die RNA wurde zum weiteren Reinigen mit 400 µl Phenol/Chloroform versetzt, gevortext und erneut zentrifugiert (10 min, 13000 rpm, 4°C, Laborzentrifuge). Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die RNA durch Zuführen von 1/10 Vol 3 M Natriumacetat-Lösung und 1 Vol 98 % Ethanol, Vortexen und Zentrifugieren (10 min, 13000 rpm, 4°C, Laborzentrifuge) gefällt. Die RNA wurde nun mit 70 % Ethanol gewaschen und in 30 µl TE mit 1 % Proteinase K aufgenommen. Die präparierte RNA wurde direkt für weitere Analysen eingesetzt oder bei –80°C gelagert.
Die RNA für die quantitative real time PCR wurde mit TRIZOL (Invitrogen) nach Herstellerangaben aufgereinigt.

Auftrennung von RNA durch Agarosegelelektrophorese

Zur Auftrennung von RNA-Molekülen durch Agarose-Gelelektrophorese wurde eine horizontale Elekrophorese-Apparatur verwendet. Eine Suspension von 1 % Agarose in MOPS-Puffer wurde bis zum vollständigen Lösen der Agarose aufgekocht und auf ca. 60°C erkalten lassen. Anschließend wurde die Lösung mit Ethidiumbromid versetzt (Endkonzentration 1-5 µg/ml) und in einen Gelschlitten mit eingestecktem Gelkamm gegossen, der zuvor mit RNAse-Away (Invitrogen) behandelt worden war. Nach dem Erstarren wurde der Gelkamm gezogen und der Schlitten in die mit MOPS-Puffer gefüllte RNase-freie Elektrophorese-Apparatur gelegt.
Die RNA-Proben (etwa 2,5 µg) wurden in einem Endvolumen von 40µl mit 2 µl MOPS (10 x), 2 µl Glyoxal (8 M), und 10 µl DMSO versetzt und zwischen 30 Minuten und einer Stunde bei 50°C inkubiert. Anschließend wurden 6 µl RNA-Auftragspuffer zugegeben und die Proben auf das Gel aufgetragen. Als Größen-Standard diente mit *Pst*I vollständig geschnittene λ-DNA (s. Material). Die Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 90 V. Alle 30 min wurde die Polung der Kammer und die Orientierung des Gels in der Kammer umgekehrt, um den pH-Wert des Puffers möglichst konstant zu halten. Da sich das Ethidiumbromid in die RNA einlagert, konnte diese anschließend unter UV-Licht sichtbar gemacht und photographiert werden.

Transfer und Detektion von RNA auf Membranen

Zur Untersuchung der Expressionsstärke eines Gens wurde die Northern Blotting Methode angewandt. Die nach der gelelektrophoretischen Auftrennung auf eine Nylon-Membran übertragene RNA kann hierbei durch anschließende Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten Sonde detektiert werden.

Transfer von RNA (Northern Blotting)

Für den Transfer auf eine Biodyne B – Nylonmembran wurde die aufwärts gerichtete Methode gewählt. Hierzu wurde eine Wanne mit 20 x SSC gefüllt. Über die Wanne wurde eine Glasplatte quer gelegt. Über diese Glasplatte wurde ein mit 20 x SSC getränkter Streifen Whatman-Papier so gelegt, dass beide Enden in die 20 x SSC-Lösung hingen. Dieser wurde mit drei Lagen 20 x SSC getränktem Whatman-Papier überschichtet. Anschließend folgte das zuvor für eine Viertelstunde in 20 x SSC gebadete Gel, so orientiert, dass seine Taschenöffnungen unten lagen. Auf dieses wurde die Nylonmembran, gefolgt von drei Schichten Whatman-Papier und einem dicken Stapel saugfähigem Laborpapier gelegt. Zwischen das Gel und die Membran wurde zur seitlichen Abdichtung an den Rändern etwa 5 mm weit wasserdichter Parafilm eingeführt. Auf diese Konstruktion wurde zur Beschwerung ein Gewicht von etwa 400 g gelegt. Das Blotten erfolgte über Nacht: Die 20 x SSC-Lösung wurde dabei von dem Papier durch das Gel und die Membran nach oben gesaugt. Hierdurch wurde die RNA auf die Membran überführt. Anschließend wurde die RNA durch UV-Bestrahlung (UV-Stratalinker) auf der Membran fixiert.

Hybridisierung

Die auf der Nylon-Membran fixierte DNA wurde nach der Methode von Church und Gilbert (Church and Gilbert, 1984) mit der radioaktiven Sonde hybridisiert. Zunächst wurde die Membran für 20 min bei 60°C mit Northern-Hybridisierungspuffer vorinkubiert. Die für 5 min bei 95°C denaturierte Sonde wurde zugegeben und der Ansatz über Nacht bei 60°C im Hybridisierungsofen drehend inkubiert.

Die Hybridisierungs-Lösung wurde entfernt und die Membran zweimal mit 20 ml Northern-Waschpuffer für jeweils 20 min bei 60°C gewaschen. Nach dem Einschweißen der Membran in Klarsichtfolie wurde diese üN in einer Phosphoimager Kassette exponiert. Die Detektion der radioaktiven Signale wurde dann mit Hilfe eines Phosphoimagers (Storm860, der Fa. Amersham, Braunschweig) ausgewertet.

Stripping

Um die hybridisierte Sonde wieder von der Membran zu entfernen (Stripping), bevor diese mit einer anderen Sonde hybridisiert wurde, wurde sie mit Northern-Strip-Puffer versetzt und für zwei Stunden bei 85°C im Hybridisierungsofen drehend inkubiert. Anschließend wurde die Membran mit Northern-Waschpuffer 20 min bei 65°C gewaschen. Dann konnte sie für eine erneute Hybridisierung eingesetzt werden.

Quantitative „real time"-PCR

DNAseI Behandlung

Um alle Kontaminationen genomischer DNA zu beseitigen, wurde folgende Reaktion angesetzt und 1h bei 37°C inkubiert:

10X DNaseI Puffer	10µl
DNaseI (2U/µl)	10µl
100µg GesamtRNA	50µl
RNase freies H_2O	30µl

RNA Aufreinigung

Die RNA wurde mittels Qiagen RNeasy Mini Kit aufgereinigt. Zur Entfernung der DNaseI und zur weiteren selektiven Aufreinigung der RNA wurden die Schritte nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Aufreinigung erfolgt über eine Silica Gel Membran, die eine geringe Affinität zu kurzen RNA-Molekülen (kürzer als 20bp) hat.

cDNA Synthese

Die Reverse Transkription erfolgte unter der Verwendung des cDNA Archive KIT (ABI) nach Herstellerangaben. Als Primer wurden entweder oligo-dT- oder radom hexamer Primer verwendet.

Folgender Reaktionsmix wurde zuerst 10 Minuten bei 25°C, dann 120 Minuten bei 37°C inkubiert:

10X Puffer	10µl
25X dNTPs	4µl
10X Primer	10µl
1 µg RNA	10µl
MultiScribe Reverse Transkriptase (50U/µl)	5µl
Nuklease freies H_2O	61µl

Real Time PCR Reaktion

Alle Reaktionen wurden in unabhängigen Triplikaten durchgeführt, um Pipettierfehler auszuschliessen. Die cDNA wurde 1:10 verdünnt eingesetzt. Von der Kontroll DNA wurden 4 serielle Verdünnungsstufen hergestellt, die sowohl der Bestimmung der Primereffizienz als auch der Erstellung einer Eichkurve dienten.

Pro Primerpaar wurde ein Mastermix hergestellt und in eine Mikrotiterplatte vorgelegt; direkt vor dem Reaktionsstart wurde RNA, cDNA, DNA verschiedener Verdünnungen oder H_2O zugegeben.

Mastermix

SYBR GREEN PCR Master Mix	12,5µl
Primer1 (10µM)	0,25µl
Primer2 (10µM)	0,25µl
cDNA (oder DNA Verdünnung oder RNA oder H_2O)	1µl
H_2O	11µl

PCR Protokoll

10 min	95°C	
15 sec	95°C	} 40X
1 min	60°C	

Primerdimere wurden anhand einer Dissoziationskurve ausgeschlossen.

5.7 Biochemische Methoden

Proteinexpression

Die DH Domänen und die GTPasen von *U. maydis* wurden als GST Fusionsproteine in *E. coli* exprimiert. Dazu wurden sie entweder in das pGEX Vektor System oder in pGSTparallel-1 ligiert. Eine über Nacht Kultur wurde 1:20 verdünnt und 4 Stunden mit IPTG (1mM) induziert.

Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen

Die induzierten *E. coli* Kulturen (200 ml) wurden 10 Minuten bei 4000rpm abzentrifugiert und in 10 ml Lysispuffer resuspendiert. Die Zellen wurden mittels „french press" aufgeschlossen und das Rohlysat für 10 Minuten bei 10000rpm abzentrifugiert. 1,5 ml des klaren Überstandes wurden für 30 Minuten rollend mit Gluthation Sepharose beads (GE healthcare) inkubiert. Die beads wurden abzentrifugiert und 3mal mit je 100 µl Elutionspuffer gewaschen. Alle Arbeiten erfolgten bei 4°C, von jedem Arbeitsschritt wurde eine Probe auf einem SDS-Gel analysiert. Die Proteinkonzentration im Eluat wurde über Messungen der optischen Dichte (OD595) bestimmt. Das Eluat der GTPasen kann bei -80°C eingefroren werden, die Aktivität der GEFs wurde sofort getestet, da diese bei Lagerung ihre Aktivität verlieren.

