Die Rolle von PAM2-Proteinen während des endosomalen mRNA-Transports in Ustilago maydis

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Thomas Pohlmann

aus Osnabrück

Düsseldorf, Juli 2013

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

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

Referent: Prof. Dr. Michael Feldbrügge Korreferent: Prof. Dr. Rolf Wagner

Tag der mündlichen Prüfung: _____

Eidesstattliche Erklärung

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

Ort, Datum

Thomas Pohlmann

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

Baumann S., Pohlmann T., Jungbluth M., Brachmann A. und Feldbrügge M. (2012) Kinesin-3 and dynein mediate microtubule-dependent co-transport of mRNPs and endosomes. *J Cell Sci* 125: 2740-2750

Weitere wissenschaftliche Beiträge:

König J., Baumann S., Koepke J., Pohlmann T., Zarnack K. und Feldbrügge M. (2009) The fungal RNA-binding protein Rrm4 mediates long-distance transport of *ubi1* and *rho3* mRNAs. *EMBO J.* 28: 1855 – 1866

Vollmeister E., Schipper K., Baumann S., Haag C., Pohlmann T., Stock J. und Feldbrügge M. (2012) Fungal development of the plant pathogen *Ustilago maydis*. *FEMS Microbiol Rev* 36: 59-77

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von Oktober 2008 bis Oktober 2009 in Marburg am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie in der Abteilung für Organismische Interaktionen und von November 2009 bis Mai 2013 an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf in dem Institut für Mikrobiologie unter der Leitung und Betreuung von Herrn Prof. Dr. Michael Feldbrügge durchgeführt. Für Maren

Zusammenfassung

Die Etablierung von Zellpolarität ist entscheidend für die Entwicklung und Funktion eukaryotischer Zellen. Dieser Prozess wird durch die asymmetrische Verteilung und Aktivität von Polaritätsfaktoren und weiterer zentraler Proteine gesteuert. Ein wichtiger Mechanismus ist der aktive Transport von mRNA und deren lokale Translation am Bestimmungsort. In dem phytopathogenen Basidiomyzeten *Ustilago maydis* ist das RNA-bindende Protein Rrm4 eine Schlüsselkomponente des Langstreckentransports von mRNA. Rrm4 bindet spezifische Transkripte und bildet zusammen mit dem Poly(A)-bindenden Protein Pab1 sowie weiteren Faktoren große Boten (*messenger*)-Ribonukleoprotein (mRNP)-Komplexe. Diese Komplexe werden anschließend entlang eines antipolaren Mikrotubuli-Zytoskeletts zu ihrem Bestimmungsort in der Zelle transportiert. Die C-terminale MLLE-Domäne von Rrm4 ist essentiell für die Verbindung der mRNP-Komplexe mit der Transportmaschinerie. Daraus leitete sich die Frage ab, wie der Transport der Rrm4-abhängigen mRNPs vermittelt wird und welche Faktoren an diesem Prozess beteiligt sind.

In der vorliegenden Arbeit konnte das UNC-104/KIF1A-ähnliche Kinesin Kin3 als Plus-Endgerichtetes molekulares Motorprotein der Rrm4-abhängigen mRNPs identifiziert werden. Aufgrund der Bedeutung dieses Motorproteins für die Beförderung von frühen Endosomen wurde untersucht, ob eine Verbindung zwischen dem Transport von mRNPs und Endosomen existiert. In der Tat wird Rrm4 mit Endosomen transportiert und assoziiert mit diesen unabhängig von Kin3. Basierend auf diesen Daten wurde die neuartige Hypothese eines Endosomen-gekoppelten Transports von mRNA postuliert.

Ein nächster wichtiger Schritt für das Verständnis des mRNA-Langstreckentransports ist die Aufklärung der genauen Zusammensetzung der mRNPs und deren Assoziation mit Endosomen. Sowohl Rrm4 als auch Pab1 besitzen an ihrem C-Terminus eine MLLE-Domäne, für die eine Interaktion mit dem PAM2-Motiv vorhergesagt wird. Daher wurde die Rolle zweier Kandidatenproteine mit PAM2-Motiv, genannt Upa1 (Ustilago PAM2 Protein 1) und Upa2, während des mRNA-Langstreckentransport untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass das endosomale Protein Upa1 spezifisch den mRNA-Transport beeinflusst, ohne die Funktion oder den Transport von Endosomen zu beeinträchtigen. Der Verlust von Upa1 oder dessen membranbindender FYVE-Domäne führt zu einer Beeinträchtigung der Rrm4-Bewegung und gestörtem Transport von Pab1. Upa1 interagiert im Hefe-Zwei-Hybrid-System sowohl mit Rrm4 als auch mit Pab1 und könnte als Adapterprotein die mRNPs mit den Endosomen verbinden. Im Gegensatz dazu interagiert Upa2 spezifisch mit Pab1, nicht jedoch mit Rrm4. Dementsprechend wirkt sich der Verlust von Upa2 nicht auf die Bewegung von Rrm4, jedoch auf den Transport von Pab1 aus, und der Phänotyp einer upa2-Deletion ist mit dem eines gestörten mRNA-Transports vergleichbar. Somit konnten zwei PAM2-Proteine als wichtige neue Faktoren des mRNA-Transports in U. maydis identifiziert werden.

I

Summary

The establishment of cellular polarity is crucial for the development and function of eukaryotic cells. This process is mediated by asymmetric distribution and activity of polarity factors and other regulatory proteins. One major way to achieve this is the active transport of mRNA followed by their local translation. This enables the cell to control gene expression in a spatiotemporal manner. In the phytopathogenic basidiomycete *Ustilago maydis*, the RNA-binding protein Rrm4 is a key component of long-distance mRNA transport. Rrm4 binds a distinct set of transcripts and forms large messenger ribonucleoprotein (mRNP) particles together with the poly(A)-binding protein Pab1 as well as additional factors. Subsequently, these complexes are transported along an antipolar microtubule cytoskeleton to their cellular destination. The C-terminal MLLE domain of Rrm4 is important for the connection of mRNPs to the transport machinery. At the beginning of this project the involved motor proteins as well as the connection of Rrm4 to these were unknown.

In this thesis, the UNC-104/KIF1A-like kinesin motorprotein Kin3 was identified as plus-end directed motor for the Rrm4-dependent mRNPs. Based on its role in trafficking of early endosomes a possible connection between the transport of mRNPs and endosomes was investigated. Indeed, Rrm4 is cotransported with mobile endosomes and associates with these organelles independent of Kin3. As a result of these observations, the novel hypothesis of an endosome-coupled transport of mRNA was proposed.

An important next step in the characterization of mRNA long-distance transport was the investigation of the exact composition of mRNPs as well as their association with endosomes. Rrm4 and Pab1 contain both a C-terminal MLLE domain, which is described to bind the defined PAM2 motif. Thus, the role of two candidate proteins containing a PAM2 motiv, called Upa1 (Ustilago PAM2 protein 1) and Upa2, during long distance mRNA transport was investigated. It could be demonstrated that the endosomal protein Upa1 specifically affects mRNA transport without impairing the function or transport of endosomes. Loss of Upa1 or its membrane-binding FYVE domain impairs transport of Rrm4 and Pab1. In the yeast two-hybrid system Upa1 interacts with Rrm4 as well as Pab1 and could thereby act as an adapter between mRNPs and endosomes. In contrast Upa2 specifically interacts with Pab1, but not with Rrm4. Consistent with this observation, loss of Upa2 affects only the transport of Pab1, but not of Rrm4, and the *upa2* deletion resembles the phenotype observed upon disturbing mRNA transport. Hence, two PAM2-proteins could be identified as important new factors of mRNA transport.

Abkürzungen und Fachbegriffe

°C	Grad Celsius	μm	Mikrometer	
AD	Aktivierungsdomäne	mМ	millimolar (als Konzentration)	
AK	Antikörper	mM	mutierte MLLE-Domäne (als	
Ank	Ankyrin Wiederholung		Allel)	
AS	Aminosäure(n)	mRNA	messenger RNA (Boten-RNA)	
ATP	Adenosintriphosphat	mRNP	messenger Ribonukleoprotein	
BD	Bindedomäne	MT	Mikrotubuli	
bp	Basenpaar(e)	MUMDB	MIPS Ustilago DataBase	
BSA	Bovines Serumalbumin	N-	amino-	
Cbx	Carboxin	Nat	Nourseothricin	
C-	carboxy-	nt	Nukleotid(e)	
(-)CM	C-terminale Fusion mit	PABP	Poly(A)-bindendes Protein	
	mCherry-3xMyc	PAM2	PABP-interagierendes Motiv 2	
(-)Cn	N-terminale Fusion mit	PH	Pleckstrin-Homologie	
	mCherry	OD	optische Dichte	
Δ	Delta, steht für eine Deletion	ORF	open reading frame	
DIC	differential interphase contrast	PCR	polymerase chain reaction	
DNA	Desoxyribonukleinsäure	Rfp	(monomeric) red fluorescent	
DUF	Domäne von unbekannter		protein	
	Funktion	RING	really interesting new gene	
Genit	Geniticin	RRM	RNA recognition motif	
Gfp	(enhanced) green fluorescent	RT	Raumtemperatur	
	protein	RNA	Ribonukleinsäure	
(-)G	C-terminale Fusion mit Gfp	(-)R	C-terminale Fusion mit Rfp	
(-)Gn	N-terminlae Fusion mit Gfp	S	Sekunde(n)	
GZL	Gesamtzelllysat	U	Unit (Einheit der	
h	Stunde(n)		Enzymaktivität)	
Hyg	Hygromycin	Upm	Umdrehungen pro Minute	
$H_2O_{\text{bid.}}$	zweifach destilliertes Wasser	UTR	untranslatierte Region	
kDa	Kilodalton	UV	ultraviolettes Licht	
I	Liter	VF	Vesikelfraktion	
LE	Lokalisationselement	v/v	Volumenprozent	
min	Minute(n)	wt	Wildtyp	
ml	Milliliter	w/v	Gewichtsprozent	

Inhaltsverzeichnis

Zusammen	fassungI
Summary	
Abkürzung	en und Fachbegriffe III
Inhaltsverz	eichnisIV
1. Einleitu	Ing 1
1.1 mR	NA-Transport und lokale Translation1
1.1.1	Aktin-abhängiger Transport von mRNPs3
1.1.2	Mikrotubuli-abhängiger Transport von mRNPs4
1.2 Die	Struktur und Funktion Poly(A)-bindender Proteine8
1.2.1	Die Interaktion der MLLE-Domäne mit PAM29
1.3 Ust	ilago maydis als Modell für Mikrotubuli-abhängigen mRNA-Transport
1.3.1	Der Lebenszyklus von Ustilago maydis11
1.3.2	Ustilago maydis als Modellorganismus13
1.3.3	Mikrotubuli-abhängige Transportprozesse in U. maydis
1.4 Ziel	setzung dieser Arbeit18
2. Ergebn	isse
2.1 Die	Rolle des molekularen Motors Kin319
2.1.1	Kin3 vermittelt den Langstreckentransport von mRNPs
2.1.2	Rrm4 wird mit Endosomen transportiert
2.2 Die	Identifikation von PAM2-tragenden Proteinen als potentielle Adapter25
2.2.1	Die Assoziation von Rrm4 mit Endosomen wird von der MLLE-Domäne
	vermittelt
2.2.2	PAM2-tragende Proteine als potentielle Interaktionspartner von Rrm427
2.2.3	Mehrere PAM2-Proteine beeinflussen die Filamentbildung von <i>U. maydis</i> 30
2.3 Die	Charakterisierung von Upa132
2.3.1	Upa1 ist wichtig für das filamentöse Wachstum und die Sekretion von Cts132
2.3.2	Upa1 ist ein endosomales Protein
2.3.3	Das PAM2-Motiv von Upa1 interagiert mit der MLLE-Domäne von Pab136
2.3.4	Der Verlust des PAM2-Motivs hat keinen Einfluss auf die Funktion von Upa1 39
2.3.5	Die FYVE-Domäne ist notwendig für die Assoziation von Upa1
	an Endosomen41
2.3.6	Eine Deletion der Ankyrin-Wiederholungen wirkt destabilisierend45
2.3.7	Upa1 zeigt eine PAM2-unabhängige Interaktion mit Rrm447
2.3.8	Transport und Funktion von Endosomen sind unabhängig von Upa150
2.3.9	Upa1 ist wichtig für den Langstreckentransport von mRNA51

2	2.4	4	Die	Charakterisierung des Multi-PAM2-Proteins Upa2	.55
		2.4.	1	Upa2 beeinflusst das filamentöse Wachstum und die Sekretion von Cts1	.55
		2.4.	2	Upa2 wird mit Rrm4 kotransportiert	.57
		2.4.	3	Upa2 interagiert mit der MLLE-Domäne von Pab1	.59
		2.4.	4	Die PAM2-Motive von Upa2 sind bedeutungslos für die Assoziation mit den	~ (
		~ .	_		.61
		2.4.	5	Komplexen	'- 63
3.		Dis	kus	sion	65
:	3.´	1	Die	Motorkomposition zum Transport der Rrm4-abhängigen mRNPs	.65
		3.1.	1	Kin3 vermittelt den Plus-End-gerichteten Transport	.65
		3.1.	2	Membran-gekoppelter mRNA-Transport	.68
:	3.2	2	Die	Interaktion von PAM2-Motiven mit der MLLE-Domäne	.70
	3.3	3	Die Trar	Rolle von Upa1 als substantielle Proteinkomponente der mRNA- nsportmaschinerie	73
		3.3.	1	Upa1 besitzt ein funktionelles PAM2-Motiv	.73
		3.3.	2	Die Bedeutung der Ankyrin-Wiederholungen für die Stabilität von Upa1	.77
		3.3.	3	Upa1 bindet über die FYVE-Domäne an Endosomen	.77
:	3.4	4	Die	Rolle von Upa2 im mRNA-Langstreckentransport	.81
		3.4.	1	Upa2 ist eine zentrale Komponente der Rrm4-abhängigen mRNPs	.81
		3.4.	2	Upa2 interagiert mit Pab1	.84
(3.5	5	Neu	e Aspekte im Modell des Endosomen-gekoppelten mRNA-Transports	.85
:	3.6	6	Aus	blick	.87
4.		Mat	teria	l und Methoden	89
4	4.′	1	Mat	erialien und Bezugsquellen	.89
		4.1.	1	Lösungen, Medien, Enzyme, Kits und Chemikalien	.89
	4	4.1.	2	Zentrifugen	.93
		4.1.	3	Oligonukleotide	.93
		4.1.	4	Plasmide und Plasmidkonstruktionen	.94
	4	4.1.	5	Stämme	108
4	4.2	2	Mikr	obiologische, zellbiologische und genetische Methoden	110
		4.2.	1	Arbeiten mit Escherichia coli	110
		4.2.	2	Arbeiten mit Ustilago maydis	111
		4.2.	3	Arbeiten mit Saccharomyces cerevisiae	115
4	4.3	3	Mole	ekularbiologische Methoden	117
		4.3.	1	Isolierung von Nukleinsäuren	117
		4.3.	2	Arbeiten mit Nukleinsäuren	118

4.3.3	Auftrennung und Nachweis von Nukleinsäuren	120			
4.3.4	Polymerase Kettenreaktion (PCR)	122			
4.3.5	Sequenzanalyse				
4.4 F	Proteinbiochemische Methoden				
4.5 0	Computerprogramme				
5. Literaturverzeichnis					
6. Ergänzende Daten					

1. Einleitung

1.1 mRNA-Transport und lokale Translation

Subzellulärer Transport von mRNA gefolgt von lokaler Translation ist ein verbreiteter Mechanismus, um Genexpression räumlich und zeitlich zu regulieren. Dieser Prozess ist besonders entscheidend in polar auswachsenden eukaryotischen Zellen, in denen die Aktivität vieler Polaritätsfaktoren und weiterer Proteine genauestens reguliert werden muss (Martin und Ephrussi, 2009; Holt und Bullock, 2009). Während zunächst angenommen wurde, dass sich die Lokalisierung von mRNAs auf wenige spezielle Transkripte und Zelltypen beschränkt, konnte in den vergangenen Jahren gezeigt werden, dass dieser Prozess weit verbreitet ist (Holt und Bullock, 2009; Martin und Ephrussi, 2009; Zarnack und Feldbrügge, 2010). Besonders eindrucksvoll ist dies am Beispiel der Taufliege *Drosophila melanogaster (D. melanogaster)* zu sehen. In den frühen Embryonen von *D. melanogaster* weisen die Transkripte von 71% der exprimierten Gene eine subzelluläre Lokalisierung auf (Lécuyer *et al.*, 2007). In den letzten Jahren rückte der Mechanismus des RNA-Transports zudem in den Fokus der medizinischen Forschung, da zahlreiche Studien eine Verbindung zwischen RNA-Lokalisierung und neurodegenerativen Erkrankungen belegen (Liu-Yesucevitz *et al.*, 2011).

Die Lokalisierung von mRNA kann durch unterschiedliche Prozesse erreicht werden: durch den lokalen Schutz vor Degradation, durch die Diffusion mit anschließender lokaler Verankerung, und durch den aktiven Transport entlang des Zytoskeletts (St Johnston, 2005; Martin und Ephrussi, 2009). Von diesen Prozessen ist der aktive Transport von mRNA der am besten untersuchte und wohl auch am weitesten verbreitete. Dabei zeigen sich in den meisten Organismen grundlegende identische Prinzipien und Schritte, die für diesen Prozess notwendig sind (Besse und Ephrussi, 2008; Martin und Ephrussi, 2009; Meignin und Davis, 2010).

Eine fundamentale Gemeinsamkeit des aktiven Transportes ist es, dass die transportierten Transkripte ihre Zielinformation als *cis*-agierendes Element in ihrer eigenen Nukleotidsequenz kodieren. Diese auch als "zipcode" (Postleitzahl) oder Lokalisationselement (LE) bezeichneten Sequenzen können eine Länge von wenigen bis hin zu 1000 Nukleotiden (nt) aufweisen und befinden sich häufig in der 3' untranslatierten Region (UTR) (Jambhekar und Derisi, 2007; Martin und Ephrussi, 2009). Die LEs werden von RNA-bindenden Proteinen spezifisch erkannt und gebunden, wodurch große Ribonukleoprotein (mRNP)-Komplexe entstehen. Diese mRNPs binden anschließend direkt oder indirekt an Motorproteine und werden entlang des Zytoskeletts zu ihrem subzellulären Ziel transportiert, wo die mRNAs schließlich translatiert werden können (Jambhekar und Derisi, 2007; Besse und Ephrussi, 2008; Martin und Ephrussi, 2009). Diese grundlegenden

Schritte des aktiven mRNA-Transports unterscheiden sich in verschiedenen Organismen bezüglich der beteiligten Faktoren wie Zytoskelett, Motoren und der RNA-bindenden Proteine (St Johnston, 2005; Martin und Ephrussi, 2009).

An dem Transport von mRNA können Mitglieder aus allen drei bekannten Motor-Familien beteiligt sein: Myosine, Kinesine und Dyneine, wobei sich Myosine entlang von Aktinfilamenten und Kinesine sowie Dyneine entlang von Mikrotubulifilamenten bewegen. Hierfür nutzen sie die Energie, die sie aus der Hydrolyse von ATP gewinnen (Gennerich und Vale, 2009; Gagnon und Mowry, 2011). Myosine bilden eine große Superfamilie von Motoren (Hartman und Spudich, 2012). Die konventionellen Myosin II-Proteine bilden lange bipolare Filamente und haben eine gut untersuchte Funktion in der Kontraktion von Muskelgewebe (Adelstein und Eisenberg, 1980; Hartman und Spudich, 2012). Dagegen bilden unkonventionelle Myosine, wie das Myosin V, Dimere und können so molekulare Fracht, wie zum Beispiel mRNA, entlang von Aktinfilamenten transportieren (Gagnon und Mowry, 2011; Hartman und Spudich, 2012).

Die Dynein-Superfamilie besteht aus lediglich zwei Mitgliedern: dem axonemalen und dem zytoplasmatischen Dynein (Gagnon und Mowry, 2011). Das zytoplasmatische Dynein transportiert molekulare Fracht in Richtung der Minus-Enden von Mikrotubuli (MT) und besteht aus einem großen Multiproteinkomplex mit einer ungefähren Größe 1,5 Megadalton (MDa) (Vallee *et al.*, 2004; Hirokawa *et al.*, 2010). Dies ist darauf zurückzuführen, dass Dynein wahrscheinlich evolutionär aus den AAA-ATPasen hervorgegangen ist und somit multiple ATPase-Einheiten besitzt, die einen hexameren Ring bilden (Vallee *et al.*, 2004). Die Aktivität von Dynein wird von dem ebenfalls aus mehreren Untereinheiten bestehenden Proteinkomplex Dynactin reguliert (Hirokawa *et al.*, 2010; Gagnon und Mowry, 2011).

Die Superfamilie der Kinesine setzt sich aus 15 Mitgliedern zusammen, die sich je nach Position ihrer Motordomäne in drei Gruppen unterteilen lassen: N-Kinesine haben die Motordomäne am aminoterminalen Ende, C-Kinesine haben eine Motordomäne am carboxyterminalen Ende, und die Motordomäne der M-Kinesine liegt im mittleren Bereich der Peptidsequenz (Hirokawa *et al.*, 2010). N-Kinesine bilden dabei die größte Gruppe und transportieren molekulare Fracht in Richtung der Mikrotubuli-Plus-Enden, während C-Kinesine sich in Richtung der Minus-Enden bewegen. M-Kinesine sind an der Depolymerisierung von Mikrotubuli beteiligt (Hirokawa *et al.*, 2010).

Durch die Rekrutierung verschiedener Motoren zu den mRNPs kann die Lokalisierung dieser Komplexe spezifisch reguliert werden. Gleichwohl spielt auch die Orientierung des Zytoskeletts in der Zelle eine wichtige Rolle in diesem Prozess. Zusammenfassend kann zwischen Aktin- und Mikrotubuli-basiertem Transport von mRNA unterschieden werden und im weiteren Verlauf sollen einige Beispiele dieser Mechanismen näher beschrieben werden.

1.1.1 Aktin-abhängiger Transport von mRNPs

Ein umfangreich untersuchter Vorgang der Aktin-abhängigen Lokalisierung von mRNA ist der aktive Transport der ASH1 mRNA in der Bäckerhefe Saccharomyces cerevisiae (S. cerevisiae). Dieser Modellorganismus vermehrt sich durch Knospung, wodurch eine große Mutterzelle und eine kleine Tochterzelle entstehen. Während die Mutterzelle den Paarungstyplokus durch die Aktivität der HO-Endonuklease wechseln kann, wird die Expression dieses Enzyms in der Tochterzelle durch das Zink-Finger-Protein Ash1p (asymmetric synthesis of HO) auf transkriptioneller Ebene inhibiert. Voraussetzung für diese Regulation ist die ausschließliche Lokalisation von Ash1p in der Tochterzelle (Sil und Herskowitz, 1996; Bobola et al., 1996), was durch einen aktiven Transport der ASH1 mRNA erreicht wird (Long et al., 1997; Heym und Niessing, 2012). Die mRNA von ASH1 trägt vier LEs (E1, E2A, E2B und E3), die sowohl im offenen Leserahmen (ORF, open reading frame), als auch in der 3' UTR liegen und den Transport in die Tochterzelle vermitteln (Chartrand et al., 1999; Gonzalez et al., 1999). Diese werden von dem RNA-bindenden Protein She2p bereits im Zellkern kotranskriptionell gebunden (Böhl et al., 2000; Long et al., 2000; Shen et al., 2010). Im Zytoplasma interagiert She2p mit She3p, welches wiederum als Adapterprotein den She2p-ASH1-Komplex mit dem Typ V Myosin-Motor Myo4p verbindet (Böhl et al 2000, Long et al 2000). Myo4p transportiert daraufhin den gebundenen mRNP-Komplex in die knospende Tochterzelle (Heym und Niessing, 2012). Während dieses Prozesses wird die Translation von ASH1 aktiv durch die Proteine Puf6p und Khd1p inhibiert (Irie et al., 2002; Gu et al., 2004). In der Tochterzelle angelangt, werden Puf6p und Khd1p phosphoryliert und ASH1 kann anschließend translatiert werden (Paquin et al., 2007; Deng et al., 2008). Der She2p-abhängige mRNA-Transport beschränkt sich nicht nur auf ASH1, sondern ist an der Lokalisierung von ungefähr 30 mRNAs in S. cerevisiae beteiligt (Heym und Niessing, 2012). Während die grundlegenden biologischen Funktionen der She2-Maschinerie - auch Lokasom genannt - aufgeklärt scheinen, geben neuere Studien Hinweise, dass dieser Prozess deutlich

genannt - aufgeklärt scheinen, geben neuere Studien Hinweise, dass dieser Prozess deutlich vielschichtiger sein könnte. So besitzt das bisher als Adapterprotein charakterisierte She3p ebenfalls die Fähigkeit RNA zu binden, und eine Interaktion von She2p und She3p ist für die effektive Bindung von Ziel-RNAs notwendig (Müller *et al.*, 2011). Des Weiteren vermittelt in dem humanpathogenen Pilz *Candida albicans* (*C. albicans*) ein She3p-Myo4p-Komplex den selektiven Transport von mRNA, obwohl in dem Genom kein eindeutiges Ortholog von *SHE2* identifiziert werden konnte. Demnach könnte die Bindung der mRNA durch ein bisher nicht identifiziertes Protein oder allein durch She3p erfolgen (Elson *et al.*, 2009).

Ein weiterer interessanter Aspekt ist die Verbindung von RNA- und Membrantransport. So vermittelt der She3p-Myo4p-Komplex in *S. cerevisiae* den Kotransport von *ASH1*-She2p mit tubulären Strukturen des endoplasmatischen Retikulums (Schmid *et al.*, 2006; Aronov *et al.*, 2007). Weiterführende Studien zu der Frage, ob es sich bei dem Kotransport von mRNP mit

Membranstrukturen um ein allgemeines biologisches Konzept oder eine Ausnahmeerscheinung handelt, fehlen jedoch.

Der Mechanismus des Aktin-abhängigen mRNA-Transports beschränkt sich nicht auf einzellige Organismen. So wird der Transport der *β-Aktin* mRNA zu der Vorderseite von migrierenden Säugetierzellen hauptsächlich entlang des Aktinzytoskeletts vermittelt (Condeelis und Singer, 2005; Mili und Macara, 2009). Es wurde gezeigt, dass die mRNA von β -Aktin am auswachsenden Ende von Hühnerembryo-Fibroblasten, 3T3-Fibroblasten, Endothelzellen, Myoblasten sowie in den Wachstumskegeln von Neuriten lokalisiert (Zhang et al., 2001; Condeelis und Singer, 2005). Entscheidend für diesen Prozess ist eine 54 nt lange Sequenz innerhalb der 3' UTR der RNA, der zipcode (Kislauskis et al., 1993; Kislauskis et al., 1994). Diese wird von dem Protein ZBP1 (zipcode binding protein 1) und orthologen Proteinen spezifisch gebunden, wobei die Hexanukleotid-Seguenz ACACCC entscheidend ist (Ross et al., 1997; Mili und Macara, 2009). ZBP1 trägt im N-terminalen Bereich zwei RRM (RNA recognition motif)-Domänen, während sich im C-terminalen Bereich vier KH (hnRNP K-Homologie)-Domänen befinden, von denen die dritte und vierte KH-Domäne für die Bindung des zipcodes und die Bildung des mRNP-Komplexes verantwortlich sind. Dennoch werden für eine Lokalisation der mRNPs ebenfalls die RRM-Domänen benötigt (Farina et al., 2003). ZBP1 assoziiert mit der *β-Aktin* mRNA bereits während deren Transkription und ist wichtig für die Bildung des Transport-Komplexes und dessen Assoziation mit dem Zytoskelett (Farina et al., 2003; Oleynikov und Singer, 2003). Die β-Aktin mRNA scheint sowohl entlang von Aktin- als auch entlang von Mikrotubulifilamenten transportiert zu werden, jedoch weist die essentielle Rolle des Myosins II-B in diesem Prozess auf eine vorherrschende Verwendung des Aktin-Zytoskeletts hin (Latham et al., 2001; Oleynikov und Singer, 2003; Fusco et al., 2003; Mili und Macara, 2009). Die entscheidende Funktion von ZBP1 ist die Inhibition der Translation der transportierten mRNA. Ist der Komplex indessen an den auswachsenden Enden der Zelle angelangt, phosphoryliert die dort lokalisierende Proteinkinase Src ein konserviertes Tyrosin in ZBP1, welches nahe der KH-Domänen gelegen ist. Dadurch wird die Bindung von ZBP1 zu dem Transkript gelöst und die Translation kann beginnen (Hüttelmaier et al., 2005; Mili und Macara, 2009).

1.1.2 Mikrotubuli-abhängiger Transport von mRNPs

In Oozyten, Embryonen und größeren Zellen, in denen Transkripte über weite Strecken bewegt werden müssen, ist überwiegend ein Mikrotubuli-abhängiger mRNA-Transport vorzufinden. Dieser Prozess ist beispielsweise wichtig für die Oogenese und Embryonalentwicklung von *Xenopus laevis* (*X. laevis*) und *D. melanogaster*, aber auch für die Entwicklung von Neuronen in Säugetieren. Zudem spielt der Mikrotubuli-abhängige

Transport von mRNA eine wichtige Rolle während des polaren Wachstums von Pilzen (Martin und Ephrussi, 2009; Vollmeister *et al.*, 2012b).

Ein gut untersuchtes Beispiel ist die mRNA-Lokalisation während der Oogenese des Krallenfroschs X. laevis (Abb. 1A). Die Oozyten dieses Modellorganismus eignen sich aufgrund ihrer Größe von bis zu 1,3 mm besonders gut für zellbiologische Studien über die Lokalisierung von kodierenden und nicht-kodierenden RNAs. Die Eizelle weist während der Reifung eine Polarisation in eine sogenannten animale und eine vegetative Hemisphäre auf, welche für die spätere Ausbildung der Keimzelllinien essentiell ist. Dabei entwickeln sich aus der animalen Hemisphäre die ektodermalen Zellen, während das Meso- und Endoderm ihren Ursprung in der vegetativen Hemisphäre haben (Mowry und Cote, 1999; King et al., 2005). Die Lokalisation mehrerer Transkripte am Zellkortex des vegetativen Pols ist von essentieller Bedeutung für die Ausbildung der Keimzelllinien. So führt die Mislokalisation der mRNA von Vq1 und VegT am animalen Pol zu der dortigen Ausbildung von Mesoderm, anstatt von Ektoderm (Dale et al., 1993). Die mRNAs von Vg1 und VegT besitzen in ihrer 3' UTR über 300 nt lange LEs, die von den RNA-bindenden Proteinen Vg1RBP/Vera, einem Homolog von ZBP1, und VgRBP60/hnRNP I bereits im Nukleus gebunden werden (Mowry und Melton, 1992; Kwon et al., 2002; Kress et al., 2004). Nach dem Export in das Zytoplasma assoziieren an den mRNA-Protein-Komplex weitere RNA-bindenden Proteine wie XStau, ein Homolog des Doppelstrang-RNA (dsRNA)-bindenden Proteins Staufen aus D. melanogaster (Kress et al., 2004). XStau bindet dabei auch das konventionelle Kinesin-1 und rekrutiert so den notwendigen Mikrotubuli-abhängigen Motor an den Komplex (Yoon und Mowry, 2004). Dieser mRNA-Protein-Komplex wird dann durch ein Zusammenspiel von Kinesin-1 und dem heterotrimeren Kinesin-2 entlang einer polarisierten Subpopulation von Mikrotubuli transportiert (Betley et al., 2004; Messitt et al., 2008).

Ähnlich wie bei *X. laevis*, ist der Mikrotubuli-abhängige mRNA-Transport wichtig während der Oogenese von *D. melanogaster* (Abb. 1B). Die Oozyte befindet sich in einer Ei-Kammer und ist mit einem angrenzenden Synzytium von 15 Ammenzellen (*nurse cells*) über Ring-Kanäle verbunden (St Johnston und Nüsslein-Volhard, 1992). Durch die Lokalisierung von *oskar*, *bicoid* und *gurken* mRNA in der Oozyte werden die späteren Körperachsen festgelegt, wobei *oskar* zum posterioren, *bicoid* zum anterioren und *gurken* zum dorsoanterioren Pol transportiert wird (Driever und Nüsslein-Volhard, 1988; Ephrussi *et al.*, 1991; González-Reyes *et al.*, 1995; Bashirullah *et al.*, 1998; St Johnston, 2005). Die Lokalisierung dieser drei Transkripte wird durch verschiedene Mechanismen erreicht.

Der Transport von *oskar* mRNA wird sowohl von den RNA-bindenden Proteinen Staufen und Hrp48, als auch von dem Multiproteinkomplex EJC (*exon junction complex*) vermittelt (St Johnston *et al.*, 1991; Hachet und Ephrussi, 2001; Huynh *et al.*, 2004). Der EJC ist ein Proteinkomplex, der nach dem Herausspleißen eines Introns an den Verknüpfungspunkt

(*junction*) der beiden Exons bindet (Moore, 2005). Das Herausspleißen des ersten Introns der *oskar* mRNA und die Markierung des entstandenen Verknüpfungspunktes mit dem EJC ist essentiell für die Lokalisierung dieses Transkripts (Hachet und Ephrussi, 2004). Der *oskar*-Protein-Komplex wird von dem konventionellen Kinesin entlang des Mikrotubuli-Zytoskeletts transportiert. Dabei bewegen sich die *oskar* mRNPs bidirektional in Richtung sowohl des anterioren als auch des posterioren Pols der Oozyte, jedoch zeigt der Transport hierbei eine etwas stärkere Ausrichtung hin zu dem posterioren Pol, wodurch die *oskar* mRNA letztendlich an diesem lokalisiert (Zimyanin *et al.*, 2008).

Die Lokalisierung der mRNA von *bicoid* und *gurken* hingegen wird durch den Minus-Endgerichteten Motor Dynein vermittelt (MacDougall *et al.*, 2003; Meignin und Davis, 2010). Im Fall der *gurken* mRNA dient Dynein nicht nur dem Transport der mRNA in der Oozyte, sondern verankert daraufhin zudem die Transkripte in Zusammenspiel mit dem heterogenen nukleären RNP (hnRNP) Squid an dem dorsoanterioren Pol (Delanoue *et al.*, 2007). Ebenfalls beteiligt an der Dynein-vermittelten Lokalisation von *gurken* sind die Proteine Egalitarian (Egl) und Bicaudal-D (BicD) (Delanoue *et al.*, 2007).

Am besten untersucht ist die Funktion von Egl und BicD jedoch während der frühen Embryonalentwicklung von *D. melanogaster* (Abb. 1C). In der Phase des synzytialen Blastoderm ist der Transport mehrerer Transkripte, wie die der pair-rule Gene *hairy* und *fushi tarazu*, in das apikale Zytoplasma eine Voraussetzung für die Ausbildung der Segment-Polarität in Embryonen. Dieser Prozess wird durch den molekularen Motor Dynein sowie Egl und BicD vermittelt (Wilkie und Davis, 2001; Bullock *et al.*, 2006; Meignin und Davis, 2010). Egl und BicD kooperieren dabei in der Rekrutierung von lokalisierten mRNAs an den Dynein-Komplex. Egl bindet an Dynein, und BicD interagiert mit dem Dynein/Dynactin-Komplex (Hoogenraad *et al.*, 2001; Navarro *et al.*, 2004). Obwohl Egl keine kanonischen RNA-bindenden Domänen besitzt, bindet es spezifisch an die LEs mehrerer lokalisierender Transkripte, wie *hairy* und *gurken*. Zudem interagiert Egl mit der C-terminalen Domäne (CTD) von BicD und kann somit einen stabilen Transportkomplex bilden (Dienstbier *et al.*, 2009).

Ein bedeutendes Modell der mRNA-Lokalisierung stellen Neuronen dar (Abb. 1D). Neuronen besitzen einen sehr polaren Zellaufbau. Viele bestehen aus einem Zellkörper, einem efferenten Axon und einem verästelten Bereich von Dendriten, der das postsynaptische Kompartiment der Neuronen bildet (Tahirovic und Bradke, 2009; Martin und Ephrussi, 2009; Doyle und Kiebler, 2011). Die lokale Translation ermöglicht es den Dendriten, die räumliche und zeitliche Regulation der Genexpression in Abhängigkeit von synaptischen Stimuli zu kontrollieren. Diese Autonomie der Dendriten von der Genexpression im Zellkern ermöglicht es Neuronen, schnell auf äußere Einflüsse zu reagieren und die Wirksamkeit einzelner Synapsen lokal zu regulieren (Holt und Bullock, 2009; Doyle und Kiebler, 2011).



Abbildung 1: Beispiele des Mikrotubuli-abhängien mRNA-Transports. A) Das konventionelle und das heterotrimere Kinesin vermitteln den Transport der *Vg1* mRNA entlang einer Subpopulation von Mikrotubuli während der Oogenese von *X. laevis*. B) Die *gurken* mRNA wird während der Oogenese von *D. melanogaster* von Dynein an den dorsoanterioren Pol befördert und dort von dem Faktor Squid verankert. C) Im Stadium des synzytialen Blastoderms werden pair-rule mRNAs mit Hilfe von Dynein in das apikale Blastoderm von *D. melanogaster*-Embryonen transportiert. D) In den Dendriten von Säugetierneuronen werden mRNAs von Dynein und dem konventionellen Kinesin zu den Synapsen transportiert und an diesen lokal translatiert. Die Abbildung ist modifiziert nach Vollmeister *et al.* (2012b).

Dementsprechend scheint sich die Translation in den Dendriten auf Proteine zu beschränken, die eine bestimmte Funktion in der Synapse besitzen. So werden in die Dendriten die mRNAs für die Alpha-Untereinheit der Ca²⁺/Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II (CaMKIIα) oder das Mikrotubuli-assoziierte Protein 2 (MAP2) lokalisiert (Bramham und Wells, 2007; Doyle und Kiebler, 2011). Für den aktiven Transport dieser Transkripte ist ein Zusammenspiel von mehreren Proteinen notwendig. So sind an diesem

Prozess das Protein FMRP (*fragile X mental retardation protein*) sowie mehrere Isoformen von Staufen beteiligt (Abb. 2D; Doyle und Kiebler, 2011; Vollmeister *et al.*, 2012b). FMRP ist ein RNA-Bindeprotein, welches sowohl das *CaMKII* α Transkript bindet als auch mit der leichten Kette des konventionellen Kinesins interagiert und somit als ein möglicher Adapter zwischen lokalisierender mRNA und Motor dienen könnte (Dictenberg *et al.*, 2008). Zudem wurde in *D. melanogaster* gezeigt, dass FMRP über die C-terminale Domäne von BicD an Dynein rekrutiert werden kann und somit auch einen Minus-End-gerichteten RNA-Transport entlang von Mikrotubuli vermitteln kann (Bianco *et al.*, 2010).

Die Lokalisierung von mRNA findet jedoch nicht nur in Neuronen, sondern auch in weiteren polaren Nervenzellen statt. So wird in Oligodendrozyten die mRNA des MBP (*myelin basic protein*) in den Myelin-Bereich der Zelle transportiert, wo sich das Protein direkt nach der Translation in die Membran integriert (Smith, 2004; Doyle und Kiebler, 2011).

1.2 Die Struktur und Funktion Poly(A)-bindender Proteine

Eukaryoten Protein-kodierende In werden Gene von der DNA-abhängigen RNA-Polymerase II transkribiert. Die dabei entstehende prä-mRNA wird noch während dieses Prozesses in mehreren Schritten modifiziert. Darunter fallen das Anbringen einer 7-Methylguanosin (^{M7}GpppN)-Kappe am 5'-Ende, das Herausspleißen von intronischen Sequenzen und die Polyadenylierung des 3'-Endes der mRNA (Moore, 2005; Gu und Lima, 2005; Feldbrügge et al., 2008; Millevoi und Vagner, 2010; Vannini und Cramer, 2012). Der so entstandene Poly(A)-Anhang, auch Poly(A)-Schwanz genannt, findet sich bei fast allen eukaryotischen und sogar einigen prokaryotischen mRNAs und hat eine bedeutende Funktion in der Regulation der Translation und dem Abbau der Transkripte (Wahle und Keller, 1992; Sarkar, 1997; Brook und Gray, 2012). Eine wichtige Rolle dabei spielen Poly(A)-bindende Proteine, eine konservierte Gruppe von Proteinen, die an den Poly(A)-Anhang binden. Bei diesen wird zwischen nukleären (PABPN) und zytoplasmatischen Poly(A)-bindenden Proteinen (hier PABP genannt, oft aber auch als PABPC bezeichnet, S. cytoplasmic) unterschieden. Einzellige Eukaryoten wie cerevisiae, Schizosaccharomyces pombe (S. pombe), C. albicans, aber auch die Taufliege D. melanogaster besitzen nur ein PABP, während in dem Genom von Säugetieren und Pflanzen mehrere Gene für PABPs identifiziert worden sind (Mangus et al., 2003).

Die PABPs besitzen eine konservierte Domänenarchitektur aus vier RRM-Domänen, die C-terminal über eine prolinreiche Verbindungsregion mit der MLLE (MademoiseLLE)-Domäne, die auch als PABC (Poly(A)-bindendes Protein C-terminale)-Domäne bezeichnet wird, verbunden sind (Mangus *et al.*, 2003; Kozlov *et al.*, 2010a). Die ersten beiden RRMs binden spezifisch an eine Poly(A)-Sequenz, während RRM3 und RRM4 sowohl Poly(A)- als auch Adenin/Uridin-reiche Sequenzen binden können (Brook und Gray, 2012). PABP interagiert mit der zweiten RRM-Domäne zudem mit dem Multiproteinkomplex eIF4F, der sich aus den Komponenten eIF4E, eIF4A und eIF4G zusammensetzt. Die Untereinheit eIF4E bindet an die ^{M7}GpppN-Kappe am 5'-Ende der mRNA, während das Gerüstprotein eIF4G an eIF4E, die RNA-Helikase eIF4A und eIF3 bindet. Für die Initiation der Translation ist eIF3 essentiell, da dieser Multiproteinfaktor die ribosomale 40S-Untereinheit rekrutiert und die Bildung des 43S-Präinitiationskomplexes fördert. Die Interaktion von PABP mit eIF4G führt zu einer Verknüpfung der am 5'- und 3'-Ende gelegenen Komplexe, was zu einem Ringschluss der mRNA führt (Kessler und Sachs, 1998; Wells *et al.*, 1998; Gingras *et al.*, 1999; Roy *et al.*, 2002; Martineau *et al.*, 2008). Es wird angenommen, dass diese Ringbildung die Reinitiation der Translation unterstützt und die Rekrutierung der ribosomalen 60S-Untereinheit fördert, und somit insgesamt einen verstärkenden Einfluss auf die Translation der mRNA hat. Zudem werden durch deren Verknüpfung sowohl das 5'- als auch das 3'-Ende vor einem enzymatischen Abbau geschützt (Roy *et al.*, 2002; Brook und Gray, 2012).

Darüber hinaus gehen PABPs über mehrere funktionelle Bereiche Interaktionen mit verschiedensten Proteinen ein. So ermöglicht die prolinreiche Region die Interaktion zweier PABPs, wodurch deren kooperative Bindung an Poly(A)-Sequenzen positiv beeinflusst wird (Melo *et al.*, 2003; Lin *et al.*, 2012; Brook und Gray, 2012). Eine entscheidende Rolle für die Funktion von PABPs spielt die C-terminale MLLE-Domäne, die einen Großteil der Protein-Protein-Interaktionen von PABPs vermittelt (Albrecht und Lengauer, 2004; Huang *et al.*, 2013).

1.2.1 Die Interaktion der MLLE-Domäne mit PAM2

Die konservierte MLLE-Domäne befindet sich am C-Terminus des zytoplasmatischen PABP und kommt zudem auch in Proteinen der HYD (*hyperplastic disc protein*)-Familie von Ubiquitin-Ligasen und dem RNA-bindenden Protein Rrm4 vor (Kozlov *et al.*, 2001; Deo *et al.*, 2001; Becht *et al.*, 2005; Kozlov *et al.*, 2010b). Die MLLE-Domäne besitzt eine Länge von ungefähr 70 Aminosäuren und verdankt ihren Namen der konservierten Aminosäuresequenz KITGMLLE (Deo *et al.*, 2001; Kozlov *et al.*, 2002; Siddiqui *et al.*, 2003; Kozlov *et al.*, 2010a; Kozlov und Gehring, 2010). Die Erkennung und Bindung der entsprechenden Interaktionspartner erfolgt spezifisch über ein kurzes, aus ungefähr 15 Aminosäuren bestehendes Motiv, genannt PAM2 (PABP-interagierendes Motiv 2, welches im Folgenden als PAM2-Motiv bezeichnet wird) (Kozlov *et al.*, 2004; Albrecht und Lengauer, 2004). Das PAM2-Motiv findet sich in vielen Organismen in einer großen Anzahl von PABP-interagierenden Proteinen und wurde zudem in zahlreichen bisher nicht untersuchten Proteinen vorhergesagt (Albrecht und Lengauer, 2004; Bravo *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2013).

In Säugetieren wurden grundlegende Arbeiten über die Interaktion zwischen PABP und Proteinen mit PAM2-Motiv an den Beispielen von Paip1 (PABP-interagierendes Protein 1) und Paip2 durchgeführt, welche eine gegensätzliche Rolle bei der Translation von mRNA spielen (Martineau *et al.*, 2008). Paip1 hat einen positiven Einfluss auf die Translation, was mit Hilfe einer Luciferase-Reporter-mRNA gezeigt werden konnte (Craig *et al.*, 1998). Paip1 interagiert zudem auch mit eIF4G und eIF3 und stabilisiert somit die Ringschließung der mRNA (Martineau *et al.*, 2008). Paip2 hingegen wirkt als Translationsrepressor. Interessanterweise hemmt Paip2 spezifisch die ^{M7}GpppN-Kappen-abhängige Translation, nicht jedoch die Translation der mRNA des Hepatitis-C-Virus, welche über eine interne Ribosomen-Eintrittsstelle (IRES) verfügt. Paip2 konkurriert mit Paip1 um die Bindung zu PABP1 und vermindert so vermutlich die Affinität von PABP1 zu dem Poly(A)-Anhang von mRNAs (Khaleghpour *et al.*, 2001a; Khaleghpour *et al.*, 2001b; Berlanga *et al.*, 2006).

Ein Wettbewerb um die Bindung der MLLE-Domäne findet auch bei der eRF3-abhängigen Deadenylierung statt. Der Translations-Terminationskomplex eRF1-eRF3 (*eukaryotic release factor*) und die Deadenylase-Komplexe Caf1-Ccr4 und Pan2-Pan3 konkurrieren um die Interaktion mit der MLLE-Domäne von PABP1 durch die PAM2-Motive von eRF3, Tob (einem Interaktionspartner von Caf1) und Pan3 (Funakoshi *et al.*, 2007). Interessanterweise besitzt eRF3 zwei PAM2-Motive, von denen jeweils nur eins mit der MLLE-Domäne interagieren kann (Kozlov und Gehring, 2010). Es wird angenommen, dass bei einer Translationstermination eRF1-eRF3 an das Ribosom rekrutiert wird und dadurch die Bindungsstelle an der MLLE-Domäne für die Deadenylase-Komplexe Caf1-Ccr4 und Pan2-Pan3 zugänglich wird. Die Deadenylase-Komplexe werden über die Interaktion mit PABP1 effektiv an ihr Substrat, den Poly(A)-Anhang, rekrutiert und können dieses abbauen (Funakoshi *et al.*, 2007; Osawa *et al.*, 2012).

Eine PAM2-vermittelte Interaktion mit PABP ist ebenfalls wichtig für die mikroRNA (miRNA)vermittelte Translationsrepression im Menschen. Für diesen Prozess sind Proteine der GW182-Familie essentiell. Diese interagieren mit den Argonaut-Proteinen, den Schlüsselfaktoren des miRISC (*micro RNA induced silencing complex*) und besitzen darüber hinaus selbst eine C-terminal gelegene, zweiteilige SD-Domäne (*silencing domain*), über die sie einen miRNA-vermittelten Abbau und eine Translations-Repression von Ziel-mRNAs bewirken (Eulalio *et al.*, 2009; Huntzinger *et al.*, 2010). Diese C-terminale SD interagiert unter anderem über ein PAM2-Motiv mit dem Poly(A)-bindenden Protein in *D. melanogaster* und Mauszelllinien und bewirkt somit die miRNA-vermittelte Deadenylierung (Zekri *et al.*, 2009; Fabian *et al.*, 2009).

Eine PAM2-vermittelte Interaktion findet sich außerdem bei dem medizinisch relevanten Protein Ataxin-2 im Menschen (Kozlov *et al.*, 2010b). Mutationen in dem entsprechenden Gen *ATXN2* führen zu Wiederholungen des Trinukleotids CAG, die in lange Polyglutamin-

Regionen übersetzt werden. Liegt eine solche Mutation vor, kann dies zu einer spinozerebrellären Ataxie Typ 2, Parkinsonismus oder neuen Erkenntnissen zufolge auch zu amyotropher Lateralsklerose (ALS) führen (Imbert et al., 1996; Simon-Sanchez et al., 2005; Satterfield und Pallanck, 2006; Elden et al., 2010). Ataxin-2 ist ein konserviertes Protein, das sich in vielen eukaryotischen Organismen findet (Ciosk et al., 2004; Bravo et al., 2005; Satterfield und Pallanck, 2006). Über die eigentliche Funktion von Ataxin-2 ist wenig bekannt, doch scheint es eine wichtige Rolle im RNA-Metabolismus zu spielen (Ciosk et al., 2004). Ataxin-2 besitzt am N-Terminus eine RNA-bindende Lsm (Like Sm) und eine LsmAD (Lsm associated domain)-Domäne. Zudem findet sich am C-Terminus ein PAM2-Motiv für eine Interaktion mit der MLLE-Domäne von PABP1 (Albrecht und Lengauer, 2004; Kozlov et al., 2010b). Eine Studie an menschlichem Ataxin-2 und dem homologen Protein ATX2 aus D. melanogaster konnte zeigen, dass diese Proteine mit Polyribosomen interagieren und sowohl die Lsm/LsmAD-Domänen als auch das PAM2-Motiv für dieses Zusammenspiel ausreichend sind (Satterfield und Pallanck, 2006). Weitere Erkenntnisse über eine mögliche Funktion von Ataxin-2-ähnlichen Proteinen konnten durch Arbeiten an Pbp1p (Pab1pbindendes Protein 1), einem entfernt homologen Protein von Ataxin-2 in S. cerevisiae, gewonnen werden. Interessanterweise interagiert Pbp1p mit dem C-Terminus von Pab1p, dem Homolog von PABP1, obwohl es über kein PAM2-Motiv verfügt (Mangus et al., 1998; Albrecht und Lengauer, 2004).

In diesem Überblick zeigt sich, dass Poly(A)-bindende Proteine über die MLLE-Domänenvermittelte Interaktion mit PAM2-tragenden Proteinen eine Vielzahl von posttranskriptionellen Prozessen vermitteln. Doch im Gegensatz zu den Poly(A)-bindenden Proteinen ist die Funktion der MLLE-Domäne in den HYD-Ubiquitin-Ligasen und dem RNA-bindenden Protein Rrm4 wenig untersucht.

1.3 Ustilago maydis als Modell für Mikrotubuli-abhängigen mRNA-Transport

1.3.1 Der Lebenszyklus von Ustilago maydis

Ustilago maydis (*U. maydis*) ist ein phytopathogener Basidiomyzet und gehört zu den Ustilaginales, einer monophyletischen Gruppe biotropher Pflanzenparasiten, die auf den Befall von Süßgräsern (Poaceae) spezialisiert sind (Bölker, 2001; Kellner *et al.*, 2011). *U. maydis* hat ein enges Wirtsspektrum und infiziert neben Mais (*Zea mays*) nur die nah mit diesem verwandte Teosinte (*Zea mays* subsp. *parviglumis*). Dabei durchläuft *U. maydis* einen dimorphen Lebenszyklus, der sich in drei Teile gliedern lässt: die Vermehrung von haploiden Zellen, die Paarung gefolgt von filamentösem Wachstum und die Infektion der Wirtspflanze (Abb. 2; Bölker, 2001; Vollmeister *et al.*, 2012a). Der Begriff des dimorphen Lebenszyklus bezieht sich auf die Tatsache, dass *U. maydis* sowohl als haploide Hefen als

auch als dikaroytische, filamentös auswachsende Zellen vorkommen kann. Zur Vollendung des Lebenszyklus muss der Pilz beide Phasen durchlaufen.

Die haploiden Zellen, Sporidien genannt, haben eine zylindrische Zellform und vermehren sich durch Knospung. In dieser Phase ist U. maydis apathogen und ernährt sich saprobiontisch. Der Wechsel zu einer parasitären Lebensweise ist eng mit der Paarung und der sexuellen Entwicklung verbunden (Bölker, 2001; Kellner et al., 2011; Vollmeister et al., 2012a). Bei der Paarung erkennen sich zwei kompatible Sporidien, wachsen aufeinander zu und verschmelzen miteinander (Abb. 2). Dieser Prozess wird durch ein tetrapolares Paarungssystem reguliert, das sich aus dem biallelischen a-Lokus und dem multiallelischen b-Lokus zusammensetzt (Bölker, 2001; Brefort et al., 2009). Der a-Lokus kodiert für ein Pheromon und einen Pheromonrezeptor, wobei letzterer spezifisch das Pheromon des jeweils anderen Allels erkennt (Bolker et al., 1992; Spellig et al., 1994; Szabó et al., 2002). Haben sich zwei kompatible Sporidien erkannt, führt dies zu einem Zellzyklusarrest, und die Zellen wachsen mit speziellen Konjugationshyphen aufeinander zu und verschmelzen zu einer Zelle. Dabei kommt es zu einer Plasmogamie ohne eine anschließende Karyogamie, wodurch sich ein stabiles Dikaryon bildet (Abb. 2; Bölker, 2001; Kruzel und Hull, 2010; Vollmeister et al., 2012a). Das anschließende Wachstum des dikaroytischen Filaments wird durch den b-Lokus kontrolliert. Der b-Lokus kodiert für die beiden Untereinheiten eines heterodimeren Homöodomänen-Transkriptionsfaktors, bE und bW (Kronstad und Leong, 1990; Schulz et al., 1990; Gillissen et al., 1992; Bölker, 2001). Stammen die beiden Untereinheiten von unterschiedlichen Paarungstypen, bilden diese einen funktionellen Transkriptionsfaktor, der die Expression der Gene für eine pathogene Entwicklung des Dikaryons aktiviert (Kämper et al., 1995; Bölker, 2001; Brefort et al., 2009).

Die Zelle wächst durch polare Expansion an der apikalen Spitze filamentös aus. Am basalen Pol findet eine Ansammlung von Vakuolen statt. Diese werden von dem Zytoplasma durch Einziehen von Septen getrennt, wodurch leere Abschnitte entstehen (Abb. 3A). Die Zellkerne befinden sich im mittleren Bereich des Filaments, welches im Folgenden auch als Hyphe bezeichnet wird (Lehmler *et al.*, 1997; Steinberg *et al.*, 1998; Vollmeister *et al.*, 2012a). Auf der Pflanzenoberfläche bildet die Hyphe als Antwort auf bestimmte Signale der Pflanze hin ein Appressorium aus, eine spezialisierte Struktur, mit der *U. maydis* in das Pflanzengewebe eindringt (Brefort *et al.*, 2009; Vollmeister *et al.*, 2012a). Im Maisgewebe wird der Zellzyklusarrest aufgehoben und *U. maydis* wächst vermehrt in Richtung der Leitbündel. Von dort aus proliferiert das Pilzmyzel und führt zu einer Tumorbildung in allen grünen Pflanzenteilen. In den Tumoren bildet *U. maydis* nach erfolgter Karyogamie stark melanisierte Teliosporen. Diese verleihen den Pflanzen nach dem Aufbruch der Tumore das verbrannte Äußere, was zu dem Namen Maisbeulenbrand geführt hat. Die Teliosporen werden über Wind und Regen verteilt und können unter günstigen Umweltbedingungen

auskeimen, wobei durch Meiose vier haploide Sporidien entstehen und der Lebenslauf somit geschlossen ist (Abb. 2; Bölker, 2001; Feldbrügge *et al.*, 2004; Brefort *et al.*, 2009; Vollmeister *et al.*, 2012a).



Abbildung 2: Der Lebenszyklus von Ustilago maydis. Der Lebenszyklus von U. maydis lässt sich in drei Teile gliedern: die Vermehrung von haploiden Zellen, die Paarung gefolgt von filamentösem Auswachsen und die Infektion der Wirtspflanze. Haploide Sporidien sind apathogen, ernähren sich saprobiontisch und vermehren sich durch Knospung. Erkennen sich zwei kompatible Sporidien über ein Pheromon/Pheromon-Rezeptor-System, wachsen sie aufeinander zu und verschmelzen miteinander zu einer dikaroytischen Zelle. Daraufhin wächst diese unter Aktivierung des b-Transkriptionsfaktors polar aus und bildet eine Hyphe. Auf der Pflanzenoberfläche dringt die Hyphe mit Hilfe eines Appressoriums in das Pflanzengewebe ein und proliferiert dort als Myzel. In der Pflanze bildet der Pilz Tumore (eigentlich Pflanzengallen) und bildet in diesen melanisierte Teliosporen. Nach Aufbrechen der Tumore werden die Sporidien über Umwelteinflüsse verbreitet und keimen unter günstigen Bedingungen zu Sporidien aus. Die Abbildung ist modifiziert nach Kämper *et al.* (2006).

1.3.2 Ustilago maydis als Modellorganismus

Der Maisbeulenbrand ist nur von geringer landwirtschaftlicher Bedeutung, da die Krankheit meistens lokal begrenzt ist und nicht zu schweren Ernteausfällen führt (Dean *et al.*, 2012). Eine wesentlich bedeutendere Rolle spielt *U. maydis* dagegen als Modellorganismus in der grundlegenden und angewandten Forschung. Für *U. maydis* wurden zahlreiche genetische und zellbiologische Techniken entwickelt, wodurch dieser Organismus Verwendung in verschiedenen biologischen Forschungsdisziplinen gefunden hat (Kämper, 2004; Brachmann *et al.*, 2004; Steinberg und Perez-Martin, 2008). Ein großer Vorteil ist dabei, dass das Genom von *U. maydis* sequenziert und manuell annotiert ist (Kämper *et al.*, 2006). Dies ermöglicht eine gezielte Manipulation von Genen und erlaubt genomweite Vergleichsstudien mit den veröffentlichten Sequenzen nah verwandter Organismen (Kämper *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2007; Schirawski *et al.*, 2010; Laurie *et al.*, 2012).

U. maydis und *Z. mays* sind aufgrund dieser Möglichkeiten bestens geeignet, um die Interaktion zwischen Wirtspflanze und biotrophen Parasiten zu untersuchen. Mithilfe dieses etablierten Pathosystems konnte gezeigt werden, dass für die Infektion durch *U. maydis* die Sekretion von vielen sogenannten Effektoren von großer Bedeutung ist (Brefort *et al.*, 2009; Djamei und Kahmann, 2012). Diese wirken sowohl in der frühen Phase als auch im späteren Verlauf der Infektion (Skibbe *et al.*, 2010; Djamei und Kahmann, 2012). Während der frühen Phase unterdrücken apoplastische Effektoren die Abwehrmechanismen der Maispflanze. So inhibiert der Effektor Pep1 die vom Mais sekretierte Peroxidase POX12 (Doehlemann *et al.*, 2009; Hemetsberger *et al.*, 2012). Im späteren Verlauf der Infektion kann *U. maydis* den metabolischen Status der Zellen durch sekretierte Effektoren wie die Chorismatmutase Cmu1 manipulieren, wodurch die Synthese wichtiger Substanzen der Pflanzenabwehr gehemmt wird (Djamei *et al.*, 2011).

Tiefgreifende Erkenntnisse über die Mechanismen der Rekombination und Reparatur von DNA lieferten die frühen Arbeiten von Robin Holliday. Aufgrund seiner Experimente mit *U. maydis* und *S. cerevisiae* postulierte er die Holliday-Struktur der Rekombination (Holliday, 1964, 2004). Studien über die DNA-Reparatur-Mechanismen von *U. maydis* haben zudem medizinische Relevanz. So konnten Arbeiten an Brh2, einem homologen Protein der BRCA2-Familie in Säugetieren, wichtige Erkenntnisse über die Mechanismen der DNA-Reparatur liefern. Proteine der BRCA2-Familie spielen eine Rolle bei der Entstehung von Brustkrebs bei Menschen (Kojic *et al.*, 2011; Holloman, 2011; Kojic und Holloman, 2012). Darüber hinaus hat eine vergleichende Genomstudie gezeigt, dass *U. maydis* mit dem Menschen viele medizinisch relevante Gene teilt, die in der Bäckerhefe *S. cerevisiae* nicht vorkommen (Münsterkotter und Steinberg, 2007).

Seit wenigen Jahren wird auch die Eignung von *U. maydis* in der angewandten Forschung, z. B. als Expressionssystem in der biotechnologischen Gewinnung von Proteinen und in der Produktion von Biokraftstoffen, untersucht (Feldbrügge *et al.*, 2013). Dabei zeichnet sich *U. maydis* sowohl durch seine große Robustheit gegenüber Verunreinigungen und osmotischem Stress als auch durch seine enzymatischen Leistungen aus und kombiniert damit die Vorteile von hefeartigen sowie filamentösen Pilzen (Klement *et al.*, 2012). Durch die elegante Expression von rekombinanten Proteinen über den Mechanismus einer mRNA-abhängigen unkonventionellen Sekretion, kann deren N-Glykosylierung umgangen werden. Dies ist für medizinisch relevante Proteine und Peptide wichtig, da auf diesem Weg ungewollte Immunreaktionen vermieden werden. In einer Testphase konnte bereits ein Einzelketten-Antikörper exprimiert werden (Stock *et al.*, 2012).