GEF-Assays

Die Fähigkeit der GEFs, den Guanin Nukleotid Austausch an der GTPase zu katalysieren, wurde über die Bindung von mant-GDP untersucht. Dazu wurde die Bindung von mant-GTP an die GTPase mit einem Tecan Sapphire Spectrophotometer bei 25°C fluorimetrisch gemessen (Abe et al., 2000).
Die Reaktionen erfolgten in Mikrotiterplatten im Volumen von 150 µl. Dazu wurde folgender Mastermix vorgelegt:

75 µl 2X Assay Puffer

6 µl mant-GDP (10µM)

56µl H_2O

Vorgelegt. Direkt vor der Messung wurden 3 µl GTPase (Endkonz.: 2 µM) und 10 µl aufgereinigte DH Domäne (Endkonz.: 0,4 µM) zugegeben. Über den Zeitraum von 1 Stunde wurde die Zunahme der Fluoreszenz (λ_{ex} = 360 nm, λ_{em} = 440 nm) gemessen.

5.8 Transformationen

Herstellung elektrokompetenter *E. coli*-Zellen

Zur Herstellung elektrokompetenter *E. coli*-Zellen wurden 2 ml einer ÜNK des Stammes DH5α auf 200 ml dYT-Medium überimpft und in einem Schikane-Kolben bei 37°C und 180 rpm bis zu einer OD_{600} von ca. 0,5 geschüttelt. Die Kultur wurde für 15 min auf Eis gekühlt und abzentrifugiert (10 min, 4500 rpm, 4°C, Laborzentrifuge). Das Zellsediment wurde nacheinander mit 200 ml und 50 ml sterilem H_2O sowie 5 ml und 2,5 ml 10 % Glycerin gewaschen und jeweils wie oben zentrifugiert. Die Zellen wurden dann in 1 ml 10 % Glycerin aufgenommen, in Reaktionsgefäßen auf 50 µl aliquotiert und bei -80°C eingefroren.

Elektro-Transformation von elektrokompetenten *E. coli*-Zellen

Zur effizienten Transformation von DNA aus Ligations-Ansätzen in *E. coli* wurde häufig die die Methode der Elektroporation gewählt. Hierbei wurden 50 µl elektro-kompetente *E. coli* mit 1 µl des Ligations-Ansatzes versetzt und 1 min auf Eis inkubiert, damit sich die DNA an die Zellen anlagern konnte. Anschließend wurde das Gemisch in eine Elektroporations-Küvette überführt und bei 125 µF, 200 Ω und 2,5 kV elektroporiert (Gene Pulser, Fa. Biorad, München). Es wurde darauf geachtet, dass der ausgegebene Wert für τ bei 4,5 bis 4,7 ms lag. Die Zellen wurden in 1 ml 37°C warmem dYT-Medium

aufgenommen und für 30 min bei 37°C inkubiert. 50 bis 500 µl der Zellsuspension wurden auf dYT-Agar mit Ampicillin, falls nötig mit X-Gal, ausplattiert.

Herstellung chemokompetenter *E. coli*-Zellen

Zur Herstellung chemokompetenter *E. coli*-Zellen wurden 200 ml dYT-Medium mit 2 ml Übernachtkultur des Stammes DH5α versetzt und in einem Schikanekolben bei 37°C und 150 rpm bis zu einer OD_{600} von 0,6-0,8 geschüttelt. Die Kultur wurde bei 4°C für 10 min bei 4000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde in 100 ml 50 mM $CaCl_2$ auf Eis resuspendiert und erneut mit den gleichen Einstellungen für 10 min zentrifugiert. Dann wurde es in 5 ml 50 mM $CaCl_2$, 10 % Glycerin resuspendiert. Je 100 µl wurden in Eppendorf-Gefäßen aliquotiert und dann bei -80°C eingefroren.

Transformation chemokompetenter *E. coli*-Zellen

Zur Transformation von DNA aus Ligations-Ansätzen in chemokompetente *E. coli*-Zellen wurden 10 µl des Ligationsansatzes mit 50 µl chemokompetenten Zellen versetzt und für 10 min auf Eis inkubiert. Dann wurde der Ansatz für 1 min auf 42°C gebracht und anschließend sofort mit 800 µl dYT-Medium versetzt. Es erfolgte eine Inkubation für 30 min bei 37°C auf dem Schüttler bei 150 rpm. Anschließend wurden zwischen 100 und 200 µl des Ansatzes auf Selektivplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Protoplastierung von *U. maydis*

Zur Herstellung von *U. maydis*-Protoplasten wurde eine Kultur in 50 ml YEPS-Medium bis zu einer OD_{600} von ca. 0,7 gezogen. Diese wurde zentrifugiert (3200 rpm, 10 min, 4°C, Laborzentrifuge) und das Zellsediment in 25 ml SCS-Lösung resuspendiert. Es wurde erneut zentrifugiert (3000 rpm, 10 min, 4°C, Laborzentrifuge) und das Pellet mit 2 ml SCS-Novozym-Lösung versetzt. Der Ansatz wurde bei 28ºC inkubiert, bis ca. 80 % der Zellen als runde Protoplasten vorlagen (ca. 10 bis 45 min). Die Protoplastierung wurde durch

Zugabe von 10 ml SCS-Lösung gestoppt und die Protoplasten pelletiert (2300 rpm, 10 min, 4°C, Laborzentrifuge). Das Zellsediment wurde vorsichtig nacheinander mit zweimal 10 ml SCS-Lösung und 10 ml STC-Lösung gewaschen und jeweils wie im vorhergehenden Schritt zentrifugiert. Die Protoplasten wurden in 500 µl STC-Lösung aufgenommen, auf 50 µl aliquotiert und bei -80°C gelagert.

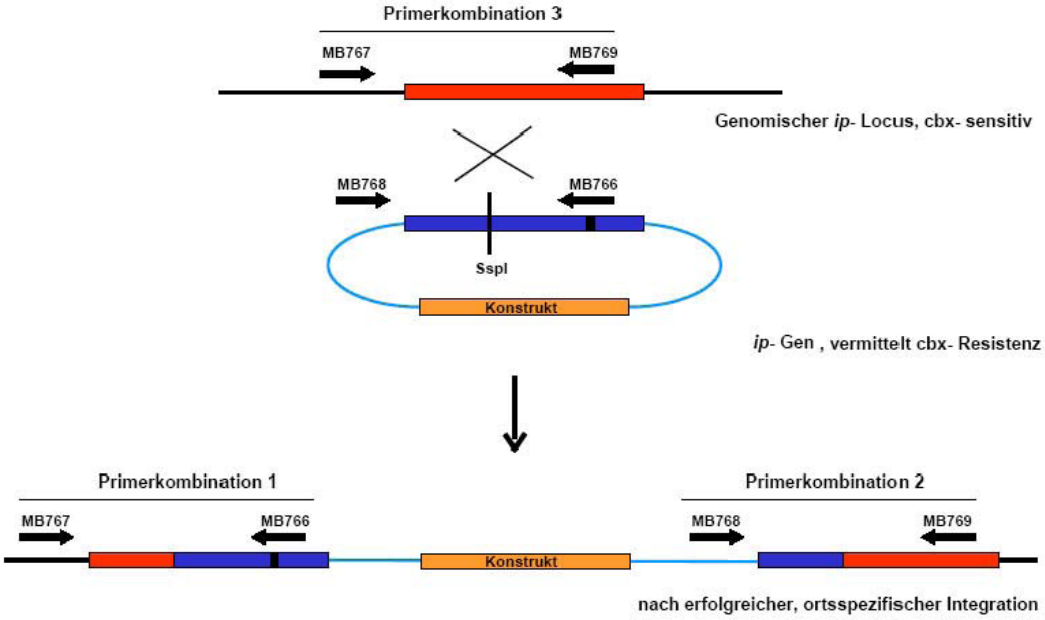
Transformation von *U. maydis*-Protoplasten

Zur Transformation von *U. maydis* wurden zu 50 µl Protoplasten-Suspension 500 ng bis 5 µg lineare oder Plasmid-DNA gegeben. Ebenso wurde jeweils eine Kontrolle mit gleichem Volumen an H_2O versetzt. Die Ansätze wurden für 10 min auf Eis inkubiert und anschließend mit 500 µl eiskalter STC/PEG-Lösung vermengt. Durch die Zugabe von PEG werden die Zellmembranen für die zugegebene DNA permeabel und diese kann in die Protoplasten aufgenommen werden. Die Gemische wurden weitere 15 min auf Eis inkubiert und anschließend auf Regenerations-Agar, bzw. YNB-Regenerationsagar mit Glukose bzw. Arabinose als einziger Kohlenstoffquelle ausplattiert und unter der Sterilbank für ca. 20 min getrocknet. Die Platten enthielten als untere Schicht 10 ml Regenerations-Agar mit einer zweifachen Antibiotika-Konzentration (Hygromycin: 400 µg/ml, Carboxin 4 µg/ml, Nourseothricin: 300 µg/ml) und darüber 10 ml Regenerations-Agar ohne Antibiotikum (AB). So stellt sich in Folge der Diffusion auf der Oberfläche des Agars mit der Zeit die übliche Konzentration an AB ein, so dass vorher die Resistenz in den transformierten Protoplasten zur Ausprägung kommen kann. Die Platten wurden bei 28°C für zwei bis fünf Tage inkubiert und gebildete Kolonien auf PD-Agar bzw YNB-G- oder YNB-A-Agar mit AB vereinzelt.

Integration von Vektoren in den genomischen *ip*-Locus

Der häufig zur Integration von Vektorkonstrukten genutzte *cbx*-Locus wird so genannt, da er Carboxinresistenz (Cbx^R) nach Integration spezieller Vektoren vermittelt. Der *cbx*-Locus wird auch *ip*-Locus genannt. Diese speziellen Vektoren tragen ein Carboxinresistenz vermittelndes Allel des *ip*-Gens. Carboxin ist ein Fungizid, das die Eisen-Schwefel-Untereinheit der Succinat-Dehydrogenase inhibiert. Das vektorkodierte IP-Protein wird

nicht durch das Fungizid inhibiert und vermittelt dadurch die Carboxinresistenz. Der Vektor kann durch SspI in dem *ip*-Allel linearisiert werden und nach der Transformation durch ortsspezifische, homologe Rekombination in den genomischen *ip*-Locus integrieren. Der *ip*-Locus wird durch die Integration des Vektors verdoppelt. Durch die in der Abbildung 36 dargestellten Primerkombinationen kann die Integration des Konstruktes überprüft werden (Hlubek, 2004).