Von besonderer Bedeutung ist *U. maydis* als zellbiologisches Modellsystem. So können Gene für fluoreszenzmarkierte Fusionsproteine unter der Kontrolle des nativen Promotors in das Genom integriert und diese unter natürlichen Expressionsniveaus studiert werden

(Spellig *et al.*, 1996; Kämper, 2004; Brachmann *et al.*, 2004). Des Weiteren bietet der dimorphe Lebenszyklus eine exzellente Möglichkeit, die Etablierung und Aufrechterhaltung des polaren Wachstums einer eukaryotischen Zelle mit einem einfachen Modellorganismus zu untersuchen. Besondere Verwendung findet hierbei der Laborstamm AB33, der den b-Transkriptionsfaktor unter der Kontrolle eines induzierbaren Promotors trägt, wodurch filamentöses Wachstum durch einen Wechsel der Stickstoffquelle induziert werden kann (Abb. 3B; Brachmann *et al.*, 2001).

1.3.3 Mikrotubuli-abhängige Transportprozesse in U. maydis

Das Mikrotubuli-Zytoskelett ist für das filamentöse Wachstums von *U. maydis* von zentraler Bedeutung (Fuchs *et al.*, 2005) und weist in der Hyphe eine antipolare Anordnung auf, bei der die Plus-Enden zu den Zellpolen hin ausgerichtet sind (Steinberg *et al.*, 2001; Straube *et al.*, 2003; Lenz *et al.*, 2006; Schuster *et al.*, 2011b). Das Genom von *U. maydis* kodiert für zehn Kinesine und das geteilte Dynein Dyn1-Dyn2 (Straube *et al.*, 2001; Wedlich-Söldner *et al.*, 2002). Der Verlust der Kinesine Kin1 und Kin3 führt zu Defekten des Hyphenwachstums, wie zum Beispiel der Bildung von bipolaren Filamenten und Septierungsdefekten (Schuchardt *et al.*, 2005).

Es wurde gezeigt, dass Kin3 in U. maydis sowohl in der Sporidie, als auch in der Hyphe für den Transport von frühen Endosomen verantwortlich ist (Wedlich-Söldner et al., 2002; Schuster et al., 2011c; Schuster et al., 2011b). Diese Strukturen können mit Hilfe des lipophilen Farbstoffes FM4-64, sowie der kleinen GTPase Rab5a, welche kennzeichnend für frühe Endosomen ist, markiert werden (Wedlich-Söldner et al., 2002; Fuchs et al., 2006; Schuster et al., 2011c; Schuster et al., 2011b). Mit Rab5a kolokalisiert der t-SNARE (target soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor) Yup1, dessen Verlust in einer abnormalen Zellform und gestörter Aufnahme von FM4-64 resultiert (Wedlich-Söldner et al., 2000; Fuchs et al., 2006). Der Transport von Endosomen in der Hyphe von U. maydis resultiert aus einem Zusammenspiel der Motoren Kin3 und Dynein. Dynein akkumuliert an den Zellpolen der Hyphe und bildet dort ein Motor-Reservoir für den retrograden (zum Zellinneren gerichteten) Transport der frühen Endosomen (Wedlich-Söldner et al., 2002; Lenz et al., 2006; Schuster et al., 2011a; Schuster et al., 2011c; Schuster et al., 2011b). Dies ist vor allem im Bereich des unipolaren Zytoskeletts an den Zellpolen wichtig, wo retrograder Transport nur in Richtung der Mikrotubuli-Minus-Enden ablaufen kann (Schuster et al., 2011b). Kin1 ist mit dem konventionellen Kinesin aus Neurospora crassa (N. crassa) und Tieren verwandt und vermittelt unter anderem den Transport des Dyneins zu den Ladungszonen an den Zellpolen (Lehmler et al., 1997; Lenz et al., 2006). Der Verlust von Kin3 resultiert in der Akkumulation von Endosomen in der Zellmitte der Hyphen, während ein Mangel an Dynein eine Anhäufung der Endosomen im

Bereich der Zellpole zur Folge hat (Lenz *et al.*, 2006; Schuster *et al.*, 2011c; Schuster *et al.*, 2011b).



Abbildung 3: Rrm4 ist wichtig für das filamentöse Wachstum von *U. maydis*. (A) Ein typisches unipolares Filament des Laborstamms AB33 sechs Stunden nach Induktion des Hyphenwachstums. Der Größenmaßstab entspricht 10 µm und trifft ebenfalls auf die folgenden Bilder zu. (B) Eine Sporidie des Stammes AB33rrm4∆. Der Verlust von Rrm4 wirkt sich nicht auf das Wachstum dieser Zellen aus. (C) Ein typisches Filament des Stammes AB33rrm4∆ sechs Stunden nach Hypheninduktion. Der Verlust von Rrm4 resultiert in einer fehlerhaften Bildung der Polaritätsachse. Die Initialzelle wächst bipolar aus und ist in der Septenbildung gestört. (D) Filament des Stammes AB33rrm4G. Dieser Stamm exprimiert eine C-terminale Fusion von Rrm4 mit Gfp (Rrm4G). Die Fusionsproteine akkumulieren in klaren zytoplasmatischen Einheiten (Pfeilköpfe). Einzelbild und Kymograph sind untereinander gezeigt. Der Kymograph zeigt die bidirektionale Bewegung von Rrm4G im Zytoplasma des Filaments. Die Abbildung ist modifiziert nach Vollmeister *et al.* (2012a).

Ein weiterer Mikrotubuli-abhängiger Prozess in *U. maydis* ist der Langstreckentransport von mRNA (Becht *et al.*, 2006; König *et al.*, 2009). Das RNA-bindende Protein Rrm4 spielt dabei eine zentrale Rolle (König *et al.*, 2009). Rrm4 ist ein ELAV (*embryonic lethal abnormal vision*)-ähnliches Protein, welches eine neuartige Domänenstruktur aufweist. Im N-terminalen Bereich besitzt Rrm4 drei RRM-Domänen (RRM1-3), die eine charakteristische relative Anordnung zueinander aufweisen, wie sie auch bei Proteinen der ELAV/HuD-Familie zu finden ist. Darüber hinaus trägt das Protein am C-Terminus zusätzlich eine MLLE-Domäne (Becht *et al.*, 2005; Becht *et al.*, 2006). Eine Deletion von *rrm4* führt zu einer gestörten Filamentbildung, die eine hohe Rate an bipolar auswachsenden Zellen zur Folge hat und in einer verminderten Virulenz resultiert (Abb. 3D; Becht *et al.*, 2005). Eine C-terminale Fusion von Rrm4 mit Gfp zeigte, dass es im Zytoplasma der Filamente in eindeutig abgegrenzten Strukturen akkumuliert und sich diese bidirektional entlang des

Mikrotubuli-Zytoskeletts bewegen. Diese Bewegung wird durch Depolymerisation der Mikrotubuli mittels Benomyl inhibiert (Becht *et al.*, 2006). Durch die Methode der *in vivo* UV-Kreuzvernetzung und Immunpräzipitation (*UV-crosslinking and immune precipitation*, CLIP) konnten eine RNA-Bindung durch Rrm4 bestätigt und mehrere der gebundenen Transkripte identifiziert werden (Becht *et al.*, 2006; König *et al.*, 2009; Koepke *et al.*, 2011). Eine direkte Ziel-mRNA kodiert für die Endochitinase Cts1, deren Sekretion bei Verlust von Rrm4 gestört ist (Koepke *et al.*, 2011). Cts1 verfügt über keine typische Signalsequenz und die Rrm4-abhängige Sekretion erfolgt auf unkonventionellem Weg, wahrscheinlich unter Umgehung des endoplasmatischen Retikulums und des Golgi-Apparates (Stock *et al.*, 2012).

Durch eine Rekrutierung von Gfp an die Ziel-mRNAs von Rrm4 konnte gezeigt werden, dass diese über längere Strecken in dem Filament transportiert werden, und dass dieser Prozess Rrm4-abhängig ist (König *et al.*, 2009). Die transportierten mRNAs können zudem über die funktionelle Fusion des Poly(A)-bindenden Proteins Pab1 mit Gfp (Pab1G) sichtbar gemacht werden (König *et al.*, 2009). Pab1G zeigt eine gleichmäßige Verteilung im Zytoplasma des Filaments und akkumuliert darüber hinaus zusammen mit Rrm4 in sich bidirektional bewegenden mRNPs. Die Deletion von *rrm4* führt zu einem Verlust dieser mobilen Strukturen und resultiert in einer gestörten Verteilung des zytoplasmatischen Pab1G (König *et al.*, 2009). Da Pab1 an sämtliche Poly(A)-Anhänge von Transkripten binden sollte, kann es als Indikator für die gebundene mRNA-Fracht von Rrm4 dienen (Hogan *et al.*, 2008; König *et al.*, 2009). Somit repräsentiert eine Kolokalisation von Rrm4 und Pab1 höchstwahrscheinlich funktionelle mRNP-Komplexe des mRNA-Langstreckentransportes. Eine Deletion von *rrm4* ein Schlüeßen lässt, dass Rrm4 ein Schlüsselprotein des Langstreckentransportes von mRNA ist (König *et al.*, 2009).

Als weitere Schlüsselkomponenten des mRNA-Transports können die daran beteiligten Motorproteine angesehen werden. Interessanterweise führt der Verlust des konventionellen Kinesins Kin1 zu einer Akkumulation von Rrm4 an den Mikrotubuli-Plus-Enden im Bereich der Zellpole (Becht *et al.*, 2006). Dies ist überraschend, da Kin1 ein Plus-End-gerichteter Motor ist und somit eine Akkumulation von Rrm4 and den Minus-Enden der Mikrotubuli erwartet worden ist. Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass der bidirektionale Transport von Rrm4 durch Dynein und Kin3 vermittelt wird. Kin1 wäre demnach nur indirekt an dem Minus-End-gerichteten Transport von Rrm4 beteiligt, indem es Dyneine an die Zellpole transportiert (Lenz *et al.*, 2006; Schuster *et al.*, 2011b). Dort könnte Dynein an die mRNPs binden und diese in retrograder Richtung befördern. Desweiteren ist für die bidirektionale Bewegung der Rrm4-abhängigen mRNPs, insbesondere zu den Zellpolen, die Beteiligung eines Plus-End-gerichteten Motorproteins notwendig und nur Kin1 und Kin3 scheinen eine Funktion während des filamentösen Wachstums von *U. maydis* zu besitzen (Schuchardt *et al.*, 2005).

Nähere Untersuchungen der Domänen von Rrm4 haben gezeigt, dass weder eine Mutation noch eine Deletion der RRM-Domänen einen Einfluss auf die Bewegung des Proteins besitzen (Becht *et al.*, 2006; König *et al.*, 2009). Demgegenüber führt eine Deletion der MLLE-Domäne oder die Mutation von konservierten Aminosäuren in dieser zu einem Verlust der bidirektionalen Bewegung von Rrm4 (Becht *et al.*, 2006). Somit ist die Mobilität von Rrm4 unabhängig von dessen Fähigkeit RNA zu binden und wird vermutlich über eine Interaktion der molekularen Motoren oder eines Adapterproteins mit der MLLE-Domäne vermittelt.

1.4 Zielsetzung dieser Arbeit

In den vorangegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass der Mikrotubuli-abhängige Transport von mRNA durch Rrm4 für das effiziente filamentöse Wachstum von *U. maydis* wichtig ist. Durch eine elegante Kombination von biochemischen und zellbiologischen Methoden konnten gebundene Ziel-Transkripte identifiziert und deren Rrm4-abhängiger Transport *in vivo* untersucht werden.

Im Gegensatz zu den detaillierten Studien über die Funktion von Rrm4-abhängigen mRNPs war bisher wenig über den Transportmechanismus von diesen bekannt. Im Rahmen dieser Arbeit sollte der Plus-End-gerichtete Motor des Rrm4-abhängigen mRNA-Transportes identifiziert werden. Aufgrund der Vorarbeiten wurde gezielt das Motorprotein Kin3 hinsichtlich seiner Beteiligung an diesem Prozess untersucht.

Darüber hinaus war es von Interesse zu verstehen, wie die Rrm4-abhängigen mRNPs mit den molekularen Motoren assoziieren. Da die MLLE-Domäne von Rrm4 essentiell für die Bewegung der mRNP-Komplexe ist, wurden PAM2-tragende Proteine auf eine mögliche Funktion als Adapter zwischen Rrm4 und der Transportmaschinerie untersucht. Ein solches Adapterprotein zwischen RNA-bindenden Proteinen und molekularen Motoren könnte eine wichtige regulatorische Funktion in dem Langstreckentransport von mRNA besitzen.

2. Ergebnisse

2.1 Die Rolle des molekularen Motors Kin3

2.1.1 Kin3 vermittelt den Langstreckentransport von mRNPs

Durch genetische und mikroskopische Analysen konnte gezeigt werden, dass Dynein für den retrograden Mikrotubuli-abhängigen Transport der Rrm4-abhängigen mRNP-Komplexe von den Polen zur Zellmitte in *U. maydis* verantwortlich ist (Baumann *et al.*, 2012). Dennoch wird zusätzlich ein Plus-End-gerichteter Motor für den Transport der mRNPs zu den Zellpolen benötigt. In vorangegangenen Studien wurde gezeigt, dass Stämme mit einer Deletion des konventionellen Kinesins Kin1 oder des UNC-104/KIF1A-ähnlichen Kinesins Kin3 ein gestörtes filamentöses Wachstum aufweisen (Schuchardt *et al.*, 2005), jedoch ist das konventionelle Kin1 nur indirekt an dem Plus-End-gerichteten Transport von Rrm4 beteiligt (Becht *et al.*, 2006; Baumann *et al.*, 2012). Somit war Kin3 ein möglicher Kandidat für den Plus-End-gerichteten, anterograden Transport von Rrm4 zu den Zellpolen.

Um die Funktion dieses Motorproteins näher zu untersuchen, wurde kin3 in dem Stamm AB33rrm4G/pab1R deletiert. In vorherigen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass in diesem Stamm Pab1R (Pab1 C-terminal fusioniert mit Rfp) und Rrm4G in sich bidirektional bewegenden mRNPs kolokalisieren (König et al., 2009). Sowohl der resultierende Stamm AB33rrm4G/pab1R/kin3∆, als auch der Ausgangsstamm ermöglichen die gleichzeitige Beobachtung von Rrm4 und Pab1 als Gfp- bzw. Rfp-Fusionen (Rrm4G; Pab1R) in vivo. AB33rrm4G/pab1R/kin3∆ zeigte den bereits beschriebenen Phänotyp einer kin3-Deletion mit einer hohen Anzahl an bipolar auswachsenden Zellen (Abb. 4A, I; Schuchardt et al., 2005). Sowohl Rrm4G als auch Pab1R kolokalisierten in größeren immobilen Akkumulationen, die sich vorwiegend in der Initialzelle befanden, jedoch nie an den Zellpolen (Abb. 4A, 4B). Beide Proteine akkumulierten in einem Bereich, in dem organisierende Zentren für zytoplasmatische und perinukleäre Mikrotubuli zu vermuten sind (Straube et al., 2003; Lenz et al., 2006). Daraus lässt sich folgern, dass die Rrm4-abhängigen mRNP-Komplexe in Abwesenheit von Kin3 an den Minus-Enden der Mikrotubuli lokalisieren. In AB33rrm4G/pab1R/kin3∆ konnten nur vereinzelt bewegliche Signale von Rrm4G beobachtet werden, was darauf schließen lässt, dass Kin3 als einziges Motorprotein für den anterograden Transport der mRNPs verantwortlich ist und die restliche Bewegung auf die Aktivität von Dynein im Bereich des antipolaren Mikrotubuli-Zytoskeletts zurückzuführen ist (Schuster et al., 2011c). Die Anzahl der stationären mRNPs war geringer als die Anzahl der beweglichen Einheiten von Rrm4 in AB33rrm4G (Abb. 3D). Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass sich die mRNP-Komplexe in wenigen stationären Akkumulationen konzentrieren und so die einzelnen Signale nicht mehr aufgelöst werden können.



Abbildung 4: Kin3 transportiert Rrm4-abhängige mRNPs. (A) Mikroskopische Aufnahmen von AB33rrm4G/pab1R/kin3A. DIC-, Gfp-Fluoreszenz und Rfp-Fluoreszenzbilder sind untereinander dargestellt. Größenmaßstab, 10 µm. Pfeilspitzen markieren kolokalisierende Akkumulationen von Rrm4G und Pab1R. (B) Simultane Aufnahme von AB33rrm4G/pab1R/kin3∆. Einzelbilder von Rrm4G und Pab1R sind nebeneinander dargestellt, mit Kymographen darunter. Pfeile markieren unbewegliche Akkumulationen. (C) Filament von AB33rrm4R/kin3G³. Das Quadrat zeigt den vergrößerten Bereich. Gleichzeitig aufgenommene Rfp- und Gfp-Bilder sind nebeneinander dargestellt. Pfeil: eine bewegliche Einheit von Kin3G³ und Rrm4R. Zeitangabe in Sekunden, Größenangabe: 10 μ m (oben) und 2 μ m (unten). (D) Kymographen von Rrm4R und Kin3G³ in AB33rrm4R/kin3G³. Rfp- und Gfp-Aufnahmen sind nebeneinander dargestellt. Der Pfeil markiert den Wendepunkt einer beweglichen Einheit. Größenangabe 10 µm. (E) Anteil an mobilen Rrm4R-Einheiten, die mit Kin3G³ in anterograder und retrograder Richtung kolokalisieren. Fehlerbalken: Standardfehler. Drei unabhängige Experimente mit acht bis zehn Filamenten pro Experiment, Messzone im Bereich 10 µm von der Spitze, 49 Rrm4R-Signale in anterograder Richtung, 53 Rrm4R-Signale in retrograder Richtung. (F) Domänenarchitektur von Kin3G³ und Kin3^{PHΔ}G³, KISc: Kinesin Motor, katalytische Domäne; FHA: forkhead-assoziierte Domäne; PH: Pleckstrin-Homologie-Domäne,

(Fortsetzung von vorheriger Seite) 3xGfp: dreifache Wiederholung des eGfp. Größenangabe in Aminosäuren (AS). (G) Western-Analyse der Stämme AB33 (*kin3*), AB33rrm4R/kin3G³ (*kin3G*³) und AB33rrm4R/kin3^{PHA}G³ (*kin3^{PHA}G*³), sechs Stunden nach Induktion des filamentösen Wachstums. Oben: Detektion mit einem α Gfp-Antikörpers (AK); Unten: Detektion mit einem α Tub1-AK. Kin3G³: 265,6 kDa, Kin3^{PHA}G³: 252,2 kDa. Größenangaben in kDa. (H) Filament von AB33rrm4R/kin3^{PHA}G³. Rfp- und Gfp-Bilder sind nebeneinander, Einzelbild und Kymographen sind untereinander gezeigt. Größenmaßstab 10 µm. (I) Anteil von unipolar und bipolar auswachsenden Filamenten der Stämme AB33rrm4G/pab1R (wt), AB33rrm4G/pab1R/kin3 Δ (*kin3* Δ) und AB33rrm4R/kin3^{PHA}G³ (*kin3* $^{PHA}G^3$) sechs Stunden nach Induktion. Sechs unabhängige Experimente. Fehlerbalken zeigen Standardfehler.

Für eine weiterführende Untersuchung der Rolle von Kin3 am Langstrecken-Transport von mRNPs, wurde der Stamm AB33rrm4R/kin3G³ hergestellt. Dieser trägt sowohl Rrm4R, als auch Kin3, fusioniert mit drei Kopien des Gfp (Kin3G³), und ermöglicht somit eine gleichzeitige Beobachtung von Rrm4 und Kin3. Rrm4R und Kin3G³ kolokalisierten in sich bidirektional bewegenden Einheiten in der gesamten Hyphe, was im Bereich der Filamentspitze besonders deutlich zu beobachten war (Abb. 4C, D). Dabei kolokalisierten Rrm4R und Kin3G³ sowohl in anterograder als auch in retrograder Richtung (Abb. 4E, 92% in anterograder Richtung, 90% in retrograder Richtung).

Die bisherigen Daten zeigen folglich eine direkte Beteiligung von Kin3 am Langstrecken-Transport von Rrm4-positiven mRNP-Komplexen. Interessanterweise ist Kin3 ein Mitglied der Kinesin-3-Familie, zu der auch UNC-104 aus dem Nematoden Caenorhabditis elegans (C. elegans) und KIF1A aus der Maus gehören. Für diese Familie von Motorproteinen ist bisher eine Beteiligung am Transport von membranumschlossener Ladung, wie Vesikeln und Endosomen, beschrieben worden (Wedlich-Söldner et al., 2002; Hirokawa, 2006; Verhey und Hammond, 2009; Schuster et al., 2011b). Für den Transport dieser molekularen Fracht entscheidend ist die C-terminal gelegene Pleckstrin-Homologie (PH)-Domäne. Es wurde gezeigt, dass diese Domäne von UNC-104 spezifisch Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (Pl_{4.5}P₂) bindet und wichtig für den Transport von Vesikeln in *C. elegans* ist (Klopfenstein *et* al., 2002; Klopfenstein und Vale, 2004). Ausgehend von der vorher beschriebenen Rolle von UNC-104/KIF1A-ähnlichen Motoren für den Transport von membranumschlossener Ladung. stellte sich die Frage, ob eine mögliche Verbindung zwischen dem Transport von frühen Endosomen (Wedlich-Söldner et al., 2002; Schuster et al., 2011c; Schuster et al., 2011b) und der Bewegung von Rrm4-positiven mRNP-Komplexen existiert. Um diese Frage zu beantworten, sollte die Bedeutung der PH-Domäne für den Transport von mRNPs untersucht werden. Hierfür wurde der Stamm AB33rrm4R/kin3^{PHA}G³ hergestellt, der das modifizierte Protein Kin3^{PHA}G³ exprimiert. In dieser Variante des Motorproteins wurde die Membranbindende PH-Domäne entfernt (Abb. 4F). Nach der Induktion der Filamente wiesen 72% der Zellen von AB33kin3^{PHA}G³ ein bipolares Wachstum auf (Abb. 4I). Dieser Anteil an bipolaren Filamenten ist mit dem Phänotyp einer kin3-Deletion mit 80% bipolar auswachsenden Zellen vergleichbar (Abb. 4I). Daraus lässt sich schließen, dass Kin3^{PHA}G³ nicht funktionell ist. Diese

Vermutung stimmt mit der Beobachtung überein, dass die bidirektionale Bewegung von Rrm4R gestört ist und Rrm4R in größeren Akkumulationen in der Zellmitte lokalisierte (Abb. 4H). Interessanterweise lokalisierte Kin3^{PHΔ}G³ weder in fahrenden, noch in stationären Einheiten. Stattdessen zeigte Kin3^{PHΔ}G³ ein gleichmäßig in der gesamten Zelle verteiltes Signal (Abb. 4H). Die Abwesenheit von klar abgegrenzten Einheiten war nicht auf eine verringerte Menge des Proteins zurückzuführen, da in einer Western-Analyse eine vergleichbare Expression von Kin3G³ und Kin3^{PHΔ}G³ gezeigt werden konnte (Abb. 4G). Somit war die gleichmäßige zytoplasmatische Lokalisation von Kin3^{PHΔ}G³ ein Hinweis darauf, dass die PH-Domäne für die Rekrutierung zu den Rrm4-enthaltenden mRNP-Komplexen notwendig ist.

2.1.2 Rrm4 wird mit Endosomen transportiert

Die PH-Domäne von Kinesin-3-Motoren bindet an Phosphatidylinositole und befördert so membranumschlossene Fracht (Klopfenstein and Vale 2004). In U. maydis wurde gezeigt, dass Kin3 für den Transport von Endosomen verantwortlich ist (Wedlich-Söldner et al., 2002; Schuster et al., 2011c; Schuster et al., 2011b). Die in dieser Arbeit gewonnen Ergebnisse zeigen, dass Kin3 ebenfalls an dem Plus-End-gerichteten Transport von Rrm4-abhängigen mRNPs beteiligt ist. Somit werden in U. maydis mit Kin3 und Dynein für den Langstreckentransport sowohl von Endosomen als auch von mRNP-Komplexen die gleichen Motoren verwendet (Baumann et al, 2012). Daher stellte sich die Frage, ob die beiden molekularen Frachten separat oder gemeinsam transportiert werden. In U. maydis wurden die kleine GTPase Rab5a und der t-SNARE Yup1 als endosomale Proteine identifiziert und können, fusioniert mit Fluoreszenzproteinen, für Studien über die Lokalisation von Endosomen verwendet werden (Wedlich-Söldner et al., 2000; Wedlich-Söldner et al., 2002; Fuchs et al., 2006; Schuster et al., 2011c). Um zu verifizieren, dass Kin3 mit diesen Endosomen kolokalisiert, wurde der Stamm AB33kin3G³/rab5aCn hergestellt, welcher sowohl Kin3G³ als auch eine N-terminale Fusion von Rab5a mit mCherry (einem Derivat von Rfp; Shaner et al., 2004) trägt. Das Gen rab5aCn wurde unter der Kontrolle des konstitutiv aktiven Promotors P_{tef} ektopisch in den definierten ip^S-Lokus integriert (Brachmann et al., 2004). Beide Proteine kolokalisierten in sich bidirektional bewegenden Einheiten (Abb. 5A). Somit lässt sich der Transport von Endosomen durch Kin3 unter der gegebenen mikroskopischen Einstellung beobachten. Da Kin3 jedoch nicht nur mit Endosomen, sondern auch mit Rrm4 kolokalisiert (Abb. 4C, D), sollte untersucht werden, ob eine Kolokalisation von Rrm4 mit Endosomen beobachtet werden kann. Hierzu wurde der Stamm AB33rrm4G/rab5aCn hergestellt, der sowohl Rrm4G als auch Rab5aCn exprimiert. In vivo kolokalisierten Rrm4G und das endosomale Protein Rab5aCn in sich bidirektional bewegenden Einheiten (Abb. 5B, Pfeil). Dabei zeigten beide eine Kolokalisation sowohl in anterograder als auch in retrograder Richtung (Abb. 5B). Vergleichbare Ergebnisse konnten unter der Verwendung des t-SNARE Yup1, welches C-terminal mit mCherry fusioniert wurde (Yup1C), an anderer Stelle gezeigt werden (Baumann *et al.*, 2012).

Die mikroskopischen Untersuchungen legen somit nahe, dass Rrm4-abhängige mRNPs mit Endosomen kotransportiert werden. Um diese Hypothese biochemisch zu überprüfen, wurde der Stamm AB33rrm4GT/yup1CM hergestellt. Dieser exprimiert Rrm4, C-terminal fusioniert mit Gfp, gefolgt von einem Tandem-Affinitäts-Epitop (Rrm4GT; Becht et al., 2006), und Yup1, das C-terminal mit mCherry gefolgt von einem dreifachen c-Myc-Epitop (Evan et al., 1985) fusioniert wurde (Yup1CM), wobei yup1CM unter der Kontrolle des starken, konstitutiv aktiven Promotors P_{otef} ektopisch in den definierten ip^S-Lokus integriert wurde (Brachmann et al., 2004). Das c-Myc-Epitop diente der Detektion des Fusionsproteins Yup1CM in einer Western-Analyse. Um zu überprüfen, ob Rrm4GT und Yup1CM in der Zelle wie Rrm4G und Yup1C kolokalisieren (Baumann et al., 2012), wurde AB33rrm4GT/yup1CM mikroskopisch untersucht. Beide Proteine kolokalisierten in sich bidirektional bewegenden Einheiten (Abb. 5C, Pfeil) und können somit als funktionell betrachtet werden. Um zu testen, ob Rrm4 und Endosomen auch biochemisch miteinander assoziieren, wurde untersucht, ob beide Proteine in einer diskontinuierlichen Dichtegradientenzentrifugation kofraktionieren. Dazu wurde ein Gesamtzellextrakt des Stammes AB33rrm4GT/yup1CM zu einer 40%igenlodixanol-Lösung vermischt und mit einer 35% igen und einer 5% igen lodixanol-Lösung überschichtet. Aufgrund ihrer geringeren Dichte sammeln sich nach der Ultrazentrifugation membranumschlossene Organellen an dem Übergang von der 5% igen zu der 35% igen Iodixanol-Stufe (Abb. 5D). In dieser Übergangsfraktion sollten membranassoziierte Proteine im Verhältnis zu der zytoplasmatischen Fraktion angereichert sein (Graham, 2002). In einer Western-Analyse zeigte sich, dass sich sowohl Rrm4GT als auch Yup1CM in dieser membranassoziierten Fraktion befinden (Abb. 5E, Fraktion 2). Dabei wies vor allem Yup1CM eine Anreicherung gegenüber der zytoplasmatischen Fraktionen auf. Als Kontrolle für zytoplasmatische Proteine diente Tub1, das Homolog von αTubulin in U. maydis (Steinberg et al., 2001). Tub1 wurde sowohl in den zytoplasmatischen Fraktionen, als auch in geringen Spuren in der membranassoziierten Übergangsstufe gefunden. Jedoch zeigte sich eine deutliche Anreicherung von Tub1 in der zytoplasmatischen Fraktion (Abb. 5E). Rrm4GT wies dagegen sowohl in der membranassoziierten als auch in der zytoplasmatischen Fraktion ein gleich starkes Signal auf. Im Gegensatz zu den zytoplasmatischen Fraktionen zeigten sich in der membranassoziierten Übergangsstufe dagegen keine Abbauprodukte von Rrm4GT, was darauf hinweist, dass nur funktionelles Rrm4GT mit membranumschlossenen Organellen kofraktionierte (Abb. 5E).



Abbildung 5: Rrm4 wird mit Endosomen kotransportiert.

(A-C) Filamente der Stämme AB33kin3G3/rab5aCn, AB33rrm4G/rab5aCn und AB33rrm4G/yup1CM. Gfp- und mCherry-Bilder sind nebeneinander abgebildet, Einzelbild und Kymographen werden untereinander gezeigt. Größenmaßstab: 5 µm (A, C) und 2 µm (B). Pfeile markieren gut sichtbare Kolokalisationen (D) Schematische Darstellung der diskontinuierlichen Dichtegradientenzentrifugation. Die Veskelfraktion (VF) sammelt sich an der 5%/35% Übergangsgrenze. (E) Western-Analyse einer Dichtegradientenzentrifugation des Stammes AB33rrm4G/yup1CM. Fraktionen gemäß Abb. 5D. Rrm4GT (132 kDa) wurde mit α Gfp, Yup1CM (65 kDa) mit α c-Myc und Tub1 (49,1 kDa) mit α Tub1 detektiert. Größenangabe in kDa. (F-G) Mikroskopische Aufnahmen von AB33rrm4GT/yup1CM/kin3 O HAA3. Gfp- und Rfp-Bilder werden untereinander dargestellt. Größenmaßstab: 10 µm. Pfeile: Akkumulationen von Rrm4G und Yup1CM

Die Verbindung zwischen Rrm4 und Endosomen scheint unabhängig von Kin3 zu sein. So kolokalisierten Rrm4GT und Yup1CM auf subzellulärer Ebene, selbst wenn *kin3* deletiert (Abb. 5G), oder die PH-Domäne von Kin3 entfernt wurde (Abb. 5F). Diese Ergebnisse deuten, in Kombination mit den Resultaten der Fraktionierung, auf eine Interaktion von Rrm4 mit Endosomen hin. Zudem zeigten weitergehende Untersuchungen, dass der Transport von Rrm4 auf funktionelle Endosomen angewiesen ist, jedoch deren Transport von einer *rrm4*-Deletion nicht beeinflusst wird (Baumann et al 2012). Diese Ergebnisse führen zu der Vermutung, dass Rrm4 an die Endosomen bindet und auf dem Weg auch mit der Transportmaschinerie verbunden wird. So stellen die Endosomen ein Vehikel dar, auf dem sich die Rrm4-abhängigen mRNPs durch die Zelle bewegen.

2.2 Die Identifikation von PAM2-tragenden Proteinen als potentielle Adapter

2.2.1 Die Assoziation von Rrm4 mit Endosomen wird von der MLLE-Domäne vermittelt

Die vorherigen Ergebnisse zeigen, dass Rrm4 mit Endosomen kotransportiert wird. Rrm4 besitzt jedoch keine bioinformatisch vorhersagbare membranbindende Domäne, sondern lediglich drei kanonische RRM und die C-terminale MLLE-Domäne (Abb. 7A). Anhand von vorhergehenden Studien und in dieser Arbeit angefertigter Experimente konnten wichtige Aspekte der bidirektionalen Bewegung von Rrm4 aufgedeckt werden, die in der Abbildung 6 näher aufgeführt sind. Die abgebildeten Stämme exprimierten Rrm4GT oder Variationen dieses Fusionsproteins. Rrm4GT zeigte innerhalb der Filamente eine bidirektionale Bewegung (Abb. 6A). Diese ist abhängig von einem intakten Mikrotubuli-Zytoskelett und kann durch Zugabe von Benomyl (50 µM Endkonzentration; eine Stunde) gestoppt werden (Abb. 6B, Becht et al., 2006). Der Plus-End-gerichtete, Mikrotubuli-abhängige Transport von Rrm4 wird von Kin3 vermittelt und der Verlust dieses Motors resultierte in immobilien Akkumulationen von Rrm4GT im Bereich der Zellmitte (Abb. 6C). Die dabei zu beobachtende Restbewegung beruhte vermutlich auf der Aktivität von Dynein (Schuster et al., 2011c; Schuster et al., 2011b; Baumann et al., 2012). Mutationen in funktionell konservierten Aminosäuren der MLLE-Domäne (Rrm4GT^{mM}; F740A, I743A, A751G und K753A; vgl. Abb. 24; für eine Übersicht der Domänenstruktur von Rrm4 siehe Abb. 7) führten zu einer Störung der bidirektionalen Bewegung (Abb. 6D), wie es bereits für Rrm4G^{mM} gezeigt worden ist (Becht *et al.*, 2006; dort als Rrm4G^{mP} bezeichnet).


Abbildung 6: Die Bewegung von Rrm4GT ist abhängig von Mikrotubuli, Kin3 und einer funktionellen MLLE-Domäne. (A-E) Filamente verschiedener Stämme. Gfp- Einzelbild und Kymograph werden jeweils untereinander abgebildet. Größenmaßstab: 10 µm. (A) Filament des Stammes AB33rrm4GT. Der Kymograph zeigt die bidirektionale Bewegung von Rrm4GT. (B) Filament des Stammes AB33rrm4GT nach Behandlung mit Benomyl (50 µM Endkonzentration, eine Stunde behandelt). Der Kymograph zeigt stationäre Rrm4GT-Akkumulationen als senkrechte Linien an. (C) Filament des Stammes AB33rrm4GT im *kin3* Δ -Hintergrund. (D) Filament des Stammes AB33rrm4GT^{mM}. Der Kymograph zeigt stationäre Rrm4GT-Akkumulationen als senkrechte Linien an. (E) Filament des Stammes AB33rrm4GT^{RRM}. Der Kymograph zeigt die bidirektionale Bewegung von Rrm4GT im *kin3* Δ -Hintergrund. (D) Filament des Stammes AB33rrm4GT^{RRM}. Der Kymograph zeigt stationäre Rrm4GT-Akkumulationen als senkrechte Linien an. (E) Filament des Stammes AB33rrm4GT^{RRM}. Der Kymograph zeigt die bidirektionale Bewegung von Rrm4GT ^{RRM}. (F) Western-Analyse des Gesamtzellextraktes von Filamenten der Stämme AB33rrm4GT^{RRM} (*rrm4GT*^{RRM}), AB33rrm4GT^{MM} (*rrm4GT*^{mM}) und AB33rrm4GT^{RRM} (*rrm4GT*^{RRM}). Tub1 dient als Ladekontrolle der Proteinmenge. Varianten von Rrm4GT wurden mit einem α Gfp-Antikörper detektiert, Tub1 mit α Tub1-Antikörper nachgewiesen, Größenangaben in kDa.

Im Gegensatz dazu war die Bewegung von Rrm4GT unabhängig von der Fähigkeit RNA zu binden, denn selbst nach Entfernen der RRM-Domänen (Rrm4GT^{RRM∆}) bewegte sich das Protein bidirektional in der Zelle (Abb. 6E). Schon in vorhergegangenen Experimenten wurde gezeigt, dass der Verlust der RRM zwar zu einem gestörten Transport von mRNA, jedoch nicht zu einer gestörten Bewegung von Rrm4 selbst führt (König *et al.*, 2009). Eine Western-Analyse des Gesamtzellextrakts aus Filamenten der beschriebenen Stämme zeigte, dass sich weder die Deletion von *kin3* noch genetische Modifikationen von Rrm4 selbst auf

dessen Proteinmenge auswirkten (Abb. 6F). Somit wird Rrm4 bei gestörtem Transport und gestörter Funktion nicht verstärkt abgebaut und zeigt das gleiche Expressionsniveau wie Rrm4GT im Ausgangsstamm.

Folglich ist eine funktionelle MLLE-Domäne für die Bewegung von Rrm4 entscheidend (Abb. 6D, Becht *et al.*, 2006). Da der Transport von Endosomen nicht von einem funktionalen Rrm4 abhängig ist (Baumann *et al.*, 2012), kann dieses Ergebnis so gedeutet werden, dass Mutationen in der MLLE-Domäne die Assoziation von Rrm4 mit den Endosomen stören. MLLE-Domänen vermitteln Protein-Protein-Interaktionen mit dem PAM2-Motiv (Kozlov *et al.*, 2004; Albrecht und Lengauer, 2004; Kozlov *et al.*, 2010b; Brook *et al.*, 2012). Darauf aufbauend wurde die Hypothese formuliert, dass Rrm4 über ein PAM2-Motiv tragendes Protein an die Endosomen gekoppelt sein könnte.

2.2.2 PAM2-tragende Proteine als potentielle Interaktionspartner von Rrm4

Um mögliche Interaktionspartner von Rrm4 zu finden, wurde das Genom von *U. maydis* bioinformatisch nach Sequenzen von PAM2-Motiv tragenden Proteinen durchsucht. Dabei wurden 14 potentielle Kandidaten identifiziert und als Upa 1-14 (<u>U</u>stilago <u>PA</u>M2-Protein) bezeichnet (Tab. 1, Abb. 7; M. Albrecht und M. Feldbrügge, persönliche Kommunikation).

Unter diesen Proteinen finden sich bereits in anderen Organismen beschriebene Interaktionspartner des Poly(A)-bindenden Proteins. So ist Upa3 ein Ortholog von Pbp1p (Pab1p bindendes Protein 1) aus S. cerevisiae, bzw. von Ataxin-2 aus dem Menschen (Mangus et al., 1998; Kozlov et al., 2010b). Upa8 ist ein Ortholog von eRF3 (Osawa et al., 2012), und Upa13 und Upa14 sind Homologe von Pan3 und Not1, zwei Komponenten der Deadenylierungskomplexe Pan2-Pan3, sowie Caf1-Not-Ccr4 (Funakoshi et al., 2007). Upa7 besitzt eine Homologie zu dem PAM2-tragenden Protein CID7 in Arabidopsis thaliana (A. thaliana), jedoch wurde CID7 bisher nicht näher untersucht (Bravo et al., 2005). Diese Proteine finden sich damit auch in Organismen, die kein Homolog von Rrm4 besitzen und interagieren vermutlich mit der MLLE-Domäne des Poly(A)-bindenden Proteins. Somit ist es eher unwahrscheinlich, dass diese konservierten Proteine als spezifische Adapter zwischen Rrm4 und den Endosomen funktionieren. Jedoch finden sich in der Liste der potentiell PAM2-Motiv-tragenden Proteine auch mögliche Kandidaten, die eine Rolle in dem Langstreckentransport von mRNA spielen könnten. Dabei fiel besonders Upa1 auf, da es neben einem potentiellen PAM2-Motiv auch eine FYVE-Domäne besitzt. Diese Domäne bindet mit hoher Spezifität Phosphatidylinositol-3-Phosphat, ein Lipid, das in den Membranen von frühen Endosomen gefunden wird (Hayakawa et al., 2004). Somit könnte Upa1 als Adapter zwischen Rrm4 und den Endosomen agieren.

Als weiterer interessanter Kandidat erschien Upa2, da es vier vorhergesagte PAM2-Motive trägt und dadurch als möglicher Faktor die Multimerisierung von mehreren Rrm4-Proteinen

oder sogar eine Verknüpfung zwischen Rrm4 und Pab1 vermitteln könnte. In Anbetracht dessen ist zu berücksichtigen, dass alle PAM2-tragenden Proteine potentiell sowohl mit der MLLE-Domäne von Rrm4 als auch Pab1 interagieren könnten. Um auszuschließen, dass das Genom von *U. maydis* noch für weitere Proteine mit einer MLLE-Domäne kodiert, wurde es auf diese bioinformatisch durchsucht. Dabei konnte eine MLLE-Domäne nur in Pab1 und Rrm4 mit verlässlicher Sicherheit vorhergesagt werden und findet sich somit nur bei Komponenten des Langstreckentransports von mRNA wieder (Tab. 2, Abb. 7A). Aus diesem Grund erscheint eine detailliertere Untersuchung von PAM2-Motiv tragenden Proteinen als vielversprechend, um die Bildung und den Transport von mRNPs aufzuklären.

			PAM2-	Punkt-	
Protein	um-Nr.*	bekanntes Ortholog	Motiv(e)	zahl**	E-Wert***
Upa1	um12183	Pib1 (S.c.)	1	16	0,038
Upa2	um10350	NA	1 / 4	17	0,027
			2 / 4	16,2	0,035
			3 / 4	3,2	2,7
			4 / 4	7,4	0,068
Upa3	um02637	Ataxin-2 (H.s.), Pbp1 (S.c.)	1	13,4	0,09
Upa4	um03521	NA	1	14	0,073
Upa5	um00427	NA	1	13,3	0,093
Upa6	um00859	THOC7 (<i>D.m.</i>)	1	6,4	0,95
Upa7	um04609	CID7 (A. t.)	1	8,8	0,42
Upa8	um05695	Sup35 (S.c.) / eRF3 (H.s.)	1	7,7	0,61
Upa9	um06200	Pex3p (S.c.)	1	15,7	0,042
Upa10	um03505	Sac3p (<i>S.c.</i>)	1	6,2	1
Upa11	um01657	NA	1	5,8	1,2
Upa12	um00883	Kcs1 BZIP (A. o.)	1/2	1,6	4,7
			2/2	5,5	1,3
Upa13	um02501	Pan3 (S.c. / H.s.)	1	5,1	1,5
Upa14	um05540	Not1p (S.c.)	1	5	1,5

Tabelle 1: Die potentiellen PAM2-tragenden Proteine in U. maydis (vgl. Abb. 7).

Die Analysen wurden in Zusammenarbeit mit Mario Albrecht durchgeführt. NA: Nicht auffindbar, S.c.: Saccharomyces cerevisiae, D.m.: Drosophila melanogaster, A.t.: Arabidopsis thaliana, H.s.: Homo sapiens, A.o.: Aspergillus oryzae.

*Zugriffsnummern der Gene in der MUMDB (http://mips.helmholtz-muenchen.de/genre/proj/ustilago), **Die Punktzahl und ***der E-Wert für diese Motiv-Vorhersagen mit Hilfe der Conserved Domain Database (Marchler-Bauer *et al.* (2011); http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/Structure/cdd/wrpsb.cgi) ermittelt.

Gennummer*	Protein	Homo	ologie zu <i>S.c.</i>	SM/	ART**	Pfam***				
um03494	Pab1	8,70E	-09	8,26	6E-32	5,00E-29				
um10836	Rrm4	0,095		3,46	6E-01	0,00012				
*Gennummer	für	einen	Zugriff	über	die	MUMDB	(http://mips.helmholtz-			
muenchen.de/g	enre/proj/	ustilago),	**SMART		(http://smart.embl-heide		elberg.de/), ***Pfam			
(http://pfam.sanger.ac.uk/).										



Abbildung 7: In *U. maydis* konnten 14 potentielle PAM2-Proteine identifiziert werden. Schematische Darstellung von MLLE- und PAM2-tragenden Proteinen. Größenangabe: 200 Aminosäuren (AS). Die Proteine können anhand der Gennummer (*um*-Nummer) über die MUMDB (http://mips.helmholtz-muenchen.de/genre/proj/ustilago) identifiziert werden. **(A)** Schematische Darstellung der Domänenarchitektur der RNA-bindenden Proteine Rrm4 und Pab1. Beide besitzen RNA-bindende RRM (*RNA recognition motif*)-Domänen und eine C-terminale MLLE-Domäne. **(B)** Das PAM2 (*PABP-interacting motif* 2)-Protein Upa1 aus *U. maydis* zeigt im C-Terminus Homologie zu Pib1p aus *S. cerevisiae*. **(C)** Die potentiellen PAM2-Proteine Upa2 und Upa3 wurden ebenfalls in dieser Arbeit untersucht. **(D)** Die nicht näher analysierten potentiellen PAM2-tragenden Proteine.

2.2.3 Mehrere PAM2-Proteine beeinflussen die Filamentbildung von U. maydis

In dieser Arbeit wurden drei der potentiellen PAM2-Proteine näher untersucht. Upa1 und Upa2 wurden aufgrund ihrer interessanten Domänenarchitektur und einer möglichen Rrm4-Spezifität ausgewählt. Zusätzlich wurde Upa3 analysiert, welches aufgrund seines ubiquitären Vorkommens von S. cerevisiae bis zum Menschen vermutlich mit Pab1 interagiert, jedoch nicht mit Rrm4. Es wurden Deletionsmutanten von allen zugehörigen Genen erstellt, und deren filamentöses Wachstum auf aktivkohlehaltigem Festmedium im Vergleich zu dem gemeinsamen Ausgangsstamm AB33 und AB33rrm4∆ getestet. Dieses Festmedium (NM-CC) besaß als einzige Stickstoffguelle Nitrat, welches im Zusammenspiel mit den hydrophoben Eigenschaften der Aktivkohle zu einer Hyphenbildung des Laborstammes AB33 führt. Dieser zeigte nach zwei Tagen Wachstum eine filzige Koloniemorphologie von weißer Farbe mit deutlich erkennbaren Filamenten an den Rändern (Abb. 8A). Der bereits bekannte Filamentbildungsdefekt von AB33rrm4A äußerte sich in einer deutlich weniger filzigen Morphologie und glatten Kolonierändern (Abb. 8A; Becht et al., 2006). In dem direkten Vergleich dazu zeigten AB33upa1 Δ und AB33upa2 Δ interessanterweise ebenfalls eine gestörte Hyphenbildung (Abb. 8B). Ein Defekt im filamentösen Wachstum ist sowohl mit dem Phänotyp eines gestörten Langstreckentransports von mRNA (Becht et al., 2005; Becht et al., 2006) als auch mit einem fehlerhaften Transport von Endosomen assoziiert (Schuchardt et al., 2005). Somit wurde eine Beteiligung von Upa1 und Upa2 an diesen Prozessen vermutet. Im Gegensatz dazu hatte der Verlust von Upa3 keinen Einfluss auf das filamentöse Wachstum und ist vermutlich an keinem der Transportprozesse beteiligt. Um eine mögliche Funktion der Kandidaten an dem Langstreckentransport von mRNA zu untersuchen, wurden die drei Proteine C-terminale mit Gfp fusioniert (Upa1G, Upa2G und Upa3G), und hinsichtlich ihrer subzellulären Lokalisation in den Filamenten untersucht. Nach Induktion des filamentösen Wachstums lokalisierte sowohl Upa1G als auch Upa2G in sich bidirektional bewegenden Einheiten (Abb 8D, E). Somit glichen sie der subzellulären Lokalisation und Mobilität von Rrm4 (Abb. 8B) und unterschieden sich bezüglich der fehlenden zytoplasmatischen Lokalisation von Pab1 (Abb. 8C). Demgegenüber zeigte Upa3G keine eindeutige Bewegung, sondern eine einheitliche zytoplasmatische Lokalisation in der Zelle, wobei diese im Bereich des Zellkerns schwächer war (Abb. 8F). Diese initialen Experimente wiesen auf eine Beteiligung von Upa1 und Upa2 an dem Langstreckentransport von mRNA hin, während Upa3 nicht an diesem Prozess beteiligt zu sein scheint und aus diesem Grund nicht weiter untersucht wurde.



Abbildung 8: Upa1 und Upa2 könnten potentielle Interaktionspartner von Rrm4 sein.

(A) Filamentöses Wachstum von *U. maydis* auf aktivkohlehaltigem NM-Festmedium. Der Laborstamm AB33 (*wt*) zeigt ein effizientes filamentöses Wachstum, das sich in einem weißen, filzigen Aussehen der Kolonien äußert. Die Deletion von *rrm4* (*rrm4* Δ , AB33rrm4 Δ) führt zu einem Filamentbildungsdefekt, der in einer glatten Koloniemorphologie resultiert. Die Deletion von *upa1* und *upa2* führt zu einer mit *rrm4* Δ vergleichbaren Koloniemorphologie. Die Deletion von *upa3* bewirkt dagegen keinen Filamentbildungsdefekt. (**B-F**) Filamente der Stämme AB33rrm4G (B), AB33pab1G (C), AB33upa1G (D), AB33upa2G (E) und AB33upa3G (F). Gfp-Einzelbild und Kymograph sind untereinander gezeigt. Größenmaßstab: 10 µm. Rrm4G lokalisiert in eindeutig abgegrenzten, sich bewegenden Einheiten in der Zelle, während Pab1G sowohl ein zytoplasmatisches Signal als auch eine Lokalisation in sich bewegenden mRNPs aufweist. Upa1G und Upa2G ähneln in ihrer subzellulären Akkumulation der von Rrm4. Upa3G weist eine vorwiegend zytoplasmatische Lokalisation auf.

2.3 Die Charakterisierung von Upa1

2.3.1 Upa1 ist wichtig für das filamentöse Wachstum und die Sekretion von Cts1

Upa1 erscheint als attraktiver Kandidat für die Rolle eines Adapterproteins zwischen Rrm4 und den Endosomen, da es mit seinem PAM2-Motiv an die MLLE-Domäne von Rrm4 binden und dieses über die FYVE-Domäne an Endosomen rekrutieren könnte (Abb. 7A, B). Desweiteren besitzt Upa1 fünf Ankyrin-Wiederholungen, die eine Protein-Protein-Interaktion vermitteln könnten und somit weitere Faktoren mit dem Komplex verbinden könnten (Abb. 7B; Li *et al.*, 2006). Zudem trägt Upa1 am C-Terminus eine RING-Finger-Domäne und könnte mit dieser den mRNP-Transport durch Ubiquitinierung regulieren (Abb. 7B; Hochstrasser, 2009).

Eine Deletion von upa1 führt zu einem gestörten filamentösen Wachstum auf Festmedium (Abb. 8A). Um diesen Effekt näher zu untersuchen, wurde die Hyphenbildung von AB33upa1 Δ und AB33upa1G im Vergleich zu AB33 und AB33rrm4 Δ in Flüssigkultur untersucht. Bei keinem der Stämme zeigte sich ein morphologischer Defekt der Sporidien (Abb. 9A, links). Nach Induktion des filamentösen Wachstums wuchs jedoch bei AB33rrm4 Δ und AB33upa1∆ ein signifikanter Anteil der Zellen bipolar aus (Abb. 9A, rechts). Acht Stunden nach der Induktion des filamentösen Wachstums zeigte AB33 zu einem Großteil unipolar auswachsende Filamente mit Septenbildung (Abb. 9B). Wie bereits beschrieben (Becht et al., 2006) zeigt der Stamm AB33rrm4∆ ein gestörtes filamentöses Wachstum mit 38% bipolar auswachsenden Zellen, von denen nur wenige Septenbildung zeigten (Abb. 9B). Interessanterweise wuchsen auch Zellen von AB33upa1^Δ nach Induktion der Hyphenbildung bipolar aus und die unipolaren Filamente hatten einen Defekt in der Septenbildung (Abb. 9B). Demnach störte der Verlust von Upa1 das filamentöse Wachstum von U. maydis, allerdings in einem geringeren Maß als eine Deletion von rrm4. AB33upa1G dagegen zeigte ein mit dem Ausgangsstamm AB33 vergleichbares filamentöses Wachstum (Abb. 9B). Dies deutet darauf hin, dass Upa1G funktionell ist.



Abbildung 9: Upa1 ist wichtig für das filamentöse Wachstum und die Sekretion von Cts1. (A) DIC-Aufnahmen von sporidialen Zellen und Filamenten (acht Stunden nach Hypheninduktion) der Stämme AB33 (*wt*), AB33rrm4 Δ (*rrm4\Delta*), AB33upa1 Δ (*upa1\Delta*) und AB33upa1G (*upa1G*). Größenmaßstab: 10 µm. (B) Anteil der unipolar und bipolar auswachsenden Zellen mit und ohne Septenbildung in Kulturen der Stämme AB33 (*wt*), AB33rrm4 Δ (*rrm4\Delta*), AB33upa1 Δ (*upa1\Delta*), AB33upa1 Δ (*upa1\Delta*) und AB33upa1G (*upa1G*) acht Stunden nach Induktion des filamentösen Wachstums. Fehlerbalken zeigen Standardfehler. Die Daten stammen aus drei unabhängigen Experimenten. (C-D) Die relative endochitinolytische Aktivität der oben genannten Stämme in Sporidien oder in Filamenten acht Stunden nach Induktion des Hyphenwachstums. Die Aktivität wurde auf den Ausgangsstamm (*wt*) normalisiert. Fehlerbalken zeigen Standardfehler. Die Daten stammen aus drei unabhängigen Experimenten. (C) Teile dieser Messungen finden auch in Abbildung 19C Verwendung, da die gezeigten Ergebnisse aus einer gemeinsamen Versuchsreihe stammen. (D) Teile dieser Messungen finden auch in Abbildung 13E, da die gezeigten Ergebnisse aus einer gemeinsamen Versuchsreihe stammen.

Der Verlust von Rrm4 und damit auch des Langstreckentransports von mRNA führt nicht nur zu einer zellmorphologischen Störung des filamentösen Wachstums, sondern resultiert auch in einer verminderten Aktivität der Endochitinase Cts1 (Koepke et al., 2011). Der Effekt von Rrm4 auf die Sekretion von Cts1 beschränkt sich auf filamentöse Zellen und kann in Sporidien nicht nachgewiesen werden (Koepke et al., 2011). Um den Einfluss einer Deletion von upa1 auf die Aktivität von Cts1 zu untersuchen, wurde die relative endochitinolytische Aktivität in dem Ausgangsstamm AB33, sowie den Stämmen AB33rrm4_{\(\Delta\)}, AB33upa1_{\(\Delta\)} und AB33upa1G mit Hilfe des fluoreszierenden Substrates 4-Methylumbelliferyl β-D-N,N',N"-Triacetylchitotriosid untersucht. Weder die Deletion von upa1 noch die Expression von Upa1G hatten dabei eine Auswirkung auf die relative endochitinolytische Aktivität in Sporidien (Abb. 9C). Diese lag im rrm4/2-Hintergrund leicht über der Aktivität des Ausgangsstammes AB33, jedoch zeigten andere Messungen einen vergleichbaren Wert für beide Stämme (Koepke et al., 2011). Demgegenüber führte die Deletion von rrm4 in Filamenten zu einer relativen endochitinolytischen Aktivität von 32% und war somit stark reduziert (Abb. 9D, Koepke et al 2012). Interessanterweise zeigte der Stamm AB33upa1 Δ nur eine relative endochitinolytische Aktivität von 28% im Vergleich zu dem Ausgangsstamm und besitzt somit eine vergleichbar reduzierte Aktivität wie AB33rrm4∆ (Abb. 9D). Dagegen ist die endochitinolytische Aktivität in Filamenten von AB33upa1G vergleichbar mit AB33 (Abb. 9D). Eine Deletion von upa1 führt somit zu einem rrm4₄-ähnlichen Phänotyp.

2.3.2 Upa1 ist ein endosomales Protein

Durch bioinformatische Vorhersagen wurde postuliert, dass Upa1 eine FYVE-Domäne besitzt und somit an Endosomen binden könnte (Abb. 7B). Tatsächlich lokalisiert Upa1G, ähnlich wie Rrm4, in sich bidirektional bewegenden Einheiten (Abb. 6B, 8A). Frühe Endosomen werden entlang von Mikrotubulifilamenten transportiert und wäre Upa1 ein endosomales Protein, müsste dessen Transport ebenfalls entlang dieser Zytoskelettelemente geschehen. Tatsächlich führt die Behandlung von Filamenten des Stammes AB33upa1G mit Benomyl zu einer Inhibition der Bewegung von Upa1G und das Protein lokalisiert in mehreren, über die Zelle verteilten, immobilen Akkumulationen (Abb. 10B). Somit ist die Mobilität von Upa1G abhängig von einem intakten Mikrotubuli-Zytoskelett. Als Plus-End-gerichteter Motor transportiert Kin3 Endosomen und Rrm4abhängige mRNPs in Filamenten von U. maydis (Abb 4, Wedlich-Söldner et al 2002). Um eine Verbindung zwischen Kin3 und der Bewegung von Upa1G zu überprüfen, wurde der Stamm AB33upa1G/kin3∆ hergestellt. Die Deletion von kin3 führt, wie bereits beschrieben (Abb. 4), nach Induktion der Hyphenbildung zu einem bipolaren Auswachsen der Zellen. Darüber hinaus resultiert der Verlust von Kin3 in einer gestörten Bewegung von Upa1G, das in immobilen Akkumulationen im Bereich der Zellmitte lokalisierte (Abb. 10C).



Abbildung 10: Upa1 wird mit Endosomen kotransportiert. (A-C, E, F) Filamente verschiedener Stämme von *U. maydis*. Gfp-Einzelbild und Kymograph sind untereinander gezeigt. Größenmaßstab: 10 µm. (A) Filament des Stammes AB33upa1G. Der Kymograph zeigt die bidirektionale Bewegung von Upa1G. (B) Filament des Stammes AB33upa1G nach Behandlung mit Benomyl für eine Stunde (50 µM Endkonzentration). Der Kymograph zeigt stationäre Upa1G-Akkumulationen als senkrechte Linien an. (C) Filament des Stammes AB33upa1G/kin3 Δ . Der Kymograph zeigt die gestörte bidirektionale Bewegung von Upa1G im *kin3* Δ -Hintergrund. Der Pfeil weist auf eine Restbewegung hin. (D) Filament des Stammes AB33upa1G/rab5aCn. Gfp- und mCherry-Bilder der simultanen Zweifarbaufnahme sind nebeneinander gezeigt, Einzelbild und Kymographen sind untereinander gezeigt. Der Größenmaßstab entspricht 5 µm. Die Pfeile markieren gut erkennbare Kolokalisationen. (E) Filament des Stammes AB33upa1G/rm4 Δ . Der Kymograph zeigt die bidirektionale Bewegung von Upa1G im *rrm4* Δ -Hintergrund. (F) Filament des Stammes AB33upa1G/upa2 Δ . Der Kymograph zeigt die bidirektionale Bewegung von Upa1G im *upa2* Δ -Hintergrund.

Dennoch ist bei Zellen von AB33upa1G/kin3∆ noch eine Restbewegung von Upa1G zu beobachten, die vermutlich auf die Aktivität von Dynein zurückzuführen ist (Abb. 10C, Pfeil). Somit gleicht die Bewegung von Upa1 bezüglich der Abhängigkeit von Mikrotubulifilamenten und Kin3 dem Transport von Endosomen und Rrm4. Diese Ergebnisse legen nahe, dass

Upa1G wie Rrm4 mit Endosomen transportiert wird. Um einen gemeinsamen Transport sichtbar zu machen, wurde der Stamm AB33upa1G/rab5aCn hergestellt, welcher gleichzeitig Upa1G und Rab5aCn exprimiert. Beide Proteine kolokalisierten *in vivo* in sich bidirektional bewegenden Einheiten (Abb. 10D). Somit findet in den Hyphen ein Kotransport von Upa1G und Endosomen statt. Es ist zu vermuten, dass Upa1G über die FYVE-Domäne an die Endosomen gebunden wird, jedoch trägt Upa1G auch ein PAM2-Motiv und könnte damit über die MLLE-Domäne von Rrm4 oder sogar Pab1 an die Endosomen rekrutiert werden. Um dies zu überprüfen wurde die Lokalisation von Upa1G im Stamm AB33upa1G/rrm4∆ untersucht. Der Verlust von Rrm4 und somit auch von Pab1 an den Endosomen hatte keinen Einfluss auf die bidirektionale Bewegung von Upa1G (Abb. 10E). Darüber hinaus zeigte auch eine Deletion von *upa2* keinen Effekt auf den Transport von Upa1G (Abb. 10F). Aus diesen unabhängig von den weiteren, in dieser Arbeit untersuchten Proteinen ist.