Integration von Plasmiden in den genomischen *ip*-Locus.
Die verwendeten Plasmide tragen neben den erstellten Konstrukten das ip_r-Allel, welches nach Linearisierung mit dem genomischen ip_s-Allel rekombiniert. Ein erfolgreiches Integrationsereignis kann mit Hilfe der angegeben Primerkombinationen überprüft werden.

Transformation von *S. cerevisiae*

Am Vorabend wurden 10 ml YEPG Medium mit einer Hefekolonie angeimpft und über Nacht bei 24°C auf dem Roller inkubiert. Am Folgetag wurden 30 ml YEPG mit 2- 3 ml dieser dicht gewachsenen Kultur angeimpft und ca. 3 Stunden unter gleichen Bedingungen inkubiert, bis die OD_{600} = 0,5 erreicht hat.

Dann wurden die Zellen 5 Minuten mit 1200 rpm zentrifugiert und nach Abgiessen des Überstandes in 15 ml sterilem Wasser resuspendiert. Nach erneutem Zentrifugieren bei

1200 rpm für 5 Minuten wird das Zellpellet in 1 ml Wasser aufgenommen und in ein steriles Reaktionsgefäß überführt. Es folgte ein Zentrifugationsschritt bei 13000 rpm für 30 Sekunden, dann wurde das Pellet erneut in 1 ml Wasser aufgenommen und diese Suspension in Aliquots zu 100 µl aufgeteilt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt bei 13000 rpm für 30 Sekunden wurde der Überstand abgenommen und zum Zellpellet folgender Prämix zugegeben:

Prämix: (auf Eis ansetzten)

240 µl 50%PEG4000

36 µl 1M LiAc

20 µl Heringssperma- DNA (5 mg/ml)
(vor Gebrauch 5 Minuten bei 100°C gekocht, dann 10 Minuten Eis)

30 µl Wasser

Dazu wurden 34 µl DNA- Lösung (ca. 200 ng/µl) gegeben, gut geschüttelt und dann für 45 Minuten bei 42°C inkubiert.
Nach 30 Sekunden auf Eis wurden die Zellen abzentrifugiert (13000rpm, 1 Minute) und in 500 µl Wasser resuspendiert, davon wurden 200 µl auf geeignete Minimalmediumplatten ausgestrichen. Nach einer Inkubation bei 24°C für 3–4 Tage konnten die Kolonien vereinzelt werden.

5.9 Untersuchung von *U. maydis*

Mikroskopie

Für die fluoreszenzmikroskopische Analyse von *U. maydis* kam ein Fluoreszenzmikroskop des Typs Axioskop 2 (Firma Zeiss) zum Einsatz. Für die Mikroskopie wurden 5 µl einer frischen Übernachtkultur auf einen mit 1,5 % Agarose beschichteten Objektträger aufgetropft und dieser mit einem Deckglas versehen. Die Mikroskopie erfolgte unter DIC-Belichtung oder mittels Epifluoreszenz. Hierbei wurden folgende Filtersätze verwendet:

DAPI (Anregung: 365 nm, Farbteiler: 395 nm, Emission: >397 nm), FITC (Anregung: 450-490 nm, Farbteiler: 510 nm, Emission: 515-565 nm), Rhodamin (Anregung: 546 nm, Farbteiler: 580 nm, Emission: >590 nm). Aufnahmen wurden mit einer hoch auflösenden CCD-Kamera (Typ Mega Fire, INTAS) und der Software MagnaFire 2.0 erstellt. Kontrastverstärkung, Skalierung von Maßstäben, die Vergrößerung von Bildausschnitten und die farbliche Überlagerung von Aufnahmen wurden mit der Software Adobe-Photoshop 6.0 durchgeführt.

Färbungen

Folgende Fluoreszenz-Farbstoffe wurden für die Mikroskopie eingesetzt:

Tabelle 10: Verwendete Farbstoffe.

Farbstoff	Anregung (nm)	Emmission (nm)	Verwendete Konzentration
Calcofluor white	395	440	2 µg/ml
DAPI	358	461	2 µg/ml
SYTO11	508	527	5 nM
FM4-64	508	640	16 µM
CMAC	350	466	100 µM
GFP	475	508	-

Kernfärbung

Für die Kernfärbung mittels DAPI wurden Übernachtkulturen in der Tischzentrifuge bei 5000 rpm für fünf Miinuten abzentrifugiert und in 70 % Ethanol in 1 x PBS resuspendiert, um sie zu fixieren. Anschließend wurden sie in 1 x PBS gewaschen und mit 2 µg/ml DAPI versehen. Die Färbung wurde mit dem DAPI-Filter betrachtet. Alternativ wurden die Kerne durch Zugabe von 5 nM SYTO11 zu den auf den Objektträger aufgebrachten Zellen einer Übernachtkultur gefärbt.

Septen- und Zellwandfärbung

Für die Visualisierung der Septen und der Zellwandfärbung wurde der Farbstoff Calcofluor white sowie WGA (wheat germ agglutinin) verwendet. Calcofluor white färbt neu gebildetes Zellwandmaterial (Mitchison and Nurse, 1985). Es wurde in Konzentrationen von 2 µg/ml zu frischen Übernachtkulturen zugegeben. Nach 10 Minuten Inkubation wurden die Zellen auf einen Objektträger gegeben und im Lichtmikroskop mit DAPI-Filtersatz betrachtet. Rhodamin-gekoppeltes WGA ist ein spezifischer Farbstoff für Chitin (Nagata and Burger, 1974). Die Färbung erfolgte mit 25 µg/ml für 5 min und anschließender Betrachtung mit dem Rhodamin-Filtersatz.

Vakuolenfärbung

Vakuolen wurden mit CellTrackerTMblue (CMAC) gefärbt. Hierfür wurde eine frische Übernachtkultur mit 100 µM CMAC versehen und für fünf Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit dem DAPI-Filtersatz betrachtet. Bei gleichzeitiger Färbung mit dem Farbstoff FM4-64 wurde die FM4-64-Färbung wie beschrieben durchgeführt (Wendland et al., 1996) und nach Ablauf von 45 Minuten der Farbstoff CMAC in der angegebenen Konzentration zugesetzt.

Endocytosefärbung

Zellen aus einer logarithmischen Kultur wurden für 1-3 min mit 16 µM FM4-64 (Vida and Emr, 1995) bei RT gefärbt (puls). Anschließend wurden die Zellen für 1 min bei 5000 rpm pelletiert und in Wasser resuspendiert. Nach 60 min (chase) wurden die Zellen auf einen Objektträger gegeben und mit dem Rhodamin- Filtersatz betrachtet. Um die Endocytose zeitlich zu verfolgen, wurden die Zellen wie oben beschrieben gefärbt und nach der Resuspendierung in Wasser unverzüglich auf den Objektträger gegeben. Der Verlauf der Endocytose konnte dann in zeitlich definierten Abständen verfolgt werden.

6. Literaturverzeichnis

Abdul-Manan, N., Aghazadeh, B., Liu, G.A., Majumdar, A., Ouerfelli, O., Siminovitch, K.A. and Rosen, M.K. (1999) Structure of Cdc42 in complex with the GTPase-binding domain of the 'Wiskott-Aldrich syndrome' protein. *Nature*, **399**, 379-383.

Abe, K., Rossman, K.L., Liu, B., Ritola, K.D., Chiang, D., Campbell, S.L., Burridge, K. and Der, C.J. (2000) Vav2 is an activator of Cdc42, Rac1, and RhoA. *J Biol Chem*, **275**, 10141-10149.

Abraham, M.T., Kuriakose, M.A., Sacks, P.G., Yee, H., Chiriboga, L., Bearer, E.L. and Delacure, M.D. (2001) Motility-related proteins as markers for head and neck squamous cell cancer. *Laryngoscope*, **111**, 1285-1289.

Abrams, C.S., Zhao, W., Belmonte, E. and Brass, L.F. (1995) Protein kinase C regulates pleckstrin by phosphorylation of sites adjacent to the N-terminal pleckstrin homology domain. *J Biol Chem*, **270**, 23317-23321.

Adams, A.E., Johnson, D.I., Longnecker, R.M., Sloat, B.F. and Pringle, J.R. (1990) CDC42 and CDC43, two additional genes involved in budding and the establishment of cell polarity in the yeast Saccharomyces cerevisiae. *J Cell Biol*, **111**, 131-142.

Adamson, P., Marshall, C.J., Hall, A. and Tilbrook, P.A. (1992a) Post-translational modifications of p21rho proteins. *J Biol Chem*, **267**, 20033-20038.

Adamson, P., Paterson, H.F. and Hall, A. (1992b) Intracellular localization of the P21rho proteins. *J Cell Biol*, **119**, 617-627.

Aghazadeh, B., Lowry, W.E., Huang, X.Y. and Rosen, M.K. (2000) Structural basis for relief of autoinhibition of the Dbl homology domain of proto-oncogene Vav by tyrosine phosphorylation. *Cell*, **102**, 625-633.

Arkowitz, R.A. (1999) Responding to attraction: chemotaxis and chemotropism in Dictyostelium and yeast. *Trends Cell Biol*, **9**, 20-27.

Banuett, F. and 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. and Herskowitz, I. (1996) Discrete developmental stages during teliospore formation in the corn smut fungus, Ustilago maydis. *Development*, **122**, 2965-2976.

Barale, S., McCusker, D. and Arkowitz, R.A. (2004) The exchange factor Cdc24 is required for cell fusion during yeast mating. *Eukaryot Cell*, **3**, 1049-1061.

Barber, M.A. and Welch, H.C. (2006) PI3K and RAC signalling in leukocyte and cancer cell migration. *Bull Cancer*, **93**, E44-52.

Bellanger, J.M., Astier, C., Sardet, C., Ohta, Y., Stossel, T.P. and Debant, A. (2000) The Rac1- and RhoG-specific GEF domain of Trio targets filamin to remodel cytoskeletal actin. *Nat Cell Biol*, **2**, 888-892.