2.3.3 Das PAM2-Motiv von Upa1 interagiert mit der MLLE-Domäne von Pab1

Durch zellbiologische Analysen konnte gezeigt werden, dass Upa1 ein endosomales Protein ist (Abb. 10). Es könnte daher als Adapter zwischen den Endosomen und den mRNP-Komplexen fungieren. Eine Rekrutierung des Schlüsselproteins Rrm4 oder des ebenfalls in den Transport-Komplexen enthaltenen Pab1 könnte möglicherweise über das PAM2-Motiv erfolgen. Um diese Theorie zu untersuchen, sollte zunächst überprüft werden, ob das bioinformatisch vorhergesagte PAM2-Motiv funktionell ist. Zu diesem Zweck wurde das Hefe-Zwei-Hybrid-System verwendet, mit dem bereits die Interaktion von Pan3 mit PABP1 aus S. cerevisiae nachgewiesen werden konnte (Siddigui et al., 2007). Zunächst sollte Upa1 auf eine mögliche Interaktion mit Pab1 getestet werden. Aus diesem Grund wurden die zu testenden Varianten von Pab1 N-terminal mit der Gal4-DNA-bindenden Domäne gefolgt von einem c-Myc-Epitop (im Folgenden als BD bezeichnet) und die entsprechenden Varianten von Upa1 mit der Gal4-Aktivierungsdomäne gefolgt von einem Hämagglutinin-Epitop (im Folgenden als AD bezeichnet) fusioniert und auf eine Interaktion in dem Hefestamm AH109 hin untersucht (Abb. 11A; Matchmaker III, Clontech). Eine Interaktion beider Proteine im Zellkern des Hefestammes resultiert in der Bildung eines aktiven Transkriptionsfaktors, der die Expression der Reportergene HIS3 und ADE2 induziert und infolgedessen zum Wachstum der Zellen auf entsprechendem Selektionsmedium führt.

In dem Hefe-Zwei-Hybrid-System hat sich gezeigt, dass Pab1 nicht mit Upa1 interagiert, wenn letzteres in voller Länge in diesem System exprimiert wird (Abb. 11B, Reihe 1). Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass die membranbindende FYVE-Domäne die für den Test essentielle Lokalisation von AD-Upa1 im Zellkern verhindert. Aus diesem Grund wurde ein mittlerer Bereich von Upa1 (Aminosäuren 814-1156) entfernt, in dem sich auch die FYVE-

Domäne befindet (Upa1^{MA}, Abb. 11A). Interessanterweise zeigte Pab1 nun mit Upa1^{MA} eine deutlich erkennbare Interaktion (Abb. 11, Reihe 2). Demgegenüber führte die Verwendung von Pab1^{mM}, das die Aminosäuresubstitutionen Y580A, V583A, K593A und I598A an funktionell wichtigen Positionen der MLLE-Domäne trägt (vgl. Abb. 24), einerseits zu keiner Aktivierung der Reportergene (Abb. 11B, Reihe 3). Andererseits interagierte die MLLE-Domäne von Pab1 (MLLE^{Pab1}) mit Upa1^{MA} und ist somit sowohl notwendig als auch hinreichend für eine Interaktion (Abb. 9B, Reihe 4). Als nächstes sollte überprüft werden, ob die Bindung der MLLE-Domäne über das vorhergesagte PAM2-Motiv von Upa1 erfolgt. Dazu wurde das Protein Upa1^{mP/MΔ} als Fusion mit der AD angeboten. In diesem Protein wurden neben der Deletion des Mittelbereiches noch funktionell wichtige Aminosäuren in dem PAM2-Motiv mutiert (L132A, A136S, F139A und P141A; vgl. Abb. 24). Diese Aminosäuresubstitutionen verhinderten eine Interaktion mit Pab1 (Abb. 11B, Reihe 5). Den gleichen Effekt hatte eine N-terminale Verkürzung der ersten 143 Aminosäuren von Upa1^{MA}, die das PAM2-Motiv einschließt (Upa1^{NA/MA}, Abb. 11B, Reihe 6). Diese Ergebnisse belegen, dass ein funktionelles PAM2-Motiv für die Interaktion von Upa1 mit Pab1 notwendig ist. Anschließend wurde mit einem kurzen N-terminalen Bereich von Upa1 (Upa1^{C1Δ}) getestet, ob diese Region mit dem PAM2-Motiv für eine Bindung mit Pab1 hinreichend ist. Upa1^{C1} zeigte tatsächlich eine Interaktion mit Pab1 (Abb. 11B, Reihe 7) und MLLE^{Pab1} (Abb. 11B, Reihe 9), aber nicht mit Pab1^{mM} (Abb. 11B, Reihe 8). Die Ergebnisse der Hefe-Zwei-Hybrid-Studien sind in der Abbildung 11A zusammengefasst. Eine Western-Analyse belegte die Expression der Hybridproteine in allen getesteten Stämmen, wodurch die Abwesenheit eines Hybriden als Grund für fehlende Interaktionen ausgeschlossen werden konnte (Abb. 11C). Als Positivkontrolle wurde p53 aus der Maus auf eine Interaktion mit dem großen T-Antigen des Virus SV40 (Simian Virus 40) getestet und als Negativkontrolle wurde Lamin C in Kombination mit dem großen T-Antigen überprüft. Dies sind etablierte Kontrollen des Systems, da p53 mit dem T-Antigen interagiert, während Lamin C keine Interaktion mit dem T-Antigen aufweist (Abb. 11B, Reihe 14, 15).



Abbildung 11: Upa1 besitzt ein funktionelles PAM2-Motiv und interagiert im Hefe-Zwei-Hybridsystem mit Pab1. (A) Schematische Darstellung der im Hefe-Zwei-Hybrid-System getesteten Proteine. Diese werden ohne die N-terminale Fusion mit BD oder AD gezeigt. (#) Das Molekulargewicht bezieht sich auf die Fusionsproteine mit BD und AD. (B) Wachstumsanalysen im Hefe-Zwei-Hybrid-System auf Interaktion der angegebenen Proteinvarianten. (C) Western-Analyse der getesteten Hefetransformanten aus (B). BD-Fusionsproteine wurden mit einem α C-Myc-AK und AD-Fusionsproteine mit einem α HA-AK nachgewiesen. Sternchen zeigen Kreuzreaktionssignale bei einer Größe von ~140 kDa(*) und 45 kDa(**). Letztere (**) wurde bereits von Zhu *et al.* (1998) beschrieben.

2.3.4 Der Verlust des PAM2-Motivs hat keinen Einfluss auf die Funktion von Upa1 Mit Hilfe des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems konnte gezeigt werden, dass das bioinformatisch vorhergesagte PAM2-Motiv von Upa1 funktionell ist und mit der MLLE-Domäne von Pab1 interagieren kann (Abb. 11). Auf Basis dieser Ergebnisse sollte anhand verschiedener N-terminaler Modifikationen und Verkürzungen von Upa1 untersucht werden, wie sich der Verlust des PAM2-Motivs und der fünf Ankyrin-Wiederholungen in U. maydis auswirkt Folgende Proteinvarianten wurden getestet: Upa1G^{mP} (Abb. 12A). besaß die Aminosäuresubstitutionen L132A, A136S, F139A und P141A in funktionell konservierten Aminosäuren des PAM2-Motivs (vgl. Abb. 24). Die übrigen Proteine trugen eine N-terminale Deletion verschieden langer Aminosäurebereiche: Upa1G^{N1 Δ} (Δ 1-143), Upa1G^{N2 Δ} (Δ 1-357), Upa1G^{N3 Δ} (Δ 1-551), Upa1G^{N4 Δ} (Δ 1-633), Upa1G^{N5 Δ} (Δ 1-719), Upa1G^{N6 Δ} (Δ 1-969). Eine Western-Analyse ergab, dass Upa1G^{MP}, Upa1G^{N1 Δ}, Upa1G^{N2 Δ} und Upa1G^{N6 Δ} eine vergleichbare Expression in Filamenten aufwiesen (Abb. 12B). Allerdings konnten die Varianten Upa1G^{N3 Δ}, Upa1G^{N4 Δ} und Upa1G^{N5 Δ} nur schwach oder gar nicht in den Gesamtzellextrakten detektiert werden, was auf eine gestörte Expression oder verringerte Stabilität dieser verkürzten Versionen von Upa1 hindeutete (Abb. 12B).

Um die Funktionalität der Varianten zu testen, wurden die entsprechenden Stämme auf ihre Fähigkeit zur Hyphenbildung auf aktivkohlehaltigem Festmedium hin untersucht. Dabei zeigte sich überraschenderweise, dass sowohl AB33upa1G^{mP} als auch AB33upa1G^{N1Δ} ein mit dem Ausgangsstamm vergleichbares filamentöses Wachstum zeigten (Abb. 12C). Dies war unerwartet, da beiden Stämmen ein funktionelles PAM2-Motiv fehlt. Folglich war dieses Motiv, und damit die Interaktion mit Pab1, für eine Funktion von Upa1 *in vivo* nicht notwendig. Demgegenüber führten alle weiteren getesteten N-terminalen Verkürzungen zu einem Filamentbildungsdefekt auf dem Festmedium (Abb. 12C). Dies war bei den Stämmen AB33upa1G^{N3Δ}, AB33upa1G^{N4Δ} und AB33upa1G^{N5Δ} zu erwarten, da diese eine stark verminderte Expression der entsprechenden Upa1-Varianten zeigten. Im Gegensatz dazu gab der beobachtete Filamentbildungsdefekt von AB33upa1G^{N2Δ} und AB33upa1G^{N6Δ} einen Hinweis darauf, dass die exprimierten Allele in ihrer Funktion gestört sind. Dies ließ zumindest eine funktionelle Bedeutung des Bereiches N2 (Aminosäuren 1-357) vermuten.

Abbildung 12 (nachfolgende Seite): Das PAM2-Motiv ist für die Funktion von Upa1 nicht wichtig. (A) Schematische Darstellung von Upa1 und dessen N-terminal modifizierten Varianten in C-terminaler Fusion mit Gfp. Größenangabe in Aminosäuren (AS). (B) Western-Analyse des Gesamtzellextraktes von Filamenten der Stämme AB33upa1G (*upa1G*) und der entsprechenden Varianten. Tub1 dient als Ladekontrolle der Proteinmenge. Die Varianten von Upa1G wurden mit einem α Gfp-Antikörper detektiert, Tub1 mit α Tub1-Antikörper nachgewiesen. Größenangabe in kDa. (C) Filamentöses Wachstum der Stämme AB33 (*upa1*), AB33upa1 Δ (*upa1* Δ), AB33upa1G (*upa1G*), AB33upa1G^{M2} (*upa1G*^{M3}), Upa1G^{M3} (*upa1*^{M3}), Upa1G^{M4} (*upa1*^{M4}), Upa1G^{N5 Δ} (*upa1*^{N5 Δ}), Upa1G^{N6 Δ} (*upa1*^{N6 Δ}) auf aktivkohlehaltigem NM-Festmedium. (D-K) Filamente der oben beschriebenen Stämme. Gfp-Einzelbild und Kymograph sind untereinander gezeigt. Größenmaßstab: 10 µm.



Durch fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen sollte getestet werden, ob die modifizierten Varianten von Upa1 in ihrer Fähigkeit der bidirektionalen Bewegung gestört sind. Dabei war zu beobachten, dass Upa G^{mP} (Abb. 12E) und Upa $1G^{N1\Delta}$ (Abb. 12F) in den Filamenten eine mit Upa1G (Abb. 12D) vergleichbare bidirektionale Bewegung aufwiesen. In Übereinstimmung mit der gestörten Expression der Proteine Upa $1G^{N3\Delta}$, Upa $1G^{N4\Delta}$ und Upa $1G^{N5\Delta}$ konnten diese Varianten in fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen nicht detektiert werden (Abb. 12H-J). Demgegenüber lokalisierten Upa $1G^{N2\Delta}$ und Upa $1G^{N6\Delta}$ in sich bidirektional bewegende Einheiten (Abb. 12G, K). Diese zeigten im Vergleich zu Upa1G jedoch eine geringere Signalintensität. Neben den sich bewegenden Einheiten, waren auch statische Signale von Upa $1G^{N2\Delta}$ und Upa $2G^{N6\Delta}$ zu beobachten (Abb. 12G, K), die bei Upa $1G^{N2\Delta}$ stärker ausgeprägt waren. Gleichwohl konnten beide Proteine anscheinend noch an Endosomen assoziieren, um mit diesen transportiert zu werden.

2.3.5 Die FYVE-Domäne ist notwendig für die Assoziation von Upa1 an Endosomen

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Upa1 mit der endosomalen kleinen GTPase Rab5a kolokalisiert und in den Filamenten eine bidirektionale Bewegung zeigt (Abb. 10). Upa1 trägt an seinem C-Terminus eine FYVE-Domäne, die die Interaktion mit dem Endosom vermitteln könnte, sowie eine RING-Finger-Domäne und besitzt in diesem Bereich eine Homologie zu dem endosomalen Protein Pib1p aus S. cerevisiae (Abb. 7B). Um die Bedeutung der FYVE-Domäne und der RING-Finger-Domäne für die Funktion von Upa1 zu untersuchen, wurden C-terminal verkürzte oder modifizierte Varianten von Upa1 in U. maydis getestet. Upa1G^{R Δ} trägt eine Deletion des RING-Fingers (Δ 1241-1287), während bei Upa1G^{FRA} der gesamte C-terminale Bereich einschließlich FYVE-Domäne entfernt worden ist (Δ 1048-1287, Abb. 13A). Upa1G^{mF} trägt Alaninsubstitutionen der funktionell wichtigen Arginine R1028 und R1029 in der FYVE-Domäne. Diese hergestellten Stämme wurden zunächst auf eine Störung des filamentösen Wachstums auf aktivkohlehaltigem Festmedium hin untersucht. Dabei zeigte sich, dass AB33upa1G und AB33upa1G^{RA} eine vergleichbare Koloniemorphologie aufwiesen, bei der die auswachsenden Filamente für ein filziges Aussehen an den Rändern verantwortlich sind (Abb. 13B). Demgegenüber zeigten AB33upa1G^{FRA} und AB33upa1G^{mF} einen Filamentbildungsdefekt (Abb. 13B), wie er bei Deletionen von rrm4 und upa1 zu beobachten war (vgl. Abb. 8B). Somit scheint die FYVE-Domäne von Upa1 wichtig für dessen Funktion zu sein. Um den Defekt des filamentösen Wachstums näher zu untersuchen, wurde der Anteil der unipolar und bipolar auswachsenden Zellen innerhalb der Kultur quantifiziert und zudem auf die Fähigkeit zur Septenbildung hin untersucht. Dabei wurde die Zellmorphologie zu drei verschiedenen Zeitpunkten erfasst (vier, sechs und neun Stunden nach Induktion der Filamente), um eine

41

genaue Entstehung eines Filamentbildungsdefekt zu dokumentieren. Vier Stunden nach der Induktion lag der Anteil an unipolaren Zellen in allen getesteten Kulturen bei ungefähr 80-90% (upa12: 77%, wt: 87%), während der Anteil der bipolaren Zellen bei ungefähr 10-20% lag (Abb. 13C). Dabei konnte eine Septenbildung in unipolar auswachsenden Zellen nur in AB33 (*wt*), AB33upa1G und AB33upa1G^{R Δ} beobachtet werden (Abb. 13C). Dies ist in Übereinstimmung mit dem Filamentbildungsdefekt der Kolonien von AB33upa1G^{FRA} und AB33upa1G^{mF} (Abb. 13B). Sechs Stunden nach Induktion des filamentösen Wachstums konnten bereits deutliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Stämmen gemessen werden. So ging bei AB33, AB33upa1G und AB33upa1G^{RA} der Anteil an bipolaren Zellen auf 7-8% zurück (Abb. 13C). Zusätzlich zeigte sich bei 64%-69% der Zellen neben einem unipolaren Wachstum auch eine Septenbildung (Abb. 13C). Dies impliziert, dass viele der zunächst bipolar ausgewachsenen Zellen auf ein unipolares Wachstum gewechselt haben und dabei eines der beiden Filamente durch Septierung von dem Zytoplasma abgetrennt wurde. Im Gegensatz dazu wiesen AB33upa1∆ und AB33upa1G^{FR∆} einen verringerten Anteil von unipolar auswachsenden Zellen auf (je 69% und 70%, Abb. 13C), von denen so gut wie keine Zelle eine Septenbildung aufwies (Abb.13C). Interessanterweise zeigte AB33upa1G^{mF} mit 94% einen hohen Anteil an unipolar auswachsenden Zellen, welcher mit dem des Ausgangsstammes AB33 vergleichbar ist (Abb. 13C). Dies war unerwartet, da AB33upa1G^{mF} auf aktivkohlehaltigem Festmedium einen Filamentbildungsdefekt aufwies (Abb. 13B). Lediglich der Anteil an unipolaren Filamenten mit eingezogenen Septen war mit 53% im Vergleich zu den Stämmen AB33 (64%), AB33upa1G (66%) und AB33upa1G^{R∆} (69%) etwas niedriger. Neun Stunden nach Induktion der Hyphenbildung, haben sich die nach sechs Stunden gewonnenen Eindrücke bestätigt. Von AB33, AB33upa1G und AB33upa1G^{RA} wuchsen fast alle Zellen unipolar aus und ein Großteil von diesen bildete zudem Septen (Abb. 13C). Demgegenüber bildeten nur wenige der unipolar ausgewachsenen Filamente von AB33upa1∆ und AB33upa1G^{FR∆} leere Abschnitte und ein Drittel der Zellen wuchs bipolar aus (Abb. 13C). Der Stamm AB33upa1G^{mF} zeigte nach neun Stunden fast ausschließlich unipolares Wachstum mit Septenbildung und war somit mit AB33 zu vergleichen (Abb. 13C). Demnach stören die eingebrachten Mutationen in der FYVE-Domäne lediglich das filamentöse Wachstum auf Festmedium, während diese in Flüssigkulturen nur eine geringe zeitliche Verzögerung hervorgerufen haben. Um einen Effekt der C-terminalen Verkürzungen und der Mutation in der FYVE-Domäne auf die Stabilität von Upa1 auszuschließen, wurden Proteinextrakte aus den entsprechenden Filamenten einer Western-Analyse unterzogen. In dieser zeigten alle getesteten Varianten von Upa1 eine vergleichbare Expression (Abb. 13D). Dabei wurde erneut die Stabilität von Upa1G^{mP} überprüft, welches Mutationen in dem PAM2-Motiv trägt. In dieser Western-Analyse zeigte Upa1G^{mP}, wie schon zuvor, keinen deutlichen Unterschied in der Proteinmenge im Vergleich zu den anderen Varianten (Abb. 13D, 12B).

Abbildung 13: Die FYVE-Domäne ist notwendig für die Funktion von Upa1. (A) Schematische Darstellung von Upa1 und dessen C-terminal modifizierten Varianten in Fusion mit Gfp. (B) Filamentöses Wachstum auf aktivkohlehaltigem NM-Festmedium. (C) Anteil der unipolaren und bipolaren auswachsenden Zellen mit und ohne Septenbildung, jeweils vier (links), sechs (mittig) und neun Stunden (rechts) nach Induktion des filamentösen Wachstums. Fehlerbalken zeigen Standardfehler. (D) Western-Analyse des Gesamtzellextraktes von Filamenten der Stämme AB33upa1G (upa1G) und der entsprechenden Varianten. Zusätzlich wurden AB33 (upa1) und AB33upa1G^{mP} ($upa1G^{mP}$) getestet. Tub1 diente als Ladekontrolle der Proteinmenge. Die Varianten von Upa1G wurden mit einem α Gfp-AK detektiert, Tub1 mit α Tub1-Antikörper nachgewiesen. (E) Die relative endochitinolytische Aktivität von Filamenten der Stämme AB33 (wt), AB33upa1 Δ ($upa1\Delta$), AB33upa1G (upa1G), AB33upa1G^{mP} ($upa1G^{mP}$), AB33upa1G^{R Δ} ($upa1G^{R\Delta}$), AB33upa1G^{R Δ} ($upa1G^{R}$

(Fortsetzung von vorheriger Seite) AB33upa1G^{FR_Δ} (*upa1G^{FR_Δ*) und AB33upa1G^{mF} (*upa1^{mF}*) acht Stunden nach Induktion der Hyphenbildung. Die Aktivität wurde auf den Ausgangsstamm (*wt*) normalisiert. Dieses Diagramm ist ein größerer Ausschnitt des Säulendiagramms in Abbildung 9D. Fehlerbalken zeigen Standardfehler. (F-I) Filamente der Stämme AB33upa1G, AB33upa1G^{R_Δ}, AB33upa1G^{FR_Δ} bis AB33upa1G^{mF} acht Stunden nach Induktion der Hyphenbildung. Gfp-Einzelbild und Kymograph sind untereinander gezeigt. Größenmaßstab: 10 µm. (H) Pfeil: vereinzelte stationäre Akkumulationen von Upa1G^{FR_Δ}. (I) Pfeil: Upa1G^{mF} zeigt die Bewegung eines mobilen Signals.}

Der Verlust von Upa1 führt neben einem gestörten filamentösen Wachstum auch zu einer geringeren endochitinolytischen Aktivität der Hyphen (Abb. 9D). Um einen Effekt der C-terminalen Modifikationen von Upa1 und des mutierten PAM2-Motivs näher zu untersuchen, wurde die endochitinolytische Aktivität dieser Stämme nach Induktion des filamentösen Wachstums gemessen. Dabei wiesen AB33upa1G^{mP} und AB33upa1G^{RΔ} eine dem Ausgangsstamm vergleichbare endochitinolytische Aktivität auf (Abb. 13E). Dagegen zeigte AB33upa1G^{FRΔ} eine gegenüber dem Ausgangsstamm stark verminderte endochitinolytische Aktivität (Abb. 13E) und war den Deletionsstämmen von *rrm4* und *upa1*. Die Mutationen in der FYVE-Domäne von Upa1 reduzierten die endochitinolytische Aktivität um die Hälfte, jedoch lag diese noch höher als bei AB33upa1G^{FRΔ} (Abb. 13E). Infolgedessen wirkt sich die Mutation in Upa1G^{mF} auf die endochitinolytische Aktivität der Filamente negativer aus, als auf deren effektives Wachstum (Abb. 13E).

Da die FYVE-Domäne von Upa1 vermutlich die Assoziation mit Endosomen vermittelt, sollten fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen den Einfluss der C-terminalen Modifikationen auf die Mobilität von Upa1 sichtbar machen. Upa1G zeigte acht Stunden nach Induktion der Filamente eine bidirektionale Bewegung in den Zellen (Abb. 13F). Eine ähnliche Mobilität war bei Upa1G^{RA} zu beobachten (Abb. 13G). Folglich ist die Assoziation von Upa1 an die Endosomen unabhängig von der RING-Finger-Domäne. Demgegenüber war bei AB33upa1G^{FRA} keine bidirektionale Bewegung von Upa1G^{FRA} zu beobachten (Abb. 13H). Upa1G^{FRA} lokalisierte allerdings in vereinzelten unbeweglichen Akkumulationen (Abb. 13H, Pfeil). Da die Expression von Upa1G^{FRA} nicht vermindert war, scheint die Ursache für die fehlende Bewegung eine Störung der Assoziation mit den Endosomen zu sein. In Filamenten von AB33upa1G^{mF} konnte dagegen ein starker Rückgang an mobilen Signalen beobachtet werden (Abb. 13I), obwohl diese noch häufig eine bidirektionale Bewegung zeigten (Abb. 13I). Der Anteil der sich bewegenden Einheiten war dabei in der Nähe der Initialzelle größer als im Bereich des Wachstumspols (Abb. 13I).

Die hier gesammelten Daten zeigen, dass die C-terminale RING-Finger-Domäne für die Funktion von Upa1, zumindest unter den getesteten Bedingungen, entbehrlich war. AB33upa $1G^{R\Delta}$ zeigte keinen Filamentbildungsdefekt (Abb. 13B, C), keine reduzierte endochitinolytische Aktivität (Abb. 13E) und hat keinen Einfluss auf die bidirektionale Bewegung des Proteins (Abb. 13G). Demgegenüber resultiert die Deletion der FYVE-

Domäne und des Bereiches C-terminal von dieser (Upa1G^{FRΔ}) in einem Phänotyp, der hinsichtlich des filamentösen Wachstums (Abb. 13B, C) und der endochitinolytischen Aktivität (Abb. 13E) mit dem einer *upa1*-Deletion vergleichbar ist. Upa1G^{FRΔ} scheint nicht mehr mit Endosomen zu assoziieren (Abb. 13H) und somit ist die FYVE-Domäne notwendig für die Bindung von Upa1 an diese Organellen. Eine Mutation von funktionell konservierten Aminosäuren in der FYVE-Domäne resultierte nur in einem intermediären Phänotyp, der fast keine Beeinträchtigung des filamentösen Wachstums in Flüssigkultur zur Folge hatte (Abb. 13C), aber zu einer gestörten Hyphenbildung auf Festmedien (Abb. 13B) und zu einer verringerten endochitinolytischen Aktivität führte (Abb. 13E). Letztere war zwar höher als in AB33upa1Δ und AB33upa1G^{FRΔ}, zeigte aber dennoch eine über 50%ige Reduktion gegenüber dem Ausgangsstamm (Abb. 13E). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die FYVE-Domäne für die Funktion von Upa1 notwendig ist, die eingebrachten Aminosäuresubstitutionen deren Funktion jedoch nur beeinträchtigen und nicht völlig stören.

2.3.6 Eine Deletion der Ankyrin-Wiederholungen wirkt destabilisierend

Im Laufe dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sowohl das PAM2-Motiv als auch die RING-Domäne für die Funktion von Upa1 während der Filamentbildung und der Sekretion von Cts1 entbehrlich sind (Abb. 12, 13). Darüber hinaus ist die FYVE-Domäne für die Assoziation von Upa1 und damit auch für dessen Funktion von entscheidender Bedeutung (Abb. 13). Aus den Untersuchungen über N-terminale Verkürzungen von Upa1 konnten keine Erkenntnisse über die Ankyrin-Wiederholungen gewonnen werden, da die Proteinvarianten Upa1G^{N3Δ}, Upa1G^{N4Δ} und Upa1G^{N5Δ} eine gestörte Expression aufwiesen (Abb. 12B). Aus diesem Grund sollte die Funktion der fünf vorhergesagten Ankyrin-Wiederholungen (Abb. 14A) durch eine gezieltere Deletion untersucht werden (Upa1G^{AnkΔ}). Zudem wurde auch Upa1G^{mP/AnkΔ} getestet, welches neben der Deletion der fünf Ankyrin-Einheiten zudem Mutationen in dem PAM2-Motiv trägt (Abb. 14B). Beide Varianten zeigten in Filamenten eine im Vergleich zu Upa1G verringerte Proteinexpression (Abb. 14C). Trotzdem waren eindeutige Proteinbanden zu detektieren und so wurden die Stämme weiter untersucht. Sowohl auf Festmedium als auch in Flüssigkultur wiesen die Stämme AB33upa1G^{AnkA} und AB33upa1G^{mP/AnkA} einen Filamentbildungsdefekt auf, der dem Phänotyp einer upa1-Deletion entsprach (Abb. 14D, E). In einem weiteren Experiment zeigte sich dagegen, dass die endochitinolytische Aktivität nach Deletion der Ankyrin-Wiederholungen vermindert war, jedoch höher lag als die des Deletionsstamms AB33upa1A. Dies deutet darauf hin, dass die Proteine Upa1G^{AnkA} und Upa1G^{mP/AnkA} noch eine geringe Aktivität besaßen (Abb. 14F). In fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen der Filamente konnten keine sich gewegenden Signale von Upa $1G^{Ank\Delta}$ und Upa $1G^{mP/Ank\Delta}$ beobachtet werden (Abb. 14G).

10 µm

Abbildung 14: Die Region der Ankyrin-Wiederholungen ist wichtig für die Stabilität von Upa1. (A) Sequenzvergleich der fünf Ankyrin-Wiederholungen von Upa1. (B) Schematische Darstellung von Upa1 und Varianten in C-terminaler Fusion mit Gfp. (C) Western-Analyse von Filamenten der entsprechenden Stämme. Tub1 diente als Ladekontrolle. Varianten von Upa1G wurden mit α Gfp-AK. Tub1 mit aTub1-AK nachgewiesen. Größenangabe in kDa. (D) Anteil der unipolaren und bipolaren Filamente mit und ohne Septenbildung von den Stämmen AB33 (wt), AB33upa1A (upa1A), $(upa1G^{Ank_{\Delta}})$ und AB33upa1G^{mP/Ank_{\Delta}} AB33upa1G^{Ank∆} $(upa1G^{mP/Ank\Delta})$ AB33upa1G (upa1G), acht Stunden nach Induktion. Fehlerbalken: Standardfehler; Drei unabhängige Experimente. (F) Die relative endochitinolytische Aktivität von Filamenten der oben genannten Stämme. Die Aktivität wurde auf den Ausgangsstamm normalisiert (wt). Fehlerbalken: Standardfehler. Drei unabhängige Experimente, (G-I) Filamente der Stämme AB33upa1G, AB33upa1G^{Ank} und AB33upa1G^{mP/Ank}, Gfp-Einzelbild und Kymograph sind untereinander gezeigt. Größenmaßstab: 10 µm.

Die erzielten Ergebnisse müssen mit gewisser Vorsicht interpretiert werden, da eine Differenzierung zwischen der Auswirkung der fehlenden Ankyrin-Wiederholungen und der geringeren Proteinexpression nicht getroffen werden kann. Das Fehlen von beweglichen Fluoreszenzsignalen in den Ankyrin-Deletionsstämmen ist vermutlich auf die niedrigere Proteinmenge zurückzuführen. Allerdings belegen die Ergebnisse in Übereinstimmung mit den Daten der N-terminalen Verkürzungen, dass ein Entfernen der Ankyrin-Wiederholungen und den daran anschließenden C-terminalen Regionen zu einer deutlich geringeren Proteinexpression führt, was vermutlich auf eine erhöhte Instabilität dieser Varianten zurückzuführen ist.

2.3.7 Upa1 zeigt eine PAM2-unabhängige Interaktion mit Rrm4

Mithilfe des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems konnte eine PAM2-abhängige Interaktion von Pab1 und Upa1 nachgewiesen werden (Abb. 11), die jedoch für die Funktion von Upa1 in U. maydis nicht notwendig ist (Abb. 12). Als nächster Schritt sollte eine mögliche Interaktion von Rrm4 und Upa1 unter Verwendung des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems untersucht werden. In diesem Experiment lagen die zu testenden Varianten von Upa1 N-terminal fusioniert mit der BD vor und wurden auf eine mögliche Interaktion mit AD-Rrm4 getestet (Abb. 15A). Zudem sind einige der Upa1-Varianten C-terminal mit Gfp fusioniert (Abb. 15A). Bemerkenswerterweise interagierten fast alle Varianten von Upa1 mit Rrm4 (Abb. 15B). Ein weiterer interessanter Aspekt war, dass Rrm4 in Kombination mit dem wildtypischen Upa1 ein Wachstum auf dem Mangelmedium zeigte (Abb. 15B, Reihe 1), während Pab1 nur mit den modifizierten Upa1^{MA}-Varianten interagierte (Abb. 11B). Des Weiteren scheint das PAM2-Motiv von Upa1 für ein Zusammenspiel mit Rrm4 nicht nötig. So konnten verschiedene N-terminale Verkürzungen von Upa1, denen das PAM2-Motiv fehlte, in Kombination mit Rrm4 noch Wachstum auf dem Mangelmedium auslösen (Abb. 15B, Reihe 2-6). Einzig die Kombination von Rrm4 mit Upa1^{N6Δ} führte zu keiner Aktivierung der Reportergene (Abb. 15B, Reihe 7). Bei Upa $1^{N6\Delta}$ wurden die ersten 969 Aminosäuren entfernt, so dass nahezu nur noch die FYVE-Domäne mit dem RING-Finger vorlag (Abb. 15A). In Einklang mit diesem Ergebnis führte ein Verlust der FYVE-Domäne und des RING-Fingers zu keiner Beeinträchtigung der Interaktion mit Rrm4 (Abb. 15B, Reihe 8).

Α	RRM N	<i>ILLE</i>			Mole	kular	gew	icht [#]	Int	erakt	ion mit	<u>Upa1</u>
				Rrm4		104,1	i kDa	l	Int	orakt	+ ion mit	Rrm4
	PAM2 5xAnk	۲٩		Upa1		160.3	3 kDa	a		Grant	+	<u>IXIIII</u>
			Gip	Upa1GN1∆		173,	1 kDa	à			+	
				Upa1G ^{N2∆}		150,	5 kDa	a			+	
				Upa1G ^{N3∆}		129,8	8 kDa	a			+	
				Upa1GN4 Δ		120,8	8 kDa	a			+	
	200 AS			Upa1G $^{N5\Delta}$		111,2	2 kDa	1			+	
				Upa1G ^{N6∆}		84,3	kDa				-	
				Upa1G ^{FR∆}		161,3	3 kDa	à			+	
				Upa1G ^{M∆}		150,8	8 kDa	a			+	
				Upa1G ^{C2A}		91,9	кDа				+	
				Upa1GmP/C	JZΔ	91,8	кра				+	
В	Fusion BD		Fusion AD	OD			OD					
1)	Upa1	x	Rrm4	$\bullet \bullet \bullet$	•	£9) Ø			
2)	Upa1GN1 Δ	х	Rrm4		•	÷4	۲) 🎲	14		
3)	Upa1G ^{N2∆}	х	Rrm4			2)	۲	۰	3	50		
4)	Upa1G ^{N3∆}	х	Rrm4			***	۲		•	62 1		
5)	Upa1GN4 Δ	х	Rrm4			2.	•	0) @	\$\$**		
6)	Upa1G ^{N5∆}	х	Rrm4			24	۲) @	¥		
7)	Upa1G ^{N6∆}	х	Rrm4		8	.3	0					
8)	Upa1G ^{FR∆}	х	Rrm4		÷.	1	۲	04		.*		
9)	Upa1G ^{M∆}	х	Rrm4			* : ,	۲	• 4		1.		
10)	Upa1G ^{C2∆}	х	Rrm4	• • •		+97 -	۲			·		
11)	Upa1G ^{mP/C2∆}	x	Rrm4)	-) 🚳			
12)	Positivkontrolle					2				**		
13)	Upa1	х	Vektor	$\bullet \bullet \bullet$	•	4						
14)	Vektor	х	Rrm4		•	\$	0					
				Kont	rolle			Sele	tion			
С	123	4 5	678	9 10 11	12							
260)		-	1.5		- 14						
140) –	-	<u>a</u>	-	-	αc-IVI	yc Jpa1-	-Varia	nten)		
100) –		-							,		
70					-							
50) -			-								
	-											
140		-		-		α HA						
100			A REAL PROPERTY AND A REAL			(AD-R	(rm4))				

Abbildung 15: Upa1 interagiert mit Rrm4 im Hefe-Zwei-Hybrid-System. (A) Schematische Darstellung der getesteten Proteine. Diese werden ohne die N-terminale Fusion mit BD bzw. AD gezeigt. Bis auf das unmodifizierte Upa1 liegen alle Varianten als C-terminale Fusion mit Gfp vor. Größenmaßstab: 200 Aminosäuren (AS). (#) Das Molekulargewicht bezieht sich auf die Fusionsproteine mit BD und AD des Hefe Zwei-Hybrid-Systems. (B) Wachstumsanalysen im Hefe-Zwei-Hybrid System. Als Positivkontrolle dienten p53 und das große T-Antigen. (C) Western-Analyse der getesteten Hefetransformanten aus (B) für den Nachweis der Expression der Fusionsproteine. BD-Fusionsproteine wurden mit einem α c-Myc-Antikörper und AD-Fusionsproteine mit einem α HA-Antikörper nachgewiesen.

Würden nur diese Ergebnisse in betrachtet, könnte eine mögliche Interaktion von Rrm4 mit dem PAM2-Motiv, den Ankyrin-Wiederholungen, sowie dem Aminosäurebereich von 1 bis 719 (Upa^{N5Δ} trägt eine Deletion der Aminosäuren 1-719) ausgeschlossen werden. Rrm4 zeigte aber in Kombination mit Upa1^{C2A}, einer Variante bei der ein großer C-terminaler Bereich deletiert wurde (A410-1287), Wachstum auf dem Minimalmedium (Abb.135, Reihe 10). Dieser angebotene N-terminale Bereich schließt das PAM2-Motiv mit ein, jedoch ist dieses für das beobachtete Wachstum nicht notwendig, denn Mutationen in dem PAM2-Motiv (vgl. Abb. 24) zeigten keinen negativen Einfluss auf die Interaktion von Rrm4 und Upa1^{mP/C2A} (Abb. 15C, Reihe 11). Eine Western-Analyse bestätigte die Expression aller Hybridproteine in den getesteten Hefestämmen (Abb. 15C). In Kontrollexperimenten, bei denen jeweils nur der Vektor für eines der Hybridproteine mit dem leeren komplementären Vektor in die Hefen transformiert wurde, konnte kein Wachstum der Hefen auf Mangelmedium beobachtet werden. Exemplarisch dafür wird gezeigt, dass weder Upa1 (Abb. 15B, Reihe 13) noch Rrm4 (Abb. 15B, Reihe 14) allein ausreichend waren, um die Reportergene zu aktivieren. In Vorversuchen wurde jedoch beobachtet, dass Upa1^{C1A} (Abb. 11A) in N-terminaler Fusion mit der BD zu einer Autoaktivierung des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems führen kann (Daten nicht gezeigt), weshalb diese Variante nicht weiter auf eine Interaktion mit Rrm4 getestet wurde. Erwähnenswert ist zudem, dass Upa1 und Rrm4 nur in der getesteten Hybridorientierung die Reportergene aktivieren konnten. Lag Upa1 als Fusion mit der AD und Rrm4 als Fusion mit der BD vor, konnte kein Wachstum der Hefen auf Minimalmedium beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Die gewonnenen Ergebnisse weisen auf eine Interaktion von Rrm4 mit zwei verschiedenen Regionen von Upa1 hin, von denen eine im N- und eine im C-terminalen Bereich des Proteins liegen muss. Diese Daten sollten jedoch in weiterführenden Studien verifiziert und genauer untersucht werden.

2.3.8 Transport und Funktion von Endosomen sind unabhängig von Upa1

Upa1 besitzt eine funktionelle FYVE-Domäne (vgl. Abb. 13) und wird mit Endosomen kotransportiert (vgl. Abb. 10). Upa1 könnte demnach sowohl den Transport als auch die Funktion der frühen Endosomen beeinflussen. Ein gestörter Transport von Endosomen resultiert in einem Zellteilungsdefekt, bei dem das primäre Septum gebildet wird, das sekundäre Septum jedoch nicht. Als Folge daraus wachsen die Zellen in verästelten "Bäumchen" aus (Weinzierl *et al.*, 2002; Wedlich-Söldner *et al.*, 2002; Schink und Bölker, 2009). Der Stamm AB33kin3 Δ ist in dem Endosomen-Transport stark beeinträchtigt und zeigte dementsprechend ein verästeltes Wachstum der Sporidien (Abb. 16A). Eine Färbung mit dem Farbstoff Calcofluor (CF) zeigte an, dass sich die Zellen nicht trennen konnten, obwohl sich die primären Septen gebildet haben (Abb. 16A oben). Ein vergleichbarer Wachstumsdefekt konnte in den Stämmen AB33 (*wt*), AB33rrm4 Δ (*rrm4\Delta*) und AB33upa1 Δ (*upa1\Delta*) jedoch nicht beobachtet werden (Abb. 16A, unten).

Mithilfe einer N-terminalen Fusion von Rab5a mit Gfp (Rab5aGn) sollte daraufhin untersucht werden, ob der Verlust von Upa1 einen Effekt auf die Bewegung von frühen Endosomen besitzt. Nach Induktion des filamentösen Wachstums zeigten Zellen von AB33rab5aGn/upa1∆ den bereits beschriebenen Filamentbildungsdefekt einer upa1-Deletion (Abb. 16C). In fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen konnte jedoch keine Störung der Rab5aGn in AB33rab5aGn/upa1∆ beobachtet bidirektionalen Bewegung von werden (Abb. 16C). Die frühen Endosomen zeigten die gleiche bidirektionale Bewegung wie im Stamm AB33rab5aGn (Abb. 16B). Der Verlust von Upa1 führte daher nicht zu einer Beeinträchtigung der Bewegung von Endosomen und scheint auch für deren Funktion nicht wichtig zu sein. Dessen ungeachtet resultierte die Deletion von upa1 in einem bipolaren Wachstum und einer verminderten Sekretion von Cts1 (Abb. 9). Eine mögliche Erklärung dafür wäre, dass Upa1 einen Einfluss auf den Langstreckentransport von mRNA hat.

Abbildung 16: Upa1 hat keinen Einfluss auf die Bewegung von Endosomen. (A) Sporidien der Stämme AB33 (*wt*), AB33rrm4 Δ (*rrm4\Delta*), AB33upa1 Δ (*upa1\Delta*) und AB33kin3 Δ (*kin3\Delta*). Die Zellen wurden mit dem Farbstoff Calcofluor (CF) angefärbt. Abgebildet sind DIC- und Fluoreszenzaufnahmen im DAPI-Kanal (CF). Größenmaßstab: 10 µm. Die Vergrößerung zeigt die primären Septen von zusammenhängenden Zellen. (B) Filament des Stammes AB33rab5aGn. Gfp-Einzelbild und Kymograph sind untereinander gezeigt. Größenmaßstab: 10 µm. Das Gen *rab5Gn* kodiert für eine Nterminale Fusion von Rab5a mit eGfp und ist ektopisch in den definierten *ip*^S-Lokus integriert und steht unter Kontrolle des konstitutiv aktiven Promotors P_{otef}. (C) Filament des Stammes AB33rab5aGn/upa1 Δ . Gfp-Einzelbild und Kymograph werden untereinander gezeigt. Größenmaßstab: 10 µm.

2.3.9 Upa1 ist wichtig für den Langstreckentransport von mRNA

Der Kotransport von Endosomen und Upa1 ist unabhängig von Rrm4 (Abb. 10E). Dies stimmt mit der Hypothese überein, dass Upa1 als Adapter zwischen diesem Schlüsselprotein des mRNA-Langstreckentransports und den Endosomen fungieren könnte. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden die Stämme AB33rrm4G/upa1∆ und AB33pab1G/upa1∆ hergestellt. Mit ihnen lassen sich die Auswirkungen einer Deletion von upa1 auf die Rrm4abhängigen mRNP-Komplexe mikroskopisch untersuchen. Der Verlust von Upa1 resultierte in einer gestörten Mobilität von Rrm4G. Rrm4G zeigte dabei vereinzelt prozessive Bewegungen (Abb. 17C, Pfeilkopf), doch war die Signalintensität verglichen mit den Ausgangsstamm AB33rrm4G schwächer (Abb. 17A). Neben einigen mobilen mRNPs waren auch mehrere nicht-prozessive Rrm4G-Signale zu erkennen, welche sich auf einer kurzen Distanz vor und zurück bewegten (Abb. 17C, Pfeile). Eine Erklärung für diese Störung der Bewegung wäre, dass diese statischen Rrm4G-Moleküle nicht mit der Transport-Maschinerie verbunden waren. Dennoch unterschied sich die Mobilität von Rrm4G in dem upa1-Deletionshintergrund von der Lokalisation von Rrm4GT^{mM} in immobilen Akkumulationen (vgl. Abb. 6D). Nach einer Depolymerisation des Mikrotubuli-Zytoskeletts durch Benomyl konnten in AB33rrm4G/upa1a stationäre Akkumulationen beobachtet werden (Abb. 17D), die mit

Abbildung 17: Upa1 ist wichtig für den Transport von mRNP an Endosomen. (A-H) Filamente von AB33rrm4G, AB33rrm4G/upa1 Δ , AB33pab1G und AB33pab1G/upa1 Δ . Falls angegeben wurden die Stämme für eine Stunde mit Benomyl (50 µM Endkonzentration) behandelt. Gfp-Einzelbild und Kymograph sind untereinander dargestellt. Größenmaßstab: 10 µm. (I) Western-Analyse der Proteinmenge von Rrm4G in den Stämmen AB33rrm4G (*wt*) und AB33rrm4G/upa1 Δ (*upa1* Δ) (links) und der Proteinmenge von Pab1G in den Stämmen AB33pab1G (*wt*) und AB33pab1G/upa1 Δ (*upa1* Δ) (rechts). Tub1 dient als Ladekontrolle der Proteinmenge. Gleiche Proteinmengen wurden geladen. Die Varianten von Pab1G und Rrm4G wurden mit einem α Gfp-Antikörper detektiert, Tub1 mit einem α Tub1-Antikörper nachgewiesen. Größenangabe in kDa.

jenen in dem Ausgangsstamm AB33rrm4G nach Benomylbehandlung vergleichbar waren (Abb. 17B). Dies weist darauf hin, dass Rrm4G auch nach Verlust von Upa1 mit Mikrotubuliabhängigen Komponenten assoziiert. Somit resultiert die Deletion von *upa1* in einem intermediären Effekt auf die Bewegung von Rrm4, bei dem sich einige Proteine noch prozessiv bewegen konnten, während andere eine Störung in der Mobilität zeigten (Abb. 17C). Der Verlust von Upa1 beeinträchtige demnach die Assoziation von Rrm4 mit dem Transportapparat und somit zu den Endosomen, aber störte diese nicht vollständig. Die gewonnenen Ergebnisse können die Hypothese einer möglichen Adapterfunktion von Upa1 weder bestätigen noch widerlegen.

Im Gegensatz dazu resultierte die Deletion von *upa1* in einer drastischen Reduktion von mobilem Pab1G in den Filamenten (Abb. 17G). So wurde sowohl die Gesamtzahl als auch die Prozessivität der mRNPs stark verringert (Quantifizierung nicht gezeigt). Eine Behandlung von AB33pab1G/upa1∆ mit Benomyl führte zu keiner Bildung von stationären Pab1G-Akkumulationen (Abb. 14H), wie diese im Ausgangsstamm zu erkennen war (Abb. 17F). Die zu beobachtenden Auswirkungen auf den mRNP-Transport hatten vermutlich mechanistische Ursachen, da eine Western-Analyse der Proteinkonzentration von Rrm4G und Pab1G keinen Einfluss von der Deletion von *upa1* auf die Expression dieser Proteine zeigte (Abb. 17I). Zusammenfassend resultierte der Verlust von Upa1 nur in einer partiellen Störung der Prozessivität von Rrm4 (Abb. 17C). Die Rekrutierung von mRNA-Molekülen und damit Pab1 zu diesem Schlüsselprotein wurde aber massiv beeinträchtigt (Abb. 17G, H).

Da Upa1 ein funktionelles PAM2-Motiv besitzt und dies mit Pab1 interagierte, könnte es sein, dass der Verlust von Pab1 von den Endosomen auf dieses Protein beschränkt gewesen wäre und weitere Komponenten der mRNP noch transportiert werden könnten. Um dieses näher zu beleuchten, wurde der Einfluss von Upa1 auf ein weiteres RNA-bindendes Protein untersucht. Dafür bot sich das Glyzin-reiche RNA-bindende Protein Grr1 an. Durch alternatives Spleißen der mRNA existieren in U. maydis zwei Isoformen, genannt Grr1A und Grr1B (Abb. 18A). C-terminal mit Gfp fusionierte Varianten von beiden Isoformen (Grr1AG und Grr1BG) lokalisierten in mobilen zytoplasmatischen Einheiten und bewegten sich bidirektional in den Filamenten (Abb. 18B). Dieses Muster ähnelte stark der subzellulären Lokalisation von Pab1. Grr1A und Rrm4 kolokalisierten in sich bewegenden Einheiten, womit Grr1A ebenfalls eine mögliche Komponente der Rrm4-abhängigen mRNPs darstellen könnte (Abb. 18C). Aufgrund einer vergleichbaren subzellulären Lokalisation von Pab1 und Grr1, wurde vermutet, dass letzteres an viele oder sogar alle mRNAs im Zytoplasma bindet, unabhängig davon, ob diese aktiv transportiert werden oder nicht. Basierend darauf hat Grr1 vermutlich keine spezifische Funktion beim Transport von mRNA, sondern wird nur passiv in den mRNPs in der Zelle befördert. In Übereinstimmung damit führte ein Verlust von Rrm4 zu einem Verlust von mobilen Signalen sowohl von Grr1A als auch von Grr1B (Abb. 18D).

Ergebnisse

Abbildung 18: Upa1 ist wichtig für den Transport des RNA-bindenden Proteins Grr1. (A) Schematische Darstellung des genomischen Lokus von *grr1*. Graue Boxen: untranslatierte Regionen (UTR) der mRNA von *grr1*; blaue Box: Exon 1 von *grr1*; orangene und gelbe Boxen: die beiden zweiten Exons von *grr1*. Größenmaßstab: 300 Basenpaare (bp) (B) Filamente der Stämme AB33grr1AG und AB33grr1BG. Gfp-Einzelbild und Kymograph sind untereinander gezeigt. Größenmaßstab: 10 µm. (C) Filament des Stammes AB33rrm4R/grr1AG. Rfp- und Gfp-Bilder sind nebeneinander gezeigt, Einzelbild und Kymographen sind untereinander gezeigt. Größenmaßstab: 5 µm. (D-E) Filamente der Stämme AB33grr1AG/rrm4∆, AB33grr1BG/rrm4∆, AB33grr1AG/upa1∆ und AB33grr1BG/upa1∆. Gfp-Einzelbild und Kymograph sind untereinander gezeigt. Größenmaßstab: 10 µm. Dieses Ergebnis unterstreicht die Rolle von Rrm4 als Schlüsselprotein des Langstreckentransports von mRNA in *U. maydis*. Interessanterweise resultierte die Deletion von *upa1* ebenfalls in einem Verlust der sich bewegenden mRNPs von Grr1A und Grr1B (Abb. 18F). Dadurch hatte die Deletion von *upa1* nicht nur Auswirkungen auf die MLLE-Domänen besitzenden Proteine Pab1 und Rrm4, sondern auch auf den Transport von weiteren Komponenten der mRNPs. Upa1 ist demnach neben Rrm4 ein weiterer wichtiger Faktor des Langstreckentransports von mRNA in *U. maydis*.

2.4 Die Charakterisierung des Multi-PAM2-Proteins Upa2

2.4.1 Upa2 beeinflusst das filamentöse Wachstum und die Sekretion von Cts1

Zu Beginn dieser Arbeit wurde mit Upa2 ein weiteres PAM2-tragendes Protein identifiziert, dessen Verlust zu einem Filamentbildungsdefekt führt (vgl. Abb. 7A). Zudem bewegte sich Upa2G wie Rrm4 in eindeutig abgegrenzten Einheiten bidirektional in den Filamenten (vgl. Abb. 7B). Diese Beobachtungen ließen vermuten, dass auch Upa2 an dem Langstreckentransport von mRNA beteiligt ist und wurde aus diesem Grund weitergehend untersucht.

Die Deletion von upa2 führte, wie auch der Verlust von Rrm4, zu keiner Störung des Wachstums von sporidialen Zellen (Abb. 19A). Nach Induktion der Hyphenbildung führte die Deletion von upa2, ähnlich wie die Deletion von rrm4, zu einem bipolaren Auswachsen der Filamente (Abb. 19A). Eine C-terminale Fusion von Upa2 mit Gfp (Upa2G) wies dagegen ein normales Wachstum der Filamente auf (Abb. 19A). Um diese Beobachtung näher zu studieren, wurden die Stämme in Flüssigmedium auf bipolares Wachstum sowie auf Defekte in der Septenbildung hin untersucht. Es zeigte sich, dass AB33rrm4^Δ acht Stunden nach Induktion nur 59% unipolar auswachsende Zellen aufwies, von denen fast keine Septen gebildet hatten (Abb. 19B). Überraschenderweise zeigte sich bei AB33upa2∆, dass 67% der Zellen bipolar auswuchsen und 33% neben dieser Bipolarität auch Septenbildung aufwiesen (Abb. 19B). Damit führte der Verlust von upa2 zu einer höheren Rate an bipolar auswachsenden Zellen, als bei einer Deletion von rrm4 (Abb. 19B, vgl. Abb. 9B), welche aber geringer war als die Rate von kin3 Δ (vgl. Abb. 41). Demgegenüber wuchsen fast alle Zellen von AB33upa2G unipolar aus und ein Großteil von diesen bildete Septen, was darauf schließen ließ, dass Upa2G funktionell ist (Abb. 19C). Neben einer Auswirkung der upa2-Deletion auf das filamentöse Wachstum wurde zudem die endochitinolytische Aktivität der Stämme getestet. In den Sporidien aller Stämme zeigte sich, dass die endochitinolytische Aktivität vergleichbar war (Abb. 19C). Demgegenüber lag diese während des filamentösen Wachstums in AB33upa2 Δ im Vergleich zu dem Ausgangsstamm bei nur 50% (Abb. 19D).

Abbildung 19: Upa2 beeinflusst das filamentöse Wachstum und die Sekretion von Cts1. (A) DIC-Aufnahmen von sporidialen Zellen und Filamenten der Stämme AB33 (*wt*), AB33rrm4 Δ (*rrm4\Delta*), AB33upa2 Δ (*upa2\Delta*) und AB33upa2G (*upa2G*). Größenmaßstab: 10 µm. (B) Anteil der unipolar und bipolar auswachsenden Zellen mit und ohne Septenbildung in Kulturen der oben genannten Stämme acht Stunden nach Induktion des filamentösen Wachstums. Fehlerbalken: Standardfehler. Die Daten stammen aus vier unabhängigen Experimenten. (C) Die relative endochitinolytische Aktivität von Sporidien der oben genannten Stämme. Die Aktivität wurde auf den Ausgangsstamm (*wt*) normalisiert. Teile dieser Messungen finden auch in Abb. 9C Verwendung, da die gezeigten Ergebnisse aus einer gemeinsamen Versuchsreihe stammen. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler. Die Daten stammen aus drei unabhängigen Experimenten. (D) Die relative endochitinolytische Aktivität von Filamenten der oben genannten Stämme acht Stunden nach Induktion. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler. Die Daten stammen aus vier unabhängigen Experimenten.

Mit einer relativen endochitinolytischen Aktivität von 0,50 liegt AB33upa2 Δ jedoch höher, als dies bei einem Verlust von *rrm4* (0,22) zu beobachten ist (Abb. 19). Dies ist insofern interessant, als dass eine Diskrepanz zwischen dem beobachteten Auswirkung von *upa2* Δ auf das filamentöse Wachstum und der endochitinolytischen Aktivität der Hyphen herrschte. Die Filamentbildung war stärker gestört als in *rrm4* Δ , wohingegen die Sekretion von Cts1 oder weiterer Endochitinasen weniger gestört war. Eine vergleichbare Beobachtung konnte auch für *upa1* gemacht werden, jedoch beeinflusste eine Deletion dieses Gens demgegenüber die Sekretion von Cts1 stärker, als die Filamentbildung (vgl. Abb. 9B, D).

2.4.2 Upa2 wird mit Rrm4 kotransportiert

In Filamenten lokalisierte Upa2G in eindeutigen Einheiten, die sich sowohl in anterograder als auch in retrograder Richtung durch die Zelle bewegten (vgl. Abb. 20A). Diese Bewegung war vergleichbar mit der Mobilität von Endosomen und den damit assoziierten mRNPs. Die Bewegung von Upa2G konnte durch die Behandlung mit Benomyl vollständig gestoppt werden, was auf einen mikrotubuliabhängigen Transportprozess hinweist (Abb. 20B). Desweiteren führte auch die Deletion von kin3 zu einer Störung der Bewegung von Upa2G (Abb. 20C). Ähnlich wie Rrm4 (Abb. 6C) und Upa1 (Abb. 10C) akkumulierte Upa2G dabei in dem mittleren Bereich der Initialzelle und zeigte eine nur geringe Restbewegung. Aus diesen Ergebnissen konnte geschlossen werden, dass Kin3 ebenfalls an dem Transport von Upa2G beteiligt ist und Upa2 wahrscheinlich zusammen mit Rrm4 und Endosomen kotransportiert wird. Um dies zu überprüfen wurde die subzelluläre Lokalisation von Upa2G und Rrm4R in dem Stamm AB33upa2G/rrm4R überprüft. Dabei zeigte sich, dass beide Proteine in sich bewegenden Einheiten sowohl in anterograder als auch in retrograder Richtung kolokalisierten (Abb. 20D, Pfeile). Upa2 wird demnach mit Rrm4 kotransportiert, woraus sich die Fragestellung ergab, ob Upa2 direkt an die Endosomen bindet oder ein Teil der mRNP-Komplexe ist. Um dies zu überprüfen wurde die subzelluläre Lokalisation von Upa2G in *rrm4*⊿-Deletionshintergrund (AB33upa2G/rrm4 Δ). einem Stamm mit untersucht Interessanterweise führte die Deletion von rrm4 zu einem Verlust von beweglichen Upa2G-Signalen in der Zelle (Abb. 20E). Somit ist davon auszugehen, dass Upa2 eine Komponente der Rrm4-abhängigen mRNPs ist und nicht direkt an die Endosomen bindet. Ein möglicher Mechanismus wäre, dass Upa2 über dessen PAM2-Motive an transportierte Rrm4-Moleküle bindet und mit diesen durch die Zelle befördert werden könnte. Diese Interaktion könnte durch die MLLE-Domäne von Rrm4 vermittelt werden und sollte dann durch entsprechende Mutationen gestört werden. Aus diesem Grund wurde die subzelluläre Lokalisation von Upa2G in einem Rrm4R^{mM}-Hintergrund untersucht.

Abbildung 20: Upa2 ist eine Komponente der Rrm4-abhängigen mRNPs. (A-C, E) Filamente von U. mavdis acht Stunden nach Induktion des filamentösen Wachstums. Gfp- Einzelbild und Kymograph sind untereinander gezeigt. Der Größenmaßstab entspricht 10 µm. (A) Filament des Stammes AB33upa2G. Der Kymograph zeigt die bidirektionale Bewegung von Upa2G. (B) Filament des Stammes AB33upa2G nach Behandlung mit Benomyl (1 h, 50 µM Endkonzentration). Der Kymograph zeigt stationäre Upa2G-Akkumulationen als senkrechte Linien an. (C) Filament des Stammes AB33upa2G/kin3a. Der Kymograph zeigt die gestörte bidirektionale Bewegung von Upa2G im kin3a-Hintergrund. (D) Filament des Stammes AB33upa2G/rrm4R. Rfp- und Gfp-Bilder sind nebeneinander gezeigt, Einzelbild und Kymographen sind untereinander gezeigt. Größenmaßstab: 5 µm. Die Pfeile markieren zwei gut sichtbare Kreuzungspunkte von mobilen mRNPs. (E) Filament des Stammes AB33upa2G/rrm4_Δ. Die Deletion von *rrm4* resultiert in einem Verlust von sich bewegenden Einheiten von Upa2G. (F) Filament des Stammes AB33upa2G/rrm4R^{mM}. Rfp- und Gfp-Bilder sind nebeneinander gezeigt, Einzelbild und Kymographen sind untereinander gezeigt. Der Größenmaßstab entspricht 10 µm. Der Pfeil markiert die Kolokalisation von Upa2G und Rrm4R^{mM} in einer immobilen Akkumulation. (G) Filament des Stammes AB33upa2G/rrm4R^{mR1}. Rfp- und Gfp-Bilder sind nebeneinander gezeigt, Einzelbild und Kymographen werden untereinander gezeigt. Der Größenmaßstab entspricht 5 µm. Rrm4^{mR1} zeigt eine eindeutige Lokalisation in sich bidirektional bewegenden Einheiten, Upa2G dagegen eine eher einheitlich zytoplasmatische Verteilung.

Wie bereits beschrieben führen Mutationen in der MLLE-Domäne von Rrm4 zu einem Verlust der bidirektionalen Bewegung und zu immobilen Akkumulationen des Proteins (Abb. 6D). Diese konnten in dem Stamm AB33upa2G/rrm4R^{™M} ebenfalls beobachtet werden (Abb. 20F, Pfeil rechts). Die Mutationen resultierten ebenfalls in einem Verlust der Bewegung von Upa2G, doch zeigte dies bemerkenswerterweise noch eine Kolokalisation mit Rrm4R^{mM} (Abb. 20F, Pfeile). Diese Beobachtung war unerwartet, da vermutet wurde, dass die Kolokalisation von Rrm4 und Upa2 durch eine Interaktion beider Proteine über die MLLE-Domäne mit den PAM2-Motiven vermittelt werden würde. Obwohl dieses Ergebnis eine direkte Rolle der MLLE-Domäne von Rrm4 in diesem Zusammenspiel widerlegte, war Rrm4 für die Mobilität von Upa2 notwendig (Abb. 20E). Es wurde jedoch vermutet, dass die bidirektionale Bewegung von Upa2 von der RNA-Bindungsfähigkeit von Rrm4 abhängt. Um dies näher zu untersuchen, wurde die Bewegung von Upa2G in Abhängigkeit von Rrm4R^{mR1} getestet. Rrm4R^{mR1} (mutiertes RRM1) trägt Substitutionen von funktionell wichtigen Aminosäuren in der ersten RRM-Domäne, so dass diese Variante eine stark eingeschränkte RNA-Bindung aufweist (Becht et al 2006). Die Proteinvariante Rrm4R^{mR1} zeigte wie Rrm4GT^{RRM∆} (Abb. 6E) eine bidirektionale Bewegung in den Zellen (Abb. 20G, rechts). Die Mobilität von Rrm4 ist unabhängig von dessen Fähigkeit RNA zu binden. Dennoch war in diesem Stamm die Bewegung von Upa2G völlig abwesend (Abb. 20G, links). Insofern wurde postuliert, dass die Mobilität von Upa2 von der RNA-Bindung durch Rrm4 abhängig ist.

2.4.3 Upa2 interagiert mit der MLLE-Domäne von Pab1

Die vorangegangenen Ergebnisse könnten so interpretiert werden, dass ein Verlust der RNA-Bindung von Rrm4 zu einem Verlust von mobilem Upa2 führte. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung wäre, dass die Mutation in der ersten RRM-Domäne von Rrm4 zu einem Verlust der transportierten mRNA und somit auch von Pab1 führt. Upa2 besitzt vier potentielle PAM2-Motive und könnte über eine Bindung mit der MLLE-Domäne von Pab1 an die Rrm4-abhängigen mRNPs rekrutiert werden. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde Upa2 in dem Hefe-Zwei-Hybrid-System auf eine Interaktion mit Pab1 und Rrm4 hin untersucht. Da es sich bei Upa2 um ein sehr großes Protein handelt (231,9 kDa), wurde zusätzlich zu dem gesamten Protein auch eine C-terminal verkürzte Variante angeboten (Upa2¹⁻¹¹⁵⁶, Deletion der Aminosäuren 1157-2121), welche alle PAM2-Motive besaß (Abb. 21A). Keines der getesteten Proteine zeigte eine Autoaktivierung der Reportergene (Abb. 21B). In dem Test ist zu erkennen, dass Pab1 und MLLE^{Pab1}, nicht iedoch Pab1^{mM} in Kombination mit Upa2¹⁻¹¹⁵⁶ zu einem Wachstum auf Minimalmedium führten (Abb. 21B). Diese Interaktion war unabhängig von der Orientierung der Proteine im Hefe-Zwei-Hybrid-System, da neben der Kombination BD-Pab1/AD-Upa2¹⁻¹¹⁵⁶ auch BD-Upa2¹⁻¹¹⁵⁶/AD-Pab1 zu einer Aktivierung der Reportergene führte (Abb. 21B).

D

В										C			୍ୟୁ
Fusion BD	<u>Fu</u>	ision AD	OD				OD					N Lab	N. N.
1) Pab1	х	Vektor	۲	۲	• •	e74				<i>2</i> ⁰	10. 6 30 r	AL . IS	<u>ۍ</u> ر
2) Pab1 ^{mM}	х	Vektor	۲	۲	• *	*	0			de	17.38	-	-250 -130
3) MLLE ^{Pab1}	х	Vektor	۲	۲	•	-						_	-100 -70
4) Vektor	х	Upa2 ¹⁻¹¹⁵⁶	۲	۲	•	÷	Ó			-			-55
5) Pab1	х	Upa2 ¹⁻¹¹⁵⁶	۲	۲	چ 📀	31	•	چ 💿	\$ ¹	-		_	-35 -27
6) Pab1 ^{mM}	х	Upa2 ¹⁻¹¹⁵⁶	. 💿	۲	() E	•	0					_	-15
7) MLLE ^{Pab1}	х	Upa2 ¹⁻¹¹⁵⁶	۲	۲	ود 🍪		۲	۵ 🚯	÷.				
⁸⁾ Upa2 ¹⁻¹¹⁵⁶	х	Pab1		۲	•	**	۲	0 2	2 C				
9) Rrm4	х	Upa2 ¹⁻¹¹⁵⁶	۲	۲	• 6	÷ 4.	0						
10) Upa2 ¹⁻¹¹⁵⁶	х	Rrm4	0	۲	۵ و	**	0	0					
11) Pab1	х	Upa2	۲	۲	0 4	۰.	0	@					
12) Upa2	х	Pab1		۲	•	: 1	. 0		83 - A-				
13) Rrm4	х	Rrm4	•	۲	<u>م</u>	•	0						
14) Upa2 ¹⁻¹¹⁵⁶	х	Vektor	Ó	۲	•	• •*	. ©						
15) Vektor	х	Pab1		۲	•	1			-				
16) Upa2	х	Rrm4		۲	÷ -	:	\odot						
17) Upa2	х	Vektor	0	۲	4	.:	Ó						
18) Vektor	х	Upa2	۲	۲	* ÷	3	0						
19) Negativkontrol	lle		• 💿	۲	• 4	2							
20) Postivikontrolle	е		۲	۲	۵ ۽		۲	•	🔅 🛠				
				Kon	trolle			Selektio	on				

Abbildung 21: Upa2 interagiert mit Pab1, nicht jedoch mit Rrm4. (A) Schematische Darstellung der im Hefe-Zwei-Hybrid-System getesteten Proteine. Diese werden ohne die N-terminale Fusion mit BD oder AD gezeigt. Größenangabe: 200 Aminosäuren (AS). DUF: Domäne von unbekannter Funktion. (#) Das Molekulargewicht bezieht sich auf die Fusionsproteine mit BD und AD. (B) Wachstumsanalysen im Hefe-Zwei-Hybrid System nach Transformation der angegebenen Proteinvarianten. Die Kulturen wurden in vier 1:5-Verdünnungsschritten ausgehend von einer OD₆₀₀ von 0,5 auf Kontroll- und Selektionsmedien getropft. (C) Western-Analyse der BD-Fusionsproteine von ausgewählten Hefetransformanten aus (B). Es wurden die Transformanten aus Nr. 4 (Pab1), Nr. 5 (Pab1^{mM}), Nr. 6 (MLLE^{Pab1}) und Nr. 7 (Upa2¹⁻¹¹⁵⁶) überprüft. Upa2 konnte jedoch nie in voller Länge detektiert werden (Daten nicht gezeigt, vgl. Abb. 22). Die BD-Fusionsproteine wurden mit einem α c-Myc-Antikörper detektiert. Größenangabe in kDa.

Demgegenüber zeigte Rrm4 in keiner Orientierung eine Interaktion mit Upa2¹⁻¹¹⁵⁶ (Abb. 21B), was darauf hinweist, dass Rrm4 mit keinem der PAM2-Motive von Upa2 interagieren kann. Ein Test auf die Interaktion zwischen Pab1 und dem vollständigen Protein von Upa2 führte zu einem schwachen Wachstum auf den Minimalmedien (Abb. 21B). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Verwendung des gesamten Proteins die Interaktion beider Hybride im Hefesystem sterisch behindern könnte. Insgesamt unterstützten die gewonnenen Ergebnisse dennoch die Hypothese, dass Upa2 über eine Interaktion mit Pab1 an die Komplexe des mRNA-Langstreckentransports rekrutiert wird.

2.4.4 Die PAM2-Motive von Upa2 sind bedeutungslos für die Assoziation mit den mRNPs

Um das Modell einer PAM2-vermittelten Bindung von Upa2 zu Pab1 in vivo zu überprüfen, wurden sowohl eine N-terminal verkürzte (Upa2G^{N∆}) als auch eine C-terminal verkürzte Variante von Upa2G (Upa2G^{CA}) auf ihre subzelluläre Lokalisation in *U. maydis* hin untersucht (Abb. 22A). Upa2G^{CA} beinhaltete die vier potentiellen PAM2-Motive, während Upa2G^{NA} diese nicht mehr hatte. Upa2G^{NA} trägt am C-Terminus eine Domäne von unbekannter Funktion, die Homologien zu prokaryotischen Smc (structural maintenance of chromosomes)-Proteinen besitzt (Abb. 20A). Als Kontrolle diente Upa2G, welches wie bereits beschrieben eine bidirektionale Bewegung in den Filamenten aufwies (Abb. 20A, 22B). Interessanterweise bewegte sich Upa2G[№] auf vergleichbare Weise in den Filamenten, obwohl diese Variante keine PAM2-Motive besaß (Abb. 22C). Demgegenüber zeigte Upa2G^{CA} keine bidirektionale Bewegung in den Filamenten, sondern schien gleichmäßig im Zytoplasma verteilt zu sein (Abb. 22D). Diese Ergebnisse sind überraschend, da sie der zuvor postulierten Hypothese entgegenstehen. Demnach war die PAM2-vermittelte Interaktion mit Pab1 für die Assoziation von Upa2 mit den mRNPs nicht notwendig. Interessanterweise schien vielmehr der C-Terminus an diesem Prozess beteiligt zu sein. Die Expression der Varianten von Upa2 in den erstellten Stämmen wurde in einer Western-Analyse überprüft. Interessanterweise konnte dabei nur Upa $2G^{N\Delta}$, nicht aber Upa2G und Upa $2G^{C\Delta}$ nachgewiesen werden (Abb. 22E). Zumindest die Expression von Upa2G konnte durch die eindeutig beweglichen Signale in den Filamenten mikroskopisch bestätigt werden (Abb. 22B), womit die fehlende Detektion in der Western-Analyse nicht auf eine Abwesenheit des Proteins zurückzuführen war. Bei Upa2G^{CA} waren keine mobilen Partikel zu beobachten (Abb. 20D). Im Vergleich zu dem Stamm AB33upa1G^{N5} (Abb. 12G), der keine detektierbare Expression des Fusionsproteins Upa1G^{N5Δ} aufweist, wurde aber deutlich, dass es sich bei dem zytoplasmatischen Signal nicht um Hintergrundfluoreszenz handelte (Abb. 22D) und Upa2G^{CA} somit vermutlich exprimiert wurde. Diese Resultate sollten jedoch in weiteren Studien näher verifiziert werden.


Abbildung 22: Der C-Terminus von Upa2 ist ausreichend für eine Rekrutierung zur mRNA-Transportmaschinerie. (A) Schematische Darstellung von Upa2 und den modifizierten Varianten in C-terminaler Fusion mit Gfp. PAM2: PABP-interagierendes Motiv 2, DUF: Domäne unbekannter Funktion, Gfp: Grün fluoreszierendes Protein. Der Aminosäure-Bereich, sowie das Molekulargewicht der Fusionsproteine sind angegeben. Größenmaßstab: 200 Aminosäuren (AS). (B-D) Filamente der *U. maydis* Stämme acht Stunden nach Induktion des Hyphenwachstums. Gfp-Einzelbild und Kymograph sind untereinander gezeigt. Größenmaßstab: 10 µm. (B) Filament des Stammes AB33upa2G. Upa2G zeigt eine Lokalisation in sich bidirektional bewegende mRNPs. (C) Filament des Stammes AB33upa2G^{NA}. Upa2G^{NA} zeigt eine mit Upa2G vergleichbare Lokalisation in sich bidirektional bewegenden Einheiten, wobei viele Zellen ein bipolares Wachstum aufweisen. (D) Filament des Stammes AB33upa2G^{CA}. Upa2G^{CA} zeigt keine Akkumulation in mobilen mRNP-Komplexen, sondern weist eine gleichmaßige zytoplasmatische Lokalisation auf. (E) Western-Analyse des Gesamtzellextraktes von Filamenten der Stämme AB33upa2G (*upa2G*), AB33upa2G^{NA} (*upa2G^{NA}*) und AB33upa2G^{CA} (*upa2G^{CA}*). Tub1 dient als Ladekontrolle der Proteinmenge. Die Varianten von Upa2G wurden mit einem α Gfp-Antikörper detektiert, Tub1 mit einem α Tub1-Antikörpern nachgewiesen. Größenangabe in kDa.

2.4.5 Upa2 hat eine entscheidende Funktion im Langstreckentransport von mRNP-Komplexen

Die bisherigen Ergebnisse zeigten, dass Upa2 mit den Rrm4-abhängigen mRNPs kotransportiert wird (Abb. 20D) und mit Pab1 über dessen MLLE-Domäne interagierte (Abb. 21B). Da eine Deletion von *upa2* einen *rrm4*⊿-ähnlichen Phänotyp aufwies (Abb. 19), sollte untersucht werden, inwiefern sich ein Verlust von Upa2 auf den Langstreckentransport von mRNPs auswirken könnte. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen zeigten, dass eine Deletion von *upa2* keine Auswirkungen auf die bidirektionale Bewegung von Rrm4G hatte (Abb. 23A, B). Dies bestätigte das bisherige Modell einer Rrm4-vermittelten Rekrutierung von Upa2 an die Endosomen und zeigt im Umkehrschluss, dass Upa2 keinen Einfluss auf die Assoziation von Rrm4 mit diesen Organellen besitzt.

Im Gegensatz dazu führte der Verlust von Upa2 zu einer Störung des Transports von Pab1 (Abb. 23D). So sind im Vergleich zu AB33pab1G in AB33pab1G/upa2 Δ deutlich weniger Pab1-mRNPs zu beobachten (Abb. 23C, D). Die noch detektierbaren Pab1-mRNPs zeigten eine geringere Signalintensität, schienen jedoch in ihrer Mobilität nicht gestört zu sein (Abb. 23D, Pfeil). Eine Benomyl-Behandlung von AB33pab1G/upa2 Δ resultierte zudem in keiner erkennbaren Akkumulation von Pab1G außerhalb der Initialzelle (Abb. 23F). Eine Erklärung für diese Ergebnisse wäre, dass ein Verlust von Upa2 zu einer geringeren Assoziation oder zu einer stärkeren Dissoziation von Pab1 und der mRNA mit bzw. von der Rrm4-abhängigen Transportmaschinerie führt. Damit übereinstimmend ist die Expression von Pab1 unbeeinflusst von der Deletion von *upa2*, wodurch die Verringerung der Pab1-mRNPs auf einen gestörten Langstreckentransport der mRNA zurückzuführen sein muss (Abb. 23G).

Diese Ergebnisse belegen, dass Upa2 als Komponente der mRNPs eine wichtige Funktion besitzt und in diesen Transport-Komplexen mehrere Pab1 über die PAM2-Motive als strukturell wichtiges Gerüstprotein stabilisieren könnte.



Abbildung 23: Upa2 ist wichtig für den Langstreckentransport von mRNP. (A-F) Filamente der Stämme AB33rrm4G, AB33rrm4G/upa2A, AB33pab1G und AB33pab1G/upa2A mit und ohne Behandlung mit Benomyl (1 h, 50 µM Endkonzentration). Gfp-Einzelbild und Kymograph sind untereinander gezeigt. Größenmaßstab: 10 µm. (A) Rrm4G zeigt eine Akkumulation in sich bidirektional bewegenden Einheiten. (B) Der Verlust von Upa2 hat keinen Einfluss auf die bidirektionale Bewegung von Rrm4. (C) Pab1G zeigt sowohl eine gleichmäßige Verteilung im Zytoplasma als auch eine Lokalisation in sich bidirektional bewegenden Einheiten. (D) Der Verlust von Upa2 führt zu einer Verringerung der Anzahl von mobilen Pab1G-mRNPs und zu einer geringeren Signalintensität von diesen. Die generelle bidirektionale Bewegung dieser Komplexe schien nicht gestört zu sein (Pfeil). (E) Pab1G lokalisiert nach Behandlung mit Benomyl in wenigen stationären Akkumulationen, die sich nicht in direkter Assoziation mit dem Zellkern befinden (Pfeile). (F). Der Verlust von Upa2 führt zu einer gestörten Akkumulation von Pab1G nach Behandlung mit Benomyl. Es konnten höhere Konzentrationen von Pab1G in direkter Nähe zum Zellkern beobachtet werden. (G) Western-Analyse des Gesamtzellextraktes von Filamenten der Stämme AB33pab1G (wt) und AB33pab1G/upa2A (upa2A). Tub1 dient als Ladekontrolle der Proteinmenge. Pab1G wurde mit einem α Gfp-Antikörper detektiert. Tub1 mit einem α Tub1-Antikörper nachgewiesen. Größenangabe in kDa.

3. Diskussion

Der Langstreckentransport von mRNA ist die Grundlage für ein effizientes filamentöses Wachstum von *U. maydis*. Ein Schlüsselfaktor in diesem Prozess ist das RNA-bindende Protein Rrm4. Rrm4 bewegt sich bidirektional in den Filamenten und vermittelt den Transport von zahlreichen Ziel-RNAs in Form von großen mRNP-Komplexen (Becht *et al.*, 2006; König *et al.*, 2009). Dabei war die zugrundeliegende Transportmaschinerie dieses Prozesses bislang unbekannt.

Mit Hilfe einer Kombination aus genetischen, zellbiologischen und biochemischen Methoden konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Kin3, ein Motorprotein der Kinesin-3-Familie, für die Plus-End-gerichtete Bewegung von Rrm4-abhängigen mRNPs verantwortlich ist. Interessanterweise wird Rrm4 während dieses Prozesses mit Endosomen kotransportiert. Die Kopplung des mRNA-Transports an Endosomen stellt damit einen neuartigen Mechanismus der mRNA-Lokalisierung dar.

Die C-terminale MLLE-Domäne von Rrm4 ist essentiell für die Verbindung mit der Transportmaschinerie. MLLE-Domänen binden an das definierte PAM2-Motiv. Basierend darauf wurden mehrere potentielle PAM2-Proteine näher charakterisiert Das endosomale PAM2-Protein Upa1 interagiert sowohl mit Pab1 als auch mit Rrm4 und wird über dessen FYVE-Domäne an die Endosomen rekrutiert. Die Bindung von Upa1 an diese Organellen ist wichtig für dessen Funktionalität. Der Verlust von Upa1 hatte dagegen keinen Einfluss auf die Bewegung und Funktion von Endosomen, resultierte jedoch in einem gestörten Langstreckentransport von mRNA in den Filamenten. Somit ist Upa1 ein endosomales Protein, das spezifisch den mRNA-Transport reguliert. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass Upa2 mit Pab1, nicht jedoch mit Rrm4 interagiert. Upa2 ist eine Komponente der Rrm4abhängigen mRNP und ein Verlust dieses Proteins resultiert in einem gestörten Transport von diesen Einheiten.

3.1 Die Motorkomposition zum Transport der Rrm4-abhängigen mRNPs

3.1.1 Kin3 vermittelt den Plus-End-gerichteten Transport

In dem Modellorganismus *U. maydis* ist Dynein an dem Transport von Rrm4-abhängigen mRNPs entlang von Mikrotubuli beteiligt. Dabei vermittelt dieser Minus-End-gerichtete Motor die retrograde Bewegung dieser Komplexe (Baumann *et al.*, 2012). Das konventionelle Kinesin Kin1 hingegen ist nur indirekt an der mRNA-Lokalisation beteiligt, indem es Dynein an die Plus-Enden der Mikrotubuli befördert (Lenz *et al.*, 2006; Becht *et al.*, 2006; Baumann *et al.*, 2012). In den Filamenten von *U. maydis* besteht das Mikrotubuli-Zytoskelett in der Zellmitte aus antipolaren Mikrotubulibündeln, während es im Bereich der Zellpole eine

unipolare Ausrichtung aufweist. Dabei weisen die Plus-Enden der MT in Richtung der Pole und die Minus-Enden in Richtung der Zellmitte (Lenz *et al.*, 2006; Schuster *et al.*, 2011b). Dementsprechend bedarf es eines Plus-End-gerichteten Motors um molekulare Fracht an die äußersten Zellpole zu befördern und folglich ist die Bewegung der mRNPs nicht allein auf Dynein zurückzuführen.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der anterograde Transport von Rrm4abhängigen mRNPs von dem Kinesin-3-Motorprotein Kin3 vermittelt wird. Zusammen mit Dynein wurde somit zum ersten Mal die vollständige Transportmaschinerie aufgeklärt, die eine bidirektionale Bewegung von mRNPs in einer eukaryotischen Zelle erklärt (Baumann *et al.*, 2012).

Rrm4 und Kin3 kolokalisieren miteinander sowohl in anterograder als auch in retrograder Richtung. Dies lässt darauf schließen, dass beide Proteine in einem gemeinsamen Komplex in die Zellmitte zurückgeführt werden. Dieser Rücktransport wird vermutlich von Dynein vermittelt. In Übereinstimmung damit kolokalisieren Rrm4 und Dynein vorwiegend in retrograder Richtung (Baumann *et al.*, 2012). Es wäre jedoch auch möglich, dass Kin3 ebenfalls an der retrograden Bewegung der mRNPs beteiligt ist. So wurde gezeigt, dass der retrograde Transport von frühen Endosomen im Bereich des antipolaren Mikrotubuli-Zytoskeletts von Kin3 übernommen werden kann und Dynein nur für die Bewegung im Bereich der unipolar angeordneten Mikrotubuli essentiell ist (Schuster *et al.*, 2011b).

Kin3 gehört zu den UNC-104/KIF1A-ähnlichen Kinesinen. Studien an C. elegans haben gezeigt, dass Mutationen in dem Gen unc-104 (uncoordinated-104) zu einer unkoordinierten Bewegung der Nematoden führt (Brenner, 1974; Bloom, 2001). Es stellte sich heraus, dass unc-104 für einen Kinesin-Motor kodiert, der an dem Transport von Vorläufern synaptischer Vesikel beteiligt ist (Otsuka et al., 1991; Hall und Hedgecock, 1991). Später wurde in Mäusen mit KIF1A ein homologes Kinesin identifiziert, das spezifisch in Neuronen exprimiert wird und ebenfalls Vorläufer von synaptischen Vesikeln transportiert (Okada et al., 1995). Nach einer Standardisierung der Nomenklatur wurden UNC-104/KIF1A-ähnliche Motoren der Kinesin-3-Familie zugeordnet (Lawrence et al., 2004). Bisher konnte nicht abschließend geklärt werden, wie sich Proteine dieser Familie fortbewegen. Zunächst ist eine Bewegung als Monomer postuliert worden (Okada und Hirokawa, 1999; Okada et al., 2003). Dennoch geben andere Studien Hinweise darauf, dass sich UNC-104/KIF1A-ähnliche Motoren, wie die meisten Kinesine, als Dimere fortbewegen. Dabei wird die Dimerisierung vermutlich über eine hohe Konzentration der Motorproteine an der molekularen Fracht, sowie durch die regulatorische FHA (forkhead-associated)-Domäne gesteuert (Klopfenstein et al., 2002; Tomishige et al., 2002; Lee et al., 2004; Verhey und Hammond, 2009).

Der gemeinsame Rücktransport von Kin3 und Rrm4 in *U. maydis* steht im Gegensatz zu der Beobachtung in *C. elegans*, in dem UNC-104 nach Entladung der Fracht an der Synapse

oder bei eingeschränkter Frachtbindung abgebaut wird (Kumar *et al.*, 2010). Kin3 dagegen zeigt auch bei Verlust der Fracht-bindenden PH-Domäne keine Verminderung der Proteinmenge und wird somit nicht über einen ladungsabhängigen Abbau reguliert.

Wie auch in *U. maydis* wurde sowohl in den Neuronen von Säugetieren als auch in Oozyten und Embryos von D. melanogaster ein bidirektionaler Tranport der mRNPs beobachtet (Martin und Ephrussi, 2009; Becalska und Gavis, 2009; Doyle und Kiebler, 2011). Diese Bewegung kann durch die Arbeit eines einzelnen Motors entlang eines antiparallelen, leicht polarisierten Mikrotubuli-Zytoskeletts oder die koordinierte Aktivität zweier Motoren mit gegensätzlicher Ausrichtung bei polarisierter Mikrotubuliorganisation erfolgen. Die an der mRNA-Lokalisierung beteiligte Transportmaschinerie wurde in mehreren Modellsystemen intensiv untersucht. In einer biochemischen Charakterisierung von Staufen-enthaltenen mRNPs aus den Neuronen von Säugetieren konnte gezeigt werden, dass sowohl das konventionelle Kinesin als auch Dynein Teile dieser Komplexe sind (Mallardo et al., 2003; Villacé et al., 2004). In Übereinstimmung damit konnten mit der schweren Kette des konventionellen Kinesins (oft auch als Kinesin-1 oder Kin1 bezeichnet) mehrere RNAbindenden Proteine aufgereinigt werden. Die Bewegung dieser Komplexe in den Dendriten wird dementsprechend durch die Aktivität von Kinesin-1 und einem antagonistischen Motor, vermutlich Dynein, vermittelt (Kanai et al., 2004; Hirokawa, 2006). Das konventionelle Kinesin ist auch in weiteren Organismen an dem Transport von mRNP beteiligt. So transportiert in der Oozyte von X. laevis Kinesin-1 im Zusammenspiel mit dem heterotrimeren Motor Kinesin-2 Vg1 mRNA entlang einer Subpopulation von Mikrotubuli zu dem Zellkortex des vegetativen Pols (Messitt et al., 2008). Kinesin-1 vermittelt zudem den bidirektionalen Transport von oskar mRNA in den Oozyten von D. melanogaster. Dabei bewegen sich die mRNP-Komplexe entlang eines leicht polarisierten antiparallelen Mikrotubuli-Zytoskeletts, sodass die oskar mRNA letztendlich an dem posterioren Pol der Zelle akkumuliert (Zimyanin et al., 2008). Im Gegensatz dazu ist der Transport der mRNA gurken und bicoid in diesen Oozyten abhängig von der Aktivität von Dynein (MacDougall et al., 2003; Weil et al., 2006; Delanoue et al., 2007; Weil et al., 2008; Becalska und Gavis, 2009). Dynein ist darüber hinaus auch an dem Transport von mRNA in den Embryonen von D. melanogaster beteiligt. Im Stadium des synzytialen Blastoderms bindet Egl verschiedene lokalisierte Transkripte und interagiert zudem mit der Fracht-bindenden Domäne von BicD und der leichten Kette des Dyneins. BicD wiederum interagiert mit Dynactin und der schweren Kette von Dynein, wodurch sich ein stabiler Transportkomplex bildet (Dienstbier et al., 2009). Jedoch erklärt dieses Modell nur den Minus-End-gerichteten Transport, obwohl mRNP-Komplexe in Embryonen von *D. melanogaster* eine bidirektionale Bewegung aufzeigen (Bullock et al., 2006). Somit müssen noch weitere Faktoren an diesem Prozess beteiligt sein.

In *U. maydis* kann nun mit der Identifizierung von Kin3 und Dynein als molekulare Motoren von Rrm4, die bidirektionale Bewegung der mRNPs entlang des antipolaren Mikrotubuli-Zytoskeletts erklärt werden. Daraus ergab sich wiederum die Frage, wie die mRNP-Komplexe mit den Motoren verbunden sind.

3.1.2 Membran-gekoppelter mRNA-Transport

In Eukaryoten transportieren Motoren der Kinesin-3-Familie vorwiegend Vesikel und Membran-umschlossene Strukturen (Verhey und Hammond, 2009; Hirokawa *et al.*, 2010). Entscheidend dafür ist die C-terminal gelegene PH-Domäne, die spezifisch an Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (Pl_{4,5}P₂) bindet und so für die Rekrutierung der Vesikel an den Motor notwendig ist (Klopfenstein *et al.*, 2002; Klopfenstein und Vale, 2004). In Übereinstimmung mit der Rolle der Kinesin-3 Familie in anderen Organismen, wurde Kin3 in *U. maydis* als Motor für den Transport von frühen Endosomen identifiziert (Wedlich-Söldner *et al.*, 2002; Schuster *et al.*, 2011c; Schuster *et al.*, 2011b). Dieser dynamische Prozess konnte mit Hilfe der endosomalen Proteine Rab5a und Yup1 detailliert untersucht werden (Wedlich-Söldner *et al.*, 2002; Fuchs *et al.*, 2006; Schuster *et al.*, 2011c; Schuster *et al.*, 2011b). Die frühen Endosomen entstehen vorwiegend aus der Fusion mit endozytotischen Vesikeln und stellen die zentrale Sortierungseinheit im Verlauf endozytotischer Prozesse dar (Huotari und Helenius, 2011).

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass Rrm4-abhängige mRNPs und Endosomen nicht nur von dem gleichen Plus-End-gerichteten Motor, Kin3, befördert werden, sondern auch dass dessen Lipid-bindende PH-Domäne für diesen Transportprozess notwendig ist. Dabei stört der Verlust von Kin3 oder dessen PH-Domäne zwar den Transport von Endosomen und mRNPs, aber nicht die Kolokalisation der beiden Strukturen. Diese Beobachtung war Grundlage für die Hypothese, dass Rrm4-abhängige mRNPs an die Endosomen und nicht an den Motor binden, was einen Transport "per Anhalter" auf diesen ermöglicht. In Übereinstimmung damit zeigten weiterführende Studien eine Abhängigkeit des mRNP-Transports von funktionellen Endosomen, womit die Modellvorstellung der passiv mitfahrenden mRNP unterstützt wird (Baumann *et al.*, 2012).

Der postulierte Mechanismus eines Endosomen-gekoppelten mRNA-Transports leistet einen weiteren Hinweis auf eine mögliche Verbindung zwischen Membrantransport und mRNA-Lokalisierung.

Gegen eine Beteiligung von Membranstrukturen an Lokalisierungsprozessen von mRNA sprechen die Ergebnisse der biochemischen Charakterisierungen von Staufen-enthaltenen mRNPs aus den Neuronen von Säugetieren. Diese ergaben, dass die mRNP-Komplexe zwar RNase-sensitiv, aber resistent gegenüber einer Behandlung mit Detergenzien sind, wodurch Membranen als strukturelle Komponenten ausgeschlossen wurden (Mallardo *et al.*,

2003; Kanai *et al.*, 2004). Weitere Studien suggerieren, dass RNA-bindende Proteine, wie FMRP, direkt an das konventionelle Kinesin gebunden sind (Dictenberg *et al.*, 2008). In Embryonen von *D. melanogaster* bindet das RNA-bindende Protein Egl an den Adapter BicD, der wiederum mit Dynein interagiert (Dienstbier *et al.*, 2009). Interessanterweise vermittelt BicD auch den Transport von Clathrin-umhüllten Vesikeln. Jedoch ist dieser Prozess unabhängig von Egl, wonach Dynein vermutlich Vesikel- und mRNA-Fracht getrennt transportiert (Li *et al.*, 2010).

Demgegenüber geben mehrere Studien in unterschiedlichsten Organismen Hinweise auf eine Assoziation zwischen Membrantransport und mRNA-Lokalisierung (Cohen, 2005; Gerst, 2008). So triff dies auch auf die ausführlich untersuchte Lokalisierung der *ASH1* mRNA in *S. cerevisiae* zu. Es konnte gezeigt werden, dass tubuläres ER zusammen mit dem She2p-Maschinerie transportiert wird und so die Bildung von neuem kortikalen ER in der Tochterzelle reguliert wird. Dabei ist die Assoziation von She2p zu dem ER unabhängig von dem Motorprotein Myo4p und dem Adapterprotein She3p (Schmid *et al.*, 2006). Interessanterweise ist nur ein Teil der lokalisierten mRNAs auf einen Transport und Verteilung des tubulären ERs angewiesen. Dabei handelt es sich um die Transkripte von sekretierten und ER-assoziierten Proteinen, deren Translation von dem Vorhandensein von ER abhängt (Fundakowski *et al.*, 2012).

In Oozyten von X. laevis besteht zudem ein Zusammenspiel zwischen der Lokalisierung des RNA-bindenen Proteins Vg1 und dem ER, deren Transport unter anderem von Kinesin-2 vermittelt wird, einem Motor dem bisher eine vorwiegende Beteiligung am Membrantransport zugerechnet wurde. Es wird spekuliert, dass Vg1 "per Anhalter" mit dem ER transportiert werden könnte (Cohen, 2005). Ein ähnlicher Mechanismus wurde für die Lokalisierung der gurken mRNA in Oozyten von D. melanogaster postuliert. So zeigte sich eine Abhängigkeit dieses Prozesses von Rab11, welches an dem Transport von Vesikeln zu der Plasmamembran beteiligt ist. Ein Verlust von Rab11 führt zu einer gestörten Lokalisation der gurken mRNA an den posterioren Pol (Dollar et al., 2002). Wurde dieser Effekt zunächst auf eine gestörte Organisation des Mikrotubuli-Zytoskeletts zurückgeführt, könnte in Anbetracht vergleichender Studien auch ein Rab11-abhängiger Transport von gurken mRNA an Vesikeln für die Lokalisierung dieses Transkripts wichtig sein (Dollar et al., 2002; Cohen, 2005). In Übereinstimmung damit konnte gezeigt werden, dass Komponenten der ESCRT-Maschinerie (endosomal sorting complex required for transport) wichtig für die Lokalisierung der bicoid mRNA in der Eizelle von Drosophila sind (Irion und St Johnston, 2007). Ein Endosomen-abhängiger Tranpsort wurde auch für die genomische RNA von Retroviren in Säugetieren postuliert (Basyuk et al., 2003; Cohen, 2005; Molle et al., 2009).

Darüber hinaus ist die Kernmembran an der FNI (*Frizzled nuclear import*)-vermittelten Biogenese von mRNPs in *D. melanogaster* beteiligt. Nach Bindung des synaptischen Signalproteins Wingless (Wg) wird der Rezeptor Frizzled-2 durch Endozytose internalisiert und geschnitten. Das C-terminale Fragment dieses Rezeptors (DFz2C) wird in den Nukleus importiert, wo es den Export von mRNPs vermittelt, die Transkripte für synaptische Proteine enthalten. Interessanterweise erfolgt der nukleäre Export nicht über den kanonischen Weg unter Verwendung des NPC (*nuclear pore complex*), sondern über Knospung an der Kernmembran. Eine solche Knospung wurde bisher nur für den Kernexport von Herpesviren beobachtet; allerdings scheint es sich dabei um einen endogenen Prozess zu handeln, der von den Viren lediglich ausgenutzt wird (Speese *et al.*, 2012; Montpetit und Weis, 2012).

All diese Studien belegen, dass Membranen an vielen unterschiedlichen Schritten der mRNA-Lokalisierung beteiligt sein können. Bisher ist der Transport von endogener mRNA an Endosomen nur in *U. maydis* beschrieben, doch könnten die Ergebnisse dieser Arbeit auch auf weitere Organismen zutreffen. So zeigen neue Studien, dass KIF1Bβ, wie Kin3 auch ein Motor aus der Kinesin-3-Familie, den Transport von *mbp* (Myelin basisches Protein) und *36k* mRNA in Oligodendrozyten des Zebrabärblings *Danio rerio* vermittelt (Lyons *et al.*, 2009). Darüber hinaus ist KIF1Bβ an dem Transport von mRNA in den Dendriten von menschlichen Neuronen beteiligt (Charalambous *et al.*, 2013). Obwohl die Motor-mRNP-Komplexe in Säugetierneuronen resistent gegenüber Detergenzien sind, konnte bisher in keinem der beiden Modellsysteme die Verbindung zwischen mRNA und Motorprotein aufgeklärt werden (Lyons *et al.*, 2009; Charalambous *et al.*, 2013).

Der hier in Zusammenarbeit mit Sebastian Baumann postulierte Mechanismus eines Membran-gekoppelten Transports von mRNA ist in Übereinstimmung mit der Vorstellung, dass die Funktion von Endosomen in der eukaryotischen Zelle über eine einfache Endo- und hinausgeht (Baumann et al., 2012). Vielmehr Exozytose stellen diese eine Mehrzweckplattform dar, auf denen sich molekulare Maschinen zusammensetzen und verschiedene biologische Prozesse vermitteln können (Gould und Lippincott-Schwartz, 2009). Eine dieser neuen Funktionen ist in U. maydis somit der Langstreckentransport von mRNA. Aufgrund der großen Oberfläche von Endosomen, könnten viele mRNPs an diese binden und zusammen als eine große Einheit transportiert werden. Auf diese Weise kann eine bereits bestehende Transportmaschinerie für unterschiedliche Funktionen, wie Endo-/Exozytose und mRNA-Lokalisation, verwendet werden. Für eine derartige Anpassung ist nur ein geringer evolutionärer Aufwand erforderlich, da theoretisch lediglich ein Adapterprotein entwickelt werden müsste.

3.2 Die Interaktion von PAM2-Motiven mit der MLLE-Domäne

Die C-terminale MLLE-Domäne von Rrm4 ist wichtig für dessen bidirektionale Bewegung (Becht *et al.*, 2006) und somit vermutlich für die Rekrutierung des Proteins an die Endosomen. Die MLLE-Domäne bindet an eine kurze, konservierte Aminosäuresequenz,

das PAM2-Motiv (Roy *et al.*, 2002; Kozlov *et al.*, 2004; Albrecht und Lengauer, 2004). Das PAM2-Motiv hat eine Länge von ungefähr 15 Aminosäuren und zeigt die Konsensussequenz xxLNxxAxEFxP, wobei die Aminosäuren L3, A7 und F10 einen Großteil der Interaktion mit der MLLE-Domäne vermitteln (Kozlov *et al.*, 2004; Kozlov *et al.*, 2010a; Kozlov *et al.*, 2010b). Bisherige Studien über das PAM2-Motiv beschränkten sich auf Interaktionspartner von PABP, von denen viele an posttranskriptionalen Prozessen beteiligt sind.

In einer bioinformatischen Analyse konnte gezeigt werden, dass *U. maydis* tatsächlich nur zwei Proteine mit MLLE-Domänen besitzt: Pab1 und Rrm4 (Tab. 2). Dennoch konnte die MLLE-Domäne von Rrm4 nicht mit gleicher Sicherheit vorhergesagt werden, wie die von Pab1 (Tab. 2). Um zu überprüfen, ob die MLLE-Domäne von Rrm4 tatsächlich eine Bindungstasche für ein PAM2-Motiv formen kann, wurde sie mit den MLLE-Domänen der Poly(A)-bindenden Proteine von *Homo sapiens* (HsPab1), *S. cerevisiae* (ScPab1) und *U. maydis* (UmPab1) verglichen (Abb. 24). Die Aminosäuren der MLLE-Domäne werden im Folgenden entsprechend ihrer Position im humanen PABP1 bezeichnet und die beteiligten Aminosäurereste des PAM2-Motivs anhand ihrer funktionellen Positionen 1-12 benannt (Abb. 24B, C; Kozlov *et al.*, 2010a).

In dem Sequenzvergleich der MLLE-Domänen fällt eine hohe Ähnlichkeit der Peptidbereiche auf. Alle vier Domänen besitzen die konservierte LGExL(F/Y)-Sequenz in dem N-terminalen Bereich, jedoch ist das Glutamat in der MLLE-Domäne von Rrm4 (UmRrm4) durch ein physikalisch ähnliches Aspartat ersetzt. Die LGExL(F/Y)-Sequenz ist notwendig für die Ausbildung einer hydrophoben Tasche zur Bindung des F10 des PAM2-Motivs (Kozlov et al., 2010a). Dabei ist das F567 (in LGExL(F/Y)) essentiell für die Ausbildung einer aromatischen π -Stapelung mit dem F10 des PAM2-Motivs und eine genetische Substitution dieses Phenylalanins mit Alanin verhindert jegliche Interaktion zwischen MLLE und PAM2 (Abb. 24A; Kozlov et al., 2004; Funakoshi et al., 2007; Kozlov et al., 2010a). Zusätzlich geht F567 einen hydrophoben Kontakt mit dem P12 ein (Kozlov et al., 2010a). Ebenfalls wichtig für die Bindung des PAM2-Motivs ist die namensgebende KITGMLLE-Sequenz. Diese ist in den drei MLLE-Domänen der zytoplasmatischen Poly(A)-bindenden Proteine von H. sapiens, S. cerevisiae und U. maydis sehr konserviert und zeigt nur Substitutionen des L585 mit dem chemisch vergleichbaren Isoleucin (Abb. 24A). Die für die Bindung von PAM2 wichtigen Aminosäuren K580, L585 und L586 (Kozlov et al., 2004; Kozlov et al., 2010b) sind ebenfalls in der MLLE-Domäne von Rrm4 vorhanden (Abb. 24A). Das E587 (in MLLE) geht eine Wasserstoffbrückenbindung mit dem Amid der Aminosäure an der Position 13 des PAM2 ein, wobei die Art der Aminosäure im PAM2-Motiv irrelevant ist (Kozlov und Gehring, 2010). Dieses Glutamat ist in Rrm4 durch ein Aspartat ersetzt und kann aufgrund der physikalisch ähnlichen Eigenschaften beider Aminosäuren vermutlich diese Funktion weiterhin ausüben (Abb. 24A). Interessanterweise sind in Rrm4 die drei funktionellen Aminosäuren G579, G583

und M584 in der GKITGMLLE-Sequenz substituiert (Abb. 24A). G579 geht zusammen mit dem K580 eine Wasserstoffbrückenbindung mit dem oft konservierten E9 in der PAM2-Motiv ein (Kozlov und Gehring, 2010). Jedoch ist dieses Glutamat in Upa1 durch Valin ersetzt und nur das zweite PAM2-Motiv von Upa2 trägt an der Position 9 ein Glutamat (Abb. 24B, C). Somit ist es möglich, dass G579 für die Funktion der MLLE-Domäne von Rrm4 nicht wichtig ist. Dagegen bindet das M584 an das konservierte A7 im PAM2-Motiv und eine Mutation des Alanins stört die MLLE/PAM2-Interaktion (Kozlov et al., 2004; Kozlov und Gehring, 2010). Darüber hinaus besitzt Rrm4 eine Substitution des G583 mit Isoleucin, obwohl Strukturanalysen gezeigt haben, dass in diesem Bereich der engste Kontakt zwischen MLLE und Pam2 stattfindet und eine Substitution mit einer sperrigen Aminosäure eine Bindung sterisch behindern würde (Kozlov et al., 2010a). Inwiefern sich diese Substitution auf eine tatsächliche Interaktion auswirken würde, kann jedoch nicht allein anhand dieses Sequenzvergleichs vorhergesagt werden. Interessant ist, dass das regulatorische K606, sowohl in HsPab1, als auch in UmPab1 und UmRrm4 konserviert ist (s. Abschn. 3.3.2). Unter dem Sequenzvergleich werden die Aminosäuresubstitutionen der mutierten Allele Pab1^{mM} und Rrm4^{mM} angezeigt (Abb. 24A; Becht *et al.*, 2006).

Das PAM2-Motiv von Upa1 und die vier PAM2-Motive von Upa2 wurden getrennt voneinander mit den Motiven der gut untersuchten menschlichen Proteine Paip1, Paip2, eRF3B und ATX2 verglichen (Abb. 24B, C). Dabei ist zu erkennen, dass die Motive aus Upa1 und Upa2 mit der Konsensussequenz von xxLNxxAxEFxP übereinstimmen. Auffällig ist, dass das PAM2-Motiv von Upa1, sowie das vierte PAM2-Motiv von Upa2 eine Substitution des N4 zu Serin beziehungsweise Threonin tragen (Abb. 24B, C). Paip1 besitzt an dieser Position ebenfalls ein Serin, wodurch eine Interaktion mit der MLLE-Domäne nicht beeinträchtigt wird und aus diesem Grund die Funktion der PAM2-Motive von Upa1 und Upa2 vermutlich ebenfalls nicht gestört wird. Mutationsanalysen haben ergeben, dass die Aminosäuren L3, A7 und F10 für eine Bindung an die MLLE-Domäne hauptverantwortlich sind (Kozlov et al., 2004). Zudem ist die Position 12 oft mit einem Prolin besetzt (Kozlov et al., 2004; Kozlov und Gehring, 2010; Kozlov et al., 2010a; Kozlov et al., 2010b). Upa2 besitzt im zweiten PAM2-Motiv an der Position 12 dagegen ein Phenylalanin, wodurch eine Funktionalität dieses Motivs dennoch nicht ausgeschlossen werden kann (Abb. 24C; Kozlov et al., 2004). Bis auf das vierte PAM2-Motiv besitzen die Motive von Upa1 und Upa2 an der Position 5 ein Prolin oder Valin wodurch diese sich in die hydrophobe Vertiefung der Helix 5 der MLLE-Domäne einfügen können (Abb. 24B, C; Kozlov und Gehring, 2010). In ihrer Sequenz scheinen folglich sowohl die MLLE-Domäne von Rrm4 und die PAM2-Motive von Upa1 und Upa2 funktionell zu sein und könnten somit potentiell miteinander interagieren.

Α						ملد		
HsPab1	PPOEOKOMLGE	RLEPLICAM	HPTLAGKIT	MLLEID-NSELI	HMLES	-PESIRS	DEAVAV-LQ	AH - 617
ScPab1	YQQKQRQALGE	QLY <mark>KKV</mark> ŠAK	TSNEEAAGKIT	GMIL <mark>D</mark> LP-PQEVE	PLLES	-DELFEQH	KEASAA-YÊ	SF - 566
UmPab1	SFE <mark>E</mark> QKQ <mark>M</mark> LGE	AIY <mark>PKV</mark> AAS	QPELAGKLT	GMILE <mark>LP-VTEL</mark> I	HLLEE	-SEALDAK	/NEALEV-LKI	EY - 630
UmRrm4	AAHDQKQKLGDQ	2LFKKIRTF	GVKGAPKLT	IH <mark>LLD</mark> SEDLRALA	HLMNS	YEDVLKEK	/QHKVAAGLNI	K 792
UmRrm4 ^{mM}		A A	G A					
UmPab1 ^{mM}		A A	Α	Α				
_								
В	12345678	9012		C		12345	6789012	
HsPaip1	VLMSKLSVNAF	EFYPSGY -	140	Hs	Paip1	VLMSKLSV	NAPEFYPSG	r - 140
HsPaip2	VVKSNLNPNAK	E <mark>FVP</mark> GVK -	123	Hs	Paip2	VVKSNLNF	NA <mark>KE</mark> FVPGVI	<u>(</u> - 123
HseRF3B	AFSRKLNVNAK	(PFVPNVH -	64	Hs	eRF3B	AFSRKLNV	NAKPFVPNVI	H - 64
HsAtx2	VRKSTLNPNAK	EFNPRSF -	637	Hs	Atx2	VRKSTLNF	NA <mark>KE</mark> FNPRSI	- 637
UmUpa1	ASQS <mark>TL</mark> SPNAS	V <mark>F</mark> KPSRS -	144	Um	1Upa2-1	MEGSSLNV	AAPVFKPSG	A - 18
UmUpa1 ^{mP}	A S	AA		Um	1Upa2-2	SGISLLNF	DAKEFKFGG	r - 875
				Um	וUpa2-3	TNAAHLNV	GAAPFTPGL	- 936
				Um	1Upa2-4	SHESRLTA	DAPSFVPTW/	A - 1061

Abbildung 24: Aminosäuresequenzvergleiche von MLLE-Domänen und PAM2-Motiven. Schwarz: Die Aminosäure ist in allen Proteinen gleich oder ähnlich; Grau: Die Aminosäure ist in 75% der Proteine gleich oder ählich. **(A)** Sequenzvergleich der MLLE-Domäne von PABP1 aus dem Menschen (HsPab1), der Bäckerhefe *S. cerevisiae* (ScPab1) und *U. maydis* (UmPab1) sowie von Rrm4 aus *U. maydis* (UmRrm4). Wichtige Bereiche sind mit einer roten Umrandung hervorgehoben. Das Sternchen markiert ein konserviertes Lysin. Unter den Sequenzen sind die Aminosäuresubstitutionen der Allele Rrm4^{mM} und Pab1^{mM} angegeben. **(B-C)** Aminosäurevergleiche von PAM2-Motiven. Die Aminosäuren sind entsprechend ihrer funktionellen Position von 1-12 durchnummeriert (Kozlov *et al.*, 2010a). **(B)** Sequenzvergleich des PAM2-Motives von Upa1 (UmUpa1) mit den PAM2-Motiven von Paip1, Paip2, eRF3B und Ataxin-2 aus *H. sapiens*. Unter den Sequenzvergleich der vier PAM2-Motive von Upa2 (UmUpa2-1 bis UmUpa2-4) mit den PAM2-Motiven von Paip1, Paip2, eRF3B und Ataxin-2 aus *H. sapiens*.

3.3 Die Rolle von Upa1 als substantielle Proteinkomponente der mRNA-Transportmaschinerie

3.3.1 Upa1 besitzt ein funktionelles PAM2-Motiv

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass Upa1 ein funktionelles PAM2-Motiv besitzt und über dieses mit Pab1 interagieren kann. Damit konnte die bioinformatische Vorhersage bestätigt werden. Interessanterweise ist das PAM2-Motiv jedoch für die Funktion von Upa1 in *U. maydis* nicht notwendig. Diese scheint vielmehr über eine Interaktion mit Rrm4 vermittelt zu werden, die mit Hilfe des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems gezeigt werden konnte und die unabhängig von dem PAM2-Motiv war. Stattdessen scheint Rrm4 an zwei unterschiedliche Regionen von Upa1 zu binden, eine im N-terminalen und eine weitere im C-terminalen Bereich.

Eine Bindung über mehrere Domänen wurde auch während der Interaktion von PABP mit mehreren PAM2-tragenden Proteinen beobachtet. Paip1 und Paip2 besitzen jeweils zwei Bereiche (PAM1 und PAM2) mit denen sie mit PABP1 interagieren können. PAM1 besteht aus einem Sequenzabschnitt von mehreren sauren Aminosäuren, die mit den RRM-Domänen von PABP1 interagieren können (Khaleghpour *et al.*, 2001a; Roy *et al.*, 2002). Das PAM2-Motiv hingegen bindet mit hoher Spezifität an die MLLE-Domäne von PABP. Paip1 und Paip2 unterscheiden sich trotz dieser Domänengleichheit in ihrer Bindungsstöchiometrie. Paip1 interagiert mit PABP in einem Verhältnis von 1:1, während die Interaktion von Paip2 mit PABP1 eine Stöchiometrie von 2:1 aufweist (Khaleghpour *et al.*, 2001a; Roy *et al.*, 2002; Kozlov *et al.*, 2004).

Ein weiterer Fall von zwei unabhängigen Bindemotiven für das Poly(A)-bindende Protein findet sich bei GW182 Proteinen, die eine zentrale Rolle bei der mikroRNA (miRNA)vermittelten RNA-Interferenz spielen. Sie dienen als Gerüstproteine und bewirken durch die Argonaut-Proteinen, Deadenylierungskomplexen und PABP Interaktion mit eine Stummschaltung und Deadenylierung der betroffenen mRNA (Huntzinger und Izaurralde, 2011; Zekri et al., 2013). GW182-Proteine können über zwei verschiedene Bereiche mit PABP interagieren: Zum einen über das PAM2-Motiv und zum anderen über das Zusammenspiel zweier getrennter Bereiche, der M2- und der C-terminalen Region. Interessant dabei ist, dass diese Bereiche je nach Organismus eine unterschiedliche Bedeutung besitzen. So ist in D. melanogaster das PAM2-Motiv von DmGW182 für eine Interaktion mit PABP nicht notwendig, sondern wird die Bindung hauptsächlich über die M2und die C-terminale Region vermittelt. Im Gegensatz dazu ist ein funktionelles PAM2-Motiv in den drei humanen GW182-Proteinen TNRC6A-C essentiell für eine Interaktion mit PABP. Die M2- und die C-terminale Region von DmGW182 interagieren mit den RRM-Domänen von PABP. Es zeigen sich jedoch Hinweise, dass die M2- und die C-terminale Region nur indirekt mit PABP interagieren und die Bindung über weitere Proteine vermittelt wird. Trotz der Unterschiede in der Interaktion mit PABP sind DmGW182 und TNRC6A-C in ihrer Funktion äquivalent und können jeweils den Verlust des anderen komplementieren (Zekri et al., 2009; Fabian et al., 2009; Huntzinger et al., 2010; Jinek et al., 2010; Kozlov et al., 2010b; Zekri et al., 2013).

Es lässt sich spekulieren, dass Upa1 über eine Bindung von Rrm4 mit den mRNPs interagiert und dass die über das PAM2-Motiv vermittelte Interaktion mit Pab1 nur unterstützend auf diesen Prozess wirkt. Diese Hypothese wird dadurch untermauert, dass viele Orthologe von Upa1 in anderen Basidiomyzeten kein PAM2-Motiv besitzen (Abb. 25). So findet sich das PAM2-Motiv nur in Upa1-Proteinen aus nahen Verwandten wie *Sporisorium reilianum* (*S. reilianum*), *Ustilago hordei (U. hordei)* und *Pseudozyma antarctica (P. antarctica)* (Abb. 25). Demzufolge ist es wahrscheinlich, dass dieses Motiv erst in der, aus evolutionärer Sicht, jüngeren Vergangenheit erworben worden ist.

Ein vergleichbarer Neuerwerb erfolgte bei La-verwandten RNA-bindenden Proteinen (LARPs, *La related proteins*). Die Verdoppelung der Gene für LARP4 in den Vertebraten und LARP6 in Pflanzen führte beispielsweise zu einem Erwerb von PAM2-Motiven bei den LARP und infolgedessen zu einer Neofunktionalisierung von diesen Proteinen. In Übereinstimmung

damit unterscheiden sich die PAM2-tragenden LARP6b und LARP6c in ihrer RNA-Bindung von LARP6a, welches kein PAM2-Motiv trägt. LARP6b und LARP6c können beide mit PABP interagieren, wobei die Bindung von LARP6c womöglich nicht nur über das PAM2-Motiv, sondern zusätzlich über weitere Bereiche des Proteins vermittelt werden könnte (Merret *et al.*, 2013). Interessanterweise weicht das PAM2-Motiv in LARP4 von der kanonischen Sequenz ab, indem es ein Tryptophan anstelle des ansonsten konservierten Phenylalanins an der Position 10 trägt. Die Assoziation dieses neuen Motivs (PAM2w) zu der MLLE-Domäne von PABP scheint jedoch dadurch nicht beeinträchtigt zu werden (Yang *et al.*, 2011).

Diese Ergebnisse suggerieren, dass der Erwerb der PAM2-Motive ebenfalls in Zusammenhang mit der Neofunktionalisierung der Upa1-Proteine stehen könnte. Diese sind vermutlich durch eine evolutionäre Anpassung eines endosomalen Pib1p-verwandten Proteins (Abb. 25) entstanden und haben dabei Funktionen in dem Endosomen-gekoppelten Langstreckentransport von mRNA erworben. Die Upa1-Proteine unterscheiden sich dabei von Pib1p durch eine N-terminale Erweiterung und den Besitz von Ankyrin-Wiederholungen. Es könnte sein, dass Upa1-verwandte Proteine aus der Fusion von zwei einzelnen Proteinen entstanden sind. So besitzt *Piriformospora indica (P. indica)* zwei Proteine, von denen eins Homologien zu dem N-terminalen Teil von Upa1 aufweist und eines mit dem C-terminalen Bereich (Abb. 25). Der Neuerwerb des N-terminalen PAM2-Motivs von Upa1 Proteinen in Ustilaginomyzeten könnte die Bindung an die mRNP-Komplexe unterstützen oder eine Feinregulation des Transports ermöglichen. Nichtsdestotrotz ist dieses PAM2-Motiv vermutlich aufgrund des jüngst geschehenen, evolutionären Neuerwerbs nicht essentiell für die Funktion von Upa1.



Abbildung 25: Homologe von Rrm4 und Upa1 in anderen Organismen. Abgebildet sind homologe Proteine von Rrm4 (links) und Upa1 (rechts) in folgenden Organismen: *Sporisorium reilianum* (*S.r.*), *Ustilago hordei* (*U.h.*), *Pseudozyma antarctica* (*P.a.*), *Coprinopsis cinerea* (*C.c.*), *Coniophora putanea* (*C.p.*), *Punctularia strigosozonata* (*P.s.*), *Trametes versicolor* (*T.v.*), *Auricularia delicata* (*A.d.*), *Laccaria bicolor* (*L.b.*), *Piriformospora indica* (*P.i.*), *Malassezia globosa* (*M.g.*), *Saccharomyces cerevisiae* (*S.c.*), *Schizosaccharomyces pombe* (*S.p.*), *Aspergillus nidulans* (*A.n.*), *Neurospora crassa* (*N.c.*) und *Homo sapiens* (*H.s.*). NCBI Refseq- (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/) oder UniProt (www.uniprot.org/)-Identifikationsnummern sind angegeben. In *M.g., S.c., S.p., C.a., A.n., N.c.* und *H.s.* konnte kein eindeutiges Homolog von Rrm4 identifiziert werden. In *P.i.* zeigen zwei Proteine Homologien zu Upa1. Das menschliche Homolog zu Upa1 (*H.s.* NP_001017368.1; Rififylin) ist dunkler dargestellt, da es keine Ähnlichkeit in der Aminosäuresequenz besitzt, sondern lediglich eine ähnliche Domänenstruktur aufweist. In dieser Darstellung befindet sich der C-Terminus aller Proteine rechts. Der Größenmaßstab entspricht 200 Aminosäuren (AS).

3.3.2 Die Bedeutung der Ankyrin-Wiederholungen für die Stabilität von Upa1

Upa1 besitzt neben den bisher beschriebenen Domänen zudem fünf Ankyrin-Wiederholungen. In dieser Arbeit konnte die Funktion dieser Wiederholungen nicht näher untersucht werden, da eine genetische Entfernung dieses Bereiches zu einer drastisch verminderten Proteinmenge in der Zelle führte. Vermutlich ist dies auf eine reduzierte Stabilität der Proteinvarianten zurückzuführen.

Ankyrin-Wiederholungen sind eine der häufigsten Aminosäuremotive in Proteinen (Mosavi et al., 2004). Diese aus ungefähr 33 Aminosäuren bestehende Sequenz wurde zunächst in Swi6p, einem Zellzyklus-regulierendem Protein aus S. cerevisiae, sowie Notch in D. melanogaster identifiziert (Breeden und Nasmyth, 1987). Der Name dieses Motivs leitet sich jedoch von dem menschlichen Zytoskelettprotein Ankyrin ab, das 24 Wiederholungen dieser Sequenz besitzt (Lux et al., 1990; Mosavi et al., 2004). Dieses Wiederholungsmotiv ist weit verbreitet und findet sich von Viren bis Menschen in einer Vielzahl unterschiedlichster Organismen (Sedgwick und Smerdon, 1999). Es kann in nukleären, zytosolischen, membrangebundenen sowie sekretierten Proteinen, wie dem Toxin der schwarzen Witwe vorkommen (Kohl et al., 2003). Ankyrin-Wiederholungen besitzen keine enzymatische Aktivität, sondern vermitteln Protein-Protein-Interaktionen (Li et al., 2006). Im Gegensatz zu anderen Protein-bindenden Domänen, wie SH2 und SH3, binden die modularen Ankyrin-Wiederholungen keine definierte Erkennungssequenz, sondern passen sich jeweils an den Interaktionspartner an (Kohl et al., 2003; Mosavi et al., 2004). Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass Proteine mit Ankyrin-Wiederholungen eine hohe thermodynamische Stabilität besitzen (Kohl et al., 2003). Dieses Ergebnis gibt einen Hinweis darauf, dass die Entfernung dieser Domäne aus Upa1 zu einer reduzierten Stabilität des Proteins geführt haben könnte. Aufgrund der großen Vielfalt von Proteinen mit Ankyrin-Wiederholungen und deren Interaktionspartnern kann die Funktion dieser Domäne in Upa1 jedoch nicht vorhergesagt werden. Es lässt sich lediglich spekulieren, dass sie die Bindung von Upa1 mit einem weiteren Protein vermittelt.

3.3.3 Upa1 bindet über die FYVE-Domäne an Endosomen

Upa1 trägt im C-terminalen Bereich eine RING-Finger- sowie eine FYVE-Domäne. Die RING-Finger (RNF, *really interesting new gene*)-Domäne ist charakteristisch für die Klasse der RNF-E3-Ubiquitin-Ligasen. Diese übertragen in Zusammenarbeit mit den Komponenten E1 und E2 das konservierte Polypeptid Ubiquitin auf Zielproteine. Die Ubiquitinierung von Proteinen reguliert viele zelluläre Prozesse, wie den Proteasom-abhängigen Abbau von markierten Peptiden und die Transkription (Li *et al.*, 2008; Metzger *et al.*, 2012). Darüber hinaus ist Ubiquitin ein Schlüsselsignal im Membrantransport und dabei speziell für die Sortierung in Multivesikuläre Körper verantwortlich (Hochstrasser, 2009; Gould und

Lippincott-Schwartz, 2009). In dieser Arbeit wurde nicht getestet, ob Upa1 eine E3 Ubiquitin-Ligase Aktivität zeigt, was aber aufgrund der hohen Sequenzähnlichkeit zu den RNF-Domänen anderer Proteine wahrscheinlich ist (Daten nicht gezeigt). Die Deletion des RING-Fingers resultierte in keinem biologischen Defekt, so dass eine mögliche Ubiquitin-Ligase-Aktivität unter den gegebenen Bedingungen entweder nicht von Bedeutung war oder dass diese Funktion von redundanten Ubiquitin-Ligasen übernommen wurde.

Upa1 lokalisierte ausschließlich an sich bewegenden Endosomen, nicht aber an Vakuolen. Die FYVE-Domäne von Upa1 war für die Assoziation mit diesen Organellen und die Funktion des Proteins notwendig. Die Deletion der FYVE-Domäne von Upa1 führte zu einem bipolaren Filamentwachstum und einer gestörten unkonventionellen Sekretion der Endochitinase Cts1. Der Verlust von Upa1 wirkte sich dabei nicht auf die Bewegung und Funktion der Endosomen aus, sondern resultierte ausschließlich in einem gestörten Langstreckentransport von mRNP-Komplexen. In Übereinstimmung damit hatte die Deletion von *rrm4* und *upa1* keinen Effekt auf das Wachstum der Sporidien, während der koordinierte Transport von Endosomen für diesen Prozess notwendig ist (Wedlich-Söldner *et al.*, 2000; Wedlich-Söldner *et al.*, 2002; Schink und Bölker, 2009).

Die FYVE-Domäne bindet mit hoher Affinität an Phosphatidylinositol-3-Phosphat (Pl₃P). Dieses Lipid findet sich vorwiegend in den Membranen von frühen Endosomen, Phagosomen und internen Vesikeln, wodurch FYVE-Domänen-tragende Proteine an diese Organellen rekrutiert werden (Burd und Emr, 1998; Kutateladze, 2006). Die Bezeichnung FYVE leitet sich von den Proteinen Eab1, YotB, Vac1 und Eea1 ab, in denen diese Domäne zuerst identifiziert worden ist und die allesamt eine Rolle im Membrantransport spielen (Stenmark et al., 1996). Im Proteom des Menschen wurden 27 FYVE-tragenden Proteine identifiziert, während in S. cerevisiae nur fünf vorkommen (Stenmark et al., 2002). U. maydis besitzt sechs Gene für potentiell FYVE-tragende Proteine (um01215, um03862, um03883, um10152, um10465.2 und um12183 [Upa1]). Das Gen um10152 kodiert für Don1, ein GEF (guanine nucleotide exchange factor) des kleinen G-Proteins Cdc42, einem Hauptregulator der Zellpolarität in Eukaryoten. Don1 ist ein Mitglied der FGD1/Frabin-Familie, die GEF-Proteine mit einer C-terminalen FYVE-Domäne umfasst. Die FYVE-Domäne von Don1 ist sowohl für die Assoziation des Proteins mit Endosomen als auch für die Funktion des Proteins unter nativer Expression notwendig. Es wurde ein Modell vorgeschlagen, demzufolge der FYVE-Domänen-vermittelte Transport für einen effizienten Transport von Don1 zu dem Zielprotein Cdc42, welches sich in der Plasmamembran befindet, benötigt wird (Schink und Bölker, 2009).