Bi, E., Chiavetta, J.B., Chen, H., Chen, G.C., Chan, C.S. and Pringle, J.R. (2000) Identification of novel, evolutionarily conserved Cdc42p-interacting proteins and of redundant pathways linking Cdc24p and Cdc42p to actin polarization in yeast. *Mol Biol Cell*, **11**, 773-793.

Birkenfeld, J., Nalbant, P., Bohl, B.P., Pertz, O., Hahn, K.M. and Bokoch, G.M. (2007) GEF-H1 modulates localized RhoA activation during cytokinesis under the control of mitotic kinases. *Dev Cell*, **12**, 699-712.

Birnboim, H. and Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*, **7**, 1513-1523.

Bishop, A.L. and Hall, A. (2000) Rho GTPases and their effector proteins. *Biochemical Journal*, **348**, 241-255.

Blondel, M., Alepuz, P.M., Huang, L.S., Shaham, S., Ammerer, G. and Peter, M. (1999) Nuclear export of Far1p in response to pheromones requires the export receptor Msn5p/Ste21p. *Genes Dev*, **13**, 2284-2300.

Boivin, D. and Beliveau, R. (1995) Subcellular distribution and membrane association of Rho-related small GTP-binding proteins in kidney cortex. *Am J Physiol*, **269**, F180-189.

Bokoch, G.M. (2003) Biology of the p21-activated kinases. *Annu Rev Biochem*, **72**, 743-781.

Bose, I., Irazoqui, J.E., Moskow, J.J., Bardes, E.S., Zyla, T.R. and Lew, D.J. (2001) Assembly of scaffold-mediated complexes containing Cdc42p, the exchange factor Cdc24p, and the effector Cla4p required for cell cycle-regulated phosphorylation of Cdc24p. *J Biol Chem*, **276**, 7176-7186.

Boureux, A., Vignal, E., Faure, S. and Fort, P. (2007) Evolution of the Rho family of ras-like GTPases in eukaryotes. *Mol Biol Evol*, **24**, 203-216.

Bourne, H.R., Sanders, D.A. and McCormick, F. (1990) The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions. *Nature*, Vol. 348, pp. 125-132.

Boyce, K., Hynes, M. and Andrianopoulos, A. (2005) The Ras and Rho GTPases genetically interact to co-ordinately regulate cell polarity during development in Penicillium marneffei. *Molecular Microbiology*, **55**, 1487-1501.

Boyce, K.J., Hynes, M.J. and Andrianopoulos, A. (2003) Control of morphogenesis and actin localization by the Penicillium marneffei RAC homolog. *J Cell Sci*, **116**, 1249-1260.

Brachmann, A., Konig, J., Julius, C. and Feldbrugge, 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. and Kahmann, R. (2001) Identification of genes in the bW/bE regulatory cascade in Ustilago maydis. *Mol Microbiol*, **42**, 1047-1063.

Brecht, M., Steenvoorden, A.C., Collard, J.G., Luf, S., Erz, D., Bartram, C.R. and Janssen, J.W. (2005) Activation of gef-h1, a guanine nucleotide exchange factor for RhoA, by DNA transfection. *Int J Cancer*, **113**, 533-540.

Brett, D., Pospisil, H., Valcarcel, J., Reich, J. and Bork, P. (2002) Alternative splicing and genome complexity. *Nat Genet*, **30**, 29-30.

Buchsbaum, R.J., Connolly, B.A. and Feig, L.A. (2003) Regulation of p70 S6 kinase by complex formation between the Rac guanine nucleotide exchange factor (Rac-GEF) Tiam1 and the scaffold spinophilin. *J Biol Chem*, **278**, 18833-18841.

Burbelo, P.D., Drechsel, D. and Hall, A. (1995) A conserved binding motif defines numerous candidate target proteins for both Cdc42 and Rac GTPases. *J Biol Chem*, **270**, 29071-29074.

Bustelo, X.R., Sauzeau, V. and Berenjeno, I.M. (2007) GTP-binding proteins of the Rho/Rac family: regulation, effectors and functions in vivo. *Bioessays*, **29**, 356-370.

Butty, A.C., Perrinjaquet, N., Petit, A., Jaquenoud, M., Segall, J.E., Hofmann, K., Zwahlen, C. and Peter, M. (2002) A positive feedback loop stabilizes the guanine-nucleotide exchange factor Cdc24 at sites of polarization. *Embo J*, **21**, 1565-1576.

Butty, A.C., Pryciak, P.M., Huang, L.S., Herskowitz, I. and Peter, M. (1998) The role of Far1p in linking the heterotrimeric G protein to polarity establishment proteins during yeast mating. *Science*, **282**, 1511-1516.

Casey, P.J., Thissen, J.A. and Moomaw, J.F. (1991) Enzymatic modification of proteins with a geranylgeranyl isoprenoid. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 8631-8635.

Castillo-Lluva, S., Alvarez-Tabares, I., Weber, I., Steinberg, G. and Perez-Martin, J. (2007) Sustained cell polarity and virulence in the phytopathogenic fungus Ustilago maydis depends on an essential cyclin-dependent kinase from the Cdk5/Pho85 family. *J Cell Sci*, **120**, 1584-1595.

Cataldo, A.M., Peterhoff, C.M., Troncoso, J.C., Gomez-Isla, T., Hyman, B.T. and Nixon, R.A. (2000) Endocytic pathway abnormalities precede amyloid beta deposition in sporadic Alzheimer's disease and Down syndrome: differential effects of APOE genotype and presenilin mutations. *Am J Pathol*, **157**, 277-286.

Cerione, R.A. and Zheng, Y. (1996) The Dbl family of oncogenes. *Curr Opin Cell Biol*, **8**, 216-222.

Chan, A.M., Takai, S., Yamada, K. and Miki, T. (1996) Isolation of a novel oncogene, NET1, from neuroepithelioma cells by expression cDNA cloning. *Oncogene*, **12**, 1259-1266.

Chang, E.C., Barr, M., Wang, Y., Jung, V., Xu, H.P. and Wigler, M.H. (1994) Cooperative interaction of S. pombe proteins required for mating and morphogenesis. *Cell*, **79**, 131-141.

Chant, J. and Stowers, L. (1995) GTPase cascades choreographing cellular behavior: movement, morphogenesis, and more. *Cell*, **81**, 1-4.

Chardin, P., Camonis, J.H., Gale, N.W., van Aelst, L., Schlessinger, J., Wigler, M.H. and Bar-Sagi, D. (1993) Human Sos1: a guanine nucleotide exchange factor for Ras that binds to GRB2. *Science*, **260**, 1338-1343.

Chen, C. and Dickman, M.B. (2004) Dominant active Rac and dominant negative Rac revert the dominant active Ras phenotype in Colletotrichum trifolii by distinct signalling pathways. *Mol Microbiol*, **51**, 1493-1507.

Chen, W., Lim, H.H. and Lim, L. (1993) The CDC42 homologue from Caenorhabditis elegans. Complementation of yeast mutation. *J Biol Chem*, **268**, 13280-13285.

Cherfils, J. and Chardin, P. (1999) GEFs: structural basis for their activation of small GTP-binding proteins. *Trends Biochem Sci*, **24**, 306-311.

Chrissobolis, S. and Sobey, C.G. (2006) Recent evidence for an involvement of rho-kinase in cerebral vascular disease. *Stroke*, **37**, 2174-2180.

Christensen, J.J. (1963) *Corn Smut Caused by Ustilago maydis. Monograph No. 2*. American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota.

Chuang, T.H., Xu, X., Kaartinen, V., Heisterkamp, N., Groffen, J. and Bokoch, G.M. (1995) Abr and Bcr are multifunctional regulators of the Rho GTP-binding protein family. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 10282-10286.

Church, G. and Gilbert, W. (1984) Genomic Sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **81**, 1991-1995.

Clarke, S. (1992) Protein isoprenylation and methylation at carboxyl-terminal cysteine residues. *Annu Rev Biochem*, **61**, 355-386.

Cote, J.F., Motoyama, A.B., Bush, J.A. and Vuori, K. (2005) A novel and evolutionarily conserved PtdIns(3,4,5)P3-binding domain is necessary for DOCK180 signalling. *Nat Cell Biol*, **7**, 797-807.

Cote, J.F. and Vuori, K. (2007) GEF what? Dock180 and related proteins help Rac to polarize cells in new ways. *Trends Cell Biol*, **17**, 383-393.

Daniels, R.H., Zenke, F.T. and Bokoch, G.M. (1999) alphaPix stimulates p21-activated kinase activity through exchange factor-dependent and -independent mechanisms. *J Biol Chem*, **274**, 6047-6050.

Didsbury, J., Weber, R.F., Bokoch, G.M., Evans, T. and Snyderman, R. (1989) rac, a novel ras-related family of proteins that are botulinum toxin substrates. *J Biol Chem*, **264**, 16378-16382.

Dransart, E., Olofsson, B. and Cherfils, J. (2005) RhoGDIs revisited: novel roles in Rho regulation. *Traffic*, **6**, 957-966.
Drubin, D.G. and Nelson, W.J. (1996) Origins of cell polarity. *Cell*, **84**, 335-344.
Eden, S., Rohatgi, R., Podtelejnikov, A.V., Mann, M. and Kirschner, M.W. (2002) Mechanism of regulation of WAVE1-induced actin nucleation by Rac1 and Nck. *Nature*, **418**, 790-793.
Edwalds-Gilbert, G., Veraldi, K.L. and Milcarek, C. (1997) Alternative poly(A) site selection in complex transcription units: means to an end? *Nucleic Acids Res*, **25**, 2547-2561.
Elion, E.A. (2000) Pheromone response, mating and cell biology. *Curr Opin Microbiol*, **3**, 573-581.
Elion, E.A. (2001) The Ste5p scaffold. *J Cell Sci*, **114**, 3967-3978.
Elliot-Smith, A.E., Mott, H.R., Lowe, P.N., Laue, E.D. and Owen, D. (2005) Specificity determinants on Cdc42 for binding its effector protein ACK. *Biochemistry*, **44**, 12373-12383.
Engqvist-Goldstein, A.E. and Drubin, D.G. (2003) Actin assembly and endocytosis: from yeast to mammals. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **19**, 287-332.
Erickson, J.W. and Cerione, R.A. (2004) Structural elements, mechanism, and evolutionary convergence of Rho protein-guanine nucleotide exchange factor complexes. *Biochemistry*, **43**, 837-842.
Etienne-Manneville, S. (2004) Cdc42--the centre of polarity. *J Cell Sci*, **117**, 1291-1300.
Evangelista, M., Blundell, K., Longtine, M.S., Chow, C.J., Adames, N., Pringle, J.R., Peter, M. and Boone, C. (1997) Bni1p, a yeast formin linking cdc42p and the actin cytoskeleton during polarized morphogenesis. *Science*, **276**, 118-122.
Fan, W.T., Koch, C.A., de Hoog, C.L., Fam, N.P. and Moran, M.F. (1998) The exchange factor Ras-GRF2 activates Ras-dependent and Rac-dependent mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr Biol*, **8**, 935-938.
Feltham, J.L., Dotsch, V., Raza, S., Manor, D., Cerione, R.A., Sutcliffe, M.J., Wagner, G. and Oswald, R.E. (1997) Definition of the switch surface in the solution structure of Cdc42Hs. *Biochemistry*, **36**, 8755-8766.
Fernandez-Chacon, R., Achiriloaie, M., Janz, R., Albanesi, J.P. and Sudhof, T.C. (2000) SCAMP1 function in endocytosis. *J Biol Chem*, **275**, 12752-12756.
Fotheringham, S. and Holloman, W.K. (1989) Cloning and disruption of Ustilago maydis genes. *Mol Cell Biol*, **9**, 4052-4055.
Fotheringham, S. and Holloman, W.K. (1990) Pathways of transformation in Ustilago maydis determined by DNA conformation. *Genetics*, **124**, 833-843.
Gao, Y., Xing, J., Streuli, M., Leto, T.L. and Zheng, Y. (2001) Trp(56) of rac1 specifies interaction with a subset of guanine nucleotide exchange factors. *J Biol Chem*, **276**, 47530-47541.
Garcia-Mata, R. and Burridge, K. (2007) Catching a GEF by its tail. *Trends Cell Biol*, **17**, 36-43.
Gardiner, K., Davisson, M.T. and Crnic, L.S. (2004) Building protein interaction maps for Down's syndrome. *Brief Funct Genomic Proteomic*, **3**, 142-156.
Gillissen, B., Bergemann, J., Sandmann, C., Schroeer, B., Bölker, M. and Kahmann, R. (1992) A two-component regulatory system for self/non-self recognition in Ustilago maydis. *Cell*, **68**, 647-657.
Gong, T.W., Shin, J.J., Burmeister, M. and Lomax, M.I. (1997) Complete cDNAs for CDC42 from chicken cochlea and mouse liver. *Biochim Biophys Acta*, **1352**, 282-292.

Gow, N.A., Brown, A.J. and Odds, F.C. (2002) Fungal morphogenesis and host invasion. *Curr Opin Microbiol*, **5**, 366-371.

Gu, Y., Lin, Q., Childress, C. and Yang, W. (2004) Identification of the region in Cdc42 that confers the binding specificity to activated Cdc42-associated kinase. *J Biol Chem*, **279**, 30507-30513.

Guipponi, M., Scott, H.S., Hattori, M., Ishii, K., Sakaki, Y. and Antonarakis, S.E. (1998) Genomic structure, sequence, and refined mapping of the human intersectin gene (ITSN), which encompasses 250 kb on chromosome 21q22.1-->q22.2. *Cytogenet Cell Genet*, **83**, 218-220.

Gulli, M.P. and Peter, M. (2001a) Temporal and spatial regulation of Rho-type guanine-nucleotide exchange factors: the yeast perspective. *Genes Dev*, **15**, 365-379.

Gulli, M.P. and Peter, M. (2001b) Temporal and spatial regulation of Rho-type guanine-nucleotide exchange factors: the yeast perspective. *Genes Dev*, **15**, 365-379.

Hall, A. (1998) Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science*, **279**, 509-514.

Hall, A. and Nobes, C.D. (2000) Rho GTPases: molecular switches that control the organization and dynamics of the actin cytoskeleton. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **355**, 965-970.

Han, J., Luby-Phelps, K., Das, B., Shu, X., Xia, Y., Mosteller, R.D., Krishna, U.M., Falck, J.R., White, M.A. and Broek, D. (1998) Role of substrates and products of PI 3-kinase in regulating activation of Rac-related guanosine triphosphatases by Vav. *Science*, **279**, 558-560.

Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J Mol Biol*, **166**, 557-580.

Harris, S.D. and Momany, M. (2004) Polarity in filamentous fungi: moving beyond the yeast paradigm. *Fungal Genet Biol*, **41**, 391-400.

Hart, M.J., Eva, A., Evans, T., Aaronson, S.A. and Cerione, R.A. (1991) Catalysis of guanine nucleotide exchange on the CDC42Hs protein by the dbl oncogene product. *Nature*, **354**, 311-314.

Hartman, H.L., Hicks, K.A. and Fierke, C.A. (2005) Peptide specificity of protein prenyltransferases is determined mainly by reactivity rather than binding affinity. *Biochemistry*, **44**, 15314-15324.

Hartwell, L.H., Culotti, J., Pringle, J.R. and Reid, B.J. (1974) Genetic control of the cell division cycle in yeast. *Science*, **183**, 46-51.

Hill, C.S., Wynne, J. and Treisman, R. (1995) The Rho family GTPases RhoA, Rac1, and CDC42Hs regulate transcriptional activation by SRF. *Cell*, **81**, 1159-1170.

Hlubek, A. (2004) Untersuchungen der kleinen GTPasen Cdc42 und Rac1 in Ustilago maydis*:* Funktioneller Vergleich und Regulation Diplomarbeit. *Fachbereich Biologie*. Philipps-Universität, Marburg.

Ho, E.C., Cahill, M.J. and 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, G.R., Nassar, N. and Cerione, R.A. (2000) Structure of the Rho family GTP-binding protein Cdc42 in complex with the multifunctional regulator RhoGDI. *Cell*, **100**, 345-356.

Hofmann, C., Shepelev, M. and Chernoff, J. (2004) The genetics of Pak. *J Cell Sci*, **117**, 4343-4354.

Holliday, R. (1965) Induced mitotic crossing-over in relation to genetic replication in synchronously dividing cells of Ustilago maydis. *Genetic Res*, **5**, 104-120.

Holliday, R. (1975) Further evidence for an inducible recombination repair system in Ustilago maydis. *Mutat Res*, **29**, 149-153.

Horii, Y., Beeler, J.F., Sakaguchi, K., Tachibana, M. and Miki, T. (1994) A novel oncogene, ost, encodes a guanine nucleotide exchange factor that potentially links Rho and Rac signaling pathways. *Embo J*, **13**, 4776-4786.

Huang, B. and Cai, M. (2007) Pan1p: an actin director of endocytosis in yeast. *Int J Biochem Cell Biol*, **39**, 1760-1764.

Hurley, J.H. and Misra, S. (2000) Signaling and subcellular targeting by membrane-binding domains. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, **29**, 49-79.

Hurtado, C.A., Beckerich, J.M., Gaillardin, C. and Rachubinski, R.A. (2000) A rac homolog is required for induction of hyphal growth in the dimorphic yeast Yarrowia lipolytica. *J Bacteriol*, **182**, 2376-2386.

Hussain, N.K., Jenna, S., Glogauer, M., Quinn, C.C., Wasiak, S., Guipponi, M., Antonarakis, S.E., Kay, B.K., Stossel, T.P., Lamarche-Vane, N. and McPherson, P.S. (2001) Endocytic protein intersectin-l regulates actin assembly via Cdc42 and N-WASP. *Nat Cell Biol*, **3**, 927-932.

Hussain, N.K., Yamabhai, M., Ramjaun, A.R., Guy, A.M., Baranes, D., O'Bryan, J.P., Der, C.J., Kay, B.K. and McPherson, P.S. (1999) Splice variants of intersectin are components of the endocytic machinery in neurons and nonneuronal cells. *J Biol Chem*, **274**, 15671-15677.

Innis, M.A. and Gelfand, D.H. (1990) Optimization of PCRs. In Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. and White, T.J. (eds.), *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, San Diego, pp. 3-20.

Innocenti, M., Tenca, P., Frittoli, E., Faretta, M., Tocchetti, A., Di Fiore, P.P. and Scita, G. (2002) Mechanisms through which Sos-1 coordinates the activation of Ras and Rac. *J Cell Biol*, **156**, 125-136.

Iseli, C., Stevenson, B.J., de Souza, S.J., Samaia, H.B., Camargo, A.A., Buetow, K.H., Strausberg, R.L., Simpson, A.J., Bucher, P. and Jongeneel, C.V. (2002) Long-range heterogeneity at the 3' ends of human mRNAs. *Genome Res*, **12**, 1068-1074.

Jenna, S., Hussain, N.K., Danek, E.I., Triki, I., Wasiak, S., McPherson, P.S. and Lamarche-Vane, N. (2002) The activity of the GTPase-activating protein CdGAP is regulated by the endocytic protein intersectin. *J Biol Chem*, **277**, 6366-6373.

Ji, G., Zheng, J., Shen, Y., Wu, X., Jiang, R., Lin, Y., Loke, J.C., Davis, K.M., Reese, G.J. and Li, Q.Q. (2007) Predictive modeling of plant messenger RNA polyadenylation sites. *BMC Bioinformatics*, **8**, 43.

Johnson, D.I. (1999) Cdc42: An essential Rho-type GTPase controlling eukaryotic cell polarity. *Microbiol Mol Biol Rev*, **63**, 54-105.

Johnson, D.I. and Pringle, J.R. (1990) Molecular characterization of CDC42, a Saccharomyces cerevisiae gene involved in the development of cell polarity. *J Cell Biol*, **111**, 143-152.