Die Bäckerhefe *S. cerevisiae* besitzt kein Homolog von Don1, jedoch wurden in diesem Modellorganismus die biologische Funktion von drei der insgesamt fünf FYVE-Proteine weitestgehend aufgeklärt. Vac1p reguliert die Fusion von Vesikeln der Plasmamembran und

des Golgi-Apparates mit den Vakuolen, während Vps27p, eine Komponente der ESCRT-Maschinerie, eine Rolle am Transport von den Endosomen zu Lysosomen und Vakuolen spielt. Fab1p ist eine Phosphatidylinositol 5-Kinase und reguliert die Vesikelbildung und die Homöostase der Vakuolen (Burd und Emr, 1998; Stenmark et al., 2002; Kutateladze, 2006). Die Rolle von Pib2p (YGL023) ist dagegen kaum untersucht und die Rolle von Pib1p wenig verstanden. Pib1p (*PI*₃*P*-binding protein 1) weist eine große Ähnlichkeit zu dem C-terminalen Bereich von Upa1 auf (Abb. 25). Das 286 Aminosäuren große Protein besitzt am N-Terminus eine FYVE-Domäne und trägt am C-Terminus eine RING-Finger-Domäne, welche in vitro eine E3-Ubiquitin-Ligase-Aktivität aufweist. Die FYVE-Domäne von Pib1p ist sowohl notwendig als auch hinreichend, um das Protein an die Membran von Endosomen und Vakuolen zu rekrutieren, während sich eine Mutation der RING-Domäne nicht auf die Lokalisation des Proteins auswirkt (Burd und Emr, 1998; Shin et al., 2001). Interessanterweise konnte die Funktion von Pib1p bisher nicht vollständig aufgeklärt werden. Da die drei gut untersuchten FYVE-Proteine Vac1p, Vps27p und Fab1p für die Sortierung von endosomalen Proteinen benötigt werden, wurde für Pib1p eine ähnliche Funktion vermutet. Die Deletion von pib1 wirkt sich jedoch nicht auf die Rückführung des gut untersuchten Siderophortransporters Sit1 (siderophore iron transporter 1) aus (Erpapazoglou et al., 2008). Demgegenüber zeigt eine Doppeldeletion von pib1 und bsd2, welches für einen Adapter der HECT-Ubiquitin-Ligase Rsp5 kodiert, einen Defekt in dem Transport des internalisierten Mangantransporters Smf1 und der Uracilpermease Fur4 zu den Vakuolen, nicht jedoch in der Sortierung des Hexosetransporters Hxt6 (Nikko und Pelham, 2009). Daher besitzt Pib1p vermutlich eine redundante Funktion in dem Membrantransport von S. cerevisiae.

Interessanterweise konnte in *S. cerevisiae* ein Bezug zwischen Pib1p und dem RNA-Metabolismus über den Deadenylasekomplex Ccr4-Not-Caf1 hergestellt werden. Ccr4-Not-Caf1 ist ein Multiproteinkomplex, der aus neun Untereinheiten besteht und sowohl an der zytoplasmatischen Deadenylierung von mRNA, als auch an nukleären Prozessen wie der Transkriptionsregulation beteiligt ist (Assenholt *et al.*, 2011; Brook und Gray, 2012). Die Untereinheit Not4p besitzt eine RING-Finger-Domäne und weist eine Ubiquitin-Ligase-Aktivität *in vitro* auf. Die Bedeutung dieser Aktivität *in vivo* konnte bisher nicht abschließend geklärt werden, doch führt eine Doppeldeletion von *not4* und *pib1* zu einem synthetisch lethalen Phänotyp in *S. cerevisiae*. Diese Beobachtung lässt auf eine funktionelle Redundanz der beiden Ubiquitin-Ligasen oder eine anderweitige Beziehung der beiden Proteine zueinander schließen (Mulder *et al.*, 2007).

Pib1p und Upa1 gleichen sich ebenfalls in physikalischen Eigenschaften. So wird Pib1p als ein sehr stabiles Protein beschrieben, das zudem in einer SDS-PAGE deutlich höher läuft als vorhergesagt (Shin *et al.*, 2001). Dies trifft auch auf Upa1 zu, da in Western-Analysen im

Vergleich zu Rrm4 kaum Abbaubanden des Proteins beobachtet werden konnten und Upa1 höher läuft als vorhergesagt.

Im Genom des Menschen konnte bisher kein Ortholog von Pib1p (Li et al., 2008) oder Upa1 identifiziert werden. Allerdings zeigt das humane Rififylin (RING Finger and FYVE-like domain-containing protein, auch als Rffl oder CARP2 bezeichnet) eine vergleichbare Domänenstruktur mit einer N-terminalen FYVE-Domäne und einer C-terminalen RING-Finger-Domäne (Coumailleau et al., 2004; McDonald und El-Deiry, 2004) auf. Eine Überexpression von Rffl führt zu einem Defekt in dem endozytotischen Membrantransport und resultiert in einer Akkumulation von Rab5- und Rab11-positiven Organellen in einer perinukleären Region. Eine Deletion des RING-Fingers zeigt keinen Einfluss auf den Phänotyp der Überexpression, während die FYVE-Domäne sowohl für die Lokalisation von Rffl in den Rab5-positiven Strukturen als auch für den Transportdefekt notwendig ist (Coumailleau et al., 2004). Im Gegensatz zu Pib1p konnten einige Substrate der Ubiguitin-Ligase-Aktivität von Rffl identifiziert werden. So ubiquitiniert Rffl den Tumor-Suppressor p53 und den Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF α)-Komplex nach dessen Internalisierung in Endosomen (Yang et al., 2007; Liao et al., 2008). Neueste Studien belegen zudem eine Beteiligung von Rffl an dem Signaltransduktionsweg von mTORC2 in Abhängigkeit von Lysophosphatsäure (LPA) (Gan et al., 2012). Inwieweit sich diese Ergebnisse auf Pib1p und Upa1 übertragen lassen ist nicht klar, doch scheint Rffl vorwiegend eine wichtige Rolle in dem Membrantransport zu spielen, während Upa1 von zentraler Bedeutung für den mRNA-Transport ist.

Es wäre möglich, dass Upa1 als regulatorischer Schalter die Signalwege von Endosomen und mRNA-Transport verbindet. Durch spezifische Aktivierung könnte es die Rekrutierung der mRNP-Komplexe an die Endosomen einleiten. Es wäre möglich, dass Upa1 selbst durch weitere endosomale Proteine wie Rab5a gesteuert wird. Ein anschauliches Bild für solch eine Regulation bietet die Interaktion von Rab5 und dem FYVE-Domänen-Protein Eea1 (*early endosomal antigen 1*) in menschlichen Zellen. Eea1 kann über zwei Rab5-abhängige Mechanismen an Endosomen rekrutiert werden. Einerseits interagiert Rab5 direkt mit Eea1, andererseits steuert Rab5 die lokale Aktivität der Phosphoinositid-3-Kinase Vps34. Diese synthetisiert Pl₃P, welches wiederum von der FYVE-Domäne von Eea1 gebunden wird. An den Endosomen reguliert Eea1 daraufhin die Fusion dieser Organellen (Simonsen *et al.*, 1998; Backer, 2008). *U. maydis* besitzt kein Homolog von Eea1, jedoch binden sowohl Upa1 und Rrm4 an Rab5a-positive Endosomen. Rab5a könnte folglich über Upa1 die Assoziation von Rrm4-abhängigen mRNP an die Endosomen regulieren.

Die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Ergebnisse deuten darauf hin, dass Upa1 an der Rekrutierung der mRNP-Komplexe an mobile Endosomen beteiligt ist. Jedoch assoziierte Rrm4 auch in Abwesenheit von Upa1 noch mit den Transporteinheiten, sodass wahrscheinlich weitere Adapterproteine an diesem Prozess beteiligt sind. Dessen ungeachtet ist Upa1 eine neuartige endosomale Komponente, die spezifisch für die mRNA-Transportfunktion der Endosomen zu sein scheint.

3.4 Die Rolle von Upa2 im mRNA-Langstreckentransport

3.4.1 Upa2 ist eine zentrale Komponente der Rrm4-abhängigen mRNPs

Neben der Rolle von Upa1 wurde in der vorliegenden Arbeit auch die Funktion eines zweiten PAM2-tragenden Proteins, Upa2, an dem Langstreckentransport von mRNPs in U. maydis untersucht. Die Rekrutierung von Upa2 an die Endosomen ist abhängig von Rrm4. Mutationen in funktionell wichtigen Aminosäuren in der ersten RRM-Domäne sind ausreichend für eine Fehllokalisation von Upa2. Aus diesem Grund wurde zunächst vermutet, dass Upa2 über eine Interaktion mit Pab1 an die mRNA und über deren Bindung durch Rrm4 an die Endosomen rekrutiert wird. Es zeigte sich jedoch, dass die PAM2-Motive nicht notwendig sind, um Upa2 mit der Transportmaschinerie zu verbinden, sondern dass dies von dem C-terminalen Bereich des Proteins vermittelt wird. Dieser könnte ebenfalls mit Pab1 oder einem weiteren Protein des mRNP-Komplexes interagieren. Zudem besteht die Möglichkeit, dass Upa2 direkt RNA binden könnte. So weist die konservierte Domäne von unbekannter Funktion (DUF) im C-Terminus von Upa2 eine schwache Sequenzähnlichkeit mit der ATPase-Region von prokaryotischen Smc (structural maintenance of chromosomes)-Proteinen auf (Daten nicht gezeigt) und könnte somit eine Bindeaffinität zu Nukleinsäuren besitzen (Griese und Hopfner, 2011). Dies könnte in folgenden Studien mit verschiedenen Techniken, wie dem Hefe-Drei-Hybrid-System oder CLIP getestet werden (König et al., 2007; König *et al.*, 2009).

Upa2 ist wichtig für den Langstreckentransport von mRNPs in *U. maydis*. Die Deletion von *upa2* resultierte in gestörtem filamentösen Wachstum, einer verringerten Sekretion der Chitinase Cts1, sowie einer Verringerung der Anzahl und Signalintensität von mobilen Pab1-mRNPs. Aufgrund dieser Ergebnisse stellt sich die Frage nach der Funktion von Upa2. Eine auffällige Eigenschaft dieses Proteins ist, dass es vier potentielle PAM2-Motive besitzt. Bisher wurden nur PAM2-tragende Proteine identifiziert, die maximal zwei dieser Motive besitzen (Albrecht und Lengauer, 2004; Bravo *et al.*, 2005) und in dem speziellen Fall von Tob2 konnte gezeigt werden, dass nur eines von zwei PAM2-Motiven eine Bindung mit PABP eingehen kann (Funakoshi *et al.*, 2007). Obwohl das zweite PAM2-Motiv von Upa2 einen Aminosäureaustausch des konservierten Prolin12 (P12) zu Phenylalanin besitzt, kann vermutet werden, dass dieses noch funktionell ist (Kozlov *et al.*, 2004). Die Interaktion zwischen MLLE und PAM2 geschieht mit einer Stöchiometrie von 1:1, so dass stets nur ein PAM2-Protein an eine MLLE-Domäne binden kann (Kozlov *et al.*, 2004; Kozlov *et al.*, 2010a;

Kozlov *et al.*, 2010b). In Übereinstimmung damit wurde gezeigt, dass eRF3 mit den Deadenylasekomplexen Pan2-Pan3 und Ccr4-Not1-Caf1 um die Bindung an PABP konkurriert und somit die Deadenylierung von mRNA in einer Translations-abhängigen Art und Weise reguliert (Funakoshi *et al.*, 2007). Da Upa2 jedoch ein Protein ist, das gleich mehrere PAM2-Motive besitzt und diese im Hefe-Zwei-Hybrid-System nur mit Pab1 interagieren, ist zu vermuten, dass Upa2 eine simultane Interaktion mit mehreren Pab1-Molekülen eingeht. Somit könnte Upa2 die Funktion eines Gerüstproteins in den mRNPs einnehmen und diese Komplexe strukturell stabilisieren. In Übereinstimmung damit beeinträchtigt die Deletion von *upa2* nicht die Geschwindigkeit und Prozessivität der mRNPs, sondern sie führt zu einer verringerten Anzahl an mobilen Pab1-Partikeln mit schwächerer Signalintensität. Neben einer potentiell strukturellen Aufgabe könnte Upa2 jedoch auch die Funktion der transportierten Pab1-Moleküle regulieren.

Obwohl das Poly(A)-bindende Protein eines der am stärksten exprimierten RNA-bindenden Proteine in der eukaryotischen Zelle ist, wurde dessen Rolle am Langstreckentransport von mRNAs bisher wenig untersucht. So wurden in zwei detaillierten biochemischen Charakterisierungen von Staufen-enthaltenen mRNP-Komplexen zahlreiche RNA-bindenden Proteine identifiziert, allerdings wurde dabei kein assoziiertes Poly(A)-bindendes Protein in den Komplexen gefunden (Mallardo et al., 2003; Kanai et al., 2004). Vermutlich ist dies auf einen partiellen Abbau der RNA-Fracht zurückzuführen, denn Villacé et al. (2004) konnten mit Hilfe einer biochemischen Tandem-Affinitätsreingung des hStaufen sowohl PABP als auch Ribosomen in diesen Komplexen identifizieren. was auf eine aktive Translationskontrolle in den transportierten mRNPs hinweist. Desweiteren wurden in IMP1abhängigen mRNPs und RNA-Komplexen aus dem Rattengehirn PABP-Proteine gefunden, ohne dass deren Bedeutung in diesem Prozess jedoch näher untersucht worden ist (Elvira et al., 2006; Jønson et al., 2007).

Die wichtigste Funktion von PABP1 ist die Interaktion mit eIF4G und die daraus resultierende Bildung der "geschlossenen Ring"-Struktur der mRNA. Diese Struktur steigert die Translation des gebundenen Transkripts und schützt die mRNA vor einem Abbau (Gorgoni und Gray, 2004; Brook *et al.*, 2009). Die Deadenylierung ist der initiale und Geschwindigkeitsbestimmende Schritt bei dem enzymatischen Abbau von mRNA. PABP dient einerseits als sterischer Schutz des Poly(A)-Anhangs vor den zytoplasmatischen Deadenylasekomplexen und reguliert andererseits deren Aktivität durch eine direkte Interaktion mit diesen (Brook und Gray, 2012). Die Interaktion von PABP mit dem Poly(A)-Anhang ist dementsprechend der bestimmende Faktor für die Stabilität einer mRNA (Bernstein *et al.*, 1989).

Die durchschnittliche Länge des Poly(A)-Anhangs in *U. maydis* wurde bislang nicht ermittelt, doch in der Spalthefe *Schizosaccharomyces pombe* beträgt dieser 40 nt, in der Bäckerhefe *S. cerevisiae* 70 nt und in Menschen ungefähr 200 bis 250 nt (Wahle und Keller, 1992;

Lackner et al., 2007; Lemay et al., 2010). Für eine Bindung von Poly(A)-bindenden Proteinen sind zwölf Adenosine notwendig, doch bedecken PABP-Moleküle insgesamt einen Bereich von ungefähr 27 Nukleotiden (Baer und Kornberg, 1980, 1983; Sachs et al., 1987; Gorgoni und Gray, 2004). Somit kann davon ausgegangen werden, dass an die Poly(A)-Anhänge der mRNAs von U. maydis bei einer spekulativen Länge von 60-90 nt zwei bis drei Pab1-Moleküle binden können. Die Rolle von Upa2 könnte darin bestehen, diese Proteine miteinander zu verknüpfen und somit die Stabilität des transportierten mRNP-Komplexes sicherzustellen. Eventuell könnte Upa2 dabei eine kooperative Bindung zweier PABP-Proteine unterstützen, wodurch der PABP-Poly(A)-Komplex stabilisiert wird (Lin et al., 2012). Es ist jedoch auch denkbar, dass Upa2 nicht nur die Pab1-Moleküle einer mRNA, sondern die mehrerer Transkripte miteinander verbindet. Jedoch ist bisher nicht geklärt, wie viele mRNAs sich an den Endosomen in U. maydis befinden. In S. cerevisiae werden mehrere lokalisierte Transkripte in derselben Transporteinheit in die sich bildende Tochterzelle befördert (Lange et al., 2008). Desweiteren wurde in den Neuronen von Säugetieren gezeigt, dass verschiedene mRNAs, die das gleiche A2RE-Lokalisationselement besitzen, in einem gemeinsamen Komplex zu den Dendriten befördert werden (Gao et al., 2008). In Übereinstimmung damit wurde ein Modell vorgeschlagen, in dem eukaryotische mRNP-Komplexe ein posttranskriptionelles Operon oder Regulon darstellen könnten. In diesen könnten Transport, Stabilität, Lokalisation und Translation von funktionell verwandten mRNAs durch sequenzspezifische RNA-bindende Proteine in koordinierter Weise reguliert werden (Keene und Tenenbaum, 2002; Keene, 2007).

Demnach wäre es möglich, dass Rrm4 den Transport von zusammengehörigen mRNAs in gemeinsamen Transporteinheiten koordiniert. Auf diese Weise könnte die Zelle nicht nur einzelne Gene, sondern ganze Prozesse zeitlich und räumlich regulieren. Allerdings bindet Rrm4 als Schlüsselprotein des Langstreckentransports von mRNA vermutlich viele transportierte Transkripte und daher müssten zusätzliche Faktoren die spezifische Organisation und Regulation der mRNA-Fracht in den posttranskriptionellen Regulons vermitteln.

Darauf aufbauend kann spekuliert werden, dass über Pab1 eine lokale Translation der Transkripte in diesem Komplexen gesteuert werden kann. Neueste Studien anhand der lokalisierten mRNA des Septins Cdc3 legen nahe, dass in *U. maydis* eine lokale Translation bestimmter Transkripte an den Endosomen nicht nur möglich ist, sondern dass dieser Prozess für einen effizienten Zusammenbau komplexer Multiproteinkomplexe, wie etwa der Heterooktamere von Septinen, benötigt wird (Baumann *et al.*, 2013). Dies impliziert gleichzeitig, dass die Transkripte der drei weiteren Septine von *U. maydis*, die für den Aufbau der Oktamere benötigt werden, ebenfalls mit der *cdc3* mRNA in einem Komplex transportiert werden müssten (Baumann *et al.*, 2013). Upa2 könnte durch die simultane

Bindung von Pab1-Molekülen auf verschiedenen mRNAs die lokale Translation oder auch die lokale Entladung von diesen regulieren. Um dies zu überprüfen, sollte der Einfluss von Upa2 auf den Transport und die Translation der *cdc3* mRNA untersucht werden.

3.4.2 Upa2 interagiert mit Pab1

Aufgrund der vier potentiellen PAM2-Motive wurde zunächst vermutet, dass Upa2 mit Rrm4 interagiert oder als Gerüstprotein die MLLE-tragenden Proteine Rrm4 und Pab1 verbinden könnte. In Hefe-Zwei-Hybrid-Experimenten interagierte Upa2 jedoch lediglich mit Pab1 und nicht mit Rrm4. Dieses Ergebnis ist unerwartet, da Upa2 ausschließlich in Rrm4-abhängigen mRNP-Komplexen lokalisiert. Die fehlende Interaktion von Upa2 und Rrm4 in dem Hefe-Zwei-Hybrid-System bestätigt jedoch die Beobachtung, dass beide Proteine auch bei einer Mutation der MLLE-Domäne von Rrm4 (Rrm4^{mM}) kolokalisieren. Es ist allerdings möglich, dass Upa2 und Rrm4 in *U. maydis* über eine PAM2-MLLE-Bindung interagieren, dieses jedoch unter den Bedingungen des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems nicht getestet werden kann.

So wurde gezeigt, dass die Interaktion zwischen der MLLE-Domäne und dem PAM2-Motiv in anderen Organismen durch posttranslationale Modifikationen reguliert werden kann. In humanen Zellen kann das K606 in der MLLE-Domäne von PABP durch posttranslationale Modifikationen sowohl dimethyliert als auch acetyliert vorliegen. Mithilfe von Modellanalysen und Strukturvorhersagen wurde postuliert, dass eine Dimethylierung lediglich geringe Auswirkungen auf die Interaktion zwischen MLLE und PAM2 hätte, eine Acetylierung des K606 jedoch eine Bindung an das PAM2-Motiv von Paip2 stärken würde (Brook et al., 2012). Somit stellen posttranslationale Modifikationen einen möglichen Mechanismus dar, um die Interaktion der MLLE-Domäne mit verschiedenen PAM2-tragenden Proteinen zu regulieren. Interessanterweise ist das K606 in den MLLE-Domänen von Pab1 und Rrm4 konserviert (vgl. Abb. 24, Sternchen), wodurch eine vergleichbare Modifikation dieser Proteine vermutet werden kann. Die Ergebnisse der Hefe-Zwei-Hybrid-Analysen könnten so interpretiert werden, dass eine Interaktion der unmodifizierten MLLE-Domäne von Pab1 und den PAM2-Motiven von Upa2 und auch Upa1 stark genug ist, damit diese in dem Hefe-Zwei-Hybrid-System nachgewiesen werden kann, jedoch eine Bindung an die MLLE-Domäne von Rrm4 möglicherweise erst nach Modifikation von dieser erfolgen kann. In diesem Zusammenhang ist es bemerkenswert, dass in der MLLE-Domäne von Pab1p aus S. cerevisiae das Lysin an Position 606 durch einen Austausch mit Histidin ersetzt worden ist und somit vermutlich nicht durch eine vergleichbare Modifikation reguliert wird. Es lässt sich spekulieren, dass aus diesem Grund ebenfalls die enzymatischen Mechanismen fehlen könnten, um die MLLE-Domänen von Rrm4 und Pab1 in der Bäckerhefe zu modifizieren.

Eine neue Studie belegt zudem, dass auch PAM2-tragende Proteine posttranslational modifiziert werden. In vielen dieser Proteine liegen PAM2-Motive vorwiegend in intrinsisch ungeordneten Bereichen (IDR, *intrinsic disordered regions*) und sind häufig von einer großen Anzahl phosphorylierbarer Aminosäuren umgeben. Eine Dephosphorylierung der getesteten PAM2-Proteine Tob2, Pan3 und TNRC6C stärkte dabei die Bindung von diesen zu PABP. Eine Phosphorylierung oder die Expression phosphomimetischer Mutanten führte dementsprechend zu einer schwächeren Interaktion dieser Proteine mit der MLLE-Domäne von PABP (Huang *et al.*, 2013). Die PAM2-Motive von Upa2 befinden sich ebenfalls in IDR (Daten nicht gezeigt) und könnten somit einer vergleichbaren Regulation durch Phosphorylierung unterworfen sein. Die Erkenntnisse über die Proteinmodifikationen sowohl von MLLE- als auch von PAM2-tragenden Proteinen sollten genutzt werden, um diese Form der Regulation in Bezug auf den Langstreckentransport von mRNA in *U. maydis* weiterführend zu untersuchen.

3.5 Neue Aspekte im Modell des Endosomen-gekoppelten mRNA-Transports

Der Mikrotubuli-abhängige mRNA-Transport ist essentiell für ein effizientes unipolares Filamentwachstum von U. maydis (Becht et al., 2006). Rrm4 ist dabei das entscheidende Schlüsselprotein in diesem Prozess. Es bindet Transkripte und bildet mit der polyadenylierten mRNA, Pab1 und weiteren Proteinen ("X, Y", Abb. 26) große mRNP-Komplexe. Über Rrm4 werden die mRNPs mit der Transportmaschinerie verbunden. Die Rrm4-abhängigen mRNPs bewegen sich in Filamenten bidirektional in anterograder und retrograder Richtung ohne an den Zellpolen zu akkumulieren (Becht et al., 2006; König et al., 2009). In dieser vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass Kin3 der Plus-End-gerichtete Motor des Langstreckentransports von mRNA in U. maydis ist. Zeitgleich wurde Dynein als Motorprotein für den retrograden Transport der mRNPs identifiziert (Baumann et al., 2012). Interessanterweise sind die gleichen molekularen Motoren auch an dem Transport von frühen Endosomen in U. maydis beteiligt und die Rrm4-abhängigen mRNPs werden zusammen mit diesen Endosomen kotransportiert (Baumann et al., 2012). Darauf aufbauend wurde für U. maydis postuliert, dass die Rrm4-abhängigen mRNP-Komplexe an die Endosomen binden und mit diesen "per Anhalter" passiv transportiert werden. Übereinstimmend damit ist der Transport von Rrm4 abhängig von dem Transport der Endosomen, nicht jedoch umgekehrt (Baumann et al., 2012). Die Endosomen dienen als Transportplattform für die mRNP-Komplexe und stellen dabei den Kontakt mit der Mikrotubuli-abhängigen Transportmaschinerie bestehend aus den molekularen Motoren Kin3 und Dynein her. Aus evolutionärer Sicht scheint der Mechanismus des Kotransports von Rrm4 mit den Endosomen sinnvoll, da die bereits bestehende Transportmaschinerie der Membranorganellen für die Beförderung von mRNPs genutzt wird. Dies hat jedoch zur Folge,

85

dass die mRNA-Lokalisierung nicht auf der Ebene der molekularen Motorproteine reguliert werden kann, sondern die Assoziation der mRNPs mit den Endosomen gesteuert werden muss. Rrm4 besitzt dabei zwei wichtige Funktionen in diesem Prozess, indem es die transportierten mRNP-Komplexe bildet und diese mit der Transportmaschinerie verbindet, wobei letzteres durch die C-terminale MLLE-Domäne von Rrm4 vermittelt wird. Die MLLE-Domäne interagiert mit dem PAM2-Motiv und aus diesem Grund wurde postuliert, dass ein PAM2-tragendes Protein als Adaptermolekül die Rrm4-abhängigen mRNP-Komplexe an die Endosomen rekrutiert. Upa1 spielt hierbei eine wichtige Rolle, da es sowohl mit Rrm4 interagiert, als auch mit der FYVE-Domäne an Endosomen bindet. Zudem kann Upa1 mit dessen PAM2-Motiv mit Pab1 interagieren und so den Komplex zusätzlich stabilisieren. Bei Verlust von Upa1 ist der Transport von Rrm4 nicht völlig gestört, jedoch lokalisiert ein großer Anteil von Rrm4 in nicht-prozessiven Akkumulationen, was auf eine Abtrennung des Proteins von den Endosomen hinweist. Aus diesem Grund scheint ein weiterer Adapter die Rekrutierung von Rrm4 an die Endosomen zu vermitteln. Dieser wird vorläufig als Protein "X" bezeichnet und könnte in Kooperation mit Upa1 oder auch unabhängig von diesem funktionieren (Abb. 26).

Upa2 dagegen ist nicht an der Verbindung zwischen Rrm4 und Endosomen beteiligt. Aufgrund seiner Größe, der multiplen PAM2-Motive und der nachgewiesenen Interaktion mit Pab1, ist Upa2 vermutlich ein Gerüstprotein, welches für die Stabilität der mRNPs verantwortlich ist (Abb. 26). Zudem wäre es denkbar, dass Upa2 darüber hinaus Pab1abhängige Prozesse wie Translation und Stabilität der Transkripte in den mRNP reguliert. Der Mechanismus der mRNA-Lokalisierung in *U. maydis* mit einer bidirektionalen Bewegung der Transporteinheiten ohne eine sichtbare Akkumulation von mRNA erinnert dabei an das von Doyle und Kiebler aufgestellte Sushi-Fließband-Modell (Doyle und Kiebler, 2011). Demnach werden in einem japanischen Restaurant, die Sushi-Portionen auf einem Fließband zu den Kunden befördert, die sich bei Bedarf das bevorzugte Sushi herunternehmen (Doyle und Kiebler, 2011). In Analogie dazu bewegen sich die mRNP-Komplexe bidirektional in den Filamenten, sodass sie sämtliche Bereiche der Zelle erreichen. Werden die transportierten Transkripte an einem bestimmten Bereich benötigt, werden diese abgeladen und lokal translatiert.

Neueste Studien suggerieren zudem, dass bestimmte Transkripte noch während des Transports an den Endosomen translatiert werden (Baumann *et al.*, 2013). Demnach müsste das Sushi-Fließband-Modell modifiziert werden, indem nicht nur die mRNA, sondern auch neu translatierte Proteine durch die Zelle transportiert werden, bis sie in einem bestimmten Bereich abgeladen werden.

86



Abbildung 26: Das Modell des Endosomen-gekoppelten mRNA-Transports. Das obere Bild zeigt eine schematische Darstellung eines Filaments von *U. maydis*. Blaue Linien repräsentieren das Mikrotubuli-Zytoskelett, das in der Zellmitte antipolar ausgerichtet ist und nur im Bereich der Zellpole eine unipolare Orientierung aufweist. Die molekularen Motoren Kin3 und Dynein transportieren Endosomen und daran gebundene mRNPs entlang des Mikrotubuli-Zytoskeletts. Auf diese Weise kann eine lokale Translation und somit auch Lokalisation der Proteine (rot) erreicht werden. Das untere Bild stellt den mRNP-Komplex dar. Die Endosomen dienen (unter anderem) als Transportplattform für die Rrm4-abhängigen mRNPs und verbinden diese mit den molekularen Motoren Kin3 und Dynein. Upa1 bindet sowohl Rrm4 als auch Pab1 und ist an der Rekrutierung der beiden RNA-bindenden Proteine beteiligt. Ein weiteres Adapterprotein (X) ist für die Rekrutierung von Rrm4 notwendig. An die mRNA binden weitere regulatorische Proteine (Y). Upa2 interagiert mit Pab1-Molekülen, die an den Poly(A)-Anhang der transportierten mRNA binden. Es wird nur eine mRNA gezeigt, doch ist es möglich, dass Upa2 an die Pab1-Moleküle von mehreren mRNAs bindet. Upa2 ist entweder an der Regulation von Pab1 beteiligt oder besitzt strukturelle Funktionen in den mRNPs (modifiziert nach Vollmeister *et al.* (2012b)).

3.6 Ausblick

Innerhalb der vorliegenden Arbeit konnten grundlegende Erkenntnisse über die Lokalisierung von mRNA in dem Modellorganismus *U. maydis* gewonnen werden. Infolgedessen wurde das Modell der Endosomen-gekoppelten mRNA-Langstreckentransports postuliert und mit dem molekularen Motor Kin3 sowie den PAM2-tragenden Proteinen Upa1 und Upa2 beteiligte Faktoren identifiziert. Dennoch sind viele Aspekte von diesem Prozess nicht aufgeklärt. So muss mindestens ein weiteres Adapterprotein ("X") existieren, welches Rrm4 an die Endosomen rekrutiert (Abb. 26). Da die MLLE-Domäne essentiell für die Rekrutierung von Rrm4 an die Transportmaschinerie ist, handelt es sich bei diesem Adapterprotein vermutlich um ein PAM2-tragendes Protein. Die bisherige Analyse hat gezeigt, dass zwei von drei untersuchten Kandidaten der insgesamt 14 identifizierten PAM2-tragenden Proteine an dem Langstreckentransport von mRNA in *U. maydis* beteiligt sind. Die in dieser Arbeit gewonnen Ergebnisse deuten darauf hin, dass Upa1 und Upa2 eine zentrale Funktion in diesem Prozess innehaben und dabei auf unterschiedlichen Ebenen wirken. Dennoch

müssen weitere Experimente folgen, um die genaue Funktion dieser PAM2-Proteine aufzuklären.

Es wäre interessant, einen Stamm mit der Doppeldeletion von *upa1/upa2* hinsichtlich des mRNA-Transports, des filamentösen Wachstums und der Sekretion der Endochitinase Cts1 zu untersuchen. Dies könnte aufdecken, inwiefern die beiden Proteine den mRNA-Transport auf derselben Ebene oder auf unterschiedliche Weise regulieren.

Viele Erkenntnisse könnten zudem über weiterführende Interaktionsstudien gewonnen werden. So muss verifiziert werden, ob Rrm4 und Upa1 tatsächlich miteinander interagieren und über welche Bereiche diese Interaktion erfolgt. Infolgedessen könnte eine Interaktion beider Proteine über eine GST-Aufreinigung in *E. coli* nachgewiesen werden. Dies hätte gegenüber dem Hefe-Zwei-Hybrid-System den Vorteil, dass zwischen einer direkten oder indirekten Bindung unterschieden werden könnte. Durch die Verwendung verkürzter Proteinvarianten könnte auch die genaue Bindungsregion identifiziert werden. In diesem Zusammenhang ist es interessant, dass anhand von Deletionsanalysen der Bereich einer möglichen Bindung eingegrenzt wurde und sich in diesem eine Ansammlung von sauren Aminosäuren befindet (AS 720-969, Daten nicht gezeigt). Zudem muss geprüft werden, ob Upa1 an die MLLE-Domäne von Rrm4 oder an einen anderen Bereich dieses Proteins bindet. Darüber hinaus ist nicht geklärt, wie Upa2 mit den mRNPs assoziiert und welche Rolle die verschiedenen PAM2-Motive spielen. Aufgrund der vielversprechenden Ergebnisse dieser Arbeit sollte außerdem die Funktion der weiteren 11 PAM2-tragenden Proteine hinsichtlich einer Beteiligung an dem Langstreckentransport von mRNA untersucht werden.

Neben diesen detaillierten Fragen sollten zudem grundsätzliche Eigenschaften des Endosomen-gekoppelten mRNA-Transports analysiert werden. So wurde bisher nicht ergründet, wie viele mRNAs an den Endosomen transportiert werden. Zudem könnte eine Bestimmung der Länge der Poly(A)-Anhänge in *U. maydis* Aufschluss darüber geben, wie viele Moleküle von Pab1 an eine transportierte mRNA binden. Eine zentrale Fragestellung ist nach wie vor, welche Funktion der Prozess des mRNA-Transports für die Filamentbildung und nicht-konventionelle Sekretion von *U. maydis* hat und ob dabei das oben postulierte Sushi-Fließband-Modell zutreffend ist. Von besonderer Bedeutung ist dabei, ob die lokale Translation auf wenige spezielle Proteine wie Septine beschränkt ist, oder ob weitere mRNAs lokal an den Endosomen translatiert werden (Baumann *et al.*, 2013).

Vertiefende Studien über den mRNA-Transport in *U. maydis* können schließlich dazu beitragen, ein besseres Verständnis über die verschiedenen Mechanismen der mRNA-Lokalisatierung in Eukaryoten zu erlangen und können helfen, die Beteiligung des Membrantransports an diesen Prozessen aufzuklären.

4. Material und Methoden

4.1 Materialien und Bezugsquellen

4.1.1 Lösungen, Medien, Enzyme, Kits und Chemikalien

Chemikalien: Die verwendeten Chemikalien wurden von den folgenden Firmen bezogen: Applichem GmbH (Darmstadt Deutschland)

	(Dannstaat, Deatschland)
Biozym Scientific GmbH	(Hessisch Oldendorf, Deutschland)
Beckton Dickinson	(Franklin Lakes, NJ,USA)
Carl Roth	(Karlsruhe, Deutschland)
Duchefa	(Haarlem, Niederlande)
GE Healthcare	(Little Chalfont, England)
Gerbu	(Heidelberg, Deutschland)
Grüssing GmbH Analytika	(Filsum, Deutschland)
Honeywell Riedel-de-Haën	(Seelze, Deutschland)
Life Technologies	(Carlsbad, CA, USA)
Merck	(Darmstadt, Deutschland)
Roche	(Penzberg, Deutschland)
Serva	(Heidelberg, Deutschland)
Sigma-Aldrich	(St. Louis, MI, USA)
Thermo Fisher Scientific	(Waltham, MA, USA)
VWR	(Darmstadt, Deutschland)

Puffer und Lösungen: In dieser Arbeit wurden Standard-Puffer und Lösungen nach Ausubel (1987) und Sambrook (1989) hergestellt und verwendet. Für einige Methoden wurden spezielle Puffer verwendet und sind unter den zugehörigen Methoden beschrieben.

Medien:

<u>E. coli:</u>

E. coli wurde in dYT-Flüssigmedium und auf YT-Festmedium kultiviert (Ausubel, 1987; Sambrook, 1989). Die Medien wurden vor Verwendung für 5 min bei 121 °C autoklaviert.

YT-Medium

 $\begin{array}{l} (Sambrook, 1989) \\ 0,8\% \ (w/v) \ Trypton \\ 0,5\% \ (w/v) \ Yeast \ Extract \\ 0,5\% \ (w/v) \ NaCl \\ 1\% \ (w/v) \ Bacto \ Agar \ (für \ Festmedium) \\ In \ H_2O_{bid.} \end{array}$

dYT-Medium

(Sambrook, 1989) 1,6% (w/v) Trypton 1,0% (w/v) Hefeextrakt 0,5 % (w/v) NaCl In H₂O_{bid.}

Antibiotika wurden in folgender Konzentration eingesetzt: Ampicillin: 100 µg/ml Kanamycin: 25 µg/ml

<u>U. maydis:</u>

Für die Kultivierung von *U. maydis* wurden folgende Medien verwendet. Sofern nicht anders angegeben wurden diese 5 min bei 121 °C autoklaviert.

CM (Vollmedium)

(Holliday, 1974; Banuett und Herskowitz, 1989) 0,25% (w/v) Casaminosäuren 0,1% (w/v) Hefeextrakt 1,0% (v/v) Vitaminlösung (nach Holliday) 6,25% (v/v) Salzlösung (nach Holliday) 0,05% (w/v) DNA, degradiert (Sigma, D-3159) 0,15% (w/v) DNA, degradiert (Sigma, D-3159) 0,15% (w/v) NH₄NO₃ 2% (w/v) Bacto Agar (für Festmedien) In H₂O_{bid.}, mit NaOH auf pH 7,0 einstellen. <u>Nach dem Autoklavieren:</u> 1% (w/v) Glukose-Lösung (sterilfiltriert) hinzugeben.

NM (Nitratminimalmedium)

0,3% (w/v) KNO₃ 6,25% (v/v) Salzlösung In H₂O_{bid.}, mit KOH auf pH 7,0 einstellen. <u>Nach dem Autoklavieren:</u> 1% (w/v) Glukose-Lösung (sterilfiltriert) hinzugeben.

NSY-Glycerin (Für Glycerinkulturen)

0,8% (w/v) Nutrient Broth 0,1% (w/v) Hefeextrakt 0,5% (w/v) Saccharose 80% (v/v) 87% Glycerin In $H_2O_{\text{bid.}}$

Spurenelementlösung

 $\begin{array}{l} (\text{Holliday, 1974}) \\ 0,06\% \ (\text{w/v}) \ H_3BO_3 \\ 0,14\% \ (\text{w/v}) \ MnCl_2 \ x \ 4 \ H_2O \\ 0,4\% \ (\text{w/v}) \ ZnCl_2 \\ 0,4\% \ (\text{w/v}) \ Na_2MoO_4 \ x \ 2 \ H_2O \\ 0,1\% \ (\text{w/v}) \ FeCl_3 \ x \ 6 \ H_2O \\ 0,04\% \ (\text{w/v}) \ CuSO_4 \ x \ 5 \ H_2O \\ In \ H_2O_{\text{bid.}}, \ \text{sterilfiltrieren} \end{array}$

Antiobiotikakonzentrationen

Hygromycin (B) Nourseothricin Carboxin Geneticin

<u>Salzlösung</u>

(Holliday, 1974) 16,0‰ (w/v) KH₂PO₄ 4,0‰ (w/v) Na₂SO₄ 8,0‰ (w/v) KCI 1,32‰ (w/v) CaCl₂ x 2 H₂O 8,0‰ (v/v) Spurenelementlösung 1,0‰ (w/v) MgSO₄ (wasserfrei) In H₂O_{bid.}, sterilfiltrieren

<u>Vitaminlösung</u>

(Holliday, 1974)
0,1‰ (w/v) Thiamin (Hydrochlorid)
0,05‰ (w/v) Riboflavin
0,05‰ (w/v) Pyridoxin
0,2‰ (w/v) Calciumpantothenat
0,05‰ (w/v) p-Aminobenzoesäure
0,2‰ (w/v) Nicotinsäure
0,2‰ (w/v) Cholinchlorid
1‰ (w/v) (myo)-Inositol
In H₂O_{bid.}, sterilfiltrieren

YEPS-light-Medium

(modifiziert nach Tsukuda *et al.* (1988)) 1,0% (w/v) Hefeextrakt 0,4% (w/v) Pepton 0,4% (w/v) Saccharose In H₂O_{bid.}

Regenerationsagar

(Schulz *et al.*, 1990) (i) Top-Agar:

1,5% (w/v) Bacto Agar 1 M Sorbitol In YEPS-light-Medium wie (i), zusätzlich mit Antibiotikum

(ii) Bottom-Agar:

CM-Festmedium

200 μg/ml 150 μg/ml 2 μg/ml 500 μg/ml Regenerationsagar (Bottom) 400 μg/ml 300 μg/ml 4 μg/ml 1000 μg/ml

S. cerevisiae:

Für die Kultivierung von *S. cerevisiae* wurden folgende Medien verwendet, die, wenn nicht anders angegeben, 5 min bei 121 °C autoklaviert wurden.

SD- (*Synthetic Dropout*) und YPD-Hefemedien werden durch die Kombination von drei Einzelkomponenten hergestellt.

- 1) 200 ml 2x selektive SD-Nährlösung bzw. 2x YP-Nährlösung
- 2) 50 ml 20% Glukose
- 3) 250 ml H₂O für Flüssigmedien oder 10 g Agar in H₂O für Festmedien

(optional kann dem SD-leu-trp Medium 7,5 ml 0,2% Adenin-Hemisulfat hinzugefügt werden.)

SD-Grundmischung

Alanin	10 g
Arginin	10 g
Asparagin	10 g
Aspartat	10 g
Cystein	10 g
Glutamin	10 g
Glutamat	10 g
Glycin	10 g
(myo)-Inositol	10 g
Isoleucin	10 g
Lysin	10 g
Phenylalanin	10 g
Prolin	10 g
Serin	10 g
Threonin	10 g
Tyrosin	10 g
Uracil	10 g
Valin	10 g
p-Aminobenzoesäure	1 g

Das Pulver wird in eine 1 l Flasche gefüllt und über Nacht bei 4 °C auf einem Drehrad gemischt. Die SD-Grundmischung wurde anschließend bei 4 °C gelagert.

Selektives* SD-Pulver

SD-Grundmischung	36,7 g
Histidin	2 g
Leucin	4 g
Methionin	2 g
Tryptophan	2 g
Adenin	0,5 g

*Für die Zubereitung selektiver SD-Pulver, wurde(n) die jeweils gewünschte(n) Aminosäure(n) weggelassen (z.B. SD-leu-trp enthält kein Leucin und kein Tryptophan). Das Pulver wurden üN bei 4 °C auf einem Drehrad gemischt. Das selektive SD-Pulver wurde direkt verwendet oder bei 4 °C gelagert.

2x selektive SD-Nährlösung

Selektives SD-Pulver		5 g
Yeast Nitrogen Base w/o	Amino Acids	16,75 g

Mit H₂O_{bid.} auf 1 I auffüllen, 30 min rühren, auf einen pH-Wert von 5,8 einstellen und zu je 200 ml Aliquots abfüllen und autoklavieren.

YP-Komplettmedium (2x Stammlösung)

50 g Bacto Pepton
25 g Bacto Hefeextrakt
Mit H ₂ O _{bid.} auf 1 I auffüllen

YPAD

200 ml YP-Stammlösung (2x), 250 ml H₂O, 50 ml Glukose 7,5 ml 0,2% Adenin-Hemisulfat.

Enzyme:

Tabelle 3: Die in dieser Arbeit verwendeten Enzyme.

Enzym	Bezugsquelle
Alkalische Phosphatase	Roche
Lysozym	Merck
Novozym 234	Novo Nordisc
Phusion	Finnzymes (NEB)
Restriktionsenzyme	New England Biolabs
Rnase A	Boehringer
Taq-DNA-Polymerase	Laborpräparation
T4-DNA-Ligase	Roche

Größenstandards für DNA-Gelelektrophorese:

- λ PstI: Mit dem Restriktionsenzym PstI geschnittene genomische DNA des Phagen λ -(λ genomische DNA von Thermo Scientific)
- -Generuler 1 kb DNA Ladder (Fermentas/Thermo Scientific)
- Generuler 50 bp DNA Ladder (Fermentas/Thermo Scientific) -

Größenstandards für SDS-PAGE:

- Spectra Mulitcolor Broad Range Protein Ladder (Thermo Scientific) -
- PAGE Ruler (Fermentas/Thermo Scientific)
- PAGE Ruler Plus (Fermentas/Thermo Scientific) -

Kits:

-	Plasmid Midi Kit (100)	(Qiagen; Hilden, Deutschland)
-	JETSORB Gel Extraction Kit	(Genomed; Löhne, Deutschland)
	IETOLIICK DNA Clean Un Spin Kit	(Genomed)

JETQUICK DNA Clean-Up Spin Kit - PCR.DIG-labeling Kit

(Genomed)

- (Roche)
- TOPO-TA cloning Kit with pCRII Vector -
- SureClean -

(Life Technologies) (Bioline; Luckenwalde, Deutschland)

4.1.2 Zentrifugen

Die Proben in 1,5 ml und 2 ml Reaktionsgefäßen wurden in der Heraeus Biofuge pico oder Heraeus Biofuge fresco (Heraeus/Thermo Fisher Scientific) zentrifugiert. Proben mit einem größeren Volumen wurden in 15 ml oder 50 ml Zentrifugationsröhren in einer Heraeus Biofuge stratos (Heraeus/Thermo Fisher Scientific) zentrifugiert. Für die Dichtegradientenzentrifugation wurde eine L8-70 Ultrazentrifuge (Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland) mit dem Rotor SW 40 Ti verwendet.

4.1.3 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion GmbH (Martinsried, Deutschland) synthetisiert. In Tabelle 4 sind die Oligonukleotide angegeben, die für Klonierungen verwendet wurden. Nähere Informationen finden sich bei den Plasmidbeschreibungen. Oligonukleotide, die für Sequenzierungsreaktionen verwendet wurden, sind nicht angegeben.

Tabelle 4: Die in dieser Arbeit für Klonierunger	n verwendeten Oligonukleotide.
--	--------------------------------

Dozonomiang	
oMF502	ACGACGTTGTAAAACGACGGCCAG
oMF503	TTCACACAGGAAACAGCTATGACC
oMF369	TGTGGCCGTTTACGTCGC
oMF963	TGGAAAGCGGGCAGTGAG
oMF964	GCGCAACTGTTGGGAAGG
oSL29	CCTCTGACAAAACCGGGC
oSL46	GGGTCACGCCTTAAACCC
oSL99	AGCGCAACAACGCCGATG
oSL217	ATGGTCTCGACTTGCGCG
oSL802	GCATGCAATATTCACGAGAGAGAGAGACCC
oSL803	ACCTGGTGGCCGCGTTGGCCGCGCAAAACACATGGCCCGC
oSL804	TGAGGCCTGAGTGGCCCTAGAAGGCGTCATGGCC
oSL805	ACCGTAATATTGGGCTGTAAGCCACTCCG
oSL861	CCATGGTGGCCGCGTTGGCCGCGTAGCCCTGGCCGTTGTAC
oSL862	TGAGGCCTGAGTGGCCGCTGCTTGATGCTTCTTGTTC
oSL863	CCATGGTGGCCGCGTTGGCCGCCTGGCTCTGTCCGTTGTATC
oSL864	TGAGGCCTGAGTGGCCACGACTCTTGTCGGGGC
oSL865	GTCATTTAAATGGTCTCGACTTGCGCG
oSL866	GCTATTTAAATGTAGCGTTGCCACTCAGC
oSL900	AATTTCGGCGGCCAACG
oSL901	TGGCCGCCGA
oRL305	AATATTTGCACAAATGAACGGCTCC
oRL306	AATATTCCTGTTTTGCTATACCCTTAGCG
oRL307	TTGGGCCATCTAGGCCGTCGATTCAGACCATGCAAG
oRL308	AATGGCCGCGTTGGCCGCCCAATCTCTGGCGTGCACAG
oRL309	TGAGGCCTGAGTGGCCATGGTCCCATACGGGTTTCG
oRL312	GCTCTCTGCCCTACAAGC
oRL313	GGCTGAGACGACCACTTG
oRL314	GTGGGCAAAGAGTGCTCG
oRL315	CTCCACACGACACCTACG
oRL340	AATGGCCGCGTTGGCCGCGTTCTGCTCGCGCATGGTG
oRL395	AATGGCCGCGTTGGCCGCGCCCACGATTGGCGAGTC
oRL408	TGACCATGGCGCTGTCGCAGATACAGAATC
oRL419	GCCCGGAATTAGCTTGGC
oRL422	AGAGGTTACATGGCCAAG
oRL423	TGAGGCCATTACGGCCCATATGTCCGATTCGATTTACGCC

Bezeichnung Nukleotidseguenz (in 5'-3'-Richtung)

oRL424	CGTGGCCGAGGCGGCCGTCACTTGTTCAGACCTGCAGC
oRL519	GGTCTCGCCTGCAATAATTGCTGCATTGTGGACGG
oRL520	GGTCTCCAGGCCGACAAGAGATAGTCACTACCG
oRL521	GGTCTCCGGCCGAGCGCATCTTGTTCTCATGG
oRL522	GGTCTCGCTGCAATATTTCACGTGCACACTGCG
oRL587	GGTCTCCTGGCCGCAGCTGTCGAGGAAGCAGC
oRL591	TGAGGCCATTACGGCCCATATGGAGGGCAGCAGTCTC
oRL592	CGTGGCCGAGGCGGCCGTCAAGACCACCACCCGCCTTC
oRL594	TGAGGCCATTACGGCCCATATGTCGTCCACCGAGTCC
oRL595	CGTGGCCGAGGCGGCCGTCAAGCCTCAGTCTTGGGAGC
oRL596	TGAGGCCATTACGGCCCATATGACGATACCAGACCCG
oRL597	CGTGGCCGAGGCGGCCGTCACCAATCTCTGGCGTGCAC
oRL669	GGTCTCGCCTGCAATATTTGTGATTGCACTGTTAAGGCAGC
oRL671	GGTAAGGGCCCCGGCAAGCTCGGGCTGGCTGGCGGCGAGCCTTGGGGGGCGATGGCCTCACC
oRL672	TTGCCGGGGCCCTTACCGGTATGGCCCTTGAGCTT
oRL754	GGGAAGCTTTGGCGACGGAGAGGGTGGGAGAGGCGGTGCTTTGCG
oRL755	CTTCAAAGCTTCCCGATCCTTGCAACCG
oRL765	AAAGATGCGGCCGCATGCAGCACAGTGATGCTTGC
oRL766	GCAAGCATCACTGTGCTGCATGCGGCCGCATCTTT
oRL774	AGTCGGCCATTACGGCCAGTCCCGAGGAGCAGAAG
oRL901	TCTCCCGGGTTCCAGATCTACTACCTCGTCCCCTTC
oRL915	GTGAACGTTTCTCAGCTCCTTGGTGGG
oRL916	AATGGCCGCGTTGGCCCCTCTAGACCCACCAAGGAGC
oRL1103	TACGGCCATTACGGCCAGATCTAGTACTATGTCCTTGCAACCGAATCAC
oRL1104	TACGGCCATTACGGCCAGATCTTCTAGAATGCTCTCCAACGACCCAAAC
oRL1105	TACGGCCATTACGGCCAGATCTACTAGTATGACTCGTCTGGTCAACGGC
oRL1106	GTCAGATCTGTCGATTCAGACCATGCAAG
oRL1121	TACGGCCATTACGGCCAGATCTGATATCATGCCCTACGAGCCACTTGCC
oRL1122	TACGGCCATTACGGCCAGATCTGATATCATGTCTCTGCCCTACAAGCTG
oRL1123	TACGGCCATTACGGCCAGATCTCATATGGTAGACGTCGAACACGGC

4.1.4 Plasmide und Plasmidkonstruktionen

4.1.4.1 Plasmide für Arbeiten mit U. maydis:

Ausgangsplasmide und Klonierungsvektoren:

pCR[®]II-TOPO (Life Technologies)

Vektor zum Klonieren von PCR-Produkten mit Hilfe einer Topoisomerase-Aktivität. Die Blau/Weiß-Selektion auf Anwesenheit eines inserierten Fragments ist möglich.

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

Dieser Vektor enthält eine Hygromycin-Resistenzkassette als 1884 bp langes Sfil/Sfil-Fragment. Die Kassette besteht aus dem konstitutiv aktiven Promotor P_{hsp70} , dem *hph*-Gen für die Hygromycin-Phosphotransferase und dem heterologen Terminator T_{nos} aus *Agrobacterium tumefaciens* (Bevan *et al.*, 1983).

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

Dieser Vektor enthält eine Geniticin-Resistenzkassette als 2073 bp langes Sfil/Sfil-Fragment. Die Kassette besteht aus dem konstitutiv aktiven Promotor P_{otef} , dem Gen *neo* für eine 3-Aminoglykosid-Phosphotransferase und dem Terminator des *iso-1-cytochrom c* Gens aus *S. cerevisiae* T_{cyc1} .

pMF5-1n (pUMa389)

Dieser Vektor enthält eine 2448 bp lange Sfil/Sfil-Kassette für eine C-terminale Fusion mit Gfp (Spellig *et al.*, 1996), gefolgt von dem Terminator T_{nos} in Kombination mit einer Nourseothricin-Resistenzkassette.

pMF5-4h (pUMa647)

Dieser Vektor enthält eine 5161 bp lange Sfil/Sfil-Kassette für eine C-terminale Fusion mit einem dreifachen Gfp, gefolgt von dem Terminator T_{nos} in Kombination mit einer Hygromycin-Resistenzkassette.

pMF5-5h (pUMa1093; König et al., 2009)

Dieser Vektor enthält eine 3876 bp lange Sfil/Sfil-Kassette für eine C-terminale Fusion mit mCherry (Shaner et al 2004) gefolgt von einem dreifachen c-Myc-Epitop (EQKLISEEDL; Evan *et al.*, 1985) und dem Terminator T_{nos} in Kombination mit einer Hygromycin-Resistenzkassette.

pMF5-9h (pUMa792; Baumann et al., 2012)

Dieser Vektor enthält eine 3102 bp lange Sfil/Sfil-Kassette für eine C-terminale Fusion mit einem dreifachen HA-Epitop (YPYDVPDY, Wilson *et al.*, 1984; Field *et al.*, 1988), gefolgt von dem Terminator T_{nos} in Kombination mit einer Hygromycin-Resistenzkassette.

pRrm4∆-HygR (pUMa495; Becht et al., 2006)

Plasmid für die Herstellung einer Deletionsmutante des *rrm4*-Gens (um10836). Es enthält eine 818 bp lange stromaufwärts des offenen Leserahmens von *rrm4* liegende Flanke, sowie eine 1943 bp lange stromabwärts liegende Flanke. Zwischen den Flanken befindet sich ein 1884 bp langes Sfil/Sfil-Fragment aus pMF1hs (pUMa194) mit einer Hygromycin-Resistenzkassette. Das Plasmid wurde für die homologe Integration in den *rrm4*-Lokus verwendet.

pRrm4G-NatR (pUMa496; Becht et al., 2006)

Plasmid für die Expression einer C-terminalen Fusion von Rrm4 mit Gfp unter der Kontrolle des nativen Promotors. Es enthält eine 3205 bp lange stromaufwärts gelegene Flanke, inklusive 2376 bp des offenen Leserahmens von *rrm4*, sowie eine 1987 bp lange stromabwärts gelegene Flanke für die homologe Rekombination im *rrm4*-Lokus. Zwischen den Flanken wurde ein 2448 bp langes Sfil/Sfil-Fragment mit *egfp*, gefolgt von dem Terminator T_{nos} in Kombination mit einer Nourseothricin-Resistenz eingefügt. Das Plasmid wurde für die homologe Integration in den *rrm4*-Lokus verwendet.

pPab1G-NatR (pUMa805; König et al., 2009)

Plasmid für die Expression einer C-terminalen Fusion von Pab1 mit Gfp unter der Kontrolle des nativen Promotors. Es enthält eine 3004 bp lange stromaufwärts gelegene Flanke, inklusive 1935 bp des offenen Leserahmens von *pab1* (um03494), sowie eine 986 bp lange stromabwärts gelegene Flanke für die homologe Rekombination im *pab1*-Lokus. Zwischen den Flanken wurde ein 2448 bp langes Sfil/Sfil-Fragment mit *egfp*, gefolgt von dem Terminator T_{nos} in Kombination mit einer Nourseothricin-Resistenz eingefügt. Das Plasmid wurde für die homologe Integration in den *pab1*-Lokus verwendet.

pUpa2∆-HygR (pUMa691, J. Hohenner, unveröffentlicht)

Plasmid für die Herstellung einer Deletionsmutante des *upa2*-Gens (um10350). Es enthält eine 2010 bp lange stromaufwärts des offenen Leserahmens von *upa2* liegende Flanke, sowie eine 1369 bp lange stromabwärts gelegene Flanke. Zwischen den Flanken befindet sich ein 1884 bp langes Sfil/Sfil-Fragment aus pMF1hs (pUMa194) mit einer Hygromycin-Resistenzkassette. Das Plasmid wurde für die homologe Integration in den *upa2*-Lokus verwendet.

pUpa2G-NatR (pUMa853; M. Feldbrügge, unveröffentlicht)

Plasmid für die Expression einer C-terminalen Fusion von Upa2 mit Gfp unter der Kontrolle des nativen Promotors. Es enthält eine 8438 bp lange stromaufwärts gelegene Flanke, inklusive 6446 bp des offenen Leserahmens von *upa2*, sowie eine 1373 bp lange stromabwärts gelegene Flanke für die homologe Rekombination im *upa2*-Lokus. Zwischen den Flanken wurde ein 2448 bp langes Sfil/Sfil-Fragment mit *egfp*, gefolgt von dem Terminator T_{nos} in Kombination mit einer Nourseothricin-Resistenz eingefügt. Das Plasmid wurde für die homologe Integration in den *upa2*-Lokus verwendet. Dieses Plasmid besitzt in dem offenen Leserahmen von *upa2* zwei Punktmutationen: C->T an der Basenpaarung 5068 und A->T an der Basenpaarung 5205. Dies führt zu den Punktmutationen T16621 und S1708C. Alle Plasmide mit dem offenen Leserahmen von *upa2* besitzen diese Mutationen, da diese erst spät bemerkt wurden. Eine Expression von Upa2G resultiert jedoch in einem dem Ausgangsstamm vergleichbaren Phänotyp und weist keine der typischen Defekte einer *upa2*-Deletion auf. Somit kann davon ausgegangen werden, dass Upa2 trotz der Aminosäuresubstitutionen funktionell ist.

pPotefYup1C-CbxR (pUMa1216; Baumann et al., 2012)

Plasmid für die Expression einer C-terminalen Fusion von Yup1 (um05406) mit mCherry unter Kontrolle des konstitutiv aktiven Promotors P_{otef} . Unter der Kontrolle des Promotors P_{otef} (896 bp langes Kpnl/Ncol-Fragment) befindet sich der 902 bp lange offene Leserahmen von Yup1 gefolgt von mCherry und dem Terminator T_{nos} . Das Plasmid enthält eine Carboxin (CbxR/*ip*^{*R*})-Resistenz und wurde für die Integration in den *ip*^S-Lokus verwendet.

pKin3△-CbxR (pUMa1231; (Baumann et al., 2012))

Plasmid für die Herstellung einer Deletionsmutante des *kin3*-Gens (um06251). Es ist ein Derivat von pKin3-kohyg-RWS74 (G. Steinberg) und besteht aus 0,9 kbp der stromaufwärts liegenden Flanke und 2,5 kbp der Stromabwärts liegende Flanke von *kin3*. Die stromaufwärts liegende Flanke besteht aus 884 bp der Promotorregion und 36 bp des offenen Leserahmens von *kin3*. Die stromabwärts liegende Flanke besteht aus den Basenpaaren 2053-5031 des offenen Leserrahmens von *kin3*. Zwischen den Flanken befindet sich eine Carboxin-Resistenzkassette als 1853 bp langes Notl/Not-Fragment. Das Plasmid wurde für die homologe Integration in den *kin3*-Lokus verwendet.