Johnson, J.M., Castle, J., Garrett-Engele, P., Kan, Z., Loerch, P.M., Armour, C.D., Santos, R., Schadt, E.E., Stoughton, R. and Shoemaker, D.D. (2003) Genome-wide survey of human alternative pre-mRNA splicing with exon junction microarrays. *Science*, **302**, 2141-2144.

Kahmann, R., Steinberg, G., Basse, C. and Kämper, J. (2000) *Ustilago maydis, the causative agent of corn smut disease. In Fungal Pathology. Kluwer academic publishers, Dotrecht, The Netherlands*.

Kaksonen, M., Sun, Y. and Drubin, D.G. (2003) A pathway for association of receptors, adaptors, and actin during endocytic internalization. *Cell*, **115**, 475-487.

Kamper, J., Kahmann, R., Bolker, M., Ma, L.J., Brefort, T., Saville, B.J., Banuett, F., Kronstad, J.W., Gold, S.E., Muller, O., Perlin, M.H., Wosten, H.A., de Vries, R., Ruiz-Herrera, J., Reynaga-Pena, C.G., Snetselaar, K., McCann, M., Perez-Martin,

J., Feldbrugge, 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., Munch, K., Rossel, 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., Schluter, T., Margolis, J., Platt, D., Swimmer, C., Gnirke, A., Chen, F., Vysotskaia, V., Mannhaupt, G., Guldener, U., Munsterkotter, 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. and Birren, B.W. (2006) Insights from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen Ustilago maydis. *Nature*, **444**, 97-101.

Kamper, J., Reichmann, M., Romeis, T., Bölker, M. and Kahmann, R. (1995) Multiallelic recognition: nonself-dependent dimerization of the bE and bW homeodomain proteins in Ustilago maydis. *Cell*, **81**, 73-83.

Karnoub, A.E., Symons, M., Campbell, S.L. and Der, C.J. (2004) Molecular basis for Rho GTPase signaling specificity. *Breast Cancer Res Treat*, **84**, 61-71.

Karnoub, A.E., Worthylake, D.K., Rossman, K.L., Pruitt, W.M., Campbell, S.L., Sondek, J. and Der, C.J. (2001) Molecular basis for Rac1 recognition by guanine nucleotide exchange factors. *Nat Struct Biol*, **8**, 1037-1041.

Klahre, U., Becker, C., Schmitt, A.C. and Kost, B. (2006) Nt-RhoGDI2 regulates Rac/Rop signaling and polar cell growth in tobacco pollen tubes. *Plant J*, **46**, 1018-1031.

Klahre, U. and Kost, B. (2006) Tobacco RhoGTPase ACTIVATING PROTEIN1 spatially restricts signaling of RAC/Rop to the apex of pollen tubes. *Plant Cell*, **18**, 3033-3046.

Klosterman, S.J., Perlin, M.H., Garcia-Pedrajas, M., Covert, S.F. and Gold, S.E. (2007) Genetics of morphogenesis and pathogenic development of Ustilago maydis. *Adv Genet*, **57**, 1-47.

Koch, G., Tanaka, K., Masuda, T., Yamochi, W., Nonaka, H. and Takai, Y. (1997) Association of the Rho family small GTP-binding proteins with Rho GDP dissociation inhibitor (Rho GDI) in Saccharomyces cerevisiae. *Oncogene*, **15**, 417-422.

Kohno, H., Tanaka, K., Mino, A., Umikawa, M., Imamura, H., Fujiwara, T., Fujita, Y., Hotta, K., Qadota, H., Watanabe, T., Ohya, Y. and Takai, Y. (1996) Bni1p implicated in cytoskeletal control is a putative target of Rho1p small GTP binding protein in Saccharomyces cerevisiae. *Embo J*, **15**, 6060-6068.

Kohout, S.C., Corbalan-Garcia, S., Torrecillas, A., Gomez-Fernandez, J.C. and Falke, J.J. (2002) C2 domains of protein kinase C isoforms alpha, beta, and gamma: activation parameters and calcium stoichiometries of the membrane-bound state. *Biochemistry*, **41**, 11411-11424.

Kojic, M. and Holloman, W.K. (2000) Shuttle vectors for genetic manipulations in Ustilago maydis. *Can J Microbiol*, **46**, 333-338.

Kovacs, E.M., Makar, R.S. and Gertler, F.B. (2006) Tuba stimulates intracellular N-WASP-dependent actin assembly. *J Cell Sci*, **119**, 2715-2726.

Kozminski, K.G., Chen, A.J., Rodal, A.A. and Drubin, D.G. (2000) Functions and functional domains of the GTPase Cdc42p. *Mol Biol Cell*, **11**, 339-354.

Kranenburg, O., Poland, M., Gebbink, M., Oomen, L. and Moolenaar, W.H. (1997) Dissociation of LPA-induced cytoskeletal contraction from stress fiber formation by differential localization of RhoA. *J Cell Sci*, **110 (Pt 19)**, 2417-2427.

Lanzetti, L. (2007) Actin in membrane trafficking. *Curr Opin Cell Biol*, **19**, 453-458.
Lehmler, C., Steinberg, G., Snetselaar, K.M., Schliwa, M., Kahmann, R. and Bolker, M. (1997) Identification of a motor protein required for filamentous growth in Ustilago maydis. *Embo J*, **16**, 3464-3473.
Leonard, D.A., Evans, T., Hart, M., Cerione, R.A. and Manor, D. (1994) Investigation of the GTP-binding/GTPase cycle of Cdc42Hs using fluorescence spectroscopy. *Biochemistry*, **33**, 12323-12328.
Leveleki, L., Mahlert, M., Sandrock, B. and Bölker, M. (2004) The PAK family kinase Cla4 is required for budding and morphogenesis in Ustilago maydis. *Mol Microbiol*, **54**, 396-406.
Li, R., Debreceni, B., Jia, B., Gao, Y., Tigyi, G. and Zheng, Y. (1999) Localization of the PAK1-, WASP-, and IQGAP1-specifying regions of Cdc42. *J Biol Chem*, **274**, 29648-29654.
Maesaki, R., Ihara, K., Shimizu, T., Kuroda, S., Kaibuchi, K. and Hakoshima, T. (1999) The structural basis of Rho effector recognition revealed by the crystal structure of human RhoA complexed with the effector domain of PKN/PRK1. *Mol Cell*, **4**, 793-803.
Magnotta, S.M. and Gogarten, J.P. (2002) Multi site polyadenylation and transcriptional response to stress of a vacuolar type H+-ATPase subunit A gene in Arabidopsis thaliana. *BMC Plant Biol*, **2**, 3.
Mahajan, N.P. and Earp, H.S. (2003) An SH2 domain-dependent, phosphotyrosine-independent interaction between Vav1 and the Mer receptor tyrosine kinase: a mechanism for localizing guanine nucleotide-exchange factor action. *J Biol Chem*, **278**, 42596-42603.
Mahlert, M., Leveleki, L., Hlubek, A., Sandrock, B. and Bölker, M. (2006) Rac1 and Cdc42 regulate hyphal growth and cytokinesis in the dimorphic fungus Ustilago maydis. *Mol Microbiol*, **59**, 567-578.
Manser, E., Leung, T., Salihuddin, H., Zhao, Z.S. and Lim, L. (1994) A brain serine/threonine protein kinase activated by Cdc42 and Rac1. *Nature*, **367**, 40-46.
Marinissen, M.J. and Gutkind, J.S. (2005) Scaffold proteins dictate Rho GTPase-signaling specificity. *Trends Biochem Sci*, **30**, 423-426.
Martin, R., Hellwig, D., Schaub, Y., Bauer, J., Walther, A. and Wendland, J. (2007) Functional analysis of Candida albicans genes whose Saccharomyces cerevisiae homologues are involved in endocytosis. *Yeast*, **24**, 511-522.
Matsuura, N. (2006) [Aarskog-Scott syndrome]. *Nippon Rinsho*, **Suppl 3**, 395-399.
Meller, N., Merlot, S. and Guda, C. (2005) CZH proteins: a new family of Rho-GEFs. *J Cell Sci*, **118**, 4937-4946.
Menard, L., Tomhave, E., Casey, P.J., Uhing, R.J., Snyderman, R. and Didsbury, J.R. (1992) Rac1, a low-molecular-mass GTP-binding-protein with high intrinsic GTPase activity and distinct biochemical properties. *Eur J Biochem*, **206**, 537-546.
Michaelson, D., Silletti, J., Murphy, G., D'Eustachio, P., Rush, M. and Philips, M.R. (2001a) Differential localization of Rho GTPases in live cells: Regulation by hypervariable regions and RhoGDI binding. *Journal of Cell Biology*, **152**, 111-126.
Michaelson, D., Silletti, J., Murphy, G., D'Eustachio, P., Rush, M. and Philips, M.R. (2001b) Differential localization of Rho GTPases in live cells: regulation by hypervariable regions and RhoGDI binding. *J Cell Biol*, **152**, 111-126.
Miki, H., Yamaguchi, H., Suetsugu, S. and Takenawa, T. (2000) IRSp53 is an essential intermediate between Rac and WAVE in the regulation of membrane ruffling. *Nature*, **408**, 732-735.

Miliaras, N.B., Park, J.H. and Wendland, B. (2004) The function of the endocytic scaffold protein Pan1p depends on multiple domains. *Traffic*, **5**, 963-978.

Minden, A., Lin, A., Claret, F.X., Abo, A. and Karin, M. (1995) Selective activation of the JNK signaling cascade and c-Jun transcriptional activity by the small GTPases Rac and Cdc42Hs. *Cell*, **81**, 1147-1157.

Mitchison, J.M. and Nurse, P. (1985) Growth in cell length in the fission yeast Schizosaccharomyces pombe. *J Cell Sci*, **75**, 357-376.

Mosch, H.U., Kohler, T. and Braus, G.H. (2001) Different domains of the essential GTPase Cdc42p required for growth and development of Saccharomyces cerevisiae. *Mol Cell Biol*, **21**, 235-248.