In dieser Arbeit hergestellte Plasmide:

Die Plasmide wurden mittels molekularbiologischer Standardmethoden hergestellt. Alle Plasmide tragen entweder eine Ampicillin- oder eine Kanamycin-Resistenzkassette zur Selektion in *E. coli*. Alle Klonierungsschritte wurden durch Restriktionsanalyse überprüft, alle eingebrachten PCR-Amplifikate sequenziert. Einige der beschrieben Plasmide wurden von Marvin Korries im Rahmen seiner Bachelorarbeit unter meiner Aufsicht hergestellt und tragen einen entsprechenden Vermerk.

pKin3Δ-GenitR (pUMa1288; Baumann et al., 2012)

Plasmid für die Herstellung einer Deletionsmutante des *kin3*-Gens. Wie pKin3∆-CbxR, jedoch wurde die Carboxin-Resistenzkassette durch ein 2028 bp langes Notl/NotI-Fragment aus pMF1g ersetzt. Dieses inserierte Fragment enthält eine Geniticin-Resistenzkassette. Das Plasmid wurde für die homologe Integration in den *kin3*-Lokus verwendet.

pKin3G³-HygR (pUMa1295; Baumann *et al.*, 2012)

Plasmid für die Expression einer C-terminalen Fusion von Kin3 mit einem dreifachen Gfp unter der Kontrolle des nativen Promotors. Es enthält eine 5527 bp lange stromaufwärts gelegene Flanke, inklusive 5028 bp des offenen Leserahmens von *kin3*, sowie eine 1414 bp lange stromabwärts gelegene Flanke für die homologe Rekombination im *kin3*-Lokus. Die Flanken wurden durch eine Polymere Kettenreaktion (PCR, *polymerase chain reaction*) mit den Oligonukleotid-Kombinationen oSL802/oSL803 und oSL804/oSL805 auf genomischer UM521-DNA hergestellt. Zwischen den Flanken wurde ein 5161 bp großes Sfil/Sfil-Fragment aus pMF5-4h (pUMa647) eingefügt. Dieses enthält drei Kopien des *egfp*, gefolgt von dem Terminator T_{nos}, sowie einer Hygromycin-Resistenzkassette. Das Plasmid wurde für die homologe Integration in den *kin3*-Lokus verwendet.

pKin3 PHAG³-HygR (pUMa1373; Baumann *et al.*, 2012)

Wie pKin3G³-HygR, jedoch wurden die letzten 116 AS inklusive der PH-Domäne entfernt. Hierfür wurde ein 10562 bp langes Mfel/Sfil-Fragment aus pKin3G³-HygR über einen Oligonukleotid-Linker bestehend aus oSL900/oSL901 mit dem 5161 bp langen Sfil/Sfil-Fragment aus pMF5-4h (pUMa647) ligiert. Das Plasmid wurde für die homologe Integration in den *kin3*-Lokus verwendet.

pPotefYup1CM-CbxR (pUMa1376; Baumann et al., 2012)

Plasmid für die Expression einer C-terminalen Fusion von Yup1 mit mCherry gefolgt von einem dreifachen c-Myc-Epitop unter Kontrolle des konstitutiv aktiven Promotors P_{otef}. Unter der Kontrolle des Promotors P_{otef} (896 bp langes Kpnl/Ncol-Fragment) befindet sich der 902 bp lange offene Leserahmen von Yup1 gefolgt von mCherry-3xMyc und dem Terminator T_{nos}. Das Plasmid ist ein Derivat von pP_{otef}Yup1C-CbxR (Baumann et al 2012) und enthält ein 465 bp langes BsrGl/NotI-Fragment aus pMF5-5h (pUMa1093). Es enthält eine Carboxin (Cbx)-Resistenz und wurde für die Integration in den *ip*^S-Lokus verwendet.

pKin3 PHAHA³-HygR (pUMa1420; Baumann et al., 2012)

Wie pKin3^{PH_Δ}G³-HygR, jedoch wurden das dreifache *egfp* durch drei HA-Epitope ersetzt. Hierfür wurde das 5161 bp langes Sfil/Sfil-Fragment aus pKin3^{PH_Δ}G³-HygR durch ein 3102 bp langes Sfil/Sfil-Fragment aus pMF5-9h (pUMa792) ersetzt. Das Plasmid wurde für die homologe Integration in den *kin3*-Lokus verwendet.

pPotefRab5aGn-CbxR (pUMa1481; Baumann et al., 2012)

Plasmid für die Expression einer N-terminalen Fusion von Rab5a (um10615) mit Gfp unter der Kontrolle des Promoters P_{otef}. Der offene Leserahmen wurde durch PCR mit den Oligonukleotiden oRL114/oRL115 auf genomischer UM521-DNA hergestellt und als 928 bp langes Ascl/Ndel-Fragment in den Vektor p123-Gfp_Ndel (pUMa1479) integriert, gefolgt von zwei hintereinander liegenden Kopien des Terminators T_{nos}. Das Plasmid enthält eine Carboxin-Resistenz und wurde für die Integration in den *ip*^S-Lokus verwendet.
pUpa1∆-HygR (pUMa1574)

Plasmid für die Herstellung einer Deletionsmutante des *upa1*-Gens (um12183). Es enthält eine 1055 bp lange stromaufwärts des offenen Leserahmens von *upa1* liegende Flanke, sowie eine 1874 bp lange stromabwärts liegende Flanke. Die Flanken wurden durch PCR mit den Oligonukleotid-Kombinationen oRL305/oRL307 und oRL306/oRL309 auf genomischer UM521-DNA hergestellt. Zwischen den Flanken wurde ein 1884 bp langes Sfil/Sfil-Fragment aus pMF1hs (pUMa194) eingefügt. Dieses enthält eine Hygromycin-Resistenzkassette. Das Plasmid wurde für die homologe Integration in den *upa1*-Lokus verwendet.

pUpa1G-NatR (pUMa1575)

Plasmid für die Expression einer C-terminalen Fusion von Upa1 mit Gfp unter der Kontrolle des nativen Promotors. Es enthält eine 4905 bp lange stromaufwärts gelegene Flanke, inklusive 3861 bp des offenen Leserahmens von *upa1*, sowie eine 1874 bp lange stromabwärts gelegene Flanke für die homologe Rekombination im *upa1*-Lokus. Die Flanken wurden durch PCR mit den Oligonukleotid-Kombinationen oRL305/oRL308 und oRL306/oRL309 auf genomischer UM521-DNA hergestellt. Zwischen den Flanken wurde ein 2448 bp langes Sfil/Sfil-Fragment aus pMF5-1n (pUMa389) eingefügt. Dieses enthält *egfp*, gefolgt von dem Terminator T_{nos}, sowie einer Nourseothricin-Resistenzkassette. Das Plasmid wurde für die homologe Integration in den *upa1*-Lokus verwendet.

pGrr1AG-NatR (pUMa1594)

Plasmid für die Expression einer C-terminalen Fusion von Grr1A (um02412) mit Gfp unter der Kontrolle des nativen Promotors. Es enthält eine 1979 bp lange stromaufwärts gelegene Flanke, inklusive 1098 bp des offenen Leserahmens von *grr1A*, sowie eine 1158 bp lange stromabwärts gelegene Flanke für die homologe Rekombination im *grr1*-Lokus. Die Flanken wurden durch PCR mit den Oligonukleotid-Kombinationen oSL217/oSL861 und oRL862/oRL866 auf genomischer UM521-DNA hergestellt. Zwischen den Flanken wurde ein 2448 bp langes Sfil/Sfil-Fragment aus pMF5-1n (pUMa389) eingefügt. Dieses enthält *egfp*, gefolgt von dem Terminator T_{nos}, sowie einer Nourseothricin-Resistenzkassette. Dieses Konstrukt verhindert vermutlich die Expression der Isoform Grr1B. Das Plasmid wurde für die homologe Integration in den *grr1*-Lokus verwendet.

pGrr1BG-NatR (pUMa1595)

Plasmid für die Expression einer C-terminalen Fusion von Grr1B (um10149) mit Gfp unter der Kontrolle des nativen Promotors. Es enthält eine 2338 bp lange stromaufwärts gelegene Flanke, inklusive 1457 bp des offenen Leserahmens von *grr1B*, sowie eine 1158 bp lange stromabwärts gelegene Flanke für die homologe Rekombination im *grr1*-Lokus. Die Flanken wurden durch PCR mit den Oligonukleotid-Kombinationen oSL863/oSL865 und oSL864/oSL866 auf genomischer UM521-DNA hergestellt. Zwischen den Flanken wurde ein 2448 bp langes Sfil/Sfil-Fragment aus pMF5-1n (pUMa389) eingefügt. Dieses enthält *egfp*, gefolgt von dem Terminator T_{nos}, sowie einer Nourseothricin-Resistenzkassette. Dieses Konstrukt sollte die Expression der Isoform Grr1A nicht beeinträchtigen. Das Plasmid wurde für die homologe Integration in den *grr1*-Lokus verwendet.

pUpa3∆-HygR (pUMa1658; M. Korries)

Plasmid für die Herstellung einer Deletionsmutante des *upa3*-Gens (um02637). Es enthält eine 1199 bp lange stromaufwärts des offenen Leserahmens von *upa3* liegende Flanke, sowie eine 1067 bp lange stromabwärts liegende Flanke. Die Flanken wurden durch PCR mit den Oligonukleotid-Kombinationen oRL519/oRL520 und oRL521/oRL522 auf genomischer

UM521-DNA hergestellt. Zwischen den Flanken wurde ein 1884 bp langes Sfil/Sfil-Fragment mit einer Hygromycin-Resistenzkassette eingefügt. Das Plasmid wurde für die homologe Integration in den *upa3*-Lokus verwendet.

pUpa3G-NatR (pUMa1686; M. Korries,)

Plasmid für die Expression einer C-terminalen Fusion von Upa3 mit Gfp unter der Kontrolle des nativen Promotors. Es enthält eine 4069 bp lange stromaufwärts gelegene Flanke, inklusive 3147 bp des offenen Leserahmens von *upa3*, sowie eine 1067 bp lange stromabwärts gelegene Flanke für die homologe Rekombination im *upa3*-Lokus. Die Flanken wurden durch PCR mit den Oligonukleotid-Kombinationen oRL587/oRL669 und oRL521/oRL522 auf genomischer UM521-DNA hergestellt. Zwischen den Flanken befindet sich ein 2448 bp langes Sfil/Sfil-Fragment mit *egfp*, gefolgt von dem Terminator T_{nos}, sowie einer Nourseothricin-Resistenzkassette. Das Plasmid wurde für die homologe Integration in den *upa3*-Lokus verwendet.

pPtefRab5aGn-CbxR (pUMa1712; M. Korries)

Wie pP_{otef}Rab5aGn-CbxR, jedoch wurde der stark konstitutiv aktive Promotor P_{otef} durch den konstitutiven Promotor P_{tef} ersetzt. Hierfür wurde ein 1137 bp langes Mfel/Ncol-Fragment aus ptef-eGfp-nosT/cbxR (pUMa1139, Koepke *et al.* 2011) inklusive des Promotors P_{tef} mit einem 5744 bp langen Mfel/Ncol-Fragment aus pP_{otef}Rab5aGn-CbxR (pUMa1481) ligiert. Das Plasmid enthält eine Carboxin-Resistenz und wurde für die Integration in den *ip*^S-Lokus verwendet.

pUpa2G^{ia}-NatR (pUMa1695)

Wie pUpa2G-NatR, jedoch wurde das Intron im offenen Leserahmen von *upa2* entfernt. Hierfür wurde ein 2377 bp langes Mfel/Ncol-Fragment (hergestellt durch PCR mit den Oligonukleotiden oSL31 und oRL408 auf pUpa2G-NatR) in das Plasmid pUpa2G-NatR (pUMa853) integriert. Das Plasmid wurde für die homologe Integration in den *upa2*-Lokus verwendet, sowie die Herstellung von Upa2-Konstrukten für das Hefe Zwei-Hybrid-System verwendet.

pUpa1G^R[▲]-NatR (pUMa1739)

Wie pUpa1G-NatR, jedoch die letzten C-terminalen 47 AS inklusive der RING-Finger-Domäne entfernt. Hierfür wurde ein 1293 bp langes Agel/Sfil-Fragment (hergestellt durch PCR mit den Oligonukleotiden oRL395 und oRL312 auf pUpa1G-NatR) mit einem 9330 bp langen Agel/Sfil-Fragment aus pUpa1G-NatR (pUMa1575) und einen 2448 bp langen Sfil/Sfil-Fragment aus pMF5-1n (pUMa389) ligiert. Das Plasmid wurde für die homologe Integration in den *upa1*-Lokus verwendet.

pUpa1G^{FR∆}-NatR (pUMa1740)

Wie pUpa1G-NatR, jedoch wurden die letzten C-terminalen 240 AS inklusive der FYVE- und RING-Finger-Domäne entfernt. Hierfür wurde ein 714 bp langes Agel/Sfil-Fragment (hergestellt durch PCR mit den Oligonukleotiden oRL340 und oRL312 auf pUpa1G-NatR) mit einem 9330 bp langen Agel/Sfil-Fragment aus pUpa1G-NatR (pUMa1575) und einem 2448 bp langen Sfil/Sfil-Fragment aus pMF5-1n (pUMa389) ligiert. Das Plasmid wurde für die homologe Integration in den *upa1*-Lokus verwendet.

pUpa1G^{mP}-NatR (pUMa1786)

Wie pUpa1G-NatR, jedoch wurden Mutationen eingefügt, die in dem PAM2-Motiv zu den Aminosäuresubstitutionen L132A, A136S, F139A und P141A führen. Die Mutationen wurden durch

eine PCR-Reaktion eingefügt. Das 1502 bp lange HindIII/Spel-Fragment (hergestellt aus dem PCR-Produkt von oMF963/oRL754 auf pUpa1G-NatR) und das 586 bp lange HindIII/SacII-Fragment (hergestellt aus dem PCR-Produkt von oRL313/oRL755 auf pUpa1G-NatR) wurden mit einem 11124 bp langen SacII/Spel-Fragment aus pUpa1G-NatR (pUMa1575) ligiert. Das Plasmid wurde für die homologe Integration in den *upa1*-Lokus verwendet.

pUpa1G^{Ank∆}-NatR (pUMa1787)

Wie pUpa1G-NatR, jedoch wurde ein Bereich von 167 Aminosäuren von N366-A532 inklusive der fünf Ankyrin-Wiederholungen entfernt. Hierfür wurde ein 931 bp langes Agel/SacII-Fragment aus pGBKT7-Upa1G^{AnkΔ} (pUMa1887, siehe unten) mit einem 9609 bp langen AscI/SacII-Fragment aus pUpa1G-NatR (pUMa1575) und einem 2171 bp langen Agel/AscI-Fragment aus pUpa1G-NatR (pUMa1575) ligiert. Das Plasmid wurde für die homologe Integration in den *upa1*-Lokus verwendet.

pP_{tef}Rab5aCn-CbxR (pUMa1806)

Wie pP_{tef}Rab5aGn-CbxR, jedoch wurde das N-terminale Gfp durch ein mCherry ersetzt. Hierfür wurde ein 769 bp langes BamHI/Ndel-Fragment aus pP_{otef}Tub1Cn-CbxR (pUMa1613, S. Baumann, unveröffentlicht), das *mcherry* enthält, mit einem 1109 bp langen BamHI/Mfel-Fragment aus pP_{tef}Rab5aGn-CbxR (pUMa1712) und einem 5015 bp langen Mfel/Ndel-Fragment aus pP_{tef}Rab5aGn-CbxR (pUMa1712) ligiert. Das Plasmid enthält eine Carboxin-Resistenz und wurde für die Integration in den *ip*^S-Lokus verwendet.

pUpa1G^{mF}-NatR (pUMa1863)

Wie pUpa1G-NatR, jedoch wurden Mutationen eingefügt, die in der FYVE-Domäne zu den Aminosäuresubstitutionen R1028A und R1029A führen. Hierfür wurde ein 3603 bp langes Ascl/SacII-Fragment aus pGADT7-Upa1G^{mF} (pUMa1848, siehe unten) geschnitten und mit einem 9609 bp langen Ascl/SacII-Fragment aus pUpa1G-NatR (pUMa1575) ligiert. Das Plasmid wurde für die homologe Integration in den *upa1*-Lokus verwendet.

pUpa1G^{mP/Ank∆}-NatR (pUMa1787)

Wie pUpa1G^{mP}-NatR, jedoch besitzt diese Variante von Upa1 neben den Aminosäuresubstitutionen in dem PAM2-Motiv zusätzlich eine Deletion der Ankyrin-Wiederholungen. Hierfür wurde ein 931 bp langes Agel/SacII-Fragment aus pGBKT7-Upa1G^{Ank} (pUMa1887, siehe unten) mit einem 9609 bp langen Ascl/SacII-Fragment aus pUpa1G^{mP}-NatR (pUMa1786) und einem 2171 bp langen Agel/AscI-Fragment aus pUpa1G-NatR (pUMa1575) ligiert. Das Plasmid wurde für die homologe Integration in den *upa1*-Lokus verwendet.

pUpa2G^{N∆}-NatR (pUMa1891)

Plasmid für die Expression einer N-terminal verkürzten Variante von Upa2 in C-terminaler Fusion mit Gfp unter der Kontrolle des nativen Promotors. Das Plasmid ist ein Derivat von pUpa2Gⁱ-NatR (pUMa1695). Das Protein besitzt die ersten 8 Aminosäuren, sowie die AS 1066-2121 von Upa2. Für die Herstellung wurde ein 1250 bp langes AcII/XmnI-Fragment (hergestellt durch PCR mit den Oligonukleotiden oSL29 und oRL915 auf pUpa2Gⁱ-NatR) mit einem 2669 bp langen AscI/XmnI-Fragment aus pUpa2Gⁱ-NatR, einem 6951 bp langen AscI/BamHI-Fragment aus pUpa2Gⁱ-NatR und einem 2052 bp langen AcII/BamHI-Fragment aus pUpa2Gⁱ-NatR ligiert. Das Plasmid wurde für die homologe Integration in den *upa2*-Lokus verwendet.

pUpa2G^{CA}-NatR (pUMa1892)

Plasmid für die Expression einer C-terminal verkürzten Variante von Upa2 in C-terminaler Fusion

mit Gfp unter der Kontrolle des nativen Promotors. Das Plasmid ist ein Derivat von pUpa2G^{iA}-NatR (pUMa1695). Das Protein besteht aus den Aminosäuren 1-1071 von Upa2G^{iA}. Für die Herstellung wurde ein 2586 bp langes Agel/SfiI-Fragment (hergestellt durch PCR mit den Oligonukleotiden oSL46 und oRL916 auf pUpa2G^{iA}-NatR) mit einem 4543 bp langen Agel/XmnI-Fragment aus pUpa2G^{iA}-NatR, einem 3375 bp langen SfiI/XmnI-Fragment aus pUpa2G^{iA}-NatR und einem 2448 bp langen SfiI/SfiI-Fragment aus pUpa2G^{iA}-NatR ligiert. Das Plasmid wurde für die homologe Integration in den *upa2*-Lokus verwendet.

pUpa1∆-GenR (pUMa1915)

Wie pUpa1∆-HygR (pUMa1574), jedoch wurde das 1884 bp lange Sfil/Sfil-Fragment mit der Hygromycin-Resistenzkassette durch ein 2073 bp langes Sfil/Sfil-Fragment aus pMF1g (pUMa1057) mit einer Geniticin-Resistenzkassette ausgetauscht. Das Plasmid wurde für die homologe Integration in den *upa1*-Lokus verwendet.

pUpa1G^{N1A}-NatR (pUMa1969)

Wie pUpa1G-NatR, jedoch wurden die ersten 143 AS des N-Terminus inklusive des PAM2-Motivs entfernt. Hierfür wurde ein 1084 bp langes Spel/BgIII-Fragment (hergestellt durch PCR mit den Oligonukleotiden oMF963 und oRL1106 auf pUpa1G-NatR) mit einem 7521 bp langen Ascl/Spel-Fragment aus pUpa1G^{FRΔ}-NatR), einem 2100 bp langen Ascl/SalI-Fragment aus pUpa1G^{FRΔ}-NatR), einem 2100 bp langen Ascl/SalI-Fragment aus pUpa1G-NatR (pUMa1575) und einem 2093 bp langen BgIII/SalI-Fragment aus pGBKT7-Upa2G^{N1Δ} (pUMa1964, siehe unten) ligiert. Das Plasmid wurde für die homologe Integration in den *upa1*-Lokus verwendet.

pUpa1G^{N2Δ}-NatR (pUMa1970)

Wie pUpa1G^{N1Δ}-NatR, jedoch wurden die ersten 357 AS des N-Terminus inklusive des PAM2-Motivs entfernt. Hierfür wurde ein 1084 bp langes Spel/BgIII-Fragment (hergestellt durch PCR mit den Oligonukleotiden oMF963 und oRL1106 auf pUpa1G-NatR) mit einem 7521 bp langen Ascl/Spel-Fragment aus pUpa1G^{FRΔ}-NatR (pUMa1740), einem 2100 bp langen Ascl/SalI-Fragment aus pUpa1G-NatR (pUMa1575) und einem 1451 bp langen BgIII/SalI-Fragment aus pGBKT7-Upa2G^{N2Δ} (pUMa1965, siehe unten) ligiert. Das Plasmid wurde für die homologe Integration in den *upa1*-Lokus verwendet.

pUpa1G^{N3A}-NatR (pUMa2051)

Wie pUpa1G^{N1Δ}-NatR jedoch wurden die ersten 551 AS des N-Terminus inklusive des PAM2-Motivs und den fünf Ankyrin-Wiederholungen entfernt. Hierfür wurde ein 1084 bp langes Spel/BgllI-Fragment aus pUpa1G^{N1Δ}-NatR (pUMa1969) mit einem 5810 bp langen Spel/Sfil-Fragment aus pUpa1G^{N1Δ}-NatR, einem 2448 bp langen Sfil/Sfil-Fragment aus pUpa1G^{N1Δ}-NatR und einem 2232 bp langen BgllI/Sfil-Fragment aus pGBKT7-Upa2G^{N3Δ} (pUMa2030, siehe unten) ligiert. Das Plasmid wurde für die homologe Integration in den *upa1*-Lokus verwendet.

pUpa1G^{N4A}-NatR (pUMa2052)

Wie pUpa1G^{N1Δ}-NatR jedoch wurden die ersten 633 AS des N-Terminus inklusive des PAM2-Motivs und den fünf Ankyrin-Wiederholungen entfernt. Hierfür wurde ein 1084 bp langes Spel/BgllI-Fragment aus pUpa1G^{N1Δ}-NatR (pUMa1969) mit einem 5810 bp langen Spel/Sfil-Fragment aus pUpa1G^{N1Δ}-NatR, einem 2448 bp langen Sfil/Sfil-Fragment aus pUpa1G^{N1Δ}-NatR und einem 1989 bp langen BgllI/Sfil-Fragment aus pGBKT7-Upa2G^{N4Δ} (pUMa2031, siehe unten) ligiert. Das Plasmid wurde für die homologe Integration in den *upa1*-Lokus verwendet.

pUpa1G^{N5∆}-NatR (pUMa2053)

Wie pUpa1G^{N1Δ}-NatR jedoch wurden die ersten 719 AS des N-Terminus inklusive des PAM2-Motivs und den fünf Ankyrin-Wiederholungen entfernt. Hierfür wurde ein 1084 bp langes Spel/Bglll-Fragment aus pUpa1G^{N1Δ}-NatR (pUMa1969) mit einem 5810 bp langen Spel/Sfil-Fragment aus pUpa1G^{N1Δ}-NatR, einem 2448 bp langen Sfil/Sfil-Fragment aus pUpa1G^{N1Δ}-NatR und einem 1725 bp langen Bglll/Sfil-Fragment aus pGBKT7-Upa2G^{N5Δ} (pUMa2032, siehe unten) ligiert. Das Plasmid wurde für die homologe Integration in den *upa1*-Lokus verwendet.

pUpa1G^{N6A}-NatR (pUMa2029)

Wie pUpa1G^{N1Δ}-NatR, jedoch wurden die ersten 969 AS des N-Terminus inklusive des PAM2-Motivs und den fünf Ankyrin-Wiederholungen entfernt. Hierfür wurde ein 1084 bp langes Spel/Bglll-Fragment aus pUpa1G^{N1Δ}-NatR (pUMa1969) mit einem 5810 bp langen Spel/Sfil-Fragment aus pUpa1G^{N1Δ}-NatR, einem 2448 bp langen Sfil/Sfil-Fragment aus pUpa1G^{N1Δ}-NatR und einem 978 bp langen Bglll/Sfil-Fragment aus pGBKT7-Upa2G^{N6Δ} (pUMa1966, siehe unten) ligiert. Das Plasmid wurde für die homologe Integration in den *upa1*-Lokus verwendet.

4.1.4.2 Plasmide für die Hefe-Zwei-Hybrid-Analysen:

Alle Plasmide basieren auf dem Vektor pGAD-DS (Dualsystems Biotech, als pGADT7 bezeichnet) und pGBKT7 des Matchmaker GAL4 Two-Hybrid-System 3 (Clontech/Takara, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich). Der Vektor pGBKT7 wurde für eine bessere Kompatibilität mit pGAD-DS modifiziert (K. Heimel, persönliche Kommunikation). Die Plasmide wurden für die Transformation in den *S. cerevisiae*-Stamm AH109 verwendet.

Ausgangsplasmide und Klonierungsvektoren:

pGADT7 (pUMa1624; pGAD-DS; Dualsystems Biotech, Schlieren, Schweiz)

Plasmid zur Expression eines Proteins in N-terminaler Fusion mit einem Kernlokalisationssignal (NLS, *nuclear localization signal*) des SV40 (Simian Virus 40), gefolgt von der Aktivierungsdomäne von Gal4 (AS 768-881) sowie einem HA-Epitop. Diese drei N-terminalen Komponenten werden in der Arbeit unter der Abkürzung AD (Aktivierungsdomäne) zusammengefasst bezeichnet. Die kodierende Sequenz des zu testenden Proteins kann als Sfil/Sfil-Fragment eingefügt werden. Das Gen steht unter Kontrolle des ADH1-Promotors P_{ADH1} und wird terminiert durch T_{ADH1} . Das Plasmid trägt das *LEU2*-Gen zur Selektion in *S. cerevisiae* und eine Ampicillin-Resistenzkassette zur Selektion in *E. coli*.

pGBKT7 (pUMa1625; Clontech)

Plasmid zur Expression eines Proteins in N-terminaler Fusion mit der DNA-bindenden Domäne von Gal4 (AS 1-147) gefolgt von einem c-Myc-Epitop. Diese zwei N-terminalen Komponenten werden in der Arbeit unter der Abkürzung BD (Bindedomäne) zusammengefasst bezeichnet. Der Vektor enthält eine modifizierte MCS (*multiple cloning site*) mit zwei unterschiedlichen Sfil-Erkennungssequenzen, damit die kodierende Sequenz des zu testenden Proteins als Sfil/Sfil-Fragment eingefügt werden kann. Das Gen steht unter Kontrolle des *ADH1*-Promotors P_{ADH1} und wird terminiert durch T_{ADH1}. Das Plasmid trägt das *TRP1*-Gen zur Selektion in *S. cerevisiae* und eine Kanamycin-Resistenzkassette zur Selektion in *E. coli*.

pGADT7-T (pUMa1636; Clontech)

Plasmid zur Expression einer N-terminalen Fusion des großen T-Antigens von SV40 mit AD. Es dient in Verbindung mit pGBKT7-p53 als Positivkontrolle, da das große T-Antigen mit p53 im Hefe Zwei-Hybrid-System interagiert.

pGBKT7-Lam (pUMa1637; Clontech)

Plasmid zur Expression einer N-terminalen Fusion des humanen Proteins Lamin C mit BD. Es dient im Hefe-Zwei-Hybrid-System als Negativkontrolle, da Lamin C keine Komplexe bildet und mit so gut wie keinem anderen Protein interagiert.

pGBKT7-p53 (pUMa1638; Clontech)

Plasmid zur Expression einer N-terminalen Fusion des Proteins p53 aus *Mus musculus* mit BD. Es dient in Verbindung mit pGADT7-T als Positivkontrolle, da das große T-Antigen mit p53 im Hefe Zwei-Hybrid-System interagiert

pGBD-Rrm4G (pUMa577; M. Feldbrügge, unveröffentlicht)

Plasmid zur Expression einer N-terminalen Fusion von Rrm4 mit der GAL4-DNA-bindenden Domäne und einer C-terminalen Fusion mit Gfp. Das Plasmid trägt *TRP1* zur Selektion in *S. cerevisiae* und eine Ampicillin-Resistenz zur Selektion in *E. coli*.

pGAD-Rrm4G (pUMa578; M. Feldbrügge, unveröffentlicht)

Plasmid zur Expression einer N-terminalen Fusion von Rrm4 mit der NLS von SV40, gefolgt von der GAL4-Aktivierungsomäne und einer C-terminalen Fusion mit Gfp. Das Plasmid trägt das *LEU2*-Gen zur Selektion in *S. cerevisiae* und eine Kanamycin-Resistenzkassette zur Selektion in *E. coli*.

In dieser Arbeit hergestellte Plasmide:

Einige der beschrieben Plasmide wurden von Christiane Iserman im Rahmen ihrer Bachelorarbeit unter meiner Aufsicht hergestellt und tragen einen entsprechenden Vermerk.

pGBKT7-Rrm4 (pUMa1628)

Plasmid zur Expression von BD-Rrm4. Hierfür wurde ein 2396 bp langes Sfil/Sfil-Fragment (hergestellt durch PCR mit oRL423 und oRL424 auf pRrm4G-NatR) mit einem 7347 bp langen Sfil/Sfil-Fragment aus pGBKT7 (pUMa1625) ligiert.

pGADT7-Rrm4 (pUMa1629)

Plasmid zur Expression von AD-Rrm4. Hierfür wurde ein 2396 bp langes Sfil/Sfil-Fragment (hergestellt durch PCR mit oRL423 und oRL424 auf pRrm4G-NatR) mit einem 8010 bp langen Sfil/Sfil-Fragment aus pGADT7 (pUMa1624) ligiert.

pGBKT7-Rrm4G (pUMa1684)

Wie pGBKT7-Rrm4, jedoch mit C-terminaler Fusion von Gfp an Rrm4. Hierfür wurde ein 2507 bp langes EcoRI/NotI-Fragment aus pGBD-Rrm4G (pUMa577, M. Feldbrügge, unveröffentlicht) mit einem 7912 bp langen EcoRI/NotI-Fragment aus pGBKT7-Rrm4 ligiert.

pGBKT7-Upa2 (pUMa1630)

Plasmid zur Expression von BD-Upa2. Hierfür wurde ein 6836 bp langes Sfil/Sfil-Fragment aus pGADT7-Upa2 (siehe unten) mit einem 7347 bp langen Sfil/Sfil-Fragment aus pGBKT7 (pUMa1625) ligiert.

pGADT7-Upa2 (pUMa1631)

Plasmid zur Expression von AD-Upa2. Hierfür wurde ein 6836 bp langes Sfil/Sfil-Fragment (hergestellt durch PCR mit oRL591 und oRL592 auf pUpa2 $G^{i\Delta}$ -NatR) mit einem 8010 bp langen Sfil/Sfil-Fragment aus pGADT7 (pUMa1624) ligiert.

pGBKT7-Pab1 (pUMa1632)

Plasmid zur Expression von BD-Pab1. Hierfür wurde ein 1973 bp langes Sfil/Sfil-Fragment (hergestellt durch PCR mit oRL594 und oRL595 auf pPab1G-NatR) mit einem 7347 bp langen Sfil/Sfil-Fragment aus pGBKT7 (pUMa1625) ligiert.

pGADT7-Pab1 (pUMa1633)

Plasmid zur Expression von AD-Pab1. Hierfür wurde ein 1973 bp langes Sfil/Sfil-Fragment (hergestellt durch PCR mit oRL594 und oRL595 auf pPab1G-NatR) mit einem 8010 bp langen Sfil/Sfil-Fragment aus pGADT7 (pUMa1624) ligiert.

pGBKT7-Pab1G (pUMa1652)

Wie pGBKT7-Pab1, jedoch mit C-terminaler Fusion von Gfp an Pab1. Hierfür wurde ein 3014 bp langes EcoRV/Sall-Fragment aus pGBKT7-Pab1 mit einem 1981 bp langen BsrGI/Sall-Fragment aus pPab1G-NatR und einem 5001 bp langen EcoRV/BsrGI-Fragment aus pGBKT7-Rrm4G ligiert.

pGBKT7-Upa1 (pUMa1730)

Plasmid zur Expression von BD-Upa1. Hierfür wurde ein 3881 bp langes Sfil/Sfil-Fragment aus pGADT7-Upa1 mit einem 7347 bp langen Sfil/Sfil-Fragment aus pGBKT7 (pUMa1625) ligiert.

pGADT7-Upa1 (pUMa1731)

Plasmid zur Expression von AD-Upa1. Hierfür wurde ein 3881 bp langes Sfil/Sfil-Fragment (hergestellt durch PCR mit oRL596 und oRL597 auf pUpa1G-NatR) mit einem 8010 bp langen Sfil/Sfil-Fragment aus pGADT7 (pUMa1624) ligiert.

pGADT7-Upa1^{M∆} (pUMa1764)

Wie pGADT7-Upa1, jedoch wurden die Aminosäuren 814-1156 inklusive der FYVE-Domäne entfernt. Hierfür wurde ein 2942 bp langes BspEl/NotI-Fragment und ein 7920 bp langes Agel/NotI-Fragment aus pGADT7-Upa1 ligiert.

pGADT7-Upa1G (pUMa1765)

Wie pGADT7-Upa1, jedoch mit C-terminaler Fusion von Gfp an Upa1. Hierfür wurde ein 1473 bp langes AfIII/AscI-Fragment aus pGAD-Rrm4G (pUMa578, M. Feldbrügge, unveröffentlicht) mit einem 7088 bp langen AfIII/BamHI-Fragment aus pGADT7-Upa1 und einem 4026 bp langen AscI/BamHI-Fragment aus pUpa1G-NatR ligiert.

pGBKT7-Upa1G (pUMa1785)

Wie pGADT7-Upa1G, nur in dem Vektor pGBKT7 zur Expression von BD-Upa1G. Hierfür wurde ein 3319 bp langes EcoRV/SacII-Fragment aus pGBKT7-Upa1 mit einem 3584 bp langen BsrGI/SacII-Fragment aus pGADT7-Upa1G und einem 5001 bp langen BsrGI/EcoRV-Fragment aus pGBKT7-Pab1G ligiert.

pGBKT7-Upa1G^{M∆} (pUMa1791)

Plasmid zur Expression von BD-Upa1G^{M_Δ}. Hierfür wurde ein 2487 bp langes Acc65I/Nsil-Fragment aus pGADT7-Upa1^{M_Δ} mit einem 5926 bp langen Acc65I/BstXI-Fragment aus pGBKT7-Upa1G und einem 2462 bp langen BstXI/Nsil-Fragment aus pGBKT7-Upa1G ligiert.

pGBKT7-Upa1G^{mP/M∆} (pUMa1792)

Plasmid zur Expression von BD-Upa1G^{mP/MΔ}. Hierfür wurde ein 1805 bp langes Notl/Sacl-Fragment aus pGBKT7-Upa1G^{MΔ} mit einem 9070 bp langen Notl/Sacl-Fragment aus pGBKT7-Upa1G^{mP/mF} (pUMa1862) ligiert.

pGBKT7-Pab1G^{mM} (pUMa1797, Christiane Iserman)

Plasmid zur Expression von BD-Pab1G^{™M}. Wie pGBKT7-Pab1G, jedoch wurden Mutationen eingefügt, die in der MLLE-Domäne zu den Aminosäuresubstitutionen Y580A, V583A, K593A und I598A führen. Hierfür wurde ein 1079 bp langes Apal/Sall-Fragment (hergestellt durch PCR mit oSL99/oRL691 auf pGBKT7-Pab1G) und ein 915 bp langes Apal/NotI-Fragment (hergestellt durch PCR mit oMF503/oRL672 auf pGBKT7-Pab1G) mit einem 8002 bp langen NotI/Sall-Fragment aus pGBKT7-Pab1G ligiert.

pGBKT7-MLLEG^{Pab1} (pUMa1801, Christiane Iserman)

Plasmid zur Expression einer N-terminalen BD-Fusion mit der MLLE-Domäne von Pab1 mit einem C-terminalen Gfp. Hierfür wurde ein 270 bp langes Sfil/Sfil-Fragment (hergestellt durch PCR mit oRL774/oRL419 auf pGBKT7-Pab1G) mit einem 8025 bp langen Sfil/Sfil-Fragment aus pGBKT7-Pab1G fusioniert.

pGADT7-Upa1G^{mF} (pUMa1848)

Plasmid zur Expression von AD-Upa1G^{mF}. Wie pGADT7-Upa1G, jedoch wurden Mutationen eingefügt, die in der FYVE-Domäne zu den Aminosäuresubstitutionen R1028A und R1029A führen. Hierfür wurde ein 803 bp langes Agel/Notl-Fragment (hergestellt durch PCR mit oRL312/oRL765 auf pGADT7-Upa1G) und ein 1368 bp langes Ascl/Notl-Fragment (hergestellt durch PCR mit oRL422/oRL766 auf pGADT7-Upa1G) mit einem 10416 bp langen Agel/Ascl-Fragment aus pGBKT7-Pab1G ligiert.

pGBKT7-Upa1G^{mF} (pUMa1861)

Plasmid zur Expression von BD-Upa1G^{mF}. Hierfür wurde ein 1169 bp langes Acc65I/Sall-Fragment aus pGADT7-Upa1G^{mF} mit einem 10735 bp langen ACC65I/Sall-Fragment aus pGBKT7-Upa1G ligiert.

pGBKT7-Upa1G^{mP/mF} (pUMa1862)

Plasmid zur Expression von BD-Upa1G^{mP/mF}. Hierfür wurde 2347 bp langes Nsil/Sall-Fragment mit einem 7095 bp langen BstXI/Sall-Fragment und einem 2462 bp langen BstXI/Nsil-Fragment ligiert.

pGBKT7-Upa1G^{Ank∆} (pUMa1887)

Plasmid zur Expression von BD-Upa1G^{Ank}. Hierfür wurde ein 918 bp langes Sall/Xmal-Fragment (hergestellt durch PCR mit oMF369/oRL901 auf pUpa1G-NatR) mit einem 10485 bp langen Sall/Xmal-Fragment aus pGBKT7-Upa1G ligiert.

pGBKT7-Upa1G^{FR∆} (pUMa1938)

Plasmid zur Expression von BD-Upa1G^{FR_Δ}. Hierfür wurde ein 2864 bp langes BsrGI/SacII-Fragment aus pUpa1G^{FR_Δ} mit einem 4196 bp langes SacII/XcmI-Fragment aus pGBKT7-Upa1G und einem 4124 bp langen BsrGI/XcmI-Fragment aus pGBKT7-Upa1G ligiert.

pGBKT7-Upa1G^{C2A} (pUMa1939)

Plasmid zur Expression von BD-Upa1G^{$C2\Delta$}. Wie pGBKT7-Upa1G, jedoch wurden die Aminosäuren 410-1287 von Upa1 entfernt. Hierfür wurde ein 9252 bp langes Ncol/Ncol-Fragment aus pGBKT7-Upa1G mit sich selbst ligiert.

pGBKT7-Upa1G^{mP/C2A} (pUMa1940)

Wie pGBKT7-Upa1G^{C2A}, jedoch mit den Aminosäuresubstitutionen L132A, A136S, F139A und P141A im PAM2-Motiv von Upa1. Hierfür wurde ein 9252 bp langes Ncol/Ncol-Fragment aus pGBKT7-Upa1G^{mP/mF} mit sich selbst ligiert.

pGBKT7-Upa1^{mP/M∆} (pUMa1953)

Plasmid zur Expression von BD-Upa1^{mP/MΔ}. Hierfür wurde ein 3973 bp langes Acc65I/Pvul-Fragment aus pGBKT7-Upa1G^{mP/MΔ} mit einem 6226 bp langen Acc65I/Pvul-Fragment aus pGBKT7-Upa1 ligiert.

pGBKT7-Upa1G^{N1A} (pUMa1964)

Plasmid zur Expression von BD-Upa1G^{N1Δ}. Die ersten 143 AS von Upa1 wurden entfernt. Hierfür wurde ein 596 bp langes SacII/SfiI-Fragment (hergestellt durch PCR mit oRL313/oRL1103 auf pGBKT7-Upa1G) mit einem 2866 bp langen SacII/SfiI-Fragment und einem 8025 bp langen SfiI/SfiI-Fragment aus pGBKT7-Upa1G ligiert.

pGBKT7-Upa1G^{N2A} (pUMa1965)

Plasmid zur Expression von BD-Upa1G^{N2∆}. Die ersten 357 AS von Upa1 wurden entfernt. Hierfür wurde ein 1297 bp langes Pvul/Sfil-Fragment (hergestellt durch PCR mit oMF369/oRL1104 auf pGBKT7-Upa1G) mit einem 1523 bp langen Pvul/Sfil-Fragment und einem 8025 bp langen Sfil/Sfil-Fragment aus pGBKT7-Upa1G ligiert.

pGBKT7-Upa1G^{N3∆} (pUMa2030)

Plasmid zur Expression von BD-Upa1G^{N3∆}. Die ersten 551 AS von Upa1 wurden entfernt. Hierfür wurde ein 2238 bp langes Sfill/Sfil-Fragment (hergestellt durch PCR mit oMF369/oRL1121 auf pGBKT7-Upa1G) mit einem 8025 bp langen Sfil/Sfil-Fragment aus pGBKT7-Upa1G ligiert.

pGBKT7-Upa1G^{N4} (pUMa2031)

Plasmid zur Expression von BD-Upa1G^{N4 Δ}. Die ersten 633 AS von Upa1 wurden entfernt. Hierfür wurde ein 1995 bp langes Sfill/Sfil-Fragment (hergestellt durch PCR mit oMF369/oRL1122 auf pGBKT7-Upa1G) mit einem 8025 bp langen Sfil/Sfil-Fragment aus pGBKT7-Upa1G ligiert.

pGBKT7-Upa1G^{N5}∆ (pUMa2032)

Plasmid zur Expression von BD-Upa1G^{N5 Δ}. Die ersten 719 AS von Upa1 wurden entfernt. Hierfür wurde ein 1731 bp langes Sfill/Sfil-Fragment (hergestellt durch PCR mit oMF369/oRL1123 auf pGBKT7-Upa1G) mit einem 8025 bp langen Sfil/Sfil-Fragment aus pGBKT7-Upa1G ligiert.

pGBKT7-Upa1G^{№6}Δ (pUMa1966)

Plasmid zur Expression von BD-Upa1G^{N1Δ}. Die ersten 969 AS von Upa1 wurden entfernt. Hierfür wurde ein 984 bp langes Sfil/Sfil-Fragment (hergestellt durch PCR mit oMF369/oRL1105 auf pGBKT7-Upa1G) mit einem 8025 bp langen Sfil/Sfil-Fragment aus pGBKT7-Upa1G ligiert.

pGBKT7-Upa2¹⁻¹¹⁵⁶ (pUMa1990)

Plasmid zur Expression von BD-Upa2¹⁻¹¹⁵⁶. Der Bereich der AS 1157-2121 wurde deletiert. Hierfür wurde ein 10772 bp langes Pstl/Pstl-Fragment aus pGBKT7-Upa2 mit sich selbst ligiert.

pGADT7-Upa2¹⁻¹¹⁵⁶ (pUMa1991)

Plasmid zur Expression von AD-Upa2¹⁻¹¹⁵⁶. Der Bereich der AS 1157-2121 wurde deletiert. Hierfür wurde ein 1455 bp langes AfIII/PstI-Fragment, ein 966 bp BamHI/PstI-Fragment und ein 9008 bp AfIII/BamHI-Fragment aus pGADT7-Upa2 ligiert.

pGBKT7-Pab1^{mM} (pUMa1998)

Plasmid zur Expression von BD-Pab1^{mM}. Wie pGBKT7-Pab1G^{mM}, nur ohne Gfp. Hierfür wurde ein 1971 bp Sfil/Sfil-Fragment aus pGBKT7-Pab1G^{mM} mit einem 7347 bp Sfil/Sfil-Fragment über den Sfil/Sfil-Linker oRL1115/oRL1116 ligiert.

pGBKT7-MLLE^{Pab1} (pUMa2000)

Plasmid zur Expression von BD-MLLE^{Pab1}. Wie pGBKT7-MLLEG^{Pab1}, nur ohne Gfp. Hierfür wurde ein 270 bp Sfil/Sfil-Fragment aus pGBKT7-MLLEG^{Pab1} mit einem 7347 bp Sfil/Sfil-Fragment über den Sfil/Sfil-Linker oRL1115/oRL1116 ligiert.

pGADT7-Upa1^{C1} (pUMa2002)

Plasmid zur Expression von AD-Upa1^{C1}^Δ. Hierfür wurden die AS 195-1287 entfernt, indem ein 8565 bp langes BamHI-Fragment von Upa1 mit sich selbst ligiert wurde

pGADT7-Upa1^{mP/M∆} (pUMa2044)

Plasmid zur Expression von AD-Upa1^{mP/M_Δ}. Hierfür wurde ein 2852 bp langes Sfil/Sfil-Fragment aus pGBKT7-Upa1^{mP/M_Δ} mit einem 8010 bp langen Sfil/Sfil-Fragment aus pGADT7 ligiert.

pGADT7-Upa1^{№1Δ/MΔ} (pUMa2057)

Plasmid zur Expression von AD-Upa1^{N1 Δ /M Δ}. Hierfür wurde ein 596 bp langes SacII/Sfil-Fragment aus pGBKT7-Upa1G^{N1 Δ} mit einem 1839 bp langen SacII/Sfil-Fragment aus pGADT7-Upa1^{M Δ} und einem 8010 bp langen Sfil/Sfil-Fragment aus pGADT7 ligiert.

4.1.5 Stämme

<u>U. maydis:</u>

Die Stämme in Tabelle 5 lagen zu Beginn dieser Arbeit vor oder wurden gleichzeitig von Mitarbeitern in der Arbeitsgruppe hergestellt. Sie dienten als Ausgangs- und/oder Teststämme.

Die in Tabelle 6 aufgeführten Stämme wurden im Rahmen dieser Arbeit hergestellt. In allen hergestellten Stämmen wurden die homologen Rekombinationsereignisse durch eine Southern-Analyse bestätigt.

Stamm	relevanter Genotyp*	UMa**	Referenz
AB33	a2 P _{nar} :bW2 bE1*	133	(Brachmann <i>et al.</i> , 2001)
AB33rrm4∆	rrm4∆	273	(Becht <i>et al.</i> , 2006)
AB33rrm4G	rrm4G	274	(Becht <i>et al.</i> , 2006)
AB33rrm4R	rrm4R	279	(Baumann <i>et al.</i> , 2012)
AB33rrm4GT	rrm4GT	303	(Becht <i>et al.</i> , 2006)
AB33rrm4G/upa2∆	rrm4G, upa2∆	329	S. Baumann, unveröffentlicht
AB33rrm4GT ^{™M}	rrm4GT ^{™M}	359	(Becht et al., 2006)
AB33grr1∆	grr1∆	380	M. Feldbrügge, unveröffentlicht
AB33pab1G	pab1G	389	(König <i>et al.</i> , 2009)
AB33rrm4GT ^{RRMΔ}	rrm4GT ^{RRM∆}	396	P. Happel, unveröffentlicht
AB33rrm4G/pab1R	rrm4G, pab1R	428	(Becht et al., 2006)
AB33upa2G	upa2G, rrm4∆	453	S. Baumann, unveröffentlicht
AB33upa2G/rrm4R	upa2G, rrm4R	466	S. Baumann, unveröffentlicht
AB33upa2G/rrm4∆	upa2G, rrm4∆	515	S. Baumann, unveröffentlicht
AB33upa2G/rrm4R ^{™M}	upa2G, rrm4R ^{mM}	516	S. Baumann, unveröffentlicht
AB33upa2G/rrm4R ^{mR1}	upa2G, rrm4R ^{mR1}	896	S. Baumann, unveröffentlicht

Tabelle 5: Die in dieser Arbeit verwendeten Ausgangs- und/oder Teststämme.

(*) Alle Derivate von AB33 tragen zusätzlich den Genotypen *a2 P*_{nar}:*bW2 bE1*. (**) *Interne Labornummer*.

Tabelle G. Die in dieser Arbeit hergestenten Stamme.	Tabelle 6	: Die in	dieser	Arbeit	hergestellten	Stämme.
--	-----------	----------	--------	--------	---------------	---------

			integriertes			
Stamm	relevanter Genotyp*	UMa**	Plasmid	Lokus	Ausgangsstamm	Referenz
AB33rrm4G/pab1R	rrm4G, pab1R, kin3 \varDelta	595	pKin3∆-CbxR	kin3	AB33rrm4G/pab1R	(Baumann <i>et al.</i> ,
/kin3∆						2012)
AB33rrm4R/kin3G ³	rrm4R, kin3G ³	622	pKin3G ³ -NatR	kin3	AB33rrm4R	(Baumann <i>et al.</i> ,
						2012)
AB33rrm4R/kin3∆	rrm4R, kin3∆	664	pKin3∆-CbxR	kin3	AB33rrm4R	(Baumann <i>et al</i> .,
						2012)
AB33rrm4R/kin3 ^{PH} ∆G ³	rrm4, kin3 ^{₽H⊿} G ³	684	pKin3 ^{PH∆} G³-	kin3	AB33rrm4R	(Baumann <i>et al.</i> ,
			NatR			2012)
AB33kin3∆	kin3∆	662	pKin3∆-CbxR	kin3	AB33	diese Arbeit
AB33kin3G ³	kin3G	661	nKin3G ³ -NatR	kin3	AB33kin31	diese Arbeit
ABCOMINCE	KIIIOO	001		King		
AB33kin3G ³ /rab5aCn	kin3G³, rab5aCn	1169	pP _{tef} Rab5aCn-	ip ^s	AB33kin3G ³	diese Arbeit
			CbxR			
AB33rrm4G/rab5aCn	rrm4G, rab5aCn	1053	pP _{tef} Rab5aCn-	ip ^s	AB33rrm4G	diese Arbeit
			CbxR			
AB33rrm4GT/yup1CM	rrm4GT, yup1CM	686	pP _{otef} Yup1CM-	ip ^s	AB33rrm4GT	diese Arbeit
			CbxR			

AB33rrm4GT/yup1CM /kin3 ^{PH} ∆HA ³	rrm4GT, yup1CM, kin3 ^{PH⊿} HA ³	727	pKin3 ^{PH∆} HA ³ - NatR	kin3	AB33rrm4GT /yup1CM	(Baumann <i>et al.</i> , 2012)
AB33rrm4GT/yup1CM /kin3∆	rrm4GT, yup1CM, kin3∆	755	pKin3∆-GenitR	kin3	AB33rrm4GT /yup1CM	(Baumann <i>et al.,</i> 2012)
AB33rrm4GT ^{RRM} ∆ /yup1CM	rrm4GT ^{RRM} , yup1CM	751	pP _{otef} Yup1CM- CbxR	ip ^s	AB33rrm4GT ^{RRM} ∆	diese Arbeit
AB33upa1∆	upa1⊿	859	pUpa1∆-HygR	upa1	AB33	diese Arbeit
AB33upa2∆	upa2∆	1176	pUpa2∆-HygR	upa2	AB33	diese Arbeit
AB33rrm4G/upa3∆	rrm4G, upa3∆	936	pUpa3∆-HygR	upa3	AB33rrm4G	M. Korries, diese Arbeit
AB33upa1G	upa1G	956	pUpa1G-NatR	upa1	AB33	diese Arbeit
AB33upa3G	upa3G	987	pUpa3G-NatR	upa3	AB33	M. Korries, diese Arbeit
AB33upa1G/kin3∆	upa1G, kin3∆	1163	pKin3∆-GenitR	kin3	AB33upa1G	diese Arbeit
AB33upa1G/rab5aCn	upa1G, rab5aCn	1155	pP _{tef} Rab5aCn- CbxR	ip ^s	AB33upa1G	diese Arbeit
AB33upa1G/rrm4∆	upa1G, rrm4 Δ	1048	pRrm4∆-HygR	rrm4	AB33upa1G	diese Arbeit
AB33upa1G/upa2∆	upa1G, upa2∆	1164	pUpa2∆-HygR	upa2	AB33upa1G	diese Arbeit
AB33upa1G ^{mP}	upa1G ^{mP}	1016	pUpa1G ^{mP} -NatR	upa1	AB33upa1∆	diese Arbeit
AB33upa1G ^{№1}	upa1G ^{N1}	1198	pUpa1G ^{№1∆} -NatR	upa1	AB33upa1∆	diese Arbeit
AB33upa1G ^{№2}	upa1G ^{N2}	1199	pUpa1G ^{№2} -NatR	upa1	AB33upa1∆	diese Arbeit
AB33upa1G ^{№3}	upa1G ^{N3}	1241	pUpa1G ^{№3∆} -NatR	upa1	AB33upa1∆	diese Arbeit
AB33upa1G ^{N4Δ}	upa1G ^{N4}	1242	pUpa1G ^{№4} Δ-NatR	upa1	AB33upa1∆	diese Arbeit
AB33upa1G ^{№5}	upa1G ^{N5} ⁄	1243	pUpa1G ^{№5} -NatR	upa1	AB33upa1∆	diese Arbeit
AB33upa1G ^{№∆}	upa1G ^{N6}	1244	pUpa1G ^{№∆} -NatR	upa1	AB33upa1∆	diese Arbeit
AB33upa1G ^R ∆	upa1G ^R ₄	1059	pUpa1G ^R ∆-NatR	upa1	AB33	diese Arbeit
AB33upa1G ^{FR} ∆	upa1G ^{FR} ⊿	1061	pUpa1G ^{FR} ∆- NatR	upa1	AB33	diese Arbeit
AB33pab1CM	pab1CM	578	pPab1CM-HygR	pab1	AB33	diese Arbeit
AB33pab1CM/upa1G ^{mF}	pab1CM, upa1G ^{mF}	1076	pUpa1G ^{mF} -NatR	upa1	AB33pab1CM	diese Arbeit
AB33pab1CM/upa1G ^{Ank∆}	pab1CM, upa1G ^{Ank} ⊿	1108	pUpa1G ^{Ank∆} - NatR	upa1	AB33pab1CM	diese Arbeit
AB33pab1CM /upa1G ^{mP/Ank∆}	pab1CM, upa1G ^{mP/Ank} ∆	1110	pUpa1G ^{mP/Ank} ∆- NatR	upa1	AB33pab1CM	diese Arbeit
AB33rrm4G/upa1∆	rrm4G, upa1∆	856	pUpa1∆-HygR	upa1	AB33rrm4G	diese Arbeit
AB33pab1G/upa1∆	pab1G, upa1∆	857	pUpa1∆-HygR	upa1	AB33pab1G	diese Arbeit
AB33grr1AG	grr1AG	854	pGrr1AG-NatR	grr1	AB33grr1∆	diese Arbeit
AB33grr1BG	grr1BG	911	pGrr1BG-NatR	grr1	AB33	diese Arbeit
AB33rrm4R/grr1AG	rrm4R, grr1AG	853	pGrr1AG-NatR	grr1	AB33rrm4R	diese Arbeit
AB33grr1AG/rrm4∆	grr1AG, rrm4∆	1049	pRrm4∆-HygR	rrm4	AB33grr1AG	diese Arbeit
AB33grr1BG/rrm4∆	grr1BG, rrm4∆	1050	pRrm4∆-HygR	rrm4	AB33grr1BG	diese Arbeit
AB33grr1AG/upa1∆	grr1AG, upa1∆	1125	pUpa1∆-HygR	upa1	AB33grr1AG	diese Arbeit
AB33grr1BG/upa1∆	grr1BG, upa1∆	1126	pUpa1∆-HygR	upa1	AB33grr1BG	diese Arbeit
AB33rab5aGn	rab5aGn	826	pP _{otef} Rab5aGn- CbxR	ip ^s	AB33	diese Arbeit

AB33rab5aGn/upa1∆	rab5aGn, upa1∆	1252	pUpa1∆-GenitR	upa1	AB33rab5aGn	diese Arbeit
AB33upa2G/kin3∆	upa2G, kin3∆	1162	pKin3∆-GenitR	kin3	AB33upa2G	diese Arbeit
AB33upa2G ^{i∆}	upa2G ⁱ ∆	1209	pUpa2G ^{i∆} -NatR	upa2	AB33upa2∆	diese Arbeit
AB33upa2G ^{N∆}	upa2G ^N ∆	1210	pUpa2G ^{N∆} -NatR	upa2	AB33upa2∆	diese Arbeit
AB33upa2G ^C ∆	upa2G ^{CΔ}	1211	pUpa2G ^{C∆} -NatR	upa2	AB33upa2∆	diese Arbeit
AB33pab1G/upa2∆	pab1G, upa2∆	1165	pUpa2∆-HygR	upa2	AB33pab1G	diese Arbeit

(*) Alle Stämme sind Derivate von AB33 und tragen zusätzlich zu den angegebenen Genotpyen die den Paarungstyp *a2 P_{nar}:bW2 bE1. (**) Interne Labornummer.*

<u>E. coli:</u>

Für sämtliche Klonierungen wurde der Stamm TOP10 (Life Technologies) benutzt, der ein Derivat des Stammes K12 ist und folgenden Genotyp besitzt: F-, *mcr*A, Δ (*mrr-hsd*RMS-*mcr*BC), ϕ 80/*acZ* Δ M15, Δ /*acX*74, *deo*R, *rec*A1, *ara*D139, Δ (ara-leu)7697, *gal*U, *gal*K, *rpsL*(St^R), *end*A1, *nup*G

S. cerevisiae:

Für die Hefe-Zwei-Hybrid-Analysen wurde der Stamm AH109 (Clontech; James *et al.* (1996)) verwendet. Der Stamm AH109 besitzt folgenden Genotyp: *MATa, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4*Δ, *gal80*Δ, *LYS2::GAL1*_{UAS}-*GAL1*_{TATA}-*HIS3, GAL2*_{UAS}-*GAL2*_{TATA}-*ADE2, URA3::MEL1*_{UAS}-*MEL1*_{TATA}-*lacZ*

4.2 Mikrobiologische, zellbiologische und genetische Methoden

4.2.1 Arbeiten mit Escherichia coli

Kultivierung von *E. coli*:

Kulturen von *E. coli* wurden entweder in YT-Flüssigmedium oder auf dYT-Festmedium angezogen. In Flüssigmedien wurden die Stämme in Schikanekolben als Schüttelkulturen bei 110 Upm kultiviert oder in Reagenzgläsern auf einem schräggestellten Kulturroller inkubiert. Die Inkubation erfolgte unter aeroben Bedingungen bei 37 °C.

Bestimmung der Zelldichte von E. coli:

Die Zelldichte von Flüssigkulturen wurde photometrisch mit einem Novospec II Photometer (Pharmacia Biotech) bei einer Wellenlänge von 600 nm bestimmt. Um die Messung in einem Bereich der linearen Abhängigkeit durchzuführen, wurden die Kulturen so verdünnt, dass der gemessene Wert der OD_{600} unter 0,5 lag. Als Blindwert wurde die OD_{600} des YT-Mediums gemessen. Eine OD_{600} von 1,0 entspricht ungefähr 10⁹ Zellen/ml.

Herstellung kompetenter Zellen nach der RbCI-Methode:

Das folgende Protokoll ist modifiziert nach Cohen *et al.* (1972). Für die Herstellung wurden 100 ml dYT-Medium (mit 10 mM MgCl₂ und 10 mM MgSO₄) mit 1 ml einer Übernachtkultur des Stammes TOP10 angeimpft und bei 37 °C und 110 Upm inkubiert, bis eine OD_{600} von ~0,5 erreicht worden ist. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (3.000 Upm, 15 min, 4 °C)

pelletiert. Das Zellpellet wurde in 33 ml eiskalter RF1-Lösung resuspendiert und 30-60 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation (3.000 Upm, 15 min, 4 °C) pelletiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in 5 ml eiskalter RF2-Lösung resuspendiert und für 15 min auf Eis inkubiert. Die Zellsuspension wurde zu je 50 µl in 1,5 ml- Reaktionsgefäßen aliqotiert, in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80 °C gelagert.

RF1	-Lös	ung	l

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

<u>RF2-Lösung</u>

10 mM MOPS 10mM RbCl 75 mM CaCl₂ x 2 H₂O 15% (v/v) Glycerin In H₂O_{bid.} Mit NaOH auf pH 5,8 einstellen und sterilfiltrieren.

Transformation von Plasmid-DNA in RbCl-kompetente E.coli:

Für eine Transformation wurden 50 µl chemisch (RbCl)-kompetente Zellen von *E. coli* auf Eis aufgetaut (~10 min), mit 10 µl Plasmidlösung (~1-5 ng DNA) bzw. einem Ligationsansatz versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock von 45 s bei 42 °C wurde die Zellsuspension mit 150 µl dYT-Medium versetzt und je nach verwendeter Antibiotikaresistenz 30 min (Ampicillin) oder 60 min (Kanamycin) schüttelnd bei 37 °C inkubiert. In diesem Schritt wird die Resistenz gegen das jeweils verwendete Antibiotikum ausgebildet. Daraufhin wurde der Transformationsansatz auf YT-Festmedium (+ Antibiotikum) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

4.2.2 Arbeiten mit Ustilago maydis

Kultivierung von U. maydis:

Stämme von *U. maydis* wurden als Schüttelkulturen bei 200 Upm oder auf Festmedien unter aeroben Bedingungen bei 28 °C kultiviert (sofern nicht anders vermerkt). Kulturen auf Festmedien wurden bis zu einem Monat bei 4 °C gelagert. Von diesen wurden Vorkulturen in 3 ml CM-Medium angeimpft und über Nacht auf einem schräggestellten Kulturroller bei 28 °C inkubiert. Von diesen Vorkulturen wurden am nächsten Tag die Hauptkulturen angeimpft, die als Schüttelkulturen über Nacht bei 28 °C inkubiert wurden. Die Hauptkulturen wurden dabei in Schikanekolben angezogen, um eine gute Versorgung mit Sauerstoff zu gewährleisten.

Bestimmung der Zelldichte bei U. maydis:

Die Zelldichte von Flüssigkulturen wurde photometrisch mit einem Novospec II Photometer (Pharmacia Biotech) bei einer Wellenlänge von 600 nm bestimmt. Um die Messung in einem Bereich der linearen Abhängigkeit durchzuführen, wurden die Kulturen so verdünnt, dass der gemessene Wert der OD_{600} unter 0,5 lag. Als Blindwert wurde die OD_{600} des sterilen Mediums gemessen. Eine OD_{600} von 1,0 entspricht ungefähr 1-5 x 10⁷ Zellen/ml.