Mott, H.R., Owen, D., Nietlispach, D., Lowe, P.N., Manser, E., Lim, L. and Laue, E.D. (1999) Structure of the small G protein Cdc42 bound to the GTPase-binding domain of ACK. *Nature*, **399**, 384-388.

Munemitsu, S., Innis, M.A., Clark, R., McCormick, F., Ullrich, A. and Polakis, P. (1990) Molecular cloning and expression of a G25K cDNA, the human homolog of the yeast cell cycle gene CDC42. *Mol Cell Biol*, **10**, 5977-5982.

Nagata, Y. and Burger, M.M. (1974) Wheat germ agglutinin. Molecular characteristics and specificity for sugar binding. *J Biol Chem*, **249**, 3116-3122.

Nimnual, A.S., Yatsula, B.A. and Bar-Sagi, D. (1998) Coupling of Ras and Rac guanosine triphosphatases through the Ras exchanger Sos. *Science*, **279**, 560-563.

Nobes, C.D. and Hall, A. (1995) Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell*, **81**, 53-62.

O'Bryan, J.P., Mohney, R.P. and Oldham, C.E. (2001) Mitogenesis and endocytosis: What's at the INTERSECTIoN? *Oncogene*, **20**, 6300-6308.

Otsuki, Y., Tanaka, M., Yoshii, S., Kawazoe, N., Nakaya, K. and Sugimura, H. (2001) Tumor metastasis suppressor nm23H1 regulates Rac1 GTPase by interaction with Tiam1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 4385-4390.

Owen, D., Mott, H.R., Laue, E.D. and Lowe, P.N. (2000) Residues in Cdc42 that specify binding to individual CRIB effector proteins. *Biochemistry*, **39**, 1243-1250.

Park, H.O., Sanson, A. and Herskowitz, I. (1999) Localization of bud2p, a GTPase-activating protein necessary for programming cell polarity in yeast to the presumptive bud site. *Genes Dev*, **13**, 1912-1917.

Pasteris, N.G., Buckler, J., Cadle, A.B. and Gorski, J.L. (1997) Genomic organization of the faciogenital dysplasia (FGD1; Aarskog syndrome) gene. *Genomics*, **43**, 390-394.

Pasteris, N.G., Cadle, A., Logie, L.J., Porteous, M.E., Schwartz, C.E., Stevenson, R.E., Glover, T.W., Wilroy, R.S. and Gorski, J.L. (1994) Isolation and characterization of the faciogenital dysplasia (Aarskog-Scott syndrome) gene: a putative Rho/Rac guanine nucleotide exchange factor. *Cell*, **79**, 669-678.

Perez-Sala, D. (2007) Protein isoprenylation in biology and disease: general overview and perspectives from studies with genetically engineered animals. *Front Biosci*, **12**, 4456-4472.

Pesole, G., Liuni, S., Grillo, G., Licciulli, F., Larizza, A., Makalowski, W. and Saccone, C. (2000) UTRdb and UTRsite: specialized databases of sequences and functional elements of 5' and 3' untranslated regions of eukaryotic mRNAs. *Nucleic Acids Res*, **28**, 193-196.

Pfaffl, M.W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, **29**, e45.

Pirone, D.M., Carter, D.E. and Burbelo, P.D. (2001) Evolutionary expansion of CRIB-containing Cdc42 effector proteins. *Trends Genet*, **17**, 370-373.

Pruyne, D. and Bretscher, A. (2000) Polarization of cell growth in yeast I. Establishment and maintenance of polarity states. *Journal of Cell Science*, **113**, 365-375.

Pucharcos, C., Estivill, X. and de la Luna, S. (2000) Intersectin 2, a new multimodular protein involved in clathrin-mediated endocytosis. *FEBS Lett*, **478**, 43-51.

Pucharcos, C., Fuentes, J.J., Casas, C., de la Luna, S., Alcantara, S., Arbones, M.L., Soriano, E., Estivill, X. and Pritchard, M. (1999) Alu-splice cloning of human Intersectin (ITSN), a putative multivalent binding protein expressed in proliferating and differentiating neurons and overexpressed in Down syndrome. *Eur J Hum Genet*, **7**, 704-712.

Qualmann, B. and Kessels, M.M. (2002) Endocytosis and the cytoskeleton. *Int Rev Cytol*, **220**, 93-144.

Quesada, V., Dean, C. and Simpson, G.G. (2005) Regulated RNA processing in the control of Arabidopsis flowering. *Int J Dev Biol*, **49**, 773-780.

Reddy, A.S. (2007) Alternative splicing of pre-messenger RNAs in plants in the genomic era. *Annu Rev Plant Biol*, **58**, 267-294.

Resh, M.D. (2004) Membrane targeting of lipid modified signal transduction proteins. *Subcell Biochem*, **37**, 217-232.

Richman, T.J., Toenjes, K.A., Morales, S.E., Cole, K.C., Wasserman, B.T., Taylor, C.M., Koster, J.A., Whelihan, M.F. and Johnson, D.I. (2004) Analysis of cell-cycle specific localization of the Rdi1p RhoGDI and the structural determinants required for Cdc42p membrane localization and clustering at sites of polarized growth. *Curr Genet*, **45**, 339-349.

Ridley, A.J., Paterson, H.F., Johnston, C.L., Diekmann, D. and Hall, A. (1992) The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell*, **70**, 401-410.

Ron, D., Tronick, S.R., Aaronson, S.A. and Eva, A. (1988) Molecular cloning and characterization of the human dbl proto-oncogene: evidence that its overexpression is sufficient to transform NIH/3T3 cells. *Embo J*, **7**, 2465-2473.

Rossman, K.L., Cheng, L., Mahon, G.M., Rojas, R.J., Snyder, J.T., Whitehead, I.P. and Sondek, J. (2003) Multifunctional roles for the PH domain of Dbs in regulating Rho GTPase activation. *J Biol Chem*, **278**, 18393-18400.

Rossman, K.L., Der, C.J. and Sondek, J. (2005) GEF means go: turning on RHO GTPases with guanine nucleotide-exchange factors. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **6**, 167-180.

Rossman, K.L., Worthylake, D.K., Snyder, J.T., Siderovski, D.P., Campbell, S.L. and Sondek, J. (2002) A crystallographic view of interactions between Dbs and Cdc42: PH domain-assisted guanine nucleotide exchange. *Embo J*, **21**, 1315-1326.

Salazar, M.A., Kwiatkowski, A.V., Pellegrini, L., Cestra, G., Butler, M.H., Rossman, K.L., Serna, D.M., Sondek, J., Gertler, F.B. and De Camilli, P. (2003) Tuba, a novel protein containing bin/amphiphysin/Rvs and Dbl homology domains, links dynamin to regulation of the actin cytoskeleton. *J Biol Chem*, **278**, 49031-49043.

Sanger, F., Nicklen, S. and Coulsen, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*, **74**, 5463-5467.

Sarrouilhe, D., di Tommaso, A., Metaye, T. and Ladeveze, V. (2006) Spinophilin: from partners to functions. *Biochimie*, **88**, 1099-1113.

Schafer, D.A. (2002) Coupling actin dynamics and membrane dynamics during endocytosis. *Curr Opin Cell Biol*, **14**, 76-81.

Scheffer, J., Chen, C., Heidrich, P., Dickman, M.B. and Tudzynski, P. (2005) A CDC42 Homologue in Claviceps purpurea Is Involved in Vegetative Differentiation and Is Essential for Pathogenicity. *Eukaryot Cell*, **4**, 1228-1238.

Schmidt, A. and Hall, A. (2002) Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch. *Genes Dev*, **16**, 1587-1609.

Sengar, A.S., Wang, W., Bishay, J., Cohen, S. and Egan, S.E. (1999) The EH and SH3 domain Ese proteins regulate endocytosis by linking to dynamin and Eps15. *Embo J*, **18**, 1159-1171.

Sheffield, P., Garrard, S. and Derewenda, Z. (1999) Overcoming expression and purification problems of RhoGDI using a family of "parallel" expression vectors. *Protein Expr Purif*, **15**, 34-39.

Sheu, Y.J., Santos, B., Fortin, N., Costigan, C. and Snyder, M. (1998) Spa2p interacts with cell polarity proteins and signaling components involved in yeast cell morphogenesis. *Mol Cell Biol*, **18**, 4053-4069.

Shimada, Y., Gulli, M.P. and Peter, M. (2000a) Nuclear sequestration of the exchange factor Cdc24 by Far1 regulates cell polarity during yeast mating. *Nat Cell Biol*, **2**, 117-124.

Shimada, Y., Gulli, M.P. and Peter, M. (2000b) Nuclear sequestration of the exchange factor Cdc24 by Far1 regulates cell polarity during yeast mating. *Nat Cell Biol*, **2**, 117-124.

Shimada, Y., Wiget, P., Gulli, M.P., Bi, E. and Peter, M. (2004) The nucleotide exchange factor Cdc24p may be regulated by auto-inhibition. *Embo J*, **23**, 1051-1062.

Shinjo, K., Koland, J.G., Hart, M.J., Narasimhan, V., Johnson, D.I., Evans, T. and Cerione, R.A. (1990) Molecular cloning of the gene for the human placental GTP-binding protein Gp (G25K): identification of this GTP-binding protein as the human homolog of the yeast cell-division-cycle protein CDC42. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**, 9853-9857.

Shou, C., Farnsworth, C.L., Neel, B.G. and Feig, L.A. (1992) Molecular cloning of cDNAs encoding a guanine-nucleotide-releasing factor for Ras p21. *Nature*, **358**, 351-354.

Silvius, J.R. (2002) Mechanisms of Ras protein targeting in mammalian cells. *J Membr Biol*, **190**, 83-92.

Snetselaar, K.M., Bölker, M. and Kahmann, R. (1996) Ustilago maydis Mating Hyphae Orient Their Growth toward Pheromone Sources. *Fungal Genet Biol*, **20**, 299-312.

Snyder, J.T., Worthylake, D.K., Rossman, K.L., Betts, L., Pruitt, W.M., Siderovski, D.P., Der, C.J. and Sondek, J. (2002) Structural basis for the selective activation of Rho GTPases by Dbl exchange factors. *Nat Struct Biol*, **9**, 468-475.