Herstellung transformationskompetenter Protoplasten von U. maydis:

Dieses Protokoll ist modifiziert nach Schulz et al. (1990) und Gillissen et al. (1992). Von einem U. maydis-Stamm wurde eine Vorkultur in 3 ml CM angeimpft und über Nacht inkubiert. Von dieser Vorkultur wurde am nächsten Tag eine Hauptkultur in 50 ml CM angeimpft und über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Kultur bei einer OD₆₀₀ von 0,6-1,0 (am besten 0,8) durch Zentrifugation (3.000 Upm, 5 min) pelletiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in 25 ml SCS resuspendiert und erneut durch Zentrifugation (3.000 Upm, 5 min) pelletiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in 2 ml SCS/Novozym 234 (3,5 mg/ml Novozym 234) resuspendiert und für 5-15 min inkubiert. Der enzymatische Abbau der Zellwand wurde mikroskopisch kontrolliert. Bei einem Anteil von ~30-40% runden oder abgerundeten Zellen wurden 30 ml eiskaltes SCS hinzugegeben und die Zellen durch Zentrifugation (2.400 Upm, 5 min, 4 °C) pelletiert. Das Zellpellet wurde anschließend zweimal mit 10 ml eiskaltem SCS gewaschen (2.400 Upm, 5 min, 4 °C). Anschließend wurde das Zellpellet in 10 ml eiskaltem STC resuspendiert und durch Zentrifugation (2.400 Upm, 5 min, 4 °C) pelletiert. Das so entstandene Zellpellet wurde in 1 ml eiskaltem STC resuspendiert und zu je 100 µl in vorgekühlte 2 ml-Reaktionsgefäße aliquotiert. Die so behandelten Protoplasten konnten einige Stunden auf Eis gelagert werden oder bei -80°C für mehrere Jahre aufbewahrt werden.

Transformation von U. maydis-Protoplasten mit Plasmid-DNA:

Zur integrativen Transformation wurden 100 µl Protoplasten mit 5 µl linearisierter Plasmid-DNA (ca. 2,5 µg) und 1 µl Heparinlösung für 10 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 0,5 ml STC/PEG folgte eine Inkubation von 15 min auf Eis. Anschließend wurde der Transformationsansatz auf zwei (<u>kurz zuvor</u> mit Top-Agar überschichteten) Regenerationsagarplatten ausgestrichen. Nach 4 bis 7 Tagen Inkubation bei 28 °C wurden die gewachsenen Kolonien auf antibiotikahaltigen CM-Platten vereinzelt.

<u>SCS</u>	<u>STC</u>
20 mM Na-Citrat, pH 5,8	10 mM Tris-HCI, pH 7,5
1 M Sorbitol	100 mM CaCl2
In H ₂ O _{bid.} , sterilfiltriert	1 M Sorbitol
	In $H_2O_{bid.}$, sterilfiltriert
<u>Heparin-Lösung</u>	STC/PEG
15 mg/ml Heparin	15 ml STC
in $H_2O_{bid.}$, sterilfiltriert.	10 g PEG 4000

Induktion des filamentösen Wachstums von AB33 und Derivaten:

Der Stamm AB33 trägt die kompatiblen Allele *bW2* und *bE1* unter der Kontrolle des Stickstoff-regulierten Promotors P_{nar} . Um die Expression zu induzieren wurden die Zellen von einem NH₄NO₃-haltigen Medium (CM) in ein KNO₃-haltiges Medium (NM) überführt. Eine Hauptkultur wurde nach Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,5 durch Zentrifugation (5.000 Upm, 5 min) pelletiert, in 15 ml NM resuspendiert und erneut zentrifugiert (5.000 Upm, 5 min). Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in der entsprechenden Menge NM

resuspendiert, dass die Kultur eine OD_{600} von 0,5 besitzt. Die Kultur wurde für mindestens 4 h bei 28 °C und 200 Upm inkubiert.

Fluorimetrische Messung der endochitinolytischen Aktivität:

Dieses Protokoll ist modifiziert nach Koepke et al., 2011. Die enzymatische Aktivität der *maydis* wurde mit Hilfe des spezifischen Substrats Endochitinasen von U. 4-Methylumbelliferyl β-D-N,N',N''-triacetylchitotriosid (Sigma-Aldrich) ermittelt. Die Kulturen wurden auf eine OD₆₀₀ von 0,5 eingestellt und dieses nach Einstellung erneut überprüft. Die enzymatische Aktivität wurde in einem Fluoreszenzspektrometer (Infinite M200; Tecan Group Ltd., Männedorf, Österreich) bei Raumtemperatur gemessen. Die Anregungswellenlänge lag bei 360 nm und die Emissionswellenlänge lag bei 450 nm (jeweils mit einer Bandbreite von 7,5 nm). Für die Messung wurden jeweils 30 µl einer U. maydis-Kultur mit 70 µl 0,25 µM Substrat abgedunkelt für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Die Reaktionsplatte wurde mit Parafilm luftdicht verschlossen. Nach dieser Inkubationszeit wurde die Reaktion durch Zugabe von 200 μ l 1 M Na₂CO₃ abgestoppt. Es wurden mindestens drei unabhängige Experimente durchgeführt. In einer Messung wurden pro Stamm jeweils drei technische Replikate gemessen. Die endochitinolytische Aktivität des Ausgangsstammes AB33 wurde als Wert 1 festgelegt und die enzymatischen Aktivitäten der anderen Stämme werden im Verhältnis zu dieser angegeben.

KHM-Puffer

(zur Verdünnung der Substrat-Stammlösung) 20 mM HEPES, pH 7,3 110 mM KAc 2mM MgCl₂ In H₂O_{bid.}, autoklaviert

Mikroskopie und Bildverarbeitung

Für die Mikroskopie wurden folgende Mikroskope der Firma Visitron Systems (München, Deutschland) verwendet:

- i) Zeiss (Oberkochen, Deutschland) Axio Imager M.1, ausgestattet mit einer Spot-Pursuit CCD-Kamera (*charge-coupled device*; Diagnostic Instruments, Sterling Heights, MI, USA) und den Objektivlinsen Plan Neofluar (40x und 100x, numerische Apertur [NA] 1,3; 63x, NA 1,25).
- ii) Zeiss Axio Observer.Z1 ausgestattet mit einer CCD-Kamera (Photometrics CoolSNAP HQ2) und den Objektivlinsen Plan Neofluar (40x, NA 1,3), Plan Apochromat (63x und 100x, NA 1,4) und α -Plan Apochromat (100x, NA 1.46).

Die Anregung von Fluoreszenz-markierten Proteinen wurde mittels einer HBO 103 Quecksilber-Lampe oder einer HXP Halogen-Metalldampflampe (LEj; Jena, Deutschland) in Kombination mit Filtersätzen für Gfp (ET470/40BP, ET495LP, ET525/50BP) und Rfp/mCherry (ET560/40BP, ET585LP, ET630/75BP; Chroma, Bellow Falls, VT, USA) durchgeführt. Schwache Signale wurden unter Verwendung einer Laser-basierten Epifluoreszenz-Mikroskopie detektiert. Ein VS-LMS4 Laser-Vereinigungssystem (Visitron System) vereinigte die Feststofflaser für die Anregung von Gfp (488 nm / 50 mW) und Rfp/mCherry (561 nm / 50 mW). Kolokalisations-Studien wurden unter Verwendung eines Zweikanal-Bildwandlers (DV2, Photometrics) durchgeführt. Dieser ermöglichte die simultane Detektion von Gfp und Rfp/mCherry. Für die Anregung von Gfp und Rfp/mCherry wurde ein dichroitischer Strahlteiler in Verbindung mit einem spezifischen Anregungsfilter für Gfp und mCherry (Gfp/mCherry, Chroma) verwendet. Die Fluoreszenzsignale wurden von einem zweiten dichroitischer Strahlteiler (dcxr565) innerhalb des Zweikanal-Bildwandlers in die jeweiligen Wellenlängen aufgeteilt. Die Fluoreszenzsignale wurden anschließend getrennt mit Emissionsfiltern (Gfp ET520/40; Rfp/mCherry ET632/60) gefiltert, bevor sie auf unterschiedlichen Bereichen eines CCD-Chips detektiert wurden. Für Kolokalisationstudien mit starken Fluoreszenzsignalen wurde msALEX (millisecond alternating laser excitation; Lange et al., 2008)) mit der Verwendung des Zweikanal-Bildwandlers kombiniert. Der Wechsel zwischen dem 488 nm (Gfp) und 561 nm (Rfp/mCherry) Laser-Anregung wurde mit Hilfe eines akustooptischen Modulators erreicht. Die Fluorophore Gfp und Rfp/mCherry wurden alternierend jeweils für 70 ms angeregt. Die Steuerung der Mikroskope sowie Auswertung und Bearbeitung der Aufnahmen erfolgte mit dem Programm Metamorph (Version 7.7.0.0, Molecular Devices, Seattle, IL, USA). Die Fluoreszenzaufnahmen sind invertiert dargestellt.

Quantifizierung von kolokalisierenden Proteinen

Für die Quantifizierung von kolokalisierenden Proteinen in sich bewegenden Partikeln, wurde ein Bereich von 10 µm im Bereich des apikalen Wachstumspols definiert. Die beweglichen Rrm4-Partikel wurden gezählt und auf eine Kolokalisation mit Kin3 hin überprüft. Es wurden drei unabhängige Experimente mit acht bis 10 Filamenten pro Experiment durchgeführt. Es ist der Mittelwert der kolokalisierenden Proteine angegeben. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler an.

Quantifizierung des filamentösen Wachstums

Der Anteil von unipolar und bipolar auswachsenden Zellen in einer Kultur von *U. maydis* wurde mikroskopisch ermittelt. Hierfür wurde eine 20 ml Hauptkultur in CM über Nacht bei 28 °C inkubiert und bei einer OD₆₀₀ von 0,5 abzentrifugiert (5.000 Upm, 5 min, RT), mit 15 ml NM gewaschen und das Pellet schließlich in 20 ml NM aufgenommen. Die Kultur wurde wenn nicht anders vermerkt 8 h bei 28 °C inkubiert und nach dieser Zeit mikroskopisch ausgezählt. Dabei wurden mindestens 100 Zellen ausgezählt. Es wurden mindestens drei unabhängige Experimente durchgeführt. Der Mittelwert des Anteils der jeweiligen Zellen ist angegeben. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler an.

Analyse des filamentösen Wachstums auf Festmedium

Für einen Test des filamentösen Wachstums wurden 4 µl einer CM-Vorkultur auf Aktivkohlehaltige NM-Festmedien getropft, mit Parafilm abdichtet und für 2 Tage bei 28 °C inkubiert. Für die Analyse des filamentösen Wachstums von *U. maydis*-Kolonien wurde das Stereomikroskop Zeiss Stemi 2000C verwendet. Als Lichtquelle diente eine Zeiss KL1500 LCD (Zeiss). Für die Aufnahmen der Kolonien wurde eine stationär angebrachte Canon PowerShot A650 IS-Kamera (Canon Deutschland GmbH, Krefeld, Deutschland) verwendet.

4.2.3 Arbeiten mit Saccharomyces cerevisiae

Kultivierung von S. cerevisiae:

Stämme von *S. cerevisiae* wurden als Schüttelkulturen bei 200 Upm oder auf Festmedien unter aeroben Bedingungen bei 28 °C kultiviert. Kulturen auf Festmedien wurden bis zu sechs Wochen bei 4 °C gelagert. Von diesen wurden Flüssigkulturen angeimpft und über Nacht inkubiert.

Bestimmung der Zelldichte bei S.cerevisiae:

Die Zelldichte von Flüssigkulturen wurde photometrisch mit einem Novospec II Photometer (Pharmacia Biotech) bei einer Wellenlänge von 600 nm bestimmt. Um die Messung in einem Bereich der linearen Abhängigkeit durchzuführen, wurden die Kulturen so verdünnt, dass der gemessene Wert der OD_{600} unter 0,5 lag. Als Blindwert wurde die OD_{600} des sterilen Mediums gemessen. Eine OD_{600} von 1,0 entspricht ungefähr 2 x 10⁷ Zellen/ml.

Herstellung transformationskompetenter Zellen von S. cerevisiae:

Als Vorkultur wurden 10 ml YPAD-Medium mit einer auf Festmedium wachsenden Hefekolonie angeimpft und über Nacht bei 28 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden 50 ml YPAD-Medium mit 3 ml dieser Vorkultur angeimpft und ca. 3-6 Stunden bei 28 °C inkubiert, bis diese eine OD₆₀₀ von 0,5-0,7 erreicht hatte. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (500x g, 5 min, RT) pelletiert das Pellet mit 20 ml H₂O resuspendiert und erneut zentrifugiert (500x g, 5 min, RT). Das Zellpellet wurde daraufhin in 10 ml HefeSORB resuspendiert und erneut zentrifugiert (500x g, 5 min, RT). Anschließend wurde das Zellpellet in 360 µl HefeSORB resuspendiert und 40 µl Lachssperma-DNA hinzugegeben. Die Zellen wurden zu je 50 µl in 2 ml-Reaktionsgefäße aliquotiert. Die so behandelten Zellen können einige Stunden auf Eis gelagert werden oder bei -80 °C für mehrere Monate aufbewahrt werden.

<u>HefeSORB</u>

10 mM Tris-HCl (pH 8,0) 1 M Sorbitol 100 mM LiOAc 1 mM EDTA (pH8,0) In $H_2O_{bid.}$, Mit Essigsäure auf pH 8,0 einstellen und sterilfiltrieren

Lachssperma-DNA

10 mg/ml Lachssperma-DNA (Sigma-Aldrich, D1626) In TE-Puffer, pH 8,0 5 min bei 95 °C denaturieren, anschließend für mehr als 5 min auf Eis

TE-Puffer

10 mM Tris-HCl, pH 8,0 1 mM EDTA In H₂O_{bid.}, autoklavieren

Transformation von Plasmid-DNA in S. cerevisiae:

Für eine Transformation werden 50 µl Zellen auf Eis aufgetaut (ca. 10 min) und zu diesen 1 µg Plasmid-DNA (ca. 2 µl) sowie 300 µl PEG (in LiT) hinzugegeben. Die Zellen werden auf einem Drehrad für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgt ein Hitzeschock der Zellsuspensionen bei 42 °C für 15 min. Danach werden die Zellen für 2 min auf Eis gekühlt. Nach Zugabe von 600 µl YPAD werden die Zellen durch Zentrifugation (2.000 Upm, 5 min) pelletiert und mit 1 ml YPAD gewaschen. Das Zellpellet wird in 950 µl YPAD resuspendiert und die Zellen werden bei 28 °C für 1-4 Stunden inkubiert. Dabei liegen die 2 ml-Reaktionsgefäße auf der Seite und werden unter linearer Schüttelbewegung bei ca. 50 Bewegungen pro Minute durchmischt. Anschließend werden die Zellen durch Zentrifugation (2.000 Upm, 5 min) pelletiert und in 150 µl YPAD resuspendiert und auf Festmedium ausplattiert. Nach 3-4 Tagen haben sich Kolonien gebildet.

<u>LiT</u>

100 mM Lithiumacetat 10 mM Tris-HCl (pH 8,0) In H_2O_{bid} , autoklavieren

PEG in LiT

40% (w/v) PEG 3350 100 mM Lithiumacetat 10 mM Tris-HCI (pH 8,0) 1 mM EDTA (pH 8,0) In H₂O_{bid.}, sterilfiltrieren

Hefe-Zwei-Hybrid-Analyse

Die Hefe-Zwei-Hybrid-Analysen erfolgten mit dem Matchmaker III System (Clontech). Die entsprechenden Plasmide basierend auf pGADT7 und pGBKT7 wurden wie beschrieben in den Stamm AH109 transformiert. Nach drei bis vier Tagen konnten einzelne Kolonien weiterverwendet werden. In einem ersten Schritt wurden drei bis fünf einzelne Kolonien auf SD-leu-trp und auf SD-leu-trp-his-ade Festmedien ausgestrichen und drei Tage bei 28 °C inkubiert. Das Wachstum auf SD-leu-trp-his-ade zeigte eine Interaktion der getesteten Proteine an. Für eine weitergehende Analyse wurden, ausgehend von den SD-leu-trp Festmedien, 5 ml SD-leu-trp Flüssigkulturen in Reagenzgläsern mit viel Zellmaterial angeimpft und über Nacht bei 28 °C dicht wachsen gelassen. Von diesen Kulturen wurden 10-20 µl in frisches 5 ml SD-leu-trp Flüssigmedium in Reagenzgläsern überimpft und über Nacht bei 28 °C inkubiert. Die Kulturen wurden auf eine OD₆₀₀ von 0,5 eingestellt in vier Verdünnungsschritten jeweils 1:5 mit sterilem H₂O verdünnt. Es wurden 4 µl der fünf Verdünnungsstufen mit einer Mehrkanalpipette auf SD-leu-trp (Kontrollbedingung) und auf SD-leu-trp-his-ade (Selektivbedingung)-Festmedien getropft und drei Tage lang bei 28 °C inkubiert. Das Hefewachstum wurde mit Hilfe des Aufnahmesystem ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare Life Sciences) dokumentiert.

Die Verwendung des *MEL1*-Reportergens hat sich in dieser Arbeit als nicht brauchbar erwiesen. Die alleinige Verwendung des *HIS3*-Reportgens hat sich als ungenügend erwiesen, während kein Unterschied zwischen der Verwendung des *ADE2*-Reportergens oder der Kombination von *HIS3* und *ADE2* beobachtet werden konnte. Dennoch wurde stets auf die Aktivität beider Reportergene hin getestet. Als Positivkontrolle wurde pGBKT7-p53 mit pGADT7-T und als Negativkontrolle pGBKT7-Lam mit pGADT7-T in den Hefestamm transformiert.

4.3 Molekularbiologische Methoden

Molekularbiologische Standardtechniken, wie z.B. Aufreinigung und Klonierungstechniken wurden modifiziert nach (Ausubel et al 1987) und (Sambrook et al 1989) durchgeführt.

4.3.1 Isolierung von Nukleinsäuren

Präparation von Plasmid-DNA aus E. coli:

Die Isolierung von Plasmid-DNA erfolgte nach der Methode der "kochenden Lyse" (modifiziert nach Sambrook (1989)). Es wurden 1,5 ml einer Übernachtkultur von E. coli durch Zentrifugation (8.000 Upm, 2 min, RT) pelletiert. Das Zellpellet wurde nach Zugabe von 200 µl STET und 20 µl Lysozym-Lösung durch Schütteln resuspendiert und danach für 1 min bei 99 °C in einem Heizblock inkubiert. Auf diese Weise wurden die Nukleinsäuren denaturiert. Anschließend wurden die gekochten Zellsuspensionen zentrifugiert (13.000 Upm, 10 min). Die genomische DNA kann nach dem Erhitzen nicht wieder renaturieren und wird mit den Zellresten pelletiert. Die Plasmid-DNA kann aufgrund der Superspiralisierung renaturieren und befindet sich im Überstand. Das Zellpellet wird mit Hilfe eines Zahnstochers entfernt. Durch Zugabe von 20 µl 3 M Na-Acetat (pH 5,3) sowie 500 µl Isopropanol und einer Durchmischung durch Invertieren wird die Plasmid-DNA gefällt und durch Zenrifugation (13.000 Upm, 10 min, RT) pelletiert. Das Pellet wird durch Zugabe von 200 µl 70% Ethanol gewaschen und anschließend 10 min bei 37 °C getrocknet. Daraufhin wird das Pellet in 100 µl TE/RNase A gelöst.

<u>STET</u>

50 mM Tris-HCl, pH 8,0 50 mM Na₂-EDTA 8% (w/v) Saccharose 5% (w/v) Triton x-100 In H₂O_{bid.}

Lysozom-Lösung

10 mg/ml Lysozym 10 mM Tris-HCl, pH 8,0 In H₂O_{bid.}

TE/RNase A

10 mM Tris-HCl, pH 7,9 1 mM Na₂-EDTA 20 μg/ml RNase A In H₂O_{bid.}

Präparation genomischer DNA aus U. maydis:

Diese Methode ist modifiziert nach Hoffman und Winston (1987). Eine Vorkultur von 3 ml CM-Medium wird mit einem auf Festmedium wachsenden Stamm angeimpft und über Nacht bei 28 °C inkubiert. Am nächsten Tag werden 2 ml der dicht (!) gewachsenen Flüssigkultur in ein 2 ml-Reaktionsgefäß gefüllt und durch Zentrifugation (13.000 Upm, 2 min, RT) pelletiert. Zu dem Zellpellet werden ca. 0,3 g Glasperlen gegeben und durch kurzes anzentrifugieren an den Gefäßboden konzentriert. In das Gefäß wird nun 500 µl TE-Phenol/Chloroform und 500 µl Ustilago-Lysispuffer hinzugegeben. Die Suspension wird für 6-10 min auf einem Vibrax-Schüttler geschüttelt und anschließend abzentrifugiert (13.000 Upm, 15 min, RT). Dadurch wird eine Phasentrennung in eine untere (organische) und obere (wässrige) Phase erreicht. Proteine und Zelltrümmer sammeln sich im Bereich des Phasenübergangs, während die DNA in der wässrigen Phase gelöst vorliegt. Es werden 400 µl dieser wässrigen

Phase abgenommen und zusammen mit 1 ml Ethanol (100 %) in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Durch mehrmaliges Invertieren fällt die DNA sichtbar aus und wird durch Zentrifugation (13.000 Upm, 5 min, RT) pelletiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet erneut anzentrifugiert. Der restliche Überstand wird abgenommen und 50 µl TE/RNase A hinzugegeben. Das Pellet wird bei 50 °C durch Schütteln resuspendiert und kann bei -20 °C gelagert werden

Ustilago-Lysispuffer

10 mM Tris-HCl, pH 8 100 mM NaCl 1% (w/v) SDS 2% (w/v) Triton X-100 1 mM EDTA In H₂O_{bid.}

TE-Phenol/Chloroform

Mischung aus gleichen Teilen Phenol (mit TE-Puffer äquilibriert) und Chloroform Das Phenol sollte vor Gebrauch mit einer Spatelspitze 8-Hydroxychinolin versetzt werden.

4.3.2 Arbeiten mit Nukleinsäuren

Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren:

Die Konzentration von Nukleinsäuren in Lösungen wurde photometrisch mit einem NanoDrop ND-2000c Spectrophotometer (Thermo Scientific) bestimmt. Die Konzentration der Nukleinsäure wurde anhand der Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Der Quotient der OD₂₆₀/OD₂₈₀, gab Aufschluss über die Reinheit der Nukleinsäurelösung.

Restriktionsendonukleolytische Reaktionen

Für analytische und präparative endonukleolytische Reaktionen wurden Restriktionsenzyme der Firma NEB (New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland) verwendet. Das Volumen des Ansatzes und die eingesetzte DNA-Menge richteten sich nach der späteren Verwendung. Die Inkubationstemperatur richtete sich je nach Restriktionsenzym. Analytische Reaktionen wurden für 1-2 h, Präparative Reaktionen für 4-6 h und Reaktionen für Transformationen oder eine Southern-Analyse über Nacht durchgeführt.

Analytische Reaktion

1-3 μl Plasmid-DNA
2 μl NEB-Puffer
2 μl BSA (10 mg/ml) (wenn nötig)
0,5-1 U Restriktionsenzym
ad 20 μl mit H₂O_{bid.}

Präparative Reaktion

4-15 μl Plasmid DNA
6 μl NEB-Puffer
6 μl BSA (10 mg/ml) (wenn nötig)
1-2 U Restriktionsenzym
ad 60 μl mit H₂O_{bid.}

Reaktion für Transformationsfragmente

40 μl Plasmid-DNA (500 ng/μl) 10 μl NEB-Puffer 10 μl BSA (10 mg/ml) (wenn nötig) 3-6 U Restriktionsenzym ad 100 μl mit H₂O_{bid.}

Reaktion für Southern-Analyse

19 μl genomische DNA 2,5 μl NEB-Puffer 2,5 μl BSA (10 mg/ml) (wenn nötig) 1-2 U Restriktionsenzym ad 25 μl mit H₂O_{bid.}

Ethanol-Salz-Fällung von DNA:

Die Fällung von Nukleinsäuren aus einer wässrigen Lösung erfolgte nach der Methode der Ethanol-Salz-Fällung. Zu einer Nukleinsäurelösung wurde 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,3) sowie das 2,5-fache Volumen an kaltem 100% Ethanol hinzugegeben. Durch Invertieren wurde die Lösung gemischt und auf ein sichtbares Ausfällen der DNA hin überprüft. Die gefällte DNA wurde durch Zentrifugation (13.000 Upm, 15 min, RT) pelletiert. Das Pellet wurde mit dem 2,5-fachen Volumen 70% Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (13.000 Upm, 15 min, RT). Der Überstand wird verworfen, das Pellet getrocknet und in H_2O_{bid} . Oder TE-Puffer gelöst.

Auftrennung von Nukleinsäuren mittels Gelelektrophorese

DNA-Fragmente wurden mit Hilfe einer Agarose-Gelelektrophorese der Größe entsprechend aufgetrennt. In dieser Arbeit wurde hierfür das TAE-Puffersystem verwendet. Die Agarosekonzentration der Gele lag je nach Größe der Nukleinsäurefragmente bei 0,8% bis 2%. Die entsprechende Menge Agarose wurde in einem 1xTAE-Puffer aufgekocht, auf eine Temperatur von 55 °C bis 60 °C abgekühlt und schließlich wurde dem flüssigen Gel Ethidiumbromidlösung (1 µg/ml Endkonzentration) hinzugegeben. Das Gel wurde in einen präparierten Gelschlitten gegossen, die Taschen mit einem Kamm abgesteckt und nach frühestens 20 Minuten verwendet. Das Gel wurde hierfür in eine Laufkammer gefüllt mit 1x TAE-Puffer gelegt und die Nukleinsäure vermischt mit DNA-Auftragspuffer in die entstandenen Taschen gefüllt. Dauer und Stromspannung der Gelelektrophorese wurde je nach Probe eingestellt. Der Verlauf der Elektrophorese konnte anhand der blauen Lauffront des Auftragspuffers nachverfolgt werden

<u>TAE (50x)</u>	DNA-Auftragspuffer
2 M Tris-Acetat	30% (v/v) Glycerin
100 mM Na2-EDTA	0,4% (w/v) Bromphenolblau
In H ₂ O _{bid.}	In H ₂ O _{bid.}

Präparation von Gelfragmenten aus Agarosegelen:

DNA-Fragmente wurden nach einer Gelelektrophorese mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die Ethidiumbromid-gefärbten Fragmente wurden auf einem UV-Tisch (TCP-20.LM; Vilber Lourmat Deutschland GmbH, Eberhardzell, Deutschland) angeregt. Die herausgeschnittenen Fragmente wurden mit Hilfe des JETSORB Gel Extraction Kit (Genomed) nach Herstellerangaben aus dem Gel eluiert.

Ligation von Nukleinsäurefragmenten

Nukleinsäurefragmente wurden mit Hilfe einer T4 DNA-Ligase (Roche) ligiert. Bei einer Ligation von zwei Fragmenten wurde darauf geachtet, dass das Verhältnis zwschen dem Resistenz-tragenden Fragment und dem Insert bei 1:2 lag. Bei einer Ligation von mehreren Fragmenten wurden diese in einem Verhältnis von 1:1 eingesetzt: Die Ligation erfolgte stets über Nacht bei 16 °C.

Ligationsansatz x μl Fragmente 2 μl T4 Ligase-Puffer (10x) 1 μl T4 DNA-Ligase ad 20 μl mit H₂O_{bid.}

4.3.3 Auftrennung und Nachweis von Nukleinsäuren

Transfer von DNA (Southern-Blot):

Diese Methode ist modifiziert nach Southern (1975). Die in einer Restriktionsendonukleolyse geschnittene genomische DNA wird in einem TAE-Agarosegel aufgetrennt. Der Transfer der DNA-Fragmente aus dem Agarosegel auf eine Nylonmembran erfolgte durch einen Kapillar-Blot. Vor dem Transfer wurde das Agarosegel nacheinander für jeweils 20 min in 0,25 M HCI, DENAT- und RENAT-Lösung inkubiert (zwischen den Inkubationsschritten kurz mit H₂O waschen). So wird unter anderem ein Teil der Purine abgespalten und durch Auftrennung der Stränge ein Transfer großer DNA-Fragmente erleichtert. Anschließend wird der Transfer wie folgt aufgebaut: Auf einem Behältnis mit Transferlösung (20x SSC) wird eine Glasplatte gelegt und über diese ein langer Streifen Whatman-Papier gelegt. Dieser dient als "Salzbrücke" und reicht mit beiden Enden der kurzen Seite in die Transferlösung. Auf die Brücke wird mit den Taschen nach unten zeigend das Agarosegel platziert und auf dieses wiederum eine Nylonmembran (Hybond-N+, GE Healthcare Life Sciences) gelegt. Auf diese werden schließlich zwei Whatmanpapiere in der gleichen Größe sowie ein großer Stapel Papierhandtücher platziert. Ein gleichmäßig verteiltes Gewicht auf dem Papierstapel gewährleistet eine dichte Verbindung zwischen den Lagen des Transfersystems. Die Transferlösung wird aus dem Pufferreservoir durch Kapillarkräfte über die Salzbrücke, das Gel und die Membran in die Papierhandtücher gesaugt. Die DNA-Fragmente werden durch den Pufferstrom aus dem Gel eluiert und binden an die darüber liegende Nylonmembran. Der Kapillar-Blot erfolgte in der Regel über Nacht, jedoch mindestens für 4 Stunden. Nach einem Transfer der Nukleinsäuren wurde die DNA auf der Membran durch UV-Bestrahlung (120 mJ/cm²) in einer UV-Kammer (BLX-254; Vilber Lourmat) fixiert.

<u>20x SSC</u>

3 M NaCl 300 mM Na-Citrat x 2 H₂O In H₂O_{bid.} Mit HCl auf pH 7,0 einstellen

RENAT-Lösung 1,5 M NaCl 282 mM Tris-HCl

218 mM Tris

In H₂O_{bid.}

DENAT-Lösung

1,5 M NaCl 400 mM NaOH In H₂O_{bid.}

Der spezifische Nachweis immobilisierter Nukleinsäure (Southern-Analyse):

Für den Nachweis der gewünschten Fragmente wurden genspezifische Sonden verwendet. Diese wurden durch den Einbau von Digoxigenin-11-dUTP (DIG-dUTP) während einer PCR markiert. Ein PCR-Ansatz enthielt 5 ng linearisierte Plasmid-DNA, 5 µl PCR-Puffer, 5 µl PCR-DIG-Labeling-Mix (DIG-Labeling Kit, Roche), jeweils 20 pmol der beiden Oligonukleotide, 0,5 μ l Phusion-DNA-Polymerase und wurde mit H₂O_{bid.} auf 50 μ l aufgefüllt. Die Reaktion erfolgte in einem Thermocycler PTC200 (MJ Research) analog einer normalen PCR.

Die Hybond-N+-Membran wurde mit Southern-Hybridisierungspuffer für mindestens 30 min bei 65 °C in einer Hybridisierungsröhre präinkubiert. Die DIG-markierte Sonde wurde in 15-20 ml Southern-Hybridisierungspuffer gelöst und für 5 min bei 99 °C in einem Wasserbad denaturiert und nach dem Entfernen des Präinkubationspuffers zu der Membran gegeben. Die Hybridisierung der Sonde erfolgte bei 65 °C in der Regel über Nacht, nicht jedoch kürzer. Im Anschluss wurde die Membran für jeweils 15 min bei 65 °C mit Southern-Waschpuffer I, Southern-Waschpuffer II und Southern-Waschpuffer III gewaschen.

Die nachfolgenden Waschschritte wurden nun bei Raumtemperatur ausgeführt. Nach 5 min Inkubation mit DIG-Waschpuffer wurde die Membran 30 min mit DIG2-Puffer blockiert. Anschließend wurde eine DIG2-Antikörperlösung (Anti-Digoxigenin-AB Fab-Fragmente [Roche] 1:10.000 in DIG2-Puffer) hinzugegeben und für 30 bis 60 min inkubiert. Anschließend wurde die Membran zweimal 15 min mit DIG-Waschpuffer gewaschen und 5 min mit DIG3 äquilibriert. In einer Plastikhülle wurde die Membran für 5 min mit einer Chemilumineszenzlösung (CDP-Star [Roche] 1:100 in DIG3) inkubiert. Anschließend wurde die Membran in einen Plastikbeutel eingeschweißt und das Chemilumineszenzsignal mit dem Aufnahmesystem ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare Life Sciences) detektiert.

20xSSPE

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

Denhardt-Lösung

2% (v/v) BSA Fraktion V (Sigma A-9647) 2% (v/v) Ficoll 2% (v/v) PVP (Sigma PVP-360) In H₂Ob_{id}

Southern-Hybridisierungspuffer

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

Southern-Waschpuffer I

 $\begin{array}{l} 2x \; SSPE \\ 0,1\% \; SDS \\ \text{in } H_2O_{\text{bid.}} \end{array}$

Southern-Waschpuffer II

1x SSPE 0,1% SDS

Southern Waschpuffer III

0,1x SSPE 0,1% SDS in H₂O_{bid.}

DIG1

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

DIG-Waschpuffer

0,3% Tween-20 In DIG1-Lösung

DIG2

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

DIG3

100 mM Tris-HCl 100 mM CaCl In $H_2O_{bid.}$ pH-Wert mit NaOH auf 9,5 einstellen

4.3.4 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Standard-PCR:

Die Polymerase Kettenreaktion (PCR) wurde modifiziert nach Innis (1990) durchgeführt. Ein typischer Ansatz enthielt 1-10 ng Ausgangs-DNA, zwei sequenzspezifischen Oligonukleotiden ("Primer", 1 μ M) und 125 μ M dNTP-Mix (aus je 200 μ M dATP, dCTP, dGTP und dTTP) in PCR-Puffer und 1 U Polymerase (Taq oder Phusion).

Das standardmäßig angewendete Programm für eine <u>Taq-PCR</u> war: 8 min bei 94 °C [30 s bei 94 °C / 30 s bei 65 °C / X* min 72 °C] x34 8 min bei 72 °C

Das standardmäßig angewendete Programm für eine <u>Phusion-PCR</u> war: 30 sec bei 94 °C [10 s bei 94 °C / 20 s bei 65 °C / X* min 72 °C] x34 8 min bei 72 °C

* die Elongationszeit wurde je nach verwendeter Polymerase und Größe des zu amplifizierenden DNA-Produkts angepasst. Eine Taq-Polymerase benötigt für die Herstellung eines 1 kb-Produkts ca. 1 min, während die Phusion-Polymerase für die Herstellung eines 1 kb-Produkts ca. 30 s benötigt.

Die Reaktionen erfolgten in Thermocyclern PTC100 / 200 (MJ Research; St. Bruno, Quebec, Kanada) oder Labcycler (SensoQuest GmbH; Göttingen, Deutschland).

4.3.5 Sequenzanalyse

Sequenzierung von DNA:

Die DNA-Sequenzierung wurde von der Zentralabteilung DNA am Max-Planck-Institut für Züchtungsfoschung (MPIZ) in Köln und von dem Sequencing Service, am Biozentrum der LMU München durchgeführt. Die Sequenzierung erfolgte nach der BigDye v3.1-Methode. Die erhaltenen Daten wurden mit dem Programm Clonemanager (Version 9; Scientific and Educational Software) ausgewertet.

Sequenz- und Strukturanaylse:

Für die Identifizierung homologer oder ähnlicher Proteine und Nukleinsäuresequenzen wurde das NCBI BLAST (Altschul *et al.*, 1990; Gish und States, 1993; Altschul *et al.*, 1997) verwendet.

Für die Erstellung von Aminosäuresequenzvergleichen wurden Clustal W und Clustal X (Larkin *et al.*, 2007) verwendet.

Für die Graphische Darstellung und Auswertung von Aminosäuresequenzvergleichen wurde GeneDoc 2.6 (Nicholas *et al.,* 1997) verwendet.

Die Identifikation von funktionellen Domänen in Proteinen erfolgte mit SMART (Schultz *et al.*, 1998; Letunic *et al.*, 2012) und NCBI CDD (Marchler-Bauer und Bryant, 2004; Marchler-Bauer *et al.*, 2009; Marchler-Bauer *et al.*, 2011).

Identifikation der PAM2-tragenden Proteine

Die Identifikation von Genen für Proteine, die ein potentielles PAM2-Motiv besitzen, wurde in Zusammenarbeit mit Mario Albrecht (derzeitige Adresse: Institut für Biometrie und Medizinische Informatik, Abteilung für Bioinformatik, Universitätsmedizin Greifswald, Ferdinand-Sauerbruch-Str. 1, 17475 Greifswald, Deutschland) durchgeführt. Hierfür wurde auf die Datenbank NCBI CDD (s.o.; http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/Structure/cdd/wrpsb.cgi) zurückgegriffen. Vorhergesagte Domänen mit einem E-Wert unter 2,5 wurden weiter analysiert.

4.4 Proteinbiochemische Methoden

Konzentrationsbestimmung von Proteinen nach der Bradford-Methode:

Diese Methode ist modifiziert nach Bradford (1976). Für eine Bestimmung der Proteinkonzentration werden 10 µl der Proteinlösung mit 200 µl Bradford-Färbelösung (1:5 mit H₂O verdünnt; Bio-Rad Laboratories, München) vermischt, in eine 96-Behälterplatte gefüllt, mit einer Aluminiumfolie verpackt und bei Raumtemperatur 10 min im Dunkeln inkubiert. Anschließend wird in einem Monochromator-basierten Fluoreszenzspektrometer (Infinite M200; Tecan) die Absorption bei einer Wellenlänge von 595 nm bestimmt. Durch Messen einer Standardreihe aus Proben mit 0,05 / 0,1 / 0,15 und 0,2 µg/ml BSA (in H₂O_{bid.}) wurde zudem eine Standardkurve erstellt. Als Blindwert dient H₂O. Vor der Messung werden die Proteinlösungen standardmäßig 1:20 mit Wasser verdünnt, damit diese im Bereich der Standardkurve liegen. Sind diese dennoch außerhalb des messbaren Bereichs, muss eine entsprechend höhere oder niedrigere Verdünnungstufe gemessen werden.

Zellaufschluss von U. maydis für eine Dichtegradientenzentrifugation:

Hauptkulturen von 150 ml CM wurden bei einer OD₆₀₀ von 0,5 bis 0,8 abzentrifugiert und nach einem Waschschritt mit NM in 150 ml NM resuspendiert, um das filamentöse Wachstum zu induzieren. Nach einer Inkubation von sechs Stunden bei 28 °C wurden die Filamente protoplastiert. Hierfür wurden die Zellen durch Zentrifugation (8.500 Upm, 5 min, RT) pelletiert und in 25 ml SCS resuspendiert, abzentrifugiert (8.500 Upm, 5 min, RT) und in 5 ml SCS/Novozym 234 (3,5 mg/ml) resuspendiert. Nach einer Inkubation von 10-15 min wurde zu der Suspension 40 eiskaltes SCS hinzugegeben und die Zellen wurden abzentrifugiert (2.400 Upm, 5 min, 4 °C). Das Pellet wurde zweimal mit 20 ml eiskaltem SCS und anschließend einmal mit 10 ml eiskaltem ST(C)* gewaschen (je 2.400 Upm, 5min, 4 °C). Das Pellet wurde in 2 ml eiskalten Usti-VIB (+ Protease-Inhibitoren) resuspendiert. Alle nachfolgenden Schritte wurden bei 4°C ausgeführt.

Für den Zellaufschluss wird die Zellsuspension in einen gekühlten Hand-Homogenisator (Volumen: 5 ml, Spaltbreite: 0,01-0,03 mM, Sartorius AG; Göttingen, Deutschland) überführt. Die Zellsuspension wird mit 20 langsamen Stößen aufgeschlossen, anschließend in ein 15 ml-Reaktionsgefäß überführt und abzentrifugiert (5.000 Upm, 5 min, 4 °C). Der Überstand wird in ein neues 15 ml-Reaktionsgefäß überführt und das Pellet in 2 ml Usti-VIB (+

Protease-Inhibitoren) resuspendiert. Dieses wird erneut in dem Homogenisator mit 20 langsamen Stößen aufgeschlossen. Das Homogenat wird in ein 15 ml-Reaktionsgefäß überführt und abzentrifugiert (5.000 Upm, 5 min, 4 °C). Der Überstand wird mit dem ersten Überstand vereint und abzentrifugiert (5.000 Upm, 5 min, 4 °C). Der Überstand wird in ein neues 15 ml-Reaktionsgefäß überführt und ein weiteres Mal zentrifugiert (5.000 Upm, 5 min, 4 °C). Der Überstand wird das Pellet verworfen.

Usti-VIB (vesicle isolation buffer)

20 mM HEPES-NaOH, pH 7,4 400 mM Sorbitol 150 mM NaCl 5 mM MgCl₂ x 6 H₂O 1 mM Na₂-EDTA In H₂O_{bid}

Protease-Inhibitoren

- 1 Tablette complete EDTA-free (Roche)
- 250 µl Benzamidin (500 mM Stammlösung)
- 250 µl PMSF (100 mM Stammlösung) In 25 ml Usti-VIB-Puffer

<u>ST(C)*</u>

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

Dichtegradientenzentrifugation:

Diese Methode ist modifiziert nach Graham (2002).

Das Gesamtzelllysat (GZL) von *U. maydis* wurde über einen diskontinuierlichen Dichtegradienten (Stufengradient) aufgetrennt. Der Dichtegradient wurde mit Iodixanol hergestellt. Eine Stammlösung von Iodixanol (60% Iodixanol in H₂O; OptiPrep, Sigma-Aldrich) wurde 6:1 mit OptiPrep Diluent (OD) verdünnt, um eine 50% Arbeitslösung zu erhalten (WS, *working stock*). Aus dem 50% WS können durch Verdünnung mit Usti-VIB eine 35% WS und eine 5% WS hergestellt werden. Es werden 600 µl von dem GZL mit 2,4 ml 50% WS vermischt, damit 3 ml eines 40% GZL-Iodixanol-Gemisches entstehen. Dieses GZL/Iodixanol-Gemisch wird in ein 14 ml Ultrazentrifugationsröhrchen (14x95mm, Polyallomer, für den Rotor SW 40 Ti, Beckman Coulter GmbH; Krefeld, Deutschland) gefüllt. Dieses Gemisch wird vorsichtig mit 9 ml 35% WS und 1 ml 5% WS überschichtet. Nach Zentrifugation (200.000x g, 3 h, 4 °C, SW 40 Ti, Beckman L8-70) wurde der Gradient von oben zu je 500 µl Einheiten in gekühlte 1,5 ml-Reaktionsgefäße abgetragen. Die Aliquots wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und konnten später ohne weitere Behandlung oder Fällung in einer Western-Analyse untersucht werden.

6x Optiprep Diluent (OD)

120 mM HEPES-NaOH (pH 7,4) 2,4 M Sorbitol 900 mM NaCl 30 mM MgCl₂ x 6 H₂O 6 mM Na₂-EDTA In H₂O_{bid.}

Standardmäßige Präparation von Proteinen aus U. maydis:

Eine Hauptkultur von 50 ml CM wurde bei einer OD_{600} von 0,5-0,8 (je Experiment alle Kulturen angleichen) durch Zentrifugation (Sporidien: 5.000 Upm, 5 min; Filamente: 8.500 Upm, 5 min) pelletiert und in 2 ml eiskalten Usti-VIB (+Protease-Inhibitoren) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in Metallbehälter (in flüssigem Stickstoff gekühlt) überführt und zwei Metallkugeln (in Stickstoff gekühlt) hinzugegeben. Die Metallbehälter wurden in eine Kugelmühle (MM 400; Retsch GmbH, Haan, Deutschland) eingesetzt und die Zellsuspension zweimal für 5 min bei 30 Herz und 4 °C aufgeschlossen. Zwischen den beiden Schritten wurde die Probe in flüssigem Stickstoff gekühlt. Die aufgeschlossene Zellsuspension wurde bei 4 °C aufgetaut, in ein vorgekühltes 2 ml-Reaktionsgefäß überführt und zentrifugiert (10.000x g, 15 min, 4 °C). Der Überstand wurde in ein neues, vorgekühltes 2 ml-Reaktionsgefäß überführt und kann bei -80 °C für mehrere Monate gelagert werden.

Proteinpräparation aus S. cerevisiae:

Dieses Protokoll wurde modifiziert nach dem Yeast Protocols Handbook (Clontech). Um die Expression der Hybridproteine in dem Hefestamm AH109 zu überprüfen, wurden die Proteine mit folgender Methode isoliert. Eine Vorkultur von 5 ml SD-leu-trp wurde mit einer Hefekolonie angeimpft und über Nacht bei 28 °C inkubiert. Am nächsten Abend wurde eine Hauptkultur von 50 ml SD-leu-trp mit 75-100 μ l der Vorkultur angeimpft und bei 28 °C über Nacht inkubiert. Die Zellen wurden bei einer OD₆₀₀ von ca. 0,75 geerntet. Die genaue OD₆₀₀ der Kultur wurde notiert!

Mit Hilfe des Kulturvolumens und der OD_{600} konnten die OD-Einheiten der Probe berechnet werden

- Beispiel: 50 ml einer Kultur mit einer OD₆₀₀ von 0,75 = 50 x 0,75 = 37,5 OD-Einheiten Die Zellen wurden durch Zentrifugation (2.000x g, 5 min, RT) pelletiert und das Zellpellet in YCB (+ Protease-Inhibitoren) resuspendiert. Das Volumen des YCB richtete sich nach den OD-Einheiten der Kultur. Es wurden 100 μ I YCB pro 7,5 OD-Einheiten eingesetzt.

- Beispiel: Bei 37,5 OD-Einheiten wird ein Zellpellet in 500 μl YCB resuspendiert: (37,5 / 7,5 * 100 = 500 μl)

Die Zellsuspension wurde zusammen mit ca. 0,3 g Glasperlen in ein 2 ml-Reaktionsgefäß überführt. Die Zellsuspension wurde für 10 min bei 99 °C in einem Heizblock bei 1.000 Upm schüttelnd aufgekocht. Die Zellsuspension wurde anschließend abzentrifugiert (13.000 Upm, 10 min, 4 °C) und der Überstand in ein neues, vorgekühltes 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Die Probe konnte direkt auf ein SDS-Gel aufgetragen werden oder bei -70 °C für mehrere Monate aufbewahrt werden.

YCB (yeast cracking buffer)

40 mM Tris-HCl (pH 6,8) 8 M Urea 5% (w/v) SDS 0,1 mM Na₂-EDTA 0,4 mg/ml Bromphenolblau In $H_2O_{bid.}$ Vor Gebrauch wird 1 ml YCB mit 10 µl β-Mercaptoethanol, 70 µl Benzamidin (0,5 M) und 50 µl PMSF (0,5 M) versetzt.

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Diese Methode ist modifiziert nach Laemmli (1970)

Proteinextrakte wurden unter denaturierenden Bedingungen mittels einer SDS-Polyacrylamid-Gelektrophorese aufgetrennt. Das Gel wurde zwischen zwei vertikalen Glasplatten auspolymerisiert, hatte eine Schichtdicke von 1 mm und bestand aus einem Sammelgel mit anschließendem Trenngel. Die Proben wurden mit 3x Probenpuffer für 10 min bei 80-95 °C aufgekocht und anschließend auf Eis gekühlt. Die Auftrennung erfolgte in einer Mini Protean II Apparatur (Biorad) für 1-1,5 h bei 30 mA pro Gel.

3x Probenpuffer (Laemmli)

15 mM Tris-HCl, pH 6,8 30% (v/v) Glycerin 6% (w/v) SDS 0,003% Bromphenolblau In H₂O_{bid.}

<u>Trenngel</u>

375 mM Tris-HCl, pH 8,8 8%-10% Acrylamid 0,1% (w/v) SDS 1,25% (v/v) Glycerin 0,05% (w/v) APS 0,001% (v/v) TEMED In H₂O_{bid.}

<u>Sammelgel</u>

125 mM Tris-HCl, pH 6,8 5% Acrylamid 0,1% (w/v) SDS 0,05% (w/v) APS 0,001% (v/v) TEMED In H₂O_{bid.}

SDS-Laufpuffer

25 mM Tris, pH 8,4 192 mM Glycin 0,1% (w/v) SDS In H₂O_{bid.}

Western-Blot und Analyse (semi-trocken)

Diese Methode wurde modifiziert nach Kyhse-Andersen (1984). Die durch die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine wurden mit einem semi-trockenen Blot auf eine PVDF-Membran (Hybond-P, GE Healthcare Life Sciences) übertragen. Dazu wurde die Membran zunächst 30 s in 100% Methanol aktiviert, 5 min mit $H_2O_{bid.}$ gewaschen und anschließend in dem Anodenpuffer 2 äquilibriert. Der Aufbau des Blots von oben (Kathode) nach unten (Anode) war wie folgt (Semi-Trocken-Blotter B44, Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland):

Kathode

drei Lagen Whatman-Papier in Kathodenpuffer Polyacrylamidgel (Minigel) PVDF-Membran (Hybond-P, GE-Healthcare Life Sciences) eine Lage Whatman-Papier in Anodenpuffer 2 eine Lage Whatman-Papier in Anodenpuffer 1

Anode

Der Transfer wurde für 1,5 h bei ~1,5 mA/cm² durchgeführt.

Der immunologische Nachweis von Proteinen erfolgte mit Hilfe einer an den sekundären Antikörper gekoppelten Meerrettich-Peroxidase (HRP, *horseradish peroxidase*). Hierfür wurde die PVDF-Membran (Hybond[™]-P, Amersham / GE Healthcare Life Sciences) nach dem Blotten für einen Zeitraum von 30 bis 60 min mit 3% Magermilchpulver in TBST blockiert. Anschließend wurde die Membran über Nacht mit dem primären Antikörper in

TBST mit 3% Magermilchpulver inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für 10 min in TBST wurde die Membran für 1 h mit dem sekundären Antikörper in TBST mit 3% Magermilchpulver inkubiert. Anschließend wurde die Membran dreimal für 10 min mit TBST und einmal für 5 min in TBS gewaschen. In einer Plastikhülle wurde die Membran für 5 min mit einer Chemilumineszenz-Lösung ECL plus Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare Life Sciences) oder SuperSignal West Dura (Thermo Scientific) inkubiert. Anschließend wurde die Membran in einen Plastikbeutel eingeschweißt und das Chemilumineszenzsignal mit dem Aufnahmesystem ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare Life Sciences) detektiert.

Primäre Antikörper

- α Gfp (Mischung der monoklonalen Antikörper 7.1 und 13.1, Maus IgG_{1K}; Roche)
- αc-Myc (Anti-c-Myc, monoklonaler Antikörper, Klon 9E10, Maus IgG_{1K}; Roche)
- αHA (Anti-HA, monoklonaler Antikörper, Klon 12CA5, Maus IgG_{2bK}; Roche)
- αTub1 (Anti-a-Tubulin, monoklonaler Antikörper, Klon DM 1A, Maus IgG_{1K}; Sigma)

Sekundärer Antikörper

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

Die primären Antikörper wurden in einer Konzentration von 0,1 μ g/ml (in TBST mit 3% Magermilchpulver) eingesetzt, mit Ausnahme von α Gfp, der in einer Konzentration von 0,4 μ g/ml (in TBST mit 3% Magermilchpulver) eingesetzt wurde. Der sekundäre Antikörper wurde in einer Konzentration von 40 ng/ml (in TBST mit 3% Magermilchpulver) eingesetzt.

<u>TBS</u>

20 mM Tris-HCl, pH 7,6 136 mM NaCl in $H_2O_{\text{bid.}}$

<u>TBST</u>

20 mM Tris-HCl, pH 7,6 136 mM NaCl 0,05% (v/v) Tween 20 in H₂O_{bid.}

Anodenpuffer 1

300 mM Tris-HCl, pH 10,4 15% MeOH In H₂O_{bid.}

Anodenpuffer 2 30 mM Tris-HCl, pH 10,4 15% MeOH In H₂O_{bid.}

Kathodenpuffer

25 mM Tris-HCl, pH 9,4 40 mM ε-Aminocapronsäure 15% MeOH In H₂O_{bid.}

4.5 Computerprogramme

Für die Erstellung und Bearbeitung der Sequenzen von Plasmiden und genomischen Loci, wurde das Programm Clonemanager 9 (Scientific and Educational Softare; Cary, NC, USA) verwendet. Zudem wurden mit diesem Programm Klonierungsstrategien entworfen und Oligonukleotide geplant, sowie genetische Karten der bearbeiteten Nukleinsäuresequenzen erstellt.

Die statistischen Auswertungen wurden mit dem Programm GraphPad Prism 5 (Version 5.04; GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) durchgeführt.

Für die Erstellung und Bearbeitung der Abbildungen wurden die Programme Canvas 12 (ACD Systems of America, Inc., Seattle, WA, USA) sowie Adobe Photoshop 7.0 und CS5 (Adobe Systems GmbH, München, Deutschland) verwendet.

Weitere verwendete Programme sind unter den jeweiligen Methoden aufgeführt.

5. Literaturverzeichnis

Adelstein, R.S., Eisenberg, E. (1980) Regulation and kinetics of the actin-myosin-ATP interaction. *Annual review of biochemistry* **49**: 921-956

Albrecht, M., Lengauer, T. (2004) Survey on the PABC recognition motif PAM2. *Biochemical and biophysical research communications* **316**: 129-138

Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology* **215**: 403-410

Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic acids research* **25**: 3389-3402

Aronov, S., Gelin-Licht, R., Zipor, G., Haim, L., Safran, E., Gerst, J.E. (2007) mRNAs encoding polarity and exocytosis factors are cotransported with the cortical endoplasmic reticulum to the incipient bud in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology* **27**: 3441-3455

Assenholt, J., Mouaikel, J., Saguez, C., Rougemaille, M., Libri, D., Jensen, T.H. (2011) Implication of Ccr4-Not complex function in mRNA quality control in *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA* **17**: 1788-1794

Ausubel, F.M., Brenz, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Strukl, K. (1987) *Current Protocols in Molecular Biology*: John Wiley & Sons, Inc., USA.

Backer, J.M. (2008) The regulation and function of Class III PI3Ks: novel roles for Vps34. *The Biochemical journal* **410**: 1-17

Baer, B.W., Kornberg, R.D. (1980) Repeating structure of cytoplasmic poly(A)-ribonucleoprotein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **77**: 1890-1892

Baer, B.W., Kornberg, R.D. (1983) The protein responsible for the repeating structure of cytoplasmic poly(A)-ribonucleoprotein. *The Journal of cell biology* **96**: 717-721

Banuett, F., Herskowitz, I. (1989) Different a alleles of *Ustilago maydis* are necessary for maintenance of filamentous growth but not for meiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **86**: 5878-5882

Bashirullah, A., Cooperstock, R.L., Lipshitz, H.D. (1998) RNA localization in development. *Annual review of biochemistry* **67**: 335-394

Basyuk, E., Galli, T., Mougel, M., Blanchard, J.M., Sitbon, M., Bertrand, E. (2003) Retroviral genomic RNAs are transported to the plasma membrane by endosomal vesicles. *Developmental cell* **5**: 161-174

Baumann, S., König, J., Koepke, J., Feldbrügge, M. (2013) Endosomal transport of septin mRNA and encoded protein mediates correct septin filamentation, submitted.

Baumann, S., Pohlmann, T., Jungbluth, M., Brachmann, A., Feldbrügge, M. (2012) Kinesin-3 and dynein mediate microtubule-dependent co-transport of mRNPs and endosomes. *Journal of cell science* **125**: 2740-2752

Becalska, A.N., Gavis, E.R. (2009) Lighting up mRNA localization in *Drosophila* oogenesis. *Development* **136**: 2493-2503

Becht, P., König, J., Feldbrügge, M. (2006) The RNA-binding protein Rrm4 is essential for polarity in *Ustilago maydis* and shuttles along microtubules. *Journal of cell science* **119**: 4964-4973

Becht, P., Vollmeister, E., Feldbrügge, M. (2005) Role for RNA-binding proteins implicated in pathogenic development of *Ustilago maydis*. *Eukaryotic cell* **4**: 121-133

Berlanga, J.J., Baass, A., Sonenberg, N. (2006) Regulation of poly(A) binding protein function in translation: Characterization of the Paip2 homolog, Paip2B. *RNA* **12**: 1556-1568

Bernstein, P., Peltz, S.W., Ross, J. (1989) The poly(A)-poly(A)-binding protein complex is a major determinant of mRNA stability in vitro. *Molecular and cellular biology* **9**: 659-670

Besse, F., Ephrussi, A. (2008) Translational control of localized mRNAs: restricting protein synthesis in space and time. *Nature reviews Molecular cell biology* **9**: 971-980

Betley, J.N., Heinrich, B., Vernos, I., Sardet, C., Prodon, F., Deshler, J.O. (2004) Kinesin II mediates Vg1 mRNA transport in *Xenopus* oocytes. *Current biology* **14**: 219-224

Bevan, M., Barnes, W.M., Chilton, M.D. (1983) Structure and transcription of the nopaline synthase gene region of T-DNA. *Nucleic acids research* **11**: 369-385

Bianco, A., Dienstbier, M., Salter, H.K., Gatto, G., Bullock, S.L. (2010) Bicaudal-D regulates fragile X mental retardation protein levels, motility, and function during neuronal morphogenesis. *Current biology* **20**: 1487-1492

Bloom, G.S. (2001) The UNC-104/KIF1 family of kinesins. Current opinion in cell biology 13: 36-40

Bobola, N., Jansen, R.P., Shin, T.H., Nasmyth, K. (1996) Asymmetric accumulation of Ash1p in postanaphase nuclei depends on a myosin and restricts yeast mating-type switching to mother cells. *Cell* **84**: 699-709

Böhl, F., Kruse, C., Frank, A., Ferring, D., Jansen, R.P. (2000) She2p, a novel RNA-binding protein tethers *ASH1* mRNA to the Myo4p myosin motor via She3p. *The EMBO journal* **19**: 5514-5524

Bölker, M. (2001) Ustilago maydis--a valuable model system for the study of fungal dimorphism and virulence. *Microbiology* **147**: 1395-1401

Bölker, M., Urban, M., Kahmann, R. (1992) The a mating type locus of *U. maydis* specifies cell signaling components. *Cell* **68**: 441-450

Brachmann, A., König, J., Julius, C., Feldbrügge, M. (2004) A reverse genetic approach for generating gene replacement mutants in *Ustilago maydis*. *Molecular genetics and genomics* **272**: 216-226

Brachmann, A., Weinzierl, G., Kämper, J., Kahmann, R. (2001) Identification of genes in the bW/bE regulatory cascade in *Ustilago maydis*. *Molecular microbiology* **42**: 1047-1063

Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* **72**: 248-254

Bramham, C.R., Wells, D.G. (2007) Dendritic mRNA: transport, translation and function. *Nature reviews Neuroscience* **8**: 776-789

Bravo, J., Aguilar-Henonin, L., Olmedo, G., Guzmán, P. (2005) Four distinct classes of proteins as interaction partners of the PABC domain of *Arabidopsis thaliana* Poly(A)-binding proteins. *Molecular genetics and genomics* **272**: 651-665

Breeden, L., Nasmyth, K. (1987) Similarity between cell-cycle genes of budding yeast and fission yeast and the Notch gene of *Drosophila*. *Nature* **329**: 651-654

Brefort, T., Doehlemann, G., Mendoza-Mendoza, A., Reissmann, S., Djamei, A., Kahmann, R. (2009) *Ustilago maydis* as a Pathogen. *Annual review of phytopathology* **47**: 423-445

Brenner, S. (1974) The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 77: 71-94

Brook, M., Gray, N.K. (2012) The role of mammalian poly(A)-binding proteins in co-ordinating mRNA turnover. *Biochemical Society transactions* **40**: 856-864

Brook, M., McCracken, L., Reddington, J.P., Lu, Z.L., Morrice, N.A., Gray, N.K. (2012) The multifunctional poly(A)-binding protein (PABP) 1 is subject to extensive dynamic post-translational modification, which molecular modelling suggests plays an important role in co-ordinating its activities. *The Biochemical journal* **441**: 803-812

Brook, M., Smith, J.W., Gray, N.K. (2009) The DAZL and PABP families: RNA-binding proteins with interrelated roles in translational control in oocytes. *Reproduction* **137**: 595-617

Bullock, S.L., Nicol, A., Gross, S.P., Zicha, D. (2006) Guidance of bidirectional motor complexes by mRNA cargoes through control of dynein number and activity. *Current biology* **16**: 1447-1452

Burd, C.G., Emr, S.D. (1998) Phosphatidylinositol(3)-phosphate signaling mediated by specific binding to RING FYVE domains. *Molecular cell* **2**: 157-162

Charalambous, D.C., Pasciuto, E., Mercaldo, V., Pilo Boyl, P., Munck, S., Bagni, C., Santama, N. (2013) KIF1Bbeta transports dendritically localized mRNPs in neurons and is recruited to synapses in an activity-dependent manner. *Cellular and molecular life sciences* **70**: 335-356

Chartrand, P., Meng, X.H., Singer, R.H., Long, R.M. (1999) Structural elements required for the localization of *ASH1* mRNA and of a green fluorescent protein reporter particle *in vivo*. *Current biology* **9**: 333-336

Ciosk, R., DePalma, M., Priess, J.R. (2004) ATX-2, the *C. elegans* ortholog of ataxin 2, functions in translational regulation in the germline. *Development* **131**: 4831-4841

Cohen, R.S. (2005) The role of membranes and membrane trafficking in RNA localization. *Biology of the cell* **97**: 5-18

Cohen, S.N., Chang, A.C., Hsu, L. (1972) Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **69**: 2110-2114

Condeelis, J., Singer, R.H. (2005) How and why does beta-actin mRNA target? *Biology of the Cell* **97**: 97-110

Coumailleau, F., Das, V., Alcover, A., Raposo, G., Vandormael-Pournin, S., Le Bras, S., Baldacci, P., Dautry-Varsat, A., Babinet, C., Cohen-Tannoudji, M. (2004) Over-expression of Rififylin, a new RING finger and FYVE-like domain-containing protein, inhibits recycling from the endocytic recycling compartment. *Molecular biology of the cell* **15**: 4444-4456

Craig, A.W., Haghighat, A., Yu, A.T., Sonenberg, N. (1998) Interaction of polyadenylate-binding protein with the eIF4G homologue PAIP enhances translation. *Nature* **392**: 520-523

Dale, L., Matthews, G., Colman, A. (1993) Secretion and mesoderm-inducing activity of the TGF-betarelated domain of *Xenopus* Vg1. *The EMBO journal* **12**: 4471-4480

Dean, R., Van Kan, J.A., Pretorius, Z.A., Hammond-Kosack, K.E., Di Pietro, A., Spanu, P.D., Rudd, J.J., Dickman, M., Kahmann, R., Ellis, J., Foster, G.D. (2012) The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular plant pathology* **13**: 414-430

Delanoue, R., Herpers, B., Soetaert, J., Davis, I., Rabouille, C. (2007) *Drosophila* Squid/hnRNP helps Dynein switch from a *gurken* mRNA transport motor to an ultrastructural static anchor in sponge bodies. *Developmental cell* **13**: 523-538

Deng, Y., Singer, R.H., Gu, W. (2008) Translation of ASH1 mRNA is repressed by Puf6p-Fun12p/eIF5B interaction and released by CK2 phosphorylation. *Genes & development* **22**: 1037-1050

Deo, R.C., Sonenberg, N., Burley, S.K. (2001) X-ray structure of the human hyperplastic discs protein: an ortholog of the C-terminal domain of poly(A)-binding protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**: 4414-4419

Dictenberg, J.B., Swanger, S.A., Antar, L.N., Singer, R.H., Bassell, G.J. (2008) A direct role for FMRP in activity-dependent dendritic mRNA transport links filopodial-spine morphogenesis to fragile X syndrome. *Developmental cell* **14**: 926-939

Dienstbier, M., Boehl, F., Li, X., Bullock, S.L. (2009) Egalitarian is a selective RNA-binding protein linking mRNA localization signals to the dynein motor. *Genes & development* **23**: 1546-1558

Djamei, A., Kahmann, R. (2012) *Ustilago maydis*: dissecting the molecular interface between pathogen and plant. *PLoS pathogens* **8**: e1002955

Djamei, A., Schipper, K., Rabe, F., Ghosh, A., Vincon, V., Kahnt, J., Osorio, S., Tohge, T., Fernie, A.R., Feussner, I., Feussner, K., Meinicke, P., Stierhof, Y.D., Schwarz, H., Macek, B., Mann, M., Kahmann, R. (2011) Metabolic priming by a secreted fungal effector. *Nature* **478**: 395-398

Doehlemann, G., van der Linde, K., Assmann, D., Schwammbach, D., Hof, A., Mohanty, A., Jackson, D., Kahmann, R. (2009) Pep1, a secreted effector protein of *Ustilago maydis*, is required for successful invasion of plant cells. *PLoS pathogens* **5**: e1000290

Dollar, G., Struckhoff, E., Michaud, J., Cohen, R.S. (2002) Rab11 polarization of the *Drosophila* oocyte: a novel link between membrane trafficking, microtubule organization, and oskar mRNA localization and translation. *Development* **129**: 517-526

Doyle, M., Kiebler, M.A. (2011) Mechanisms of dendritic mRNA transport and its role in synaptic tagging. *The EMBO journal* **30**: 3540-3552

Driever, W., Nüsslein-Volhard, C. (1988) A gradient of bicoid protein in *Drosophila* embryos. *Cell* **54**: 83-93

Elden, A.C., Kim, H.J., Hart, M.P., Chen-Plotkin, A.S., Johnson, B.S., Fang, X., Armakola, M., Geser, F., Greene, R., Lu, M.M., Padmanabhan, A., Clay-Falcone, D., McCluskey, L., Elman, L., Juhr, D., Gruber, P.J., Rüb, U., Auburger, G., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M., Van Deerlin, V.M., Bonini, N.M., Gitler, A.D. (2010) Ataxin-2 intermediate-length polyglutamine expansions are associated with increased risk for ALS. *Nature* **466**: 1069-1075

Elson, S.L., Noble, S.M., Solis, N.V., Filler, S.G., Johnson, A.D. (2009) An RNA transport system in *Candida albicans* regulates hyphal morphology and invasive growth. *PLoS genetics* **5**: e1000664

Elvira, G., Wasiak, S., Blandford, V., Tong, X.K., Serrano, A., Fan, X., del Rayo Sánchez-Carbente, M., Servant, F., Bell, A.W., Boismenu, D., Lacaille, J.C., McPherson, P.S., DesGroseillers, L., Sossin, W.S. (2006) Characterization of an RNA granule from developing brain. *Molecular & cellular proteomics* **5**: 635-651

Ephrussi, A., Dickinson, L.K., Lehmann, R. (1991) Oskar organizes the germ plasm and directs localization of the posterior determinant nanos. *Cell* **66**: 37-50

Erpapazoglou, Z., Froissard, M., Nondier, I., Lesuisse, E., Haguenauer-Tsapis, R., Belgareh-Touzé, N. (2008) Substrate- and ubiquitin-dependent trafficking of the yeast siderophore transporter Sit1. *Traffic* **9**: 1372-1391

Eulalio, A., Tritschler, F., Izaurralde, E. (2009) The GW182 protein family in animal cells: new insights into domains required for miRNA-mediated gene silencing. *RNA* **15**: 1433-1442

Evan, G.I., Lewis, G.K., Ramsay, G., Bishop, J.M. (1985) Isolation of monoclonal antibodies specific for human c-myc proto-oncogene product. *Molecular and cellular biology* **5**: 3610-3616

Fabian, M.R., Mathonnet, G., Sundermeier, T., Mathys, H., Zipprich, J.T., Svitkin, Y.V., Rivas, F., Jinek, M., Wohlschlegel, J., Doudna, J.A., Chen, C.Y., Shyu, A.B., Yates, J.R., 3rd, Hannon, G.J.,

Filipowicz, W., Duchaine, T.F., Sonenberg, N. (2009) Mammalian miRNA RISC recruits CAF1 and PABP to affect PABP-dependent deadenylation. *Molecular cell* **35**: 868-880

Farina, K.L., Hüttelmaier, S., Musunuru, K., Darnell, R., Singer, R.H. (2003) Two ZBP1 KH domains facilitate beta-actin mRNA localization, granule formation, and cytoskeletal attachment. *The Journal of cell biology* **160**: 77-87

Feldbrügge, M., Kämper, J., Steinberg, G., Kahmann, R. (2004) Regulation of mating and pathogenic development in *Ustilago maydis*. *Current opinion in microbiology* **7**: 666-672

Feldbrügge, M., Kellner, R., Schipper, K. (2013) The biotechnological use and potential of plant pathogenic smut fungi. *Applied microbiology and biotechnology* **97**: 3253-3265

Feldbrügge, M., Zarnack, K., Vollmeister, E., Baumann, S., Koepke, J., König, J., Münsterkötter, M., Mannhaupt, G. (2008) The posttranscriptional machinery of *Ustilago maydis*. *Fungal genetics and biology* **45** Suppl 1: S40-46

Field, J., Nikawa, J., Broek, D., MacDonald, B., Rodgers, L., Wilson, I.A., Lerner, R.A., Wigler, M. (1988) Purification of a RAS-responsive adenylyl cyclase complex from *Saccharomyces cerevisiae* by use of an epitope addition method. *Molecular and cellular biology* **8**: 2159-2165

Fuchs, U., Hause, G., Schuchardt, I., Steinberg, G. (2006) Endocytosis is essential for pathogenic development in the corn smut fungus *Ustilago maydis*. *The Plant cell* **18**: 2066-2081

Fuchs, U., Manns, I., Steinberg, G. (2005) Microtubules are dispensable for the initial pathogenic development but required for long-distance hyphal growth in the corn smut fungus *Ustilago maydis*. *Molecular biology of the cell* **16**: 2746-2758

Funakoshi, Y., Doi, Y., Hosoda, N., Uchida, N., Osawa, M., Shimada, I., Tsujimoto, M., Suzuki, T., Katada, T., Hoshino, S. (2007) Mechanism of mRNA deadenylation: evidence for a molecular interplay between translation termination factor eRF3 and mRNA deadenylases. *Genes & development* **21**: 3135-3148

Fundakowski, J., Hermesh, O., Jansen, R.P. (2012) Localization of a subset of yeast mRNAs depends on inheritance of endoplasmic reticulum. *Traffic* **13**: 1642-1652

Fusco, D., Accornero, N., Lavoie, B., Shenoy, S.M., Blanchard, J.M., Singer, R.H., Bertrand, E. (2003) Single mRNA molecules demonstrate probabilistic movement in living mammalian cells. *Current biology* **13**: 161-167

Gagnon, J.A., Mowry, K.L. (2011) Molecular motors: directing traffic during RNA localization. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* **46**: 229-239

Gan, X., Wang, J., Wang, C., Sommer, E., Kozasa, T., Srinivasula, S., Alessi, D., Offermanns, S., Simon, M.I., Wu, D. (2012) PRR5L degradation promotes mTORC2-mediated PKC-delta phosphorylation and cell migration downstream of Galpha12. *Nature cell biology* **14**: 686-696

Gao, Y., Tatavarty, V., Korza, G., Levin, M.K., Carson, J.H. (2008) Multiplexed dendritic targeting of alpha calcium calmodulin-dependent protein kinase II, neurogranin, and activity-regulated cytoskeleton-associated protein RNAs by the A2 pathway. *Molecular biology of the cell* **19**: 2311-2327

Gennerich, A., Vale, R.D. (2009) Walking the walk: how kinesin and dynein coordinate their steps. *Current opinion in cell biology* **21**: 59-67

Gerst, J.E. (2008) Message on the web: mRNA and ER co-trafficking. *Trends in cell biology* 18: 68-76

Gillissen, B., Bergemann, J., Sandmann, C., Schroeer, B., Bölker, M., Kahmann, R. (1992) A twocomponent regulatory system for self/non-self recognition in *Ustilago maydis*. *Cell* **68**: 647-657

Gingras, A.C., Raught, B., Sonenberg, N. (1999) eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Annual review of biochemistry* **68**: 913-963
Gish, W., States, D.J. (1993) Identification of protein coding regions by database similarity search. *Nature genetics* **3**: 266-272

González-Reyes, A., Elliott, H., St Johnston, D. (1995) Polarization of both major body axes in *Drosophila* by *gurken-torpedo* signalling. *Nature* **375**: 654-658

Gonzalez, I., Buonomo, S.B., Nasmyth, K., von Ahsen, U. (1999) *ASH1* mRNA localization in yeast involves multiple secondary structural elements and Ash1 protein translation. *Current biology* **9**: 337-340

Gorgoni, B., Gray, N.K. (2004) The roles of cytoplasmic poly(A)-binding proteins in regulating gene expression: a developmental perspective. *Briefings in functional genomics & proteomics* **3**: 125-141

Gould, G.W., Lippincott-Schwartz, J. (2009) New roles for endosomes: from vesicular carriers to multipurpose platforms. *Nature reviews Molecular cell biology* **10**: 287-292

Graham, J.M. (2002) Separation of membrane vesicles and cytosol from cultured cells and bacteria in a preformed discontinuous gradient. *TheScientificWorldJournal* **2**: 1555-1559

Griese, J.J., Hopfner, K.P. (2011) Structure and DNA-binding activity of the *Pyrococcus furiosus* SMC protein hinge domain. *Proteins* **79**: 558-568

Gu, M., Lima, C.D. (2005) Processing the message: structural insights into capping and decapping mRNA. *Current opinion in structural biology* **15**: 99-106

Gu, W., Deng, Y., Zenklusen, D., Singer, R.H. (2004) A new yeast PUF family protein, Puf6p, represses *ASH1* mRNA translation and is required for its localization. *Genes & development* **18**: 1452-1465

Hachet, O., Ephrussi, A. (2001) *Drosophila* Y14 shuttles to the posterior of the oocyte and is required for oskar mRNA transport. *Current biology* **11**: 1666-1674

Hachet, O., Ephrussi, A. (2004) Splicing of *oskar* RNA in the nucleus is coupled to its cytoplasmic localization. *Nature* **428**: 959-963

Hall, D.H., Hedgecock, E.M. (1991) Kinesin-related gene unc-104 is required for axonal transport of synaptic vesicles in *C. elegans. Cell* **65**: 837-847

Hartman, M.A., Spudich, J.A. (2012) The myosin superfamily at a glance. *Journal of cell science* **125**: 1627-1632

Hayakawa, A., Hayes, S.J., Lawe, D.C., Sudharshan, E., Tuft, R., Fogarty, K., Lambright, D., Corvera, S. (2004) Structural basis for endosomal targeting by FYVE domains. *The Journal of biological chemistry* **279**: 5958-5966

Hemetsberger, C., Herrberger, C., Zechmann, B., Hillmer, M., Doehlemann, G. (2012) The Ustilago maydis effector Pep1 suppresses plant immunity by inhibition of host peroxidase activity. *PLoS pathogens* **8**: e1002684

Heym, R.G., Niessing, D. (2012) Principles of mRNA transport in yeast. *Cellular and molecular life sciences* **69**: 1843-1853

Hirokawa, N. (2006) mRNA transport in dendrites: RNA granules, motors, and tracks. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **26**: 7139-7142

Hirokawa, N., Niwa, S., Tanaka, Y. (2010) Molecular motors in neurons: transport mechanisms and roles in brain function, development, and disease. *Neuron* **68**: 610-638

Hochstrasser, M. (2009) Origin and function of ubiquitin-like proteins. Nature 458: 422-429

Hoffman, C.S., Winston, F. (1987) A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene* **57**: 267-272

Hogan, D.J., Riordan, D.P., Gerber, A.P., Herschlag, D., Brown, P.O. (2008) Diverse RNA-binding proteins interact with functionally related sets of RNAs, suggesting an extensive regulatory system. *PLoS biology* **6**: e255

Holliday, R. (1964) The Induction of Mitotic Recombination by Mitomycin C in *Ustilago* and *Saccharomyces*. *Genetics* **50**: 323-335

Holliday, R. (1974) Ustilago maydis, in Handbook of Genetics, Vol. 1: Plenum Press.

Holliday, R. (2004) Early studies on recombination and DNA repair in *Ustilago maydis*. *DNA repair* **3**: 671-682

Holloman, W.K. (2011) Unraveling the mechanism of BRCA2 in homologous recombination. *Nature structural & molecular biology* **18**: 748-754

Holt, C.E., Bullock, S.L. (2009) Subcellular mRNA localization in animal cells and why it matters. *Science* **326**: 1212-1216

Hoogenraad, C.C., Akhmanova, A., Howell, S.A., Dortland, B.R., De Zeeuw, C.I., Willemsen, R., Visser, P., Grosveld, F., Galjart, N. (2001) Mammalian Golgi-associated Bicaudal-D2 functions in the dynein-dynactin pathway by interacting with these complexes. *The EMBO journal* **20**: 4041-4054

Huang, K.L., Chadee, A.B., Chen, C.Y., Zhang, Y., Shyu, A.B. (2013) Phosphorylation at intrinsically disordered regions of PAM2 motif-containing proteins modulates their interactions with PABPC1 and influences mRNA fate. *RNA* **19**: 295-305

Huntzinger, E., Braun, J.E., Heimstädt, S., Zekri, L., Izaurralde, E. (2010) Two PABPC1-binding sites in GW182 proteins promote miRNA-mediated gene silencing. *The EMBO journal* **29**: 4146-4160

Huntzinger, E., Izaurralde, E. (2011) Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. *Nature reviews Genetics* **12**: 99-110

Huotari, J., Helenius, A. (2011) Endosome maturation. *The EMBO journal* **30**: 3481-3500

Hüttelmaier, S., Zenklusen, D., Lederer, M., Dictenberg, J., Lorenz, M., Meng, X., Bassell, G.J., Condeelis, J., Singer, R.H. (2005) Spatial regulation of beta-actin translation by Src-dependent phosphorylation of ZBP1. *Nature* **438**: 512-515

Huynh, J.R., Munro, T.P., Smith-Litière, K., Lepesant, J.A., St Johnston, D. (2004) The *Drosophila* hnRNPA/B homolog, Hrp48, is specifically required for a distinct step in *osk* mRNA localization. *Developmental cell* **6**: 625-635

Imbert, G., Saudou, F., Yvert, G., Devys, D., Trottier, Y., Garnier, J.M., Weber, C., Mandel, J.L., Cancel, G., Abbas, N., Dürr, A., Didierjean, O., Stevanin, G., Agid, Y., Brice, A. (1996) Cloning of the gene for spinocerebellar ataxia 2 reveals a locus with high sensitivity to expanded CAG/glutamine repeats. *Nature genetics* **14**: 285-291

Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninksy, J.J., White, T.J. (1990) *PCR Protocols: a guide to methods and amplifications*, San Diego, USA: Academic press.

Irie, K., Tadauchi, T., Takizawa, P.A., Vale, R.D., Matsumoto, K., Herskowitz, I. (2002) The Khd1 protein, which has three KH RNA-binding motifs, is required for proper localization of *ASH1* mRNA in yeast. *The EMBO journal* **21**: 1158-1167

Irion, U., St Johnston, D. (2007) *bicoid* RNA localization requires specific binding of an endosomal sorting complex. *Nature* **445**: 554-558

Jambhekar, A., Derisi, J.L. (2007) *Cis*-acting determinants of asymmetric, cytoplasmic RNA transport. *RNA* **13**: 625-642

James, P., Halladay, J., Craig, E.A. (1996) Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics* **144**: 1425-1436

Jinek, M., Fabian, M.R., Coyle, S.M., Sonenberg, N., Doudna, J.A. (2010) Structural insights into the human GW182-PABC interaction in microRNA-mediated deadenylation. *Nature structural & molecular biology* **17**: 238-240

Jønson, L., Vikesaa, J., Krogh, A., Nielsen, L.K., Hansen, T., Borup, R., Johnsen, A.H., Christiansen, J., Nielsen, F.C. (2007) Molecular composition of IMP1 ribonucleoprotein granules. *Molecular & cellular proteomics* **6**: 798-811

Kämper, J. (2004) A PCR-based system for highly efficient generation of gene replacement mutants in Ustilago maydis. *Molecular genetics and genomics* **271**: 103-110

Kämper, J., Kahmann, R., Bölker, M., Ma, L.J., Brefort, T., Saville, B.J., Banuett, F., Kronstad, J.W., Gold, S.E., Müller, O., Perlin, M.H., Wösten, H.A., de Vries, R., Ruiz-Herrera, J., Reynaga-Pena, C.G., Snetselaar, K., McCann, M., Pérez-Martín, J., Feldbrügge, M., Basse, C.W., Steinberg, G., Ibeas, J.I., Holloman, W., Guzman, P., Farman, M., Stajich, J.E., Sentandreu, R., Gonzalez-Prieto, J.M., Kennell, J.C., Molina, L., Schirawski, J., Mendoza-Mendoza, A., Greilinger, D., Münch, K., Rössel, N., Scherer, M., Vranes, M., Ladendorf, O., Vincon, V., Fuchs, U., Sandrock, B., Meng, S., Ho, E.C., Cahill, M.J., Boyce, K.J., Klose, J., Klosterman, S.J., Deelstra, H.J., Ortiz-Castellanos, L., Li, W., Sanchez-Alonso, P., Schreier, P.H., Häuser-Hahn, I., Vaupel, M., Koopmann, E., Friedrich, G., Voss, H., Schlüter, T., Margolis, J., Platt, D., Swimmer, C., Gnirke, A., Chen, F., Vysotskaia, V., Mannhaupt, G., Güldener, U., Münsterkötter, M., Haase, D., Oesterheld, M., Mewes, H.W., Mauceli, E.W., DeCaprio, D., Wade, C.M., Butler, J., Young, S., Jaffe, D.B., Calvo, S., Nusbaum, C., Galagan, J., Birren, B.W. (2006) Insights from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen *Ustilago maydis*. *Nature* 444: 97-101

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

Kanai, Y., Dohmae, N., Hirokawa, N. (2004) Kinesin transports RNA: isolation and characterization of an RNA-transporting granule. *Neuron* **43**: 513-525

Keene, J.D. (2007) RNA regulons: coordination of post-transcriptional events. *Nature reviews Genetics* 8: 533-543

Keene, J.D., Tenenbaum, S.A. (2002) Eukaryotic mRNPs may represent posttranscriptional operons. *Molecular cell* **9**: 1161-1167

Kellner, R., Vollmeister, E., Feldbrügge, M., Begerow, D. (2011) Interspecific sex in grass smuts and the genetic diversity of their pheromone-receptor system. *PLoS genetics* **7**: e1002436

Kessler, S.H., Sachs, A.B. (1998) RNA recognition motif 2 of yeast Pab1p is required for its functional interaction with eukaryotic translation initiation factor 4G. *Molecular and cellular biology* **18**: 51-57

Khaleghpour, K., Kahvejian, A., De Crescenzo, G., Roy, G., Svitkin, Y.V., Imataka, H., O'Connor-McCourt, M., Sonenberg, N. (2001a) Dual interactions of the translational repressor Paip2 with poly(A) binding protein. *Molecular and cellular biology* **21**: 5200-5213

Khaleghpour, K., Svitkin, Y.V., Craig, A.W., DeMaria, C.T., Deo, R.C., Burley, S.K., Sonenberg, N. (2001b) Translational repression by a novel partner of human poly(A) binding protein, Paip2. *Molecular cell* **7**: 205-216

King, M.L., Messitt, T.J., Mowry, K.L. (2005) Putting RNAs in the right place at the right time: RNA localization in the frog oocyte. *Biology of the cell* **97**: 19-33

Kislauskis, E.H., Li, Z., Singer, R.H., Taneja, K.L. (1993) Isoform-specific 3'-untranslated sequences sort alpha-cardiac and beta-cytoplasmic actin messenger RNAs to different cytoplasmic compartments. *The Journal of cell biology* **123**: 165-172

Kislauskis, E.H., Zhu, X., Singer, R.H. (1994) Sequences responsible for intracellular localization of beta-actin messenger RNA also affect cell phenotype. *The Journal of cell biology* **127**: 441-451

Klement, T., Milker, S., Jager, G., Grande, P.M., Dominguez de Maria, P., Buchs, J. (2012) Biomass pretreatment affects *Ustilago maydis* in producing itaconic acid. *Microbial cell factories* **11**: 43

Klopfenstein, D.R., Tomishige, M., Stuurman, N., Vale, R.D. (2002) Role of phosphatidylinositol(4,5)bisphosphate organization in membrane transport by the Unc104 kinesin motor. *Cell* **109**: 347-358

Klopfenstein, D.R., Vale, R.D. (2004) The lipid binding pleckstrin homology domain in UNC-104 kinesin is necessary for synaptic vesicle transport in *Caenorhabditis elegans*. *Molecular biology of the cell* **15**: 3729-3739

Koepke, J., Kaffarnik, F., Haag, C., Zarnack, K., Luscombe, N.M., König, J., Ule, J., Kellner, R., Begerow, D., Feldbrügge, M. (2011) The RNA-binding protein Rrm4 is essential for efficient secretion of endochitinase Cts1. *Molecular & cellular proteomics* **10**: M111 011213

Kohl, A., Binz, H.K., Forrer, P., Stumpp, M.T., Plückthun, A., Grütter, M.G. (2003) Designed to be stable: crystal structure of a consensus ankyrin repeat protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**: 1700-1705

Kojic, M., Holloman, W.K. (2012) Brh2 domain function distinguished by differential cellular responses to DNA damage and replication stress. *Molecular microbiology* **83**: 351-361

Kojic, M., Zhou, Q., Fan, J., Holloman, W.K. (2011) Mutational analysis of Brh2 reveals requirements for compensating mediator functions. *Molecular microbiology* **79**: 180-191

König, J., Baumann, S., Koepke, J., Pohlmann, T., Zarnack, K., Feldbrügge, M. (2009) The fungal RNA-binding protein Rrm4 mediates long-distance transport of *ubi1* and *rho3* mRNAs. *The EMBO journal* **28**: 1855-1866

König, J., Julius, C., Baumann, S., Homann, M., Goringer, H.U., Feldbrügge, M. (2007) Combining SELEX and the yeast three-hybrid system for *in vivo* selection and classification of RNA aptamers. *RNA* **13**: 614-622

Kozlov, G., De Crescenzo, G., Lim, N.S., Siddiqui, N., Fantus, D., Kahvejian, A., Trempe, J.F., Elias, D., Ekiel, I., Sonenberg, N., O'Connor-McCourt, M., Gehring, K. (2004) Structural basis of ligand recognition by PABC, a highly specific peptide-binding domain found in poly(A)-binding protein and a HECT ubiquitin ligase. *The EMBO journal* **23**: 272-281

Kozlov, G., Gehring, K. (2010) Molecular basis of eRF3 recognition by the MLLE domain of poly(A)binding protein. *PloS one* **5**: e10169

Kozlov, G., Ménade, M., Rosenauer, A., Nguyen, L., Gehring, K. (2010a) Molecular determinants of PAM2 recognition by the MLLE domain of poly(A)-binding protein. *Journal of molecular biology* **397**: 397-407

Kozlov, G., Safaee, N., Rosenauer, A., Gehring, K. (2010b) Structural basis of binding of P-bodyassociated proteins GW182 and ataxin-2 by the Mlle domain of poly(A)-binding protein. *The Journal of biological chemistry* **285**: 13599-13606

Kozlov, G., Siddiqui, N., Coillet-Matillon, S., Trempe, J.F., Ekiel, I., Sprules, T., Gehring, K. (2002) Solution structure of the orphan PABC domain from *Saccharomyces cerevisiae* poly(A)-binding protein. *The Journal of biological chemistry* **277**: 22822-22828

Kozlov, G., Trempe, J.F., Khaleghpour, K., Kahvejian, A., Ekiel, I., Gehring, K. (2001) Structure and function of the C-terminal PABC domain of human poly(A)-binding protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**: 4409-4413

Kress, T.L., Yoon, Y.J., Mowry, K.L. (2004) Nuclear RNP complex assembly initiates cytoplasmic RNA localization. *The Journal of cell biology* **165**: 203-211

Kronstad, J.W., Leong, S.A. (1990) The b mating-type locus of *Ustilago maydis* contains variable and constant regions. *Genes & development* **4**: 1384-1395

Kruzel, E.K., Hull, C.M. (2010) Establishing an unusual cell type: how to make a dikaryon. *Current opinion in microbiology* **13**: 706-711

Kumar, J., Choudhary, B.C., Metpally, R., Zheng, Q., Nonet, M.L., Ramanathan, S., Klopfenstein, D.R., Koushika, S.P. (2010) The *Caenorhabditis elegans* Kinesin-3 motor UNC-104/KIF1A is degraded upon loss of specific binding to cargo. *PLoS genetics* **6**: e1001200

Kutateladze, T.G. (2006) Phosphatidylinositol 3-phosphate recognition and membrane docking by the FYVE domain. *Biochimica et biophysica acta* **1761**: 868-877

Kwon, S., Abramson, T., Munro, T.P., John, C.M., Köhrmann, M., Schnapp, B.J. (2002) UUCAC- and vera-dependent localization of VegT RNA in *Xenopus* oocytes. *Current biology* **12**: 558-564

Kyhse-Andersen, J. (1984) Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *Journal of biochemical and biophysical methods* **10**: 203-209

Lackner, D.H., Beilharz, T.H., Marguerat, S., Mata, J., Watt, S., Schubert, F., Preiss, T., Bähler, J. (2007) A network of multiple regulatory layers shapes gene expression in fission yeast. *Molecular cell* **26**: 145-155

Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685

Lange, S., Katayama, Y., Schmid, M., Burkacky, O., Bräuchle, C., Lamb, D.C., Jansen, R.P. (2008) Simultaneous transport of different localized mRNA species revealed by live-cell imaging. *Traffic* **9**: 1256-1267

Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D., Gibson, T.J., Higgins, D.G. (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* **23**: 2947-2948

Latham, V.M., Yu, E.H., Tullio, A.N., Adelstein, R.S., Singer, R.H. (2001) A Rho-dependent signaling pathway operating through myosin localizes beta-actin mRNA in fibroblasts. *Current biology* **11**: 1010-1016

Laurie, J.D., Ali, S., Linning, R., Mannhaupt, G., Wong, P., Güldener, U., Münsterkotter, M., Moore, R., Kahmann, R., Bakkeren, G., Schirawski, J. (2012) Genome comparison of barley and maize smut fungi reveals targeted loss of RNA silencing components and species-specific presence of transposable elements. *The Plant Cell* **24**: 1733-1745

Lawrence, C.J., Dawe, R.K., Christie, K.R., Cleveland, D.W., Dawson, S.C., Endow, S.A., Goldstein, L.S., Goodson, H.V., Hirokawa, N., Howard, J., Malmberg, R.L., McIntosh, J.R., Miki, H., Mitchison, T.J., Okada, Y., Reddy, A.S., Saxton, W.M., Schliwa, M., Scholey, J.M., Vale, R.D., Walczak, C.E., Wordeman, L. (2004) A standardized kinesin nomenclature. *The Journal of cell biology* **167**: 19-22

Lécuyer, E., Yoshida, H., Parthasarathy, N., Alm, C., Babak, T., Cerovina, T., Hughes, T.R., Tomancak, P., Krause, H.M. (2007) Global analysis of mRNA localization reveals a prominent role in organizing cellular architecture and function. *Cell* **131**: 174-187

Lee, J.R., Shin, H., Choi, J., Ko, J., Kim, S., Lee, H.W., Kim, K., Rho, S.H., Lee, J.H., Song, H.E., Eom, S.H., Kim, E. (2004) An intramolecular interaction between the FHA domain and a coiled coil negatively regulates the kinesin motor KIF1A. *The EMBO journal* **23**: 1506-1515

Lehmler, C., Steinberg, G., Snetselaar, K.M., Schliwa, M., Kahmann, R., Bölker, M. (1997) Identification of a motor protein required for filamentous growth in *Ustilago maydis*. *The EMBO journal* **16**: 3464-3473

Lemay, J.F., Lemieux, C., St-André, O., Bachand, F. (2010) Crossing the borders: poly(A)-binding proteins working on both sides of the fence. *RNA biology* **7**: 291-295

Lenz, J.H., Schuchardt, I., Straube, A., Steinberg, G. (2006) A dynein loading zone for retrograde endosome motility at microtubule plus-ends. *The EMBO journal* **25**: 2275-2286

Letunic, I., Doerks, T., Bork, P. (2012) SMART 7: recent updates to the protein domain annotation resource. *Nucleic acids research* **40**: D302-305

Li, J., Mahajan, A., Tsai, M.D. (2006) Ankyrin repeat: a unique motif mediating protein-protein interactions. *Biochemistry* **45**: 15168-15178

Li, W., Bengtson, M.H., Ulbrich, A., Matsuda, A., Reddy, V.A., Orth, A., Chanda, S.K., Batalov, S., Joazeiro, C.A. (2008) Genome-wide and functional annotation of human E3 ubiquitin ligases identifies MULAN, a mitochondrial E3 that regulates the organelle's dynamics and signaling. *PloS one* **3**: e1487

Li, X., Kuromi, H., Briggs, L., Green, D.B., Rocha, J.J., Sweeney, S.T., Bullock, S.L. (2010) Bicaudal-D binds clathrin heavy chain to promote its transport and augments synaptic vesicle recycling. *The EMBO journal* **29**: 992-1006

Liao, W., Xiao, Q., Tchikov, V., Fujita, K., Yang, W., Wincovitch, S., Garfield, S., Conze, D., El-Deiry, W.S., Schutze, S., Srinivasula, S.M. (2008) CARP-2 is an endosome-associated ubiquitin ligase for RIP and regulates TNF-induced NF-kappaB activation. *Current biology* **18**: 641-649

Lin, J., Fabian, M., Sonenberg, N., Meller, A. (2012) Nanopore detachment kinetics of poly(A) binding proteins from RNA molecules reveals the critical role of C-terminus interactions. *Biophysical journal* **102**: 1427-1434

Liu-Yesucevitz, L., Bassell, G.J., Gitler, A.D., Hart, A.C., Klann, E., Richter, J.D., Warren, S.T., Wolozin, B. (2011) Local RNA translation at the synapse and in disease. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **31**: 16086-16093

Long, R.M., Gu, W., Lorimer, E., Singer, R.H., Chartrand, P. (2000) She2p is a novel RNA-binding protein that recruits the Myo4p-She3p complex to *ASH1* mRNA. *The EMBO journal* **19**: 6592-6601

Long, R.M., Singer, R.H., Meng, X., Gonzalez, I., Nasmyth, K., Jansen, R.P. (1997) Mating type switching in yeast controlled by asymmetric localization of ASH1 mRNA. *Science* **277**: 383-387

Lux, S.E., John, K.M., Bennett, V. (1990) Analysis of cDNA for human erythrocyte ankyrin indicates a repeated structure with homology to tissue-differentiation and cell-cycle control proteins. *Nature* **344**: 36-42

Lyons, D.A., Naylor, S.G., Scholze, A., Talbot, W.S. (2009) Kif1b is essential for mRNA localization in oligodendrocytes and development of myelinated axons. *Nature genetics* **41**: 854-858

MacDougall, N., Clark, A., MacDougall, E., Davis, I. (2003) *Drosophila* gurken (TGFalpha) mRNA localizes as particles that move within the oocyte in two dynein-dependent steps. *Developmental cell* **4**: 307-319

Mallardo, M., Deitinghoff, A., Muller, J., Goetze, B., Macchi, P., Peters, C., Kiebler, M.A. (2003) Isolation and characterization of Staufen-containing ribonucleoprotein particles from rat brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**: 2100-2105

Mangus, D.A., Amrani, N., Jacobson, A. (1998) Pbp1p, a factor interacting with *Saccharomyces cerevisiae* poly(A)-binding protein, regulates polyadenylation. *Molecular and cellular biology* **18**: 7383-7396

Mangus, D.A., Evans, M.C., Jacobson, A. (2003) Poly(A)-binding proteins: multifunctional scaffolds for the post-transcriptional control of gene expression. *Genome biology* **4**: 223

Marchler-Bauer, A., Anderson, J.B., Chitsaz, F., Derbyshire, M.K., DeWeese-Scott, C., Fong, J.H., Geer, L.Y., Geer, R.C., Gonzales, N.R., Gwadz, M., He, S., Hurwitz, D.I., Jackson, J.D., Ke, Z., Lanczycki, C.J., Liebert, C.A., Liu, C., Lu, F., Lu, S., Marchler, G.H., Mullokandov, M., Song, J.S., Tasneem, A., Thanki, N., Yamashita, R.A., Zhang, D., Zhang, N., Bryant, S.H. (2009) CDD: specific functional annotation with the Conserved Domain Database. *Nucleic acids research* **37**: D205-210

Marchler-Bauer, A., Bryant, S.H. (2004) CD-Search: protein domain annotations on the fly. *Nucleic acids research* **32**: W327-331

Marchler-Bauer, A., Lu, S., Anderson, J.B., Chitsaz, F., Derbyshire, M.K., DeWeese-Scott, C., Fong, J.H., Geer, L.Y., Geer, R.C., Gonzales, N.R., Gwadz, M., Hurwitz, D.I., Jackson, J.D., Ke, Z., Lanczycki, C.J., Lu, F., Marchler, G.H., Mullokandov, M., Omelchenko, M.V., Robertson, C.L., Song, J.S., Thanki, N., Yamashita, R.A., Zhang, D., Zhang, N., Zheng, C., Bryant, S.H. (2011) CDD: a Conserved Domain Database for the functional annotation of proteins. *Nucleic acids research* **39**: D225-229

Martin, K.C., Ephrussi, A. (2009) mRNA localization: gene expression in the spatial dimension. *Cell* **136**: 719-730

Martineau, Y., Derry, M.C., Wang, X., Yanagiya, A., Berlanga, J.J., Shyu, A.B., Imataka, H., Gehring, K., Sonenberg, N. (2008) Poly(A)-binding protein-interacting protein 1 binds to eukaryotic translation initiation factor 3 to stimulate translation. *Molecular and cellular biology* **28**: 6658-6667

McDonald, E.R., 3rd, El-Deiry, W.S. (2004) Suppression of caspase-8- and -10-associated RING proteins results in sensitization to death ligands and inhibition of tumor cell growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 6170-6175

Meignin, C., Davis, I. (2010) Transmitting the message: intracellular mRNA localization. *Current opinion in cell biology* **22**: 112-119

Melo, E.O., Dhalia, R., Martins de Sa, C., Standart, N., de Melo Neto, O.P. (2003) Identification of a C-terminal poly(A)-binding protein (PABP)-PABP interaction domain: role in cooperative binding to poly (A) and efficient cap distal translational repression. *The Journal of biological chemistry* **278**: 46357-46368

Merret, R., Martino, L., Bousquet-Antonelli, C., Fneich, S., Descombin, J., Billey, E., Conte, M.R., Deragon, J.M. (2013) The association of a La module with the PABP-interacting motif PAM2 is a recurrent evolutionary process that led to the neofunctionalization of La-related proteins. *RNA* **19**: 36-50

Messitt, T.J., Gagnon, J.A., Kreiling, J.A., Pratt, C.A., Yoon, Y.J., Mowry, K.L. (2008) Multiple kinesin motors coordinate cytoplasmic RNA transport on a subpopulation of microtubules in *Xenopus* oocytes. *Developmental cell* **15**: 426-436

Metzger, M.B., Hristova, V.A., Weissman, A.M. (2012) HECT and RING finger families of E3 ubiquitin ligases at a glance. *Journal of cell science* **125**: 531-537

Mili, S., Macara, I.G. (2009) RNA localization and polarity: from A(PC) to Z(BP). *Trends in cell biology* **19**: 156-164

Millevoi, S., Vagner, S. (2010) Molecular mechanisms of eukaryotic pre-mRNA 3' end processing regulation. *Nucleic acids research* **38**: 2757-2774

Molle, D., Segura-Morales, C., Camus, G., Berlioz-Torrent, C., Kjems, J., Basyuk, E., Bertrand, E. (2009) Endosomal trafficking of HIV-1 gag and genomic RNAs regulates viral egress. *The Journal of biological chemistry* **284**: 19727-19743

Montpetit, B., Weis, K. (2012) Cell biology. An alternative route for nuclear mRNP export by membrane budding. *Science* **336**: 809-810

Moore, M.J. (2005) From birth to death: the complex lives of eukaryotic mRNAs. *Science* **309**: 1514-1518

Mosavi, L.K., Cammett, T.J., Desrosiers, D.C., Peng, Z.Y. (2004) The ankyrin repeat as molecular architecture for protein recognition. *Protein Science* **13**: 1435-1448

Mowry, K.L., Cote, C.A. (1999) RNA sorting in *Xenopus* oocytes and embryos. *FASEB journal* **13**: 435-445

Mowry, K.L., Melton, D.A. (1992) Vegetal messenger RNA localization directed by a 340-nt RNA sequence element in *Xenopus* oocytes. *Science* **255**: 991-994

Mulder, K.W., Inagaki, A., Cameroni, E., Mousson, F., Winkler, G.S., De Virgilio, C., Collart, M.A., Timmers, H.T. (2007) Modulation of Ubc4p/Ubc5p-mediated stress responses by the RING-finger-dependent ubiquitin-protein ligase Not4p in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **176**: 181-192

Müller, M., Heym, R.G., Mayer, A., Kramer, K., Schmid, M., Cramer, P., Urlaub, H., Jansen, R.P., Niessing, D. (2011) A cytoplasmic complex mediates specific mRNA recognition and localization in yeast. *PLoS biology* **9**: e1000611

Münsterkotter, M., Steinberg, G. (2007) The fungus *Ustilago maydis* and humans share disease-related proteins that are not found in *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC genomics* **8**: 473

Navarro, C., Puthalakath, H., Adams, J.M., Strasser, A., Lehmann, R. (2004) Egalitarian binds dynein light chain to establish oocyte polarity and maintain oocyte fate. *Nature cell biology* **6**: 427-435

Nikko, E., Pelham, H.R. (2009) Arrestin-mediated endocytosis of yeast plasma membrane transporters. *Traffic* **10**: 1856-1867

Okada, Y., Higuchi, H., Hirokawa, N. (2003) Processivity of the single-headed kinesin KIF1A through biased binding to tubulin. *Nature* **424**: 574-577

Okada, Y., Hirokawa, N. (1999) A processive single-headed motor: kinesin superfamily protein KIF1A. *Science* **283**: 1152-1157

Okada, Y., Yamazaki, H., Sekine-Aizawa, Y., Hirokawa, N. (1995) The neuron-specific kinesin superfamily protein KIF1A is a unique monomeric motor for anterograde axonal transport of synaptic vesicle precursors. *Cell* **81**: 769-780

Oleynikov, Y., Singer, R.H. (2003) Real-time visualization of ZBP1 association with beta-actin mRNA during transcription and localization. *Current biology* **13**: 199-207

Osawa, M., Hosoda, N., Nakanishi, T., Uchida, N., Kimura, T., Imai, S., Machiyama, A., Katada, T., Hoshino, S., Shimada, I. (2012) Biological role of the two overlapping poly(A)-binding protein interacting motifs 2 (PAM2) of eukaryotic releasing factor eRF3 in mRNA decay. *RNA* **18**: 1957-1967

Otsuka, A.J., Jeyaprakash, A., García-Anoveros, J., Tang, L.Z., Fisk, G., Hartshorne, T., Franco, R., Born, T. (1991) The *C. elegans unc-104* gene encodes a putative kinesin heavy chain-like protein. *Neuron* **6**: 113-122

Paquin, N., Ménade, M., Poirier, G., Donato, D., Drouet, E., Chartrand, P. (2007) Local activation of yeast *ASH1* mRNA translation through phosphorylation of Khd1p by the casein kinase Yck1p. *Molecular cell* **26**: 795-809

Ross, A.F., Oleynikov, Y., Kislauskis, E.H., Taneja, K.L., Singer, R.H. (1997) Characterization of a beta-actin mRNA zipcode-binding protein. *Molecular and cellular biology* **17**: 2158-2165

Roy, G., De Crescenzo, G., Khaleghpour, K., Kahvejian, A., O'Connor-McCourt, M., Sonenberg, N. (2002) Paip1 interacts with poly(A) binding protein through two independent binding motifs. *Molecular and cellular biology* **22**: 3769-3782

Sachs, A.B., Davis, R.W., Kornberg, R.D. (1987) A single domain of yeast poly(A)-binding protein is necessary and sufficient for RNA binding and cell viability. *Molecular and cellular biology* **7**: 3268-3276

Sambrook, J., Frisch, E.F., und Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratroy Manual.*, Cold Spring Harbour, New York, USA.: *Cold Spring Harbour Laboratory Press*.

Sarkar, N. (1997) Polyadenylation of mRNA in prokaryotes. Annual review of biochemistry 66: 173-197

Satterfield, T.F., Pallanck, L.J. (2006) Ataxin-2 and its *Drosophila* homolog, ATX2, physically assemble with polyribosomes. *Human molecular genetics* **15**: 2523-2532

Schink, K.O., Bölker, M. (2009) Coordination of cytokinesis and cell separation by endosomal targeting of a Cdc42-specific guanine nucleotide exchange factor in *Ustilago maydis*. *Molecular biology of the cell* **20**: 1081-1088

Schirawski, J., Mannhaupt, G., Münch, K., Brefort, T., Schipper, K., Doehlemann, G., Di Stasio, M., Rössel, N., Mendoza-Mendoza, A., Pester, D., Müller, O., Winterberg, B., Meyer, E., Ghareeb, H., Wollenberg, T., Münsterkötter, M., Wong, P., Walter, M., Stukenbrock, E., Güldener, U., Kahmann, R. (2010) Pathogenicity determinants in smut fungi revealed by genome comparison. *Science* **330**: 1546-1548

Schmid, M., Jaedicke, A., Du, T.G., Jansen, R.P. (2006) Coordination of endoplasmic reticulum and mRNA localization to the yeast bud. *Current biology* **16**: 1538-1543

Schuchardt, I., Assmann, D., Thines, E., Schuberth, C., Steinberg, G. (2005) Myosin-V, Kinesin-1, and Kinesin-3 cooperate in hyphal growth of the fungus *Ustilago maydis*. *Molecular biology of the cell* **16**: 5191-5201

Schultz, J., Milpetz, F., Bork, P., Ponting, C.P. (1998) SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**: 5857-5864

Schulz, B., Banuett, F., Dahl, M., Schlesinger, R., Schafer, W., Martin, T., Herskowitz, I., Kahmann, R. (1990) The b alleles of *U. maydis*, whose combinations program pathogenic development, code for polypeptides containing a homeodomain-related motif. *Cell* **60**: 295-306

Schuster, M., Kilaru, S., Ashwin, P., Lin, C., Severs, N.J., Steinberg, G. (2011a) Controlled and stochastic retention concentrates dynein at microtubule ends to keep endosomes on track. *The EMBO journal* **30**: 652-664

Schuster, M., Kilaru, S., Fink, G., Collemare, J., Roger, Y., Steinberg, G. (2011b) Kinesin-3 and dynein cooperate in long-range retrograde endosome motility along a nonuniform microtubule array. *Molecular biology of the cell* **22**: 3645-3657

Schuster, M., Lipowsky, R., Assmann, M.A., Lenz, P., Steinberg, G. (2011c) Transient binding of dynein controls bidirectional long-range motility of early endosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**: 3618-3623

Sedgwick, S.G., Smerdon, S.J. (1999) The ankyrin repeat: a diversity of interactions on a common structural framework. *Trends in biochemical sciences* **24**: 311-316

Shaner, N.C., Campbell, R.E., Steinbach, P.A., Giepmans, B.N., Palmer, A.E., Tsien, R.Y. (2004) Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nature biotechnology* **22**: 1567-1572 Shen, Z., St-Denis, A., Chartrand, P. (2010) Cotranscriptional recruitment of She2p by RNA pol II elongation factor Spt4-Spt5/DSIF promotes mRNA localization to the yeast bud. *Genes & development* **24**: 1914-1926

Shin, M.E., Ogburn, K.D., Varban, O.A., Gilbert, P.M., Burd, C.G. (2001) FYVE domain targets Pib1p ubiquitin ligase to endosome and vacuolar membranes. *The Journal of biological chemistry* **276**: 41388-41393

Siddiqui, N., Kozlov, G., D'Orso, I., Trempe, J.F., Gehring, K. (2003) Solution structure of the C-terminal domain from poly(A)-binding protein in *Trypanosoma cruzi*: a vegetal PABC domain. *Protein science* **12**: 1925-1933

Sil, A., Herskowitz, I. (1996) Identification of asymmetrically localized determinant, Ash1p, required for lineage-specific transcription of the yeast *HO* gene. *Cell* **84**: 711-722

Simon-Sanchez, J., Hanson, M., Singleton, A., Hernandez, D., McInerney, A., Nussbaum, R., Werner, J., Gallardo, M., Weiser, R., Gwinn-Hardy, K., Singleton, A.B., Clarimon, J. (2005) Analysis of *SCA-2* and *SCA-3* repeats in Parkinsonism: evidence of *SCA-2* expansion in a family with autosomal dominant Parkinson's disease. *Neuroscience letters* **382**: 191-194

Simonsen, A., Lippé, R., Christoforidis, S., Gaullier, J.M., Brech, A., Callaghan, J., Toh, B.H., Murphy, C., Zerial, M., Stenmark, H. (1998) EEA1 links PI(3)K function to Rab5 regulation of endosome fusion. *Nature* **394**: 494-498

Skibbe, D.S., Doehlemann, G., Fernandes, J., Walbot, V. (2010) Maize tumors caused by *Ustilago maydis* require organ-specific genes in host and pathogen. *Science* **328**: 89-92

Smith, R. (2004) Moving molecules: mRNA trafficking in Mammalian oligodendrocytes and neurons. *The Neuroscientist* **10**: 495-500

Southern, E.M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of molecular biology* **98**: 503-517

Speese, S.D., Ashley, J., Jokhi, V., Nunnari, J., Barria, R., Li, Y., Ataman, B., Koon, A., Chang, Y.T., Li, Q., Moore, M.J., Budnik, V. (2012) Nuclear envelope budding enables large ribonucleoprotein particle export during synaptic Wnt signaling. *Cell* **149**: 832-846

Spellig, T., Bölker, M., Lottspeich, F., Frank, R.W., Kahmann, R. (1994) Pheromones trigger filamentous growth in *Ustilago maydis*. *The EMBO journal* **13**: 1620-1627

Spellig, T., Bottin, A., Kahmann, R. (1996) Green fluorescent protein (GFP) as a new vital marker in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Molecular & general genetics* **252**: 503-509

St Johnston, D. (2005) Moving messages: the intracellular localization of mRNAs. *Nature reviews Molecular cell biology* **6**: 363-375

St Johnston, D., Beuchle, D., Nüsslein-Volhard, C. (1991) Staufen, a gene required to localize maternal RNAs in the *Drosophila* egg. *Cell* **66**: 51-63

St Johnston, D., Nüsslein-Volhard, C. (1992) The origin of pattern and polarity in the *Drosophila* embryo. *Cell* **68**: 201-219

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

Steinberg, G., Schliwa, M., Lehmler, C., Bölker, M., Kahmann, R., McIntosh, J.R. (1998) Kinesin from the plant pathogenic fungus *Ustilago maydis* is involved in vacuole formation and cytoplasmic migration. *Journal of cell science* **111** (Pt 15): 2235-2246

Steinberg, G., Wedlich-Söldner, R., Brill, M., Schulz, I. (2001) Microtubules in the fungal pathogen *Ustilago maydis* are highly dynamic and determine cell polarity. *Journal of cell science* **114**: 609-622

Stenmark, H., Aasland, R., Driscoll, P.C. (2002) The phosphatidylinositol 3-phosphate-binding FYVE finger. *FEBS letters* **513**: 77-84

Stenmark, H., Aasland, R., Toh, B.H., D'Arrigo, A. (1996) Endosomal localization of the autoantigen EEA1 is mediated by a zinc-binding FYVE finger. *The Journal of biological chemistry* **271**: 24048-24054

Stock, J., Sarkari, P., Kreibich, S., Brefort, T., Feldbrügge, M., Schipper, K. (2012) Applying unconventional secretion of the endochitinase Cts1 to export heterologous proteins in *Ustilago maydis*. *Journal of biotechnology* **161**: 80-91

Straube, A., Brill, M., Oakley, B.R., Horio, T., Steinberg, G. (2003) Microtubule organization requires cell cycle-dependent nucleation at dispersed cytoplasmic sites: polar and perinuclear microtubule organizing centers in the plant pathogen *Ustilago maydis*. *Molecular biology of the cell* **14**: 642-657

Straube, A., Enard, W., Berner, A., Wedlich-Soldner, R., Kahmann, R., Steinberg, G. (2001) A split motor domain in a cytoplasmic dynein. *The EMBO journal* **20**: 5091-5100

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

Tahirovic, S., Bradke, F. (2009) Neuronal polarity. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **1**: a001644

Tomishige, M., Klopfenstein, D.R., Vale, R.D. (2002) Conversion of Unc104/KIF1A kinesin into a processive motor after dimerization. *Science* **297**: 2263-2267

Tsukuda, T., Carleton, S., Fotheringham, S., Holloman, W.K. (1988) Isolation and characterization of an autonomously replicating sequence from *Ustilago maydis*. *Molecular and cellular biology* **8**: 3703-3709

Vallee, R.B., Williams, J.C., Varma, D., Barnhart, L.E. (2004) Dynein: An ancient motor protein involved in multiple modes of transport. *Journal of neurobiology* **58**: 189-200

Vannini, A., Cramer, P. (2012) Conservation between the RNA polymerase I, II, and III transcription initiation machineries. *Molecular cell* **45**: 439-446

Verhey, K.J., Hammond, J.W. (2009) Traffic control: regulation of kinesin motors. *Nature reviews Molecular cell biology* **10**: 765-777

Villacé, P., Marión, R.M., Ortín, J. (2004) The composition of Staufen-containing RNA granules from human cells indicates their role in the regulated transport and translation of messenger RNAs. *Nucleic acids research* **32**: 2411-2420

Vollmeister, E., Schipper, K., Baumann, S., Haag, C., Pohlmann, T., Stock, J., Feldbrügge, M. (2012a) Fungal development of the plant pathogen *Ustilago maydis*. *FEMS microbiology reviews* **36**: 59-77

Vollmeister, E., Schipper, K., Feldbrügge, M. (2012b) Microtubule-dependent mRNA transport in the model microorganism *Ustilago maydis*. *RNA biology* **9**: 261-268

Wahle, E., Keller, W. (1992) The biochemistry of 3'-end cleavage and polyadenylation of messenger RNA precursors. *Annual review of biochemistry* **61**: 419-440

Wedlich-Söldner, R., Bölker, M., Kahmann, R., Steinberg, G. (2000) A putative endosomal t-SNARE links exo- and endocytosis in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *The EMBO journal* **19**: 1974-1986

Wedlich-Söldner, R., Straube, A., Friedrich, M.W., Steinberg, G. (2002) A balance of KIF1A-like kinesin and dynein organizes early endosomes in the fungus *Ustilago maydis*. *The EMBO journal* **21**: 2946-2957

Weil, T.T., Forrest, K.M., Gavis, E.R. (2006) Localization of *bicoid* mRNA in late oocytes is maintained by continual active transport. *Developmental cell* **11**: 251-262

Weil, T.T., Parton, R., Davis, I., Gavis, E.R. (2008) Changes in *bicoid* mRNA anchoring highlight conserved mechanisms during the oocyte-to-embryo transition. *Current biology* **18**: 1055-1061

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

Wells, S.E., Hillner, P.E., Vale, R.D., Sachs, A.B. (1998) Circularization of mRNA by eukaryotic translation initiation factors. *Molecular cell* **2**: 135-140

Wilkie, G.S., Davis, I. (2001) *Drosophila* wingless and pair-rule transcripts localize apically by dyneinmediated transport of RNA particles. *Cell* **105**: 209-219

Wilson, I.A., Niman, H.L., Houghten, R.A., Cherenson, A.R., Connolly, M.L., Lerner, R.A. (1984) The structure of an antigenic determinant in a protein. *Cell* **37**: 767-778

Xu, J., Saunders, C.W., Hu, P., Grant, R.A., Boekhout, T., Kuramae, E.E., Kronstad, J.W., Deangelis, Y.M., Reeder, N.L., Johnstone, K.R., Leland, M., Fieno, A.M., Begley, W.M., Sun, Y., Lacey, M.P., Chaudhary, T., Keough, T., Chu, L., Sears, R., Yuan, B., Dawson, T.L., Jr. (2007) Dandruff-associated *Malassezia* genomes reveal convergent and divergent virulence traits shared with plant and human fungal pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**: 18730-18735

Yang, R., Gaidamakov, S.A., Xie, J., Lee, J., Martino, L., Kozlov, G., Crawford, A.K., Russo, A.N., Conte, M.R., Gehring, K., Maraia, R.J. (2011) La-related protein 4 binds poly(A), interacts with the poly(A)-binding protein MLLE domain via a variant PAM2w motif, and can promote mRNA stability. *Molecular and cellular biology* **31**: 542-556

Yang, W., Rozan, L.M., McDonald, E.R., 3rd, Navaraj, A., Liu, J.J., Matthew, E.M., Wang, W., Dicker, D.T., El-Deiry, W.S. (2007) CARPs are ubiquitin ligases that promote MDM2-independent p53 and phospho-p53^{ser20} degradation. *The Journal of biological chemistry* **282**: 3273-3281

Yoon, Y.J., Mowry, K.L. (2004) *Xenopus* Staufen is a component of a ribonucleoprotein complex containing Vg1 RNA and kinesin. *Development* **131**: 3035-3045

Zarnack, K., Feldbrügge, M. (2010) Microtubule-dependent mRNA transport in fungi. *Eukaryotic cell* **9**: 982-990

Zekri, L., Huntzinger, E., Heimstädt, S., Izaurralde, E. (2009) The silencing domain of GW182 interacts with PABPC1 to promote translational repression and degradation of microRNA targets and is required for target release. *Molecular and cellular biology* **29**: 6220-6231

Zekri, L., Kuzuoglu-Öztürk, D., Izaurralde, E. (2013) GW182 proteins cause PABP dissociation from silenced miRNA targets in the absence of deadenylation. *The EMBO journal* **32**: 1052-1065

Zhang, H.L., Eom, T., Oleynikov, Y., Shenoy, S.M., Liebelt, D.A., Dictenberg, J.B., Singer, R.H., Bassell, G.J. (2001) Neurotrophin-induced transport of a beta-actin mRNP complex increases beta-actin levels and stimulates growth cone motility. *Neuron* **31**: 261-275

Zhu, Z., Labbe, S., Pena, M.M., Thiele, D.J. (1998) Copper differentially regulates the activity and degradation of yeast Mac1 transcription factor. *The Journal of biological chemistry* **273**: 1277-1280 Zimyanin, V.L., Belaya, K., Pecreaux, J., Gilchrist, M.J., Clark, A., Davis, I., St Johnston, D. (2008) In vivo imaging of *oskar* mRNA transport reveals the mechanism of posterior localization. *Cell* **134**: 843-853

6. Ergänzende Daten

Auf dem beiliegenden Datenträger befinden sich ergänzende Filme, die zum Teil für die Erstellung der Kymographen und sonstiger Abbildungen verwendet worden sind. Die Filme sind den Abbildungen entsprechend bezeichnet. Zudem befindet sich auf dem Datenträger eine elektronische Version dieser Arbeit.

Danksagung

An erster Stelle bedanke ich mich bei Michael Feldbrügge für die exzellente Betreuung, das herausfordernde, spannende Projekt, viel wissenschaftliche Freiheit und die gemeinsamen abenteuerlichen Reisen nach Mexiko.

Herrn Prof. Dr. Rolf Wagner danke ich sehr für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Ich möchte mich zudem bei den vielen netten Menschen bedanken, die mich während der Doktorarbeit begleitet haben. Carl danke ich für die unvergessliche, gemeinsame Zeit im Labor und im Büro, die ich garantiert vermissen werde. Ohne Dich wären die vergangenen Jahre auf keinen Fall so schön gewesen und ich hätte sicher viel weniger zu lachen gehabt. Sebastian danke ich für die gemeinschaftliche Arbeit an den Motoren und an Upa2, sowie die Hilfe mit den Mikroskopen. Ute danke ich für die wertvolle Unterstützung in der Endphase meiner Promotion. Simone danke ich für die vielen Leckereien und ihre unverwüstlich gute Laune. Kerstin, Kathi und Lilli danke ich für das Korrekturlesen dieser Arbeit. "Meinen" beiden fleißigen Studenten Marvin und Christiane danke ich dafür, dass sie mir im Rahmen ihrer Bacherlorarbeit bei meinen Projekten geholfen haben. Für die tolle Atmosphäre und die alltägliche Hilfe danke ich auch allen übrigen aktiven oder ehemaligen Mitgliedern des STaR/RAB-Labs/Instituts für Mikrobiologie, allen voran natürlich Janine, Evelyn und Julian. Der AG Ernst von nebenan danke ich für die unterhaltsame Nachbarschaft und die witzigen Karnevalspartys.

Bei den besten Eltern der Welt, Renate und Johannes, sowie meiner herzallerliebsten Schwester Sonja, bedanke ich mich für ihre grenzenlose Unterstützung. Es ist schön, so eine tolle Familie zu haben.

Mein größter Dank gilt meiner wundervollen Freundin Maren, die mich die gesamte Zeit über motiviert hat, die mich nach schlechten Tagen aufgebaut hat und mir letztendlich die Kraft für diese Arbeit gegeben hat. Ich freue mich auf unsere nächsten gemeinsamen Wege. Die Zukunft gehört uns.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Thomas Pohlmann Geburtstag: 26.05.1982 Geburtsort: Osnabrück

Schulische und universitäre Ausbildung

08/93 – 06/02	Kardinal-von-Galen Gymnasium, Mettingen Abitur
10/03 – 08/08	Philipps-Universität Marburg
	<u>Fach:</u> Biologie; <u>Hauptfächer:</u> Genetik, Mikrobiologie, Biochemie <u>Abschluss:</u> Diplom
	Titel der Diplomarbeit: "Das CUE-Domänen Protein Cud1 beeinflusst Wachstum und Pathogenität von <i>Ustilago maydis</i> ."
	Angefertigt in der Abteilung Organismische Interaktionen am Max- Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie Marburg
10/08 - heute	Promotionsstudium (Biologie):
	Zu dem Thema: "Die Rolle von PAM2-Proteinen während des endosomalen mRNA-Transports in <i>Ustilago maydis</i> ."
10/08 – 10/09	An der Philipps-Universität Marburg, angefertigt in der Abteilung
	Organismische Interaktionen am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie Marburg
11/09 – heute	Umzug und Fortsetzung der Promotion am Institut für Mikrobiologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Stipendien und Mitarbeit in Forschergruppen

- 10/08 10/09 Stipendiat der International Max Planck Research School for Environmental, Cellular and Molecular Microbiology, Marburg
- 03/10 heute Doktorand in der DFG Forschergruppe 1334 "Determinants of Polarized Growth and Development in Filamentous Fungi"

Düsseldorf, Juli 2013