Southern, E. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol*, **98**, 503-517.

Sparks, K.A. and Dieckmann, C.L. (1998) Regulation of poly(A) site choice of several yeast mRNAs. *Nucleic Acids Res*, **26**, 4676-4687.

Spellig, T., Bölker, M., Lottspeich, F., Frank, R.W. and Kahmann, R. (1994) Pheromones trigger filamentous growth in Ustilago maydis. *Embo J*, **13**, 1620-1627.

Stamm, S., Ben-Ari, S., Rafalska, I., Tang, Y., Zhang, Z., Toiber, D., Thanaraj, T.A. and Soreq, H. (2005) Function of alternative splicing. *Gene*, **344**, 1-20.

Stefan, C.J. and Blumer, K.J. (1999) A syntaxin homolog encoded by VAM3 mediates down-regulation of a yeast G protein-coupled receptor. *J Biol Chem*, **274**, 1835-1841.

Steinberg, G., Wedlich-Soldner, R., Brill, M. and Schulz, I. (2001) Microtubules in the fungal pathogen Ustilago maydis are highly dynamic and determine cell polarity. *J Cell Sci*, **114**, 609-622.

Stewart, A. and Deacon, J.W. (1995) Vital fluorochromes as tracers for fungal growth studies. *Biotech Histochem*, **70**, 57-65.

Stradal, T., Kranewitter, W., Winder, S.J. and Gimona, M. (1998) CH domains revisited. *FEBS Lett*, **431**, 134-137.

Sumimoto, H., Kamakura, S. and Ito, T. (2007) Structure and function of the PB1 domain, a protein interaction module conserved in animals, fungi, amoebas, and plants. *Sci STKE*, **2007**, re6.

Symons, M. (1996) Rho family GTPases: the cytoskeleton and beyond. *Trends Biochem Sci*, **21**, 178-181.

Takai, Y., Sasaki, T. and Matozaki, T. (2001) Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev*, **81**, 153-208.

Tichopad, A., Dilger, M., Schwarz, G. and Pfaffl, M.W. (2003) Standardized determination of real-time PCR efficiency from a single reaction set-up. *Nucleic Acids Res*, **31**, e122.

Tirode, F., Malaguti, C., Romero, F., Attar, R., Camonis, J. and Egly, J.M. (1997) A conditionally expressed third partner stabilizes or prevents the formation of a transcriptional activator in a three-hybrid system. *J Biol Chem*, **272**, 22995-22999.

Tong, X.K., Hussain, N.K., Adams, A.G., O'Bryan, J.P. and McPherson, P.S. (2000a) Intersectin can regulate the Ras/MAP kinase pathway independent of its role in endocytosis. *J Biol Chem*, **275**, 29894-29899.

Tong, X.K., Hussain, N.K., de Heuvel, E., Kurakin, A., Abi-Jaoude, E., Quinn, C.C., Olson, M.F., Marais, R., Baranes, D., Kay, B.K. and McPherson, P.S. (2000b) The endocytic protein intersectin is a major binding partner for the Ras exchange factor mSos1 in rat brain. *Embo J*, **19**, 1263-1271.

Tsyba, L., Skrypkina, I., Rynditch, A., Nikolaienko, O., Ferenets, G., Fortna, A. and Gardiner, K. (2004) Alternative splicing of mammalian Intersectin 1: domain associations and tissue specificities. *Genomics*, **84**, 106-113.

Vallim, M.A., Nichols, C.B., Fernandes, L., Cramer, K.L. and Alspaugh, J.A. (2005) A Rac homolog functions downstream of Ras1 to control hyphal differentiation and high-temperature growth in the pathogenic fungus Cryptococcus neoformans. *Eukaryot Cell*, **4**, 1066-1078.

Van Aelst, L. and D'Souza-Schorey, C. (1997) Rho GTPases and signaling networks. *Genes Dev*, **11**, 2295-2322.

Vetter, I.R. and Wittinghofer, A. (2001) The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science*, **294**, 1299-1304.

Vida, T.A. and Emr, S.D. (1995) A new vital stain for visualizing vacuolar membrane dynamics and endocytosis in yeast. *J Cell Biol*, **128**, 779-792.

Wang, J.B., Wu, W.J. and Cerione, R.A. (2005) Cdc42 and Ras cooperate to mediate cellular transformation by intersectin-L. *J Biol Chem*, **280**, 22883-22891.

Wang, L., Zhu, K. and Zheng, Y. (2004) Oncogenic Dbl, Cdc42, and p21-activated kinase form a ternary signaling intermediate through the minimum interactive domains. *Biochemistry*, **43**, 14584-14593.

Wear, M.A., Schafer, D.A. and Cooper, J.A. (2000) Actin dynamics: Assembly and disassembly of actin networks. *Curr Biol*, **10**, R891-R895.

Wedlich-Soldner, R., Altschuler, S., Wu, L. and Li, R. (2003) Spontaneous cell polarization through actomyosin-based delivery of the Cdc42 GTPase. *Science*, **299**, 1231-1235.

Wedlich-Söldner, R. and Li, R. (2003) Spontaneous cell polarization: undermining determinism. *Nat Cell Biol*, **5**, 267-270.

Weinzierl, G., Leveleki, L., Hassel, A., Kost, G., Wanner, G. and Bölker, M. (2002) Regulation of cell separation in the dimorphic fungus Ustilago maydis. *Mol Microbiol*, **45**, 219-231.

Welch, H.C., Coadwell, W.J., Ellson, C.D., Ferguson, G.J., Andrews, S.R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Hawkins, P.T. and Stephens, L.R. (2002) P-Rex1, a PtdIns(3,4,5)P3- and Gbetagamma-regulated guanine-nucleotide exchange factor for Rac. *Cell*, **108**, 809-821.

Wendland, B., McCaffery, J.M., Xiao, Q. and Emr, S.D. (1996) A novel fluorescence-activated cell sorter-based screen for yeast endocytosis mutants identifies a yeast homologue of mammalian eps15. *J Cell Biol*, **135**, 1485-1500.

Whitehead, I.P., Khosravi-Far, R., Kirk, H., Trigo-Gonzalez, G., Der, C.J. and Kay, R. (1996) Expression cloning of lsc, a novel oncogene with structural similarities to the Dbl family of guanine nucleotide exchange factors. *J Biol Chem*, **271**, 18643-18650.

Wittinghofer, A. and Nassar, N. (1996) How Ras-related proteins talk to their effectors. *Trends Biochem Sci*, **21**, 488-491.

Wu, X. and Jiang, Y.W. (2005) Possible integration of upstream signals at Cdc42 in filamentous differentiation of S. cerevisiae. *Yeast*, **22**, 1069-1077.

Yamabhai, M., Hoffman, N.G., Hardison, N.L., McPherson, P.S., Castagnoli, L., Cesareni, G. and Kay, B.K. (1998) Intersectin, a novel adaptor protein with two Eps15 homology and five Src homology 3 domains. *J Biol Chem*, **273**, 31401-31407.

Yamazaki, D., Oikawa, T. and Takenawa, T. (2007) Rac-WAVE-mediated actin reorganization is required for organization and maintenance of cell-cell adhesion. *J Cell Sci*, **120**, 86-100.

Ye, X. and Szaniszlo, P.J. (2000) Expression of a constitutively active Cdc42 homologue promotes development of sclerotic bodies but represses hyphal growth in the zoopathogenic fungus Wangiella (Exophiala) dermatitidis. *J Bacteriol*, **182**, 4941-4950.

Yokoyama, K., Goodwin, G.W., Ghomashchi, F., Glomset, J.A. and Gelb, M.H. (1991) A protein geranylgeranyltransferase from bovine brain: implications for protein prenylation specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 5302-5306.

Zhang, B., Zhang, Y., Wang, Z. and Zheng, Y. (2000) The role of Mg2+ cofactor in the guanine nucleotide exchange and GTP hydrolysis reactions of Rho family GTP-binding proteins. *J Biol Chem*, **275**, 25299-25307.

Zhang, F.L. and Casey, P.J. (1996) Protein prenylation: molecular mechanisms and functional consequences. *Annu Rev Biochem*, **65**, 241-269.

Zhang, H., Wang, L., Kao, S., Whitehead, I.P., Hart, M.J., Liu, B., Duus, K., Burridge, K., Der, C.J. and Su, L. (1999) Functional interaction between the cytoplasmic leucine-zipper domain of HIV-1 gp41 and p115-RhoGEF. *Curr Biol*, **9**, 1271-1274.

Zhao, Z.S., Leung, T., Manser, E. and Lim, L. (1995) Pheromone signalling in Saccharomyces cerevisiae requires the small GTP-binding protein Cdc42p and its activator CDC24. *Mol Cell Biol*, **15**, 5246-5257.

Zheng, Y. (2001) Dbl family guanine nucleotide exchange factors. *Trends Biochem Sci*, **26**, 724-732.

Zheng, Y., Bender, A. and Cerione, R.A. (1995) Interactions among proteins involved in bud-site selection and bud-site assembly in Saccharomyces cerevisiae. *J Biol Chem*, **270**, 626-630.

Zheng, Y., Cerione, R. and Bender, A. (1994) Control of the yeast bud-site assembly GTPase Cdc42. Catalysis of guanine nucleotide exchange by Cdc24 and stimulation of GTPase activity by Bem3. *J Biol Chem*, **269**, 2369-2372.

Zheng, Y., Fischer, D.J., Santos, M.F., Tigyi, G., Pasteris, N.G., Gorski, J.L. and Xu, Y. (1996) The faciogenital dysplasia gene product FGD1 functions as a Cdc42Hs-specific guanine-nucleotide exchange factor. *J Biol Chem*, **271**, 33169-33172.

Zhou, K., Wang, Y., Gorski, J.L., Nomura, N., Collard, J. and Bokoch, G.M. (1998) Guanine nucleotide exchange factors regulate specificity of downstream signaling from Rac and Cdc42. *J Biol Chem*, **273**, 16782-16786.